

BR7403073



**PADRONIZAÇÃO E APLICAÇÃO CLÍNICA DO RADIOIMUNOENSAIO DE
SOMATOMEDINA B SÉRICA HUMANA. DESENVOLVIMENTO DO
MÉTODO DE RADIOIODAÇÃO ENZIMÁTICA**

Elsie Neiva Domingues da Silva Gomes

**DISSERTAÇÃO E TESE - IEA 123
IEA - DT - 123**

JANEIRO/1979

CONSELHO DELIBERATIVO

MEMBROS

Klaus Reinach – Presidente
Roberto D'Utra Vaz
Heicio Modesto da Costa
Ivano Humbert Marchesi
Admar Cervellini

PARTICIPANTES

Regina Elisabete Azevedo Beretta
Flávio Gori

SUPERINTENDENTE

Rômulo Ribeiro Pieroni

**PADRONIZAÇÃO E APLICAÇÃO CLÍNICA DO RADIOIMUNOENSAIO DE
SOMATOMEDINA B SÉRICA HUMANA. DESENVOLVIMENTO DO
MÉTODO DE RADIOIODAÇÃO ENZIMÁTICA**

Elsie Neiva Domingues da Silva Gomes

**Dissertação para obtenção do Título de "Mestre - Área
Tecnologia Nuclear" - Orientador Dr. Gian Maria A. A.
Sordi. Apresentada e defendida em 6 de setembro de 1978,
ao Instituto de Energia Atômica.**

**INSTITUTO DE ENERGIA ATÔMICA
SÃO PAULO - BRASIL**

Série DISSERTAÇÃO E TESE IEA

INIS Categories and Descriptors

C45

Radioimmunoassay

STH

Labelling

Iodine 125

Nota: A redação, ortografia e conceitos são de responsabilidade dos autores.

SUMÁRIO

	Página
1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 – Importância dos Radioisótopos em Medicina e Biologia	1
1.2 – Provas "In Vitro"	2
1.3 – Radioimunoensaio	3
1.3.1 – Histórico	3
1.3.2 – Aplicação	4
1.3.3 – Princípios do Método	4
1.3.4 – Procedimento	5
1.3.4.1 – Seleção do Anti-Soro	5
1.3.4.2 – Antígeno Marcado	5
1.3.4.3 – Imunoensaio	10
1.3.4.4 – Técnicas de Separação das Frações Livres e Ligadas ao Anticorpo ..	10
1.3.4.5 – Curva Padrão	10
1.4 – Objetivos	11
2 – SOMATOMEDINAS	11
2.1 – Histórico	11
2.2 – Constituição Química	12
2.3 – Fontes de Produção das Somatomedinas e Ação Biológica	13
2.4 – Ensaio das Somatomedinas	13
2.5 – Correlação das Somatomedinas com o GH	14
2.6 – Radioimunoensaio da Somatomedina B	14
3 – EQUIPAMENTO, MATERIAL E MÉTODO	15
3.1 – Equipamento	15
3.1.1 – Empregado na Pesagem dos reagentes das Soluções	15
3.1.2 – Empregado na Iodação Biológica	15
3.1.3 – Empregado na Purificação da Mistura de Iodação	16
3.1.4 – Empregado na Cromatografia	15
3.1.5 – Empregado na Eletroforese em Gel de Poliacrilamida	16
3.1.6 – Empregado na Separação das Frações Livres e Ligadas ao Anticorpo	16
3.1.7 – Empregado na Determinação de Atividades	16
3.1.8 – Empregado na Confecção de Gráficos e Determinação de Áreas	16
3.2 – Iodação Biológica	16
3.2.1 – Reagentes e Soluções Usados no Processo	16

3.2.2 – Material Biológico	17
3.2.3 – Procedimento da Iodação Enzimática da Somatomedina B	17
3.3 – Cromatografia em Coluna de Exclusão Molecular – Sephadex	17
3.3.1 – Material Empregado	17
3.3.2 – Procedimento da Purificação em Gel Sephadex	18
3.4 – Análise da Eficiência das Técnicas de Marcação e Purificação	20
3.4.1 – Cromatoelektroforese em Papel	20
3.4.1.1 – Material Empregado	20
3.4.1.2 – Procedimento	20
3.4.2 – Auto-Radiografia	21
3.4.2.1 – Material Empregado	21
3.4.2.2 – Procedimento	21
3.4.3 – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida	23
3.4.3.1 – Material Usado	23
3.4.3.2 – Procedimento	24
3.4.4 – Teste de Imureatividade	26
3.4.4.1 – Reagentes e Soluções Empregados	26
3.4.4.2 – Procedimento	27
3.4.5 – Estabilidade da Preparação	27
3.4.6 – Atividade Específica	27
3.5 – Avaliação das Condições Ótimas para o Ensaio	28
3.5.1 – Escolha da Quantidade de Traçador a ser Usado	28
3.5.2 – Escolha do Título ou Diluição do Anti-Soro	29
3.5.3 – Efeito da Temperatura	29
3.5.4 – Tempo de Incubação	29
3.5.5 – Diluição Adequada do Segundo Anticorpo	29
3.6 – Ensaio da Somatomedina B	29
3.6.1 – Material Empregado	29
3.6.2 – Procedimento	30
3.6.3 – Determinação das Concentrações das Amostras	31
3.7 – Análise da Técnica	33
3.7.1 – Especificidade	33
3.7.2 – Exatidão	33
3.7.3 – Sensibilidade	34
3.7.4 – Precisão	34
3.7.4.1 – Reprodutibilidade Intra-Ensaio	34
3.7.4.2 – Reprodutibilidade Inter-Ensaio	34
3.7.5 – Estudos das Características da Curva Padrão	35

	Página
3.8 – Determinação da Concentração de Amostras de Soros	35
4 – RESULTADOS	35
4.1 – Resultados das Purificações	35
4.2 – Resultados das Análises	41
4.2.1 – Cromatoeletroforese e Auto-Radiografia	41
4.2.2 – Resultados da Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE)	41
4.2.3 – Resultado da Determinação de Atividade Específica	52
4.3 – Resultado das Avaliações das Condições Ótimas	53
4.3.1 – Quantidade de Traçador a ser Usado	53
4.3.2 – Escolha do Título do Anti-Soro	53
4.3.3 – Tempo de Incubação	53
4.3.4 – Diluição do Segundo Anticorpo	53
4.4 – Resultados da Curva Padrão do Ensaio de Somatomedina B	53
4.5 – Resultados das Características Intrínsecas do Método	59
4.5.1 – Especificidade	59
4.5.2 – Exatidão	59
4.5.3 – Sensibilidade	64
4.5.4 – Precisão	64
4.5.4.1 – Reprodutibilidade Intra-Ensaio	64
4.5.4.2 – Reprodutibilidade Inter-Ensaio	64
4.6 – Concentrações Séricas de Somatomedina B	66
5 – DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	66
5.1 – Dos Resultados das Purificações	66
5.2 – Das Análises	68
5.3 – Das Avaliações das Condições Ótimas	70
5.4 – Das características do Método	71
5.5 – Dos Níveis Séricos de SM-B Encontrados	71
6 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	72
APÊNDICE	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

PADRONIZAÇÃO E APLICAÇÃO CLÍNICA DO RADIOIMUNOENSAIO DE SOMATOMEDINA B SÉRICA HUMANA. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE RADIOIODAÇÃO ENZIMÁTICA

Elsie Neiva Domingues da Silva Gomes

RESUMO

Padronizaram-se as diferentes fases para o radioimunoensaio de SM-B, efetuando a radioiodação pelo método enzimático e a purificação em Sephadex G-25 fino e posterior repurificação em G-75. Demonstrou-se que a preparação de SM-B marcada com ^{125}I , apresenta pureza radioquímica de 99,8%, atividade específica média determinada pelo método de auto deslocamento de $54,1 \pm 3,6 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ e ligação de 98% em presença de excesso de anticorpo.

A separação das frações livres e ligadas foi feita pelo método do segundo anticorpo, após um período de incubação de 4 dias a 4°C .

A análise estatística do método demonstrou a sua especificidade, analisada através do estudo do efeito de diluição do soro em determinações de SM-B endógena. O coeficiente de correlação entre os diferentes volumes de soro e valores obtidos foi $r=0,9944$. O estudo da exatidão, demonstrou recuperações de soros, adicionados à solução padrão, de 83% e 103% para respectivamente 0,21 e 1,03 ng/ml de SM-B adicionada. O coeficiente de correlação entre os valores esperados ou teóricos e os obtidos nas provas de recuperação, foi $r=0,9933$. A precisão foi estimada pela reprodutibilidade intra e inter-ensaios. O primeiro caso, acusou coeficientes de variação de 9,7; 5,1 e 4,9% respectivamente, para as análises dos soros com elevado, médio e baixo teor de SM-B. Os coeficientes de variação na reprodutibilidade inter-ensaio foram de 11,1; 7,0 e 7,9% para valores altos, médios e baixos de SM-B respectivamente.

A sensibilidade da técnica determinada por análise discreta dos pontos iniciais da curva padrão, resultou em 0,31 ng/ml e 0,37 ng/ml no ponto de 90% de ligação.

Finalmente apresenta-se os níveis de SM-B séricos encontrados em indivíduos normais e com alterações da secreção de HGH.

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Importância dos Radioisótopos em Medicina e Biologia

Os radioisótopos são largamente utilizados em medicina nuclear e biologia, na forma de fontes de irradiação e na forma de traçadores. No primeiro caso, os radionuclídeos não interagem diretamente com o meio irradiado, este apenas recebe as radiações emitidas pelo radioisótopo. No segundo, o próprio radioisótopo interage com o sistema em análise e é incorporado por este.

As fontes de irradiação são amplamente empregadas em radioterapia⁽²⁴⁾ e o seu uso se faz quer a distância, quer em contato com o material biológico, sendo particularmente úteis no tratamento de tumores malignos. As fontes radioativas são também usadas em radiobiologia⁽¹⁹⁾, onde a irradiação de

cultura de tecidos ou células dá subsídio ao entendimento dos efeitos da radiação à nível de biologia molecular⁽⁴³⁾ e ao estudo da radiosensibilidade⁽⁴⁴⁾ de diferentes organismos, bem como os efeitos de substâncias radioprotetoras e radiosensibilizadoras⁽¹⁹⁾, frente à exposição em diversos níveis de doses de radiação.

Os traçadores⁽³¹⁾, mediante contato íntimo e interação com o sistema biológico, são empregados em medicina nuclear para terapêutica e sobretudo para diagnóstico. No primeiro caso, os traçadores visam a destruição celular decorrente da incorporação de determinado radiofármaco administrado em alta atividade. Cita-se o emprego do iodeto em atividade elevada, que se presta ao tratamento exigido em circunstâncias onde pretende-se suprimir parcial ou totalmente a glândula tireoidiana⁽²⁴⁾.

No caso de diagnóstico, o uso de traçadores pode ser classificado como "in vivo" e "in vitro", na dependência do radioisótopo ser introduzido no organismo em análise, ou somente entrar em contato com o material biológico através dos fluidos corpóreos sem a prévia administração do radionuclídeo. O uso de traçadores nas provas "in vivo", implica na administração de radioisótopos ao paciente para posterior detecção externa das radiações provenientes do corpo. A utilidade clínica do radiofármaco empregado é dependente da capacidade do radionuclídeo concentrar-se seletivamente em determinado órgão de interesse. Em respeito a esta limitação, os radioisótopos são administrados sob diversas formas químicas. É o caso por exemplo do iodo que se mostra um elemento de grande valia em medicina nuclear, dado a sua vasta utilização nas provas isotópicas. A administração de iodo sob a forma aniônica, ocasiona a retenção deste elemento na glândula tireoidiana, em consequência da captação do iodeto pelas células da tireóide. Desta forma, é possível a avaliação do estado funcional e da conformação da glândula por meio dos estudos de captação e cintilografia tireoidianas. Em contrapartida, quando o iodo é usado na cintilografia pulmonar, emprega-se o composto de macro-agregado de albumina marcada com este elemento.

O uso de traçadores nas provas "in vitro" implica na marcação da substância de interesse, utilizando-se um radioisótopo adequado, sem expor o organismo em estudo aos efeitos da radiação. Como exemplo, cita-se a determinação da concentração de hormônios no sangue, mediante a utilização de hormônios marcados com ¹²⁵I sem a prévia introdução deste isótopo no organismo de interesse.

1.2 – Provas "In Vitro"

O uso de traçadores nas provas "in vitro"⁽³¹⁾ permite a mensuração das substâncias existentes em quantidades diminutas nos fluidos corpóreos. Os métodos químicos e biológicos usuais⁽⁴⁸⁾, mostram-se pouco sensíveis e carentes de especificidade, tornando-se, portanto, inadequados para a determinação de substâncias existentes em micro quantidades, tais como os hormônios. As técnicas⁽³¹⁾ que fazem uso de substâncias marcadas com traçadores radioativos e que consistem na competição de duas formas da mesma molécula, uma marcada e outra não radioativa, para ocuparem os sítios de ligações de uma terceira de menor concentração, são denominadas genericamente de ensaios por ligação competitiva – "Competitive Binding Assay" (CBA) ou de análise por saturação, este último sugerido por Barakat e Ekins em 1961⁽²³⁾. As bases dessas técnicas foram anunciadas por Yalow e Rerson em 1959 na determinação de Insulina por radioimunoensaio (RIA)⁽³⁾ por Ekins em 1960 na dosagem de tiroxina pela análise por ligação competitiva proteica⁽²³⁾. As origens dessas técnicas repousam no conceito de complexo antígeno-anticorpo.

Antígeno é qualquer material que, ao penetrar no organismo, é capaz de provocar a formação de seu antagonista fundamental. Anticorpo é uma proteína da classe das globulinas, formada pelo organismo em resposta ao estímulo antigênico. A molécula do anticorpo⁽⁴⁸⁾ difere da molécula de uma globulina normal por possuir uma área de configuração complementar àquela do grupo antigênico com o qual ela reage. A área complementar é denominada sítio de ligação e ocupa aproximadamente 1% da superfície da molécula de gama globulina que tem um peso molecular de 160.000⁽⁴⁸⁾.

A capacidade demonstrada pelos anticorpos de somente reagirem com o antígeno usado para produzi-los, é denominada especificidade. Esta propriedade é de extrema importância, desde que torna possível não somente a detecção mas também a determinação de antígenos em misturas, que de outra forma seriam de difícil quantificação.

Após as observações da formação de anticorpos por Collip e Anderson em 1934⁽³⁰⁾, por repetidas injeções de tirotopina bovina em ratos, desenvolveu-se o conceito de complexo antígeno-anticorpo.

Desde então, muitos progressos foram feitos⁽³¹⁾, permitindo dosagens de vários hormônios, como também de moléculas pequenas até mesmo íons. Assim surgiram outras técnicas^(2,23,31,41,58,68,73), nas quais o uso dos anticorpos foram substituídos por outras moléculas. De acordo com a molécula usada, as técnicas recebem diferentes denominações. No caso de ser uma proteína de ocorrência natural, é designada de ensaio por ligação competitiva proteica – “Competitive Protein-Binding Assay” (CPBA). Os primeiros a fazerem uso de tal procedimento foram Ekins⁽²³⁾ e Murphy⁽⁵⁸⁾. Quando a proteína empregada é o anticorpo, a terminologia usual é radioimunoensaio “radioimunoassay” (RIA)⁽²⁾. Quando usamos uma enzima, o ensaio passa a ser chamado radioenzimático⁽³¹⁾. Quando se emprega anticorpos marcados, específicos para determinado antígeno, a técnica recebe o nome de ensaio imunorradiométrico. Esta técnica foi desenvolvida por Miles e Hales em 1968^(34,41). Há ainda outra análise denominada ensaio por receptores, primeiramente usados por Lefkowitz e Goodfriend em 1969 no estudo da interação de ¹²⁵I – ACTH e ¹²⁵I – angiotensina, respectivamente, com os receptores específicos das células alvo⁽⁷³⁾.

Conforme demonstrado pelo estudo da ligação de hormônios peptídicos a receptores específicos, o primeiro passo para a ação de hormônios em tecidos alvos, é a sua ligação com os sítios receptores específicos das células alvo⁽⁷³⁾. O uso de receptores em substituição ao uso de anticorpos, permite a quantificação de hormônios biologicamente ativos^(68,73) no plasma.

O princípio de todas estas técnicas é o mesmo e consiste no seguinte: se uma proteína com capacidade ligante (P), apresentando sítios de ligações específicos, é colocada em contato com determinado substrato (S), formar-se-á um complexo P – S no meio de reação. Se um substrato marcado isotopicamente (S*) é adicionado a esse meio de reação, um complexo P – S* também se formará. A ligação do substrato à proteína ligante é reversível e conseqüentemente, a adição do substrato em concentração tal que exceda o número de sítios disponíveis da proteína ligante, resultará na competição dos substratos marcados S* e não marcados (S) para ocupar os sítios disponíveis. Esta competição será proporcional à concentração existente de S* e S, obedecendo a lei de ação das massas. Se as amostras de P e S* são mantidas constantes, a adição do substrato não marcado (S) levará à formação de maior quantidade do complexo P – S e à conseqüente diminuição da formação do complexo P – S*. Assim, quantidades desconhecidas de S podem ser lidas diretamente da curva padrão, que foi obtida pela adição de quantidades crescentes e conhecidas de S a quantidades fixas de P e S*.

Embora as técnicas sejam usadas principalmente para a determinação de hormônios, o princípio geral pode teoricamente ser aplicado a qualquer substâncias, desde que um agente com capacidade ligante seja utilizado de forma adequada à determinada situação.

1.3 – Radioimunoensaio

1.3.1 – Histórico

A importância do desenvolvimento desta técnica pode ser aplicada se levarmos em consideração alguns fatos: as análises químicas e biológicas⁽⁴⁸⁾ disponíveis até o final da década de 50, careciam de sensibilidade e especificidade necessárias para a quantificação de substâncias presentes em níveis extremamente baixos, tais como os hormônios^(30,41,91). As concentrações plasmáticas de hormônios

tireoidianos e esteróidicos eram determinadas por técnicas químicas não específicas, tais como a solubilidade diferencial destes compostos ou o conteúdo de iodo nos hormônios tireoidianos⁽³⁰⁾. A inexistência de especificidade destas técnicas resultavam na mensuração de proteínas plasmáticas estruturalmente similares e em concentrações bem superiores àquelas dos hormônios peptídicos plasmáticos.

Em contrapartida, o radioimunoensaio^(41,91) oferece a sensibilidade, especificidade, precisão e praticabilidade exigidas, tornando exequível a micro-determinação de uma substância específica, a despeito da presença de várias outras existentes no mesmo sistema em estudo, com pouca ou frequentemente nenhuma interferência destas. O uso de antígenos marcados permite a quantificação de sua concentração em pg/ml, valor este que é inferior àquele normalmente encontrado no meio biológico, ainda que se use para a sua determinação, volumes de soros menores que 0,1 ml.

Berson e Yalow reconheceram a necessidade de dispor de um método sensível e específico que possibilitasse a dosagem de hormônios peptídicos, e introduziram os métodos radiométricos para determinar a reação antígeno-anticorpo⁽⁴⁾.

A extraordinária especificidade da reação e sua mensuração foram analisadas⁽³⁾, e estudos posteriores culminaram com o uso de anti-soros adequados, permitindo o desenvolvimento de um ensaio sensível o suficiente para possibilitar a medida de insulina plasmática humana⁽⁹³⁾.

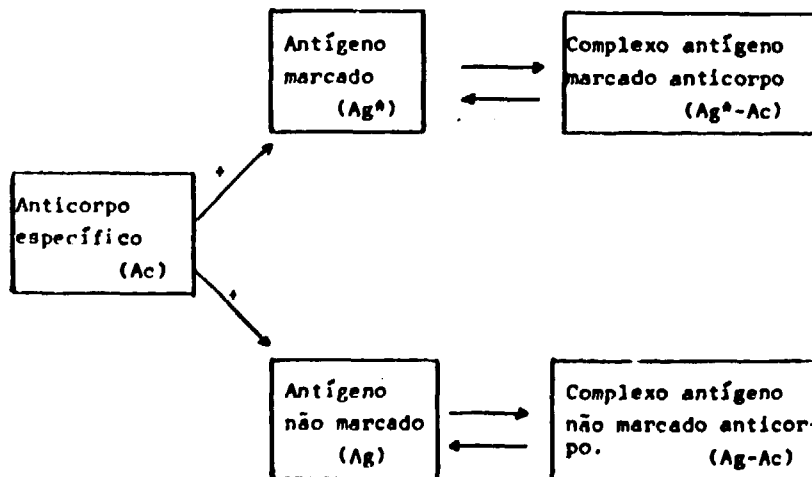
1.3.2.— Aplicação

A aplicação e o desenvolvimento da técnica de radioimunoensaio revolucionou a endocrinologia. A sua utilização em outros campos tais como virologia e toxicologia tornou possível a mensuração de diversas substâncias⁽³⁰⁾ e o entendimento de mecanismos fisiológicos e patológicos em diversos campos tais como em gastroenterologia, hematologia, nefrologia, oncologia e farmacologia.

1.3.3 — Princípios do Método

A reação, como já salientamos, obedece à lei de ação das massas e é descrita pela expressão:

$$Ag + Ac \xrightleftharpoons[K_1]{K_2} Ag - Ac$$
 onde K_1 = constante de associação e K_2 = constante de dissociação, que pode ser melhor visualizada pelo esquema seguinte:



A reação é reversível e, em decorrência da baixa concentração usada de anticorpo, a adição de antígeno não marcado à mistura produzirá uma competição quantitativa com aquele marcado. Assim quanto maior a quantidade de antígeno não marcado no meio da reação, menor quantidade de anticorpo estará disponível para a ligação com o marcado. Mantendo constante a quantidade de anticorpo e de antígeno marcado correspondente, a adição de padrões de antígeno não marcado em concentrações crescentes, ocasionará um deslocamento proporcional daquele marcado a partir do complexo antígeno-anticorpo ($Ag^* - Ac$) em obediência a lei da ação das massas.

1.3.4 – Procedimento

O método consiste em: seleção do anti-soro, preparação do antígeno, imuno ensaio, separação das frações livres e ligadas ao anticorpo após atingirem o equilíbrio de reação, determinação das atividades correspondentes, construção da curva padrão, leitura das concentrações das amostras a partir da curva.

Embora as diferentes substâncias dosadas pela técnica de radioimunoensaio obedçam ao mesmo procedimento do método, cada técnica apresenta problemas individuais que devem ser analisados e solucionados para cada caso particular.

1.3.4.1 – Seleção do Anti-soro

As técnicas de radioimunoensaio requerem a produção de anticorpos capazes de se ligarem especificamente às substâncias que se deseja quantificar. O anticorpo é produzido injetando-se a substância a ser medida (antígeno) em animal de outra espécie repetidas vezes, até que haja a formação de anticorpos capazes de reagirem com o antígeno formador.

A experimentação imunológica mostrou que a molécula de anticorpo (Ac) com um peso molecular médio de 160.000 contém dois sítios de ligação⁽⁴⁸⁾. O tratamento termodinâmico dos dados, na experimentação imunológica, indica que as forças de ligações entre os sítios disponíveis dos anticorpos e os antígenos específicos, apresentam baixa energia de ligação, da ordem daquelas encontradas em pontes de hidrogênio⁽⁵⁹⁾. Apesar da baixa energia de ligação, as constantes de associações intrínsecas refletem um alto grau de complexação na reação de anticorpos com os haptenos para formarem complexos⁽³⁰⁾. O antígeno marcado usado na reação, combina com o anticorpo específico para formar o complexo antígeno marcado-anticorpo.

O anti-soro^(30,41) deve conter anticorpos de especificidade apropriada, com uma alta constante de afinidade e com um título suficiente para um razoável número de ensaios.

A diluição ou título apropriado do anti-soro⁽⁴¹⁾ deve ser tal que permita uma ligação de 50% do antígeno radioativo com o anticorpo, na ausência de antígeno não marcado.

A sensibilidade do ensaio depende da diluição apropriada do anti-soro e da atividade específica (a.l.) do antígeno⁽³⁰⁾.

