

Atsuko Kumagai Nakazono

*RADIOIMUNOENSAIO PARA DOSAGEM DE
HORMÔNIO DE CRESCIMENTO*



*Tese apresentada à Faculdade
de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade de
São Paulo para obtenção do
título de "Mestre em Ciências"*

Orientador: Prof. Dr. Armando de Aguiar Pupo

A

Sérgio e
meus filhos

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Armando de Aguiar Pupo, exemplo de médico e pesquisador votado ao estudo, pela orientação desta tese, ensinamentos, estímulo e amizade.

Ao Prof. Dr. Rômulo Ribeiro Pieroni, Diretor do Instituto de Energia Atômica e Chefe da Divisão de Radiobiologia, pelo apoio e interesse constantes.

Ao Prof. Dr. Metry Bacila, coordenador do curso de pós-graduação em Bioquímica, pelas valiosas sugestões.

Ao Prof. Dr. José Carlos Barbério, por nos ter introduzido no campo das aplicações de radioisótopos, úteis sugestões e incentivo.

Ao Prof. Dr. Bernardo Léo Hajchenberg, por nos ter iniciado nas pesquisas radioimunológicas.

A Dra. Rosalyn S. Yalow, pelos ensinamentos em radioimunoensaio durante a sua permanência no Instituto de Energia Atômica.

Ao Dr. Evaldo Hermínio de Lúcia Melo, pelas sugestões referentes à análise estatística.

A matemática Odette Guedes pela programação e processamento de dados.

A todos que contribuíram na realização deste trabalho e que involuntariamente omitimos.

ÍNDICE

	<u>Página</u>
I. INTRODUÇÃO.	1
A. Dados gerais	1
B. Princípios Fundamentais do Radioimunoensaio.	2
C. Processos de separação	3
D. Proposição	6
II. MATERIAL E MÉTODO	9
A. Material Biológico.	9
B. Tratamento dispensado ao Material Biológico.	9
1. Obtenção de sêro humano	9
2. Preparação do segundo anticorpo	10
C. Método Analítico	10
1. Marcação do hormônio de crescimento com ^{125}I	10
1.1 - Solução e substâncias químicas empregadas	10
1.2 - Técnica da iodação.	12
1.3 - Técnica da purificação do HC^{125}I	12
1.4 - Teste de pureza do HC^{125}I	12
1.4.1 - Eletroforese.	13
1.4.2 - Adsorção em carvão.	13
1.4.3 - Teste da atividade específica do hormônio iodado.	13
1.4.4 - Teste da precipitabilidade do hormônio iodado e escolha da diluição do primeiro anticorpo.	14
2. Radioimunoensaio.	14
2.1 - Soluções e substâncias químicas empregadas.	14
2.2 - Técnica do ensaio	16
2.3 - Cálculo dos resultados.	20
2.4 - Análise estatística dos dados obtidos	20

III. RESULTADOS.	21
1. Purificação do hormônio de crescimento iodado. . .	24
2. Contrôlo eletroforético do hormônio de crescimento iodado.	25
3. Teste, em carvão, da pureza do hormônio de cresci- mento iodado.	26
4. Teste de precipitabilidade do hormônio iodado. Es- colha da diluição do primeiro anticorpo, Ac ₁ . . .	27
5. Escolha do volume do segundo anticorpo, Ac ₂	28
6. Curvas padrão e cálculo de amostras.	29
7. Análise estatística dos resultados obtidos	30
7.1 - Estudo da precisão e reprodutibilidade do método empregado.	30
7.2 - Outros tratamentos estatísticos dos resulta- dos das dosagens	30
7.3 - Dosagem das amostras em duplicata.	32
IV. DISCUSSÃO.	33
V. CONCLUSÕES	34
VI. SUMÁRIO.	35
VII. BIBLIOGRAFIA	36

I. INTRODUÇÃO*

A. Dados Gerais

Até a década de 60, a determinação dos hormônios peptídicos no plasma era feita através de ensaios biológicos, em sua maioria carentes de especificidade e de precisão^(9,8). Os hormônios tireoidianos e adrenais possuem configuração química que inclui grupos químicos particulares e apresentam-se em concentrações relativamente altas no plasma, tornando possível sua dosagem química; o mesmo não acontece com as substâncias hormonais peptídicas. Estas não possuem grupamentos químicos particulares que as distingam entre si e de outras proteínas do plasma, sendo que estas aparecem em concentrações de um milhão a um bilhão de vezes maiores que as do hormônio. Em termos de concentração molar, o hormônio de crescimento se apresenta no soro, em níveis de 60×10^{-12} , não havendo, pois, condições de se utilizarem métodos químicos clássicos de dosagem.

Valendo-se da alta especificidade das reações imunológicas, tentou-se desenvolver um imunoensaio⁽¹⁹⁾, para hormônio de crescimento (HC), baseado na produção de potentes anticorpos^(14,1). Tal tentativa teve o mérito real de abrir as portas para as técnicas imunológicas, mas apresentou resultados pouco reprodutíveis.

* O presente trabalho foi executado na Divisão de Radiobiologia do Instituto de Energia Atômica - Cidade Universitária - São Paulo.

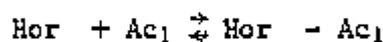
Abreviaturas:

- HC - Hormônio de Crescimento
- Hor. - Hormônio não radioativo
- Hor.* - Hormônio radioativo
- [Hor] - Concentração do hormônio não radioativo
- [¹²⁵I]Hor - Concentração do hormônio radioativo
- Ac₁ - Anticorpo anti hormônio de crescimento
- Ac₂ - Anticorpo anti gamaglobulina de cobaie
- Hor-Ac₁ - Complexo antígeno anticorpo, não radioativo
- Hor*-Ac₁ - Complexo antígeno anticorpo, radioativo
- EQ125I - Hormônio de crescimento radioativo com 125I
- T_{1/2} - Meia vida
- SND - Soro normal de cobaie
- SAB - Soro albumina bovina, fração V.

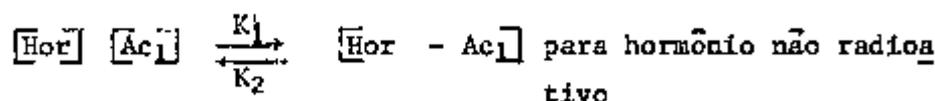
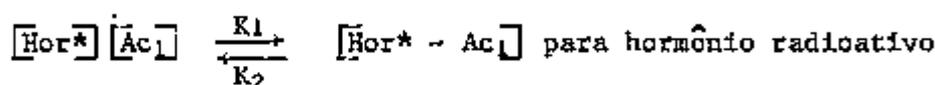
Associando ao Imunoensaio traçadores radioativos, mais comumente isótopos de iodo ^{131}I e ^{125}I - desenvolveu-se finalmente a técnica do radioimunoensaio, introduzida por Berson e Yalow^(2,30). Esta técnica, por possuir sensibilidade, especificidade e precisão adequadas, permitiu a dosagem dos hormônios peptídicos em larga escala, propiciando enorme impulso às pesquisas endocrinológicas e metabólicas.

B. Princípios Fundamentais do Radioimunoensaio

O método do radioimunoensaio, como já foi referido, tem por princípio fundamental a competição entre o hormônio tornado radioativo (Hor^*), pela marcação com isótopo radioativo e o hormônio não radioativo (Hor), para se ligarem ao anticorpo específico anti hormônio (Ac_1).



De acordo com a lei de ação das massas, segue-se que:



No equilíbrio, tem-se:

$$\frac{[\text{Hor}^* - \text{Ac}_1] \text{ ou } [\text{Hor} - \text{Ac}_1]}{[\text{Hor}^*][\text{Ac}_1] \text{ ou } [\text{Hor}][\text{Ac}_1]} = \frac{K_1}{K_2} = K \text{ (constante de equilíbrio)}$$

Sendo constante a quantidade de anticorpo, Ac_1 , e sendo também constante a quantidade de hormônio radioativo, Hor^* , a quantidade de complexo Hor^*-Ac_1 formado será inversamente proporcional à quantidade de hormônio não radioativo, Hor , presente.

Assim, se hormônio não radioativo, Hor , estiver presente em grande quantidade, vai ocupar os sítios de ligação do anticorpo, permitindo entrada de pequena quantidade de hormônio radioativo, Hor^* , formando pequena quantidade de complexo radioativo. Já na presença de pequena quantidade de Hor , formar-se-á maior quantidade de complexo radioativo Hor^*-Ac_1 (Fig.1).

Valendo-se dessa proporcionalidade inversa entre o complexo Hor^*-Ac_1 e o hormônio não radioativo presente, pode-se, medindo Hor^*-Ac_1 , calcular Hor , desde que se construa uma curva padrão obtida usando-se concentrações de Hor crescentes (Fig.2). A medida do complexo Hor^*-Ac_1 é conseguida através de sua radioatividade que é contada e expressa em número de contagens por minuto (cpm). Torna-se, por conseguinte, necessário separar o complexo Hor^*-Ac_1 que vai ser medido, do restante Hor^* que não se ligou a anticorpo.

C. Processos de Separação

Existem vários processos de separação entre o hormônio complexado e o não complexado nos radioimunoensaios. No caso particular de hormônios peptídicos, são os seguintes os processos descritos:

1) Processos baseados na diferença da migração entre o hormônio não complexado e o complexado.

1.1 - Sistema cromatoeletroforético de Berson e Yalow⁽³⁾, onde inicialmente se desenvolve a cromatografia seguida de eletroforese, sistema esse usado para HC por Roth e col.⁽²⁶⁾, Glick e col.⁽¹⁰⁾.

1.2 - Processo eletroforético de Hunter e Greenwood⁽¹⁷⁾ e Fitschen⁽⁷⁾, que empregam a eletroforese para a separação do complexo e do não complexo.

