THAIS HISSAMI INOUE LIMA

**Reavaliação do papel da determinação das concentrações
séricas do IGF-1 e IGFBP-3 na investigação de crianças com
baixa estatura**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Medicina

Programa de Endocrinologia
Orientador: Prof. Dr. Alexander Augusto de
Lima Jorge

São Paulo

2018

THAIS HISSAMI INOUE LIMA

**Reavaliação do papel da determinação das concentrações
séricas do IGF-1 e IGFBP-3 na investigação de crianças com
baixa estatura**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Medicina

Programa de Endocrinologia
Orientador: Prof. Dr. Alexander Augusto de
Lima Jorge

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Lima, Thais Hissami Inoue

Reavaliação do papel da determinação das
concentrações séricas do IGF-1 e IGFBP-3 na
investigação de crianças com baixa estatura / Thais
Hissami Inoue Lima. -- São Paulo, 2018.

Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Endocrinologia.

Orientador: Alexander Augusto de Lima Jorge.

Descritores: 1.Fator de crescimento insulín-like
I 2.Proteína 3 de Ligação a fator de crescimento
semelhante à insulina 3.Nanismo hipofisário
4.Diagnóstico 5.Sensibilidade e especificidade
6.Valor preditivo dos testes

USP/FM/DBD-517/18

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Ao meu querido esposo, Fernando,
e à nossa filha amada, Marina Saori.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a meus pais, Cleyde e Moacir, por terem proporcionado a educação e formação que eu tive, por seu carinho incondicional, por tudo que possibilitou que eu pudesse estar aqui hoje. Agradeço a meu esposo e grande amor e companheiro, Fernando Mesquita Lima, por seu apoio, incentivo e auxílio em todos os momentos, por seu amor e companheirismo e paciência. Agradeço à minha amada filha, Marina Saori, por trazer um novo sentido à minha vida, por proporcionar inúmeras experiências, todas especiais e inesquecíveis.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Alexander Jorge, pelos ensinamentos, amizade, paciência, estímulo e dedicação. Agradeço ainda à sua esposa, Lenira Stella, cuja indicação propiciou o início da pós-graduação. Agradeço ainda ao Dr. Ivo Arnhold por ter compartilhado seus conhecimentos nesse período e às professoras titulares, Dra. Berenice Mendonça e Dra. Ana Cláudia Latrônico pela oportunidade e apoio à pesquisa.

Agradeço às amigas da pós-graduação, pelas trocas de experiências, amizade, ensinamentos, companheirismo, com quem dividimos muitas angústias: Thais Kataoka, Edoarda Vasco, Gabriela Vasques, Renata Scalco, Marilena Nakaguma, Isabela Biscotto, Alexandra Malaquias, Fernanda Correa, Renata Noronha, Natália Lisboa, Natália Ferreira.

E por fim agradeço aos pacientes atendidos nos ambulatórios de baixa estatura e de deficiência de hormônio de crescimento, sem os quais esta tese não seria possível.

Esta dissertação (mestrado) está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª Ed, São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

1 INTRODUÇÃO	01
1.1 Eixo GH/IGF-1	02
1.2 Patologias do eixo GH/IGF-1	04
1.3 Deficiência de hormônio de crescimento (DGH)	06
1.4 Diagnóstico de DGH	06
1.5 Uso do IGF-1 e IGFBP-3 na avaliação indireta da secreção de GH ..	09
1.5.1 Ensaio laboratorial de IGF-1 e IGFBP-3.....	10
1.5.2 Desempenho discriminativo do IGF-1 e IGFBP-3.....	11
1.6 Proposta do presente estudo e contribuições originais esperadas	12
2 OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo geral	14
2.2 Objetivo específico	14
3 CASUÍSTICA E METODOLOGIA	15
3.1 Casuística	16
3.2 Considerações éticas	16
3.3 Critérios de seleção de pacientes	16
3.3.1 Critérios de inclusão	17
3.3.2 Critérios de exclusão	18
3.4 Critérios para diagnóstico de deficiência de GH	18
3.5 Critérios para diagnóstico de suficiência de GH	19
3.6 Dosagens hormonais	20
3.7 Análise estatística	21
4 RESULTADOS	24
4.1 Características dos pacientes	25
4.2 Desempenho discriminatório dos Escores-Z do IGF-1 e do IGFBP-3	28
4.2.1 Avaliação da influência da puberdade na performance do Escore-Z do IGF-1 e do IGFBP-3.....	33
4.3 Avaliação do valor diagnóstico do emprego dos Escores-Z do IGF-1 e do IGFBP-3 combinados	40

5 DISCUSSÃO	42
6 CONCLUSÕES	50
7 ANEXO	52
Anexo I – Fórmulas utilizadas para os cálculos de sensibilidade, especificidade, acurácia e valores preditivos positivo e negativo	53
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Resumo da estratégia e seleção da casuística para o estudo. BE: Baixa estatura; BEI: baixa estatura idiopática; ACCD: atraso constitucional do crescimento e desenvolvimento; PIG: pequeno para idade gestacional	17
Figura 2	Fluxograma de inclusão/exclusão dos pacientes	25
Figura 3	Gráfico de dispersão tipo box-plot dos escores-Z do IGF-1 e do IGFBP-3. Escore-ZIC: escore-Z avaliado em relação à idade cronológica	29
Figura 4	Diagrama de Venn ilustrando o número de pacientes com resultados alterados e normais dos escores-Z das concentrações séricas do IGF-1 e do IGFBP-3 nos pacientes com e sem DGH	29
Figura 5	Análise do desempenho discriminatório das curvas Receiver Operator Curve (ROC) do Escore-ZIC do IGF-1 e do IGFBP-3 de todos os pacientes avaliados; Escore-ZIC: escore-Z avaliado em relação à idade cronológica; AUC: área sob a curva	30
Figura 6	Análise do desempenho discriminatório das curvas Receiver Operator Curve (ROC) dos Escore-ZIC e Escore-ZIO do IGF-1 e do IGFBP-3 de todos os pacientes avaliados; Escore-ZIC: escore-Z para idade cronológica; Escore-ZIO: escore-Z para idade óssea; AUC: área sob a curva	32
Figura 7	Gráfico de dispersão tipo box-plot dos escores-Z do IGF-1 e do IGFBP-3 nos pacientes em idade pré-puberal. Escore-ZIC: escore-Z avaliado em relação à idade cronológica; Escore-ZIO: escore-Z avaliado em relação à idade óssea	35

Figura 8	Comparação do desempenho discriminatório das curvas Receiver Operator Curve (ROC) do escore-Z das concentrações séricas do IGF-1 para idade cronológica e idade óssea nos pacientes em idade pré-púberal, ($p=0,853$); Escore-ZIC: escore-Z avaliado em relação à idade cronológica; Escore-ZIO: escore-Z avaliado em relação à idade óssea; AUC: área sob a curva	35
Figura 9	Gráfico de dispersão tipo box-plot dos escores-Z do IGF-1 e do IGFBP-3 nos pacientes em idade puberal. Escore-ZIC: escore-Z avaliado em relação à idade cronológica; Escore-ZIO: escore-Z avaliado em relação à idade óssea; Escore-ZIP: escore-Z avaliado em relação ao estadio puberal	39
Figura 10	Comparação do desempenho discriminatório das curvas Receiver Operator Curve (ROC) dos escores-Z do IGF-1 e do IGFBP-3 avaliados em relação a idade cronológica (Escore-ZIC), idade óssea (Escore-ZIO) e idade puberal (Escore-ZIP) nos pacientes em idade puberal	39
Figura 11	Fluxograma de investigação de DGH em crianças com baixa estatura em idade puberal. Escore-ZIC: escore de desvio padrão do IGF-1 comparado com a idade cronológica; Escore-ZIP: escore de desvio padrão do IGF-1 comparado com o estadio puberal; SNC: sistema nervoso central	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Principais defeitos do eixo-GH/IGF-1 e as características clínicas e laboratorial	05
Tabela 2	Metodologias utilizadas para dosagem sérica de IGF-1 e IGFBP-3 realizadas em nosso serviço nos últimos 20 anos	21
Tabela 3	Comparativo das características clínicas das crianças avaliadas no presente estudo	26
Tabela 4	Comparativo do desempenho dos escores-Z dos valores séricos do IGF-1 e do IGFBP-3 em relação à idade cronológica no diagnóstico de DGH nos pacientes avaliados	31
Tabela 5	Comparativo do desempenho discriminativo dos escores-Z dos valores séricos do IGF-1 e do IGFBP-3 em relação à idade cronológica e óssea no diagnóstico de DGH nos pacientes avaliados	32
Tabela 6	Comparativo dos dados clínicos dos pacientes em idade pré-púbere	34
Tabela 7	Comparativo do desempenho dos escores-Z dos valores séricos do IGF-1 e do IGFBP-3 em relação à idade cronológica e óssea no diagnóstico de DGH nos pacientes em idade pré-puberal	36
Tabela 8	Comparativo dos dados clínicos dos pacientes em idade púbere	37
Tabela 9	Comparativo do desempenho discriminativo dos escores-Z dos valores séricos do IGF-1 e do IGFBP-3 em relação à idade cronológica e óssea no diagnóstico de DGH nos pacientes em idade puberal	40
Tabela 10	Comparativo do desempenho dos escores-ZIC dos valores séricos do IGF-1 e do IGFBP-3 considerados em separado e conjuntamente no diagnóstico de DGH nos pacientes avaliados, e nas diferentes faixas etárias (idade pré-puberal e idade puberal)	41

Tabela 11	Estimativa da performance de teste de estímulo de secreção de GH com clonidina e insulina [34] de acordo com a probabilidade pré-teste	47
------------------	--	----

RESUMO

LIMA THI. Reavaliação do papel da determinação das concentrações séricas do IGF-1 e IGFBP-3 na investigação de crianças com baixa estatura [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

IGF-1 e IGFBP-3 são medidas indiretas da secreção de GH e ferramentas úteis na avaliação do eixo GH/IGF-1. No diagnóstico de deficiência de GH (DGH) estes peptídeos são avaliados pela idade cronológica. Nosso estudo avaliou a capacidade discriminativa desses peptídeos na identificação de pacientes com DGH e comparou a performance dos escores de desvio padrão do IGF-1 e do IGFBP-3 avaliados para idade cronológica (escore- Z_{IC}), idade óssea (escore- Z_{IO}) e estadio puberal (escore- Z_{IP}) no diagnóstico de DGH. Trata-se de um estudo retrospectivo, transversal, com levantamento de dados de prontuário de pacientes pediátricos com distúrbios de crescimento acompanhados em nosso serviço. Os pacientes foram classificados como DGH ou suficientes de GH (não-DGH). O IGF-1 e o IGFBP-3 foram dosados pelo ensaio quimioluminescência – IMMULITE® e foram calculados o escore- Z_{IC} , escore- Z_{IO} e escore- Z_{IP} . Foram avaliados 50 pacientes classificados como DGH e 187 como não-DGH. Os escores- Z_{IC} , escores- Z_{IO} e escores- Z_{IP} do IGF-1 e do IGFBP-3 foram significativamente menores no grupo DGH em comparação com o grupo não-DGH ($p < 0,001$). O escore- Z_{IC} do IGF-1 apresentou desempenho discriminativo superior ao escore- Z_{IC} do IGFBP-3 na identificação de pacientes com DGH [área sob a curva ROC (AUC) 0,877 e 0,766, respectivamente, $p = 0,001$], em que o IGF-1 apresentou melhor sensibilidade (92% vs 45,2%) e o IGFBP-3 melhor especificidade (93,8% vs 69%). Entretanto, o valor preditivo positivo, considerando uma prevalência estimada de DGH de 2% entre crianças com baixa estatura, foi de 5,7% para o escore- Z_{IC} do IGF-1 e de 13,1% para o do IGFBP-3, com valores preditivos negativos semelhantes. O escore- Z_{IO} do IGF-1 demonstrou melhor desempenho discriminativo que o escore- Z_{IC} sem atingir significância estatística (AUCs de 0,902 e 0,877, respectivamente, $p = 0,29$). Mas essa superioridade não foi observada com o escore- Z_{IO} do IGFBP-3. Nos pacientes em idade pré-púbere, não houve diferença estatisticamente significativa entre o desempenho do escore- Z_{IC} e escore- Z_{IO} das concentrações séricas do IGF-1 e do IGFBP-3. Já nos pacientes em idade puberal houve uma melhora significativa da especificidade dos escore- Z_{IO} e escore- Z_{IP} do IGF-1 em relação ao escore- Z_{IC} (de 65,6% para 92,7% e 98,4%), apesar da redução da sensibilidade (de 91,3% para 72,2% e 63,6%, respectivamente). Além disso, os valores preditivos positivos (VPP) do escore- Z_{IO} e do escore- Z_{IP} apresentaram uma melhora significativa em relação ao escore- Z_{IC} do IGF-1 (16,8%, 44,8% e 5,1%, respectivamente), sem prejuízo nos valores preditivos negativos. A avaliação combinada de IGF-1 e IGFBP-3 em comparação com o escore-Z do

IGF-1 isolado apresentou melhor sensibilidade (de 92% para 94,4%) quando somente um escore-Z desses peptídeos está baixo e melhor especificidade (de 69% para 95,7%) quando os escores-Z de ambos os peptídeos estão baixos.

Descritores: Fator de Crescimento Insulin-Like I; Proteína 3 de Ligação a Fator de Crescimento Semelhante à Insulina; Nanismo Hipofisário; Diagnóstico; Sensibilidade e Especificidade; Valor Preditivo dos Testes

ABSTRACT

LIMA THI. Re-evaluation of the role of IGF-1 and IGFBP-3 serum concentrations in the assessment of children with short stature [dissertation]. "São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

IGF-1 and IGFBP-3 are an indirect measure of the GH secretion and are a useful tool in the evaluation of the GH/IGF-1 axis. These peptides are usually evaluated according to the chronological age in the diagnosis of GH deficiency (GHD). Our study evaluated the diagnostic value of IGF-1 and IGFBP-3 in the diagnosis of GHD and compared their performance assessed by chronological age, bone age and pubertal status. This is a retrospective, cross-sectional study; data of pediatric patients with growth disorders evaluated in our tertiary outpatient clinic were retrieved from medical records. The patients were classified as GHD or GH sufficient (non-GHD). The IGF-1 and IGFBP-3 were measured by a chemiluminescent immunometric assay (IMMULITE®) and these values were transformed into standard deviation scores according to chronological age (SDS-CA), bone age (SDS-BA) and pubertal status (SDS-PS). 50 patients were classified as GHD and 187 patients as non-GHD. The IGF-1 and IGFBP-3 SDS-CA, SDS-BA and SDS-PS were significantly lower in the GHD group in comparison to the non-GHD group ($p < 0.001$). The IGF-1 SDS-CA had a superior discriminatory performance than the IGFBP-3 SDS-CA in the diagnosis of GHD [area under the ROC curve (AUC) 0.877 and 0.766, respectively, $p = 0.001$]. The IGF-1 SDS-CA had a higher sensitivity (92% vs 45.2%) and the IGFBP-3 SDS-CA had a higher specificity (93.8% vs 69%). However, the predictive value of a positive result, considering an estimated GHD prevalence of 2% among children with short stature was 5.7% for the IGF-1 SDS-CA and 13.1% for the IGFBP-3 SDS-CA, with similar predictive values of a negative result. The IGF-1 SDS-BA had a better discriminatory performance than the IGF-1 SDS-CA, though not statistically significant (AUCs 0.902 and 0.877, respectively, $p = 0.29$). There was no difference in the performance of the IGFBP-3 SDS-CA and SDS-BA. The diagnostic value of the IGF-1 and IGFBP-3 SDS-CA and SDS-BA of patients of pre-pubertal age was similar. On the other hand, in patients of pubertal age, there was a significant improvement of the specificity of the IGF-1 SDS-BA and SDS-PS in comparison to the IGF-1 SDS-CA (from 65.5% to 92.7% and 98.4%), albeit the decay on the sensitivity (from 91.3% to 72.2% and 63.6%, respectively). Furthermore, the positive predictive values of the IGF-1 SDS-BA and SDS-PS were higher than the IGF-1 SDS-CA (16.8%, 44.8% and 5.1%, respectively), with similar negative predictive values. The evaluation of IGF-1 and IGFBP-3 assessed simultaneously in comparison to IGF-1 had a better sensitivity (from 92% to 94.4%) when either one of these peptides is low, and a better specificity (from 69 to 95.7%) when both the peptides are low.

