

A GH no diagnóstico e monitorização da acromegalia.

Condicionantes fisiológicas e tecnológicas

Paiva I, Gomes L

Assistentes Graduadas de Endocrinologia › Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo › Hospitais da Universidade de Coimbra

Correspondência:

Dra. Isabel Paiva › Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo › Hospitais da Universidade de Coimbra
Praceta Mota Pinto 3000-075 Coimbra › E-mail: ipaiva@netcabo.pt

RESUMO

As progressivas alterações dos valores indicativos da normalidade da hormona de crescimento, para estabelecer o diagnóstico de acromegalia ou avaliar o resultado de terapêuticas instituídas, justifica uma revisão da fisiologia da sua secreção, dos vários padrões decorrentes de uma secreção anormal, assim como das particularidades relativas aos métodos de doseamento. Estes últimos tendo aumentado significativamente em sensibilidade e especificidade trouxeram também variáveis ligadas ao tipo de metodologia laboratorial (anticorpo utilizado, interferência das proteínas de transporte, tipo de energia emitida, unidades de medição e respectivos factores de conversão e padrão de referência internacional adoptado) que comprometem a comparação directa dos resultados brutos encontrados em cada doente, quer com os valores aceites como referência, quer com os resultados obtidos em diferentes laboratórios (ou no mesmo laboratório se alterações na metodologia).

A publicação sucessiva de orientações internacionais, indicando valores precisos de GH para diagnóstico e avaliação terapêutica, torna ainda mais imperiosa a necessidade de padronizar a metodologia laboratorial.

PALAVRAS-CHAVE

Hormona de crescimento; Padrões de secreção de GH; Métodos de doseamento de GH; Acromegalia; Critérios de diagnóstico da acromegalia; Factores de erro dos métodos laboratoriais.

SUMMARY

The progressive changes in values used to measure the normality of growth hormone in order to establish the diagnosis of acromegaly or to evaluate the result of the established therapeutics, justify an examination of the physiology of its secretion; of the several patterns of an abnormal secretion and of the details concerning the methods of dosage.

Due to the significant increase in sensitivity and specification, these methods also brought variables connected to the type of laboratorial methodology (used anti corps, interference of the transport proteins, type of energy issued, units of measurement and correlated factors of conversion and adopted international pattern of reference) that compromise the direct comparison of the raw results found in each patient with the values accepted as referential or with the results obtained in different laboratories (or in the same laboratory if there are changes in the methodology).

The successive publication of international guidelines, indicating precise values of GH for diagnosis and therapeutical evaluation, makes even more urgent the need to pattern laboratorial methodology.

KEY-WORDS

Growth hormone; Patterns of secretion; Methods of GH dosing; Acromegaly; Criteria for Acromegaly diagnosis; Factors of error in laboratorial methods.

INTRODUÇÃO

O diagnóstico de acromegalia é realizado quando à suspeita clínica se alia a confirmação laboratorial. Se casos de acromegalia florida não representam geralmente dificuldades de diagnóstico – sendo os dados laboratoriais unicamente de confirmação e avaliação dos níveis hormonais circulantes – já os casos de clínica mais fruste (eventualmente em fases mais precoces de evolução, ou desencadeados por adenomas de menor capacidade secretora) podem necessitar de doseamentos séricos para confirmação. No seguimento desta patologia estes revestem-se ainda de maior relevância, não só para definição de critérios de remissão como para avaliação das terapêuticas instituídas.

Na avaliação do eixo somatotrófico, é importante considerar a hormona de crescimento (GH) e a “insulin-like growth factor 1” (IGF1). A fracção desta última, que é produzida no fígado, ao ser libertada para a corrente sanguínea permite uma percepção “integrada” da secreção da GH. A que é sintetizada nos restantes tecidos, nomeadamente músculos e cartilagens, é actualmente inacessível ao doseamento, sendo a determinante das alterações orgânicas específicas.

Neste trabalho analisa-se a problemática do valor da GH no diagnóstico e seguimento dos doentes, e também as particularidades das técnicas laboratoriais – métodos de doseamento, especificidades dos anticorpos, padrões de aferição e factores de conversão – que tão grande impacto têm sobre o resultado obtido em cada doseamento efectuado.

