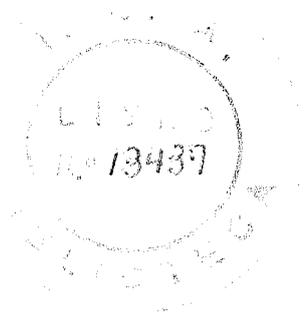


HEIDI PINTO

**PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DO
RADIOIMUNOENSAIO PARA A DOSAGEM DO
HORMÔNIO LUTEINIZANTE NO SORO HUMANO,
PELO MÉTODO DO "DUPLO ANTICORPO"**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo, Departamento de
Fisiologia Geral, para obtenção do Título de
"Mestre em Fisiologia", - sob a orientação do
Prof. Dr. Paulo Sawaya.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS - INSTITUTO DE ENERGIA ATÔMICA
Departamento de Fisiologia Geral Departamento de Radiobiologia

SÃO PAULO
1973

A
meus Pais.

*Ao Prof. Dr. Paulo Sawaya
Orientador*

*Ao Prof. Dr. Rômulo Ribeiro Pieroni
Superintendente do Instituto de Energia Atômica*

*Ao Prof. Dr. Bernardo Léo Wajchenberg
Chefe de Pesquisa do Departamento de Radiobiologia
Instituto de Energia Atômica*

*Ao Prof. Dr. José Moura Gonçalves
Diretor do Departamento de Radiobiologia
Instituto de Energia Atômica*

*Ao Dr. Rubens S. Werner
Pesquisador do Departamento de Radiobiologia
Instituto de Energia Atômica*

*Às Mestras Iracélia Torres de Toledo e Souza e Olga Zazuco Higa
Pesquisadoras do Departamento de Radiobiologia
Instituto de Energia Atômica*

*À equipe do Dr. Nelson Mendes
Departamento de Imunologia
Faculdade Paulista de Medicina*

*Aos colegas do
Departamento de Radiobiologia
Instituto de Energia Atômica*

*À todos que contribuíram na realização deste trabalho e que involuntaria-
mente omitimos,*

nossos agradecimentos.

ABREVIATURAS

LH	Hormônio luteinizante
FSH	Hormônio folículo estimulante
HCG	Hormônio gonadotrófico
Ab	Anticorpo
H	Hormônio frio
H*	Hormônio marcado com ¹²⁵ I
AAb	Anti-gama globulina
UI	Unidades Internacionais
NPA	"National Pituitary Agency" Maryland- Estados Unidos
cpm	Contagens por minuto
rpm	Rotações por minuto
\bar{x}	Média
s	Desvio padrão
C.V.	Coefficiente de variação
I.C.	Intervalo de confiança
r	Coefficiente de correlação
α	Nível de significância

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	5
a) Método de iodação do LH com ^{125}I	6
b) Purificação do LH- ^{125}I	9
c) Determinação da diluição apropriada dos anticorpos.....	11
d) Sequência operacional do radioensaio de LH.....	13
e) Preparo do padrão de LH humano.....	14
f) Protocolo da curva padrão.....	15
g) Avaliação da sequência operacional para o ensaio de LH no soro humano.....	17
3. RESULTADOS.....	20
a) Controle da eficiência da marcação de LH.....	20
b) Controle da eficiência da extração de LH- ^{125}I , do gel de a- mido.....	20
c) Purificação do hormônio luteinizante marcado.....	20
d) Determinação da diluição adequada dos anticorpos.....	20
e) Controle do dano causado ao hormônio luteinizante durante o período de incubação.....	29
f) Curva padrão do ensaio.....	29
g) Avaliação das características do método.....	29
h) Eficiência da purificação em diversos "sephadex" G.....	37
i) Estudo comparativo entre diversas amostras de soros humanos	37
j) Estudo comparativo entre diversos imunoabsorventes usados..	37
4. DISCUSSÃO.....	42
5. CONCLUSÕES.....	46
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

1. INTRODUÇÃO

A partir do informe original de Yalow e Berson^(10,13,23) iniciou-se o desenvolvimento de técnicas radioimunológicas capazes de quantificar quantidades pequenas de hormônios proteicos e, mais recentemente, de substâncias não proteicas.

Devido ao crescente interesse nos aspectos endocrinológicos referentes à reprodução humana e animal, tornou-se necessário poder quantificar, de forma precisa, as gonadotropinas hipofisárias que participam em sua regulação. Durante muito tempo a mensuração destes hormônios proteicos esteve limitada a ensaios biológicos que, por sua pequena sensibilidade, tem sérias limitações.

O ensaio biológico é o uso de um organismo, ou parte dele, para medida de um hormônio através de sistemas receptores específicos a ele, excluindo-se os demais hormônios e outros materiais presentes. Os ensaios biológicos são altamente específicos, sendo a sua especificidade, provavelmente, determinada, principalmente, pelas especificidades dos receptores residuais tissulares.

Por definição, o ensaio biológico pode ser denominado "olho biológico" ⁽²⁴⁾, mostrando somente o hormônio no seu estado fisiológico ativo. A clássica definição de hormônio é, então, aceita.

O ensaio biológico de hormônio luteinizante (LH) humano é, correntemente, feito pelo método do aumento de peso da porção ventral da próstata (VPM) ou pela depleção do ácido ascórbico ovariano (OAA), utilizando-se, ratos, como material.

O radioensaio, por sua vez, se baseia nas características antigênicas do hormônio, sendo este avaliado por determinada fração da cadeia peptídica que se fixa ao anticorpo, quer o hormônio seja ativo ou não ⁽¹⁶⁾.

A estrutura química do hormônio luteinizante humano é pouco conhecida não tendo sido determinado, com precisão, o(s) sítio(s) da molécula responsável pela sua atividade biológica. Quando tratado com uréia, guanidina ou ácido forte, obtem-se duas subunidades - α e β - que são biologicamente inertes mas retêm sua atividade imunológica. A atividade biológica é restituída quando as subunidades são incubadas juntas.

Sendo o hormônio luteinizante uma glicoproteína, os estudos químicos se tornam mais complexos. Ácido N-acetil neuramínico e, provavelmente, outros carboidratos não se acham envolvidos na atividade imunológica, mas são necessários para a ação biológica^(14,15). São conhecidos muitos grupos determinantes da atividade imunológica nos hormônios proteicos, podendo ser diferentes das áreas da molécula responsáveis pela atividade biológica. Estudos em que se produzem modificações na estrutura do hormônio, por métodos químicos, enzimáticos ou outros, resultaram em alterações em ambas as atividades, biológicas e imunológicas.

Parece que hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH) e hormônio gonadotrófico (HCG) tem muitos sítios antigênicos e alguns podem ser mesmo comuns, dependendo do fato da cadeia α ser a mesma para todos estes hormônios, o que explica a imunoreatividade cruzada parcial que apresentam entre si^(14,15).

Antisoros altamente específicos para gonadotropinas foram produzidos em coelhos com antígenos impuros, não havendo evidências que antígenos purificados sejam melhores para produzir antisoros específicos⁽³⁷⁾.

Em 1966 e 1967 Midgley e colaboradores^(3,4,5) divulgaram um método para quantificar hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante humano, utilizando um procedimento radioimunológico com o emprego de "duplo anticorpo"^(21,28).

O radioimunoensaio de LH, bem como do FSH, é uma variação da técnica geral de análise por competição, que será discutida depois. O uso de reagentes "marcados" com radioisótopos (geralmente o antígeno) tem a vantagem óbvia da facilidade e alta precisão da medida. Associada à extraordinária sensibilidade das reações imunológicas, estas condições tornam o radioimunoensaio uma técnica atrativa. A especificidade, contudo, depende de diversos fatores, sendo o mais importante a pureza do antígeno "marcado" e sua afinidade pelo antisoro.

Neste trabalho procuramos estudar a técnica de radioimunoensaio para mensuração do LH em soro humano visando a sua padronização de modo a torná-la aplicável nas medidas desse hormônio em condições clínicas e experimentais.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

Quando uma amostra de um hormônio é adicionada a uma quantidade fixa do anticorpo (Fig. 1), uma parte dos sítios de ligação do antissoro se une ao hormônio. Uma amostra do hormônio sendo adicionada subsequentemente (Fig. 2), os sítios livres do anticorpo são ocupados e o restante do hormônio radioativo permanece em solução, livre.

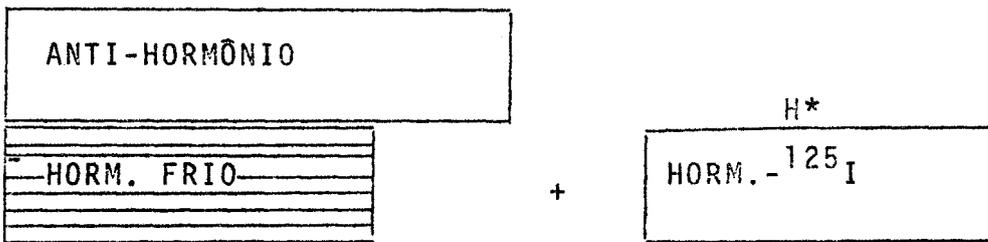
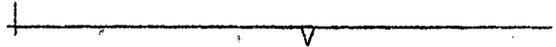
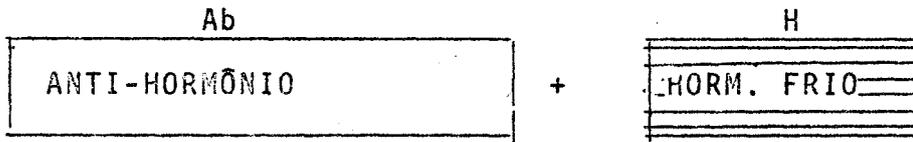
Um segundo anticorpo, produzido contra a gama globulina da espécie em que se produziu o primeiro anticorpo é então adicionado para ligar e precipitar o complexo hormônio-anticorpo (Fig. 3).

O excesso de hormônio marcado é eliminado e somente a radioatividade ligada ao anticorpo (Ab) é contada. Uma relação inversa existe entre a quantidade de hormônio frio (H) e o número de contagens no precipitado.

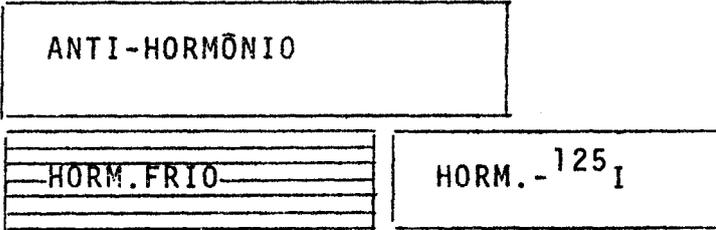
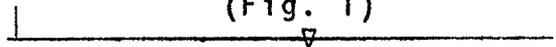
Considerando que a reação obedece a lei da ação das massas, mantendo-se constantes as quantidades de anticorpo (Ab) e de hormônio marcado (H^*), a quantidade de complexo $H^* - Ab - H$ vai ser proporcional a quantidade de hormônio frio (H).