Descriptors: Insulin-Like Growth Factor I; Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 3; Dwarfism; Pituitary; Diagnosis; Sensitivity and Specificity; Predictive Value of Tests

1 INTRODUÇÃO

1.1 Eixo GH/IGF-1

O sistema hormônio de crescimento (GH) / Fator de Crescimento Insulina-Símile tipo 1 (IGF-1) é o principal regulador endócrino do crescimento linear na vida pós-natal [1]. O GH é produzido na adenohipófise pelos somatotrofos e é regulado pelo hormônio liberador de GH (GHRH, *growth hormone releasing hormone*) e pela somatostatina com efeitos estimulatórios e inibitórios, respectivamente [1, 2]. A Ghrelina, produzida, sobretudo no trato gastrointestinal assim como em neurônios hipotalâmicos, também estimula a síntese e liberação do GH por sua ação no receptor secretagogo de GH (GHSR, *growth hormone secretagogue receptor*), localizado no hipotálamo e na hipófise [3].

As ações do GH ocorrem por meio de sua ligação com o seu receptor GHR – da família dos receptores de citocinas classe I, associado à proteína Janus quinase 2 (JAK2) –, ativando a via de sinalização das proteínas STATs (*signal transducer and activator of transcription*) [3]. A STAT5B é a principal proteína na transdução do sinal do GHR em humanos, regulando positivamente a expressão de diversos genes como o do IGF-1, de suas proteínas ligadoras (IGFBPs, *insulin-like growth factor binding protein*) e da subunidade ácido-lábil (ALS, *acid labile subunit*).

O GH age na cartilagem de crescimento, promovendo o crescimento linear de forma direta – induzindo a proliferação e diferenciação do condrócito – e indireta – mediadas pela ação do IGF-1 [1]. Este peptídeo, estruturalmente semelhante à proinsulina, sintetizado no fígado e em diversos tecidos periféricos, age nas camadas proliferativa e hipertrófica da cartilagem de crescimento, estimulando a proliferação, hipertrofia e diferenciação de condrócitos, a formação de osso endocondral e a ativação do *turnover* ósseo [1, 4]. No soro, cerca de 70-80% do IGF-1 encontra-se na forma de um complexo ternário formado com a IGFBP-3 e a ALS, aproximadamente 20% encontra-se ligado às IGFBPs e menos de 5% é encontrada na forma livre [5, 6].

As IGFBPs têm a função de transportar os IGFs para os tecidos periféricos, mediar a interação dos IGFs com seu receptor, modulando sua bioatividade e biodisponibilidade [7, 8]. Seis IGFBPs foram identificadas até o momento, em que a IGFBP-3 é o principal peptídeo envolvido na regulação do IGF-1 circulante [1]. A IGFBP-3 é produzida no fígado, além de prolongar a meia

vida do IGF-1 e age de forma dependente do IGF-1 modulando suas ações, assim como de forma independente ligando-se a receptores de membrana e nucleares, regulando a transcrição gênica e podendo até induzir a apoptose celular [1].

A ALS é uma proteína sintetizada no fígado, circula no soro na sua forma livre (50-60%) ou na forma do complexo ternário e, liga-se ao IGFBP-3 independente do IGF-1 e modula a afinidade entre ambos esses peptídeos [2, 9, 10]. Suas concentrações séricas são influenciadas pelo estado nutricional, estados catabólicos (grandes queimados), cirrose hepática, diabetes mellitus. O complexo ternário limita a passagem do IGF-1 livre ou ligado à IGFBP-3 através do endotélio, prolongando sua meia vida e minimizando as ações insulina-símile do IGF-1, como hipoglicemia [10]. A meia vida do IGF-1 é de aproximadamente 10 minutos na sua forma livre, de 30 a 90 minutos quando ligado à IGFBP-3 e superior a 12 horas na forma do complexo ternário. Como os componentes do complexo ternário são sintetizados e secretados pelo fígado de forma dependente do GH, suas concentrações séricas podem estar reduzidas em estados de hipoinsulinemia (desnutrição, jejum, diabetes) ou de resistência ao GH, como em doenças catabólicas (grandes queimados, cirrose), com o uso de algumas medicações (glicocorticóides) [10].

Após o nascimento e durante a infância, as concentrações séricas de IGF-1 e IGFBP-3 aumentam gradual e progressivamente em resposta ao GH. Durante a puberdade há uma elevação acentuada da concentração sérica destes peptídeos que se correlaciona com o estirão de crescimento puberal [11]. Após esse período, há uma redução progressiva dessas concentrações durante a vida adulta [12]. Com relação ao sexo, meninas têm o pico de concentrações séricas de IGF-1 e IGFBP-3 antes que os meninos, paralelamente ao pico da velocidade de crescimento e à produção de GH e de hormônios sexuais [11, 12].

Os valores séricos de IGF-1 e IGFBP-3 são influenciados não somente pela idade, sexo e estadio puberal, mas também por fatores genéticos, nutricionais, doenças crônicas (doenças hepáticas, insuficiência renal), diabetes e hipotireoidismo não compensados, uso de medicações (corticóides, drogas psicotrópicas) e condições psicossociais [3, 12, 13]. Os valores séricos da IGFBP-3 são menos influenciados pelo estado nutricional que o IGF-1 [14] e são menos susceptíveis a alterações no curto prazo como doenças agudas [15].

1.2 Patologias do eixo GH/IGF-1

Baixa estatura é uma queixa frequente na população pediátrica da Endocrinologia [16]. Há necessidade de investigação de doenças que cursem com baixa estatura em uma criança quando apresentar altura inferior ao percentil 2,5 ou ao escore de desvio padrão da altura para idade e sexo (escore-Z da altura) menor que -2 , desaceleração do crescimento, e/ou altura incompatível com a altura familiar [17]. Várias doenças que envolvem diversos sistemas podem comprometer o crescimento linear de maneiras distintas. Doenças do eixo GH/IGF-1 (Tabela 1) são um grupo importante e heterogêneo de doenças que abrangem desde distúrbios hipotalâmicos e hipofisários até alterações na ação tanto do GH, como do IGF-1 [3]. Os principais defeitos do eixo GH/IGF-1 juntamente com seu padrão de crescimento e sua caracterização fenotípica e laboratorial estão ilustrados na Tabela 1.

Tabela 1 - Principais defeitos do eixo-GH/IGF-1 e as características clínicas e laboratorial

Gene	Distúrbio de Crescimento		Avaliação Hormonal			Características clínicas
	Pré natal	Pós natal	GH	IGF-1	IGFBP-3	
Deficiência de GH	Vários	Normal	↓ a ↓↓↓	↓ a ↓↓↓	↓ a ↓↓↓	
GH Biologicamente inativo	GH1	Normal ou ↓	↓↓↓	↓↓	↓↓	Fenótipo da síndrome de Laron IGF-1 aumenta com uso de rhGH
Insensibilidade ao GH (GHI)	GHR	Normal ou ↓	↓↓ a ↓↓↓	Normal a ↑↑	↓ a ↓↓↓	Fenótipo de síndrome de Laron na forma completa; GHP ↓ em 70% dos casos; IGF-1 não se altera após rhGH
GHI associada a disfunção imune	STAT5B	Normal ou ↓	↓↓↓	↑↑	↓↓	Fenótipo similar a síndrome de Laron associado a disfunção autoimune e elevação da PRL
Defeitos no complexo ternário	IGFALS	Normal ou ↓	↓	Normal a ↑	↓↓↓	Alteração laboratorial desproporcional à baixa estatura leve, atraso puberal
	PAPPA2	Normal ou ↓	↓ a ↓↓	↑↑↑	↑↑↑	Microcefalia leve, IGF-1 livre baixo
Defeitos do IGF1	IGF1	↓↓↓	↓↓↓	↑↑	Normal ou ↑	Microcefalia, surdez neurosensorial, atraso de desenvolvimento, déficit cognitivo, resistência insulínica
Defeitos do IGF2	IGF2	↓↓↓	↓↓ a ↓↓↓	Normal ou ↑	Normal ou ↑	Fenótipo semelhante a síndrome de Silver-Russell e IGF-2 baixo (*)
IGF-1 Bioinativo	IGF1	↓↓↓	↓↓↓	↑↑	Normal	Microcefalia, surdez neurosensorial, atraso de desenvolvimento, déficit cognitivo, resistência insulínica
Insensibilidade ao IGF1	IGF1R	↓ a ↓↓↓	↓ a ↓↓↓	Normal a ↑↑	Normal a ↑↑	Microcefalia, atraso de desenvolvimento, déficit cognitivo podem estar presentes

↑ = aumentado; ↓ = reduzido; PRL = prolactina.

1.3 Deficiência de hormônio de crescimento (DGH)

Entre as doenças que afetam o eixo GH/IGF-1, a deficiência de GH (DGH) é a mais frequente; porém, é uma condição pouco prevalente, variando entre 1:3.480 a 1:8.646 nascidos vivos [3, 18-20]. Quando se avalia crianças com baixa estatura, sua frequência oscila entre 0,8% a 8,4% [18, 19, 21-27], conforme os critérios diagnósticos adotados e a amostra populacional estudada. Essa prevalência pode ser ainda maior, quando há viés de referência em centros terciários [28], viés de seleção, como crianças com baixa estatura mais grave, definida como escore-Z de altura $< -2,5$ ou -3 [29] e grau de consanguinidade da população [30]. Como essa patologia é a única que apresenta tratamento específico disponível e de alto custo – o GH recombinante humano (rhGH) –, é importante realizar uma abordagem diagnóstica adequada e custo-efetiva.

1.4 Diagnóstico de DGH

O diagnóstico de DGH exige uma avaliação clínica, combinada com testes bioquímicos do eixo GH/IGF-1, exames de imagem do sistema nervoso central e testes genéticos [3, 13]. Isso porque não existe um único teste para o diagnóstico de DGH, mas sim diversos testes que, em conjunto, nos levam a esse diagnóstico. Os testes diagnósticos na avaliação de DGH são imperfeitos, ou seja, não são capazes de determinar o diagnóstico em um paciente com absoluta precisão e sem falhas (ausência de falsos positivos e falsos negativos). Nesse sentido, a avaliação clínica é a primeira etapa nesta investigação diagnóstica, indicando a necessidade ou não de investigação complementar. Inicialmente, deve-se optar por exames mais simples, de baixo custo e alta sensibilidade para minimizar a taxa de falsos negativos. Em seguida, é necessário avaliar com testes com maior especificidade podendo ser mais dispendiosos e mais onerosos para confirmação diagnóstica.

Os aspectos clínicos típicos de uma criança com DGH incluem, na anamnese, antecedentes pregressos de hipoglicemia neonatal, icterícia neonatal prolongada, microfalo, distócia de parto, irradiação craniana, trauma ou infecção do sistema nervoso central; história familiar de consanguinidade ou de

quadro clínico semelhante, anomalias craniofaciais de linha média [2, 13]. Já no exame físico, são característicos fronte proeminente, fácies infantil e hipoplásica, dentição atrasada, obesidade truncal, cabelos finos e ralos, baixa massa magra. O crescimento é caracterizado por uma desaceleração progressiva desde o período pós-natal, associado a atraso de idade óssea, de desenvolvimento puberal e acromicria. A DGH apresenta um grande espectro clínico, variando desde quadros bastante graves e característicos até quadros oligossintomáticos e de maior dificuldade diagnóstica [2, 13].

A investigação laboratorial do eixo GH/IGF-1 baseia-se na análise da secreção do GH. A dosagem de GH em amostra isolada geralmente não tem utilidade para o diagnóstico de DGH devido à pulsatilidade de sua secreção, exceto em neonatos quando suas concentrações séricas são mais elevadas [2]. Dessa forma, essa avaliação é realizada de forma direta por meio de testes de estímulo de secreção do GH e, indireta, pelas dosagens séricas de IGF-1 e IGFBP-3, cujas concentrações refletem a ação do GH [2, 13, 31].

O teste de estímulo de secreção do GH tradicionalmente é considerado o "padrão ouro" na identificação de pacientes com DGH. O diagnóstico é confirmado quando o pico de GH em dois testes com estímulos diferentes não atinge o valor de corte estabelecido [2, 32, 33]. Inicialmente, era utilizado um valor de corte entre 5 a 7 µg/L e, com o advento do GH biosintético e o aumento da sua oferta após 1990, esse valor foi aumentado arbitrariamente para 10 µg/L [3, 34]. Avaliação dos testes de estímulo de GH em crianças saudáveis e com crescimento normal demonstrou que, quando adotado um valor de corte de 7 µg/L, quase 25% dessas crianças não responderam adequadamente ao teste; e quase 50% das crianças não atingiram o valor de corte de 10 µg/L [35]. A utilização de dois testes de estímulos de secreção de GH reduziu essa proporção de falsos positivos para 2,6% e 10,2% para os valores de corte de 7 µg/L e 10 µg/L, respectivamente. Além disso, quando crianças diagnosticadas com DGH isolado são retestadas após o término do crescimento linear, pelo menos 25% desses pacientes demonstram secreção adequada de GH [36-38], sobretudo naqueles pacientes sem substrato anatômico ou genético que explique a deficiência de GH na infância. Este dado sugere que muitos dos diagnósticos de DGH realizados na infância não correspondiam a uma real deficiência deste hormônio.

Os estímulos farmacológicos mais empregados nos testes de estímulo de secreção de GH propostos são: insulina, clonidina, arginina, glucagon, GHRH, levodopa [3]. A hipoglicemia induzida por insulina foi o primeiro estímulo reconhecido para a secreção de GH. Assim, o teste de tolerância à insulina (ITT), realizado há décadas, induz hipoglicemia no paciente, a qual reduz o tônus hipotalâmico da somatostatina e, conseqüentemente, estimula a secreção de GH [39]. Este teste apresenta uma alta predição no diagnóstico de DGH, identificando 91,5% dos casos [34]. Entretanto, o teste é desconfortável, não isento de riscos à criança e é contraindicado em crianças menores de 20 kg, antecedente pessoal de convulsões, doença isquêmica coronariana ou cerebral [39].

A clonidina é um alfa-bloqueador do receptor adrenérgico que aumenta a secreção do GH provavelmente por induzir a liberação de GHRH, com mínimos efeitos colaterais (sonolência e hipotensão leve que normalmente não necessitam de intervenção) [40]. A avaliação do poder discriminativo desse estímulo foi realizada por Silva *et al* [41], a partir da análise de curvas ROC, em que um valor de corte de 3,3 µg/L apresentou sensibilidade de 100% e especificidade de 93%. E, utilizando um valor de corte de 6,8 µg/L, Guzzetti *et al* encontraram mais recentemente valores de sensibilidade de 88,5% e especificidade de 97,4% [34].

Adicionalmente, é conhecida a influência dos esteróides sexuais na secreção de GH, sobretudo no período peripuberal [38]. Nos estudos que avaliaram o pico de GH nos testes de estímulo, observa-se que essa influência dos hormônios sexuais ocorreu somente nos pacientes sem deficiência completa de secreção de GH [42]. Nesses casos, “priming” com esteróides sexuais foi proposto para melhorar a performance desses testes de estímulo e reduzir a taxa de falsos positivos, mas sua utilização ainda é controversa e não é endossada pelos consensos [3].

Vários estudos advogam a necessidade de elaborar um novo e mais efetivo algoritmo no diagnóstico de DGH, e de se estabelecer novos valores de corte para os testes de estímulo de GH, considerando o estímulo farmacológico utilizado, o ensaio empregado para dosagem do GH e fatores que possam interferir com a secreção de GH, como idade, sexo, hormônios esteróides sexuais e índice de massa corpórea (IMC) [34, 40]. Além disso, quando um

paciente é submetido a dois testes de estímulo, seja o mesmo estímulo, sejam estímulos farmacológicos diferentes, a correlação entre esses testes foi ruim ($r < 0,80$) [43]. E, com o aperfeiçoamento e automatização dos ensaios de GH cada vez mais sensíveis e específicos, o seu limiar de detecção tornou-se cada vez menor; porém, esse aperfeiçoamento não foi acompanhado de estudos que estabelecessem novos valores de corte para os testes de estímulo [44].

