



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Denise Boechat Leite


**Valores de referência para níveis séricos do Fator de crescimento  
semelhante à insulina tipo I (IGF-I) numa população adulta  
do Estado do Rio de Janeiro, Brasil**

Rio de Janeiro

2013

Denise Boechat Leite

**Valores de referência para níveis séricos do Fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I) numa população adulta do Estado do Rio de Janeiro, Brasil**



Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador : Prof. Dr. Mario Bernardo-Filho

Rio de Janeiro

2013

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

L533 Leite, Denise Boechat.

Valores de referência para níveis séricos do Fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I) numa população adulta do Estado do Rio de Janeiro, Brasil / Denise Boechat Leite. – 2013.

60 f.

Orientador: Mario Bernardo Filho

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Ciências Médicas.

1. Somatotropina – Teses. 2. Valores de referência (Medicina) – Teses. 3. Marcadores biológicos. 4. Hormônio do crescimento humano. 5. Fator de crescimento Insulin-like I. 6. Ensaio imunorradiométrico. I. Bernardo Filho, Mario. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 612.433.65

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Denise Boechat Leite

**Valores de referência para níveis séricos do Fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I) numa população adulta do Estado do Rio de Janeiro, Brasil**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 08 de maio de 2013.

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Mario Bernardo Filho (Orientador)  
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

---

Prof. Dr. Paulo Mário Fernandes de Oliveira  
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Jodélia Lima Martins Henriques  
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

---

Prof. Dr. Walmir Ferreira Coutinho  
Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Carmem Regina Leal Assumpção  
Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2013

## **DEDICATÓRIA**

A todos os que, porventura, venham a se beneficiar dos resultados deste estudo.

## AGRADECIMENTOS

A Deus que, por graça, amor e misericórdia, nos sustenta a vida e a caminhada.

À minha família, por todo o imenso amor, cooperação e estímulo.

Ao Professor Mário Bernardo-Filho, meu orientador amigo, presente, seguro e competente, incentivando-me sempre.

Ao Dr Ricardo Meirelles, exemplo profissional, pelo grande suporte, sempre participante, acreditando neste trabalho e me estimulando.

Ao Professor Carlos Alberto Mandarim de Lacerda, mestre amigo, pela confiança, estímulo, sugestões e reflexões críticas que grandemente contribuíram para este estudo.

Aos professores Mário Fritsch Toros Neves e Denizar Vianna Araújo, pelo crédito dado a este estudo, e pela oportunidade de desenvolvê-lo.

Às colegas de trabalho, Dras. Priscila Pessanha Faria Pereira e Sabrina Ribeiro França, e ao Dr. Iaco Lobo, pelo apoio e colaboração na etapa de coleta de dados dos indivíduos que participaram deste estudo.

Ao Dr. Paulo Sergio Souza Silva e ao Dr. Bruno Dalcin, amigos, cujo incentivo foi fundamental.

Aos Drs. Carlos Eduardo Raymundo e Márcio Bartolomeu Azevedo da Costa, por suas preciosas participações na análise estatística dos dados deste estudo.

Ao Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti - HEMORIO, que através da Dra. Clarisse Lopes de Castro Lobo, diretora geral, e da Dra. Laura Jane Gonçalves Neumann, do Comitê de Ética em Pesquisa - CEP HEMORIO, viabilizaram parte deste trabalho.

A todos os doadores de sangue, anônimos, que concordaram em participar, sem nenhum interesse pessoal.

Ao Professor Sebastião David Santos-Filho por sua colaboração e estímulo.

À Professora Mary Rangel, mestra amiga, por seu exemplo profissional e humano.

A todos os meus Professores da UERJ e do IEDE, que além do conhecimento médico cooperaram para minha formação profissional. Especialmente à Dra. Doris Rosenthal, minha orientadora de Mestrado, e ao Dr. Raul Farias Junior, grande colaborador.

À colega Fernanda Santos do Carmo, por seu apoio e colaboração.

À Professora Marcella Mortara, amiga de uma vida inteira, incentivadora e mestra, dando-me a oportunidade de valorizar o conhecimento.

Porque eu sei que o meu Redentor vive.

*Bíblia Sagrada (Jó 19:25)*

## RESUMO

LEITE, D B. *Valores de referência para níveis séricos do Fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I) numa população adulta do Estado do Rio de Janeiro, Brasil.* 2013. 60 f. Dissertação (Doutorado em Ciências Médicas) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

O nível sérico do Fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I) é fundamental para auxiliar no diagnóstico e controle terapêutico dos transtornos relacionados à secreção do Hormônio de Crescimento (GH), bem como no diagnóstico e seguimento de outras doenças. Estabelecer valores de referência para as dosagens séricas de IGF-I por um ensaio imunoquimioluminométrico (ICMA), utilizando o sistema automatizado *Immulite 2000/Diagnostic Products Corporation* (DPC), e por um ensaio imunoradiométrico (IRMA), utilizando o *kit* comercial *ACTIVE IGF-I/Diagnostic System Laboratories* (DSL)-5600, numa população brasileira adulta da cidade do Rio de Janeiro. Este estudo, aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti, Rio de Janeiro, Brasil, incluiu amostras de 484 indivíduos saudáveis (251 homens e 233 mulheres) com idades entre 18 e 70 anos. As amostras foram estudadas por ICMA- *Immulite 2000/DPC* and IRMA- *ACTIVE IGF-I/DSL-5600*. Para análise dos dados foram utilizados modelos específicos para idade e sexo, após transformação dos dados de IGF-I. Foi observada uma lenta diminuição dos níveis de IGF-I com a idade usando ambos os ensaios. Os níveis de IGF-I foram significativamente ( $p=0,0181$ ) mais elevados em mulheres do que em homens, quando as amostras foram analisadas usando ICMA. Não houve diferença significativa dos níveis de IGF-I entre homens e mulheres quando as amostras foram analisadas usando IRMA. Este estudo estabeleceu valores de referência de IGF-I específicos para idade e sexo, determinados com o sistema automatizado ICMA-*Immulite 2000/DPC*, e valores de referência de IGF-I específicos para idade, determinados com o *kit* comercial IRMA- *ACTIVE IGF-I/DSL-5600*, em uma população adulta brasileira, da cidade do Rio de Janeiro.

Palavras chave: População brasileira. Ensaio imunoquimioluminométrico. Ensaio imunoradiométrico. Fator de crescimento semelhante à insulina tipo I. Valores de referência.

## ABSTRACT

Serum level of insulin-like growth factor I (IGF-I) is fundamental in order to aid in the diagnosis and follow-up of growth hormone (GH)-related disorders, as well as in the diagnosis and follow-up of other diseases. The aim of this investigation was to determine reference values for IGF-I using an automated immunochemiluminometric assay (ICMA) system *Immulite 2000/Diagnostic Products Corporation (DPC)*; and an immunoradiometric assay (IRMA), using the commercial kit *ACTIVE IGF-I/Diagnostic System Laboratories (DSL)-5600*, in an adult Brazilian population of Rio de Janeiro city. The study, approved by the Ethical Committee of the *Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti*, Rio de Janeiro, Brazil, included samples of blood taken from 484 healthy subjects (251men, 233 women) aged from 18 up to 70. The samples were analyzed by ICMA-*Immulite 2000/DPC* and IRMA- *ACTIVE IGF-I/DSL-5600*. For statistical analysis, age and sex-specific models were fitted after transformation of IGF-I values. In adulthood, a slow age-dependent decrease was found, using both assays. IGF-I in women were significantly ( $p=0,0181$ ) higher than in men when samples were analyzed using ICMA. There was no significant difference between men and women IGF-I values when samples were analyzed using IRMA. The present study established age- and sex specific IGF-I reference values, determined with the automated system: ICMA-*Immulite 2000/DPC* and age-specific IGF-I reference values determined with the IRMA- *ACTIVE IGF-I/DSL-5600*, in an adult Brazilian population of Rio de Janeiro city.

Keywords: Brazilian population, immunochemiluminometric assay, Immunoradiometric assay, Insulin-like Growth Factor-I, Reference values.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AACC- *American Association for Clinical Chemistry*
- CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*
- DPC - *Diagnostic Products Corporation*
- DSL - *Diagnostic System Laboratories*
- GH - *Growth Hormone* ou *Hormônio de crescimento*
- ICMA - *Immunochemiluminometric assay*
- IFCC - *International Federation of Clinical Chemistry*
- IGF-I - *Insulin-like Growth Factor-I* ou *Fator de crescimento semelhante à insulina tipo I*
- IGFBPs - *IGF binding proteins* ou *proteínas ligadoras de IGF-I*
- IRMA - *Insulin-like Immunoradiometric assay*
- rhIGF-I - *IGF-I recombinante humano*
- WHO IS - *WHO International Standard*

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	19
2.1	<b>Objetivo geral</b> .....	19
2.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	19
3	<b>ARTIGOS PUBLICADOS</b> .....	20
3.1	<b>Artigo 1</b> - Serum insulin-like growth factor-I adult reference values for an automated chemiluminescence immunoassay system. Afr J Biotechnol 2011; 10: 18027-18033 .....	21
3.2	<b>Artigo 2</b> - Determination of insulin-like growth factor-I reference values using an immunoradiometric assay in a Brazilian adult population. Indian J Med Sci. 2013; in press. ....	28
4	<b>DISCUSSÃO</b> .....	42
5	<b>CONCLUSÃO</b> .....	46
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	47
	<b>APÊNDICE A</b> – Questionário .....	52
	<b>APÊNDICE B</b> - Termo de consentimento livre e esclarecido .....	55
	<b>ANEXO A</b> - Comitê de ética .....	59
	<b>ANEXO B</b> - Carta de aceite do Artigo 2 .....	60

## INTRODUÇÃO

A dosagem sérica do Fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I) é fundamental para auxiliar no diagnóstico e controle terapêutico das desordens relacionadas à secreção de Hormônio do Crescimento (GH) (1-4), bem como para a avaliação de inúmeras outras doenças (5-9), sendo importante estabelecer valores de referência de IGF-I locais, por idade (10, 11), e específicos para cada metodologia utilizada (12).

### Importância e dificuldades da análise de IGF-I

Uma das mais conhecidas ações biológicas do GH é o estímulo para a produção de IGF-I em vários tecidos. IGF-I é o principal responsável pelas ações biológicas do GH (3, 13). A dosagem de IGF-I oferece várias vantagens sobre a de GH. As principais vantagens são: a secreção hepática de IGF-I ser relativamente constante durante o dia, permitindo sua dosagem numa única amostra de sangue, diferentemente da dosagem de GH basal, e o fato de que a maior parte de IGF-I encontra-se ligado às proteínas séricas ligadoras de IGF (IGFBPs), o que contribui para que o IGF-I permaneça na circulação durante várias horas (3, 14). Inúmeras variáveis afetam as concentrações séricas de GH, mas não as de IGF-I, como o ritmo circadiano, a liberação pulsátil, o exercício, a privação aguda de nutrientes e a flutuação aguda da glicemia (13, 15, 16). Os níveis séricos de IGF-I guardam boa relação com os níveis médios de GH secretados durante o dia, e estão elevados na maioria dos pacientes com secreção excessiva de GH. Portanto, níveis elevados de IGF-I têm alta especificidade no diagnóstico da acromegalia (13, 17).

As causas de alterações mais frequentes das dosagens de IGF-I são as alterações crônicas de desnutrição, alterações dos níveis de IGFBPs, insulina, androgênios, tiroxina, cortisol, doenças crônicas, idade e estrogênios (14, 18, 19-23), além de dificuldades técnicas relativas às metodologias. Os valores de IGF-I se elevam cerca de 5 vezes do nascimento até a puberdade e declinam posteriormente cerca de 3,5 vezes até os 80 anos (14). O estrogênio tem ação direta sobre a secreção de GHRH estimulando a liberação de GH, além de uma ação indireta inibindo a liberação de somatostatina (24, 25). As principais dificuldades técnicas das dosagens de IGF-I são a afinidade e especificidade dos anticorpos anti-IGF-I e a interferência das IGFBPs (10, 23, 25-27). Outros obstáculos para determinação de valores de referência de ensaios de IGF-I são a necessidade de valores de referência locais para cada metodologia

usada, tamanho da amostra de indivíduos saudáveis, falta de padronização dos valores de referência quanto à divisão por faixas etárias ideais, inexistência de padronização quanto à separação por sexo, uso de tabelas por estratificação etária em vez de gráficos com distribuição contínua dos dados (10, 26, 27), além da variabilidade da amostra (14). Amostras de um mesmo paciente colhidas com intervalos de 6-12 semanas podem apresentar variação de 3 a 36%, mesmo ensaiadas numa mesma bateria para evitar variação inter-ensaio (14). Isto aponta, inclusive, para a necessidade de repetir amostras com resultados discrepantes para garantir que esta não foi a razão da discrepância.

Os ensaios de IGF-I têm sido largamente utilizados como teste de *screening* para diagnóstico da deficiência de GH (28), bem como na monitoração da resposta ao tratamento com GH em adultos (5, 28, 29). Também é extremamente útil para o diagnóstico e monitoração do tratamento da acromegalia (3), especialmente nos pacientes em uso de uma promissora classe de drogas, que são os antagonistas de GH, como o *Pegvisomant* (4). O *Pegvisomant* é um novo análogo, geneticamente modificado, do GH humano. Funciona como antagonista altamente seletivo do receptor de GH (4, 13, 30-34). Nos pacientes que fazem uso desta terapia, a dosagem de IGF-I é a única possibilidade de avaliação laboratorial para monitoração da doença. Isto decorre da reação cruzada entre o *Pegvisomant* e o GH, nos ensaios biológicos, inviabilizando assim a dosagem de GH para monitoração de tratamento dos pacientes em uso deste medicamento.

Estudos também têm relacionado os níveis de IGF-I com o risco e prognóstico de doenças malignas (29, 35) e evidenciado sua importância para seguimento de várias outras doenças (6, 15). Friedrich *et al.* (5) demonstraram uma relação entre os níveis de IGF-I e índices de mortalidade por diversas causas. Portanto, é imperativa a padronização dos ensaios de IGF-I e da interpretação de seus resultados. Isto inclui estabelecer parâmetros de normalidade para cada população, através de estudos populacionais representativos, que considerem fatores que influenciam as concentrações de IGF-I, como idade e sexo (10).