1.3.4.2 – Antígeno Marcado

O preparo do antígeno marcado requer a seleção do radionuclídeo, a marcação do antígeno, a purificação e a avaliação do procedimento empregado. A escolha do radionuclídeo^(18,30,40,41) baseia-se especialmente na a.l. que se deseja obter e na estabilidade do composto marcado.

Os radionuclídeos de meia vida longa, como ^{14}C (5.740 anos) e 3H (12,3 anos) apresentam a vantagem de serem diretamente incorporados às cadeias de moléculas orgânicas⁽¹⁸⁾. Consequentemente,

a marcação de antígenos com estes radionuclídeos não acarretaria a diminuição da capacidade imunorreativa⁽⁴⁵⁾. Contudo, a sensibilidade desejável no método de radioimunoensaio não pode ser obtida com a incorporação de radionuclídeos de meia vida longa pelo fato destes possuírem baixa taxa de desintegração. Assim o uso do ^{14}C e ^3H é restrito a casos especiais, onde a marcação do antígeno com os radionuclídeos emissores gama ocasiona a perda de imunorreatividade em consequência de extensas modificações estruturais na molécula do antígeno. Entretanto, esta necessidade de preservação da identidade molecular leva à desvantagem da obtenção de compostos marcados com ^3H ou ^{14}C de baixa atividade específica. Os hormônios são encontrados em baixas concentrações plasmáticas, necessitando de um sistema sensível para a sua detecção. Os radioisótopos do iodo ^{131}I e ^{125}I , oferecem numerosas vantagens para a marcação de antígenos em radioimunoensaio, quando comparados com os nuclídeos de meia vida longa, ^{14}C e ^3H .

Um átomo de ^{131}I substituído numa molécula de insulina produz uma taxa de desintegração 200 vezes maior do que aquela obtida se todos os 263 átomos de carbono na molécula fossem substituídos pelo ^{14}C ⁽¹⁶⁾. Altas atividades específicas são obtidas com procedimentos químicos relativamente simples de marcação de antígenos com iodo, com retenção satisfatória de imunorreatividade. Entretanto, as vantagens do uso ^{125}I sobrepujam as do ^{131}I ^(25,16,41).

A menor eficiência de contagens obtidas com ^{131}I , o maior dano potencial ao antígeno causado pela radiação beta, e a sua menor meia vida, favorecem o uso do ^{125}I ⁽²⁵⁾. Na maioria dos laboratórios, um tempo médio de seis dias decorre entre a marcação do hormônio e a contagem das amostras. Ao final deste período, o ^{131}I perde 40% da sua atividade inicial, enquanto o ^{125}I retém 94%. Além destas vantagens, o ^{125}I possui maior a.ℓ. e é praticamente livre de carreadores.

As marcações ou iodações biológicas⁽⁵⁴⁾ ocorrem pela substituição do iodo pelo átomo de hidrogênio na molécula da proteína. O radioiodo é fornecido na forma de iodeto, tornando-se necessário o uso de agente que promova a sua oxidação, em todos os processos que envolvem esta reação, pois somente o iodo na forma livre reage com a proteína.

Embora em certas circunstâncias o iodo possa reagir com os grupos sulfidril^(39,48), triptofano⁽⁵⁴⁾ e histidina⁽¹²⁾, a reação principal e em maior grau ocorre com a tirosina^(45,54,79).

As reações do iodo com as tirosilas⁽¹⁶⁾ envolvem um mecanismo iônico entre (ou fenolato daquele grupo e a forma catiônica do iodo (I^+) formada no meio aquoso de reação a partir do iodo livre (I_2). As condições de iodação são otimizadas em pH levemente alcalino e dependem da concentração do iodo utilizado.

Inicialmente, vários agentes oxidantes foram usados, como nitrato, persulfato, como também o uso de iodo ativo pré-formado em iodeto de potássio⁽³⁹⁾, e em todos estes métodos, o aproveitamento de radioiodo é apenas de 50% da sua concentração total, pois somente a porção catiônica dele liga-se ao anel da tirosina. Por esta razão não se obtém alta a.ℓ., embora a primeira preparação bem sucedida de ^{131}I - insulina⁽⁹³⁾, fosse decorrente de uma variação desse procedimento.

Em 1958, McFarlane⁽⁵⁰⁾ introduziu o uso de monocloreto de iodo (ICI) que facilitou a utilização máxima do iodo. Entretanto, esta técnica possui a desvantagem de permitir a substituição em certo grau do carreador adicionado na forma de $^{127}\text{I-Cl}$, e a marcação de substâncias em níveis de miligramas mas, não em níveis de microgramas conforme exigido pelo radioimunoensaio.

Variações desta técnica foram propostas⁽⁶⁹⁾ e uma destas apresentada por Hunter e Greenwood⁽³³⁾ permitiu preparações de altas atividades específicas. O método da cloramina T⁽³³⁾ é amplamente empregado na marcação de diversas substâncias^(38,40,64,77) e consiste no uso de cloramina (p-tolueno sulfonamida N-monoclorada) como agente oxidante do iodeto. A cloramina T em solução aquosa forma o ácido hipocloroso, que promove condições de oxidação.

A reação é similar àquela que faz uso de monocloreto de iodo e que aqui é formado como

Tabela I.1

Nuclídeos Usados em Ensaio Competitivo Segundo Tothill – The Use of the Scintillation Counter in Radioimmunoassay

Nuclídeo	T 1/2	Emissão	a.é. teórica (Ci at-mg ⁻¹)
³ H	12 a.	β	29
¹⁴ C	5700 anos	β	0,06
¹²⁵ I	60 dias	γ + X	2160
¹³¹ I	8 dias	β + γ	16200
⁷⁵ Se	121 dias	γ + X	1070
⁵⁷ Co	270 dias	γ + X	480

Tabela I.2

Propriedades dos Isótopos de Iodo Segundo Chervu e Murty⁽¹⁶⁾

	¹²⁵ I	¹³¹ I
meia vida	60 dias	8 dias
Principais fótons e abundância	27-35 Kev (144%)	364 Kev (80%)
Eficiência de contagem em detetor de NaI	≈ 90%	~ 45%
a.é. teórica (mCi/ug)	17,4	125
Abundância isotópica em produtos comerciais	95%	~ 25%
Janela de contagem	20 – 80 Kev	310 – 410 Kev

passo intermediário do processo. Esse método permite marcação de proteínas ao nível de micrograma e com alta atividade específica. Entretanto, estas preparações são menos estáveis, sendo frequente a formação de espécies com mais de um átomo de radioiodo substituído, ocasionando a diminuição da imunorreatividade^(45,47,77) e a maior formação de produtos de degradação e agregados moleculares^(41,65,71), resultantes da exposição da proteína à agente oxidante potente como a cloramina T. Pequenas modificações deste método foram propostas⁽¹⁴⁾ com a finalidade de diminuir os efeitos dos agentes oxidantes durante o processo da iodação.

A oxidação enzimática do iodeto pela lactoperoxidase, oferece um método de marcação de vários hormônios^(37,56,51,65,84) em quantidades de microgramas com a.l. elevada. Este método não emprega agentes redutores ou oxidantes, embora faça uso de uma quantidade mínima de peróxido de hidrogênio como catalizador. Os antígenos preparados por este método são superiores àqueles preparados pela cloramina T, pois apresentam maior imunorreatividade, maior estabilidade e menor quantidade de produtos degradados. Este método foi empregado primeiramente por Marchalonis em 1969⁽⁵¹⁾, seguindo-se Morrison, depois Bayse e Webster, e por fim Thorrel e Johansson⁽⁸⁴⁾, todos em 1971.

O dano à molécula do antígeno na marcação eletrolítica apresentada por Rosa⁽⁷²⁾ é pequeno, mas o seu uso, em nível de micrograma, é restrito. A iodação por reação de troca isotópica⁽¹⁶⁾ embora não leve à preparações de alta a.l., pode ser efetuada em compostos que contenham átomos de iodo.

A marcação por conjugação^(16,40,41) utilizada por Bolton e Hunter, envolve o preparo de uma molécula de ¹²⁵I-éster pelo método da cloramina T, sua purificação para retirada de todos os agentes redutores, e a subsequente conjugação do éster ao grupo amino livre da molécula de proteína. Este processo pode levar à diminuição da imunorreatividade do antígeno marcado em consequência da condensação do grupo amino, embora evite alteração da imunorreatividade decorrente da iodação dos grupos tirosinas. Entretanto, a a.l. da preparação é um pouco menor por este método.

A purificação da preparação é um processo indispensável e visa a separação dos vários componentes da mistura de iodação, isto é: o hormônio íntegro, os produtos de degradação e agregados moleculares formados, outras substâncias iodadas e o iodo livre que não participou da reação. Com esta finalidade, vários métodos^(16,30) são usados e classificados como: Filtração em gel, Eletroforese em gel, Cromatografia de adsorção e Cromatografia de troca iônica. Dentre eles destacamos a filtração em gel, que usa um material molecular como o Sephadex, é um procedimento simples e eficiente, sendo empregado em vários sistemas e a eletroforese em gel, que emprega quer gel de amido, quer gel de poliacrilamida e é um processo seletivo no que concerne à separação dos componentes.

Na avaliação do procedimento empregado, devem ser feitos testes para controle da atividade específica, da imunorreatividade, da pureza radioquímica e da estabilidade da preparação, com a finalidade de propiciar o uso de preparações de boa quantidade no sistema de radioimunoensaio.

Em virtude da importância destes fatores, teceremos algumas considerações a respeito.

A atividade específica do antígeno é importante desde que a sensibilidade do método, definida como a menor quantidade detectável do antígeno, é dependente, principalmente, da quantidade do traçador utilizado^(16,30). Entretanto, o uso de preparações de alta a.l. pode ser prejudicial pois afeta seriamente a imunorreatividade do antígeno^(45,77), diminui a sua estabilidade durante o armazenamento⁽⁴⁰⁾ e causa alterações na molécula promovendo a degradação da mesma. A a.l. ideal varia de sistema para sistema e deve ser adequada aos valores de interesse da curva padrão utilizada.

A imunorreatividade é a afinidade apresentada pelo antígeno na sua ligação com o anticorpo. As alterações da capacidade de ligação do antígeno são atribuídas a várias causas. Há evidências que quanto maior o grau de iodação da molécula do antígeno, menor a sua imunorreatividade^(45,77,41). Mesmo a substituição de apenas 1 átomo de iodo por hidrogênio na molécula da proteína, pode alterá-la significativamente afetando a ligação antígeno-anticorpo. A denifcação química também afeta a

imunorreatividade, pela alteração da proteína em consequência do uso de agentes oxidantes fortes, redutores, ou impurezas existentes nas soluções de iodo radioativo. A própria radiação afeta a imunorreatividade e este dano é proporcional à quantidade de radioatividade empregada. Devemos aqui considerar, os efeitos das radiações durante o processo de iodação e àqueles resultantes do decaimento catastrófico⁽³⁰⁾. Com relação ao primeiro caso, tenta-se minimizar os seus efeitos realizando a reação de iodação no menor tempo disponível, promovendo a purificação da mistura logo após a marcação. No que diz respeito ao segundo, quando o átomo radioativo se desintegra, causa algum tipo de modificação estrutural sobre as moléculas remanescentes⁽⁹⁰⁾.

No caso de produto de decaimento monoiodinado, a molécula remanescente não será nem radioativa nem imunorreativa. Entretanto, quando somente um átomo de iodo de um produto diiodinado se desintegra, o produto remanescente será ainda radioativo mas imunologicamente inativo, afetando seriamente a sensibilidade do ensaio e também a estabilidade do traçador.

A pureza radioquímica da preparação deve ser tal, que seja livre de iodo não reativo, livre de produtos de degradação da proteína ou agregados de espécies moleculares, e possuir máxima imunorreatividade⁽¹⁶⁾. Para se conseguir tal objetivo, a preparação deve ser submetida a métodos de purificações logo após a iodação.

O antígeno marcado e purificado deve manter durante certo tempo a pureza radioquímica e imunorreatividade para permitir o seu uso durante prolongado período de tempo, portanto, deve ser estável.

Os fatores que afetam esta estabilidade são:

- 1) Meia-vida do radionuclídeo
- 2) Liberação do iodo livre
- 3) Perda de imunorreatividade.

Com relação à meia vida do produto obtido, este fator dependerá exclusivamente do radionuclídeo escolhido para a sua marcação.

Com relação à liberação de iodo livre, a sua presença em pequenas quantidades não interfere com o ensaio, porém grandes quantidades podem invalidá-lo. Alguns pesquisadores preferem remover o iodo livre e outros produtos de degradação formados durante a estocagem por procedimentos de repurificação⁽¹⁶⁾.

O critério mais importante de estabilidade é a imunorreatividade das espécies marcadas. A estabilidade das preparações marcadas é também afetada pela temperatura e pelo meio de estocagem.

Em geral, os peptídicos devem ser estocados à -20°C , evitando-se o descongelamento e congelamento repetidos, para preservar a integridade da molécula⁽¹⁶⁾.

A adição de proteínas carreadoras tais como soro albumina bovina humana aumenta a estabilidade da preparação com relação à temperatura⁽¹⁶⁾.

A ligação dos componentes do ensaio é influenciada por outros fatores além da concentração de antígeno e anticorpo. Estes fatores incluem temperatura, pH, presença de contaminantes que interferem ou degradem a porção reativa da molécula de um dos componentes do ensaio^(30,41).

Levando-se em consideração todos estes fatores deve-se padronizar as concentrações dos reagentes e procurar as condições ideais de trabalho.

1.3.4.3 – Imunoensaio

Os requisitos essenciais para o ensaio incluem o antígeno marcado, o anticorpo específico e uma técnica que permita a separação do complexo antígeno-anticorpo do antígeno livre, desde que nas condições usuais do ensaio o complexo antígeno-anticorpo não precipita espontaneamente. O radioimunoensaio é desenvolvido pelo preparo simultâneo de soluções padrões de concentrações conhecidas e amostras de concentrações desconhecidas colocadas em tubos testes. Nestes tubos são adicionadas quantidades fixas de antígeno marcado e de anti-soro. Após um tempo de reação apropriado, que pode variar de horas a dias e que depende da constante de associação – dissociação do complexo para a reação particular^(3,41,90), as frações livres e ligadas ao anticorpo são separadas pelo uso de uma das várias técnicas disponíveis.

1.3.4.4 – Técnicas de Separação das Frações Livres e Ligadas ao Anticorpo

Os critérios para a escolha de uma técnica conveniente de separação estão relacionadas com a capacidade de uma total separação, com um sistema prático que permita o uso em condições de rotina, com a reprodutibilidade entre as replicadas, com o volume de incubação e com o trabalho e tempo dispendido, na operação.

Os diversos sistemas de separação usados^(30,41) baseiam-se nas diferenças de configuração molecular entre o antígeno ligado e o antígeno livre. Há técnicas baseadas na migração diferencial do complexo formado e do traçador livre. O uso da celulose, do carvão, das resinas de troca iônicas, de silicatos, promovem a adsorção do antígeno livre a estes materiais. Por outro lado, o uso de um segundo anticorpo que se acopla ao primeiro, que está na forma de complexo, e o uso de solventes orgânicos como o polietileno glicol permite a precipitação do complexo antígeno-anticorpo. Há técnicas que adsorvem ou complexam o anticorpo a material em fase sólida, como por exemplo, a adsorção em tubos plásticos ou complexação com dextran.

O sistema mais empregado é a técnica de duplo anticorpo, que possibilita a precipitação do complexo com o segundo anticorpo produzido diretamente contra o primeiro, também o uso de carvão é muito empregado, este adsorve o antígeno livre. Os métodos que favorecem a migração diferencial do complexo e do antígeno livre, foram empregados na fase inicial do radioimunoensaio. Entretanto, os métodos que possibilitam o processamento de um grande número de amostras apresentam muitas vantagens práticas em relação àqueles primeiramente utilizados. A separação é seguida pela determinação da radioatividade de ambas as frações ou de uma delas e da atividade total de hormônio marcado adicionado aos tubos testes.

1.3.4.5 – Curva Padrão

Após as determinações das contagens do complexo antígeno-anticorpo e ou do antígeno livre, a curva padrão é construída e os valores das amostras são determinados pelas comparações entre as suas radioatividades e as das amostras de concentrações conhecidas de antígeno.

Frequentemente se faz a correção da quantidade de radioatividade correspondente às ligações inespecíficas por meio de tubos controles, nos quais não se adicionam anticorpos ou padrões.

Há várias formas de se construir a curva padrão, uma delas é transferindo para o gráfico os valores da relação fração ligada/fração livre (B/F) contra as concentrações do antígeno, pois, os valores de B/F são inversamente proporcionais à concentração do substrato. Outra, é usando-se os valores percentuais das frações ligadas B contra as concentrações dos substratos. Existem ainda métodos que expressam os valores percentuais das frações livres, ou também a razão entre a radioatividade total e àquela das frações ligadas contra as concentrações dos substratos.

Estas são apenas formas diferentes de se traçar a curva padrão, e o uso de uma ou outra é apenas decorrente de escolha individual.

Entretanto, uma vez efetuada a escolha, esta deve ser mantida para uma melhor comparação entre as curvas resultantes de diferentes ensaios.

1.4 – Objetivos

É objetivo do presente trabalho, a padronização de um método que permita a quantificação de Somatomedina B sérica humana, que possa ser introduzido em nosso meio, e que seja aplicável a grande número de dosagens simultâneas requeridas em rotina clínica.

A importância de que as alterações de desenvolvimento físico quando associadas com os níveis de hormônio de crescimento, estão relacionadas com as alterações dos níveis de Somatomedina B. Então torna-se importante a mensuração do hormônio de crescimento humano e da Somatomedina B, que é intermediária da ação do primeiro, para o seu diagnóstico e tratamento.

A técnica a ser desenvolvida, necessita para a sua aplicabilidade prática ser: precisa, exata, específica, e sensível. Para tanto teve-se que analisar as características pertinentes a cada componente usado no imunoensaio, a saber, vencer as seguintes etapas:

- a) Selecionar a técnica, os componentes da marcação e determinar o seu rendimento.
- b) Desenvolver métodos de purificação da preparação e separação das frações.
- c) Efetuar análises por vários processos, determinando-se a pureza radioquímica, a estabilidade do preparado e sua atividade específica.
- d) Determinar as condições ótimas para se chegar ao preparado final, examinando-se os principais interferentes, tais como quantidade de traçador, título do anti-soro e efeito da temperatura, tempo de incubação e diluição do segundo anticorpo.
- e) Ensaiar a Somatomedina B marcada com os demais componentes do ensaio para proceder à determinação da concentração das amostras.
- f) Analisar a técnica desenvolvida quanto a especificidade, exatidão, sensibilidade e precisão.
- g) Avaliar a técnica ensaiada determinando os níveis séricos de Somatomedina B em indivíduos normais e com hipo ou hiper secreção de hormônio de crescimento humano.

2 – SOMATOMEDINAS

2.1 – Histórico

O hormônio de crescimento (GH) é, reconhecidamente, aquele que regula o crescimento esquelético⁽¹⁵⁾. Entretanto, a ação de estímulo do crescimento linear é realizada através da formação de fatores secundários.

Em 1957, Salmon e Daughaday⁽⁷⁶⁾ mostraram a presença de fatores GH dependentes no soro e, propuseram o nome de Fator de Sulfatação, devido aos estímulos provocados por eles na captação de sulfato radioativo na cartilagem de ratos hipofisectomizados.

A existência do fator de sulfatação foi amplamente confirmada^(67,89,81,18), e as evidências sugeriram propriedades adicionais a estes fatores séricos GH dependentes.

O termo mais geral "Somatomedinas", foi proposto⁽²²⁾, sendo usado como nome genérico para qualquer substância GH dependente que se comporte como mediadora da ação do hormônio de crescimento.

As extensas pesquisas realizadas^(35,85,18,17,20,27), na tentativa de isolamento destes peptídios, revelaram, a existência de no mínimo quatro fatores séricos diferentes^(85,88): as Somatomedinas A, B e C e o NSILA-S, que são:

- Somatomedina A, que estimula a incorporação de sulfato pela cartilagem de galinha⁽³⁵⁾;
- Somatomedina B, como sendo aquela substância que aumenta a síntese de DNA quando adicionada às culturas de células humanas gliais⁽⁸⁵⁾;
- Somatomedina C, como sendo um peptídio que estimula a captação de sulfato e Timidina em cartilagem de rato⁽²⁶⁾.

Algumas similaridades foram relatadas entre as Somatomedinas A e C e o NSILA-S, sendo que todos esses três fatores possuem um efeito similar à insulina em gordura de epidídimo de ratos, qual seja o de estimular a captação de sulfato pela cartilagem^(17,26).

Conseguiu-se o isolamento, a purificação e caracterização dos dois polipeptídios, Somatomedinas A e B^(86,80,23), contrariando a idéia inicial de que estes seriam fragmentos de GH⁽⁵⁾.

2.2 – Constituição Química

A Somatomedina A, possui um peso molecular da ordem de 7000 Daltons, é um polipeptídio neutro, contendo unicamente resíduos de cisteína^(80,86) sendo que a Somatomedina B é menor, possuindo um peso molecular da ordem de 5000 Daltons, é de natureza ácida e contém quatro pontes dissulfeto^(80,86).

Ambas as substâncias estão presentes no soro, ligadas a uma proteína carreadora de alto peso molecular⁽⁵⁾.

Os níveis de ambos os peptídios A e B, no soro e na urina⁽⁹⁷⁾, são dependentes do nível de Somatotropina do indivíduo^(36,17,89,82).

A Somatomedina B, parece estar associada a uma proteína carreadora plasmática, de peso molecular de 150000 Daltons, que é da ordem do γ -globulina⁽⁹⁸⁾.

A Somatomedina C é um peptídio de natureza básica, com peso molecular de 7000 Daltons⁽⁵⁾, e parece estar associada com uma proteína plasmática com peso da ordem de 60000 Daltons.

A NSILA-S⁽²⁶⁾, possui peso molecular de 7500 Daltons e consiste numa cadeia com duas ou três pontes dissulfeto. Este peptídio não apresenta reação cruzada com os anti-corpos anti-insulina, embora mimetize todos os efeitos da insulina nos seus principais tecidos alvos, isto é, músculos e tecido adiposo.

O teor de NSILA-S também aumenta em indivíduos acromegálicos e diminui nos casos de hiposecreção de HGH. Estes resultados são similares aos encontrados para o fator de sulfatação ou Somatomedinas.

2.3 – Fontes de Produção das Somatomedinas e Ação Biológica

Evidências consideráveis apontam o fígado como fonte de Somatomedinas^(89,36,17,76). Demonstrou-se a atividade Somatomedínica em fígados, quando este órgão isolado é perfundido com GH⁽⁸⁸⁾. O mesmo se verificou tanto em ratos normais, quanto em animais hipofisectomizados⁽⁵⁾.

O hormônio de crescimento parece estimular a produção de Somatomedina pelo fígado⁽⁸¹⁾. O rim parece conter maior atividade promotora de sulfatação quando este órgão isolado é perfundido com GH⁽⁵⁾, sendo possivelmente outra fonte de produção de Somatomedinas.

O GH nos estudos "in vitro" mostrou pouco ou nenhum efeito na incorporação de sulfato pela cartilagem de ratos hipofisectomizados. Entretanto a incorporação de sulfato pelo tecido incubado com soro de ratos normais ou hipofisectomizados tratados com HGH, foi maior que a obtida na presença de soro de ratos hipofisectomizados sem o tratamento com o hormônio⁽⁵⁾.

Após uma única injeção intra-peritoneal de GH, verifica-se um aumento da atividade sérica em ratos hipofisectomizados dentro de 2 a 6 horas, chegando ao máximo após 12 horas⁽⁵⁾.

Estudos subsequentes⁽¹⁷⁾ demonstram que o soro contendo fator de sulfatação, também estimula a incorporação de amino-ácidos pela proteína e de timidina pelo DNA de cartilagem de ratos hipofisectomizados. Preparações parcialmente purificadas do fator sérico, produzem estes efeitos e aumentam a incorporação de uridina pelo RNA. Aumentos nas incorporações de sulfato, amino-ácido e uridina são evidentes nas primeiras 2 horas de incubação de tecidos.

No caso de incorporação de sulfato, o GH possui pouco ou nenhum efeito na incorporação de amino-ácidos pelas proteínas, uridinas pelo RNA ou timidinas pelo DNA⁽⁵⁾.

