

BR8818761

ISSN 0101-3084

**CNEN/SP**

---

**ipen** *Instituto de Pesquisas  
Energéticas e Nucleares*

**CONTROLE DE QUALIDADE DA GASTRINA HUMANA RADIOIODADA  
PARA RADIOIMUNOENSAIO**

**Maria Glória Peig Ginabreda, Vânia Ceira Borghi e Agostinho Bettarello**

**PUBLICAÇÃO IPEN 181**

**JULHO/1988**

**SÃO PAULO**

**CONTROLE DE QUALIDADE DA GASTRINA HUMANA RADIOIODADA  
PARA RADIOIMUNOENSAIO**

**Maria Glória Peig Ginabreda, Vânia Caira Borghi e Agostinho Bettarello**

**DEPARTAMENTO DE APLICAÇÕES EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**CNEN/SP  
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES  
SÃO PAULO – BRASIL**

**Série PUBLICAÇÃO IPEN**

**INIS Categories and Descriptors**

**C45.00**

**GASTRIN  
IODINATION  
PURIFICATION  
QUALITY CONTROL  
RADIOIMMUNOASSAY**

---

**IPEN - Doc - 3023**

**Aprovado para publicação em 10/03/88**

**Nota: A redação, ortografia, conceitos e revisão final são de responsabilidade do(s) autor(es).**

## CONTROLE DE QUALIDADE DA GASTRINA HUMANA RADIOIODADA PARA RADIOIMUNOENSAIO

Maria Glória Peig Ginabreda, Vária Caira Borghi & Agostinho Bettarello.

### RESUMO

A gastrina humana tem sido radioiodada nos laboratórios do IPEN para uso em radioimunoensaio. O presente trabalho realiza o controle de qualidade deste traçador analisando parâmetros da reação de marcação, da purificação cromatográfica e do ensaio radioimunológico. O rendimento obtido em cinco radioiodação foi reprodutível e semelhante quando analido pela eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) a 7% ( $51,70 \pm 10,76\%$ ) e pela precipitação com ácido tricloroacético (TCA) a 5% ( $57,36 \pm 9,69\%$ ). Após purificação, a gastrina radioiodada apresentou grau de pureza elevado e invariável quando submetida às análises por EGPA ( $96,57 \pm 1,06\%$ ) e pelo TCA ( $94,82 \pm 4,20\%$ ). As atividades específicas dos traçadores e os títulos do anti-soro que forneceram ligação adequada para realização dos ensaios variaram de 62 a 307 uCi/ug e de 1:32.000 a 1:180.000, respectivamente. Os ED<sub>50</sub> correspondentes variaram de 155 a 24 pmol/l. Entretanto, essas doses permaneceram praticamente constantes para cada traçador, mesmo após ter decorrido três meses de seu preparo. Os traçadores apresentaram baixíssima ligação inespecífica ( $1,78 \pm 0,79\%$ ), ligação específica constante ( $46,49 \pm 5,65\%$ ) e boa precisão inter-ensaio avaliada por amostra de controle de qualidade interno ( $25,71 \pm 4,30$  pmol/l com coeficiente de variação de 16,74%). A análise por EGPA da gastrina fria empregada na primeira e na última radioiodação, revelou um componente único que permaneceu inalterado, confirmando a qualidade dos traçadores.

### QUALITY CONTROL OF RADIOIODINATED GASTRIN FOR RADIOIMUNOASSAY

#### ABSTRACT

Radioiodinated human gastrin has been prepared at IPEN laboratory for radioimmunoassay use. This work developed the quality control of this tracer analyzing parameters of the labelling reaction, chromatographic purification and radioimmunoassay. The radioiodination yield obtained in five experiments was reproducible and similar when analyzed on 7% polyacrylamide gel electrophoresis -PAGE- (mean  $\pm$  SD of  $51.70 \pm 10.76\%$ ) and by <sup>125</sup>I incorporation -

poration checked through trichloroacetic acid precipitation -TCA- (57-36  $\pm$  9.69%). Similarly, after purification the labelled gastrin revealed high and reproducibile purity degree when submitted to PAGE (96.57  $\pm$  1.06%) and TCA (94.82  $\pm$  4.20%) analysis. The respective specific activities varied from 62 to 307  $\mu$ Ci/ $\mu$ g, being determined by the self-displacement method, which is based on the immunoactivity of the tracer. In this way, the antibody titers required to bind 50% of the tracer ranged from 1:32.000 to 1:180.000. Consequently, the respective doses producing 50% fall in the maximum response of the radioimmunoassays ranged from 155.0 to 24.0 pmol/l, but remained unchanged for each tracer even after three months of its preparations. The tracers presented very low non-specific binding values (1.78  $\pm$  0.79%), stable specific binding values (46.49  $\pm$  5.65%) and a good between-assay precision, evaluated by an internal quality control sample (25.71  $\pm$  4.30% with coefficient of variation of 16.74%). The PAGE analysis of the unlabeled gastrin used in the first and last radioiodination revealed an unique and unaltered component, confirming the quality of the tracers.

