

CNEN/SP**ipen** Instituto de Pesquisas
Energéticas e Nucleares

DESENVOLVIMENTO DE UMA TÉCNICA DE FASE SÓLIDA
PARA RADIOIMUNOENSAIO DO HORMÔNIO
TRIIODOTIRONINA (T₃) NO SORO

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

IPEN - PUB - - 215

PUBLICAÇÃO IPEN 215

OUTUBRO/1988

SÃO PAULO

**DESENVOLVIMENTO DE UMA TÉCNICA DE FASE SÓLIDA
PARA RADIOIMUNOENSAIO DO HORMÔNIO
TRIIODOTIRONINA (T₃) NO SORO**

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

DEPARTAMENTO DE PROTEÇÃO RADIOLÓGICA

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

Série PUBLICAÇÃO IPEN

INIS Categories and Descriptors

C62.00

**BLOOD SERUM
RADIOIMMUNOASSAY
TRIIODOTHYRONINE**

IPEN - Doc - 3087

Publicação aprovada pela CNEN em 24/09/87.

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

**DESENVOLVIMENTO DE UMA TÉCNICA DE FASE SÓLIDA PARA RADIOIMUNOENSAIO
DO HORMÔNIO TRIIODOTIRONINA (T₃) NO SORO***

Margarida M. Hamada, Carlos H. Mesquita e Constância Pagano G. da Silva

RESUMO

Desenvolveu-se um sistema de radioimunoensaio (RIE) do hormônio T₃ pela técnica de "fase sólida", imobilizando-se anticorpo, anti-T₃ 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 T₃ no soro de indivíduos hipotiroideos e hipertiroideos e a faixa de normalidade de T₃ foram determinados para esta técnica, estando de acordo com a literatura.

**DEVELOPMENT OF A SOLID PHASE TECHNIC FOR RADIOIMUNOASSAY
OF TRIIODOTHYRONINE (T₃) IN SERUM**

ABSTRACT

We have developed a solid phase radioimmunoassay (RIA) system for triiodothyronine (T₃), 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 (MDD), 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 T₃ 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) é um dos métodos mais utilizados atualmente na rotina de dosagens de substâncias contidas nos fluídos biológicos.

(*) Trabalho apresentado no II Congresso Geral de Energia Nuclear, Rio de Janeiro, Abril de 1988.

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, bacterologia e outros.

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

- 1 - Praticabilidade (simplicidade, rapidez);
- 2 - Confiabilidade (precisão, exatidão, especificidade, sensibilidade);
- 3 - Ter baixo custo (custo/benefício).

Encontram-se na literatura diversas propostas técnicas^(2, 6, 9) que procuram satisfazer esses itens e dentre elas a técnica denominada de "fase sólida" destaca-se como a mais eficiente⁽²⁾. 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 T_3 (triiodotironina) como modelo pois é um radioensaio típico e um dos hormônios de maior solicitação clínica.

MATERIAIS E MÉTODOS

O anti-soro, anti T_3 , 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 T_3 e por não ser imunogênico na sua forma natural,⁽³⁾ o imunógeno foi preparado conjugando-se T_3 com soro albumina bovina (SAB) utilizando-se a reação com carbodiimida⁽¹⁾.

Na injeção da primeira dose o complexo imunogênico (T_3 -SAB) foi misturado em coadjuvante de Freund (Difco) completo (com BCG) e nas doses de reforço subsequentes misturou-se o imunógeno em adjuvante 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 centrifugado a 1000 g. O sobrenadante (soro) foi separado e isolou-se suas imunoglobulinas por precipitação com sulfato de amônia. As amostragens de sangue foram repetidas após 8 a 10 dias de cada dose de reforço. Selecionou-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: (T_3 100%), (T_4 0,05%), (rT_3 0,008%), (T_2 0,006%), (Tetrac 0,004%), (Triac 0,02%), (DIT 0,0001%) e (MIT 0,0001%).

O anti-soro assim obtido apresentou características semelhantes ao anti-soro gentilmente fornecido pelo Dr. Ewaldo M.K. Russo, que serviu para os nossos primeiros experimentos.

