

INIS - mp. - 1024.

Olga Zazuco Higa

**APLICAÇÃO DO MÉTODO DO RADIOIMUNOENSAIO
NA DOSAGEM DO HORMÔNIO DE CRESCIMENTO
HUMANO NO PLASMA**

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

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

Departamento de Fisiologia Geral

INSTITUTO DE ENERGIA ATÔMICA

Departamento de Radiobiologia

São Paulo

1972

OLGA ZAZUCO HIGA

APLICAÇÃO DO MÉTODO DO RADIOIMUNOENSAIO NA DOSAGEM
DO HORMÔNIO DE CRESCIMENTO HUMANO NO PLASMA

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

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Instituto de Biociências Instituto de Energia Atômica
Departamento de Fisiologia Geral Departamento de Radiobiologia

SÃO PAULO

1972

*A meu pai, de quem aprendi a tenacidade
e espírito de luta com que deve ser
enfrentado o caminho do auto-aperfeiçoamento,*

*A minha mãe, que me ensinou com seu silêncio
as virtudes da paciência e da disciplina,*

A meus irmãos, companheiros de todas as horas,

**DEDICO O PRESENTE TRABALHO, QUE, EM
CERTO SENTIDO, SERIA IMPOSSÍVEL
SEM AS SUAS PARTICIPAÇÕES.**

Que os Profs. Drs. PAULO SAWAYA, ROMULO RIBEIRO PIERONI, JOSÉ MOURA GONÇALVES, respectivamente, Orientador, Superintendente do I. E.A. e Diretor do Departamento de Radiobiologia, aos quais tanto devemos em termos de estímulo, interesse, apoio, colaboração e amizade;

Que a Dra. ROSALYN S. YALOW, personalidade contemporânea de alta expressão na área do radioimunoensaio, a quem devemos os fundamentos do presente trabalho;

Que o Dr. BERNARDO LÉO WAJCHENBERG, Chefe de Pesquisa, a quem devemos a coordenação de nossas atividades e, sobretudo, a oportunidade de manter um produtivo contacto com a brilhante pesquisadora citada;

Que as Bioquímicas IRACÉLIA TORRES DE TOLEDO E SOUZA, HEIDI PINTO e RITA MARIA DE MORAES, às quais devemos incontáveis auxílios, inclusive, a esta última, a orientação segura no que diz respeito ao tratamento estatístico do presente estudo;

Que a amiga SUZANA CAETANO, a quem devemos a revisão do texto e cuja paciência permitiu que a clareza fosse introduzida na exposição do trabalho;

Que os Srs. Médicos da Unidade de Diabetes e Supra-renal da 1ª Clínica Médica do Hospital das Clínicas da FMUSP, aos quais devemos as infusões e plasmas utilizados em nosso experimento;

Que todos, enfim, que de alguma forma concorreram para a realização de nosso trabalho,

possam receber com intensidade a força e a dimensão dos sentimentos de profunda gratidão que nos suscitaram seus gestos, desinteressados e gentis, mas de inestimável valor para nós.

ABREVIATURAS

| | |
|-----------------------|---|
| HCH | Hormônio de crescimento humano |
| HCH- ¹²⁵ I | Hormônio de crescimento humano marcado com ¹²⁵ I |
| Hor* | Hormônio marcado |
| Ac | Anticorpo |
| Hor*-Ac | Complexo hormônio marcado-anticorpo |
| B(bound) | Hormônio marcado ligado ao anticorpo |
| F(free) | Hormônio marcado livre |
| P.A. | Mistura plasmática com alto teor de HCH |
| P.B. | Mistura plasmática com teor médio de HCH |
| C.P. | Controle paralelo à dosagem |
| T.P. | Traçador paralelo à dosagem |
| cpm | Contagens por minuto |
| T _{1/2} | Meia vida |
| a.e. | Atividade específica |
| X | Média |
| s | Desvio padrão |
| c.V. | Coefficiente de variação |
| I.C. | Intervalo de confiança |
| r | Coefficiente de correlação |
| α | Nível de significância |

I N D I C E

| | Página |
|--|--------|
| Abreviaturas | |
| 1. INTRODUÇÃO E PROPÓSITO | 1 |
| 2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL | 8 |
| 2.1. Hormônio marcado (Hor*) | 9 |
| 2.2. Anticorpo específico (Ac) | 12 |
| 2.3. Técnica da separação do hormônio livre (F) do complexo formado (B) | 12 |
| 2.4. Tratamento estatístico | 16 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 19 |
| 3.1. Reagentes e soluções reagentes | 19 |
| 3.2. Material biológico | 20 |
| 3.2.1. Plasma humano | 20 |
| 3.2.2. Soro de cobaio anti hormônio de cres- cimento humano | 21 |
| 3.2.3. Hormônio de crescimento humano (HCH). | 21 |
| 3.3. Marcação do HCH com ^{125}I | 22 |
| 3.3.1. Técnica de iodação | 22 |
| 3.3.2. Purificação do hormônio marcado | 23 |
| 3.3.3. Teste de pureza do HCH- ^{125}I | 25 |
| 3.3.4. Teste da imunorreatividade do HCH- ^{125}I e seleção de condições ótimas para o ensaio | 27 |

| | Página |
|---|--------|
| 3.4. Técnica do radioimunoensaio | 28 |
| 3.4.1. Preparo das amostras de plasmas | 28 |
| 3.4.2. Curva padrão | 28 |
| 3.4.3. Sequência operacional do radioimunoensaio do HCH plasmático | 30 |
| 3.4.4. Controle da degradação e da ligação do hormônio ligado ao anticorpo, durante o período de incubação..... | 31 |
| 3.4.5. Separação do hormônio marcado livre do ligado ao anticorpo..... | 31 |
| 3.4.6. Cálculo e correção dos resultados... | 32 |
| 3.5. Análise estatística | 33 |
| 3.5.1. Especificidade | 33 |
| 3.5.2. Sensibilidade | 34 |
| 3.5.3. Precisão | 34 |
| 3.5.4. Exatidão | 34 |
| | |
| 4. RESULTADOS | 36 |
| | |
| 5. DISCUSSÃO | 56 |
| | |
| 6. CONCLUSÕES | 63 |
| | |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 64 |

1. INTRODUÇÃO E PROPÓSITO

Os métodos de microensaio, pelos altos padrões de sensibilidade e especificidade revelados assim como por sua aplicabilidade a um extenso número de compostos biológicos, têm sido preferentemente empregados em pesquisas endocrinológicas.

Pode-se mesmo afirmar que, em certo sentido, esses métodos são os responsáveis pelo grande desenvolvimento desse campo da ciência na última década, respondendo com eficiência às necessidades mais urgentes dos pesquisadores.

Podemos dizer que os principais problemas enfrentados pelo experimentador dessa área da ciência enquadram-se em 2 itens gerais, a saber:

- obtenção de informações quantitativas, o mais exatas possíveis, dos elementos bioquímicos (hormônio, enzimas, vitaminas, etc.) presentes em tecidos ou fluídos biológicos;
- discernimento imediato dos sítios e modos de ação desses mesmos elementos.

Com efeito, tem mostrado a experiência que as técnicas de microensaio, que exploram exatamente a extrema delicadeza das medidas radioativas e a especificidade que caracteriza as reações

bioquímicas, ajusta-se perfeitamente a essa problemática, oferecendo condições ao pesquisador para superar suas facilidades.

Esses métodos, denominados por Yalow e Berson (1960) como RADIOIMUNOENSAIOS, baseiam-se essencialmente na reação de um antígeno marcado com radioisótopo e de seu anticorpo específico e têm sido os preferidos, sempre que se trata de medir com precisão e segurança hormônios proteicos e polipeptídicos, comprovadamente antigênicos em animais de laboratório.

Atualmente o radioimunoensaio vem sendo aplicado também visando-se medir substâncias tais como octapéptidos e hormônios esteróides, substâncias não propriamente imunogênicas mas com as quais se pode provocar a produção de anticorpos após lograrem-se alterações estruturais adequadas (Ekins, 1970).

As primeiras tentativas nesse sentido foram feitas por Ekins (1960) e por Rothenberg (1961), que trabalharam respectivamente com a tiroxina e a vitamina B₁₂.

Nos experimentos com substâncias não-antigênicas, porém, dá-se preferência ao uso de proteínas conjugadoras naturais - "protein binding" - com sítios de ligação específicos, enquanto que, com substâncias antigênicas - objetos de nosso presente estudo - é mais recomendável a utilização de anticorpos induzidos imunologicamente, devido precisamente à extrema especificidade apresentada pelo antisoros em geral.

O presente trabalho focalizou exclusivamente um único hormônio proteico, comprovadamente capaz de comportar-se como excelente antígeno e com o qual ótimos antisoros podem ser obtidos através de sua utilização na imunização de cobaias: o HORMÔNIO DE CRESCIMENTO HUMANO (HCH).

Esse hormônio vem sendo, durante as últimas 4 décadas, objeto de exaustivos estudos, numa tentativa de busca do método mais adequado para sua identificação. Destacam-se em especial o

valor dos trabalhos de Yalow e Berson (1968) nesse campo. Dedicaram-se ultimamente à revisão desses estudos, Korner (1961), Loraine (1966) e Bell (1967).

Um grande número dos métodos indicados revelou-se satisfatório para a estimativa em extratos de tecidos pituitários, porém nenhum apresentou um nível de sensibilidade suficiente a ponto de ser capaz de detectar a presença do hormônio de crescimento no plasma humano, com a desejável regularidade.

O fato de serem as concentrações de HCH muito baixas no plasma ($60 \times 10^{-12}M$), sua detecção exige a combinação do método empregado com um processo de inibição imunológica, de tal modo que permita ao experimentador, na avaliação de seu ensaio, distinguir claramente os efeitos de responsabilidade estrita de HCH dos dele independentes.

Com a aplicação desses métodos, ainda que se realizasse corretamente a reação, permanecia ainda uma grande dificuldade de sua visualização por parte do experimentador, que era obrigado a valer-se da espectrofotometria ou de elementos corantes ou precipitantes, para facilitar essa importante fase da operação.

A substituição desses métodos pelo radioensaio, empregando o HCH marcado com ^{125}I e seu anticorpo específico, além de dispensar esses cuidados complementares ainda revela-se, potencialmente, como capaz de uma maior especificidade e maior sensibilidade, adequando-se pois à medida de quantidades bastante pequenas.

A plena realização desse potencial, porém, requer uma apreciação cinética da reação de HCH e anticorpo, assim como das características do hormônio marcado.

Para a ilustração dessas afirmativas, a Figura 1 mostra a série de reações de competição que se desenvolve no radioensaio. Nela podemos observar que o hormônio marcado com ^{125}I reage com o anticorpo específico, resultando na formação do complexo hor

REAÇÕES DE COMPETIÇÃO QUE CONSTITUEM A BASE DO RADIOIMUNOENSAIO

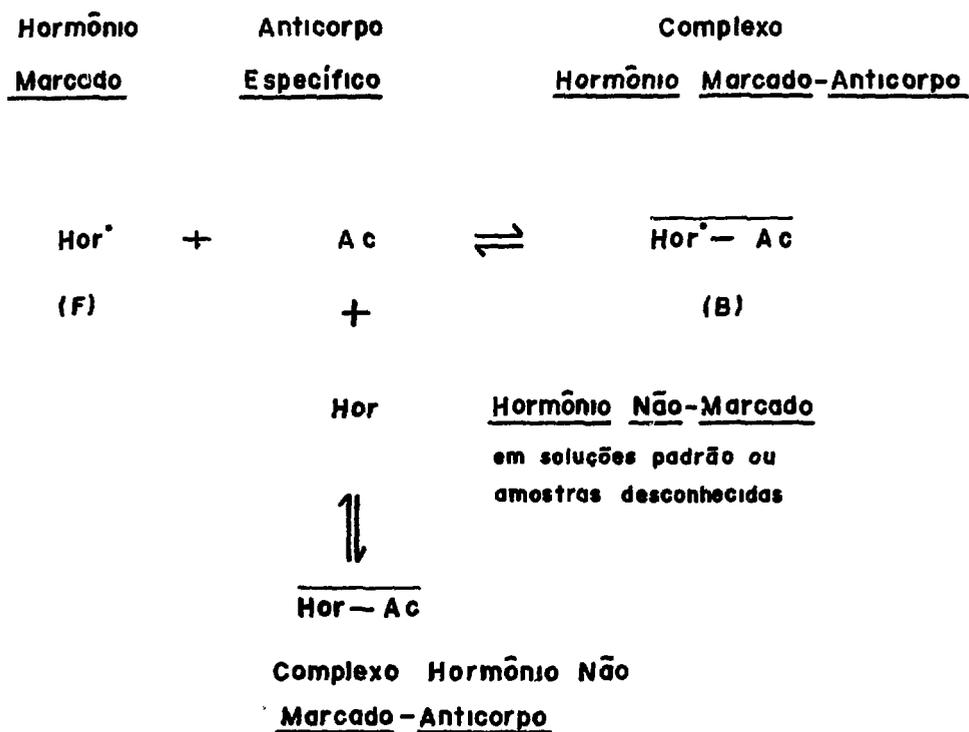


FIGURA 1

mônio marcado-anticorpo. Se o hormônio não marcado é adicionado ao sistema, automaticamente competirá com o hormônio marcado na união com uma quantidade fixa do anticorpo, passando a formar o complexo hormônio não-marcado-anticorpo, reduzindo-se consequentemente a quantidade de anticorpo que pode participar da formação do complexo marcado.

Em outras palavras, a razão entre o hormônio marcado ligado ao anticorpo (B) e o hormônio livre (F), ou seja, B/F cai progressivamente na proporção do aumento da concentração do hormônio não-marcado no meio.

Na execução do ensaio B e F serão determinados e a razão B/F será transferida para um gráfico, registrando nas abscissas as quantidades conhecidas e crescente do padrão do hormônio, com o que é obtida uma curva padrão representada na Figura 2.

A concentração hormonal no plasma é assim determinada pela comparação de B/F observado nas amostras com aquele produzido pelas soluções-padrão.

Resta ainda discutir os artifícios técnicos mais adequados para a determinação correta dos componentes B e F.