A SECREÇÃO DE GH – PADRÃO DE NORMALIDADE E ALTERAÇÕES ESPECÍFICAS NA ACROMEGALIA

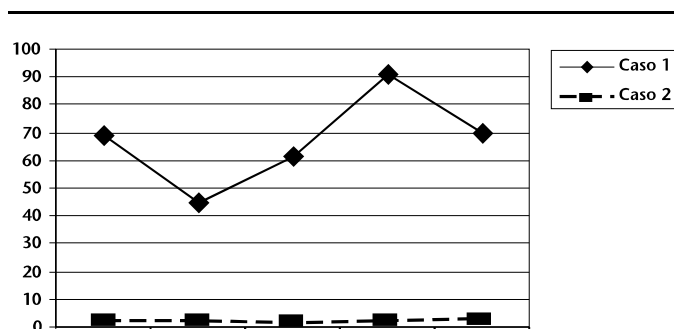
Para se poderem compreender as particularidades da secreção motivadoras das profundas alterações sistémicas verificadas nesta patologia, é importante rever brevemente as principais características da secreção normal de GH.

A sua produção é caracterizada por um ritmo circadiano bem marcado – amplos e frequentes “picos” no início do sono profundo (período de ondas REM) das 23 h às 05 h, e secreção reduzida durante o dia, com períodos relativamente longos de valores muito baixos, frequentemente referidos como “indoseáveis”.

A ausência destas duas particularidades caracteriza a secreção de GH na acromegalia: maior estabilidade dos valores basais, sem pontos de “indoseável” e com picos de pequena amplitude distribuídos erraticamente ao longo das 24 h, ou valores relativamente baixos e sem grandes oscilações¹.

Estas diferenças de padrão secretor são bem evidenciadas em dois casos clínicos: caso 1, sexo masculino, 33 anos de idade, clínica exuberante e média de valores basais de GH 67 ng/mL; e caso 2, sexo feminino, clínica fruste e média de GH de 2,2 ng/mL (Fig. 1).

FIGURA 1. Perfis de secreção de GH na acromegalia



Além das flutuações decorrentes do ritmo circadiano, fisiologicamente a GH também altera a sua secreção em diferentes situações e com diferentes características: aumentando os pulsos – durante episódios de *stress* agudo (físico ou psicológico) e após ingestão de alguns aminoácidos (nomeadamente arginina e leucina); aumentando a secreção basal – nos casos de diabetes mellitus descompensada, insuficiência renal crónica e malnutrição; reduzindo globalmente a secreção – nos casos de obesidade (particularmente com predomínio abdominal) devido à elevação crónica dos ácidos gordos livres².

CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO DA SECREÇÃO DE GH

Um doseamento sérico da GH dá-nos informação em relação ao nível circulante da hormona no momento da colheita, mas não nos informa sobre a dinâmica da sua secreção. A menos que seja um valor extremo (inferior ao detectável pelo método analítico utilizado, ou da ordem das centenas) não permite conclusões sobre a situação clínica do indivíduo estudado (um valor elevado pode simplesmente traduzir uma resposta à dor ou ao medo da punção, um valor baixo não exclui uma secreção anormal).

Já a colheita de várias amostras (cada 10 ou 20 minutos durante as 24 h) permite uma melhor avaliação do perfil secretor do indivíduo a estudar, mas sendo uma metodologia laboriosa e com custos elevados, só é utilizada em protocolos de investigação.

Assim, na prática clínica, resta o recurso à utilização de estímulos secretores (indutores ou inibidores), para avaliar o estado funcional do eixo. São as chamadas “provas dinâmicas”.

Para estudo de casos envolvendo secreção aumentada, são mais informativas as provas de frenação, uma vez que a doença resulta da falta de redução da secreção hormonal em resposta ao excesso dos seus efeitos periféricos.

Na acromegalia a prova de referência continua a ser a da sobrecarga oral à glicose, que se baseia na inibição fisiológica da secreção de GH induzida pela elevação súbita da glicemia: consiste na ingestão, em menos de 10 minutos e após jejum nocturno, de 75 g de glicose em 250 ml de água, com doseamentos de GH efectuados de 30 em 30 minutos durante 2 h. No entanto, a padronização desta prova – aceite em consenso no ano 2000³ – parece não estar ainda totalmente estabelecida, dado ter sido publicado em 2005 um estudo utilizando 100 g de glicose⁴.