Apesar de já estar bem estabelecida a necessidade de valores de referência locais para IGF-I (14, 17, 18, 25-28, 35-37), temos conhecimento de apenas um único estudo avaliando valores de referência numa população brasileira da região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais, realizado por Rosário, 2010 (38) utilizando o *kit* comercial ICMA-*Immulite* 2000/DPC, e nenhum estudo avaliando valores de referência para IGF-I, numa população brasileira, usando o *kit* comercial IRMA- *ACTIVE* IGF-I/DSL-5600. Considerando que o Brasil é um país de dimensões quase continentais, este estudo pretende determinar valores de

referência de IGF-I numa população adulta saudável da cidade do Rio de Janeiro/RJ, com características locais bastante distintas da região avaliada por Rosário, 2010 (38).

As duas metodologias escolhidas em nosso estudo são utilizadas no Brasil, sendo que o ICMA (*Immulite 2000/DPC*), cujos padrões foram calibrados pela preparação de IGF-I WHO IS 87/518 (39), é usada em vários centros de Neuroendocrinologia e Laboratórios de Análises Clínicas na cidade do Rio de Janeiro e em todo o Brasil. Vale ressaltar que os valores de referência deste *kit* comercial, fornecidos em bula, são derivados de uma população alemã (40). A outra metodologia escolhida, o IRMA (*ACTIVE IGF-I/ DSL-5600*), também ainda está calibrada pela mesma preparação de IGF-I WHO IS 87/518.

Tem sido recomendada a calibração dos ensaios de IGF-I com uma nova preparação de IGF-I recombinante humano (rhIGF-I) produzida pela *WHO First International Standard* (WHO IS 02/254) (41, 42). Estes ensaios, futuramente, provavelmente serão recalibrados com este novo preparado de rhIGF-I, e novos valores de referência serão determinados para os ensaios recalibrados.

### **Ensaio de IGF-I muito utilizados no Brasil**

No Brasil, a metodologia mais utilizada para dosagem de IGF-I era o IRMA. Um método manual, com extração prévia das IGF-BPs com etanol-HCl (*kit ACTIVE IGF-I/DSL-5600*) (43). Este ensaio apresenta sensibilidade analítica da ordem de 1 ng/ml. Valores séricos acima de 500ng/ml, comumente encontrados na acromegalia em atividade, requerem diluição, pois o maior padrão da curva de calibração é da ordem de 600 ng/ml.

Nos últimos anos, contudo, vem crescendo a busca de métodos automatizados, que utilizem metodologias alternativas aos ensaios com isótopos radioativos. Destes, um método muito utilizado em vários Centros de Neuroendocrinologia e Laboratórios de Análises Clínicas, no Rio de Janeiro e no restante do Brasil, é o ICMA automatizado com extração prévia das IGF-BPs (*Immulite 2000/DPC*) (44), sendo, portanto, também escolhido para este estudo. Este ensaio apresenta sensibilidade analítica da ordem de 20 ng/ml. Requer diluição apenas para valores séricos muito elevados, pois a curva padrão alcança valores de até 1600 ng/ml.

Quanto aos valores de referência, a maioria dos laboratórios no Brasil utiliza os valores referidos pelo fabricante, estabelecidos para populações de outros países. O *kit* comercial IRMA-*ACTIVE IGF-I/DSL-5600*, apresenta valores diferenciados por sexo até a idade de 30 anos. Acima desta faixa etária, o *kit* fornece um mesmo valor para ambos os

sexos. O *kit* comercial ICMA-*Immulate* 2000/DPC, fornece valores únicos para ambos os sexos em todas as faixas etárias. Ambos os *kits* comerciais citados fornecem resultados por faixas etárias, embora os intervalos destas faixas variem enormemente entre os diversos fabricantes.

### **Análise Estatística**

Todas as análises estatísticas foram realizadas no Programa R versão 2.9.0 (R Development Core Team, 2009). A amostra final é composta por 484 indivíduos sendo 251 homens e 233 mulheres com idade entre 18 e 70 anos.

Para análise dos dados foi aplicado o teste estatístico de Shapiro-Wilk com a hipótese nula de normalidade. Como a distribuição dos dados brutos obtidos por ICMA e IRMA não indicaram normalidade, foram testadas três tipos de transformações dos dados originais.

As transformações BOX-COX, Raiz Quadrada e logarítmica foram comparadas. A análise dos dados recomendou a transformação Logarítmica para os valores de IGF-I dosados pela metodologia ICMA, e a transformação Raiz Quadrada para valores de IGF-I dosados pela metodologia IRMA, a fim de serem estabelecidos os valores de referência de normalidade para IGF-I. Os dados foram transformados, calculados média  $\pm 1$  SD e  $\pm 2$  SD, e depois transformados de volta à escala original (45).

Para avaliar a existência ou não de diferença estatisticamente significativa dos valores de IGF-I entre os sexos, foi realizado o Teste de Slope. Este Teste avaliou a interação entre sexo e idade, comparando duas regressões lineares com o mesmo ponto de corte. Foram aplicados testes entre os sexos com vários pontos de corte etários.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Os valores de referência dos *kits* comerciais usados neste estudo foram estabelecidos para outras populações com características distintas da população brasileira. Até o momento, que seja do nosso conhecimento, existe apenas um estudo avaliando valores de referência para IGF-I numa população brasileira, com indivíduos da região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais (38), utilizando o *kit* comercial ICMA-*Immulite* 2000/DPC, e nenhum estudo avaliando valores de referência para IGF-I, numa população brasileira, usando o *kit* comercial IRMA-*ACTIVE* IGF-I/DSL-5600.

Considerando a necessidade de estabelecer valores de referência locais, específicos para cada metodologia, e que o Brasil é um país de proporções quase continentais, os dois estudos realizados por Leite et al (46) e Leite al (47), que são discutidos nessa tese, têm como objetivo determinar valores de referência para IGF-I, em uma população adulta brasileira da cidade do Rio de Janeiro, por estes dois métodos de dosagem sérica, através de uma amostragem significativa de indivíduos saudáveis.

### 2.2 Objetivos específicos

- Definir valores de referência de IGF-I, para o ICMA-*Immulite* 2000/DPC, em adultos saudáveis da cidade do Rio de Janeiro.
- Definir valores de referência de IGF-I, para o IRMA-*ACTIVE* IGF-I/DSL-5600, em adultos saudáveis da cidade do Rio de Janeiro.

### 3 ARTIGOS PUBLICADOS

3.1 ARTIGO 1 – Serum insulin-like growth factor-I adult reference values for an automated chemiluminescence immunoassay system. Afr J Biotechnol 2011; 10: 18027-18033.

Neste artigo, o objetivo principal foi definir valores de referência de IGF-I, para o ICMA-*Immulite* 2000/DPC, em adultos saudáveis da cidade do Rio de Janeiro.

*Full Length Research Paper*

## Serum insulin-like growth factor-I adult reference values for an automated chemiluminescence immunoassay system

Denise Boechat Leite<sup>1\*</sup>, Ricardo Martins-da-Rocha Meirelles<sup>1</sup>, Carlos Alberto Mandarin Lacerda<sup>2</sup>, Haroldo José de Matos<sup>3</sup> and Mario Bernardo-Filho<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Instituto Estadual de Diabetes e Endocrinologia Luiz Capriglione and Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>2</sup>Laboratório de Morfometria, Metabolismo e Doença Cardiovascular, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>3</sup>Departamento de Tecnologias da Informação e Educação em Saúde, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>4</sup>Departamento de Biofísica e Bioeméria, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

Accepted 17 October, 2011

**Analysis of insulin-like growth factor I (IGF-I) in serum is fundamental in order to aid in the diagnosis growth hormone (GH)-related disorders, as well as in the diagnosis and follow-up of other diseases. Considering the importance of IGF-I local normal range, the aim of this study was to determine reference values for IGF-I (Immulite 2000) in a Brazilian adult population from the city of Rio de Janeiro. This study included samples of blood taken from 484 healthy subjects (251 men, 233 women) aged 18 to 70. The subjects agreed with this study, approved by the ethical committee of the Instituto Estadual Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti, Rio de Janeiro, Brazil. The samples were analyzed by automated immunochemiluminometric assay (ICMA). For data analysis, age and sex-specific figures were fitted after transformation of IGF-I values. In adulthood, a slow age-dependent decrease was seen. IGF-I in women were significantly higher than in men. The present study established age- and sex-specific IGF-I reference values, for the healthy Brazilian adult population from the city of Rio de Janeiro determined with the currently most widely used IGF-I assay used in Brazil (Immulite 2000).**

**Key words:** Insulin-like growth factor I, chemiluminescence assay, reference range.

### INTRODUCTION

Serum insulin-like growth factor I (IGF-I) assays have been found to be useful as a screening test for the presence of growth hormone (GH) deficiency and to monitor the response to GH treatment in adults (Drake et al., 2001). IGF-I has also been found very important in establishing the diagnosis of acromegaly (Cordero and

Barkan, 2008) and in monitoring the response to treatment of acromegaly (Roemmler et al., 2009). In these applications in GH-related disorders, studies have focused on a possible relation between IGF-I levels and the risk for certain malignancies as well as a prognostic significance of IGF-I levels in patients with malignant diseases (Janssen et al., 2004). Friedman et al. (2011) reported a relation between IGF-I and mortality in male primary care patients. These comments indicate that analysis and interpretation of IGF-I levels shall comprise an important component in the diagnosis and follow-up of GH-related disorders (Ben-Shlomo and Mamed, 2001). It

\*Corresponding author. E-mail: [bernardofilho@gmail.com](mailto:bernardofilho@gmail.com).

**Abbreviations:** IGF-I, Insulin-like growth factor I; GH, growth hormone; ICMA, immunochemiluminometric assay.

**Table 1.** Age and sex distribution of the studied population .

Subject	Age (year)							All subject
	18-20	21-25	26-30	31-40	41-50	51-60	61-70	
Men	30	38	37	36	37	40	33	251
Women	31	37	31	34	34	32	34	233
Total	61	75	68	70	71	72	67	484

imperative that uniform interpretations of IGF-I levels be achieved by improving the standardization and inter-laboratory comparability of IGF-I analysis procedures (Quarmby et al., 1998). This includes the establishment of normative data in representative populations by valid immunoassays and by considering non-GH-related factors known to influence IGF-I concentrations like age and sex (Ranke et al., 2001, 2003; Barkan et al., 2007). Despite of the well known necessity of IGF-I local reference range (Clemmons, 2007), to our knowledge, there is only one study evaluating IGF-1 reference range in the Brazilian population (Rosario, 2010), with people from the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais State.

The determination of the serum levels of IGF-I has been performed by some methods, as the immunoradiometric assay (IRMA) and the immunochemiluminometric assay (ICMA). ICMA has been widely used in the world in determination of the values of the IGF-I and other biological markers in the human serum (Brabant et al., 2003; Friedrich et al., 2011). The Immulite 2000 assay is an ICMA commercial kit (IMMULITE/ IMMULITE IGF-1, 2006). Nowadays, the ICMA (Immulite 2000), chosen in this study is the assay currently used at various Neuroendocrinology centers and clinical analysis laboratories in Rio de Janeiro city, as in the most part of Brazil (Rosario, 2010). In the case of the assay tested in this present study, the reference values are derived from a German population (Elmlinger, 2004).

To improve IGF-I measurement, the calibration of assays against a new preparation of recombinant human IGF-I (rhIGF-I) produced by the WHO First International Standard (WHO IS 02/254) has been recommended (Burns et al., 2009; Clemmons, 2011).

Considering the necessity to determine local normal ranges and because Brazil is an almost continental country, the aim of this study was to determine reference values for IGF-I (Immulite 2000) in a healthy Brazilian adult population from the city of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro State.

## MATERIALS AND METHODS

### Ethical approach

Subjects were either selected from blood-bank donors or general population. Informed consent was obtained from all the subjects. This study protocol had been approved by the ethical committee of

the Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

### Excluded criteria

Subjects that has taken any medications that interfere in IGF-I analyses (contraceptive drugs, estrogens, corticosteroids) were not considered to be in this investigation. Also, subjects with renal diseases, liver diseases, malignant disorders, diabetes mellitus and diseases of the pituitary gland, were excluded from this investigation. These information were obtained directly by medical history in a private interview.

### Subjects

IGF-I was determined in samples from 484 healthy subjects (251 men, 233 women) aged from 18 to 70 (Table 1), selected from blood-bank donors or general population of the Rio de Janeiro city, Brazil. Seven groups divided according to age were pre-defined, with a minimum of 60 subjects per group (Ranke et al., 2003). Since the need of different reference values for men and women is not clear (Brabant and Wallaschofski, 2007), each group was divided into two subgroups (at least 30 men and 30 women). Each participant selected was allocated according to gender and age until the predefined number of subjects per subgroup was completed.

### Serum samples

The subjects were from the Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Samples of 10 ml of venous whole blood were collected, in fasting state, between 8 and 10 h, in plastic gel barrier tubes not containing any anticoagulant. Furthermore, these samples were routinely sent to the Laboratório Helion Póvoa, Rio de Janeiro, Brazil to be processed with a maximum time interval of 90 min between sampling and freezing. Serum was separated and stored frozen at -20°C up to the analysis. Samples were assayed within 2 to 3 months after sampling. Grossly hemolytic, lipemic or icteric samples were excluded. Prior to the IGF-I determination, the samples were allowed to reach room temperature.