## INTRODUÇÃO

A gastrina, um dos hormônios polipeptídeos gastrointestinais, é conhecida como sendo a substância mais potente para estimular a secreção ácida do estômago. A síntese da gastrina humana permitiu a padronização de um radioimunoensaio específico para sua medida no fim dos anos sessenta (1). Desde então, vários sistemas de radioimunoensaio de gastrina foram desenvolvidos para quantificar este hormônio em diferentes condições fisiológicas e patológicas (2-6). O desenvolvimento de um radioimunoensaio sensível e específico exige como condição fundamental o preparo de um traçador com pureza e qualidade comprovadas.

Vários autores referem-se a determinados parâmetros que permitem analisar as propriedades imunológicas do traçador, bem como realizar um controle de qualidade do mesmo ao longo de tempo de sua estocagem (4,7-9). Entre esses parâmetros destacam-se: atividade específica (A.E.), ligações inespecífica e específica, título do anti-soro que fornece 50% de ligação com o traçador, dose efetiva do padrão que produz uma queda de 50% na ligação máxima do traçador com o anticorpo ( $ED_{50}$ ) e concentração de amostras referentes a controle de qualidade interno.

A estabilidade de um hormônio radioiodado em função do tempo decorrido a partir de seu preparo, também constitui uma das características principais de um bom traçador.

Nesse sentido, diversos autores (2-6) realizaram estudos sobre a estabilidade da gastrina marcada com  $^{125}\text{I}$  pela técnica tradicional da oxidação com Cloramina T, demonstrando que o traçador apresenta-se estável por período variável de 2 a 3 meses após seu preparo.

Este trabalho realiza o controle de qualidade da gastrina humana radioiodada em nossos laboratórios para uso em radioimunoensaio, analisando-se os seguintes parâmetros: estabilidade da gastrina empregada para radioiodação e da gastrina radioiodada, rendimento da reação de radioiodação, atividade específica, pureza e imunorreatividade do traçador, título do anti-soro,  $\text{ED}_{50}$  e precisão inter-ensaio.

#### MATERIAIS E MÉTODOS

Foram realizadas cinco radioiodações da gastrina de acordo com o método clássico da Cloramina T modificado (10). Vinte microgramas de gastrina humana sintética I (G-17) obtida do "Research Plus Laboratories" (Denville, U.S.A.), foram marcados com 1 mCi de  $^{125}\text{I}$  na presença do agente oxidante (40 ug de Cloramina T). A reação foi interrompida dez segundos após seu início pela adição do agente redutor (40 ug de metabissulfito de sódio). A seguir, foram adicionados 200 ul de tampão TRIS 0,05 M e 500 ug de iodeto de potássio.

Os hormônios assim radioiodados foram purificados por cromatografia de troca aniônica em coluna de QAE-Sephadex A 25 (1,5 x 24 cm) a 4°C, de acordo com o método descrito por Jorgensen e Larsen (11). As colunas foram primeiramente empacotadas e equilibradas com tampão TRIS-NaCl de baixa molaridade (TRIS 0,1 M e NaCl 0,5 M contendo 1% de soro albumina bovina -SAB- a pH 8,6). As amostras foram eluídas com o mesmo tampão, porém com concentração maior de NaCl (1,0 M) e fluxo de 12 ml/h; coletando-se frações de dois mililitros cada.

As frações mais significativas dos perfis cromatográficos foram avaliadas quanto à sua imunorreatividade por incubação rápida (18 horas a 4°C) com anti-soro em excesso (1611, produzido em coelhos pelo Dr. J. H. Walsh, "University of California", Los Angeles, U.S.A.).

Alíquotas dos hormônios radioiodados não purificados, recém purificados e purificados e estocados por até 3 meses a -20°C, foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) a 7%, padronizada em nossos laboratórios (12). Os géis foram cortados em segmentos de 0,3 cm e tiveram suas atividades determinadas em contador de radiação gama.

O rendimento das radiações e a pureza dos hormônios radioiodados obtidos após as purificações foram determinados pelo cálculo do valor percentual do pico de gastrina -  $^{125}\text{I}$  com relação a radioatividade total no gel. Estes parâmetros foram analisados comparativamente pela precipitação com

o ácido tricloroacético (TCA) a 5%. Os valores de migração relativa ( $R_m$ ) das gastrinas -  $^{125}\text{I}$  foram determinados nos géis, com relação ao corante traçador (azul de bromofenol).

A mesma análise eletroforética foi efetuada com o hormônio frio ( não radioidado) por ocasião da primeira e da quinta radioiodação; sendo estes géis coradas com "Coomassie brilliant blue".

Os ensaios foram realizados de acordo com o método descrito por Russell e colaboradores (5), empregando-se gastrina -  $^{125}\text{I}$ , anti-soro com título adequado e hormônio padrão 68/439, obtido do "Medical Research Council", Londres, U.K. A separação entre a gastrina livre e a ligada ao anticorpo foi feita após período de incubação de 4 dias a 49°C, por adsorção da gastrina livre ao carvão (25 mg/tubo) recoberto com dextran.

O título do anti-soro utilizado para cada traçador foi determinado pela incubação de diversas concentrações do mesmo (variando de 1:8.000 a 1:1.200.000) com a gastrina -  $^{125}\text{I}$  na ausência de hormônio padrão.