O traçador radioativo ($^{125}\text{I}-T_3$) foi preparado segundo a técnica da reação com cloramina-T conforme protocolo de marcação já descrito por Hamada e col^(4,5). A fração cromatográfica contendo o $^{125}\text{I}-T_3$ foi diluída em solução de propileno glicol a 50% e armazenada em temperatura de - 20°C. Para fins de ensaios o $^{125}\text{I}-T_3$ foi diluído em tampão veronal 0,05M pH 8,6 com 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 preparou-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 utilizou-se o glutaraldeído diluído a 2% em solução aquosa de NaOH em pH 9,5 depositando 1ml 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 adicionou-se 1 ml de anticorpo diluído em tampão veronal 0,05M pH 8,6 de modo a conseguir ligação de 25% com os 950Bq do traçador radioativo. Com o nosso anti-soro foi necessário diluí-lo à 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, para preencher os sítios não recobertos com anticorpo. Repetiu-se o processo de lavagem e levou-se à secura a 4°C. Para verificar a qualidade desses tubos de "fase sólida" realizou-se o RIE conforme o protocolo a seguir:

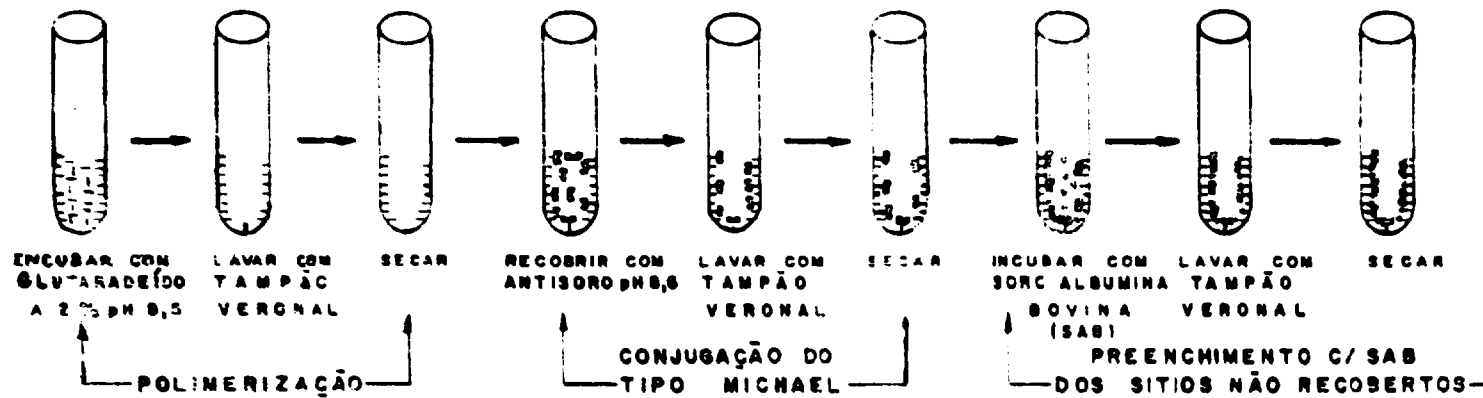
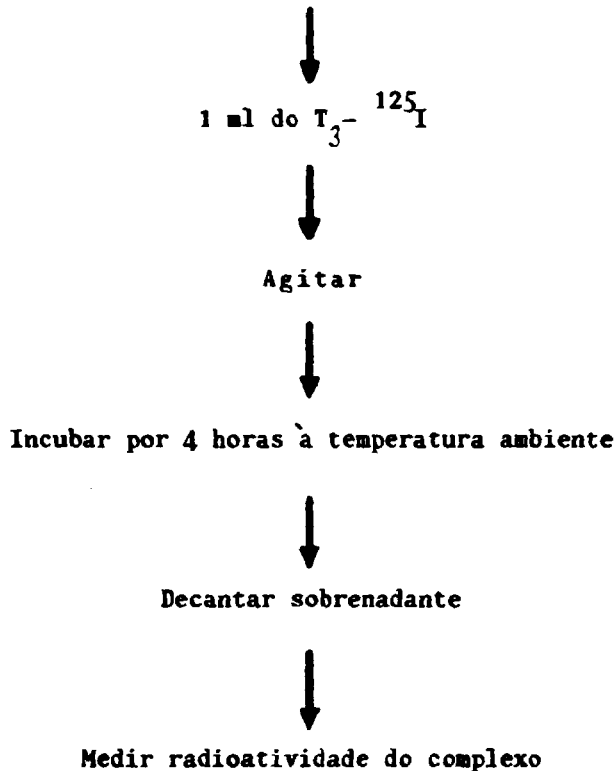


Figura 1: Esquema de preparação dos tubos de fase sólida.

Aliquotar 100 μ l dos soros padrões ou amostras
nos tubos previamente recobertos com anti-soro



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"⁽⁹⁾ e técnica da "solução PEG"⁽⁷⁾.