Também na interpretação da resposta a provas dinâmicas há que considerar a existência de situações perturbadoras de uma resposta normal ao estímulo. No caso das provas de frenação, situações fisiológicas particulares (como a puberdade ou a gravidez) ou a coexistência de outras patologias (diabetes mellitus, doenças hepáticas e renais, por exemplo), impedem a obtenção dos valores característicos da normalidade constituindo casos de falsa positividade.

Em conclusão, para a interpretação dos valores da GH, quer resultantes de doseamentos esporádicos, quer na resposta a estímulos, é necessário ter em conta as particularidades clínicas do indivíduo em estudo, e a concordância entre os resultados hormonais e as manifestações clínicas.

A GH NO DIAGNÓSTICO DE ACROMEGALIA

A atribuição de significado ao valor de GH obtido numa colheita episódica é difícil, dados os vários factores passíveis de interferência. Em análises de grupo, o valor em jejum às 8 h correlaciona-se bem com a média das 24 h, mas esta constatação não é aplicável a casos individuais⁵.

A importância da resposta à sobrecarga oral à glicose é bem patente na realização de vários consensos durante a última década, com vista à adopção de um valor indicativo da normalidade. Em 2000 foi definido como excluindo acromegalia um nadir de GH igual ou inferior a 1 ng/mL³, sendo desde logo ressalvada a necessidade de eventual correcção deste valor em função dos novos métodos laboratoriais em desenvolvimento.

De facto, as questões relativas à variação dos resultados, devido à utilização de diferentes metodologias, e pondo em causa os valores de referência, levantaram polémica⁶ e motivaram a realização de nova conferência de consenso em 2004. Nesta altura, a sensibilidade dos novos métodos laboratoriais para concentrações inferiores a 0,1 ng/mL tornava possível a quantificação de valores previamente referidos como indetectáveis, levando a considerar a eventual necessidade de definir novos valores da normalidade em função do método utilizado⁷.

O impacto na prática clínica de todas estas mudanças motivou a realização de novo consenso em 2005. No documento resultante é referida a necessidade de um valor consideravelmente inferior a 0,1 ng/mL para afirmar a normalidade⁸, e a possibilidade de virem a ser estabelecidos valores diferentes conforme o sexo.

Todos estes ajustes nos critérios previamente definidos se deveram à evolução das metodologias de doseamento hormonal.

Simultaneamente, começaram a evidenciar-se diferenças entre os sexos, nomeadamente níveis mais elevados, tanto basais como após a sobrecarga à glicose, e maior amplitude dos pulsos na mulher^{9,10}, entre os diferentes grupos etários, com redução progressiva no envelhecimento, sendo nas 5^a e 6^a décadas de vida cerca de metade do atingido na 2^a e 3^a¹¹, e com o índice de massa corporal, estando a obesidade associada à diminuição da secreção de GH¹².

Em conclusão, a disponibilidade de métodos altamente precisos para os doseamentos hormonais, obriga ao estabelecimento de valores de normalidade ajustados à metodologia utilizada e às características do indivíduo estudado, sendo cada vez mais importante a interpretação crítica dos resultados obtidos.

A GH NA MONITORIZAÇÃO DO TRATAMENTO DA ACROMEGALIA

Tal como para o diagnóstico, também para a avaliação do resultado de terapêuticas instituídas (cirurgia, radioterapia ou fármacos) é fundamental uma avaliação criteriosa tanto da clínica como dos valores de GH e IGF1, que podem eventualmente ser discrepantes¹³.

Até ao momento, e dado que a IGF1 é de utilização relativamente recente, todos os estudos avaliando o risco de mortalidade nos doentes acromegálicos foram feitos considerando os valores de GH.

A sua relação com o prognóstico foi sendo estabelecida ao longo dos anos¹⁴. Em 1982 considerava-se que níveis aleatórios inferiores a 10 ng/mL eram metabolicamente irrelevantes¹⁵. Na década de 90, foram estabelecidos valores mais baixos, inferiores a 5 ng/mL, para declarar a cura bioquímica da acromegalia. Já no início deste século, Ayuk¹⁶ numa meta-análise das publicações referentes à relação entre a mortalidade destes doentes e os níveis de GH obtidos após terapêutica, situava em 2 ng/mL o valor abaixo do qual a mortalidade era igual à da população em geral. No entanto, nesse mesmo ano, durante o já referido *Consenso da Pituitary Society*⁷, foi definido como necessários valores inferiores a 2 ng/mL para que se pudesse considerar um risco vital semelhante ao esperado para a população em geral.