Nos métodos do radioensaio, o período de incubação com o anticorpo deve ser seguido de uma técnica especial que permita separar o anticorpo complexado do antígeno marcado livre, para que um deles, ou ambos, torne-se passível de quantificação. As técnicas empregadas exploram ora as afinidades adsorptivas dos hormônios livres, ora as precipitações seletivas dos complexos antígeno-anticorpo por um sal, por um segundo anticorpo ou ainda por um anticorpo unido a um polímero insolúvel. Há ainda a técnica de exclusão molecular, que permite separar os complexos formados das pequenas moléculas do antígeno livre. No presente trabalho adotamos para essa fase, a primeira técnica citada, utilizando como adsorvente específico do hormônio livre o carvão ativo recoberto com plasma, em virtude de sua fácil obtenção, praticidade de uso e ain

CURVA PADRÃO PARA O ENSAIO RADIOIMUNOLÓGICO DO
HORMÔNIO DE CRESCIMENTO HUMANO

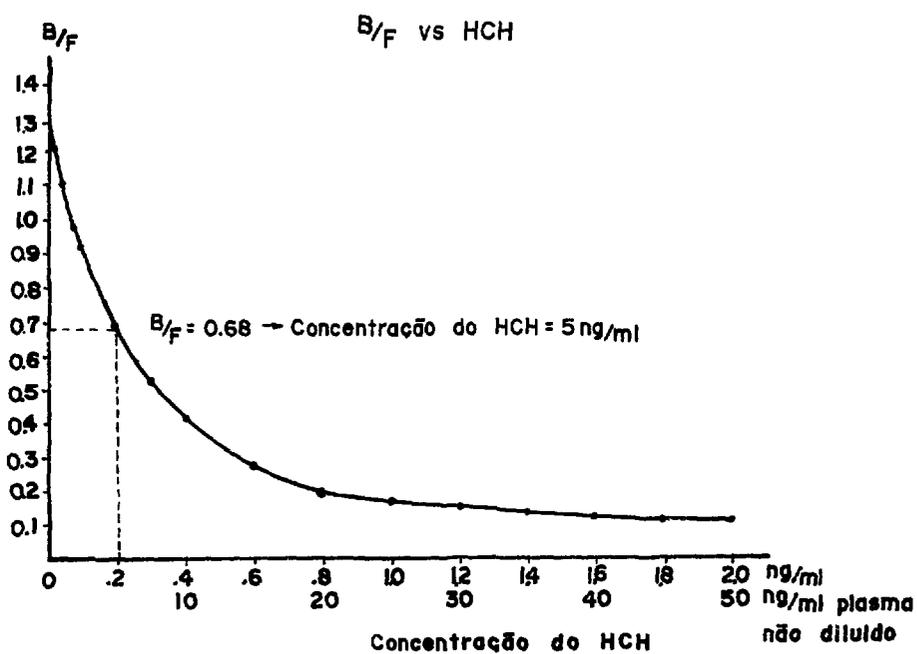


FIGURA 2 - As razões B/F de soluções padrões são colocadas no gráfico como função das concentrações conhecidas de HCH. A partir das razões B/F dos plasmas dosados, as concentrações correspondentes são determinadas na curva padrão.

da por simplificar sobremaneira as operações necessárias.

A adoção da técnica do carvão prende-se, ainda, no importante fato de termos tido um treinamento com a Dra. ROSALYN S. YALOW, da Veterans Administration Hospital (New York, USA), grande personalidade no campo do radioimunoensaio, muitas vezes citada no presente trabalho.

Dentro dessas condições, propomo-nos demonstrar a exequibilidade da técnica do radioimunoensaio em nosso meio, na dosagem do hormônio de crescimento plasmático.

Objetivamos, paralelamente, a padronização do método, de modo a torná-lo aplicável nas medições desse hormônio na rotina clínica.

2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Para que atingíssemos os objetivos propostos, tivemos ne
cessidade de trabalharmos com os seguintes elementos:

- um hormônio marcado com radioisótopo (Hor^*) a que tambe
m chamamos no decorrer da exposição de hormônio traç
ador;
- um anticorpo específico (Ac);
- uma técnica adequada que permitisse separar Hor^* -Ac
de Hor^* , ou seja, que, com um índice máximo de seguran
ça, possibilitasse o isolamento do complexo hormôn
io marcado-anticorpo do hormônio que não se ligou ao
anticorpo pela saturação dos sítios de união;
- tratamento estatístico para a verificação das condi
ções e graus de especificidade, sensibilidade, preci
são e exatidão do método empregado.

Conhecendo a importância de uma escolha criteriosa e de
um tratamento acertado desses instrumentos de trabalho para o bom
êxito de nossa tarefa, cada um desses elementos mereceu, de nossa
parte, cuidados e atenções especiais nas fases iniciais de seleção
e preparo. Passamos a detalhar nosso procedimento durante essa import
ante fase, visando principalmente a definição clara da nature

za dos elementos utilizados assim como a justificação fundamental desse mesmo procedimento.

2.1. Hormônio marcado (Hort*)

Dentre os vários agentes marcadores disponíveis, nossa escolha recaiu sobre o ^{125}I para a marcação do HCH de nosso experimento. Nossa decisão por esse agente obedeceu às seguintes razões :

- fácil obtenção desse material, com ótimas características para a técnica de radioimunoensaio (isótopo livre de carreador);
- bom índice de sensibilidade na detecção desse radioisótopo, no contador de poço ligado a espectrômetro para raios gama.

Papel importante desempenhou ainda em nossa tomada de decisão o decaimento lento de ^{125}I ($T_{1/2} = 60$ dias) que, permitindo contagens de amostras por tempo mais prolongado, pareceu-nos o agente mais apropriado para as nossas contingências experimentais, visto que a preparação do hormônio marcado, a montagem do ensaio, o indispensável período de incubação e a conclusão de contagem das amostras, geralmente em grande número, são operações que se estendem por um espaço de tempo razoavelmente prolongado e que só podem ser realizados logicamente após a obtenção do isótopo.

Para a marcação do hormônio propriamente dito, levamos em consideração que o HCH contém 8 resíduos tirosil por PM 21.000 e que cada um desses resíduos pode aceitar 2 átomos substituídos de iodo. Como o hormônio excessivamente iodado não pode reter toda a reatividade imunológica, foi calculada uma atividade específica (a.e.) para uma média de um átomo de I/molécula de HCH, o que é obtido quando a a.e. é de aproximadamente 115 mCi/mg (Berson e Ya

low, 1968).

Assim, empregamos para as marcações do HCH com ^{125}I o método da oxidação pela cloramina T, de Hunter e Greenwood (1962), com as modificações introduzidas por Berson e Yalow (1968), e utilizamos uma a.e. entre 50 - 100 mCi/mg. O metabissulfito de sódio é utilizado nesse processo para a redução do iodo oxidado que não tenha sido substituído no hormônio.

Terminada a adição dos reagentes, o hormônio assim diferenciado foi acrescido de plasma humano para que, pelo seu conteúdo proteico, fosse prevenida sua adsorção ao tubo de iodação.

O curto período de contacto do hormônio com o vidro, nos momentos que precedem sua introdução no sistema de purificação, tiveram também um papel auxiliar na limitação dessa adsorção.

A purificação do hormônio marcado foi ainda um procedimento indispensável, realizado com a finalidade primeira de livrá-lo do iodo radioativo não reagente e dos fragmentos hormonais degradados.

O hormônio degradado geralmente liga-se ou é carregado juntamente com as proteínas do plasma acrescentado, que nesse caso foi previamente corado com azul de bromofenol, para servir como indicador da passagem do preparado iodado através do sistema de purificação.

Em face da importância que teve para nós a obtenção de um hormônio perfeitamente estável e puro, servimo-nos de 3 consagrados métodos para a purificação de nosso material experimental:

- Adsorção e eluição em coluna de celulose (Yalow e Berson 1960);
- Eletroforese em gel de amido (Glick e col., 1963):
- Filtração em gel Sephadex G-75 (Hunter e Greenwood, 1962).

O método da coluna em celulose, originalmente empregado para a purificação da insulina ^{125}I , tem sido também usado para outros hormônios peptídicos, como o HCH (Yalow e Berson, 1966 b). Rápido e simples, este método baseia-se na propriedade da celulose em adsorver o HCH não-degradado, enquanto que os fragmentos degradados saem unidos às proteínas séricas.

A eletroforese em gel de amido, de comprovada eficiência, quer como método analítico, quer como técnica preparativa, foi por nós empregada por permitir a elucidação de certas características do hormônio marcado que outros métodos de purificação não podem efetuar, pois possibilita a seleção dos componentes hormonais marcados com diferentes números de átomos de iodo. Pela eluição do hormônio marcado das diferentes secções do gel, pudemos discernir as frações mais lentas das mais rápidas. Como se sabe, os componentes mais iodados caminham mais rapidamente para o anodo podendo ser facilmente excluídos, pois exibem uma imunorreatividade reduzida e apresentam-se menos estáveis durante o desenvolvimento do ensaio.

Na filtração em gel Sephadex as frações degradadas são eluídas no início e o hormônio íntegro, logo a seguir, sendo o iodo não reagente retido por mais tempo em consequência de suas proporções diminutas.

Submetemos nosso preparado iodado a esses 3 processos de purificação, realizando constantes análises comparativas a fim de chegarmos ao conhecimento do método mais adequado. Decidimo - nos pela utilização do seguinte processo: eletroforese em gel de amido e posterior cromatografia em coluna de exclusão molecular (Sephadex).

Em nossa experiência todas as frações hormonais resultantes dos diferentes métodos de purificação, foram ainda testadas quanto ao índice de pureza do hormônio marcado, ou através da cromatoeletroforese em papel ou pela adsorção em talco ou carvão.

Para chegarmos ao conhecimento do rendimento de sua marcação, esses mesmos testes foram realizados com o hormônio logo após a iotação.

Baseando-nos no procedimento acima exposto, acreditamos ter utilizado em nosso experimento, um hormônio de tal forma tratado que nos permitirá conclusões devidamente escoradas em um alto índice de confiança.

2.2. Anticorpo específico (Ac)

O hormônio de crescimento humano tem mostrado ser potencialmente antigênico nos animais de laboratórios, sendo suficiente a imunização repetida com o Adjuvante de Freund (Berson e Yalow, 1967).

Dado o tempo prolongado que exige um programa de imunização de cobaios para a obtenção de um antisoro adequado, utilizamos no desenvolvimento deste trabalho um antisoro de cobaio anti HCH doado pela National Pituitary Agency (Baltimore, Maryland).

O anticorpo hormonal veio diluído em soro fisiológico com 1% de soro normal de cobaio. As gamas globulinas deste soro adicionado servem para prevenir a perda do anticorpo por adsorção ao vidro.

Devido a sua alta potencialidade e as pequenas concentrações medidas do HCH, o anticorpo foi usado em nossos ensaios nas diluições de $1:1 \times 10^6$ a $1:3 \times 10^6$.

2.3. Técnica de separação do hormônio livre (F) do complexo formado (B)

Os critérios para a escolha de uma técnica conveniente de

separação devem necessariamente ser relacionados com a perfeição da separação, com a reprodutibilidade, a flexibilidade de condições, o volume de incubação e a aplicabilidade, principalmente com relação a tempo e trabalho dispendido.

Em nosso caso, partíamos de que, embora alguns sistemas hormonais antígeno-anticorpo deem precipitação a altas concentrações de reagentes, sob as condições do radioimunoensaio as concentrações geralmente são tão baixas que os complexos formados permanecem em solução.

Além disso, dentro do que determina a validade estatística da radioatividade medida, é imprescindível baixa concentração do hormônio traçador, para que se obtenha sensibilidade a pequenas concentrações do hormônio, no padrão ou em amostras. Obviamente observamos que volumes maiores de incubação permitem uma concentração menor do traçador.

Para contornar essa problemática, tínhamos a nosso dispor toda a série de técnicas de separação, idealizadas e já aplicadas pelos experimentadores nesses casos, a saber:

A. Técnicas baseadas na migração diferente do complexo formado e do traçador livre:

A.1. Cromatografia. Foi a primeira técnica usada por Yalow e Berson (1956) no imunoensaio e explora a adsorção da insulina livre à celulose do papel.

A.2. Cromatoeletroforese. Este processo foi empregado por Hunter e Greenwood (1964).

A.3. Eletroforese. Como no processo anterior, o hormônio marcado fica adsorvido na origem enquanto o hormônio complexado migra com as proteínas séricas. Foi usado por

Yalow e Berson (1960), Roth e col. (1963) e Glick e col. (1963).

A.4. Filtração em gel. Técnica utilizada por Haber e col. (1965) e Wide e Porath (1966).

B. Técnicas baseadas na separação do complexo formado:

B.1. Precipitação salina. É aplicável quando a solubilidade característica do hormônio e do anticorpo são suficientemente diferentes, de acordo com Grodsky e Forsham (1960).

B.2. Duplo anticorpo. Morgan e Lazarow (1963) desenvolveram este sistema de precipitação do complexo solúvel por um segundo anticorpo.

B.3. Fase sólida. Através da ligação covalente, o anticorpo fica unido a polímero insolúveis, método este aplicado por Catt e col. (1966) e Catt e Treager (1967).

C. Técnicas baseadas na adsorção do traçador livre:

C.1. Resina de troca iônica. Sistema usado por Meade e Klitgaard (1962) e Lazarus e Yuong (1966).

C.2. Sílica e talco. Desenvolveram esta teoria, Rosse lin e col. (1966).

C.3. Carvão. Herbert (1965) (1968) estudou a separação do hormônio livre por fixação a este adsorvente.

Dentre todas essas técnicas, decidimo-nos pela aplicada por Herbert, ou seja, na técnica que explora a adsorção do traçador li

vre, sendo que o produto utilizado foi o carvão recoberto com plasma.

Ponderamos para nossa escolha algumas razões, tais como a possibilidade de trabalhar-se com grandes volumes de incubação, a facilidade para a obtenção do produto, assim como a rápida adsorção do hormônio livre a esse produto.

