

DESENVOLVIMENTO DE UMA TÉCNICA DE FASE SÓLIDA PARA RADIOIMUNOENSAIO DO HORMÔNIO TRIIODOTIRONINA (T_3) NO SORO.

* Margarida Mizue Hamada
* Carlos Henrique de Mesquita
** Constância Pagano Gonçalves da Silva

* Departamento de Proteção Radiológica
** Departamento de Processamentos
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
Comissão Nacional de Energia Nuclear - IPEN-CNEN/SP

SUMÁRIO

Desenvolveu-se um sistema de radioimunoensaio (RIE) do hormônio T_3 pela técnica de "fase sólida", imobilizando-se anticorpo, anti- T_3 em tubos de polipropileno pré-recobertos com glutaraldeído polimerizado em meio alcalino.

Avaliou-se a qualidade dos tubos recobertos pelo desempenho metodológico no RIE, analisando os diversos parâmetros do ensaio, a saber: a dose mínima detectável, a ligação inespecífica (NSB), " $X_{50\%}$ ", a inclinação da curva, a precisão intra e inter-ensaio, exatidão do método e dígito de mérito.

Os intervalos de valores da concentração de T_3 no soro de indivíduos hipotiroídeos e hipertiroídeos e a faixa de normalidade de T_3 foram determinados para esta técnica, estando de acordo com a literatura.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF A SOLID PHASE TECHNIC FOR RADIOIMMUNOASSAY FOR TRIIODOTHYRONINE (T_3) IN SERUM.

We have developed a solid phase radioimmunoassay (RIA) system for triiodothyronine (T_3), by immobilizing triiodothyronine antibodies on the inner wall of reaction tubes. The antibody-coated tubes were made via reaction of antibody with glutaraldehyde residue pre coated on the inner wall of the tubes by alkaline self-polymerization.

The quality of the coated tubes was tested through its performance in the RIA methodology, by analysing the following RIA parameters: minimum detectable dose (DMD), nonspecific binding (NSB), " $X_{50\%}$ ", slope of the standard curve, intra and inter-assay precision, accuracy of the method and figure of merit.

The serum levels of T_3 in hypothyroid and hyperthyroid patients and the normal values range were determined for the solid phase RIA system. The results are in agreement with found in the literature.

INTRODUÇÃO

O radioimunoensaio (RIE) constitui-se em um dos métodos mais utilizados atualmente na rotina de dosagens de substâncias contidas nos fluidos biológicos. Provavelmente mais de cem mil dosagens são realizadas mensalmente no Brasil fazendo-se uso do RIE. Sua aplicação estende-se pela medicina humana e veterinária, principalmente nos campos da endocrinologia, cancerologia, toxicologia, gastroenterologia, bacteriologia e outros.

Uma metodologia de tão ampla escala deve satisfazer os critérios seguintes:

- 1- praticabilidade (simplicidade, rapidez)
- 2- confiabilidade (precisão, exatidão, especificidade, sensibilidade)
- 3- Economicidade (custo/benefício)

Encontram-se na literatura diversas propostas técnicas^(1,3,7) que procuram satisfazer esses itens e dentre elas a técnica denominada de "fase sólida" destaca-se como a mais eficiente⁽¹⁾. Em nosso meio, lamentavelmente, a maior parcela do consumo de reagentes do RIE ("kits") que usam a "fase sólida" é ainda de procedência importada. Essa importação é, até agora, justificada pelas dificuldades tecnológicas na obtenção e fixação do anti-soro na matriz de "fase sólida" (tubo de plástico, esfera de plástico, etc).

O propósito deste trabalho é desenvolver uma técnica de fase sólida em nosso meio e para isto selecionou-se o RIE para a dosagem do T₃ (triiodotironina) como modelo pois se trata de um dos hormônios de maior solicitação clínica.

MATERIAIS E MÉTODOS

O anti-soro anti T₃ foi obtido em coelho mediante múltiplas injeções intradérmicas dorsais do imunógeno, em cerca de 50 sítios com re-injeções espaçadas no tempo em intervalos de 15 dias. Devido ao baixo peso molecular do T₃ e por não ser imunogênico na sua forma natural⁽²⁾ o imunógeno foi preparado conjugando-se T₃ com soro albumina bovina (SAB) utilizando-se a reação com carbodiimida.

