

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**PADRONIZAÇÃO DO RADIOIMUNOENSAIO DE TIREOTROFINA
HUMANA E SUA APLICAÇÃO À PURIFICAÇÃO DO HORMÔNIO
PARA O PREPARO DE REAGENTES DO ENSAIO.**

LIN HUI LIN

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau
de Mestre em Tecnologia Nuclear

Orientadora: Dra. Vânia Cairra Borghi

SÃO PAULO

1991



*In the race for quality,
there is no finish line.*

David T. Kearns

*Aos meus pais
e irmãos*

Sinceros agradecimentos:

À Dra. Vânia Caira Borghi, pela orientação

Ao Dr. Spero Penha Morato, pela oportunidade

Às colegas: Maria Helena Bellini

Martha do Nascimento

Sandra Rosa da Silva, pelo estímulo

Aos professores Drs.: Bernardo Leo Wajchenberg e

William Nicolau e

Aos Doutores: Carmen Lúcia Lanceloti

Paolo Bartolini

Sigmar Horst Cardoso, pela colaboração

Ao "National Institute of Diabetes and Digestive and
Kidney Disease" e ao "National Hormone and Pituitary
Program, University of Maryland School of Medicine",
E.U.A., pelos reagentes biológicos doados.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo -
FAPESP, pela bolsa de mestrado concedida (processo nº
67/2800-8)

A todos que direta ou indiretamente colaboraram na
realização deste trabalho.

PADRONIZAÇÃO DO RADIOIMUNOENSAIO DE TIREOTROFINA HUMANA E SUA
APLICAÇÃO A PURIFICAÇÃO DO HORMÔNIO PARA O PREPARO DE REAGENTES
DO ENSAIO

LIN HUI LIN

RESUMO

Padronizaram-se as diferentes etapas para o radioimunoensaio de tireotrofina humana, efetuando-se a radioiodação pelo método de Cloramina T e a purificação do marcado em gel de Sephadex G-100. A separação das frações ligadas e livres foi realizada pela precipitação da fração ligada pelo polietileno glicol.

A análise dos parâmetros de controle de qualidade do ensaio demonstrou a adequação do método para dosagem de extratos hipofisários, apresentando um intervalo de determinação bastante amplo.

Realizou-se purificação de tireotrofina a partir de uma das frações colaterais, obtidas durante a extração do hormônio de crescimento, com objetivo de se obter um reagente puro para uso em radioimunoensaio. O protocolo de purificação foi adaptado do método descrito por Roos e cols., o qual envolve as seguintes etapas:

1. Cromatografia de exclusão molecular em gel Sephadex G-100.
2. Cromatografia de adsorção em hidroxilapatita.
3. Cromatografia de troca iônica em SP-Sephadex C-50.

Avaliou-se o emprego do hormônio obtido como traçador do radioimunoensaio em comparação com aquele preparado a partir do hormônio obtido do NIDDKD, E.U.A.. Os resultados indicam que, embora não tenha sido possível obter um hormônio com grau de

pureza adequado para ser empregado como traçador, criou-se experiência suficiente para o isolamento de tireotrofina que poderá ser empregado no preparo de padrão secundário e de anticorpos específicos para o radiomunoensaio.

STANDARDIZATION OF HUMAN THYROTROPIN RADIOIMMUNOASSAY AND ITS APPLICATION TO THE PURIFICATION OF THIS HORMONE TO THE PREPARATION OF THE ASSAY REAGENTS

LIN HUI LIN

ABSTRACT

The various steps that are necessary for setting up the thyrotropin radioimmunoassay are presented below. Radioiodination was carried out through the Chloramine T method and the labeled purification performed on Sephadex G-100.

The analysis of the assay quality control parameters demonstrated the adequacy of the method to measure thyrotropin in human hypophyseal extracts, presenting a useful wide determination range.

Purification of human thyrotropin from side fractions obtained during the purification of growth hormone was carried out in order to obtain a pure reagent for use in the radioimmunoassay. The purification procedure was adapted according to the method described by Roos et al., which involves the following steps:

1. Molecular sieve chromatography on Sephadex G-100.
2. Adsorption chromatography on hydroxylapatite.
3. Ion exchange chromatography on SP-Sephadex C-50.

The employment of the hormone obtained was evaluated as the radioimmunoassay tracer in comparison with that prepared from the hormone received from the NIDDKD, U.S.A..

The results indicated that although it was not possible to obtain a hormone with a purity degree adequate to be used as the tracer, enough experience was acquired for the isolation of thyrotropin so that it could be employed in the preparation of the secondary and the specific antibodies for the radioimmunoassay.

ÍNDICE :

1. Introdução	1
2. Materiais	12
2.1. Materiais e equipamentos	12
2.2. Reagentes biológicos	15
2.3. Produtos químicos	16
2.4. Soluções	18
2.4.1. Soluções empregadas na radioiodação do hTSH	18
2.4.2. Solução empregada na purificação do hTSH radioiodado	19
2.4.3. Soluções empregadas na eletroforese em gel de poliacrilamida	19
2.4.4. Soluções empregadas no RIE de hTSH	20
2.4.5. Soluções empregadas na separação do RIE de hTSH	21
2.4.6. Soluções empregadas na determinação pro- tética pelo método de Lowry	22
2.4.7. Soluções empregadas na extração do hTSH ..	23
2.4.8. Soluções empregadas na purificação do extrato hipofisário	25
2.4.9. Soluções empregadas no acondicionamento do hTSH purificado para liofilização	27
3. Métodos	26
3.1. Radioimunoensaio do hTSH	26
3.1.1. Preparo do traçador	26
3.1.1.1. Análise do hTSH "frio"	26
3.1.1.2. Técnica de iodação do hTSH	30
3.1.1.3. Cálculo da atividade total da marcação	32
3.1.1.4. Purificação de hTSH radioiodado (125 I-hTSH)	32

3.1.1.5.	Rendimento da marcação	34
3.1.1.6.	Recuperação da purificação	35
3.1.1.7.	Atividade específica do traçador.	36
3.1.1.8.	Análise eletroforética do traçador	37
3.1.1.9.	Estabilidade do traçador	38
3.1.2.	Determinação das condições ótimas para o radioensaio	38
3.1.2.1.	Preparo da curva dose-resposta ..	38
3.1.2.2.	Título ideal do antissoro	39
3.1.2.3.	Sistema de ensaio	40
3.1.2.4.	Técnica de separação	41
3.1.2.4.1.	Determinação da concentração ideal de PEG ..	42
3.1.2.4.2.	Efeito da lavagem da fração precipitada pelo PEG	43
3.1.3.	Cálculo dos resultados	43
3.1.4.	Controle de qualidade do RIE	44
3.1.4.1.	Preparo das amostras controle ...	44
3.1.4.2.	Avaliação das características operacionais	45
3.1.4.2.1.	Especificidade	45
3.1.4.2.2.	Exatidão	47
3.1.4.2.3.	Precisão	47
3.1.4.2.4.	Sensibilidade	48
3.2.	Obtenção do hTSH	49
3.2.1.	Métodos de quantificação protéica	49
3.2.1.1.	Método espectrofotométrico	49
3.2.1.2.	Método de Lowry	49
3.2.2.	Método de quantificação do hTSH	50
3.2.3.	Purificação a partir de extrato cru	51
3.2.3.1.	Purificação preliminar	51

3.2.3.2. Purificação em escala maior	56
3.2.4. Extração a partir de hipófises congeladas.	58
3.2.5. Purificação do extrato obtido a partir de hipófises congeladas	60
3.2.6. Avaliação do hTSH-IPEN	63
3.2.6.1. Iodação e purificação do hTSH-IPEN	63
3.2.6.2. Análise do ¹²⁵ I-hTSH-IPEN	65
4. Resultados	67
4.1. Padronização do radioensaio	67
4.1.1. Preparo do traçador	67
4.1.1.1. Análise do hTSH "frio"	67
4.1.1.2. Radioiodação e purificação do hTSH	67
4.1.3. Determinação da ótima diluição do antissoro.	69
4.1.4. Condições do ensaio	83
4.1.5. Sequência operacional do RIE	87
4.1.6. Controle de qualidade	89
4.1.6.1. Especificidade	89
4.1.6.2. Exatidão	94
4.1.6.3. Precisão	94
4.1.6.4. Sensibilidade	94
4.2. Extração e purificação do hTSH	102
4.2.1. Obtenção do hTSH	102
4.2.2. Avaliação de hTSH-IPEN	109
5. Discussão	129
5.1. Padronização do RIE	129
5.2. Obtenção do hTSH	137
6. Conclusões	144
6.1. Padronização do RIE	144
6.2. Obtenção do hTSH	146
7. Referências bibliográficas	147

1. INTRODUÇÃO

A tireotrofina (TSH) pertence à classe dos hormônios glicoprotéicos, onde estão incluídos os hormônios gonadotróficos tanto placentário, como a gonadotrofina coriônica (CG), quanto hipofisários: foliculotrofina (FSH) e luteotrofina (LH) (75). Esses hormônios, apesar de apresentarem funções fisiológicas diversas, possuem estreita semelhança estrutural entre si e são os hormônios protéicos mais complexos conhecidos até o presente. Eles derivam da evolução bioquímica do mesmo locus gênico, sendo formados por duas cadeias glicoprotéicas denominadas subunidades A e B. A subunidade A desses quatro hormônios é codificada por um gene comum (36) e contém determinantes antigênicos similares, enquanto que as subunidades B possuem epitopos hormônio-específicos que conferem a especificidade funcional para os hormônios respectivos (24).

Essas subunidades são unidas por ligações não covalentes, tais como as ligações hidrofóbicas, iônicas e pontes de hidrogênio, sendo indicada pela dissociação em ácido propiônico que a interação hidrofóbica é a mais importante para estabilizar as moléculas do TSH (53). A subunidade A apresenta cinco pontes dissulfeto e a subunidade B seis (75).

O TSH humano (hTSH) possui peso molecular de aproximadamente 29.000 daltons, contém 89 resíduos de aminoácidos na cadeia A e 112 resíduos na cadeia B (Figura 1). Os aminoácidos terminais da subunidade A são a valina e a serina, e o peso molecular, calculado a partir da sequência de aminoácidos e do carboidrato desta subunidade, é de 14.400 daltons. A subunidade B tem como aminoácidos terminais a fenilalanina e a tirosina e apresenta peso molecular de 14.500 daltons (89). Essas duas

H₂N-VAL-GLN-ASP-CYS-PRO-GLU-CYS-THR-LEU-GLN-GLU-ASN-PRO-PHE-PHE-
 SER-GLN-PRO-GLY-ALA-PRO-ILE-LEU-GLN-CYS-MET-GLY-CYS-CYS-PHE-
 SER-ARG-ALA-TYR-PRO-THR-PRO-LEU-ARG-SER-LYS-LYS-THR-MET-LEU-
 VAL-GLN-LYS-ASN-VAL-THR-SER-GLX-SER-THR-CYS-CYS-VAL-ALA-LYS-
 CHO
 SER-TYR-ASN-ARG-VAL-THR-VAL-MET-GLY-GLY-PHE-LYS-VAL-GLU-ASN-
 CHO
 HIS-THR-ALA-CYS-HIS-SER-CYS-THR-CYS-TYR-TYR-HIS-LYS-SER-COOH

SUBUNIDADE A

H₂N-PHE-CYS-ILE-PRO-THR-GLU-TYR-MET-THR-HIS-ILE-GLU-ARG-ARG-GLU-CYS-
 ALA-TYR-CYS-LEU-THR-ILE-ASN-THR-THR-ILE-CYS-ALA-GLY-TYR-CYS-MET-
 CHO
 THR-ARG-ASP-ILE-ASN-GLY-LYS-LEU-PHE-LEU-PRO-LYS-TYR-ALA-LEU-SER-
 GLN-ASP-VAL-CYS-THR-TYR-ARG-ASP-PHE-ILE-TYR-ARG-THR-VAL-GLU-ILE-
 PRO-GLY-CYS-PRO-LEU-HIS-VAL-ALA-PRO-TYR-PHE-SER-TYR-PRO-VAL-ALA-
 LEU-SER-CYS-LYS-CYS-GLY-LYS-CYS-ASP-THR-ASP-TYR-SER-ASP-CYS-ILE-
 HIS-GLU-ALA-ILE-LYS-THR-ASN-TYR-CYS-THR-LYS-PRO-GLN-LYS-SER-TYR-COOH

SUBUNIDADE B

Figura 1. Sequência de aminoácidos da tireotrofina humana (89).

subunidades são sintetizadas separadamente e unidas previamente ao acoplamento das cadeias glicídicas (25).

A porção glicídica do TSH refere-se a 16% de seu peso molecular, sendo constituída de D-manose, D-galactose, L-fucose, ácido N-acetilneuramínico, D-glucosamina e D-galactosamina (75). A subunidade A possui duas cadeias laterais de carboidratos ligadas ao aminoácido asparagina nas posições 49 e 75, enquanto que na subunidade B somente uma cadeia lateral de carboidrato está ligada a este mesmo aminoácido na posição 23 (89). A heterogeneidade dos carboidratos constituintes dos hormônios glicoprotéicos confere diferenças quanto a afinidade do hormônio ao receptor e quanto a sua potência biológica (25).

Já foram identificados, pelo emprego de anticorpos monoclonais, cinco epitopos diferentes em cada subunidade do hTSH, sendo um epitopo da subunidade B também expresso no TSH bovino (32). Além disso, verificou-se que a deglicosilação das subunidades do hTSH tem pouco efeito sobre sua ligação com os anticorpos, enquanto que a redução das pontes dissulfeto altera notavelmente esta ligação. Isto sugere que a conformação molecular dada por estas pontes seja essencial para a antigenicidade das subunidades e do próprio hormônio (32).

Quando analisado pela eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA), o hTSH mostrou ser bastante heterogêneo (24,84,54), apresentando até cinco componentes com pontos isoelétricos variando entre 7,25 (I) a 5,18 (V), (79).

O TSH é sintetizado em células especializadas da adenohipófise, localizadas especialmente na borda mucóide central da glândula, denominadas células tireotróficas. Essas células são grandes e de forma poliédrica, constituindo 5 a 15% das células hipofisárias. Elas contêm pequenos grânulos de secreção que

variam de 50 a 100 nm de diâmetro e possuem densidade eletrônica difusa (25).

A hipófise humana contém cerca de 100 a 150 ug de TSH. Em condições normais, em que a taxa de secreção do TSH é da ordem de 50 a 200 ug/dia, existe um excesso na síntese da subunidade A, cujas cadeias livres podem ser determinadas no soro. No entanto, uma pequena quantidade de subunidade B livre pode ser detectada apenas em condição de hipersecreção deste hormônio, característica do hipotireoidismo, com taxa de secreção de 1000 ug/dia (25).

O TSH exerce sua ação na glândula tireóide, onde regula uma série de processos bioquímicos e fisiológicos que resultam na síntese e secreção dos hormônios tireóideos. Na tireóide ele se liga aos receptores de superfície celular, aumentando o conteúdo celular da AMP cíclico via adenilato ciclase. A subunidade B é a responsável pela especificidade da ligação aos receptores celulares, enquanto que a subunidade A pode estar mais diretamente envolvida na ativação da adenilato ciclase (38).

A secreção e os níveis séricos do TSH são regulados por dois mecanismos, um deles denominado de retroalimentação positiva e o outro, negativa. O primeiro é mediado pelo hormônio liberador do TSH (TRH), o qual estimula a síntese, a secreção e a glicosilação do TSH; enquanto que o segundo é exercido pelos hormônios tireóideos, que inibem não apenas a síntese e a secreção do TRH, como também inibem diretamente a síntese e a secreção do TSH (14).

A dosagem do hTSH é de grande importância para avaliar anomalias da função tireoideana e principalmente, realizar o diagnóstico diferencial entre o hipotireoidismo primário e o

secundário (25). Sua estimativa é também de particular interesse, quando associada à determinação de tiroxina (T4), para o diagnóstico precoce do cretinismo em recém-nascidos (67). Além disso, é empregada no diagnóstico de tumores hipofisários e hipotalâmicos, de doenças granulomatosas acometendo a hipófise e outras (27). Juntamente com os hormônios tireóideos, o ensaio do TSH representa a medida hormonal mais frequentemente realizada nos laboratórios de análise clínicas.

Porém, a concentração baixa do TSH na hipófise, aliada à estreita similaridade estrutural com os demais hormônios glicoprotêicos tem dificultado sua extração, caracterização e dosagem. Muito esforço tem sido despendido, portanto, no desenvolvimento e refinamento de técnicas para extraí-lo, purificá-lo e quantificá-lo.

Como se sabe, o surgimento da endocrinologia como área do conhecimento foi motivado pelo aparecimento de métodos que possibilitaram a medida dos hormônios. Esses métodos eram, quase sem exceção, bioensaios, que apesar de serem definidos como funcionalmente específicos, apresentavam alguns problemas intrínsecos tais como: pouca praticabilidade, limitações de sensibilidade e especificidade. Essas limitações foram em parte solucionadas com a evolução da metodologia, que passou a utilizar órgãos e tecidos isolados, bem como células isoladas.

Entretanto, apesar dos melhoramentos obtidos com as evoluções metodológicas do bioensaio, não foi possível atingir sensibilidade e praticabilidade satisfatórias; o que levou ao desenvolvimento de ensaios ditos estruturalmente específicos, que mediam uma determinada estrutura química, supostamente característica de um hormônio. Tais ensaios eram em geral relativamente simples, com razoável sensibilidade, mas pouco

específicos. Suas limitações foram superadas com o surgimento, no final da década de 50, de um novo princípio de ensaio que veio revolucionar quase todas as áreas do conhecimento médico, em particular a endocrinologia, área na qual ele surgiu.

Esses ensaios foram definidos genericamente como ensaios em que o componente discriminador (anticorpo, proteína ligadora ou receptor) está presente em quantidade limitada e saturado. A substância a ser medida ou um padrão conhecido compete com uma quantidade limitada da mesma substância marcada pelos sítios de ligação (limitados) de um agente ligante, que é o componente discriminador. A quantidade de substância marcada que se une ao agente ligante é inversamente proporcional a quantidade do padrão ou da substância a ser medida, presente no meio. Através do comportamento dos padrões pode-se construir uma curva de dose-resposta, baseando-se sempre na medida de uma das frações marcadas, a que permanece unida ao agente ligante ou a que permanece livre, após ambas serem separadas por um agente separador qualquer (8).

Os primeiros trabalhos descritos com base nesse princípio foram os de Yalow e Berson (104) e os de Ekins (31). Esse método recebeu o nome de radioensaio (RIE) por empregar antígenos marcados com radioisótopos e anticorpos. A simplicidade operacional dessa técnica permitiu sua ampla aplicação para a determinação de um grande número de substâncias, fossem elas hormonais ou não. Com a evolução dos imunoenaios, outros métodos baseados nos princípios do RIE foram desenvolvidos, visando aumentar sua sensibilidade e praticabilidade, tais como os ensaios imunoradiométricos (IRMA) (66,1), enzimaensaos (EIA) (35,34,87) e fluorimensaos (FIA) (83,60,78,29).

Nesse sentido, antes do advento do RIE, os procedimen-

tos empregados para medir o TSH no soro humano eram métodos biológicos e como tais, além de não permitirem o processamento de um grande número de amostras, eram destituídos de sensibilidade e especificidade adequadas. Consequentemente, seus resultados nem sempre eram fidedignos.

A partir da obtenção do hTSH de pureza elevada por Condliffe, em 1963 (22), e o subsequente desenvolvimento de anticorpos anti-hTSH em animais de laboratório (101), tornou-se possível o desenvolvimento de um RIE sensível e específico para este hormônio, baseado no princípio do imunoensaio descrito por Yalow e Berson.

Odell e cols. em 1964 (69) descreveram o primeiro método radioimunológico para dosagem do TSH, no qual empregavam a precipitação alcóolica da fração ligada para separá-la da fração livre. A seguir, foram relatados novos métodos, em que eram solucionados diversos inconvenientes encontrados, permitindo o processamento simultâneo de um grande número de amostras em tempo relativamente curto e com grau de confiabilidade elevado (99,70,68,100,63,72,39,73,50,82).

Esses ensaios foram suficientemente sensíveis para medirem concentrações elevadas do TSH, porém, a distinção entre concentrações normais e diminuídas só foi conseguida após serem introduzidas várias modificações nos RIEs. Com a recente introdução dos IRMAs (18,85,6) e dos FIAs (58,77), que são métodos com sensibilidade e praticabilidade elevadas, capazes de diferenciar níveis abaixo da normalidade daqueles normais, houve um grande avanço no diagnóstico das doenças tireoideanas.

A grande demanda de TSH, decorrente do desenvolvimento desses ensaios, levou a realização de vários estudos sobre a obtenção de TSH, com grau de pureza adequado para ser empregado

como reagente dos imunoensaios.

Os primeiros trabalhos referentes à extração do TSH foram relatados no início da década de 30 por Janssen e Loeser (56) e por Junkmann e Schoeller (57), que haviam desenvolvido um método histológico para o ensaio biológico desse hormônio. Nos anos seguintes, muitos experimentos foram conduzidos e diferentes ensaios biológicos foram desenvolvidos com o propósito de isolá-lo.

No entanto, foi somente na década de 50, com o emprego da cromatografia de troca iônica em Amberlite IRC-50 para a purificação de proteínas, que Heideman (43) isolou o TSH bovino com potência elevada. A obtenção do TSH bovino foi seguida da purificação do hormônio humano, ovino, de baleia e porcino (75).

Condliffe e cols. (23), em 1959, empregando a resina de celulose para a purificação de TSH e LH bovinos, evidenciaram que os hormônios glicoprotéicos humanos também poderiam ser separados por essa mesma resina. Portanto, em 1963, Condliffe purificou o hTSH através de cromatografias de troca iônica em DEAE-Celulose e CM-Celulose, partindo de frações colaterais obtidas no isolamento do hormônio de crescimento (GH) (22).

Com base nesses resultados, outros trabalhos foram realizados empregando essas mesmas cromatografias e visando isolar um número maior de hormônios, a partir de um mesmo extrato hipofisário.

Assim sendo, Parlow e cols. (71) em 1965, purificaram os hormônios glicoprotéicos hipofisários humanos (TSH, LH, FSH), a partir de produtos colaterais obtidos durante a extração do GH. Bates e cols. (5), em 1968, introduziram a extração alcóolica, que inibe a ação das enzimas presentes nos extratos hipofisários, permitindo assim o isolamento do hTSH com

rendimento elevado. Torjesen e cols. (97), em 1974 e Hartree (42), em 1975, empregando o processo de fracionamento com etanol também obtiveram, com rendimento adequado os hormônios glicoprotêicos hipofisários e o GH.

Roos e cols. (84) em 1975, utilizando as frações colaterais provenientes da extração do GH como material de partida, purificaram o hTSH através de cromatografias em resinas outras que as celulósicas: Sephadex G-100, hidroxilapatita e SP-Sephadex C-50.

Ainda na década de 70, outros autores, baseando-se na capacidade da concanavalina-A ligar-se a carboidratos, isolaram o TSH bovino (7) e o de baleia (98).

Chapman e cols. (19), em 1981, tendo como objetivo a obtenção dos hormônios hipofisários para fins terapêuticos e partindo de hipófises congeladas, extraíram os diversos hormônios hipofisários variando o pH do extrato e precipitando as proteínas com sal neutro (sulfato de amônio). Este procedimento, seguido de purificação através de cromatografias de exclusão molecular (Sephadex G-100) e de troca iônica (CM-celulose e DEAE-celulose), maximizou o rendimento obtido na purificação do GH e forneceu rendimento apropriado no isolamento dos hormônios glicoprotêicos.

A introdução de técnicas cromatográficas mais eficazes, tal como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), possibilitou a obtenção, num curto período de tempo, do hTSH altamente purificado (95,16).

O aparecimento das cromatografias de imunoafinidade também permitiu o isolamento do hTSH com grau de pureza elevado. Deste modo, Pekonen e cols. (74), em 1980, empregando anticorpos policlonais produzidos em coelhos, isolaram o hTSH a partir de soro de pacientes portadores de hipotireoidismo. Mais recente-

mente, Jack e cols. (51,52) utilizando anticorpos monoclonais, que são altamente específicos, obtiveram os hormônios glicoprotêicos hipofisários humanos através de uma única etapa de purificação para os respectivos hormônios.

Além desses estudos sobre a obtenção do TSH íntegro, outras investigações já foram conduzidas, com êxito, para isolar e caracterizar suas subunidades (88,55).

Pode-se concluir pelo supra exposto que a obtenção de hTSH em nosso meio é bastante desejável, pois, por não ser produzido comercialmente no Brasil, o hormônio puro é importado a preço elevado (cerca de US\$ 415,00 o frasco contendo 100 ug), (17).

O hTSH purificado constitui, portanto, matéria-prima fundamental para o desenvolvimento de seus imunoenaios, servindo de ponto de partida para o preparo de traçadores (radioativos ou não), preparações padrão, bem como para a produção de anticorpos específicos (mono e policlonais).

PROPÓSITO.

O presente trabalho tem por objetivo contribuir para a obtenção do hTSH em nosso meio, visando a substituição de produtos importados empregados na construção de seus imunoen-
saíes.

Tal contribuição refere-se:

- Ao desenvolvimento e padronização de um RIE específico para a determinação do hTSH nos extratos hipofisários.
- À avaliação do emprego de preparações cruas, provenientes da extração do GH, para o isolamento do hTSH.
- Ao estudo da adequação do hTSH isolado no preparo de reagentes do RIE, mediante comparação com o hormônio importado.

2. MATERIAIS

2.1. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

- Agitador magnético, modelo 257, marca Fanem, São paulo.
- Agitador mecânico do tipo "vortex", modelo AT 56, marca Phoenix, São Paulo.
- Balança analítica com precisão de 0,01 mg, modelo H20T, marca Mettler, Zurique, Suíça.
- Balança semi-analítica com precisão de 0,1 g, modelo P1000N, marca Mettler, Zurique, Suíça.
- Balões volumétricos de vários volumes, marca Pyrex, São Paulo.
- Béqueres de vários valumes, marca Pyrex, São Paulo.
- Bomba peristáltica, modelo 4912A, marca LKB, Estocolmo, Suécia.
- Bomba de vácuo, modelo XX-6000000, marca Millipore, Redford, E.U.A..
- Centrífuga refrigerada automática, modelo Super Speed RC-2B, marca Sorvall, Connecticut, E.U.A..
- Centrífuga refrigerada automática, modelo PR-2, marca International Equipment Company, Boston, E.U.A..
- Coletor de frações automático, modelo Ultrorac 7000, marca LKB, Estocolmo, Suécia.
- Colunas cromatográficas de vidro de vários tamanhos, marca Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suécia e construídas nas oficinas do IPEN-CNEN/SP, São Paulo.
- Contador gama, tipo poço com detector de NaI(Tl), modelo

- 4000, marca Beckman, Fullerton, E.U.A..
- Contador gama, tipo poço com detector de NaI(Tl), modelo 1185, marca Nuclear Chicago, Illinois, E.U.A..
 - Cuba eletroforética de acrílico, marca Técnica Permatron, São Paulo.
 - Densitômetro, modelo Scan 400, marca Joyce LoebI, Londres, Inglaterra.
 - Espectrofotômetro, modelo PQM II, marca Carl Zeiss, Oberkochen, República Federal da Alemanha.
 - Fonte de alta tensão, marca Técnica Permatron, São Paulo.
 - Frasco de ultrafiltração, modelo 202, marca Amicon, Massachusetts, E.U.A..
 - Freezer a baixa temperatura (ate -40°C), marca Metalfrio, São Paulo.
 - Homogeneizador, modelo 60K, marca Virtis, Nova York, E.U.A.
 - Impressora, modelo Emilia PC, marca Elebra, São Paulo.
 - Impressora, modelo TY33, marca Teletype, Illinois, E.U.A..
 - Impressora, modelo 80 F/T, marca Grafix, São Paulo, .
 - Lâmpada fluorescente de 15W, marca Philips, São Paulo.
 - Liofilizador, modelo ML-LIO-3, marca Metallux, São Paulo.
 - Membrana de ultrafiltração, DIAFLO PM 10, marca Amicon, Massachusetts, E.U.A..
 - Microcomputador, modelo I-7000PCxtII, marca Itautec, São Paulo..
 - Micropipetas de vários volumes, marca Clay Adams, New Jersey, E.U.A..
 - Peagômetro, modelo B371, marca Micronal, São Paulo.
 - Pipetas automáticas de diversos volumes, marca Oxford,

Foster City, E.U.A..

- Pipetas automáticas reguláveis de vários volumes, marca Eppendorf, Hamburgo, República Federal da Alemanha.
- Pipetas sorológicas e volumétricas de vários volumes, marca Pyrex, São Paulo.
- Provetas de vários volumes, marca Pyrex, São Paulo.
- Refrigerador, marca Frigidare, São Paulo, .
- Registrador, modelo 28000, marca Bryans, Londres, Inglaterra.
- Repipetador automático, marca Eppendorf, Hamburgo, República Federal da Alemanha.
- Seringa de 5 ul, marca Hamilton, Reno, E.U.A..
- Segmentador de gel ("gel-slicer"), modelo 190, marca Bio Rad, California, E.U.A..
- Suportes para tubos de ensaio, construídos nas oficinas do IPEN-CNEN/SP, São Paulo.
- Tubos cilíndricos de vidro, 4 x 110 mm, para moldagem do gel de poliacrilamida, construídos nas oficinas do IPEN-CNEN/SP, São Paulo.
- Tubos de ensaio de polipropileno, 12 x 75 mm, marca Emtel, São Paulo.
- Tubos de ensaio de vidro, 10 x 75 mm, marca Vidrolabor, São Paulo.

2.2. REAGENTES BIOLÓGICOS:

- Albumina bovina (AB) fração V em pó (n° A-8022), Sigma Chemical Company, St. Louis, E.U.A..
- Albumina bovina fração V Ria Grade em pó (n° A-7888), Sigma Chemical Company, St. Louis, E.U.A..
- Anticorpo anti-hTSH: NIDDKD-anti-hTSH-3 (AFP-C611818), produzido em coelhos e obtido por doação do National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDKD), E.U.A..
- hTSH empregado para radioiodação: NIDDKD-hTSH-16 (AFP 8770-B), obtido por doação do NIDDKD, E.U.A..
- hTSH utilizado como padrão: MRC Research Standard A (63/14), obtido por doação do Medical Research Council (MRC), Inglaterra.
- hTSH utilizado como amostra controle: NIDDKD-hTSH-RP-1 (LER 1952) obtido por doação do NIDDKD, E.U.A..
- Segundo anticorpo produzido em cabras anti-gama globulina de coelho, Radioassay System Laboratories, Inc. (Lote # : 2R2MBC), California, E.U.A.
- Soro de coelho normal (SCN).
- Soro humano normal (SHN), proveniente do Banco de Sangue do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

2.9. PRODUTOS QUÍMICOS

- Ácido clorídrico concentrado, P.A. Merck, São Paulo.
- Ácido 5,5-dietilbarbitúrico, P.A. Merck, São Paulo.
- Ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), P.A. Carlo Erba, São Paulo.
- Acrilamida 97%, Bio Rad, California, E.U.A.
- Azida sódica, Merck, São Paulo.
- Azul de bromofenol, Merck, São Paulo.
- Azul dextran 2000, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia.
- Bacitracina, Inlab, São Paulo.
- Benzoato de p-hidroximercúrio, Sigma Chemical Company, St. Louis, E.U.A..
- Bicarbonato de sódio, P.A. Carlo Erba, São Paulo.
- Cloramina T, P.A. Merck, São Paulo.
- 5,5-dietilbarbiturato de sódio, P.A. Merck, São Paulo.
- Fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), Sigma Chemical Company, St. Louis, E.U.A..
- Fosfato de potássio monobásico e bibásico, P.A. Merck, São Paulo.
- Fosfato de sódio monobásico e bibásico, Merck, São Paulo.
- Glicina, P.A. Merck, São Paulo.
- Hidroxilapatita esferoidal, BDH Chemicals, Dorset, Inglaterra.
- Hidróxido de sódio, P.A. Carlo Erba, São Paulo.
- Iodeto de potássio, P.A. Merck, São Paulo.
- Manitol, Farmácia do HCFMUSP.
- Metabissulfito de sódio, P.A. Merck, São Paulo.

- NaI251 em hidróxido de sódio 0,1 N, New England Nuclear, Boston, E.U.A..
- N-etilmaleimida, Fluka, São Paulo.
- N,N'-metileno-bis-acrilamida (Bis-acrilamida), P.A. Bio Rad, California, E.U.A..
- N,N,N',N'-tetrametilenodiamina (TEMED), P.A. Bio Rad, California, E.U.A..
- Polietileno glicol (PEG) 6000, Atlas, São Paulo.
- Reativo de Folin-Ciocalteu 1,75 N, Queel, São Paulo.
- Riboflavina, Roche, São Paulo.
- Sacarose em cristais, P.A. Merck, São Paulo.
- Sephadex G-100, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suécia.
- SP-Sephadex C-50, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suécia.
- Sulfato de amônio, P.A. Reagen, São Paulo.
- Sulfato de cobre pentahidratado, P.A. Reagen, São Paulo.
- Tartarato de sódio, Hoechst, São Paulo.
- Tiomersal, Queel, São Paulo.
- Trasylol (10.000 KUI/ml), Bayer, São Paulo.
- Tris-hidroximetil-aminometano (TRIS) P.A. Merck, São Paulo.

2.4. SOLUÇÕES:**2.4.1. SOLUÇÕES EMPREGADAS NA RADIOIODAÇÃO DO
hTSH:**

- Fosfo-salina (tampão fosfato de sódio 0,01 M , 7,6, NaCl 0,15 M e tiomersal 0,01%):

Fosfato de sódio monobásico hidratado.....	0,18	g
Fosfato de sódio bibásico bihidratado.....	1,55	g
Cloreto de sódio.....	8,50	g
Tiomersal.....	0,10	g
Água destilada q.s.p.....	1,00	l

- Tampão fosfato de sódio 0,5 M , pH 7,4:

Fosfato de sódio monobásico monohidratado.....	12,97	g
Fosfato de sódio bibásico dodecahidratado.....	145,07	g
Água destilada q.s.p.....	1,00	l

- Tampão fosfato de sódio 0,05 M , pH 7,4:

Preparado a partir do tampão fosfato de sódio 0,5 M, pH 7,4, diluído 10 vezes em água destilada.

**2.4.2. SOLUÇÃO EMPREGADA NA PURIFICAÇÃO DO
HTSH RADIOIODADO**

(cromatografia em Sephadex G-100):

- Tampão fosfato de sódio 0,05 M , pH 7,4 (conforme preparado para radioiodação), contendo 0,1% de AB e 0,02% de azida sódica:

AB.....	1,00	g
Azida sódica.....	0,20	g
Tampão fosfato de sódio 0,05 M , pH 7,4 q.s.p....	1,00	l

**2.4.3. SOLUÇÕES EMPREGADAS NA ELETROFORESE
EM GEL DE POLIACRILAMIDA:**

- Ácido clorídrico 1 N: 9 ml do concentrado para 100 ml de água destilada.

- Solução A, pH 8,9:

TRIS.....	36,60	g
TEMED.....	0,23	ml
Ácido clorídrico 1 N.....	48,00	ml
Água destilada q.s.p.....	100,00	ml

- Solução C:

Acrilamida.....	28,00	g
Bis-acrilamida.....	0,74	g
Água destilada q.s.p.....	100,00	ml

- Solução E:

Riboflavina.....	4,00	g
Água destilada q.s.p.....	100,00	ml

- Solução F:

Sacarose.....20,00 g
Água destilada q.s.p.....100,00 ml

- Solução para polimerização (poliacrilamida a 7%):

Solução A.....1,00 ml
Solução C.....2,00 ml
Solução E.....1,00 ml
Água destilada.....4,00 ml

- Tampão TRIS-glicina 0,4 M , pH 8,3:

TRIS.....6,00 g
Glicina.....28,80 g
Água destilada q.s.p.....100,00 ml

Diluído 10 vezes em água destilada imediatamente antes do uso.

- Solução de azul de bromofenol: 0,1 mg em 100 ml de água destilada.

2.4.4. SOLUÇÕES EMPREGADAS NO RIE DE HTSH:

- Fosfo-salina conforme preparada para radioiodação.
Açicionado 0,1% de AB Ria Grade à solução imediatamente antes do uso.

- Solução de EDTA 0,1 M: 18,61 g em 500 ml de fosfo-salina.

- Fosfo-salina-EDTA:

EDTA 0,1 M.....10,00 ml

Fosfo-salina q.s.p.....100,00 ml

Adicionado 1% de SCN à solução imediatamente antes do uso.

2.4.5. SOLUÇÕES EMPREGADAS NA SEPARAÇÃO DO
RIE DE HTSH:

- Solução de NaCl 0,4 M: 11,69 g em 500 ml de água destilada.