As propriedades adsortivas do carvão são bem conhecidas e tem sido largamente exploradas (Hassler, 1963). Porém, sua não-seletividade na adsorção de diferentes substâncias impediu sua utilização na separação de elementos que se encontrassem numa mesma solução. Recentemente, no entanto, foi descoberto que o carvão, ou outros adsorventes, quando recoberto com plasma animal, - o humano inclusive - passa a adsorver apenas moléculas de configuração e tamanho molecular menores do que aqueles do material de cobertura (Gottlieb e col., 1965). Por extensão, supos-se que o carvão assim preparado poderia ser usado também para a separação de dois agentes que diferissem significativamente um do outro, em configuração e peso molecular. Tais diferenças parecem ocorrer entre o PM de hormônios livres e PM dos mesmos, quando complexados com um anticorpo.

Após estudos em que o carvão era utilizado como agente separador, verificou-se que uma de suas vantagens era a separação quase instantânea que sua presença determinava (Herbert, 1968). Em apenas alguns segundos o hormônio livre era adsorvido pelo carvão e rejeitado o hormônio ligado. Bastava, pois, em seguida removê-lo da solução (por centrifugação) para obter-se a separação do hormônio livre.

Em nosso experimento, em que utilizamos o carvão recoberto com plasma como adsorvente, empregamos volumes de incubação preparados em uma diluição de 1:25 do plasma, para um volume total de 2,5 ml, o que permitiu uma baixa concentração do traçador e uma sensibilidade satisfatória a baixas concentrações do HCH, que é o caso do plasma humano.

Além disso, o volume total de 2,5 ml foi determinado para que se prevenisse a perda de uma porcentagem significativa do so brenadante no sedimento do carvão. O traçador livre, uma vez ad sorvido ao carvão, torna-se de difícil eluição, permanecendo no so brenadante apenas o hormônio ligado.

2.4. Tratamento estatístico

Em função da padronização da técnica no presente trabalho, nosso principal objetivo, esta mesma técnica sofreu uma série de avaliações críticas durante o seu desenvolvimento, orientadas prin cipalmente no sentido da verificação dos seguintes parâmetros fun damentais:

- A) Especificidade
- B) Sensibilidade
- C) Precisão
- D) Exatidão

A) Especificidade

É absolutamente imprescindível no ensaio radioimunológico que o hormônio plasmático endógeno e o hormônio padrão reajam de forma idêntica com os antisoros, devendo outras substâncias presentes no plasma permanecerem inativas ou terem sua ação controlada (Yalow e Berson, 1969b). Para testar esta reatividade semelhante, recorreremos à dosagem de uma amostra plasmática com elevado teor de HCH, em diferentes diluições, sendo que cada uma destas foi comparada à curva padrão. Observamos uma perfeita correspondência à curva, pois ao ajustar-se um ponto do plasma diluído, os pontos restantes situaram-se ao longo da mesma.

A concentração do HCH correspondeu linearmente com o fa

tor de diluição, o que vale dizer que houve constância na concentração medida do hormônio multiplicada pelo fator de diluição, ou ainda, que a concentração calculada para o plasma não diluído mostrou-se independente da diluição empregada para o ensaio.

B) Sensibilidade

A condições primeira para que se tenha um radioimunoensaio sensível é a presença de um antisoro que reaja com o hormônio a energia elevada. Esta energia de interação reflete-se essencialmente no declive da curva padrão (Berson e Yalow, 1967).

Em nosso trabalho os antisoros diluídos na forma conveniente foram testados contra algumas concentrações críticas do hormônio e o anticorpo que mostrou o declive mais acentuado foi o preferido para nosso ensaio. Trabalhamos na temperatura ligeiramente superior a 0°C e justifica-se o nosso procedimento, se levamos em conta que a energia livre da reação antígeno-anticorpo aumenta à medida que a temperatura é abaixada.

C) Precisão

No que diz respeito à precisão do método, ponto importante é que a quantidade de hormônio marcado seja pequena quando comparada à quantidade de hormônio não marcado a ser medido.

Em nosso experimento levamos em consideração esse ponto e aplicamos para a avaliação do fator precisão, o método de uso corrente em ensaios biológicos, ou seja, a verificação da reprodutibilidade de um mesmo resultado em diversas amostras de um mesmo material.

A precisão do método foi assim avaliada pelo coeficien

tes de variação em dosagens intra-ensaio (condições de rotina) e inter-ensaio (determinações em diferentes dias) (Melo, 1970). Valores muito próximos uns dos outros foram obtidos, o que nos levou a concluir da precisão do método em função de sua reprodutibilidade.

D) Exatidão

Este parâmetro foi estudado pelo acréscimo de quantidades definidas e progressivamente crescentes de plasma a uma solução-padrão de HCH previamente quantificada.

Obtivemos um bom índice porcentual de recuperação, o que constitui um índice seguro da exatidão do método (Melo, 1970).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes e soluções reagentes

Utilizamos em nosso experimento:

- ^{125}I na forma de Na^{125}I em NaOH 0,1 N, livre de carreador e redutor, de concentração não inferior a 300 mCi/ml (Union Carbide Corporation). A meia vida ($T_{1/2}$) deste isótopo do iodo é de 60 dias.
- Albumina Humana "Albumisol". Solução a 5% (Merck Sharp & Dohme).
- Tampão veronal 0,025 M e 0,05 M, pH 8,6.
- Tampão fosfato 0,2 M, pH 7,4.
- Tampão borato 0,02 M, pH 8,6 e 0,3 M, pH 8,0.
- Ácido clorídrico 0,005 M, pH 2-3.
- Gel Sephadex G-75 (Pharmacia Upsalla). O gel foi entumescido em tampão veronal 0,025 M com agitação constante à temperatura ambiente (1 g em 15 ml).
- Carvão - Norit Grade A (Amend Drug and Chemical Co). Suspen

são de 100 mg por ml de tampão veronal 0,025 M (suspensão obtida por agitação contínua).

- Celulose (Whatmann, W. & R. Balston, Ltd).
- Gel de amido hidrolisado (Connaught Medical Research Laboratories).
- Talco - comprimidos de 100 mg (Gold Leaf Pharmaceutical Co).
- Cloramina T (Merck). Solução de 2,65 mg por ml de tampão fosfato 0,2 M, pH 7,4.
- Metabissulfito de sódio (Carlo Erba). Solução de 4,8mg por ml de tampão fosfato 0,2 M, pH 7,4.
- Azul de bromofenol (Merck). Corante do plasma humano ou albumina - "plasma azul" - substância indicadora.
- Veronal-albumina. Solução contendo 2,5 mg de albumina humana por ml de tampão veronal 0,025 M.
- Acetona-veronal-albumina. Solução de 20% de acetona em veronal-albumina.
- Diluente padrão. Solução de veronal albumina com 1% de soro de cobaio.

3.2. Material biológico

3.2.1. Plasma humano

Os plasmas enviados pela 1ª Clínica Médica do Hospital das Clínicas foram obtidos de indivíduos normais e pacientes com

doenças hipofisárias, em particular, aqueles com nível elevado de hormônio de crescimento (acromegalia).

Para a avaliação do método laboratorial preparamos misturas com plasmas de indivíduos normais e plasmas de pacientes acromegálicos, na proporção de 4:1 (mistura P.A.) e na proporção de 8:1 (mistura P.B.).

3.2.2. Soro de cobaio anti hormônio de crescimento humano

O antisoro de cobaio anti HCH doado pela National Pituitary Agency (Baltimore, Maryland), correspondente a partida 2-5-19, foi preparado nos laboratórios da Veterans Administration Hospital, New York. Veio diluído a 1:2.000 em soro fisiológico com 1:100 de soro normal de cobaio e 1:500 de mertiolato. As gama globulinas do soro de cobaio têm como finalidade prevenir a perda do anticorpo por adsorção ao vidro. A solução estoque foi mantida a -15°C em alíquotas que uma vez descongeladas foram conservadas em geladeira.

3.2.3. Hormônio de crescimento humano (HCH)

O hormônio foi doado pela National Pituitary Agency na forma cristalina (NIH-GH-HS-1394) com atividade hormonal de 2,0 UI/mg e atividade prolactínica de 6,0 UI/mg. Foi preparado pelo Prof. A.E. Wilhelmi da Emory University (Atlanta, Georgia).

A solução para a iodação foi preparada dissolvendo-se o HCH em HCl 0.005 M, pH 2-3, a uma concentração de 1 mg/ml. Para utilização como solução padrão, este hormônio foi diluído a 1 ug/ml.

Todas as soluções foram conservadas no máximo por 3

meses, tendo sido divididas em pequenas alíquotas e mantidas a -15°C .

3.3. Marcação do HCH com ^{125}I

3.3.1. Técnica de iodação

Com as precauções usuais na manipulação de material radioativo, a iodação foi efetuada em tubo de ensaio de 75 mm por 10 mm, empregando-se o método de Hunter e Greenwood, com modificações de Yalow e Berson (1968).

As quantidades de iodo radioativo e HCH variaram de acordo com a atividade específica empregada (50 a 100 mCi/mg).

Usando micropipetas descartáveis (Clay Adams), os reagentes foram adicionados na seguinte ordem e quantidades:

| | | |
|--|--------|----|
| Tampão fosfato 0,2 M, pH 7,4 | 20 | uI |
| Na ^{125}I | 1 - 10 | uI |
| Solução do HCH | 2 - 5 | uI |
| Solução de cloramina T | 20 | uI |
| Solução de metabissulfito de sódio | 20 | uI |
| "Plasma azul" | 5-200 | uI |

O intervalo entre as adições foi de apenas segundos e a mistura entre os reagentes foi efetuada através de um leve so pro na micropipeta, após cada adição. A quantidade de "plasma azul" variou de acordo com o sistema de purificação.

A mistura foi imediatamente removida do tubo, com a

mesma pipeta usada para o "plasma azul", e aplicada ao sistema de purificação.

3.3.2. Purificação do hormônio marcado

O preparado iodado foi submetido aos seguintes processos de purificação:

A) Coluna de celulose

Uma pequena coluna cromatográfica foi preparada a partir de uma pipeta graduada de 5 ml, cortando-se a pipeta 12cm acima da extremidade inferior. Preenchemos a coluna com pó de celulose Whatman até uma altura de 4 cm, e para favorecer sua retenção, introduzimos na extremidade inferior uma pequena quantidade de algodão de vidro.

Acrescentamos 5 μ l de "plasma azul" ao preparado iodado e o aplicamos sobre a celulose seca. A coluna contendo o hormônio marcado foi lavada com 10 ml de tampão veronal 0,02 M, pH 8,6, com uso de pressão para acelerar a passagem das soluções através da coluna, recolhendo-se 3 frações de 3 ml aproximadamente. Nesta fase, eliminamos da coluna o ^{125}I livre, e compostos degradados ligados às proteínas do plasma adicionado.

O HCH- ^{125}I adsorvido à celulose foi então eluído sob pressão, com 5 porções de 0,2 - 0,3 ml de acetona veronal albumina.

B) Eletroforese em gel de amido

O gel de amido preparado de acordo com o método

de Smithies (1959), foi colocado no molde apropriado (Buchler Instruments) e mantido a baixa temperatura ($5-10^{\circ}\text{C}$) por aproximadamente 12 horas, para uma boa solidificação.

Adicionamos 40 μl de "plasma azul" ao tubo de iodação, imediatamente após a adição do agente redutor. Em cada fenda do gel foram aplicados 40 μl da mistura iodada.

A eletroforese foi desenvolvida no sentido vertical (Mod. 3-1008 Buchler Instruments), a 90-100 V, a 4°C por 12 horas, em tampão borato 0,3 M, pH 8,6.

Quando a coloração azul das albuminas séricas se situava na metade da extensão da placa (aproximadamente após 12 horas acima indicados), o processo era interrompido. Ambas as superfícies do gel eram então colocadas em contacto com filmes raio-X, sendo interposta uma camada de "parafilm". O tempo de exposição dos filmes era de 10-15 minutos, sendo os mesmos revelados imediatamente.

A partir das autorradiografias, as placas de gel foram seccionadas na zona correspondente ao hormônio radioativo, em 3 segmentos. Cada segmento foi colocado em tubos 16 x 100 mm e congelados no mínimo por 3-4 horas.

Depois do congelamento, o HCH- ^{125}I foi eluído pela adição de 1 ml de veronal 0,02 M, comprimindo-se suavemente o gel com um tubo de ensaio de 13 x 100 mm, ao mesmo tempo em que se recebia o eluato em outro tubo. Estes foram centrifugados e decantados para remover qualquer partícula de gel.

Para o cálculo da recuperação do hormônio, medimos a atividade dos segmentos de gel, antes e depois da eluição. Depois dos testes de pureza do hormônio marcado em cada uma das três frações, guardávamos em congelador ou repurificávamos em gel Sephadex G-75.

C) Filtração em coluna de exclusão molecular (Sephadex)

O gel Sephadex G-75 foi previamente entumescido por agitação magnética com tampão veronal 0,025 M, pH 8,6, durante aproximadamente 10 horas. O gel foi empacotado com coluna de vidro de 35 x 1 cm, tendo-se vedado sua extremidade com pequena quantidade de lã de vidro.

O hormônio marcado contendo 0,2 ml de "plasma azul" foi aplicado à coluna. A eluição foi feita com veronal albumina, coletando-se frações de 1 ml através do coletor automático (G.M. Instrumental Company). Controlou-se os diversos eluatos através do contador de radiação gama-Tobor (Nuclear Chicago Corporation), a fim de localizar os picos de atividade com as respectivas frações. O HCH-¹²⁵I íntegro, localizado no 2º pico, era congelado após os testes de pureza.

3.3.3. Testes de pureza do HCH-¹²⁵I

A pureza do hormônio marcado foi avaliada através de 3 técnicas:

A) Adsorção em carvão

Uma amostra do hormônio marcado (≈ 1 uI) foi colocada em tubo de ensaio contendo 2,4 ml de tampão veronal 0,025 M e 0,1 ml de plasma de banco de sangue. O tubo foi agitado rapidamente em "Vortex" e 1 ml da suspensão de carvão (1 mg/ml) foi adicionado. Após agitação, centrifugou-se a 2.000 rpm, por 2 minutos, a 4°C (Mod.PR-2, International Equipment Company). O sobrenadante decantado e o sedimento foram contados no detetor de cintilação de

poço, para radiação gama (Nuclear Chicago Corporation), e a partir da atividade total, obtivemos a porcentagem do hormônio marcado que fica adsorvido ao carvão.