Há autores que, inclusive, questionam a necessidade do uso de testes de estímulos na investigação de DGH por suas limitações: baixa acurácia e reprodutibilidade, alta taxa de falsos positivos, alto custo, efeitos colaterais e baixa predição de resposta ao rhGH [1, 31, 45-47]. Alguns estudos propõem o uso da neuroimagem como recurso diagnóstico na investigação de DGH em pacientes com baixa estatura, pois há uma associação positiva entre alterações anatômicas da hipófise com a gravidade da secreção de GH [48, 49]. A presença de alterações de desenvolvimento da região hipotalâmico-hipofisária apresenta sensibilidade de 79% mas especificidade de somente 54%. A especificidade aumenta para 100% com a presença de neurohipófise ectópica ou para 80% com a associação com hipoplasia de adenohipófise com transsecção de haste hipofisária [2]. O fenótipo de DGH é mais grave entre os pacientes com alterações genéticas associadas a DGH e entre aqueles que apresentaram alterações anatômicas da hipófise na ressonância magnética (RM) [50, 51].

1.5 Uso do IGF-1 e IGFBP-3 na avaliação indireta da secreção de GH

Como a dosagem sérica basal de GH e os testes de estímulo têm suas limitações, a medida indireta da secreção de GH, a partir das dosagens séricas de IGF-1 e IGFBP-3 basais, é preferível por apresentarem mínima variação em 24 horas e serem mais fáceis, menos onerosas e com maior reprodutibilidade, sobretudo nos pacientes sem evidência clínica característica de DGH [1, 2]. Além disso, Juul *et al* reportaram uma alta correlação entre o pico de GH em resposta a um teste de estímulo e os valores séricos de IGF-1 e IGFBP-3 em pacientes adultos com suspeita de DGH [38]. Apesar de suas vantagens, é importante lembrar que as concentrações séricas do IGF-1, do IGFBP-3 sofrem influência de diferentes fatores, como idade, hormônios esteróides sexuais, fatores

genéticos, estado nutricional, doenças crônicas não compensadas, uso de medicações [3, 12, 13].

1.5.1 Ensaios laboratoriais de IGF-1 e IGFBP-3

Além dos diferentes fatores fisiológicos que interferem com a concentração sérica do IGF-1 e do IGFBP-3, fatores técnicos, inerentes ao ensaio, comprometem sua performance [52-55]. A mensuração acurada do IGF-1 depende de diferentes fatores como calibração do aparelho, especificidade do anticorpo em relação ao antígeno e outros interferentes do processo de mensuração como o IGF-2 e as IGFBPs [1, 56]. A influência das IGFBPs na mensuração do IGF-1 pode ser contornada com diferentes abordagens como dissociação do complexo IGFBP/IGF-1 pela separação das IGFBPs do IGF-1 em meio ácido com posterior extração das IGFBPs com etanol ou, mais recentemente, bloqueio dos sítios de ligação das IGFBPs com altas concentrações de IGF-2 [2, 57].

A quantificação da IGFBP-3 não é influenciada pela presença do IGF-1 ou do IGF-2. Entretanto, a degradação do IGFBP-3 por proteases resulta em fragmentos não funcionantes e de menor tamanho molecular (19 kDa e 24 kDa) que podem ser reconhecidos pelos imunoenaios [58, 59]. Tendo em vista esses interferentes, a Organização Mundial de Saúde (OMS) publicou um consenso recente que discorre sobre a padronização dos ensaios do IGF-1 e recomenda o padrão de referência IS 02/254, padrão bem caracterizado por ser derivado da síntese do peptídeo recombinante com 97% de pureza.

Houve uma melhora na correlação entre os ensaios laboratoriais do IGF-1 e do IGFBP-3, com o advento dos ensaios automatizados [12]. Um estudo recente [56] demonstrou boa concordância entre valores séricos de IGF-1 muito altos ou muito baixos, utilizando seis diferentes ensaios automatizados e disponíveis atualmente, mas esta concordância foi pior quando os valores de IGF-1 estavam próximos aos valores de referência (*borderline*) o que justifica cautela na interpretação dos resultados nesses casos.

Somado a isso, as concentrações de IGF-1 de um mesmo indivíduo podem apresentar uma elevada variabilidade, de 3 a 36%, em amostras obtidas

em dias diferentes [52]. A avaliação da dosagem sérica mensal de IGF-1 e de IGFBP-3 durante um período de um ano em crianças saudáveis demonstrou uma variação média de 13,9% (6,0 a 28,9%) e de 9,7% (4,1 a 36,0%) respectivamente, influenciadas pela velocidade de crescimento e ganho de peso da criança, além de doenças agudas [15].

1.5.2 Desempenho discriminativo do IGF-1 e IGFBP-3

Os baixos valores séricos de IGF-1 e IGFBP-3 (escore-Z < -2) são compatíveis com o diagnóstico de DGH desde que excluídas outras causas de redução das concentrações séricas desses peptídeos, já mencionadas. Valores normais destas proteínas são uma forte evidência contra o diagnóstico de DGH, dispensando a realização dos testes de estímulo [1]. Porém, eventualmente crianças com DGH menos grave ou de instalação recente podem ter concentrações séricas de IGF-1 e IGFBP-3 dentro da normalidade [13, 31]. E em crianças menores de seis anos de idade ou naquelas com atraso puberal, há uma sobreposição considerável dos valores séricos do IGF-1 de crianças com e sem DGH [2, 12, 13].

Vários estudos compararam a performance das dosagens séricas de IGF-1 e IGFBP-3 no diagnóstico de DGH com resultados discordantes [12, 16, 60-62]. Uma metanálise recente abordando este tema demonstrou que a sensibilidade e especificidade do IGF-1 e IGFBP-3 variaram significativamente entre os estudos (média de sensibilidade de 66% e 50% e especificidade de 69% e 79%, respectivamente) [63]. Esta divergência pode ser atribuída aos diferentes desenhos (número de pacientes, faixas etárias das crianças, critérios diagnósticos de DGH, tipo de ensaio e valores de corte adotados de IGF-1 e IGFBP-3). Nesse mesmo estudo, a capacidade discriminatória da área sob a curva *receiver operator characteristic* (ROC) mostrou acurácia aceitável do IGF-1 e IGFBP-3 no diagnóstico de DGH (0,78 e 0,80, respectivamente). O IGFBP-3 teve maior utilidade em crianças mais jovens, quando os valores séricos do IGF-1 de crianças com e sem DGH apresentaram uma maior sobreposição de valores [16, 63].

1.6 Proposta do presente estudo e contribuições originais esperadas

Todos os estudos sobre a utilidade do IGF-1 e IGFBP-3 na avaliação do eixo GH/IGF-1 analisaram os valores séricos em relação à idade cronológica. Porém, em condições que cursam com atraso ou antecipação da puberdade, é prática comum avaliar os valores destes hormônios em relação a idade óssea ou estadio puberal [44]. Por exemplo, ao avaliarmos duas crianças com baixa estatura do sexo masculino de 16 anos de idade que apresentem um escore-Z do IGF-1 comparado com os valores de referência para a idade cronológica de $-3,2$ e uma delas apresenta estadio puberal de Tanner de 2 e a outra de 4, é comum considerarmos nesta avaliação os valores de referência do IGF-1 também para o estadio puberal. Desta forma o escore-Z do IGF-1 para o estadio puberal seria de $-0,8$ e $-2,2$, respectivamente, e o diagnóstico de DGH é menos provável na primeira criança, a qual apresenta valor normal de escore-Z do IGF-1 quando utilizado os valores de referência para o estadio puberal.

Esta prática, apesar de intuitiva e recomendada por diferentes autores, carece de suporte na literatura [2]. Dessa forma, uma das propostas do presente estudo é avaliar a acurácia da dosagem destes peptídeos na avaliação da secreção de GH quando analisados em relação a idade cronológica, idade óssea e estadio puberal.

Os resultados deste estudo podem trazer significantes conhecimentos na prática clínica, estabelecendo o real valor diagnóstico desses peptídeos, IGF-1 e IGFBP-3, tão comumente solicitados na avaliação de baixa estatura.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar a utilidade da determinação sérica de IGF-1 e IGFBP-3 na avaliação de crianças com baixa estatura com foco em identificar pacientes com DGH.

2.2 Objetivos específicos

- Comparar a acurácia, valor preditivo positivo e negativo das dosagens de IGF-1 e IGFBP-3 no diagnóstico de DGH utilizando valores de escore de desvio padrão em relação a idade cronológica, idade óssea e idade puberal.
- Analisar o desempenho discriminativo da dosagem concomitante ou isolada de IGF-1 e/ou IGFBP-3 na investigação de DGH em crianças com baixa estatura.

3 CASUÍSTICA E METODOLOGIA

3.1 Casuística

Trata-se de um estudo retrospectivo, transversal com levantamento de dados de prontuário de pacientes na faixa etária pediátrica avaliados nos ambulatórios de Endocrinologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

3.2 Considerações éticas

O estudo foi conduzido de acordo com princípios éticos e orientações contidas na declaração de Helsinki e pelos termos descritos pela Portaria 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. O projeto foi aprovado pelas Comissões de Ética em Pesquisa CAPPesq sob o número 14375/2015 e Plataforma Brasil, CAAE número 53728116.8.0000.0068.

A coleta de dados foi realizada apenas com informações contidas nos prontuários dos pacientes, tratando-se de um estudo observacional e retrospectivo. A confidencialidade da identificação pessoal dos pacientes foi garantida pelo pesquisador principal e pelas técnicas de levantamento e guarda dos dados: os pacientes foram identificados por meio de iniciais e números de registro que servem para validar a individualidade da informação, não sendo objetos de análise.

3.3 Critérios de seleção de pacientes

Ao longo dos últimos 20 anos, mais de 300 pacientes com deficiência comprovada de GH e mais de 1.000 pacientes com distúrbios de crescimento sem DGH foram avaliados e acompanhados em nosso serviço. Deste universo, foram obtidos de forma retrospectiva dados clínicos e laboratoriais seguindo a estratégia de estudo detalhada a seguir e resumida na Figura 1.

As crianças foram classificadas como deficientes ou suficientes de GH. Para análise das crianças sem DGH foram excluídas aquelas com diagnóstico de condições clínicas que justifiquem o distúrbio de crescimento apresentado

pelo paciente (síndromes genéticas, displasias esqueléticas e doenças crônicas).

Figura 1 - Resumo da estratégia e seleção da casuística para o estudo. BE: Baixa estatura; BEI: baixa estatura idiopática; ACCD: atraso constitucional do crescimento e desenvolvimento; PIG: pequeno para idade gestacional.

3.3.1 Critérios de inclusão

1. Ter critérios para iniciar investigação de distúrbio de crescimento:
 - a. Baixa estatura caracterizada por escore-Z da altura inferior a -2 para idade e sexo e/ou;
 - b. Baixa estatura em relação ao potencial genético definido por um escore-Z de altura maior que 1,5 desvios padrões abaixo da altura alvo e/ou;
 - c. Desaceleração do crescimento definida como velocidade de crescimento maior que um desvio padrão abaixo da média para a idade cronológica ou um decréscimo no escore-Z de altura acima de 0,5 desvio padrão, em um período de pelo menos um ano de observação;
2. Ter disponível em prontuário dados clínicos (incluindo estadio puberal) e antropométricos que permitam a determinação diagnóstica;

3. Ter dosagens séricas de IGF-1 e IGFBP-3 realizada até 6 meses antes ou depois da avaliação clínica;
4. Ter determinação da idade óssea realizada até 6 meses antes ou depois da avaliação clínica;

3.3.2 Critérios de exclusão

1. Ter feito uso ou estar em uso de hormônio de crescimento, análogos de GnRH, estrógeno e/ou testosterona no momento da avaliação laboratorial;
2. Ter diagnóstico de puberdade precoce no momento da avaliação clínica e laboratorial;
3. Ter diagnóstico de condições clínicas identificáveis na avaliação inicial e que justifiquem o distúrbio de crescimento apresentado, mas sem necessidade de avaliação do eixo GH/IGF-1, como:
 - a. Doenças crônicas como acidose tubular renal, doença celíaca, desnutrição, anemia falciforme, entre outras;
 - b. Síndromes genéticas como síndrome de Turner, síndrome de Noonan, displasias esqueléticas, entre outras.

3.4 Critérios para diagnóstico de deficiência de GH

Pacientes foram classificados como DGH [13, 64] quando houver:

1. Critérios para iniciar investigação de distúrbio de crescimento (item 3.3.1, subitem 1);
2. Exclusão de outras condições que justifiquem o distúrbio de crescimento;
3. Documentação de hipossecreção de GH com:
 - a. Presença de dois testes de estímulo de secreção de GH sem resposta adequada (pico de GH $< 5,0 \mu\text{g/L}$) OU
 - b. Presença de um teste de estímulo de secreção de GH sem resposta adequada (pico de GH $< 5,0 \mu\text{g/L}$) associado a:
 - i. Quadro clínico compatível com DGH grave caracterizado por baixa estatura proporcional grave (escore-Z da altura < -3), presença de

hipoglicemia neonatal, *microfallus*, obesidade truncal, aparência facial infantil com fronte proeminente e nariz em sela, atraso na dentição, cabelos finos e esparsos, voz aguda e infantil, e idade óssea atrasada; E/OU

ii. Alteração anatômica da região hipotalâmico-hipofisária (transecção de haste hipofisária, presença de craniofaringeoma ou outras lesões selares, anomalias craniofaciais com defeitos de linha média, história de trauma craniano, infecção do SNC e irradiação craniana) compatível com o diagnóstico de DGH; E/OU

iii. Múltiplas deficiências de hormônios hipofisários como TSH, ACTH, LH/FSH e ADH; E/OU

iv. Defeito genético identificado associado com DGH.

Os pacientes portadores de DGH associado a deficiência de outros hormônios hipofisários foram compensados anteriormente à avaliação do eixo GH/IGF-1. Como o uso de *priming* com esteróides sexuais é controversa, este recurso não foi utilizado antes da realização de testes de estímulo de secreção de GH.

3.5 Critérios para diagnóstico de suficiência de GH

Pacientes foram classificados como não tendo DGH quando houver:

1. Documentação de secreção adequada de GH (valor de GH basal ou em teste de estímulo $\geq 5,0 \mu\text{g/L}$).
2. Observado, durante o seguimento sem intervenção, velocidade de crescimento normal ou acima da média, com recuperação espontânea do crescimento.

Dentre os pacientes sem DGH, classificamos os pacientes como nascidos pequenos para idade gestacional (PIG) ou baixa estatura idiopática (BEI) pelos seguintes critérios:

1. Pacientes foram classificados como BE por terem nascido PIG quando [65]: escore-Z de peso e/ou comprimento ao nascimento forem < -2 , desde que

excluídos o diagnóstico de DGH ou outras condições clínicas associadas ao déficit de crescimento intrauterino.

2. Pacientes foram classificados como BEI quando o escore-Z de altura for < -2 , nascidos adequados para idade gestacional e suficientes de GH, sem evidência de alterações sistêmicas, endócrinas, nutricionais ou cromossômicas que justifiquem o distúrbio do crescimento [66]. Nesta categoria, foram incluídos pacientes com baixa estatura familiar (BEF) e atraso constitucional do crescimento e desenvolvimento (ACCD) definidos conforme os critérios abaixo:

- a. Pacientes foram classificados como BEF quando pelo menos um dos progenitores tivesse escore-Z da altura < -2 .
- b. Pacientes foram classificados como ACCD quando houvesse ausência de desenvolvimento mamário (estadio de Tanner 1) com idade de 13 anos em meninas, e em meninos, volume testicular $\leq 3\text{mL}$ com 14 anos de idade, associados a atraso de idade óssea, e crescimento e desenvolvimento puberal espontâneo e completo durante o seguimento.

3.6 Dosagens hormonais

Nos últimos 20 anos, as dosagens de IGF-1 e IGFBP-3 foram realizadas por dois principais métodos em nosso serviço (Tabela 2). Somente os dados de pacientes cujas dosagens de IGF-1 e IGFBP-3 foram realizadas pelo método Quimioluminescência (Immulin® 2000; Diagnostic Products Corp, Los Angeles, CA, EUA), automatizado e calibrado conforme recomendações da OMS IRR 87/518, foram considerados para análise. Os coeficientes de variação intra e interensaio para o IGF-1 foram $<3,9\%$ e $<8,1\%$, respectivamente; e para o IGFBP-3 foram $<4,8\%$ e $<7,3\%$, respectivamente. Este ensaio foi utilizado pelo maior intervalo de tempo e apresenta o maior número de pacientes, cujas dosagens desses peptídeos foi realizada com o mesmo ensaio. Dessa forma, a variabilidade das dosagens séricas do IGF-1 e do IGFBP-3 existente entre os diferentes ensaios disponíveis no mercado foi reduzida com o objetivo de melhorar o poder estatístico do estudo [56].