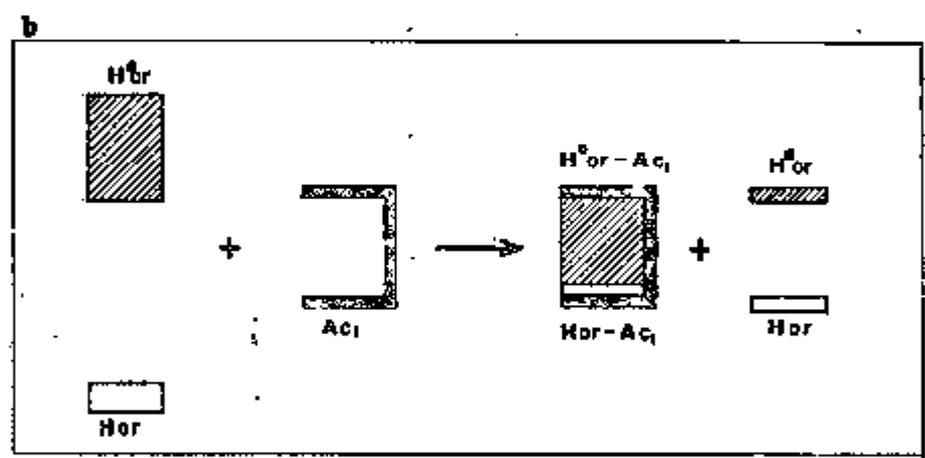
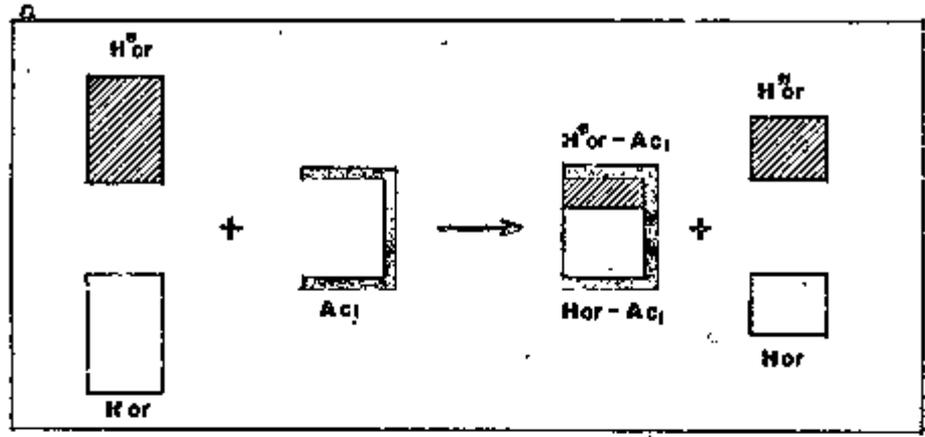


FIGURA 1. Princípio do radioimunoensaio. Reação competitiva entre o hormônio radioativo, Hor^* , e não radioativo, Hor , para se unir ao anticorpo específico Ac_1 . Na presença de grande quantidade de Hor , formar-se-á pouco complexo radioativo $Hor^* - Ac_1$ (a); na presença de pequena quantidade de Hor , formar-se-á maior quantidade de $Hor^* - Ac_1$ (b).

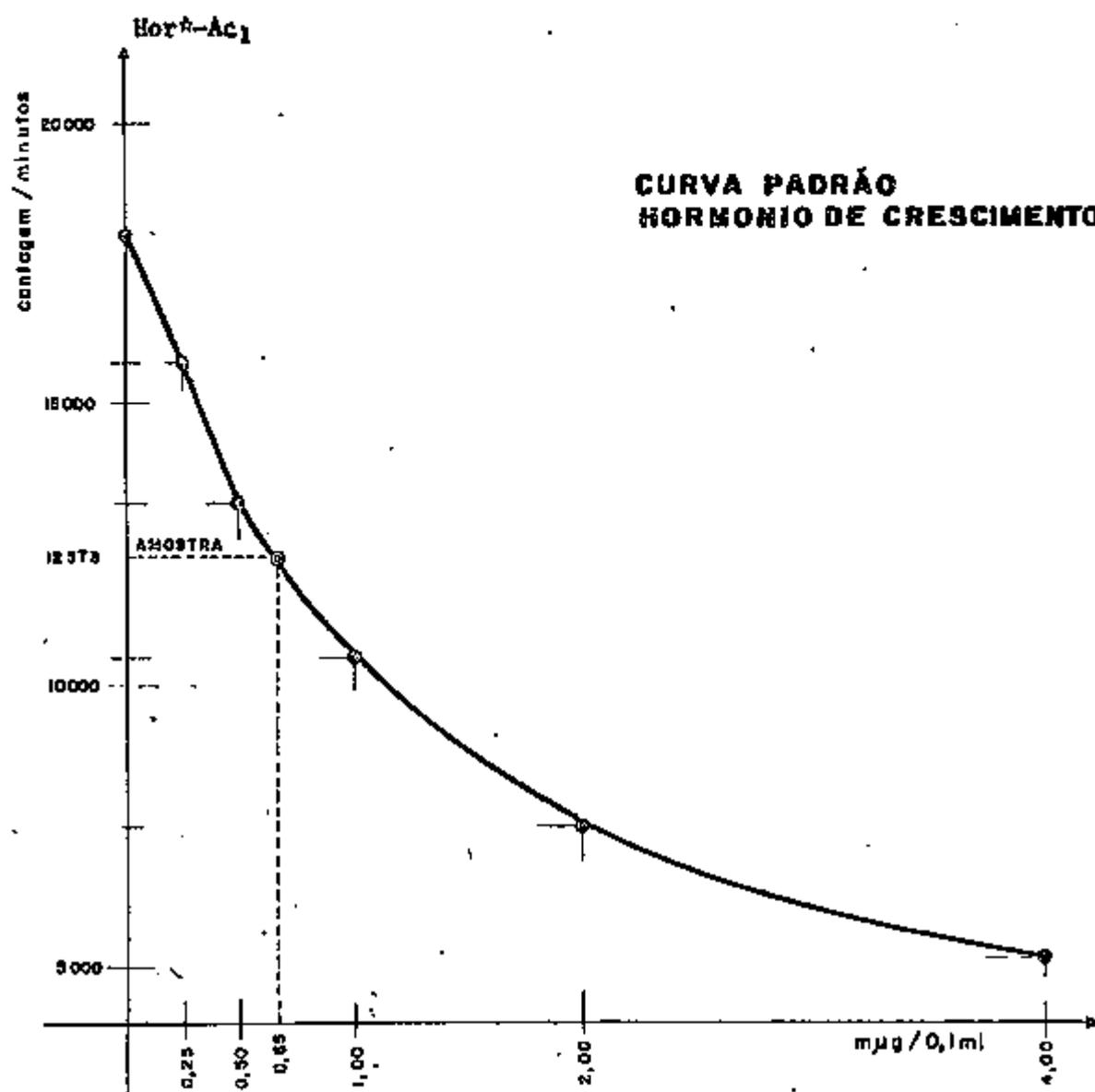


FIGURA 2. Curva padrão do radioimunoensaio. Os valores das contagens do Hor³² - Ac₁, complexo radioativo dos padrões, são registrados em ordenadas e as concentrações em abcissa. Sabendo-se a contagem da amostra desconhecida, calcula-se a sua concentração em mcg/ml através da curva padrão.

1.3 - Método de gel filtração, usado por Haber e col. (12).

2 - Processos que separam o hormônio que não se complexou.

2.1 - Resina trocadora iônica, empregada por Meade e Klitgaard (20) e Lazarus e Yuong (18).

2.2 - Utilização de carvão ativado com dextrana foi desenvolvida por Hérbert (15), e, Wool e Selenkow (29).

2.3 - Talco e sílica foram empregadas para separação por adsorção, por Rosselin e col. (25).

3 - Processos de separação do complexo hormônio-anticorpo.

3.1 - A separação por meio de fase sólida foi estudada por Catt e col. (4,5,6).

3.2 - O sistema de utilização do duplo anticorpo foi introduzido por Hales e Randle (13), aplicado posteriormente por Morgan e Lazarow (21), e Morgan (22,23).

D. Proposição

Levando em conta a importância que representa para as pesquisas metabólicas, endocrinológicas e para medicina clínica, é tarefa imperativa a montagem do método de dosagem de hormônio de crescimento. Dentre os processos de separação acima mencionados, foi escolhido o método do duplo anticorpo. Assim procedeu-se por já existir experiência anterior em radioensaio para insulina usando, com êxito, tal processo de separação (24).

Nesse processo, o primeiro anticorpo, Ac_1 , é o soro de cobaio anti hormônio de crescimento, obtido imunizando-se cobaios com HC puro. O complexo hormônio-anticorpo resultante da reação é solúvel. Utilizando-se um segundo anticorpo, Ac_2 , ou seja, soro de coelho anti gamaglobulina de cobaio, consegue-se a precipitação do complexo solúvel. Este precipitado é separado por centrifugação (Fig. 3).

Trata-se, porém, de técnica de certa complexidade e um dos principais problemas encontrados diz respeito à precisão do ensaio, depen

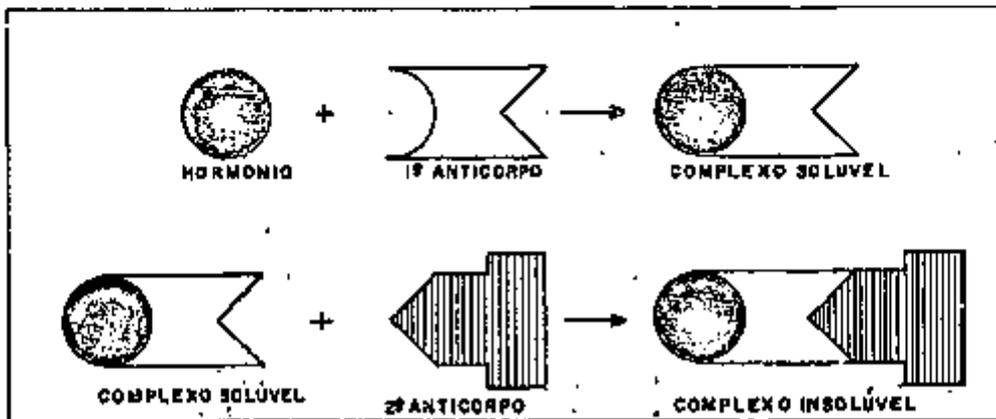


FIGURA 3. Processo do duplo anticorpo em radioimunoensaio. A reação imunológica hormônio e anticorpo, resulta na formação de um complexo solúvel. Este é precipitado por um segundo anticorpo dando um complexo insolúvel.

dendo fundamentalmente da conveniente padronização dos reagentes, da preparação e escolha das concentrações adequadas dos anticorpos utilizados e da habilidade do ensaiador. O presente trabalho trata, então, da montagem da técnica de radioimunoensaio para a dosagem do hormônio de crescimento pelo duplo anticorpo. Por outro lado, tomou-se extremo cuidado no sentido do método estudado apresentar resultados precisos e reproduzíveis, o que não é tarefa fácil em se tratando do radioimunoensaio.