Esta resposta pode ser representada em papel semi-log (% de radioatividade precipitada pelos anticorpos x concentração de hormônio frio) dando uma linha reta, ou, em papel linear (Fig. 8) capaz de detectar pequenas variações na concentração das amostras do (H, criando assim um sistema operacional para o ensaio.

PRINCÍPIO DO RADIOIMUNOENSAIO POR " DUPLO ANTICORPO "

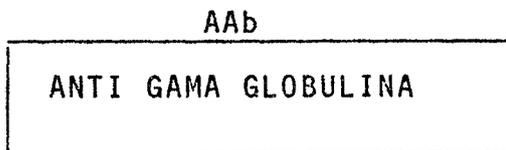


(Fig. 1)

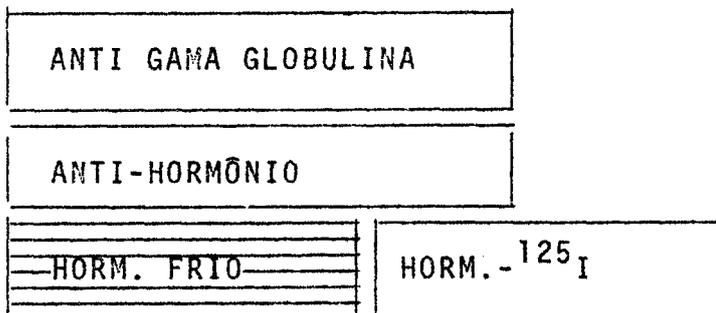
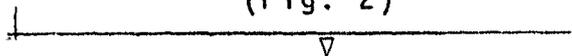


Complexo
solúvel

+



(Fig. 2)



Complexo
Insolúvel

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1.1. - Padrão de hormônio luteinizante humano.

Usamos como referência LH humano LER-907 fornecido pela National Pituitary Agency, sob a forma de solução contendo 1mg/ml de tampão fosfato. 1mg = 48 UI de LH (padronizado por ensaios biológicos)⁽³⁵⁾.

2.1.2. - Hormônio luteinizante humano, para iodação.

Imunoquimicamente puro, o hormônio é obtido a partir de hipófises humanas contendo 923 UI/LH e 1,9 UI de FSH por mg. Este hormônio também, foi obtido da National Pituitary Agency (Estados Unidos)⁽³⁵⁾.

2.2 - Antisoro anti-LH humano.

Preparado em coelhos imunizados com LH humano, extraído de hipófises, fornecido pela National Pituitary Agency (Estados Unidos).

2.3 - Antisoro anti-gama globulina de coelho, obtido em carneiros.

Foi preparado usando-se o método de Williams e Chase⁽⁶⁾, para precipitação das gamaglobulinas com Na₂SO₄⁽³⁴⁾ e posterior purificação em coluna - cromatográfica de DEAE-celulose, obtendo-se assim a gamaglobulina pura de coelho que servirá para imunizar carneiros adultos, após a adição de adjuvante de Freund e bacilos de Koch, pela seguinte técnica:

a) Injeção de 2 ml de suspensão, subcutaneamente, em 15 locais diferentes;

b) Repetir a injeção cada 2 semanas, num total de quatro vezes, incluindo-se a primeira;

c) Sangramento do carneiro na primeira semana após a quarta injeção e escolha da melhor diluição do soro, por imunodifusão em gel.

É essencial que as quantidades certas dos dois tipos de anticorpos sejam usadas no ensaio, pois uma pequena variação na proporção de um deles alterará os resultados do ensaio.

2.4 - Material radioativo.

O ¹²⁵I foi obtido da Union Carbide Corp. (Estados Unidos) na forma de iodeto de sódio, preparado especialmente para iodação de proteínas, ou seja, de elevada atividade específica, na forma de sal de iodo é fornecido em meio levemente alcalino e totalmente livre de agentes redutores, com uma atividade específica de 200 a 300 mCi/mg.

2.5 - Método de iodação.

O método de iodação empregado foi o descrito por Hunter e Greenwood^(1,2) com pequenas modificações. O hormônio a ser iodado foi dissolvido em água destilada em uma concentração de $1\mu\text{g}/\text{ul}$.

2.5.1 - Materiais necessários

A) Equipamentos:

- 1 - Coluna de "Sephadex" G-100
- 2 - Placa de gel de amido
- 3 - Microseringas Hamilton de 100 e 10 μl
- 4 - Micropipetas Clay Adams de 10, 25 e 50 μl
- 5 - Frascos de 10, 30 e 100 ml
- 6 - Tubos de ensaio, plásticos de 10 x 75 mm.
- 7 - Bequeres de 100 e 250 ml.
- 8 - Pipetas de 1 e 10 ml.
- 9 - Frascos de rolha esmerilhada de 5 ml
- 10 - Banho de gelo
- 11 - Refrigerador
- 12 - Congelador
- 13 - Balança analítica
- 14 - Contador gama automático

B) Reagentes:

- 1 - LH para iodação (LER-960), $2\mu\text{g}/20\mu\text{l}$
- 2 - Tampão fosfato de sódio 0,5 M (Q.E.E.L.)
- 3 - Tampão fosfato de sódio 0,05 M
- 4 - Solução tampão fosfato com soro albumina bovina a 1% (BSA-PBS a 1%)
- 5 - $\text{Na-}^{125}\text{I}$, livre de carregador (Union Carbide Co.)
- 6 - Cloramina T P.A. (Merck)
- 7 - Metabissulfito de sódio P.A. (Merck)
- 8 - Soro albumina bovina liofilizada (Sigma)
- 9 - Azul de bromofenol (Sigma)
- 10 - Iodeto de potássio P.A. (Merck)
- 11 - Sacarose P.A. (Sigma)
- 12 - Água destilada
- 13 - Talco em tabletes de 100 mg (Gold Leaf Pharmacal Co. N J Est.Unid.)
- 14 - "Sephadex" G-100 (Pharmacia Upsalla- Suecia)
- 15 - Amido hidrolizado (Cobbaught Medical Research Lab.)

C) Soluções necessárias:

1 - Solução de Cloramina T.

a) 10 mg de cloramina T são dissolvidos em 5 ml de tampão fosfato pH 7,5, 0,05 M e deve ser preparada no momento do uso.

2 - Solução de metabissulfito de sódio.

a) 25 mg de metabissulfito de sódio são dissolvidos em 10 ml de tampão fosfato 0,05M e deve ser preparada na hora do uso.

3 - Solução de transferencia.

a) A 10 ml de água destilada dissolvem-se 100mg de KI, 1,6 g de sacarose e 1 mg de azul de bromofenol. O material é guardado em frascos de rolha esmerilhada em alíquotas de 1 ml, sendo mantido em congelador.

b) Um frasco é usado em cada iodação.

4 - Solução de lavagem.

Preparada a partir da solução de transferencia diluída ao meio com água destilada, sendo preparado no momento do uso.

5 - Diluyente padrão (BSA-PBS a 1%).

a) Preparo do PBS (solução tampão fosfato)

Dissolver 7,15 g de NaCl P.A. em 25 ml de água. Adicionar 20 ml de tampão fosfato 0,5M. O pH é ajustado a 7 com NaOH a 10% e diluído a 875 ml com água destilada.

b) Preparo do BSA-PBS a 1%.

A 99 ml de PBS adicionar 1g de soro albumina bovina e mertiolate a 1:1000. Agitar até dissolução completa e estocar em congelador.

D) Procedimento:

Iodação:

1 - Degele um frasco contendo 2ul/ 20 ul de LH.

2 - Adicione 20 ul de tampão fosfato de sódio 0,5M.

3 - Homogenizar e adicionar o ^{125}I (o cálculo é feito para uma atividade específica de 60 a 90 uCi/ug).

4 - Misturar e adicionar 10 ul de cloramina T.

5 - Misturar por exatamente 2' e adicionar 50 ul de metabissulfito de sódio.

6 - Agitar, levemente, e adicionar 100 ul de solução de transferencia.

7- Misturar com a própria pipeta e transferir para o sistema de purificação.

8 - Para controle da eficiência da marcação utilizamos tampão fosfato 0,05M pH 7,5 preparado com $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e Na_2HPO_4 (Q.E.E.L.) e tal-

co em tabletes de 100 mg.

- 9- Em um tubo de ensaio contendo 2ml de tampão fosfato 0,05M e 0,1ml de plasma humano de banco de sangue, colocamos uma alíquota do tubo de marcação. Após agitação acrescentamos 200 mg de talco, agitando em "Vortex" até completa dissolução do mesmo. Após 20 minutos de centrifugação a 2500 rpm e 49C (I.E.C. International Centrifuge), separamos sobrenadante e precipitado, que terão suas atividades determinadas em contador gama de poço e expressas em percentagem da atividade total.

Exemplo:

Sobrenadante = 12500 c.p.m.

Precipitado = 12500 c.p.m.

Resultado = 50 % de LH-¹²⁵I íntegro, ou 50% de pureza.

O hormônio marcado, sem componentes danificados e iodo radioativo livre, fica adsorvido ao talco recoberto com plasma.

- 10- Atividade específica do hormônio marcado.

Em função do baixo nível de hormônios proteicos no soro, a quantidade de hormônio marcado deve ser muito pequena, para que a sua quantidade não seja mais elevada do que a menor quantidade que se deseja medir, podendo-se perder a sensibilidade do método, considerando que a concentração de [H] é cerca de 10^{-11} moles. Nestas condições, a atividade específica do hormônio marcado deverá ser elevada. Entretanto, isso também dependerá de outros fatores, tais como, a sensibilidade do sistema contador e o volume da mistura de incubação a ser contada (16,17). Por outro lado, a atividade específica a ser atingida dependerá da abundância isotópica avaliável do iodo radioativo (o ¹²⁵I sendo livre de carregador, frequentemente, permite o emprego de atividades específicas menores do que o ¹³¹I), o número de resíduos tirosínicos por molécula (no caso do LH temos 5 resíduos de tirosina e no FSH 7), peso molecular do hormônio e a tolerância do hormônio marcado ao ¹²⁵I (radiólise) (16,17).

2.6 - Purificação do hormônio luteinizante marcado.

É necessário purificar o hormônio marcado para livrá-lo do radioiodo não reativo e de componentes danificados.

Uma grande variedade de sistemas de purificação têm sido empregados e alguns - ainda são discutidos. Os mais comumente usados são:

2.6.1 --Cromatoeletroforese, realizada com papel de filtro "Whatman 3 MC" em tampão borato 0,3 M pH 8,2, passando-se uma corrente de 2mA por fita. O hormônio íntegro permanece na origem enquanto o hormônio danificado migra um pouco atrás da albumina corada com azul de bromofenol e o iodo mais a frente. A fita foi cortada em segmentos de 1 cm, a partir da origem, e em cada um deles foi determinada a atividade total através do contador gama de poço.

2.6.2 - Eletroforese em gel de amido (9,20).

Este método é particularmente usado para separação de componentes do hormônio - marcado de acordo com seu conteúdo em iodo, desde que moléculas com resíduos de diiodotirosina migram mais rapidamente para o ânodo do que aqueles com grupos tirosínicos monosubstituídos. Em pH 8 -8,6, cada resíduo de tirosina diiodada confere uma carga negativa extra a molécula, sendo esta a razão das moléculas mais altamente iodadas caminharem com maior velocidade em direção ao ânodo.