As somatomedinas possuem outros efeitos além da ação em tecido esquelético. O transporte de amino-ácidos e glicose, bem como a incorporação de amino-ácidos pelas proteínas no músculo, tornam-se estimuladas pela presença do fator de sulfatação^(5,67). Em tecido adiposo, a Somatomedina aumenta a oxidação de glicose e síntese lipídica e inibe a lipólise induzida pela epinefrina⁽⁸⁸⁾. Estas ações em músculos e tecido adiposo, são comumente denominadas isulino similares.

Por outro lado, as similaridades em efeitos biológicos e características químicas, levam à conclusão de que a somatomedina está intimamente relacionada à NSILA-S⁽²⁶⁾. Preparações contendo Somatomedina, NSILA-S têm a capacidade de estimular a multiplicação de certas culturas de células de origem não esquelética⁽⁵⁾.

Com relação ao mecanismo de ação, geralmente os hormônios peptídicos iniciam seus efeitos biológicos pela interação com sítios específicos de ligação em células alvo. Os receptores de membrana celular para a Somatomedina foram descritos em cartilagem de embrião de galinha, fígado de rato ou tecido adiposo e placenta humana⁽¹⁷⁾. Entretanto, um conceito claro do mecanismo de ação de Somatomedina não foi apresentado, havendo dados sugestivos de envolvimento de nucleótidos cíclicos atuando como mensageiros⁽⁵⁾.

2.4 – Ensaio das Somatomedinas

Estes fatores são comumente determinados por ensaios biológicos in vitro. Estes se baseiam em efeitos estimuladores conhecidos no metabolismo de cartilagem, geralmente aqueles que refletem a síntese de mucopolissacarídeos ou de DNA. Em métodos mais antigos, fazia-se a mensuração do efeito de soro diluído, em segmentos de cartilagem costal de ratos hipofisectomizados. Em métodos mais recentes, a cartilagem costal de porcos⁽⁷⁾ e a cartilagem de embrião de galinha são usados.

Evidentemente, estes ensaios não são específicos⁽⁵⁾. A interação de fatores múltiplos no soro que estimulam ou inibem a atividade metabólica da cartilagem determinará o resultado.

2.5 – Correlação das Somatomedinas com o GH

Os níveis de Somatomedina sérica humana aumentam progressivamente na infância^(8,9,29,62), e permanecem relativamente estáveis na idade adulta^(21,62).

Alterações associadas com panhipopituitarismo⁽⁵²⁾ ou deficiência isolada de HGH^(55,74), usualmente apresentam baixos níveis de Somatomedina^(8,34). A administração de dose única de HGH I.V., no caso de hipopituitarismo, resulta em aparecimento de um pico após 3 horas, enquanto que o HGH sérico apresenta valores basais.

Entretanto, o tratamento com HGH subcutâneo, produz um aumento gradual de Somatomedina após dias. Durante o tratamento prolongado de pacientes com deficiência de HGH, a velocidade de crescimento resultante está correlacionada com o nível de Somatomedina⁽⁵⁾.

A Síndrome de Laron^(78,10), apresenta altos níveis de HGH e baixos níveis de Somatomedina, que normalmente permanecem inalterados após a terapia com HGH. Clinicamente, esta Síndrome é idêntica ao nanismo com deficiência de HGH.

Nessa Síndrome, há também uma resistência à resposta ao tratamento com HGH, sendo a incapacidade de crescimento esquelético sido atribuída à deficiência de produção de Somatomedina.

Os pigmeus africanos possuem HGH e Somatomedina normais, mas suas respostas metabólicas ao HGH exógeno são deficientes⁽¹³⁾.

Em mal nutrição proteico-calórica⁽⁶¹⁾ em crianças⁽⁶³⁾ o GH está normalmente elevado. Entretanto, o nível de Somatomedina é baixo⁽⁸⁾.

Pacientes com acromegalia ativa possuem altos níveis de Somatomedina com redução destes após a terapêutica cirúrgica ou após irradiações⁽³⁸⁾.

Estudos da atividade somatomédica em várias espécies⁽¹¹⁾ mostram a especificidade da Somatomedina formada em relação à espécie analisada.

2.6 – Radioimunoensaio de Somatomedina B

Em 1975, Yalow desenvolveu um método capaz de quantificar a Somatomedina B sérica humana por radioimunoensaio, utilizando-se da técnica de marcação pela Cloramina T e purificação da preparação em gel de amido com posterior repurificação em Sephadex G-50.

No presente trabalho, procurou-se desenvolver um método procedendo à escolha do procedimento adequado. A seguir indica-se sucintamente a técnica escolhida, uma vez que os seus princípios foram extensivamente discutidos no Capítulo 1.

A radioiodação enzimática foi efetuada pelo método de Thorell⁽⁸⁴⁾ modificado. A purificação da preparação é realizada em gel Sephadex. Na purificação em gel Sephadex, as frações danificadas ou em agregados moleculares são eluídas primeiramente, logo a seguir, o hormônio íntegro, sendo o iodo livre retido por mais tempo. A separação dos componentes neste processo se dá pela diferença de pesos moleculares entre eles, sendo este o fundamento básico da técnica⁽⁸⁷⁾.

A solução tampão utilizada no ensaio foi o fosfato, provido de agentes antisépticos, e com concentração proteica adequada. A escolha do tampão foi feita, considerando-se ser este o tampão ideal para o método do duplo anticorpo⁽⁶⁰⁾.

A temperatura escolhida foi de 4°C, uma vez que as ligações são mais estáveis nesta temperatura^(59,60).

O segundo anticorpo foi diluído em tampão contendo EDTA uma vez que este composto acelera a reação de precipitação^(13,42,46,28). O uso de soro de bezerros normais, devido ao conteúdo de gama globulina, conforme preconizado por alguns autores, aumenta a reação de precipitação^(13,32,83). O tratamento estatístico dos dados foi realizado na avaliação da técnica apresentada.

3 – EQUIPAMENTO, MATERIAL E MÉTODO

3.1 – Equipamento

3.1.1 – Empregado na Pesagem dos Reagentes das Soluções

- Balança Analítica Mettler K20T – Zurique, Suíça. Precisão de 0,005 mg

3.1.2 – Empregado na Iodação Biológica

- Agitador magnético modelo 16 – Fisher Scientific Corporation, USA.

3.1.3 – Empregado na Purificação da Mistura de Iodação

- Colunas cromatográficas providas de sistema de refrigeração externa, de dimensões: diâmetros: 10 e 15 mm. alturas: 100 e 900 mm respectivamente, construídas na própria oficina do Instituto de Energia Atômica.
- Coletor de frações refrigerado automático – “ULTRORAC 7000” – LKB – Estocolmo, Suécia.
- Bomba peristáltica LKB modelo 4912A – Estocolmo, Suécia.

3.1.4 – Empregado na Cromatoelektroforese

- Fonte de alta tensão – Buchler Instruments – Nuclear Chicago, Fort Lee, N. J., USA., usada também para eletroforese em gel de poliacrilamida.
- Placas para eletroforese – Buchler Instruments – Nuclear Chicago, Fort Lee, N. J., USA.

3.1.5 – Empregado na Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

- Gel Electrophoresis Cell Modell 150A – Bio Rad Laboratorios – Richmond, CA., USA.
- Lâmpada para polimerização com luz fluorescente de 15 Watts.

- Agitador Vortex-Genie modelo K-550-G - Scientific Industries Inc. - Springfield, Mass., USA., também utilizado em todas as fases do trabalho que requeiram agitação.

3.1.6 - Empregado na Separação das Frações Livres e Ligadas ao Anticorpo

- Centrífuga refrigerada automática Sorvall Superspeed RC-2B - Newtown, Conn., USA.
- Rotor tipo HS-4 Série 7654566 - Newtown, Conn., USA.

3.1.7 - Empregado na Determinação de Atividades

- Espectrômetro de cintilografia automático tipo poço - Nuclear-Chicago Corporation - Des Plaines, Ill., USA, que será denominado "contador".

3.1.8 - Empregado na Confeção de Gráficos e Determinação de Áreas

- Computador IBM-370 modelo 155 do Centro de Processamento de Dados do Instituto de Energia Atômica, que será denominado "computador".
- Plotador (traçador de gráficos) - EAI 430 - Data Plotter, da Eletronic Associates, Inc. USA - do Centro de Processamento de Dados do Instituto de Energia Atômica, que será denominado "plotter".

3.2 - Iodação Biológica

3.2.1 - Reagentes e Soluções Usados no Processo

Fosfato 0,1 M (Solução estoque)

- Fosfato de sódio monobásico $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - Carlo Erba - 13,799 g.
- Água destilada g.s.p. 1.000 ml

Esta solução estoque foi usada no preparo do tampão de marcação, dos tampões eluentes A e B e do tampão diluente A.

Tampão para Marcação

- Fosfato de sódio monobásico 0.05 M pH** = 7,0

Peróxido de Hidrogênio a 30% - Merck

Diluído à 1:10⁴ com água desionizada imediatamente antes do uso.

(*) Ferreira, A. B. H., Novo Dicionário Aurélio, pgs. 854 e 1110, Nova Fronteira, Rio de Janeiro, 1976.

(**) Ajuste do pH dos tampões foi feito com NaOH 2 M.

Material Radioativo: Na^{125}I , livre de carregador e redutor, em meio alcalino. A atividade específica do produto usado foi sempre superior a 500 mCi/ml. O material foi fornecido pela New-England Nuclear-Boston, Mass., USA.

3.2.2 – Material Biológico

Lacto-peroxidase, fornecido pela Calbiochemical Co!, Los Angeles, USA., obtido na forma cristalina, foi diluída em tampão de marcação na concentração 2,5 mg/ml, dividida em alíquotas de 100 μl e mantida a -20°C .

Somatomedina B com 98% de pureza, usada para iodação, diluída em tampão de marcação, foi dividida em alíquotas de 20 μl e estocada a -20°C na concentração de 0,1 mg/ml.

3.2.3 – Procedimento da Iodação Enzimática da Somatomedina B

A marcação foi efetuada à temperatura ambiente em pequenos tubos cônicos (55 x 10 mm). Os reagentes foram adicionados com o auxílio de micropipetas descartáveis da Clay Adams, na seguinte ordem, um imediatamente após o outro:

- Somatomedina B (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) - 20 μl
- Tampão fosfato 0,05 M, pH 7,0 - 10 μl
- Na^{125}I - 500 μl

Início da agitação colocando no tubo de reação um micro metal, minúsculo pedaço de clips.

- Lactoperoxidase (2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) - 2 μl
- H_2O_2 (a 30% diluída a $1/10^4$) - 1 μl

Após 50 segundos a reação foi interrompida por efeito de diluição com 500 μl de tampão de marcação.

A mistura da reação foi imediatamente transferida com auxílio de uma pipeta Pasteur para o topo de uma coluna cromatográfica, empacotada com gel sephadex G-25 fino.

3.3 – Cromatografia em Coluna de Exclusão Molecular – Sephadex

3.3.1 – Material Empregado

Tampão Eluente A

- Fosfato 0,1 M - 500 ml
- NaCl da J. T. Backer - 9,0 g.

Tampão Eluente B – estocado a 4°C

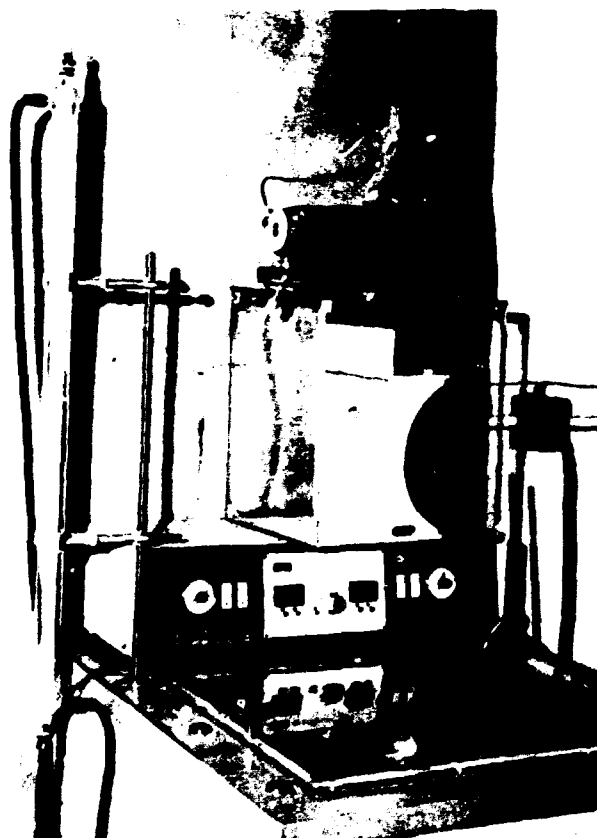


Figura 3.1 - Equipamento Usado na Filtração de SM-B-¹²⁵I em Gel Sephadex G-75

3.4 – Análise da Eficiência das Técnicas de Marcação e Purificação

3.4.1 – Cromatoeletroforese em Papel

3.4.1.1 – Material Empregado

- Azul de bromofenol da Merck, usado como substância indicadora.
- “Plasma azul” – plasma de banco de sangue corado com azul de bromofenol.
- Papel Watman 3 MM
- Tampão Veronal 0,05 M, pH 8,6

Ácido dietil barbitúrico $C_8H_{12}N_2O_3$ 1,84 g

Ácido 5,5 dietil barbitúrico da Merck.

Barbital sódico $C_9H_{11}N_2NaO_3$ 10,30 g

5,5 dietil barbitúrico de sódio da Merck

Água destilada q.s.p. 1000 ml

3.4.1.2 – Procedimento

Uma alíquota de tubo de marcação, imediatamente após a reação, foi misturada a 20 μ l de “plasma azul” e aplicada ao papel Watman 3MM.

A eletroforese foi desenvolvida no sentido horizontal, colocando-se as fitas sobre um suporte, dentro de uma cuba de eletroforese contendo o tampão veronal, conforme indica a Figura 3.2.

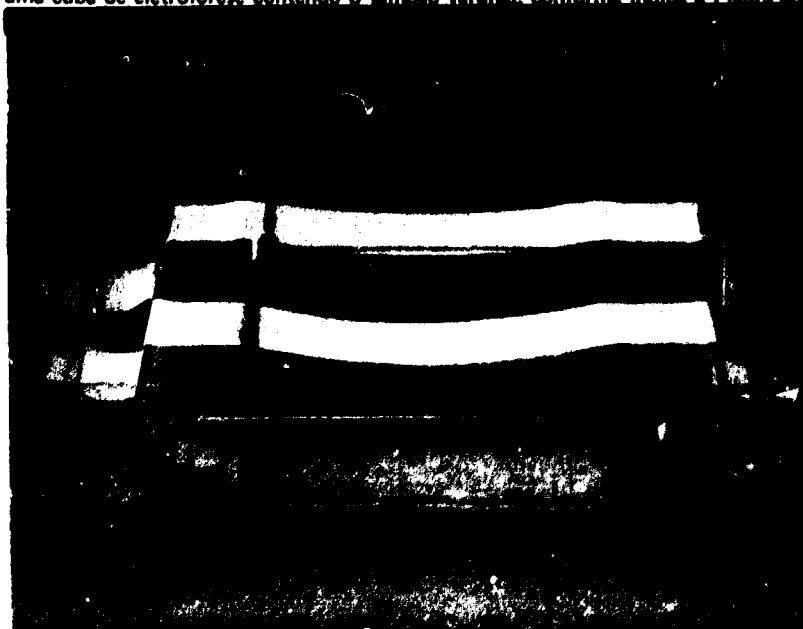


Figura 3.2 – Procedimento da Cromatoeletroforese

As extremidades das fitas foram mantidas em contato com o tampão. A amostra foi aplicada, com o auxílio de micropipetas descartáveis, às fitas levemente umedescidas em tampão. A eletroforese foi realizada a 4°C, usando-se 2 mA por fita, interrompendo-se quando "a mancha azul" se distanciou de 75 mm da origem.

A "mancha azul" corresponde à localização das proteínas séricas que se coram pelo azul de bromofenol, como é o caso, principalmente da albumina. As fitas foram secas à temperatura ambiente e cortadas em intervalos de 10 mm, iniciando-se 20 mm antes do ponto de aplicação da amostra. A atividade de cada segmento foi determinada no contador, e o gráfico correspondente foi traçado pelo traçador de gráficos "plotter" do computador.

O mesmo processo foi repetido, aplicando-se às fitas amostras de diversas frações, resultantes das purificações em gel Sephadex, para análise de suas purezas radioquímicas. Para avaliar a estabilidade da preparação, a mesma amostra mantida a 4°C foi aplicada às fitas logo após a filtração em Sephadex e após períodos de tempos consideráveis entre purificação e a análise. Os componentes presentes na amostra aplicada, apresentaram diferentes migrações no papel. Os mesmos foram identificados pela posição dos picos de atividade na representação gráfica.

As áreas correspondentes foram determinadas pela regra de Simpson para integração, utilizando-se do programa fornecido pela IBM e disponível no CPD do IEA.

Os cálculos de rendimento de marcação efetuados, levou em consideração as áreas correspondentes à cada componente. O rendimento da iodação é igual a soma das frações danificada e íntegra do polipeptídeo iodado.

$$\text{Rendimentos de marcação (\%)} = \frac{(D + P)}{D + P + I} \times 100$$

D = Área correspondente aos produtos de agregados moleculares ou danificados.

P = Área correspondente ao polipeptídeo íntegro.

I = Área correspondente ao iodo não reativo.

A pureza das frações foi determinada por processo semelhante, de acordo com a percentagem de polipeptídeo íntegro presente na amostra analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida.

$$\text{Pureza das frações (\%)} = \frac{P}{D + P + I} \times 100$$

3.4.2 – Auto-Radiografia

3.4.2.1 – Material Empregado

- Filme de Raio X tipo Royal Blue Kodak
- Soluções de revelações da Kodak, próprias para o filme.

3.4.2.2 – Procedimento

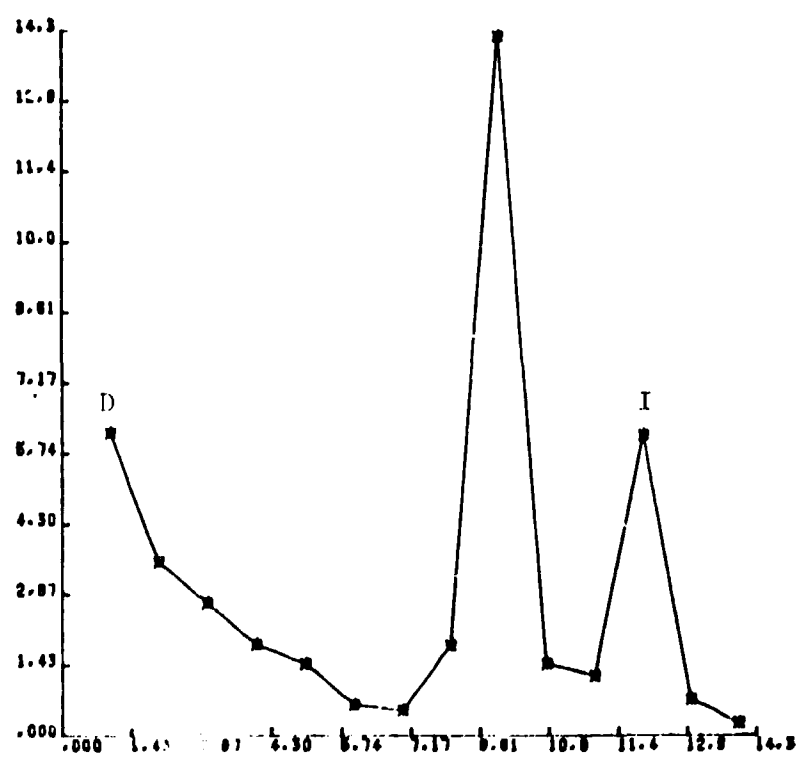


Figura 3.3 - Esquema do Perfil Gráfico Resultante da Eletroforese em Gel de Poliacrilamida da SM-B-¹²⁵I

As fitas resultantes da cromatoeletroforese, antes de serem cortadas, foram colocadas em contato com os filmes de Raio X em diversos tempos de exposições, de acordo com o teor radioativo da amostra analisada.

Os tempos de exposições variam de 4 a 36 horas e os filmes foram revelados logo a seguir.

3.4.3 – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

3.4.3.1 – Material Usado

Solução A

Tris (Tris-hidroximetil amino metano) $C_4H_{11}NO_3$ da Merck		36,6 g
Temed (N,N,N',N' tetrametil etilenodiamina) $C_6H_{16}N_2$ da Merck		0,23 ml
HCl 1N		48,0 ml
Água destilada	q.s.p. pH	= 100 ml 8,9

Solução B

Tris		5,98 g
Temed		0,46 ml
HCl 1N		48,0 ml
Água destilada	q.s.p. pH	= 100 ml 6,7

Solução C

Acrilamida $CH_2CHCONH_2$ da Bio Rad Lab.		28,0 g
Bis – N,N' metileno bisacrilamida $C_7H_{10}N_2O_2$ da Bio Rad Laboratórios.		0,735
Água destilada	q.s.p.	100 ml

Solução E

Riboglavina da Roche		4,0 mg
Água destilada	q.s.p.	100 ml

Solução G₁

Sacarose – $C_{12}H_{22}O_{11}$ da J. T. Baker		8,0 g
--	--	-------

Persulfato de amônio (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ da Bio Rad Laboratórios.		133,3 mg
Solução B		5,0 ml
Água destilada	q.s.p.	10,0 ml

Solução H

Acrilamida		500 mg
Bis		125 mg
Água destilada		1 ml

Solução Tampão Estoque-Tris Glicina

Tris		6,0 g
Glicina – Ácido amino-etanóico – C ₂ H ₃ NO ₂ da Merck		28,8 g
Água destilada	q.s.p. pH	1000 ml 8,3

As soluções foram mantidas à 4°C.

– Soro normal de cobaias, criadas no Biotério do Instituto de Energia Atômica

3.4.3.2 – Procedimento

Usou-se o método de Davis modificado segundo Bartolini e Colaboradores⁽¹⁾. Este método foi usado para analisar o grau de pureza dos diversos eluentes das purificações e também para separar as frações livres e ligadas do hormônio ao anticorpo. Por ser um método eficiente de separação dos vários componentes presentes na mistura a ser analisada, este processo foi usado como método de análise das diversas técnicas empregadas.

Polimerização do Gel

Usamos cilindros ocos de vidro, com diâmetros interno de 5 mm e externo de 7,2 mm e altura de 110 mm, fechando-se uma das extremidades com papel Parafilm.

O gel de separação é preparado de acordo com as seguintes proporções das soluções estoque, o que resultam numa concentração final de 7% de acrilamida: 1A + 2C + 4 água destilada + 1 E.

Esta mistura é agitada e transferida cuidadosamente com pipeta Pasteur para os cilindros até a altura de 93 mm. Para evitar a formação de menisco no gel e permitir bandas regulares de separação, cerca de 100 µl de água destilada é colocada à solução, com o auxílio de pipeta Pasteur de ponta curva e fina.

Os tubos são colocados a 70 mm da fonte de luz fria por 30 minutos para permitir a polimerização do primeiro gel. Após este tempo, a água é retirada por meio de papel absorvente.

Polimerização da Amostra

Os reagentes e soluções foram colocados com o auxílio de micropipetas descartáveis da Clay Adams na seguinte ordem:

Solução G ₁	75 μ l
Soro de cobaia	5 μ l
Azul de bromofenol	5 μ l
Amostra	200 μ l
Solução H	15 μ l
Total	300 μ l

Novamente ajusta-se o menisco com água destilada e após 30 minutos necessários para a sua polimerização, a água é retirada com papel absorvente. Para o controle da radioatividade total presente na amostra, o gel é colocado no tubo de contagem em posição invertida, tampado na sua extremidade por papel PARAFILM, e levado ao contador.

Eletroforese

O papel PARAFILM é retirado e os tubos transferidos para o sistema "Gel Electrophoresis Cell Bio Rad", ilustrado na Figura 3.4.



Figura 3.4 – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

A corrida eletroforética é desenvolvida em tampão tris-glicina, usando-se 2 mA por tubo de gel a ser analisado.