- Tampão veronal 0,025 M , pH 8,6:

Ácido 5,5-dietilbarbitúrico.....1,18 g

5,5-dietilbarbiturato de sódio.....19,30 g

Água destilada q.s.p.....1,00 l

Diluído 4 vezes em água destilada imediatamente antes do uso.

- Solução de polietilino glicol (PEG) 6000 a 25% : 25 g em 100 ml dos respectivos tampões (veronal, fosfato ou fosfo-salina).

**2.4.6. SOLUÇÕES EMPREGADAS NA DETERMINAÇÃO
PROTÉICA PELO MÉTODO DE LOWRY:**

- Solução A:

Carbonato de sódio.....2,00 g
Hidróxido de sódio.....4,00 g
Água destilada q.s.p.....100,00 ml

- Solução B:

Sulfato de cobre pentahidratado.....1,00 g
Água destilada q.s.p.....100,00 ml

- Solução C:

Tartarato de sódio.....2,00 g
Água destilada q.s.p.....100,00 ml

- Solução reagente:

Solução A.....100,00 ml

Solução B.....1,00 ml

Solução C.....1,00 ml

Preparada imediatamente antes do uso.

- Reativo de Folin í N: 10 ml para 17,5 ml de água destilada. Diluído imediatamente antes do uso.

2.4.7. SOLUÇÕES EMPREGADAS NA EXTRAÇÃO DO

hTSH:

- Tampão fosfato de sódio 0,02 M , pH 7,4:

Fosfato de sódio monobásico hidratado.....0,52 g

Fosfato de sódio bibásico dodecahidratado.....5,80 g

Água destilada q.s.p.....1,00 l

- Tampão fosfato de sódio 0,03 M , pH 6,2:

Fosfato de sódio monobásico hidratado.....3,37 g

Fosfato de sodio bibásico dodecahidratado.....2,00 g

Água destilada q.s.p.....1,00 l

- Solução I:

Azida sódica.....0,20 g

EDTA.....1,86 g

Trasytol.....5,00 ml

Tampão fosfato de sódio 0,03 M, pH 6,2 q.s.p....1,00 l

- Solução II:

N-etilmaleimida.....	0,25	g
Benzoato de p-hidroximercúrio.....	0,72	g
Bacitracina.....	0,10	g
Tampão fosfato de sódio 0,03 M, pH 6,2 q.s.p....	10,00	ml

- Solução III:

PMSF.....	0,35	g
Etanol q.s.p.....	10,00	ml

- Tampão de extração:

Solução I.....	250,00	ml
Solução II.....	1,00	ml
Solução III.....	1,00	ml

- Solução IV:

EDTA.....	1,86	g
Azida sódica.....	0,20	g
Trasyol.....	5,00	ml
Água destilada q.s.p.....	1,00	l

- Solução de hidróxido de sódio 1 N: 4 g em 100 ml de água destilada.

- Solução de hidróxido de sódio 0,1 N: Preparada a partir da solução hidróxido de sódio 1 N, diluída 10 vezes em água destilada.

- Solução saturada de sulfato de amônio: 531 g em 1 litro de água destilada.

**2.4.8. SOLUÇÕES EMPREGADAS NA PURIFICAÇÃO DO
EXTRATO HIPOFISÁRIO:**

CROMATOGRAFIA EM SEPHADEX G-100:

- Fosfo-salina (tampão fosfato de potássio 0,1 M , pH 7,0,
NaCl 0,3 M):

Fosfato de potássio monobásico.....	5,31 g
Fosfato de potássio bibásico.....	10,62 g
Cloreto de sódio.....	17,55 g
Água destilada q.s.p.....	1,00 l

CROMATOGRAFIA EM HIDROXILAPATITA:

- Solução A:

Fosfato de potássio monobásico 0,5 M: 68,04 g em 1 litro
de água destilada.

- Solução B:

Fosfato de potássio bibásico 0,5 M: 87,09 g em 1 litro de
água destilada.

- Tampão fosfato de potássio 0,03 M , pH 7,0:

Solução A.....	23,10 ml
Solução B.....	36,90 ml
Água destilada q.s.p.....	1,00 l

- Tampão fosfato de potássio 0,05 M , pH 7,0:

Solução A.....	19,25 ml
Solução B.....	30,75 ml
Água destilada q.s.p.....	500,00 ml

- Tampão fosfato de potássio 0,2 M , pH 7,0:
 - Solução A.....78,00 ml
 - Solução B.....122,00 ml
 - Água destilada q.s.p.....500,00 ml

- Tampão fosfato de potássio 0,5 M , pH 7,0:
 - Solução A.....195,00 ml
 - Solução B.....305,00 ml
 - Água destilada q.s.p.....500,00 ml

CROMATOGRAFIA EM SP-SEPHADEX C-50:

- Tampão fosfato de potássio 0,005 M , pH 7,0:
 - Preparado a partir do tampão fosfato de potássio 0,5 M, pH 7,0, descrito na cromatografia em hidroxilapatita, diluído 100 vezes.

- Tampão fosfato de potássio 0,02 M , pH 7,0:
 - Preparado a partir do tampão fosfato de potássio 0,2 M, pH 7,0, descrito na cromatografia em hidroxilapatita, diluído 10 vezes.

- Tampão fosfato de potássio 0,06 M , pH 7,0:
 - Solução A (cromatografia hidroxilapatita).46,20 ml
 - Solução B (cromatografia hidroxilapatita).73,80 ml
 - Água destilada q.s.p.....1,00 l

- Tampão fosfato de potássio 0,5 M, pH 7,0: Conforme descrito na cromatografia em hidroxilapatita.

**2.4.9. SOLUÇÕES EMPREGADAS NO ACONDICIONAMENTO
DO HTSH PURIFICADO PARA LIOFILIZAÇÃO**

- Tampão glicina 0,5 M - fosfato 0,005 M , pH 7,2:

Glicina.....37,56 g

Fosfato de sódio bibásico dodecahidratado..1,80 g

Água destilada q.s.p.....1,00 l

- Tampão bicarbonato de sódio 0,005 M , pH 7,0:

Bicarbonato de sódio.....0,42 g

Água destilada q.s.p.....1,00 l

- Tampão fosfato de potássio 0,06 M , pH 7,0: Conforme
descrito na cromatografia em SP-Sephadex C50.

3. MÉTODOS

3.1. RADIOIMUNOENSAIO DO hTSH

O RIE foi padronizado segundo o método comunicado por Borghi e Bartolini (9), empregando os reagentes biológicos fornecidos pelo NIDDKD e MRC especificados no item 2.2..

3.1.1. PREPARO DO TRAÇADOR

O traçador foi preparado a partir do hTSH-16 altamente purificado, fornecido pelo NIDDKD, na forma liofilizada para ser utilizado exclusivamente com esta finalidade, que apresentava potência radioimunológica de 6,6 UI/mg com relação ao padrão internacional estabelecido pela Organização Mundial da Saúde em 1969 (WHO hTSH INT. STD. 68/38). As contaminações, determinadas pelo RIE, foram 29 UI/mg para o FSH e 500 UI/mg para o LH (45).

3.1.1.1. ANÁLISE DO hTSH "FRIO"

O hTSH-16 foi analisado pela EGPA para confirmar sua integridade após seu transporte aéreo dos E.U.A. para o Brasil e eventual permanência na alfândega a temperatura ambiente. Amostras de cerca de 30 a 50 ug do hormônio proveniente de cada um dos embarques eram analisadas após seu recebimento e dissolução em fosfo-salina, desenvolvendo-se a EGPA de acordo com o método de Davis (26).

Para tanto, utilizaram-se tubos cilíndricos de vidro de 4 mm de diâmetro interno por 110 mm de comprimento, vedando-se uma das extremidades com membrana adesiva do tipo "Parafilm". Os tubos foram dispostos em estante apropriada, de forma a serem

mantidos na posição vertical.

A solução para polimerização (poliacrilamida a 7 %), preparada conforme descrito no item 2.4.3., foi transferida com pipeta Pasteur para os tubos até uma altura uniforme de 9 cm. Para evitar formação de menisco na extremidade superior dos géis, adicionaram-se sobre a solução cerca de 100 ul de água destilada; de forma a assegurar obtenção de bandas perfeitamente horizontais na separação eletroforética.

A seguir os tubos foram expostos a cerca de 7 cm de uma lâmpada fluorescente de 15 watts durante 45 minutos a 4°C, para permitir a polimerização do gel. Finda sua polimerização, a água destilada foi retirada com a ajuda de papel absorvente e as amostras foram aplicadas por meio de pipetas automáticas. O volume final das amostras foi sempre igualado até um volume máximo de 200 ul, sendo completado quando necessário com tampão fosfato de sódio 0,05 M pH 7,4.

Adicionaram-se cerca de 30 ul da solução F para aumentar a densidade das amostras e evitar sua mistura com o tampão de corrida antes do início da eletroforese. Acrescentaram-se também 10 ul da solução de azul de bromofenol para indicar o final da corrida (corante traçador - CT). As amostras resultantes foram então homogeneizadas por inversões repetidas do tubo cilíndrico de vidro, vedando a outra extremidade com "Parafilm".

Após retirada do "Parafilm" de ambas as extremidades, os tubos foram posicionados verticalmente na cuba eletroforética e completou-se o espaço acima das amostras de cada tubo com tampão TRIS-glicina. Este mesmo tampão foi empregado para a corrida eletroforética.

A corrida foi realizada com corrente anódica de 2 mA por gel a 4°C, sendo interrompida quando a banda do CT chegou até

cerca de 3 cm da extremidade inferior do gel.

Finda a eletroforese, os géis foram removidos dos tubos de vidro através de injeção de água contínua, empregando-se seringa plástica com agulha de aço inoxidável, de modo a desprender toda a superfície do gel do tubo.

Em seguida, os géis foram lidos diretamente no densitômetro com o feixe luz no intervalo de 220 a 310 nm, com a velocidade do registrador estabelecida em 1 mm/s e com 2,5 mV de amplificação, sendo o deslocamento do gel frente ao feixe de luz de 25 mm/minuto.

A partir do perfil eletroforético (absorvância x comprimento do gel) calculou-se o valor da migração relativa (R_m) do hTSH em relação a migração do CT.

3.1.1.2. TÉCNICA DE IODAÇÃO DO hTSH

O hormônio foi iodado pelo método de Hunter e Greenwood (47), modificado no que diz respeito a concentração dos reagentes, empregando-se ^{125}I na forma de iodeto de sódio, livre de carregador e de agentes redutores.

As radioiodações foram realizadas em capela e a temperatura ambiente, observando-se as devidas precauções na manipulação do material radioativo.

A um tubo de ensaio de vidro, com fundo cônico, que continha 40 μl de tampão fosfato de sódio 0,5 M, pH 7,4, adicionaram-se sucessivamente:

- a - hTSH: 10 μl da solução de concentração de 0,5 mg/ml
- b - 800 μCi^1 (29,6 MBq²) de ^{125}I , em volume variável de acordo com a atividade específica de cada partida

¹ μCi = microCurie = $3,7 \times 10^4$ desintegrações por segundo

²MBq = megaBequerel = 10^6 desintegrações por segundo.

- c - Cloramina T: 10 ul da solução de concentração de 5 mg/ml
- d - Metabissulfito de sódio: 20 ul da solução de concentração de 10 mg/ml
- e - Iodeto de sódio: 200 ul da solução de concentração de 1 mg/ml
- f - Azul dextran: 1 ml da solução de concentração de 2 mg/ml

O HTSH foi dissolvido em fosfo-salina, enquanto que os reagentes dos ítems c e d foram dissolvidos em tampão fosfato de sódio 0,05 M , pH 7,4 e aqueles dos últimos ítems foram dissolvidos nesse mesmo tampão, contendo 0,1 % de AB e 0,02 % de azida sódica.

Essas soluções foram adicionadas sob agitação moderada e contínua com o auxílio de um microíma e sobre agitador magnético. O tempo transcorrido entre a adição do agente oxidante (Cloramina T) e o agente redutor (metabissulfito de sódio) foi de 30 segundos.

Finda a reação, foram retiradas três alíquotas de 10 ul cada, a fim de se estimar a atividade total da marcação, procedendo-se a seguir a purificação do restante da mistura de reação.

Essas alíquotas foram diluídas 100 vezes no tampão de eluição da purificação. De cada uma delas foram retiradas em duplicata outras alíquotas de 10 ul que tiveram suas atividades determinadas, juntamente com as respectivas ponteiras.

O tubo da marcação e as ponteiras, usadas para retirada das alíquotas e para aplicação da amostra à coluna de purificação, também tiveram suas atividades determinadas a fim de se estimar a recuperação da purificação.

3.1.1.3. CÁLCULO DA ATIVIDADE TOTAL DA MARCAÇÃO

Essa atividade, expressa em cpm (contagens por minuto), foi calculada pela seguinte fórmula:

$$A = C \times 100 \times V_T/V_R + P \times 100$$

onde:

C = Contagem média das três alíquotas de 10 ul (diluídas 100 vezes), estimadas em duplicata.

V_T = Volume total da mistura de reação

V_R = Volume das alíquotas retiradas da mistura de reação (10 ul).

P = Somatória das contagens das ponteiras, utilizadas para retirada das alíquotas diluídas, que apresentaram um valor maior do que 10 % do valor de C.

3.1.1.4. PURIFICAÇÃO DO hTSH RADIOIODADO

(^{125}I -hTSH)

A purificação do ^{125}I -hTSH foi realizada por cromatografia de exclusão molecular em gel de Sephadex G-100 (86).

O gel previamente intumescido com água durante aproximadamente 6 horas a 90° C, foi lavado várias vezes com tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,4 e em seguida empacotado em coluna de vidro de dimensões de 45 cm de altura e 2 cm de diâmetro, mantida sob refrigeração a 4°C.

A coluna foi lavada com o mesmo tampão fosfato de sódio contendo 0,1 % de AB e 0,02 % de azida sódica (tampão de eluição), em quantidade correspondente a cerca de duas vezes o seu volume.

A mistura da reação foi aplicada à coluna, lavando-se duas vezes o tubo de marcação com o tampão de eluição (0,4 ml por vez).

Coletaram-se 120 frações de 2 ml cada, sob fluxo de 12 ml/h em sistema refrigerado a 4 °C, a fim de se prevenir a desnaturação da molécula protéica pela temperatura.

Retirou-se de cada fração uma alíquota de 10 ul. Essas alíquotas, colocadas individualmente em cones de papel alumínio, tiveram sua radioatividade determinada em contador gama (Nuclear Chicago), com eficiência determinada pela técnica descrita por Horrocks (44) de aproximadamente de 80%.

A partir das contagens obtidas traçou-se o cromatograma da purificação em escala linear, relacionando-se a radioatividade, expressa em cpm, com o nº da fração.

Procedeu-se, a seguir, a identificação dos picos revelados no cromatograma, excetuando-se aquele do ^{125}I livre, que por ter a menor massa é a última substância a ser eluída da coluna de purificação.

Esses picos tiveram os valores de seus coeficientes de distribuição (Kd) determinados através da fórmula seguinte (86):

$$K_d = \frac{V_r - V_o}{V_t - V_o}$$

onde:

V_r = Volume de retenção, correspondente ao volume de eluente que carrega as moléculas da substância examinada através da coluna,

V_o = Volume intersticial, medido pelo volume de eluição do azul dextran,

Vt = Volume total da fase móvel, medido pelo volume de eluição do ^{125}I .

As frações correspondentes ao pico do ^{125}I -hTSH foram confirmadas pelo resultado de sua incubação com excesso de antissoro (na diluição de 1:60.000), realizada na mesma solução fosfo-salina do RIE (descrita no item 2.4.4.), fornecendo o valor referente a ligação total.

Para tal finalidade foram incubados 0,1 ml de cada fração referente aos picos radioativos, contendo aproximadamente 90.000 cpm, com 0,8 ml do antissoro e 0,1 ml de fosfo-salina. Determinou-se também o valor da ligação inespecífica de cada fração, substituindo-se na incubação o volume do antissoro (0,8 ml) pelo mesmo volume de fosfo-salina. Este valor foi subtraído da ligação total correspondente, fornecendo aquele referente a ligação específica.

Após incubação de 24 horas a 4°C , o hTSH ligado ao anticorpo foi separado daquele livre por sua precipitação pelo PEG a 25%, conforme descrito adiante no item 3.1.2.3..

As frações que apresentaram os valores de ligação mais elevadas foram reunidas, separadas em alíquotadas de 0,5 e de 1,0 ml e estocadas a -20°C para serem empregadas como traçador no RIE.

Todos os traçadores foram diluídos 18 vezes em fosfo-salina imediatamente antes de seu emprego nos ensaios.

3.1.1.6. RENDIMENTO DA MARCAÇÃO

A partir da localização do pico correspondente ao ^{125}I -hTSH no perfil cromatográfico, calculou-se a porcentagem do

rendimento da marcação (R) pela fórmula seguinte:

$$\% R = \frac{H^*}{T} \times 100$$

onde:

H* = Somatória das contagens das frações correspondentes ao pico do ^{125}I -hTSH.

T = Somatória das contagens de todas as frações coletadas.

3.1.1.6. RECUPERAÇÃO DA PURIFICAÇÃO

A porcentagem dessa recuperação (RP) foi obtida pela fórmula seguinte:

$$\% RP = \frac{T'}{A'} \times 100$$

onde:

T' = Somatória das contagens de todas as frações coletadas multiplicadas pelos respectivos fatores de diluição, obtidos pela relação entre o volume total de cada fração (em torno de 2 ml) e o volume da alíquota estimada (0,01 ml).

A' = Atividade aplicada à coluna, expressa em cpm, calculada pela seguinte fórmula:

$$A' = A \times V_A / V_T - D$$

em que:

- A = Atividade total da marcação, conforme descrita anteriormente (item 3.1.1.3.).
- V_A = Volume da mistura de reação aplicado à coluna.
- V_T = Volume total da mistura de marcação.
- D = Somatória das contagens do tubo da marcação e das ponteiros, utilizadas para retirada das três alíquotas e para aplicação da amostra à coluna.

3.1.1.7. ATIVIDADE ESPECÍFICA DO TRACADOR

A atividade específica (AE) do ^{125}I -hTSH, expressa em uCi/ug, foi estimada a partir do rendimento da marcação (33), empregando a seguinte fórmula:

$$AE = \frac{A'' \times R}{M \times 100}$$

onde:

- R = Rendimento percentual da marcação.
- M = Massa do hormônio radioiodado (5 ug).
- A'' = Atividade do ^{125}I efetivamente utilizada, calculada a partir da atividade total da marcação (conforme descrita anteriormente no item 3.1.1.3.), expressa em cpm e transformada em uCi, considerando:
- A eficiência do contador gama, dada pela relação cpm/dpm (desintegração por minuto).
 - A equivalência entre 1 uCi (37 KBq) e 2.220.000 dpm.

3.1.1.8. ANÁLISE ELETROFORÉTICA DO TRAÇADOR

Alíquotas do hTSH obtido imediatamente após ter sido marcado e das frações correspondentes aos picos provenientes da purificação foram analisados pela EGPA. O procedimento empregado na eletroforese foi o mesmo que o utilizado para o hTSH não marcado, conforme descrito no item 3.1.1.1..

Finda a corrida eletroforética e após a remoção dos géis, eles foram cortados em segmentos de 3 mm com a ajuda do segmentador. Cada secção foi envolta em papel alumínio e colocada em tubo de contador para a determinação de sua radioatividade. Os perfis eletroforéticos foram traçados em escala linear, relacionando a radioatividade, expressa em cpm, com o número de cada segmento.

Estimaram-se as percentagens de rendimento e de pureza do traçador pela relação entre as contagens da área em que se localizou o pico do ^{125}I -hTSH íntegro e as contagens totais dos géis, referentes respectivamente ao hormônio marcado e purificado e aquele purificado.

Calculou-se o valor de R_m (migração eletroforética relativa) dos componentes de cada gel pela relação abaixo:

$$R_m = \frac{N_A}{N_{CT}}$$

onde:

N_A = nº do segmento referente ao pico da amostra.

N_{CT} = nº do segmento correspondente ao CT.

Os componentes do traçador foram identificados por sua

incubação com excesso de antissoro (na diluição de 1:60.000) conforme descrito anteriormente, empregando-se, porém, a mesma EGPA no lugar do PEG para a separação da fração ligada.

3.1.1.9. ESTABILIDADE DO TRACADOR

Com o ^{125}I -hTSH obtido em diferentes radioiodações, realizaram-se estudos da sua estabilidade em função do tempo de estocagem a -20°C .

Avaliou-se sua pureza pela EGPA aproximadamente após 1 mês de estocagem e sua adequação para ser empregado nos RIEs, tendo decorrido até aproximadamente dois meses após sua radioiodação. Analisaram-se para tanto parâmetros relativos ao ensaio, entre os quais cabe destacar as porcentagens de ligação (inespecífica e específica) e a sua sensibilidade, avaliada conforme especificado adiante no item 3.1.4.2.4..

3.1.2. DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS PARA O RADIOIMUNOENSAIO

3.1.2.1. PREPARO DA CURVA DOSE-RESPOSTA

A curva dose-resposta foi construída empregando-se o padrão Standard A. Este padrão foi estabelecido em 1966 no Medical Research Council e calibrado contra o TSH bovino por ensaio biológico, apresentando os seguintes contaminantes (4):

FSH < 0,9 UI/ampola = 27,3 UI/mg.

LH = 113,3 UI/ampola = 3433,3 UI/mg.

ACTH < 100 uU/ampola (não usado).

A uma ampola do padrão que continha 50 mUI de hTSH,

adicionou-se 1 ml de água destilada, obtendo-se assim uma concentração final de 50 mU/ml (solução mãe). Esta solução foi separada em alíquotas de 100 ul, mantidas a -20°C, a partir das quais foram preparadas as diferentes concentrações da curva dose-resposta do RIE, segundo o esquema de diluição a seguir:

4000,0 uU/ml (solução A) - 80 ul da solução mãe + 920 ul de fosfo-salina
 400,0 uU/ml (solução B) - 100 ul da solução A + 900 ul de fosfo-salina
 200,0 uU/ml (solução C) - 500 ul da solução B + 500 ul de fosfo-salina
 100,0 uU/ml (solução D) - 500 ul da solução C + 500 ul de fosfo-salina
 50,0 uU/ml (solução E) - 500 ul da solução D + 500 ul de fosfo-salina
 25,0 uU/ml (solução F) - 500 ul da solução E + 500 ul de fosfo-salina
 12,5 uU/ml (solução G) - 500 ul da solução F + 500 ul de fosfo-salina
 5,0 uU/ml (solução H) - 400 ul da solução G + 600 ul de fosfo-salina
 zero uU/ml (solução I) - 1000 ul de fosfo-salina

3.1.2.2. TÍTULO IDEAL DO ANTÍSSORO

O antissoro anti-hTSH-3 fornecido pelo NIDDKD apresentava as percentagens de reação cruzada especificadas abaixo, com os seguintes hormônios hipofisários (45):

hTSH	100,0000
h beta LPH.....	1,5935
hFSH.....	1,0271
hPRL.....	0,6337
hLH.....	0,5918
hGH.....	0,0332
Vasopressina.....	0,0039
hACTH.....	0,0021

Cada frasco recebido, contendo 1 ml de antissoro com título de 1:200 (diluído em fosfo-salina contendo 2% de SNC), era rediluído 10 vezes na mesma fosfo-salina (substituindo a AB pelo

SNC), separado em alíquotas de 500 μ l que foram mantidas a -20°C .

O título ideal de antissoros empregado nos RIEs foi aquele que permitiu uma ligação específica de 50 % do traçador na ausência de hTSH "frio" (8).

Este título foi determinado para cada traçador incubando-se durante 24 horas a 4°C , 0,1 ml de fosfo-salina, com 0,1 ml do ^{125}I -hTSH e 0,8 ml do antissoros nas diluições seguintes: 1:50.000, 1:500.000, 1:1.000.000, 1:2.000.000, 1:4.000.000 e 1:8.000.000, realizadas em fosfo-salina contendo 0,1 % de AB.

Foram também incubadas amostras que estimaram a ligação inespecífica, substituindo-se o volume do antissoros pelo mesmo volume de fosfo-salina.

Os ensaios foram realizados em uniplicata em tubos de vidro e separados em quadruplicata de 0,2 ml em tubos de polipropileno. Os traçadores livres foram separados daqueles ligados ao anticorpo seguindo-se o procedimento padronizado, descrito a frente no item 3.1.2.4., calculando-se a percentagem de ligação das amostras conforme especificado adiante no item 3.1.3..

A partir dos resultados obtidos, traçou-se a curva de título do antissoros em papel semi-log, relacionando-se os valores da percentagem de ligação com aqueles da diluição do antissoros. Determinou-se, através da leitura direta na curva a diluição do antissoros que forneceu 50 % de ligação com o traçador.

3.1.2.3. SISTEMA DE ENSAIO

A fim de se estabelecer as condições ótimas do RIE de hTSH, realizou-se uma análise comparativa entre dois sistemas de ensaio: em equilíbrio e em não-equilíbrio.

No sistema de ensaio em equilíbrio, incubou-se durante

24 horas uma mistura de reação contendo 0,1 ml do traçador, 0,8 ml de antissoro na diluição estabelecida e 0,1 ml de hTSH padrão nas concentrações de zero a 400 uU/ml, preparado conforme descrito anteriormente (item 3.1.2.1).

Naquele sistema em não-equilíbrio, realizou-se uma pré-incubação do hTSH padrão com o antissoro durante 24 horas, seguida da adição do traçador e de incubação por mais 24 horas.

Como sempre, foram incubadas amostras referentes a ligação inespecífica, nos quais os 0,8 ml de antissoro e os 0,1 ml de hTSH padrão foram substituídos por 0,9 ml de fosfo-salina. Em ambos os sistemas, os ensaios foram realizados a 4° C, em duplicata em tubos de vidro e separados em quadruplicatas de 0,2 ml, em tubos de polipropileno.

Após a determinação da atividade presente nos tubos de separação em contador gama, adicionaram-se 30 ul de SHN e 0,5 ml de solução de PEG a 25 % preparada em tampão veronal. As amostras foram então homogeneizadas por meio de agitação em vortex e centrifugadas a 4° C durante 30 minutos a 1.200 FCR (força centrífuga relativa). Os sobrenadantes foram aspirados, sendo determinada a atividade dos precipitados.

Os cálculos foram efetuados conforme descrito adiante no item 3.1.3.. A partir dos resultados obtidos, foram traçadas as curvas dose-resposta respectivas e comparados os parâmetros relativos a sensibilidade desses ensaios.

3.1.2.4. TÉCNICA DE SEPARAÇÃO

Com o intuito de se padronizar as condições ótimas de separação pelo PEG, foram realizadas investigações sobre

a concentração de PEG ideal e o efeito da lavagem do precipitado.

Nessas investigações, as misturas de reação foram sempre incubadas em tubos de vidro, durante 24 horas a 4°C e separadas em replicatas de 0,2 ml em tubos de polipropileno. Essas amostras tiveram sempre sua atividade determinada em contador gama antes de serem precipitadas pelo PEG.

Em todos os estudos, a solução de PEG foi adicionada juntamente com 30 µl de SHN e homogeneizada por meio de agitação em vortex. As centrifugações foram sempre realizadas a 4°C, aspirando-se os sobrenadantes com o auxílio de bomba de vácuo e determinando-se, a seguir, as atividades dos precipitados.

3.1.2.4.1. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO IDEAL DE PEG.

A fim de se estabelecer qual a concentração de PEG que causava a melhor separação entre o hTSH ligado ao anticorpo e aquele livre, analisou-se o emprego do PEG dissolvido em tampão veronal, em concentrações variando de 5 a 50 % com intervalos de 5 %.

Nesse exame, foram estimadas as ligações específicas do traçador com o antissoro na diluição estabelecida para o ensaio, com o antissoro em excesso e também a ligação inespecífica (NSB). As ligações foram verificadas incubando-se 1 ml do traçador com 1 ml de fosfo-salina e 8 ml do antissoro nas diluições de 1:800.000 (ensaio), de 1:60.000 (excesso) e com 8 ml de fosfo-salina (NSB). Após a incubação, todas as amostras foram separadas em replicatas e tiveram sua radioatividade medida.

Cada grupo de amostra, referentes a essas ligações foi dividido em triplicatas, que foram separadas com 0,5 ml da solução de PEG nas diferentes concentrações e centrifugadas durante 20 minutos a 1.600 FCR.

Os cálculos foram realizados conforme descrito no item 3.1.3., obtendo-se o valor da percentagem de ligação em relação a contagem total (B/T). A partir dos dados obtidos, foram traçadas as respectivas curvas, relacionando as percentagens de cada ligação com as respectivas concentrações de PEG.

3.1.2.4.2. EFEITO DA LAVAGEM DA FRAÇÃO PRECIPITADA PELO PEG

Objetivando minimizar o valor da ligação inespecífica do ensaio, avaliou-se o efeito da lavagem da fração precipitada pelo PEG com 0,3 ml da solução de NaCl 0,4 M, seguida de igual reprecipitação.

Nesse estudo realizou-se um ensaio incubando-se em quadruplicatas as amostras referentes a ligação inespecífica, a curva dose-resposta e aquelas controle. Os resultados foram calculados antes e após o ensaio ter sido submetido ao processo de lavagem e reprecipitação, conforme especificado no item 4.1.5., sendo também comparados os parâmetros relativos a sua sensibilidade.

3.1.3. CÁLCULO DOS RESULTADOS

Os resultados do RIE foram estimados a partir dos dados

obtidos na determinação da atividade das amostras presentes nos tubos de polipropileno, antes (contagens totais) e após a precipitação das frações ligadas ao anticorpo.

Determinou-se, portanto, a percentagem de ligação do traçador ao seu anticorpo específico para cada replicata das diferentes amostras, com referência a sua contagem total (B/T), segundo a relação abaixo:

$$\% \text{ de ligação} = \frac{\text{cpm após a precipitação}}{\text{cpm antes da precipitação}} \times 100$$

Foram calculados a média e o desvio padrão (DP) dos valores das ligações de cada amostra, aceitando-se valores de replicatas compreendidos entre dois DP. Esses valores foram corrigidos pela subtração daqueles referentes a ligação inespecífica.

A curva dose-resposta foi traçada em papel semi-log, relacionando os valores das ligações das diversas concentrações do hTSH padrão com aquela da dose zero (% B/Bo). A concentração de hTSH presente nas amostras controle e desconhecidas foi determinada pela leitura direta nesta curva, por interpolação de seus valores percentuais de B/Bo.

3.1.4. CONTROLE DA QUALIDADE DO RIE

3.1.4.1. PREPARO DAS AMOSTRAS CONTROLE

Foram preparadas amostras de controle de qualidade do RIE de hTSH, cujos teores hormonais eram habitualmente estimados

quando da realização dos diferentes ensaios.

Essas amostras foram obtidas a partir do padrão RP-1 fornecido pelo NIDDKD, que apresentava a potência radioimunológica de 1,5 UI/mg, com relação ao padrão internacional estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (WHO hTSH INT.STD.68/38) (45), que por sua vez deveria apresentar uma equivalência de unidades com o Standard A (15).

A um frasco do padrão que continha 200 ug de hTSH liofilizado, adicionaram-se 0,2 ml de água destilada, obtendo-se assim uma solução estoque de concentração de 1000 ug/ml, correspondentes a 1,5 U/ml.

As amostras controle foram preparadas diluindo-se frações dessa solução em fosfo-salina com 0,1 % de AB, até obter concentrações de hTSH que apresentavam nos ensaios, aproximadamente 80, 60 e 20% da ligação máxima do traçador ao antissoro, já descontada a ligação inespecífica. Essas amostras, contendo respectivamente teores de hTSH baixo, médio e elevado, foram divididas em alíquotas de 0,3 ml, liofilizadas e armazenadas a -20°C .

3.1.4.2. AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS OPERACIONAIS

As características operacionais do RIE de hTSH foram avaliadas através da análise dos seguintes parâmetros: especificidade, exatidão, precisão e sensibilidade.

3.1.4.2.1. ESPECIFICIDADE

Para verificar a identidade entre o hormônio presente

nos extratos hipofisários e o hormônio padrão, empregou-se uma amostra com teor de hTSH elevado, provenientes de uma das etapas iniciais de purificação do extrato hipofisário no IPEN (segunda cromatografia em gel de Sephadex G-100, citada adiante no item 3.2.4.). Esta amostra, diluída inicialmente 5.000 vezes no tampão empregado na purificação do extrato, foi submetida ao RIE nas diluições realizadas de acordo com o descrito adiante na Tabela 1.

Tabela 1 . Preparo das diluições referentes a avaliação da especificidade da técnica.

VOLUME DA AMOSTRA (ul)	VOLUME DO TAMPÃO (ul)	DILUIÇÃO
900	100	1:5555
800	200	1:6250
700	300	1:7140
600	400	1:8333
500	500	1:10000
300	700	1:16666
200	800	1:25000

Essas diluições foram efetuadas com o mesmo tampão da purificação do extrato, sendo ensaiadas para cada diluição dez replicatas.

Foram calculadas a média e o desvio padrão dos 10 resultados obtidos para cada diluição, bem como as concentrações obtidas a partir do produto de cada média pelo fator de diluição correspondente.

Calculou-se também a correlação linear entre os volumes da amostra e as concentrações médias obtidas e examinou-se a significância do coeficiente de correlação determinado.

3.1.4.2.2. EXATIDÃO

A exatidão do RIE foi avaliada pela recuperação do hTSH padrão Standard A adicionado em quantidades crescentes de 5,0 a 200,0 uU/ml (item 3.1.2.1.), a uma amostra de hTSH purificado no IPEN com concentração previamente determinada (17,33 uU/ml). A estimativa da concentração de hTSH nessas amostras foi realizada em decuplicata.

A recuperação das diferentes amostras foi estimada pela diferença entre o valor médio determinado a partir da curva dose-resposta e o valor teórico (obtido pela soma da concentração do hTSH presente no extrato e do hTSH padrão adicionado). Calcularam-se também a recuperação percentual média e o desvio padrão para cada amostra. Determinou-se o coeficiente de correlação entre os valores teóricos e os obtidos e examinou-se sua significância.

3.1.4.2.3. PRECISÃO

Este parâmetro foi estimado pela reprodutibilidade intra e inter-ensaio do método, empregando-se as amostras controle.

A reprodutibilidade intra-ensaio foi avaliada pela estimativa num mesmo ensaio de um número elevado de replicatas (n=25) das três amostras controle, com teores de hTSH baixo, médio e elevado. Calcularam-se a concentração média e o desvio padrão para cada amostra, bem como seus respectivos coeficientes

de variação.

A reprodutibilidade inter-ensaio foi avaliada pela estimativa das amostras controle semelhantes àquelas empregadas no estudo da reprodutibilidade intra-ensaio. Essas amostras foram dosadas em duplicata em 12 ensaios diferentes, realizados com quatro traçadores distintos. O valor médio para cada amostra foi calculado, bem como seu desvio padrão, permitindo a determinação dos coeficientes de variação.

3.1.4.2.4. SENSIBILIDADE

A sensibilidade dos ensaios foi avaliada pela estimativa da dose efetiva para 50 % da ligação máxima (ED_{50}), que refletiu a inclinação da curva padrão e da dose mínima detectável (DMD), que correspondeu a uma queda de 10 % da ligação máxima ($B/B_0 = 90 \%$), dividida por cinco (2).

3.2. OBTENÇÃO DO hTSH

3.2.1. MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO PROTÊICA.

3.2.1.1. MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO

Este método indireto de dosagem protéica foi empregado para monitorar as frações eluídas das colunas cromatográficas durante as diferentes etapas de purificação do extrato hipofisário.

O teor protéico de cada fração coletada foi determinado por leitura espectrofotométrica no feixe de luz de 280 nm, empregando-se as cubetas de 1 cm de caminho óptico. Assumiu-se o valor de absorvância igual a 1.0, correspondente a uma solução com concentração protéica de 1 mg/ml (84).

3.2.1.2. MÉTODO DE LOWRY

Uma medida mais precisa do teor protéico das frações reunidas nas diversas etapas de purificação foi realizada pelo método de Lowry e cols. (61), empregando-se como referência uma curva padrão de AB Ria Grade. Foram preparados os seguintes pontos da curva padrão, diluídos em 300 μ l de água destilada cada: 5, 10, 20, 30, 40 e 50 μ g. Tanto os padrões quanto as amostras foram processadas em triplicata no ensaio.

Calculou-se a regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, considerando como variável independente (x) as concentrações do padrão e como variável dependente (y) as respectivas leituras espectrofotométricas.

A diluição das amostras desconhecidas foi indicada

pela experiência adquirida após alguns ensaios e com base no conhecimento da quantidade de proteína aplicada à coluna de purificação. Toda solução cuja concentração protéica não se enquadrasse na zona de linearidade da reta padrão, era refeita, utilizando-se uma diluição mais conveniente.