Analisaram-se também as ligações específicas (ligações máximas dos traçadores com o anticorpo na ausência de hormônio padrão), inespecíficas (ligações dos traçadores na ausência de anticorpo), valores de  $\text{ED}_{50}$  e as concentrações de u'a amostra com teor de gastrina médio (ao redor de 25 pmol/l). Essas concentrações foram determinadas em ensaios realizados com os diferentes traçadores para avaliação do coeficiente de variação inter-ensaio. Estes parâmetros foram estimados em ensaios realizados com o hormônio padrão nas concentrações variando de zero a 500 pmol/l; preparado em plasma isento de gastrina.

A atividade específica dos traçadores foi avaliada pelo método do auto-deslocamento (13); o qual se baseia na atividade imunológica dos mesmos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 exhibe um perfil cromatográfico típico da purificação de gastrina -  $^{125}\text{I}$  em QAE-Sephadex A 25. Os três picos radioativos principais observados nessa figura foram obtidas nas cinco purificações.

A Tabela I apresenta os resultados da imunorreatividade e pureza das frações correspondentes a esses três picos resultantes das cinco radioiodações. Apenas as frações do segundo pico apresentaram valores médios de ligação inespecífica baixa ( $2,36 \pm 0,38\%$ ), de ligação específica com excesso de anti-soro elevada ( $82,92 \pm 5,51\%$ ) e precipitação pelo TCA acima de 90% ( $94,82 \pm 4,20\%$ ); indicando serem estas frações formadas pela gastrina -  $^{125}\text{I}$  pura e imunorreativa. Estas foram misturadas e estocadas a -20°C para serem empregadas como traçadores nos radioimunoensaios.

As frações referentes ao primeiro e ao terceiro pico representados no cromatograma da Figura 1 forneceram valores médios de ligação inespecífica elevados ( $50,60 \pm 11,25\%$  e  $40,62 \pm 26,36\%$ , respectivamente). Apenas as frações do primeiro pico apresentaram valor médio de precipitação pelo TCA significativo ( $75,96 \pm 3,62\%$ ). Estes resultados indicam serem as frações do primeiro pico constituídas por outra proteína que não a gastrina - $^{125}\text{I}$ , muito provavelmente pela SAB presente no tampão de eluição, que carregaria parte do  $^{125}\text{I}$  livre.

As frações do terceiro pico, as últimas a serem desadsorvidas da matriz do QAE - Sephadex pela troca com os íons cloro do tampão de eluição, são compostas pelo  $^{125}\text{I}$  livre propriamente dito.

A Figura 2 apresenta o eletroforetograma da gastrina fria submetida à EGPA por ocasião da primeira radioiodação. Pode-se observar que a gastrina não radioiodada revelou após coloração um único componente com valor de  $R_m$  de 0,848. Este valor é elevado devido aos múltiplos resíduos de ácido glutâmico presentes na molécula do hormônio que lhe conferem caráter negativo (4). A gastrina fria manteve-se inalterada mesmo após 30 meses de estocagem na forma liofilizada a  $-20^\circ\text{C}$ , período transcorrido entre a primeira e a última radioiodação.

Na Figura 3 é representado um eletroforetograma característico da gastrina obtida logo após sua radioiodação, no qual são observados dois picos radioativos correspondentes a gastrina - $^{125}\text{I}$  e ao  $^{125}\text{I}$  livre.

A Tabela II apresenta os valores de  $R_m$  destes componentes evidenciados nas cinco radioiodações. Devido ao seu pequeno tamanho (peso molecular de 2098 daltons), os hormônios quando radioiodados tiveram seu  $R_m$  aumentado pela forte eletronegatividade que lhes foi atribuída pela incorporação do átomo de  $^{125}\text{I}$  em suas moléculas (valor médio de  $1,020 \pm 0,011$ ). Consequentemente, seus valores de  $R_m$  foram muito próximos aos daqueles do  $^{125}\text{I}$  livre ( $1,125 \pm 0,005$ ), o qual, conforme já observado em outros experimentos (14), migra um pouco mais à frente do corante traçador.

A Tabela III apresenta os resultados comparativos dos rendimentos das cinco radioiodações estimados pelo EGPA (valor médio de  $51,70 \pm 10,76\%$ ) e pela precipitação com TCA (valor médio de  $57,36 \pm 9,69\%$ ). Ambos os métodos forneceram resultados compatíveis, permitindo a determinação do rendimento pela precipitação com TCA, que é um método bem mais simples e rápido do que a EGPA. Valores de rendimento acima de 40%, quando calculados pela precipitação com TCA, indicam o sucesso dessas radioiodações. Ganguli e Hunter (15) prepararam gastrina I radioiodada com rendimentos da ordem de 40 a 55%, enquanto que Stadil e Rehfeld (3) obtiveram em 12 experimentos ren-

dimentos maiores variando de 71 a 82%.

A Figura 4 exibe um eletroforetograma típico da gastrina -  $^{125}\text{I}$  recém purificada, no qual se observa um único componente com valor de R<sub>m</sub> característico da gastrina radioiodada. Esse comportamento se repetiu nas demais purificações, conforme é demonstrado na Tabela IV. Nessa tabela estão representados os valores da pureza dos traçadores, determinados pela EGPA (média de  $96,57 \pm 1,06\%$ ) e pela precipitação com TCA (média de  $94,48 \pm 4,20\%$ ), e os respectivos valores de R<sub>m</sub> (média de  $0,996 \pm 0,022$ ). Mais uma vez ambos os métodos forneceram resultados semelhantes, facultando o emprego da precipitação pelo TCA para análise da pureza do traçador.