As placas de gel foram feitas de acordo com a técnica de Smithies (7,8) com amido hidrolizado "Connaught", conservadas a 4°C durante 12 horas, para solidificação.

Ao término do processo de iodação, adicionam-se 100 μ l de solução de transferência e aplicam-se 40 μ l desta mistura a cada um dos sulcos feitos no gel de amido, a cor azul indicando a zona de migração da albumina (corada com azul de bromofenol). O LH apresenta duas zonas na autoradiografia, uma logo atrás da região da albumina, e outra perto da origem (Fig. 5).

A placa é colocada na horizontal, o tampão usado é borato 0,3M pH 8,0 e a tensão aplicada dependente do tempo de corrida, variando entre 200 e 100 V para 6 e 12 horas, respectivamente. Este tempo é controlado pela migração da albumina corada que deve atingir a metade da placa.

Após completar a eletroforese, remove-se a placa de gel e coloca-se Filme Royal Blue Kodak para autoradiografia, por 15 minutos. Os segmentos correspondentes - as zonas do hormônio radioativo são retirados e congelados durante 4 horas a -20°C. O hormônio marcado nos diversos segmentos de gel é extraído com BSA-PBS - a 1%.

A fração (1) normalmente é a preferida pois está livre de superiodação e após extração é passada em coluna de "Sephadex" G-100, usando-se a solução de transferência como indicador.

O controle da extração foi feito usando-se o teste do talco para saber a pureza do hormônio extraído do gel de amido (tabela III).

2.6.3. - Cromatografia em coluna de exclusão molecular.

Foi escolhido o "Sephadex" G-100, após vários testes (tabela XII)-

2.6.3.1.- Materiais necessários

A) Equipamentos:

- 1 - Bureta ou coluna de vidro de 25 x 1 cm.
- 2 - Bequers de 100 ml.
- 3 - Frascos de 100 e 1000 ml.
- 4 - Frascos volumétricos de 1000 ml e frascos redondos de 1000 ml.
- 5 - Pipetas de .1, 2 e 5 ml.
- 6 - Pérolas de vidro de 1 mm de diametro.
- 7 - Papel de filtro Whatman nº 541.
- 8 - "parafilm".
- 9 - Bomba de vácuo.
- 10 - Refrigerador.

B) Reagentes:

- 1.- "Sephadex" G-100 (Pharmacia Upsalla Suécia)
- 2 - BSA-PBS a 1%-
- 3 - Tampão fosfato 0,5 M (Q.E.E.L.)
- 4 - Nertiolato (Sigma).
- 5 - Soro albumina bovina (Sigma).

C) Soluções necessárias:

- 1 - Tampão fosfato 0,05M pH 7,5.
- 2 - BSA-PBS a 1%.

D) Procedimento:

- 1 - Algodão e pérolas de vidro são colocados no fundo de uma bureta, constituindo um filtro.
- 2 - Preparar o Shephadex G-100 entumescendo-o com tampão fosfato pH 7,5 e 0,05M.
- 3 - Misturar levemente, permitindo a máxima absorção do tampão e expansão das partículas do gel estocando durante a noite a 49C , com agitação permanente.

- 4 - No outro dia, colocar o frasco numa bomba de vácuo retirando as bolhas do gel.
- 5 - Lavar a bureta com tampão fosfato 0,05M.
- 6 - Colocar a suspensão de "Sephadex G-100 na bureta, até atingir a altura de 25 cm.
- 7 - Adicionar 1,50 ml de BSA-PBS a 5% permitindo que atravessasse gel. A seguir, lavar com tampão fosfato 0,05M por aproximadamente 10 minutos. A albumina sérica serve para cobrir as paredes da coluna e as partículas do gel, reduzindo então a adsorção não específica do hormônio radioativo pelo vidro.
- 8 - A lavagem com BSA-PBS a 5% e tampão fosfato deve ser feita no dia anterior a purificação.
- 9 - A coluna bem lavada e mantida no refrigerador pode servir para um grande número de iodações.
- 10 - Associando dois sistemas de purificação, gel de amido e cromatografia em coluna de exclusão molecular, obtivemos LH-¹²⁵I com máxima pureza.

2.6.4. - Determinação da diluição apropriada dos anticorpos.

Preparação das soluções de trabalho de anti-hormônio em coelho e anti-gama globulina de coelho em carneiro.

2.6.4.1.- Materiais necessários

A) Equipamentos:

- 1 - Tubos de ensaio e suportes para contador gama automático.
- 2 - Pipetas de 200 ul e 1 e 10 ml.
- 3 - Balões volumétricos de 1000 ml.
- 4 - Bequer de 2000 ml.
- 5 - Frascos para estocagem.
- 6 - "Parafilm" (American Can Co.)
- 7 - Agitador "Vortex".
- 8 - Lápis dermográfico.
- 9 - Refrigerador.
- 10 - Centrífuga refrigerada.
- 11 - Contador gama automático.
- 12 - Potenciômetro.
- 13 - Balança analítica.
- 14 - Estantes metálicas.

B) Reagentes:

- 1 - Solução estoque de anti-LH de coelho (N.P.A.)
- 2- Hormônio marcado, solução de trabalho.
- 3 - Solução estoque anti-gama globulina de coelho em carneiro.
- 4 - Soro normal de coelho.
- 5 - EDTA dissódico P.A. (Sigma).
- 6- PBS
- 7 - Mertiolato em PBS (1:1000)
- 8 - NaOH 5 N (Merck)
- 9 - BSA-PBS a 1%.

C) Soluções necessárias:

- 1 - EDTA- PBS.
 - Pesar 18,6 g de EDTA dissódico.
 - Adicionar cerca de 800 ml de PBS, aquecer e agitar até dissolver.
 - Adicionar 10 ml de mertiolato 1:100 em PBS.
 - Levar a pH 7 por adição de soda 5 N.
 - Transferir para um balão volumétrico de um litro, diluindo a marca com PBS e estocar em geladeira.
- 2 - EDTA-PBS-SNC a 1:400.
 - SNC = soro normal de coelho.
 - A 40 ml de EDTA-PBS, adicionar e dissolver 100 ul de soro normal de coelho.
 - A mistura deve ser preparada na hora do uso.

D) Procedimento: (Fig.7).

- 1 - Numerar os tubos de 1 a 26 e arrumar em uma estante em 5 colunas de 5 com o tubo 26 como "BlancK".
- 2 - Colocar 0,5 ml de BSA-PBS a 1% em cada tubo.
- 3 - Diluir o anti-LH a 1:100 num o volume final de 2 ml, com a solução (2).
- 4 - Colocar 0,2 ml dessa primeira diluição do anti-LH nos 5 primeiros tubos (1ª linha).
- 5 - Adicionar 1,0 ml da solução (2) ao restante da primeira diluição do anticorpo, colocando 0,2 ml na segunda linha de tubos - de 6 a 10.
 - Continuar esta diluição seriada, até chegarmos a 1:1660, na 5ª linha.

- 6 - Adicionar 0,1 ml da solução de trabalho do LH-¹²⁵I a cada tubo incluindo o 26º (B) que não tem anticorpo. Incubar a 40C, por 24 horas.
- 7 - Após a incubação, preparar uma diluição de anti-gama globulina de coelho em carneiro a 1:2,5 , a partir da solução estoque, - por adição de 0,8 ml de soro para 1,2 ml de PBS. Colocar 0,2ml desta mistura nos tubos 1, 6, 11, 16 e 21 (1ª coluna).
- 8 - Ao restante 1,0 ml da primeira diluição, adicionar 1,0 ml de PBS e desta diluição colocar 0,2 ml em cada tubo da 2ª coluna. Repetir até a 5ª coluna. A diluição seriada terá então a mistura de 1:2,5 , 1:5, 1:10, 1:20 e 1:40. Incubar estes tubos por 3 dias no refrigerador.
- 9 - Após a incubação, colocar 3 ml de PBS em cada tubo e centrifugar por 30' a 3000 rpm. Decantar os tubos, cuidadosamente, exceto o nº 26 (B). Levar os tubos ao contador gama automático - por 1 minuto.
- 10 - Posterior exame das contagens das linhas (várias diluições do LH) mostrará uma contagem mais alta, que será considerada como ótimo de diluição do anti-LH.
- 11 - Dentro desta linha, um dos tubos mostrará, aproximadamente 50% do total de contagens da radioatividade ligada aos anticorpos. Esta é a melhor concentração de anti-gama globulina a trabalhar (tabela V).

2.7. - Procedimento do radioimunoensaio (21,26)

A realização do ensaio leva 7 dias para se completar com adição de materiais no 1º, 2º e 3º dias e o término no sétimo. Séries completas precisam ser incluídas, para padrões, em cada ensaio. Tubos plásticos devem ser usados, para reduzir a adsorção não específica das proteínas.

2.7.1. - Materiais necessários

A) Equipamentos:

- 1 - Tubos plásticos (4,5 ml).
- 2 - Suportes para os tubos.
- 3 - Pipetas de 0,1 e 1,0 ml.
- 4 - "Parafilm" (American Can Co.).
- 5 - Agitador "Vortex".

- 6 - Refrigerador
- 7 - Centrífuga refrigerada
- 8 - Contador gama automático

B) Reagentes:

- 1 - BSA-PBS a 1%.
- 2 - Solução padrão de hormônio luteinizante- LER-907 - da H.P.A.
- 3 - Amostras de soro.
- 4- Amostras de soro desconhecido.
- 5 - Solução de trabalho de anti-LH.
- 6- Solução de trabalho de LH marcado .
- 7 - Solução de trabalho de anti-gama globulina de coelho em carneiro.
- 8 - PBS.

C) Procedimento:

- 1 - Separe e numere 49 pequenos tubos em duas estantes. Tubos de 1 a 27 numa (padrão) e de 28 a 49 na outra (amostras). Este é o número habitual em nossos ensaios.
- 2 - No primeiro dia prepare os tubos como segue:
 - Coloque 500 ul de BSA-PBS a 1% nos tubos 1 e 3 (controles) e 7 a 10 e 18 (traçadores).
 - Coloque 400 ul de BSA-PBS a 1% em todos os outros tubos exceto 4 a 6, que nada recebem.
 - As duas séries de padrões são dos tubos 11 a 17 e 19 a 25.

2.7.2. - Preparo do padrão de LH humano⁽³⁵⁾

Usamos como referência LH humano LER-907 fornecido sob a forma de solução contendo 1mg/ml de tampão fosfato. Uma mg contém 48 UI de LH. A solução de uso de LH padrão contém 0,01 ng /ul.

Continuando com o procedimento do radioimunoensaio, temos:

- No tubo 26 colocar 100 ul de soro com baixa concentração - de gonadotropina. Colocar 100 ul de soro com níveis elevados de gonadotropina no 28 e no tubo 27 colocar uma mistura de partes iguais dos dois anteriores. Estes serão nossos tubos controles.
- Na outra estante colocar 100 ul de soro a ser dosado, em cada tubo correspondente.