II. MATERIAL E MÉTODO

A. Material Biológico

1. "Pool" de sêro humano, obtido pela mistura de sêro de pacientes acromegâlicos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e de sêro de indivíduos normais na proporção de 1 para 6.

2. Primeiro anticorpo, Ac₁, obtido da National Pituitary Agency, USA.

3. Sêro normal de cobaio, SNC, obtido através da Pentex Miles Laboratories Inc. - Research Products Division, USA.

4. Segundo anticorpo, Ac₂, sêro de coelhos imunizados com gamaglobulina de cobaio. O sêro foi obtido no Biotêrio da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

B. Tratamento dispensado ao Material Biológico

1. Obtenção do sêro humano

Foram punccionados indivíduos normais e 8 acromegâlicos e o sangue mantido à temperatura ambiente até a retração do coágulo. O sêro, após centrifugação, foi conservado em congelador até que se obtivesse quantidade suficiente de material para as dosagens. Foram então preparados, após descongelamento, o "pool" de sêro de acromegâlicos e o "pool" de sêro de indivíduos normais. Uma vez obtidas ambas as misturas de sêros, preparou-se a mistura contendo uma parte do "pool" de sêro de indivíduos acromegâlicos e 6 partes de "pool" de sêros de indivíduos normais, obtendo-se assim o "pool" de sêro humano a ser usado nos ensaios para a dosagem.

Este "pool" foi dividido em alíquotas de 5 ml e conservados no congelador e apenas descongelados no momento do uso.

2. Preparação do segundo anticorpo

Dissolve-se gamaglobulina de cobaio, adquirida da Pentex Miles Laboratories Inc., USA, em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, na proporção de 16 mg para 1 ml do tampão. Adiciona-se igual volume de adjuvante de Freund completo. Injeta-se 8 mg de gamaglobulina (1 ml da mistura) no subcutâneo do dorso de cada coelho adulto, semanalmente, durante 3 semanas. Depois, injeta-se doses de reforço de 4 mg ou seja, 0,5 ml de mistura, mensalmente. Após 3 meses do início da imunização, inicia-se a sangria dos animais, mensalmente, cerca de duas semanas após a última injeção da gamaglobulina de cobaio.

Cada sangria fornece 50 ml de sangue, e o soro é separado após retração do coágulo e centrifugação. Depois de várias sangrias de animais produtores de sôros considerados potentes como anticorpo, reune-se os sôros em um "pool", e alíquotas de 20 ml são estocadas no congelador.

Esse soro, contendo o segundo anticorpo, é usado sem diluição. Seu consumo é grande, sendo necessária manutenção de razoável quantidade de coelhos doadores para que sejam sangrados e imunizados regularmente.

C. Método Analítico

1. "Marcação" do hormônio de crescimento com ^{125}I

Para iodar o HC e obter produto de alta atividade específica, utilizaram-se os métodos de Hunter e Greenwood⁽¹⁶⁾ e Greenwood e Hunter⁽¹¹⁾. O ^{125}I é oxidado pela Cloramina T, na presença do HC. O ^{125}I , carregado positivamente, vai se ligar a tirosina do hormônio. A reação é sustada pela adição de Metabissulfito de Na.

1.1 - Soluções e substâncias químicas empregadas

- ^{125}I - na forma de Na^{125}I , com atividade específica superior a 100 mCi/ml, livre de carregador e livre de redutor, obtido da ISO -

Serve Division of Cambridge Nuclear Corporation. O $T_{1/2}$ do iodo radioativo empregado é de 60 dias.

- Tampão fosfato pH 7,4, 0,2 M

- Tampão veronal, pH 8,6, 0,05 M

- Tampão veronal, pH 8,6, 0,025 M

- Tampão borato, pH 8,6, 0,05 M

- Tampão borato, pH 8,6, 0,025 M

- Veronal albumina - tampão veronal pH 8,6, 0,025M, contendo albumina humana na proporção de 2,5 mg/ml.

- Albumina humana, solução a 25% (Behring - Alemanha)

- Hormônio de crescimento humano (National Pituitary Agency - USA). 1 mg de HC é dissolvida em 1 ml de HCl 0,005 N, e alíquotas de 0,1 ml são guardadas em congelador.

- Cloramina T (Merk) - 2,65 mg/ml de tampão fosfato 0,2 M, pH 7,4.

- Metabissulfito de Na (British Drug House) - 4,8 mg/ml de tampão fosfato 0,2 M, pH 7,4.

- Sephadex G 75 médio (Pharmacia Upsalla - Suécia). O Sephadex é deixado entumescendo, durante 12 horas no mínimo, embebido em solução tampão veronal 0,025 M, pH 8,6, em geladeira.

- "Plasma azul" - plasma humano normal, com corante azul de bromofenol (Merk), para visualizar a fração ao passar pela coluna de sephadex e, também, para impedir a adsorção do hormônio nas paredes do material.

- Carvão - Norit - grade A (Amend Drug and Chemical Co.). Suspensão de 100 mg/ml de tampão veronal 0,025 M, pH 8,6 é conservado em geladeira.

- Albumina bovina fração V - pó liofilizado - (Sigma Chemical Co.).

1.2 - Técnica de iodação

A um tubo de ensaio de 1,2 cm por 7,5 cm, colocado em suporte e na capela, adicionam-se 20 µl de tampão fosfato pH 7,4, 0,2 M.

Adicionam-se 2 µl de ^{125}I de alta atividade específica, com auxílio de micropipeta.

Juntam-se 5 µl de HC, solução 1 mg/ml, com micropipeta, borbulhando dentro do tubo, com sopro, para misturar.

Juntam-se, em seguida, 20 µl de Cloramina T, também borbulhando, com auxílio de micropipeta.

Borbulham-se, logo a seguir, 20 µl de metabisulfito de sódio, com micropipeta.

Adicionam-se 500 µl de "plasma azul".

1.3 - Técnica de purificação do HC ^{125}I

Uma coluna de vidro, de 50 cm por 1 cm (por exemplo, uma bureta de 50 cc), munida de lã de vidro na sua extremidade inferior, deve estar previamente preparada, colocando-se o Sephadex G 75 médio, já entumecido, tomando-se cuidados para não formar bolhas nem fases diversas. Deixa-se empacotar, evitando que o Sephadex seque na coluna.

Coloca-se o hormônio iodado no topo da coluna e elui-se com veronal albumina, coletando-se amostras de 0,5 ml a partir da fração azul, em coletor automático (Arthur Thomas Co.).

Inicialmente, é cluída a fração degradada que sai juntamente com a fração azul. Segue-se o hormônio iodado e posteriormente sai o ^{125}I , livre, que não se ligou ao hormônio.

As amostras são levadas para o contador de radiação gama Tobor - (Nuclear Chicago Corporation), a fim de obter-se picos de eluição com as respectivas frações coletadas. Selecionam-se os tubos correspondentes ao pico do hormônio iodado e estocam-se no congelador.

1.4 - Testes de pureza do HC ^{125}I

1.4.1 - Eletroforese

Uma amostra do material iodado antes de passar pelo sephadex, e, uma amostra da fração coletada após purificação no sephadex (amostra correspondente ao pico do hormônio iodado) são semeadas em tiras de papel Whatman $\frac{1}{2}$ - 3 MM, de 3,5 cm por 32 cm. Corridas eletroforéticas de uma hora são feitas em tampão fosfato pH 7,4, 0,2 M, empregando-se corrente de 2 mA por fita, a 250 volts. As tiras são secadas, cortadas em tiras de 1 cm e a seguir, contadas em contador de cintilação para radiação gama (Nuclear Chicago Corporation).

No caso da primeira amostra, tem-se a idéia do rendimento da iodação, da quantidade de fração degradada e da quantidade de ^{125}I que não se uniu ao hormônio. Na segunda amostra, verifica-se a pureza do material obtido.

1.4.2 - Adsorção em carvão

Uma amostra do hormônio iodado antes da passagem pelo sephadex e uma amostra da fração purificada são tomadas separadamente em tubos de ensaio. Junta-se a cada amostra: 0,1 ml de "plasma azul"; 2,4 ml de veronal albumina; 1 ml de carvão. Agita-se rapidamente e centrifuga-se durante 15 minutos a 1000 rpm.

O sobrenadante é separado do precipitado por decantação, e, ambos são contados no contador para radiação gama. Obtem-se, assim, a porcentagem do hormônio iodado que fica adsorvido ao carvão.

1.4.3 - Teste da atividade específica do hormônio iodado

O hormônio iodado deve ser diluído em tampão borato pH 8,6, 0,025 M, contendo 0,25% de soro albumina bovina fração V(SAB), de modo que se obtenha uma atividade suficientemente alta para o trabalho. Uma diluição tal que 50 μl dê entre 10.000 a 50.000 cpm é a ideal. O hormônio diluído é separado em tubos, em quantidades de 5,5 ml, mantidos em

congelador. Tal quantidade é suficiente para um ensaio de 100 tubos. Uma vez descongelado, aconselha-se não utilizar o material para outro ensaio, devido à degradação sofrida pelo hormônio quando congelado e descongelado repetidamente.

1.4.4 - Teste da precipitabilidade do hormônio iodado e escolha da diluição do primeiro anticorpo.

Faz-se um ensaio prévio, com o hormônio iodado e diluído, sem a presença de hormônio não radioativo, fazendo-o reagir com diferentes concentrações de anticorpo anti hormônio de crescimento. A precipitabilidade do hormônio iodado, isto é, com excesso de anticorpo, deve ser superior a 60% e o anticorpo deve ser diluído para uma concentração capaz de precipitar cerca de 25% da atividade total colocada.