Os valores obtidos nas leituras espectrofotométricas das amostras desconhecidas foram aplicadas à equação da reta padrão para a obtenção do resultado em ug de proteína / 0,3 ml. Com o valor médio das triplicatas e através da seguinte fórmula obteve-se o valor exato da massa protéica presente na amostra:

$$M = A / 0,3 \times F \times V$$

em que:

A = concentrações das amostras em ug / 0,3 ml

F = fator de diluição da amostra empregada no ensaio

V = volume total da amostra

3.2.2. MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DO hTSH

O hTSH presente nas amostras dos extratos hipofisários decorrentes do processo de purificação foi estimado pela técnica de RIE padronizada, seguindo-se a sequência operacional indicada adiante no item 4.1.5..

Como a quantidade de hTSH nesses extratos é muito elevada em comparação com aquela do hormônio circulante, as amostras foram diluídas em fosfo-salina (contendo AB 0,1 %), de forma a serem lidas na região de confiança da curva dose-resposta do RIE.

3.2.3. PURIFICAÇÃO A PARTIR DE EXTRATO CRU

Devido a difícil obtenção de hipófises humanas, iniciou-se o estudo de purificação do hTSH a partir de um extrato cru, obtido durante o preparo do GH nos laboratórios do IPEN-CNEN/SP (SOMATORMON®).

Como se sabia que os hormônio glicoprotêicos eram eluídos no segundo pico obtido na cromatografia de exclusão molecular do extrato hipofisário (Figura 2), seis preparações desses extratos crus haviam sido armazenadas a -20°C durante o período compreendido entre 1981-2, na forma liofilizada, para estudos futuros de purificação.

Amostras de 200 mg de cada preparação foram dissolvidas em dois mililitros de água destilada e dialisadas contra tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,0, contendo NaCl 0,3 M. Depois de devidamente diluídas nesse mesmo tampão, foram determinadas suas concentrações protéica (pelo método espectrofotométrico) e tireotrófica, estimando-se a atividade específica de hTSH.

3.2.3.1. PURIFICAÇÃO PRELIMINAR

Empregou-se a técnica de purificação descrita por Roos e cols. (84), a qual também parte de produtos colaterais obtidos durante a extração do hGH. Entretanto, a resina Bio-gel P-150 utilizada por esses autores na primeira etapa de purificação do extrato foi substituída pelo Sephadex G-100, pois além de possuírem intervalos de fracionamento correspondentes, era o material disponível nos nossos laboratórios.

A partir de uma das preparações de extrato cru com

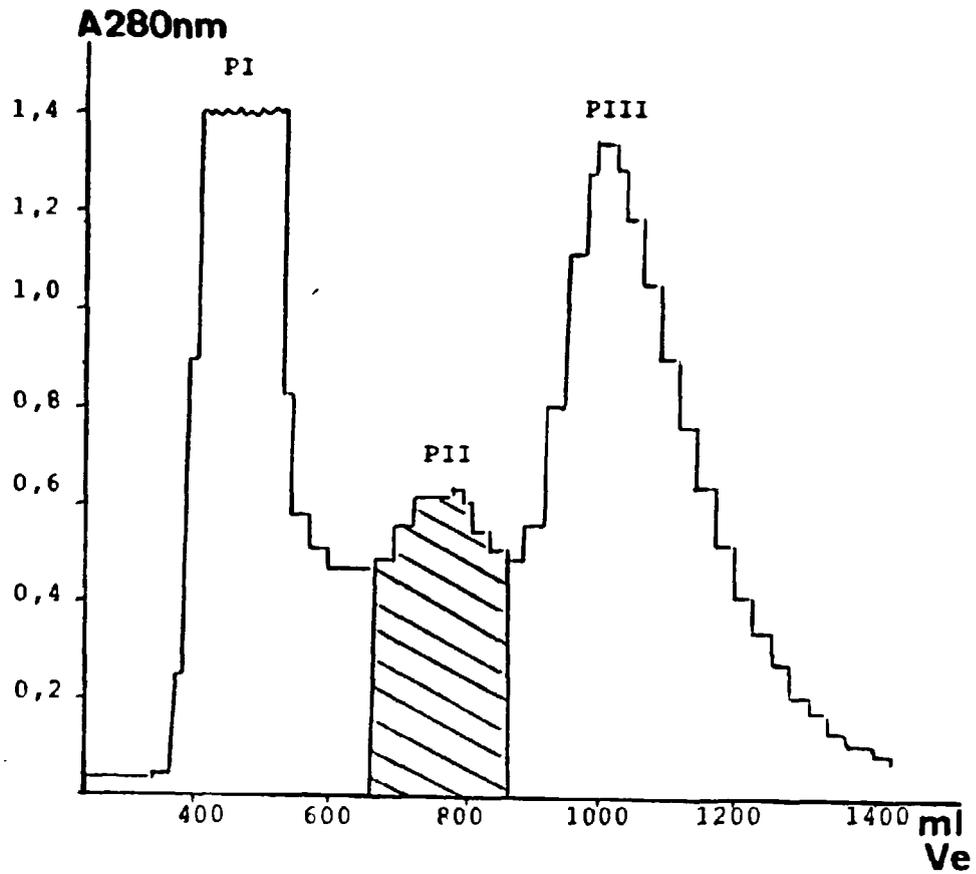


Figura 2. Representação gráfica da absorvância a 280 nm das frações eluídas pela cromatografia em gel de Sephadex G-100 durante a purificação do hGH (reproduzido com permissão de Marchione (63). A área hachurada refere-se às frações que foram reunidas, liofilizadas e estocadas a -20°C .

atividade de hTSH similar à descrita por Roos e cols. (84), realizou-se uma purificação preliminar a fim de se avaliar a viabilidade do emprego desses extratos antigos na obtenção do hTSH altamente purificado.

Todos os procedimentos foram realizados a 4°C e a atividade específica foi expressa em unidades de hTSH por miligrama de proteína.

Uma pequena amostra de 1,5 g da preparação C (Tabela 17) foi dissolvida em 6 ml de água e dialisada contra tampão fosfato de potássio 0,1 M , pH 7,0 , contendo NaCl 0,3 M. Após a diálise, a amostra foi submetida às seguintes cromatografias:

**CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR EM GEL
SEPHADEX G-100:**

O gel previamente intumescido com água durante aproximadamente 6 horas a 90°C, foi lavado várias vezes com tampão fosfato de potássio 0,1 M , pH 7,0, contendo NaCl 0,3 M e em seguida empacotado em coluna de vidro de dimensões de 45 cm de altura e 2,5 cm de diâmetro, mantido sob refrigeração a 4°C.

A coluna foi lavada com o mesmo tampão fosfato de potássio em quantidade correspondente a cerca de duas vezes o seu volume. Após a aplicação da amostra, a coluna foi eluída com o tampão mencionado acima, sob fluxo de 12 ml/h e coletaram-se frações de 2 ml cada.

A purificação foi acompanhada quantificando a concentração protéica pela leitura espectrofotométrica no feixe de luz de 280 nm, sendo o final da eluição determinado pela diminuição da absorvância até aproximadamente o mesmo valor do branco (tampão de eluição).

Finda a purificação, realizou-se a determinação do teor de hTSH por RIE a cada cinco frações. Obtidos os seus valores de atividade específica (UTSH/mg proteína), aquelas que apresentaram resultados mais elevados foram reunidas, concentradas por meio de membrana Diaflo PM 10 em sistema de ultrafiltração Amicon, dialisadas contra tampão fosfato de potássio 0,03 M , pH 7,0 e submetidas à purificação subsequente.

CROMATOGRAFIA DE ADSORÇÃO EM HIDROXILAPATITA:

A hidroxilapatita (fosfato de cálcio) foi preparada em nossos laboratórios segundo o método de Tiselius e cols. (96), apresentando capacidade de adsorver 16 mg de albumina bovina o grama seco e fluxo de 4 ml/cm²/h.

A resina previamente preparada foi suspensa em tampão fosfato de potássio 0,03 M , pH 7,0, em seguida deixou-se decantar por aproximadamente 10 minutos e as partículas mais finas foram então aspiradas. Esse procedimento foi repetido 5 vezes antecedendo o preenchimento de uma coluna de 3,7 cm de altura e 2,5 cm de diâmetro.

Depois de equilibrar a coluna pela eluição de cerca de 3 vezes o seu volume com o mesmo tampão fosfato de potássio, aplicou-se a amostra proveniente da purificação em cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-100 e prosseguiu-se a purificação sob fluxo constante de 8,8 ml/h, coletando-se frações de 2 ml cada.

Essa purificação foi eluída em gradiente não-linear com o tampão fosfato de potássio em concentrações crescentes (0,03 , 0,05 , 0,2 e 0,5 M) e a pH 7,0 constante. A troca de tampão foi efetuada quando a absorvância a 280 nm das frações se aproxima-

mou da leitura do branco.

Realizou-se a determinação do teor de hTSH por RIE a cada cinco frações coletadas e aquelas que apresentaram o valor de atividade específica de hTSH mais elevado foram reunidas, dialisadas contra o tampão fosfato de potássio 0,005 M , pH 7,0 para serem submetidas à etapa final de purificação.

CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM SP-SEPHADEX C-50:

O gel previamente intumescido com tampão fosfato de potássio 0,005 M , pH 7,0 durante aproximadamente uma hora a 90 °C, foi lavado várias vezes com o mesmo tampão e em seguida empacotado em coluna de dimensões de 20 cm de altura e 1,6 cm de diâmetro.

A amostra proveniente da purificação anterior foi aplicada à coluna previamente equilibrada com o tampão mencionado, seguida da purificação em gradiente não-linear do mesmo tampão fosfato de potássio em concentrações crescentes (0,005, 0,02 , 0,06 e 0,5 M) a pH 7,0 constante; com fluxo de 8 ml/h, coletando-se frações de 2 ml cada. A troca de tampão foi efetuada conforme descrito na purificação em hidroxilapatita.

Após a purificação, determinou-se a atividade específica das frações eluídas e aquelas que apresentaram valores mais elevados foram reunidas.

Determinaram-se também as atividades específica e recuperada do hTSH ao longo de todo o procedimento de purificação.

Adicionou-se ao produto obtido, denominado hTSH-IPEN#1, 1,3 mg de manitol por µg de proteína da solução. Essa preparação foi então concentrada por

meio de liofilização, dialisada contra o tampão empregado na radioiodação do hormônio (fosfato de sódio 0,05 M , pH 7,4) e acondicionada nesta solução a -20°C . Após a liofilização, determinou-se o peso da preparação para calcular o valor da recuperação deste procedimento.

3.2.3.2. PURIFICAÇÃO EM ESCALA MAIOR

Finda a purificação em pequena escala, realizou-se a purificação dos 10,75 mg restantes da preparação C, empregando-se as mesmas resinas e seguindo-se o mesmo procedimento da purificação preliminar, porém em escala proporcional, conforme indicado na Figura 3.

Determinou-se apenas a concentração protéica das frações obtidas nas duas últimas cromatografias, de adsorção e de troca iônica, pois já se sabia pela purificação preliminar em qual força iônica o hTSH seria eluído.

O produto final assim obtido, denominado hTSH-IPEN#2, foi separado em três alíquotas que foram mantidas em diferentes meios, a fim de se avaliar a melhor forma de estocagem.

Uma alíquota foi dialisada contra tampão glicina 0,5 M-fosfato de sódio 0,05M, pH 7,2, a outra foi dialisada contra tampão bicarbonato de sódio 0,005 M pH 7,0, e a última permaneceu no tampão em que o hormônio foi eluído da coluna, ou seja, fosfato de potássio 0,06 M, pH 7,0.

A alíquota dialisada contra o tampão bicarbonato de sódio foi separada em duas outras, adicionando-se a uma delas

Extrato cru liofilizado - 10,75 g

↓
DIALISE - Tampão fosfato de potássio 0,1 M , pH 7,0 + NaCl 0,3 M

↓
CROMATOGRAFIA em coluna de Sephadex G-100 (248 mg)

Dimensões da coluna: 100 cm de altura e 5 cm de diâmetro

Fluxo: 40 ml/h, coletando-se frações de 8,5 ml cada

Eluição com o mesmo tampão da diálise

↓
CONCENTRAÇÃO por ultrafiltração

↓
DIALISE - Tampão fosfato de potássio 0,03 M , pH 7,0

↓
CROMATOGRAFIA em coluna de hidroxilapatita (73,5)

Dimensões da coluna: 6 cm de altura e 5 cm de diâmetro

Fluxo: 8 ml/h, coletando-se frações de 1,5 ml cada

Eluição com gradiente crescente de tampão fosfato de potássio: 0,03 M - 0,05 M - 0,2 M - 0,5 M , pH 7,0

↓
DIALISE - Tampão fosfato de potássio 0,005 M , pH 7,0

↓
CROMATOGRAFIA em coluna de SP-Sephadex C-50 (37,7 mg)

Dimensões da coluna: 20 cm de altura e 1,6 cm de diâmetro

Fluxo: 9 ml/h, coletando-se frações de 2 ml cada

Eluição com gradiente crescente de tampão fosfato de potássio: 0,005 M - 0,02 M - 0,06 M - 0,5 M , pH 7,0

Figura 3. Esquema de purificação do hTSH em escala maior. Os valores entre parênteses referem-se à massa protéica submetida as respectivas cromatografias.

manitol, na mesma proporção de 1.300:1. O mesmo sucedeu com a alíquota que permaneceu no tampão fosfato de potássio. As cinco alíquotas resultantes foram então liofilizadas.

Essas alíquotas foram estocadas a -20°C juntamente com outra que permaneceu em solução no tampão de eluição da coluna e tiveram seus pesos determinados para o cálculo da recuperação do procedimento de liofilização.

3.2.4. EXTRAÇÃO A PARTIR DE HIPÓFISES CONGELADAS

Foram empregadas hipófises provenientes do Serviço de Verificação de Óbitos do Hospital São Paulo e da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, retiradas até 24 horas após o óbito. Essas glândulas permaneceram estocadas a -20°C durante 4 meses até que se obtivesse um número mínimo de 165 glândulas.

O método de extração empregado foi o mesmo utilizado na obtenção do hGH, descrito por Roos e cols. (83), e modificado por Assis e cols. (3). Todas as etapas foram realizadas a 4°C , segundo o esquema representado na Figura 4. As hipófises foram descongeladas, lavadas com solução fisiológica gelada e pesadas após secagem em papel de filtro.

A extração foi realizada adicionando-se o tampão de extração (item 2.4.7.) na proporção de 1,5 ml/g de hipófise e homogeneizando no Virtis por 2 minutos. Em seguida o homogenato foi centrifugado a 16.000 FCR durante 10 minutos, sendo o sobrenadante separado e mantido a 4°C .

Repetiu-se por 4 vezes o processo de extração acima descrito, empregando-se sucessivamente as seguintes proporções do tampão: 5 ml/g, 2,5 ml/g, 2,5 ml/g e 1,25 ml/g. Nesta última etapa, porém, a extração realizada em agitador magnético durante

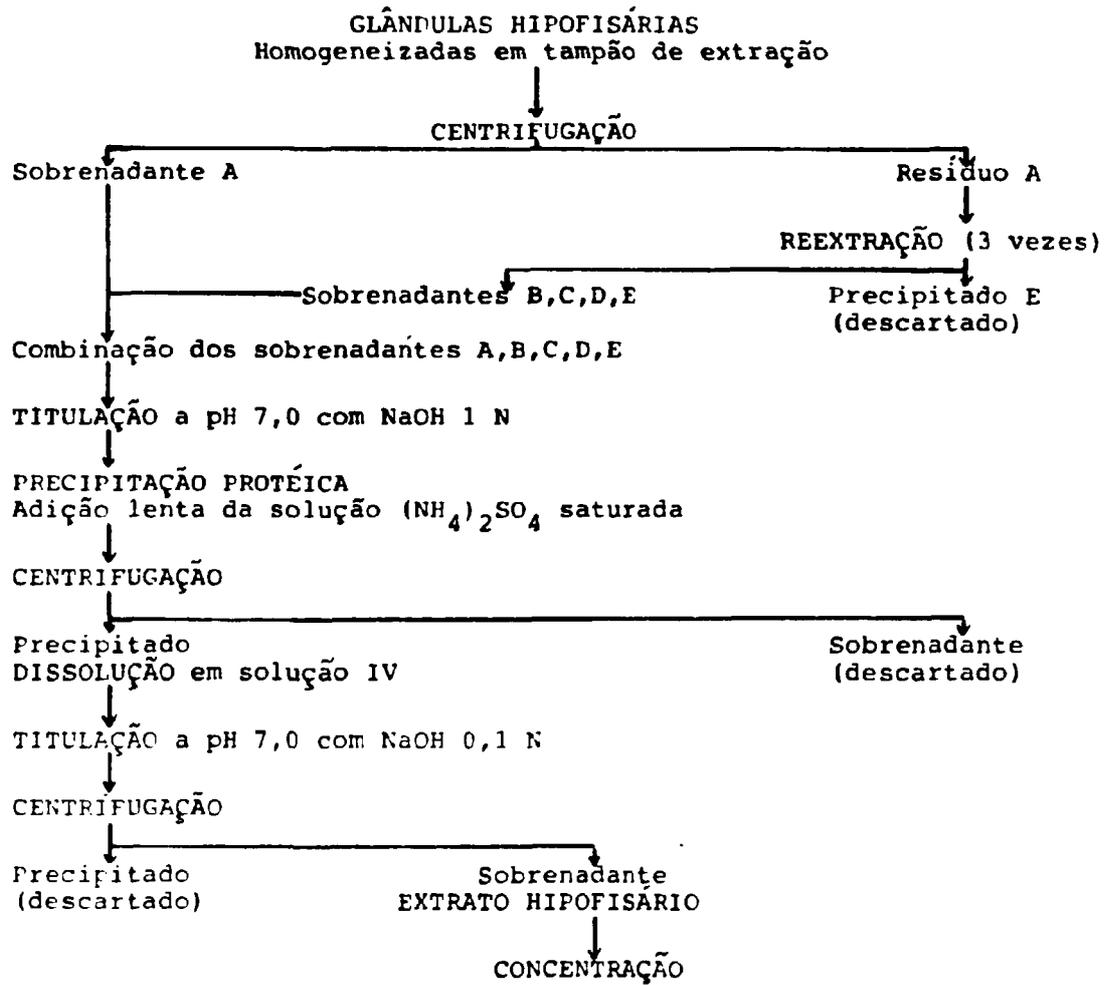


Figura 4. Esquema de obtenção do extrato cru de hTSH a partir de hipófises congeladas.

105 minutos.

Finda esta etapa, o precipitado foi descartado por apresentar apenas tecidos residuais e os sobrenadantes reunidos e filtrados através de lã de vidro para remoção de gorduras.

O extrato foi então titulado a pH 7,0 com solução de NaOH 1 N, e submetido a precipitação protéica pela adição lenta e sob agitação constante da solução saturada de sulfato de amônio (item 2.4.7.) até obter-se uma saturação de 50 % do sal.

O precipitado, separado por centrifugação nas mesmas condições mencionadas, foi dissolvido no menor volume possível de solução IV (item 2.4.7) e titulado a pH 7,0 com solução de NaOH 0,1 N.

A seguir, a solução resultante foi agitada lentamente por 30 minutos e centrifugada nas mesmas condições. O precipitado foi descartado e o sobrenadante concentrado através de membrana DIAFLO PM 10 em sistema de ultrafiltração Amicon.

3.2.5. PURIFICAÇÃO DO EXTRATO OBTIDO A PARTIR DE HIPÓFISES CONGELADAS

O extrato, contendo 1,26 g de proteínas quantificadas pelo método de Lowry, foi inicialmente submetido a cromatografia de exclusão molecular em gel Sephadex G-100 para a separação do GH e dos hormônios glicoprotéicos.

Nessa purificação empregou-se coluna refrigerada (PHARMACIA K 50/100) de dimensão de 100 cm de altura e 5 cm de diâmetro.

O gel previamente intumescido com água durante aproximadamente 6 horas a 90° C, foi lavado várias vezes com tampão

fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,4. Após o preenchimento da coluna, a mesma foi eluída 2 a 3 vezes o seu volume com o mesmo tampão, empregando-se o sistema fechado e o fluxo ascendente mantido por meio de uma bomba peristáltica, num fluxo de 13 ml/h.

Após a aplicação do extrato, a coluna foi eluída nas condições acima mencionadas e frações de 2 ml cada foram obtidas por meio de um coletor automático.

O perfil da purificação foi acompanhado pela medida protéica em espectrofotômetro com leitura da absorvância a 280 nm das frações coletadas, sendo o final da purificação determinado quando a absorvância se igualar ao valor obtido da leitura do branco.

As frações correspondentes ao segundo pico obtido no perfil cromatográfico (extrato cru de hTSH) foram reunidas e submetidas as cromatografias subsequentes, conforme indicado na Figura 5.

Seguiu-se o mesmo procedimento descrito na purificação anterior (item 3.2.3.2.), em escala proporcional e a cromatografia de adsorção foi realizada empregando-se desta feita a hidroxilapatita comercial, com capacidade de adsorver 4,5 mg de AB o grama seco e fluxo de até 100 ml/cm²/h (94).

O produto assim obtido, denominado hTSH-IPEN#3, permaneceu em solução no tampão de eluição da última cromatografia, sendo armazenado a -20°C.

Realizaram-se duas radioiodações deste hormônio, uma com o hormônio recém purificado e outra um mês após sua estocagem a -20°C.

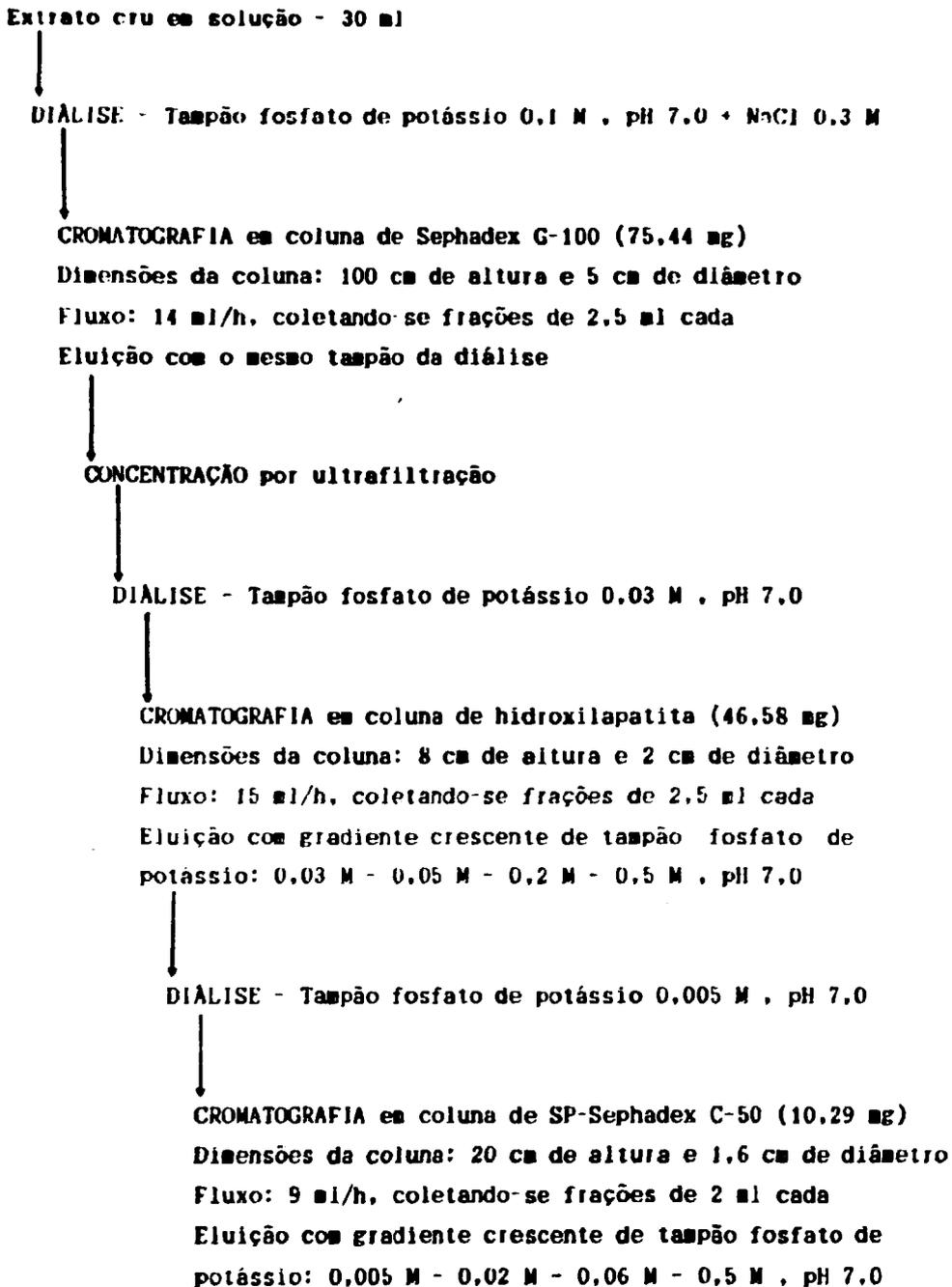


Figura 5: Esquema de purificação do hTSH. Os valores entre parênteses referem-se à massa protéica submetida às respectivas cromatografias.

3.2.6. AVALIAÇÃO DO hTSH-IPEN

As condições de armazenamento das três preparações do hTSH purificado em nossos laboratórios estão indicadas na Tabela 2. Essas preparações foram avaliadas em comparação com o hTSH-16 altamente purificado, fornecido pelo NIDDKD, no preparo do traçador do RIE.

A preparação #2 foi também analisada comparativamente com o padrão Standard A na construção da curva dose-resposta do RIE.

3.2.6.1. IODAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO hTSH-IPEN

Alíquotas do hTSH-IPEN recém obtido e conservado a - 20 °C nas diferentes condições, foram radioiodadas e purificadas pelas mesmas técnicas empregadas para o hTSH NIDDKD, descritas no item 3.1.1..

Como o hormônio obtido se encontrava muito diluído, substituiu-se o tampão da radioiodação (fosfato de sódio 0,5 M , pH 7,4) por igual volume da própria solução em que ele se encontrava armazenado.

As frações obtidas nas purificações desses traçadores também foram identificados pelo seu K_d e pela ligação com excesso de antissoro (título de 1:60.000), empregando-se a técnica de RIE pelo duplo anticorpo descrita no item seguinte.

Aquelas frações que se ligaram especificamente ao antissoro foram reunidas, separadas em alíquotas e conservadas a -20° C até serem avaliadas como traçador do RIE.

Tabela 2. Formas de armazenamento do hTSH-IPEN a -20°C.

PREPARAÇÃO	CONDIÇÃO	MEIO
IPEN # 1	Solução (após liofilização e diálise)	Tampão fosfato de sódio 0,05 M., pH 7,4
IPEN # 2	Solução	Tampão fosfato de potássio 0,06 M . pH 7,0
IPEN # 2-A	Liofilizado (após diálise)	Tampão glicina 0,5 M - fosfato de sódio 0,05 M , pH 7,2
IPEN # 2-B	Liofilizado (após diálise)	Tampão bicarbonato de sódio 0,005 M. pH 7,0
IPEN # 2-C	Liofilizado (após diálise)	Tampão bicarbonato de sódio 0,005 M . pH 7,0 + manitol
IPEN # 2-D	Liofilizado	Tampão fosfato de potássio 0,06 M , pH 7,0
IPEN # 2-E	Liofilizado	Tampão fosfato de potássio 0,06 M . pH 7,0 + manitol
IPEN # 3	Solução	Tampão fosfato de potássio 0,06 M . pH 7,0

3.2.6.2. ANÁLISE DO ^{125}I -hTSH-IPEN

Os traçadores IPEN foram analisados em comparação com aqueles preparados com o hTSH-NIDDKD através da EGPA, na determinação do título do antissoro específico, na construção da curva dose-resposta e na determinação da concentração de TSH das amostras controle.

Nessa avaliação empregou-se um protocolo de ensaio diferente daquele estabelecido para a determinação do hTSH nos extratos hipofisários, mais compatível com os utilizados para a determinação do hormônio circulante nos laboratórios de análises clínicas.

Para tanto, as incubações foram realizadas em menor volume diretamente nos tubos de polipropileno, empregando-se uma atividade fixa do traçador, em torno de 10.000 cpm por tubo e o método de separação pelo duplo anticorpo.

Essa forma de separação do ensaio implicou na utilização da solução fosfo-salina contendo EDTA (item 2.4.4.) e permitiu a estimativa das contagens totais a partir da inclusão de decuplicatas do traçador, cujas atividades eram determinadas juntamente com as demais amostras após a precipitação das frações ligadas.

A curva do título do antissoro foi obtida incubando-se em quadruplicata 0,1 ml do traçador com 0,1 ml de fosfo-salina-EDTA e 0,1 ml do antissoro nas diluições seguintes: 1:20.000, 1:200.000, 1:400.000, 1:800.000, 1:1.600.000, 1:3.200.000, realizadas em fosfo-salina-EDTA. Foram também incubadas as amostras que estimaram a ligação inespecífica, substituindo-se o volume do antissoro pelo mesmo volume de fosfo-salina-EDTA.

Calculou-se a percentagem de B/T das amostras conforme descrito no item 3.1.3., considerando-se a média das decuplicatas do traçador como a contagem total do ensaio.

A curva dose-resposta foi realizada em sistema de ensaio em não-equilíbrio, incubando-se previamente 0,1 ml do padrão com 0,1 ml do antissoro na diluição estabelecida, durante 4 horas a temperatura ambiente. Em seguida adicionou-se 0,1 ml do traçador e a incubação prosseguiu por mais 24 horas a 4°C. As soluções padrão foram preparadas conforme descrito no item 3.1.2.1., empregando-se, porém, fosfo-salina-EDTA.

A separação foi feita adicionando-se 0,1 ml de segundo anticorpo, na diluição recomendada pelo fabricante de 1:5 e incubando-se por mais 90 minutos a temperatura ambiente. Após a adição de 2 ml de água, as amostras foram homogeneizadas em vortex e centrifugadas a 4°C durante 30 minutos a 1.700 RCF. Os sobrenadantes foram descartados vertendo-se os tubos e as atividades dos precipitados foram então determinadas.

Os resultados foram obtidos pela aplicação do programa RIAKALK, implantado nos nossos laboratórios (10).

4. RESULTADOS

4.1. PADRONIZAÇÃO DO RADIOIMUNOENSAIO

4.1.1. PREPARO DO TRAÇADOR

4.1.1.1. ANÁLISE DO hTSH "FRIO"

A Figura 6 apresenta o eletroforetograma proveniente de um dos embarques do hTSH-16 do NIDDKD, quando submetido a EGPA. Observa-se a presença de um único componente, com valor de R_m de 0,289, mesmo após o hTSH ter permanecido em solução a -20°C , durante 22 dias.

4.1.1.2. RADIOIODAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO hTSH

Os valores da atividade do ^{125}I efetivamente empregada em dez radioiodações, de seus respectivos rendimentos e recuperações, bem como da atividade específica de cada traçador estão indicados na Tabela 3.

A Figura 7 mostra o eletroforetograma de uma das preparações do ^{125}I -hTSH antes de sua purificação em gel de Sephadex G-100. Nessa figura são observados três picos radioativos correspondentes ao ^{125}I -hTSH, a um componente que migra junto com o corante traçador, azul de bromofenol, e ao ^{125}I livre.

A Figura 8 exhibe um perfil cromatográfico típico da purificação de ^{125}I -hTSH em gel de Sephadex G-100, no qual são indicadas as ligações das frações dos três primeiros picos com o antissoro em excesso. Esse resultado confirmou ser o terceiro pico formado pelo ^{125}I -hTSH íntegro e imunorreativo.

A Tabela 4 apresenta os valores de Kd referentes ao segundo e ao terceiro pico revelados no cromatograma da purificação. Os valores de Kd do pico II variaram de 0,094 a 0,211 (média \pm DP = 0,148 \pm 0,039), enquanto que aqueles do pico III (^{125}I -hTSH) variaram de 0,244 a 0,371 (média \pm DP = 0,285 \pm 0,046).

A Figura 9 apresenta os eletroforetogramas das frações correspondentes aos picos obtidos na purificação do hormônio radioiodado, excetuando-se aquele do ^{125}I livre. O primeiro pico (Figura 9 A) inclui vários componentes com valor de Rm diferente do que o do ^{125}I -hTSH, enquanto que o segundo pico (Figura 9 B) apresenta um componente principal migrando juntamente com o CT. A Figura 9 C exibe um eletroforetograma típico do terceiro pico (^{125}I -hTSH), apresentando um componente principal com valor de Rm (0,461) próximo ao do ^{125}I -hTSH não purificado (0,475, Figura 7) e dois componentes secundários que migram junto e a frente do CT, respectivamente.

Os valores de Rm do componente principal revelado na EGPA do pico III dos traçadores estão indicados na Tabela 5. Nesta tabela estão também relacionados os valores percentuais deste componente, estimados com relação a radioatividade total no gel, correspondendo a um valor médio de pureza do traçador de 65,65 %.

A separação pela EGPA do traçador incubado com o antissoro em excesso exibida na Figura 10, além de comprovar a imunorreatividade de seu componente principal, indica a não imunorreatividade do componente que migra com o CT. Esse componente, que praticamente constitui o pico II (Figura 9 B), corresponde a uma provável forma degradada do ^{125}I -hTSH.

O estudo da estabilidade do traçador pela EGPA após 40

dias de armazenamento a -20°C , mostra que, enquanto sua pureza diminuiu, a percentagem de ^{125}I livre aumentou e o componente que migra junto com o CT manteve-se praticamente inalterado (Figura 11).

O emprego de um dos traçadores no decorrer de dois meses de armazenamento a -20°C é evidenciado na Figura 12, que apresenta curvas padrão comparativas obtidas com esse traçador. Na Tabela 6 são apresentados os valores das ligações inespecífica e específica, de ED_{50} e DMD correspondentes a essas curvas comparativas.

4.1.3. DETERMINAÇÃO DA ÓTIMA DILUIÇÃO DO ANTISSORO

Na figura 13 pode-se observar a determinação da ótima diluição do antissoro a ser utilizada nos ensaios realizados com determinado traçador. Nessas condições a diluição que forneceu ligação específica de 50 % com o ^{125}I -hTSH foi a de 1:875.000. Os títulos obtidos com os diferentes traçadores preparados neste trabalho estão apresentados na Tabela 7.

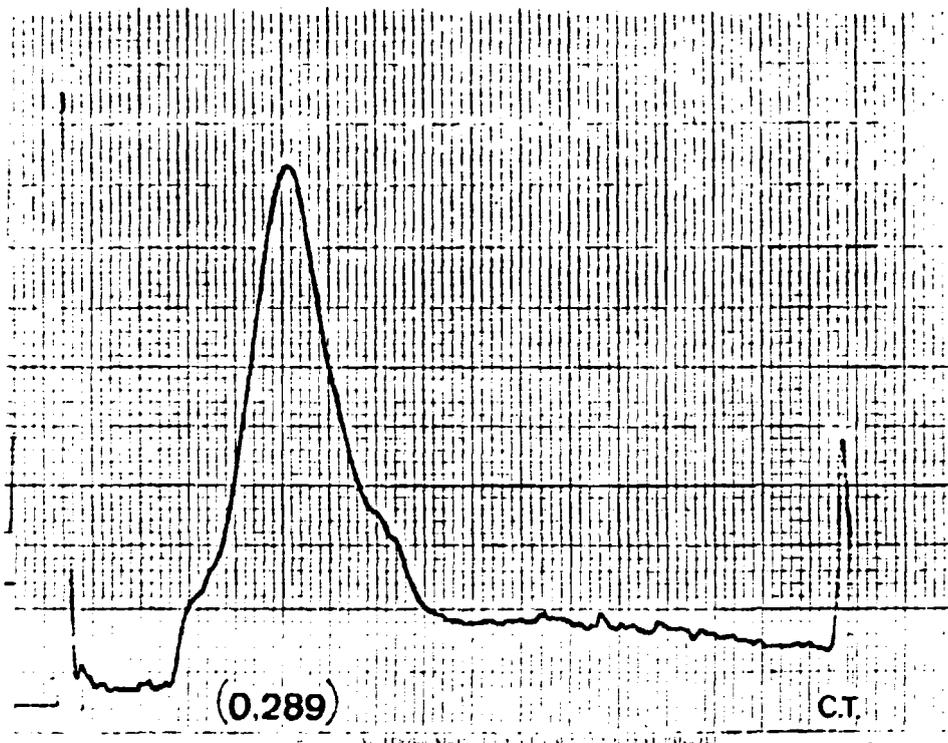


Figura 6. EGPA do hTSH-NIDDKD (30 ug). O valor da migração relativa do seu único componente é indicado entre parênteses. C.T. indica a posição do corante traçador, azul de bromofenol.

Tabela 3. Resultados obtidos nas diversas radiolodações realizadas com o hTSH-NIDDKD.

