Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo
Copyright ® 2010 por la Sociedad Argentina de Endocrinología y Metabolismo
Vol 47 ● Nº 4

TRABAJO ORIGINAL

Acromegalia: comparación de los niveles séricos de IGF-I por dos inmunoensayos y su correlación con la prueba de tolerancia oral a la glucosa

Acromegaly: Comparison of serum IGF-1 levels measured by two immunoassays and their correlation with the Oral Glucose Tolerance Test

Boero L.[1], Mallea Gil M S.[2], Manavela M.[1], Stalldecker G.[3], Danilowicz K.[1], Guitelman M.[4], Alfieri A.[5], Ballarino M.C.[2], Chervin A.[6], García Basavilbaso N.[4], Glerean M.[6], Loto M.G.[7], Nahmías J.A.[8], Rogozinski A.S.[9], Servidio M.[10], Vitale N.M.[6], Katz D.[11], Fainstein Day P.[6]

Departamento de Neuroendocrinología de la Sociedad Argentina de Endocrinología y Metabolismo. Hospitales participantes: [1]Htal. de Clínicas, [2]Htal. Militar Central, [3]Htal. Pirovano, [4]Htal. Durand, [5]Htal. Posadas, [6]Htal. Santa Lucía, [6]Htal. Italiano, [7]Htal. Británico, [8]Htal. Rivadavia, [9]Htal. Ramos Mejía, [10]Htal. Álvarez, [11]Instituto FLENI

RESUMEN

Introducción: La determinación de IGF-I en suero o plasma es una herramienta esencial en el diagnóstico y seguimiento de la acromegalia. Sin embargo, se deben tener presentes algunos inconvenientes en su medición por diferentes inmunoensayos.
Objetivos: Evaluar dos inmunoensayos para la determinación de IGF-I y su correlación con el nadir de GH en el TTOG en pacientes acromegalicos.
Materiales y métodos: Se analizaron 37 pacientes acromegálicos, 20 mujeres y 17 hombres. IGF-I fue determinada por Immulite 1000, (IMM) y por IRMA (DSL). Se realizó el TTOG y se determinó glucosa y GH en todos los tiempos (basal, 30, 60, 90 y 120min). Se consideró respuesta normal un nadir de GH <1ng/ml. Nueve pacientes se encontraban bajo tratamiento y 28 sin tratamiento. Análisis estadístico: se utilizaron el test de Wilcoxon, de Bland y Altman y curvas ROC. Se consideró significativa una $p<0,05$.
Resultados: Las concentraciones basales de glucosa fueron 97,86±10,91 mg/dl, de GH 2,8 (1,59-14,4) ng/ml, de IGF-I por IMM 602±318 ng/ml y por DSL 1006±596 ng/ml. IGF-I por IMM y DSL mostró una diferencia significativa con $p <0,01$ y un bias de – 403,2 ng/ml con valores menores por IMM. IGF-I elevada por IMM y DSL, se encontró en el 84% y en el 97% respectivamente. IGF-I elevada con nadir de GH >1ng/ml se encontró en el 70%, con nadir de GH normal en el 13,5%. IGF-I normal con nadir >1ng/ml en el 2,7% y con nadir de GH normal en el 13,5%. El área bajo las curvas ROC no mostró diferencias significativas.
Conclusiones: Los niveles de IGF-I determinados por IMM y DSL fueron significativamente diferentes mostrando un bias negativo para IMM. La mayoría de los valores del nadir de GH fueron consistentes con los niveles de IGF-I observándose una discrepancia en el 30% de los pacientes, estuvieran o no bajo tratamiento.
Rev Argent Endocrinol Metab 47: 18-23, 2010

Los autores declaran no poseer conflictos de intereses

Palabras clave: acromegalia, inmunoensayos, TTOG

ABSTRACT

Introduction: IGF-I determination in serum or plasma is an essential tool in the diagnosis and follow-up of acromegaly. Hepatic production of IGF-I is regulated by GH and circulates bound to several IGF-I binding proteins which extends its half life. IGF-I is not released in a pulsatile pattern and has no significant variability in 24 h.
Objective: To evaluate two different methodologies in IGF-I levels determination and their correlation with GH nadir in OGTT in acromegalic patients.