A "corrida eletroforética" é interrompida quando a banda do azul de bromofenol se encontra distante 30 mm da extremidade inferior do tubo de gel.

Fragmentação do Gel e Análise

Por meio de uma seringa plástica e agulha nº 23BD, o gel é retirado do cilindro de vidro com injeção contínua de água destilada.

O gel de separação é cortado em 13 pedaços de 7 mm com o "Electrophoresis gel Slicer", sendo que o gel da amostra é cortado com o auxílio de bisturi. Para evitar contaminação, cada segmento é envolto em papéis de alumínio e colocado em tubos de contador para a determinação dos picos de atividades. O gráfico é traçado em escala linear e as áreas dos diferentes picos são calculadas e identificadas de acordo com o método anterior.

3.4.4 – Teste de Imunorreatividade

3.4.4.1 – Reagentes e Soluções Empregados

- Antisero anti somatomedina B humana, produzido em coelhos, foi diluído a 1:4000 em tampão denominado eluente B.

A solução estoque foi guardada a -20°C em alíquotas de 100 μl .

O antígeno, a somatomedina B purificada e o padrão foram doados pela Kabi Diagnostica – Estocolmo, Suécia, na forma cristalina.

– Tampão Diluente A

Fosfato 0,1 M		500 ml
NaCl		9,0 g
Azida sódica		1,0 g
BSA		5,0 g
Água destilada		1000 ml
	pH =	7,5

Estocado a 4°C .

- Somatomedina B marcada com alta pureza radioquímica, foi diluída em tampão diluente A, com a finalidade de apresentar 5000 contagens por minuto (cpm) em volume de 50 μl .

– Tampão Diluente B

Tampão diluente A		100 ml
-------------------	--	--------

Etileno Diamina tetracetato dissódico $\text{Na}_2\text{.EDTA.2H}_2\text{O}$ da QEEL 3,7 g

Estocado a 4°C.

Soros de bezerros normais, gentilmente fornecidos pelo Dr. Biergle da faculdade de Veterinária da USP.

– Antigamaglobulina de coelhos obtida em carneiros e fornecida pela Bio Rad foi usada na diluição de 1/16.

3.4.4.2 – Procedimento

Para testar a capacidade ligante da preparação, a Somatomedina B marcada com ^{125}I (SM-B *) era incubada a 4°C durante 24 horas antes de ser usada no ensaio, em duas condições:

SMB * sem anticorpo

SMB * com excesso de anticorpo.

A diluição do anticorpo usada era de 1.40000, isto é, numa menor diluição do que a habitualmente usada no ensaio, visto que o tempo de incubação dos testes era de apenas 1 dia, havendo portanto necessidade de maior quantidade de anticorpo disponível para a ligação. Após 1 dia de incubação, o procedimento de separação das frações livres e ligadas dos testes era feito como usualmente no ensaio.

O segundo anticorpo era diluído de 1/16 com tampão diluente B, adicionado ao tubo de reação juntamente com o soro de bezerro, incubado por 24 horas a 4°C, depois de agitação dos tubos. Nos tubos controle onde o primeiro anticorpo era suprimido, as ligações ocorridas com o segundo anticorpo, forneciam o valor das ligações inespecíficas. Se o valor da ligação do produto marcado com o anticorpo era ao redor de 50% naquela diluição do primeiro anticorpo previamente ajustada às condições dos testes, isto é, 1 dia de incubação a 4°C, a fração escolhida para o ensaio comprovava o poder imunorreativo. Caso contrario, nova marcação se fazia necessária.

3.4.5 – Estabilidade da Preparação

A estabilidade da preparação foi determinada, analisando-se em cromatoelektroforese e em gel de poliacrilamida, alíquotas de Somatomedina B marcada, procedentes das purificações em Sephadex G-25 fino e G-75, e mantidas a 4°C, após períodos de tempos consideráveis entre a purificação e a análise. Com esta mesma finalidade, uma amostra correspondente ao pico de SM-B* oriunda de purificação única em Sephadex G-25 fino e mantida a 4°C foi submetida à uma segunda purificação, após decorrido um período de meses entre a purificação e a análise

Todo esse processo foi efetuado para verificação da danificação e liberação de iodo sofridas por preparações no decorrer do tempo.

3.4.6 – Atividade Específica

A determinação da atividade específica da Somatomedina B usada no ensaio, foi feita pelo método de deslocamento, tratando a amostra radioativa como amostra desconhecida e procedendo-se à sua incubação com o anticorpo, sem adição de massa fria, ou seja, Somatomedina B não marcada. A leitura da massa de Somatomedina B existente na amostra, foi feita na curva padrão, construída a partir

do valor percentual da relação $\frac{B}{T}$, onde B representa a contagem relativa ao complexo SM-B* - Ac (Somatomedina B marcada, ligada ao anticorpo) e T, a contagem total presente no sistema de reação. As ligações inespecíficas foram subtraídas quando se efetuou o cálculo. Fez-se uma correção entre as contagens totais presentes nestes tubos de reações e aquelas adicionadas a todos os tubos testes, sendo esta aproximadamente de 5000 cpm. Após a correção, as contagens da amostra em análise foram convertidas em atividades e estas foram relacionadas às massas encontradas, como anteriormente descrito, chegando-se finalmente à atividade específica.

Para esta determinação, foram incubadas diferentes atividades de Somatomedina B marcada com ^{125}I e anti-soro sem adição de massa fria. A Tabela III.1 indica o procedimento utilizado, e A_1 , A_2 e A_3 representam diferentes amostras dosadas em triplicatas de cada, onde o padrão ou soro foi substituído por igual volume de tampão diluente. Para a conversão de contagens por minuto à desintegração por minuto, a eficiência do contador gama foi estimado em 70% por meio de uma fonte padrão de ^{129}I , como usualmente é feito.

Tabela III.1

Protocolo para Determinação da Atividade Específica

Tubos	Diluente (μl)	Padrões (μl)	Antisoro (μl)	Somatomedina B - ^{125}I (cpm)
Curva padrão	250	100	50	5000
A_1	350	-	50	20000
A_2	350	-	50	35000
A_3	350	-	50	60000

3.5 - Avaliação das Condições Ótimas para o Ensaio

3.5.1 - Escolha da Quantidade de Traçador a ser Usado

É prática corrente em radioimunoensaio, o estabelecimento da quantidade de traçador a ser empregado, em termos de contagens por minuto ao invés de massa.

A fim de minimizar o desvio médio padrão para o valor de 1%, o emprego de atividades elevadas do traçador seria ideal, visto que permite a redução do tempo necessário para o acúmulo de dez mil contagens da amostra, que forneceria este erro. Entretanto, deve existir um compromisso entre a quantidade de traçador e a quantidade de anticorpo necessária para permitir uma ligação entre o primeiro e o segundo em torno de 50%. Com esta finalidade foram realizados testes para verificação da ligação ocorrida entre 5000 e 10000 cpm de Somatomedina B imuno-reativa com diluição do anti-soro

de $\frac{1}{400000}$, $\frac{1}{200000}$, $\frac{1}{100000}$.

Verificou-se que o uso de 10000 cpm do traçador, acarretaria a necessidade de emprego de maior concentração do anti-soro. Entretanto, a diluição deste deve ser tal que permita a realização de um grande número de ensaios com o mesmo lote de anti-soro.

Levando-se em conta estas implicações, resolveu-se também determinar o título do anti-soro para o uso de 5000 cpm de traçador.

3.5.2 – Escolha do Título ou Diluição do Anti-Soro

Uma vez escolhida a quantidade de traçador, a diluição ótima de anti-soro foi testada, para verificação do título deste que apresentaria uma ligação de 50% na reação com o traçador. Os testes foram realizados em duplicatas, incubando-se o anti-soro nas diluições de $\frac{1}{800000}$, $\frac{1}{400000}$, $\frac{1}{200000}$, $\frac{1}{100000}$, $\frac{1}{40000}$, $\frac{1}{20000}$ com 5000 cpm do traçador. Considerou-se as ligações inespecíficas, por meio dos tubos controles, fazendo-se reagir o traçador com o agente de separação, sem a presença do primeiro anticorpo. A diluição do anti-soro que proporcionou uma ligação em torno de 50% foi escolhida para uso no ensaio.

3.5.3 – Efeito da Temperatura

A mistura de reação foi incubada à temperatura ambiente, à 37°C e a 4°C.

Verificou-se maior ligação à 4°C, apesar do equilíbrio de reação ser atingido mais rapidamente em temperatura elevada, razão pela qual testou-se o período de tempo ideal para incubação do ensaio à 4°C.

3.5.4 – Tempo de Incubação

Para verificação do tempo necessário para o equilíbrio da reação, as ligações entre o primeiro anticorpo e a SM-B*, foram analisadas em função do tempo de incubação dos reagentes. Para isto, testes em triplicatas foram realizados durante tempos de incubação variáveis no período de 1 a 7 dias.

Após os cálculos de percentagem de ligação, procedeu-se à análise de variância e ao teste de Tukey, para verificação do nível de significância das variações apresentadas no decorrer do tempo de incubação.

3.5.5 – Diluição Adequada do Segundo Anticorpo

Com o objetivo de examinar qual a maior diluição capaz de tornar completa a separação das frações livres e ligadas ao primeiro anticorpo, o agente de separação foi diluído em tampão diluente B, e usado nos testes de separação. As diluições do segundo anticorpo foram de $\frac{1}{32}$, $\frac{1}{16}$, $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{4}$, e $\frac{1}{2}$.

A maior diluição do segundo anticorpo capaz de promover completa separação foi escolhida, na tentativa de evitar a influência de agentes interferentes.

3.6 – Ensaio de Somatomedina B

3.6.1 – Material Empregado

Empregou-se padrão de Somatomedina B diluída em tampão fosfato 0,05 M pH = 7,5, contendo 2% BSA e 0,2% de azida sódica. A solução estoque foi guardada a -20°C em alíquotas de 500 µl, na concentração de 100 ng/ml.

Soros de indivíduos normais e portadores de alterações comprovadas de secreção de hormônio de crescimento (HGH) foram cedidos pela 1ª Clínica Médica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP.

- Anti-soro antisomatomedina B. O título do anti-soro foi de $\frac{1}{180000}$.
- Somatomedina B marcada com ^{125}I purificada em Sephadex G-25 fino e G-75. Foi utilizada a fração do pico correspondente ao hormônio íntegro, após o teste de imunorreatividade.
- Diluente A foi empregado como diluente padrão do ensaio.
- Anticorpo antigamaglobulina de coelho, preparado em carneiros e usado na diluição de $\frac{1}{16}$.
- Soro de bezerros normais.
- Tubos de polietileno de dimensões: 70 x 11 mm.

3.6.2 - Procedimento

Uma vez determinadas as condições ótimas para realização do ensaio, amostras de soros de concentração desconhecida e amostras de padrões de Somatomedina B purificada de concentração conhecida, foram colocadas para reagir com 5000 cpm de Somatomedina B marcada e de anti-soro diluído a $\frac{1}{180000}$ a 4°C por 4 ou 5 dias de incubação. Todas as determinações foram feitas em triplicata a partir de volumes de 100 μl . Os padrões são resultantes de diluições consecutivas de uma solução padrão de Somatomedina B contendo 10 ng/ml e são apresentados na Tabela III.2 juntamente com as concentrações respectivas.

Tabela III.2

Protocolo do Ensaio de SM-B*

Tubo/Reagente	Concentração de Somatomedina B (ng/ml)	Quantidade de Somatomedina B (ng/tubo)
Controle	0	0
Ponto Zero (B_0)	0	0
Padrão A	0,31	0,031
Padrão B	0,63	0,063
Padrão C	1,25	0,125
Padrão D	2,50	0,250
Padrão E	3,75	0,375
Padrão F	5,00	0,500
Padrão G	10,00	1,00
Soros	desconhecida	

Os tubos controles, nos quais somente estão presentes o traçador e o segundo anticorpo, oferecem a percentagem de ligações inespecíficas. O ponto zero de massa fria (B_0) fornece a ligação máxima entre SM-B* e o primeiro anti-soro, na ausência de adição de massa fria, pois nestes, o padrão não é adicionado. Nos pontos restantes da curva padrão, coloca-se o traçador, o padrão de SM-B*, o primeiro e o segundo anticorpos. Os soros são diluídos a $\frac{1}{5000}$ ou $\frac{1}{10000}$ em casos especiais. A diluição inicial do padrão de Somatomedina B é feita a partir de 500 μ l de solução mantida à -20°C, completando-se o volume da mesma para 5 ml com tampão diluente A. A concentração final obtida é de 10 ng/ml. As concentrações dos pontos restantes são obtidas a partir de diluições consecutivas do padrão G, de um fator 1:2.

A diluição do anti-soro é feita a partir de alíquotas de 100 μ l estocada a -20°C. Completa-se o volume para 4,5 ml, obtendo-se um título de $\frac{1}{180000}$. A Somatomedina B marcada é diluída de forma a apresentar 5000 cpm em volume de 50 μ l. O segundo anticorpo é mantido à -20°C na forma cristalina e é reconstituído em 2 ml de água destilada, sofrendo posteriormente uma diluição de $\frac{1}{16}$ com tampão diluente B.

O procedimento do ensaio é ilustrado na Tabela III.3. Após o preparo de todos os reagentes necessários, procedeu-se à sequência operacional do ensaio realizado em triplicata, em banho de gelo, na seguinte ordem:

- Tampão diluente A
- Amostras de soros ou padrões
- Anti-soro anti Somatomedina B
- Somatomedina B*.

Os volumes de incubação são completados para 400 μ l com tampão diluente A, e 50 μ l da Somatomedina B*, usada no ensaio, é colocado em tubos de ensaio para o controle da radioatividade total adicionada aos tubos testes.

Os tubos reagentes são agitados cuidadosamente em Vortex, e mantidos a 4°C por períodos de 4 ou 5 dias.

Após a primeira incubação, adicionou-se o segundo anticorpo e o soro de bezerro normal. Os tubos foram agitados delicadamente e incubados a 4°C de 6 a 24 horas. Decorrido este tempo, 0,5 ml de diluente A foi colocado nos tubos reagentes e centrifugados a 7000 rpm ou 9000 g, por 40 minutos a 4°C. Procedeu-se à decantação dos tubos limpando-se as bordas dos mesmos com auxílio de papel absorvente.

3.6.3 – Determinação das Concentrações das Amostras

As atividades do precipitado dos tubos reagentes, correspondente à fração ligada ao anticorpo, são determinadas no contador, por tempo suficiente para o acúmulo de 10000 contagens.

Os valores percentuais de ligação em relação ao ponto zero de massa fria é calculado pela razão entre o valor médio da contagem nos padrões ou soros (B) e o valor médio da contagem no ponto zero (B_0), multiplicada por 100. Desta forma, os valores percentuais de ligação dos padrões em relação ao ponto de concentração 0 (zero) e a concentração correspondente do padrão são transferidos para

Tabela III.3

Procedimento do Ensaio de Somatomedina

tubo / Reagente	Padrões (μ l)	Controle (μ l)	Soros (μ l)
Tampão diluente	200	350	200
Radioativo (5000 cpm)	50	50	50
Antisoro – diluição 1:180000	50	–	50
Padrões	100	–	–
Soros diluídos a 1/5000	–	–	100
Incubação a 4°C	por 4	ou 5	dias
Segundo anticorpo diluição 1:16	50	50	50
Soro de bezerro normal	100	100	100
Incubação a 4°C	entre 6	e 24	horas
Tampão	500	500	500

Centrifugação a 9000 g (7000 rpm) a 4°C por 40 minutos. Decantação dos tubos e determinação da atividade do precipitado.

gráficos em papel semi-log e é traçada uma curva. A determinação da concentração das amostras é feita diretamente pela leitura na curva padrão.

As amostras de soro usadas, foram de indivíduos normais, de acromegálicos e dos portadores de nanismo com deficiência de hormônio de crescimento. As concentrações de HGH foram previamente determinadas nestes soros.

3.7 – Análise da Técnica

3.7.1 – Especificidade

Visto que o intervalo de variação da curva padrão é de 0,31 a 10 ng/ml e que a concentração sérica de Somatomedina B é da ordem de μg , todas as amostras de soros foram diluídas de um fator 5000. Em seguida tomou-se volumes crescentes da mistura de soros, conforme indicado na Tabela III.4 coluna 1 e completou-se com tampão diluente A até perfazer 100 μl . Foi calculada a média dos 5 resultados de cada diluição, o seu desvio padrão e por fim, as concentrações resultantes. Calculou-se a correlação linear entre os volumes da amostra e a média dos valores encontrados, obtendo-se a reta de regressão linear e ensaiou-se a significância pelo Teste T de Student. Além disso, as concentrações resultantes foram transferidas para a curva padrão, obtida a partir de soluções de Somatomedina B purificada (Padrões) com a finalidade de colocar em evidência possíveis fatores interferentes.

3.7.2 – Exatidão

Para o estudo da exatidão da técnica, volumes crescentes de uma mistura de vários soros, de concentração $10,30 \pm 0,35 \mu\text{g/ml}$ no soro não diluído, foi diluída a $\frac{1}{5000}$ e adicionadas em volumes crescentes a um volume constante de solução padrão A com concentração 0,63 ng/ml, completando-se o volume final da amostra para 100 μl com tampão diluente A. Ver Tabela III.5 colunas 1, 2 e 3 respectivamente. A recuperação das diversas alíquotas adicionadas foi verificada pela relação entre o valor calculado e o teórico. O valor calculado é igual ao valor total obtido, subtraído daquele correspondente à solução A, coluna 4 da Tabela. O valor teórico é o valor esperado pela recuperação da amostra adicionada, como mostrado na última coluna da Tabela correspondente. O teste foi realizado em quadruplicata para cada amostra. Calculou-se a recuperação percentual de cada valor correspondente ao volume da amostra de soro adicionada, bem como a média e o desvio padrão. Determinou-se o coeficiente de correlação entre os valores teóricos e os valores calculados obtendo-se a reta de regressão linear e o nível de significância pelo Teste T de Student.

Tabela III.4

Efeito da Diluição do Soro

Aliquotas do soro diluídas a 1/5000 (μl)	Tampão	Diluição Final
20	80	1:25000
40	60	1:12500
60	40	1:8333
80	20	1:6250
100	-	1:6000

Tabela III.5

Exatidão da Técnica

Amostra de soros (μ l)	Solução A (μ l)	Tampão diluente (μ l)	Resultados	
			Valor Calculado	Valor teórico B
10	50	40	0Bt-A	1/10 S
20	50	30	0Bt-A	2/10 S
30	50	20	0Bt-A	3/10 S
40	50	10	0Bt-A	4/10 S
50	50	—	0Bt-A	5/10 S

3.7.3 – Sensibilidade

Este parâmetro foi avaliado pelo processo discreto, determinando-se a percentagem de ligação ocorrida entre a SMB* e o anticorpo, sem adição de massa fria, e a ligação ocorrida quando adicionadas quantidades diminutas de soluções padrões. Assim, 10 determinações foram feitas dos três pontos da curva padrão, $P = 0$ (zero); $P_1 = 0,031$ ng e $P_2 = 0,063$ ng.

Dos resultados obtidos calculou-se a média, o desvio padrão e coeficiente de variação. A fim de verificar a menor quantidade detetável, os valores encontrados foram submetidos ao teste estatístico F bem como ao teste de Tukey para o nível de significância de 5%. Considerando-se que a amostra de soro é diluída de um fator de 5000, a menor quantidade significativa deve ser multiplicada por este valor para se estabelecer qual é a menor quantidade mensurável de Somatomedina B sérica humana.

3.7.4 – Precisão

Esta avaliação foi feita pela análise da reprodutibilidade intra-ensaio e inter-ensaio.

3.7.4.1 – Reprodutibilidade Intra-Ensaio

Com o objetivo de testar a precisão da técnica em diferentes níveis de concentração, dosou-se num mesmo ensaio oito replicatas de uma mesma amostra de mistura de soros.

Usou-se para tanto, três diferentes misturas de soros com alto, médio e baixo teor de Somatomedina B. Calculou-se também, o desvio padrão e o coeficiente de variação para cada nível de concentração estimada.

3.7.4.2 – Reprodutibilidade Inter-Ensaio

Três diferentes amostras, constituídas de misturas de soros, foram dosadas em triplicatas de cada amostra em ensaios consecutivos. As amostras empregadas possuíam teor alto, médio e baixo de Somatomedina B. O objetivo do teste foi avaliar o coeficiente de variação dos valores encontrados em diversos ensaios e em diferentes níveis de concentração.

3.7.5 – Estudos das Características da Curva Padrão

Calculou-se o desvio padrão dos pontos da curva traçada em papel mono-log a partir dos valores percentuais de $\frac{N - B}{B_0 - N}$, em função da concentração em ng/ml, onde B = fração ligada ao anticorpo, N = ligações inespecíficas, B_0 = fração ligada ao anticorpo sem adição de massa fria. Determinou-se também a sensibilidade do método por meio da leitura da concentração no ponto de 90% de ligação. A mesma curva padrão traçada em papel mono-log foi transferida para o sistema logit = $\ln \left(\frac{P}{100 - P} \right)$; onde P é a percentagem da fração ligada. A reta obtida com os valores de logit contra log da concentração dos padrões teve a sua inclinação determinada.

3.8 – Determinação da Concentração de Amostras de Soros

A concentração de Somatomedina B foi determinada em soros de indivíduos normais e em pacientes com hiper ou hipo secreção comprovada de HGH.

Os soros foram diluídos a $\frac{1}{5000}$ com tampão diluente A e amostras de 100 μ l foram tomadas para o uso no ensaio. Os resultados obtidos para os diversos níveis de concentração sérica de SM-B foram agrupados em torno da respectiva média.

4 – RESULTADOS

4.1 – Resultados das Purificações

Nas Figuras 4.1 e 4.2, são apresentados os resultados típicos da primeira e da segunda purificação da Somatomedina B respectivamente, para uma atividade de 125 I de 500 μ Ci, de uma das 18 marcações realizadas.

A Figura 4.3 apresenta a repurificação de uma amostra, imediatamente após a sua eluição em Sephadex G-25 fino. O gráfico 4.4 apresenta o perfil de eluição da mesma amostra, após decorrido um período de tempo de aproximadamente 24 horas entre a primeira purificação e a segunda.

O gráfico 4.5 mostra a repurificação em Sephadex G-75 de uma amostra, após decorrido 2 meses entre as duas purificações, e também o perfil resultante da repurificação logo após a primeira. A fração usada foi a mesma que deu origem ao gráfico 4.2, e que ficou estocada a 4°C. Nos gráficos 4.6 e 4.7, são apresentados resultados análogos aos dos gráficos 4.1 e 4.2, para uma atividade de 600 μ Ci de 125 I.

Na Tabela IV.1, são apresentados os valores das áreas sob os picos 1 e 2, relativos aos: polipeptídeo iodado e iodo livre respectivamente, para purificações em Sephadex G-25 fino, de cinco diferentes misturas de iodação. O valor percentual da área correspondente à SM-B*, nos dá a estimativa da eficiência da iodação.

Na Tabela IV.2, são apresentados os valores das áreas sob os picos 1, 2 e 3, correspondentes à fração danificada ou resultante de agregados moleculares, fração indene e iodo livre, respectivamente, obtidas pela repurificação em Sephadex G-75 do pico um da primeira purificação realizada em Sephadex G-25, em cinco diferentes amostras.