Compreende-se que seja de crucial impor-

tância a definição dos níveis a obter após as intervenções terapêuticas: eles irão condicionar a necessidade de instituir terapêuticas complementares ou de ajustar posologias ao longo do tempo.

Tal como para o diagnóstico, valores pontuais de GH são de difícil interpretação, embora a comparação com os valores existentes antes da terapêutica instituída nos possa fornecer indicações em relação ao seu sucesso. Ainda assim, para os valores mais baixos torna-se indispensável o estudo da resposta à frenagem com glicose oral, de modo a avaliar a persistência da doença ou o retorno à normalidade da função hipotálamo-hipofisária^{17,11}.

Ainda que verificada a persistência da doença, é importante saber se as modificações obtidas na secreção da GH melhoraram o prognóstico vital do doente¹⁸, e se foi possível normalizar a sobrevida em relação à da restante população. No entanto, não é só dos níveis de GH que depende o prognóstico: também a maneira de atingir estes objectivos^{19,20,21,22} é de primordial importância, dado existirem riscos ligados às metodologias terapêuticas que devem ser levados em conta^{23,24}. Do mesmo modo, a coexistência de outras patologias com evolução autónoma (como é o caso da diabetes mellitus) deve ser considerada na avaliação do prognóstico e da sobrevida.

A GH NO SANGUE: O QUE CIRCULA E O QUE É MEDIDO

MÚLTIPLAS FORMAS DA GH

Na avaliação de qualquer tipo de resultado analítico é necessário ter em conta que nem tudo o que existe em circulação é detectado pelos métodos laboratoriais disponíveis. No que refere à GH, esta afirmação é particularmente adequada, dado que são libertadas pela adenohipófise, e existem em circulação, várias moléculas heterogéneas.

O estudo mais detalhado sobre este assunto foi publicado por Baumann em 1991²⁵. Verifica-se que há duas formas monoméricas em concentrações diferentes: a de 191 aa e 22 kDa de massa molecular, constituindo 43% do total circulante, e a forma de 176 aa e 20kDa, constituindo 8%. Qualquer delas pode circular

livre ou associada a proteínas de transporte; podem também agrupar-se entre si ou uma com a outra, formando dímeros (homodímeros e heterodímeros) ou multímeros (com três a cinco elementos associados); podem ainda sofrer modificações estruturais: acetilação, desaminação e ligações dissulfureto. Além de tudo isto, estas partículas circulantes e activas, são interconvertíveis²⁶.

Considerando estas especificidades, há que questionar a capacidade dos actuais métodos laboratoriais para a correcta identificação e avaliação de todas estas formas activas.

Poder-se-à também interrogar, se quando na presença de uma secreção anormal, as diferentes formas são produzidas na mesma proporção, ou se haverá predomínio de algum dos tipos.

MÉTODOS DE DOSEAMENTO DA GH

Os procedimentos laboratoriais para doseamentos hormonais têm como base a obtenção de anticorpos, que misturados com o soro a estudar irão permitir a sua medição directa ou indirecta.

Até 1990, os anticorpos eram obtidos a partir de extractos hipofisários humanos, dando assim origem a anticorpos dirigidos contra todas as formas de GH produzidas (policlonais). Os métodos de doseamento baseavam-se no radio-imunoensaio (RIA). Esta metodologia pressupõe que os anticorpos são ligados a hormona de crescimento marcada com radioisótopos. A adição do soro que se pretende estudar leva à competição da nova GH para o anticorpo, deslocando a hormona marcada. A junção de um segundo anticorpo faz com que os complexos formados precipitem, sendo então medida a emissão de radioactividade. Quanto mais hormona “problema” se tiver ligado aos complexos, menos emissão radioactiva há no precipitado.

Estas metodologias, com baixa especificidade (anticorpos policlonais) e baixa sensibilidade (da detecção da radioactividade) produziam valores de GH relativamente elevados e frequentes resultados de “indoseável”.

A partir de 1990, houve evolução nos métodos, quer no tipo de anticorpos produzidos – altamente específicos porque formados a partir das moléculas de GH recombinantes – quer

nas técnicas laboratoriais, com a utilização da emissão de outras formas de energia além da radioactiva – a cor, a fluorescência e a luz.

No que refere à síntese de anticorpos, eles passaram a ser formados contra epítomos específicos, permitindo assim a sua detecção com toda a precisão. A especificidade foi ainda aumentada com a formação anticorpos para dois epítomos diferentes de cada molécula, sendo a técnica referida como “técnica de sandwich”.