Na Figura 5 estão representados os cromatogramas do traçador decorridos 1 e 3 meses após seu preparo. Pode-se observar que mesmo após 3 meses de estocagem a  $-20^\circ\text{C}$  a gastrina -  $^{125}\text{I}$  permanece pura e inalterada, com valores de R<sub>m</sub> característicos. O emprego deste traçador nos radioimunoensaios é evidenciado na Figura 6, que apresenta curvas padrão comparativas preparadas com a gastrina -  $^{125}\text{I}$  após 1 e 3 meses de estocagem. Os valores de ligação inespecífica variaram de 1,11 a 3,65% enquanto que os valores de ED<sub>50</sub> variaram de 69 a 48 pmol/l nesse período de dois meses.

A Tabela V apresenta os resultados dos diversos parâmetros de controle de qualidade analisados, referentes aos cinco traçadores. A atividade específica obtida variou de 62 a 307 uCi/ug, podendo ser explicada pelo tempo muito curto de exposição do peptídeo à Cloramina T (dez segundos), que dificulta o controle da reação. Valores um pouco mais elevados foram obtidos por Stadil e Renfeld (3) variando de 220 a 605 uCi/ug com média de 335 uCi/ug, por McGuigan e Wolfe (6) com valor médio entre 300 a 400 uCi/ug e por Russel e cols. (5) com valor médio de 550 uCi/ug.

Considerando uma abundância isotópica de 100% para o  $^{125}\text{I}$  (17,2Ci/mg) a A.E. correspondente a substituição de 1 átomo de  $^{125}\text{I}$  por molécula de gastrina seria de 1025 uCi/ug. Como a A.E. do  $^{125}\text{I}$  empregado nas radioiodações foi da ordem de 15 Ci/mg, seria esperado uma A.E. de 894 uCi por micrograma de gastrina monoiodada. Entretanto, os traçadores obtidos no presente estudo apresentaram substituição de até 0,30 átomos de  $^{125}\text{I}$  por molécula de gastrina.

Apesar de Ganguli e Hunter (15) não terem observado alterações na imunorreatividade de traçadores obtidos com substituição de até 1 átomo de  $^{125}\text{I}$  por molécula de gastrina, no presente trabalho houve uma progressiva diminuição na imunorreatividade dos traçadores que apresentaram valores de A.E. mais baixos.

A perda da imunorreatividade é evidenciada pelos menores títulos de

anti-soro (1:32.000 e 1:88.000) que forneceram 50% de ligação com os traçadores obtidos nas preparações com A.E. de 62 e 70 uCi/ug (radioações de nº 1 e 3), correspondentes a 0,07 e 0,08 átomos de  $^{125}\text{I}$  por molécula de gastrina).

Os valores de  $\text{ED}_{50}$ , que refletem a sensibilidade das curvas padrão preparadas com esses traçadores, variaram inversamente com a A.E. dos mesmos. As preparações com valores de A.E. e título de anti-soro mais elevados (radioiodação de nº 2 e 5), apresentaram os menores valores de  $\text{ED}_{50}$  permitindo a realização de ensaios mais sensíveis ( $30,25 \pm 4,89$  pmol/l) com coeficiente de variação - CV - de 16,17%, referente à média das duas preparações).

As mesmas doses médias fornecidas pelos traçadores com os valores de A.E. mais baixos (radioiodação de nº 1 e 3) foram de  $116,25 \pm 34,69$  pmol/l com CV de 29,84%. O traçador com valor de A.E. intermediário (radioiodação de nº 4) apresentou valor médio de  $\text{ED}_{50}$  de  $58,20 \pm 8,58$  pmol/l e CV de 14,75%. Apesar dessas diferenças, cada traçador forneceu valores de  $\text{ED}_{50}$  pouco variáveis ao longo dos 3 meses após seu preparo (CV de 12,82 a 27,45%).

Todos os traçadores apresentaram valores de ligação inespecífica muito baixos, em torno de 2%, que se mantiveram praticamente constantes com o decorrer do tempo de estocagem (média de  $1,78 \pm 0,79\%$ , com CV de 44,49%). Da mesma forma, seus valores de ligação específica apresentaram pequena variação entre os diferentes traçadores e durante a estocagem (média de  $46,49 \pm 5,65\%$ , com CV de 12,16%).

Essas ligações fornecidas pelos traçadores, inespecíficas baixas e específicas constantes, são devidas ao grau de pureza elevado dos mesmos (ausência de traçadores degradados ou  $^{125}\text{I}$  livre) e de sua inalterabilidade em função do tempo de estocagem, conforme demonstrado na Figura 5.

Finalmente, a concentração da amostra sérica de gastrina determinada em ensaios realizados com os cinco diferentes traçadores forneceu um valor médio de  $25,71 \pm 4,30$  pmol/l, com CV inter-ensaio de 16,74%. Valores similares de CV inter-ensaio foram estimados por outros autores para amostras de gastrina (5) e hormônio de crescimento (9).

Apesar dos traçadores com A.E. mais elevada terem se apresentado mais imunorreativos e terem fornecido curvas padrão mais sensíveis; todos eles forneceram ligações inespecífica e específica constantes e permitiram a determinação da concentração da gastrina no soro com precisão elevada.