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⁽¹⁰⁾) foram efetuados pelo sistema computacional GARLA⁽⁷⁾ 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:

$$FM = \frac{DMD \times \text{Área do perfil de precisão}}{(DMS - DMD)^2}$$

onde DMD corresponde à dose mínima detectável a qual é estatisticamente diferenciável da concentração nula; DMS corresponde à dose mínima significativa, estimada a partir do parâmetro NSB. Esses dois parâmetros foram calculados pelo programa GARLA⁽⁷⁾.

A área do perfil de precisão foi calculada por cálculo numérico. A figura 2 esquematiza a idéia do dígito de mérito.

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na figura 3 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.

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.

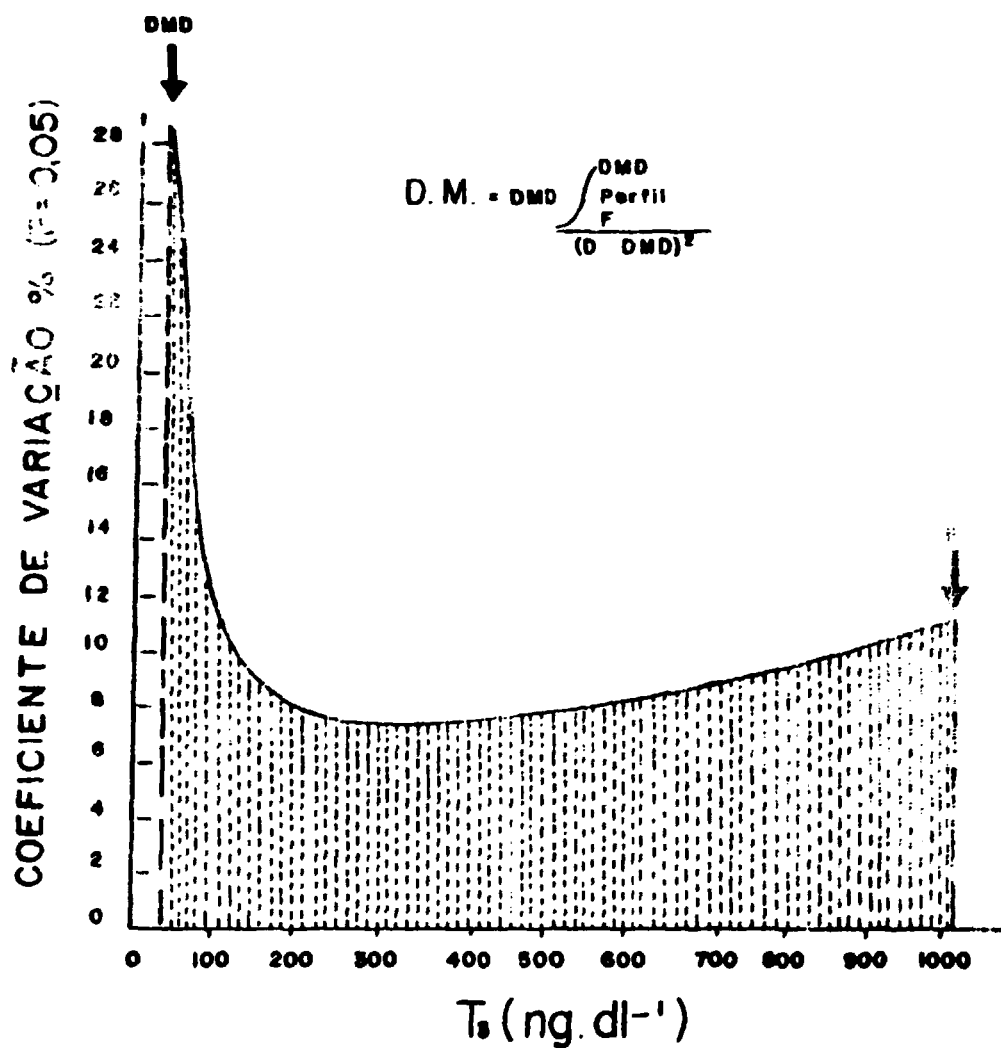


Figura 2: Elementos para cálculo do dígito de mérito.