B) Adsorção em talco

Em um tubo de ensaio contendo 2,4 ml de tampão veronal 0,025 M e 0,1 ml de plasma, colocamos uma alíquota (≈ 1 ul) do hormônio marcado. Após leve agitação, adicionamos 2 comprimidos (200 mg) de talco, agitando-se em "Vortex" até a completa dissolução dos mesmos.

Depois da centrifugação (2.000 rpm por 20 minutos a 4°C), o sobrenadante e o precipitado foram contados para a determinação porcentual do HCH-¹²⁵I na amostra. O hormônio marcado, sem componentes degradados e iodo radioativo livre, fica adsorvido ao talco.

C) Cromatoeletroforese

Para a análise eletroforética aplicou-se a uma fita de papel "Toyo 514", aproximadamente 10 ul de uma preparação iodada, contendo 2 ul de "plasma azul". A eletroforese foi desenvolvida em tampão veronal 0,05M, pH 8,6, empregando-se 2 mA por fita, a 300 V. O final da corrida foi determinada quando as proteínas sêricas (cor azul) se localizavam a uma distância aproximada de 5 cm da origem, o que correspondeu a um tempo médio de 60 minutos.

Terminada a corrida, secou-se a fita a 37°C ou a temperatura ambiente. A distribuição do iodo entre o HCH marcado, HCH marcado degradado e iodo livre, foi quantificado determinando-se as atividades dos seguintes segmentos da fita:

- C.1. da origem até 2,5 cm desta, que correspon
dia ao HCH-¹²⁵I puro;
- C.2. da origem até 5 cm desta, correspondendo
ã faixa de migração das proteínas séricas
coradas incluindo o HCH-¹²⁵I degradado;
- C.3. o restante da fita, que correspondia a zo
na de migração do iodeto livre.

3.3.4. Teste de imunoreatividade do HCH-¹²⁵I e seleção de condições ótimas para o ensaio

Incubamos o HCH-¹²⁵I em duas condições:

- HCH-¹²⁵I sem o anticorpo (solução controle);
- HCH-¹²⁵I com diluições adequadas de anticorpo (so
luções de traçadores), diluições essas planejadas
com o fim de obter uma razão (B/F) do hormônio marcado unido (B)
sobre o hormônio marcado livre (F), no intervalo de 0,8 a 1,2.

A partir do anticorpo diluído a 1:2.000 (solução es
toque) foram preparadas diluições de $1:1 \times 10^6$, $1:2 \times 10^6$ e $1:3 \times 10^6$,
com o diluente padrão. A quantidade de HCH-¹²⁵I adicionada foi a
suficiente para dar 1000 cpm por ml da solução final.

A série de soluções foi incubada a 4°C por 4-6 dias,
fazendo-se testes diários com amostras de 2,4 ml da solução contro
le e 2,4 ml de cada traçador. A cada amostra foi adicionada 0,1
ml de plasma e após leve agitação, 1 ml da suspensão de carvão.

Os tubos foram centrifugados a 2.000 rpm por 20 minu
tos a 4°C. Determinaram-se as atividades de cada sobrenadante (B)
e sedimento (F). A eventual degradação do hormônio é acusada no

sobrenadante da amostra da solução controle, o seu valor porcentual foi determinado a partir da soma das atividades (sobrenadante e sedimento)

O grau de ligação do hormônio marcado ao anticorpo foi avaliado através da razão B/F apresentado pelas soluções de traçadores. A menor diluição do anticorpo que apresentasse uma razão B/F em torno de 1, sem grande aumento da degradação do hormônio marcado, era a escolhida para ser usada no ensaio.

3.4. Técnica do radioimunoensaio

3.4.1. Preparo das amostras de plasmas

Os plasmas guardados a -15°C foram descongelados e a seguir centrifugados (4°C) para a retirada da fibrina.

O ensaio foi desenvolvido com o plasma diluído a 1:25, pipetando-se 100 μl de cada amostra, com a pipeta "Biopet" e ponteiros descartáveis "Biotip" (Schwarz/Mann). Para o controle da degradação do hormônio, de cada série de plasmas, separava-se uma alíquota (100 μl).

3.4.2. Curva padrão

Uma quantidade exatamente pesada de HCH padrão foi dissolvida em HCl 0,005 M, pH 2,3, a uma concentração de 1ug/ml (solução estoque). Desta solução 50 μl foram levados a 1 ml com diluente padrão (50 ug/ml). A partir desta nova solução foram feitas pipetagens dos padrões, em duplicata, conforme mostra o protocolo indicado na Tabela A. Levou-se o volume dos padrões pipetados a 100 μl , com diluente padrão.

TABELA A

PROTOCOLO DO ENSAIO DO HCH PLASMÁTICO

| TUBOS | CURVA PADRÃO | | DILUENTE PADRÃO | PLASMA | DILUENTE PADRÃO + HCH- ¹²⁵ I | DILUENTE PADRÃO + HCH- ¹²⁵ I + ANTICORPO |
|--------------------|--------------|------------|-----------------|--------|---|---|
| | PADRÃO *HCH | PADRÃO HCH | | | | |
| | uI | ng / ml | uI | uI | ml | ml |
| Traçador A | - | - | 100 | - | - | 2,4 |
| Traçador B | - | - | 100 | - | - | 2,4 |
| Traçador C | - | - | 100 | - | - | 2,4 |
| Traçador D | - | - | 100 | - | - | 2,4 |
| Controle do Padrão | - | - | 100 | - | 2,4 | - |
| Padrão n°1 | 1 | 0,02 | 99 | - | - | 2,4 |
| Padrão n°2 | 2 | 0,04 | 98 | - | - | 2,4 |
| Padrão n°3 | 3 | 0,06 | 97 | - | - | 2,4 |
| Padrão n°4 | 4 | 0,08 | 96 | - | - | 2,4 |
| Padrão n°5 | 5 | 0,10 | 95 | - | - | 2,4 |
| Padrão n°6 | 10 | 0,20 | 90 | - | - | 2,4 |
| Padrão n°7 | 15 | 0,30 | 85 | - | - | 2,4 |
| Padrão n°8 | 20 | 0,40 | 80 | - | - | 2,4 |
| Padrão n°9 | 30 | 0,60 | 70 | - | - | 2,4 |
| Padrão n°10 | 40 | 0,80 | 60 | - | - | 2,4 |
| Padrão n°11 | 50 | 1,0 | 50 | - | - | 2,4 |
| Padrão n°12 | 60 | 1,2 | 40 | - | - | 2,4 |
| Padrão n°13 | 70 | 1,4 | 30 | - | - | 2,4 |
| Padrão n°14 | 100 | 2,0 | - | - | - | 2,4 |
| Controle do plasma | - | - | - | 100 | 2,4 | - |
| Plasma | - | - | - | 100 | - | 2,4 |

* Padrão de HCH = solução de 50 ng/ml.

Quatro tubos (A, B, C, D) foram ainda preparados para avaliar a ligação do HCH-¹²⁵I ao anticorpo na ausência do HCH padrão e/ou plasma. No lugar destes, os tubos continham 100 μ l de diluentes padrão, e foram chamados de traçadores. A média das razões B/F dos traçadores, determinados no final do ensaio, foi considerada como o B/F inicial da curva padrão.

Mais dois tubos (E, F), contendo também 100 μ l de diluente padrão foram preparados para o controle da degradação do hormônio.

3.4.3. Sequência operacional do radioensaio do HCH plasmático.

Nos tubos controle (do HCH padrão e dos plasmas) foram colocados 2,4 ml de diluente padrão contendo HCH-¹²⁵I em uma quantidade suficiente para dar 1000 cpm por ml.

Posteriormente as estas pipetagens, adicionava-se ao restante do diluente, o anticorpo específico na diluição determinada pelos testes prévios (geralmente $1:2 \times 10^6$). Esta solução com o hormônio marcado e anticorpo foi chamada de solução de incubação.

Conforme é mostrado no protocolo da dosagem (Tabela A), todos os volumes foram levados a 2,5 ml e a ordem de adição dos 2,4 ml da solução de incubação aos tubos (exceto os de controle) foi a seguinte:

1. Traçador A
2. Números pares da série de padrões
3. Traçador B
4. Amostras de plasmas desconhecidos
5. Traçador C

6. Números ímpares da série de padrões

7. Traçador D

Depois de agitados, os tubos foram levados à incubação a 4°C.

Da mistura do diluente padrão contendo apenas o hormônio marcado, separamos 20 ml para o controle paralelo à dosagem (C.P.).

Posteriormente à adição do anticorpo, também 20ml foram reservados, para o estudo paralelo do comportamento do traçador na dosagem (T.P.).

3.4.4. Controle da degradação e da ligação do hormônio ao anticorpo, durante o período de incubação.

Retiramos, diariamente, alíquotas de 2,4 ml dos frascos "C.P." e "T.P.", desde o início até o final da incubação. A ca da alíquota foi adicionado 0,1 ml de plasma e 1 ml da suspensão de carvão (100 mg/ml).

Após a centrifugação nas condições já citadas, as atividades dos sobrenadantes e precipitados foram determinadas no contador de cintilação (de poço) para radiação gama, integrando-se pelo menos 10.000 impulsos.

3.4.5. Separação do hormônio marcado livre do hormônio ligado ao anticorpo.

De acordo com os valores acusados no procedimento do Item anterior, era determinado o momento do equilíbrio da reação

hormônio-anticorpo, e com isto a finalização da incubação.

Esta finalização estava condicionada ao alcance do valor de B/F (fornecido pela amostra do frasco T.P.) no intervalo de 0,8 a 1,2, dentro de uma faixa de degradação do hormônio (fornecida pela amostra do frasco C.P.) de até 15%. Isto era conseguido geralmente, entre 4-6 dias de incubação.

Aos tubos que não continham plasma, ou seja, aos traçadores e padrões, adicionamos 0,1 ml de plasma de banco de sangue.

Posteriormente, a todos os tubos foi adicionado 1 ml da suspensão de carvão. Depois da agitação em "Vortex", estes foram centrifugados a 2.000 rpm, por 20 minutos a 4°C.

Os sobrenadantes separados por decantação, bem como os sedimentos, foram contados em cintilador automático para radiação gama, por tempo médio de 10 minutos, ou o suficiente para o acúmulo de aproximadamente 10.000 impulsos.

3.4.6. Cálculo e correção dos resultados

As atividades dos sobrenadantes obtidos dos tubos controle (padrões e plasmas) representam a fração do hormônio marcado degradado durante a incubação, lembrando que estes tubos contêm somente o HCH-¹²⁵I sem o anticorpo. Esta mesma atividade aparecerá, logicamente, nos sobrenadantes dos demais tubos (traçadores e plasmas dosados), somando-se à atividade correspondente ao complexo formado. Desta maneira, na determinação da relação B/F, o valor porcentual da degradação do hormônio deve ser descontado, o que é feito com a seguinte operação:

$$B/F \text{ corrigido} = \frac{B - \{(B + F) \times D\}}{F}$$

onde: $D = \frac{\text{cpm do sobrenadante}}{\text{cpm total}}$ (tubos controle)

B = cpm do sobrenadante (traçadores, padrões e plasmas dosados)

F = cpm do precipitado

Colocando-se em ordenada o B/F corrigido contra as concentrações correspondentes do HCH padrão, obtemos os pontos para a construção da curva padrão. A concentração hormonal da amostra plasmática é calculada a partir desta curva, multiplicando-se a concentração lida por 25 (fator de diluição).

3.5. Análise estatística

3.5.1. Especificidade

Para a verificação da reatividade semelhante do hormônio plasmático e o hormônio padrão, a mistura plasmática P.A. foi diluída conforme a Tabela B.

TABELA B

| TUBOS nº | PLASMA u1 | VERONAL ALBUMINA u1 | DILUIÇÃO FINAL u1 |
|-------------|--------------|------------------------|----------------------|
| 1 e 2 | 10 | 90 | 1:250 |
| 3 e 4 | 30 | 70 | 1:83 |
| 5 e 6 | 50 | 50 | 1:50 |
| 7 e 8 | 70 | 30 | 1:35 |
| 9 e 10 | 90 | 10 | 1:27 |

O volume dos tubos foi levado a 2,5 ml com a mistura de incubação (HCH-¹²⁵I mais anticorpo). Posteriormente foram leva dos à geladeira (4°C) para incubar por 4-6 dias.

3.5.2. Sensibilidade

A sensibilidade do método foi avaliada através de de clive de uma curva padrão (curva dose-resposta). Esta foi con-struída com concentrações de HCH padrão que variaram no intervalo de 0,1 a 2 ng/ml. A diluição de $1:2 \times 10^6$ do anticorpo foi a que, em geral, mostrou a melhor interação com o hormônio, e empregada no ensaio.

O protocolo da dosagem está esquematizado na Tabela A.

3.5.3. Precisão

Da mistura de plasmas P.B., guardada a -15°C, pipeta mos 20 amostras de 0,1 ml para a quantificação do HCH e o estudo da reprodutibilidade intra ensaio.

Em 20 ensaios diferentes, determinamos a quantidade de HCH em 0,1 ml da mesma mistura de plasmas, para a verificação da reprodutibilidade inter-ensaios.

3.5.4. Exatidão

A exatidão da técnica empregada foi avaliada através de 10 determinações, pela adição de quantidades crescentes da mis-tura P.A. de plasmas, a 50 ul de uma solução com HCH de teor co-nhecido (C).

Paralelamente, foi dosada 0,1 ml da mesma mistura de

plasma P.A., para a quantificação do HCH neste volume, e determinação da concentração teórica das diluições.

A recuperação do hormônio foi determinada de acordo com o esquema da Tabela C.