Os valores obtidos foram transformados em escore de desvio padrão (escore-Z) conforme os valores de referência de média e desvios-padrões para idade e sexo fornecidos pelo laboratório [55].

Tabela 2 - Metodologias utilizadas para dosagem sérica de IGF-1 e IGFBP-3 realizadas em nosso serviço nos últimos 20 anos

Dosagem	Metodologia	Laboratório	Período
IGF-1	Radioimunoensaio após extração com etanol	Diagnostic Systems Laboratories - DSL, Webster, TX	1994-2005
	Quimioluminescência	IMMULITE, Diagnostic Products Corporation – DPC, Los Angeles, CA, EUA	Nov/2005 – 05/05/2017
	Quimioluminescência	IDS-iSYS, Immunodiagnostic Systems Holdings, Boldon Colliery, Reino Unido	05/05/2017 – dias atuais
IGFBP-3	Radioimunoensaio	Diagnostic Systems Laboratories - DSL, Webster, TX	1994-2005
	Quimioluminescência	IMMULITE, Diagnostic Products Corporation – DPC, Los Angeles, CA, EUA	Nov/2005 – 05/05/2017
	Quimioluminescência	IDS-iSYS, Immunodiagnostic Systems Holdings, Boldon Colliery, Reino Unido	05/05/2017 – dias atuais

O GH foi mensurado utilizando dois ensaios monoclonais. O kit imunofluorimétrico (Delfia®, Wallac, Turku, Finlândia) foi utilizado entre 2005 e 2014, de acordo com o padrão internacional 80/505 da OMS, com limite de detecção do ensaio de 0,01 µg/L. O imunoensaio automatizado por quimioluminescência (Immunodiagnostic Systems Holdings PLC, Tyne & Wear, Reino Unido) foi utilizado entre 2014 e 2017 e calibrado conforme o padrão da OMS IS 98/574, com um limite de detecção de 0,050 µg/L.

3.7 Análise estatística

Foi realizada a análise descritiva dos dados obtidos em que as variáveis numéricas são demonstradas em média e desvio padrão, e mediana e intervalo percentual (5% e 95%); e as categóricas, em números absoluto e relativo

(porcentagem). A altura alvo (TH) foi utilizada para estimar a “o potencial genético” a partir da média aritmética da altura dos pais, somando-se 6,5 se o paciente fosse do sexo masculino ou subtraindo-se 6,5 se a paciente fosse do sexo feminino. Os escores de desvio padrão (escore-Z) para altura e IMC derivaram da referência dos gráficos de crescimento americanos de 2000 [67], validados para a população brasileira [68].

A determinação da idade óssea do paciente foi realizada por dois médicos capacitados, a partir da radiografia de mão e punho esquerdos, e comparada com o atlas de idade óssea de Greulich-Pyle. Nos casos em que houve discordância entre as avaliações, a opinião de um terceiro observador auxiliou nessa determinação.

Os valores absolutos de IGF-1 e IGFBP-3 foram representados como escore-Z. Para as crianças em idade pré-puberal (idade inferior a 9 anos de idade em meninos e 8 anos em meninas) os escores de desvio padrão do IGF-1 e do IGFBP-3 foram calculados baseados pelos valores de referência para idade cronológica (escore- Z_{IC}) e para idade óssea (escore- Z_{IO}). Para o cálculo dos escores- Z_{IO} , utilizou-se a idade óssea do paciente pareada com os valores de referência do IGF-1 e do IGFBP-3 para idade cronológica e sexo fornecidos pelo laboratório.

Para as crianças em idade puberal (meninos acima de 9 anos e meninas acima de 8 anos de idade), também foi calculado o escore de desvio padrão utilizando os valores de referência para estadio puberal (escore- Z_{IP}). A determinação do estadio puberal foi realizada a partir da avaliação clínica do paciente conforme os estadios puberais de Tanner, em conjunto com a avaliação laboratorial (dosagem sérica de estradiol e testosterona, nos sexos feminino e masculino respectivamente, e de LH), quando disponível.

A análise estatística foi realizada a partir de dosagens do IGF-1 e do IGFBP-3 individualizadas, propiciando que uma criança contribuísse para mais de uma dosagem, desde que fosse classificada em outro grupo etário-puberal: idade pré-puberal, idade puberal sem sinais de puberdade e idade puberal com sinais de puberdade.

Na comparação de variáveis categóricas (sexo e estadio puberal) entre os diferentes subgrupos diagnósticos foi utilizado o teste Chi-quadrado de Pearson. Testamos, no momento da avaliação, a interação entre as seguintes

variáveis numéricas: idade cronológica e óssea, escore-Z de altura, de IMC e de altura alvo, pico máximo de secreção de GH em resposta a teste de estímulo e escores-Z das dosagens séricas de IGF-1 e IGFBP-3 calculados em comparação com a idade cronológica, idade óssea e estadio puberal, utilizando *Analysis of Variance* (ANOVA) para as variáveis paramétricas e teste de Kruskal-Wallis para aquelas com distribuição não-paramétrica.

Foram calculados os valores de sensibilidade, especificidade e acurácia (fórmulas no anexo I) em relação ao diagnóstico de DGH considerando o grupo não deficiente de GH. Consideramos o valor de corte ≤ -2 para definir o diagnóstico de DGH por convenção estimada de definição de doença e em conformidade com *Consensus Guideline* da *GH Research Society* [32]. Para o cálculo dos valores preditivos positivos (VPP) e negativos (VPN) foi utilizado o teorema de Bayes (fórmulas no anexo I) com uma prevalência máxima de DGH estimada em 2% entre crianças com baixa estatura [69]. Os valores de sensibilidade, especificidade, acurácia diagnóstica e valores preditivos positivo e negativo são expressos em porcentagens.

Curvas *Receiver Operator Characteristic* (ROC) foram elaboradas para comparar o desempenho discriminatório dos escores-Z de IGF-1 e de IGFBP-3 no diagnóstico de DGH. Um teste com discriminação perfeita apresenta uma curva ROC cuja AUC é 1,0; em contrapartida, uma AUC de 0,5 representa um teste sem nenhuma discriminação [70]. Foi considerada uma discriminação excelente quando acima de 0,90; boa, entre 0,80 e 0,90; razoável, entre 0,70 e 0,80; ruim, entre 0,60 e 0,70; e falha se menor que 0,60.

Os dados foram analisados com auxílio dos programas SigmaStat (Systat Software, San Jose, CA, EUA) e MedCalc (MedCalc Software, Ostend, Bélgica). Foi considerado o valor de erro tipo $\alpha < 0,05$ como estatisticamente significativo.

4 RESULTADOS

4.1 Características dos pacientes

Foram levantados prontuários de 840 pacientes, dos quais 556 preenchiam os critérios de inclusão e exclusão do estudo (Figura 2). Destes pacientes 199 tiveram a dosagem de IGF-1 e IGFBP-3 realizada por quimioluminescência – IMMULITE®. Nessa coorte de 199 pacientes, 36 pacientes foram avaliados em diferentes categorias etárias, totalizando 237 dosagens séricas de IGF-1 e de 225 dosagens séricas de IGFBP-3 avaliadas. Em toda a casuística, houve predomínio de pacientes do sexo masculino (67,1%), a idade média dos pacientes foi de $10,1 \pm 4,2$ anos e 69% dos pacientes ainda não apresentavam sinais clínicos e/ou laboratoriais de desenvolvimento puberal. As características clínicas dos pacientes, conforme sua classificação nos diferentes grupos, estão resumidas na Tabela 3.

Figura 2 - Fluxograma de inclusão/exclusão dos pacientes

Tabela 3 - Comparativo das características clínicas das crianças avaliadas no presente estudo

	DGH	Não-DGH	BEI	PIG
N	50	187	133	54
Sexo (M:F)	30:20 a**	129:58 a*	103:30 a**,b	26:28 a**,b
Escore-Z da altura alvo	-0,8 ± 0,9 -1,0 (-2,4 a 0,6)	-1,0 ± 0,9 -0,9 (-2,5 a 0,5)	-0,9 ± 0,9 -0,9 (-2,4 a 0,6)	-1,0 ± 0,9 -1,0 (-2,7 a 0,1)
Idade (anos)	8,7 ± 4,9 a* 8,0 (1,3 a 17,0) a**	10,5 ± 3,9 a* 11,1 (3,0 a 16,0)	11,3 ± 3,7 12,1 (4,6 a 16,1) a**,b**	8,6 ± 3,8 8,3 (2,5 a 14,5) b**
Idade óssea (anos)	6,2 ± 4,7 5,0 (1,5 a 13,3) a**	8,7 ± 3,6 10,0 (2,0 a 13,5) a**	9,3 ± 3,3 10,0 (3,0 a 13,0) a**,b*	7,1 ± 3,8 6,5 (1,5 a 13,6) b*
IO-IC (anos)	-2,8 ± 1,8 -3,1 (-5,6 a 0,2) a**	-2,0 ± 1,4 -2,0 (-4,4 a 0,2) a*	-2,2 ± 1,5 -2,2 (-4,5 a 0,3) b*	-1,4 ± 1,0 -1,3 (-3,2 a 0,1) a**,b*
Escore-Z da altura	-3,8 ± 1,8 -3,4 (-6,5 a -1,8) a**	-2,8 ± 0,6 -2,7 (-3,5 a -1,8) a**	-2,7 ± 0,5 -2,7 (-3,4 a -1,8) a**	-2,9 ± 0,7 -2,9 (-3,6 a -2,1) a**
Escore-Z do IMC	0,1 ± 1,3 a* 0,4 (-2,0 a 2,0) a**	-0,9 ± 1,5 a* -0,8 (-3,2 a 1,2)	-0,9 ± 1,5 -0,8 (-3,2 a 1,1) a**	-0,8 ± 1,5 -0,7 (-3,1 a 1,4) a*
Estádios puberais (%)				
I.	84	65	62	70
II.	2	25	25	24
III.	10	7	8	6
IV.	4	3	5	0
Pico máximo de GH (µg/L)	1,5 ± 1,8 0,9 (0,1 a 5,1) a**	9,5 ± 5,0 8,4 (3,4 a 20,1) a**	9,2 ± 4,9 8,1 (4,0 a 19,7) a**	10,3 ± 5,2 8,9 (3,4 a 20,1) a**
Escore-Z_{IC} do IGF1	-2,9 ± 0,7 -2,9 (-4,0 a -1,1) a**	-1,1 ± 1,3 -1,1 (-2,9 a 1,1) a**	-1,3 ± 1,3 -1,3 (-2,9 a 0,7) a**,b*	-0,7 ± 1,4 -0,5 (-2,8 a 1,2) a**,b*
Escore-Z_{IO} do IGF1	-2,6 ± 0,9 -2,8 (-3,6 a -0,2) a**	-0,6 ± 1,2 -0,6 (-2,7 a 1,3) a**	-0,7 ± 1,1 -0,6 (-2,5 a 1,0) a**	-0,4 ± 1,4 -0,3 (-2,7 a 1,6) a**
Escore-Z_{IC} do IGFBP-3	-1,9 ± 1,5 -1,8 (-4,5 a 0,2) a**	-0,3 ± 1,1 -0,2 (-2,2 a 1,3) a**	-0,5 ± 1,0 -0,4 (-2,2 a 1,1) a**	0,0 ± 1,1 0,0 (-2,2 a 1,5) a**
Escore-Z_{IO} do IGFBP-3	-1,2 ± 1,4 -0,7 (-3,8 a 1,0) a**	0,1 ± 1,0 0,1 (-1,6 a 1,8) a**	0,0 ± 0,9 0,1 (-1,4 a 1,3) a**	0,4 ± 1,1 0,3 (-1,7 a 2,0) a**

IO = idade óssea, IC = idade cronológica; IMC = índice de massa corpórea; Escore-Z_{IC}: escore-Z avaliado em relação à idade cronológica; Escore-Z_{IO}: escore-Z avaliado em relação à idade óssea; Nas linhas individuais da tabela, as variáveis assinaladas com a mesma letra apresentam diferença estatística significativa entre o grupo DGH em relação aos grupos Não-DGH, BEI e/ou PIG com p<0,05 (a), p<0,01 (a*) ou p<0,001 (a**); ou entre o grupo BEI e PIG com p<0,05 (b), p<0,01 (b*) ou p<0,001 (b**)

Entre os 50 casos de DGH avaliados, 60% das crianças eram do sexo masculino e tinham idade média de $8,7 \pm 4,9$ anos, semelhante em ambos os sexos ($p = 0,15$). Ao nascimento, esses pacientes nasceram com idade gestacional média de 37 ± 3 semanas, peso médio de 2.942 ± 711 g (escore-Z $0,0 \pm 1,4$) e $47,9 \pm 3,1$ cm de comprimento (escore-Z $-1,3 \pm 1,3$). 25 pacientes eram portadores de DGH isolada, destes quatro pacientes apresentavam etiologia definida (displasia septo-óptica (DSO, OMIM 182230), DGH tipo IA (OMIM 262400), associado a mielomeningocele e após ressecção cirúrgica de craniofaringeoma,). Dos 25 pacientes portadores de DGH combinado, onze apresentavam diagnóstico etiológico definido: quatro eram portadores de DSO, três com mutação no *GLI2* (OMIM 610829), três após ressecção cirúrgica de craniofaringeoma e um portador de tricorinofalange (OMIM 190350).

Entre os 133 casos de BEI avaliados, houve predomínio do sexo masculino (77%) e a idade média de avaliação foi de $11,3 \pm 3,7$ anos, maior no sexo masculino ($11,8 \pm 3,7$ anos) que no sexo feminino ($9,8 \pm 3,5$ anos), porém sem significância estatística ($p=0,064$). Esses pacientes nasceram em média com 38 ± 3 semanas de idade gestacional, $3,018 \pm 566$ g de peso (escore-Z $0,1 \pm 2,3$) e $47,5 \pm 2,6$ cm de comprimento (escore-Z $-1,1 \pm 1,4$). Cinquenta e três pacientes foram classificados como atraso constitucional do crescimento e desenvolvimento, 12 pacientes como baixa estatura familiar, quatro pacientes apresentavam baixa estatura familiar associado a atraso constitucional do crescimento e desenvolvimento.

Entre os pacientes classificados como PIG ($n=54$), 48% eram do sexo masculino, com idade média de avaliação $8,6 \pm 3,8$ anos, semelhante entre ambos os sexos. Essas crianças nasceram, em média, com 37 ± 4 semanas de idade gestacional, peso ao nascimento de $2,207 \pm 666$ g (escore-Z médio de $-1,7 \pm 1,5$) e comprimento ao nascimento de $42,7 \pm 4,4$ cm (escore-Z médio de $-2,9 \pm 1,3$). 19 pacientes nasceram PIG de comprimento e de peso, 13 pacientes nasceram PIG só de peso e 21 pacientes nasceram PIG só de comprimento. E um paciente nasceu com idade gestacional de 24 semanas em que não há valores de referência para a classificação em pequeno, adequado ou grande para a idade gestacional.

Na comparação entre os grupos BEI e PIG, observamos que os grupos eram relativamente homogêneos. Entretanto, o grupo BEI apresentou maiores

idade cronológica, idade óssea e atraso da idade óssea estatisticamente significantes ($p < 0,01$), além da maior proporção de pacientes do sexo masculino (77% vs 48%, $p < 0,001$).

Quando se avaliou os grupos deficientes e suficientes de GH, os pacientes portadores de DGH apresentaram idade cronológica significativamente menor ($p < 0,01$), assim como idade óssea, escore-Z de altura e pico máximo de GH ($p < 0,001$ em todas as comparações, Tabela 3). Por outro lado, o escore-Z do IMC foi significativamente maior ($p < 0,001$) no grupo DGH. Na análise estatística entre o grupo DGH e os grupos BEI e PIG separadamente, observa-se que essas diferenças significantes se mantiveram na comparação com o grupo BEI, mas não houve diferença entre os grupos DGH e PIG nos parâmetros idade cronológica e idade óssea.

4.2 Desempenho discriminatório dos escores-Z do IGF-1 e do IGFBP-3

Os escores-Z do IGF-1 e do IGFBP-3 calculados em relação à idade cronológica (Escore-Z_{IC}) foram significativamente menores no grupo DGH em comparação com o grupo não-DGH como um todo (Tabela 3 e Figura 3), assim como em seus subgrupos ($p < 0,001$). Observamos que, entre os pacientes com DGH, os valores dos escores-Z das concentrações séricas do IGF-1 estiveram alterados (escore-Z < -2) em 91,7% dos casos, ao contrário dos escores-Z do IGFBP-3, cujos valores estavam normais em mais da metade desses pacientes. E 31,6% e 7,9% das crianças não-DGH apresentaram valores baixos de IGF-1 e IGFBP-3, respectivamente (Figura 4).