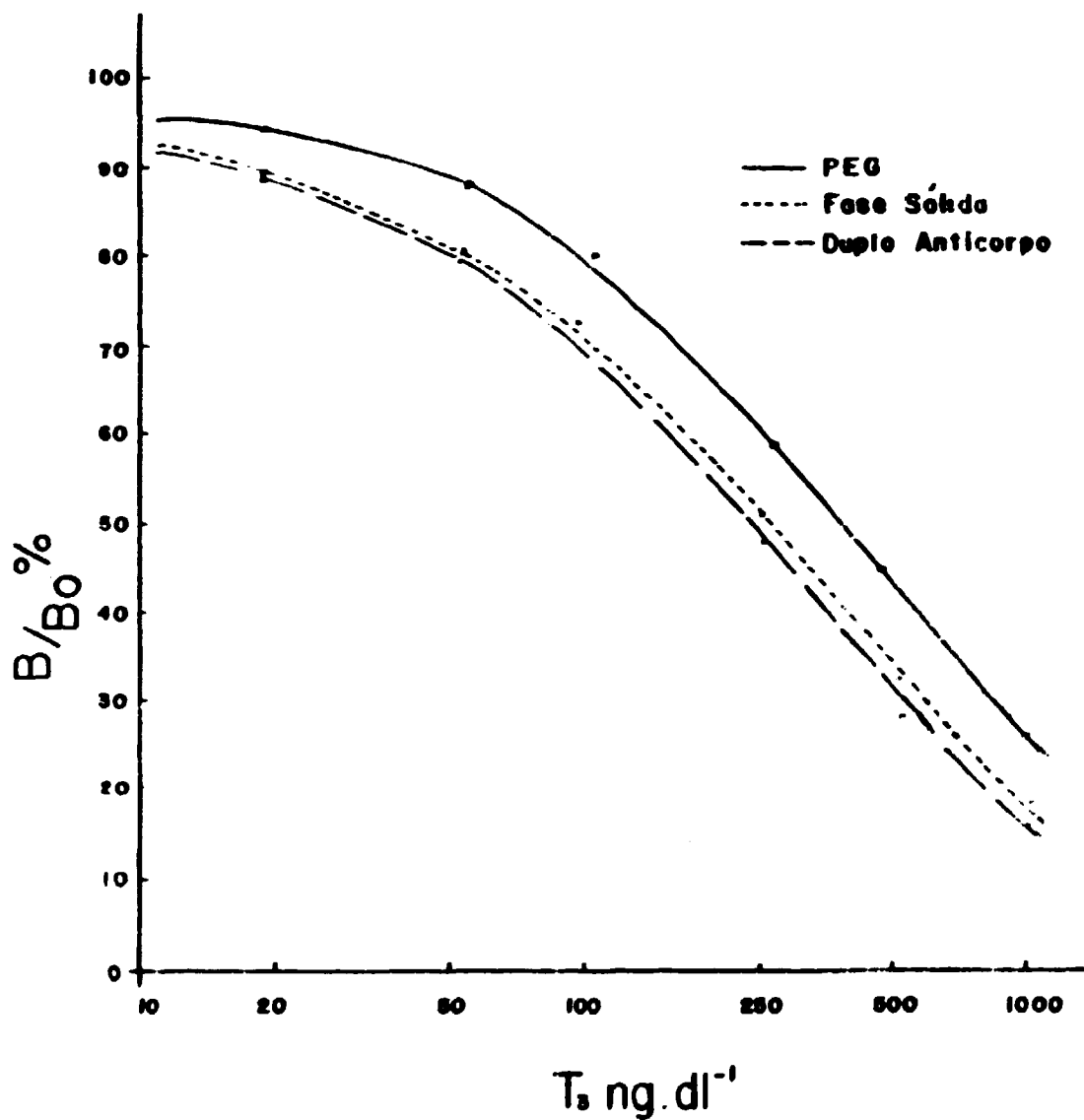


Figura 3: Curvas padrão dos RIEs de T_3 realizadas pelas três técnicas de separação da fração ligada da livre.

TABELA I

Resultados dos valores dos parâmetros a, b, c, d da função de ajuste da curva padrão, i.é,

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

e dos valores da dose mínima detectável (DMD)

Ensaio	(a)	(d)	(c)	(b)	DMD (ng/dl)
	Bo/T (%)	NSB (%)	X 50% (ng/dl)	Termo Exponencial	
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
P.E.G.	27 ± 4	10 ± 2	314 ± 43	1,20 ± 0,16	22 ± 4

Na avaliação isolada de cada parâmetro, a técnica de duplo anticorpo mostrou melhores resultados quanto a ligação não específica (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 4 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 5, acompanharam basicamente essas comparações, com valores mais elevados devido à inclusão de variáveis não controladas, conforme já previsto por Mesquita⁽⁷⁾. A dispersão inter-ensaio foi da ordem de 8 a 17% para a técnica da "fase sólida", 11 a 20% para a técnica do "duplo anticorpo"