TABELA C

| TUBOS | SOLUÇÃO C u1 | PLASMA P.A. u1 | VERONAL ALBUMINA u1 | RESULTADOS | |
|--------|-----------------|-------------------|---------------------------|------------|-----------|
| | | | | TEÓRICO | OBSERVADO |
| 1 e 2 | 50 | 10 | 40 | 1/10 M | Obt - C |
| 3 e 4 | 50 | 20 | 30 | 2/10 M | Obt - C |
| 5 e 6 | 50 | 30 | 20 | 3/10 M | Obt - C |
| 7 e 8 | 50 | 40 | 10 | 4/10 M | Obt - C |
| 9 e 10 | 50 | 50 | 0 | 5/10 M | Obt - C |

M - 100 u1 de plasma P.A.

Obt - obtido para cada tubo.

4. RESULTADOS

Damos abaixo uma série de Tabelas e Figuras demonstrativas dos resultados obtidos em diferentes fases do nosso trabalho. Em função da clareza, algumas indicações foram concentradas em ca da uma delas, visando a maior facilidade de sua leitura.

TABELA I

CONTROLE DO RENDIMENTO DA MARCAÇÃO DO HCH-¹²⁵I

| DATA | ATIVIDADE ESPECÍFICA mCi/mg | RENDIMENTO PORCENTUAL DA MARCAÇÃO % |
|----------|--------------------------------|--|
| 10/12/70 | 96 | 83 |
| 15/02/71 | 100 | 67 |
| 07/05/71 | 47 | 64 |
| 13/09/71 | 92 | 74 |
| 04/10/71 | 88 | 73 |
| 17/01/72 | 80 | 79 |
| 27/01/72 | 82 | 68 |
| 10/05/72 | 78 | 62 |
| 20/02/72 | 96 | 72 |

Indicações do HCH efetuadas com a.e. altas (100 mCi/mg) e baixas (47 mCi/mg) mostraram grande eficiência nas marcações. O rendimento médio foi de 71%.

TABELA II

CONTROLE DA PUREZA DAS FRAÇÕES DE HCH-¹²⁵I
 INTEGRO SEPARADAS POR ADSORÇÃO EM CELULOSE

| ELUENTE | ELUATOS RECOLHIDOS (c.p.m.) | | | DISTRIBUIÇÃO DOS VALORES PORCEN TUAIS DE PUREZA NOS ELUATOS | | | |
|----------------------------------|--------------------------------|---------|---------|--|----|----|-----|
| | | I | II | III | I | II | III |
| Tampão Veronal | 1 | 534.223 | 194.202 | 347.790 | - | - | - |
| | 2 | 11.430 | 3.961 | 22.340 | - | - | - |
| | 3 | 5.185 | 1.648 | 3.247 | - | - | - |
| Acetona- Veronal- Albumina | 4 | 23.952 | 2.140 | 10.782 | 96 | 72 | 92 |
| | 5 | 31.532 | 3.565 | 9.472 | 97 | 77 | 90 |
| | 6 | 10.427 | 16.170 | 8.840 | 90 | 84 | 85 |
| | 7 | 7.709 | 9.709 | 5.234 | 88 | 80 | 78 |
| | 8 | 7.291 | 6.579 | 4.941 | 88 | 78 | 70 |

Partidas de HCH (I, II e III) foram purificadas em colu
 na de celulose, logo após a iodação. A alta atividade da primeira
 fração eluída acusa a eliminação do iodo não reagente e frações de
 gradadas. A partir da fração 4, os eluatos mostram um conteúdo
 porcentual alto de HCH-¹²⁵I, porém heterogêneos.

AUTORADIOGRAFIA DO H.C.H. —¹²⁵I
PURIFICADO POR ELETROFORESE EM
GEL DE AMIDO.

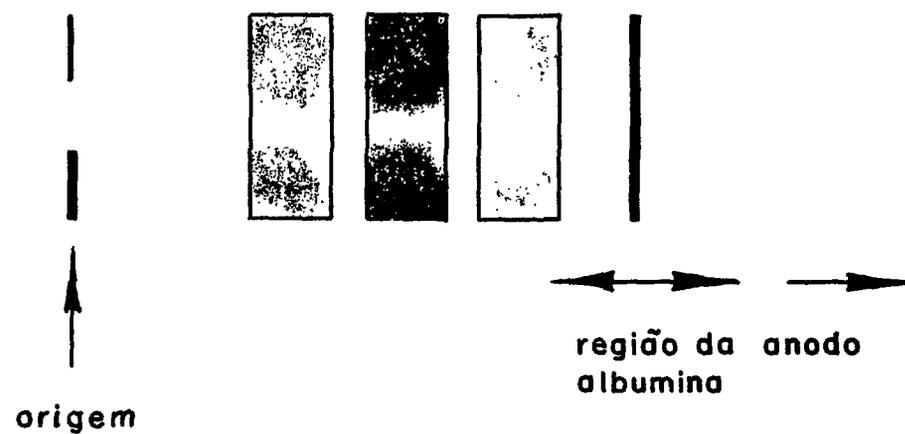


FIGURA 3 - Hormônio aplicado ao gel de amido imediatamente após a iodação. A zona do gel correspondente ao hormônio purificado foi dividida em 3 segmentos, para a separação do HCH-¹²⁵I de acordo com o grau de iodação. A recuperação do hormônio marcado do gel foi cerca de 60%.

TABELA III

CONTROLE DAS FRAÇÕES DE $\text{HCH-}^{125}\text{I}$ PURO SEPARADAS POR
ELETROFORESE EM GEL DE AMIDO E POSTERIOR CROMATOGRAFIA
EM COLUNA DE EXCLUSÃO MOLECULAR (SEPHADEX)

| PARTIDAS | DISTRIBUIÇÃO DOS VALORES PORCENTUAIS DE PUREZA NAS DIFERENTES FRAÇÕES ELUÍDAS | |
|----------|--|----------------------------------|
| | PURIFICAÇÃO EM GEL DE AMIDO | REPURIFICAÇÃO EM GEL SEPHADEX |
| 1/71 | a) 86 b) 87 c) 85 | 92 93 90 |
| 3/71 | a) 90 b) 90 c) 87 | 95 97 96 |
| 2/72 | a) 85 b) 91 c) 90 | 94 94 95 |

O quadro expressa o grau de pureza do $\text{HCH-}^{125}\text{I}$ separado por eletroforese em gel de amido (frações a, b, c). No sentido de obter-se hormônio mais imunorreativo, as frações hormonais foram repurificadas em gel Sephadex G-75.

CROMATOGRAMA DA FILTRAÇÃO EM GEL SEPHADEX G-75
DO HCH - ^{125}I

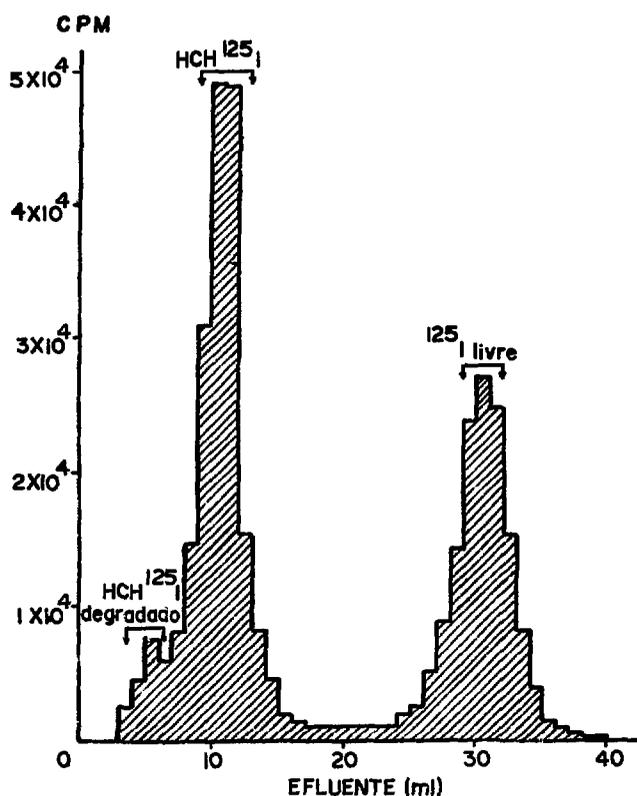


Figura 4 - Purificação do hormônio marcado logo após a iodação. Após a eluição do hormônio degradado (1º pico), separam-se as frações correspondentes ao HCH- ^{125}I puro, com o pico máximo em geral no tubo nº 10 (2º pico). O iodo livre é acusado nos efluentes bastantes posteriores ao do hormônio íntegro.

TABELA IV

CONTROLE DAS FRAÇÕES DE HCH-¹²⁵I PURO SEPARADAS
 POR ELUIÇÃO EM COLUNA DE GEL SEPHADEX G-75

| PARTIDAS | DISTRIBUIÇÃO DOS VALORES PORCENTUAIS DE PUREZA NOS ELUATOS | | |
|----------|---|----|-----|
| | I | II | III |
| 2/71 | 95 | 96 | 96 |
| 4/71 | 94 | 96 | 93 |
| 1/72 | 90 | 93 | 92 |
| 2/72 | 92 | 94 | 94 |
| 3/72 | 96 | 95 | 95 |

O HCH submetido a iodação foi purificado, logo a seguir, em gel Sephadex G-75. A Tabela reúne os valores altos e homogêneos dos eluatos (I, II, III) de 1 ml.

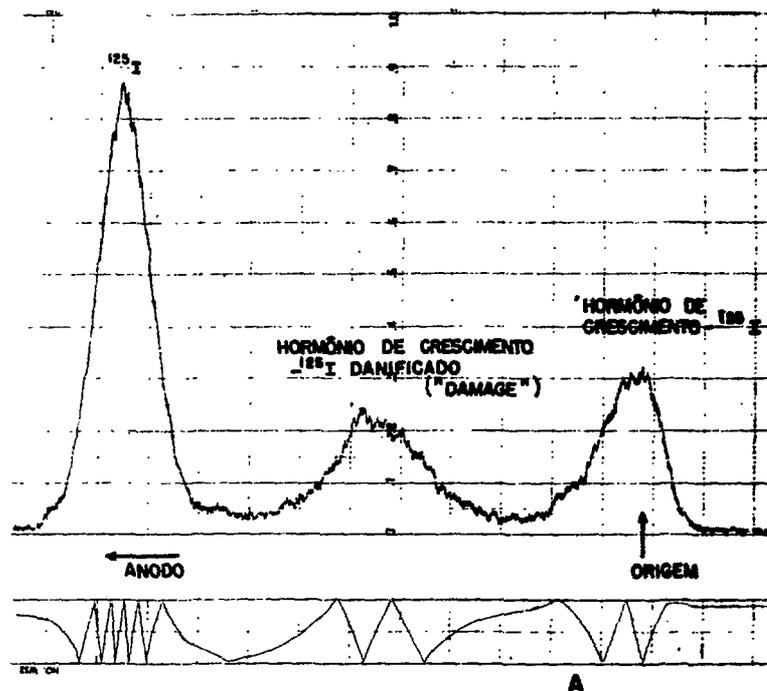
TABELA V

COMPARAÇÃO ENTRE A CROMATOELETROFORESE, ADSORÇÃO EM CARVÃO E ADSORÇÃO EM TALCO, NA IDENTIFICAÇÃO DOS ELEMENTOS FORMADOS NA IODAÇÃO DO HCH 3/72

| TÉCNICA | DISTRIBUIÇÃO PORCENTUAL DAS ATIVIDADES | | |
|---------------------|--|------------------------------------|------------------------|
| | HCH- ¹²⁵ I Íntegro | HCH- ¹²⁵ I degradado | ¹²⁵ I livre |
| Cromatoeletroforese | 61 | 6 | 33 |
| Adsorção em carvão | 62 | 38 | |
| Adsorção em talco | 58 | 42 | |

As 3 técnicas comparadas mostram que apenas a cromatoeletroforese fornece distintamente os valores percentuais das frações degradadas e do ¹²⁵I livre. O resultado obtido com o carvão, quanto ao teor de HCH-¹²⁵I, se aproximou bastante da cromatoeletroforese.

REPRESENTAÇÃO GRÁFICA LINEAR DA VARREDURA DA FITA
DE PAPEL NO CONTROLE DO HCH-¹²⁵I POR CROMATO -
ELETROFORESE



- FIGURA 5 - A varredura de uma fita por um detector gama acoplado a um registrador, permitiu a identificação de 3 picos, correspondentes a:
- Um pico na origem constituído de HCH-¹²⁵I puro que fica adsorvido ao papel no local da aplicação;
 - Um pico central representando os componentes hormonais degradados ligados às proteínas séricas ou migrando com elas por causa da perda da capacidade de adsorção à celulose do papel;
 - Um pico final correspondendo ao todo radioativo livre.

PICOS DE ATIVIDADES DO CROMATOGRAMA
OBTIDO NO CONTROLE DO HCH-¹²⁵I POR ELETRO-
FORESE EM PAPEL

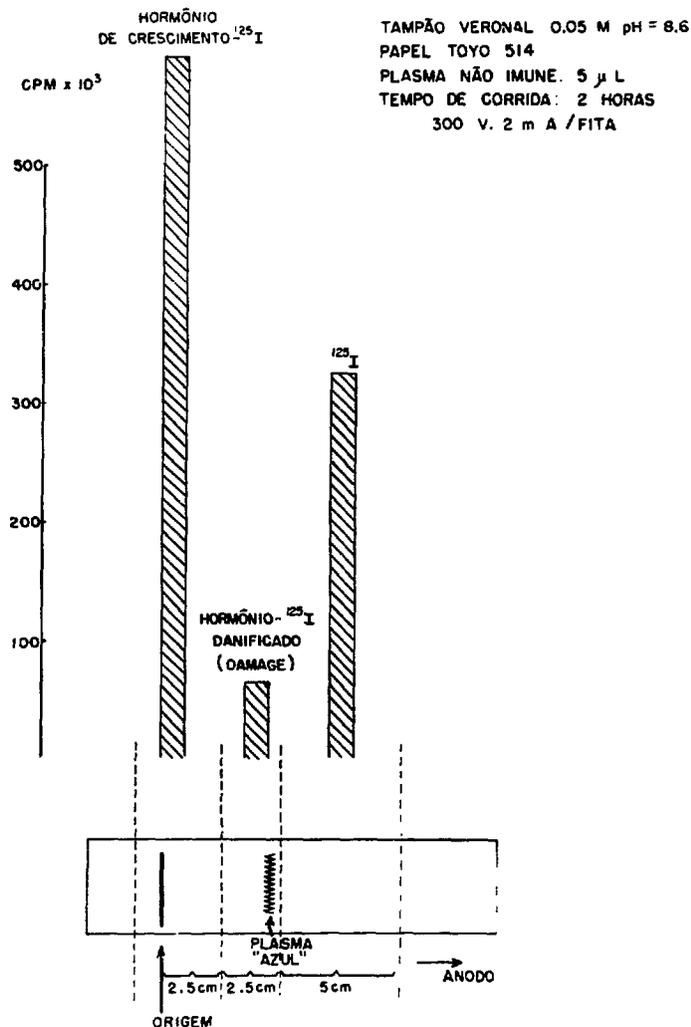


FIGURA 6 - HCH marcado com ¹²⁵I, e logo após a iodação submetido a cromatoeletroforese. Terminada a corrida, quantificou-se a distribuição do iodo entre o HCH marcado, HCH marcado degradado e iodo livre, cortando-se a fita como mostra o esquema.