Figura 3 - Gráfico de dispersão tipo box-plot dos escores-Z do IGF-1 e do IGFBP-3. Escore-Z_{IC}: escore-Z avaliado em relação à idade cronológica

Figura 4 - Diagrama de Venn ilustrando o número de pacientes com resultados alterados e normais dos escores-Z das concentrações séricas do IGF-1 e do IGFBP-3 nos pacientes com e sem DGH

A análise do desempenho discriminativo desses peptídeos nas curvas ROC demonstra superioridade do escore- Z_{IC} do IGF-1 (área sob a curva (AUC) 0,877) em relação ao IGFBP-3 (AUC 0,766, $p = 0,001$) na identificação de pacientes com DGH (Figura 5). Os valores de sensibilidade, especificidade, acurácia, valores preditivos positivo e negativo para os escores- Z_{IC} de IGF-1 e IGFBP-3 estão detalhados na Tabela 4, em que foi adotado o valor de corte -2 para identificar DGH. O escore- Z_{IC} do IGF-1 teve uma melhor sensibilidade (92% vs 45,8%), mas pior especificidade (69% vs 93,8%) e acurácia (73,8% vs 83,6%) em relação ao do IGFBP-3 na identificação de pacientes DGH. A avaliação do desempenho desses testes considerando a prevalência de DGH estimada de 2% entre crianças de baixa estatura, observamos que o escore- Z_{IC} do IGF-1 apresentou valor preditivo negativo semelhante ao do escore- Z_{IC} do IGFBP-3, mas menor valor preditivo positivo (5,7% vs 13,1%).

Figura 5 - Análise do desempenho discriminatório das curvas *Receiver Operator Curve* (ROC) do Escore- Z_{IC} do IGF-1 e do IGFBP-3 de todos os pacientes avaliados; Escore- Z_{IC} : escore-Z avaliado em relação à idade cronológica; AUC: área sob a curva

Tabela 4 - Comparativo do desempenho dos escores-Z dos valores séricos do IGF-1 e do IGFBP-3 em relação à idade cronológica no diagnóstico de DGH nos pacientes avaliados

	Sensibilidade	Especificidade	Acurácia	VPP*	VPN*
Escore-Z_{IC} IGF-1	92,0	69,0	73,8	5,7	99,8
Escore-Z_{IC} IGFBP-3	45,8	93,8	83,6	13,1	98,8

VPP: valor preditivo positivo, VPN: valor preditivo negativo; Escore-Z_{IC}: escore-Z avaliado em relação à idade cronológica; * - para o cálculo do VPP e VPN foi considerado uma frequência de 2% de DGH em população de crianças com baixa estatura (ver item 3.7); os valores de sensibilidade, especificidade, acurácia, VPP e VPN são expressos em porcentagens (%)

A comparação do escore-Z do IGF-1 com a idade óssea (escore-Z_{IO}) com o escore-Z_{IC} demonstrou melhor desempenho discriminativo na avaliação das curvas ROC, porém sem atingir significância estatística (AUCs do escore-Z_{IC} e o escore-Z_{IO} de 0,877 e 0,902, respectivamente, $p = 0,290$). O valor de corte das curvas ROC dos escore-Z_{IC} e escore-Z_{IO} que apresenta a melhor performance foi semelhante entre ambos os testes: -2,4 (sensibilidade de 86,0% e especificidade de 80,2%) para o escore-Z_{IC} e de -2,3 (sensibilidade de 85,0% e especificidade de 90,2%) para o escore-Z_{IO}. Por outro lado, o escore-Z_{IO} do IGFBP-3 não apresentou melhor desempenho discriminatório que o escore-Z_{IC} (AUCs do escore-Z_{IC} e o escore-Z_{IO} de 0,766 e 0,748, respectivamente, Figura 6).

A avaliação da capacidade de identificação de pacientes portadores de DGH do IGF-1 e do IGFBP-3 na comparação com a idade cronológica e com a idade óssea está demonstrada na Tabela 5. Observa-se uma piora da sensibilidade do escore-Z_{IO} em relação ao escore-Z_{IC} tanto do IGF-1 como do IGFBP-3, porém houve uma melhora da especificidade e da acurácia. Considerando a prevalência populacional de DGH de 2% entre as crianças com baixa estatura, o emprego do escore-Z_{IO} tanto do IGF-1 como do IGFBP-3 melhorou substancialmente a capacidade diagnóstica deste exame laboratorial (melhor VPP) sem aumento significativo da taxa de falsos negativos (VPN semelhante nas duas comparações).

Figura 6 - Análise do desempenho discriminatório das curvas *Receiver Operator Curve* (ROC) dos Escore- Z_{IC} e Escore- Z_{IO} do IGF-1 e do IGFBP-3 de todos os pacientes avaliados; Escore- Z_{IC} : escore-Z para idade cronológica; Escore- Z_{IO} : escore-Z para idade óssea; AUC: área sob a curva

Tabela 5 - Comparativo do desempenho discriminativo dos escores-Z dos valores séricos do IGF-1 e do IGFBP-3 em relação à idade cronológica e óssea no diagnóstico de DGH nos pacientes avaliados

	Sensibilidade	Especificidade	Acurácia	VPP*	VPN*
Escore-Z_{IC} IGF-1	92,0	69,0	73,8	5,7	99,8
Escore-Z_{IO} IGF-1	85,0	87,9	87,3	12,5	99,7
Escore-Z_{IC} IGFBP-3	45,8	93,8	83,6	13,1	98,8
Escore-Z_{IO} IGFBP-3	31,6	98,2	85,6	26,4	98,6

VPP = valor preditivo positivo, VPN = valor preditivo negativo; Escore- Z_{IC} : escore-Z avaliado em relação à idade cronológica; Escore- Z_{IO} : escore-Z avaliado em relação à idade óssea; * para o cálculo do VPP e VPN foi considerado uma frequência de 2% de DGH em população de crianças com baixa estatura (ver item 3.7); os valores de sensibilidade, especificidade, acurácia, VPP e VPN são expressos em porcentagens (%)

4.2.1 Avaliação da influência da puberdade na performance do escore-Z do IGF-1 e do IGFBP-3

Na avaliação somente dos pacientes em idade pré-puberal (crianças com idade inferior a 9 anos e 8 anos no sexo masculino e feminino, respectivamente), a idade média dos pacientes foi de $5,5 \pm 2,2$ anos e 67,9% eram do sexo masculino. As características clínicas e laboratoriais desses pacientes constam na Tabela 6. Observa-se que o grupo DGH apresentou menor idade óssea, escore-Z de altura e pico máximo de GH que o grupo não DGH e maior escore-Z do IMC, todos com diferença estatisticamente significantes ($p < 0,01$). Além disso, não houveram diferenças significativas entre os grupos BEI e PIG nesta faixa etária.

Os valores do escore- Z_{IC} e do escore- Z_{IO} das concentrações séricas do IGF-1 e do IGFBP-3 estão ilustrados na Figura 7, em que a dispersão tanto do escore- Z_{IC} e escore- Z_{IO} do IGF-1 e do escore- Z_{IC} e escore- Z_{IO} do IGFBP-3 foi bastante semelhante. O desempenho discriminativo do escore- Z_{IO} de ambos esses peptídeos não foi melhor que o do escore- Z_{IC} (Figura 8).

Tabela 6 - Comparativo dos dados clínicos dos pacientes em idade pré-púbere

	DGH	Não-DGH	BEI	PIG
N	27	57	33	24
Sexo (M:F)	18:9	39:18	25:8	14:10
Escore-Z da altura alvo	-0,6 ± 0,8 -0,6 (-1,6 a 0,5)	-0,9 ± 0,9 -0,9 (-2,5 a 0,5)	-0,9 ± 0,9 -1,0 (-2,2 a 0,6)	-0,9 ± 0,9 -0,7 (-2,9 a 0,4)
Idade (anos)	5,0 ± 2,4 5,5 (0,7 a 8,1)	5,7 ± 2,1 6,1 (2,2 a 8,7)	6,1 ± 2,1 6,7 (2,2 a 8,8)	5,2 ± 2,0 5,6 (2,3 a 7,7)
Idade óssea (anos)	2,9 ± 1,7 ^{a*} 2,5 (1,0 a 7,0) ^{a*}	4,2 ± 1,8 ^{a*} 4,5 (1,4 a 6,9)	4,5 ± 1,8 5,0 (1,5 a 7,0) ^{a*}	3,8 ± 1,8 4,5 (1,5 a 6,5)
IO - IC	-2,3 ± 1,6 ^a -2,1 (-4,7 a -0,3)	-1,7 ± 1,1 -1,7 (-3,5 a -0,1)	-2,0 ± 1,1 -1,7 (-3,9 a -0,7)	-1,3 ± 1,0 ^a -1,1 (-3,1 a 0,1)
Escore-Z da altura	-3,7 ± 1,9 -3,4 (-6,8 a -1,9) ^{a*}	-2,8 ± 0,7 -2,7 (-3,7 a -2,0) ^{a*}	-2,7 ± 0,5 -2,7 (-3,7 a -1,9) ^{a*}	-3,0 ± 0,9 -2,9 (-3,6 a -2,3)
Escore-Z do IMC	0,3 ± 1,2 ^{a*} 0,5 (-1,3 a 2,0)	-0,7 ± 1,3 ^{a*} -0,7 (-2,9 a 1,3)	-0,6 ± 0,9 ^a -0,6 (-2,0 a 0,7)	-0,8 ± 1,8 ^a -0,8 (-3,1 a 1,8)
Pico máximo de GH (µg/L)	1,7 ± 2,2 0,8 (0,1 a 6,7) ^{a*}	9,6 ± 4,2 9,0 (4,0 a 17,7) ^{a*}	9,2 ± 4,0 8,1 (4,1 a 16,9) ^{a*}	10,4 ± 4,7 10,0 (4,8 a 17,5) ^{a*}
Escore-Z _{IC} do IGF1	-2,7 ± 0,6 ^{a*} -2,9 (-3,3 a -1,6)	-1,0 ± 1,2 ^{a*} -0,9 (-2,9 a 0,8)	-1,2 ± 1,0 ^{a*} -1,0 (-2,9 a 0,1)	-0,7 ± 1,4 ^{a*} -0,7 (-2,7 a 1,3)
Escore-Z _{IO} do IGF1	-2,7 ± 0,4 -2,8 (-3,2 a -2,3) ^{a*}	-0,8 ± 1,3 -0,6 (-2,9 a 1,1) ^{a*}	-1,0 ± 1,1 -0,7 (-2,9 a 0,3) ^{a*}	-0,6 ± 1,5 -0,5 (-2,7 a 1,4) ^{a*}
Escore-Z _{IC} do IGFBP-3	-1,4 ± 1,3 ^{a*} -1,5 (-3,1 a 0,5)	0,3 ± 0,8 ^{a*} 0,4 (-0,9 a 1,6)	0,2 ± 0,8 ^{a*} 0,3 (-1,2 a 1,3)	0,5 ± 0,9 ^{a*} 0,7 (-0,9 a 1,6)
Escore-Z _{IO} do IGFBP-3	-0,9 ± 1,1 ^{a*} -0,6 (-2,5 a 0,4)	0,7 ± 0,8 ^{a*} 0,8 (-0,4 a 2,0)	0,6 ± 0,9 ^{a*} 0,7 (-0,8 a 2,1)	0,9 ± 0,8 ^{a*} 0,8 (-0,3 a 2,0)

IO = idade óssea, IC = idade cronológica; IMC = índice de massa corpórea; Escore-Z_{IC}: escore-Z avaliado em relação à idade cronológica; Escore-Z_{IO}: escore-Z avaliado em relação à idade óssea. Nas linhas individuais da tabela, as variáveis assinaladas com a mesma letra apresentam diferença estatística significativa entre o grupo DGH em relação aos grupos Não-DGH, BEI e/ou PIG com p<0,05 (a), p<0,01 (a*) ou p<0,001 (a**); ou entre o grupo BEI e PIG com p<0,05 (b), p<0,01 (b*) ou p<0,001 (b**)

Figura 7 - Gráfico de dispersão tipo box-plot dos escores-Z do IGF-1 e do IGFBP-3 nos pacientes em idade pré-puberal. Escore-Z_{IC}: escore-Z avaliado em relação à idade cronológica; Escore-Z_{IO}: escore-Z avaliado em relação à idade óssea

Figura 8 - Comparação do desempenho discriminatório das curvas *Receiver Operator Curve* (ROC) do escore-Z das concentrações séricas do IGF-1 para idade cronológica e idade óssea nos pacientes em idade pré-puberal, ($p=0,853$); Escore-Z_{IC}: escore-Z avaliado em relação à idade cronológica; Escore-Z_{IO}: escore-Z avaliado em relação à idade óssea; AUC: área sob a curva

Os valores de sensibilidade, especificidade, acurácia, valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN) também foram semelhantes nesta faixa etária tanto para o escore- Z_{IC} e o escore- Z_{IO} do IGF-1 como para o escore- Z_{IC} e o escore- Z_{IO} do IGFBP-3 (Tabela 7). A performance do escore- Z_{IC} do IGFBP-3 em relação ao do IGF-1 na identificação de pacientes com DGH, apresentou maior especificidade, apesar da piora de sua sensibilidade e acurácia. A avaliação de escore- Z_{IC} ou escore- Z_{IO} não causaram mudanças significativas no VPP ou VPN.

Tabela 7 - Comparativo do desempenho dos escores-Z dos valores séricos do IGF-1 e do IGFBP-3 em relação à idade cronológica e óssea no diagnóstico de DGH nos pacientes em idade pré-puberal

	Sensibilidade	Especificidade	Acurácia	VPP*	VPN*
Escore-Z_{IC} IGF-1	92,6	77,2	82,1	7,65	99,8
Escore-Z_{IO} IGF-1	95,5	76,5	82,2	7,66	99,9
Escore-Z_{IC} IGFBP-3	37,0	100,0	79,3	100,0	98,7
Escore-Z_{IO} IGFBP-3	22,7	100,0	76,1	100,0	98,4

VPP: valor preditivo positivo, VPN: valor preditivo negativo; Escore- Z_{IC} : escore-Z avaliado em relação à idade cronológica; Escore- Z_{IO} : escore-Z avaliado em relação à idade óssea; * para o cálculo do VPP e VPN foi considerado uma frequência de 2% de DGH em população de crianças com baixa estatura (ver item 3.7); os valores de sensibilidade, especificidade, acurácia, VPP e VPN são expressos em porcentagens (%)

Entre os pacientes em idade puberal (crianças com idade acima de 9 anos de idade no sexo masculino e de 8 anos de idade no sexo feminino), a média de idade cronológica foi de $12,7 \pm 2,5$ anos em que 66% eram do sexo masculino e 51,3% ainda não apresentavam sinais de desenvolvimento puberal. As características clínicas e laboratoriais desses pacientes constam na Tabela 8. O grupo DGH apresentou maior atraso de idade óssea e escore-Z do IMC, e menor predomínio de crianças do sexo masculino, escore-Z de altura e pico máximo de GH estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