### Analysis of IGF-I

Serum IGF-I concentrations were determined by an automated, two-site immunochemiluminescent assay system (Immulite 2000/ Diagnostic Products Corp., Los Angeles, CA). Immulite 2000 IGF-I is a solid-phase, enzyme-labeled chemiluminescent immunometric assay with an analytical sensitivity of 25 µg/L, intra- and interassay coefficient of variation < 8%, standards calibrated against the WHO IS 87/518 preparation (Bristow, 1990), and the reference values provided by the manufacturer (Elmlinger et al., 2004). The steps of

**Table 2.** Serum IGF-I (ng/ml) reference ranges for Immulite 2000 at ages 18 to 70.

Parameter	-2SD	-1SD	Mean	+1SD	+2SD
<b>ICMA – Men age in years</b>					
18 - 20	177.68	230.44	298.87	387.61	502.70
21 - 25	149.61	194.03	251.64	326.36	423.27
26 - 30	96.06	140.47	205.41	300.37	439.22
31 - 40	105.95	137.41	178.22	231.13	299.77
41 - 50	70.18	99.58	141.32	200.54	284.58
51 - 60	82.02	106.38	137.96	178.93	232.06
61 - 70	71.74	95.87	128.12	171.23	228.83
<b>ICMA – Women age in years</b>					
18- 20	178.39	238.41	318.62	425.81	569.07
21 - 25	173.12	226.78	297.08	389.16	509.79
26 - 30	100.99	143.31	203.36	288.59	409.53
31 - 40	84.02	126.60	190.76	287.44	433.11
41 - 50	81.45	112.17	154.47	212.72	292.95
51 - 60	54.65	84.86	131.76	204.59	317.67
61 – 70	54.93	77.94	110.61	156.96	222.74

the protocol to the assays have followed manufacturer indications (IMMULITE/IMMULITE IGF-1, 2006). Briefly, this system uses beads coated with monoclonal murine anti-IGF-I for capture and alkaline phosphatase (bovine calf intestine) conjugated to polyclonal rabbit anti-IGF-I in buffer for detection. The antibody is highly specific for IGF-I. Measurement of IGF-I in serum is complicated by the presence of acid-labile components and binding proteins. Acid treatment is necessary to release IGF-I to ensure accurate quantitation. Subject samples are acidified to separate IGF-I from IGF binding proteins. This displacement method was found to be very accurate. Calibration range is up to 1600 ng. Analytical sensitivity is 20 ng/ml.

To ensure proper instrument performance and allow the comparison between runs, IGF-I control samples (three levels) were analyzed in each batch of reference samples. All runs with one or more controls out of given ranges (mean  $\pm$  2 SD) were recalibrated until all controls were in range.

#### Statistical analysis

In order to find a scale with as constant variance as possible for the observations, different transformations of the IGF-I values were compared (BOX-COX (p-value <0.001), square root (p-value < 0.001), log (p-value 0.27)). The analysis of the data recommended logarithmic transformation of IGF-I data to establish normal ranges (Armitage et al., 2002). The reference range was defined using logarithmic transformation of the values obtained, calculation of the mean  $\pm$  1 and  $\pm$  2 SD of these values, and exponentiation to obtain the limits corresponding to the original scale (Brabant et al., 2003; Elminger et al., 2004; Massart and Poirier, 2006). Then, we decided to fit age and sex-specific evaluations following data transformation.

Gender contribution was tested in the final analysis. Potential interaction between age and gender was tested using Slope test for men and women data at three different cut levels: 30, 40, and 50 years. R Program - version 2.9.0 (R Development Core Team,

2009) was used for the statistical analyses.

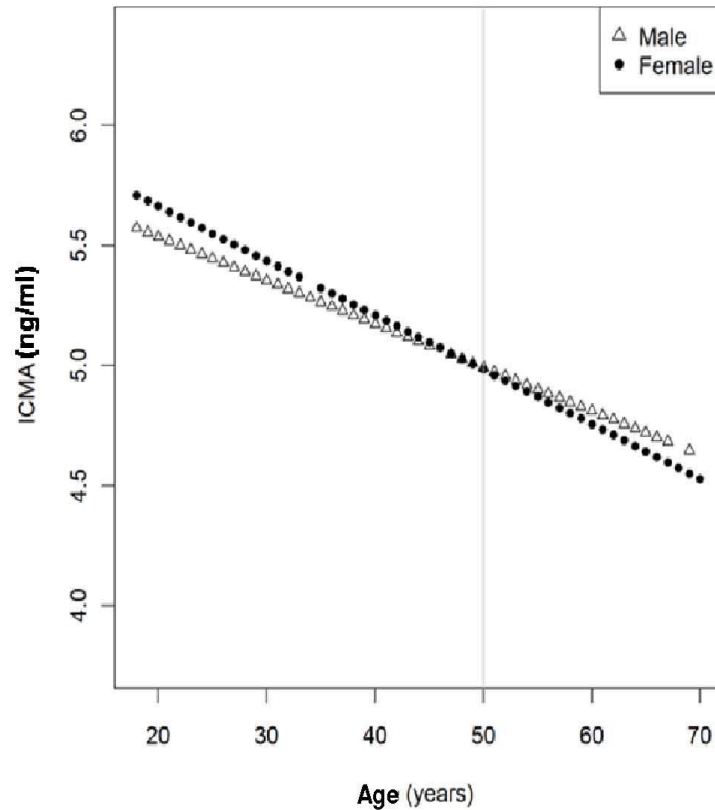
#### RESULTS

The transformation that best converted these IGF-I data to normal distribution was the power 0.27. Mean value, SD and reference limits was calculated on the IGF-I<sup>0.27</sup> scale and then transformed back (Table 2).

As shown in Figure 1, the intersection between men and women curves represented interaction between age and gender, with an inversion between men and women results around 50 years of age. Women had statistically ( $p < 0.05$ ) higher values than men up to 50 years of age. After 50 years of age, women had slightly lower values.

The mean and standard deviation (SD) of the IGF-I values were dependent on age. After puberty peak, serum IGF-I decreased rapidly to approximately 25 years of age. From there, a slow decrease began, persisting up to at least 70 years of age (Figure 2 and Table 2).

When Slope Test was used incorporating an interaction between gender and age, the data showed a statistically significant difference in levels between men and women. The p-value for both genders was 0.0181. Due to this significant effect of gender and of different standard deviation sizes, we decided to fit two separate figures, one for each gender as shown in Figure 2a, Figure 2b. Table 2 shows read values from Figure 2a, b for ages 18 year up to 70 for men and women. The difference between fitted gender-specific means was greatest between ages 18 and 25, when women had fitted means 19 to 45 ng/ml higher. Between ages 25 to 50 women



**Figure 1.** Slope test for men and women data with cut level at 50 years; slope test between genders – ICMA (p-value: 0.0181).

had fitted means around 12 ng/ml higher. At ages above 50, men had 6 to 17 ng/ml higher mean values. The smallest between-gender difference was 2 ng/ml. This was seen between ages 26 and 30. Moreover, the reference range was a bit broader for women compared to men, for a given age (Table 2). The distribution of observed serum IGF-I values closely followed what was expected from the log normal distribution (Figure 2).

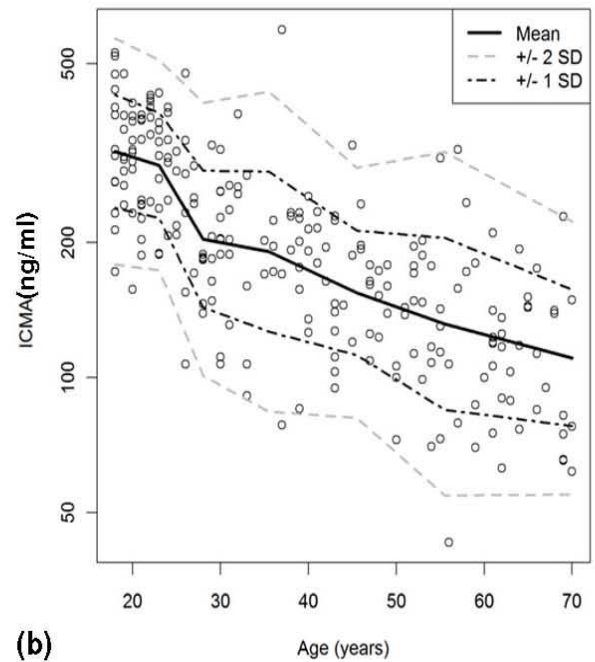
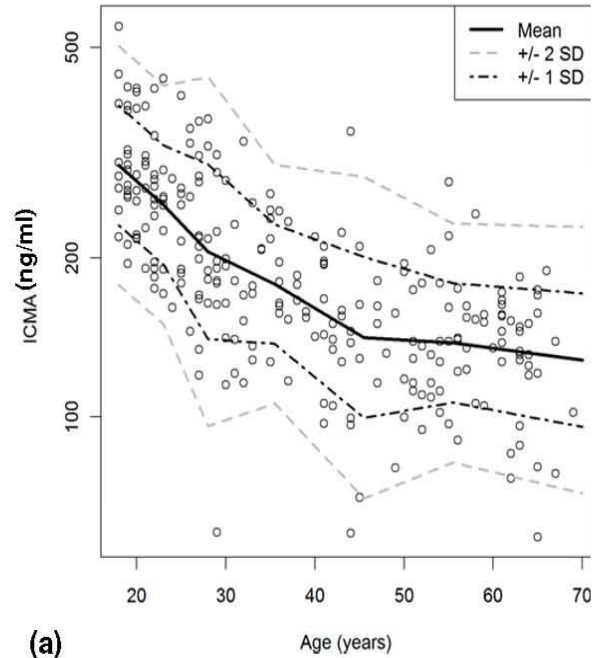
## DISCUSSION

IGF-I, while being GH-dependent, is also regulated by multiple other factors including nutrient intake, nutritional status, thyroxine, estrogen, cortisol and genetic background. In addition, the individual levels of IGF-binding proteins (IGFBP) can have major influences on IGF-I levels (Clemmons, 2007). Considering these knowledge, local reference range should be established (Clemmons, 2007). Brazil is an almost continental country and the only one studying evaluating IGF-1 reference range in the Brazilian population, done with people from the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais (Rosario,

2010).

The aim of this investigation was to generate data for IGF-I (Immulite 2000) in a clinically well-characterized healthy Brazilian adult population from the city of Rio de Janeiro, under normal routine situation. In this present study, reference values for IGF-I was established based on a large number of healthy subjects between ages 18 and 70. The results of this study were substantially different from the results of the another one performed with subjects from the metropolitan region of Belo Horizonte, Brazil (Rosario, 2010), supporting the necessity of establishment of local reference range. In this study of Rosario (2010), no difference in IGF-I levels was observed between genders.

The need for assay-specific IGF-I reference values has been well established. The Immulite 2000 assay used in this study is yet standardized against the WHO IS 87/518. Otherwise, this method is widely used at various Neuroendocrinology centers and clinical analysis laboratories in Brazil (Rosario, 2010) and in others countries (Elmlinger, 2004). This fact has stimulated the realization of our investigation with this commercial assay. In the future, this automated assay probably will



**Figure 2.** Serum IGF-I data as function of age. The figure presents the individual values of the 484 healthy subjects (251 men and 233 women) as well as the curves for the fitted mean,  $\pm 1$  SD and  $\pm 2$  SD functions. Scattergrams are given for men (Figure a) and women (Figure b) separately, after logarithmic transformation. (a)- IGF-I data as function of age for men, (b)- IGF-I data as function of age for women.

be calibrated against the WHO IS 02/254 and reference values will be determined using this recalibrated assay.

The major variability of reference laboratory assays for establishing useful normative data seems to be the number of subjects collected (Clemmons, 2007). If adequate numbers of subjects are collected, then normal ranges should be reasonably comparable across various assays methodologies. In a study by Ranke et al. (2003) using 427 normal adults, in which a standard radioimmunoassay using excess IGF-II was compared to an IRMA and an ICMA assay, there was excellent comparability. The correlation coefficients varied between 0.79 and 0.87 for the 427 normal adults. Thus, for establishment of normal ranges, it is likely that techniques that use high affinity, high specificity antibodies and some method for eliminating binding protein interference will give reproducible comparisons for values within the normal range, if adequate numbers of subjects are collected.

By having a large number of healthy subjects involved in this work to establish reference ranges for an analyte, it was possible to eliminate systematic analytical errors before the reference samples were analyzed. In our study, our findings have involved 484 subjects. The size of this investigation is close to the study reported by Ranke et al. (2003).

Logarithmic transformation of IGF-I data approach makes the reference values well suited for monitoring of IGF-I levels by Immulite 2000/DPC system. Moreover, the authors recommend logarithmic transformation of normative data to establish normal ranges, since the normative dataset follow a lognormal distribution (Armitage et al., 2002).

IGF-I values rise from birth until puberty and then decline with advancing age (Bagg et al., 2006; Brooke and Drake, 2007). Over the duration of the life span these changes are quite extensive, that is, from birth to puberty the values can increase by a mean of 5-fold and, conversely, between puberty and age 80 they can decline 3.5-fold. Therefore, it is necessary to establish age adjusted ranges (Brabant et al., 2003; Kwan and Hartman, 2007). During childhood, particularly in the years surrounding puberty, the age intervals need to be relatively narrow. No more than 3 to 4 years included in each group. In contrast, after age 30, the rate of decline of IGF-I was lower, so that grouping by decade was reasonable.

In adult subjects, our results show a steady decrease of serum IGF-I levels with age, which has already been demonstrated by other authors (Strasburger et al., 2001; Friedrich et al., 2008; Jones and Honour, 2006; Li et al., 2005; Massart and Poirier, 2006; Barkan, 2004). In addition to this, wellknown age-dependent IGF-I decrease, this study indicated a gender difference in the adult reference ranges with adult women until age 50, having slightly, but significantly higher IGF-I values than men. The gender difference was inverted after 50 years of age with men having slightly higher IGF-I values than

women. Moreover, the reference range for women were generally a bit broader compared to that of men. A possible explanation for these gender differences may be the effect of estrogen in women before menopause, which is well known to influence serum IGF-I levels (Anderson et al., 2001; Jernström et al. 2001).

Another finding of this study was that the values of some few reference samples differed significantly from the total mean. This result obviously reflects the influence of several factors which could affect IGF-I levels, as differences between subjects with respect to genetic background or nutritional status, pre-analytical influences like sample collection and storage, as well as analytical interferences (Chestnut and Quarmby, 2002; Yuen et al., 2004). The finding underlines the fact that selection of a representative reference population is a delicate task and that a big sample size reduces the risk of a non-desirable impact from a single or few subjects.

In conclusion, this present study has established age- and sex-specific serum IGF-I reference values for the Brazilian adult population from Rio de Janeiro city, based on a large number of healthy subjects, and with the currently most widely IGF-I assay used in Brazil (Immulite 2000/DPC). The reference values may be used in different laboratories, since systematic difference between systems is low using the same calibrators and establishing an efficient intra- and inter-laboratory control procedure.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Instituto Estadual de Hematologia – Arthur de Siqueira Cavalcanti, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, for providing serum samples from healthy adults and also to Dr. Carlos Eduardo Raymond, specialist in statistic analysis, for helping in the analysis of our findings.