Protocolo da curva padrão

Nº tubo	BSA-PBS a 1% u1	Padrão de LH 0,01ng/u1		Soro albumina hum. u1
		u1	ng/ml	
11 e 19	100	1	10	100
12 e 20	95	5	50	100
13 e 21	90	10	100	100
14 e 22	80	20	200	100
15 e 23	60	40	400	100
16 e 24	40	60	600	100
17 e 25	--	100	1000	100

- A seguir colocar 200 u ℓ de anti-hormônio apropriado em cada tubo. Nos tubos 1 a 3 colocar 200 u ℓ de EDTA-PBS-SNC a 1:400.
- Cobrir os tubos com parafilme e agitar no "Vortex". Incubar no refrigerador por 24 horas.
- No dia seguinte, colocar 100 u ℓ da solução de trabalho do hormônio marcado em cada tubo (100 u ℓ deverá conter de 5000 a 10000 cpm). Misturar e incubar a 49C, por mais 24 horas.
- No 3º dia, adicionar 200 u ℓ da solução de trabalho antigama globulina de coelho a todos os tubos. Misturar e refrigerar - por 72 horas.
- Após esta incubação colocar 3 ml de PBS em cada tubo e centrifugar por 30' a 3000 rpm. Decantar os tubos, exceto 4 a 6.
- Colocar cada tubo nos suportes plásticos e contar por um minuto.
- Os tubos de 1 a 3 contêm hormônio marcado sem antisoro e são decantados. Estas leituras indicarão a atividade relativa à adsorção no tempo de duração da incubação nos tubos, e podem ser consideradas BG ("background" ou contagem de fundo)
- Os tubos 4 a 6 contêm s \tilde{o} o hormônio marcado e representam o "total de contagens" ou radioatividade adicionada a cada um.
- Os tubos 7 a 10 e 18 contêm hormônio marcado mais anticorpos, mas não hormônio frio. Representam o máximo de hormônio (sua radioatividade) possível de ser ligado aos anti-soros. Deve estar sempre por volta de 50% da atividade total de contagens.
- Usando a média de radioatividade dos tubos 7 a 10 e 18 calcular a percentagem de ligação nas duas séries de padrões. Dispor estes valores em papel milimetrado, percentagem de ligação x concentração de hormônio no padrão (Fig.8).

2.8. - Avaliação da sequência operacional para o ensaio de LH no soro.⁽³¹⁾

2.8.1. - Especificidade

A especificidade pode ser definida como o nível de segurança para qua não haja interferência de outras substâncias que não se deseja medir. Esta interferência pode ser avaliada devido a reatividade imunológica cruzada, a presença de substâncias marcadas indesejáveis e diferenças na composição do meio de incubação.

Uma condição necessária, mas nem sempre suficiente, para completa especificidade é dada pelo teste da diluição que requer que concentrações hormonais medidas em diferentes diluições do soro, em relação a curva padrão, forneça sempre o mesmo valor para o soro não diluído^(30,31).

Para o teste da diluição duas amostras de cada diluição de uma mistura de soros com concentração conhecida de LH foram preparados de acordo com a tabela abaixo. A concentração hormonal para cada diluição determinada por referência a curva padrão é disposta em gráfico linear contra a correspondente diluição e determinado o coeficiente de correlação.

Tubos	Mistura de soro ul	Diluyente ul	diluição final
1 e 2	10	90	1:20
3 e 4	30	70	1:6,6
5 e 6	50	50	1:4
7 e 8	70	30	1: 2,8
9 e 10	90	10	1:2,2
11 e 12	100	--	1:2

2.8.2. - Sensibilidade

Pode ser definida como a menor quantidade de hormônio não marcado que pode ser distinguida dos traçadores. Desta maneira, a sensibilidade depende do erro na determinação da relação da queda inicial da curva padrão.

A quantidade de anti-soro que dará a curva de queda mais intensa proporcionará o ensaio mais sensível, desde que pequenas variações da concentração de hormônio não marcado, na parte inicial da curva padrão (concentração hormonal-baixa) corresponderá a grandes variações de contagens.

Para se obter máxima sensibilidade requer-se que a atividade do traçador seja elevada, empregando assim pequenas quantidades de traçador e grande diluição do anticorpo.

A sensibilidade foi avaliada através da análise de variância de 5 determinações do ponto zero de massa fria e igual número de determinações do 1º e do 2º pontos da curva padrão.

2.8.3. - Precisão

Esta propriedade pode ser definida como a extensão de um dado número de medidas da mesma amostra que dá resultados tão próximos quanto possível, um do outro. Uma estimativa da precisão foi obtida calculando-se coeficientes da variação das medidas de dois modos diferentes:

a) Reprodutibilidade inter-ensaio

Utilizando-se uma mistura de soros normais separamos 20 amostras que foram distribuídas em outros tantos dias de trabalho. A média dos valores da concentração de LH foi calculada estabelecendo-se um coeficiente de variação de até 20% como limite de aceitação.

b) Reprodutibilidade intra-ensaio.

Da mesma mistura de soros normais preparamos amostras iguais que são processadas no mesmo ensaio. Foram calculados os valores numéricos da concentração e também o coeficiente de variação, cujo limite de aceitação foi de 10%

2.8.4. - Exatidão

Esta característica foi avaliada através de recuperação de quantidades conhecidas de hormônio purificado em solução tampão ou amostras de soro com concentração previamente conhecida.

Esta propriedade foi estudada pela adição de quantidades crescentes de uma mistura de soros com concentrações elevadas de LH a uma solução padrão com teor conhecido de LH, segundo a tabela que segue:

Concentração de A= 100 ng/ 100 uI.

Tubos	Solução A uI	Soro normal uI	ESA-PBS 1% uI	Resultados	
				Teórico	Observado
1 e 2	100	20	80	1/10	Obtido-A
3 e 4	"	40	60	2/10	"
5 e 6	"	60	40	3/10	"
7 e 8	"	80	20	4/10	"
9 e 10	"	100	--	5/10	"

3. Resultados

3.1. Controle da eficiência da marcação do LH.

3.1.1. - A tabela I reúne os rendimentos percentuais de diversas iodações realizadas. O controle foi feito usando-se talco recoberto com plasma como adsorvente do LH-¹²⁵I indene. Nestas condições, pode-se verificar que a eficiência da marcação variou de 41 a 60%.

3.1.2. - A tabela II reúne os controles da eficiência da marcação por cromatoeletroforese, em diversas iodações. A comparação entre as tabelas I e II, indica sempre resultados mais baixos para a cromatoeletroforese nas mesmas amostras estudadas.

3.1.3. - Na figura 4 mostramos uma fita cromatográfica, onde se observam tres picos de atividade, com as respectivas contagens, correspondentes ao LH-¹²⁵I indene, LH-¹²⁵I danificado e ¹²⁵I livre.

3.2. Controle da eficiência da extração do LH-¹²⁵I, do gel de amido.

A tabela III mostra os rendimentos percentuais das extrações do LH - ¹²⁵I em várias purificações com eletroforese em gel de amido. Os testes foram feitos com talco recoberto com plasma.

3.3. Purificação do hormônio luteinizante marcado.

3.3.1. - A figura 5 representa a disposição das frações do LH-¹²⁵I separadas por eletroforese em gel de amido. Notamos duas zonas de migração: (1) corresponde ao LH com resíduos de tirosina monoiodadas; (2) corresponde ao LH com resíduos de tirosin diiodados.

3.3.2. - A figura 6 apresenta o gráfico da purificação em coluna cromatográfica de exclusão molecular em "Sephadex" G-100, após purificação em eletroforese em gel de amido. Notamos um pico único, sendo que nos tubos 19 a 22 estão as frações mais puras.

3.3.3. - A tabela IV reúne os valores percentuais que expressam o grau de pureza das diferentes amostras eluídas da coluna de "Sephadex" G-100, após purificação prévia em eletroforese em gel de amido.

3.4. Determinação da diluição adequada dos anticorpos.

3.4.1. - A tabela V reúne os dados obtidos nos testes preliminares para a es-

Tabela I. - Controle da eficiência da marcação de LH-¹²⁵I, em diversas iodacões.

Nº	DATA	ATIVIDADE ESPECÍFICA mCi/mg	EFICIÊNCIA PERCENTUAL DE MARCAÇÃO
1	25-8-72	60	50
2	10-10-72	74	48
3	24-11-72	80	45
4	09-01-73	70	43
5	27-02-73	60	41
6	19-03-73	65	52
7	24-04-73	75	51
8	15-05-73	60	60

Tabela II. Controle da eficiência da marcação do LH-¹²⁵I por cromato-eletroforese.

cm a partir da origem	Fração	Porcentagem da radioatividade total	Data da iodação
1	LH- ¹²⁵ I indene	45%	25.08.72
2			
3		38%	09.01.73
4		45%	15.05.73
5	LH- ¹²⁵ I danificado		
6			
7		5%	25.08.72
8			
9		10%	09.01.73
10			
11			
12			
13		15%	15.05.73
14	¹²⁵ I livre		
15			
16		50%	25.08.72
17			
18			
19		53%	09.01.73
20			
21			
22			
23		40%	15.05.73

FIGURA -4-

Cromatoelektroforese da marcação do LH - ^{125}I .