2. Radioimunoensaio

A dosagem do HC desenvolvida neste trabalho está baseada no trabalho proposto por Morgan⁽²²⁾ e Pupo e Marreiro⁽²⁴⁾. Esquemáticamente, o que se passa no ensaio ilustrado na (Fig.3), onde o complexo solúvel $Hor^* - Ac_1$ formado é precipitado pela adição de Ac_2 , que é antigamaglobulina de coelho, produzido em coelhos. Por centrifugação e decantação, obtém-se o complexo $Hor^* - Ac_1$ no precipitado.

Para este trabalho, foram realizados 8 ensaios consecutivos, doseando-se em cada ensaio 40 vezes o mesmo "pool" de soro humano. Para cada ensaio fez-se a dosagem dos padrões para se obter a respectiva curva padrão. O trabalho foi idealizado para montagem da técnica e estudo da precisão e reprodutibilidade do método.

2.1 - Soluções e substâncias químicas empregadas

- $HC^{125}I$, obtido conforme descrição anterior, testado e diluído e mantido em congelador.

- HC puro para padrão - (National Pituitary Agency, USA). Solução de 200 µg/ml é estocada congelada para preparo de padrões, em alíquotas de 0,1 ml. Esta solução é preparada, juntando-se 200 µl de água destilada a 1 mg de HC puro, e a seguir, 20 µl de NaOH, 1 N. Eleva-se o volume a 5 ml com tampão fosfato 0,05 M, pH 7,4.

Para preparar os padrões, toma-se 20 µl da solução de 200 µg/ml, leva-se a 10 ml com tampão borato pH 8,6, 0,05 M, contendo 0,25% de soro albumina bovina e obtém-se padrão de 4 µg/0,1 ml.

Desta solução, faz-se diluições sucessivas ao meio, com tampão borato com 0,25% de SAB para se obter as concentrações de: 2 µg/0,1 ml; 1 µg/0,1 ml; 0,5 µg/0,1 ml; 0,25 µg/0,1 ml.

- Tampão borato, pH 8,6, 0,025 M.

- Tampão borato, pH 8,6, 0,025 M.

- Soro albumina bovina, fração V (Sigma Chemical Co., USA).

- Tampão fosfato, 0,05 M, pH 7,4.

- Anticorpo anti hormônio de crescimento (National Pituitary Agency, USA).

Solução de 1:2.500 em tampão borato pH 8,6, 0,05 M, contendo 0,25% de soro albumina bovina, é guardada congelada em alíquotas de 0,3 ml. As diluições para as dosagens são efetuadas conforme as exigências do ensaio prévio. Em geral, diluições de 1:100.000 e 1:150.000 são as empregadas.

- Soro normal de cobaio (Pentex Miles Laboratories Inc. - Research Products Division).

Um grama do produto é diluído a 20 ml em solução fisiológica. Dilui-se a seguir a 1:25 em tampão borato pH 8,6, 0,025 M contendo 0,25% de SAB. Alíquotas de 5 a 10 ml são estocadas no congelador.

- Soro de coelho anti gamaglobulina de cobaio.

Obtido no Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, conforme descrição anterior. Esse anticorpo é usado em volume que permita seguramente a precipitação máxima do complexo solúvel,

isto é, em excesso. Essa quantidade é determinada usando volumes crescentes do soro de coelho no ensaio, fazendo reagir com hormônio radioativo, Ac₁ - primeiro anticorpo. Verifica-se que a precipitabilidade do complexo vai aumentando até atingir um platô. Toma-se, usualmente, um volume que se localize no platô, no caso estudado, foi de 150 µl.

- "Pool" de soro humano - conforme descrição no item Material Biológico.

2.2 - Técnica do ensaio

As determinações foram realizadas em soro obtido a partir de sangue coagulado à temperatura ambiente, centrifugado e conservado congelado até o momento do uso. Como o soro de indivíduos acromegálicos contém hormônio em concentração elevada, foi feita uma diluição de 1:6 com soro normal.

A Fig. 4 representa uma esquematização do processo empregado: hormônio não marcado (padrão ou amostra desconhecida) é incubado juntamente com hormônio radioativo e o anticorpo, por um período de 72 horas a 4°C. Depois são adicionados o complemento, SNC, mais o segundo anticorpo. Incuba-se por 24 horas a 4°C. Centrifuga-se, lava-se o precipitado, recentrifuga-se e conta-se o precipitado.

É feito um protocolo para o ensaio, conforme Tabela I.

Os tubos 1 e 2 deverão conter somente HC¹²⁵I.

Os tubos 3 e 4 são para testar a precipitabilidade máxima do HC¹²⁵I e conterão Ac₁ em excesso.

Os tubos 5 e 6 constituem o zero da curva padrão, isto é, não contém o hormônio não marcado.

Os tubos 7 até 16 conterão padrões de HC, 100 µl da solução de 0,25 - 0,5 - 1,0 - 2,0 - 4,0 µg/0,1 ml, em duplicatas.

Os tubos 17 em diante, conterão amostras a dosear, em duplicata, 100 µl para cada tubo.

A sequência de adição dos reagentes é a seguinte:

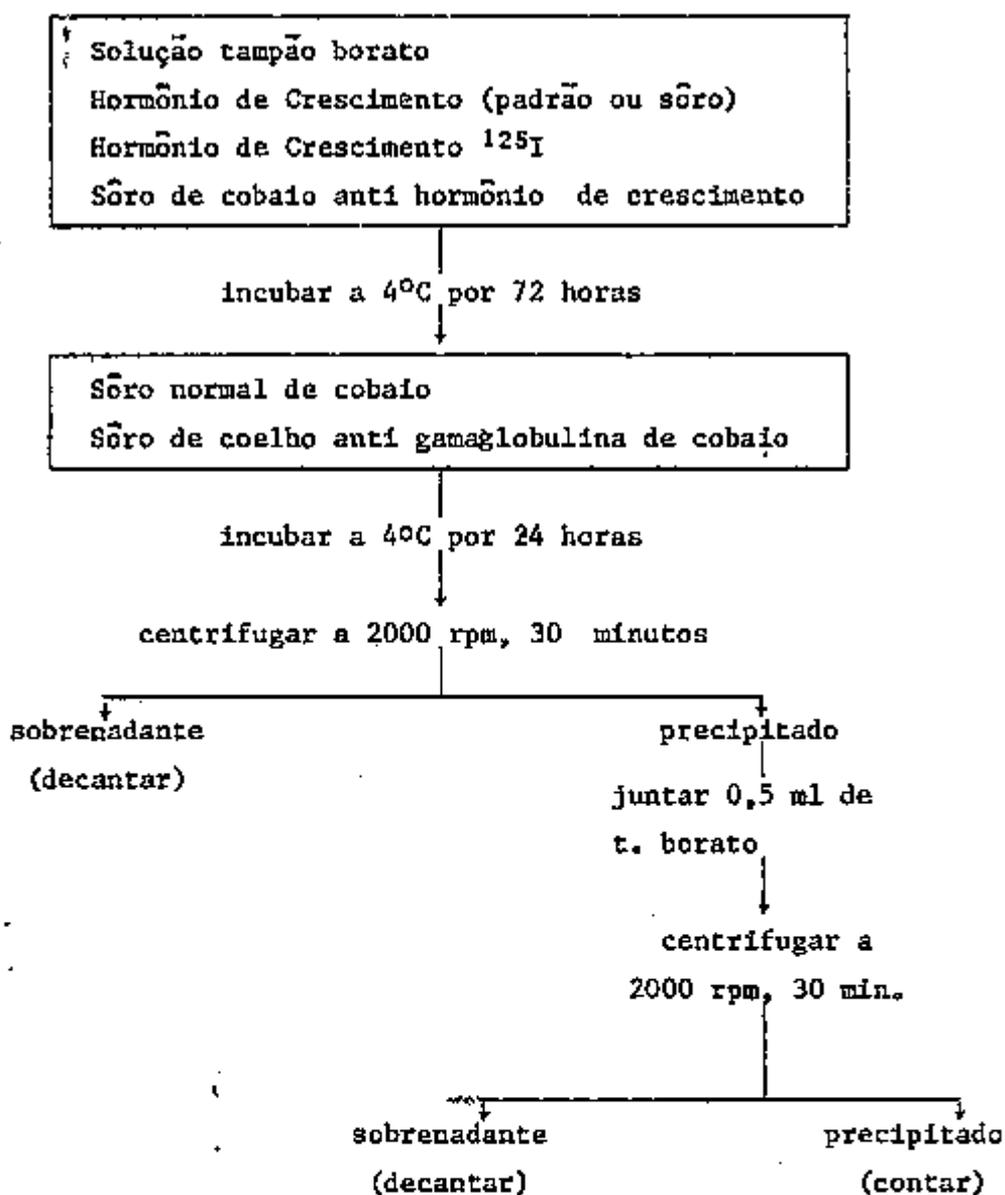


FIGURA 4. Esquema geral do Radioimunoensaio - Método do duplo anticorpo.

TABELA I-2

Radioimunoensaio do Hormônio de Crescimento - protocolo do ensaio.

TUBO Nº	Padrão ou Amostra μ l	T. borato com 0,5% SAB μ l	HC ¹²⁵ I μ l	Ac ₁ μ l	SNC μ l	Ac ₂ μ l	Contagem	Média	Resultado μ g/ml
1	-	-	50	-	-	-	77.426	78.008	
2	-	-	50	-	-	-	78.591		
3	-	450	50	100 1:2500	50	100	58.030	59.258	
4	-	450	50	100 1:2500	50	100	60.486		
5	-	500	50	50 1:100000	50	100	18.003	18.103	
6	-	500	50	50 1:100000	50	100	18.203		
7	100 0,25 μ g	400	50	50 1:100000	50	100	15.570	15.671	
8	100 0,25 μ g	400	50	50 1:100000	50	100	15.772		
9	100 0,5 μ g	400	50	50 1:100000	50	100	13.408	13.722	
10	100 0,5 μ g	400	50	50 1:100000	50	100	14.037		
11	100 1,0 μ g	400	50	50 1:100000	50	100	10.141	10.489	
12	100 1,0 μ g	400	50	50 1:100000	50	100	10.836		
13	100 2,0 μ g	400	50	50 1:100000	50	100	7.759	7.467	
14	100 2,0 μ g	400	50	50 1:100000	50	100	7.176		
15	100 4,0 μ g	400	50	50 1:100000	50	100	5.287	5.188	
16	100 4,0 μ g	400	50	50 1:100000	50	100	5.090		
17	100 amostra	400	50	50 1:100000	50	100	5.779	8.977	16,25
18	100 amostra	400	50	50 1:100000	50	100	5.574		
19	100 amostra	400	50	50 1:100000	50	100	12.670	8.723	15,75
20	100 amostra	400	50	50 1:100000	50	100	12.076		

A quantidade de cada reagente é anotada, bem como os tubos com os respectivos conteúdos. Terminado o ensaio, anota-se a contagem de cada amostra, a média das duplicatas, e o resultado das leituras são expressos em μ g/ml de soro.