RADIOIODAÇÃO (Nº)	¹²⁵ I EMPREGADO NA IODAÇÃO (μCi^1)	RENDIMENTO (%)	RECUPERAÇÃO (%)	ATIVIDADE ESPECÍFICA ($\mu\text{Ci}^1/\mu\text{g}$)
1	550.00	56.28	112.73	62.51
2	876.00	20.26	91.50	36.37
3	826.00	26.29	104.74	47.31
4	511.00	26.70	75.55	28.79
5	1.057.00	66.93	84.66	143.83
6	755.00	33.34	79.25	53.72
7	923.00	18.60	99.62	36.21
8	935.00	33.00	99.00	61.68
9	735.00	40.21	124.01	61.58
10	776.00	18.50	114.60	29.13
Media =	794.40	33.97	98.57	56.11
DP =	169.44	16.30	15.95	33.57
CV =	21.33 %	48.07 %	16.18 %	59.83 %

¹ 1 μCi = 37 KBq

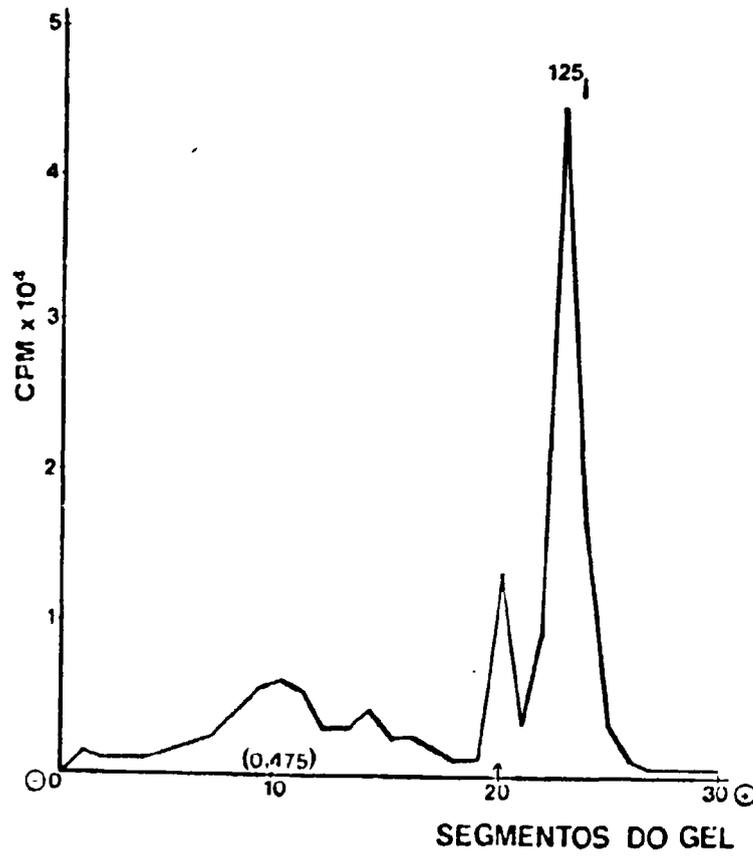


Figura 7. Eletroforetograma do ^{125}I -htsh radioiodado não purificado. O valor de R_m do componente principal é indicado entre parênteses, enquanto que a seta indica a posição do C.T..

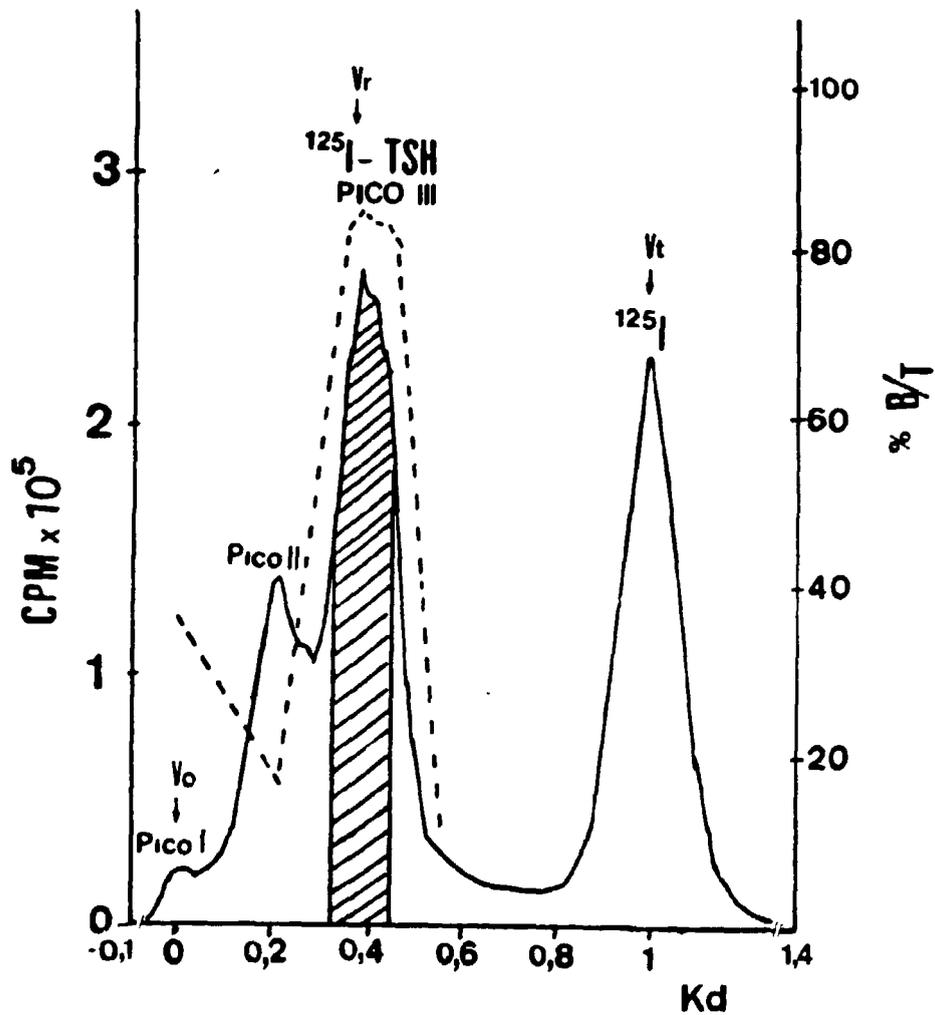


Figura 8. Cromatograma da purificação do ^{125}I -hTSH em gel de Sephadex C-100, referente à 8ª radioiodação. A linha contínua expressa a radioatividade de 10 μl de cada fração em cpm e a linha descontínua apresenta a percentagem de ligação do ^{125}I -hTSH ao seu anticorpo específico, empregado em excesso. A área hachurada corresponde às frações que foram reunidas e estocadas a -20°C para serem empregadas como traçador no RIE.

Tabela 4. Valores de Kd referentes aos picos II e III revelados nos cromatogramas das diversas radioiodações.

RADIODIDAÇÃO (n°)	Kd	
	Pico II	Pico III (¹²⁵ I-hTSH)
1	0,130	0,244
2	0,138	0,259
3	0,119	0,277
4	0,115	0,250
5	0,094	0,255
6	0,142	0,265
7	0,146	0,271
8	0,200	0,364
9	0,186	0,371
10	0,211	0,297
Media =	0,148	0,265
DP =	±0,039	±0,046
CV =	26,08 %	16,07 %

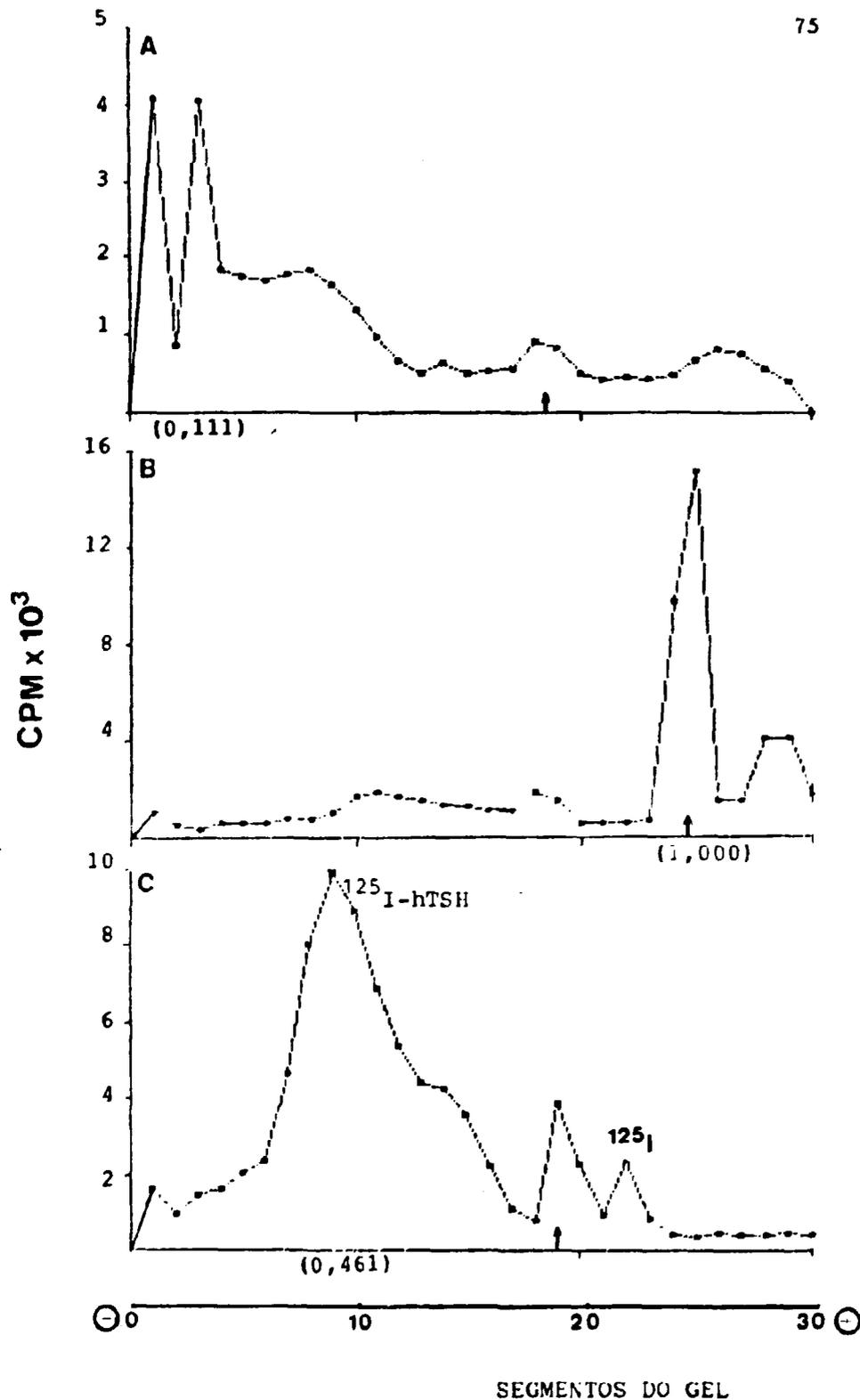


Figura 9. Eletroforetogramas das frações correspondentes aos picos I (A), II (B), e III (C), obtidas na purificação do ¹²⁵I-hTSH em Sephadex G-100 (radioiodação nº 9). Os valores de R_m do componente principal de cada gel são indicados entre parênteses e as setas indicam a posição do C T.

Tabela 5. Valores de R_m e da percentagem de pureza eletroforética de oito traçadores analisados pela EGPA.

TRAÇADOR (n°)	R_m	PUREZA (%)
1	0,480	81,06
4	0,395	72,66
5	0,442	71,35
6	0,438	59,90
7	0,419	37,67
8	0,342	52,73
9	0,461	70,49
10	0,513	77,48
Média =	0,436	65,65
DP =	±0,052	±14,58
CV =	12,05%	22,20%

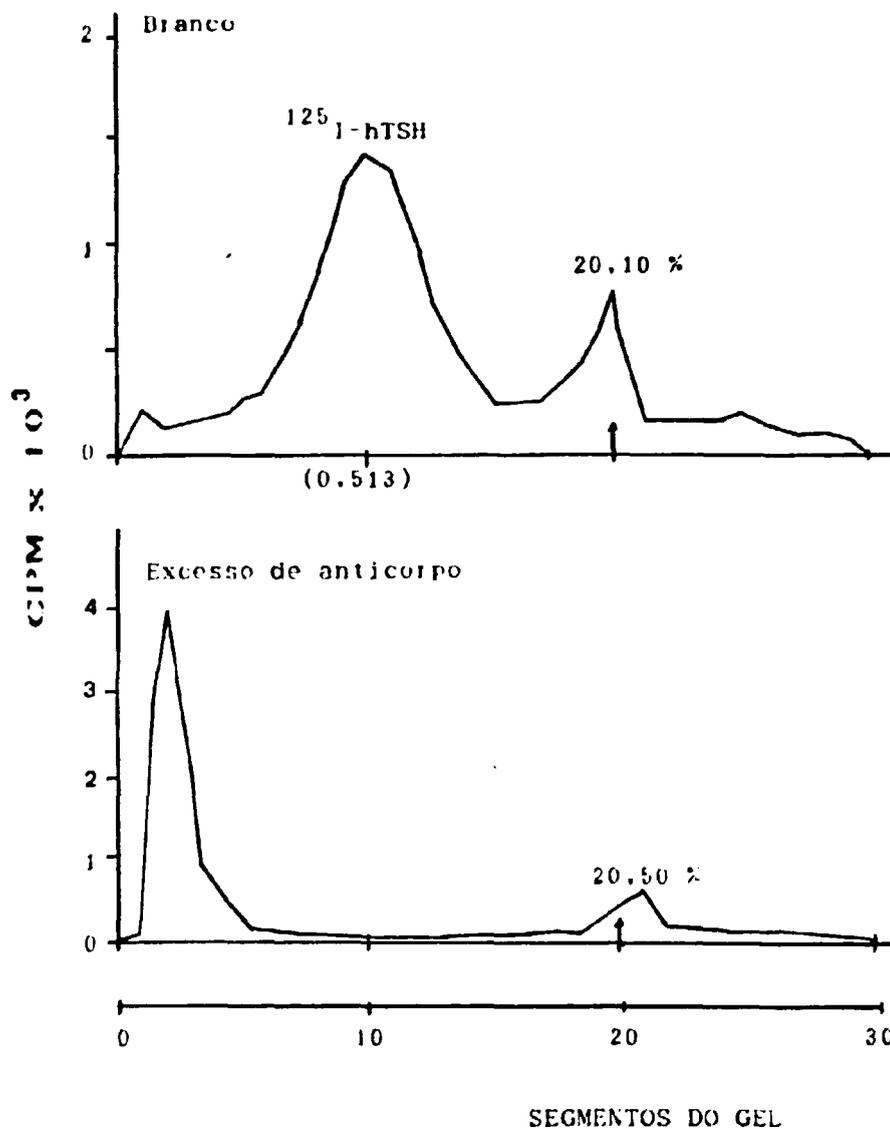


Figura 10. Separação do ^{125}I -hTSH livre daquele ligado ao anticorpo em EGPA. Para esta análise empregou-se o traçador proveniente da radioiodação nº 10. O valor de R_m do componente principal é indicado entre parênteses e as setas indicam a posição do CT. Os valores percentuais dos picos correspondentes ao componente secundário, estimados em relação à radioatividade total no gel, são também

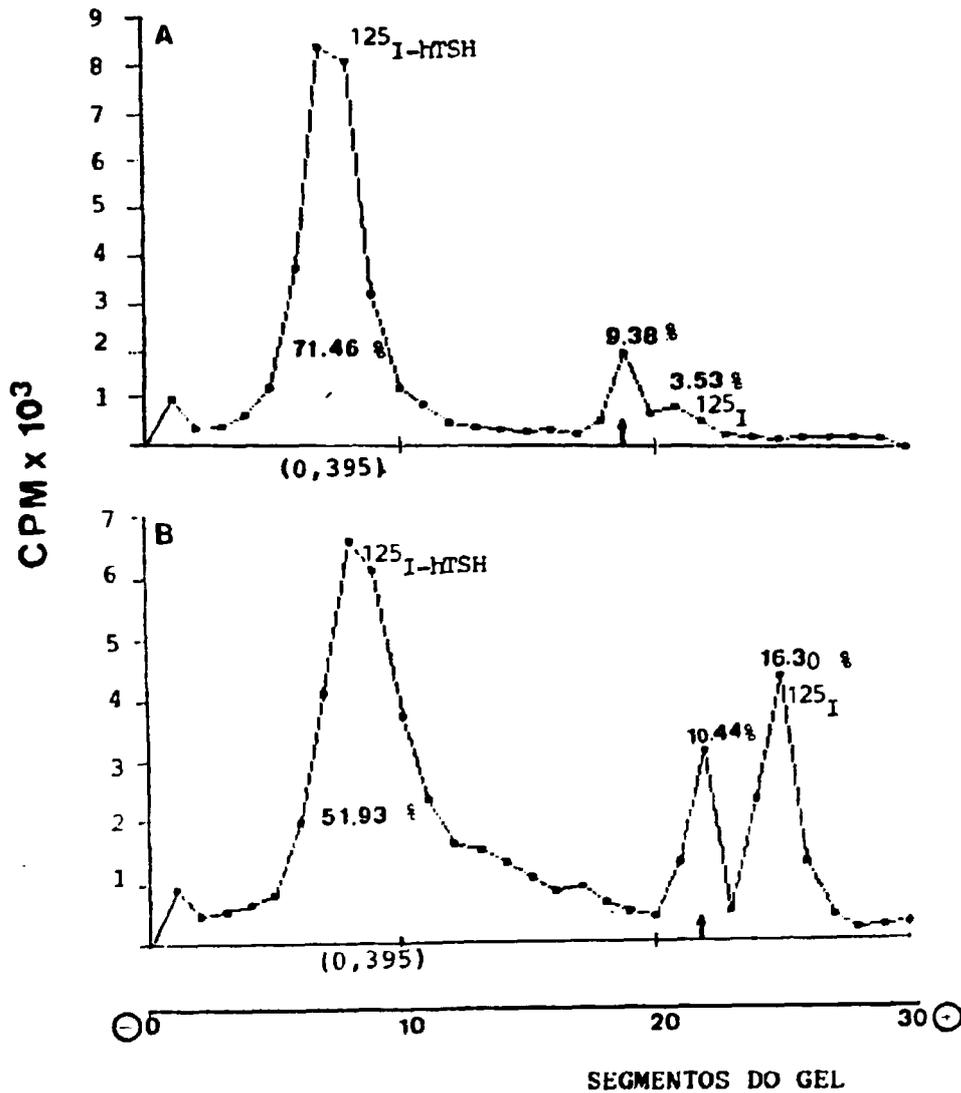


Figura 11. Eletroforetogramas obtidos com ^{125}I -hTSH proveniente da radioiodação nº 4: recém purificado (A) e após 40 dias de armazenamento a -20°C (B). As setas indicam a posição do C.T.. Os valores de R_m do componente principal são indicados entre parênteses. Os valores percentuais dos picos correspondentes aos componentes principal e secundário e ao ^{125}I livre, estimados com relação à atividade total no gel, também são indicados.

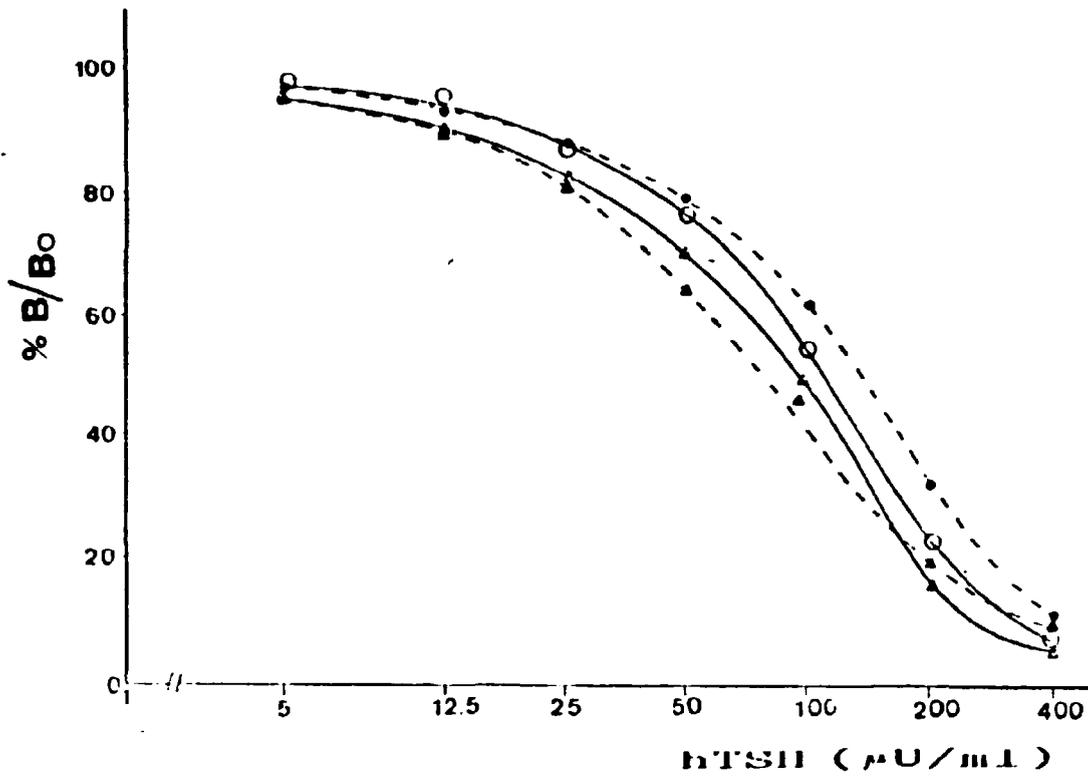


Figura 12. Curvas padrão obtidas com o traçador proveniente da radiocodação nº 1 decorridos 26 (o—o), 45 (●---●), 56 (▲---▲) e 63 (▲—▲) dias após seu preparo.

Tabela 6. Valores dos parâmetros relativos às curvas dose-resposta obtidas com o traçador após 26, 48, 56 e 63 dias de armazenamento a - 20°C.

TEMPO DE ARMAZENAMENTO	% LIGAÇÃO		ED ₅₀ (uU/ml)	DMD (uU/ml)
	INESPECÍFICA	ESPECÍFICA		
26 DIAS	10,12	49,38	110,00	8,0
48 DIAS	9,13	43,20	137,50	11,0
56 DIAS	9,95	39,96	92,50	7,0
63 DIAS	10,00	33,59	100,00	11,0
Média =	9,80	41,53	110,00	9,25
DP =	±0,45	±6,58	±19,68	±2,06
CV =	4,62 %	15,84 %	17,89 %	22,29 %

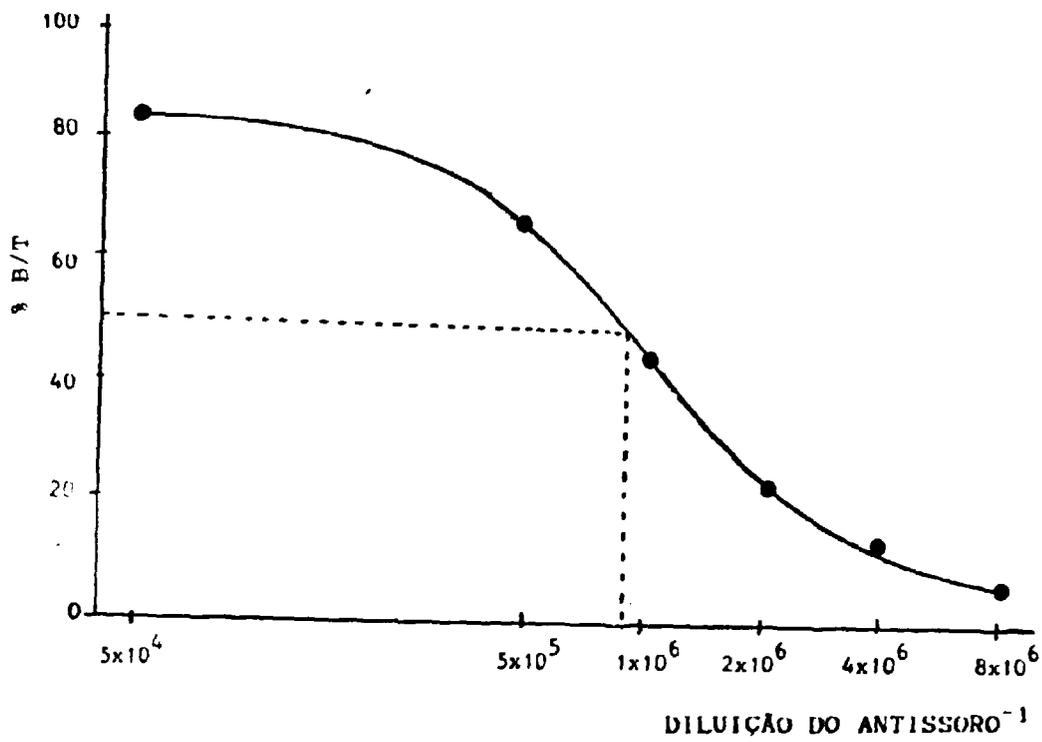


Figura 13. Curva de titulação do antissoro anti-hTSH, realizada com o traçador proveniente da radiolodação nº 8.

Tabela 7. Título do antissoro determinado para os diferentes traçadores.

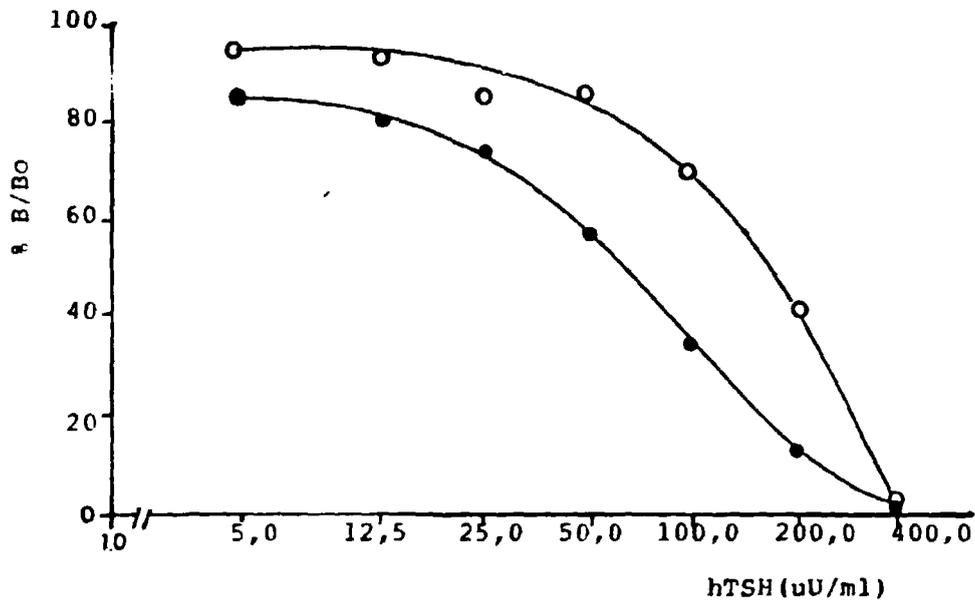
TRAÇADOR (n°)	TÍTULO DO ANTISSORO
1	1: 625.000
2	1:1.162.500
3	1: 770.000
4	1: 850.000
5	1: 925.000
6	1: 900.000
7	1: 975.000
8	1: 875.000
9	1:1.250.000
10	1: 625.000

4.1.4. CONDIÇÕES DO ENSAIO

A Figura 14 exibe as curvas dose-resposta obtidas empregando-se os dois sistemas de ensaio: em equilíbrio e em não-equilíbrio e os respectivos valores de ligação inespecífica, específica, ED₅₀ e DMD. Nota-se que com a adição atrasado do traçador, no sistema em não-equilíbrio, os parâmetros referentes a sensibilidade do ensaio mostraram-se consideravelmente diminuídos.

A Figura 15 apresenta o efeito da concentração do PEG na precipitação do ¹²⁵I-hTSH ligado ao anticorpo. Observa-se que na concentração de PEG a 25 % garantiu-se a precipitação total do complexo antígeno-anticorpo, mantendo-se o valor da ligação inespecífica baixo. Além disso, nota-se que em torno dessa concentração, variando de 20 a 30 %, as ligações permaneceram constantes.

A Figura 16 exibe os resultados comparativos da separação de um ensaio pela precipitação com PEG, seguida ou não de lavagem e reprecipitação. Observa-se que a reprecipitação diminuiu sensivelmente os valores da ligação inespecífica, enquanto que os valores da ligação específica, ED₅₀, DMD e das concentrações das amostras controle permaneceram inalteradas.



	SISTEMAS DE INCUBAÇÃO	
	EQUILÍBRIO	NÃO-EQUILÍBRIO
NSB (%)	12,84	12,92
Bo (%)	29,26	29,99
ED ₅₀ (uU/ml)	180,00	68,00
DMD (uU/ml)	22,00	10,00

Figura 14. Comparação das curvas padrão construídas no sistema de ensaio em equilíbrio (○—○) e em não-equilíbrio (●—●) com o traçador proveniente da radioiodação nº 10.

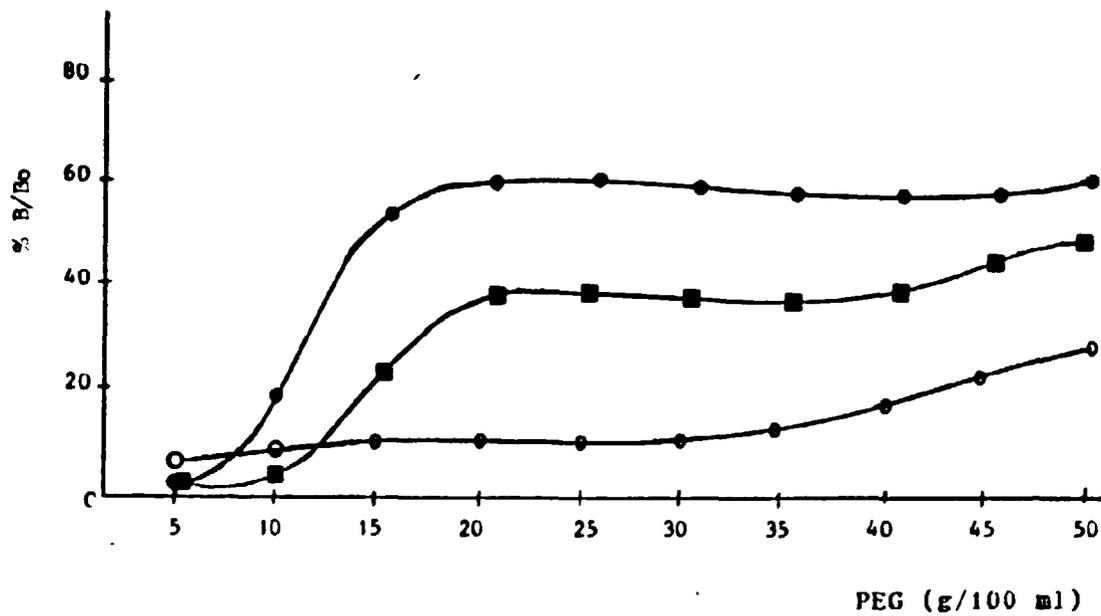
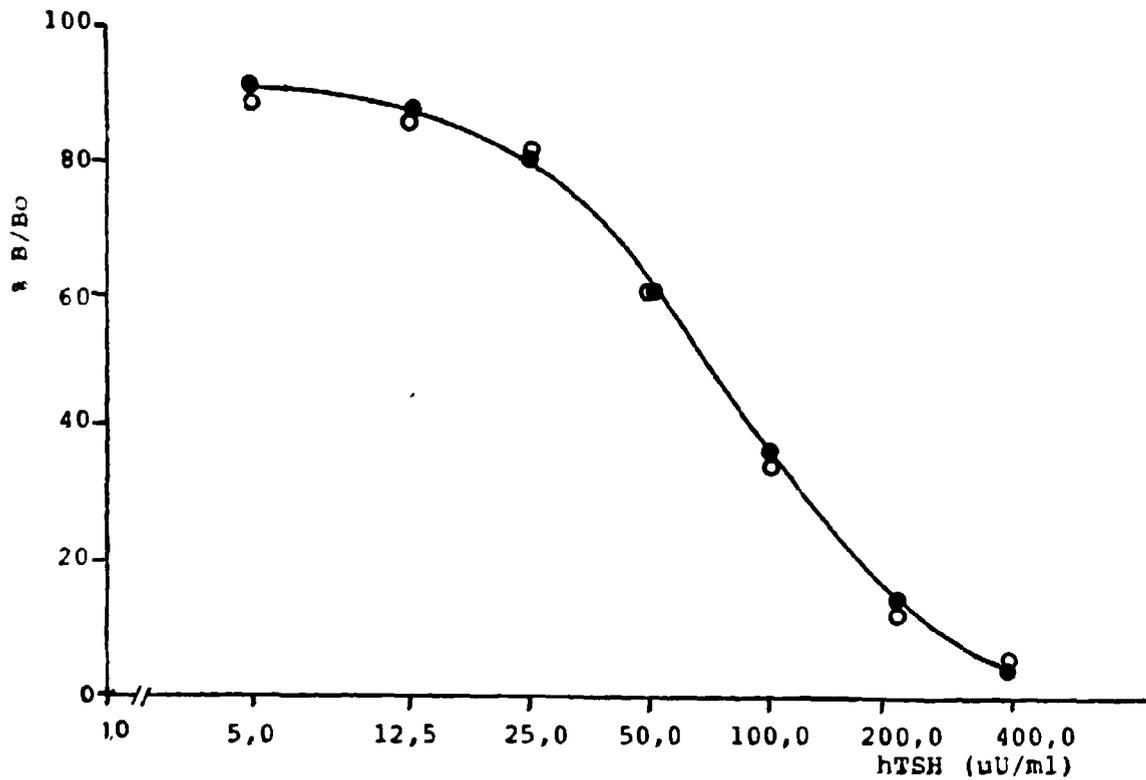


Figura 15. Efeito de concentrações crescentes de PEG na precipitação inespecífica do ^{125}I -hTSH (○—○) e nas precipitações do ^{125}I -hTSH ligado ao antissoro na diluição do RIE (■—■) e ligado ao antissoro em excesso (●—●).



	SEPARAÇÃO DO ENSAIO	
	SEM LAVAGEM	COM LAVAGEM E REPRECIPITAÇÃO
NSB (%)	15,54	7,64
B/T (%)	23,58	25,40
ED50 (uU/ml)	74,00	73,00
DMD (uU/ml)	17,00	15,00
CONT. ALTO (uU/ml)	140,00	130,00
CONT. MÉDIO (uU/ML)	61,00	63,00
CONT. BAIXO (uU/ml)	27,00	25,00

Figura 16. Comparação das curvas dose-resposta obtidas pela separação com PEG seguida (●—●) ou não (○—○) de lavagem e reprecipitação (traçador nº 10).

4.1 5. SEQUÊNCIA OPERACIONAL DO RIE

A partir dos resultados obtidos no estabelecimento das condições ótimas para o RIE, obedeceu-se a sequência operacional seguinte para sua realização:

Todos os ensaios foram realizados a 4°C pelo sistema em não-equilíbrio, conforme descrito no item 3.1.2.3..

Para a construção da curva dose-resposta foram incubados por 24 horas o hTSH padrão, na concentração de zero a 400 uU/ml, com o antissorio na diluição estabelecida para cada traçador (Tabela 7). Após esse período, foi adicionado o traçador (diluído 18 vezes) e a incubação prosseguiu por mais 24 horas.

A amostra que estimou a ligação inespecífica foi obtida pela incubação do traçador com fosfo-salina e as amostras controle e aquelas com teor de hTSH desconhecido foram incubadas em substituição às soluções padrão, conforme indicado na Tabela 8.

Finda essa incubação, as amostras foram separadas em replicatas, sendo determinada sua atividade em contador gama. Cada amostra foi ensaiada em quadruplicata, correspondendo a duplicata de incubação e duplicata de separação.

A separação foi realizada pela adição de 0,5 ml da solução a. PEG a 25 % preparada em tampão veronal, juntamente com 30 ul de SHN por tubo. Os tubos foram então homogeneizados em vortex, centrifugados a 1.600 FCR durante 20 minutos e os sobrenadantes aspirados.

Os precipitados foram então dissolvidos com 0,3 ml da solução de NaCl 0,4 M e precipitados pela adição de 0,5 ml da mesma solução de PEG, seguida de centrifugação a 1.200 RCF du-

Tabela 8 . Protocolo do ensaio de hTSH.