## REFERENCES

- Anderson SM, Wideman L, Patrie JT, Weltman A, Bowers CY, Veldhuis JD (2001). E2 supplementation selectively relieves GH's autonegative feedback on GH-releasing peptide-2-stimulated GH secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86: 5904-5911.
- Armitage P, Berry G, Matthews JNS (2002). *Statistical Methods in Medical Research*, Blackwell Sci. Oxford, England.
- Bagg W, Aoina J, Cross PA, Whalley GA, Gamble GD, Doughty RN, Holdaway IM (2006). Serum IGF-I levels are similar in samoan, maori and european populations despite differences in body composition. *Growth Horm. IGF Res.* 16: 57-60.
- Barkan AL (2004). Biochemical markers of acromegaly: GH vs. IGF-I. *Growth Horm. IGF Res.* 14: 97-100.
- Barkan AL (2007). Defining normally of the somatotrophic axis. An attainable goal? *Pituitary*, 10: 135-139.
- Ben-Shlomo A, Malmmed S (2001). Acromegaly. *Endocrinol. Metab. Clin. North. Am.* 30: 565-583.
- Brabant G, Von Zur Muhlen A, Wuster C, Ranke MB, Kratzsch J, Kiess W, Ketelslegers JM, Wilhelmsen L, Hulthen L, Saller B, Mattsson A, Wilde J, Schemer R, Kann P (2003). Serum Insulin-like Growth Factor-I reference values for an automated chemiluminescence immunoassay system: Results from a multicenter study. *Horm. Res.*

- 60: 53-60.
- Brabant G, Wallaschofski H (2007). Normal levels of serum IGF-I determinants and validity of current reference ranges. *Pituitary*, 10: 129-133.
- Bristow AF, Gooding RP, Das RE (1990). The International Reference Reagent for insulin-like growth factor-I. *J. Endocrinol.* 125: 191-197.
- Brooke AM, Drake WM (2007). Serum IGF-I levels in the diagnosis and monitoring of acromegaly. *Pituitary*, 10: 173-179.
- Burns C, Rigsby P, Moore M, Rafferty B (2009). The First International Standard for Insulin-like Factor-1 (IGF-I) for immunoassay: preparation and calibration in a international collaborative study. *Growth Horm. IGF Res.* 19: 457-462.
- Chestnut RE, Quarby V (2002). Evaluation of total IGF-I assay methods using samples from Type I and Type II diabetic patients. *J. Immunol. Method.* 259: 11-24.
- Clemmons DR (2007). IGF-I assays: current assay methodologies and their limitations. *Pituitary*, 10: 121-128.
- Clemmons DR on the behalf of the conference participants (2011). Consensus statement on the standardization and evaluation of IGF-I assays. *Clin. Chem.* 57: 555-559.
- Cordero RA, Barkan AL (2008). Current diagnosis of acromegaly. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 9: 13-19.
- Drake WM, Howell SJ, Monson JP, Shalet SM (2001). Optimizing GH therapy in adults and children. *Endocr. Rev.* 22: 425-450.
- Elmlinger MW, Kühnel W, Weber MM, Ranke MB (2004). Reference ranges for two automated chemiluminescent assays for serum insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding protein 3 (IGFBP-3). *Clin. Chem. Lab. Med.* 42: 654-664.
- Friedrich N, Alte D, Volzke H, Spilcke-Liss E, Ludemann J, Lerch MM, Kohlmann T, Nauck M, Wallaschofski H (2008). Reference ranges of serum IGF-I and IGFBP-3 levels in a general adult population: Results of the Study of Health in Pomerania (SHIP). *Growth. Horm. IGF Res.* 18: 228-237.
- Friedrich N, Schneider H, Dörr M, Nauck M, Völzke H, Klotsche J, Sievers C, Pittrow D, Böhler S, Lehnert H, Pieper L, Wittchen HU, Wallaschofski H, Stalla GK (2011). *Growth Horm. IGF Res.* 21: 102-106.
- IMMULITE/IMMULITE IGF-I. Siemens Medical Solutions Diagnostics, PILKGF-10. (2006).
- Janssen JA, Wildhagen MF, Ito K, Blijenberg BG, Van Schaik RH, Roobol MJ, Pols HA, Lamberts SW, Schroder FH (2004). Circulating free Insulin-like Growth Factor I (IGF-I), total IGF-I, and IGF binding protein-3 levels do not predict the future risk to develop prostate cancer: Results of a case-control study involving 201 patients within a population-based screening with a 4-year interval. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89: 4391-4396.
- Jernström H, Deal C, Wilkin F, Chu W, Tao Y, Majeed N, Hudson T, Narod S, Pollak M (2001). Genetic and Nongenetic Factors Associated with Variation of Plasma Levels of Insulin-like Growth Factor-I and Insulin-like Growth Factor-binding Protein-3 in Healthy Premenopausal Women. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 10: 377-384.
- Jones AM, Honour JW (2006). Unusual results from immunoassays and the role of the clinical endocrinologist. *Clin. Endocrinol. (Oxf).* 64: 234-244.
- Kwan AY, Hartman ML (2007). IGF-I measurements in the diagnosis of adult Growth Hormone deficiency. *Pituitary*, 10: 151-157.
- Li HJ, Ji CY, Wang W, Hu YH (2005). A twin study for serum leptin, soluble leptin receptor, and free Insulin-like Growth Factor-I in pubertal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90: 3659-3664.
- Massart C, Poirier JY (2006). Serum Insulin-like Growth Factor-I measurement in the follow-up of treated acromegaly: Comparison of four immunoassays. *Clin. Chim. Acta.* 373: 176-179.
- Quarby V, Quan C, Ling V, Compton P, Canova-Davis E (1998). How much Insulin-like Growth Factor I (IGF-I) circulates? Impact of standardization on IGF-I assay accuracy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83: 1211-1216.
- Ranke MB, Feldt-Rasmussen U, Bang P, Baxter RC, Camacho-Hubner C, Clemmons DR, Juul A, Orskov H, Strasburger CJ (2001). How should Insulin-like Growth Factor-I be measured? A consensus statement. *Horm. Res.* 55: 106-109.
- Ranke MB, Osterziel KJ, Schweizer R, Schuett B, Weber K, Robbel P, Vormwald A, Blumenstock G, Elmlinger MW (2003). Reference levels of Insulin-like Growth Factor-I in the serum of healthy adults: Comparison of four immunoassays. *Clin. Chem. Lab. Med.* 41: 1329-1334.
- Roemmler J, Steffin B, Gutt B, Sievers C, Bidlingmaier M, Schopohl J (2009). The effect of acute application of pegvisomant alone and in combination with octreotide on endogenous GH levels during a 6-h test in patients with acromegaly on constant pegvisomant treatment. *Growth Horm. IGF Res.* 19: 245-251.
- Rosario PW (2010). Normal values of serum IGF-1 in adults: results from a Brazilian Population. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* 54: 477-481.
- Strasburger CJ, Bidlingmaier M, Wu Z, Morrison KM (2001). Normal values of Insulin-like Growth Factor-I and their clinical utility in adults. *Horm. Res.* 55: 100-105.
- Yuen K, Frystyk J, Umpleby M, Fryklund L, Dunger D (2004). Changes in free rather than total Insulin-like Growth Factor-I enhance insulin sensitivity and suppress endogenous peak Growth Hormone (GH) release following short-term low-dose GH administration in young healthy adults. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89: 3956-3964.

3.2 **ARTIGO 2** - Determination of insulin-like growth factor-I reference values using an immunoradiometric assay in a Brazilian adult population. *Indian J Med Sci.* 2013; *in press.*”

Neste artigo, o objetivo principal foi definir valores de referência de IGF-I, para o IRMA-ACTIVE IGF-I/DSL-5600, em adultos saudáveis da cidade do Rio de Janeiro.

**Determination of Insulin-like Growth Factor-I reference values using an immunoradiometric assay in a Brazilian adult population**

Denise B Leite<sup>1,2\*</sup>, Ricardo MR Meirelles<sup>1\*</sup>, Carlos A Mandarim-de-Lacerda<sup>3\*</sup>, Haroldo J Matos<sup>4</sup>, Sebastião D Santos-Filho<sup>5</sup>, Mario Bernardo-Filho<sup>5\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto Estadual de Diabetes e Endocrinologia Luiz Capriglione, Rio de Janeiro, RJ, Brazil;

<sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil; <sup>3</sup>Laboratório de Morfometria, Metabolismo e Doença Cardiovascular, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil;

<sup>4</sup>Departamento de Tecnologias da Informação e Educação em Saúde, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; <sup>5</sup>Departamento de Biofísica e Bioemtria, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

\*These authors contributed equally to this work

Email addresses: DBL: [deniseboechat@globocom.com](mailto:deniseboechat@globocom.com); RMRM: [r.meirelles@terra.com.br](mailto:r.meirelles@terra.com.br);

CAML: [mandarim@uerj.br](mailto:mandarim@uerj.br); SDSF: [sdavidsfilho@gmail.com](mailto:sdavidsfilho@gmail.com); MBF:

[bernardofilhom@gmail.com](mailto:bernardofilhom@gmail.com);

---

## Abstract

**Background:** Serum levels of total insulin-like growth factor I (IGF-I) reflects endogenous GH secretion in healthy adults, which makes it a good diagnostic marker for screening of GH-related disorders. Studies also have supported a possible relation between IGF-I levels and the risk and prognostic for some malignancies, besides a relation between IGF-I levels and mortality. **Objective:** As the determination of the IGF-I normal values for local populations is strongly desired, the aim of this investigation was to determine reference values for IGF-I using an immunoradiometric assay in an adult Brazilian population of Rio de Janeiro city, since there is no other study using this methodology in Brazilian population, and that this method is widely used in Brazil and worldwide. **Methods:** The study included samples of blood taken from 484 healthy subjects (251men, 233 women) aged 18 to 70. The subjects agreed with this study, approved by the Ethical Committee of the *Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti*, Rio de Janeiro, Brazil. The samples were analyzed using a Diagnostic System Laboratories kit. For data analysis, age and sex-specific figures were fitted after transformation of IGF-I values. **Results:** In adulthood, a slow age-dependent decrease was found. There was no significant difference between men and women IGF-I values. **Conclusion:** The present study established age-specific IGF-I reference values, for a healthy Brazilian adult population, determined by a widely IGF-I immunoradiometric assay used currently in Brazil.

**Keywords:** Brazilian population, Immunoradiometric assay, Insulin-like Growth Factor-I, Reference values.

## Background

Insulin-like growth factor-I (IGF-I) has become common in practice of endocrinologists because it has great clinical utility. IGF-I concentrations are not influenced by many variables that influence growth hormone (GH) levels [1]. IGF-I assays have been found to be useful as a screening test for the presence of GH deficiency and to monitor the response to GH treatment in adults [2], in establishing the diagnosis [3] and monitoring treatment of acromegaly [4, 5]. Studies have also related IGF-I levels and risk for certain malignancies [6] and for many others clinical disorders [7, 8, 9, 10].

IGF-I is regulated by multiple factors including nutritional status, cortisol, thyroxin, and estrogen. The levels of IGF-binding proteins (IGFBP) also have influence on IGF-I levels. Chronological age and reference ranges [11] are two factors that impact on interpretation of IGF-I assays results. It is imperative the establishment of normal data in representative population considering age [12-14], but the necessity of reference values considering gender is not clear in the literature [15].

The determination of the serum levels of IGF-I has been widely performed by immunoradiometric assay (IRMA) worldwide. [8, 16]. The assay chosen for this study is the IRMA ACTIVE IGF-I DSL-5600. It is a monoclonal-antibody-based immunoradiometric assay easy to perform, with a low detection limit and a short incubation time [16-18]. This assay is currently used in many Healthcare Centers, in Brazil and worldwide [8, 16-18].

Despite the well known necessity of assay-specific and local IGF-I reference values [1, 19], there is no other study evaluating IGF-I reference range in the Brazilian population using the methodology chosen in this study, what causes, sometimes, doubts in diagnosis and treatment monitoring of Brazilian patients evaluated by this method, since, until now, there was no appropriate reference range for them. It was the main motivation for performing this study, considering it is not appropriate to use, for Brazilian population, reference ranges established for other populations.

There are just two other published studies evaluating IGF-I reference range in Brazilian populations [20, 21], but they used another methodology, totally distinct from that used in this study, and thus, they are not applicable to this IRMA kit.

Therefore, the aim of this study was to determine reference values for IGF-I in a health Brazilian adult population, using an IRMA/DSL commercial kit widely used in Brazil, considering the need to determine local normal ranges for this specific methodology.

## **Methods**

### **Ethical approach**

Subjects were either selected from blood-bank donors or general population, after carefully medical interview, respecting excluded criteria described below. Informed consent was obtained from all the subjects. The study protocol was approved by the Ethical Committee of the *Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti*, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

## **Excluded criteria**

All information was obtained directly by medical history in a private interview. All subjects who were using any medications that interfere in IGF-I analyses (contraceptive drugs, estrogens, corticosteroids), and subjects with renal diseases, liver diseases, malignant disorders, diabetes mellitus, and diseases of the pituitary gland, were not considered to be in this investigation.

### *Subjects*

IGF-I has been determined in samples from 484 healthy subjects (251 men, 233 women) aged from 18 to 70 years old, selected from blood-bank donors or general population of the Rio de Janeiro city, Brazil. They were divided in seven pre-defined groups according to age, with a minimum of 60 subjects per group [13]. Since the necessity of different reference values for men and women is not clear [15], each group was divided into two sub groups (at least 30 men and 30 women). Each participant selected was allocated according to gender and age until completing the predefined number of subjects per sub group.

## **Serum samples**

Samples of whole blood were taken from selected individuals at the *Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti*, Rio de Janeiro, Brazil. The samples were collected in plastic gel barrier tubes not containing any anticoagulant, and sent to the *Laboratório Helion Póvoa*, Rio de Janeiro, Brazil, to be processed within a time interval at most ninety minutes (centrifuged and frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  up to the analysis). Grossly hemolytic, lipemic or icteric samples were excluded. Prior to the IGF-I determination, the samples were allowed to reach to room temperature.