No entanto, estas metodologias utilizando anticorpos muito específicos podem não ser as que retratam melhor a situação clínica do doente: basta que haja predomínio de uma forma diferente de GH em relação à identificada pelo método, para que o resultado seja falsamente negativo...

No que refere aos métodos de detecção, foram modificados através da ligação de substâncias activadoras de substratos (cromogénicos, fluorescentes ou quimioluminescentes), também eles adicionados à solução contendo os complexos antigénio-anticorpo. Em função da substância em causa, chama-se método ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) se houver reacção enzimática com emissão de cor por substância cromogénica; IFMA (Immuno FluoroMetric Assay) se houver emissão de fluorescência ou ILMA (Immuno LuminoMetric Assay) se indução de quimioluminescência. Todas estas diferentes formas de energia são susceptíveis de ser medidas com alta sensibilidade²⁷.

VARIABILIDADE DOS RESULTADOS

Desde cedo se verificou a existência de diferenças significativas nos resultados das análises de um mesmo soro, analisado por laboratórios diferentes^{28,29}. Esta situação tem-se mantido até à actualidade apesar das melhorias técnicas já referidas^{30,31}. Um dos últimos estudos, comparando vários laboratórios idóneos (104 no total) com um soro resultante do mínimo obtido numa prova de sobrecarga à glicose oral³², mostrou a existência de variações que tanto faziam o diagnóstico de acromegalia como o excluía.

Esta variabilidade põe em causa a definição universal de “pontos de corte” precisos

para exclusão de diagnósticos assim como a possibilidade de comparação de resultados analíticos (quer entre vários laboratórios, quer no mesmo laboratório entre valores obtidos ao longo do tempo).

QUAIS OS MOTIVOS ENCONTRADOS PARA ESSAS DIFERENÇAS?

Diferenças nos métodos laboratoriais

a) Tipos de anticorpos utilizados

A utilização de anticorpos policlonais ou monoclonais é determinante para o resultado do doseamento, sendo que com anticorpos policlonais o nível de GH será mais elevado. Com os monoclonais, também haverá diferenças em função do anticorpo escolhido (dirigido para a forma 22kDa ou 20kDa) em virtude das suas concentrações relativas. Nos doentes acromegálicos, a possibilidade do adenoma produzir maioritariamente uma das formas de GH, poderá motivar resultados incongruentes se tiver sido utilizado um anticorpo identificador da outra molécula.

b) Tipo de energia emitida

Os métodos utilizados (enzimáticos, imunoluminescentes ou imunoradiométricos, por exemplo) só por si têm influência, dadas as diferenças de sensibilidade na detecção das emissões resultantes.

A magnitude destas diferenças foi devidamente demonstrada em 2000³³, e mais recentemente confirmada¹⁰. Este último estudo, utilizando em simultâneo e no mesmo laboratório, três tipos de preparações comerciais – Immulite 2000 (técnica de quimioluminescência cujo limite inferior de detecção é 0,05 ng/mL), Nichols (quimioluminescência, com limite inferior de detecção de 0,02 ng/mL) e DSL (método ELISA, com limite inferior de detecção de 0,00066) – demonstrou que os valores resultantes para o mesmo soro eram, em média 2,3 vezes mais elevados no Immulite em relação ao Nichols e 6 vezes mais se considerada a relação com o DSL.

c) Interferência das proteínas de transporte

Outro factor a considerar é a possibilidade de interferência das proteínas de transporte no resultado final.

Como é sabido, cerca de 50% da GH circula em ligação de alta afinidade com uma proteína de transporte, a GHBP (variável com o estado nutricional e metabólico).

A ligação com a GHBP feita em epítomos específicos, tal como a ligação ao anticorpo utilizado no doseamento. Se o epítopo de junção for o mesmo, a ligação do anticorpo vai ser impedida e o resultado do doseamento falsamente baixo.

Nos métodos laboratoriais com tempos mais longos de incubação, este factor de erro pode ser atenuado, dado que se torna possível a dissociação da proteína de transporte e consequentemente a ligação do anticorpo. Quando, como é o caso da maior parte dos “kits” laboratoriais actuais, os períodos de incubação são curtos, esta possibilidade de correcção não existe, tornando-se fundamentais a utilização de métodos de extracção da GHBP³⁴.