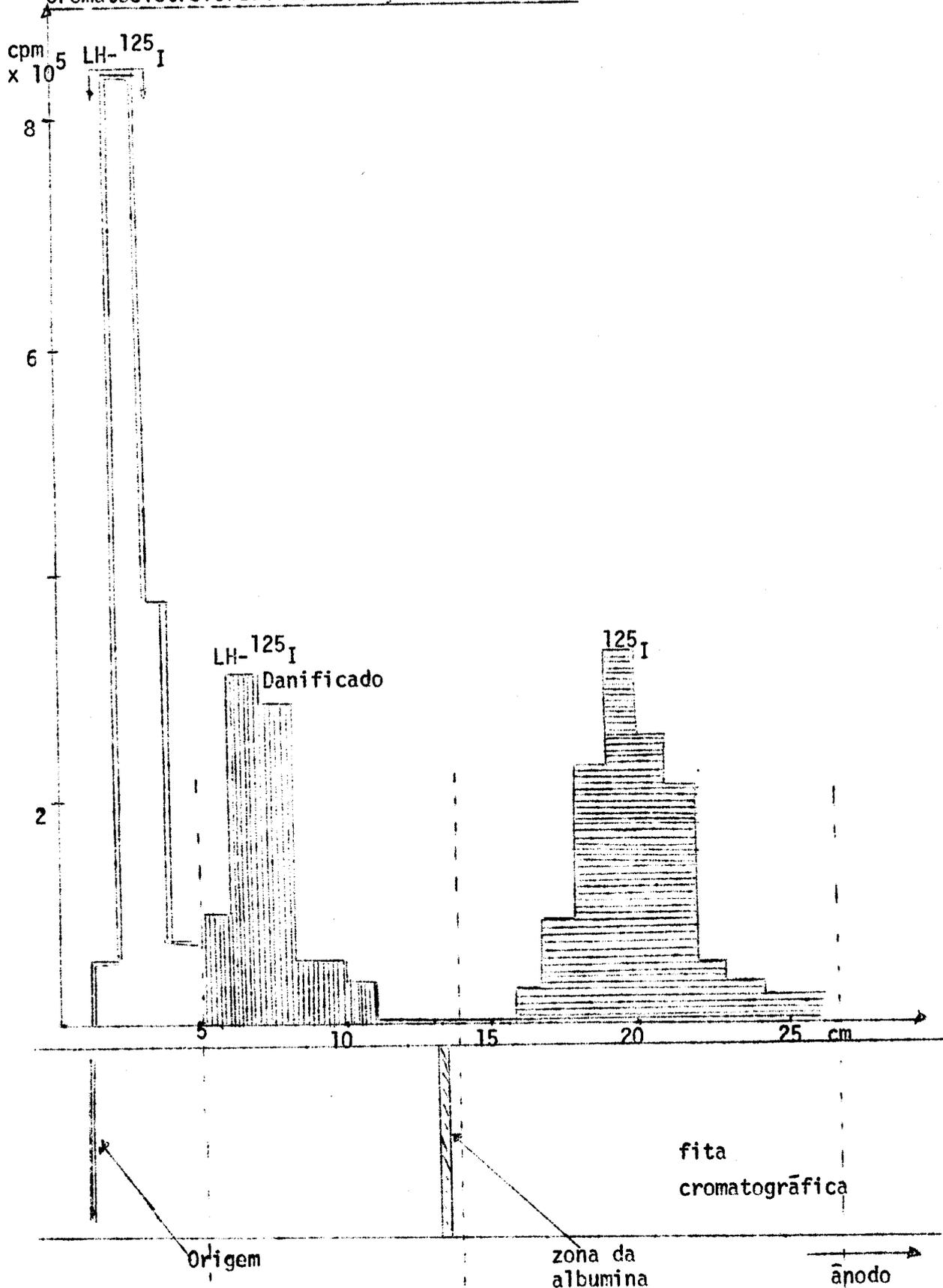


Tabela III. Controle da eficiência da extração do LH-¹²⁵I do gel de amido.

Nº	Data da iodação	Eficiência*
1	25.08.72	72 %
2	10.10.72	67%
3	24.11.72	71%
4	09.01.73	81%
5	27.02,73	64%

* Percentagem da radioatividade total da secção do gel correspondente a LH-¹²⁵I indene, fixada pelo talco recoberto com plasma.

FIGURA -5-

Autoradiografia de eletroforese em gel de amido das gonadotropinas
LH e FSH-¹²⁵I.

tampão borato 0,3 M pH 8,1
tempo= 12 horas
110 V

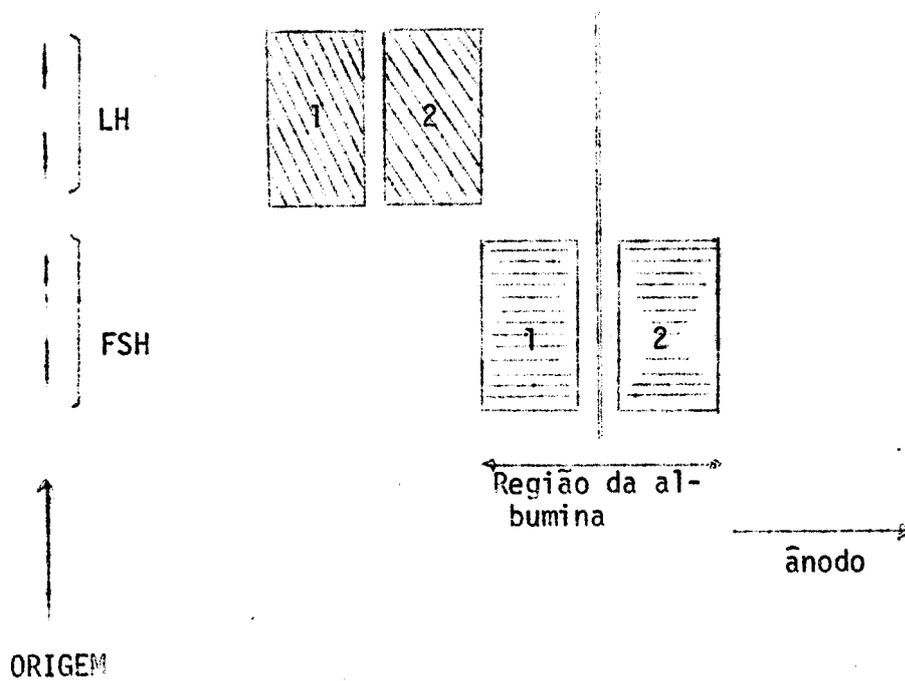
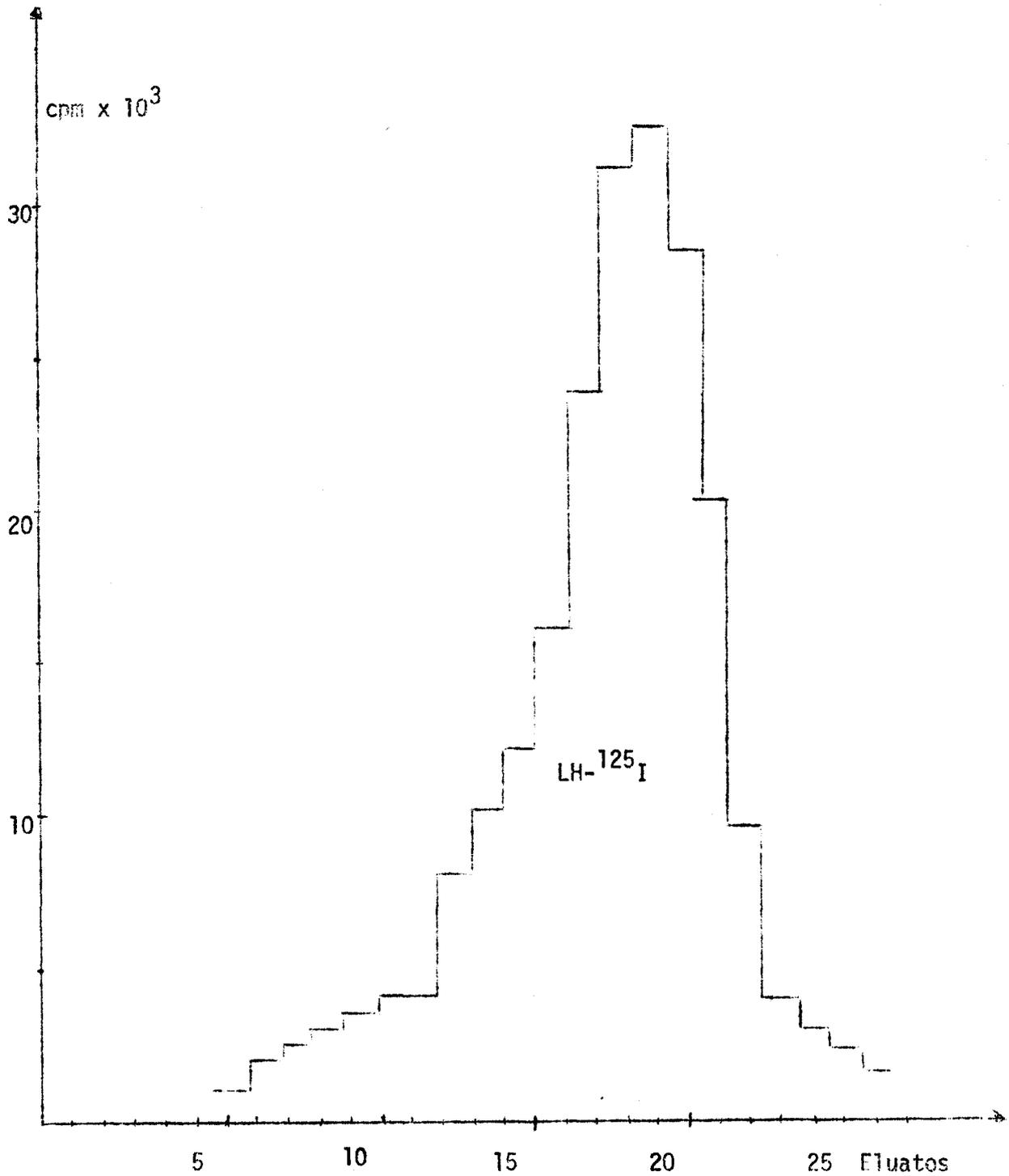


FIGURA -6-



Cromatografia de hormônio luteinizante humano marcado com ^{125}I
(Atividade específica= 80 mCi/mg) em "Sephadex" G-100, após pré-
via purificação em eletroforese de gel de amido.

Tabela IV. Controle da pureza das frações de LH-¹²⁵I separadas por cromatografia em coluna de exclusão molecular ("Sephadex G-100)

* Eluatos contendo a maior percentagem de hormônio-¹²⁵I íntegro.

Eluato	Teste feito com talco (200 mg)			
	Data da iodação: 09.01.73		Data da iodação: 27.02.73	
	% Danific.	% Horm.puro	% Danific.	% Horm. puro
11	48	52	49	41
12	44	56	47	43
13	45	55	48	42
14	44	56	43	47
15	43	57	49	51
16	41	59	44	56
17	31	69	29	71
18	27	73	28	72
19	15	85*	20	80*
20	13	87*	12	88*
21	6	94*	8	92*
22	8	92*	15	85*
23	24	76	19	81

Tabela V. Determinação das diluições adequadas de anti-LH e anti-gama globulina de coelho.

Nº tubo	cpm		
	Iodação :25.8.72	Iodação:09.01.73	Iodação: 27.2.73
B (26)	39423	31126	28746
1	12473	8217	7636
2	18008	14126	14091
3	20413***	17416***	15018***
4	15085	11037	8936
5	3686	1145	1834
6	7731	4372	4976
7	13747	8937	10112
8	16685	11576	10184
9	14052	10008	7326
10	5436	2738	2996
11	7169	5469	6817
12	11127	8791	8319
13	13465	12096	10094
14	11435	9731	8937
15	4516	1784	2231
16	5306	3618	4617
17	7929	4197	1896
18	11568	8736	10061
19	10253	7491	6374
20	2325	891	1491
21	3635	1941	2836
22	5875	3895	4871
23	7805	5875	6346
24	7614	5193	9638
25	3754	2144	3441

colha de diluições apropriadas do anti-LH e do anti-gama globulina de coelho: os asterisco identificando as diluições escolhidas, 1:100 para o primeiro e 1:10 para o segundo anticorpo.

3.4.2. - A figura 7 apresenta um diagrama do ensaio para a escolha das melhores diluições do 1º e 2º anticorpos. As linhas representam as diluições crescentes do anti-LH humano em coelho e as colunas as diluições da anti-gamaglobulina de coelho produzida em carneiro.

3.5. Controle do dano causado ao hormônio luteinizante durante o período de incubação.

Notamos na tabela VI que o hormônio purificado nos dois sistemas, - gel de amido e gel de "Sephadex" G-100, apresenta menor percentagem de dano em relação ao purificado apenas em gel "Sephadex".