- Tampão borato pH 8,6, 0,05 M, contendo 0,5% de SAB, assim distribuídos: 450 μ l nos tubos 3 e 4; 500 μ l nos tubos 5 e 6; 400 μ l nos tubos 7 em diante.

- Padrão nos respectivos tubos, 100 μ l para cada tubo.

- Amostras a dosear nos respectivos tubos, 100 μ l para cada tubo.

- RC^{125}I , 50 μ l em todos os tubos.

- Primeiro anticorpo Ac_1 , em excesso, 50 μ l da diluição 1:2.500, nos tubos 3 e 4.

- Primeiro anticorpo, Ac_1 , 50 μ l em diluição previamente escolhida, para todos os tubos, exceto os quatro primeiros.

- Todos os tubos são incubados a 4°C, por 72 horas.

- Soro normal de cobaia, 50 μ l, é juntado a todos os tubos, exceto 1 e 2.

- Segundo anticorpo, Ac_2 , no volume de 150 μ l é juntado a todos os tubos, exceto 1 e 2.

- Todos os tubos são incubados por mais 24 horas a 4°C.

- Os tubos são centrifugados em centrífuga refrigerada a 4°C, durante 30 minutos, a 2.000 rpm, menos os tubos 1 e 2. Separam-se sobrenadante e um precipitado branco.

- Os sobrenadantes são decantados, ficando os precipitados aderentes ao fundo dos tubos.

- Os tubos são lavados com 0,5 ml de tampão borato pH 8,6, 0,05 M, contendo 0,5% de SAB. Toma-se cuidado para fazer escorrer a solução pela parede toda do tubo.

- Os tubos são centrifugados novamente a 2.000 rpm, durante 30 minutos.

- O sobrenadante é desprezado por decantação, e os tubos com os precipitados são contados em contador automático para radiações gama (Nuclear Chicago Corporation, USA).

RC^{125}I e Ac_1 foram medidos com microseringas tipo Hamilton, com cursor. Padrões e amostras foram medidos com micropipetas.

2.3 - Cálculo dos resultados

A leitura dos padrões vai servir para a construção da curva padrão, onde, nas ordenadas, registram-se as contagens de Hor^*-Ac_1 e na abcissa, as concentrações correspondentes de HC utilizadas.

Os desconhecidos, isto é, as amostras a dosear, são lidos na curva padrão.

2.4 - Análise estatística dos dados obtidos

Como foram realizados 8 ensaios diferentes, calculou-se a média (\bar{x}), o desvio padrão (s), o intervalo de confiança ao nível de 95% das 40 amostras de cada ensaio. Calculou-se o coeficiente de variação (cV), precisão ideal ou simplesmente precisão, ou seja, variação dentro do ensaio, das 40 amostras doseadas cada vez.

Como foram realizadas dosagens de 40 amostras em 8 ensaios diferentes, calculou-se a média (\bar{x}), desvio padrão (s), o intervalo de confiança ao nível de 95% dentre os 8 ensaios realizados. Calculou-se o coeficiente de variação (cV), precisão habitual ou reprodutibilidade que mede a variação dentre os 8 ensaios realizados.

Calculou-se a média (\bar{x}), o desvio padrão (s), o intervalo de confiança ao nível de 95%, da média dos tubos 1 e 2 nos 8 ensaios realizados para evidenciar a vantagem da dosagem em duplicatas.

Os cálculos estatísticos obedeceram aos processos clássicos (28) e foram realizados em computador.

III. RESULTADOS

1. Purificação do hormônio de crescimento iodado

O hormônio de crescimento iodado foi purificado através da coluna de Sephadex G 75 médio. Frações de 0,5 ml foram coletadas e contadas em contador automático para radiações gama. A Figura 5 mostra os picos obtidos da eluição do hormônio iodado.

2. Contrôle eletroforético do hormônio de crescimento iodado

Uma amostra do hormônio de crescimento iodado purificado e uma amostra do hormônio iodado sem purificar foram controladas por eletroforese em papel Whatman 3 MM. As tiras secadas e cortadas foram contadas em contador de cintilação para radiação gama. Conforme Figura 6, verifica-se que na purificação elimina-se quase que totalmente a fração degradada e o iodo que não se ligou ao hormônio. Verifica-se, também que o rendimento da iodação foi de aproximadamente 70%.

3. Teste, em carvão, da pureza do hormônio de crescimento iodado

A Tabela II mostra os resultados obtidos com as amostras do hormônio iodado, antes e após purificação pelo Sephadex, testadas por adsorção em carvão. Verifica-se que antes de purificar, havia 69% de HC¹²⁵I. Após purificação, a pureza do hormônio passou para cerca de 95% no eluato nº 8.

4. Teste de precipitabilidade do hormônio iodado. Escolha da diluição do primeiro anticorpo, Acl

Um ensaio prévio com o hormônio iodado e diluído, na ausência

do hormônio não radioativo, fazendo-o reagir com diferentes diluições de anticorpo anti hormônio de crescimento, mostra a Tabela III que a precipitabilidade do hormônio iodado foi de 74,61%; a diluição do anticorpo deve ser de 1:100.000, cuja precipitabilidade foi de 23,25%.

5. Escolha do volume do segundo anticorpo, Ac₂

Verifica-se que a precipitabilidade de complexo Hor* - Ac₂ vai aumentando conforme o aumento do volume de Ac₂ na reação, de acordo com a Figura 7, até atingir um platô. No caso em questão, verifica-se que o volume ideal de Ac₂ é de 150 µl.

6. Curvas padrão e cálculo de amostras

Utilizaram-se, conforme referido em Material e Métodos, 5 diluições diferente do padrão de hormônio de crescimento, obtendo-se 6 pontos para a curva padrão que correspondem a: 0 - 0,25 - 0,5 - 1 - 2 - 4 milimicrogramas de HC por 0,1 ml, considerando-se, para cada ponto, a média das duplicatas realizadas. Nos 8 ensaios realizados, as curvas padrão foram bastantes semelhantes. A Figura 8 mostra uma dessas curvas, a do ensaio V, que é bastante representativa do traçado habitualmente obtido.

Em cada ensaio, a concentração em HC de 40 amostras do "Pool" de soro humano foi calculada por leitura direta na respectiva curva padrão. Verifica-se que o valor encontrado para o "pool" de soro em 320 dosagens variou de 12,25 µg/ml a 20,25 µg/ml da amostra (Tabela IV).

7. Análise estatística dos resultados obtidos

7.1 - Estudo da precisão e reprodutibilidade do método empregado

Nos 8 ensaios consecutivos efetuados, doseando 40 vezes o mes

mo "pool" de sôro humano em cada ensaio, obteve-se uma precisão que variou de 7,37% a 10,93%, com precisão média de 8,9% (Tabela IV). A reprodutibilidade, por sua vez, variou de 4,61% a 16,72%, com a reprodutibilidade média de 8,81% (Tabela IV).

7.2 - Outros tratamentos estatísticos dos resultados das dosagens

Foram calculadas as médias (\bar{x}), desvio-padrão (s), intervalo de confiança ao nível de 95% das leituras das dosagens. Os dados se acham expressos na Tabela IV.

7.3 - Dosagem das amostras em duplicata

Usando-se o recurso de se dosear em duplicata e considerando o resultado como sendo a média das duas dosagens, melhora-se a precisão habitual ou reprodutibilidade. Para tanto, calculou-se a precisão habitual ou reprodutibilidade dos tubos de série 1. O mesmo cálculo foi feito para os tubos de série 2. Calculou-se a média dos tubos 1 e 2 em cada ensaio e determinou-se o coeficiente de variação ou seja, a reprodutibilidade dessas médias. Pelos resultados expressos na Tabela V, verificam-se que os coeficientes de variação dos tubos 1 e dos tubos 2, nos 8 ensaios realizados, situam-se na faixa de 5 a 10% (8,55 e 6,46% respectivamente). Se se considerarem duplicata de 1 e 2, e tirando-se a média dos dois valores, verifica-se que o coeficiente de variação é reduzida a 3,15%.