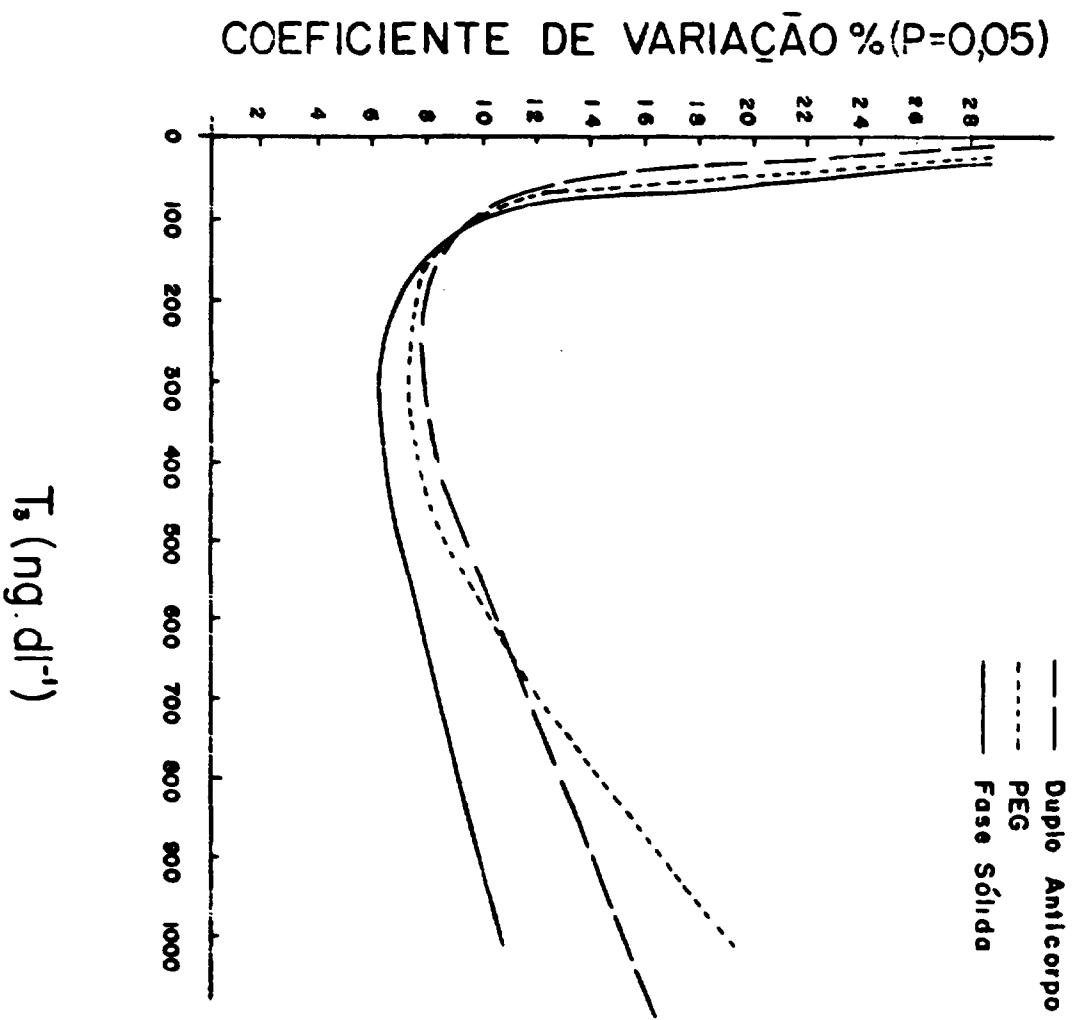


Figura 4: Perfil de precisão intra-ensaio para cada uma das três técnicas.