3.6. Curva padrão

A tabela VII reúne os dados referentes as percentagens de hormônio-ligado aos anticorpos, na curva padrão. Há uma relação inversamente proporcional entre quantidade de hormônio luteinizante padrão (não marcado) e radioatividade do tubo (cpm).

Na figura 8 apresentamos uma curva padrão preparada de modo a abranger valores de hormônio luteinizante que se estendem de 10 a 1000 ng/ml.

3.7. Avaliação das características do método.

3.7.1. - Especificidade.

A tabela VIII reúne os valores em duplicata, expressos em ng/ml, de uma mesma amostra de soro, em cinco diluições diferentes. A correlação entre diluição e concentração de LH nos deu um valor de $r=0,998$.

3.7.2. - Exatidão.

A tabela IX reúne ao lado das quantidades conhecidas de hormônio luteinizante de cada tubo, as adicionadas, os valores obtidos e as recuperações percentuais. O coeficiente de correlação foi de $r= 0,896$.

3.7.3. - Sensibilidade.

Na tabela X temos 5 determinações do traçador (zero de massa fria)- H_0 , do ponto 1 da curva padrão, H_1 e do ponto 2 da mesma curva, H_2 . Foram calculados o coeficiente de variação, as médias, e também os desvios padrões.

FIGURA -7-

Esquema para determinação da melhor diluição do anti-LH
(linhas) e do anti-gama globulina de coelho (colunas).

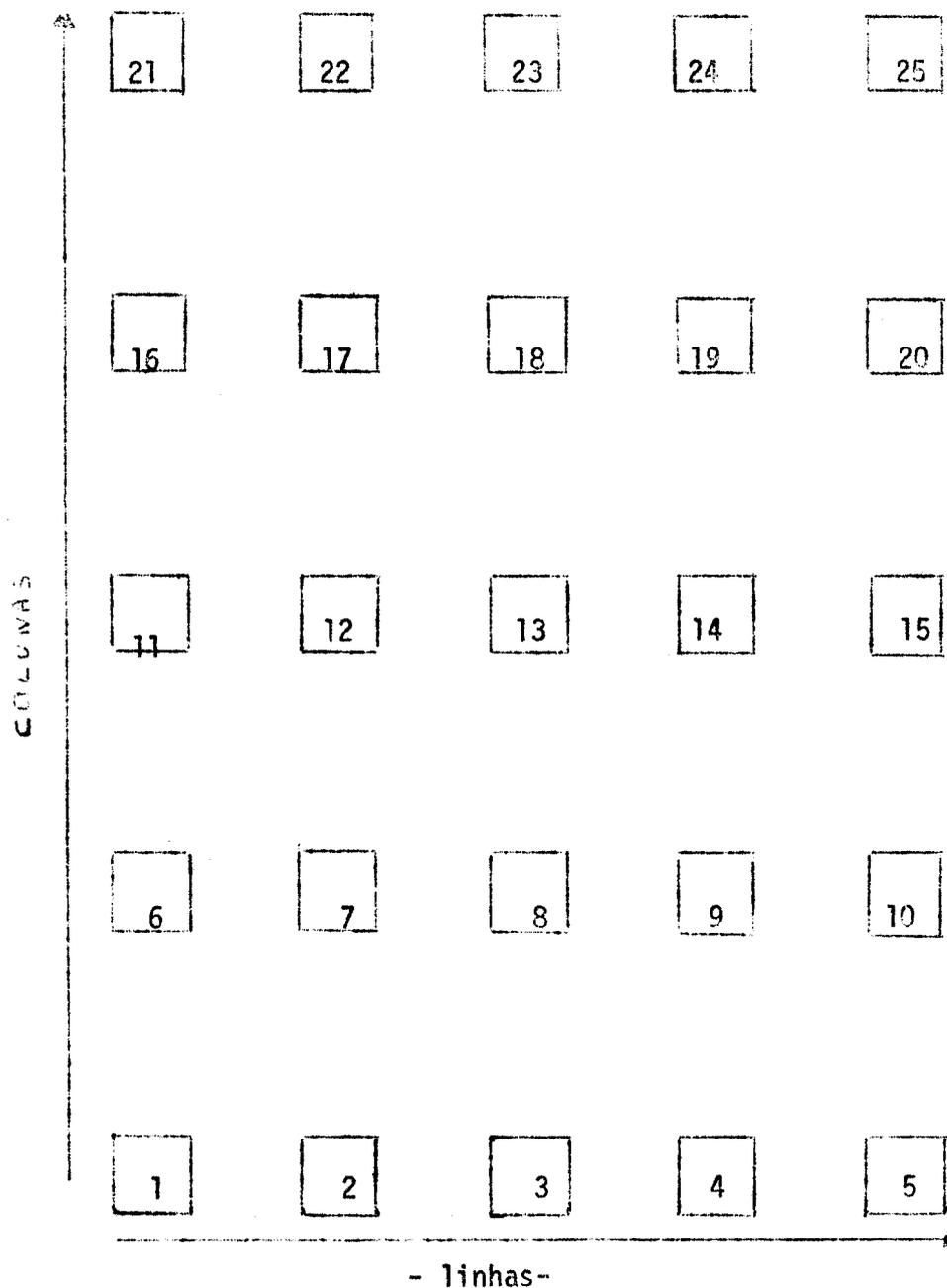


Tabela VI. Estudo dos níveis de degradação do LH-¹²⁵I durante sete dias de incubação.

Dias de incubação	Percentagem de degradação	
	LH- ¹²⁵ I purificado em gel de amido e Sephadex G-100	LH- ¹²⁵ I purificado em gel Sephadex G-100
1	9	10
2	9	11
3	11	13
4	13	15
5	14	17
6	14	18
7	14	19
1	7	13
2	7	15
3	8	17
4	9	18
5	10	20
6	11	20
7	11	22

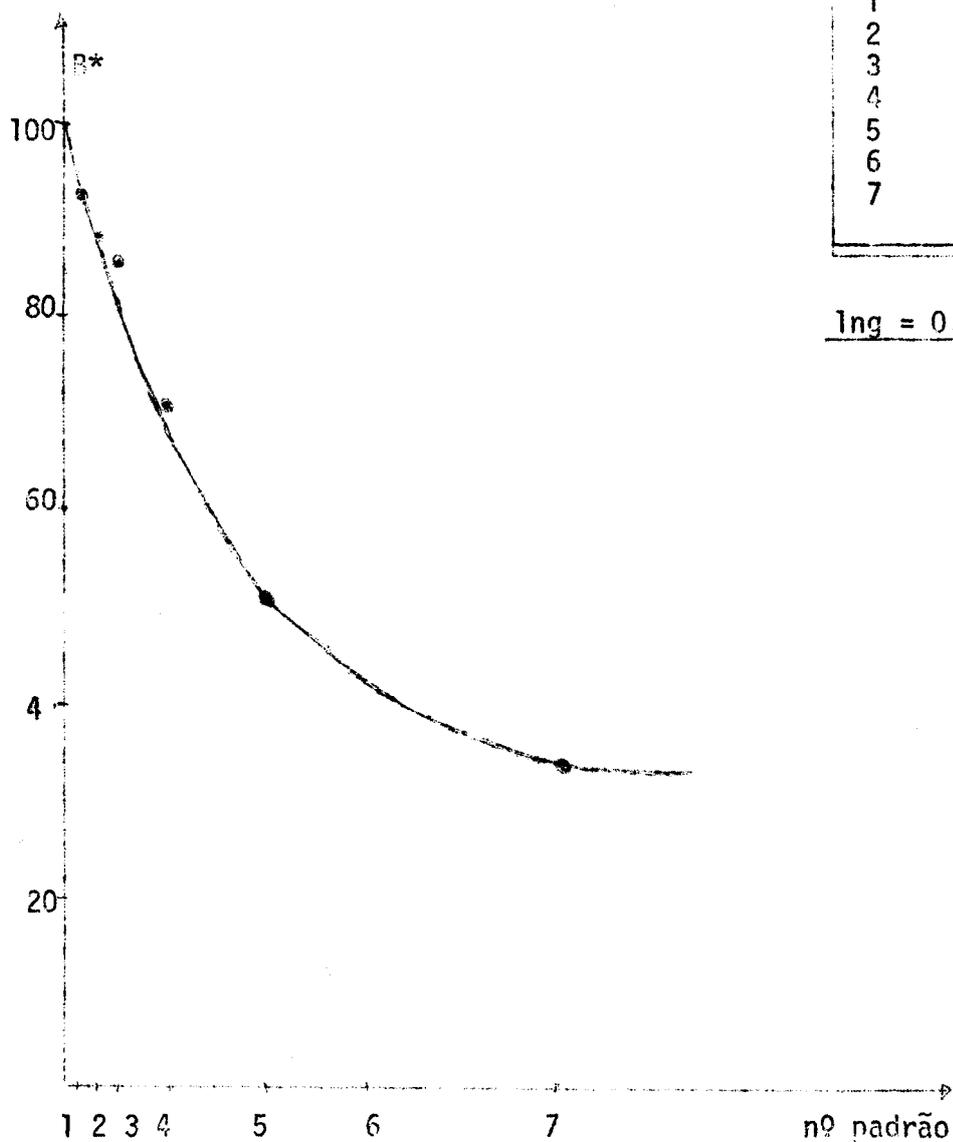
Tabela VII. Percentagem de hormônio ligado aos anticorpos na curva padrão de LH entre 10 e 1000 ng/ml, estimados com LH-¹²⁵I.

Tubos	Conc. LH humano ng/ml	Percentagem de ligado			MÉDIA %
		curva 1	curva 2	curva 3	
7 a 10	--	100%	100%	100%	100%
18	--	100%	100%	100%	100%
1	10	94%	93%	91%	92%
2	50	90%	86%	88%	88%
3	100	90%	84%	85%	86%
4	200	72%	69%	73%	71%
5	400	49%	52%	51%	50%
6	600	37%	41%	39%	39%
7	1000	30%	34%	32%	33%

FIGURA -8-

Curva padrão para o ensaio de LH humano(sérico) pelo duplo anticorpo.

B* = Percentagem de radioatividade total no tubo,
precipitada com o segundo anticorpo (AAb)



Padrão	
nº	ng/ml
1	10
2	50
3	100
4	200
5	400
6	600
7	1000

1ng = 0,048 mU/ml (35)

Tabela VIII. Especificidade.