## **Analysis of IGF-I**

Serum IGF-I concentrations were determined by a two-site immunoradiometric assay described by Milles et al. [22], using the DSL-5600 Active kit (Diagnostic System Laboratories, Webster, TX), with an analytical sensitivity of 20 ng/ml.; intra- and inter-assay coefficient of variation  $<8,2\%$  and standards calibrated against the WHO IS 87/518

preparation. Calibration range is up to 600 ng/ml. Acid treatment is necessary to release IGF-I to ensure accurate quantitation since measurement of IGF-I in serum is complicated by the presence of acid-labile components and binding proteins (IGFBPs). In this study, IGF-I was extracted from IGF-binding proteins by using the acid-ethanol extraction method. This displacement method was found to be very accurate [23-25]. The steps of the protocol to the assay have followed manufacturer indications. Briefly, this immunoradiometric assay uses plastic tubes coated with monoclonal anti-IGF-I for capture and polyclonal anti-IGF-I, labeled with  $I^{125}$ , in buffer, for detection. The antibody is highly specific for IGF-I. To ensure proper instrument performance and allow the comparison between runs, IGF-I control samples (three levels) were analyzed in each batch of reference samples. All runs with one or more controls out of given ranges (mean  $\pm$  2 SD) were recalibrated until all controls were in range.

### *Statistical analysis*

In order to find a scale with as constant variance as possible for the observations, different transformations of the IGF-I values were compared: (BOX-COX (p-value  $<0.001$ ), square root (p-value  $<0.627$ ), log (p-value  $0.001$ )). The analysis of the data recommended square root transformation of IGF-I data to establish normal ranges [26]. The reference range was defined using square root transformation of the values obtained, calculation of the mean  $\pm$  1 SD and  $\pm$  2 SD of these values, and then back transformed (Table 1), to obtain the limits corresponding to the original scale [27]. Gender contribution was tested in the final analysis. Potential interaction between age and gender was tested using Slope Test for men and women data at three different cut levels: 30, 40, and 50 years. R Program - version 2.9.0 (R Development Core Team, 2009) was used for the statistical analyses.

## **Results**

The transformation that best converted these IGF-I data to normal distribution was square root transformation. Mean value, SD and reference limits were calculated with transformed data, and then, transformed back (Table 1). The mean and standard deviation (SD) of the IGF-I values were dependent on age. After puberty peak, serum IGF-I decreased rapidly to approximately 25 years of age. From there, a slow decrease began, persisting up to at least 70 years of age (Figure 1; Table 1). Slope Test was used testing an interaction between gender and age. The data shown no statistically significant difference in levels between men and

women groups by the immunoradiometric assay used in this study. The p-value for both genders was 0.0832. Due to this no significant effect of gender, we fitted just one figure and one table for both genders as shown in Figure 1 and Table 1.

### ***Discussion***

IGF-I is regulated by multiple factors including genetic background, cortisol, nutritional status, thyroxine and estrogen. In addition, the individual levels of IGF-BP can have influence on IGF-I levels [1]. Considering these knowledge, local reference range should be established [1]. The necessity for assay-specific IGF-I reference values has also been well established [19]. Brazil is an almost continental country and no one published study evaluating IGF-I reference range in the Brazilian population, until now, was done with the methodology used in this study. The aim of the investigation was to generate data for IGF-I IRMA DSL-5600 Active kit (Diagnostic System Laboratories, Webster, TX), in a clinically well-characterized healthy Brazilian adult population of the Rio de Janeiro city, under normal routine situation.

To improve IGF-I measurement, the calibration of assays against a new preparation of recombinant human IGF-I (rhIGF-I) produced by the WHO First International Standard (WHO IS 02/254) has been recommended [28; 29]. The assay used in this study is yet standardized against the WHO IS 87/518.

Leite et al, 2011 [21], have performed a study evaluating the IGF-I reference range in people from Rio de Janeiro State, Brazil, but with another distinct methodology (ICMA). The reference values obtained in that study [21] can not be used for immunoradiometric assay, since it is already well established that IGF-I reference values need to be established for each specific methodology [19]. Other aliquots of serum samples used by Leite et al, 2011, were used to determine IGF-I values by IRMA assay. These two methodologies are often used nowadays for IGF-I analysis by many Health Care Centers in Brazil and worldwide [19]. Until this moment there was no study with Brazilian population to determine IGF-I reference ranges for immunoradiometric assay. This stimulated our study with this commercial assay. In the future, this assay probably will be calibrated against the WHO IS 02/254 and reference ranges will be determined again using the recalibrated assay.

The establishment of reference ranges for an analyte requires the analysis of a large number of reference samples, in order to be possible to eliminate systematic analytical errors. In the study by Ranke et al. [13] using 427 normal adults, in which a standard radioimmunoassay

using excess IGF-II was compared to an IRMA assay, there was excellent comparability. The correlation coefficients varied between 0.79 and 0.87 for the 427 normal adults. In our study, our findings have involved 484 subjects. The size of this investigation is close to the study reported by Ranke et al [13].

Square root transformation of IGF-I data approach makes the reference values well suited for monitoring of IGF-I levels by IRMA DSL-5600 Active kit. IGF-I values rise from birth until puberty and then decline with advancing age [30]. Throughout of the lifespan of an individual, authors have reported that these variations are quite important. Firstly, from the birth to the puberty the values can increase by a mean of 5-fold. Secondly, it has been reported, that, conversely, between the puberty and 80 years old, the values can decline 3.5-fold. Putting together these findings, it is desired to try to establish age adjusted ranges, as suggest by Brooke et al, 2007 [31] and we agree with this consideration.

Clemmons, 2007 [1] has suggested that during childhood, and particularly in the years surrounding puberty, the age intervals in the investigations need to be relatively narrow. It is proposed by Clemmons, 2007 [1], and we agree, that no more than 3–4 years would be included in each group. However, if it is considered a group of individuals with age after 30, as the rate of decline of IGF-I is lower in this group, it is possible to consider that grouping by decade would be reasonable [1].

In adult subjects, our results showed a steady decrease of serum IGF-I levels with age, which has already been demonstrated by other authors [27, 32, 33].

In the present study, no difference in IGF-I levels was observed between genders, differently from Leite et al, 2011, using another methodology [21]. Other studies also have failed to demonstrate such difference and their results were reported without distinction between genders [19, 27, 34], suggesting that these findings can be specific for different methodologies and may be dependent on the assay used [19]. The upper and lower limits (mean  $\pm$  2SD) related by Leite et al [21] study, for the same population, but using another methodology (ICMA), were different from those obtained in the present study (IRMA), confirming need to establish reference values for each specific assay, as has already been widely documented in the literature [1, 19]. Another finding of this study is that the values of some few reference samples differed significantly from the total mean. This result obviously reflects the influence of several factors which could affect IGF-I levels, as differences between subjects with respect to genetic background or nutritional status, pre-analytical influences like sample collection and storage, as well as analytical interferences [35]. The finding underlines the fact that selection of a representative reference population is a delicate

task and that a big sample size reduces the risk of a non-desirable impact from a single or few subjects.

## **Conclusions**

The present study has established age-specific serum IGF-I reference values for a Brazilian adult population, by a currently widely IGF-I assay used in Brazil (IRMA DSL-5600 Active), based on a large number of healthy subjects from Rio de Janeiro city. Until now there is no other study performed to determine IGF-I reference values for Brazilian population using IRMA. These reference values may be used for this methodology in different laboratories, since systematic difference between systems is low using the same calibrators and establishing an efficient intra- and inter-laboratory control procedure.

## **Abbreviations**

Insulin-like growth factor-I (IGF-I); Growth hormone (GH); Standardized mortality ratio (SMR); IGF-binding proteins (IGFBP); Immunoradiometric assay (IRMA); Immunochemiluminometric assay (ICMA).

## **Acknowledgements**

The authors thank *Instituto Estadual de Hematologia – Arthur de Siqueira Cavalcanti*, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, for providing serum samples from healthy adults. The authors thank very much Dr. Carlos Eduardo Raymundo, specialist in statistic analysis, for helping in the analysis of our findings.

## **Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

**Authors' contributions**

Denise B Leite worked directly with the subjects, and with the collaboration of Ricardo MR Meirelles in the elaboration of the text and the interpretation of the results, and also in the discussion and conclusions; Ricardo MR Meirelles, Carlos A. Mandarim-de-Lacerda and Haroldo J Matos contributed with the statistic analysis performed by Carlos E Raymundo; Sebastião D Santos-Filho contributed with the revision of the text and the formatting of tables, figures and the submission of the manuscript; Mario Bernardo-Filho have supervised this investigation and participated in all the process.

## References

1. Clemmons DR: IGF-I assays: current assay methodologies and their limitations. *Pituitary* 2007; 10: 121-128.
2. Drake WM, Howell SJ, Monson JP, Shalet SM: Optimizing GH therapy in adults and children. *Endocr Rev* 2001; 22: 425–450.
3. Cordero RA, Barkan AL: Current diagnosis of acromegaly. *Rev. Endocr. Metab Disord* 2008; 9: 13-19.
4. Roemmler J, Steffin B, Gutt B, Sievers C, Bidlingmaier M, Schopohl J: The effect of acute application of pegvisomant alone and in combination with octreotide on endogenous gh levels during a 6-h test in patients with acromegaly on constant pegvisomant treatment. *Growth Horm IGF Res* 2009; 19: 245-251.
5. Holdaway IM, Bolland MJ and Gamble GD: A meta-analysis of the effect of lowering serum levels of GH and IGF-I on mortality in acromegaly. *Eur J Endocrinol* 2008; 159: 89–95.
6. Janssen JA, Wildhagen MF, Ito K, Blijenberg BG, Van Schaik RH, Roobol MJ, *et al.* Circulating free Insulin-like Growth Factor I (IGF-I), total IGF-I, and IGF binding protein-3 levels do not predict the future risk to develop prostate cancer: Results of a case-control study involving 201 patients within a population-based screening with a 4-year interval. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 4391-4396.
7. Gao X, Xing D. Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation. *J Biom Sci* 2009; 16:4
8. Movérare-Skrtic S, Svensson J, Karlsson MK, Orwoll E, Ljunggren Ö, Mellström D, *et al.* Serum Insulin-Like Growth Factor-I concentration is associated with leukocyte telomere length in a population-based cohort of elderly men. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94: 5078–5084.
9. Friedrich N, Schneider H, Dörr M, Nauck M, Völzke H, Klotsche J, *et al.* All-cause mortality and serum insulin-like growth factor I in primary care patients. *Growth Horm IGF Res* 2011; 21: 102-106.
10. Ben-Shlomo A, Melmed S. Acromegaly. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2001; 30: 565-583.
11. Quarmby V, Quan C, Ling V, Compton P, Canova-Davis E. How much Insulin-like Growth Factor I (IGF-I) circulates? Impact of standardization on IGF-I assay accuracy. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 1211-1216.
12. Ranke MB, Feldt-Rasmussen U, Bang P, Baxter RC, Camacho-Hubner C, *et al.* How should Insulin-like Growth Factor-I be measured? A consensus statement. *Horm Res* 2001; 55: 106–109.

13. Ranke MB, Osterziel KJ, Schweizer R, Schuett B, Weber K, Robbel P, *et al.* Reference levels of Insulin-like Growth Factor-I in the serum of healthy adults: Comparison of four immunoassays. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41: 1329-1334.
14. Barkan AL. Defining normalcy of the somatotropic axis. An attainable goal? *Pituitary* 2007; 10:135-139.
15. Brabant G, Wallaschofski H. Normal levels of serum IGF-I determinants and validity of current reference ranges. *Pituitary* 2007; 10: 129-133.
16. Scott MG, Cuca GC, Petersen JR, Lyle LR, Burielgh BD, Daughaday WH. Specific Immunoradiometric Assay of Insulin-like Growth Factor I with use of Monoclonal Antibodies. *Clin. Chem* 1987; 33: 2019-2023.
17. Eliakim A, Nemet D, Zaldivar F, McMurray RG, Culler FL, Galassetti P, Cooper DM. Reduced exercise-associated response of the GH-IGF-I axis and catecholamines in obese children and adolescents. *J Appl Physiol* 2006; 100:1630-1637.
18. Bereket A, Lang CH, Blethen SL, Gelato MC, Fan J, Frost RA, *et al.* Effect of insulin on the insulin-like growth factor system in children with new-onset insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80:1312-1317.
19. Granada ML, Ulied A, Casanueva FF, Pico A, Lucas T, Torres E, Sanmarti 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)* 2008; 68: 942-50.
20. Rosario, PW. Normal values of serum IGF-1 in adults: results from a Brazilian Population. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2010; 54: 477-481.
21. Leite DB, Meirelles R M R, Mandarim-de-Lacerda C A, Matos H J and Bernardo-Filho M. Serum insulin-like growth factor-I adult reference values for an automated chemiluminescence immunoassay system. *Afr J Biotechnol* 2011; 10 (78): 18027-18033.
22. Milles LEM, Lipschitz DA, Bieber CP and Cook JD. Measurement of serum ferritin by a 2-site immunoradiometric assay. *Analit Biochem* 1974; 61: 209-224.
23. Daughaday E, Rotwein P: Insulin-like Growth Factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum and tissue concentrations. *Endocrin Review* 1989; 10: 68-91.
24. Powell DR, Rosenfeld RG, Baker BK, Liu F, Hintz EL. Serum somatomedin levels in adults with chronic renal failure. The importance of measuring Insulin-like Growth Factors I and II in acid-chromatographed uremic serum. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 63: 1186-1192.
25. Conover CA, Lee PDK, Kanoley JA, Clarkson JT, Jensen MD. Insulin regulation of Insulin-like Growth Factor Binding Protein-I in obese and nonobese humans. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74: 1355-1360.
26. Armitage P, Berry G, Matthews JNS: *Statistical Methods in Medical Research*. 4<sup>th</sup> ed. Oxford: Blackwell Science; 2002.