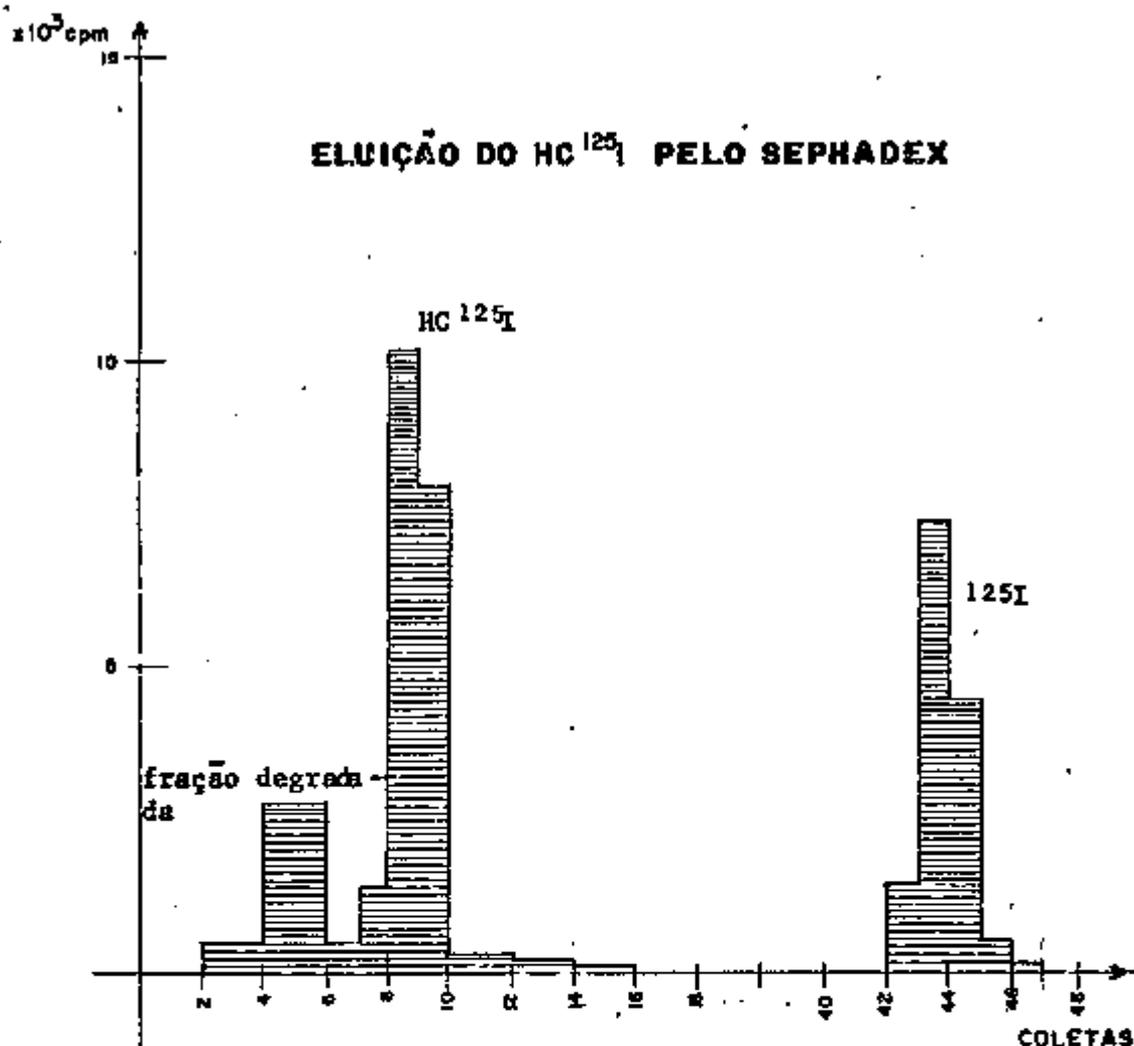


FIGURA 5. Purificação de HC ^{125}I pela coluna de Sephadex. O hormônio iodado é passado através da coluna de 50 cm x 1 cm, contendo sephadex G 75 médio entumecido em tampão veronal. A eluição é feita com tampão veronal albumina, coletando frações de 0,5 ml que são contadas em contador para radiação gama. Inicialmente é eluída a fração degradada; segue-se o hormônio iodado e por último a fração de ^{125}I , que não se ligou ao hormônio.

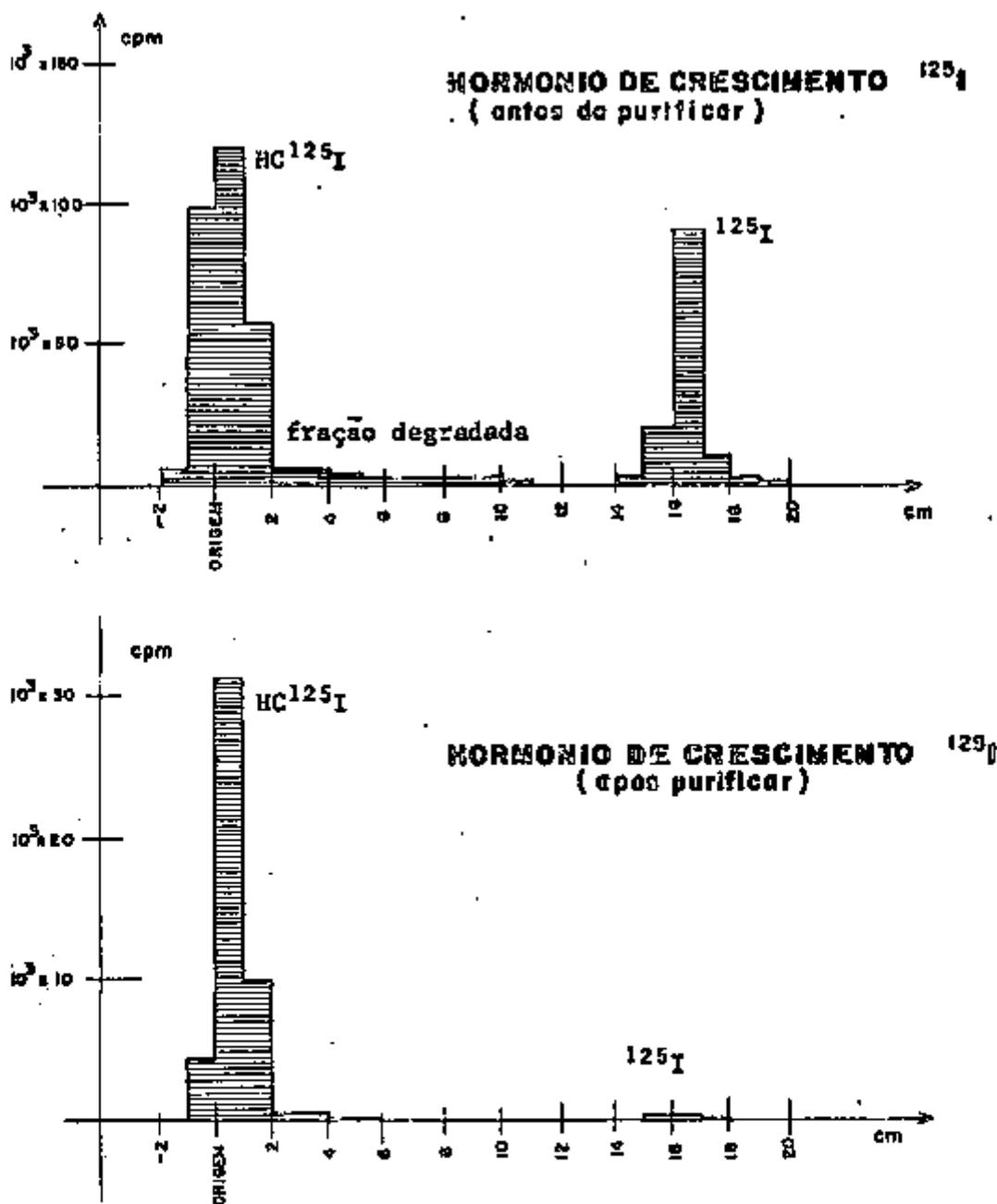


FIGURA 6. Controle do HC^{125}I , antes e após purificação.
 Eletroforese em tampão fosfato pH 7,4, 0,2 M; papel
 Whatman 3 MM; corrida de 1 hora e 250 volts, 2 mA/fita.
 As fitas são secadas e cortadas de cm em cm e contadas
 em contador automático para radiação gama. Com a purifi-
 cação elimina-se a fração degradada e o ^{125}I que não se
 uniu ao hormônio.

TABELA I I

Teste de pureza do HC¹²⁵I, em carvão

	Antes de purificar	Após purificar		
		coleta 7	coleta 8	coleta 9
sobrenadante	7.153 cpm	1.931 cpm	2.370 cpm	1.121 cpm
precipitado	14.331 cpm	20.915 cpm	51.890 cpm	38.189 cpm
% precipitado	69	90	95	90

Amostras do hormônio iodado sem purificar e purificado foram testadas em carvão. Tomou-se alíquotas das amostras, juntou-se 0,1 ml de plasma "azul", 2,4 ml de veronal albumina, 1 ml de carvão. Agitou-se, centrifugou-se. Sobrenadantes e precipitados foram contados em contador para radiação gama. O rendimento da iodação foi de 69%. Depois de purificado, a coleta nº 8 é que apresenta maior pureza, de 95%.

TABELA II \bar{c}

Teste para escolha da diluição do anticorpo.

Tubo	T. borato com 0,5% SAB μ l	HC ¹²⁵ I μ l	Ac ₁ $\frac{\text{volume}(\mu\text{l})}{\text{diluição}}$	SNC μ l	Ac ₂ μ l	Contagem cpm	Média	% precipitação
1	-	50	-	-	-	77.426	78.294	
2	-	50	-	-	-	79.163		
3	450	50	$\frac{50}{1:2500}$	50	150	58.030	58.422	74,61
4	450	50	$\frac{50}{1:2500}$	50	150	58.814		
5	450	50	$\frac{50}{1:75000}$	50	150	22.435	21.873	27,93
6	450	50	$\frac{50}{1:75000}$	50	150	21.511		
7	450	50	$\frac{50}{1:100000}$	50	150	18.103	18.210	23,25
8	450	50	$\frac{50}{1:100000}$	50	150	18.317		
9	450	50	$\frac{50}{1:100000}$	50	150	14.763	14.656	18,71
10	450	50	$\frac{50}{1:150000}$	50	150	14.550		

No ensaio pr \bar{e} vio para escolha da diluição de Ac₁, para o horm \bar{o} nio ioda-
do, junta-se tamp \bar{a} o borato, HC¹²⁵I e Ac₁, nas diluições indicadas. Dei-
xa-se reagir a 4 $^{\circ}$ C por 72 horas. Junta-se a seguir, s \bar{o} ro normal de co-
balo e o Ac₂, deixando reagir por mais 24 horas a 4 $^{\circ}$ C. Centrifuga-se a
2.000 rpm por 30 minutos, decanta-se, lava-se o precipitado com 0,5 ml
de tamp \bar{a} o borato e recentrifuga-se. Decanta-se e o precipitado \bar{e} conta-
do em contador autom \bar{a} tico para radiação gama. A diluição de Ac₁ a
1:100000 foi a adequada.