Preparações internacionais de referência

A aferição dos resultados obtidos em cada laboratório é feita pela utilização de preparações internacionais de referência (*International Reference Preparation* ou IRP), cuja concentração em GH está previamente estabelecida.

Também desde 1994 são constituídas por GH 22 kDa de origem recombinante²⁷, têm sido objecto de sucessivos aperfeiçoamentos, particularmente na purificação da molécula sintetizada. A existência de várias preparações aceites pela OMS leva a que qualquer delas possa ser utilizada como padrão pelas empresas produtoras dos “kits” laboratoriais.

Verifica-se que este é um dos principais motivos de variação dos resultados obtidos, sendo susceptível de correcção com a adopção internacional da mesma IRP. Com esse objectivo, foi realizada em 2006 uma reunião de consenso para apelar à uniformização, adoptando como padrão de referência a IRP 98/574³⁵, o que ainda se não verificou.

Unidades de medida e factores de conversão

Outro importante factor de erro identificado é a utilização de dois tipos de unidades para expressão dos resultados – as unidades interna-

cionais (mU/L) e as unidades de massa (ug/L) – com o respectivo factor de conversão.

A variabilidade deste factor está bem documentada, em função dos autores e seus laboratórios de referência: em 1998 há referência bibliográfica utilizando o factor de conversão 2³⁶; em 2000, na mesma revista científica outro autor utilizava o factor 3³⁷, e em 2001 era utilizado 2,5³⁸. Esta variabilidade agrava a dificuldade de avaliação de resultados, da comparação com valores de referência e da transposição para a prática clínica dos objectivos terapêuticos indicados nas publicações.

Actualmente, e dados os tipos de medição obtidos com os métodos actuais, é considerada mais correcta a utilização de unidades de massa, devendo ser abandonada a utilização de unidades internacionais.

CONCLUSÕES

Não parece haver dúvidas que o doseamento da GH é de grande relevância quer para o diagnóstico quer para o seguimento dos doentes com acromegalia. No entanto, apesar dos esforços e publicações internacionais no sentido de dar orientações sobre a sua interpretação, do atrás exposto ficou bem evidente a relevância de uma atitude crítica na sua interpretação. São várias as condicionantes (fisiológicas, patológicas e laboratoriais) que podem interferir num resultado de GH podendo ter implicações no diagnóstico e atitudes terapêuticas para com estes doentes.

A conjugação dos aspectos clínicos com a interpretação crítica dos doseamentos de GH, e à luz das orientações internacionais parece ser a atitude mais correcta na avaliação actual de uma acromegalia.

BIBLIOGRAFIA

1. Sata A, Ho KKY. Growth hormone measurements in the diagnosis and monitoring of acromegaly. *Pituitary* 2007; 10: 165-72.
2. Goldenberg N, Barkan A. Factors regulating growth hormone secretion in humans. *Endocrinol Metab Clin N Am* 2007; 36: 37-55.
3. 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; 86: 526-9.
4. Webb SM, Sucunza N, Barahona MJ. Biochemical evidence in favour of revising Cortina criteria. *J Endocrinol Invest* 2005; 28 (11 Suppl International): 84-6.
5. 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* 1998; 67: 69-73.
6. Trainer PJ. Acromegaly – consensus, what consensus? [editorial] *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 3534-6.
7. The Growth Hormone Research Society and The Pituitary Society. Consensus Statement: biochemical assessment and long-term monitoring in patients with acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 3099-102.
8. Melmed S, Casanueva F, Cavagnini F, Chanson P, Frohman LA, Gaillard R et al. Consensus statement: medical management of acromegaly. *European Journal of Endocrinology* 2005; 153: 737-40.
9. Veldhuis JD, Patrie J, Wideman L, Patterson M, Weltman JY, Weltman A. Contrasting negative-feedback control of endogenously driven and exercise-stimulated pulsatile growth hormone secretion in women and men. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 840-46.
10. Arafat AM, Mohlig M, Weickert MO, Perschel FH, Purschwitz J, Spranger J et al. Growth hormone response during OGTT: 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 BMI. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 1254-62.
11. Barkan AL. Defining normalcy of the somatotrophic axis: an attainable goal? *Pituitary* 2007; 10: 135-9.
12. Bonert VS, Elashoff JD, Barnett P, Melmed S. Body mass index determines evoked growth hormone (GH) responsiveness in normal healthy male subjects: diagnostic caveat for adult GH deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 61-7.
13. Tzanela M. Dynamic tests and basal values for defining active acromegaly. *Neuroendocrinology* 2006; 83: 200-4.
14. Rajasoorya C, Holdaway IM, Wrightson P, Scott DJ, Ibbertson HK. Determinants of clinical outcome and survival in acromegaly. *Clin Endocrinol* 1994; 41: 95-102.