TABELA VI

COMPARAÇÃO DA IMUNORREATIVIDADE DO HCH-¹²⁵I PURIFICADO
EM COLUNA DE CELULOSE E GEL SEPHADEX G-75

| PARTIDA DE HCH- ¹²⁵ I | PERÍODO DE INCUBAÇÃO | DILUIÇÃO DO ANTICORPO | HCH- ¹²⁵ I PURIFICADO EM CELULOSE B/F | HCH- ¹²⁵ I PURIFICADO EM GEL SEPHADEX G-75 B/F |
|-------------------------------------|----------------------------|-----------------------------|---|--|
| 12/70 | 3 dias | 1:2000000 | 0,35 | 0,46 |
| 12/70 | 5 dias | 1:4000000 | 0,53 | 0,76 |
| 2/71 | 3 dias | 1:2000000 | 0,46 | 0,67 |
| 2/71 | 5 dias | 1:4000000 | 0,68 | 0,77 |
| 1/72 | 3 dias | 1:2000000 | 0,81 | 0,92 |
| 1/72 | 5 dias | 1:4000000 | 0,80 | 1,01 |

Partidas de HCH-¹²⁵I submetidas a técnicas diferentes de purificação, acusaram valores de razão B/F ligeiramente mais altos, quando separados por cromatografia em gel Sephadex G-75.

TABELA VII

VALORES DAS RAZÕES B/F OBTIDOS COM O HCH-¹²⁵I
 PURIFICADO POR ELETROFORESE EM GEL DE AMIDO
 E POSTERIOR REPURIFICAÇÃO EM GEL SEPHADEX

| PARTIDAS | HCH- ¹²⁵ I PURIFICADO EM GEL DE AMIDO | HCH- ¹²⁵ I REPURIFICADO EM GEL SEPHADEX |
|----------|---|---|
| | B/F | B/F |
| 1/71 | 0,51 | 0,72 |
| 2/71 | 0,64 | 0,80 |
| 3/71 | 0,42 | 0,53 |
| 2/72 | 0,31 | 0,49 |
| 3/72 | 0,68 | 0,71 |

Esta Tabela reúne as razões B/F obtidas após 1 dia de incubação do hormônio com o anticorpo diluído a 1:1x10⁶. Verificamos a elevação dos valores com a repurificação do hormônio.

TABELA VIII

DETERMINAÇÃO DA DILUIÇÃO ADEQUADA DO ANTICORPO PARA
O INTERVALO DE INCUBAÇÃO E CONTROLE DE DEGRADAÇÃO DO HCH-125_I

| PERÍODO DE INCUBAÇÃO (dias) | DEGRADAÇÃO PERCENTUAL DO HCH-125 _I | TÍTULO DA DILUIÇÃO DO ANTICORPO | HCH-125 _I + ANTICORPO RAZÃO B/F |
|-----------------------------|---|---|--|
| 1 | 7 | 1:1 x 10 ⁶ 1:2 x 10 ⁶ 1:3 x 10 ⁶ | 0,63 0,37 0,18 |
| 2 | 9 | 1:1 x 10 ⁶ 1:2 x 10 ⁶ 1:3 x 10 ⁶ | 1,24 0,69 0,26 |
| 3 | 9 | 1:1 x 10 ⁶ 1:2 x 10 ⁶ 1:3 x 10 ⁶ | 1,40 0,85 0,43 |
| 4 | 10 | 1:1 x 10 ⁶ 1:2 x 10 ⁶ 1:3 x 10 ⁶ | 1,57 1,00 0,60 |
| 5 | 11 | 1:1 x 10 ⁶ 1:2 x 10 ⁶ 1:3 x 10 ⁶ | 1,57 1,17 0,70 |
| 6 | 11 | 1:1 x 10 ⁶ 1:2 x 10 ⁶ 1:3 x 10 ⁶ | 1,42 1,33* 0,78 |

Vemos relacionadas as razões B/F e a degradação percentual de HCH, em cada um dos dias de incubação do hormônio com diferentes diluições do anticorpo.

O asterístico identifica a diluição ideal (no caso 1:2x10⁶), caracterizada pelo valor B/F e dentro de uma faixa de degradação percentual aceitável.

TABELA IX

VALORES DE RAZÕES B/F NAS DILUIÇÕES DO ANTICORPO
SELECIONADAS PARA DIFERENTES ENSAIOS

| TÍTULO DA DILUIÇÃO DO ANTICORPO | DEGRADAÇÃO DO HCH- ¹²⁵ I % | B/F | TEMPO DE INCUBAÇÃO |
|---------------------------------|---------------------------------------|------|--------------------|
| 1: 2.000.000 | 11% | 1,17 | 5 |
| 1: 2.000.000 | 11% | 1,06 | 5 |
| 1: 2.500.000 | 12% | 1,33 | 6 |
| 1: 2.000.000 | 10% | 1,21 | 6 |
| 1: 2.000.000 | 9% | 1,08 | 6 |
| 1: 2.500.000 | 10% | 1,19 | 6 |
| 1: 2.000.000 | 11% | 1,00 | 6 |
| 1: 2.000.000 | 10% | 0,98 | 6 |
| 1: 2.000.000 | 9% | 1,23 | 6 |

Nesta Tabela acham-se reunidos os níveis máximos de de gradação, bem como as razões B/F, nas diluições do anticorpo sele cionadas para os ensaios.

TABELA X

ESTUDO DOS NÍVEIS DE DEGRADAÇÃO DO HCH-¹²⁵I E DA RAZÃO B/F DURANTE
5 DIAS DE INCUBAÇÃO NA DOSAGEM DO HCH EM PLASMA HUMANO

| PERÍODO DE INCUBAÇÃO (dias) | PORCENTAGEM DE DEGRADAÇÃO | HCH- ¹²⁵ I + ANTICORPO RAZÃO B/F |
|--------------------------------|---------------------------------|--|
| 1 | 9 | 0,43 |
| 2 | 9 | 0,66 |
| 3 | 10 | 0,81 |
| 4 | 10 | 0,89 |
| 5 | 10 | 0,98 |
| 6 | 10 | 1,08 |
| 1 | 11 | 0,36 |
| 2 | 11 | 0,45 |
| 3 | 11 | 0,75 |
| 4 | 11 | 0,80 |
| 5 | 12 | 0,97 |
| 6 | 12 | 1,05 |
| 1 | 10 | 0,20 |
| 2 | 10 | 0,42 |
| 3 | 11 | 0,55 |
| 4 | 11 | 0,84 |
| 5 | 11 | 1,01 |
| 6 | 12 | 1,10 |
| 1 | 8 | 0,40 |
| 2 | 8 | 0,69 |
| 3 | 9 | 0,98 |
| 4 | 9 | 1,01 |
| 5 | 10 | 1,07 |
| 6 | 10 | 1,15 |

A Tabela registra, em 4 dosagens do HCH plasmático, a de
gradação porcentual do hormônio e a relação B/F (traçador), em ca
da um dos dias de incubação.

TABELA XI

CURVA PADRÃO PARA VALORES DE HCH COMPREENDIDOS
ENTRE 0,01 a 2,0 ng/ml ESTIMADOS COM HCH-¹²⁵I 2/72

| TUBOS | CONCENTRAÇÃO ng/ml | RAZÃO B/F | | |
|---|-----------------------|-----------|----------|-------|
| | | 1ª SÉRIE | 2ª SÉRIE | MÉDIA |
| A | - | 1,05 | 1,04 | 1,03 |
| B | - | 1,08 | 1,08 | 1,08 |
| C | - | 1,13 | 1,07 | 1,10 |
| D | - | 1,12 | 1,10 | 1,11 |
| 1 | 0,02 | 1,06 | 1,00 | 1,03 |
| 2 | 0,04 | 1,02 | 0,96 | 0,99 |
| 3 | 0,06 | 0,98 | 0,92 | 0,95 |
| 4 | 0,08 | 0,91 | 0,89 | 0,90 |
| 5 | 0,10 | 0,88 | 0,84 | 0,86 |
| 6 | 0,20 | 0,72 | 0,70 | 0,71 |
| 7 | 0,30 | 0,60 | 0,56 | 0,58 |
| 8 | 0,40 | 0,52 | 0,48 | 0,50 |
| 9 | 0,60 | 0,37 | 0,35 | 0,36 |
| 10 | 0,80 | 0,33 | 0,31 | 0,32 |
| 11 | 1,00 | 0,26 | 0,26 | 0,26 |
| 12 | 1,2 | 0,24 | 0,22 | 0,23 |
| 13 | 1,4 | 0,23 | 0,15 | 0,19 |
| 14 | 2,0 | 0,17 | 0,13 | 0,15 |
| CONTROLE PORCENTUAL DA FRAÇÃO DEGRADADA | | | | |
| E | - | 10 | 10 | 10 |
| F | - | 9 | 10 | 9,5 |

Os valores médios das razões B/F e as massas correspondentes de HCH padrão, lançados no gráfico linear, determinaram os pontos para a construção de uma curva padrão. Os traçadores (A, B, C, D) estabelecem o ponto inicial da curva (massa = 0).

TABELA XII

CONTROLE DA ESPECIFICIDADE DA TÉCNICA DOSANDO-SE MISTURA
PLASMÁTICA COM ALTO TEOR DE HCH A DIFERENTES DILUIÇÕES

| FATOR DE DILUIÇÃO | CONCENTRAÇÃO DE HCH NO PLASMA DILUIDO ng / ml | CONCENTRAÇÃO DE HCH NO PLASMA NÃO DILUIDO ng / ml |
|-------------------|--|--|
| 1:250 | 0,20 | 50,00 |
| 1:83 | 0,63 | 52,29 |
| 1:50 | 1,04 | 52,00 |
| 1:35 | 1,40 | 49,00 |
| 1:27 | 1,90 | 51,30 |
| 1:25 | 1,98 | 49,50 |
| $r = 0,998$ | | $\bar{X} = 50,92$ |

A Tabela reúne as concentrações obtidas em 5 diferentes diluições do plasma. Verificamos que a concentração medida do hormônio, multiplicada pelo fator de diluição, permaneceu constante. O coeficiente de correlação foi de 0,998.

EFEITO DA DILUIÇÃO DO PLASMA SOBRE A CONCENTRAÇÃO HORMONAL ENDÓGENA MEDIDA

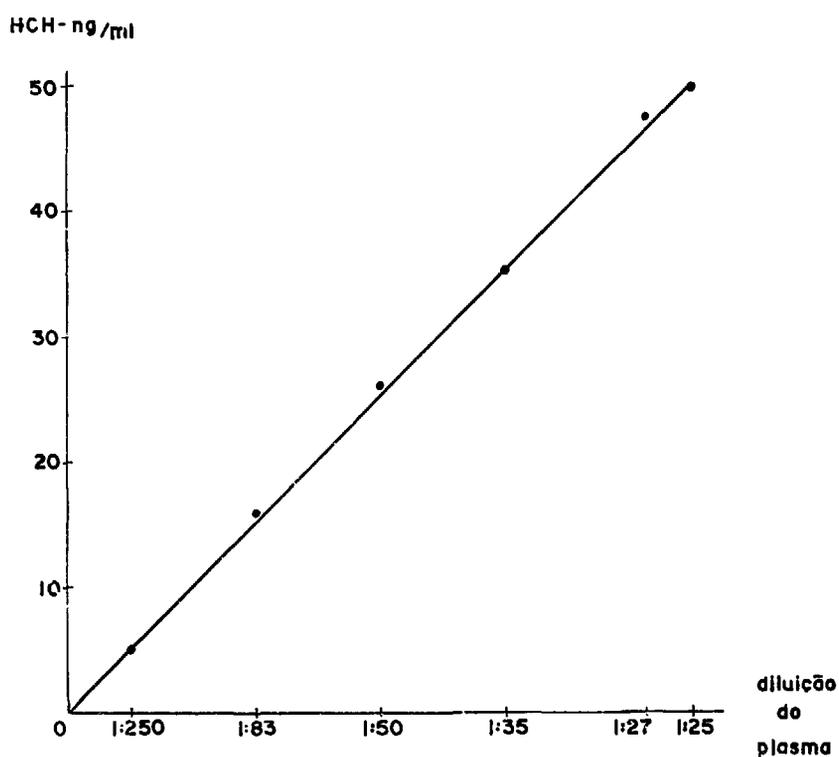


FIGURA 7 - Plasma contendo alto teor de HCH foi dosado a diferentes diluições. As concentrações hormonais dos plasmas diluídos foram determinadas em relação a curva padrão e verificou-se que correspondeu linearmente com o fator de diluição. O coeficiente de correlação foi de 0.998.