Tabela 8 - Comparativo dos dados clínicos dos pacientes em idade púbere

	DGH	Não-DGH	BEI	PIG
N	23	131	100	31
Sexo (M:F)	12:11 ^{a**}	90:41 ^{a**}	78:22 ^{a**}	12:19 ^{a**}
Z altura alvo	-1,1 ± 0,9 -1,1 (-2,4 a 0,1)	-1,0 ± 0,9 -0,9 (-2,6 a 0,3)	-1,0 ± 0,9 -0,9 (-2,4 a 0,4)	-1,2 ± 0,8 -1,0 (-2,7 a 0,0)
Idade (anos)	13,1 ± 3,2 ^a 13,5 (8,5 a 17,1)	12,6 ± 2,4 12,8 (8,7 a 16,2)	13,0 ± 2,3 ^b 13,2 (9,4 a 16,2)	11,3 ± 2,3 ^{a,b} 11,3 (8,2 a 15,3)
Idade óssea (anos)	10,1 ± 4,0 9,8 (5,0 a 16,7)	10,5 ± 2,2 11,0 (6,1 a 13,6)	10,8 ± 2,0 11,0 (7,0 a 13,5)	9,8 ± 2,7 10,0 (6,0 a 13,8)
IO-IC	-3,4 ± 2,0 ^{a**} -3,9 (-6,2 a 0,3)	-2,1 ± 1,5 ^a -2,1 (-4,5 a 0,3)	-2,3 ± 1,6 ^{a,b} -2,3 (-4,5 a 1,0)	-1,5 ± 1,0 ^{a**} -1,3 (-3,1 a -0,2)
Z da altura	-3,8 ± 1,7 -3,5 (-6,5 a -1,8) ^{a**}	-2,7 ± 0,5 -2,8 (-3,4 a -1,8) ^{a**}	-2,7 ± 0,5 -2,7 (-3,5 a -1,8) ^{a**}	-2,8 ± 0,5 -2,9 (-3,6 a -2,0) ^{a**}
Z do IMC	-0,1 ± 1,5 ^a -0,1 (-2,1 a 2,0)	-1,0 ± 1,5 ^a -0,8 (-3,6 a 1,1)	-1,0 ± 1,6 ^a -0,8 (-4,1 a 1,1)	-0,8 ± 1,2 -0,7 (-3,0 a 0,8)
Estádios puberais (%)				
I.	65	50	49	52
II.	4	35	33	41
III.	22	10	10	7
IV.	9	7	7	0
Pico máximo de GH (µg/L)	1,3 ± 1,5 0,9 (0,1 a 4,7) ^{a**}	9,4 ± 5,3 8,1 (3,4 a 21,6) ^{a**}	9,2 ± 5,2 8,1 (3,4 a 21,9) ^{a**}	10,4 ± 5,6 8,5 (3,3 a 19,8) ^{a**}
Escore-Z_{IC} do IGF1	-3,1 ± 0,8 ^{a**} -3,2 (-4,1 a -1,1)	-1,2 ± 1,4 ^{a**} -1,3 (-3,0 a 1,1)	-1,4 ± 1,3 ^{a**} -1,6 (-3,0 a 1,0)	-0,6 ± 1,4 ^{a**} -0,3 (-2,9 a 1,2)
Escore-Z_{IO} do IGF1	-2,4 ± 1,2 ^{a**} -2,6 (-3,6 a 0,0)	-0,5 ± 1,1 ^{a**} -0,5 (-2,1 a 1,4)	-0,5 ± 1,1 ^{a**} -0,6 (-2,1 a 1,1)	-0,2 ± 1,3 ^{a**} 0,2 (-2,5 a 1,6)
Escore-Z_{IP} do IGF1	-1,7 ± 0,9 -2,1 (-2,4 a -0,1) ^{a**}	-0,1 ± 0,8 -0,1 (-1,0 a 0,9) ^{a**}	-0,1 ± 0,9 -0,2 (-1,0 a 0,9) ^{a**}	0,0 ± 0,7 -0,1 (-0,9 a 1,0) ^{a**}
Escore-Z_{IC} do IGFBP-3	-2,4 ± 1,6 ^{a**} -2,6 (-4,6 a -0,3)	-0,6 ± 1,0 ^{a**} -0,6 (-2,3 a 1,0)	-0,7 ± 1,0 ^{a**} -0,7 (-2,3 a 0,8)	-0,4 ± 1,1 ^{a**} -0,2 (-2,3 a 1,2)
Escore-Z_{IO} do IGFBP-3	-1,4 ± 1,7 ^{a**} -1,1 (-3,8 a 0,9)	-0,1 ± 1,0 ^{a**} -0,1 (-1,8 a 1,3)	-0,1 ± 0,9 ^{a**} -0,1 (-1,6 a 1,1)	0,0 ± 1,2 ^{a**} 0,1 (-2,0 a 1,7)
Escore-Z_{IP} do IGFBP-3	-1,4 ± 1,5 -0,9 (-4,1 a 0,3) ^{a**}	0,0 ± 0,7 0,0 (-0,8 a 0,7) ^{a**}	0,0 ± 0,6 0,0 (-0,9 a 0,8) ^{a**}	-0,1 ± 0,7 -0,1 (-0,8 a 0,6) ^{a**}

IO = idade óssea, IC = idade cronológica; IMC = índice de massa corpórea; Escore-Z_{IC}: escore-Z avaliado em relação à idade cronológica; Escore-Z_{IO}: escore-Z avaliado em relação à idade óssea; Escore-Z_{IP}: escore-Z avaliado em relação ao estágio puberal. Nas linhas individuais da tabela, as variáveis assinaladas com a mesma letra apresentam diferença estatística significativa entre o grupo DGH em relação aos grupos Não-DGH, BEI e/ou PIG com p<0,05 (a), p<0,01 (a*) ou p<0,001 (a**); ou entre o grupo BEI e PIG com p<0,05 (b), p<0,01 (b*) ou p<0,001 (b**)

Entre os grupos BEI e PIG nesta faixa etária, a proporção de pacientes do sexo masculino, a idade cronológica e o atraso da idade óssea foram maiores no grupo BEI, com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$, $p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente). No grupo BEI, 49 (37%) pacientes tiveram diagnóstico de baixa estatura familiar (BEF), 54 pacientes foram classificados como atraso constitucional do crescimento e desenvolvimento (ACCD), cujo diagnóstico só foi possível durante o acompanhamento desses pacientes na maioria dos casos, e dez pacientes apresentavam BEF associado a ACCD. A proporção de pacientes com ACCD que apresentaram escores- Z_{IC} do IGF-1 igual ou abaixo do valor de corte estabelecido de -2 foi de 28 pacientes (51,9%) para o escore- Z_{IC} , cinco pacientes (9,3%) para o escore- Z_{IO} e somente um paciente (1,9%) o escore- Z_{IP} .

Não houve melhora da performance dos escores- Z dos valores séricos de IGF-1 e IGFBP-3 na comparação entre a idade cronológica, idade óssea e idade puberal (Figuras 9 e 10). Entretanto, na avaliação das características inerentes do teste, pode-se observar uma melhora significativa da especificidade e da acurácia do escore- Z_{IO} e escore- Z_{IP} do IGF-1 em relação ao escore- Z_{IC} , apesar da redução da sensibilidade tanto para escore- Z_{IO} como para escore- Z_{IP} em relação ao escore- Z_{IC} , (Tabela 9). Estas mesmas reduções da sensibilidade e incrementos da especificidade e da acurácia também foram observadas para os escores- Z do IGFBP-3.

Considerando a prevalência estimada de DGH entre as crianças com baixa estatura de 2%, a probabilidade de um paciente ser portador de DGH diante de um resultado alterado tanto do escore- Z do IGF-1 e do IGFBP-3 foi maior para o escore- Z_{IO} e, principalmente, para o escore- Z_{IP} (pelo maior VPP) sem incremento da taxa de falsos negativos, ou seja, sem prejuízo dos VPNs.

Figura 9 - Gráfico de dispersão tipo box-plot dos escores-Z do IGF-1 e do IGFBP-3 nos pacientes em idade puberal. Escore-Z_{IC}: escore-Z avaliado em relação à idade cronológica; Escore-Z_{IO}: escore-Z avaliado em relação à idade óssea; Escore-Z_{IP}: escore-Z avaliado em relação ao estadio puberal

Figura 10 - Comparação do desempenho discriminatório das curvas Receiver Operator Curve (ROC) dos escores-Z do IGF-1 e do IGFBP-3 avaliados em relação a idade cronológica (Escore-Z_{IC}), idade óssea (Escore-Z_{IO}) e idade puberal (Escore-Z_{IP}) nos pacientes em idade puberal.

Tabela 9 - Comparativo do desempenho discriminativo dos escores-Z dos valores séricos do IGF-1 e do IGFBP-3 em relação à idade cronológica e óssea no diagnóstico de DGH nos pacientes em idade puberal

	Sensibilidade	Especificidade	Acurácia	VPP*	VPN*
Escore-Z_{IC} IGF-1	91,3	65,6	69,5	5,1	99,7
Escore-Z_{IO} IGF-1	72,2	92,7	90,1	16,8	99,4
Escore-Z_{IP} IGF-1	63,6	98,4	93,3	44,8	99,3
Escore-Z_{IC} IGFBP-3	57,1	91,1	86,1	11,6	99,0
Escore-Z_{IO} IGFBP-3	43,8	97,4	90,9	25,6	98,8
Escore-Z_{IP} IGFBP-3	45,0	98,3	90,6	35,1	98,9

VPP = valor preditivo positivo, VPN = valor preditivo negativo; Escore-Z_{IC}: escore-Z avaliado em relação à idade cronológica; Escore-Z_{IO}: escore-Z avaliado em relação à idade óssea; Escore-Z_{IP}: escore-Z avaliado em relação ao estádio puberal; * para o cálculo do VPP e VPN foi considerado uma frequência de 2% de DGH em população de crianças com baixa estatura (ver item 3.7); os valores de sensibilidade, especificidade, acurácia, VPP e VPN são expressos em porcentagens (%)

4.3 Avaliação do valor diagnóstico dos emprego dos escores-Z do IGF-1 e do IGFBP-3 combinados

Isoladamente, o desempenho do escore-Z_{IC} dos valores séricos do IGF-1 foram superiores ao do escore-Z_{IC} do IGFBP-3. Foi avaliado o valor diagnóstico de ambos esses peptídeos analisados em conjunto, considerando quando ambos os escores-Z_{IC} do IGF-1 e do IGFBP-3 estão alterados (teste conjunto) e quando ou um ou outro está alterado (teste separado). O teste conjunto, quando comparado ao teste separado, apresentou melhor especificidade e acurácia em todas as faixas etárias avaliadas, mas pior sensibilidade como demonstrado na Tabela 10. O valor preditivo positivo dessa avaliação conjunta também foi superior, com mínima redução do valor preditivo negativo. Entretanto, quando é comparado o desempenho do teste conjunto com o escore-Z_{IC} do IGF-1 isoladamente (Tabela 10), observa-se que a uma diminuição na sensibilidade, mas incremento na especificidade e na acurácia. Além disso, o valor preditivo positivo apresenta melhora significativa, sem alteração do valor preditivo negativo. A comparação do teste separado com o escore-Z_{IC} do IGF-1 isoladamente, apresentou melhora discreta da sensibilidade.

Tabela 10 - Comparativo do desempenho dos escores- Z_{IC} dos valores séricos do IGF-1 e do IGFBP-3 considerados em separado e conjuntamente no diagnóstico de DGH nos pacientes avaliados, e nas diferentes faixas etárias (idade pré-púberal e idade puberal)

	Sensibilidade	Especificidade	Acurácia	VPP*	VPN*
Toda Casuística (DGH=48)					
Escore-Z_{IC} IGF-1	92,0	69,0	73,8	5,7	99,8
Teste Separado	94,4	61,9	70,6	4,8	99,8
Teste Conjunto	44,2	95,7	88,2	17,3	98,8
Pacientes Pré-Púberes (DGH=27)					
Escore-Z_{IC} IGF-1	92,6	77,2	82,1	7,65	99,8
Teste Separado	94,7	73,7	82,1	6,8	99,9
Teste Conjunto	37,9	99,0	85,0	43,6	98,7
Pacientes Púberes (DGH=21)					
Escore-Z_{IC} IGF-1	91,3	65,6	69,5	5,1	99,7
Teste Separado	93,9	58,5	65,5	4,4	99,8
Teste Conjunto	52,2	94,1	89,8	15,3	99,0

VPP = valor preditivo positivo, VPN = valor preditivo negativo; Escore- Z_{IC} : escore-Z avaliado em relação à idade cronológica; Teste separado = Escore- Z_{IC} do IGF-1 ou do IGFBP-3 ≤ -2 ; Teste conjunto: Escore- Z_{IC} do IGF-1 e do IGFBP-3 ≤ -2 ; * para o cálculo do VPP e VPN foi considerado uma frequência de 2% de DGH em população de crianças com baixa estatura (ver item 3.7); os valores de sensibilidade, especificidade, acurácia, VPP e VPN são expressos em porcentagens (%)

5 DISCUSSÃO

A deficiência do hormônio de crescimento corresponde a menos de 5% das causas de baixa estatura e a importância do seu diagnóstico adequado deve-se ao fato de ser o único distúrbio de crescimento que apresenta um tratamento específico e de alto custo. As dificuldades em realizar esse diagnóstico variam desde a variabilidade na apresentação clínica até a investigação complementar que apresenta uma alta taxa de falsos positivos.

O rastreio de uma doença deve ser realizado com um teste diagnóstico de fácil execução, pouco oneroso, minimamente invasivo e bastante sensível, ou seja, baixa taxa de falsos negativos; por outro lado, exames que confirmam o diagnóstico devem apresentar alta especificidade, nos quais exames normais excluem a doença com uma baixa taxa de falsos positivos [44]. Além das características inerentes aos exames laboratoriais (sensibilidade, especificidade e acurácia), é importante levar em consideração a prevalência da doença na interpretação dos resultados e na aplicabilidade de um exame laboratorial. Isso porque uma doença com a frequência populacional do DGH, estimada em torno de 2% entre as crianças com baixa estatura [69], apresenta um baixo valor preditivo positivo, ou seja, a taxa de falsos positivos é alta, independente das características do teste [71]. Dessa forma, quando um exame alterado, até mesmo os testes de estímulo de secreção de GH que são tradicionalmente considerados o “padrão ouro” no diagnóstico de DGH, a probabilidade de o paciente ser de fato portador de DGH é inferior a 50%. Por outro lado, o valor preditivo negativo de um exame nessa frequência populacional é alto, ou seja, a probabilidade de um paciente não estar doente diante de um resultado de exame normal é bastante alta.

Nesse contexto, os valores séricos do IGF-1 e IGFBP-3 são ferramentas úteis na avaliação inicial de pacientes com baixa estatura e suspeita de DGH, por serem uma medida indireta da secreção de GH e apresentarem mínima variação ao longo do dia [72]. A concentração sérica desses peptídeos é influenciada por diversos fatores, inclusive os esteróides sexuais produzidos durante a puberdade [11]. É prática comum avaliar os valores séricos do IGF-1 e IGFBP-3 em relação à idade óssea e ao estágio puberal, além da avaliação em relação à idade cronológica. Esta prática, apesar de rotineira, carece de embasamento na literatura [44].

O presente estudo avaliou retrospectivamente o valor diagnóstico das concentrações séricas de IGF-1 e IGFBP-3 em relação à idade cronológica, idade óssea e ao estadio puberal no diagnóstico de DGH em crianças com baixa estatura. A utilidade do escore-Z do IGF-1 comparado com a idade cronológica (escore-Z_{IC}) na identificação de pacientes com DGH foi superior à do escore-Z_{IC} do IGFBP-3, pois seu valor de sensibilidade foi superior (92% e 45,8%, respectivamente), apesar de menor especificidade (69% e 93,8%, respectivamente). Dessa forma, o escore-Z_{IC} do IGF-1 é útil para rastreamento de pacientes com DGH. Em uma metanálise recente [63], os valores de sensibilidade e especificidade encontrados foram de 66% e 69% para o IGF-1 e de 50% e 79% para o IGFBP-3, respectivamente. A maior sensibilidade do escore-Z_{IC} do IGF-1 encontrada neste estudo pode ser atribuído aos critérios diagnósticos de DGH mais estritos que na literatura, utilizando um pico máximo de secreção de GH de 5 µg/L associado às avaliações clínica, neuroradiológica e genética. Adicionalmente, a reavaliação do eixo GH/IGF-1 dos pacientes com DGH após o término no crescimento linear em nosso serviço tem uma taxa de confirmação da insuficiência de secreção de GH de 98%.

Apesar de apresentar uma menor sensibilidade, o diagnóstico de DGH é mais provável diante de valores baixos do escore-Z_{IC} do IGFBP-3 [37], pois seu valor preditivo positivo é maior. Entre as crianças portadoras de DGH, nenhuma apresentava os valores de escore-Z_{IC} do IGFBP-3 alterados sem que o escore-Z_{IC} do IGF-1 também estivesse alterado. Todavia, o escore-Z_{IC} do IGFBP-3 foi mais útil para excluir DGH entre os pacientes com secreção suficiente de GH – nesses pacientes, a taxa de falsos positivos foi 5,5 vezes maior para o escore-Z_{IC} do IGF-1 que para o escore-Z_{IC} do IGFBP-3.