Correspondencia: Laura Estela Boero.Tapiales 1756. Vicente López. Telefax: 4791-0061. laura.boero@hotmail.com

Material and methods: We analyzed 37 acromegalic patients, 20 women and 17 men, mean age was 45±12 years. IGF-I levels were assayed by Immulite 1000, DPC (IMM) and DSL-5600 ACTIVE® IGF-I Coated-Tube IRMA (DSL) and OGTTs (at baseline and at 30, 60, 90 and 120 minutes) were performed by measuring plasma glucose and GH assay by immunochemiluminometric assay (Access); we considered a nadir <1ng/ml as normal response. Nine patients were under medical treatment (cabergoline: 4, octeotride: 4, and cabergoline plus octeotrite: 1) and 28 without treatment. Statistical analysis: Wilcoxon and, Bland and Altman tests and ROC curves. Differences were considered significant at $p< 0.05$.
Results: Basal glucose levels were 97.86±10.91 mg/dl and mean GH was 2.8 (1.59-14.4) ng/ml. Mean IGF-I levels performed by IMM were 602±318 ng/ml and 1006±596 ng/ml by DSL. There was a statistically significant difference between both methodologies ($p<0.01$). Bland and Altman test showed a bias of – 403.2 ng/ml with lower values by IMM. We observed elevated IGF-I levels in 84% by IMM and in 97% by DSL, and only one patient had normal levels with both methodologies. Elevated IGF-I levels and GH nadir >1ng/ml were observed in 70% of the patients, increased IGF-I with normal GH nadir in 13.5%, normal IGF-I with GH nadir >1ng/ml in 2.7% and normal IGF-I with normal GH nadir in 13.5%. Patients under treatment: 3 showed normal GH nadir with elevated IGF-I levels, in 2 of them by both methodologies, and in the other one it was normal by IMM and elevated by DSL; the other 6 showed GH nadir > 1ng/ml, 5 of them presented elevated IGF-I by both methodologies and the other one showed discrepancy in IGF-I levels. The under ROC curve area and confidence interval (CI) of 95% for IGF-I IMM and DSL were 0.96 (0.90-1.00) and 0.91 (0.82-1.00) respectively. Differences between the ROC curves areas were not significant
Conclusions: IGF-I levels determined by IMM and DSL were statistically significantly different. IGF-I levels showed a negative bias by IMM. Most of the results of GH nadir were consistent with IGF-I levels but we observed discrepancy in 30% of the patients, regardless of whether they were under treatment or not. **Rev Argent Endocrinol Metab 47: 18-23, 2010**

No financial conflict interest exist.

Key words: acromegaly, immunoassay, OGTT

INTRODUCCIÓN

La determinación del factor de crecimiento insulinosímil tipo I (IGF-I) en suero o plasma es una herramienta de suma importancia en el diagnóstico y seguimiento de los estados de exceso de hormona de crecimiento (GH) en adultos, como es la acromegalia[1,2]. La producción hepática del IGF-I es regulada por GH, se encuentra en circulación unido a diferentes proteínas, lo que prolonga marcadamente su vida media, no es liberado de manera pulsátil, ni presenta variabilidad significativa en 24 horas[3]. Su concentración en una sola muestra de sangre representa la secreción integrada de GH, constituyéndose en un excelente marcador bioquímico de actividad de la enfermedad[4].

La disponibilidad de inmunoensayos sensibles y específicos ha fortalecido el uso de IGF-I en el diagnóstico y monitoreo de desórdenes del crecimiento. Sin embargo, se deben tener presentes algunos inconvenientes en la medición de este factor como la falta de estandarización, posibles interferencias de las proteínas de unión, inadecuadas preparaciones de referencia internacional e inadecuados valores de referencia[5,6].