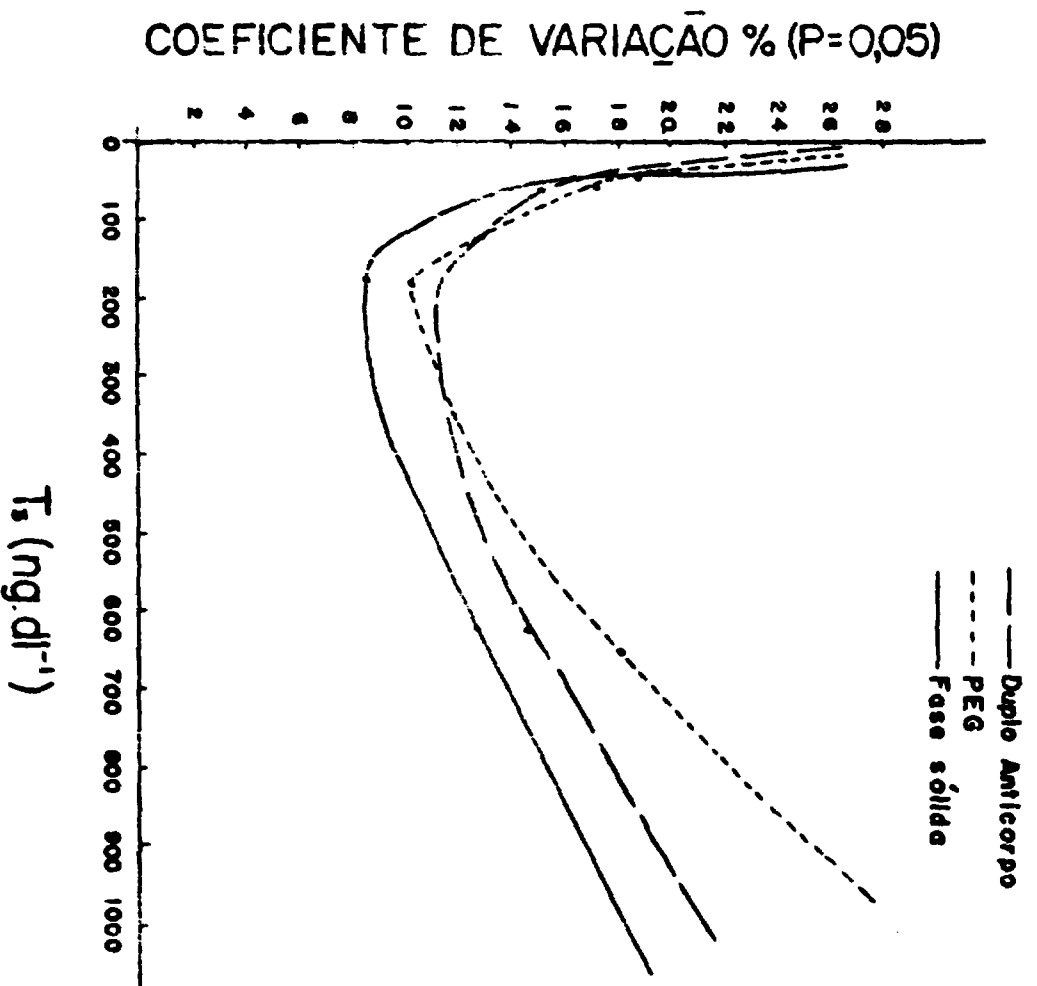


Figura 5: Perfil de precisão inter-ensaio para cada uma das três técnicas.

e de 10 a 26% para a técnica da "solução PEG", quando apreciadas na faixa de 50 a 950 ng/dl de T_3 .

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

Ensaio	DMD (ng/dl)	Área do perfil de precisão	Dígito do mérito
Fase Sólida	17	7806	0,14
Duplo Anticorpo	14	13098	0,19
P.E.G.	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 hipotireoídeos. No entanto, os três sistemas de separação mostraram-se adequados para a quantificação dos níveis séricos de T_3 .

A exatidão da técnica da "fase sólida" foi avaliada por compara-

ção entre os resultados de 39 amostras de soro dosados pelas três técnicas. A figura 6 ilustra essa análise comparativa. 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 hipotireóides, normais e hipertireóides encontra-se na figura 7. 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 a uma distribuição normal (gaussiana) estabeleceu-se o intervalo numérico de normalidade ao nível estatístico de $P = 0,05$ como sendo de 90 a 200ng/dl, com valor médio e desvio padrão de 145 ± 27 ng/dl.

Quanto aos aspectos econômicos envolvidos na técnica de "fase sólida" devemos considerar que o seu custo poderá ser impróprio 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⁽⁸⁾. Por outro lado, nossa experiência mostrou que na técnica de "fase sólida" foi necessário dispendir de maior quantidade de anti-soro, aproximadamente 10 vezes daquela quantidade utilizada normalmente nas técnicas de "fase líquida" e ainda, no preparo dos tubos de "fase sólida" o anti-soro deve ser de melhor qualidade e de maior título. O mesmo anti-soro quando usado nas técnicas de "fase líquida" deve apresentar uma diluição ao nível de pelo menos 1/10.000, para os hormônios de baixo peso molecular como é o caso do T_3 conforme Parsons⁽⁸⁾. Anticorpos do tipo monoclonal⁽¹¹⁾ provavelmente seriam mais indicados na preparação dos tubos de "fase sólida".