Na injeção da primeira dose o complexo imunogênico (T₃-SAB) foi misturado em coadjuvante de Freund (Difco) completo (com BCG) e nas doses de reforço subsequentes misturou-se o imunógeno em coadjuvante de Freund incompleto (sem BCG). Após 10 dias da terceira dose de reforço, aproximadamente 55 dias do início da imunização, retirou-se cerca de 10 ml de sangue de cada animal. O sangue foi mantido por duas horas em banho maria a 37 °C e a seguir foi levado à centrifugação a 1000 G. O sobrenadante (soro) foi separado e isolou-se suas imunoglobulinas pela técnica de precipitação com sulfato de amônia. As amostras de sangue foram repetidas após 8 a 10 dias de cada dose de reforço. Seleccionou-se para o uso dos experimentos deste trabalho o anti-soro que apresentou as melhores características, ou seja:

- constante de afinidade $K=0,92 \times 10^{10}$ l/mol
- concentração molar aparente no tubo igual a $0,42 \times 10^{-9}$ mol/l
- especificidade avaliada pelo índice de reatividade cruzada com os seguintes valores:
(T₃ → 100%), (T₄ → 0,05%), (rT₃ → 0,0008%)
(T₂ → 0,006%), (Tetrac → 0,004%), (Triac → 0,02%)
(DIT → 0,0001%) e (MIT → 0,0001%)

O traçador radioativo (¹²⁵I-T₃) foi preparado segundo a técnica da reação com cloramina-T conforme protocolo de marcação já descrito por Hamada e col.^(3,4). A fração cromatográfica contendo o ¹²⁵I-T₃ foi diluída em solução de propileno glicol a 50% para armazenamento em temperatura de -20°C. Para fins de ensaios o ¹²⁵I-T₃ foi diluído em tampão veronal 0,05M pH 8,6 com 0,35% de ANS (ácido anilino naftaleno sulfônico, da Sigma Chemical Co) e 0,01% de

timerosol (Eli Lilly do Brasil) em concentração radioativa de 950 Bq/ml (26nCi/ml).

As soluções padrão para definir a curva de dose x resposta (curva padrão do RIE) foram preparadas a partir de 3,5,3'-L-triiodotironina (Sigma Chemical Co) na concentração inicial de 100 ng/ml (solução estoque) em solução de propileno glicol e soro isento de T_3 (soro Strip, "pool" de soro humano pré-tratado com carvão ativado) na proporção de 1:1. A partir desta solução estoque prepararam-se os demais soros de referência da curva padrão nas seguintes concentrações: 0, 25, 50, 100, 250, 500 e 1000 ng/dl, usando-se o soro "strip" como diluente.

PREPARAÇÃO DOS TUBOS DE FASE SÓLIDA

A fixação do anti-soro, anti- T_3 nos tubos plásticos de ensaio ("fase sólida") foi obtida seguindo o esquema da figura 1.

Neste procedimento utiliza-se o glutaraldeído diluído a 2% em solução aquosa de NaOH em pH 9,5 depositando 1 ml desta solução em cada tubo de ensaio. Após repouso durante 4 horas em temperatura ambiente decantou-se essa solução. Em seguida lavou-se cada tubo por três vezes com tampão veronal 0,025M pH 8,6 para retirar o excesso de glutaraldeído. Nessas operações obtém-se resíduos polimerizados de glutaraldeído aderido às paredes do tubo de ensaio. A seguir adiciona-se 1 ml de anticorpo diluído em tampão veronal 0,05M pH 8,6 de modo a conseguir ligação de 25% com os 950 Bq do traçador radioativo. Com o soro anti-soro foi necessário diluí-lo a 1/1000. Os tubos foram incubados durante 24 horas em temperatura de 4°C para efetivar a reação dos resíduos de aldeído do glutaraldeído com grupos amino da molécula do anticorpo. Após estas operações a solução foi decantada e os tubos foram lavados com tampão veronal 0,025M pH 8,6 por três vezes, seguindo-se a incubação por trinta minutos com solução de SAB 0,5% neste mesmo tampão. Repete-se o processo de lavagem e leva-se a secar a 4°C para preencher os sítios não recobertos com anticorpo. Para verificar a qualidade desses tubos de "fase sólida" realizou-se o RIE seguindo o protocolo abaixo.