EFEITO DA DILUIÇÃO DO PLASMA COMPARADO À CURVA - PADRÃO

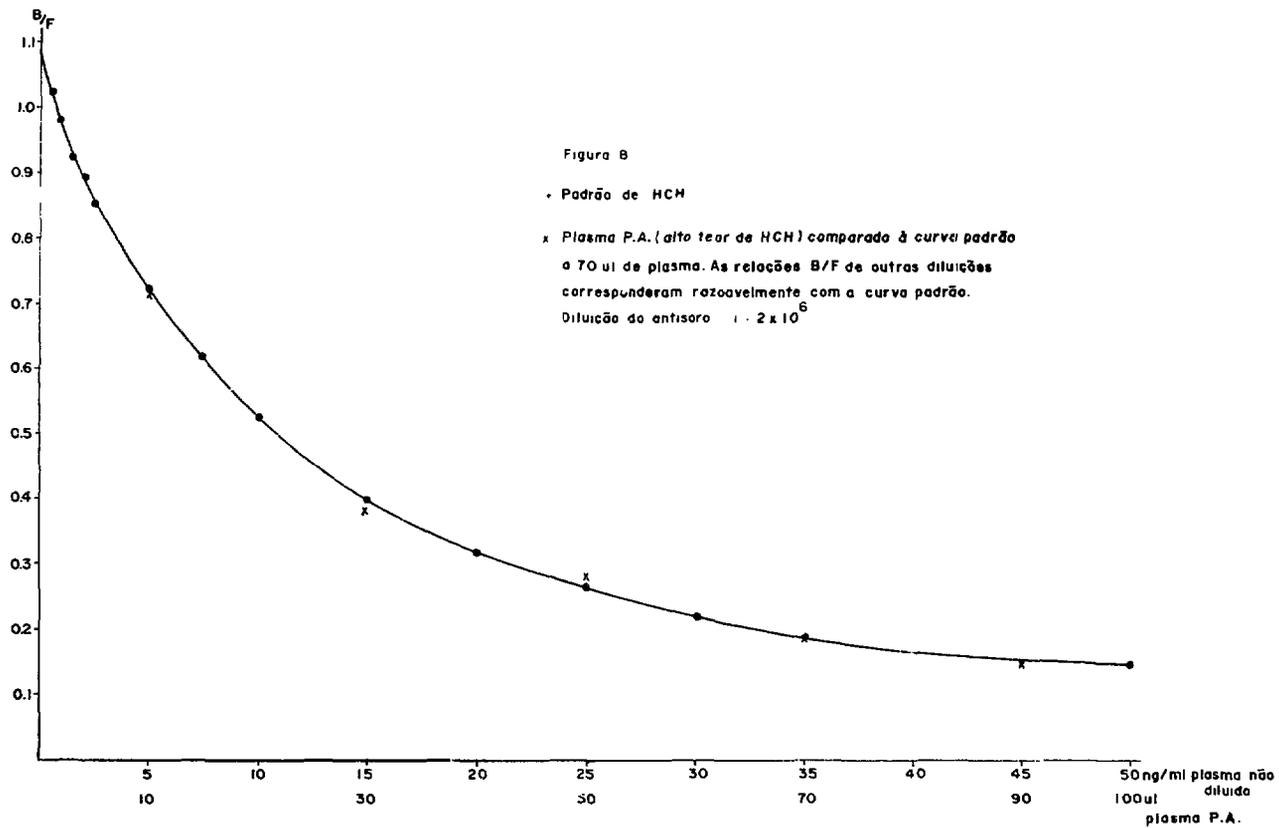


TABELA XIII

ANÁLISE DA REPRODUTIBILIDADE DE 20 DETERMINAÇÕES E 20 ENSAIOS
DE HCH, EFETUADAS EM PLASMA COM CONCENTRAÇÃO ELEVADA DE HCH

| REPRODUTIBILIDADE INTRA - ENSAIO (20 amostras) ng/ml | REPRODUTIBILIDADE INTER - ENSAIO (20 ensaios) ng/ml |
|--|--|
| 13,20 | 13,40 |
| 13,40 | 13,20 |
| 12,50 | 11,00 |
| 12,75 | 13,00 |
| 13,60 | 12,50 |
| 13,00 | 12,75 |
| 12,00 | 11,75 |
| 12,75 | 13,75 |
| 13,60 | 12,25 |
| 12,25 | 12,50 |
| 12,25 | 13,60 |
| 12,00 | 13,40 |
| 13,60 | 13,00 |
| 12,40 | 14,00 |
| 12,25 | 12,00 |
| 14,00 | 13,20 |
| 12,25 | 12,40 |
| 13,20 | 13,10 |
| 13,20 | 13,75 |
| 13,10 | 12,00 |
| $\bar{X} = 12,85$ $s = 0,602$ c.V. = 4,6% I.C. = $12,85 \pm 1,25$ | $\bar{X} = 12,82$ $s = 0,772$ c.V. = 6% I.C. = $12,82 \pm 1,61$ |

Resultados numéricos individuais de 40 amostras de um mesmo plasma, ensaiados em condições habituais (inter-ensaio) e condições ideais de trabalho (intra-ensaio). Calculou-se a média, o desvio-padrão, o coeficiente de variação e o intervalo de confiança desses resultados.

TABELA XIV

PROVAS DE RECUPERAÇÃO ADICIONANDO QUANTIDADES CRESCENTES DE PLASMA
A UMA SOLUÇÃO COM CONCENTRAÇÃO DE HCH CONSTANTE E CONHECIDA

| TUBOS | CONCENTRAÇÃO DE C (50 μ l) ng / ml | RESULTADOS | | | |
|-------|---|---------------------------|----------------------------|--|---------------------------|
| | | VALOR TEÓRICO ng/ml | VALOR OBTIDO ng / ml | VALOR OBTIDO CALCULADO (Obt - C) ng / ml | RECUPERAÇÃO PORCENTUAL |
| 1 | 6,25 | 4,95 | 9,75 | 3,50 | 70,70 |
| 2 | 6,25 | 4,95 | 10,25 | 4,00 | 80,80 |
| 3 | 6,25 | 9,90 | 16,10 | 9,85 | 99,50 |
| 4 | 6,25 | 9,90 | 16,50 | 10,25 | 103,53 |
| 5 | 6,25 | 14,85 | 20,00 | 13,75 | 92,60 |
| 6 | 6,25 | 14,85 | 19,00 | 12,75 | 85,85 |
| 7 | 6,25 | 18,80 | 25,25 | 19,00 | 95,95 |
| 8 | 6,25 | 18,80 | 22,80 | 16,55 | 83,60 |
| 9 | 6,25 | 24,75 | 28,20 | 22,00 | 88,90 |
| 10 | 6,25 | 24,75 | 30,00 | 23,75 | 95,95 |

Os resultados das provas de recuperação em diferentes -
quantidades de plasma dosado, mostraram valores percentuais que
variaram de 70,7 a 103,5%. O coeficiente de correlação (r) en-
tre os valores teóricos e obtidos foi de 0,989. ($\alpha = 0,05$).

5. DISCUSSÃO

Passaremos a discutir os resultados obtidos nas diferentes fases de nossa experiência, procurando justificar nosso procedimento com relação a outras possibilidades disponíveis, ao mesmo tempo que registramos as observações feitas durante as várias etapas.

*A radioiodação pelo método da cloramina T de Hunter e Greenwood (1962) tem sido de emprego mais corrente para a substituição do iodo na molécula proteica. Uma característica do método é a reação realizada em um pequeno volume, com reagentes a uma relativamente alta concentração. O procedimento, em nosso caso, foi bastante simplificado pelo uso de micropipetas descartáveis que, utilizadas para adicionar, misturar e transferir reagentes, permitiu uma mais rápida e simples execução. Como decorrência, pudemos obter valores de rendimento bastante altos, conforme foi demonstrado na Tabela indicativa das marcações do HCH com ^{125}I .

*Para a purificação do hormônio, pré-condição de extrema importância para a obtenção do hormônio marcado íntegro, livre de resíduos degradados e iodo não reagente, tínhamos três diferentes métodos à disposição:

O método da coluna de celulose, utilizado por nós a princípio, por sua rapidez e simplicidade, logo foi abandonado, ao observarmos que era obtida uma preparação de reduzida imunorreatividade frente

ao hormônio purificado por outros métodos.

Passamos pois à separação por eletroforese em gel de amido que, embora mais trabalhosa que a anterior, permitia a elucidação de certas características do hormônio marcado, impossíveis de se obter com outras técnicas de purificação. Além disso, trazia como vantagem a possibilidade de seleção de HCH^{125}I de acordo com o seu conteúdo de iodo por molécula.

A substituição do iodo diminui o pK dos fenoxi grupos dos resíduos tirosil. Em pH 8,6, as moléculas contendo resíduos diiodotirosil adquirem uma carga negativa extra à molécula e assim caminham mais rapidamente em direção ao anodo (Yalow e Berson, 1966). Nestas condições, uma intensa substituição de iodo aumenta a mobilidade eletroforética do hormônio marcado e assim, nos permite selecionar moléculas de HCH^{125}I que não tenham sido intensamente marcadas, as quais são indesejáveis ao radioimunoensaio, visto que apresentam uma imunorreatividade diminuída. (Berson e Yalow, 1968).

Embora manchas individuais não sejam claramente separadas, na autorradiografia do hormônio marcado purificado por gel de amido, presumivelmente aquela mais próxima ao cátodo, ou seja da fenda de aplicação do hormônio, contém resíduos predominantemente monoiodotirosil; a mancha mais próxima do anodo, presumivelmente, corresponde ao HCH iodado com resíduos diiodotirosil (Yalow e Berson, 1969a). De acordo ainda com Yalow e Berson (1966a), a níveis muito baixos de iodação do HCH (por exemplo, 0,05 átomos de I/mol) quase todo o iodo está localizado na primeira mancha (mais próxima ao cátodo). Entretanto, para uma média de 1 átomo de I/mol, o ideal para o nosso caso, mais do que a metade do radioiodo está presente nas outras manchas. Deste modo, quando se faz a seleção do hormônio marcado a partir da eletroforese em gel de amido, é aconselhável não escolher as regiões muito próximas ao anodo e ao cátodo, pois as frações mais lentas incluirão moléculas de HCH não marcadas, resultando num produto com a.e. menor que a desejada, e as mais rápidas moléculas mais intensamente iodadas, ainda que estas sejam de a.e. alta, porém de menor imunorreatividade, confor

me já mencionado. O ideal será, portanto, o segmento imediatamente à frente da mancha mais lenta (que chamamos de "b" na Tabela III), onde presumivelmente teremos hormônio marcado com um átomo de I/mol, condição requerida para uma boa sensibilidade do ensaio.

A terceira técnica de purificação - filtração em gel Sephadex G-75-permitiu a separação do hormônio íntegro dos componentes degradados e do I livre. O Sephadex G-75 é ideal quando se considera sua eficiência na filtração de moléculas de proporções semelhantes às do HCH e a boa resolução que dá na separação dos 3 elementos que se formam após a iodação (Figura 4). Seu ponto fraco, no entanto, é não permitir a seleção de moléculas de HCH mais ou menos iodadas. Por esta razão foi por nós adotada a técnica anteriormente descrita, em fase anterior à filtração no Sephadex.

De qualquer modo, a utilização deste gel foi indispensável para que obtivéssemos uma preparação livre de componentes degradados que, na maioria das vezes, são formados no próprio momento da recuperação do HCH-¹²⁵I do gel de amido.

* Os testes de pureza são efetuados para a detecção de eventuais componentes degradados junto com o HCH-¹²⁵I. A separação desses componentes não termina com a purificação da preparação iodada, pois o hormônio marcado purificado pode vir a sofrer uma degradação subsequente aos processos de purificação, durante a incubação com o plasma a ser dosado. Parte da "degradação de incubação" é devido à ação de enzimas plasmáticos e outros fatores que estão, de alguma maneira, sob o controle do experimentador. Entretanto, alguma degradação ainda pode ocorrer espontaneamente, como consequência da irradiação, da iodação excessiva e da oxidação da proteína (Yalow e Berson, 1969a).

Em nosso caso, o controle da presença desses produtos de degradação foi possível através de três técnicas, que exploram todas a adsorção do HCH-¹²⁵I íntegro (Palmieri e col., 1970): carvão, talco e cromatoeletroforese em papel. Assim, a partir das atividades dos adsorventes, deduzimos a quantidade porcentual do

hormônio puro existente na amostra. Com isto, asseguramos o uso de $\text{HCH-}^{125}\text{I}$ com pureza superior a 90%.

No procedimento eletroforético é mostrado que quando se semeia a uma fita de papel uma alíquota do material marcado (ao qual se juntou um pouco de plasma corado), o $\text{HCH-}^{125}\text{I}$ permanece no local da aplicação (origem) enquanto que a fração hormonal degradada e ^{125}I livre migram com as proteínas séricas (Figuras 5 e 6).

A Tabela V mostra os resultados obtidos pela aplicação das três técnicas citadas numa mesma amostra obtida logo após a iodação do hormônio. Por ela podemos observar resultados bastante aproximados dos três processos, na indicação do teor de elementos degradados. Os índices de ^{125}I livre só puderam ser indicados quando se tratou da técnica da cromatoeletroforese, a única das 3 apta a discriminá-lo.

*As várias frações hormonais resultantes do sistema de purificação foram ainda, para uma maior certeza dos resultados finais, submetidos a um teste prévio de incubação com o anticorpo, para a verificação de sua imunorreatividade.

A Tabela VI retrata os índices de imunorreatividade verificados com diferentes frações, obtidos em diferentes prazos de incubação. Comparativamente, as frações purificadas em Sephadex G-75 mostraram uma reatividade um pouco mais elevada que as submetidas à purificação com a celulose, sendo, portanto, mais altos os valores das razões B/F.

Comparações foram feitas entre a imunorreatividade do hormônio purificado apenas em gel de amido e do mesmo hormônio repurificado em gel Sephadex. Na Tabela VII pode-se facilmente verificar que ocorreu um aumento da imunorreatividade do material, quando foi submetido a uma repurificação em gel Sephadex. Por este motivo, tomamos como prática habitual, a purificação seguida do $\text{HCH-}^{125}\text{I}$ por ambos os processos citados, antes de empregá-lo nos ensaios.

*Com vistas a seleção de condições ótimas para o ensaio, antes de sua utilização em qualquer dosagem, o hormônio marcado foi submetido a uma incubação preliminar com o anticorpo a diluições diferentes, para que se observasse qual o título que acusava uma ligação mais adequada. Era escolhida a maior diluição do anticorpo que apresentasse uma relação B/F em torno de 1 (0,8 a 1,2), sem grande aumento da porcentagem de degradação do hormônio, durante o período de incubação. Esta razão era geralmente conseguida com o anticorpo diluído a $1:2 \times 10^6$, depois de 4-6 dias de incubação. Os resultados obtidos nos diferentes passos dados em direção à seleção dessas condições ideais estão indicados na Tabela VIII.