Por otro lado, el uso de antagonistas del receptor de GH en el tratamiento de la acromegalia subraya la importancia de la determinación de IGF-I en el monitoreo de la enfermedad al no poder ser utilizada la GH para evaluar la eficacia del tratamiento[7].

El objetivo de este trabajo es evaluar el comportamiento de dos metodologías utilizadas en la determinación de IGF-I, en un grupo de pacientes acromegálicos y su correlación con el nadir de GH obtenido al realizar la prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG), considerada por algunos autores como el "gold standard" en el diagnóstico y seguimiento de la acromegalia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sujetos

Se analizaron muestras de suero de 37 pacientes acromegálicos, 35 macroadenomas y 2 microadenomas, 19 operados por vía transeptoesfenoidal (TSE), 3 por vía transcraneal y 2 intervenidos por ambas vías. Radioterapia fue indicada en 8 pacientes, 5 con gamaknife y 3 con radioterapia convencional. Bajo tratamiento médico se encontraban 9 pacientes, 4 con cabergolina (0.25 - 2 mg/semana), 4 con octeotride (20 - 30 mg/mes) y 1 paciente con cabergolina asociada a octeotride. El resto de los pacientes no se encontraba bajo tratamiento médico.

Todos los participantes del estudio dieron su consentimiento informado.

Protocolo de estudio y muestras

Se obtuvieron muestras de sangre de la vena antecubital entre las 8 y 9 horas de la mañana y después de 12 horas de ayuno.

Se realizó una extracción de sangre basal para la determinación de glucosa, GH e IGF-I y luego de administrar 75gr de glucosa se obtuvieron muestras a los 30, 60, 90 y 120 minutos para la determinación de glucosa y GH.

Las muestras se centrifugaron a 1.500×g durante 15 minutos a temperatura ambiente. La determinación de glucosa se realizó durante el transcurso de la mañana en que se obtuvo la muestra y el resto del suero se almacenó en alícuotas a -70°C para la determinación de los niveles séricos de GH e IGF-1.

Determinaciones analíticas

La determinación de glucosa se realizó por un método estandarizado (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) en un autoanalizador Hitachi 917. Los niveles plasmáticos de GH se determinaron con un inmunoensayo (IE) quimioluminiscente ultrasensible (Access, Beckman Coulter TM, USA), con una sensibilidad analítica de 0,003 ng/ml y un coeficiente de variación intra y entre ensayo de 12,3% y 15,5%, respectivamente. El dosaje de IGF-1 se realizó con un IE quimioluminiscente en fase sólida (Immulite 1000, Diagnostics Products Corp., Los Angeles, CA, USA (IMM)) y un IE inmunoradiométrico con extracción (DSL-5600 ACTIVE® Insulin-Like Growth Factor-I Coated-Tube IRMA Diagnostic Systems Laboratories, Inc. USA) con una sensibilidad analítica de 20 ng/ml y 0,80 ng/ml respectivamente. Los coeficientes de variación intra y entre ensayo fueron menor al 5% y al 10% respectivamente, tanto para IMM como para DSL. Los estándares utilizados en ambos IE fueron calibrados contra el WHO IRP 87/518.

Análisis estadístico

La distribución de los datos fue analizada utilizando la prueba de Shapiro-Wilk. Los resultados se expresan como media ± DE si la distribución es normal o mediana (rango intercuartil) si la distribución es no paramétrica. La comparación entre grupos se efectuó con la prueba de Wilcoxon para muestras apareadas. Se utilizó la prueba de Spearman y de Bland y Altman para el análisis de correlación y concordancia respectivamente. Se utilizaron curvas ROC, considerando la PTOG como gold standard y un nadir menor a 1 como respuesta normal. El valor de p aceptado como estadísticamente significativo fue $<0,05$. El programa utilizado para el análisis estadístico fue Infostat.