Aliquotar 100 μ l dos soros padrão ou amostras nos tubos de "fase sólida"

Adicionar 1 ml de $^{125}I-T_3$
↓
Agitar suavemente
↓
Incubar por 4 h à temperatura ambiente
↓
Decantar o sobrenadante
↓
Medir a radioatividade no tubo

Figura 2 - Protocolo do RIE de T_3 pela técnica de "fase sólida"

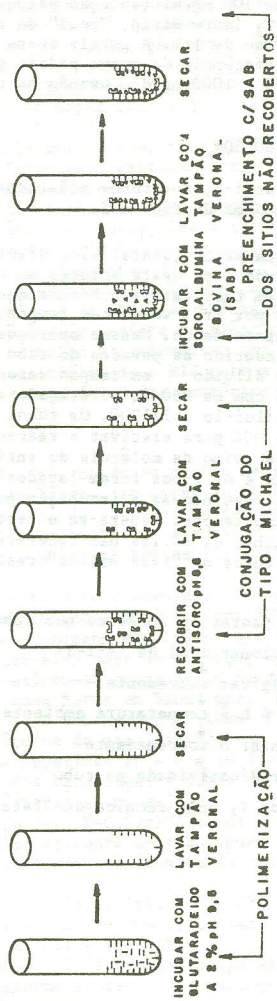


Figura 1 - Esquema de preparação dos tubos de fase sólida

Para fins comparativos realizou-se paralelamente o RIE de T₃ utilizando-se técnicas já tradicionalmente empregadas em nosso laboratório, a saber: técnica do "duplo anticorpo"⁽⁷⁾ e técnica da "solução PEG"⁽⁵⁾.

Os cálculos para a caracterização dos parâmetros da curva padrão, da dose mínima detectável, do perfil de precisão do ensaio, da constante de afinidade, da concentração do anti-soro no tubo de reação (diagrama de Scatchard) foram efetuados pelo sistema computacional GARLA⁽⁸⁾ disponível no Departamento de Processamento de Dados do IPEN-CNEN/SP.

Com a finalidade de avaliar a qualidade do ensaio em contexto amplo adotou-se o seguinte critério: formulou-se um parâmetro aqui denominado de dígito de mérito. (figure of merit, FM) definido pelo seguinte algoritmo.

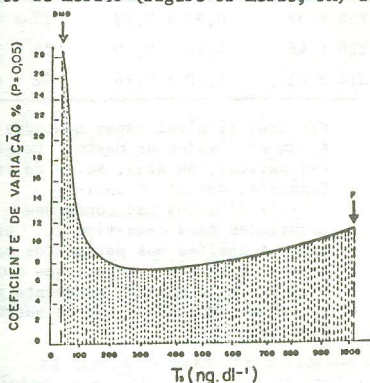


Figura 3 - Elementos para cálculo do dígito de mérito.

$$FM = \frac{DMD \times \int_{DMD}^F \text{Perfil de precisão}}{(F - DMD)^2}$$

onde DMD é o valor da dose mínima detectável, calculada pelo programa GARLA, F é o valor final da curva padrão estatisticamente diferenciado do nível de concentração tendendo ao infinito ou do não específico (NSB), conceito este semelhante aos critérios que definem a DMD, e

Perfil de Precisão = área do perfil de precisão do ensaio integrada do ponto DMD até F.

A área do perfil de precisão foi calculada por cálculo numérico. A figura 3 esquematiza a idéia do dígito de mérito.

Para caracterizar a faixa de normalidade foram dosados 153 soros de indivíduos clinicamente normais. Avaliou-se também amostras de pacientes considerados clinicamente como hipotiroideos (5 casos) e hipertiroideos (8 casos).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na figura 4 mostram-se as curvas padrão dos RIEs realizados pelas três técnicas, "fase sólida", "duplo anticorpo" e "solução PEG", traçadas em escala semi-logarítmica. Os valores dos coeficientes de ajustes de cada uma das curvas (segundo o modelo logístico de quatro parâmetros) encontram-se na tabela I

TABELA I - Resultados dos valores dos parâmetros a,b,c,d da função de ajuste da curva padrão, i, e ,

$$B/T = \frac{a - d}{1 + (X/c)} + d$$

e dos valores da dose mínima detectável (DMD).