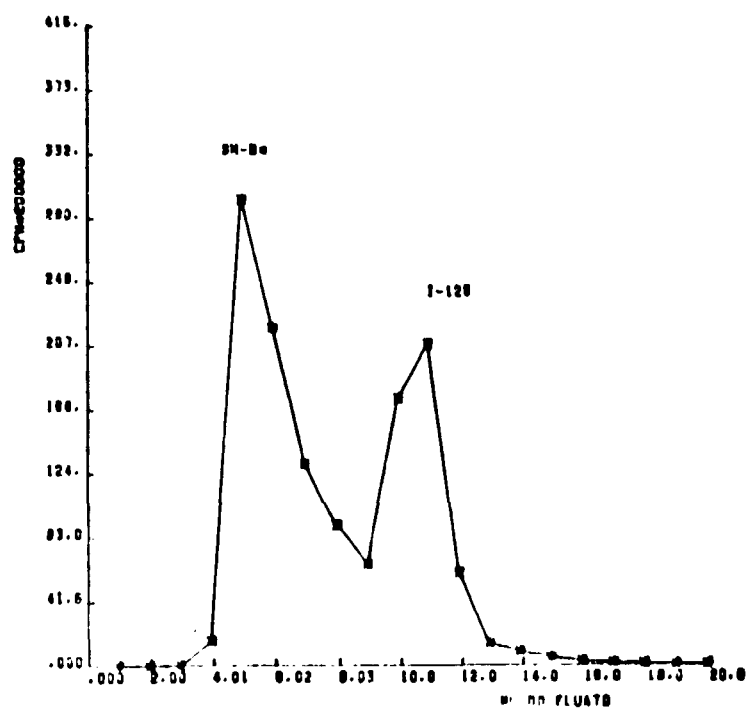


Figura 4.1 — Cromatograma da Purificação em Sephadex G-25 Fino da Somatomedina B Marcada com 500 Micro-Curies de I-125

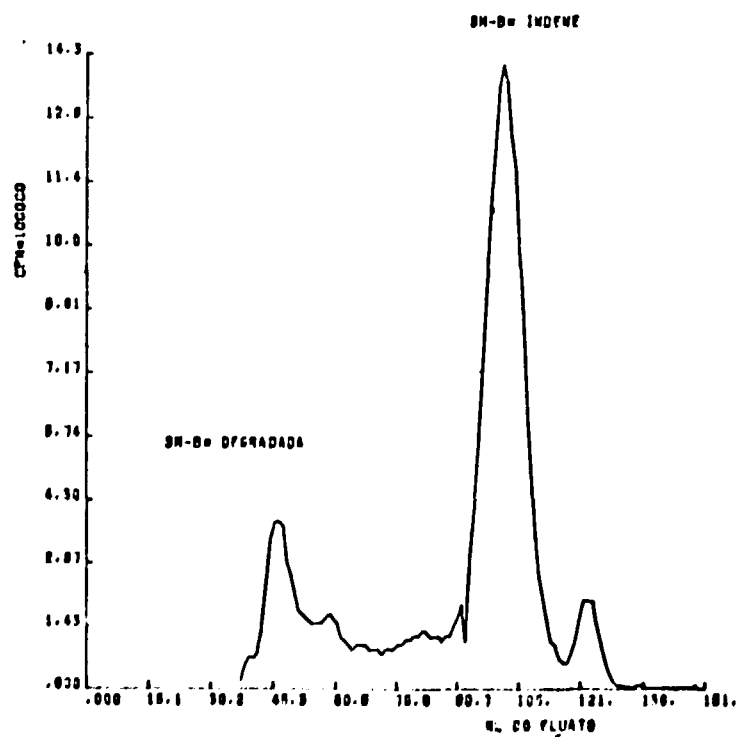


Figura 4.2 — Cromatograma da Repurificação em Sephadex G-75 da Somatomedina B Marcada com 500 Micro-Curies de I-125

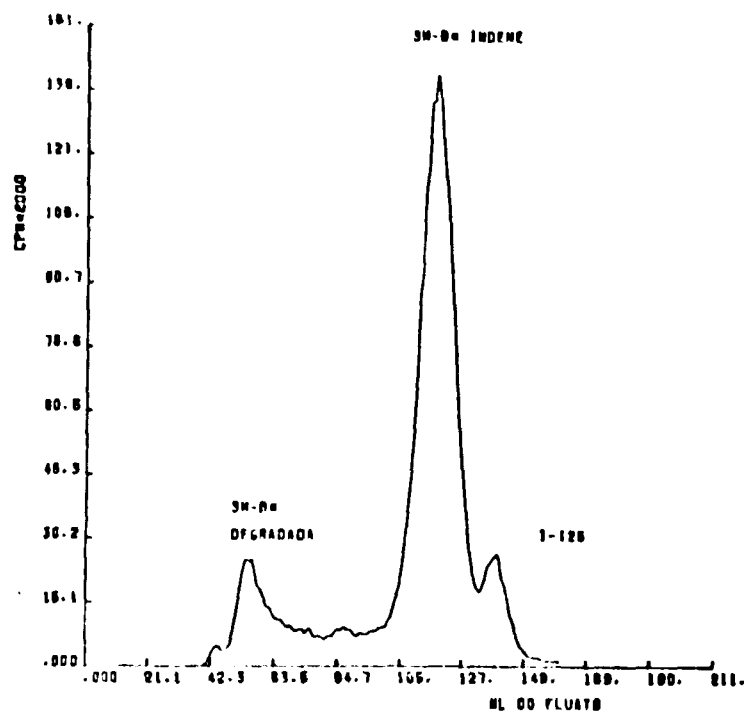


Figura 4.3 – Cromatograma de Repurificação em Sephadex G-75 da Somatomedina B/I-125 Logo Após Primeira Purificação

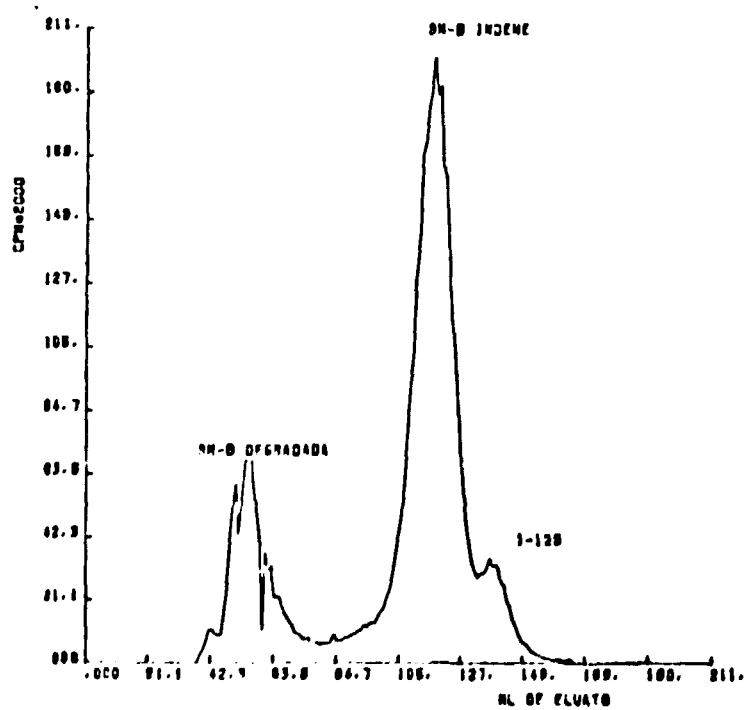


Figura 4.4 – Cromatograma da Repurificação em Sephadex G-75 da Somatomedina B/I-125, 24 hs Após Primeira Purificação

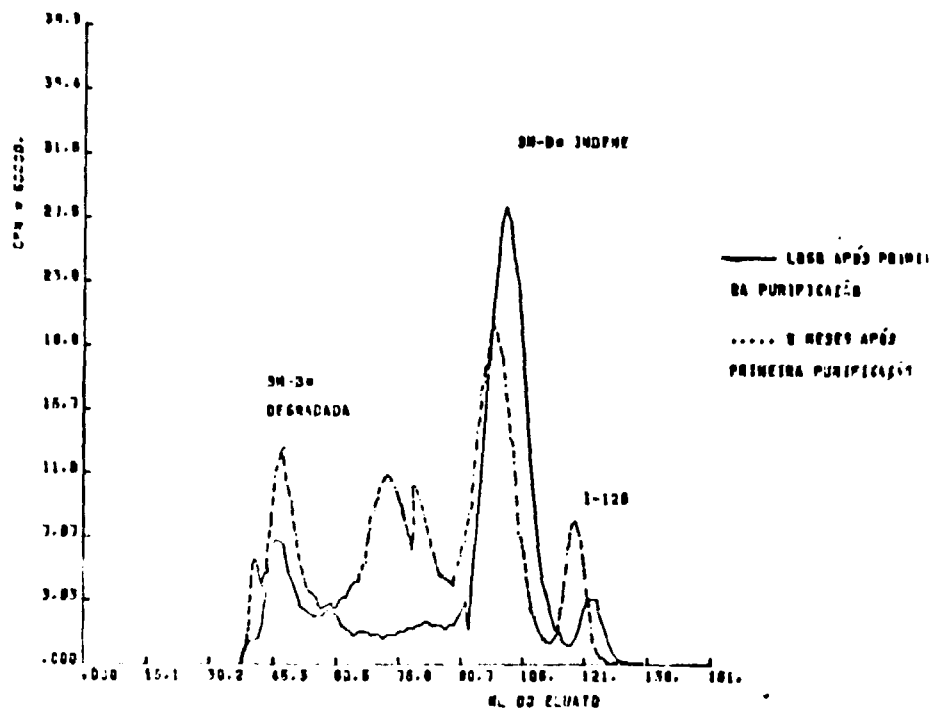


Figura 4.5 — Cromatograma da Repurificação em Sephadex G-75 da Somatomedina B (Logo Após e 2 meses Após a Primeira Purificação)

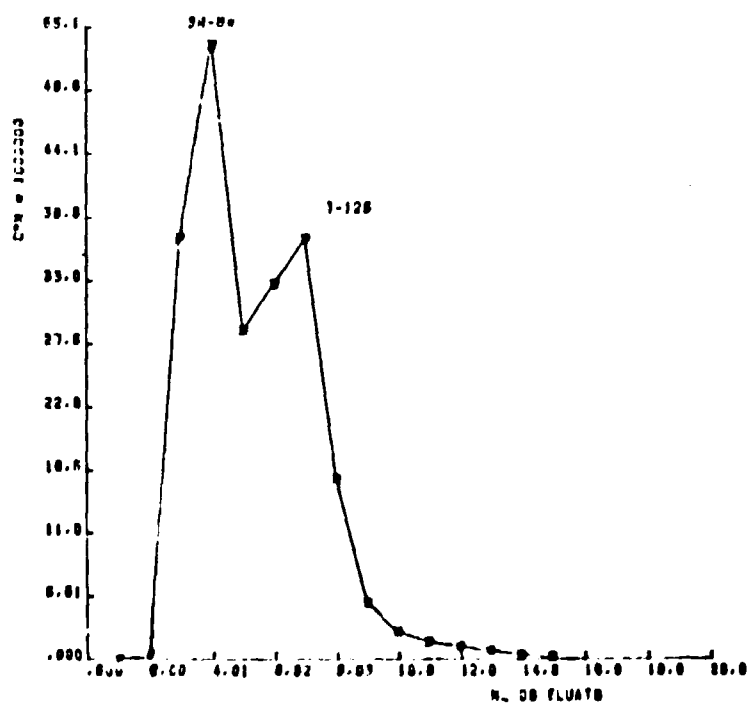


Figura 4.6 — Cromatograma da Purificação em Sephadex G-25 Fino da Somatomedina B Marcada com 600 Micro-Curies de I-125

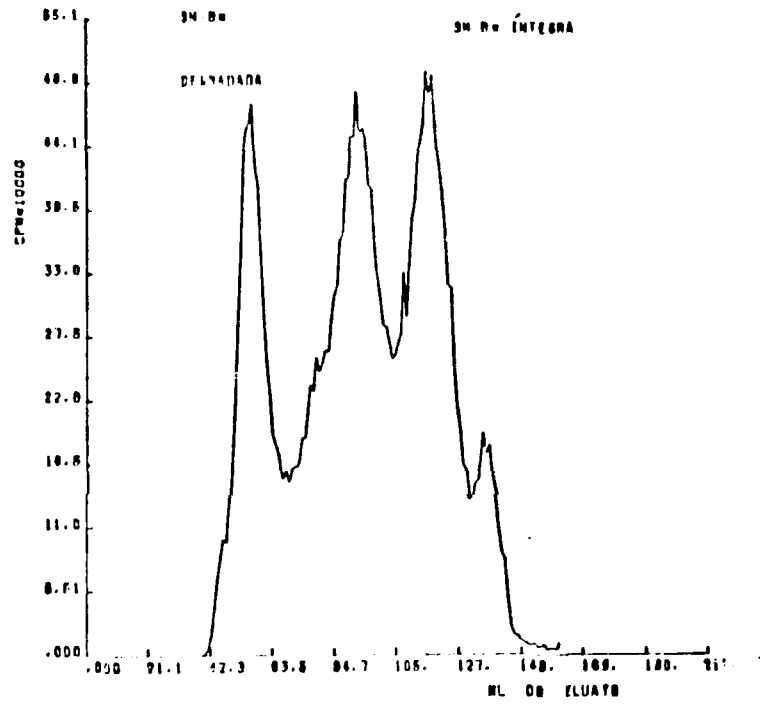


Figura 4.7 -- Cromatograma da Repurificação em Sephadex G-75 da Somatomedina B Marcada com 600 Micro-Curies de I 125

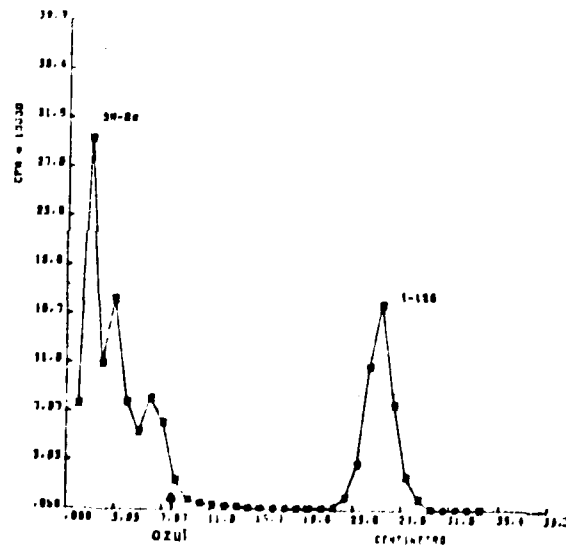


Figura 4.8 -- Cromatoeletroforetograma de Alíquota da Mistura de Iodação da Somatomedina B

Tabela IV.1

Resultados dos Cálculos de Áreas do Perfil de Purificação da SM-B*
em Sephadex G-25 fino

Iodações	% de SM-B*	% de iodo livre
1	37,0	63,0
2	49,4	50,6
3	55,4	44,6
4	55,5	44,5
5	71,5	28,5
	53,8 ± 12,5	46,2 ± 12,5

Tabela IV.2

Resultados dos Cálculos de Áreas dos Perfis Cromatográficos, Referentes à
Repurificação da SM-B* em Sephadex G-75

% de SM-B* como agregados moleculares ou fração danificada	% de SM-B* íntegra	% de iodo livre
28,9	64,4	6,8
28,9	65,4	5,7
27,7	65,5	6,8
22,2	69,3	8,5
23,2	71,1	5,7
26,2 ± 3,2	67,1 ± 2,9	6,7 ± 1,1

4.2 – Resultados das Análises

4.2.1 – Cromatoeletroforese e Auto-Radiografia

A Figura 4.8 apresenta o resultado da cromatoeletroforese e da auto-radiografia a que foi submetida uma alíquota da marcação, antes de sofrer o processo de purificação. A cromatoeletroforese foi efetuada com cinco diferentes amostras de marcações.

A Figura 4.9 apresenta o resultado da cromatoeletroforese e auto-radiografia de uma alíquota do pico 1, fração 5, correspondente ao polipeptídeo marcado, resultante da primeira purificação dada pelo gráfico 4.1.

A Figura 4.10 mostra o resultado da cromatoeletroforese e auto-radiografia a que foi submetida a fração 11, que corresponde ao iodo livre – pico 2 do gráfico 4.1. Alíquotas destas frações de polipeptídeo e de iodo livre foram analisadas em amostras de cinco diferentes eluições.

As Figuras 4.11, 4.12 e 4.13 registram o perfil resultante da aplicação de amostras, logo após a repurificação em G-75 representada na Figura 4.2, das frações 48, 103 e 123 que são: a fração danificada ou agregados moleculares – pico 1, fração indene – pico 2, e o iodo livre – pico 3. Esta análise foi determinada em amostras de cinco diversas repurificações.

As Figuras 4.14, 4.15 e 4.16 evidenciam os resultados obtidos pela cromatoeletroforese de alíquotas, correspondente ao polipeptídeo indene, após 1, 2 e 6 meses da sua purificação, período este em que ficou estocado na temperatura de 4°C.

A Figura 4.17 apresenta o resultado da cromatoeletroforese da fração 48, correspondente ao pico 1 da Figura 4.2, após 6 meses de sua repurificação. Esta fração corresponde ao pico de danificado ou de agregados moleculares do polipeptídeo marcado.

4.2.2 – Resultados da Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE)

A Figura 4.18 apresenta o resultado de análise de uma alíquota da marcação antes de sua purificação, dentre as quatro análises realizadas em misturas de marcações.

A Figura 4.19 apresenta o perfil encontrado na análise da fração 5, correspondente ao polipeptídeo iodado e referente ao pico 1 da purificação em Sephadex G-25 fino.

As Figuras 4.20 e 4.21 representam respectivamente, as análises das amostras do primeiro e terceiro pico resultantes da repurificação em Sephadex G-75, e são correspondentes à fração danificada ou agregados moleculares e ao iodo livre. Esta análise foi realizada em cinco amostras diferentes.

As Figuras 4.22, 4.23 e 4.24 são resultados das análises de amostras do segundo pico da repurificação, logo após a sua realização. Também foram efetuadas 4 medidas.

As Figuras 4.25 e 4.26 são correspondentes à análise por PAGE das mesmas amostras dos gráficos anteriores, após um período de 30 dias entre a repurificação e a eletroforese em gel de poliacrilamida.

A Tabela IV.3 evidencia os resultados percentuais de SM-B^o íntegra, encontradas na análise por PAGE de cinco amostras diferentes de SM-B^o, após separação por cromatografia em Sephadex G-25 fino e G-75.

A Figura 4.27 mostra a representação gráfica da separação por PAGE da fração livre e ligada ao anticorpo, quando 17000 cpm de Somatomedina B^o é incubada com o primeiro anticorpo diluído a um

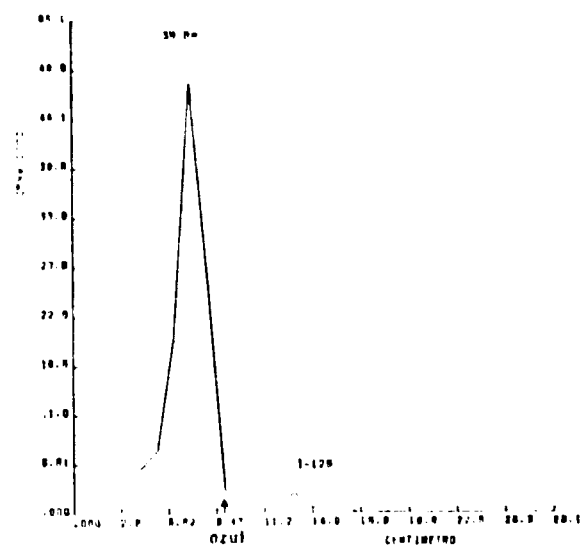


Figura 4.9 – Cromatoeletroforetograma de Aliquota da Fração 5 Logo Após Primeira Purificação da Somatomedina B

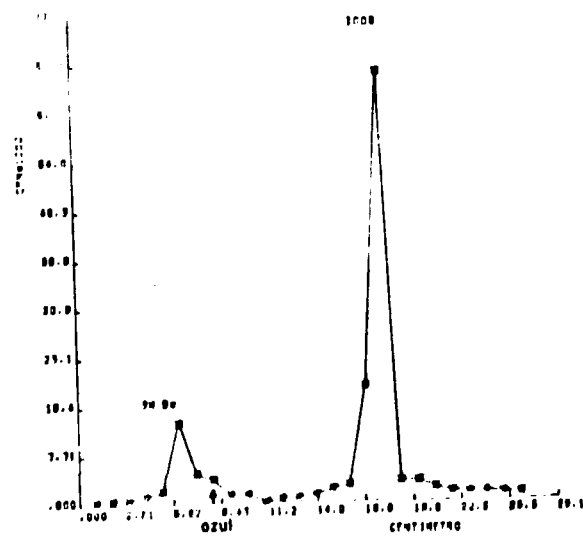


Figura 4.10 – Cromatoeletroforetograma de Aliquota da Fração 11 Logo Após a Purificação da Somatomedina B

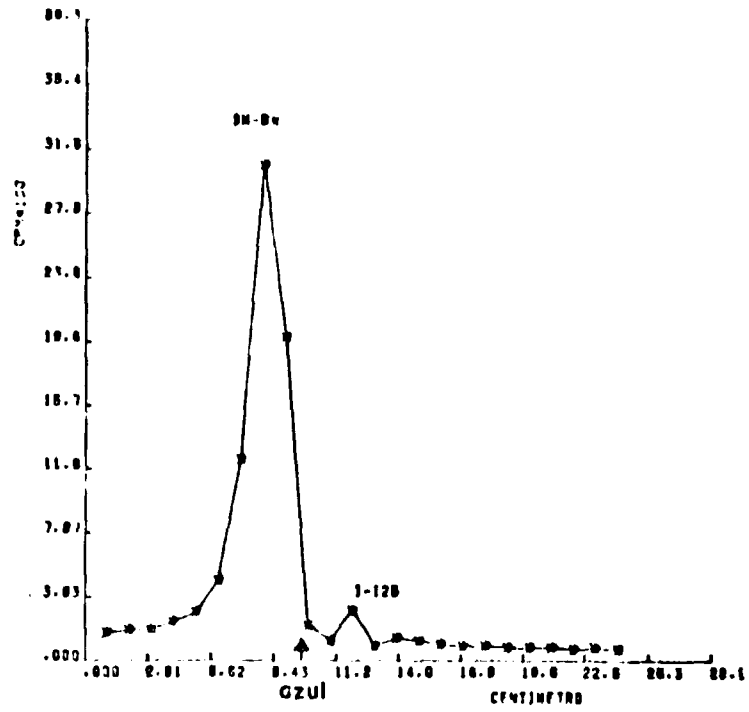


Figura 4.11 — Cromatoeletroforetograma de Alíquota da Fração 48 Logo Após a Repurificação de Somatomedina B

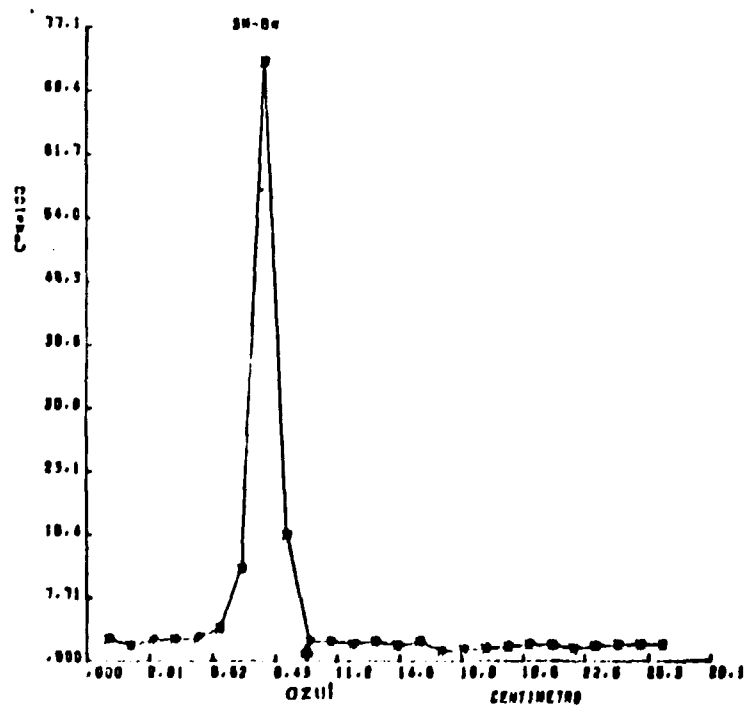


Figura 4.12 — Cromatoeletroforetograma de Alíquota da Fração 103 Logo Após a Repurificação de Somatomedina B