O papel do IGFBP-3 na investigação de DGH é controverso, com estudos a favor do seu uso [73] e outros contra [47, 60, 62, 74]. Sabe-se que o IGFBP-3 tem maior utilidade em crianças em faixa etária mais jovem, quando os valores séricos do IGF-1 de crianças com e sem DGH apresentam uma maior sobreposição [16, 63]. Neste estudo, não foi possível realizar esta avaliação em crianças na faixa etária mais jovem (menores que 4 anos) uma vez que o tamanho da amostra é limitado. Mas nas crianças na faixa etária pré-púbere (idade inferior a 9 anos e 8 anos no sexo masculino e feminino, respectivamente), quando o escore-Z_{IC} do IGFBP-3 estava alterado, a probabilidade de a criança

realmente ter DGH foi bastante alta, em razão de alta especificidade e maior valor preditivo positivo deste peptídeo. Dessa forma, o escore- Z_{IC} do IGFBP-3 apresenta valor diagnóstico na identificação de pacientes com DGH. Entretanto, para fins de rastreamento de DGH em crianças com baixa estatura, o escore- Z_{IC} do IGFBP-3 não tem utilidade por sua baixa sensibilidade (37%).

A comparação dos escores-Z em relação à idade óssea (escore- Z_{IO}) e ao estadio puberal (escore- Z_{IP}) com o escore- Z_{IC} tanto do IGF-1 como do IGFBP-3 não apresentou melhor desempenho discriminativo por meio da avaliação das curvas ROC, cujos desempenhos foram considerados muito bons para o IGF-1 e razoável para o IGFBP-3. Entretanto, na avaliação das características de um exame, o escore- Z_{IO} e o escore- Z_{IP} apresentaram pior sensibilidade, mas melhor especificidade e acurácia quando comparados com o escore- Z_{IC} . A melhora dessas características ocorreu em decorrência da superioridade do desempenho nos pacientes em idade puberal, uma vez que não houve diferença nos valores de sensibilidade, especificidade e acurácia nos pacientes avaliados na faixa etária pré-púbere.

Nos pacientes em idade púbere, as áreas sob a curva nas curvas ROC dos escore- Z_{IC} , escore- Z_{IO} e escore- Z_{IP} do IGF-1 e do IGFBP-3 foram semelhantes, com desempenho muito bom para o IGF-1 e razoável para o IGFBP-3. Este dado reforça a utilidade do escore-Z do IGF-1 na investigação de DGH em crianças com baixa estatura e em idade puberal e fala contra a dosagem sérica do IGFBP-3 na avaliação de crianças com baixa estatura na faixa etária púbere.

Houve uma melhora da acurácia e da especificidade dos escores-Z tanto do IGF-1 como do IGFBP-3 na comparação com a idade óssea, mas principalmente com a idade puberal. Essa melhora mais significativa da performance do escore- Z_{IP} em relação ao escore- Z_{IO} pode ser atribuída à variabilidade da concordância inter-observador e à maior subjetividade na avaliação da idade óssea [75], ao passo que a avaliação clínica e laboratorial do desenvolvimento puberal é mais objetiva. Além disso, o início da puberdade normalmente corresponde a uma idade óssea entre 9,5 e 10 anos no sexo feminino e entre 11 e 12,5 anos masculino, mas existe uma variabilidade fisiológica do início da puberdade em relação à idade óssea [76, 77].

Além da melhora da especificidade e acurácia, a comparação do escore-Z do IGF-1 e do IGFBP-3 com a idade óssea e com o estadiu puberal, também apresentou maiores valores preditivos positivos, sem redução do valor preditivo negativo. Na prática, uma criança com um escore- Z_{IC} do IGF-1 alterado tem 5,1% de probabilidade de ter realmente DGH, e essa probabilidade aumenta para 44,8% se apresentar um escore- Z_{IP} do IGF-1 alterado.

Na Tabela 11, foi realizada uma estimativa da performance de um teste de estímulo de GH (cujas sensibilidades e especificidades foram obtidas em estudo recente [34]) em cenários com diferentes probabilidades pré-teste: 2% (prevalência estimada de DGH em crianças com baixa estatura), 5,1% (valor preditivo positivo do escore- Z_{IC} do IGF-1), 16,8% (valor preditivo positivo do escore- Z_{IO} do IGF-1) e 44,8% (valor preditivo positivo do escore- Z_{IP} do IGF-1). Quando um paciente com baixa estatura em idade puberal (probabilidade pré-teste de 2%) é submetido a um teste de estímulo, que vem alterado, a probabilidade de o paciente realmente ter DGH é de 41%. Entretanto, quando somente os pacientes com escore- Z_{IC} do IGF-1 ≤ -2 (probabilidade pré-teste de 5,1%) são submetidos a um teste de estímulo que tem resultado alterado, a probabilidade dessas crianças terem DGH aumenta para 64,8%. E, finalmente, se um paciente com escore- Z_{IP} do IGF-1 ≤ -2 (probabilidade pré-teste de 44,8%) realizar um teste de estímulo, um resultado alterado praticamente confirma o diagnóstico de DGH com probabilidade de 96,5%.

Dessa forma, um baixo valor de escore- Z_{IP} do IGF-1 apresenta uma probabilidade pós teste de DGH semelhante a de um teste de estímulo de secreção de GH, podendo substituí-lo, reduzindo a necessidade de se realizar um segundo teste de estímulo de secreção de GH. Pacientes com escore- Z_{IP} do IGF-1 ≤ -2 que são submetidos a um teste confirmatório para o diagnóstico de GH (por exemplo um teste de estímulo de secreção de GH), cujo resultado está alterado, tem o diagnóstico de DGH praticamente confirmado.

Tabela 11 - Estimativa da performance de teste de estímulo de secreção de GH com clonidina e insulina [34] de acordo com a probabilidade pré-teste

Probabilidade Pré-Teste	Teste de estímulo de GH	Sen	Esp	VPP*	VPN*
Escore-Z altura < -2: 2,0%*	Clonidina	88,5	97,4	41,0	99,8
+ Escore-Z_{IC} do IGF-1 < -2: 5,1%	Clonidina	88,5	97,4	64,8	99,4
+ Escore-Z_{IO} do IGF-1 < -2: 16,8%	Clonidina	88,5	97,4	87,3	99,4
+ Escore-Z_{IP} do IGF-1 < -2: 44,8%	Clonidina	88,5	97,4	96,5	99,4
Escore-Z altura < -2: 2,0%*	ITT	94,4	89,6	15,6	99,9
+ Escore-Z_{IC} do IGF-1 < -2: 5,1%	ITT	94,4	89,6	33,0	99,7
+ Escore-Z_{IO} do IGF-1 < -2: 16,8%	ITT	94,4	89,6	64,7	98,8
+ Escore-Z_{IP} do IGF-1 < -2: 44,8%	ITT	94,4	89,6	88,0	95,2

Probabilidade Pré-Teste = prevalência estimada de DGH; Sen = Sensibilidade; Esp = Especificidade; VPP = valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo; Escore-Z_{IC}: escore-Z avaliado em relação à idade cronológica; Escore-Z_{IO}: escore-Z avaliado em relação à idade óssea; Escore-Z_{IP}: escore-Z avaliado em relação ao estadio puberal; * para o cálculo do VPP e VPN foi considerado uma frequência de 2% de DGH em população de crianças com baixa estatura (ver item 3.7); os valores de sensibilidade, especificidade, acurácia, VPP e VPN são expressos em porcentagens (%)

Pacientes com BEI classificados como ACCD constituem o principal diagnóstico diferencial de DGH. Como esperado, nesta casuística os pacientes com ACCD em idade púber (crianças do sexo masculino com idade superior a 9 anos e no sexo feminino com idade superior a 8 anos, n=54) apresentaram uma alta taxa de resultados falsos positivos do escore-Z_{IC} do IGF-1 (51,9%). Esta taxa de falsos positivos foi reduzida para 1,9% quando os valores do IGF-1 foram comparados com o estadio puberal (escore-Z_{IP}). Porém, o diagnóstico de atraso constitucional do crescimento e desenvolvimento é realizado durante o seguimento do paciente, e em geral é retrospectivo. Infelizmente, no momento da avaliação clínica do paciente, ainda não há parâmetros claros que os diferenciem dos pacientes com baixa estatura isolada.

A avaliação combinada do IGF-1 e do IGFBP-3 no diagnóstico de DGH apresenta uma alta especificidade (95,7%) e, portanto, a probabilidade de confirmação do diagnóstico de DGH quando ambos estão alterados é maior que

a dos escores- Z_{IC} do IGF-1 ou do IGFBP-3 avaliados isoladamente (VPP de 17,3% para a avaliação combinada, 5,7% para o IGF-1 e 13,1% para o IGFBP-3). Por outro lado, quando ou o IGF-1 ou o IGFBP-3 estão alterados, a sensibilidade do exame para o diagnóstico de DGH é superior à avaliação isolada desses peptídeos (94,4%, 92% e 45,8% respectivamente), confirmando sua utilidade no rastreio de DGH. Entretanto, em relação à dosagem isolada do IGF-1, o ganho de sensibilidade da avaliação combinada (valores baixos ou do IGF-1 ou do IGFBP-3) é discreto. Considerando-se o baixo incremento na sensibilidade e o custo da dosagem sérica do IGFBP-3, as concentrações séricas do IGF-1 isoladamente seriam a ferramenta de escolha, pela maior sensibilidade e menor ônus.

Diante dessas evidências, propomos um fluxograma de investigação de DGH (Figura 11) visando elaborar uma abordagem racional e reduzir a necessidade de testes dispendiosos e não isentos de riscos para o paciente. O escore- Z_{IC} do IGF-1 apresentou a maior sensibilidade (92%) e o maior valor preditivo negativo (99,7%) entre todos os testes. Portanto, pacientes que apresentem valores do escore- $Z_{IC} > -2$ excluem o diagnóstico de DGH com uma probabilidade próxima de 100%. Essas crianças devem ter seu crescimento monitorado sem necessidade de prosseguir investigação do eixo GH/IGF-1.

Frente a valores do escore- Z_{IC} do IGF-1 ≤ -2 em uma criança em idade pré-púbere, devemos proceder a um teste de estímulo de secreção de GH associado à dosagem de IGFBP-3 ou a um exame de imagem do SNC. Uma criança que apresentar um pico de GH em resposta a um teste de estímulo inferior a 5 $\mu\text{g/L}$ e um escore- Z_{IC} do IGFBP-3 ≤ -2 tem o diagnóstico confirmado de DGH, necessitando complementar a investigação com imagem do SNC. Uma criança que apresentar um pico de GH em resposta a um teste de estímulo inferior a 5 $\mu\text{g/L}$ e um escore- Z_{IC} do IGFBP-3 > -2 necessita de um segundo teste de estímulo de GH ou imagem do SNC com achados altamente preditivos de hipopituitarismo (neurohipófise ectópica, transecção de haste hipofisária e/ou hipoplasia de adenohipófise) para confirmação diagnóstica de DGH. Em contrapartida, uma criança com baixo escore- Z_{IC} do IGF-1 que realize um exame de imagem do SNC e apresente achados altamente preditivos de hipopituitarismo tem o diagnóstico de DGH confirmado e necessita a complementação da investigação laboratorial dos demais eixos hipofisários.

Figura 11 - Fluxograma de investigação de DGH em crianças com baixa estatura em idade puberal. Escore-Z_{IC}: escore de desvio padrão do IGF-1 comparado com a idade cronológica; Escore-Z_{IP}: escore de desvio padrão do IGF-1 comparado com o estadiu puberal; SNC: sistema nervoso central

Diante de um paciente com baixa estatura em idade puberal que apresente valores de escore-Z_{IC} do IGF-1 ≤ -2 , deve-se avaliar o escore-Z_{IP} do IGF-1, pois apresenta o maior valor preditivo positivo. Aqueles pacientes com o escore-Z_{IP} do IGF-1 ≤ -2 devem ter o eixo GH/IGF-1 avaliado somente com um teste de estímulo de GH ou um estudo neuroradiológico. Porém, se o escore-Z_{IP} do IGF-1 for > -2 , é necessário prosseguir a investigação habitual de DGH com dois testes de estímulo de GH ou um teste de estímulo de GH associado a característica clínicas de DGH grave, alterações neuroradiológicas ou estudo genético compatíveis com DGH.

6 CONCLUSÕES

- O escore-Z do IGF-1 em relação à idade cronológica (escore- Z_{IC}) é uma ferramenta útil na avaliação inicial de crianças com baixa estatura com o intuito de rastreio de pacientes com DGH.
- O escore- Z_{IC} do IGFBP-3 tem a maior especificidade e, portanto, tem seu valor no diagnóstico de pacientes com DGH, devendo ser solicitado caso os pacientes apresentem baixos valores do escore- Z_{IC} do IGF-1.
- A avaliação dos valores do IGF-1 e IGFBP-3 em relação ao estadio puberal melhora a especificidade e acurácia no diagnóstico de DGH em crianças em idade puberal, tendo maior valor preditivo positivo.

ANEXO I – FÓRMULAS UTILIZADAS PARA OS CÁLCULOS DE SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE, ACURÁCIA E VALORES PREDITIVOS POSITIVO E NEGATIVO

As fórmulas utilizadas para cálculo de sensibilidade (1), especificidade (2), acurácia (3) [71] basearam-se nas possibilidades lógicas de um resultado de um teste em relação a um estado de saúde ou doença, ilustradas na Tabela 1, em que P denomina probabilidade e | condiciona a probabilidade a uma determinada condição.

Tabela 1 – Possibilidades lógicas para um verdadeiro estado de saúde/doença e resultados de um determinado teste

Resultado de um teste	Indivíduo Doente (D+)	Indivíduo Não Doente (D-)	Subtotal
Teste Positivo (T+)	Resultado Correto (verdadeiro positivo)	Falso Positivo	Total de resultados positivos
Teste Negativo (T-)	Falso negativo	Resultado Correto (verdadeiro negativo)	Total de resultados negativos
Subtotal	Total de indivíduos doentes	Total de indivíduos não doentes	Total de indivíduos

$$(1) \text{ Sensibilidade} = P(T + | D +) = \frac{\text{Verdadeiro Positivo}}{\text{Total de indivíduos doentes}}$$

$$(2) \text{ Especificidade} = P(T - | D -) = \frac{\text{Verdadeiro Negativo}}{\text{Total de indivíduos não doentes}}$$

$$(3) \text{ Acurácia} = \frac{\text{Verdadeiro Positivo} + \text{Verdadeiro Negativo}}{\text{Total de indivíduos}}$$

Utilizou-se o Teorema de Bayes (4), do qual derivaram as fórmulas para o cálculo dos valores preditivos positivo (5) e negativo (6), considerando a

prevalência de uma determinada condição (Π), em que Sen = sensibilidade e Esp = especificidade:

$$\text{Teorema de Bayes} = P(A|B) = \frac{P(B|A) \times P(A)}{P(B)}$$

$$\text{Valor Preditivo Positivo} = P(D+|T+) = \frac{\Pi \times \text{Sen}}{[\Pi \times \text{Sen} + (1 - \Pi) \times (1 - \text{Esp})]}$$

$$\begin{aligned} \text{Valor Preditivo Negativo} &= P(D-|T-) \\ &= \frac{(1 - \Pi) \times \text{Esp}}{[(1 - \Pi) \times (1 - \text{Esp}) + \Pi \times (1 - \text{Sen})]} \end{aligned}$$

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Blum WF, Alherbisz A, Alsagheir A, El Awwa A, Kaplan W, Koledova E, et al. The growth hormone-insulin-like growth factor-I axis in the diagnosis and treatment of growth disorders. *Endocr Connect*. 2018;7(6):R212-22.
2. Sizonenko PC, Clayton PE, Cohen P, Hintz RL, Tanaka T, Laron Z. Diagnosis and management of growth hormone deficiency in childhood and adolescence. Part 1: diagnosis of growth hormone deficiency. *Growth Horm IGF Res*. 2001;11(3):137-65.
3. Ranke MB, Wit JM. Growth hormone - past, present and future. *Nat Rev Endocrinol*. 2018;14(5):285-300.
4. Baron J, Savendahl L, De Luca F, Dauber A, Phillip M, Wit JM, Nisson O. Short and tall stature: a new paradigm emerges. *Nat Rev Endocrinol*. 2015;11(12):735-46.
5. Laron Z. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1): a growth hormone. *Mol Pathol*. 2001;54(5):311-6.
6. Yakar S, Rosen CJ, Beamer WG, Ackert-Bicknell CL, Wu Y, Liu JL, Ooi GT, Setser J. Circulating levels of IGF-1 directly regulate bone growth and density. *J Clin Invest*. 2002;110(6):771-81.
7. Kiepe D, Ciarmatori S, Hoeflich A, Wolf E, Tönshoff B. Insulin-like growth factor (IGF)-I stimulates cell proliferation and induces IGF binding protein (IGFBP)-3 and IGFBP-5 gene expression in cultured growth plate chondrocytes via distinct signaling pathways. *Endocrinology*. 2005;146(7):3096-104.
8. Cannata D, Vijayakumar A, Fierz Y, LeRoith D. The GH/IGF-1 axis in growth and development: new insights derived from animal models. *Adv Pediatr*. 2010;57(1):331-51.
9. David A, Kelley LA, Sternberg MJ. A new structural model of the acid-labile subunit: pathogenetic mechanisms of short stature-causing mutations. *J Mol Endocrinol*. 2012;49(3):213-20.
10. Boisclair YR, Rhoads RP, Ueki I, Wang J, Ooi GT. The acid-labile subunit (ALS) of the 150 kDa IGF-binding protein complex: an important but forgotten component of the circulating IGF system. *J Endocrinol*. 2001;170(1):63-70.