RESULTADOS

La edad promedio de los pacientes acromegálicos fue de 45±12 años, con una relación mujeres/hombres de 20/17 y una concentración basal de glucosa de 97,86±10,91 mg/dl y de GH de 2,8 (1,59-14,4) ng/ml. Los niveles séricos de IGF-I medidos por IMM fueron de 602±318 ng/ml y por DSL 1006±596 ng/ml observándose una diferencia estadísticamente significativa entre ambas metodologías ($p<0,01$).

El test de Spearman mostró una correlación positiva entre ambos IE con un $r=0,8282$ y una $p<0,0001$ (Figura1). En la figura 2 se puede observar el análisis de concordancia de Bland y Altman entre IMM y DSL con un BIAS de -403,2 ng/ml, valores más bajos se observan con el IE IMM. Las áreas bajo la curva ROC y los intervalos de confianza (IC) del 95% para IGF-I IMM y DSL fueron 0,96 (0,90-1,00) y 0,91 (0,82-1,00) respectivamente. La diferencia entre las áreas no fue significativa.

Se observaron en 31/37 (84%) y 36/37 (97%) pacientes valores patológicos de IGF-I, al analizar los IE IMM y DSL respectivamente. Un solo paciente presentó por ambas metodologías una concentración de IGF-I dentro del rango de referencia establecido para cada método.

Si consideramos la PTOG como el método gold standard y un valor de GH menor a 1 ng/ml como un nadir normal, al analizar el nadir de GH en cada paciente y los niveles de IGF-I por las dos metodologías, con el IE IMM 70% (26/37) de los pacientes presentaron valores elevados de IGF-I y un nadir mayor a 1ng/ml de GH (verdaderos positivos), el 13,5% (5/37) IGF-I elevada con un nadir de GH normal (falsos positivos), el 2,7% (1/37) IGF-I normal con un nadir mayor a 1ng/ml de GH (falsos negativos) y el 13,5% (5/37) IGF-I y nadir de GH normal. El 73% (27/37) de los pacientes con el IE DSL presentaron valores elevados de IGF-I y un nadir mayor a 1ng/ml de GH (verdaderos positivos), el 24% (9/37) IGF-I elevada con un nadir normal (falsos positivos), y el 2,7% (1/37) niveles de IGF-I y nadir de GH normal. No se observaron concentraciones normales de IGF-I con un nadir de GH patológico (falsos negativos) (Tabla 1).

De los 9 pacientes bajo tratamiento médico 3 mostraron nadir de GH normal con niveles elevados de IGF-I, en dos de ellos por ambas metodologías y en el otro IGF-I normal por IMM y elevado