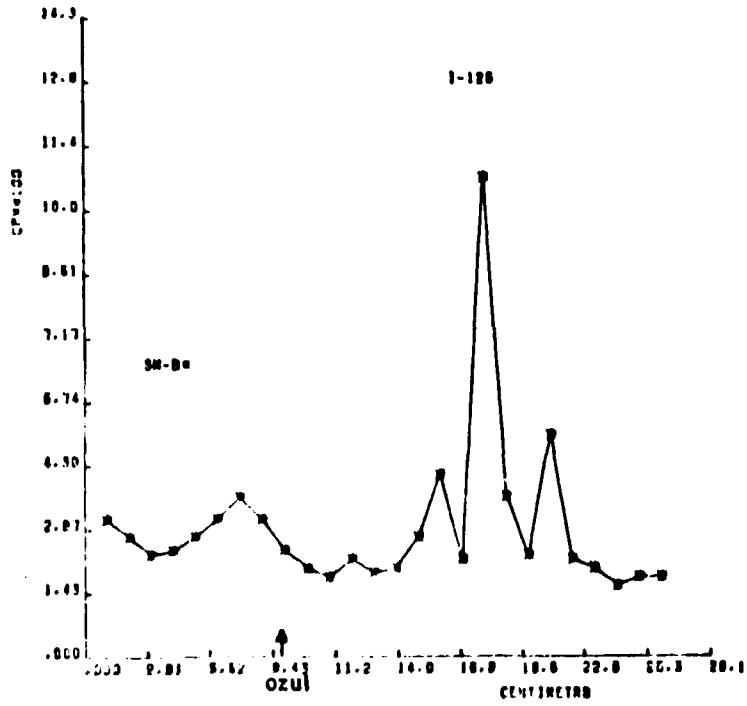


Figura 4.13 – Cromatoeletofotograma de Alíquota da Fração 123 Logo Após a Repurificação da Somatomedina B

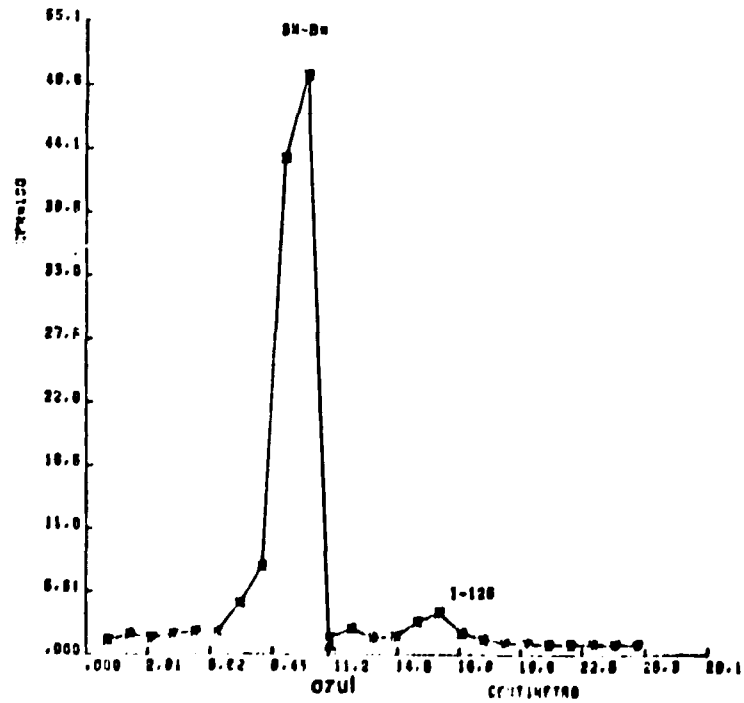


Figura 4.14 – Cromatoeletofotograma de Alíquota da Fração 103 - 1 mês Após a Repurificação da Somatomedina B

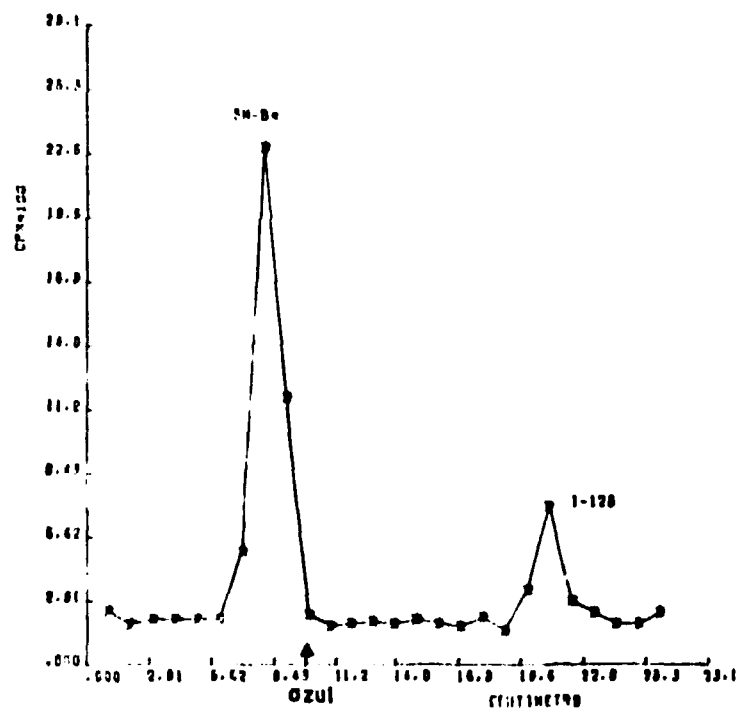


Figura 4.15 – Cromatoeletroforetograma de Alíquota da Fração 103 2 meses Após a Repurificação da Somatomedina B

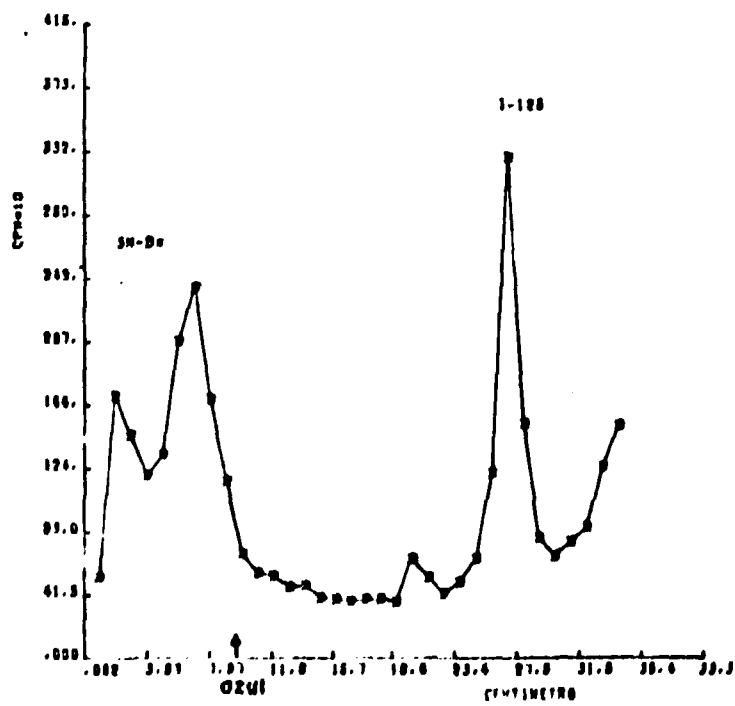


Figura 4.16 – Cromatoeletroforetograma de Alíquota da Fração 103 Após 6 meses da Repurificação da Somatomedina B

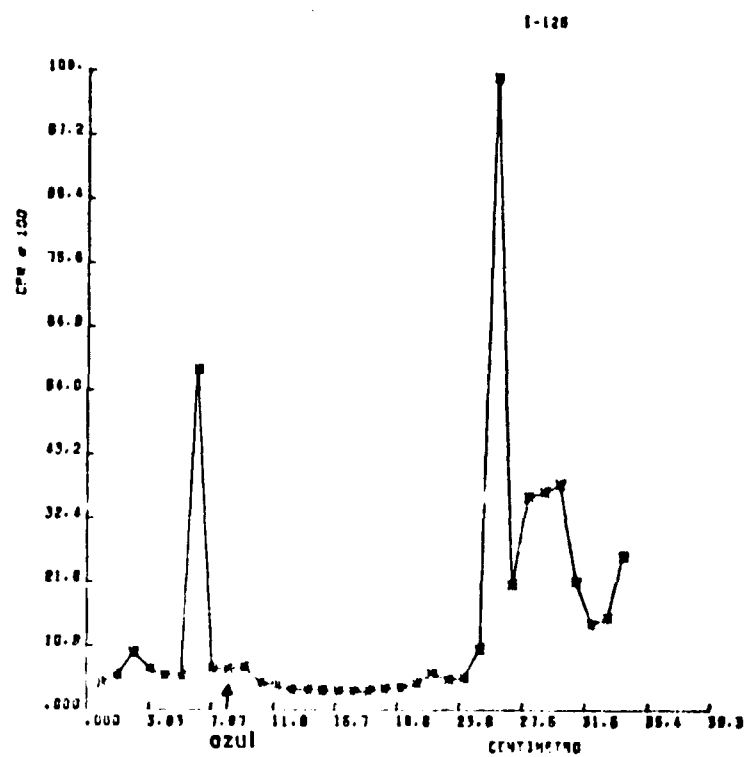


Figura 4.17 - Cromatoeletroforetograma de Alíquota da Fração 48 - 6 meses Após a Repurificação da Somatomedina B

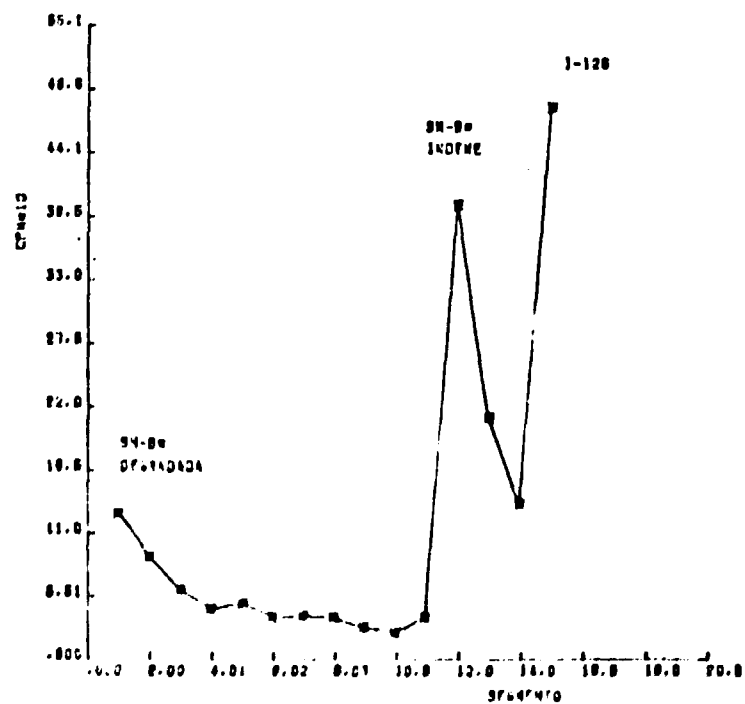


Figura 4.18 - Eletroforetograma de Alíquota da Mistura de Iodação da SM-B

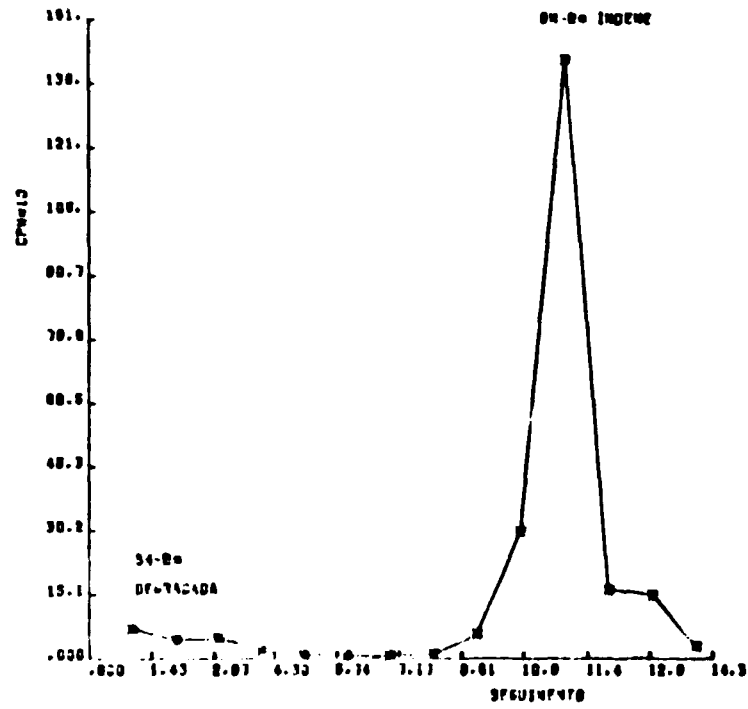


Figura 4.19 - Eletroforetograma de Alíquota da Fração 5 Resultante da Primeira Purificação de Somatomedina B

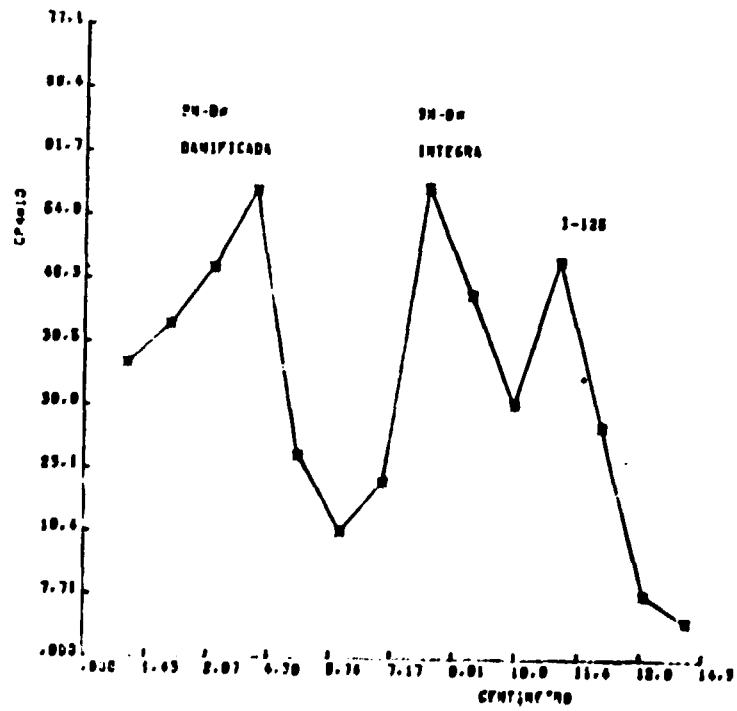


Figura 4.20 - Eletroforetograma de Alíquota da Fração 48 Resultante da Repurificação de Somatomedina B

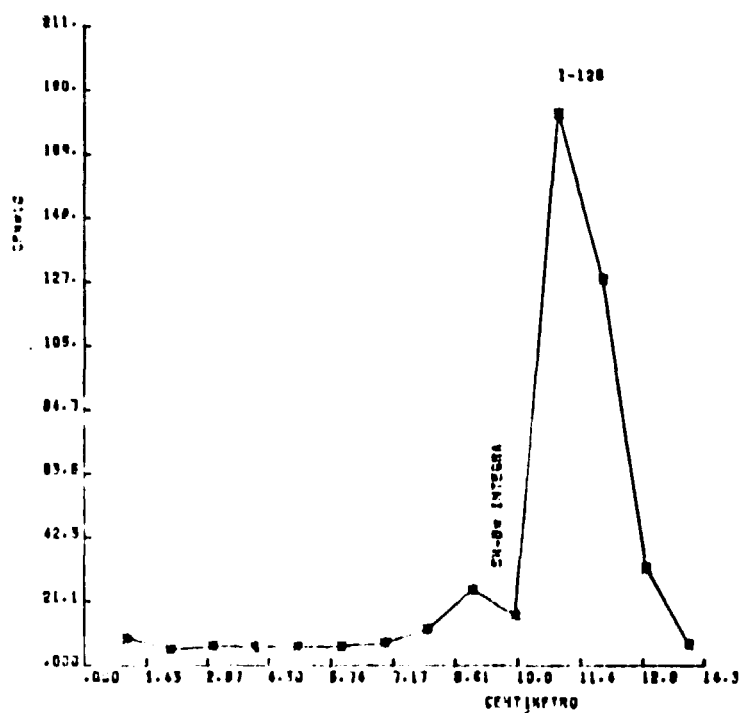


Figura 4.21 – Eletroforetograma de Alíquota da Fração 123 Resultante da Repurificação da Somatomedina B

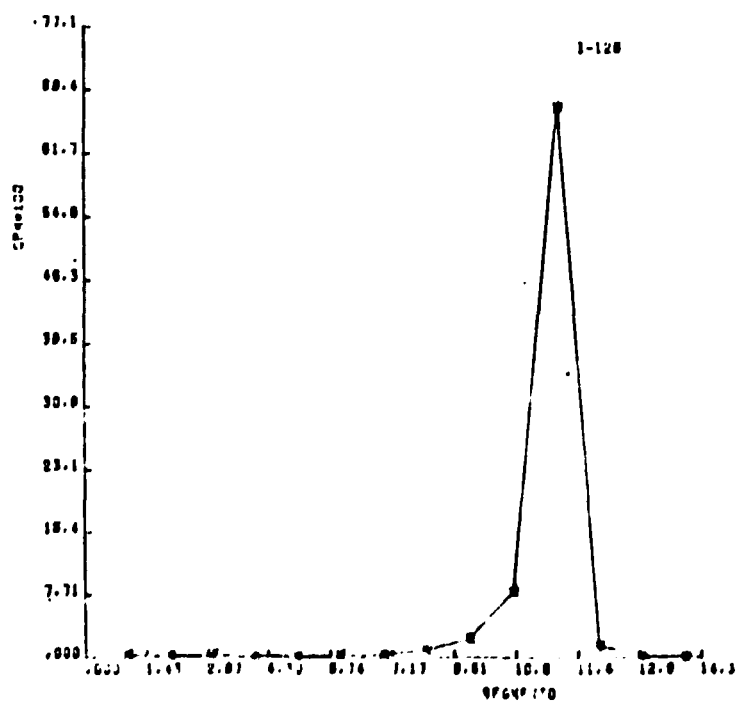


Figura 4.22 – Eletroforetograma de Alíquota da Fração 103 Após Repurificação da Somatomedina B

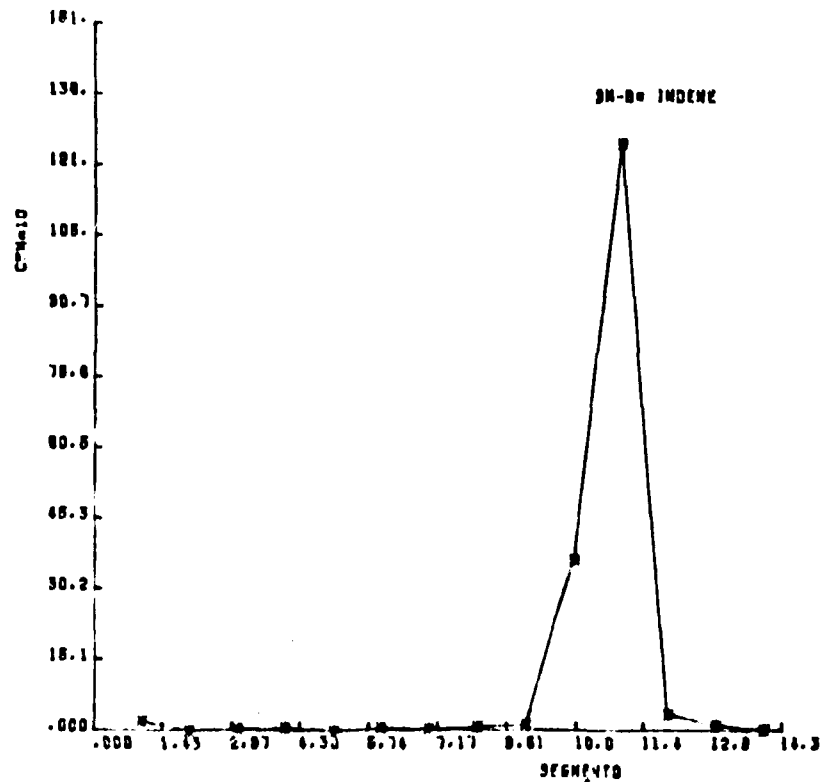


Figura 4.23 - Eletroforetograma de Alíquota da Fração 104 Após a Repurificação da Somatomedina B

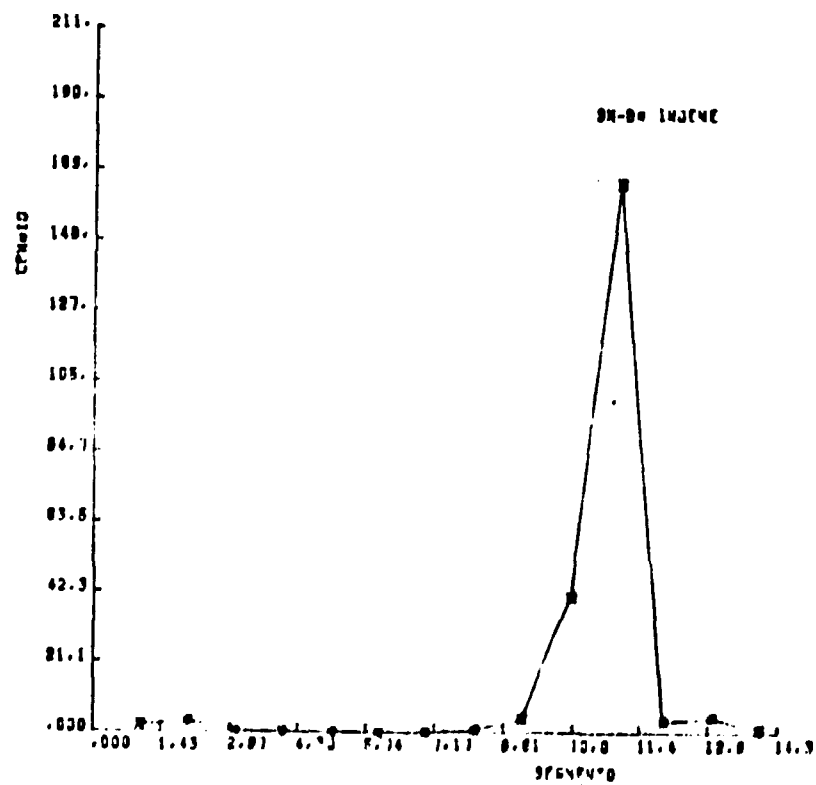


Figura 4.24 - Eletroforetograma de Alíquota da Fração 102 Após Repurificação da Somatomedina B

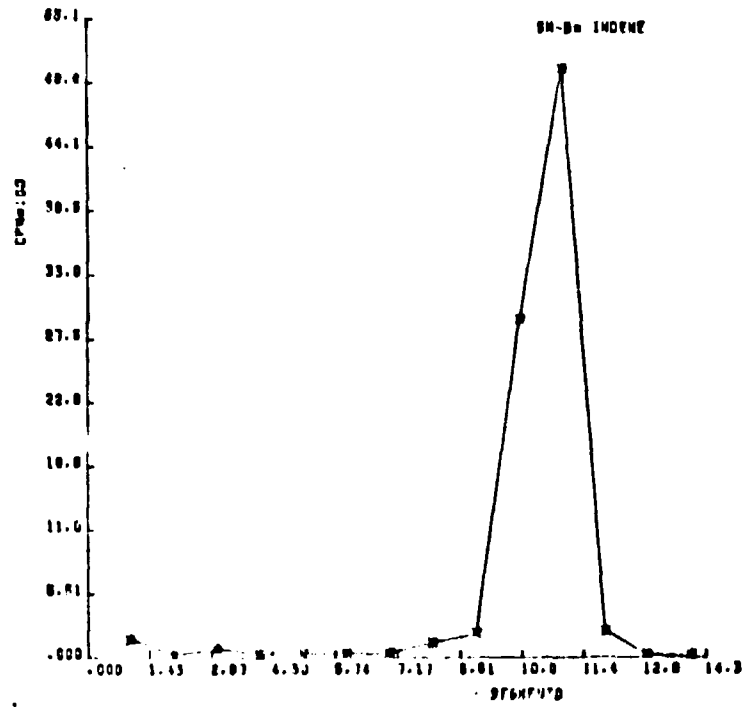


Figura 4.25 - Eletroforetograma de Alíquota da Fração 103 - 2 meses Após a Repurificação da Somatomedina B