Nº	Mistura de LH soro alto ul	Diluyente ul	Diluição final	Conc. de LH no soro diluido ng/ml	Conc. final de LH ng/ml
1	20	180	1:20	21,20	422,50
2	20	180	1:20	21,20	422,50
3	60	140	1:6,6	59,00	390,00
4	60	140	1:6,6	59,00	390,00
5	100	100	1:4,0	102,20	409,00
6	100	100	1:4,0	102,20	409,00
7	140	60	1:2,8	154,00	431,20
8	140	60	1:2,8	154,00	431,20
9	180	20	1:2,2	180,80	397,50
10	180	20	1:2,2	180,80	397,50
11	200	--	1:2,0	205,00	410,00
12	200	--	1:2,0	205,00	410,00
$r=0,998$				$\bar{x} = 410,00$	

Tabela IX. Exatidão

Tu- bos	A ng/ml	Resultados			
		Valor Teóri- co ng/ml	Valor Obti- do ng/ml	Valor obtido calculado Obtido-A ng/ml	Recuperação percentual
1	100	43,0	125,0	25,0	58,10
2	"	43,0	131,0	31,0	72,10
3	"	86,0	147,0	47,0	54,70
4	"	86,0	156,0	56,0	65,10
5	"	129,0	206,0	106,0	82,10
6	"	129,0	217,0	117,0	90,70
7	"	172,0	268,0	168,0	97,70
8	"	172,0	276,0	176,0	102,30
9	"	215,0	300,0	200,0	93,00
10	2	215,0	297,5	197,5	91,90
$\alpha=0,05$			$r= 0,8960$		

Tabela X. Sensibilidade.

Nº	cpm		
	H ₀	H ₁	H ₂
1	27772	25601	23760
2	28165	26617	24002
3	27842	25437	22918
4	25560	24918	22017
5	28052	26372	23708
	$\bar{x} = 27478$ s = 1084 CV = 3,9% B* = 100%	$\bar{x} = 25789$ s = 697 CV = 2,7% B* = 92%	$\bar{x} = 23281$ s = 815 CV = 3,5% B* = 88%

F crítico = 1,56

F = 28,763 significativo para $\alpha = 0,05$

$\nu_1 = 2$ (graus de liberdade do numerador -intragrupos)

$\nu_2 = 12$ (graus de liberdade do denominador- intergrupos)

Q = 3,77 -significativo

Podemos ,tambem, apreciar a sensibilidade pela inclinação da curva no seu trecho inicial e notamos na figura 8, que para pequenas variações nas quantidades de massa fria, grande foi a variação na percentagem de radioatividade ligada aos anticorpos.

Foram calculados: teste F e Q e vemos pelos resultados, que são significativos.

3.7.4. - Precisão.

A tabela XI reúne 20 determinações inter e intra-ensaios, com as respectivas médias, coeficiente de variação, desvio padrão e intervalo de confiança. O coeficiente de variação foi de 4,68% para as medidas no mesmo ensaio e 12,5% para as dosagens da mesma mistura de soros realizadas em diferentes ensaios, no período de 12 meses.

3.8. Eficiência da purificação em diversos "Sephadex G" (poros).

Na tabela XII apresentamos resultados comparativos da eficiência da purificação de LH-¹²⁵I em "Sephadex" G-50, G-75 e G-100. Escolhemos o G-100 por apresentar a melhor resolução.

3.9. Estudo comparativo entre diversos adsorventes e cromatoeletroforese , como método de separação de LH-¹²⁵I indene, de LH-¹²⁵I danificado.

A tabela XIII reúne tres métodos usados para determinação do grau de pureza das frações eluídas do "Sephadex". O melhor método que se nos apresenta é a cromatoeletroforese, que no entanto, não é acessível à rotina. Dos adsorventes testados, o talco(200mg) recoberto com plasma é o que apresenta melhores resultados, comparativamente a cromatoeletroforese.

3.10. Amostras de soro.

Na tabela XIV temos a amplitude de variação das concentrações dos soros dosados, relativa as diferentes fases do ciclo menstrual, menopausa e adrenogenitais.

Tabela XI. Precisão

Reprodutibilidade	
Intra-ensaio 20 determinações ng/ml	Inter-ensaio 20 determinações ng/ml
22,9	20,0
21,5	19,0
22,7	18,4
21,7	17,9
20,0	26,3
22,1	21,4
22,2	27,3
23,2	20,4
21,9	26,6
23,8	25,0
22,0	24,3
21,1	22,3
22,1	21,0
22,6	21,1
21,7	24,0
20,2	22,8
23,9	20,7
22,6	21,2
21,4	25,3
23,0	23,7
$\bar{x} = 22,10$ $s = 1,05$ $CV = 4,68\%$ $IC = 20,00 \text{ a } 24,30$	$\bar{x} = 22,43$ $s = 2,78$ $CV = 12,41\%$ $IC = 19,65 \text{ a } 25,21$

Tabela XII. Confronto das purificações com Sephadex: G-50, G-75 e G-100.

Nº da fração	Porcentagem de pureza (teste feito com talco)		
	G-50	G-75	G-100
14	87	91	93
14	80	86	89
15	87	89	94
15	85	88	93

NOTA: O eluente foi o mesmo, tampão fosfato 0,05M pH 7,5
 O tamanho da coluna foi de 25 x 1 cm.
 O nº de frações recolhidas foi o mesmo para os tres casos.

Tabela XIII. Controle das frações de LH-¹²⁵I purificadas em gel de amido e "Sephadex" G-100, usando-se diversos adsorventes e cromatoeletroforese.

Fração LH- ¹²⁵ I marcação: 09.01.73	Carvão -100mg/ml		Talco-tabletes		Cromatoeletroforese* % pureza
	ml	% pureza	mg	% pureza	
14	0,25	67	50	36	55%
	0,50	70	100	44	
	0,75	76	150	48	
	1,00	79	200	58	
	1,25	79	250	61	
	1,50	84	300	64	
	2,00	90	350	67	
17	0,25	71	50	41	65%
	0,50	74	100	47	
	0,75	78	150	51	
	1,00	82	200	64	
	1,50	90	250	67	
	2,00	93	300	71	

* Cromatoeletroforese foi usada como padrão.

Tabela XIV. Concentração de LH sérico em mulheres adultas, em menopausa e casos de hipopituitarismo.

Fases e Dias do ciclo	Nível de variação do LH sérico ng/ml	Médias do LH ng/ml
Folicular precoce Dias 1 a 6	20- 27	25
Folicular tardia Dias 2 a 5 pré-ACME*	10-40	30
Pré-ACME* Pico do meio do ciclo(14º dia)	150-270	250
Lútea inicial Dias 2 a 5 pós-ACME	12- 26	20
Lútea tardia Dias 1 a 6 pré-menstruação	20- 28	26
Menopausa	120-240	200
Casos de hipopituitarismo	10- 20	18

* Dia da provável ovulação.

4. DISCUSSÃO

Dos diversos aspectos apresentados discutiremos, inicialmente, o preparo do hormônio luteinizante marcado com ^{125}I e sua purificação.

A atividade específica para a marcação variou de 60 a 90 mCi/mg, e isto se deve ao número de resíduos tirosina da molécula de LH hipofisário (5).

A eficiência da incorporação do ^{125}I ao LH foi de 40 a 60%, como se observa na tabela I. Escolhemos o ^{125}I porque sua meia vida é de 60 dias, em contraste com a do ^{131}I que é de 8 dias, e isto nos permite utilizar o hormônio marcado por longo prazo, sendo entretanto necessária a sua repurificação antes do uso. Comparando-se os resultados de iodação de LH com ^{131}I e ^{125}I de Aono e Goldstein⁽²⁹⁾ vemos que há necessidade do dobro das quantidades de oxidante (cloramina T) e redutor (metabissulfito de sódio) para radioiodação com ^{125}I para atividades específicas comparáveis, em virtude do ^{125}I ter uma menor energia de emissão gama em relação ao ^{131}I . Porém, à medida que transcorre o tempo, quantidades progressivamente maiores de iodo se desprendem do hormônio, correspondendo a fragmentos peptídicos com Rf similar ao do Na- ^{125}I , em cromatografia de camada delgada. Assim, se torna necessário a repurificação, que é realizada a 40°C, usando-se o mesmo tipo de gel da purificação inicial.

No processo de iodação, uma vez colocado o hormônio, os demais reagentes devem ser adicionados com rapidez, não havendo aumento significativo na quantidade de hormônio marcado após cerca de 10 minutos da adição de cloramina T, mas com este tempo prolongado pode-se induzir perda progressiva de hormônio marcado por aparecimento de fragmentação da cadeia peptídica e adsorção às paredes do tubo. A adição de plasma humano (ou soro albumina bovina) serve para fixar o iodeto que não reagiu, além de prevenir a perda de hormônio por adsorção às paredes do tubo (Yalow).

O uso de um sistema duplo de purificação, eletroforese em gel de amido e cromatografia em coluna de exclusão molecular de "Sephadex" G-100, permitirá a obtenção de LH- ^{125}I , imunoreativamente puro.

Com efeito, a eletroforese em gel de amido é particularmente utilizada para separação de hormônio marcado, de acordo com o seu grau de iodação, sabendo-se que moléculas com resíduos de diiodotirosina migram mais rapidamente para o ânodo do que aquelas com grupamentos tirosínicos monosubstituídos. Em pH 8-8,6 cada resíduo de tirosina diiodada confere uma carga extra negativa a molé

cula pois a substituição do iodo diminui o pK dos fenoxi grupos dos resíduos de tirosina.

Após corrida eletroforética e posterior autoradiografia(figura 5) encontramos duas manchas correspondentes as frações de LH mono (1) e diiodada (2). A fração (1) é escolhida pois, não sendo intensamente iodada apresenta maior estabilidade e imunoreatividade⁽⁴⁰⁾. Esta fração será purificada em coluna - de "Sephadex" G-100.

O hormônio marcado e purificado, para radioimunoensaio, é testado para verificação de sua pureza. Este teste é feito com talco recoberto com plasma humano, pois o carvão ativado recoberto com plasma não tem especificidade para as gonadotropinas, adsorvendo frações danificadas, como se pode verificar na tabela XIII.

Separação do complexo hormônio-anticorpo do hormônio livre (não - reativo).

O uso do talco para separar hormônio ligado ao anticorpo do hormônio livre é aplicável para uma grande variedade de hormônios polipeptídicos, incluindo insulina, hormônio de crescimento humano, hormônio adrenocorticotrófico, hormônio da paratireoide e outros^(39,40). Nós tentamos o uso deste adsorvente - para a separação do complexo H-Ab-H*, mas os resultados foram insatisfatórios apesar de Levine e colaboradores⁽²⁷⁾ afirmarem ser um método fácil e reproduzível.

Também o carvão não apresenta especificidade na separação. Com isto, tivemos que recorrer ao soro de carneiro com anti-gama globulina de coelho, que apesar da dificuldade da preparação e aplicação, apresenta os melhores resultados^(3,4,5). Este método tem sobre os demais, a vantagem de sua alta especificidade, por precipitar exclusivamente o complexo LH-anti LH e não os demais componentes proteicos do soro.

Quanto a avaliação do método, em relação à especificidade da técnica, vemos na tabela VIII que as concentrações de LH sérico medidas em cinco diferentes diluições, nos deram o mesmo resultado do LH sérico não diluído, usando-se como referencia a curva padrão. Este critério é uma condição - necessária porém nem sempre suficiente para estudo completo da especificidade desde que a especificidade do radioimunoensaio depende da pureza dos reagentes e da capacidade do anticorpo de se ligar às proteínas. Para isto

necessitamos que o padrão e o desconhecido tenham energias idênticas de reação, com o mesmo sítio do anticorpo, numa associação que não é fácil testar. Desde que os padrões são, frequentemente, preparados a partir de extratos de hipófises humanas e que os desconhecidos são amostras de soro humano, existe a probabilidade de diferentes constantes de associação/dissociação. Por esta razão, seria vantajoso empregar como padrão materiais similares ao desconhecido⁽¹⁶⁾.