Pode-se concluir que a gastrina humana radioiodada em nossos laboratórios é extremamente pura e estável, e apresenta-se imunorreativa após lon -

PICO (Nº)	RADIOIO- DAÇÃO (Nº)	% LIGAÇÃO		% TCA
		INESPECÍFICA (AUSENCIA DE ANTI-SORO)	ESPECÍFICA (EXCESSO DE ANTI-SORO)	
1	1	-	-	-
	2	63.76	3.02	71.07
	3	54.84	4.40	78.38
	4	46.21	4.85	78.42
	5	37.58	2.48	75.40
			50.60 $\pm$ 11.25	3.68 $\pm$ 1.12
2	1	1.72	73.60	95.00
	2	2.36	88.16	87.58
	3	2.64	83.59	97.30
	4	2.65	85.25	97.96
	5	2.45	84.00	96.22
			2.36 $\pm$ 0.38	82.92 $\pm$ 5.51
3	1	28.91	12.25	22.05
	2	81.31	0.96	24.18
	3	39.02	2.62	25.60
	4	44.66	5.79	22.94
	5	9.72	0.46	13.54
			40.62 $\pm$ 26.36	4.42 $\pm$ 4.85

TABELA I

Resultados dos testes da imunorreatividade (% de ligação) e da pureza (% de precipitação pelo TCA) das frações mais significativas obtidas na purificação da gastrina  $^{125}\text{I}$ , resultante de cinco diferentes radioiodação.

RADIOIODAÇÃO (Nº)	R <sub>m</sub>	
	Gastrina - <sup>125</sup> I	<sup>125</sup> I
1	1.024	1.122
2	1.026	1.128
3	1.000	1.133
4	1.024	1.122
5	1.024	1.122
	1.020±0.011	1.125±0.005

TABELA II

Valores de R<sub>m</sub> obtidos na eletroforese em gel de poliacrilamida a 7%, da gastrina - <sup>125</sup>I e do <sup>125</sup>I livre, resultantes de cinco diferentes radioiodações.

RADIOIODAÇÃO (Nº)	% EGPA	% TCA
1	53.90	41.08
2	52.66	46.80
3	74.34	66.42
4	55.63	59.50
5	50.28	44.70
	57.36±9.69	51.70±10.76

TABELA III

Resultados comparativos dos rendimentos obtidos em cinco radioiodações, estimados pela EGPA e precipitação com TCA.

RADIOIODAÇÃO (Nº)	% EGPA	% TCA	R <sub>m</sub>
1	95.81	95.06	1.028
2	98.39	87.58	0.973
3	96.56	97.30	1.000
4	95.94	97.96	0.978
5	96.14	96.22	1.000
	96.57±1.06	94.82±4.20	0.996±0.022

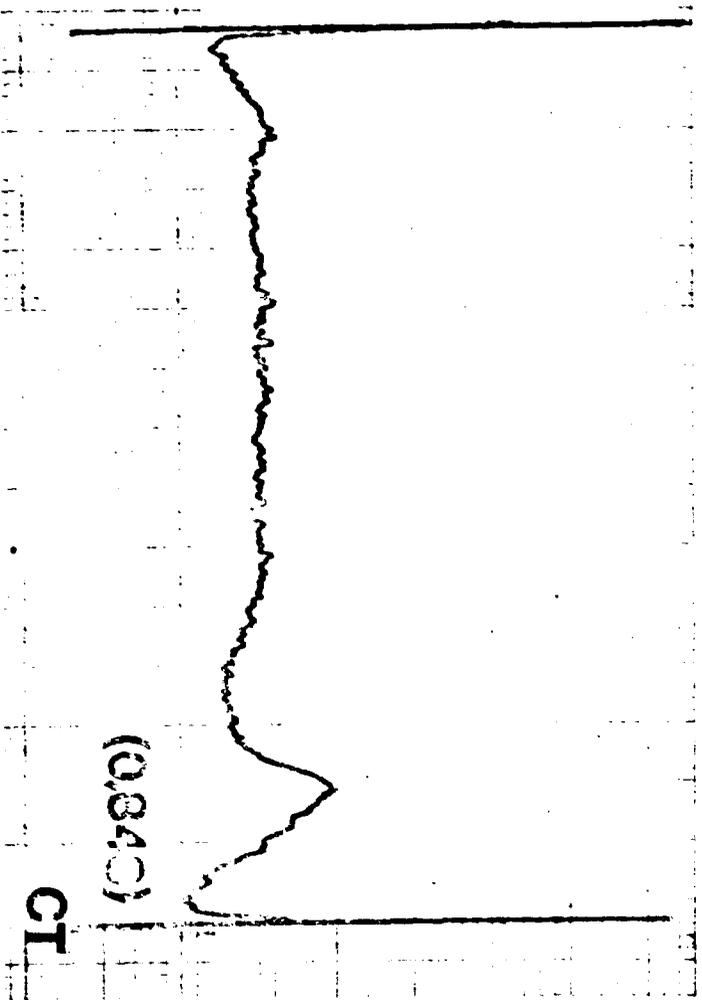
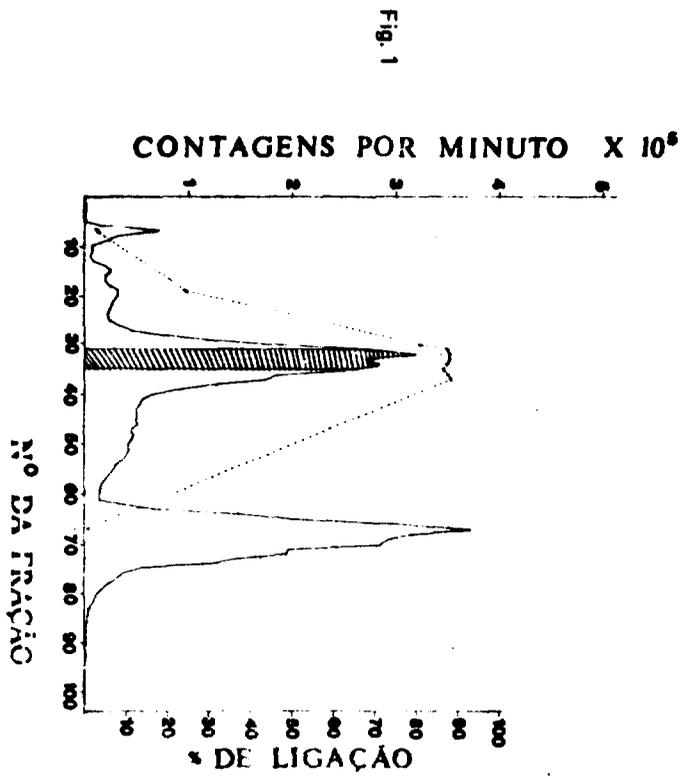
TABELA IV