27. 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* 2006; 373: 176-179.
28. Burns C, Rigsby P, Moore M, Rafferty B. The First International Standard for Insulin-like Factor-1 (IGF-I) for immunoassay: preparation and calibration in a international collaborative study. *Growth Horm IGF Res* 2009; 19: 457-462.
29. Clemmons DR on the behalf of the conference participants. Consensus statement on the standardization and evaluation of IGF-I assays. *Clin Chem* 2011; 57: 555-559.
30. Kwan AY, Hartman ML. IGF-I measurements in the diagnosis of adult Growth Hormone deficiency. *Pituitary* 2007; 10: 151-157.
31. Brooke AM, Drake WM. Serum IGF-I levels in the diagnosis and monitoring of acromegaly. *Pituitary* 2007; 10: 173-179.
32. Friedrich N, Alte D, Volzke H, Spilcke-Liss E, Ludemann J, Lerch MM. Reference ranges of serum IGF-I and IGFBP-3 levels in a general adult population: Results of the Study of Health in Pomerania (SHIP). *Growth Horm IGF Res* 2008; 18: 228-237.
33. Jones AM, Honour JW. Unusual results from immunoassays and the role of the clinical endocrinologist. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006; 64: 234-244.
34. Elmlinger MW, Kühnel W, Weber MM, Ranke MB. Reference ranges for two automated chemiluminescent assays for serum insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding protein 3 (IGFBP-3). *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 654-64.
35. Chestnut RE, Quarmby V. Evaluation of total IGF-I assay methods using samples from Type I and Type II diabetic patients. *J Immunol Methods* 2002; 259: 11-24.

**Table**

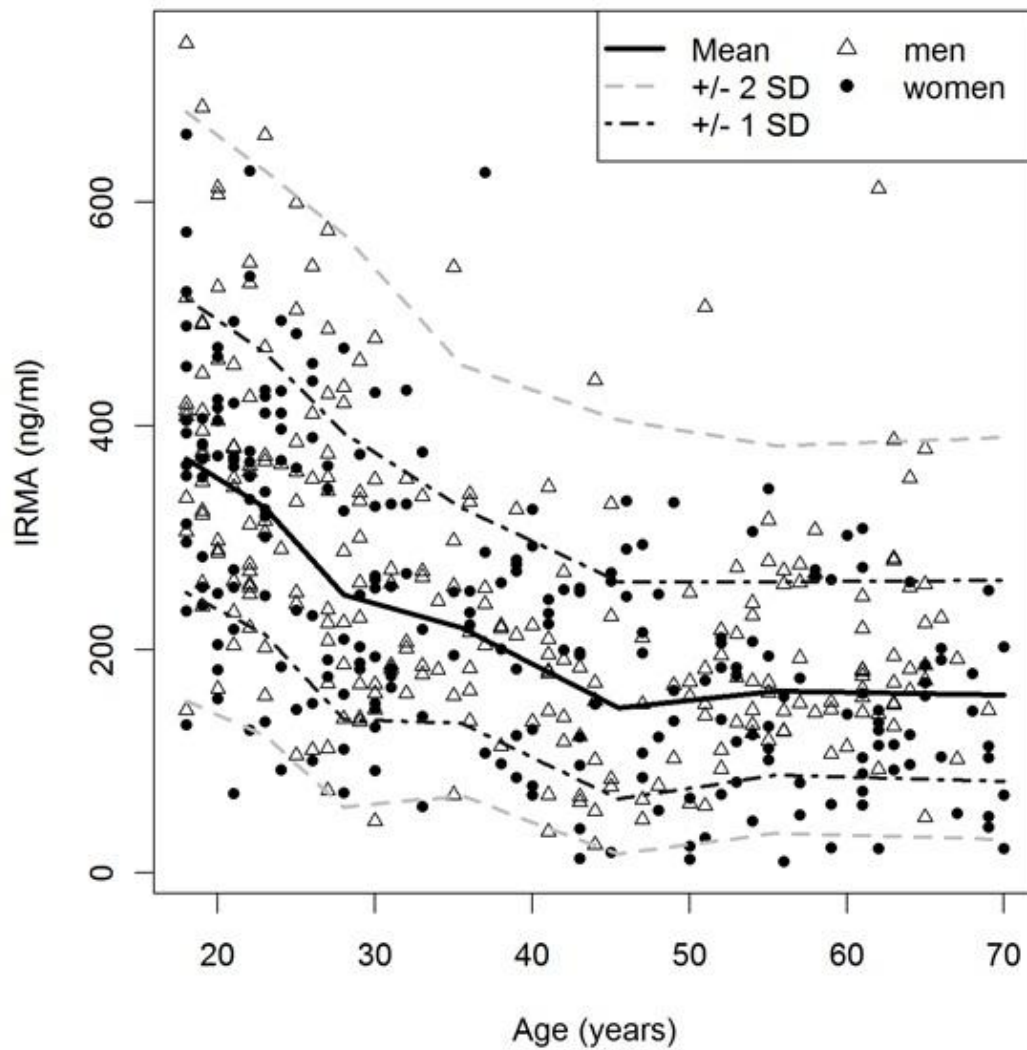
Table 1 - Serum IGF-I (ng/ml) reference ranges for IRMA DSL at ages 18 to 70 for Men/Women

<b>Age in years</b>	<b>-2SD</b>	<b>-1SD</b>	<b>Mean</b>	<b>+1SD</b>	<b>+2SD</b>
18 a 20	154.06	250.65	370.64	514.02	680.79
21 a 25	123.34	213.04	327.10	465.52	628.30
26 a 30	58.72	137.43	249.10	393.74	571.35
31 a 40	69.21	133.84	219.60	326.49	454.50
41 a 50	17.41	66.63	147.70	260.60	405.34
51 a 60	35.40	87.42	162.56	260.82	382.20
61 a 70	30.20	81.99	159.14	261.63	389.47

**Figure**

Figure 1 - IGF-I data related to age for men and women IRMA-DSL.

Figure presents the individual values of the 484 healthy subjects (251 men and 233 women) as well as the curves for the fitted mean,  $\pm 1$  SD and  $\pm 2$ SD functions before transformation data.



## 4 DISCUSSÃO

A necessidade de definir valores de normalidade de IGF-I para cada população já está bem estabelecida, devido aos inúmeros fatores que influenciam suas concentrações, como estado nutricional, uso de tiroxina, drogas anticoncepcionais, estrógenos, corticosteróides e fatores genéticos (14, 17, 18, 25-28, 35-37).

É fundamental que os laboratórios forneçam valores de referência específicos para cada metodologia, por idade, adequados à sua população, e estabelecidos numa população representativa (10, 11, 14, 23, 48). Apesar disto, existe apenas um estudo, de nosso conhecimento, avaliando valores de referência em uma população brasileira (38) com indivíduos da região metropolitana de Belo Horizonte, estado de Minas Gerais utilizando o *kit* comercial ICMA- *Immulite* 2000/DPC, e nenhum estudo com população brasileira utilizando *kit* comercial IRMA- *ACTIVE* IGF-I/DSL-5600, apesar deste ensaio imunorradiométrico também ser um ensaio frequentemente usado não apenas no Brasil, mas também no mundo (49-51). Considerando a dimensão territorial do Brasil, este estudo (46,47) determinou valores de referência para estas duas metodologias numa população da cidade do Rio de Janeiro, estado do Rio de Janeiro, com características demográficas bastante diversas das da outra cidade avaliada anteriormente (38).

Ressaltamos que os resultados encontrados para a metodologia ICMA, publicados por Leite *et al*, 2011 (46), não podem ser usados para o ensaio IRMA (47), uma vez que os valores de referência para IGF-I devem ser estabelecidos para cada metodologia específica (52). Para determinar os valores de referência para IGF-I pela metodologia IRMA (47), foram usadas outras alíquotas, fracionadas das mesmas amostras de soro usadas por Leite *et al*, 2011, para determinar os valores de referência para IGF-I pela metodologia ICMA (46).

Os valores de referência, fornecidos pelos fabricantes de *kits* para uso nas rotinas de laboratórios, geralmente não fornecem detalhes da descrição de como os intervalos de referência foram determinados, como por exemplo os fatores de particionamento da amostra, tamanho da amostra, diferenciação por sexos, dentre outros (53). Com o objetivo de melhorar a padronização dos métodos para se estabelecer intervalos de referência, o *International Federation of Clinical Chemistry* (IFCC) e o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) estão desenvolvendo trabalhos conjuntos. No encontro da *American Association for Clinical Chemistry* (AACC) em 2007, em San Diego, houve uma sessão dedicada a este assunto. As novas orientações do CLSI (versão C28-A3) que foram apresentados à

comunidade laboratorial diferem da versão anterior (C28-A2) basicamente no seguinte (53,54): (i) Para certos analitos, como colesterol, hemoglobina glicada e bilirrubina neonatal devem ser utilizados, tanto Limites de Decisão, quanto Intervalos de Referência, (ii) O laboratório deve validar os intervalos de referência estabelecidos pelo fabricante, (iii) Determinação de intervalos de referência através de estudos multicêntricos, (iv) Aceitam-se métodos não paramétricos, assim como métodos estatísticos robustos, para cálculo dos intervalos de referência, (v) Os laboratórios devem fazer relatórios mais fáceis de entender, com valores anormais em destaque e (vi) Os laboratórios devem citar ou limitar a decisão ou intervalos de referência, não ambos.

Idealmente, o CLSI recomenda um número mínimo de 120 amostras por cada grupo (por exemplo: por sexo ou faixa etária) para se estabelecer valores de referência (CLSI 28-A3) (45, 54, 55). Contudo, o mesmo documento admite que pouquíssimos Laboratórios ou mesmo Fabricantes conseguiriam atingir este quantitativo devido, principalmente, ao elevado custo e à dificuldade de se obter um grupo representativo de indivíduos normais (56, 57). Desta forma, este e outros documentos citam como válida, desde que seja realizada uma adequada análise estatística dos dados, a alternativa de um mínimo de 20 indivíduos saudáveis para que sejam validados valores de referência para um determinado analito, numa população local, por um determinado método (53, 54, 58, 59). Foi considerada, portanto, estatisticamente válida a análise de pelo menos 30 indivíduos, por cada grupo, de homens e mulheres, selecionados conforme faixas etárias que foram estipuladas através de um Projeto Piloto desenvolvido para este estudo.

Leite *et al* (46) e Leite *et al* (47) analisaram 484 indivíduos saudáveis, tamanho amostral próximo ao do estudo de Ranke *et al* (48) que usou 427 adultos normais e demonstrou excelente comparabilidade entre três ensaios analisados, com coeficiente de variação entre 0,79 e 0,87.

Quanto à escolha dos intervalos de faixas etárias para valores de referência de IGF-I, sabe-se que os valores de IGF-I se elevam cerca de 5 vezes desde o nascimento até a puberdade, declinando depois cerca de 3,5 vezes entre a puberdade e os 80 anos de idade (14, 17, 18, 28, 35, 36). Portanto, torna-se indispensável estabelecer valores de referência por faixas etárias, como sugerido por Brooke *et al*, 2007 (17) e outros autores (12, 27, 28, 60). Contudo, ainda não estão definidos quais seriam os intervalos ideais de faixas etárias para valores de referência de IGF-I. Clemmons, 2007 (14) sugere, assim como nossos resultados (46, 47), que durante a infância e, especialmente, próximo à puberdade, estes intervalos devem ser mais estreitos, não superiores a 3 ou 4 anos. Clemmons, 2007 (14) propõe ainda, e

nossos resultados (46, 47) são concordantes, que a partir de 30 anos o declínio dos níveis de IGF-I é menor, o que permite agrupar os indivíduos por décadas (14, 54). Para a escolha dos intervalos das faixas etárias usadas neste estudo, foram considerados a literatura (14, 54) e dados do Projeto Piloto, a partir do qual, após análises de inúmeras possibilidades de intervalos etários, optou-se (46, 47) pelos intervalos em que os valores de IGF-I apresentaram as distribuições mais próximas de uma distribuição Normal.

Como o intervalo pediátrico completo é do nascimento até aos 18 anos (53), essa investigação procurou estabelecer valores de referência para IGF-I em adultos, baseado em uma grande população de indivíduos saudáveis entre 18 e 70 anos de idade. Este estudo considerou faixas etárias mais estreitas até os 30 anos, com intervalo de 2 anos até os 20 anos de idade e intervalos de 5 anos entre 20 e 30 anos. A partir desta idade os indivíduos foram agrupados por décadas até os 70 anos de idade, totalizando 7 faixas etárias (46, 47).

A transformação Logarítmica dos valores de IGF-I mostrou-se a mais adequada para se estabelecer os valores de referência do ensaio de IGF-I para ICMA, pelo sistema *Immulite* 2000/DPC. Esta abordagem também é recomendada por outros autores (14, 26) que também observaram uma distribuição log normal dos valores de IGF-I nas populações por eles estudadas. Os valores de referência de ICMA foram, portanto, plotados em escala logarítmica, e apresentados por sexo e idade, por gráficos de regressão linear e, também, por tabelas com média  $\pm 1$  SD e  $\pm 2$  SD, particionados em 7 faixas etárias entre 18 e 70 anos. Quanto à metodologia IRMA, a transformação Raiz Quadrada foi a mais adequada para se estabelecer os valores de referência do ensaio de IGF-I para o *kit* comercial *ACTIVE* IGF-I/DSL-5600. Devido ao tipo de transformada utilizada (Raiz Quadrada), não foi possível gerar gráficos de regressão linear e, portanto, foram geradas apenas tabelas com valores de referência por faixas etárias.

Os resultados de Leite *et al* (46) e Leite *et al* (47), em indivíduos adultos, mostram a diminuição lenta e progressiva dos níveis séricos de IGF-I com a idade, como já tem sido demonstrado por outros autores (15, 18, 26, 27, 36, 61).