Quanto a sensibilidade, definida como a menor quantidade de hormônio não marcado que pode ser distinguida do traçador (são LH-¹²⁵I) dependerá do erro na determinação das menores concentrações de hormônio não marcado e do declive da curva padrão nestes pontos. O estudo estatístico empregando a análise de variância mostrou que a sensibilidade foi de 10 ng/ml.

A análise da reprodutibilidade permitiu-nos avaliar a precisão do método empregado que mostrou ser excelente (C.V. = 4,68%) dentro do mesmo ensaio (tabela XI) e satisfatória (C.V. = 12,41%) inter ensaio.

A tabela VIII esquematiza os valores encontrados para as concentrações de LH no soro de mulheres adultas normais com idade variando de 17 a 50 anos nas fases folicular e lútea, bem como mulheres em menopausa e casos de hipopituitarismo. As médias dos valores foram:

- a) 25 ng/ml com uma faixa de variação de 20 a 27 ng/ml para os dias 1 a 6 da fase folicular, considerando o 1º dia do início do fluxo menstrual;
- b) 30 ng/ml, variando de 10 a 40 ng/ml, nos dias 2 a 5 pré-acme ovulatório;
- c) 250 ng/ml, variando de 150 a 270 ng/ml no acme do meio do ciclo menstrual, (14º dia) correspondendo à ovulação;
- d) 20 ng/ml, variando de 12 a 26 ng/ml nos dias 2 a 5 pós-acme ovulatório, na fase lútea;
- e) 26 ng/ml, variando de 20 a 28 ng/ml, nos dias 1 a 6 pré-menstruação;
- f) 200 ng/ml, variando de 120 a 240 ng/ml, em mulheres em menopausa;
- g) 18 ng/ml, variando de 10 a 20 ng/ml nos casos de hipopituitarismo;

Nestas condições, podemos concluir que os níveis circulantes de hormônio luteinizante no ciclo menstrual se caracterizam por:

1) Fase folicular precoce, caracterizada por níveis baixos e irregulares, com tendência a elevar-se.

2) Fase folicular tardia ou pré-ovulação, dias anteriores ao 14º do ciclo, onde se observa um aumento importante do LH, correspondente à ovulação.

3) Fase lútea inicial, caracterizada por níveis, mais ou menos, estáveis.

4) Fase lútea tardia, ou pré-menstrual, com níveis variáveis, com tendência a queda.

5 - CONCLUSÕES

- (1) - Neste trabalho padronizamos um método para a dosagem de LH no soro humano, pela técnica do radioimunoensaio, usando o método do "duplo anticorpo" para a separação do hormônio ligado ao anticorpo específico e hormônio marcado livre.
- (2) - Introduzimos a técnica de separação do hormônio marcado indene daquele danificado, no qual utilizamos como adsorvente talco recoberto com plasma.
- (3) - A técnica empregada, avaliada através da especificidade, exatidão, sensibilidade e precisão, permitiu quantificar níveis de LH, circulantes no soro humano, em condições de deficiência (hipopituitarismo) e excesso (menopausa), além de mostrar variações no ciclo menstrual normal.

-*-**--*-**-

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- HUNTER, W.M. & GREENWOOD, F.C. *Preparation of iodine ¹³¹I labelled human growth hormone of high specific activity.* Nature, London, 194: 495-7, 1962.
- 2- GREENWOOD, F.C. et alii. *The preparation of ¹³¹I labelled human growth hormone of high specific radioactivity.* Biochem.J., Cambridge, 89: 114-23, 1963.
- 3- MIDGLEY, R.A. *Radioimmunoassay: a method for HCG and HLH.* Endocrinology, Glendale, 79 : 10-18, 1966.
- 4- MIDGLEY, R.A. & JAFFE, R. *Human luteinizing hormone in serum during the menstrual cycle: determination by radioimmunoassay.* J.Clin. Endocr. Metab., Springfield, 26: 1376-81, 1966.
- 5- MIDGLEY, R.A. *Radioimmunoassay for human follicle stimulating hormone.* J.Clin. Endocr. Metab., Springfield, 27: 295-9, 1967.
- 6- WILLIAMS, C.A. & CHASES, W.M. In: *Methods in Immunology and Immunochémistry.* Ac.Press, Editor, New York, 1967 v.1:p.319-24.
- 7- SMITHIES, O. *Zone electrophoresis in starch-gel : group variations in the serum proteins of normal human adults.* Biochem.J., London, 61: 629-33, 1955.
- 8- SMITHIES, O. *An improved procedure for starch gel electrophoresis: further variations in the serum proteins of normal individuals.* Biochem.J., London, 71: 585-8, 1959.
- 9- FERGUNSON, K.A. et alii. *Starch-gel electrophoresis of anterior pituitary hormones.* Nature, London, 190: 629-31, 1961.
- 10- YALOW, R.S. & BERSON, S.A. *Immunoassay of endogenous plasma insulin in man.* J.Clin. Invest., Baltimore, 39: 1157-75, 1960.
- 11- BUTT, W.R. et alii. *Preparation of antisera to human follicle stimulating hormone.* Nature, London, 197: 388-91, 1963.
- 12- FRANCHIMONT, P. *Le dosage des hormones hypophysaires somatotrope - et gonadotropes et son application en clinique.* Arscia, éd., Bruxelles, 1966 p.147-81 et 229-297.

- 13- BERSON, S.A. et alii. *Insulin ¹³¹I metabolism in human subjects: demonstration of insulin binding globulin in the circulation of treated subjects.* J.Clin.Invest., Baltimore, 35: 170-178 1966.
- 14- HARTREE, A.S. et alii. *The separation and purification of human luteinizing and thirotrophic hormones.* J.Endocrin., Cambridge, 76: 27-29, 1965.
- 15- REICHERT, L.E. & PARLOW, A.F. *Partial purification and separation of human pituitary gonadotrophins.* Endocrinology, Glendale, 74: 236-41, 1964.
- 16- BERSON, S.A. et alii. *Immunoassay of protein and peptide hormones.* Metabolism, Baltimore, 13: 1135-41, 1964.
- 17- BERSON, S.A. & YALOW, R.S. *Principles of immunoassay of peptide-hormones in plasma.* In: *Clinical Endocrinology*, v.2: 699-702 1967.
- 18- ODELL, W.D. et alii. *Radioimmunoassay for human follicle stimulating hormone: physiological studies.* J.Clin.Invest., Baltimore, 47: 2551-62, 1968.
- 19- FRANCHIMONT, P. & HENDRICK, J.C. *Some Particular Aspects of LH and FSH radioimmunoassays.* IN: *Immunological methods in endocrinology*, R. Levine, editor, New York, 1970, p.:46-52.
- 20- ROSSELIN, G. & DOLAIS, J. *Dosage de l'hormone folliculo stimulant humaine (FSH) par la méthode radioimmunologique.* Presse méd., Paris, 41: 2027-30, 1967.
- 21- ODELL, W.D. et alii. *Radioimmunoassay for Human Luteinizing hormone.* Metabolism, Baltimore, 15: 287-9, 1966.
- 22- ODELL, W.D. et alii. *Radioimmunoassay for luteinizing hormone in Human plasma or serum: Physiological studies.* J.Clin.Invest., Baltimore, 46: 248-55, 1967.
- 23- YALOW, R.S. & BERSON, S.A. *Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods.* Nature, London, 184: 1648-51, - 1959.
- 24- ALBERT, A. *Bioassay and Radioimmunoassay of human gonadotropins.* J.Clin.Endocr. Metab., Springfield, 28: 1683-7, 1968

- 25- MIDGLEY, A.R. & JAFFE, R.B. *Regulation of human gonadotropins: Correlation of serum concentrations of follicle stimulating and luteinizing hormones during the menstrual cycle.* J.Clin. Endocr. Metab., Springfield, 28: 1699-703, 1968.
- 26- ODELL, W.D. et alii. *Simplified, partially automated method -- for radioimmunoassay of human thyroid-stimulating, growth, luteinizing and follicle stimulating hormones.* J.Lab.Clin.Med. St. Louis, 70 : 973-80, 1967.
- 27- LEVINE, R.A. et alii. *A simplified radioimmunoassay for human-pituitary luteinizing hormone in serum.* Clin.Chem., Baltimore, 17: 931-5, 1971.
- 28- SOELDNER, J.S. & SLONE, D. *Critical variables in the radioimmunoassay of serum insulin using the double antibody technique.* Diabetes, New York, 14: 771-80, 1965.
- 29- AONO, T. et alii. *A radioimmunoassay method for human pituitary luteinizing hormone (LH) and human chorionic gonadotropin (HCG) using ¹²⁵I labelled LH.* Am.J.Obste.Gynec., St. Louis, 98 : 996-1001, 1967.
- 30- SMART, J.V. *Elementi di statistica medica.* Milano, Centro G. - Zambon Dell'Universit  di Milano, 1960.
- 31- MIDGLEY, Jr.A.R. et alii. *Principles for the assessment of the reliability of radioimmunoassay methods.* *Karolinska Symposia on Research Methods in Reproductive Endocrinology, "IMMUNO--ASSAY OF GONADOTROPINS"*, E. Diczfalusy, Editor, Stockholm, - 1969, p:163-184.
- 32- YALOW, R.S. & BERSON, S.A. *Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods.* Nature, London, 184:1648 - 54, 1959.
- 33- SNEDECOR, G.W. & COCHRAN, W.G. *Statistical Methods.* G. Ames, editor, Iowa, 1967 "State University Press".
- 34- MICHAEL, S.E. *The precipitation of proteins with complex salts.* Biochem.J., Liverpool, 33: 924-30, 1969.
- 35- ALBERT, A. et alii. *"Report of the National Pituitary Agency - Collaborative Study on the Radioimmunoassay of FSH and LH.* J.Clin.Endocrn.Metab., Springfield, 28 : 1214-19, 1968.

- 36- SCHALCH, O.S. et alii. *Measurement of Luteinizing hormone in plasma by radioimmunoassay.* J.Clin.Invest., Baltimore, 47 : 665-678, 1968.
- 37- WILDE, C.E. et alii. *Radioimmunoassay for Human Chorionic gonadotrophin and Luteinizing hormone.* Lancet, Londres, 21 v.1: 1118-21, 1966.
- 38- GLICK, S.M. et alii. *Immunoassay of human growth hormone in plasma.* Nature, London, 199: 784-787, 1963.
- 39- ROSSELIN, G. et alii. *Separation of antibody-bound and unbound peptide hormones labelled with ¹³¹I by talcum powder and precipitated silica.* Nature, London, 212: 355-62, 1966.
- 40- YALOW, R.S. & BERSON, S.A. *Topics in radioimmunoassay of peptide hormones.* In: *Protein and Polypeptide hormones*, Margoulies, M. Ed. Excerpta Medica International Congress, series - 161, Amsterdam, 1969, p. 21.