*No que diz respeito ao ensaio propriamente dito, cumpre destacar o que nos parece ser seu principal mérito, ou seja, que a técnica do radioensaio apresenta uma sensibilidade tal a ponto de termos podido trabalhar com altos índices de diluição. Com efeito, operamos com uma diluição de 1:25 e $1:2 \times 10^6$, respectivamente, do plasma dosado e do anticorpo específico, o que, já por si, demonstra o alto valor do método.

Cumpre ainda ressaltar os baixos níveis de degradação observados, surpreendentes sobretudo se levarmos em conta a longo período de incubação, de até 144 horas. As Tabelas VIII e IX escalam melhor nossas afirmações. Em todas as experiências, este nível de degradação do hormônio marcado foi avaliado pelos tubos de controle, para que uma correção conveniente pudesse ser feita nos demais tubos em que a concentração do HCH era determinada.

*Através dos elementos que utilizamos para a análise crítica da técnica utilizada (Smart, 1969), foi verificado um comportamento satisfatório para o requisito da especificidade: conforme a Tabela XII, as concentrações do hormônio plasmático medido a diferentes diluições, forneceram o mesmo valor do plasma não diluído.

Cuidados foram tomados para manter a mesma concentração salina, pH e força iônica em todas as diluições, pois foi estudado

por Yalow e Berson (1960) que, exceto para tampão e concentração de sal, não se observou nenhum outro fator plasmático não específico, que influenciasse a reação.

Como mostram as Figuras 8 e 9, as concentrações de HCH medidas caíram progressivamente com o fator de diluição. Se tal não acontecesse, o fator imunorreativo do plasma não estaria se comportando identicamente ao hormônio padrão, frustrando então um dos pré-requisitos indispensáveis para o radioensaio.

Resta ainda discutir os importantes aspectos da sensibilidade, precisão e exatidão do método, aspectos esses que se presentes definirão indiscutivelmente sua aplicabilidade.

A sensibilidade, assim como a precisão, é máxima sempre que a eficiência de contagem e a atividade específica do hormônio marcado for também máxima, desde que a imunoreatividade do hormônio não esteja alterada por uma iodação excessiva.

O fator mais importante para a obtenção de bons índices de sensibilidade, de acordo com Yalow e Berson (1967), é a qualidade do antisoro e quanto mais elevado for o número de animais imunizados maior será a probabilidade de obter-se um antisoro altamente sensível. A diluição de $1:2 \times 10^6$ empregada na maioria das dosagens efetuadas mostra a alta qualidade do antisoro utilizado.

Outro aspecto ligado a sensibilidade do método reflete-se essencialmente na inclinação do trecho inicial da curva padrão (Yalow e Berson, 1970). Podemos verificar que quanto maior esta inclinação, maior será o incremento $\Delta B/F$, e maior será a capacidade de discriminar pequenos valores de massa de HCH, e assim, mais sensível o ensaio.

Com o anticorpo suficientemente diluído para dar uma relação B/F entre 0,8-1,2, na presença de uma pequena quantidade de traçador (1000 cpm/ml), obtivemos curvas-padrão que mostraram uma boa inclinação na região das menores massas de HCH (Figuras 2 e 9).

A análise da reprodutibilidade de 40 determinações efetuadas em um plasma armazenado a -15°C , propiciou a ponderação da precisão da técnica estudada (Tabela XIII). De acordo com o critério proposto por Melo (1970), verificamos que os coeficientes de variação permitiram classificar a precisão do método em dois níveis:

- a) Excelente - para a reprodutibilidade intra-ensaio, quando o coeficiente de variação é menor que 5%, no nosso caso, obtivemos 4,6%;
- b) Boa - para a reprodutibilidade inter-ensaio, quando o coeficiente de variação está entre 5 a 10% ; para tal situação nosso valor foi de 6%.

A oscilação crítica das dosagens na mistura utilizada foi de 11,22 a 14,44 ng/ml.

De acordo ainda com Melo (1970), considerou-se três os níveis de recuperação:

- a) Excelente, para $r = 0,98$ ou mais;
- b) Boa, para $r = 0,941 - 0,98$;
- c) Adequada, para $r = 0,871 - 0,94$.

Assim, também para o parâmetro da recuperação obtivemos resultados excelentes, pelo alto valor do coeficiente de correlação ($r = 0,989$) entre os valores teóricos e obtidos, mostrados na Tabela XIV.

6. CONCLUSÕES

- 6.1. Foram padronizadas as diferentes fases para o imunoensaio do HCH:
- a) Marcação com ^{125}I ,
 - b) Purificação do hormônio marcado,
 - c) Teste da imunorreatividade,
 - d) Separação do hormônio livre e ligado ao anticorpo.
- 6.2. Demonstrou-se que o carvão ativado com cobertura plasmática é um excelente e simples método para a separação do HCH livre e HCH unido ao anticorpo.
- 6.3. A análise estatística da metodologia demonstrou a sua especificidade, excelente recuperação e precisão, utilizando critérios empregados usualmente em bioquímica.
- 6.4. A validade da técnica permitiu nítida discriminação das concentrações de HCH no plasma de indivíduos com níveis baixo e elevado do hormônio.

Considerando-se o acima exposto, podemos concluir que nossos objetivos iniciais foram atingidos, ou seja, podemos afirmar que a técnica do radioimunoensaio tem condições de ser empregada para a dosagem do hormônio de crescimento plasmático em nosso meio e que, pela padronização demonstrada, é perfeitamente aplicável na rotina clínica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BELL, E.T. (1967): In Vitams Horm. 24, 63.
2. BERSON, S.A., YALOW, R.S., BAUMAN, A., ROTHSCHILD, M.A., NEWERLY, K. (1956): Insulin ¹³¹I metabolism in human subjects: demonstration of insulin binding globulin in the circulation of insulin treated subjects. J.Clin.Invest., 35, 170.
3. BERSON, S.A., YALOW, R.S., GLICK, S.M. ROTH, J. (1964): Immunoassay of protein and peptide hormones. Metabolism, 13, 1135.
4. BERSON, S.A., YALOW, R.S. (1967): Principles of immunoassay of peptide hormones in plasma. Clinical Endocrinology, 2, 699.
5. BERSON, S.A., YALOW, R.S. (1968): Human Growth Hormone labeled with radioactive iodine at high specific activity: preparation and characterization for immunochemical studies and immunoassay. In Growth Hormone. Proceedings of the International Symposium, Milan. Excerpta Medica Foundation. ICS 158, 47.
6. BERSON, S.A., YALOW, R.S. (1969): Recent advances in immunoassay of peptides hormones in plasma. In Diabetes. Proceedings of the Sixth Congress of the International Diabetes

Federation. Excerta Medica Foundation, 650.

7. CATT, K.J., NIALL., TREAGER, G.W. (1966): Solid phase radioimmunoassay of HGH. Biochem.J., 100, 31.
8. CATT, K.J., TREAGER, G.W. (1967): Solid phase radioimmunoassay of HGH. Nature, 213, 825.
9. EKINS, R.P. (1960): The estimation of thyroxine in human plasma by an electrophoretic technique. Clin.Chim.Acta, 5, 453.
10. EKINS, R.P. (1970): Theoretical Aspects of Saturation Analysis. In vitro procedures with radioisotopes in medicine. I.A.E.A. Viena, 1969, 325.
11. GLICK, S.M., ROTH, J., YALOW, R.S., BERSON, S.A.(1963): Immunoassay of growth hormone in plasma. Nature, 199, 784.
12. GOTTLIEB, C.W., LAU, K.S., WASSERMAN, L.R., HERBERT, V.(1965). Rapid charcoal assay for intrinsic factor (IF), gastric juice insaturated B₁₂ binding capacity, antibody to IF, and serum insaturated B₁₂ binding capacity. Blood, 25, 875.
13. GRODSKY, G.M., FORSHAM, P.H. (1960): An immunochemical assay of total extractable insulin in man. J.Clin.Invest., 39, 1070.
14. HABER, E., PAGE, L.B., RICHARDS, F.F. (1965): Radioimmunoassay employing gel filtration. Analyt. Biochem., 12, 163.
15. HASSLER, J.W., (1963): Activated Carbon. Chemical Publishing Co, Inc. New York. Revised Edition.
16. HERBERT, V., LAU, K.S., GOTTLIEB, C.S., BLEICHER, S.J.(1965): Coated charcoal immunoassay of insulin. J.Clin.Endocr., 25, 1375.

17. HERBERT, V. (1968): Coated charcoal separation of free labeled hormone from hormone bound to antibody. In Protein and Polypeptide Hormones. Excerta Medica Foundation ICS 161, 55.
18. HUNTER, W.M., GREENWOOD, F.C. (1962): Preparation of iodine ¹³¹I labeled human G.H. of high specific activity. Nature, 194, 495.
19. HUNTER, W.M., GREENWOOD, F.C. (1964): A radioimmuno-electrophoretic assay for HGH, Biochem.J., 91, 43.
20. KORNER, A. (1961). In Hormones in Blood. 1st ed., New York, Academic Press, 209
21. LAZARUS, L., YUONG, J.D. (1966): Radioimmunoassay of HGH using ion exchange resin. J.Clin.Endocr., 26, 213.
22. LORAIN, J.A. (1966): In The Pituitary Gland. Ed. Harris, G. W. & Donovan, B.T., London, 2, 545.
23. MEADE, R.C. KLITGAARD, H.M. (1962): A simplified method for immunoassay of human serum insulin. J.Nucl.Med., 3, 407.
24. MELO, E.L. (1970): Tese de livre docência. Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Goiás.
25. MORGAN, C.R., LAZAROW, A. (1963): Immunoassay of insulin: two antibody system: plasma insulin levels of normal, subdiabetic and diabetic rats. Diabetes, 12, 115.
26. PALMIERI, G.M.A., YALOW, R.S., BERSON, S.A., (1970): Adsorbent techniques for the separation of antibody-bound from free hormone in radioimmunoassay. (no prelo).
27. ROSSELIN, G., ASSAN, R., YALOW, R.S. BERSON S.A., (1966): Separation of antibody-bound and unbound peptide hormones

labeled with iodine-131 by talcum powder and precipitated silica. Nature, 212, 355.

28. ROTH, J., GLICK, S.M., YALOW, R.S., BERSON, S.A. (1963): Hypoglycemia. A potent stimulus to secretion of G.H. Science, 140, 987.
29. ROTHENBERG, S.P. (1961): Assay of serum vitamin B₁₂ concentration using Co⁵⁷-B₁₂ and Intrinsic Factor. Proc.Soc. Exptl.Biol.Med., 108, 45.
30. SMITHIES, O. (1959): An improved procedure for starch gel electrophoresis: further variation in the serum proteins of normal individuals. Biochemical Journal, 71, 585.
31. SMART, J.V. (1969): Elementi di statistica medica. Centro G.Zambon Dell' Università di Milano.
32. WIDE, L. PORATH, J. (1966): Radioimmunoassay of proteins with the use of Sephadex coupled antibodies. Biochim. Biophys. Acta, 130, 257.
33. YALOW, R.S., BERSON, S.A. (1960): Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. J.Clin.Invest., 39, 1157.
34. YALOW, R.S., BERSON, S.A. (1966a): Labeling of proteins. Problems and practices. Trans.N.Y. Acad.Sci, 28, 1033.
35. YALOW, R.S., BERSON, S.A. (1966b): Preparation of high specific activity ¹³¹I labeled hormones. Use in radioimmunoassay of hormones in plasma. Radioactive Pharmaceutical, AEC SYMPOSIUM Series nº 6, CONF.65111, 265.
36. YALOW, R.S., BERSON, S.A. (1968): Radioimmunoassay of Human Growth Hormone in Plasma. In Growth Hormone.Proceedings of the International Symposium, Milan. Excerta Medica

Foundation, ICS 158, 60.

37. YALOW, R.S., BERSON, S.A. (1969a): Topics of radioimmunoassay of peptides hormones. In Protein and Polypeptide Hormones. Proceedings of the International Symposium, Liege. Excerta Medica Foundation. ICS 161, 36.
38. YALOW, R.S., BERSON, S.A. (1966b): Special Problems in the Radioimmunoassay or Small Polypeptides. In Protein and Polypeptide Hormones. Proceedings of the International Symposium, Liège. Excerta Medica Foundation. ICS 161, 71.
39. YALOW, R.S., BERSON, S.A. (1970): General Aspects of Radioimmunoassay Procedures. In Vitro Procedures With Radioisotopes in Medicine. Proceedings of a Symposium, Viena. I.A.E.A., 455.

APLICAÇÃO DO MÉTODO DO RADIOIMUNOENSAIO NA DOSAGEM
DO HORMÔNIO DE CRESCIMENTO HUMANO NO PLASMA

ERRATA

| Pág. | linha | onde se lê | leia-se |
|------|-------|----------------------------|---|
| 2 | 2 | facilidades | dificuldades |
| 5 | 16 | de | do |
| 9 | 3 | Hort* | Hor* |
| 12 | 20 | potencialidade | potencialidade |
| 14 | 13 | polímero | polímeros |
| 14 | 17 | Yuong | Young |
| 26 | 26 | quantificado | quantificada |
| 27 | 3 | desta, correspon- dendo | desta, excluindo C.1, correspondendo |
| 28 | 6 | menor | maior |
| 28 | 19 | extamente | exatamente |
| 30 | 4 | diluentes | diluyente |
| 49 | 3 | 5 dias | 6 dias |
| 52 | Fig.7 | 0.998 | 0,998 |
| 64 | 12 | Clinical Endocrinology | Clin. Endocr. |
| 65 | 7 | Clin. Chim. Acta | Clinica chim. Acta |
| 65 | 27 | J. Clin. Endocr. | J. clin. Endocr. Metab. |
| 66 | 12 | Yuong | Young |
| 66 | 13 | J. Clin. Endocr. | J. Clin. Endocr. Metab. |
| 67 | 11 | Biochemical Journal | Biochem. J. |