	FOSFO-SALINA (µl)	AMOSTRA (µl)	ANTI-SORO (µl)	¹²⁵ I-hTSH (µl)
NSB	900	---	---	---
PADRÕES	---	100	800	100
CONTROLES	---	100	800	100
DESCONHECIDOS	---	100	800	100

rante 30 minutos.

Os sobrenadantes foram novamente aspirados e a atividade dos precipitados foi determinada em contador gama, correspondendo a fração do traçador ligada ao anticorpo.

O cálculo da percentagem de ligação foi efetuado conforme descrito no item 3.1.3. e a curva dose-resposta traçada em papel semi-log, cujo exemplo típico é exibido na Figura 18.

A concentração das amostras desconhecidas, determinada pela leitura na curva dose-resposta foi corrigida pelo fator empregado em suas diluições.

4.1.6. CONTROLE DE QUALIDADE

4.1.6.1. ESPECIFICIDADE

Os valores de hTSH de uma amostra com teor de hTSH elevado submetida a diferentes diluições são apresentados na Tabela 9. Esses valores, quando multiplicados pelo fator de diluição, forneceram resultados bem semelhantes, como pode ser observado na Tabela 10. Obteve-se coeficiente de correlação linear de 0,9978, significativo para $p < 0,001$, entre os volumes da amostra empregados e as concentrações de hTSH determinadas (Figura 17).

A Figura 18 exibe uma curva dose-resposta típica do RIE de hTSH, indicando que os pontos correspondentes às amostras diluídas superpuseram-se a curva construída com o hTSH padrão.

Tabela 9. Valores de hTSH de uma mesma amostra com teor de hTSH elevado submetida a diferentes diluições.

DILUIÇÃO							
DA AMOSTRA	1:5555	1:6250	1:7140	1:8333	1:10000	1:16666	1:25000
CONCENTRAÇÃO	125,1	122,8	94,8	82,0	68,8	43,5	29,5
DE hTSH NA	128,8	121,2	96,5	88,1	73,5	46,0	30,0
AMOSTRA DI -	124,0	109,2	101,2	71,5	72,20	45,5	30,0
LUÍDA (uU/ml)	126,8	107,2	101,2	75,2	72,0	42,8	31,8
	133,5	108,0	100,1	84,0	68,2	41,8	32,3
	130,0	115,8	95,0	85,0	71,2	43,0	32,2
	159,0	114,5	101,5	83,5	71,0	46,5	30,0
	143,1	112,1	98,8	87,0	72,5	45,2	32,3
	131,5	109,2	96,5	85,0	64,8	39,0	31,5
	123,5	118,2	98,0	90,5	68,2	44,5	32,5
Media =	132,5	113,8	98,4	83,2	70,2	43,8	31,2
DP =	±0,4	±5,3	±2,4	±2,5	±2,5	±2,2	±1,2
CV =	7,8 %	4,6 %	2,4 %	6,6 %	3,6 %	4,9 %	3,6 %

Tabela 10. Concentrações obtidas em sete diluições diferentes de uma amostra com teor de hTSH elevado.

FATOR DE DILUIÇÃO	CONCENTRAÇÃO DE hTSH NA AMOSTRA DILUÍDA (uU/ml)	CONCENTRAÇÃO FINAL DE hTSH (U/ml)
1:5.555	132,5	0,74
1:6.250	113,8	0,71
1:7.410	98,4	0,70
1:8.333	83,2	0,69
1:10.000	70,2	0,70
1:16.666	43,8	0,73
1:25.000	31,2	0,78
		Média = 0,72
		DP = ±0,03
		CV = 4,02 %

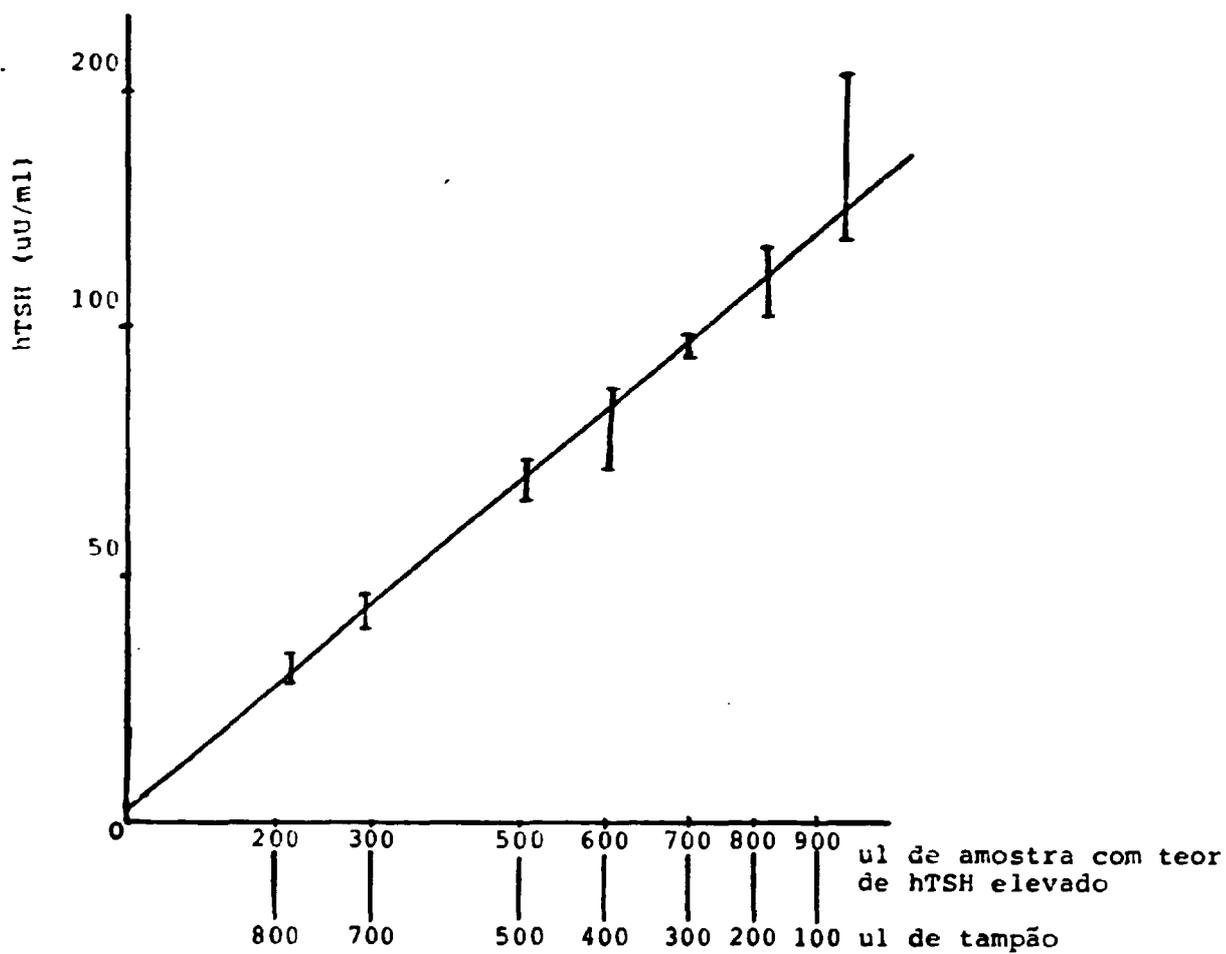


Figura 17. Efeito da diluição sobre a concentração de hTSH. A reta que melhor se ajusta é a definida pela equação $Y = 14,1870 X + 0,8784$ com coeficiente de correlação significativa para $p < 0,001$.

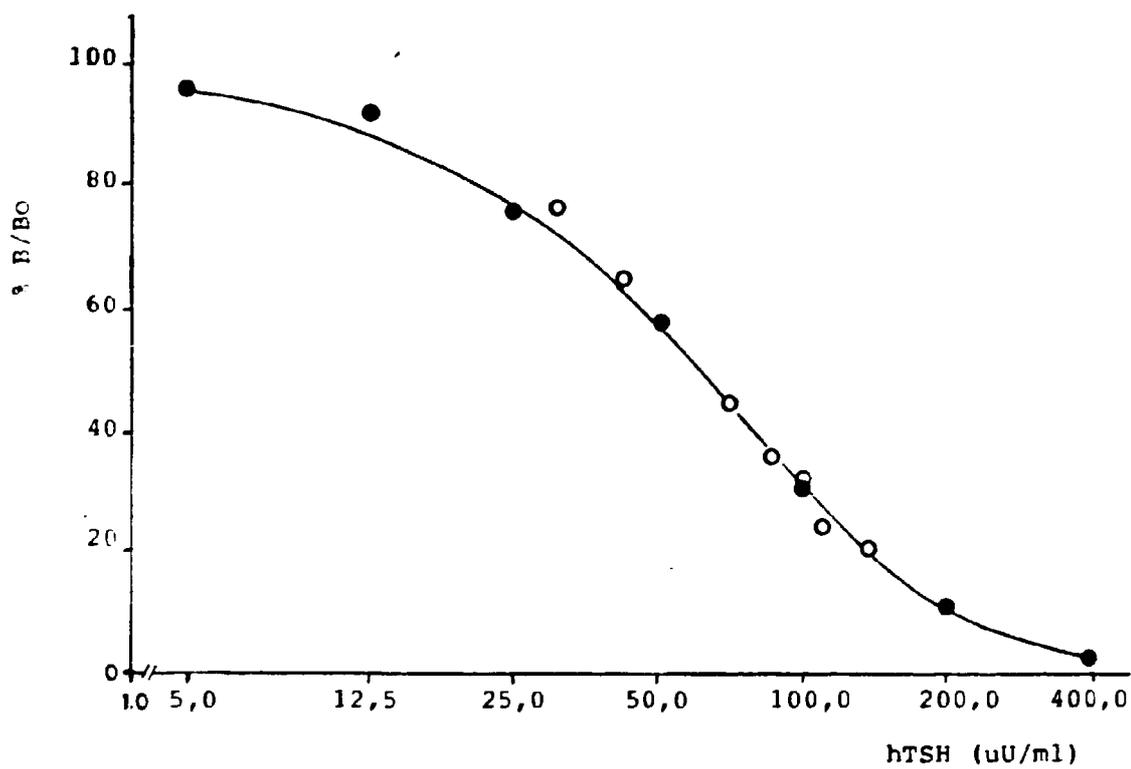


Figura 18. Efeito da diluição da amostra (o) comparado à curva dose-resposta do RIE de hTSH construída com o padrão Standard A (●—●) e o traçador de nº6.

4.1.6.2. EXATIDÃO

O estudo da exatidão desta técnica revelou recuperação de soluções de hormônio padrão adicionadas a uma amostra com teor de hTSH conhecido (17,3 uU/ml) variando de 80,8 a 98,0 % (Tabela 11). O coeficiente de correlação linear determinado entre as concentrações de hTSH padrão adicionadas e aquelas de hormônio recuperado foi de 0,9823, sendo significativo para $p < 0,001$ (Figura 19).

4.1.6.3. PRECISÃO

A Tabela 12 exhibe os valores da análise da precisão intra-ensaio, em que foram dosadas num mesmo ensaio 25 replicatas de três amostras controle. Os coeficientes de variação foram de 4,55, 5,06 e 4,01 % respectivamente para os controles baixo, médio e alto. A Figura 20 apresenta a dispersão intra-ensaio da determinação da concentração das amostras controle.

Na Tabela 13 são expressos os resultados das dosagens das amostras controle em 12 ensaios consecutivos, realizados com diferentes traçadores. Os coeficientes de variação foram de 17,76, 12,51 e 12,01 % respectivamente para os controles baixo, médio e alto. A Figura 21 exhibe a dispersão inter-ensaio da estimativa da concentração das amostras controle.

4.1.6.4. SENSIBILIDADE

A sensibilidade de 20 ensaios realizados com diferentes traçadores e expressa pelos valores de ED_{50} e de DMD está apresentada na Tabela 14.

Tabela 11. Concentrações obtidas na prova de recuperação do hTSH, adicionando quantidades crescentes deste hormônio a uma amostra com teor de hTSH conhecido (17,33 uU/ml).

hTSH ADICIONADO (uU/ml)	hTSH DETERMINADO (uU/ml) Média ± DP	hTSH RECUPERADO (uU/ml)	hTSH (%)
---	17,3 ± 1,8	---	---
5,0	22,6 ± 1,2	4,8	96,0
12,5	28,8 ± 1,3	11,5	92,0
25,0	37,5 ± 1,1	20,2	80,8
50,0	37,8 ± 1,3	40,5	81,0
100,0	104,8 ± 4,1	87,5	87,5
200,0	213,4 ± 10,2	196,1	98,0

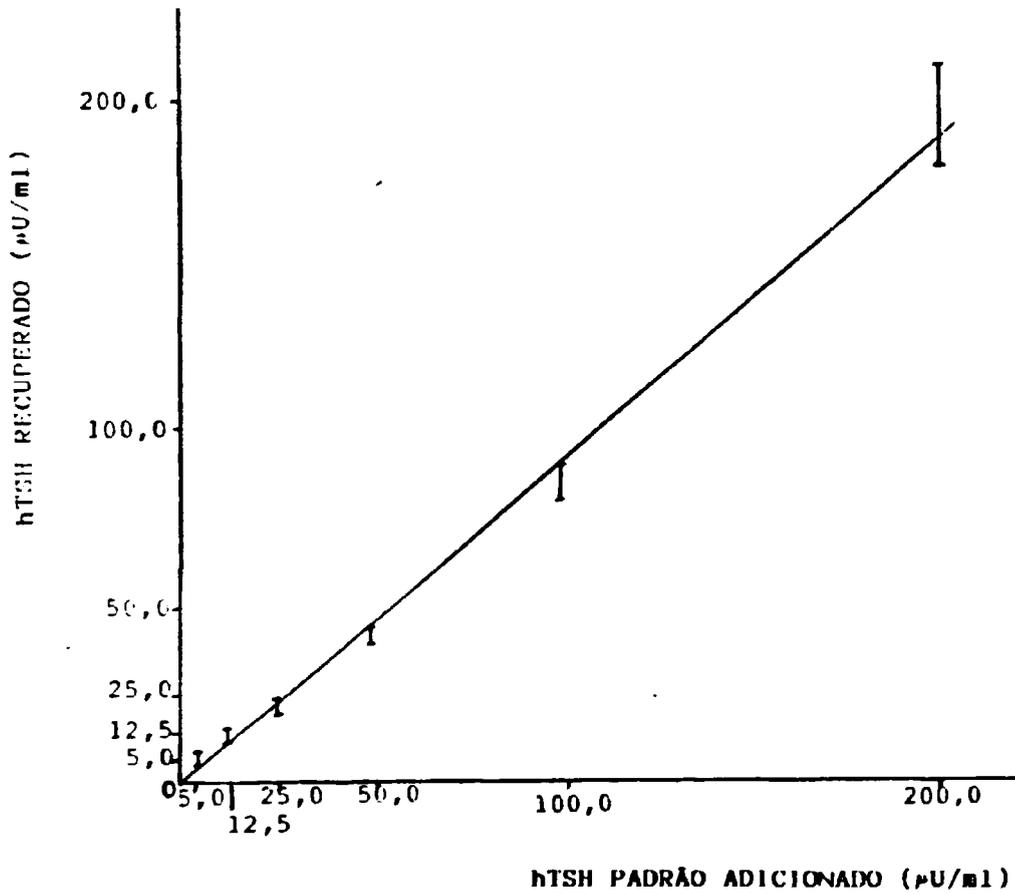


Figura 19. Estudo da recuperação do hTSH padrão adicionado a uma amostra com teor de hTSH conhecido. A reta que melhor se ajusta é a definida pela equação $Y = 0,9823 X - 4,4021$ com coeficiente de correlação significativa para $p < 0,001$.

Tabela 12. Valores da concentração de HSH das amostras controle com teor alto, médio e baixo, determinado num mesmo ensaio.

	CONTROLE BAIXO (uU/ml)	CONTROLE MÉDIO (uU/ml)	CONTROLE ALTO (uU/ml)
	28,20	92,50	192,00
	30,50	87,50	185,50
	28,50	82,50	188,50
	27,20	90,00	183,50
	29,50	82,50	187,00
	28,50	85,00	193,80
	29,50	95,00	193,50
	27,20	90,00	181,50
	28,50	88,00	186,20
	30,00	90,00	181,80
	28,80	85,00	170,50
	28,20	86,20	189,00
	28,80	90,00	180,00
	30,80	93,80	189,00
	29,80	85,00	189,20
	28,00	90,00	183,20
	25,50	97,50	181,50
	29,00	95,00	182,20
	27,50	87,50	160,20
	28,80	85,00	181,00
	28,20	90,00	184,80
	25,50	85,00	172,50
	28,50	85,00	187,50
	30,20	90,00	186,50
	29,50	98,80	191,20
Media	28,60	89,50	184,10
DP	±11,30	±14,50	±7,40
CV	4,35 %	5,06 %	4,01 %

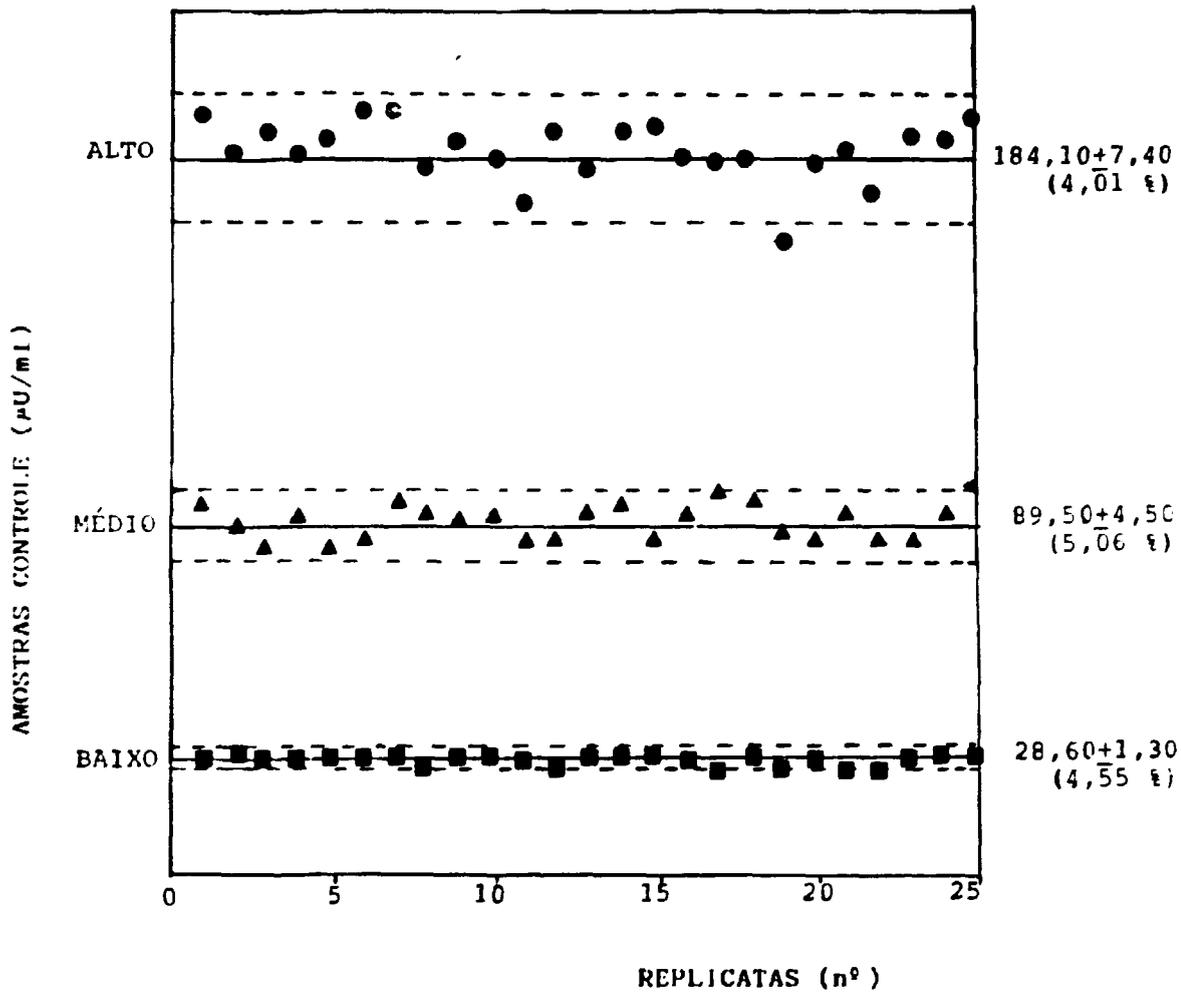


Figura 20. Variação intra-ensaio das três amostras controle dosadas com 25 replicatas. Media \pm 2 DP e CV são indicados.

Tabela 13. Valores de HTSH relativos ao estudo da precisão inter-ensaio realizado com diversos traçadores.

TRAÇADOR (n°)	AMOSTRAS CONTROLE		
	BAIXO	MÉDIO	ALTO
1	37,50	86,20	157,50
	37,50	98,75	170,00
	47,50	82,50	161,20
	32,50	95,00	176,25
2	30,00	75,00	167,50
	40,40	87,50	147,50
3	32,50	73,75	140,00
	26,25	73,75	127,50
	27,50	72,50	130,00
4	31,25	75,00	158,75
	32,50	65,00	145,00
	30,00	87,50	190,00
Média =	33,48	81,04	155,93
DP =	±6,0	±10,14	±18,75
CV =	17,76 %	12,51 %	12,20 %

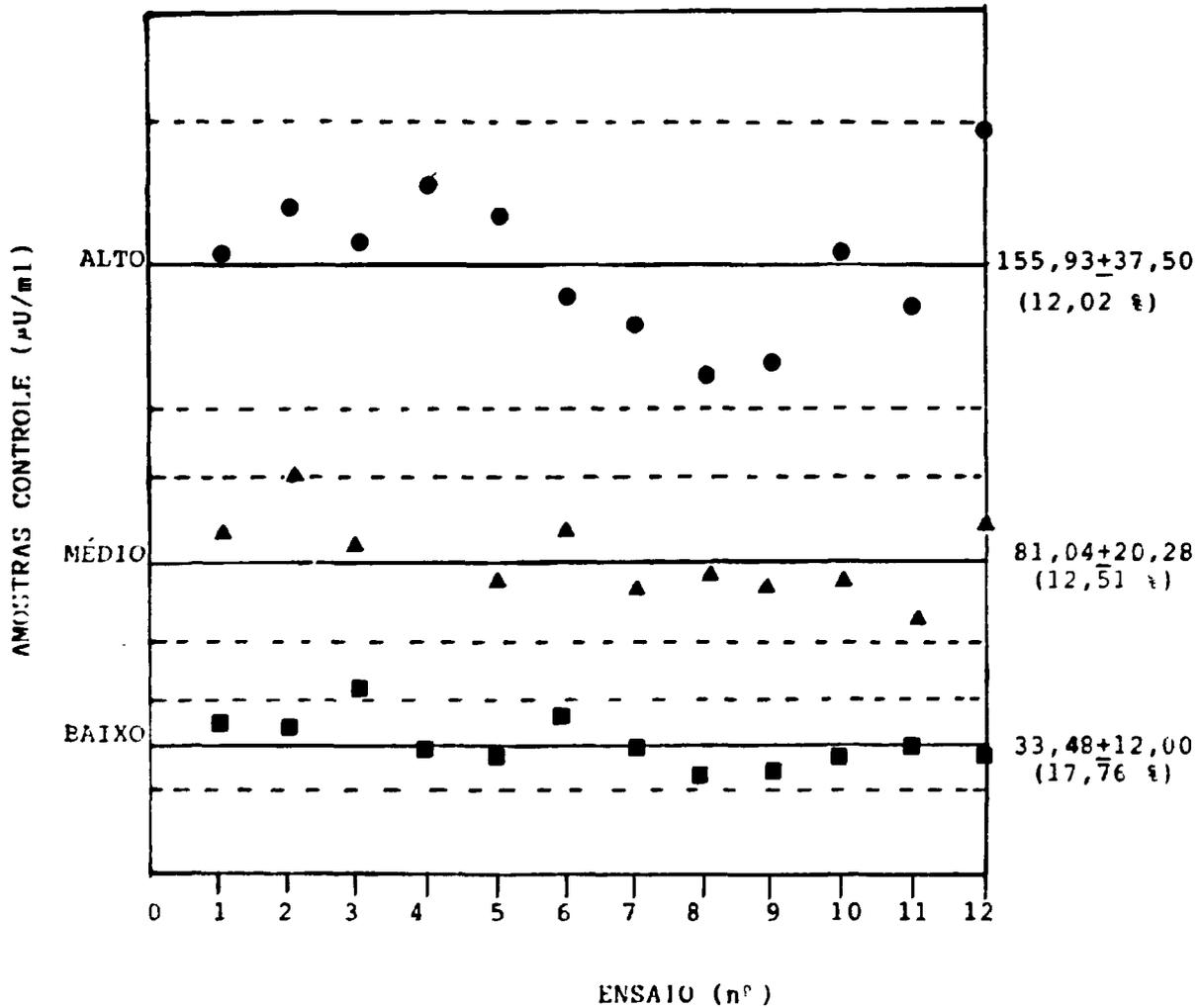


Figura 21. Variação inter-ensaio das amostras controle dosadas sistematicamente em 12 ensaios diferentes. Média \pm 2 DP e CV são indicados.

Tabela 14. Análise da sensibilidade dos ensaios de hTSH.

TRACADOR (n°)	ED ₅₀ (uU/ml)	DMD (uU/ml)
1	110,00	8,00
	137,50	11,00
	92,50	7,00
	100,00	11,00
2	58,75	4,00
	65,00	6,50
3	62,50	4,25
	66,25	4,00
	65,00	3,00
4	90,00	6,00
	72,50	5,00
	102,50	5,50
6	57,50	4,00
7	52,50	3,00
	43,75	3,00
	42,50	3,00
	37,50	3,00
8	47,50	3,50

4.2. EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO hTSH

4.2.1. OBTENÇÃO DO hTSH

A Tabela 15 apresenta os valores da atividade específica de hTSH dos vários extratos crus armazenados desde o período de 1981 a 1982, quando da obtenção do hGH no IPEN-CNEN/SP.

As Figuras 21 a 23 exibem os cromatogramas das etapas de purificação sucessivas do hTSH em Sephadex G-100, hidroxilapatita e SP-Sephadex C-50, a partir do extrato cru liofilizado (preparação C; Figuras 22 e 23) e das hipófises frescas (Figura 24). As áreas hachuradas referem-se às frações que foram reunidas e dialisadas para serem aplicadas nas purificações subsequentes.

Os valores da atividade e da recuperação do hTSH-IPEN obtido nas etapas de purificação sucessivas estão apresentados na Tabela 16. Observa-se que o aumento da atividade específica do hTSH obtido nessas etapas foi muito similar nos dois procedimentos realizados em escala proporcional, a partir do extrato cru liofilizado, empregando-se as mesmas resinas (Tabela 16 A+B).

Analisando-se os perfis cromatográficos das repurificações em Sephadex G-100, observa-se naquelas realizadas com o extrato cru liofilizado, picos referentes a componentes com peso molecular distinto do TSH (Figuras 22 A e 23 A). Esses picos não foram evidenciados quando se empregou o extrato recém obtido de hipófises frescas, cujo perfil apresentou um pico único (Figura 24 A) e recuperação de 105 % (Tabela 16 C).

As frações com maior atividade específica de hTSH reunidas nas purificações em Sephadex G-100 apresentaram um aumento da sua atividade em torno de 1,5 vezes (Tabela 16 A-C),

cerca da metade daquele obtido por Roos e cols. (84) empregando o Bio-gel P-150 (3,1 vezes).

Nas purificações subsequentes, em hidroxilapatita, as frações eluídas com o tampão na concentração de 0,2 M (Figuras 22 B e 24 B) apresentaram um aumento de aproximadamente 2 vezes na atividade do hTSH, obtido do extrato cru liofilizado, quando se empregou a hidroxilapatita preparada em nossos laboratórios (Tabela 16 A e B). Esse aumento foi de 3,3 vezes quando se utilizou o produto comercial para a purificação do extrato fresco (Tabela 16 C). No entanto, o incremento obtido por Roos e cols. (84) nessa etapa foi de 4,7 vezes.

Na última etapa de purificação em SP-Sephadex C-50, foram observados dois picos eluídos pelo tampão fosfato de potássio 0,06 M, apresentando aquele de maior força de interação com a matriz, uma atividade específica mais alta (Figuras 22 C e 24 C). Essas frações, correspondentes aos picos com atividade de hTSH maior, constituíram o hTSH-IPEN obtido a partir do extrato cru liofilizado e armazenado durante quase 10 anos a -20°C (IPEN#1 e IPEN#2) e a partir do extrato recém obtido (IPEN#3). Nessa purificação observou-se o maior aumento na atividade do hTSH, que variou de 3,9 a 4,8 vezes (Tabela 16 A a C), sendo inclusive maior do que aquele relatado por Roos e cols. (84) em purificação similar (3,1 vezes).

Apesar do extrato cru liofilizado e armazenado por longo período ter apresentado maior atividade específica de hTSH do que aquele recém obtido, o hTSH-IPEN originado desses dois extratos apresentou potência muito similar, da ordem de 2,2 U/mg (Tabela 16 A a C).

Nota-se que a atividade do hTSH-IPEN#3 aumentou 21 vezes durante sua purificação (Tabela 16 C), cerca do triplo

Tabela 15. Extratos crus de hTSH obtidos durante o preparo do hGH.

PREPARAÇÃO (DATA)	PESO TOTAL DO LIOFILIZADO (g)	PROTEÍNAS TOTAIS*		hTSH	
		(mg/100 mg de LIOFILIZADO)	(mg)	(U/mg de PROTEÍNA)	U
A (1981)	29,80	1,57	467,86	0,084	39,30
B (1981)	13,70	2,05	280,85	0,044	12,36
C (1981)	11,40	2,60	296,66	0,300	89,00
D (1982)	6,30	1,64	103,32	0,047	4,85
E (1982)	22,15	1,23	272,44	0,120	32,69
F (1982)	33,55	0,87	291,85	0,110	32,11

* Medida de absorvância a 280 nm, assumindo que $A_{1\text{ cm}}^{0.1\%} = 1,0$

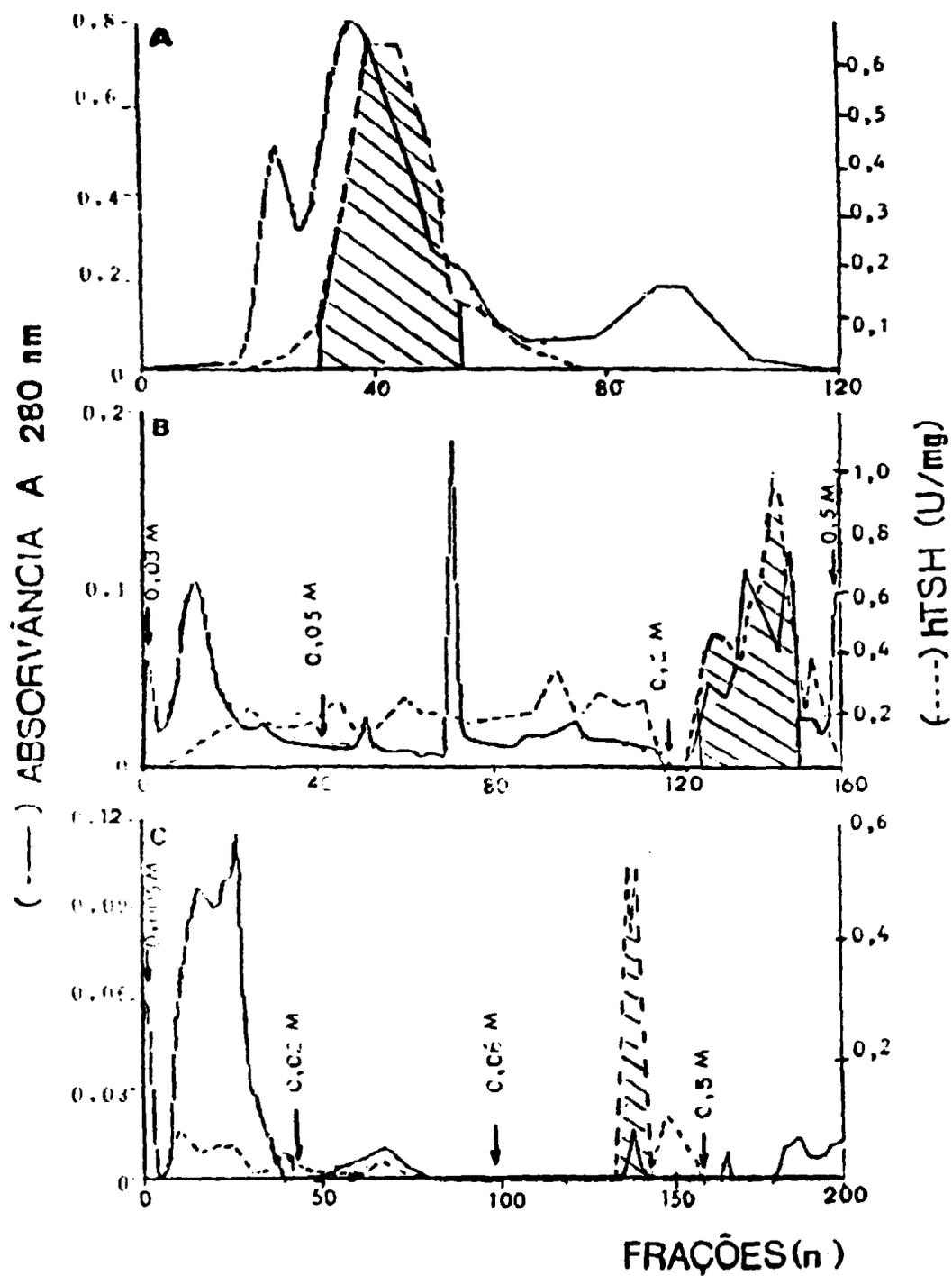


Figura 72 Cromatograma das etapas sucessivas da purificação preliminar do extrato C: A - Sephadex G-100, B - Hidroxiapatita e C - SP-Sephadex C-50.

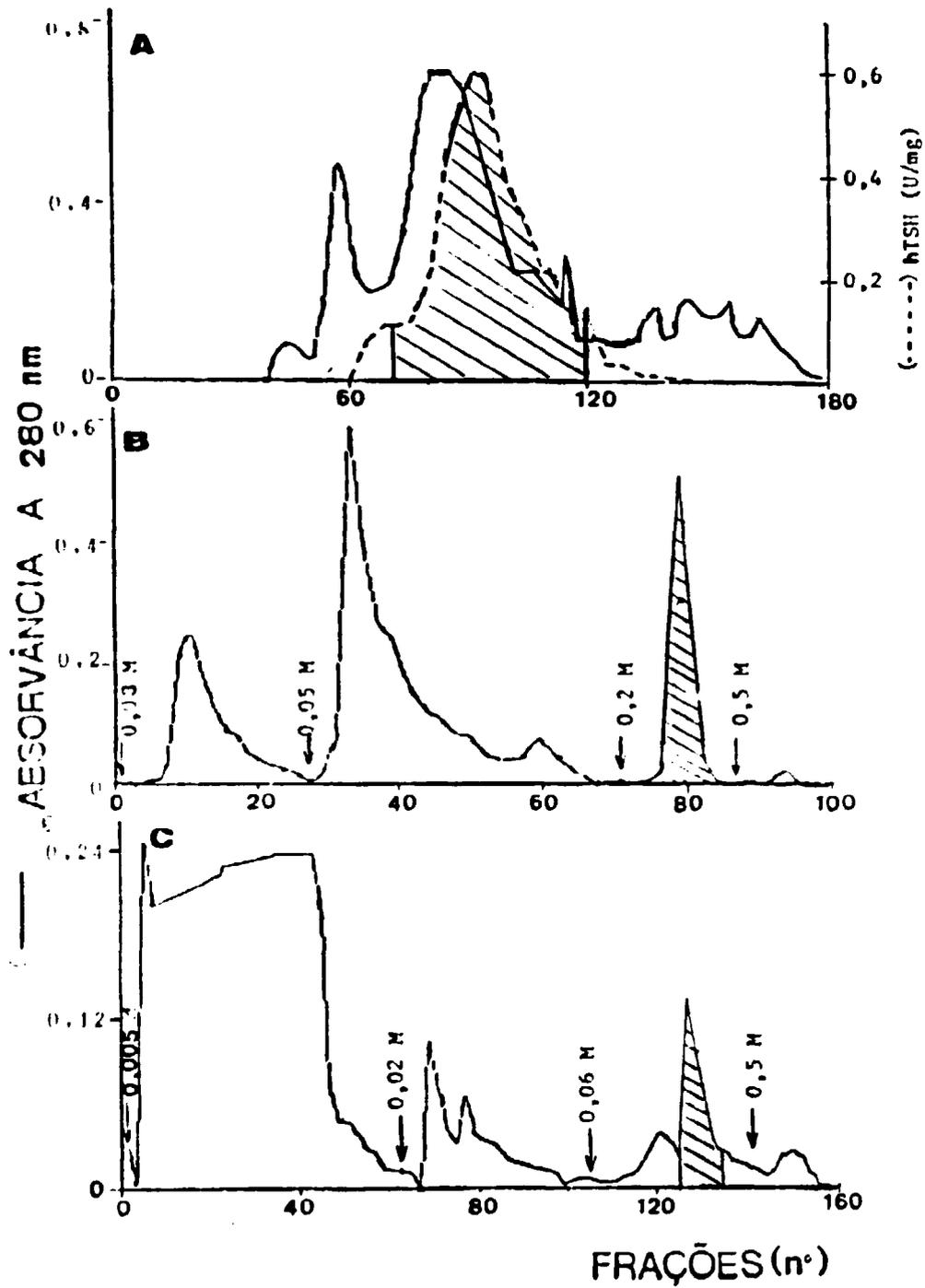


Figura 23. Cromatograma das etapas sucessivas da purificação em escala maior do extrato C: A - Sephadex G-100, B - Hidroxiapatita e C - SP-Sephadex C-50.