11. Juul A, Bang P, Hertel NT, Main K, Dalgaard P, Jørgensen K, Müller J, Hall K, Skakkebaek NE. Serum insulin-like growth factor-I in 1030 healthy children, adolescents, and adults: relation to age, sex, stage of puberty, testicular size, and body mass index. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994;78(3):744-52.
12. Peters CJ, Dattani MT. How to use insulin-like growth factor 1 (IGF1). *Arch Dis Child Educ Pract Ed.* 2012;97(3):114-8.
13. Growth Hormone Research Society. Consensus guidelines for the diagnosis and treatment of growth hormone (GH) deficiency in childhood and adolescence: summary statement of the GH Research Society. GH Research Society. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(11):3990-3.
14. Aguiar-Oliveira MH, Gill MS, de A Barretto ES, Alcântara MR, Miraki-Moud F, Menezes CA, et al. Effect of severe growth hormone (GH) deficiency due to a mutation in the GH-releasing hormone receptor on insulin-like growth factors (IGFs), IGF-binding proteins, and ternary complex formation throughout life. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(11): 4118-26.
15. Gelande L, Blum WF, Larsson L, Rosberg S, Albertsson-Wikland K. Monthly measurements of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding protein-3 in healthy prepubertal children: characterization and relationship with growth: the 1-year growth study. *Pediatr Res.* 1999;45(3): 377-83.
16. Ranke MB, Schweizer R, Lindberg A, Price DA, Reiter EO, Albertsson-Wikland K, Darendeliler F. Insulin-like growth factors as diagnostic tools in growth hormone deficiency during childhood and adolescence: the KIGS experience. *Horm Res.* 2004;62 Suppl 1:17-25.
17. Oostdijk W. Diagnostic approach in children with short stature. *Horm Res.* 2009;72(4):206-17.
18. Bao XL, Shi YF, Du YC, Liu R, Deng JY, Gao SM. Prevalence of growth hormone deficiency of children in Beijing. *Chin Med J (Engl).* 1992;105(5):401-5.
19. Lindsay R, Feldkamp M, Harris D, Robertson J, Rallison M. Utah Growth Study: growth standards and the prevalence of growth hormone deficiency. *J Pediatr.* 1994;125(1):29-35.

20. Thomas M, Massa G, Craen M, de Zegher F, Bourguignon JP, Heinrichs C, De Schepper J, Du Caju M, Thiry-Counson G, Maes M. Prevalence and demographic features of childhood growth hormone deficiency in Belgium during the period 1986-2001. *Eur J Endocrinol.* 2004;151(1):67-72.
21. Giovenale D, Meazza C, Cardinale GM, Sposito M, Mastrangelo C, Messini B, Citro G, Delvecchio M, Di Maio S, Bozzola M. The prevalence of growth hormone deficiency and celiac disease in short children. *Clin Med Res.* 2006;4(3):180-3.
22. Vimpani GV, Vimpani AF, Lidgard GP, Cameron EH, Farquhar JW. Prevalence of severe growth hormone deficiency. *Br Med J.* 1977;2(6084):427-30.
23. Voss LD, Mulligan J, Betts PR, Wilkin TJ. Poor growth in school entrants as an index of organic disease: the Wessex growth study. *BMJ.* 1992;305(6866):1400-2.
24. De Sanctis V, Eleftheriou A, Malaventura C, Thalassaemia International Federation Study Group on Growth and Endocrine Complications in Thalassaemia. Prevalence of endocrine complications and short stature in patients with thalassaemia major: a multicenter study by the Thalassaemia International Federation (TIF). *Pediatr Endocrinol Rev.* 2004;2 Suppl 2:249-55.
25. Grote FK, Oostdijk W, De Muinck Keizer-Schrama SM, van Dommelen P, van Buuren S, Dekker FW, Ketel AG, Moll HA, Wit JM. The diagnostic work up of growth failure in secondary health care; an evaluation of consensus guidelines. *BMC Pediatr.* 2008;8:21.
26. Ahmed ML, Allen AD, Sharma A, Macfarlane JA, Dunger DB. Evaluation of a district growth screening programme: the Oxford Growth Study. *Arch Dis Child.* 1993;69(3):361-5.
27. Velayutham K, Selvan SSA, Jeyabalaji RV, Balaji S. Prevalence and Etiological Profile of Short Stature among School Children in a South Indian Population. *Indian J Endocrinol Metab.* 2017;21(6):820-2.
28. Singh P, Sharma PK, Agnihotri A, Jyotsna VP, Das P, Gupta SD, Makharia GK, Khadgawat R. Coeliac disease in patients with short stature: A tertiary care centre experience. *Natl Med J India.* 2015;28(4):176-80.

29. Moore KC, Donaldson DL, Ideus PL, Gifford RA, Moore WV. Clinical diagnoses of children with extremely short stature and their response to growth hormone. *J Pediatr*. 1993;122(5 Pt 1):687-92.
30. Zayed AA, Mustafa Ali MK, Al-Ani MA, Momani MS, Yousef AM. The prevalence of isolated growth hormone deficiency among children of short stature in Jordan and its relationship with consanguinity. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2014;81(6):876-82.
31. Badaru A, Wilson DM. Alternatives to growth hormone stimulation testing in children. *Trends Endocrinol Metab*. 2004;15(6):252-8.
32. Growth Hormone Research Society. Consensus Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Growth Hormone (GH) Deficiency in Childhood and Adolescence. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(11):3990-3.
33. Murray PG, Dattani MT, Clayton PE. Controversies in the diagnosis and management of growth hormone deficiency in childhood and adolescence. *Arch Dis Child*. 2015;101(1):96-100.
34. Guzzetti C, Ibba A, Pilia S, Beltrami N, Di Iorgi N, Rollo A, Fratangeli N, Radetti G, Zucchini S, et al. Cut-off limits of the peak GH response to stimulation tests for the diagnosis of GH deficiency in children and adolescents: study in patients with organic GHD. *Eur J Endocrinol*. 2016;175(1):41-7.
35. Ghigo E, Bellone J, Aimaretti G, Bellone S, Loche S, Cappa M, Bartolotta E, Dammacco F, Camanni F. Reliability of provocative tests to assess growth hormone secretory status. Study in 472 normally growing children. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996;81(9):3323-7.
36. Chinoy A, Murray PG. Diagnosis of growth hormone deficiency in the paediatric and transitional age. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2016;30(6):737-47.
37. Tillmann V, Buckler JM, Kibirige MS, Price DA, Shalet SM, Wales JK, Addison MG, Gill MS, Whatmore AJ, Clayton PE. Biochemical tests in the diagnosis of childhood growth hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(2):531-5.

38. Juul A, Skakkebaek NE. Prediction of the outcome of growth hormone provocative testing in short children by measurement of serum levels of insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor binding protein 3. *J Pediatr*. 1997;130(2):197-204.
39. Lange M, Svendsen OL, Skakkebaek NE, Müller J, Juul A, Schmiegelow M, Feldt-Rasmussen U. An audit of the insulin-tolerance test in 255 patients with pituitary disease. *Eur J Endocrinol*. 2002;147(1):41-7.
40. Borges MEF, Teixeira FC, Feltrin AK, Ribeiro KA, Nascentes GA, Resende EA, Ferreira BP, Silva AP, et al., Clonidine-stimulated growth hormone concentrations (cut-off values) measured by immunochemiluminescent assay (ICMA) in children and adolescents with short stature. *Clinics (Sao Paulo)*. 2016;71(4):226-31
41. Silva EG, Shessarenko N, Arnhold IJ, Batista MC, Estefan V, Osorio MG, Marui S, Mendonca BB. GH values after clonidine stimulation measured by immunofluorometric assay in normal prepubertal children and GH-deficient patients. *Horm Res*. 2003;59(5):229-33.
42. Adan L, Souberbielle JC, Brauner R. Diagnostic markers of permanent idiopathic growth hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994;78(2):353-8.
43. Carel JC, Tresca JP, Letrait M, Chaussain JL, Lebouc Y, Job JC, Coste J. Growth hormone testing for the diagnosis of growth hormone deficiency in childhood: a population register-based study. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(7):2117-21.
44. Paula LP, Czepielewski MA. [Evaluating diagnosis methods on childhood GH (DGH) deficiency: IGFs, IGFBPs, releasing tests, GH rhythm and image exams]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2008;52(5):734-44.
45. Pampanini V, Pedicelli S, Gubinelli J, Scirè G, Cappa M, Boscherini B, Cianfarani S. Brain Magnetic Resonance Imaging as First-Line Investigation for Growth Hormone Deficiency Diagnosis in Early Childhood. *Horm Res Paediatr*. 2015;84(5):323-30.
46. Gandrud LM, Wilson DM. Is growth hormone stimulation testing in children still appropriate? *Growth Horm IGF Res*. 2004;14(3):185-94.

47. Mitchell H, Dattani MT, Nanduri V, Hindmarsh PC, Preece MA, Brook CG. Failure of IGF-I and IGFBP-3 to diagnose growth hormone insufficiency. *Arch Dis Child*. 1999;80(5):443-7.
48. Deal C, Hasselmann C, Pfäffle RW, Zimmermann AG, Quigley CA, Child CJ, et al. Associations between pituitary imaging abnormalities and clinical and biochemical phenotypes in children with congenital growth hormone deficiency: data from an international observational study. *Horm Res Paediatr*. 2013;79(5):283-92.
49. Deeb A, Attia S, Elhag G, El Fatih A, Reddy J, Nagelkerke N. Pituitary gland size is a useful marker in diagnosing isolated growth hormone deficiency in short children. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2015;28(9-10):981-4.
50. Arslanoğlu I, Kutlu H, Işgüven P, Tokuş F, Işık K. Diagnostic value of pituitary MRI in differentiation of children with normal growth hormone secretion, isolated growth hormone deficiency and multiple pituitary hormone deficiency. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2001;14(5):517-23.
51. Tillmann V, Tang VW, Price DA, Hughes DG, Wright NB, Clayton PE. Magnetic resonance imaging of the hypothalamic-pituitary axis in the diagnosis of growth hormone deficiency. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2000;13(9):1577-83.
52. Clemmons DR. Consensus statement on the standardization and evaluation of growth hormone and insulin-like growth factor assays. *Clin Chem*. 2011;57(4):555-9.
53. Clayton PE, Hall CM. Insulin-like growth factor I levels in healthy children. *Horm Res*. 2004;62 Suppl 1:2-7.
54. Brabant G, von zur Mühlen A, Wüster 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(2):53-60.
55. 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(6):654-64.

56. Mavromati M, Kuhn E, Agostini H, Brailly-Tabard S, Massart C, Piketty ML, et al., Classification of Patients With GH Disorders May Vary According to the IGF-I Assay. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017;102(8):2844-52.
57. Shalet SM, Toogood A, Rahim A, Brennan BM. The diagnosis of growth hormone deficiency in children and adults. *Endocr Rev.* 1998;19(2):203-23.
58. Ranke MB. Insulin-like growth factor binding-protein-3 (IGFBP-3). *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2015;29(5):701-11.
59. Ballerini MG, Ropelato MG, Domené HM, Pennisi P, Heinrich JJ, Jasper HG. Differential impact of simple childhood obesity on the components of the growth hormone-insulin-like growth factor (IGF)-IGF binding proteins axis. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2004;17(5):749-57.
60. Boquete HR, Sobrado PG, Fideleff HL, Sequera AM, Giaccio AV, Suárez MG, Ruibal GF, Miras M. Evaluation of diagnostic accuracy of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein-3 in growth hormone-deficient children and adults using ROC plot analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(10):4702-8.
61. Cianfarani S, Liguori A, Boemi S, Maghnie M, Iughetti L, Wasniewska M, et al. Inaccuracy of insulin-like growth factor (IGF) binding protein (IGFBP)-3 assessment in the diagnosis of growth hormone (GH) deficiency from childhood to young adulthood: association to low GH dependency of IGF-II and presence of circulating IGFBP-3 18-kilodalton fragment. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(11):6028-34.
62. Haghshenas Z, Sotoudeh K, Karamifar H, Karamizadeh Z, Amirhakimi G. The role of insulin like growth factor (IGF)-1 and IGF-binding protein-3 in diagnosis of Growth Hormone Deficiency in short stature children. *Indian J Pediatr.* 2009;76(7):699-703.
63. Shen Y, Zhang J, Zhao Y, Yan Y, Liu Y, Cai J. Diagnostic value of serum IGF-1 and IGFBP-3 in growth hormone deficiency: a systematic review with meta-analysis. *Eur J Pediatr.* 2015;174(4):419-27.
64. Molitch ME, Clemmons DR, Malozowski S, Merriam GR, Vance ML, Endocrine Society. Evaluation and treatment of adult growth hormone deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(6):1587-609.

65. Clayton PE, Cianfarani S, Czernichow P, Johannsson G, Rapaport R, Rogol A. Management of the child born small for gestational age through to adulthood: a consensus statement of the International Societies of Pediatric Endocrinology and the Growth Hormone Research Society. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(3):804-10.
66. Cohen P, Rogol AD, Deal CL, Saenger P, Reiter EO, Ross JL, Chernausek SD, Savage MO, et al. Consensus statement on the diagnosis and treatment of children with idiopathic short stature: a summary of the Growth Hormone Research Society, the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society, and the European Society for Paediatric Endocrinology Workshop. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(11):4210-7.
67. Kuczmarsk RJ, Ogden CL, Grummer-Strawn LM, Flegal KM, Guo SS, Wei R, et al. CDC growth charts: United States. *Adv Data*, 2000;(314):1-27.
68. Silva DA, Pelegrini A, Petroski EL, Gaya AC. Comparison between the growth of Brazilian children and adolescents and the reference growth charts: data from a Brazilian project. *J Pediatr (Rio J).* 2010;86(2):115-20.
69. Fayter D, Nixon J, Hartley S, Rithalia A, Butler G, Rudolf M, et al. Effectiveness and cost-effectiveness of height-screening programmes during the primary school years: a systematic review. *Arch Dis Child.* 2008;93(4):278-84.
70. Zweig MH, Campbell G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin Chem.* 1993;39(4):561-77.
71. Maxim LD, Niebo R, Utell MJ. Screening tests: a review with examples. *Inhal Toxicol.* 2014;26(13):811-28.
72. Hasegawa Y, Hasegawa T, Anzo M, Aso T, Tsuchiya Y. Clinical utility of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF binding protein-3 levels in the diagnosis of GH deficiency (GHD) during childhood. *Endocr J.* 1996;43 Suppl:S1-4.
73. Blum WF, Ranke MB, Kietzmann K, Gauggel E, Zeisel HJ, Bierich JR. A specific radioimmunoassay for the growth hormone (GH)-dependent somatomedin-binding protein: its use for diagnosis of GH deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 1990;70(5):1292-8.

74. Nunez SB, Municchi G, Barnes KM, Rose SR. Insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding protein-3 concentrations compared to stimulated and night growth hormone in the evaluation of short children--a clinical research center study. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81(5):1927-32.
75. Martin DD, Wit JM, Hochberg Z, Säwendahl L, van Rijn RR, Fricke O, Cameron N, et al. The use of bone age in clinical practice - part 1. *Horm Res Paediatr.* 2011;76(1):1-9.
76. Melmed S, Polonsky KS, Reed Larsen P, Kronenberg HM. *Williams Textbook of Endocrinology.* 12 ed. 2011: Elsevier.
77. Lazar L, Phillip M. Pubertal disorders and bone maturation. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2012;41(4):805-25.