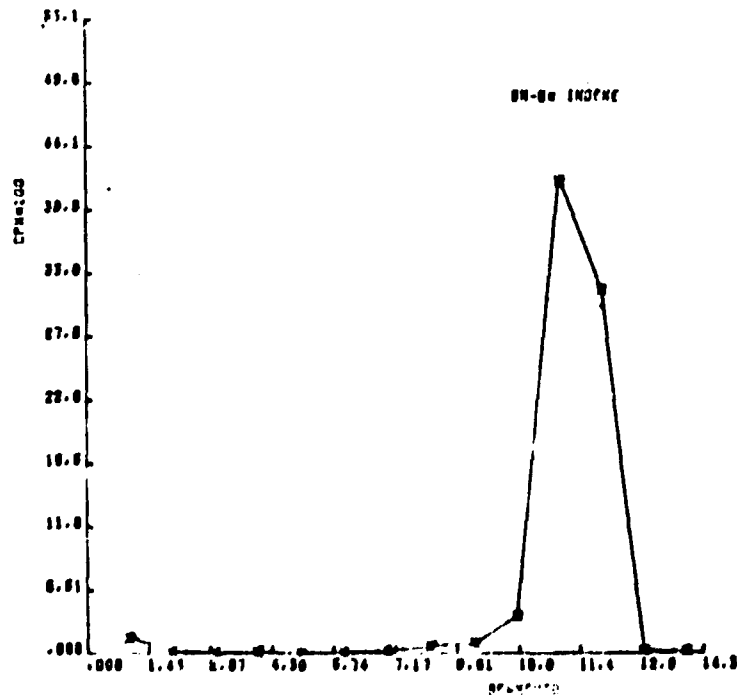


Figura 4.26 - Eletroforetograma de Alíquota da Fração 104 - 2 meses Após a Repurificação da Somatomedina B

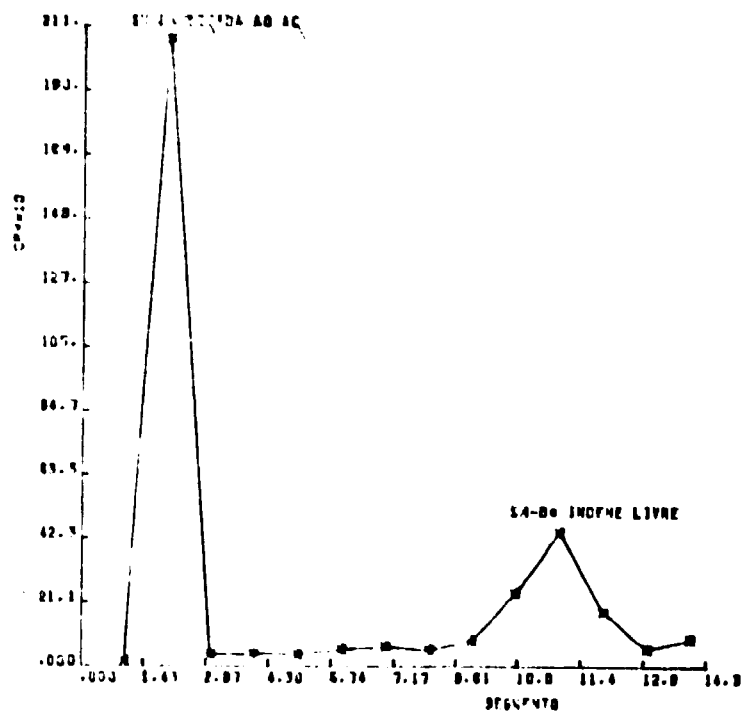


Figura 4.27 - Eletroforetograma de Alíquota da Incubação de Somatomedina B Imuno-Reativa com Anti-Corpo

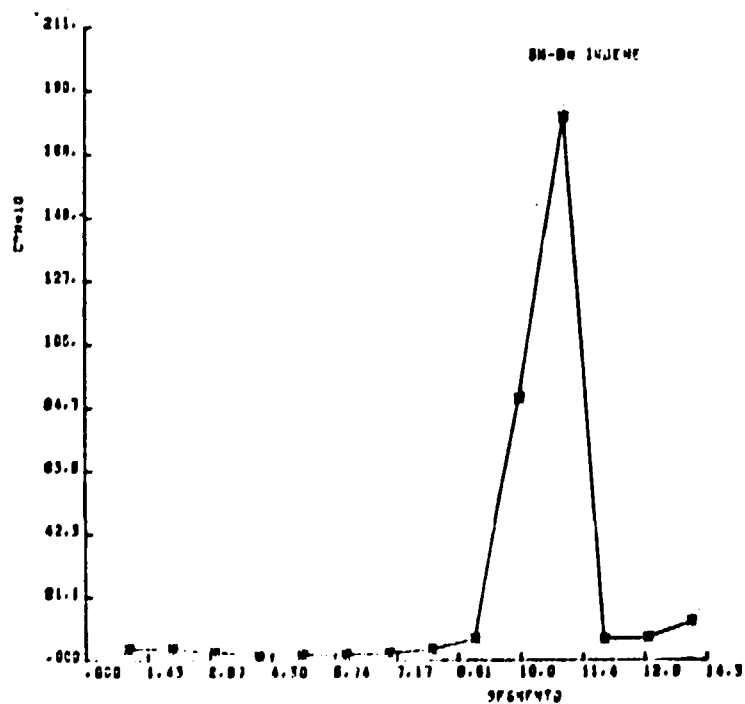


Figura 4.28 - Eletroforetograma de Alíquota de Somatomedina B Imuno-Reativa sem Adição de Anti-Corpo

fator de 1:40000. A separação por PAGE dispensa evidentemente o uso do segundo anticorpo.

A Figura 4.28 mostra a análise da mesma amostra anterior, correspondente ao tubo controle, onde o primeiro anticorpo é substituído por igual volume de tampão diluente A.

4.2.3 – Resultado da Determinação de Atividade Específica

A Tabela IV.4 registra os resultados de determinações de atividades específicas de três amostras de Somatomedina B marcada com ^{125}I , cujas massas foram determinadas pelo método do auto-deslocamento. A terceira coluna apresenta os valores percentuais da fração de Somatomedina B, ligada ao anticorpo, onde T é a radioatividade total em cpm presente na amostra.

A atividade específica, última coluna, é calculada a partir da atividade e da massa existente na amostra dosada.

Tabela IV.3

Controle de Pureza da Somatomedina B- ^{125}I Separada por Cromatografia em Sephadex G-25 Fino e Posterior Repurificação em Sephadex G-75, Analisada por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

Nº de Análises	Valores percentuais de SM-B* (íntegra)	
	Purificações em Sephadex G-25 fino	Purificações em Sephadex G-75
1	96,8	99,6
2	98,2	100,0
3	98,0	99,8
4	98,8	100,0
5	98,3	99,9

Tabela IV.4

Determinação da Atividade Específica de Somatomedina B- ^{125}I

Amostras	cpm adicionado	% $\left(\frac{B-N}{T}\right)$	Massa (ng)	Atividade (μCi)	Atividade específica ($\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$)
A ₃	55643	12,0	0,64	0,0361	56,4
A ₂	29230	16,0	0,38	0,0190	50,0
A ₁	14628	20,4	0,17	0,0095	55,9
					54,1 ± 3,6*

* $\bar{X} \pm S$

4.3 – Resultados das Avaliações das Condições Ótimas

4.3.1 – Quantidade de Traçador a ser Usado

A Tabela IV.5 mostra a ligação ocorrida quando diferentes atividades de Somatomedina B marcada com ^{125}I , e diferentes diluições do anti-soro, são submetidas à incubação por 4 dias a 4°C , sem adição de massa fria.

A ligação se aproxima de 50% na diluição do anti-soro de 1:200.000, quando a atividade é de 5000 cpm. Na diluição de $\frac{1}{100.000}$ a ligação se torna próxima de 50%, quando é usada uma atividade de 10000 cpm.

4.3.2 – Escolha do Título do Anti-Soro

O resultado da determinação de título do anti-soro é apresentada na Figura 4.29. Colocou-se a percentagem de ligação em função do inverso da diluição do anti-soro. A diluição ótima encontrada na ligação de 50% é de $\frac{1}{180.000}$.

4.3.3 – Tempo de Incubação

A Tabela IV.6 mostra a percentagem da fração de Somatomedina B^{*}, que permaneceu ligada ao anticorpo, em função do período de incubação a que foi submetido o meio de reação. A análise de variância o teste de Tukey não acusaram diferença significativa de ligação após o 3º dia de incubação. ($\alpha = 0,05$). A Tabela indica os valores de ligação em triplicatas de cada amostra.

4.3.4 – Diluição do Segundo Anticorpo

A Tabela IV.7 mostra os resultados da ligação entre a Somatomedina B^{*} e o primeiro anticorpo, em função da diluição do segundo anticorpo, com o objetivo de tornar completa a separação, evitando a ação de substâncias interferentes.

4.4 – Resultados da Curva Padrão do Ensaio de Somatomedina B

Na Tabela IV.8 apresentam-se os resultados da curva padrão para concentrações compreendidas entre 0,31 a 10 ng/ml.

Os valores médios percentuais das razões $\left(\frac{B - N}{B_0 - N}\right)$ com as respectivas concentrações dos padrões, foram lançados no gráfico representado na Figura 4.30 em papel semi-log para construção da curva.

A Figura 4.30 mostra a curva padrão, bem como os valores médios e os desvios padrões dos pontos. Determina-se a sensibilidade do método pela leitura da concentração correspondente à ligação de 90%.

Na Figura 4.31 a mesma curva padrão é apresentada na forma de $\text{logit}(Y)$ contra $\ln x$ pois facilita o cálculo de sua inclinação.

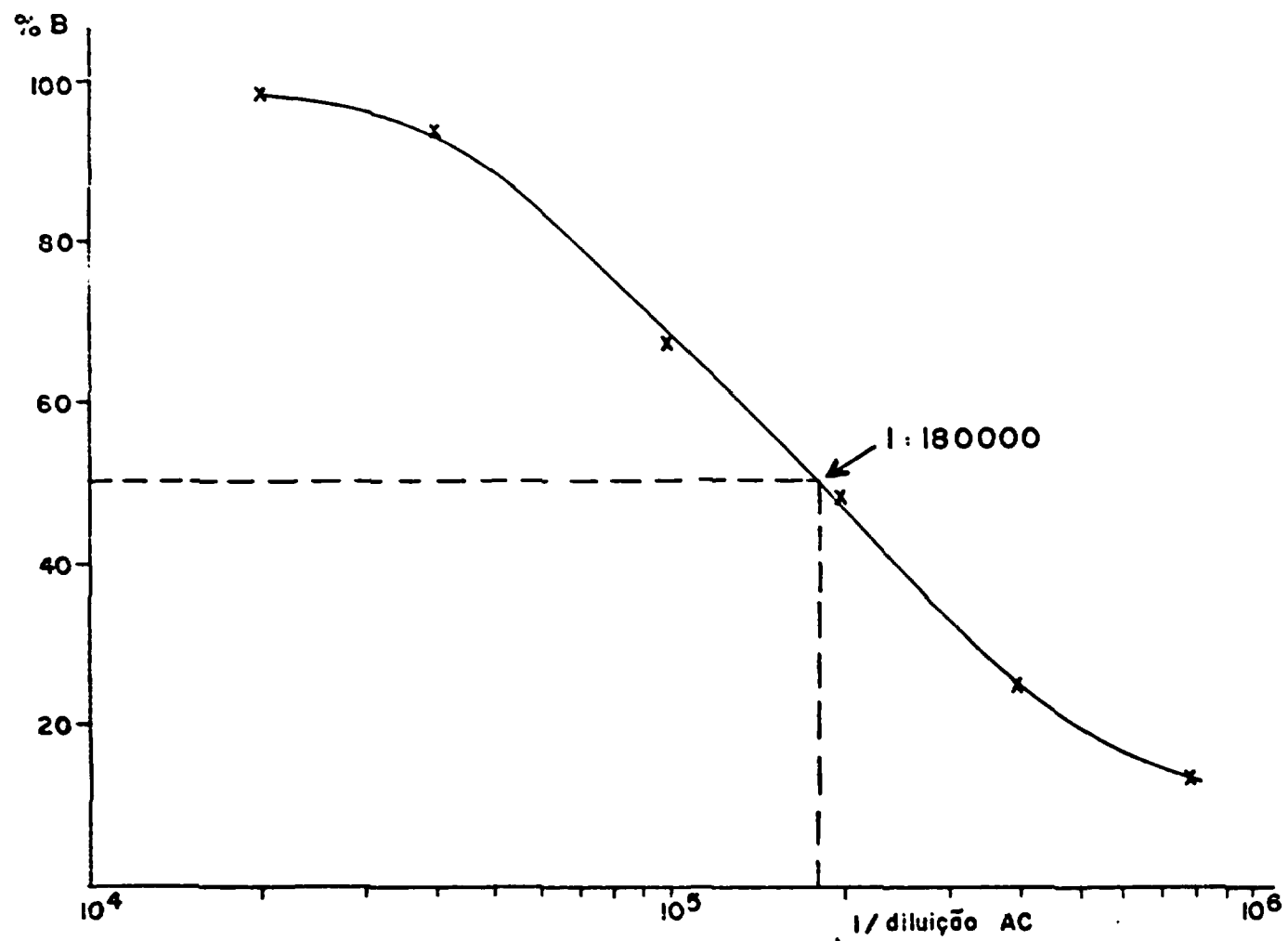


Figura 4.29 - Determinação da Diluição Ótima do Anti-Soro para SMB-¹²⁵I

Tabela IV.5

Quantidade de Somatomedina B 125 I e Diluição do Anticorpo Adequado para o Ensaio

Diluição	Resultados % $\left(\frac{B_0 - N}{T}\right)$		
	5000 cpm	10000 cpm	17000 cpm
Anti-soro			
1:400000	23,2	14,9	9,9
1:200000	46,0	35,0	21,8
1:100000	63,8	59,6	40,6

Tabela IV.6

Determinação do Período de Incubação Adequado para o Ensaio

Incubação a 4°C (dias)	Resultados % $\left(\frac{B - N}{T}\right)$		
	1	19,0	21,0
2	31,0	29,5	31,3
3	45,1	43,8	42,8
4	43,2	47,3	45,9
5	46,1	46,4	47,3
6	48,4	47,6	47,7
7	51,3	50,1	49,6

Tabela IV.7

Estudo da Diluição Adequada do Segundo Anticorpo,
para a Completa Separação das Frações Livres e Ligadas ao Primeiro Anticorpo

Diluição do segundo anticorpo	Resultados % $\left(\frac{B-N}{T}\right)$
1:32	43,0
1:16*	47,6
1:8	44,6
1:4	42,1
1:2	39,2

* Diluição do segundo anticorpo escolhida para uso no ensaio.

Tabela IV.8

Curva Padrão do Ensaio de Somatomedina B para Concentrações
Compreendidas entre 0,31 a 10 ng/ml

P (ng/ml)	B	B - N	% $\left(\frac{B-N}{B_0-N}\right)$	% (B/T)
0	1308	0	0	0
0	12042	10734	100,0	47,0
0,31	11226	9918	92,4	43,9
0,63	10075	8767	81,7	39,4
1,25	8299	6991	65,1	32,4
2,50	6524	5216	48,6	25,5
3,75	4807	3499	32,6	18,8
5,00	4206	2898	27,0	16,4
10,00	3233	1925	17,9	12,6

P - Padrão do SM-B adicionada ao sistema de reação.

B - Contagens correspondentes à fração de SM-B^o marcada com ¹²⁵I, unida ao anticorpo (média de 3 determinações).

N - Contagens não específicas obtidas pelos tubos controles.

B₀ - Contagens do complexo SM-B^o unida ao anticorpo no ponto de ligação máxima, ponto zero, onde não há adição de massa fria.

T - Contagens totais de SM-B^o presentes em cada tubo de reação.

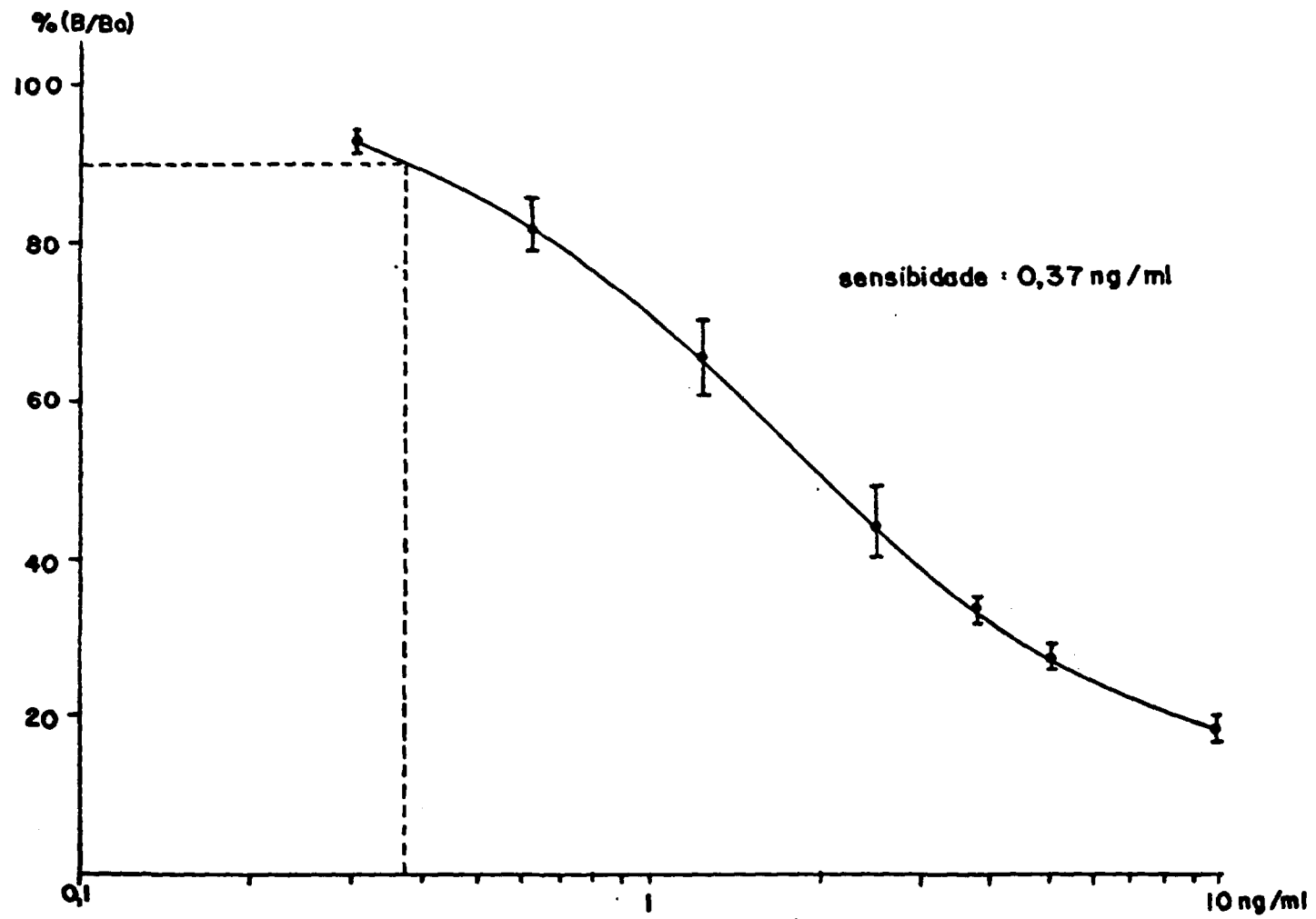


Figura 4.30 - Curva Padrão de SM-B

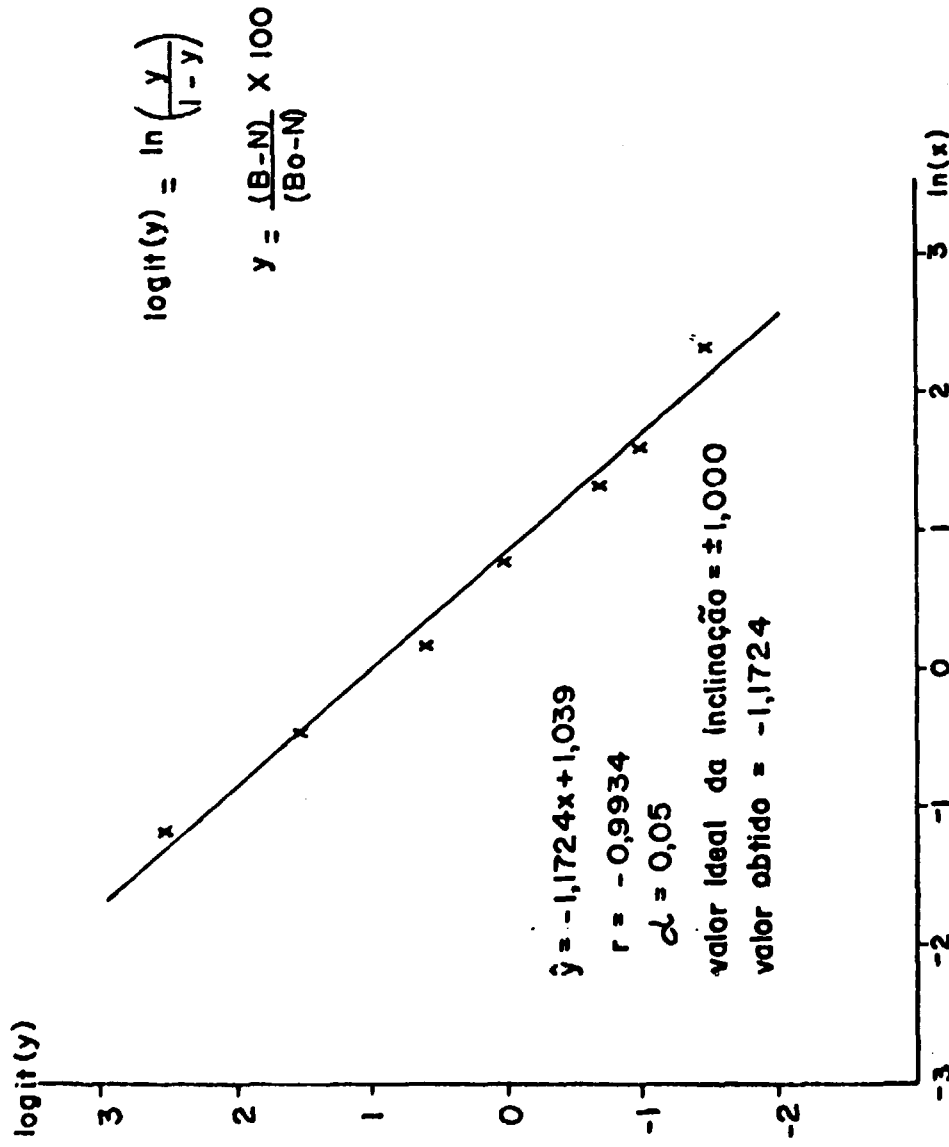


Figura 4.31 - Projção da Curva Padrão de SM-B em $\text{logit}(y) \times \ln(x)$

4.5 – Resultados das Características Intrínsecas do Método

4.5.1 – Especificidade

Na Tabela IV.9 faz-se a comparação entre os resultados provenientes da dosagem de uma mesma amostra de soro, com alto teor de SM-B, em diferentes diluições. A concentração resultante corresponde à média de 5 determinações para cada diluição.

Tabela IV.9

Controle da Especificidade da Técnica. Efeito da Diluição do Soro na Determinação Hormonal Endógena

Volume da amostra (μ l)	Fator de diluição do soro	Valor obtido $\bar{X} \pm S$ (ng/ml)	Valor obtido x fator de diluição do soro $\bar{X} \pm S$ (ng/ml)
20	1:25000	1,03 \pm 0,08	25,75 \pm 2,00
40	1:12500	1,74 \pm 0,09	21,75 \pm 1,13
60	1:8333	2,66 \pm 0,11	22,17 \pm 0,92
80	1:6250	3,54 \pm 0,45	22,13 \pm 2,81
100	1:5000	3,98 \pm 0,48	19,90 \pm 2,40
			$\bar{X}=22,34 \pm 2,12$

A Figura 4.32 representa a reta de regressão linear correspondente, e que pode ser determinada pela Equação $Y = 0,0385x + 0,28$. O resultado da correlação r entre as diversas alíquotas tomadas e os valores médios obtidos é de 0,9944, sendo significativo para $\alpha = 0,05$.