15. Christy NP. Choosing the best treatment for acromegaly. *JAMA* 1982; 247: 1320.
16. 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. *Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 1613-7
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. Dekkers OM, Biermasz NR, Pereira AM, Romijn JA, Vandenbroucke JP. Mortality in acromegaly: a meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 526-9.
19. Melmed S, Jackson I, Kleinberg D, Klibanski A. Current treatment guidelines for acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 2646-52.
20. Melmed S, Casanueva FF, Cavagnini F, Chanson P, Frohman L, Grossman A, Ho K, Kleinberg D, Lamberts S, Laws E, Lombardi G, Vance ML, Von Werder, Wass J, Giustina A. Guidelines for acromegaly management. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 4054-8.
21. AACE. Medical guidelines for clinical practice for the diagnosis and treatment of acromegaly. *Endocrine Practice* 2004; 10: 214-25.
22. Cook DM. Understanding and interpreting the AACE guidelines for the management of acromegaly. [Internet site] 2005 Medscape Diabetes & Endocrinology 7 (1) Available: <http://www.medscape.com/viewarticle/505153>. Accessed 20 July 2008.
23. Jenkins PJ, Bates P, Carson MN, Stewart PM, Wass JA. Conventional pituitary irradiation is effective in lowering serum growth hormone and insulin-like growth factor-I in patients with acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 1239-45.
24. Barkan AL. Radiotherapy in acromegaly: the argument against. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2003; 58: 132-5.
25. Baumann G. Growth hormone heterogeneity: genes, isohormones, variants, and binding proteins. *Endocrine Reviews* 1991; 12: 424-49.
26. Baumann G. Growth hormone heterogeneity in human pituitary and plasma. *Horm Res* 1999; 51 (Suppl 1): 2-6.
27. Bidlingmaier M, Strasburger CJ. Growth hormone assays: current methodologies and their limitations. *Pituitary* 2007; 10: 115-9.
28. Celniker AC, Chen AB, Wert RM jr, Sherman BM. Variability in quantitation of circulating growth hormone using commercial immunoassays. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 68: 469-76.
29. Granada ML, Sanmarti A, Lucas A, Salinas I, Carrascosa A, Foz M et al. Assay-dependent results of immunoassayable spontaneous 24-hour growth hormone secretion in short children. *Acta Paediatr Scand* 1990; Suppl 370: 63-70.
30. Strasburger CJ, Bidlingmaier M. How robust are laboratory measures of growth hormone status? *Horm Res* 2005; 64 (suppl 2): 1-5.
31. Bidlingmaier M, Strasburger CJ. What endocrinologists should know about growth hormone measurements *Endocrinol Metab Clin N Am* 2007; 36: 101-8.
32. Pokrajac A, Wark G, Ellis AR, Wear J, Wieringa GE, Trainer PJ. Variation in GH and IGF-I assays limits the applicability of international consensus criteria to local practice. *Clinical Endocrinology* 2007; 67: 65-70.
33. Rakover Y, Lavi I, Masalah R, Issam T, Weiner E, Bem-Shlomo I. Comparison between four immunoassays for growth hormone (GH) measurement as guides to clinical decisions following GH provocative tests. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2000; 13: 637-43.
34. Ebdrup L, Fisher S, Sorensen HH, Ranke MB, Orskov H. Variety in growth hormone determinations due to use of different immunoassays and to the interference of growth hormone-binding protein. *Horm Res* 1999; 51: 20-6.
35. Trainer PJ, Barth J, Sturgeon C, Wieringa G. Consensus statement on the standardisation of GH assays. *European Journal of Endocrinology* 2006; 155: 1-2
36. Orme SM, McNally RJQ, Cartwright RA, Belchetz PE. Mortality and cancer incidence in acromegaly: a retrospective cohort study. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 2730-4.
37. Baldelli R, Collao A, Razzore P, Jaffrain-Rea ML, Marzullo P, Ciccarelli E et al. Two-year follow-up of acromegalic patients treated with slow release lanreotide (30 mg). *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 4099-103.
38. 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.