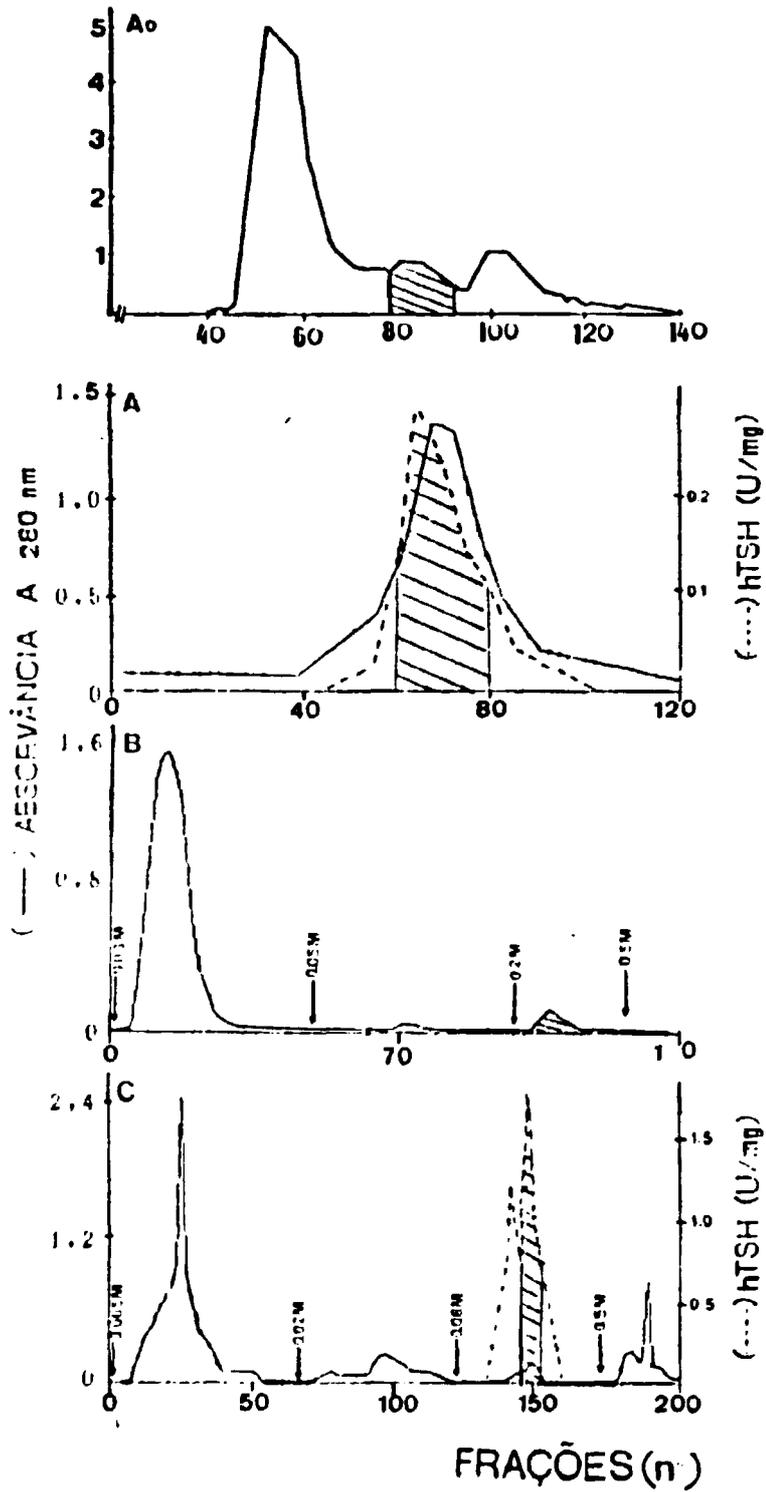


Figura 24. Cromatograma das etapas de purificação sucessivas realizadas a partir das hipófises frescas: A0 - Sephadex G-100, A - Sephadex G-100 (repurificação), B - Hidroxilapatita e C - SP-Sephadex C-50.

Tabela 16. Purificação da tireotrofina humana hipofisária. Os valores da atividade específica são expressos como média \pm DP, indicando entre parênteses o número de determinações do TSH.

ETAPA DE PURIFICAÇÃO	hTSH	nTSH	
	ATIVIDADE ESPECÍFICA (U/mg)	ATIVIDADE RECUPERADA (U)	(%)
A - Purificação a partir de extrato cru liofilizado (preliminar):			
Sephadex G-100 (#1)	0.29 \pm 0.09 (3)	11.5	100
Sephadex G-100 (#2)	0.43 \pm 0.12 (6)	4.2	37
Hidroxilapatita	0.55 \pm 0.05 (3)	1.2	11
SP - Sephadex C-50	2.29 \pm 0.00 (2)	0.1	1
B - Purificação a partir de extrato liofilizado (escala maior):			
Sephadex G-100 (#1)	0.30 \pm 0.02 (4)	77.7	100
Sephadex G-100 (#2)	0.41 \pm 0.04 (4)	30.1	30
Hidroxilapatita	0.45 \pm 0.07 (4)	9.7	13
SP - Sephadex C-50	2.15 \pm 0.35 (3)	1.9	2
C - Purificação a partir de extrato cru fresco:			
Sephadex G-100 (#1)	0.11 (1)	8.1	100
Sephadex G-100 (#2)	0.18 (1)	8.5	105
Hidroxilapatita	0.59 (1)	6.4	79
SP - Sephadex C-50	2.28 (1)	0.2	2

do aumento revelado na purificação do hTSH-IPEN#1 e #2 (Tabela 16 A e B). Este incremento foi devido não apenas ao emprego do extrato cru fresco, como também ao uso da hidroxilapatita comercial.

Entretanto, o incremento final obtido por Roos e cols. (84), que também empregaram extrato cru fresco, foi de aproximadamente 46 vezes, provavelmente por causa dos resultados melhores obtidos por esses autores com o uso do Bio-gel P-150.

Obteve-se portanto, aproximadamente 44 ug de hTSH na purificação preliminar do extrato cru antigo (IPEN#1), 884 ug na purificação deste extrato realizada em escala maior (IPEN#2) e 88 ug na purificação do extrato cru fresco obtido de 165 hipófises IPEN#3).

Na Tabela 17 são indicados os valores da recuperação dos procedimentos de liofilização a que foram submetidas a preparação hTSH-IPEN#2. Observa-se uma grande perda de material quando o hormônio é liofilizado em tampão fosfato de potássio, mesmo na presença de manitol, enquanto que a liofilização em tampão glicina-fosfato forneceu a melhor recuperação.

4.2.2. AVALIAÇÃO DE hTSH-IPEN

A Tabela 18 exhibe os resultados da radioiodação das três preparações do hTSH-IPEN. As anotações entre parênteses indicam o tempo que o hormônio permaneceu armazenado em solução a -20°C ou o meio em que foi liofilizado, conforme indicado na Tabela 2.

Como o rendimento das radioiodações realizadas com os hTSH-IPEN foi muito baixo, não foi possível estimar a atividade específica desses traçadores. Pela análise da Tabela 18 observa-se também que a maioria das preparações IPEN armazenadas em

Tabela 17. Avaliação dos procedimentos de liofilização do hTSH
 IPEN # 2. cujas condições de armazenamento estão in-
 dicadas na Tabela 2.

PREPARAÇÃO	TAMPÃO	MASSA TEÓRICA (mg)	MASSA OBTIDA (mg)	RECUPERAÇÃO (%)
# 2-A	Glicina 0,5 M - fosfato de sódio 0,05 M , pH 7,2	146,36	141,06	96,40
# 2-B	Bicarbonato de sódio 0,005 M , pH 7,0	1,76	1,55	87,10
# 2-C	Bicarbonato de sódio 0,005 M , pH 7,0 + manitol	29,17	27,85	95,50
# 2-D	Fosfato de potássio 0,06 M , pH 7,0	31,82	18,65	58,61
# 2-E	Fosfato de potássio 0,06 M. pH 7,0 + manitol	59,61	29,50	49,50

Tabela 18. Resultados obtidos nas radioiodações realizadas com o hTSH-IPEN.

PREPARAÇÃO	RADIOIODAÇÃO (nº)	RENDIMENTO (%)	Kd	
			Pico II	Pico III (¹²⁵ I-hTSH)
IPEN # 1	1	6,72	0,107	0,346
IPEN # 1 (2 meses)	2	9,00	0,111	0,352
IPEN # 2	3	5,41	0,116	0,252
IPEN # 2-A (glicina-fosfato)	4	----	0,136	0,273
IPEN # 2-B (bicarbonato)	5	----	0,176	-----
IPEN # 2-C (bicarbonato+ manitol)	6	----	0,150	-----
IPEN # 2-D (liofilizado)	7	----	0,146	-----
IPEN # 2-E (liofilizado manitol)	8	7,32	0,105	0,263
IPEN # 2 (6 meses)	9	12,77	0,123	0,263
IPEN # 3	10	4,38	0,132	0,302
IPEN # 3 (1 mês)	11	----	0,166	-----
Media =		7,60	0,134	0,293
DP =		±2,99	±0,024	±0,042
CV =		39,34 %	18,01 %	29,33 %

meios distintos, revelaram nos cromatogramas de suas marcações os picos II e III com os valores de Kd dentro da variação daqueles valores exibidos pelos traçadores NIDDKD (Tabela 4). Algumas das preparações do hTSH-IPEN#2 liofilizadas em meios distintos e do hTSH-IPEN#3, armazenado durante um mês em solução, não apresentaram o pico III, correspondente ao ^{125}I -hTSH puro e imuno-reativo.

Os perfis cromatográficos desses traçadores IPEN que apresentaram valores de Kd compatíveis com aqueles do NIDDKD estão apresentados nas Figuras 25 a 31. Nessas figuras a linha contínua expressa a radioatividade de 10 μl de cada fração e a linha descontínua indica a ligação do ^{125}I -hTSH-IPEN ao anticorpo específico, empregado em excesso. As áreas hachuradas correspondem às frações que foram reunidas para serem analisadas como traçador no RIE. A preparação IPEN#2 liofilizada após diálise contra o tampão glicina-fosfato, não apresentou imunorreatividade, apesar de ter apresentado o pico com valor de Kd correspondente ao ^{125}I -hTSH (Figura 26).

A Tabela 19 indica o resultado da análise dos quatro traçadores IPEN, que se apresentaram imuno-reativos, pela eletroforese em gel de poliacrilamida. Os eletroforetogramas desses traçadores são exibidos na Figura 32. Percebe-se que apesar dos traçadores IPEN terem apresentado um componente principal com valor de R_m dentro do intervalo dos valores exibidos pelos traçadores NIDDKD (Tabela 5), sua pureza eletroforética foi menor quando comparada com a desses traçadores (média de 43,29 % para o IPEN contra 65,65 % para o NIDDKD).

Tal como observado com o traçador NIDDKD na Figura 10, o componente secundário do traçador IPEN que migra na EGPA junto com o CT não se mostrou imuno-reativo, conforme é mostrado na Figura 33.

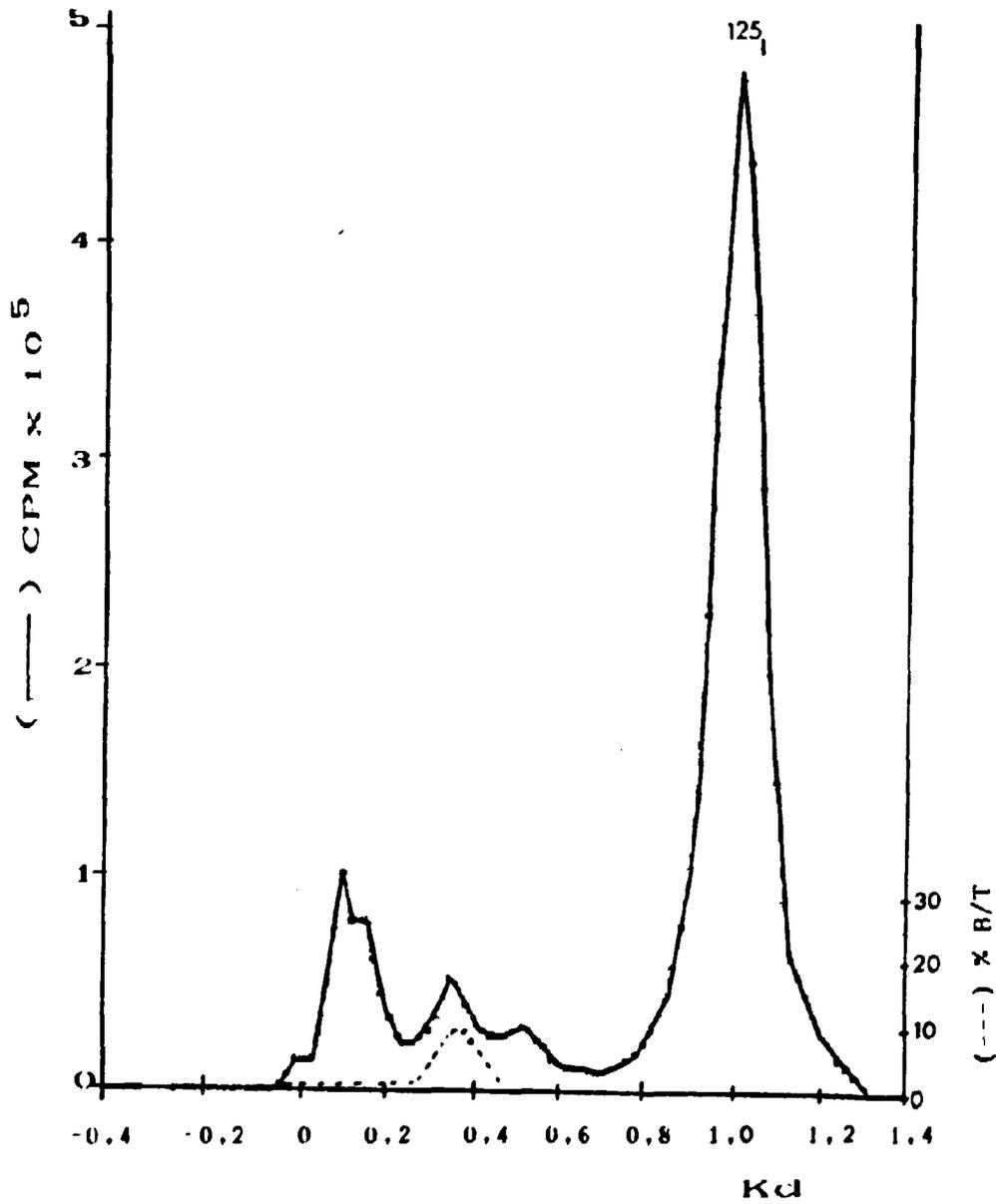


Figura 25. Cromatograma da purificação do ^{125}I -hTSH-IPEN#1 em gel de Sephadex G-100. Devido a diluição ocorrida no procedimento de diálise, foi possível radioiodar apenas 2.8 μg do hormônio.

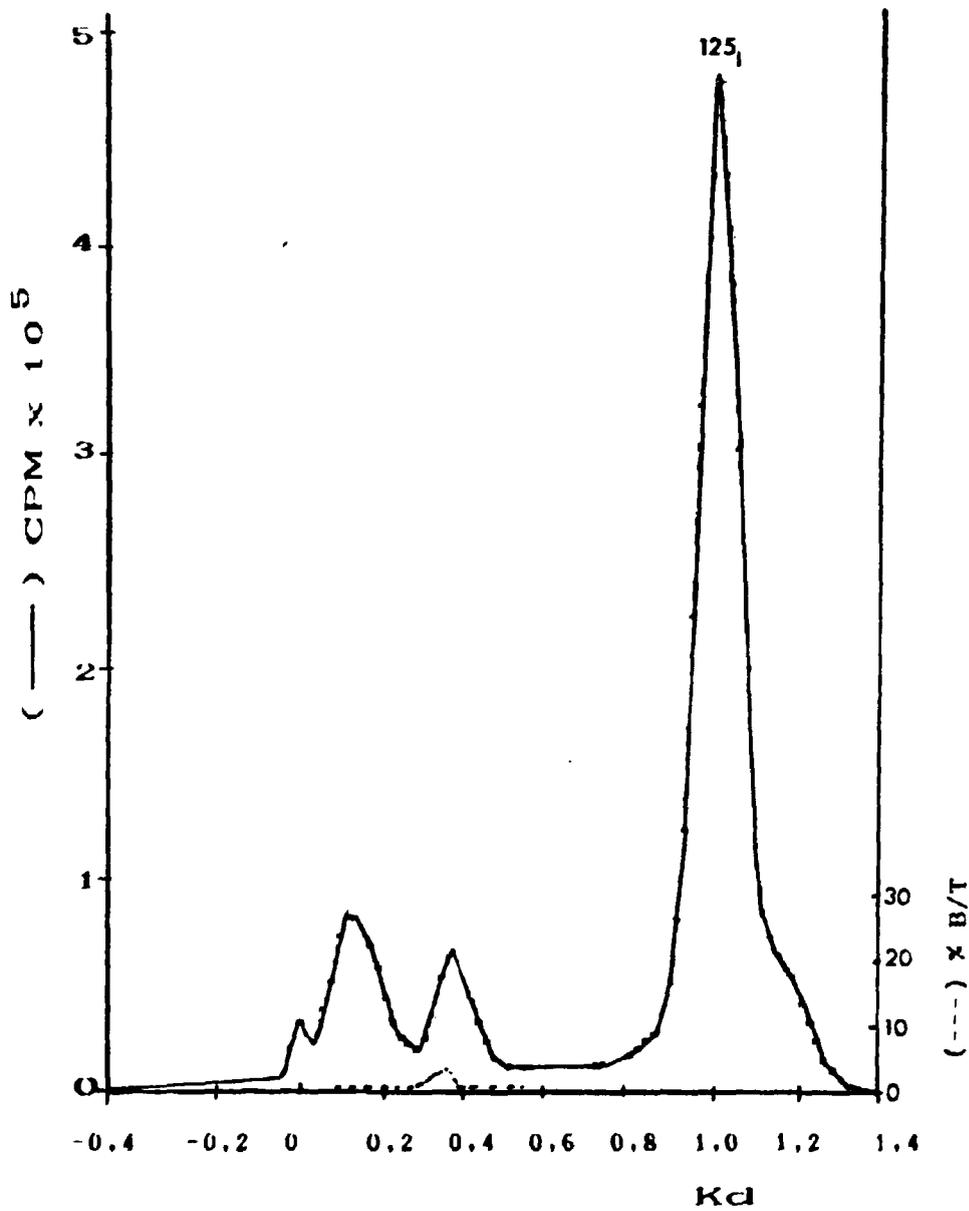


Figura 26. Cromatograma da purificação do ^{125}I -hTSH-IPEN#1 em gel de Sephadex G-100, radiolodado (2,8 μg) após 2 meses de estocagem em solução a -20°C .

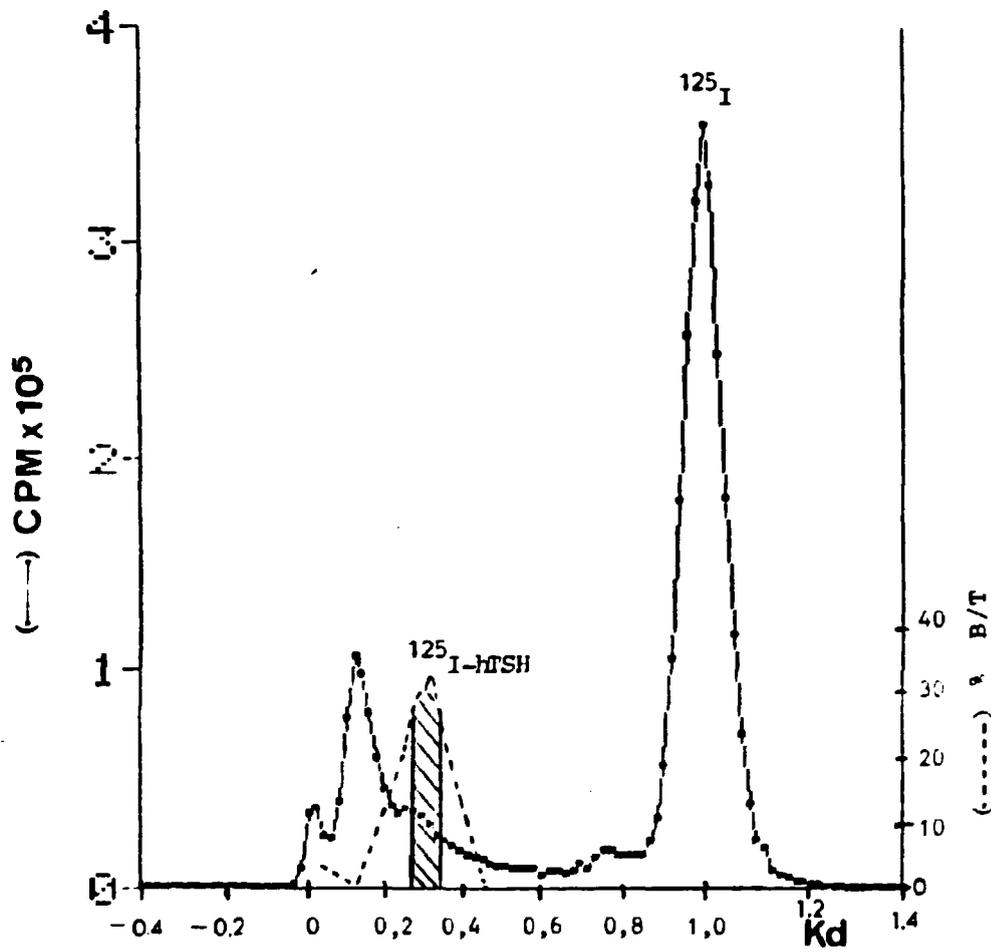


Figura 27. Cromatograma de purificação do ^{125}I -hTSH-IPEN#2 em gel de Sephadex G-100.

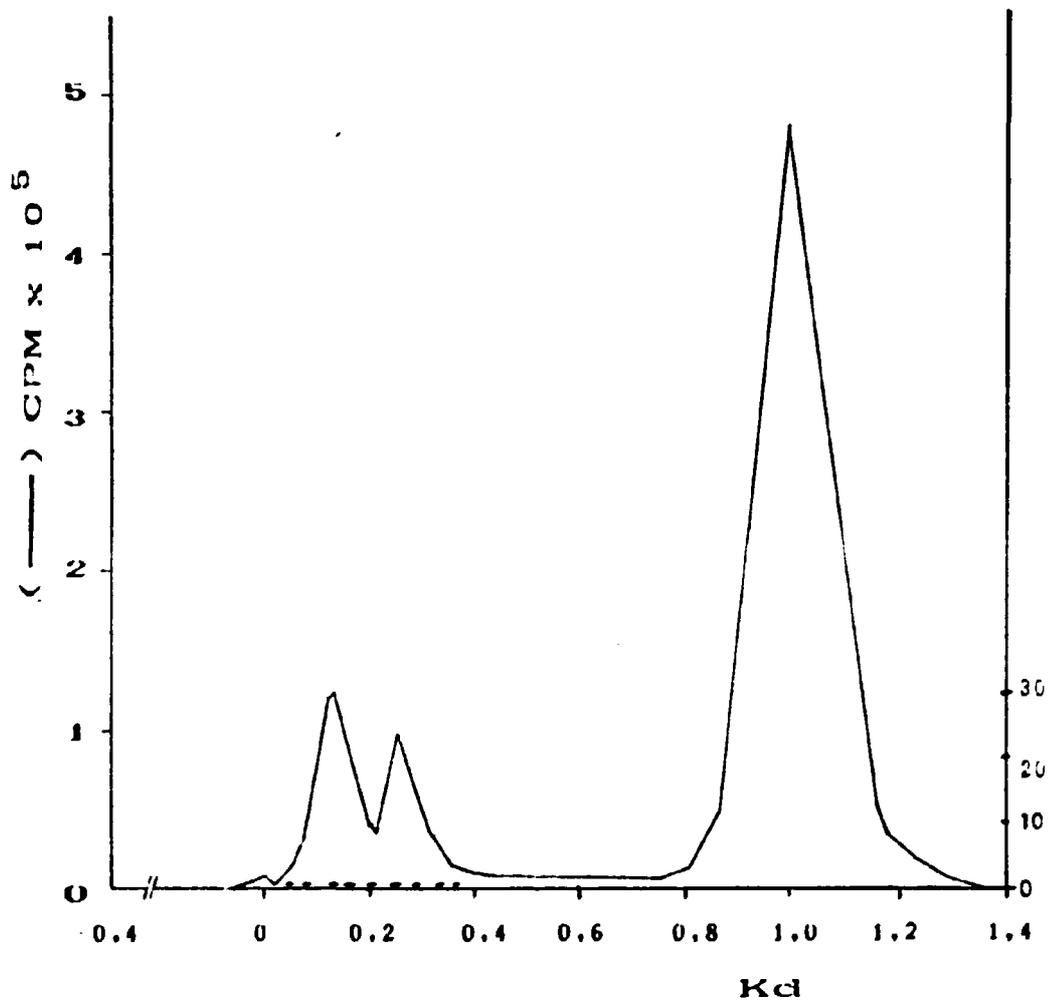


Figura 28. Cromatograma da purificação do ^{125}I -hTSH-IPEN#2-A em gel de Sephadex G-100, radioiodado após diálise em tampão glicina-fosfato seguida de liofilização.

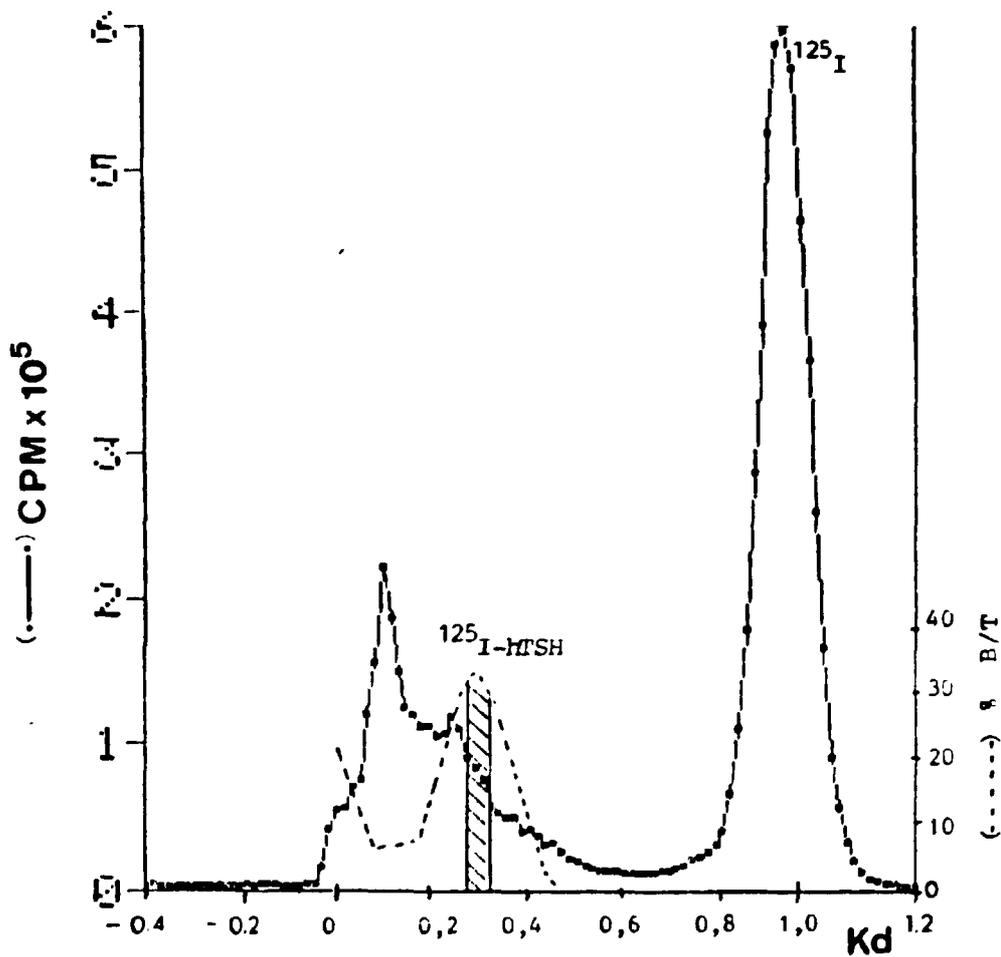


Figura 29. Cromatograma da purificação do ¹²⁵I-hTSH-IPEN#2-E em gel de Sephadex G-100, radioiodado após liofilização na presença de manitol.

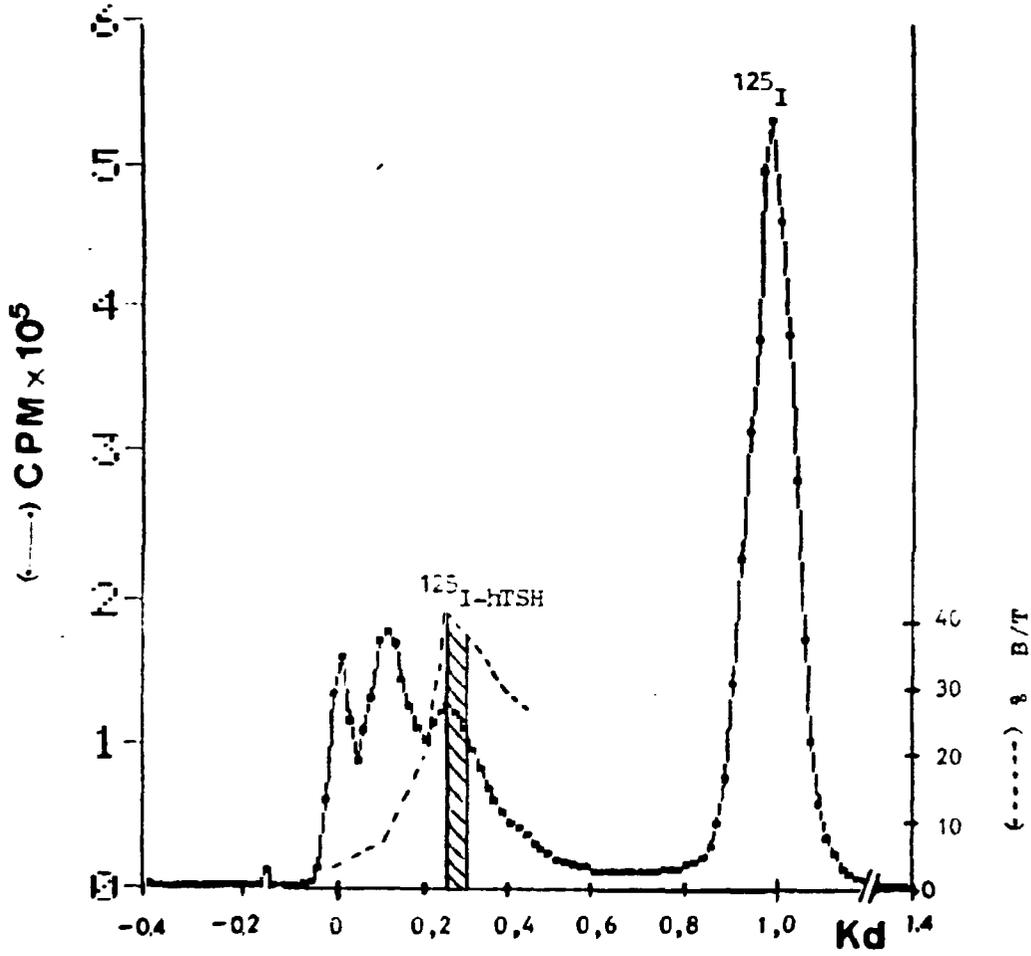


Figura 30. Cromatograma da purificação do ^{125}I -hTSH-IPEN#2 em gel de Sephadex G-100, radiiodado após 6 meses de estocagem em solução a -20°C .

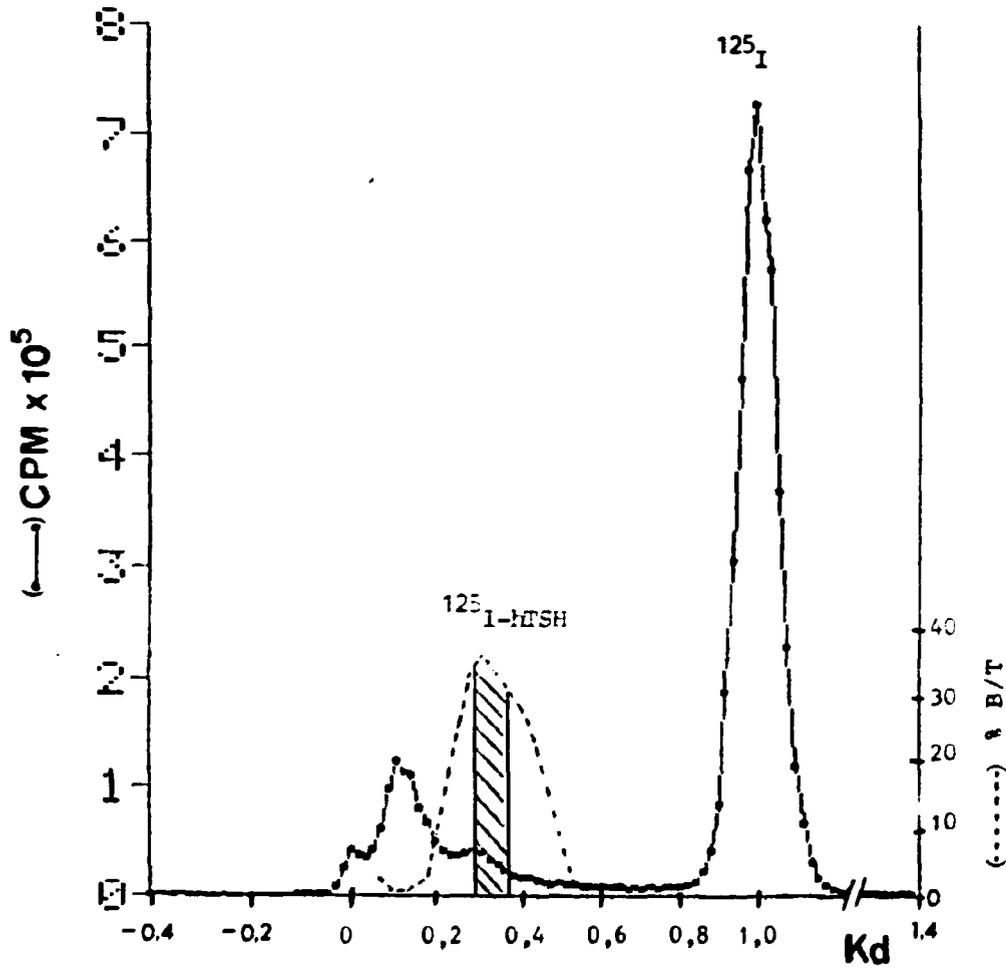


Figura 31. Cromatograma da purificação do ^{125}I -hTSH-IPEN#3 em gel de Sephadex G-100.

Tabela 19. Valores de R_m e da percentagem de pureza eletroforética dos traçadores preparados a partir do hTSH-IPEN, analisados pela EGPA.