Concluindo, o custo do anti-soro utilizado na técnica da "fase sólida" é mais oneroso. No entanto, em escala industrial, no preparo de

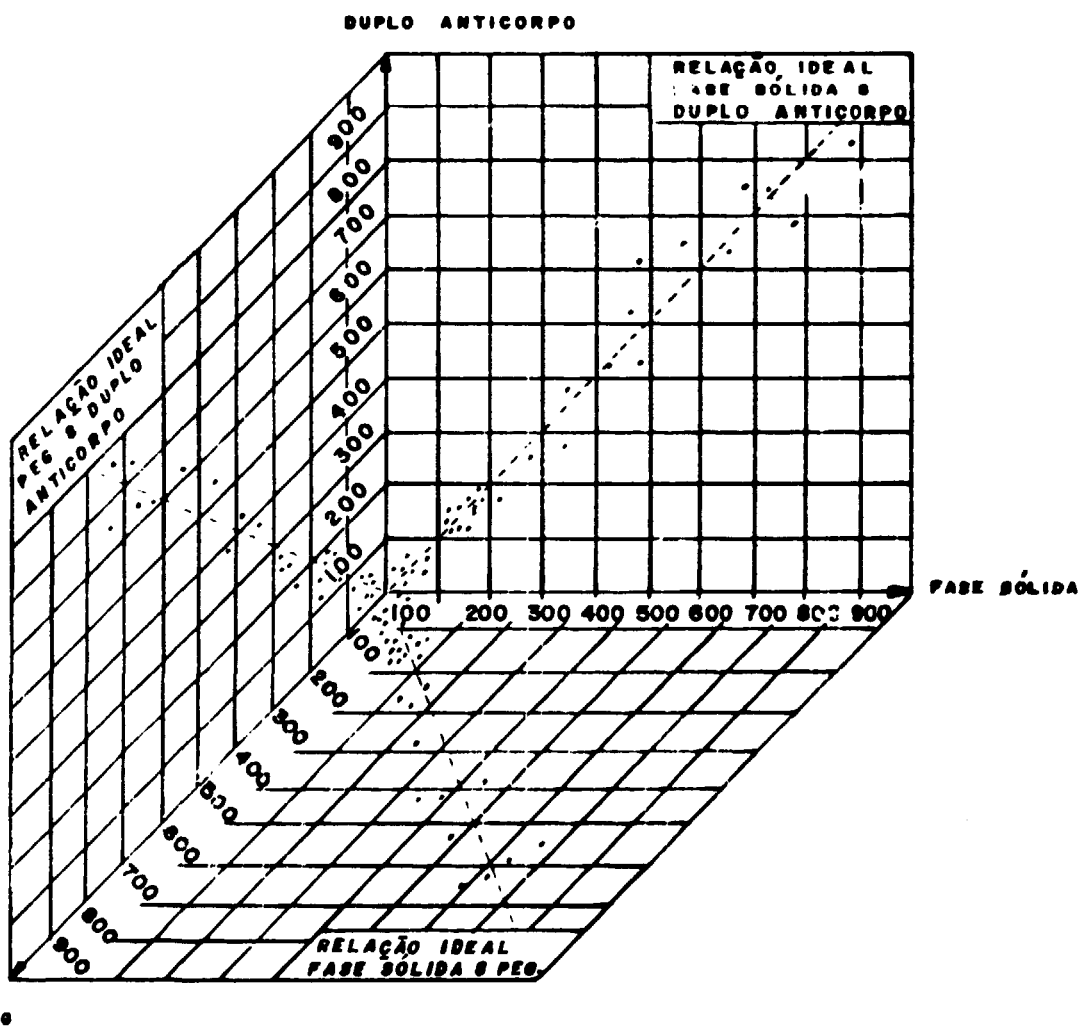


Figura 6: Correlação de resultados dos RIEs de T_3 entre as três técnicas.