Resultados comparativos da pureza dos traçadores estimada pela EGPA e precipitação com TCA e respectivos valores de migração relativa (R<sub>m</sub>) no gel. Dados referentes a cinco diferentes radioiodações.

RADIO- IODAÇÃO (Nº)	A.E. (uCi/ug)	ESTOCA- GEM (dias)	% LIGAÇÃO		TÍTULO ANTI-SORO	ED 50	GASTRI- NA (pmol/l)
			INESPECÍFICA	ESPECÍFICA			
1	62	57	3.62	45.35	1:32.000	155	25
2	307	55	1.24	48.12	1:180.000	31	29
		77	1.06	35.50		39	28
		98	1.20	43.46		32	20
3	70	23	2.00	38.32	1:88.000	115	-
		30	1.10	44.20		71	21
		72	1.27	36.99		124	-
4	178	16	1.60	46.50	1:108.000	65	34
		23	1.11	45.95		69	21
		44	1.48	48.56		55	31
		72	2.23	48.62		54	22
		86	3.65	46.95		48	25
5	252	16	1.46	51.21	1:163.200	33	23
		34	2.30	52.49		24	-
		52	1.78	57.26		24	23
		69	1.49	50.67		29	29
		86	1.73	50.21		30	29

TABELA V

Parâmetros de controle de qualidade da gastrina  $^{125}\text{I}$  obtida em cinco radio-iodações, analisados ao longo do tempo de estocagem: atividade específica (A.E.), porcentagens de ligações inespecífica e específica, título do anti-soro,  $\text{ED}_{50}$  e concentração de gastrina da amostra referente ao controle de qualidade interno.