PREPARAÇÃO	TRAÇADOR (n°)	R _m	PUREZA (%)
IPEN # 2	3	0,359	36,96
IPEN # 2-E (liofilizado + manitol)	8	0,366	46,13
IPEN # 2 (6 meses)	9	0,381	44,58
IPEN # 3	10	0,486	45,49
Média =		0,396	43,29
DP =		±0,059	±4,27
CV =		14,92 %	9,86 %

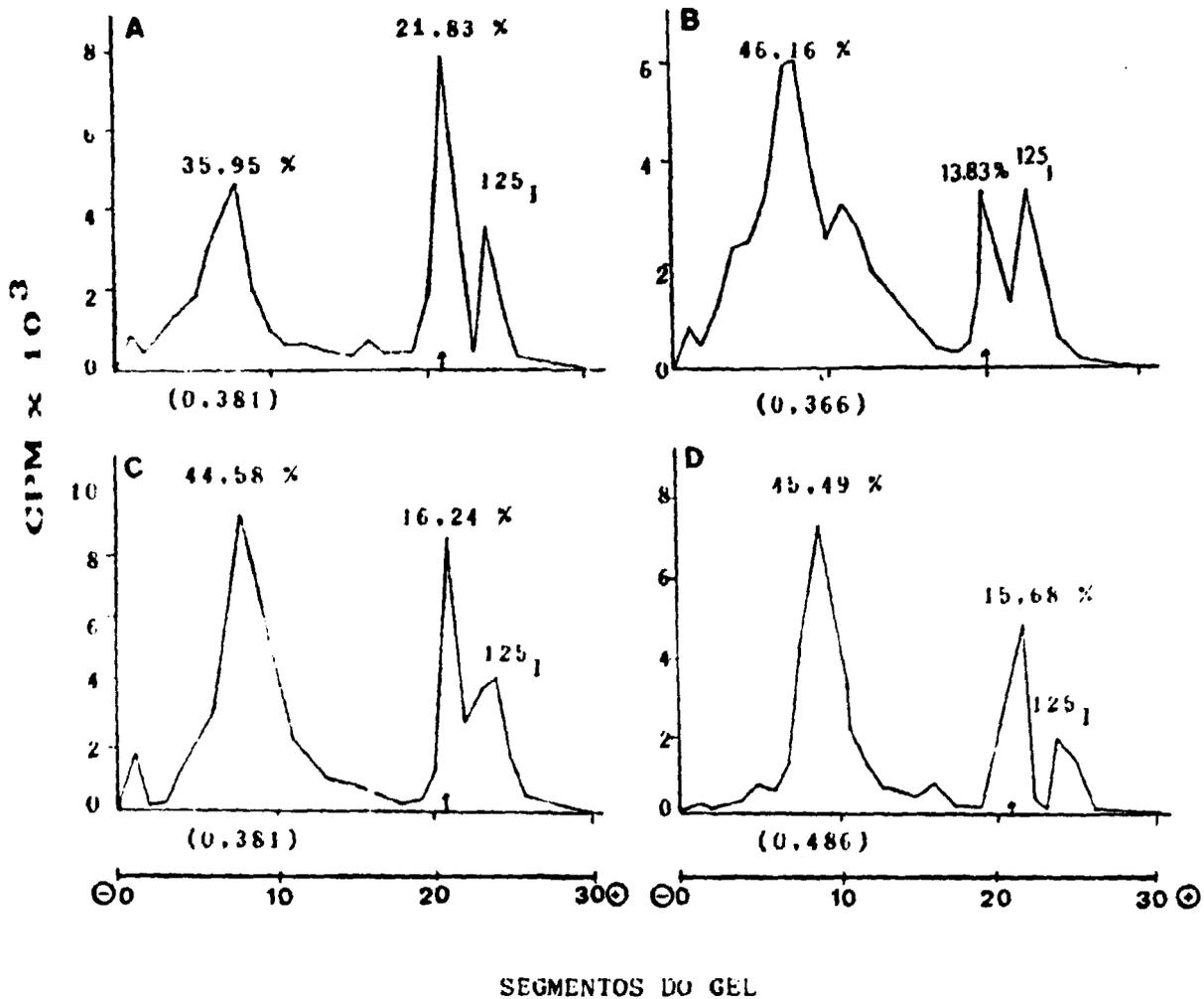


Figura 32. Eletroforetogramas dos traçadores IPEN: A - nº 3, B - nº 8, C - nº 9 e D - nº 10 conforme relacionados na Tabela 21. As setas indicam a posição do CT. Os valores de Rm do componente principal são indicados entre parênteses. Os valores percentuais dos picos correspondentes aos componentes principal e secundário e ao ¹²⁵I livre, relativos à atividade total do gel, também são indicados.

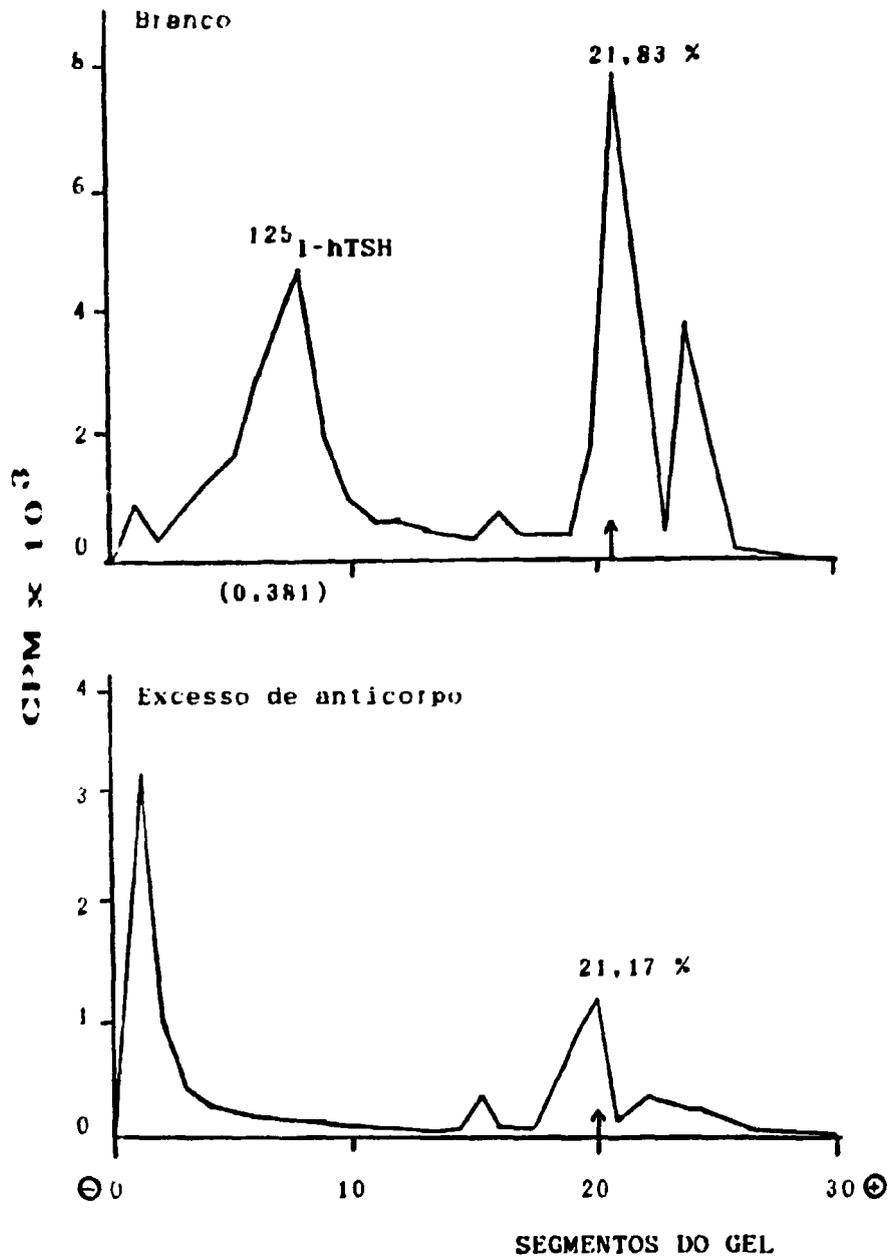


figura 33. Separação do ^{125}I -hTSH livre daquele ligado ao anticorpo em EGPA. Para esta análise empregou-se o traçador proveniente da radiiodação nº 3 do hTSH-IPEN#2. O valor de R_m do componente principal é indicado entre parênteses e as setas indicam a posição do CT. Os valores percentuais dos picos correspondentes ao componente secundário, estimados em relação a radioatividade total no gel, são também indicados.

As curvas de título do antissoro obtidos com os quatro traçadores IPEN estão apresentadas na Figura 34 em comparação com a curva obtida com o traçador NIDDKD. A Tabela 20 exibe os títulos do antissoro determinados para esses traçadores, que correspondem às diluições que forneceram a metade da ligação máxima de cada um, conforme especificado no item 3.2.6.2..

Na Tabela 21, estão arrolados os valores das ligações inespecífica e específica, de ED_{50} e de DMD dos RIEs realizadas com os traçadores IPEN comparativamente ao traçador NIDDKD e das concentrações das amostras controle.

As Figuras 35 e 36 apresentam as curvas dose-resposta realizadas com os traçadores IPEN e NIDDKD e os respectivos perfis de imprecisão intra-ensaio traçados pelo programa RIAKALK.

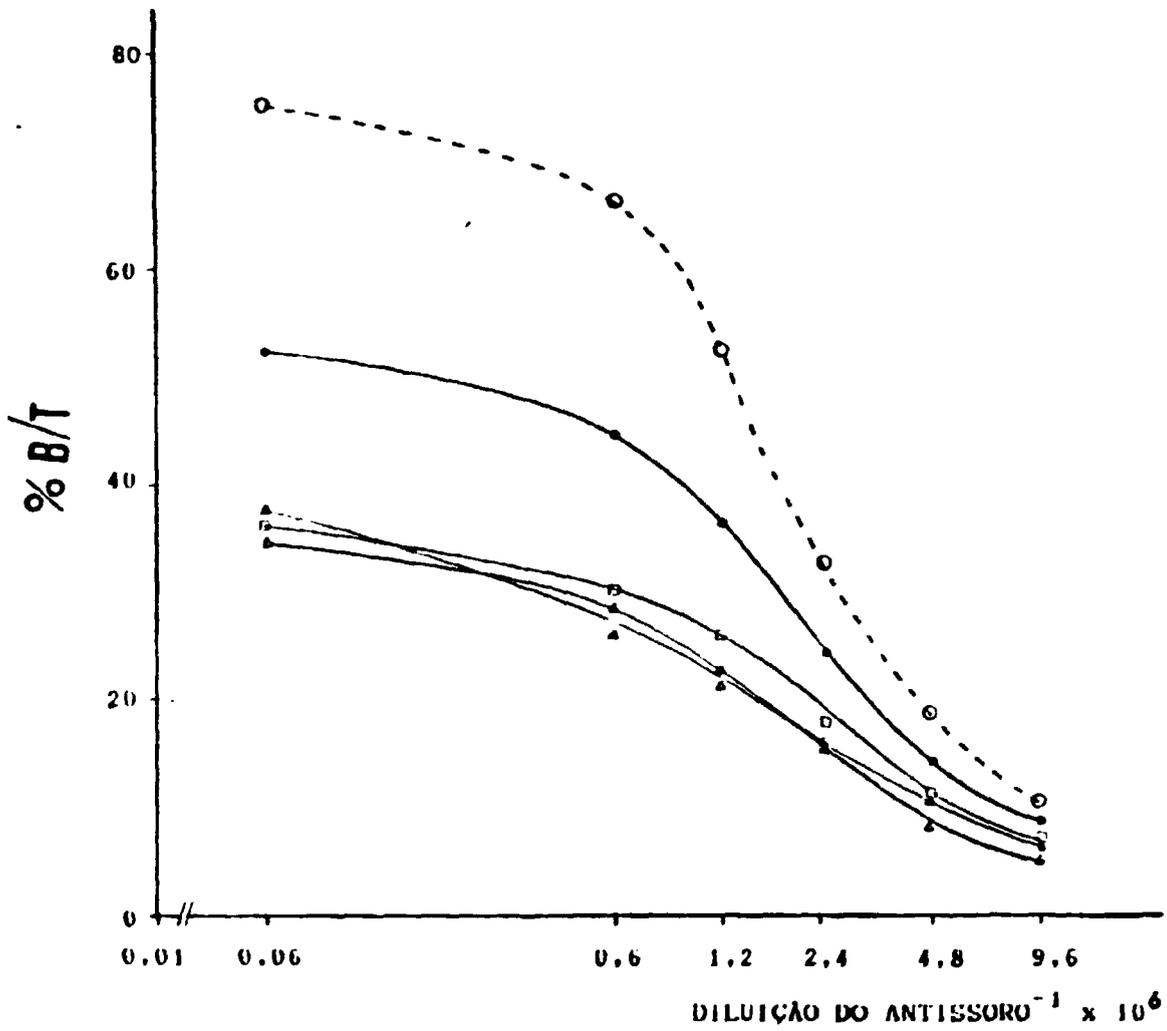


Figure 34. Curvas da titulação do antissoro anti-hTSH realizada com os traçadores IPEN nº 3 (□—□), nº 8 (▲—▲) nº 9 (Δ—Δ) e nº 10 (●—●) comparativamente com traçador NIDDKD (o---o).

Tabela 20. Título do antissoro determinado para os diferentes traçadores IPEN em comparação com o traçador NIDDKD.

PREPARAÇÃO	TRAÇADOR (nº)	TÍTULO DO ANTISSORO
IPEN # 2	3	1:1.250.000
IPEN # 2-E (liofilizado com manitol)	8	1:1.200.000
IPEN # 2 (6 meses)	9	1:1.200.00
IPEN # 3	10	1:900.000
NIDDKD	8	1:900.000

Tabela 21. Valores dos parâmetros do controle de qualidade dos RIEs realizados com os traçadores IPEN e NIDDKD.

PREPARAÇÃO	% LIGAÇÃO		ED ₅₀ (μ U/ml)	DMD (μ U/ml)	CONTROLES (μ U ML)		
	INESPECÍFICA	ESPECÍFICA			BAIXO	MÉDIO	ALTO
IPEN#2-E (liofilizado) (com manitol)	3,83	25,15	11,53	2,42	6,73	31,29	51,54
IPEN#2 (6 meses)	4,50	20,60	12,75	3,32	6,47	25,16	50,70
IPEN#1	4,97	30,20	9,40	2,03	13,12	34,04	60,34
NIDDKD	8,97	40,43	14,02	2,89	13,19	38,03	73,18

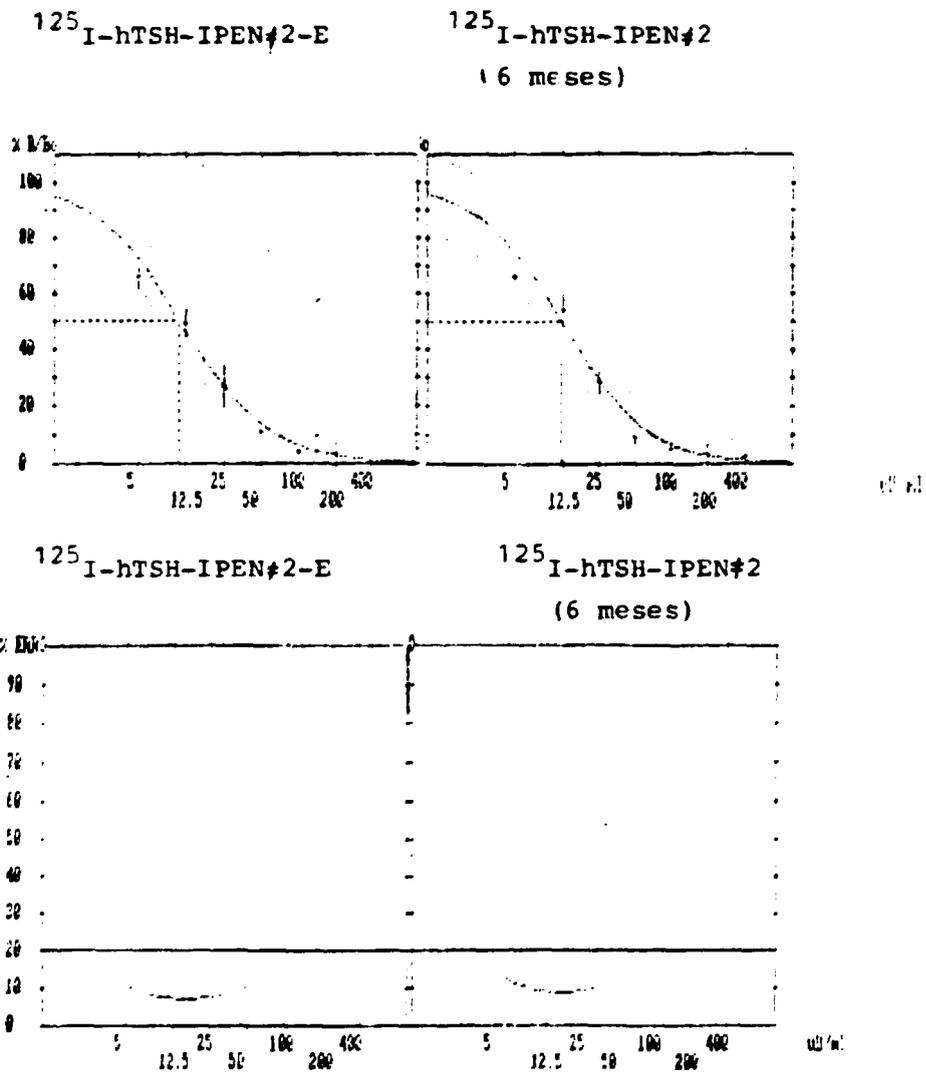


Figura 34. Curvas dose resposta (acima) e respectivos perfis de imprecisão intra-ensaio (abaixo) obtidos com os traçadores IPEN#2.

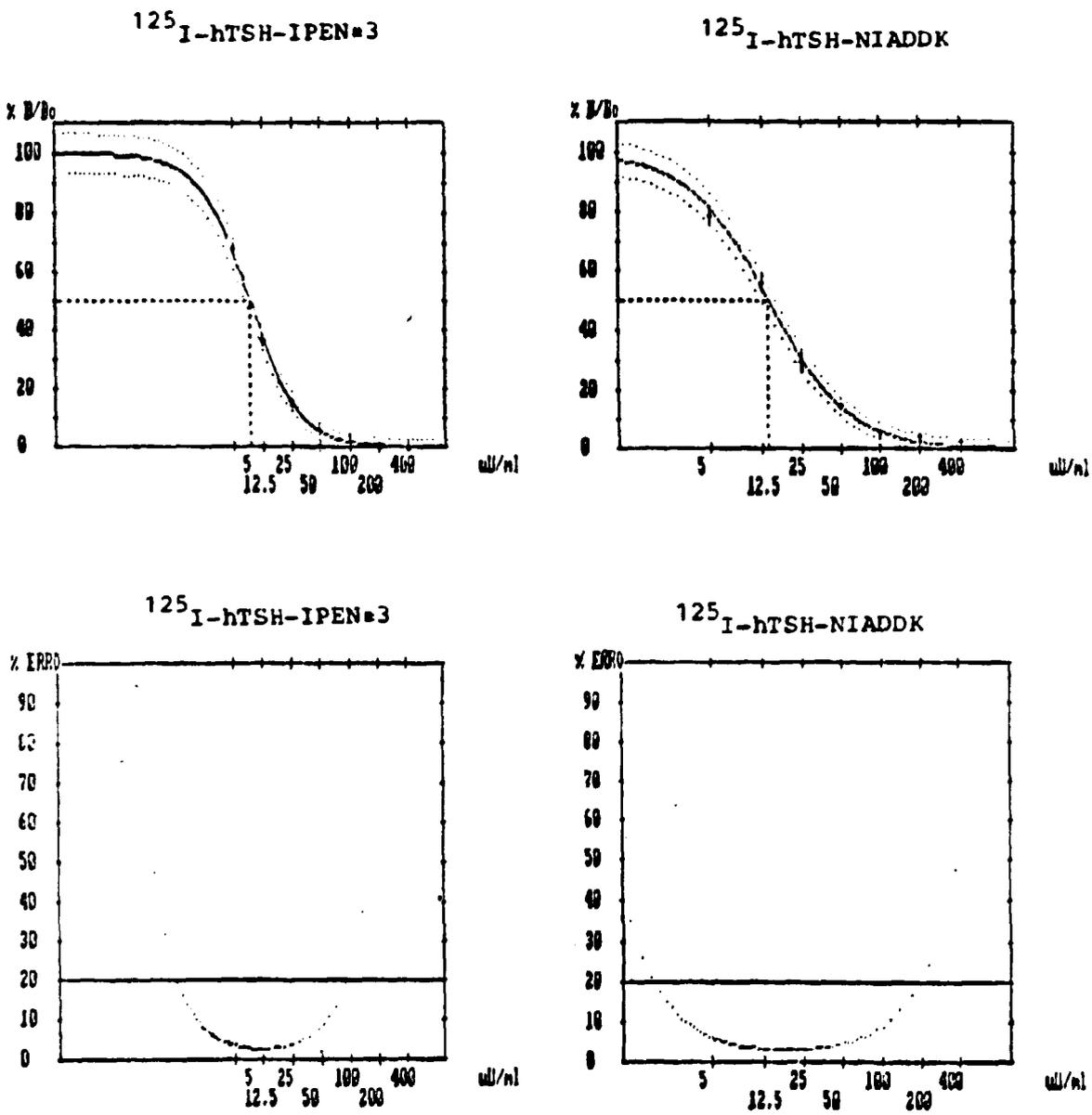


Figura 36. Curvas dose-resposta (acima) e respectivos perfis de imprecisão intra-ensaio (abaixo) obtidos com os traçadores IPEN#3 e NIDDKD.

5. DISCUSSÃO

5.1. PADRONIZAÇÃO DO RIE

O RIE de hTSH desenvolvido neste trabalho visou o doseamento deste hormônio em extrato hipofisário durante as várias etapas de sua purificação em nossos laboratórios.

Cumprе salientar que este RIE foi desenvolvido de acordo com as condições e pelo emprego dos reagentes disponíveis em nossos laboratórios, sendo portanto, realizados estudos que visavam a obtenção de resultados rápidos, reprodutíveis e fidedignos.

Conforme comprovado pela EGPA, o hTSH frio recebido do NIDDKD não sofreu degradações durante o seu transporte, nem durante seu armazenamento em solução a -20°C por 22 dias (Figura 6), sendo portanto, muito adequado para ser empregado nas radioiodações. Esses resultados concordam com as recomendações recebidas do NIDDKD de não utilizá-lo para radioiodação após o armazenamento nessas condições, por mais de um a dois meses (45).

No presente trabalho empregou-se o método de iodação descrito por Hunter e Greenwood (47), pois além de ser universalmente utilizado, seus procedimentos são simples e rápidos. Além disso, esse método já havia sido empregado em nossos laboratórios para o preparo do ^{125}I -TSH de ratos (11), bem como por vários autores para o preparo do ^{125}I -hTSH (69,99,70,68,100,63,72,39,73,50,82).

A purificação do ^{125}I -hTSH em cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-100 foi eficiente para separar o traçador (pico III) dos possíveis agregados de peso molecular

elevado (picos I e II) e do ^{125}I livre, resultando em traçadores de pureza adequada. Além disso, tal purificação possibilitou a determinação do rendimento das radioiodações e da atividade específica dos traçadores.

Os dados pouco uniformes referentes à atividade específica dos traçadores poderiam ser explicados pela atividade variável do ^{125}I efetivamente utilizada nas radioiodações (Tabela 3).

Embora a incubação com o antissoro em excesso seja uma forma muito específica de identificar o pico correspondente ao ^{125}I -hTSH puro e imunorreativo, a simples determinação de seu coeficiente de distribuição, que está relacionado com o raio molecular, pode ser o único critério empregado no reconhecimento desse pico. Os diferentes traçadores apresentaram valores precisos desse coeficiente, com CV de 16,07 % (Tabela 4).

A análise pela EGPA mostrou-se muito adequada para caracterizar o traçador, permitindo inclusive a estimativa de sua pureza. Exames similares foram realizados por Lemarchand-Beraud (59) com o TSH humano e bovino marcados com ^{131}I .

A referida análise do traçador armazenado durante 40 dias a -20°C evidenciou a diminuição de sua pureza, com aumento da liberação do ^{125}I livre (figura 11). Esse efeito poderia ser amenizado pela obtenção do hormônio marcado com atividade específica mais baixa (41). Nesse sentido, o próprio NIDDKD recomenda o emprego de uma concentração menor do agente oxidante na reação de radioiodação: 4 a 6 microgramas de Cloramina T por micrograma do hormônio (45), praticamente a metade daquela utilizada neste trabalho (10 ug).

Conforme já discutido por Hunter (48), a gradual diminuição da ligação específica do traçador ocorrida ao longo do tempo de armazenamento (Tabela 6) pode ser atribuída à perda da imunorreatividade do traçador causada pelo decaimento catastrófico do radioiodo. Esse estudo da estabilidade do traçador confirmou sua adequação para ser empregado no RIE mesmo depois de ter decorrido uma meia vida do radioiodo. Sua estabilidade está de acordo com o descrito na literatura, que se refere a períodos de armazenamento de 5 a 6 semanas (30,41).

Como já verificado por vários autores para o RIE de hTSH (50, 72, 73), a adição ulterior do traçador aumentou a sensibilidade do ensaio, enquanto que o valor da ligação específica permaneceu inalterado (Figura 14).

A técnica de separação empregada no RIE foi a da precipitação da fração ligada pelo PEG (72), que por ser um reagente de custo baixo era disponível em grandes quantidades nos laboratórios da Divisão de Medicina do IPEN-CNEN/SP. O princípio da separação pelo PEG tem como função diminuir a solvatação das moléculas biológicas, provocando assim, sua precipitação. O emprego de PEG como agente separador atende não apenas às exigências referentes ao custo bem como aos critérios de praticabilidade (rapidez e simplicidade), aplicabilidade e reprodutibilidade do método de separação. Sua principal desvantagem é o valor da ligação inespecífica elevado (5 a 15 %) podendo fornecer valores mais elevados para hormônios protéicos (20). Portanto, recomenda-se que sejam efetuados estudos para estabelecer as condições ideais de separação para cada ensaio em particular (28,20).

A concentração ideal de PEG a ser empregada na separação dos ensaios correspondeu a 25 %, em torno da qual as ligações foram constantes, apresentando os menores valores para as ligações inespecíficas e os valores mais elevados para as específicas (Figura 15).

Por não requer período adicional de incubação, a introdução de uma etapa de lavagem seguida de reprecipitação na separação do ensaio não comprometeu muito o tempo necessário para a obtenção dos resultados. Além disso, as curvas dose-resposta comparativas obtidas pela separação com PEG seguida ou não de lavagem e reprecipitação foram sobreponíveis, apresentando resultados similares para as amostras controle (Figura 16). Deste modo foi possível diminuir pela metade o valor da ligação inespecífica mantendo-o dentro dos limites aceitáveis relatados na literatura (21).

Tendo em vista as condições dos nossos laboratórios, o método de separação pelo PEG além de ser menos oneroso, mostrou ser eficiente e bastante satisfatório às nossas necessidades.

Outro achado que merece ser mencionado diz respeito a correlação altamente significativa ($p < 0.01$) verificada entre os valores da ligação inespecífica estimados na ausência de hTSH frio e na presença de hTSH padrão em excesso (Tabela 22), facultando a substituição do padrão pela solução fosfo-salina na determinação deste parâmetro do RIE.

A oportunidade de poder empregar o MRC Research Standard A (63/14) como padrão do RIE foi de grande importância para comparar os resultados da extração do hTSH realizada neste trabalho com aqueles obtidos por outros autores que se utilizaram do mesmo padrão hormonal (84, 46). Esse padrão, recebido do Medical Research Council em 1973 e armazenado a -20°C , não se deteriorou durante sua longa estocagem a temperatura baixa, confirmando as observações de Pekary e cols. feitas em 1975 (72) sobre sua

Tabela 22. Valores percentuais comparativos da ligação inespecífica obtida em diferentes ensaios substituindo ou não o hTSH padrão (Standard A) pela solução fosfo-salina.

ENSAJO (nº)	hTSH ZERO µU/ml	hTSH 400 µU/ml
1	4,30	5,20
2	4,50	6,40
3	6,90	7,00
4	7,60	7,60
5	2,60	4,30
6	3,90	4,70
Média =	4,97	5,67
DP =	±1,90	±1,33
CV =	38,28 %	22,66 %

$$Y = 2,5955 + 0,6586 X, r = 0,9421$$

Entretanto, o Standard A já foi substituído pelas preparações de referência internacionais estabelecidas pela Organização Mundial da Saúde em 1974 e em 1983 (WHO hTSH INT. STD. 68/38 e 80/558, respectivamente (37), ao mesmo tempo em que a preparação de referência para o RIE de hTSH-RP-1 (LER 1952), elaborada pelo Dr. Leo Reichert Jr. na Albany Medical College of Union University, E.U.A., tem sido distribuída pelo NIDDKD. Portanto, comparou-se o emprego dos padrões Standard A e RP-1 na construção da curva dose-resposta do RIE, obtendo-se curvas perfeitamente superponíveis (Figura 37).

O controle da qualidade do RIE, tradicionalmente realizado pelas medidas de especificidade, exatidão, precisão e sensibilidade (2,65), garante a segurança ou fidedignidade dos resultados obtidos. No presente trabalho esses parâmetros foram rigorosamente investigados.

A linearidade e a alta correlação demonstradas entre a diluição da amostra e a concentração hormonal determinada ($p < 0,001$), comprovam a inexistência de fatores interferentes na diluição, sendo portanto uma prova da especificidade do ensaio, conforme preconizado por Yalow (103) e permitem a diluição das amostras dos extratos hipofisários. A distribuição dos pontos referentes às diferentes diluições da amostra quando transferidos para a curva dose-resposta (Figura 18) revela o idêntico comportamento das amostras e do padrão, validando a técnica proposta.

O estudo da exatidão do RIE que exprime a relação entre o valor determinado e o valor real, revelou também correlação linear altamente significativa entre as quantidades de hTSH padrão adicionado e aquele recuperado ($p < 0,001$), cujo coeficiente da correlação é considerado excelente (64). Além

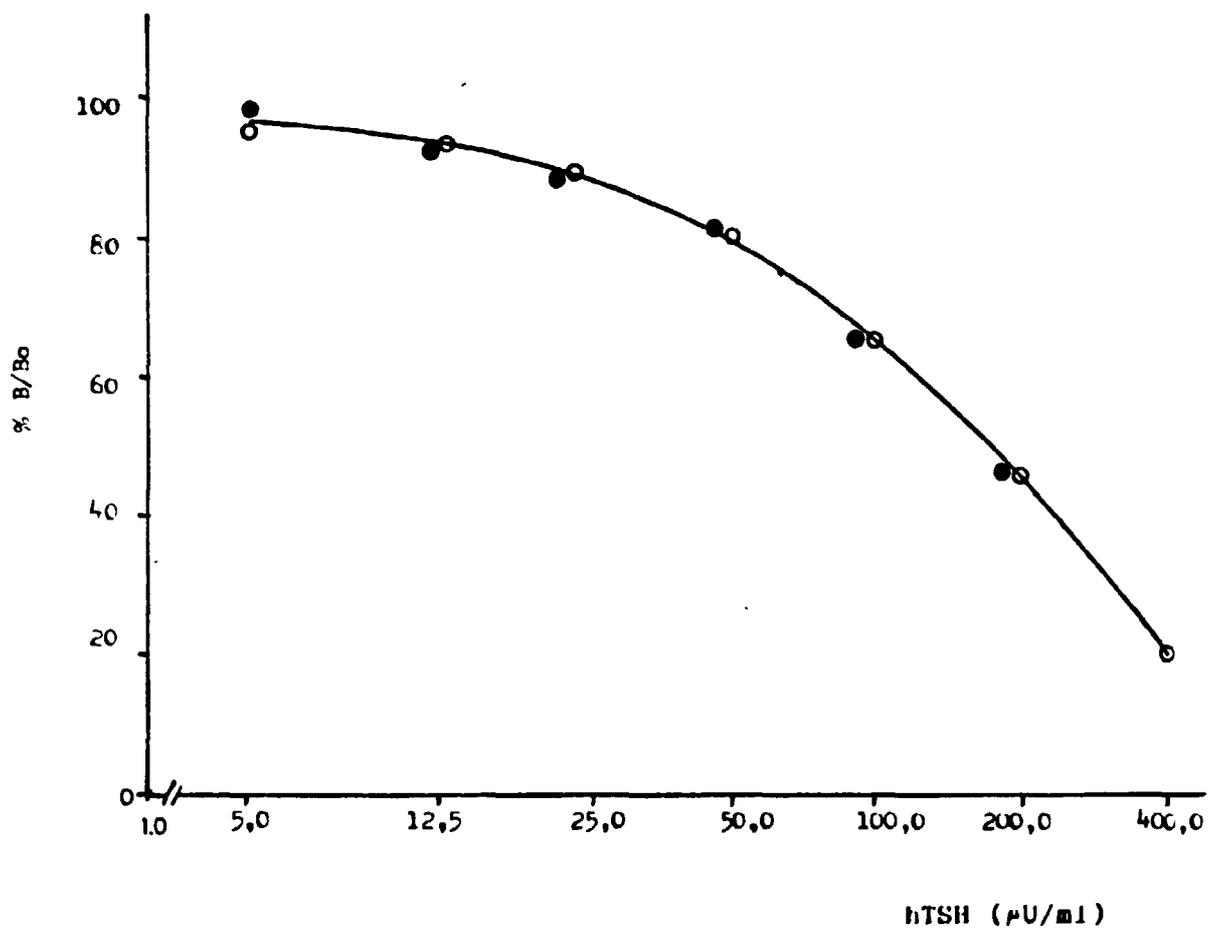


Figura 37. Curvas dose-resposta do RIE de hTSH construídas com os padrões Standard A (o—o) e RP-1 (●—●).

disso, esses valores da recuperação estão de acordo com os já descritos por Borghi e cols. para os RIEs de glucagon (12) e gastrina (13).

Os resultados obtidos na análise de precisão do método, que descreve a reprodutibilidade intra e inter-ensaio, acusaram valores do coeficiente de variação considerados excelentes para o intra-ensaio e aceitáveis para o inter-ensaio (63), para os três níveis hormonais analisados (Tabelas 12 e 13, respectivamente). Segundo as observações de Rodbard (80) já era de se esperar maior imprecisão inter-ensaio do que intra-ensaio.

A sensibilidade dos RIEs, que depende da afinidade entre o antígeno e o anticorpo e do erro dos pontos da curva dose-resposta (90), apresentou valores de DMD variando de 3,00 a 15,00 uU/ml (Tabela 14).

O RIE desenvolvido neste trabalho também poderia ser utilizado na determinação dos níveis de TSH sérico em indivíduos normais e hipotireóides, desde que a curva dose-resposta fosse preparada em soro isento de TSH, a fim de compensar os efeitos inespecíficos do soro.

O emprego desse RIE na determinação dos níveis de TSH séricos em indivíduos hipertireóides, que requer um nível de sensibilidade raramente encontrado na literatura, também exigiria que se aumentasse sua sensibilidade.

5.2. OBTENÇÃO DO hTSH

Com o estabelecimento das condições de um ensaio para dosagem de TSH nos extratos hipofisários humanos, foi possível acompanhar as várias etapas de purificação para obtenção desse hormônio.

Tendo em vista o restrito suprimento e a difícil obtenção de glândulas hipofisárias frescas, o presente trabalho tem como característica principal o estudo da possibilidade do aproveitamento de extratos crus de hTSH provenientes de outras purificações hormonais.

Uma das dificuldades em se obter hormônios glicoprotéicos altamente purificados como o TSH, é devida não só ao seu polimorfismo como também a inativação parcial que sempre ocorre durante os processos de purificação e estocagem desses hormônios (75):

Analisando-se os valores da atividade específica do hTSH nos procedimentos de purificação, observa-se que o emprego de extrato fresco apresentou um aumento significativo em comparação com o uso de extrato cru liofilizado. Além disso, observa-se que, a partir dos dois extratos, a maior perda ocorreu na última etapa de purificação, na qual a atividade recuperada foi de aproximadamente 2 %. Este resultado indica a importância da concentração protéica na preservação da atividade do hormônio, pois nesta fase da purificação o hTSH já bastante puro, encontrava-se em solução muito diluído, condição em que sua degradação é mais rápida (55).

Alguma perda de material protéico poderia também ser devida a aderência nas paredes dos tubos de vidro utilizados na coleta das frações cromatográficas ou dos próprios frascos de liofilização.

Porém, apesar do rendimento baixo e das perdas ocorridas, também devidas aos procedimentos de ultrafiltração e diálise, a potência do hTSH obtido (aproximadamente 2,2 U/mg) foi cerca da metade (46) e um quarto (84) daquela determinada por radioimunoensaio em outras preparações, empregando o mesmo hormônio padrão Standard A, e cerca da metade (97), um terço (45), o nonuplo (19) e até 17 vezes (91) da potência estimada em outras preparações utilizando padrão equipotente (WHO 68/38).