Ensaio	(a)	(d)	(c)	(b)	DMD (ng/dl)
	B ₀ /T (%)	NSB (%)	X _(50%) (ng/dl)	"slope"	
Fase Sólida	24 ± 5	7 ± 2	256 ± 37	0,97 ± 0,22	17 ± 4
Duplo Anticorpo	25 ± 4	5 ± 2	220 ± 46	0,93 ± 0,19	14 ± 3
PEG	27 ± 4	10 ± 2	314 ± 43	1,20 ± 0,16	22 ± 4

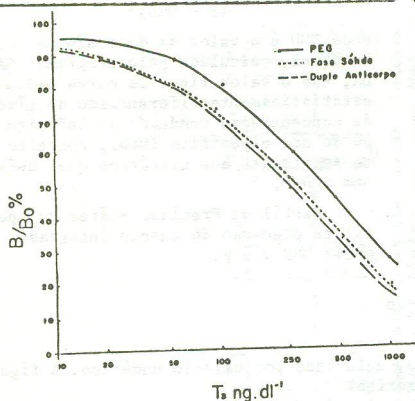


Figura 4 - Curvas padrão dos RIEs de T₃ pelas três técnicas.

Na avaliação isolada de cada parâmetro, a técnica de duplo anticorpo mostrou melhores resultados quanto a ligação inespecífica (parâmetro d), valor de DMD (dose mínima detectável) e X_{50%} (parâmetro c). No entanto, na prática, esses parâmetros estão tão próximos que essas pequenas nuances não são significativas.

A figura 5 mostra o perfil de precisão intra-ensaio para cada uma das técnicas. Dessa figura conclui-se que a precisão intra-ensaio para a técnica da "fase sólida", nos valores compreendidos na faixa de 50 a 900 ng/dl foi inferior a 10%, sendo que a faixa de maior precisão encontra-se no intervalo de 200 a 400 ng/dl. A precisão intra-ensaio no intervalo de 50 a 900 ng/dl, para as técnicas de "duplo anticorpo" e "solução PEG" variou de 8 a 13% e 7 a 16%, respectivamente.

Os perfis de precisão inter-ensaios, mostrados na figura 6, acompanharam basicamente essas comparações, com valores mais elevados devido a inclusão de variáveis não controladas, conforme já previsto por Mesquita⁽⁵⁾. A dispersão

Nas três técnicas experimentadas foram utilizados os mesmos reagentes básicos, ou seja, soros de referência, anticorpo anti-T₃ e ¹²⁵I-T₃ diluídos nas condições apropriadas para cada tipo de ensaio. A análise dos parâmetros mostrados na tabela I sugere que a técnica da "fase sólida" apresenta resultados comparáveis com as outras duas técnicas.

inter-ensaio foi da ordem de 8 a 17% para a técnica da "fase sólida", 11 a 20% para a técnica do "duplo anticorpo" e de 10 a 26% para a técnica da "solução PEG", quando apreciadas na faixa de 50 a 900 ng/dl de T₃.

Provavelmente a maior precisão verificada na técnica da fase sólida se deve a extrema simplicidade da técnica, exigindo o mínimo de operações do análisata, minimizando assim as dispersões oriundas dos erros experimentais.