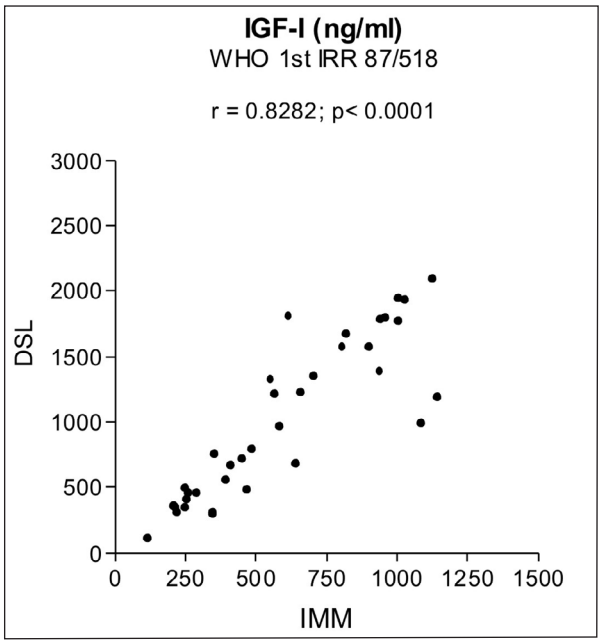

Figura 1. Correlación de Spearman

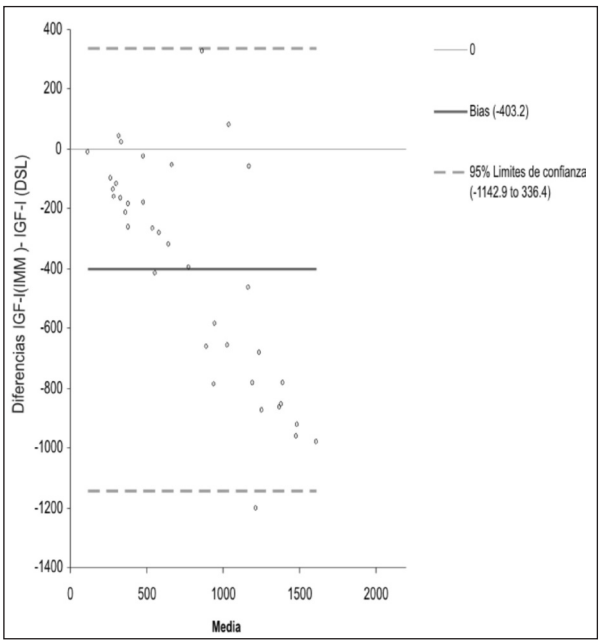

Figura 2: Análisis de Concordancia de Blant y Altman IGF-I (IMM-DSL) vs Media (IMM+DSL)/2

TABLA I. Porcentaje de pacientes con diferentes concentraciones plasmáticas de IGF-I y distintos nadires de GH en la PTOG.

	IGF-I ↑ nadir>1ng/ml	IGF-I ↑ nadir normal	IGF-I normal nadir >1ng/ml	IGF-I y nadir normal
IE IMM n=37	**70%**	**13,5%**	**2,7%**	**13,5%**
IE DSL n=37	**73%**	**24%**	**0%**	**2,7%**

por DSL. En los 6 restantes se observó un nadir de GH mayor a 1 ng/ml, 5 presentaron IGF-I elevada por ambas metodologías y 1 presentó discrepancia (elevado por DSL)

DISCUSIÓN

En el presente estudio, en un grupo de pacientes acromegálicos con y sin tratamiento, se midieron los niveles séricos de IGF-I con dos IE utilizados en nuestro medio (IMM y DSL). Las concentraciones de IGF-I obtenidas con ambas metodologías fueron interpretadas de acuerdo a los valores de referencia, acorde a la edad, provistos por el fabricante. Las diferencias observadas entre ambas metodologías en relación al número de pacientes con valores patológicos de IGF-I, pueden deberse en parte a distintos valores de corte, de acuerdo a la edad, establecidos por cada fabricante.

Massart y col.[8] destacan la importancia de los valores de referencia para IGF-I obtenidos con un determinado IE y cómo influye el número de sujetos normales utilizado, un número limitado puede dar lugar a valores de corte muy diferentes para el diagnóstico de exceso de GH al compararlos con los de un IE en el cual el número de sujetos normales incluidos es mucho mayor. Por otro lado, la distinta especificidad de los anticuerpos utilizados, la interferencia de las proteínas de unión y

las diferentes técnicas utilizadas en cada IE para remover o anular el efecto de las proteínas de unión también estarían contribuyendo a las diferencias observadas [9]. A pesar de que se han desarrollado diversas técnicas para eliminar la interferencia de las IGFBPs, en muchos IE la ineficiente eliminación de las proteínas o de sus fragmentos puede causar interferencias y producir incrementos o disminuciones falsas de los niveles de IGF-I[6]. El IE de DSL utiliza la precipitación ácido/etanol, método que según distintas publicaciones, retiene en la muestra algunas de las IGFBP como IGFBP-1 e IGFBP-4, sobre todo IGFBP-1 en el caso de pacientes diabéticos[10,11]. El otro IE utilizado se trata de un método automatizado, sin extracción y usa IGF-II para eliminar posibles interferencias de las IGFBPs. Uno de los inconvenientes de esta metodología es que si el anticuerpo utilizado no tiene una elevada afinidad por IGF-I y muy baja afinidad por IGF.II se pueden tener falsos resultados y baja reproducibilidad del ensayo[12].