Outro dado que reforçou a importância da concentração protéica na preservação do TSH em solução foi observado quando foram radioiodados o hTSH-IPEN#2, mantido em solução a -20°C durante seis meses na concentração de 83 $\mu\text{g/ml}$ e o hTSH-IPEN#3, estocado durante um mês nas mesmas condições numa concentração de 8 $\mu\text{g/ml}$. O primeiro forneceu um traçador ainda imunorreativo, mesmo após seis meses de armazenamento, enquanto que o segundo não se prestou para radioiodação após um mês de seu preparo (Tabela 18).

A forma de acondicionamento do hTSH é portanto muito crítica para garantir seu emprego no preparo dos reagentes do RIF, principalmente do traçador.

Todas as preparações de hTSH padrão contêm lactose, albumina (humano ou bovina), ou ambar, como substâncias protetoras (4). Porém, não foi possível preservar o hTSH-IPEN com albumina, pois quando do preparo do traçador esta também seria radioiodada e por ter aproximadamente o dobro do peso molecular do hTSH, não

seria convenientemente separada do ^{125}I -hTSH na cromatografia de exclusão molecular. Para obviar estes inconvenientes, proteínas de peso molecular elevado ou técnicas de purificação do ^{125}I -hTSH alternativas poderiam ser experimentadas.

Com relação ao açúcar, empregou-se o manitol que era o único disponível em nossos laboratórios. Entretanto, ele não se mostrou eficiente quando adicionado ao hTSH-IPEN#2 mantido em tampão bicarbonato (Tabela 18), possivelmente devido a algum dano já ocorrido no hormônio durante o processo de diálise (item 3.2.3.2.).

Alguns autores empregaram outras substâncias protetoras, tais como o glicerol para armazenar soluções protéicas a -20°C ou o etilenoglicol (40) durante a purificação de outras proteínas. Entretanto, como o glicerol é explosivo em contato com agentes oxidantes fortes (102), ele não pode ser utilizado na estocagem do hTSH destinado a radioiodação em que o oxidante Cloramina T é empregado.

O emprego do etilenoglicol na preservação do hTSH para fins de radioiodação foi avaliado dissolvendo-se o hormônio do NIDDKD, hTSH-16, em fosfo-salina contendo 50 % de etilenoglicol. Porém, nessas condições, o hTSH não foi marcado (dados não apresentados), sugerindo ter o etilenoglicol utilizado toda a Cloramina T disponível na mistura de reação.

Independentemente da forma de estocagem das preparações IPEN, os traçadores preparados com esse hormônio apresentaram qualidade inferior daqueles preparados com o hTSH-NIDDKD. Os rendimentos de suas marcações (Tabela 18) foram menores quando comparados com aqueles das marcações do hTSH-NIDDKD (Tabela 3). Nem mesmo a purificação do ^{125}I -hTSH-IPEN#2 numa

coluna mais alta forneceu resultados melhores, conforme mostra a Figura 38.

Além disso, a pureza eletroforética dos traçadores IPEN também foi inferior daquela dos traçadores NIDDKD, com valores médios de 43,29 % para o primeiro (Tabela 19) e 65,65 % para o segundo (Tabela 5).

Esses achados foram confirmados quando de seu emprego na construção das curvas de título do antissoro específico, nas quais o traçador IPEN#3 apresentou-se mais imunorreativo do que o IPEN#2, porém menos reativo do que o traçador NIDDKD (Figura 34). A análise comparativa dos RIEs realizados com esses traçadores também corroborou essas observações (Tabela 21 e Figuras 35 e 36).

Os resultados obtidos no presente estudo indicam que as condições empregadas na purificação do hTSH hipofisário não permitiram a obtenção de um produto com grau de pureza elevado, que é condição fundamental para o preparo de traçadores adequados para RIE (49). Embora tenha sido descrito, mais recentemente, uma técnica de purificação altamente específica para o hTSH hipofisário (51,52), os procedimentos empregados no presente trabalho foram compatíveis com os materiais disponíveis em nossos laboratórios. Entretanto, quando o hTSH-IPEN foi utilizado como padrão secundário do RIE em comparação com o Standard A, obtiveram-se curvas dose-resposta paralelas (Figura 39), sugerindo a adequação da purificação realizada para tal finalidade. Para tanto, as condições de acondicionamento do hTSH e o estudo de sua estabilidade deveriam ser estabelecidas.

Segundo Sizaret (92), o mais importante num padrão não é sua pureza, mas a sua similaridade com as substâncias as quais é comparado. Portanto, a pureza elevada de um produto pode ser dispensável se ela ocasionar a sua instabilidade.

Deve-se salientar que, apesar de nos países desenvolvidos os métodos radioimunológicos já terem sido substituídos por métodos não-isotópicos, nos países em desenvolvimento como o Brasil, o RIE ainda é utilizado no diagnóstico clínico e espera-se que ele tenha uma vida longa (76). Mesmo que no futuro ele seja substituído, todos os métodos imunológicos exigem antígenos e anticorpos. Portanto, a padronização de um método de extração e purificação do TSH a partir de hipófises humanas é muito importante, pois por ser uma molécula complexa, até o presente não se conseguiu sua síntese por biotecnologia.

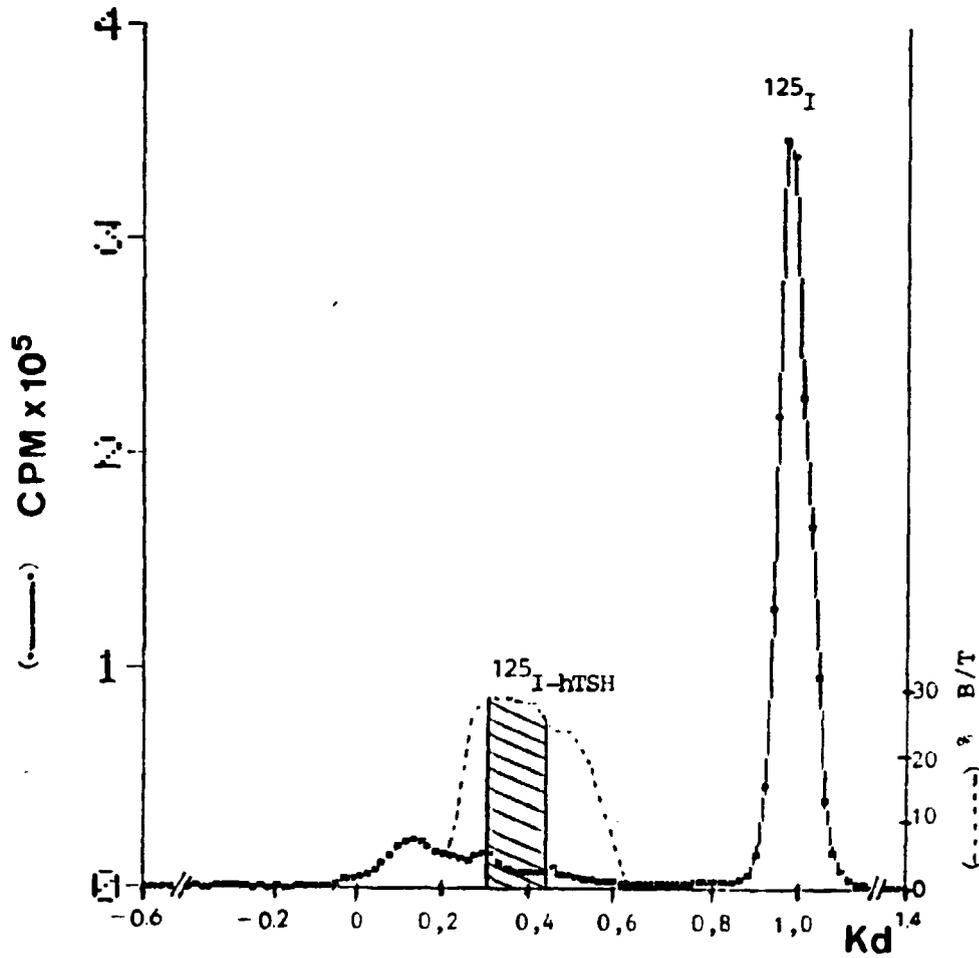


Figura 38. Cromatograma da purificação do ^{125}I -hTSH-IPEN#2 em gel de Sephadex G-100, empregando coluna de dimensões de 90 de altura por 2 cm de diâmetro. Rendimento de 4.87 % e recuperação de 80.26 %. Valores de $K_d = 0,138$ para o pico II e de 0,313 para o pico III (^{125}I -hTSH).

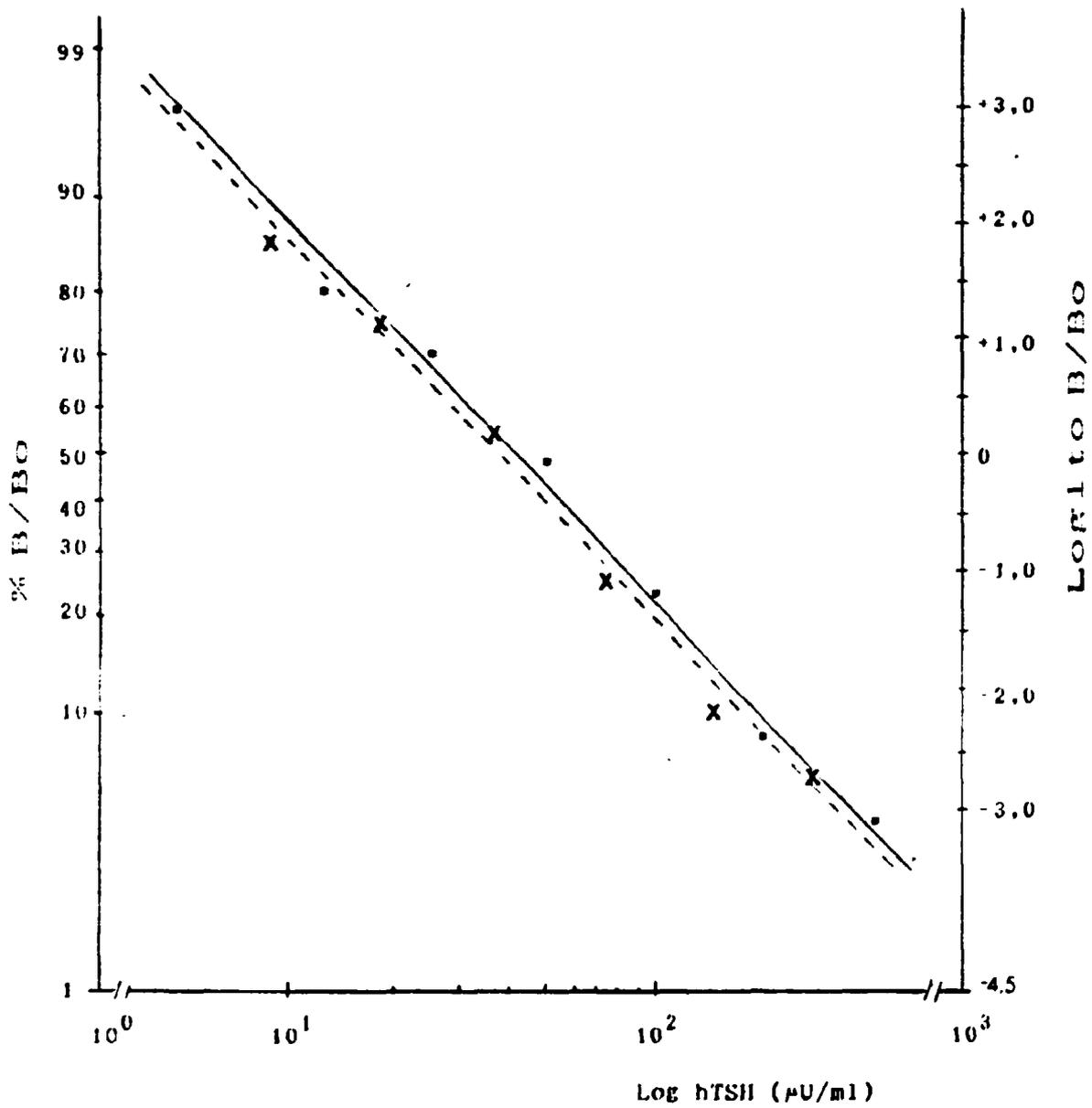


Figura 39. Comparação do deslocamento do traçador NIDDKD pelo Standard A (●—●) e hTSH-IPEN#2 (x---x). As retas são definidas pelas equações:

Standard A: $Y = -1,3864 \ln X + 5,1296$ ($r = 0,9971$) e

IPEN#2 : $Y = -1,3891 \ln X + 4,9760$ ($r = ,9938$).

6. CONCLUSÕES

6.1. PADRONIZAÇÃO DO RIE

A partir dos resultados obtidos no presente estudo pode-se concluir que:

1 - Foram desenvolvidas e padronizadas as diversas etapas do RIE de hTSH que se referem ao preparo do traçador, a determinação das condições ótimas para o ensaio e ao controle de sua qualidade.

2 - Evidenciou-se ser o traçador obtido neste trabalho imunorreativo e adequado para ser utilizado por até dois meses após seu preparo.

3 - Determinaram-se as características do traçador preparado com o hTSH proveniente no NIDDKD para comparação com traçadores preparados pela mesma metodologia, a partir de outras preparações hormonais.

4 - Confirmou-se ser o sistema de ensaio em não-equilíbrio um método mais sensível e adequado para a determinação do hTSH.

5 - Estabeleceram-se as condições de precipitação da fração ligada do ensaio pelo PEG, que atenderam aos critérios de custo e eficiência da separação.

6 - O método de RIE desenvolvido neste trabalho apre-

sentou especificidade, exatidão, precisão e sensibilidade adequadas para a realização de ensaios com a obtenção de resultados válidos.

7 - O RIE assim desenvolvido está apto a ser utilizado na determinação dos níveis de hTSH em extratos hipofisários, apresentando um intervalo de determinação bastante amplo.

6.2 OBTENÇÃO DO hTSH

A avaliação do hTSH obtido nesse estudo permite concluir que:

1 - O extrato hipofisário não deve ser armazenado por muito tempo antes de sua purificação para obtenção do hTSH, a ser utilizado como matéria-prima no preparo do traçador do RIE.

2 - Mesmo empregando um extrato cru fresco, as etapas de purificação realizadas não foram suficientes para fornecer um produto com grau de pureza adequado para radioiodação, sendo necessária uma purificação adicional.

3 - Essas preparações purificadas devem ser armazenadas adequadamente para terem uma vida útil prolongada, devendo-se estabelecer os meios apropriados para cada finalidade: padrão, traçador, etc.

4 - Criou-se experiência suficiente para a obtenção de hTSH purificado que poderá ser empregado no preparo do padrão secundário e de anticorpo específico para o RIE.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. ADDISON, G.M. & HALES, C.N. The immunoradiometric assay. In: KIRKHAM, K.E. & HUNTER, W.M. eds. Radioimmunoassay Methods. Edinburgh, Churchill-Livingstone, 1971. p. 447-61.
2. ALBUQUERQUE, R.H. Controle de qualidade em radioimunoensaios. Arg. Bras. Endocrinol. Metabol., 25: 120-4, 1981.
3. ASSIS, L.M.; NICOLAU, W.; HIRATA, I.A.D.; MURAMOTO, E.; PIERONI, R.R.; SHIBATA, H. Estudo do método de preparação do hormônio de crescimento humano pelo fracionamento em sulfato de amônio e gel filtração em Sephadex G 100. Revta. Ass. Med. Bras., 18:299-304, 1972.
4. BANGHAM, D.R. & GOTES, P.M. Reference standards for radioimmunoassays. In: KIRKHAM, K.E. & HUNTER, W.M. eds. Radioimmunoassay methods. Edinburgh, Churchill-Livingstone, 1971. p. 345-68.
5. BATES, R.W.; GARRISON, M.M.; COOPER, J.A.; CONDLIFFE, P.G. Further studies on the purification of human thyrotropin. Endocrinology, 83:721-30, 1968.
6. BERGHOUT, A; ENDERT, E.; WIERSINGA, W.M.; TOUBER, J.L. The application of an immunoradiometric assay of plasma thyrotropin (TSH-IRMA) in molar pregnancy. J. Endocrinol. Invest., 11:15-9, 1988.
7. BLOOMFIELD, G.A.; FAITH, M.R.; PIERCE, J.G. Sepharose-linked concanavalin-A in the purification and characterization of glycoprotein hormones of the bovine pituitary. Biochim. Biophys. Acta, 533:371-82, 1978.
8. BORGHI, V.C. Dosagens hormonais "in vitro" com radioisótopos. Considerações gerais e análise crítica. Cien. Cult., 35:1456-66, 1983.

9. BORGHI, V.C. & BARTOLINI, P. Desenvolvimento da técnica de radioimunoensaio para dosagem de tireotrofina (TSH) em extratos hipofisários humanos. In: SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA. Endocrinologia e metabolismo: anais do 17 congresso de... realizado em Olinda, 7-12 setembro, 1986. Recife, 1986. p. 59.
10. BORGHI, V.C.; LIN, L.H.; LOPES, E.M.L.; MORAES, V.K. Avaliação do RIAKALK: um programa para microcomputadores de análise de dados em radioimunoensaio. Cien. Cult., 42 (Suppl.): 552-3, 1990. Apres. na 42a reunião anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, realizado em Porto Alegre, 8-13 julho, 1990. Rio Grande do Sul. v.1.
11. BORGHI, V.C.; BOJARCZUK, C.; NICOLAU, W.; PIERONI, R.R. Radioimunoensaio para dosagem de tireotrofina (TSH) no soro de ratos, pela técnica do duplo anticorpo. Revta. Biol. Med. Nucl., 17:141-2, 1975.
12. BORGHI, V.C.; WAJCHENBERG, B.L.; ALBUQUERQUE, R.H. Evaluation of a sensitive and specific radioimmunoassay for pancreatic glucagon in human plasma and its clinical application. Clin. Chim. Acta, 136:39-48, 1984.
13. BORGHI, V.C.; PEIG GINABREDA M.G.; BETARELLO, A. Evaluation of a sensitive and specific radioimmunoassay for human gastrin and its clinical application. Eur. J. Nucl. Med., 16:S169, 1990.
14. BRABANT, G.; OCRAN, K.; RANFT, V; VON ZUR MUHLEN, A.; HESCH, R.D. Physiological regulation of thyrotropin. Biochimie, 71:293-301, 1989.
15. BRISTOW, A.F. Comunicação pessoal.

16. BRISTOW, A.F.; WILSON, C.; SUTCLIFFE, N. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of human thyroid-stimulating hormone. J. Chromatog., 270:285-92, 1983.
17. CALBIOCHEM BIOCHEMICAL IMMUNOCHEMICAL catalog, 1989. p. 439.
18. CALDWELL, G.; GOW, S.M.; SWEETING, V.M.; KELLETT, H.A.; BECKETT, G.J.; SETH, J.; TOFT, A.D. A new strategy for thyroid function testing. Lancet, 1:1117-9, 1985.
19. CHAPMAN, G.E.; RENWICK, A.G.C.; LIVESEY, J.H. The isolation of human pituitary hormones from frozen glands. J. Clin. Endocrinol. Metab., 53:1008-13, 1981.
20. CHARD, T. Ammonium sulfate and polyethylene glycol as reagents to separate antigen from antigen-antibody complexes. In: VUNAKIS, H.V. & LANGONE, J.L. eds. Methods Enzymol., Part A, 70:280-9, 1980.
21. CHERVU, L.R. & MURTY, D.R.K. Radiolabeling of antigens: procedures and assessment of properties. Sem. Nucl. Med., 5:157-71, 1975.
22. CONDLIFFE, P.G. Purification of human thyrotropin. Endocrinology, 72:893-6, 1963.
23. CONDLIFFE, P.G.; BATES, R.W.; FRAPS, R.M. Fractionation of bovine thyrotrophin and luteinizing hormone on cellulose ion exchange columns. Biochim. Biophys. Acta, 34:430-8, 1959.
24. CORNELL, J.S.; PIERCE, J.G. The subunits of human pituitary thyroid-stimulating hormone isolation, properties and composition. J. Biol. Chem., 248:4327-33, 1973.
25. DAUGHADAY, W.H. The anterior pituitary. In: WILSON, J.D. & FOSTER, D.W., eds. Williams textbook of endocrinology. 7.ed. Philadelphia, PA, Saunders, 1985. p. 585-6.

26. DAVIS, B.J. Disc eletrophoresis II. Methods and application to human serum proteins. Ann. N. Y. Acad. Sci., 121:404-27, 1964.
27. DE LOS SANTOS, E.T.; STARICH, G.H., MAZZAFERRI, E.L. Sensitive, specificity, and cost)effectiveness of the sensitive thyrotropin assay in the diagnosis of thyroid disease in ambulatory patients. Arch. Intern. Med., 149:526-32, 1989.
28. DESBUQUOIS, B. & AURBACH, G.D. Use of polyethylene glycol to separate free and antibody bound peptide hormones in radioimmunoassays. J. Clin. Endocrinol., 33:732-8, 1971.
29. DIAMANDIS, E.P.; MORTON, C.R.; REICHSTEIN, E.; KHOSRAVI, M.J. Multiple fluorescence labeling with europium chelators. Application to time-resolved fluoroimmunoassays. Anal. Chem., 61:48-53, 1989.
30. DONNELL, M.C.; PETERSON, J.W. Optimization of TSH iodination: comparison of enzymatic, electrolytic and chloramine T methods. Clin. Chem., 25:1065, 1979 (resumo).
31. EKINS, R.P. The estimation of thyroxine in human plasma by an electrophoretic technique. Clin. Chim. Acta, 5:453-9, 1960.
32. ENDO, Y.; MIYAI, K.; IIJIMA, Y.; NAKAJIMA, T.; EDA, Y.; FUJITA, H.; UNOKI, M. Epitope mapping of human thyrotropin. Acta Endocrinol., 120:201-9, 1989.
33. ENGLEBIENNE, P. & SLEGGERS, G. Estimation of the specific activity of radiiodinated gonadotrophins: comparison of three methods. J. Immunol. Methods, 56:135-40, 1983.
34. ENGVALL, E. & PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay, Elisa: III Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. J. Immunol., 109:129-35, 1972.

35. ENGVALL, E.; JONSSON, K.; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay: II Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G by means of enzyme-labelled antigen and antibody-coated tubes. Biochem. Biophys. Acta, 251:427-34, 1971.
36. FIDDES, J.C. & GOODMAN, H.M. The gene encoding the common alpha subunit of the four human glycoprotein hormones. J.Mol. Appl. Genet., 1:3-18, 1981 apud ENDO, Y.; MIYAI, K. IIJIMA, Y.; NAKAJIMA, T.; EDA, Y.; FUJITA, H.; UNOKI, M. Epitope mapping of human thyrotropin. Acta Endocrinol., 120:201-9, 1989.
37. GAINES DAS, R.E.; BRISTOW, A.F. The second international reference preparation of thyroid stimulating hormone, human, for immunoassay: calibration by bioassay and immunoassay in an international collaborative study. J. Endocrinol., 104:367-79, 1985.
38. GILMAN, A.G. Guanine nucleotide binding regulatory proteins and dual control of adenylate cyclase. J. clin. Invest., 73:1-4, 1984.
39. GORDIN, A. & SAARINEN, P. Methodological study of the radioimmunoassay of human thyrotropin. Acta Endocrinol. 71:24-36, 1972.
40. GOSPODAROWICZ, D; MASSOGLIA, S.; CHENG, J.; LUI, G. M.; BÖHLEN, P. Isolation of pituitary fibroblast growth factor by fast protein ligand chromatography (FPLC), partial chemical and biological characterization. J.Cell.Physiol., 122:323-32, 1985.
41. HAGAN, J.J.; TU, J.I.; MURTY, D.R.K.; NICKOLOFF, E.L. Human thyrotropin radiolabel: Specific activity, zero binding and stability. Clin. Chem., 29:1870-1, 1983.

42. HARTREE, A.S. Purification of human pituitary glycoprotein hormones. In: O'MALLEY, B.W. & HARDMAN, J.G. eds. Methods Enzymol., Part B, 37:380-8, 1975.
43. HEIDEMAN JR, M.L. Purification of bovine thyrotropic hormone by ion exchange chromatography. Endocrinology, 53:640-52, 1953.
44. HORROCKS, D.L. Standardizing 125I sources and determining 125I counting efficiencies of well)type gamma counting systems. Clin. Chem., 21:370-5, 1975.
45. HUMAN THYROID STIMULATING HORMONE RADIOIMMUNOASSAY. Pituitary Hormones and Antisera Center, Maryland. Technical report 209. (Specification sheet).
46. HUNTER, W.M. & BENNIE, J.G. Structure-activity relationships of protein and polipeptide hormones. Leyden, 1970. p.132-8 apud ROOS, P.; JACOBSON, G.; WIDE, L. Isolation of five active thyrotropin components from human pituitary gland. Biochim. Biophys. Acta, 379:247-61, 1975.
47. HUNTER, W.M. & GREENWOOD, F.C. Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. Nature, 194:495-6, 1962.
48. HUNTER, W.M. The preparation and assessment of iodinated antigens. In: KIRKHAM, K.E. & HUNTER, W.M. eds. Radioimmunoassay methods. Edinburgh, Churchill-Livingtone, 1971. p. 3-23.
49. HUNTER, W.M. Preparation and assessment of radioactive tracers. Br. Med. Bull., 30:18-23, 1974.
50. ICHIHARA, K.; YAMAMOTO, T.; AZUKIZAWA, M.; MIYAI, K. Kinetic aspects of the antigen-antibody reaction in various radioimmunoassays: effect of delayed addition of labelled or unlabelled antigens on sensitivity of assay. Clin. Chim. Acta, 98:87-101, 1979.

51. JACK, G.W. & LAZEK, R. The purification of human thyroid-stimulating hormone by immunoaffinity chromatography. J. Chem. Technol. Biotechnol., 39:1-9, 1987.
52. JACK, G.W.; BLAZEK, R.; JAMES, K.; BOYD, J.E.; MICKLEM, L.R. The automated production by immunoaffinity chromatography of the human pituitary glycoprotein hormones thyrotropin, follitropin and lutropin. J. Chem. Technol. Biotechnol., 39:45-8, 1987.
53. JACOBSON, G.; ROOS, P.; WIDE, L. Human pituitary thyrotropin: Isolation of a and b subunits by hydrophobic interaction chromatography. Biochim. Biophys. Acta, 536:363-75, 1978.
54. JACOBSON, G.; ROOS, P.; WIDE, L. Human pituitary thyrotropin. Characterization of five glycoproteins with thyrotropin activity. Biochem. Biophys. Acta, 490:403-10, 1977.
55. JACOBSON, G.; ROOS, P.; WIDE, L. Human pituitary thyrotropin. Isolation and recombination of subunit isoforms. Biochim. Biophys. Acta, 625:146-57, 1980.
56. JANSSEN, S. & LOESER, A.
Arch. Exptol. Pathol. Pharmacol. Naunyn-Schmiedeberg's, 163:517, 1931 apud BATES, R.W. & CONDLIFFE P.G. Thyroid hormones. Rec. Prog. Horm. Res., 16: 309-52, 1960.
57. JUNKMANN, K. & SCHOELLER, W.
Klin. Wochschr. 11:1176, 1932 apud BATES, R.W. & CONDLIFFE P.G. Thyroid hormones. Rec. Prog. Horm. Res., 16: 309-52, 1960.
58. KAIHOLA, H.L.; IRJALA, K.; VIIKARI, J.; NANTO, V. Determination of thyrotropin in serum by time-resolved fluoroimmunoassay evaluated. Clin. Chem., 31:1706-9, 1985.

59. LEMARCHAND-BERAUD, T. Comparison between antibodies to bovine and human thyrotrophin (TSH) for radioimmunoassay in plasma: cross reaction studies with clinical results. Acta Endocrinol., 64:610-29, 1970.
60. LOVGREN, T.; HEMMILA, I.; PETTERSSON, K.; ESKOLA, J.V.; BERTOFT, E. Determination of hormone by time-resolved fluoroimmunoassay. Talanta, 31:909-16, 1984.
61. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin Phenol reagents. J. Biol. Chem., 193:265-74, 1951.
62. MACCHIONE, M. Extração e purificação do hormônio de crescimento humano, São Paulo, 1980. (monografia de graduação, Escola Superior de Química Oswaldo Cruz).
63. MAYBERRY, W.E.; GHARIB, H.; BILSTAD, J.M.; SIZEMORE, G.W. Radioimmunoassay of human thyrotropin. Ann. Intern. Med., 74:471-80, 1971.
64. MELO, E.L. - Tese de livre docência, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 1970.
65. MIDGLEY Jr., A.R.; DISWENDER, G.D.; REBAR, R.W.; Principles for the assessment of the reliability for radioimmunoassay methods (precision, accuracy, sensitivity, specificity). Acta endocrinol., 142(suppl):163-80, 1969.
66. MILES, L.E. & HALES, C.N. The preparation and properties of purified ¹²⁵I-labelled antibodies to insulin. Biochem. J., 108:611-8, 1968.
67. NEWBORN COMMITTEE OF THE AMERICAN THYROID ASSOCIATION. Recommendations for screening programs for congenital hypothyroidism. Can. Med. Ass. J., 116:631-2, 1977.

68. ODELL, W.D.; RAYFORD, P.L.; ROSS, G.T. Simplified, partially automated method for radioimmunoassay of human thyroid-stimulating hormone. J. Lab. Clin. Med., 70:973-80, 1967.
69. ODELL, W.D.; WILBER, J.E.; PAUL, W.E. Radioimmunoassay for human and bovine thyrotropic hormones. Clin. Res., 12:461, 1964.
70. ODELL, W.D.; WILBER, J.F.; UTIGER, R.D. Studies of TSH physiology by means of RIA. Rec. Prog. Horm. Res., 23:47-85, 1967.
71. PARLOW, A.F.; CONDLIFFE, P.G.; REICHERT Jr., L.E.; WILHELMI, A.E. Recovery and partial purification of FSH and LH during the purification of TSH from human pituitary glands. Endocrinology, 76:27-34, 1965.
72. PATEL, Y.C.; BURGET, H.G.; HUDSON, B. Radioimmunoassay of serum thyrotropin: sensitivity and specificity. J. Clin. Endocrinol. Metab., 33:768-74, 1971.
73. PEKARY, A.E.; HERSHMAN, J.M.; PARLOW, A.F. A sensitive and precise radioimmunoassay for human thyroid-stimulating-hormone. J. Clin. Endocrinol. Metab., 41:676-84, 1975.
74. PEKONEN, F.; WILLIAMS, D.M.; WEINTRAT., B.D. Purification of thyrotropin and other glycoprotein hormones by immunoaffinity chromatography. Endocrinology, 106: 1327-32, 1980.
75. PIERCE, J.G. & PAARSONS, T.F. Glycoprotein hormones: structure and function. Rev. Biochem., 50:465-95, 1981.
76. PYASINA, R.D.; AIREY, P.L.; GANATRA, R.D.; NOFAL, M. Radioimmunoassay for human health in developing countries. IATA Bulletin, 1:3-9, 1989.
77. REICHSTEIN, E.; MORTON, C.R.; DIAMANDIS, E.P. Sensitive time-resolved immunofluorometric assay of thyrotropin in

78. REICHSTEIN, E.; SHAMI, Y.; RAMJEESINGH, M.; DIAMANDIS, E.P. Laser-excited time-resolved solid)phase fluoroimmunoassays with the new europium chelate 4,7-bis-chloro sulfophenyl-1,10-phenantroline-2,9-dicarboxylic acid as label. Anal. Chem., 60:1069-74, 1988.
79. RICHETTI, P.G.; TUDOR, G.; EK, K. Isoelectric points and molecular weights of proteins: A new table. J. Chromatogr., 220:115-94, 1981.
80. RODBARD, D. Quality control for RIA: recomendations for a minimal program. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Radioimmunoassay methods and related procedures in medicine: proceedings of an international symposium...realizado em Berlin, 31 outubro - 4 novembro, 1977. Viena, 1978. v.II. p.21-38.
81. RODBARD, D.; RAYFORD, P.L.; COOPER, J.A.; ROSS, G.T. Statistical quality control of radioimmunoassays. J. Clin. Endocrinol., 28:1412-8, 1968.
82. ROMALDINI, J.H.; RODRIGUES, H.F.; TANAKA, L.M.; TEIXEIRA, V.L.; REIS, L.C.F. Radioimmunoassay of human thyrotropin (TSH): an improvement on microtiter plate method. Arq. Bras. Endocrinol. Metabol., 24:93-8, 1980.
83. ROOS, P.; FEVOLD, H.R.; GEMZELL, C.A. Preparation of human growth hormone by gel filtration. Biochim. Biophys. Acta, 74:525-31, 1963.
84. ROOS, P.; JACOBSON, G.; WIDE, L. Isolation of five active thyrotropin components from human pituitary gland. Biochim. Biophys. Acta, 379:247-61, 1975.
85. ROSS, D.S. New sensitive immunoradiometric assay for thyrotropin. Ann. Inter. Med., 104:718-20, 1986.

86. ROTHSCHILD, Z. Cromatografia por exclusão. In: COLLINS, C.H. & BRAGA, G.L. eds. Introdução a métodos cromatográficos. Campinas, Unicamp, 1987, p. 119-42.
87. RUBENSTEIN, K.E.; SCHNEIDER, R.S.; ULLMAN, E.F. "Homogeneous" enzyme immunoassay. A new immunochemical technique. Biochem. Biophys. Res. Commun., 47:846-51, 1972.
88. SAIRAM, M.R. & LI, C.H. Human pituitary thyrotropin: isolation and chemical characterization of its subunits. Biochem. Biophys. Res. Commun., 51:336-42, 1973.
89. SAIRAM, M.R. & LI, C.H. Human pituitary thyrotropin. The primary structure of the a and b subunits. Can. J. Biochem. 55:755-60, 1977.
90. SARSON, D.L. Quality control and assay mathematics. In: BLOOM, S.R. & LONG, R.G. eds.. Radioimmunoassay of gut regulatory peptides. London, Praeger, 1982. p. 42-50.
91. SCHWARZ, I.; RIBELA, M.T.C.P.; PIAS, L.M.F.; ARENSTEIN, I.; BARTOLINI, P. Small scale purification of human pituitary thyrotropin (hTSH) for use in radioligand assays. In: ASOCIACION LATINOAMERICANA DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA Y MEDICINA NUCLEAR. Asociacion latinoamericana de sociedades de biologia y medicina nuclear: anais do XI congreso de la...realizado em Santiago, 8-11 outubro, 1989. Chile, 1989. p.66 (resumo 46).
92. SIZARET, P. The preparation of international reference materials for biological substances. J. Biol. Standard., 16:129-37, 1988.
93. SOINI, E. & KOJOLA, H. Time-resolved fluorometer for lanthanide chelates: a new generation of non-isotopic immunoassays. Clin. Chem., 29:65-8, 1983.

94. SPHEROIDAL HYDROXYAPATITE, POOLE, BDH CHEMICALS, SD.
(catálogo comercial).
95. STANTON, P.G.; SIMPSON, R.J.; LAMBROU, F.; HEARN, M.T.N.
High-performance liquid chromatography of aminoacids
peptides and proteins. XLVII - Analytical and semi-
preparative separation of several pituitary proteins by
high-performance ion-exchange chromatography. J.
Chromatog. 266 :273-9, 1983.
96. TISELIUS, A.; HJERTEN, S; LEVIN, O. Protein chromatography
in calcium phosphate columns. Arch. Biochem. Biophys., 65:
135-55, 1965.
97. TORJESEN, P.A.; SAND, T.; NORMAN, N.; TRYGATAD, O; FOSS, I.
Isolation of LH, FSH and TSH from human pituitaries after
removal of HGH. Acta Endocrinol., 77:485-97, 1974.
98. UI, N.; TAMURA-TAKAHASHI, H.; YORA, T; CONDLIFFE, P.G.
Bioaffinity chromatography of thyrotropin using
immobilized concanavalin-A. Biochim. Biophys. Acta,
497:812-5, 1977.
99. UTIGER, R.D. RIA for human plasma thyrotropin. J. Clin.
Invest. 44:1277-86, 1965.
100. UTIGER, R.D. Thyrotropin. In: SAFFE, M.B. & BEHRNAN, H.R.
eds. Methods of hormone radioimmunoassay. New York, NY,
Academic, 1971. p. 161.
101. UTIGER, R.D.; ODELL, W.D.; CONDLIFFE, P.G. Immunologic
studies of purified human and bovine thyrotropin.
Endocrinology, 73:359-65, 1963.
102. WINDHOLZ, M. The Merck Index, 9.ed. Rahway, New York,
NY, Merck & Co., Inc., 1976. p.580.
103. YALOW, R.S. Radioimmunoassay practices and pitfalls. Circ.
Res., 32/33 (Suppl.):116-25, 1973.
104. YALOW, R.S. & BERSON, S.A. Assay of plasma insulin in human
subjects by immunological methods. Nature, 184:1648-
9, 1959.