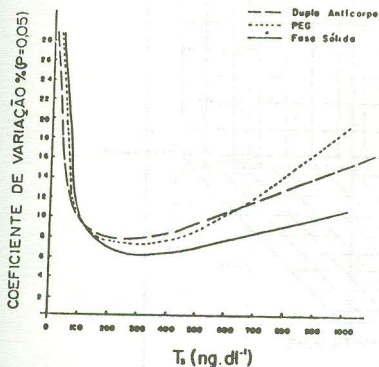


Figura 5 - Perfil de precisão intra-ensaio

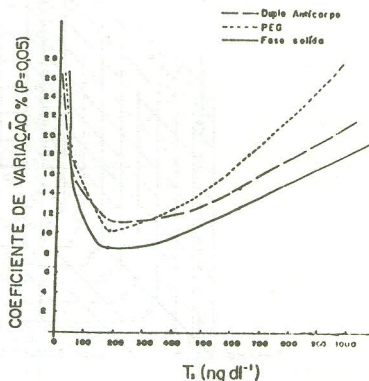


Figura 6 - Perfil de precisão inter-ensaio

Na tabela II estão relacionados os valores do dígito de mérito, da dose mínima detectável e da área do perfil de precisão, calculados para cada uma das três técnicas.

TABELA II - Análise conjunta de diferentes parâmetros do ensaio para comparação da qualidade das três técnicas.

Ensaio	DMD	DMD F	Perfil de Precisão	Dígito de Mérito
Fase Sólida	17		7806	0,14
Duplo Anticorpo	14		13098	0,19
PEG	22		8826	0,20

Alicerçados nesses resultados conclui-se que a melhor técnica corresponde à "fase sólida", seguida pela técnica do "duplo anticorpo" e finalmente pela técnica da "solução PEG", pois segundo a expressão da fórmula do dígito de mérito (FM) quanto menor o seu valor melhor a qualidade do ensaio.

Avaliando-se o ensaio pelo enfoque da dose mínima detectável (DMD) conclui-se que a técnica do "duplo anticorpo" pode satisfazer melhor os resultados de pacientes hipotiroideos. No entanto, os três sistemas de separação mostraram-se adequados para a quantificação dos níveis séricos de T₃.

A exatidão da técnica da "fase sólida" foi avaliada por comparação entre os resultados de 39 amostras de soro dosados pelas três técnicas. A figura 7 ilustra essa análise comparativa.

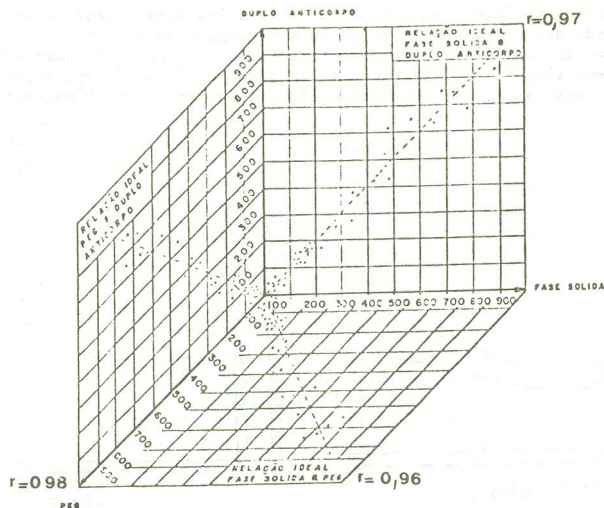


Figura 7 - Correlação de resultados dos RIEs do T_3 entre as três técnicas.

A linearidade e o alto coeficiente de correlação indicou que as três técnicas forneceram praticamente os mesmos resultados, comprovando-se a validade da técnica da "fase sólida", uma vez que se acredita na exatidão das duas outras técnicas.

A distribuição de frequência de uma amostragem de uma população de hipotiroideos, normais e hipertiroideos encontra-se na figura 8. Dessa figura pode-se concluir que a técnica da "fase sólida" mostrou-se capaz de discriminar os níveis séricos de T_3 dessas três populações.

Adotando-se a hipótese de que a população de indivíduos normais obedeça uma distribuição normal (gaussiana) estabeleceu-se o intervalo numérico de normalidade ao nível estatístico de $P=0,05$ como sendo de 90 a 200 ng/dl, com valor médio e desvio padrão de 145 ± 27 ng/dl. Estes valores estão de acordo com a literatura pertinente^(2, 7)