Para uma análise adequada da existência ou não de diferença estatística entre os níveis séricos de IGF-I entre homens e mulheres, os estudos de Leite *et al* (46) e Leite *et al*, (47) analisaram um número mínimo de 30 homens e 30 mulheres por cada faixa etária pré-estabelecida e utilizaram o Teste de Slope para avaliação da interação entre sexo e idade. No estudo com a metodologia ICMA (46), foi encontrada diferença estatisticamente significativa (p-valor: 0.0181) para os valores de referência de IGF-I entre homens e mulheres, diferentemente do estudo de Rosário, 2010 (38), realizado numa população adulta de Belo

Horizonte. Em relação ao método ICMA (46), os achados de valores de referência mais elevados em mulheres do que em homens com menos de 50 anos, demonstrados pelo Teste de Slope com corte aos 50 anos, apontam, possivelmente, para a ação estrogênica, já bem conhecida, nos níveis de IGF-I (24, 62). Após os 50 anos ocorre uma inversão destes valores, passando os valores masculinos a serem discretamente mais elevados do que os femininos. Esta diminuição dos níveis séricos de IGF-I em mulheres após os 50 anos se deve, possivelmente, à diminuição da ação estrogênica na menopausa. As faixas de referência também foram ligeiramente mais alargadas nas mulheres do que nos homens. No estudo com o método IRMA (47), não foi observada diferença estatisticamente significativa para os valores de referência de IGF-I entre homens e mulheres, diferentemente do estudo utilizando a metodologia ICMA (46). Portanto os valores de referência para o método IRMA são os mesmos para ambos os sexos. Outros estudos também não demonstraram esta diferença, e seus resultados também foram apresentados sem distinção entre os sexos (27, 40, 52, 63), sugerindo que estes achados podem ser específicos para diferentes metodologias e podem ser dependentes do ensaio utilizado (52).

Os limites superiores e inferiores (média  $\pm$  2SD) relatados pelo estudo de Leite *et al* (46), com o método ICMA, foram diferentes daqueles obtidos no estudo, para a mesma população, mas utilizando a metodologia IRMA (47), confirmando a necessidade de se estabelecer valores de referência para cada metodologia específica, como já está amplamente documentado na literatura (14, 52).

Outro achado de Leite *et al* (46) e Leite *et al* (47) é que os valores, de algumas poucas amostras de referência, diferiram significativamente da média total, refletindo a influência dos inúmeros fatores que podem afetar os níveis de IGF-I, como as diferenças genéticas e nutricionais individuais, bem como influências pré-analíticas como coleta e armazenamento da amostra, além de interferências analíticas (19, 64). Este achado confirma a importância da seleção de uma população de referência representativa, e que um número de amostras suficientemente adequado reduz o risco do impacto indesejável de uma única ou de algumas poucas amostras com valores discrepantes.

É esperado que os achados científicos desse estudo tenham impacto na abordagem clínica envolvendo a interpretação diagnóstica e o acompanhamento de pacientes portadores de transtornos relacionados aos níveis séricos de IGF-I.

## 5 CONCLUSÃO

Este estudo estabeleceu valores séricos de referência para IGF-I, numa população adulta saudável da cidade do Rio de Janeiro, para duas metodologias usadas no Brasil.

- Para o método ICMA-*Immulite* 2000/DPC: em homens adultos, os níveis de IGF-I variaram de 70,18 a 502,70 ng/dL, e em mulheres adultas, os níveis de IGF-I variaram de 54,65 a 569,07 ng/dL, considerando a faixa etária de 18 a 70 anos.
- Para o método IRMA-*ACTIVE* IGF-I/DSL-5600: em homens e mulheres adultas, os níveis de IGF-I variaram de 17,41 a 680,79 ng/dL, considerando a faixa etária de 18 a 70 anos.

Estes valores de referência são aplicáveis para as análises realizadas pelo sistema de imunoensaio quimioluminescente automatizado: ICMA-*Immulite* 2000/DPC, e para o ensaio imunorradiométrico: IRMA-*ACTIVE* IGF-I/DSL-5600, para a população estudada, mesmo que em diversos laboratórios, desde que se utilize um eficiente controle de qualidade intra e inter-laboratórios.

## REFERÊNCIAS

1. Drake WM, Howell SJ, Monson JP, Shalet SM. Optimizing GH therapy in adults and children. *Endocr Rev.* 2001; 22: 425-450.
2. Holdaway IM, Bolland MJ, Gamble GD. A meta-analysis of the effect of lowering serum levels of GH and IGF-I on mortality in acromegaly. *Eur J Endocrinol.* 2008; 159: 89-95.
3. Cordero RA, Barkan AL. Current diagnosis of acromegaly. *Rev Endocr Metab Disord.* 2008; 9: 13-19.
4. Roemmler J, Steffin B, Gutt B, Sievers C, Bidlingmaier M, Schopohl J. The effect of acute application of pegvisomant alone and in combination with octreotide on endogenous GH levels during a 6-h test in patients with acromegaly on constant pegvisomant treatment. *Growth Horm. IGF Res.* 2009; 19: 245-251.
5. Friedrich N, Schneider H, Dörr M, Nauck M, Völzke H, Klotsche J, *et al.* All-cause mortality and serum insulin-like growth factor I in primary care patients. *Growth Horm IGF Res.* 2011; 21: 102-106.
6. Janssen JA, Wildhagen MF, Ito K, Blijenberg BG, Van Schaik RH, Roobol MJ, *et al.* Circulating free Insulin-like Growth Factor I (IGF-I), total IGF-I, and IGF binding protein-3 levels do not predict the future risk to develop prostate cancer: Results of a case-control study involving 201 patients within a population-based screening with a 4-year interval. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89: 4391-4396.
7. Gao X, Xing D. Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation. *J Biom Sci.* 2009; 16: 4
8. Movérare-Skrtic S, Svensson J, Karlsson MK, Orwoll E, Ljunggren Ö, Mellström D, *et al.* Serum Insulin-Like Growth Factor-I concentration is associated with leukocyte telomere length in a population-based cohort of elderly men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009; 94: 5078-5084.
9. Ben-Shlomo A, Melmed S. Acromegaly. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2001; 30: 565-583.
10. Barkan AL. Defining normally of the somatotrophic axis. An attainable goal? *Pituitary.* 2007; 10: 135-139.
11. Ranke MB, Feldt-Rasmussen U, Bang P, Baxter RC, Camacho-Hubner C, Clemmons DR, *et al.* How should Insulin-like Growth Factor-I be measured? A consensus statement. *Horm Res.* 2001; 55: 106-109.

12. Quarmby V, Quan C, Ling V, Compton P, Canova-Davis E. How much Insulin-like Growth Factor I (IGF-I) circulates? Impact of standardization on IGF-I assay accuracy. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83: 1211-1216.
13. Liberman B, Cukiert A. *Fisiologia e Fisiopatologia do Hormônio do Crescimento.* São Paulo: Lemos Editorial, 2004. 419 p.
14. Clemmons DR. IGF-I assays: current assay methodologies and their limitations. *Pituitary.* 2007; 10: 121-128.
15. Barkan AL. Biochemical markers of acromegaly: GH vs. IGF-I. *Growth Horm IGF Res.* 2004; 14: 97-100.
16. Yuen K, Frystyk J, Umpleby M, Fryklund L, Dunger D. Changes in free rather than total Insulin-like Growth Factor-I enhance insulin sensitivity and suppress endogenous peak Growth Hormone (GH) release following short-term low-dose GH administration in young healthy adults. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89: 3956-3964.
17. Brooke AM, Drake WM. Serum IGF-I levels in the diagnosis and monitoring of acromegaly. *Pituitary.* 2007; 10: 173-179.
18. Jones AM, Honour JW. Unusual results from immunoassays and the role of the clinical endocrinologist. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2006; 64: 234-244.
19. Chestnut RE, Quarmby V. Evaluation of total IGF-I assay methods using samples from Type I and Type II diabetic patients. *J Immunol Method.* 2002; 259: 11-24.
20. Conover CA, Lee PDK, Kanoley JA, Clarkson JT, Jensen MD. Insulin regulation of Insulin-like Growth Factor Binding Protein-I in obese and nonobese humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992; 74: 1355-1360.
21. Daughaday WH, Rotwein P. Insulin-like Growth Factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum and tissue concentrations. *Endocr Rev.* 1989; 10: 68-91.
22. Powell DR, Rosenfeld RG, Baker BK, Liu F, Hintz EL. Serum somatomedin levels in adults with chronic renal failure. The importance of measuring Insulin-like Growth Factors I and II in acid-chromatographed uremic serum. *J Clin Endocrinol Metab.* 1986; 63: 1186-1192.
23. Kong AP, Wong GW, Choi KC, Ho CS, Chan MH, Lam CW, *et al.* Reference values for serum levels of insulin-like growth factor (IGF-1) and IGF-binding protein 3 (IGFBP-3) and their ratio in Chinese adolescents. *Clin Biochem.* 2007; 40: 1093-9.
24. Jernström H, Deal C, Wilkin F, Chu W, Tao Y, Majeed N, *et al.* Genetic and Nongenetic Factors Associated with Variation of Plasma Levels of Insulin-like Growth Factor-I and Insulin-like Growth Factor-binding Protein-3 in Healthy Premenopausal Women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001; 10: 377-384.
25. Laron Z, Bidlingmaier M, Strasburger CJ. Indications, limitations and pitfalls in the determination of human growth hormone, IGF-I and their binding proteins. *Pediatr Endocrinol Rev.* 2007; 5: 555-69.

26. Friedrich N, Alte D, Volzke H, Spilcke-Liss E, Ludemann J, Lerch MM, *et al.* Reference ranges of serum IGF-I and IGFBP-3 levels in a general adult population: Results of the Study of Health in Pomerania (SHIP). *Growth Horm IGF Res.* 2008; 18: 228-237.
27. 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.* 2006; 373: 176-179.
28. Kwan AY, Hartman ML. IGF-I measurements in the diagnosis of adult Growth Hormone deficiency. *Pituitary.* 2007; 10: 151-157.
29. Gallagher EJ, LeRoith D. Minireview: IGF, Insulin, and Cancer. *Endocrinology.* 2011; 152: 2546-2551.
30. Fuh G, Cunningham BC, Fukunaga R, Nagara S, Goeddel DV, Wells JA. Rational design of potent antagonists to the human growth hormone receptor. *Science.* 1992; 256: 1677-80.
31. Goffin V, Bernichtein S, Carriere O, Bennett WF, Kpchick JJ, Kelly PA. The human growth antagonist B2036 does not interact with the prolactin receptor. *Endocrinology.* 1999; 140: 3853-56.
32. Van der Lely AJ, Hutson RK, Trainer PJ, Besser GM, Barkan AL, Katznelson L, *et al.* Long-term treatment of acromegaly with pegvisomant, a growth hormone receptor antagonist. *Lancet.* 2001; 358: 1754-1759.
33. Trainer PJ, Drake WM, Katznelson L, Freda PU, Herman-Bonert V, van der Lely AJ, *et al.* Treatment of acromegaly with the growth hormone-receptor antagonist pegvisomant. *N Engl J Med.* 2000; 342: 1171-77.
34. Orskov H, Frystyk J, Nielsen C, Hansen AT, Weeke J, Jorgensen JO. Concomitant, specific determination of growth hormone and pegvisomant in human serum. *Growth Horm IGF Res.* 2007; 17: 431-4.
35. Bagg W, Aoina J, Cross PA, Whalley GA, Gamble GD, Doughty RN, *et al.* Serum IGF-I levels are similar in samoan, maori and european populations despite differences in body composition. *Growth Horm IGF Res.* 2006; 16: 57-60.
36. Li HJ, Ji CY, Wang W, Hu YH. A twin study for serum leptin, soluble leptin receptor, and free Insulin-like Growth Factor-I in pubertal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90: 3659-3664.
37. Ichihara K, Itoh Y, Lam CW, Poon PM, Kim JH, Kyono H, *et al.* Sources of variation for commonly measured serum analytes among 6 Asian cities and consideration of common reference intervals. *Clin Chem.* 2008; 54: 356-365.
38. Rosario PW. Normal values of serum IGF-1 in adults: results from a Brazilian Population. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2010; 54: 477-481.

39. Bristow AF, Gooding RP, Das RE. The International Reference Reagent for insulin-like growth factor-I. *J Endocrinol.* 1990; 125: 191-197.
40. Elmlinger MW, Kühnel W, Weber MM, Ranke MB. Reference ranges for two automated chemiluminescent assays for serum insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding protein 3 (IGFBP-3). *Clin Chem Lab Med.* 2004; 42: 654-664.
41. Burns C, Rigsby P, Moore M, Rafferty B. The First International Standard for Insulin-like Factor-1 (IGF-I) for immunoassay: preparation and calibration in a international collaborative study. *Growth Horm IGF Res.* 2009; 19: 457-462.
42. Clemmons DR on the behalf of the conference participants. Consensus statement on the standardization and evaluation of IGF-I assays. *Clin Chem.* 2011; 57: 555-559.
43. Milles LEM, Lipschitz DA, Bieber CP and Cook JD. Measurement of serum ferritin by a 2-site immunoradiometric assay. *Analit Biochem.* 1974; 61: 209-224.
44. IMMULITE/IMMULITE IGF-I. Siemens Medical Solutions Diagnostics, PILKGF-10; 2006.
45. Boyd JC. Cautions in the Adoption of Common Reference Intervals. *Clin Chem.* 2008; 54: 238-239.
46. Leite DB, Meirelles RMR, Mandarim-de-Lacerda CA, Matos HJ and Bernardo-Filho M. Serum insulin-like growth factor-I adult reference values for an automated chemiluminescence immunoassay system. *Afr J Biotechnol* 2011; 10: 18027-18033.
47. Leite DB, Meirelles RMR, Mandarim-de-Lacerda CA, Matos HJ, Santos-Filho SD, Bernardo-Filho M. Determination of insulin-like growth factor-I reference values using an immunoradiometric assay in a Brazilian adult population. *Indian J Med Sci.* 2013; *in press.*
48. Ranke MB, Osterziel KJ, Schweizer R, Schuett B, Weber K, Robbel P, *et al.* Reference levels of Insulin-like Growth Factor-I in the serum of healthy adults: Comparison of four immunoassays. *Clin Chem Lab Med.* 2003; 41: 1329-1334.
49. Scott MG, Cuca GC, Petersen JR, Lyle LR, Burielgh BD, Daughaday WH. Specific Immunoradiometric Assay of Insulin-like Growth Factor I with use of Monoclonal Antibodies. *Clin Chem.* 1987; 33: 2019-2023.
50. Eliakim A, Nemet D, Zaldivar F, McMurray RG, Culler FL, Galassetti P, *et al.* Reduced exercise-associated response of the GH-IGF-I axis and catecholamines in obese children and adolescents. *J Appl Physiol.* 2006; 100: 1630-1637.
51. Bereket A, Lang CH, Blethen SL, Gelato MC, Fan J, Frost RA, *et al.* Effect of insulin on the insulin-like growth factor system in children with new-onset insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995; 80: 1312-1317.