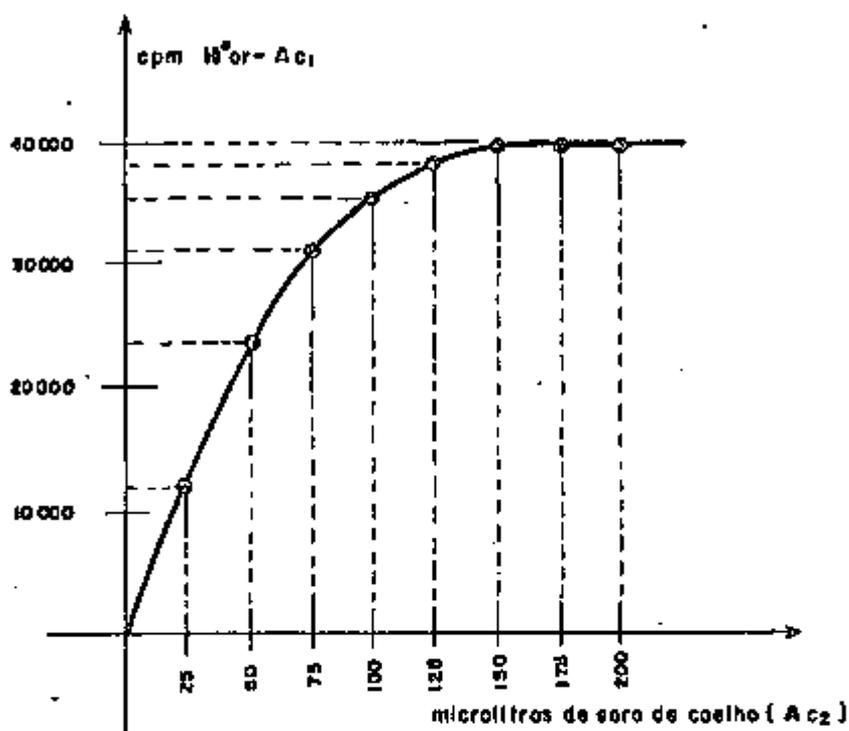


FIGURA 7. Escolha do volume do segundo anticorpo, Ac_2 . Quantidades crescentes de Ac_2 são postas a reagir com 50 μl do hormônio iodado e 50 μl do anticorpo anti hormônio de crescimento diluído 1:100000. Conforme aumenta o Ac_2 , há aumento de precipitabilidade de com-
plexo $\text{Hor}^* - \text{Ac}_1$, até atingir um platô. O volume esco-
lhido para o caso é de 150 μl .

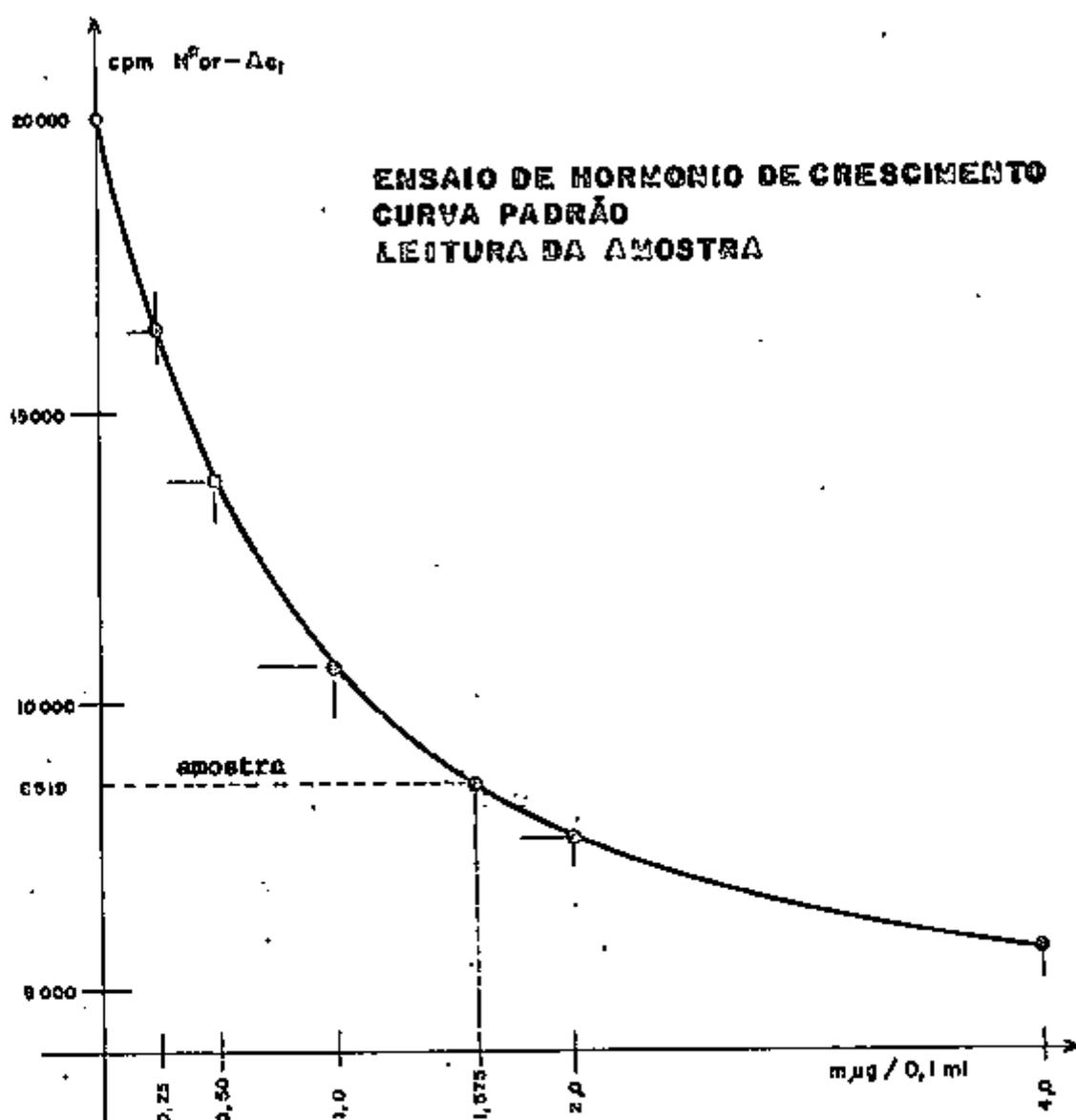


FIGURA 8. Curva padrão e leitura da amostra. As concentrações dos padrões do hormônio são registradas em abscissa e suas contagens em ordenadas: zero - 20.057 cpm; 0,25 - 16.738 cpm; 0,50 - 14.814 cpm; 1,0 - 10.750 cpm; 2,0 - 7.622 cpm; 4,0 - 5.775 cpm. A contagem do precipitado da amostra é levada à curva padrão e sua concentração é lida diretamente: 8.519 cpm - 1,575 µg/0,1 ml ou 15,75 µg/ml.

TABELA IV (Continuação)

Ensaio Número	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	\bar{x}	s	$\bar{x} \pm t_{2,3}$	cV
22	15,75	18,75	16,50	16,25	15,75	15,75	15,50	15,50	16,15	1,12	16,15 \pm 2,66	6,96
23	16,75	15,75	17,75	17,50	17,50	15,75	14,25	15,50	16,34	1,23	16,34 \pm 2,91	7,53
24	15,00	17,00	16,75	15,25	14,75	17,25	18,75	16,75	16,43	1,35	16,43 \pm 3,20	8,24
25	18,25	15,50	15,25	16,75	18,00	14,75	17,75	16,00	16,53	1,35	16,53 \pm 3,19	8,18
26	15,00	15,50	15,00	16,75	17,75	15,25	17,75	16,00	16,12	1,15	16,12 \pm 2,73	7,17
27	14,00	15,00	14,75	16,75	17,25	16,25	16,75	14,50	15,65	1,23	15,65 \pm 2,91	7,86
28	15,75	16,00	17,75	14,00	16,75	16,75	17,50	18,00	16,56	1,30	16,56 \pm 3,09	7,89
29	17,00	18,25	17,25	16,75	19,75	14,50	16,00	15,00	16,06	1,53	16,06 \pm 3,62	9,54
30	18,25	15,00	16,50	15,50	16,50	14,75	13,75	17,50	15,56	1,49	15,56 \pm 3,53	9,37
31	15,25	16,25	14,75	15,75	16,75	16,00	17,75	15,00	15,93	0,98	15,93 \pm 2,33	6,20
32	15,00	17,00	15,00	16,25	15,75	17,00	14,00	17,75	15,96	1,26	15,96 \pm 2,98	7,91
33	15,00	16,25	17,25	17,25	16,50	16,50	15,75	16,00	16,31	0,75	16,31 \pm 1,78	4,61
34	15,25	19,00	14,50	14,00	15,25	14,75	18,00	16,25	15,87	1,76	15,87 \pm 4,18	11,13
35	16,75	14,75	18,75	17,50	16,75	15,75	17,50	17,75	16,93	1,24	16,93 \pm 2,94	7,35
36	15,25	18,25	16,25	16,00	14,50	16,00	16,25	14,25	15,84	1,24	15,84 \pm 2,94	7,86
37	13,75	17,00	17,00	15,75	15,75	15,75	15,75	20,00	16,34	1,78	16,34 \pm 4,22	10,93
38	14,00	16,00	17,25	15,00	15,00	19,00	18,00	15,75	16,25	1,69	16,25 \pm 4,01	10,43
39	15,55	16,25	15,75	16,25	16,70	17,50	17,75	14,75	16,31	0,99	16,31 \pm 2,36	6,11
40	16,00	15,75	15,50	18,00	17,00	16,25	16,00	17,75	16,53	0,99	16,53 \pm 2,22	6,68
\bar{x}	16,23	16,20	16,33	16,18	16,25	16,12	16,18	15,96	\bar{x} = média			
s	1,32	1,72	1,20	1,29	1,44	1,23	1,76	1,59	s = desvio padrão			
$\bar{x} \pm t_{2,3}$	16,23 \pm 2,68	16,20 \pm 3,47	16,33 \pm 2,43	16,18 \pm 2,61	16,25 \pm 2,92	16,12 \pm 2,50	16,18 \pm 3,57	15,96 \pm 3,22	$\bar{x} \pm t_{2,3}$ = intervalo de confiança ao nível de $t = 5\%$ t_1 crítico = 2,023 (39 graus de liberdade) t_2 crítico = 2,265 (7 graus de liberdade)			
cV	8,17	10,60	7,37	8,00	8,90	7,66	10,93	9,97	cV = coeficiente de variação			

Valores encontrados para dosagem de um "pool" de soro, em 8 ensaios consecutivos (I, II...VIII), replicando-se a determinação 40 vezes em cada ensaio (1, 2, 3, ..., 40). Os valores são expressos em milimicrogramas por ml de soro.