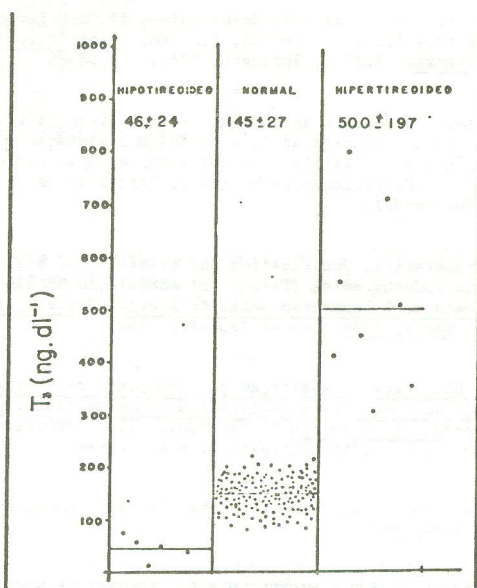


Figura 8 - Níveis séricos de T₃ em indivíduos normais e em pacientes com hipotireoidismo e hipertireoidismo.

Quanto aos aspectos econômicos envolvidos na técnica da fase sólida deve mos considerar que o seu custo poderá não ser indicado para uma rotina de pequena escala. Devemos levar em conta que para cada dosagem será necessário o preparo de pelo menos dois tubos de ensaio descartáveis de polipropileno⁽⁶⁾. Por outro lado nossa experiência mostrou que na técnica de "fase sólida" necessita-se de maior quantidade de anticorpo, cerca de 10 vezes mais daquela quantidade utilizada normalmente nas técnicas de "fase líquida". Além desse aspecto, no preparo dos tubos de "fase sólida" o anti-soro deve ser de melhor qualidade e de maior título. Esse mesmo anti-soro quando usado nas técnicas de "fase líquida" sua diluição deve ser ao nível de pelo menos 1/10000⁽⁶⁾. Para hormônios de baixo peso molecular, o que não é fácil de ser alcançado. Melhor ainda seria utilizar anticorpo do tipo monoclonal. Em todos esses casos o custo do anti-soroutilizado na técnica da "fase sólida" é naturalmente mais caro. Por outro lado, em escala industrial, no preparo de "kits" que serão usados por diferentes laboratórios, a "fase sólida" é mais recomendável pois garante ao fabricante uso adequado e simples, conseqüentemente menos sujeito a erros e com maior precisão nos resultados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) BENEDETTO, S.; DAVID, F.; GALBIATTI, A.; MALVANO, R. Preparation of coated tubes for aldosterone radioimmunoassay (RIA): aspects related to IgG surface density. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Radioimmunoassay and related procedures in medicine: proceedings of a symposium held in Vienna, June 21-25, 1982. Vienna, 1982. p.105-10.

- 2) CHOPRA, I.J. Concentration of triiodothyronines (T_3 and reverse T_3) in serum and other body fluids. CHOPRA, I.J. ed. In: Triiodothyronines in health and disease. Berlin, Springer, 1981. p.58-94.
- 3) HAMADA, M.M. Radioimunoensaio do hormônio triiodotironina (T_3) no soro. Desenvolvimento de uma técnica de fase sólida e comparação com duas técnicas de fase líquida: polietileno glicol (PEG) e duplo anticorpo. São Paulo, 1986. (Dissertação de Mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares).
- 4) HAMADA, M.M. Preparation, purification and stability of high specific activity ^{125}I -triiodothyronine (T_3). In: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ENERGIA NUCLEAR: Anais do I Congresso Geral de Energia Nuclear, realizado em Rio de Janeiro, março, 1986. Rio de Janeiro, 1986.
- 5) MESQUITA, C.H. Elaboração e avaliação do desempenho de programa computacional destinado ao controle de qualidade de ensaios radioligantes. Aplicação ao radioensaio de insulina. São Paulo, 1983. (Dissertação de Mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares).
- 6) PARSONS, G.H. Antibody-coated plastic tubes in radioimmunoassay. Meth. Enzymol. 73:224-39, 1981.
- 7) RUSSO, E.M.K.; VIEIRA, J.G.H.; MACIEL, M.R.B.; FONSECA, R.M.G. Desenvolvimento e caracterização de métodos de radioimunoensaios para dosagem de iodotironinas (T_4 , T_3 e rT_3). Arq. Bras. Endocrinol. Metabol., 26: 23-8, 1982.