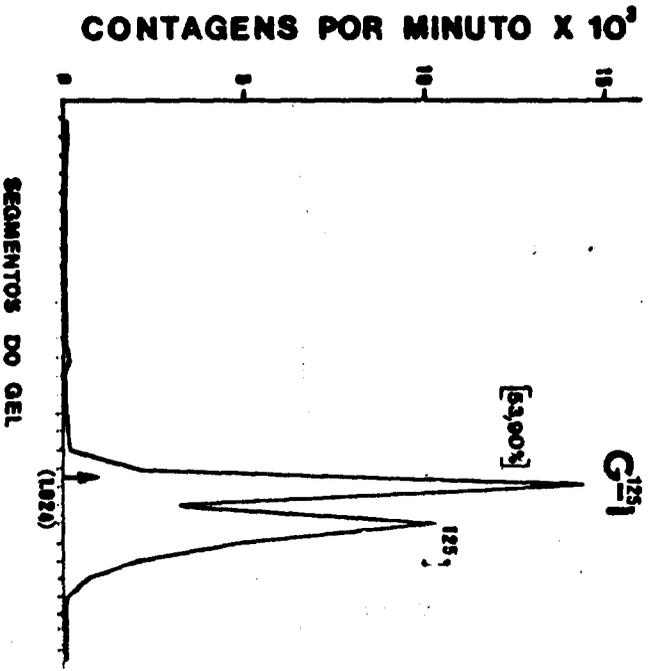


Fig. 3

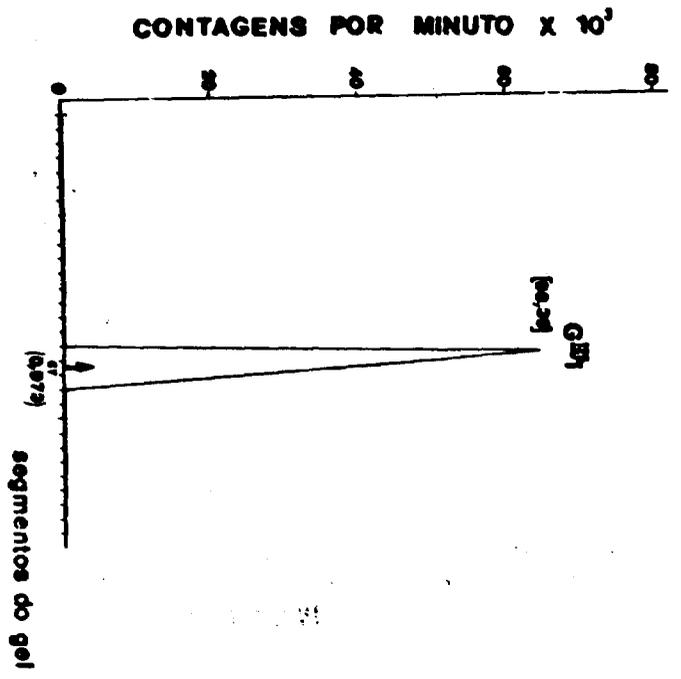
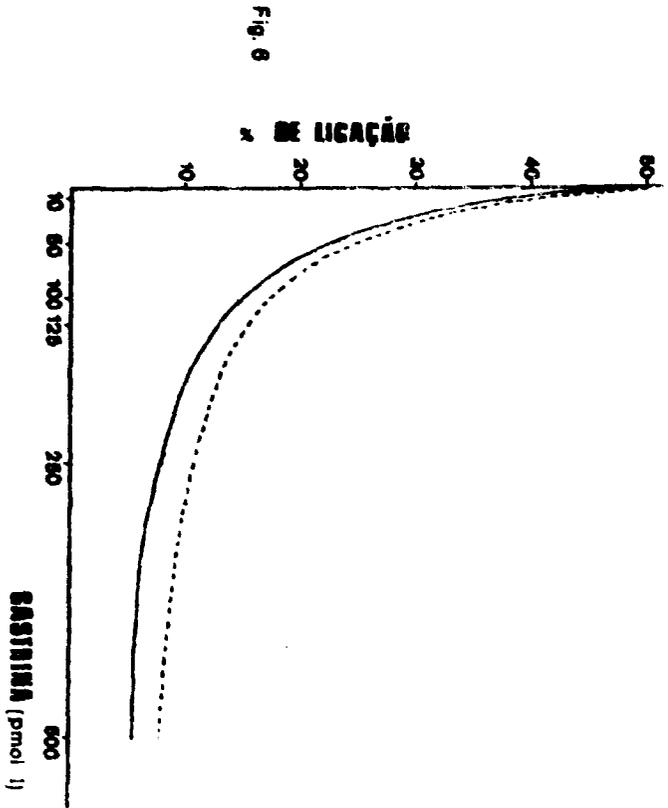
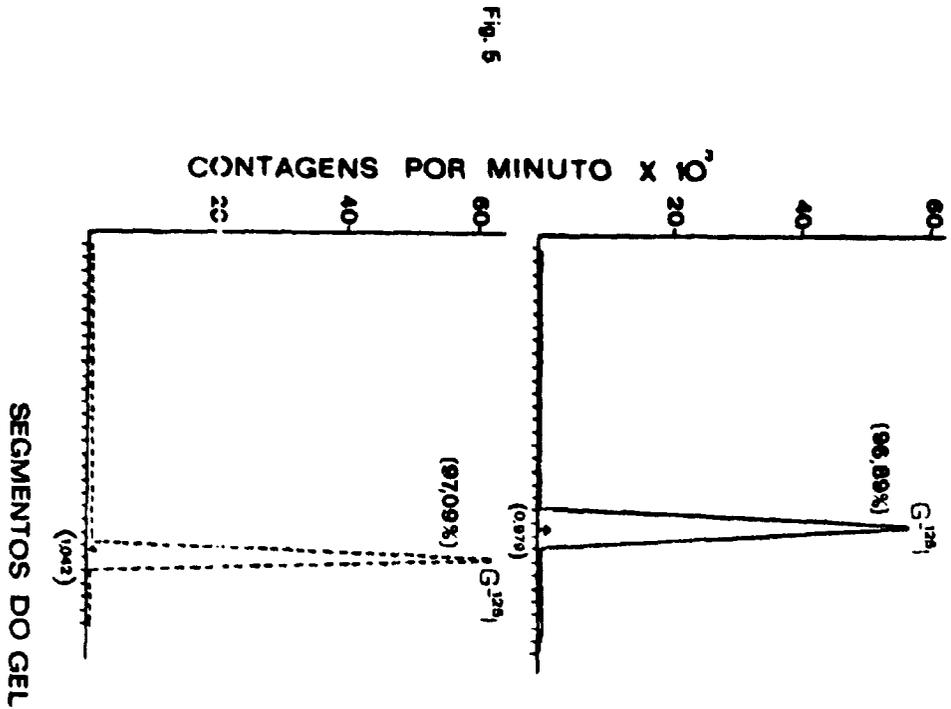