52. Granada ML, Ulied A, Casanueva FF, Pico A, Lucas T, Torres E, *et al.* Serum IGF-I measured by four different immunoassays in patients with adult GH deficiency or acromegaly and in a control population. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2008; 68: 942-50.
53. Schnabl K, Chan MK, Adeli K. Pediatric reference intervals: Critical gap analysis and establishment of a national initiative. *Clin Biochem*. 2006; 39: 559-560.
54. Ichihara k and Boyd JC on behalf of the IFCC Committee on Reference Intervals and Decision Limits (C-RIDL). IFCC Document. An appraisal of statistical procedures used in derivation of reference intervals. *Clin Chem Lab Med*. 2010; 48: 1537-1551.
55. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Defining, establishing and verifying reference intervals in the clinical laboratory; Approved Guideline- Third Edition. CLSI document C28-A3 (ISBN 1- 56238- 682-4). Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wane, Pennsylvania, USA. 2008; 19087-1898.
56. Levin A, DeSouza C, Zaarour C, Walsh W, Chan MK, Verjee Z, *et al.* Pediatric reference intervals for lymphocyte vitamin C (ascorbic acid). *Clin Biochem*. 2010; 43: 1411-1414.
57. Katayev A, Balciza C, Seccombe DW. Establishing Reference Intervals for Clinical Laboratory Test Results. Is There a Better Way? *Am J Clin Pathol*. 2010; 133: 180-186.
58. Horn PS, Pesce AJ, Copeland BE. A robust approach to reference interval estimation and evaluation. *Clin Chem*. 1998; 44: 622-31.
59. Horn PS, Pesce AJ. Reference intervals: an update. *Clin Chim Acta*. 2003; 334: 5-23.
60. Brabant G, von zur Muhlen A, Wuster C, Ranke MB, Kratzsch J, Kiess W, *et al.* Serum Insulin-like Growth Factor-I reference values for an automated chemiluminescence immunoassay system: Results from a multicenter study. *Horm Res*. 2003; 60: 53-60.
61. Strasburger CJ, Bidlingmaier M, Wu Z, Morrison KM (2001). Normal values of Insulin-like Growth Factor-I and their clinical utility in adults. *Horm. Res*. 55: 100-105.
62. Anderson SM, Wideman L, Patrie JT, Weltman A, Bowers CY, Veldhuis JD. E2 supplementation selectively relieves GH's autonegative feedback on GH-releasing peptide-2-stimulated GH secretion. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; 86: 5904-5911.
63. Brabant G, Wallaschowski H. Normal levels of serum IGF-I: determinants and validity of current reference ranges. *Pituitary*. 2007; 10: 129-133.
64. Siest G, Henny J , Gr äsbeck R , Wilding P , Petitclerc C, Queraltó JM, *et al.* The theory of reference values: an unfinished symphony. *Clin Chem Lab Med*. 2013; 51: 47-64.



3. Quantas vezes por semana ? ( ) 1 ( ) 2 ( ) 3 ( ) 4 ( ) 5 ( ) 6 ( ) 7
4. Há quanto tempo ? ( ) Menos de 1 mês ( ) 1 a 3 meses ( ) 3 a 6 meses  
( ) 6 a 9 meses ( ) 9 a 12 meses ( ) mais de 1 ano
5. Come com que frequência os seguintes alimentos :
- Carne de boi  
( ) Todos os dias ( ) Pelo menos 2 vezes por semana  
( ) Menos de 1 vez por semana ( ) Nunca
  - Peixe  
( ) Todos os dias ( ) Pelo menos 2 vezes por semana  
( ) Menos de 1 vez por semana ( ) Nunca
  - Frango  
( ) Todos os dias ( ) Pelo menos 2 vezes por semana  
( ) Menos de 1 vez por semana ( ) Nunca
  - Leite  
( ) Todos os dias ( ) Pelo menos 2 vezes por semana  
( ) Menos de 1 vez por semana ( ) Nunca
  - Queijo  
( ) Todos os dias ( ) Pelo menos 2 vezes por semana  
( ) Menos de 1 vez por semana ( ) Nunca
  - Ovos  
( ) Todos os dias ( ) Pelo menos 2 vezes por semana  
( ) Menos de 1 vez por semana ( ) Nunca
6. É portador de Diabetes ? ( ) SIM ( ) NÃO
7. É portador de tumor hipofisário ? ( ) SIM ( ) NÃO
8. É portador de doença tiroideana ? ( ) SIM ( ) NÃO
9. É portador de doença hepática ? ( ) SIM ( ) NÃO
10. É portador de doença renal ? ( ) SIM ( ) NÃO

11. Frequência do uso de bebida alcoólica :

( ) Todos os dias ( ) Frequentemente ( ) Raramente ( ) Nunca

12. Das medicações abaixo, quais as que você usa ?

◆ Anticoncepcional ou hormônio para reposição na menopausa ( estrogênio ) ?

( ) SIM ( ) NÃO

◆ Hormônio tireoideano ?

( ) SIM ( ) NÃO

◆ Fórmulas para emagrecer ?

( ) SIM ( ) NÃO

◆ Fórmulas para aumentar massa muscular ?

( ) SIM ( ) NÃO

◆ Suplementos alimentares para ginástica ( concentrados de proteína ou outros ) ?

( ) SIM ( ) NÃO

◆ Hormônio de crescimento ( GH, PRÓ-GH, ou similares ) ?

( ) SIM ( ) NÃO

◆ DHEA ?

( ) SIM ( ) NÃO

◆ Cite os nomes de todos os medicamentos em uso :

13. Qual é a altura do pai ?

14. Qual é a altura da mãe ?

15. Qual é a sua altura ?

16. Qual é o seu peso ?

17. IMC ( ÍNDICE DE MASSA CORPORAL) =

**APÊNDICE B** – Termo de consentimento livre e esclarecido

Instituto Estadual de Hematologia “Arthur de Siqueira  
Cavalcanti”

**COORDENAÇÃO DE PESQUISA E RECURSOS HUMANOS**  
**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP**

---

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**IDENTIFICAÇÃO DO PROJETO :**

Título : Padronização de normalidade para IGF1 em adultos, distribuídos por sexo e faixas etárias no Estado do Rio de Janeiro

**JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS DA PESQUISA :**

Esta pesquisa tem como objetivo estabelecer quais são os níveis normais, no sangue de indivíduos saudáveis, de uma substância responsável pelo crescimento. Esta substância se chama IGF1. A importância deste trabalho é permitir o adequado diagnóstico e tratamento de uma doença chamada acromegalia, e causada por um tumor, dentro da cabeça, que aumenta os níveis de hormônio de crescimento e, conseqüentemente, de IGF1.

Esta doença faz com que a pessoa tenha crescimento de suas extremidades, como, por exemplo, mãos, pés, nariz, queixo, etc., bem como aumenta o volume de órgãos, do corpo tais como coração, e outros, e faz surgir outras doenças como diabetes, hipertensão arterial, dores nas juntas, câncer de intestino, câncer de mama, câncer de tireóide e outros. Ainda pode provocar cegueira, dores fortes de cabeça, problemas respiratórios, etc.

É de tratamento muito difícil, com cirurgia e radioterapia e medicamentos muito caros. Não existe outra forma de um médico acompanhar bem os resultados do tratamento destes

pacientes, especialmente aqueles pacientes tratados com o remédio chamado Pegvisomant, a não ser através de exame de sangue para verificar os níveis desta substância.

Como não sabemos ainda os níveis normais desta substância para a nossa população, o tratamento hoje ainda é muito deficiente.

Com este trabalho pretendemos descobrir as taxas normais, para então podermos avaliar e tratar de forma satisfatória estes pacientes.

#### **MÉTODO PARA COLHEITA DE MATERIAL :**

Para este fim precisamos colher apenas 10 ml de sangue de uma veia do ante-braço de pessoas saudáveis. Este material será analisado em laboratório de análises clínicas

#### **IV. *DESCONFORTO E/OU RISCO :***

O procedimento de coleta do sangue poderá trazer o desconforto natural de qualquer coleta normal, ou seja, poderá apresentar dor e/ou hematoma no local da coleta.

#### **V. *BENEFÍCIOS DA PESQUISA :***

Os resultados obtidos permitirão que os médicos saibam os níveis normais desta substância (IGF1) no sangue, e desta forma possam tratar estes pacientes com tumores que aumentam as taxas do hormônio de crescimento e, conseqüentemente, as taxas de IGF1.

#### **VI. *GARANTIA DE RECEBER ESCLARECIMENTO:***

Se você não entender as palavras do texto acima, peça a alguém da equipe do estudo que lhe explique de forma a que você entenda completamente.

---

#### **VII. *ESCLARECIMENTO SOBRE A LIBERDADE DE PARTICIPAR DO ESTUDO***

---

Sua participação neste estudo é voluntária. A qualidade do seu atendimento nesta instituição não será afetada caso você decida não participar do estudo.

---

---

## **VIII. COMPROMISSO DE SIGILO SOBRE OS RESULTADOS**

A sua identidade será guardada em absoluto sigilo, ou seja, o resultado do seu exame será utilizado de forma totalmente anônima, sem identificar você, e com a única finalidade de estabelecer os níveis normais de IGF1 para a nossa população. Em qualquer publicação

## **IX. CONSENTIMENTO PARA UTILIZAR OS RESULTADOS DA PESQUISA**

Sua participação significa automaticamente que você concorda que seus resultados sejam divulgados através de encontros científicos e publicações especializadas, desde que mantidos como anônimos.

## **X. DECLARAÇÃO DO PACIENTE**

Declara seu livre consentimento para que seja colhida uma pequena amostra (10 ml) de seu sangue, com a finalidade de dosar os níveis de IGF1, uma substância relacionada ao crescimento e utilizada como principal meio de diagnóstico e acompanhamento de pacientes com tumor produtor de hormônio do crescimento.

A importância de sua participação é possibilitar estabelecer os níveis normais de IGF1, e desta forma permitir o diagnóstico e o tratamento adequado de portadores destes tumores (pacientes acromegálicos), uma vez que ainda não dispomos dos valores de normalidade de IGF1 estabelecidos para nossa população.

O resultado deste exame será absolutamente confidencial e utilizado de forma totalmente anônima, com a única finalidade de estabelecer os níveis normais de IGF1 para a nossa população.

Declara, ainda, estar ciente de que a coleta desta pequena amostra de sangue não acarreta nenhum risco para sua saúde, a não ser a possibilidade de dor e/ou hematoma que podem ocorrer em qualquer coleta de sangue. O paciente declara ainda estar ciente que não pagará nada pela sua participação, e que também não receberá qualquer espécie de remuneração para a realização da mesma.

O paciente declara também que recebeu uma cópia deste formulário de consentimento.

Finalmente, o paciente declara ainda que leu e compreendeu toda as informações acima referidas e que recebeu respostas para todas as suas dúvidas.

---

**Nome do participante (letra de forma)**

---

**Assinatura do participante ou representante legal**

---

**Assinatura da pessoa que apresentou o consentimento**

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

Eu ou meu representante esclarecemos todas as dúvidas do participante ou seu representante autorizado, fornecendo todas as informações necessárias de forma compreensível.

---

**Assinatura do investigador principal**

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

## ANEXO A – Comitê de Ética



Instituto Estadual de Hematologia "Arthur de Siqueira Cavalcanti"  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP

Rio de Janeiro, 26 de julho de 2005.

**ASSUNTO:** Parecer substanciado de projeto de pesquisa avaliado pelo CEP HEMORIO  
Prezado Pesquisador,


O projeto, "Padronização de normalidade de IGF1 em adultos, distribuídos por sexo e faixa etária, no RJ", cadastrado no CEP HEMORIO sob o nº 062/05, foi aprovado pelo Comitê desta Instituição, conforme a Resolução CNS 196, de 10/outubro de 1996, após respostas às exigências apontadas.

Ressaltamos abaixo, algumas orientações fundamentais, as quais o pesquisador deve estar muito atento:

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, **sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado** e deve receber uma **cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado;**
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou, aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeira ação imediata;
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. **É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificações ao CEP e à ANVISA, junto com seu posicionamento;**
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.
- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente até 03/01/06 e ao término do estudo.

Sendo assim, por favor, contate a Coordenação do CEP HEMORIO (Sra. Laura Jane ou Adriana) pelo telefone 2242-6080, ramal 2141, a fim de estabelecermos o fluxo de sua pesquisa e tomarmos outras providências pertinentes.

Atenciosamente,

  
Laura Jane G. Neumann  
Coordenadora do CEP  
Laura Jane Neumann  
Coordenadora do CEP HEMORIO

## ANEXO B – Carta de aceite do Artigo 2

22/02/13

Gmail - [IJMS]:Article provisionally accepted.



Sebastiao David Santos Filho &lt;sdavidfilho@gmail.com&gt;

**[IJMS]:Article provisionally accepted.**

Indian Journal of Medical Sciences &lt;editor@indianjmedsci.org&gt;

4 de dezembro de 2012 15:42

Responder a: editor@indianjmedsci.org

Para: sdavidfilho@gmail.com

If you cannot see this page properly, please [click here](#).

Dear Prof. Santos-filho,

We are pleased to inform that your manuscript "Determination of Insulin-like Growth Factor-I reference values using an immunoradiometric assay in a Brazilian adult population" is provisionally accepted. You would receive an edited version of article in about 2-3 weeks from now for a final check and correction.

We thank you for submitting your valuable research work to Indian Journal of Medical Sciences.  
With warm personal regards,

Yours sincerely,  
Prabhash Kumar  
Indian Journal of Medical Sciences

Message sent on Tuesday, December 04, 2012

Please add editor@indianjmedsci.org as a contact in your E-mail client to ensure that this mail is not considered as a junk mail.

---- END OF MESSAGE ----

Indian Journal of Medical Sciences is Indexed / Listed with Index Medicus, MEDLINE, ISI Current Web Contents, Excerpta Medica/EMBASE, CAB Abstracts, CINAHL Database, and Index Copernicus, and is available in full text from [www.indianjmedsci.org](http://www.indianjmedsci.org) and [www.bioline.org.br/ms](http://www.bioline.org.br/ms). The journal is archived for long term preservation at OAI-compliant e-print repository at the University of Toronto Library, Canada.