En este trabajo, las técnicas de cada IE fueron realizadas de acuerdo a las indicaciones dadas por el fabricante y a diferencia del trabajo de otros autores[13], los valores más elevados de IGF-I se obtuvieron con el IE con extracción, mostrando una falta de concordancia entre ambos IE los cuales calibran sus estándares contra el mismo IRP (87/518). Analizando el área bajo la curva ROC, no podemos inferir en este trabajo que una de las metodologías usadas sea más sensible o específica que la otra ya que no se observaron diferencias estadísticamente significativas en dichas áreas.

Aunque la mayoría de las veces los resultados del nadir de GH e IGF-I son congruentes, suelen observarse discrepancias como las encontradas en el presente estudio. En relación a los casos en los cuales se encuentran niveles elevados de IGF-I con respuesta normal de GH a la PTOG algunos autores consideran que en muchos casos la supresión de GH puede no ser la correcta si no se usa un apropiado cutoff. Cuando los datos de GH son comparados con un nadir elevado para el ensayo utilizado se observa una discrepancia entre el 24% y 62% [14], lo cual concuerda con lo hallado en nuestro estudio. Sin embargo, no debe dejar de considerarse la metodología utilizada para determinar los niveles de IGF-I y los valores de referencia utilizados, ya que es poco común encontrar valores elevados de IGF-I que no sea la acromegalia. La situación contraria, o sea niveles normales de IGF-I con supresión anormal de GH a la PTOG se puede observar en el 9% al 39% de los pacientes acromegálicos[15,16]. Aunque el mecanismo que lleva a esta situación es incierto, el mismo podría ser una desregulación en la secreción de GH por una alteración a nivel neural o anatómico[17]. Frente a esta situación no debe dejar de considerarse el posible uso de un valor de nadir de GH inexacto o inadecuadamente ajustado para la edad, el sexo o el BMI del paciente ya que algunos autores han observados valores más bajos del nadir de GH en individuos de mayor edad y BMI[14].

CONCLUSIÓN

Los niveles de IGF-I determinados por IMM y DSL, fueron estadísticamente diferentes, los niveles de IGF.I mostraron un bias negativo por IMM. La mayoría de los resultados del nadir de GH fueron concordantes con los niveles de IGF-I, pero se observó una discrepancia en el 30% de los pacientes, estuvieran bajo tratamiento o no.

Frente a la problemática presentada por los diferentes IE para la determinación de IGF-I, en el seguimiento del paciente acromegálico se deberían considerar tanto los niveles plasmáticos de IGF-I como el grado de inhibición de GH posterior a una PTOG en el contexto clínico presente del paciente. Ambos tests proveen información complementaria, por un lado IGF-I evalúa la secreción promedio de GH, y por otro lado la PTOG valora la neuroregulación de la secreción de GH. Asimismo, se debe resaltar la importancia de que cada laboratorio cuente con sus propios valores de referencia tanto para GH como para IGF-I, ambos calculados con un número importante de sujetos sanos, como así también la necesidad de realizar el seguimiento del paciente con un mismo sistema de medición.

Agradecimientos: Los autores agradecen la colaboración de Biodiagnóstico S.A., Bio Sidus S.A y DiagnosMed SRL. para la realización de este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Marzullo P, Di Somma C, Pratt KL, Khosravi J, Diamandis A, Lombardi G, Colao A, Rosenfeld RG.** Usefulness of different biochemical markers of the insulin-like growth factor (IGF) family in diagnosing growth hormone excess and deficiency in adults. J Clin Endocrinol Metab. 86: 3001-3008, 2001.
2. **Barkan AL.** Defining normalcy of the somatotropic axis: an attainable goal? Pituitary 10: 135-139, 2007.