Fig. 4



### LEGENDAS DAS FIGURAS

- Fig. 1: Cromatograma da purificação da gastrina -  $^{125}\text{I}$  em QAE-phadex A 25 . A linha contínua expressa a radioatividade das frações em contagens por minuto e a linha descontínua representa a porcentagem de ligação da gastrina -  $^{125}\text{I}$  ao seu anticorpo específico, empregando em excesso. A área hachurada corresponde às frações que foram misturadas e estocadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para serem usadas como traçador nos ensaios.
- Fig. 2: EGPA da gastrina não marcada. O valor da migração relativa do componente principal é indicado em parênteses. C.T. indica a posição do corante traçador, azul de bromofenol.
- Fig. 3: Eletroforetograma da gastrina obtida logo após sua radioiodação. O valor da migração relativa à atividade total no gel, é indicado em colchetes. A seta indica a posição do corante traçador, azul de bromofenol.
- Fig. 4: Eletroforetogramas da gastrina -  $^{125}\text{I}$  recém purificada. O valor da migração relativa do único componente é indicado em parênteses e seu valor porcentual, relativo à atividade total no gel, é indicado em colchetes. A seta indica a posição do corante, azul de bromofenol.
- Fig. 5: Eletroforetogramas obtidos com o traçador após 1 ( — ) e 3 ( - - ) meses de estocagem a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Os valores de migração relativa no gel da gastrina -  $^{125}\text{I}$  são indicados em parênteses e seus valores porcentuais, relativos à atividade total nos géis, são indicados em colchetes. As setas indicam as posições do corante traçador, azul de bromofenol.
- Fig. 6: Curvas padrão obtidas com a gastrina -  $^{125}\text{I}$  decorridos 1 ( — ) e 3 ( - - ) meses após seu preparo.

longos períodos de estocagem. Este traçador é portanto adequado para ser empregado em radioimunoensaios de gastrina humana, permitindo a realização de ensaios reprodutíveis e a determinação precisa de concentração desconhecidas.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CNEN, à Disciplina de Gastroenterologia Clínica da FMUSP, e ao CNPq (processo nº 405-557/87) os auxílios recebidos para a realização deste trabalho, bem como à FAPESP a bolsa de mestrado concedido. Agradecemos também às senhoritas Rosângela do Rocio Arkaten e Vanda Donizetti R. Silveira o auxílio técnico prestado.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. ODELL, W.D.; CHARTERS, A.C.; DAVIDSON, W.D.; THOMPSON, J.C. Radioimmunoassay for human gastrin using unconjugated gastrin as an antigen. J. Clin. Endocrinol., 28: 1840 - 2, 1968.
02. YALOW, R.S. & BERSON, S.A. - Radioimmunoassay of gastrin. Gastroenterology, 58: 1 - 14, 1970.
03. STADIL, F. & REHFELD, J.F. Preparation of  $^{125}\text{I}$ -labelled synthetic human gastrin I for radioimmunoanalysis. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 30: 361 - 8, 1972.
04. WALSH, J.H. Radioimmunoassay of gastrin. In: ROTHFELD, B. ed. Nuclear Medicine in vitro. Lippincott, Philadelphia, 1974, cap. 17, p.231 - 48.
05. RUSSELL, R.C.G.; FIELDING, L.F.; BOGOM, G.R.; BRYANT, M.G. Current problems in the measurement of gastrin release. A producible measure of physiological gastrin release. Postgrad. Med. J., 52:645-50, 1976.
06. MCGUIGAN, J.E. & WOLFE, M.M. Gastrin radioimmunoassay. Clin. Chem., 28: 368 - 73, 1982.
07. RODBARD, D. Quality control for RIA. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Radioimmunoassay and related procedures in medicine: proceedings of an international symposium on..., held in Berlin, 31 Oct. - 4 Nov., 1977. Vienna, 1978. v.2, p.21 - 38.

08. ALBUQUERQUE, R.H. Controle de qualidade em radioimunoensaicos. Arg. Bras. Endocrinol. Metabol., 25: 120 - 4, 1981.
09. BARTOLINI, P.; RIBELA, M.T.C.P.; CAMILLO, M.A. Improvement of reproducibility and quality control of human growth hormone radioiodination. Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo, 2: 1 - 8, 1988.
10. PLIG GINABREDA, M.G.; BORGHI, V.C.; BETTARELLO, A. Preparation of radioiodinated gastrin for radioimmunoassay. Arg. Biol. Technol., 30: 41, 1987.
11. JORGENSEN, K.H. & LARSEN, V.D. Purification of  $^{125}\text{I}$  glucagon by anion exchange chromatography. Horm. Metab. Res., 4: 223 - 4, 1972.
12. BARTOLINI, P.; ASSIS, L.M.; SCHWARZ, I.; PIERONI, R.P. An accurate determination of human growth hormone content in different pituitary extracts, using a radioimmunoassay with polycrylamide gel electrophoresis as a bound-free separation system. Clin. Chim. Acta., 79: 223-1977.
13. MORRIS, B.J. Specific radioactivity of radioimmunoassay tracer determined by self-displacement. A re-evaluation. Clin. Chim. Acta., 73 : 213 - 6, 1976.
14. BORGHI, V.C. & WAJCHENBERG, B.L. Stability of freeze-dried glucagon for tracer preparations. Arg. Bras. Endocrinol. Metabol., 27: 86 - 8, 1983.
15. GANGULI, P.C. & HUNTER, W.M. Iodination of gastrin. In: KIRKHAM, K.E. & HUNTER, W.M. eds. Radioimmunoassay Methods. Churchill livingstone , Edinburgh, 1971. p. 54 - 60.