TABELA V

Utilização de duplicata no radioimunoensaio.

Tubo	E N S A I O S								\bar{X}	s	$\bar{X} \pm t_{2,s}$	cv
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII				
1	16,50	17,00	17,00	15,25	13,75	17,25	16,75	14,25	15,96	1,36	15,96 \pm 3,22	8,55
2	16,00	15,00	16,50	15,75	17,25	16,00	16,75	18,50	16,46	1,06	16,42 \pm 2,51	6,46
Média 1 e 2	16,25	16,00	16,75	15,50	15,50	16,62	16,75	16,37	16,21	0,51	16,21 \pm 1,03	3,15

I, II, ..., VIII são os 8 ensaios realizados; 1 e 2 são tubos do mesmo ensaio. Os resultados são expressos em milimicrogramas por ml de soro.

\bar{X} - média

s - desvio padrão

$\bar{X} \pm t_{2,s}$ - intervalo de confiança

t_2 - crítico ao nível de 5%, grau de liberdade 7 = 2,365

cv - coeficiente de variação, reprodutibilidade ou precisão habitual

Verifica-se que a reprodutibilidade da média é de 3,15%; separadamente tubos 1 e 2 dão reprodutibilidade de 8,55% e 6,46%.

IV. - DISCUSSÃO

A técnica de dosagem do hormônio de crescimento por radioimunoensaio é , por certo , extremamente elaborada , já que requer correto adestramento em todos os seus detalhes , incluindo preparo dos reagentes , escolha das diluições do anticorpo, conveniente execução técnica dos diversos passos do ensaio , manuseio de micropipetas e microseringas. Todos esses fatores influem de modo direto na precisão e reprodutibilidade do método.

A técnica do radioimunoensaio foi desenvolvida em base a iodação do HC , purificação do mesmo por filtração em gel de Sephadex G 75 médio. Esse material foi controlado eletroforéticamente e por adsorção em carvão , assegurando-se assim o uso de um hormônio radioativo com pureza de cerca de 95%.

Um ensaio prévio utilizando o hormônio iodado , purificado e diluído , forneceu o estabelecimento das diluições adequadas dos dois anticorpos (anticorpo anti hormônio de crescimento e anticorpo anti gamaglobulina de coabio) a serem utilizados nos ensaios.

As provas radioimunológicas levadas a efeito , com utilização de duplo anticorpo , hormônio iodado , padrões de HC e amostras , permitiram a construção de curvas padrão , bem como o cálculo de concentração nas diferentes amostras doseadas. Forneceu , assim , a concentração de HC nas 320 amostras em 8 ensaios realizados , verificando-se que houve uma variação de 12,25 µg/ml a 20,25 µg/ml no " pool " de sôro humano doseado.

Verificou-se que a variação para a precisão do método foi de 7,37% a 10,39%, enquanto que a variação para a sua reprodutibilidade foi de 4,64% a 16,72%.

Por outro lado, o critério de se usar média de duplicatas reduziu sensivelmente o coeficiente de variação entre os 8 ensaios realizados, melhorando, assim , a reprodutibilidade do método, ajustando - a para faixa considerada ótima em dosagens bioquímicas. Considera-se precisão excelente quando o coeficiente de variação é menor do que 5% ; boa quando entre 5 a 10% ; regular ou má quando superior a esses resultados.

V. - CONCLUSÕES

1. O método de dosagem de hormônio de crescimento pelo duplo anticorpo , técnica radioimunológica , representará importante subsídio para estudos e pesquisas endocrinológicas e metabólicas.

2. O método apresenta uma precisão média de 8,95% e uma reprodutibilidade média de 8,81%.

3. É conveniente o uso de dosagem em duplicata , pois , tal recurso permite o aprimoramento da precisão do método.

VI. - SUMÁRIO

Foi desenvolvido o método de dosagem do hormônio de crescimento pelo radioimunoensaio , usando duplo anticorpo . Após conveniente adestramento e familiarização com o método , em seus diversos aspectos, tais como preparo e escolha dos reagentes, rigor na execução técnica do ensaio , realizou-se a avaliação de sua precisão e reprodutibilidade.

Tal estudo compreendeu a dosagem de um " pool " de sôro humano em 8 ensaios consecutivos , tendo sido feitas 40 dosagens em cada ensaio.

A precisão média foi de 8,95% (variando de 7,37% a 10,93%). A reprodutibilidade média foi de 8,81% (variando de 4,61% a 16,72%) .

Evidencia-se que o recurso de se considerar o resultado como sendo a média de dosagens em duplicata , melhora a reprodutibilidade do ensaio.

VII. - BIBLIOGRAFIA

1. Bergenstral, D.M.; Lobus, H.A.; Hallman, L.F.; Patten, J.; Levine, H.J. and Li, C.H.
Metabolic effects of human and monkey GH in man.
J. Lab. Clin. Med., 50, 791 (1957).
2. Berson S.A., Yalow, R.S., Bauman, A.; Rothschild, M.A.; Newerly, K.
Ins. ¹³¹I metabolism in human subjects: Demonstration of insulin binding globulin in the circulation of insulin treated subjects.
J. Clin. Invest., 35, 170 (1956).
3. Berson, S.A. and Yalow, R.S.
Isotopic tracers in the study of diabetes.
Advances in Biological and Medical Physics 6 (Tobias C.A.; Lawrence, J.H. Eds.). Academic Press, N.Y. (1958).
4. Catt, K.J.; Niall, H.D. and Treager, G.W.
Solidphase radioimmunoassays of human GH.
Biochem. J., 100, 31 c(1966)
5. Catt, K.J. and Treager, G.W.
Solidphase radioimmunoassay of HGH.
Nature, 213, 825 (1967).
6. Catt, K.J. and Treager, G.W.
Solid phase radioimmunoassay.
Proceedings of the International Symposium, Liège, Pag. 45, (1968)
Excerpta Medica Foundation.
7. Fitschen, W.
A quantitative study of antigen-antibody combination during disk eletroforesis in acrymalide gel, using ¹³¹I labelled human growth hormone.
Immunology, 7, 307 (1964).

8. Forsman, O. and Genzell, C.A.
Plasma levels of GH in patients with diabetis millitus, hypercholesterolaemia and liver diseases.
Acta Endocr., 32, 480 (1959).
9. Genzell, C.C.
Determination of GH in human plasma.
J. Clin. Endocr., 19, 1049 (1959).
10. Glick, S.M.; Roth, J.; Yalow, R.S. and Serson, S.A.
Immunoassay of HGH
Nature, 199, 784 (1963).
11. Greenwood, F.C. and Hunter, W.M.
The preparation of ^{131}I labelled GH of high specific radioactivity.
Biochem. J., 89, 114 (1963)
12. Haber, E. Page, L.B. and Richards, F.F.
Radioimmunoassay employing gel filtration.
Analyt. Biochem. 12, 163 (1965).
13. Hales, C.H.; Randle, P.J.
Immunoassay of insulin with insulin antibody precipitate.
Biochem. J., 88, 137 (1963).
14. Hayashida, T. and Li, C.H.
An immunological investigation of human pituitary GH.
Science, 128, 1276 (1958).
15. Herbert, V.
Coated charcoal separation of free labelled hormone from hormone bound to antibody.
Excerpta Medica Foundation 1 CS 165 (1968) 55.

16. Hunter, W.M. and Greenwood, F.C.
Preparation of iodine ^{131}I labelled human GH of high specific activity.
Nature, 194, 495 (1962).
17. Hunter, W.M., and Greenwood, F.C.
A radioimmuno-electrophoretic assay for hGH.
Biochem. J. 91, 43, (1964).
18. Lazarus, L. and Young, J.D.
Radioimmunoassay of hGH using ion exchange resin.
J. Clin. Endocr., 26, 213 (1966).
19. Li, C.H., Mondgal, N.R. and Papkoff, H.
Immunological investigations of h. pituitary GH.
J. Biol. Chem., 235, 1038 (1960).
20. Meade, R.C. and Klitgaard, H.M.
A simplified method for immunoassay of human serum insulin.
J. Nucl. Med. 3, 407, (1962).
21. Morgan, C.R. and Lazarow, A.
Immunoassay of insulin: two antibody system: plasma insulin levels of normal, subdiabetic and diabetic rats.
Diabetes, 12, 115 (1963).
22. Morgan, C.R.
hGH immunoassay; two antibody method using ^{125}I tracer.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 121, 62 (1966).
23. Morgan, C.R.
Two antibody system for radioimmunoassay of protein hormones.
Excerpta Medica Foundation LCS, 161 (1968) 49.

24. Pupo, A.A.; Marreiro, D.
Dosagem de insulina pelo Radioimunoensaio com duplo anticorpo.
Rev. da Associação Médica Brasileira, 16, 153 (1970).
25. Rosselin, G.; Assan, R.; Yalow, R.S. and Berson, S.A.
Separation of antibody bound and unbound peptide hormones labelled
with iodine ^{131}I by talcum powder and precipitated silica.
Nature, 212, 355 (1966).
26. Roth, J.; Glick, S.M.; Yalow, R.S. and Berson, S.A.
Hypoglycemia. A potent stimulus to secretion of GH.
Science, 140, 987 (1963).
27. Soeldner, J.S. and Slone, D.
Critical variables in the Radioimmunoassay of serum Insulin using
the double antibody technic.
Diabetes, 14, 771 (1965).
28. Steel, R.G.D. and Torrie, J.H.
Principles and Procedures of Statistics with Special Reference to
the Biological Sciences.
Mc Graw-Hill Book Company, N.Y. (1960)
29. Wool, M.S. and Selenkow, H.A.
Charcoal-dextran radioimmunoassay of HGH.
Acta Endocr., 57, 109 (1968).
30. Yalow, R.S. and Berson, S.A.
Immunoassay of endogenous plasma insulin in man.
J. Clin. Invest., 39, 1157 (1960).