3. **Clemmons DR, Van Wyk JJ.** Factors controlling blood concentration of somatomedin C. Clin Endocrinol Metab. 13: 113-143, 1984.
4. Growth Hormone Research Society; Pituitary Society. Biochemical assessment and long-term monitoring in patients with acromegaly: statement from a joint consensus conference of the Growth Hormone Research and the Pituitary Society. J Clin Endocrinol Metab. 89: 3099-3102, 2004.
5. **Lim EM, Pullan P.** Growth Hormone Research Society; Pituitary Society. Biochemical assessment and long-term monitoring in patients with acromegaly: statement from a joint consensus conference of the Growth Hormone Research Society and the Pituitary Society. Clin Biochem Rev. 26: 41-43, 2005.
6. **Clemmons DR.** IGF-I assays: current assay methodologies and their limitations. Pituitary 10: 121-128, 2007.
7. **Trainer PJ, Drake WM, Katznelson L, Freda PU, Herman-Bonert V, van der Lely AJ, Dimaraki EV, Stewart PM, Friend KE, Vance ML, Besser GM, Scarlett JA, Thorner MO, Parkinson C, Klibanski A, Powell JS, Barkan AL, Sheppard MC, Malsonado M, Rose DR, Clemmons DR, Johannsson G, Bengtsson BA, Stavrou S, Kleinberg DL, Cook DM, Phillips LS, Bidlingmaier M, Strasburger CJ, Hackett S, Zib K, Bennett WF, Davis RJ.** Treatment of acromegaly with the growth hormone-receptor antagonist pegvisomant. N Engl J Med. 342: 1171-1177. 2000.
8. **Massart C, Poirier JY.** Serum insulin-like growth factor-I measurement in the follow-up of treated acromegaly: comparison of four immunoassays. Clin Chim Acta 373: 176-179, 2006
9. **Bang P.** Valid measurements of total IGF concentrations in biological fluids: recommendations from the 3rd International Symposium on Insulin-like Growth Factors. Eur J Endocrinol. 132: 338-339, 1995.
10. **Mesiano S, Young IR, Braune CA, Thorbun GD.** Failure of acid-ethanol treatment to prevent interference by binding protein in radioligand assays for insulin-like growth factors. J Endocrinol. 119: 453-460, 1988.
11. **Mohan S, Baylink DJ.** Development of a simple valid method for the complete removal of insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins from IGFs in the human serum and other biological fluids: comparison with acid-ethanol treatment and C18 Sep-Pak separation. J Clin Endocrinol Metab 80: 637-647, 1995.
12. **Schuller AG, Lindenbergh-Kortieve DJ, de Boer WI, Zwarthoff EC, Drop SL.** Localization of the epitope of a monoclonal antibody against human insulin-like growth factor binding protein-1, functionally interfering with insulin-like growth factor binding. Growth Regul 3: 32-34, 1993.
13. **Granada ML, Ulied A, Casanueva FF, Pico A, Lucas T, Torres E, Sanmartí A.** Serum IGF-I measured by four different immunoassays in patients with adult GH deficiency or acromegaly and in a control population. Clin Endocrinol (Oxf). 68: 942-950, 2008.
14. **Freda PU.** Monitoring of acromegaly: what should be performed when GH and IGF-1 levels are discrepant? Clin Endocrinol (Oxf). 71: 166-170, 2009.
15. **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 87: 3142-3147, 2002.
16. **Arafat AM, Möhlig M, Weickert MO, Perschel FH, Purschwitz J, Spranger J, Strasburger CJ, Schöfl C, Pfeiffer AF.** Growth hormone response during oral glucose tolerance test: the impact of assay method on the estimation of reference values in patients with acromegaly and in healthy controls, and the role of gender, age, and body mass index. J Clin Endocrinol Metab. 93: 1254-1262, 2008.
17. **Ho PJ, Jaffe CA, Friberg RD, Chandler WF, Barkan AL.** Persistence of rapid growth hormone (GH) pulsatility after successful removal of GH-producing pituitary tumors. J Clin Endocrinol Metab. 78:1403-1410, 1994.