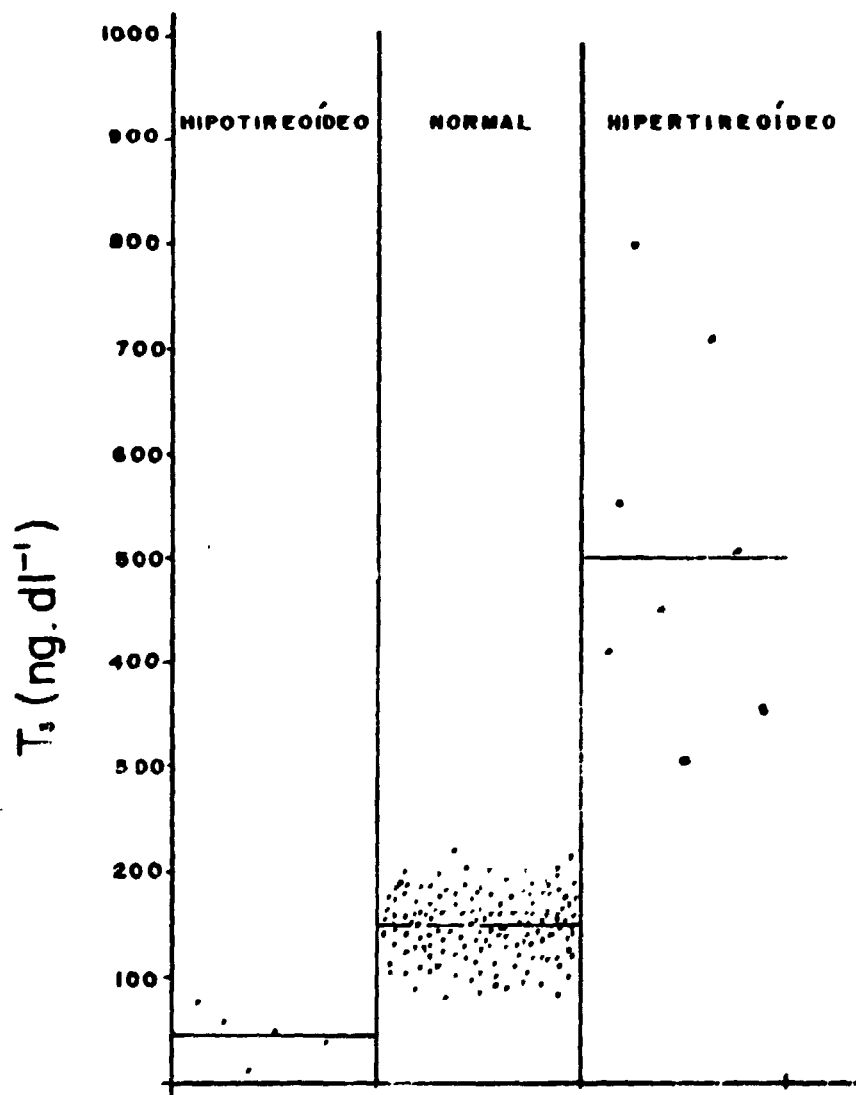


Figura 7: Níveis séricos de T_3 em indivíduos normais e em pacientes com hipotireoidismo e hipertireoidismo, dosados pela técnica de fase sólida.

"kits" que serão usados por diferentes laboratórios, a técnica de "fase sólida" é mais recomendável, pois garante ao fabricante o seu uso mais a dequado, simples e conseqüentemente menos sujeito a erros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BAUMINGER, S. & WILCHEC, M. The use of carbodiimides in the preparation of immunizing conjugates. *Methods Enzymol.*, 70:151-9, 1980.
2. 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.
3. CHOPRA, I.J. Concentration of triiodothyronines (T_3 and reverse T_3) in serum and other body fluids. In: CHOPRA, I.J. ed. *Triiodothyronines in health and disease*. Berlin, Springer, 1981, p. 58-94.
4. HAMADA, M.M. *Radioimunoensaio do hormônio triiodotironina (T_3) no so no. Desenvolvimento de uma técnica de fase sólida e comparação com duas técnicas de fase líquida: polietileno glicol (PEG) e du plo anticorpo. São Paulo, 1986. (Dissertação de Mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares).*
5. HAMADA, M.M.; MESQUITA, C.H.; SILVA, C.P.G. Preparation, purification and stability of specific activity 125 I-triiodothyronine (T_3). In: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ENERGIA NUCLEAR. *Anais do 2º Congresso Geral de... realizado no Rio de Janeiro, março, 1986*. Rio de Janeiro, v. 2, p. 98-101.
6. KIM, J.R.; AWH, O.D.; KOO, H.S.; PARK, K.B. Simple immobilization

- of T_3 antibodies of some modifications of assay buffer systems.
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. 81-93.
7. 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).
 8. PARSONS, G.H. Antibody-coated plastic tubes in radioimmunoassay. *Meth. Enzymol.*, 73:224-39, 1981.
 9. 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.
 10. SCATCHARD, G. The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 51:660-72, 1949.
 11. VIEIRA, J.G.H. Produção de anticorpos monoclonais. In: RUSSO, E.M.K. & VIEIRA, J.G.H coord. *III Curso de Laboratório em Endocrinologia*. Disciplina de Endocrinologia. Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1987.