A Figura 4.33 mostra a localização dos pontos correspondentes aos valores médios encontrados nas diferentes diluições, ao longo da curva padrão. Observa-se que os pontos obtidos pela diluição do soro, encontram-se muito próximos àqueles obtidos pelo uso de soluções padrões, praticamente se sobrepondo ao traçado da curva.

4.5.2 – Exatidão

Na Tabela IV.10 apresenta-se os resultados dos testes de controle de exatidão, por meio de provas de recuperação de quantidades crescentes de mistura de soros de teor de SM-B conhecido, adicionadas a uma solução de concentração constante e conhecida de Somatomedina B.

O soro teve a sua concentração determinada em $10,30 \pm 0,35 \mu\text{g/ml}$, em dez replicatas no mesmo ensaio em que foi realizado o teste de exatidão.

A Figura 4.34 mostra a reta de regressão linear correspondente e que é representada pela equação $Y = 1,0929x - 0,0598$. O coeficiente de correlação entre os valores esperados ou teóricos e os valores calculados, foi $r = 0,9993$, significativo ao nível de $\alpha = 0,05$, quando submetido ao teste T de Student.

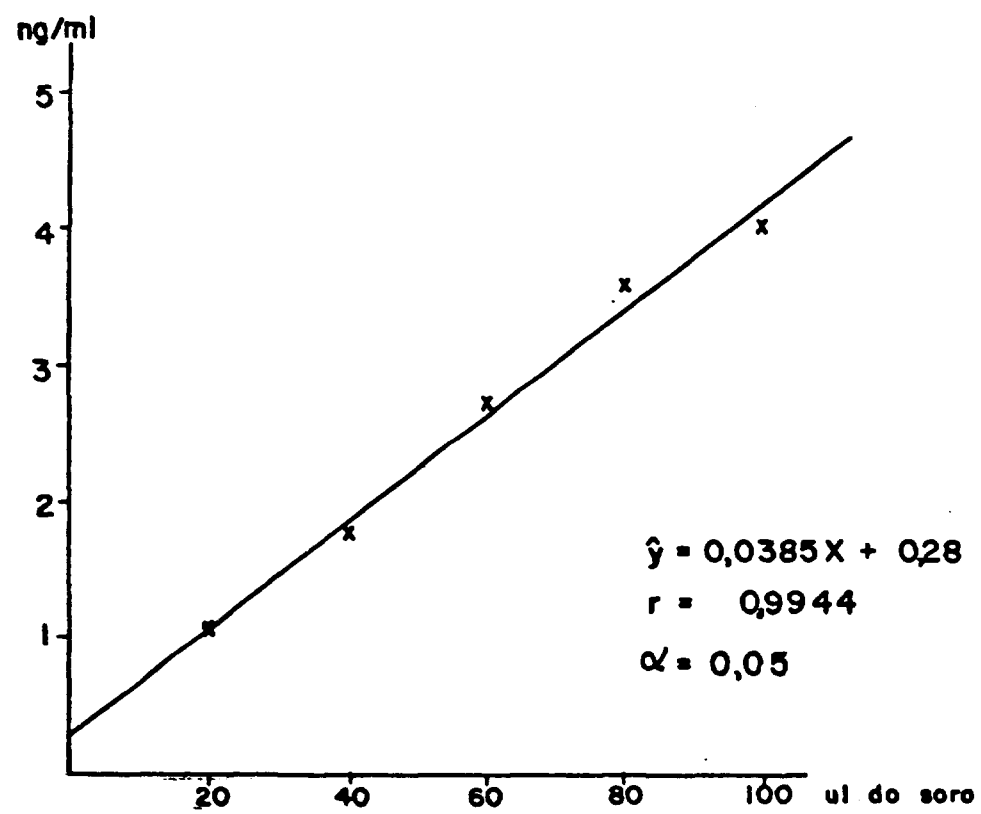
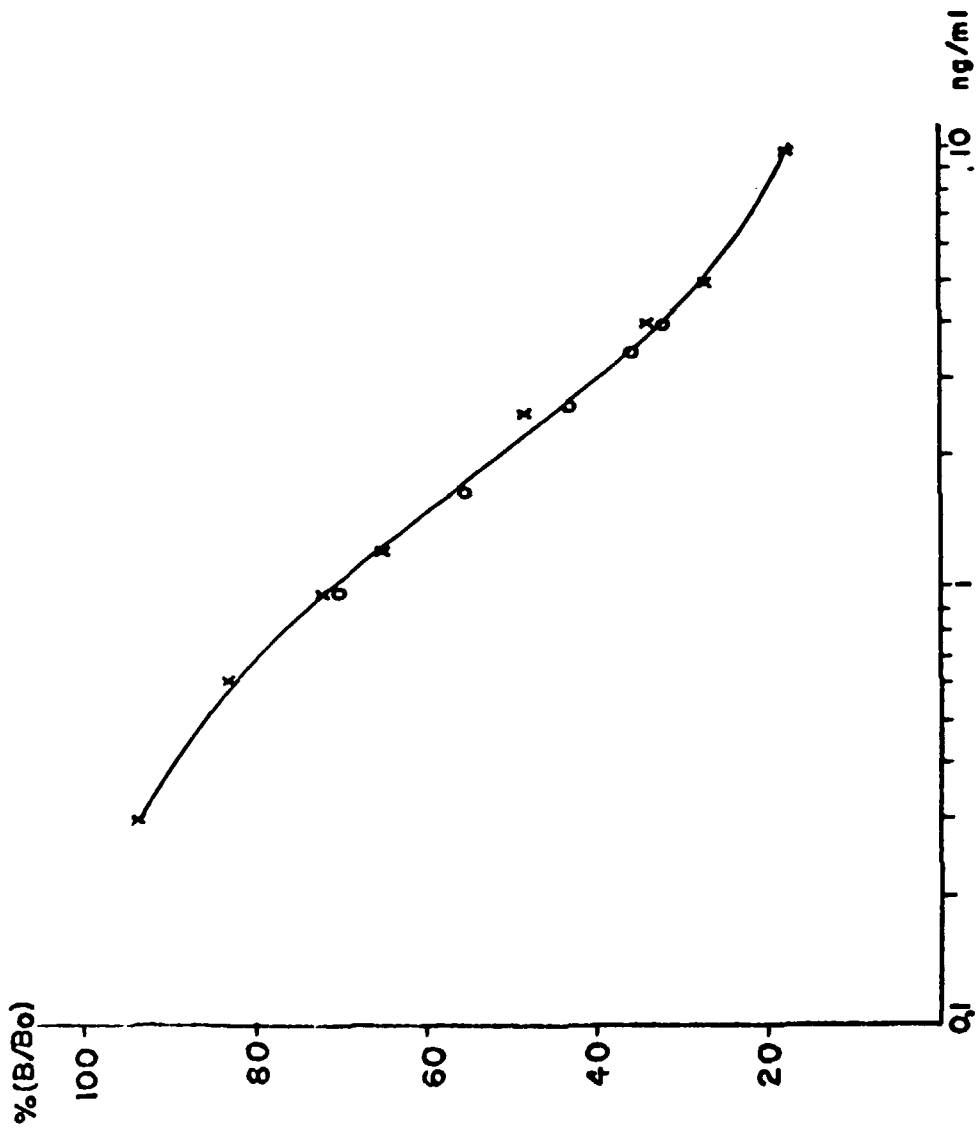


Figura 4.32 - Controle da Especificidade - Efeito da Diluição do Soro sobre a Concentração de SM-B Endógena



x - Padrão de SM - B
 o - Soro com alto teor de SM-B em diversas diluições

Figura 4.33 - Efeito da Diluição do Soro Comparado à Curva Padrão

Tabela IV.10

Controle da Exatidão – Provas de Recuperação de Quantidades Crescentes de Mistura de Soros, com Teor de Somatomedina B Conhecida, Adicionados a uma Solução de Concentração Constante e Conhecida de Somatomedina B. $\bar{X} \pm S$: $10,30 \pm 0,35 \mu\text{g/ml}$ de soro ($n = 10$)

Solução A ($\eta\text{g/ml}$)	Valor teórico de B ($\eta\text{g/ml}$)	Valor obtido ($\eta\text{g/ml}$)	Valor calculado de B Obt-A ($\eta\text{g/ml}$)	Recuperação percentual
0,63	0,21	0,78	0,15	76,2
		0,81	0,18	85,7
		0,80	0,17	81,0
		0,82	0,19	90,5
			$\bar{X} = 0,17 \pm 0,02^*$	
0,63	0,41	0,99	0,36	87,8
		1,00	0,38	92,7
		0,98	0,35	85,4
		1,00	0,38	92,7
			$\bar{X} = 0,37 \pm 0,02^*$	
0,63	0,62	1,25	0,62	100,0
		1,25	0,62	100,0
		1,30	0,67	108,1
		1,30	0,67	108,1
			$\bar{X} = 0,65 \pm 0,03^*$	
0,63	0,82	1,40	0,77	93,9
		1,45	0,82	100,0
		1,45	0,82	100,0
		1,55	0,92	112,2
			$\bar{X} = 0,83 \pm 0,06^*$	
0,63	1,03	1,65	1,02	99,0
		1,65	1,02	99,0
		1,70	1,07	103,9
		1,75	1,12	108,7
			$\bar{X} = 1,06 \pm 0,05^*$	

* $\bar{X} \pm S$

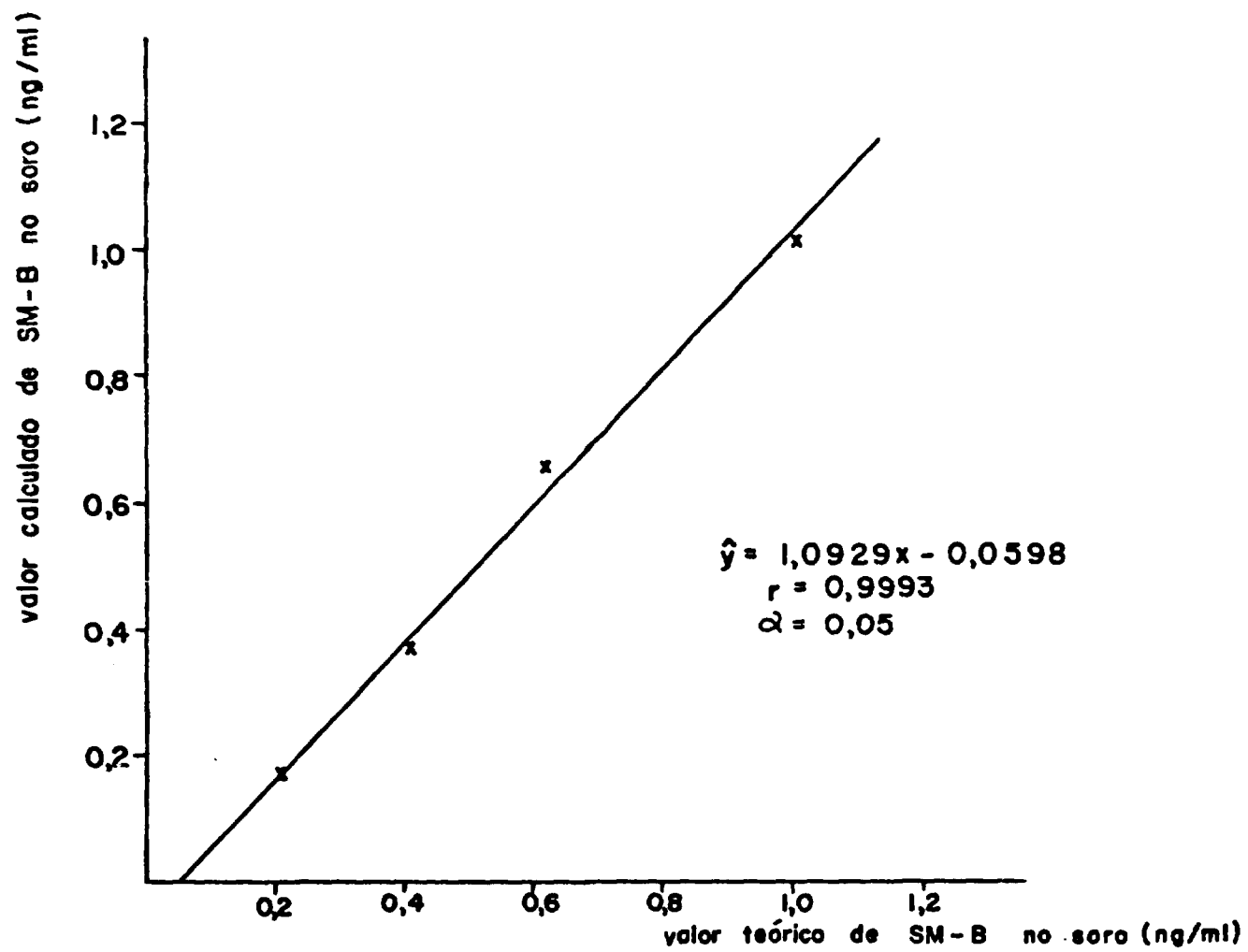


Figura 4.34 - Controle de Exatidão - Provas de Recuperação de Soros Adicionados à Solução Padrão de SM-B

4.5.3 – Sensibilidade

A fim de verificar a menor quantidade de Somatomedina B, que nos dê valores significativamente diferentes do ponto zero, dez determinações foram feitas dos pontos P_1 e P_2 da curva padrão. Os resultados são apresentados na Tabela IV.11. Tanto o teste estatístico F como aquele de Tukey evidenciaram que as concentrações de P_1 e P_2 registraram valores significativamente diferentes do nível zero. Os resultados são significativos para $\alpha = 0,05$.

Tabela IV.11

Avaliação da Sensibilidade do Método

Resultados em %		$\left(\frac{B - N}{T}\right)$	
P_0 (zero)	P_1 (0,031 ng)	P_2 (0,063 ng)	
51,49	45,04	36,86	
50,54	45,64	37,67	
51,89	44,92	39,04	
52,28	45,40	38,89	
51,48	43,71	37,03	
52,89	46,73	38,79	
53,65	44,47	38,70	
51,89	45,30	38,22	
52,14	44,64	39,40	
52,50	45,09	38,52	
\bar{X}	52,08	45,09	38,31
S :	0,85	0,84	0,86
C.V.(%)	1,63	1,86	2,24

4.5.4 – Precisão

4.5.4.1 – Reprodutibilidade Intra-Ensaio

Na Tabela IV.12 são apresentados os ensaios de reprodutibilidade das amostras de soros A, M e B, com alto, médio e baixo teor de Somatomedina B respectivamente, dosadas num mesmo ensaio com oito replicatas de cada amostra.

4.5.4.2 – Reprodutibilidade Inter-Ensaio

Na Tabela IV.13 são apresentados os resultados de reprodutibilidade das amostras A, M e B de soros, com alto, médio e baixo teor de Somatomedina B respectivamente, dosadas em cinco ensaios consecutivos, com a finalidade de avaliar a precisão inter ensaio do método. Os valores apresentados correspondem à média de três determinações de cada soro dosado.

Tabela IV.12

Análise de Precisão – Reprodutibilidade Intra Ensaio

	Amostra A ($\mu\text{g/ml}$)	Amostra M ($\mu\text{g/ml}$)	Amostra B ($\mu\text{g/ml}$)
	28,0	13,5	7,0
	32,0	14,5	6,8
	28,0	13,5	7,0
	33,0	12,5	7,3
	29,0	14,5	6,8
	27,0	14,0	7,0
	26,0	13,0	7,5
	25,0	14,0	7,8
\bar{X}	28,50	13,69	7,15
S.	2,77	0,70	0,35
C.V.(%)	9,70	5,10	4,90

Tabela IV.13

Análise de Precisão – Reprodutibilidade Inter Ensaio

Nº do ensaio	A ($\mu\text{g/ml}$)	M ($\mu\text{g/ml}$)	B ($\mu\text{g/ml}$)
1	29,42	15,75	6,70
2	27,60	14,88	7,60
3	22,50	16,80	8,90
4	30,30	13,90	9,50
5	26,70	15,20	8,80
\bar{X}	27,30	15,31	8,70
S	3,04	1,07	0,89
C.V.(%)	11,10	7,00	7,90

4.6 – Concentrações Séricas de Somatomedina B

Na Figura 4.35, apresentam-se as concentrações basais de Somatomedina B sérica humana e respectivas médias, encontradas neste trabalho em indivíduos normais, em acromegálicos com hipertensão comprovada de HGH e em pacientes com hiposecreção de HGH.

Todas as análises foram efetuadas em indivíduos adultos e as amostras de sangue foram colhidas em jejum.

As concentrações médias e respectivos erros padrão médio (E.P.M.) encontrados foram: $31,0 \pm 1,9$, $19,8 \pm 0,21$ $\mu\text{g/ml}$ e $12,2 \pm 0,7$ $\mu\text{g/ml}$ para indivíduos hiper, normo e hiposecretadores de HGH respectivamente.

5 – DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

5.1 – Dos Resultados das Purificações

Na Figura 4.1, o primeiro pico de atividade corresponde ao polipeptídeo iodado e o segundo ao iodo livre. Na Figura 4.2, o primeiro pico possivelmente corresponderia aos agregados moleculares, o segundo à fração íntegra de SM-B^o e o terceiro ao iodo livre. Entre os dois primeiros, podemos verificar pequenas ondulações dando a impressão da existência de outros picos. Estes outros, provavelmente, como se verificou noutras purificações, onde suas presenças tornaram-se evidentes, como mostram as Figuras 4.5 e 4.7, decorrem de fragmentos de danificados que no processo de remanejamento ao acaso, adquirem diferentes pesos moleculares.

O método apresentado na Figura 4.1, proporciona uma purificação simples e rápida, com a grande vantagem de se evitar o contato durante maior período de tempo, entre o iodo livre e o polipeptídeo marcado, graças ao uso da coluna cromatográfica de pequenas dimensões.

Entretanto, o Sephadex G-25 não separa as frações danificadas ou aquela resultante de agregados moleculares, da fração íntegra de SM-B, tornando-se necessário a repurificação pelo uso do Sephadex G-75.

A alta resolução da separação obtida pelo uso de coluna cromatográfica de grande altura e pequeno diâmetro, justifica o seu emprego. Há de se considerar que o uso de coluna cromatográfica de pequena altura, aumenta a rapidez de separação, mas permanece uma pequena quantidade de iodo livre que deve ser removida numa segunda purificação. Entretanto, o iodo livre retirado nesta segunda purificação, também pode ser decorrente de sua formação durante a estocagem das frações de eluatos da primeira purificação a 4°C, no período de tempo decorrido entre a primeira e segunda purificações. Outrossim, pode ser formado durante a eluição da amostra, visto que a repurificação em Sephadex G-75 necessita de 12 horas para ser completada. Tudo leva a crer que os três fenômenos podem coexistir.

Através das Figuras 4.3 e 4.4, verifica-se que a repurificação da amostra logo após a primeira purificação e decorrido um tempo de 24 horas, apresentam diferentes conteúdos de iodo livre e de frações resultantes de agregados moleculares, como pode ser visto nos primeiro e terceiro picos dos perfis cromatográficos. A fim de se evitar a formação de maiores quantidades desses produtos, procedeu-se à repurificação da amostra, imediatamente após à sua eluição em Sephadex G-25.

Conforme se observa na Figura 4.5, a repurificação da SM-B^o após dois meses da primeira eluição, deu origem ao surgimento de mais dois picos, que provavelmente devem corresponder à fração danificada, com sensível aumento desta e da de iodo livre às custas da diminuição da de polipeptídeo íntegro.

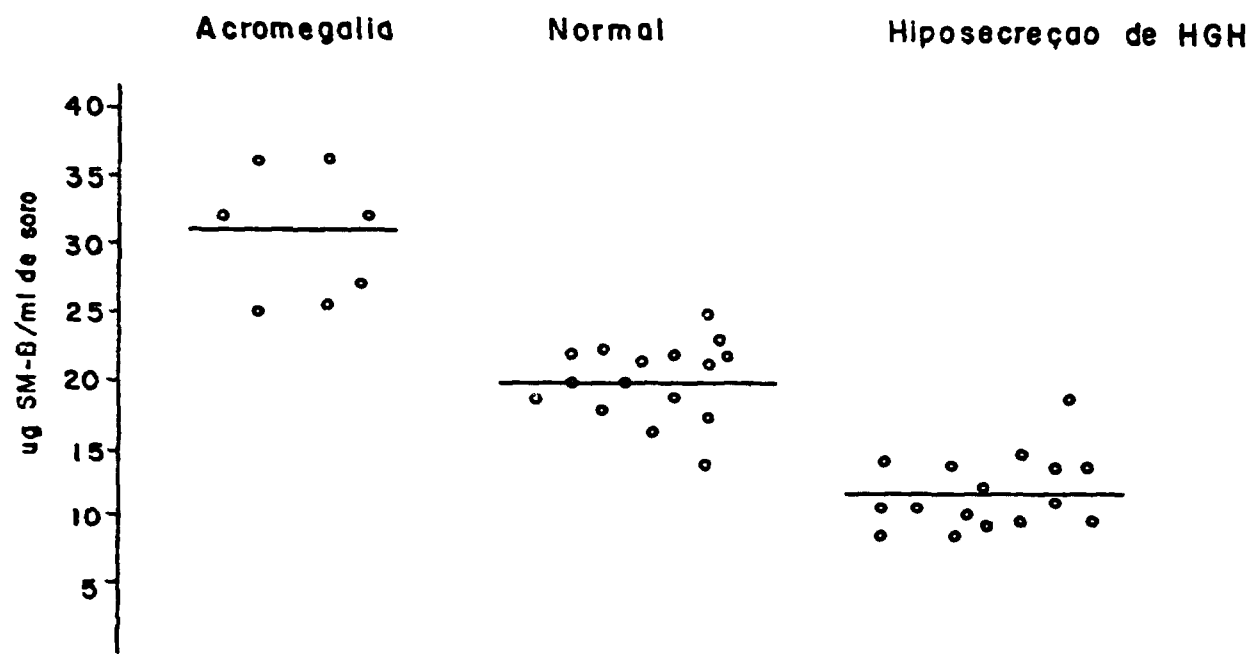


Figura 4.35 - Níveis Séricos de SM-B em Normais e em Alterações da Secreção de HGH

Quando se aumentou a atividade de ^{125}I para $600\ \mu\text{Ci}$, referentes às Figuras 4.6 e 4.7, evidenciase na Figura 4.7 a presença de grande quantidade de agregados moleculares e de fração danificada, diminuição da SM-B^o indene e aumento da fração de iodo livre.

Os cálculos de áreas da Figura 4.6 resultaram em 49,4% para o primeiro pico e 50,6% para o segundo, e de 55,5% e 44,5% para os respectivos primeiro e segundo picos da Figura 4.1, atestando a diminuição relativa da eficiência da iodação.

Pela Tabela IV.1, verifica-se que a média percentual de SM-B- ^{125}I é de 53,8%; este cálculo fornece uma estimativa da eficiência de iodação, sendo compatíveis com os resultados obtidos por outros autores^(37,56,71).

A Tabela IV.2, mostra um resultado médio de 26,6% para produtos de agregados moleculares ou de danificados. Neste cálculo, considerou-se o primeiro pico da repurificação e também a área na região de pequenas ondulações, onde provavelmente se localiza a fração danificada, até a região do segundo pico correspondente à fração indene. Verifica-se grande participação da fração que seria resultante de agregados moleculares, com pouca formação de produtos danificados, nas repurificações em condições favoráveis de trabalho. Em condições desfavoráveis, a participação de frações danificadas é bem maior, como se pode verificar nas Figuras 4.5 e 4.7.

A Tabela IV.2 também mostra uma percentagem média de 67,1% de SM-B^o indene, registrando a grande eficiência obtida através da marcação pela Lactoperoxidase e pelo processo de purificação.

Para o uso nos ensaios é suficiente o emprego de uma única fração de 1 ml, uma vez que se usa 5000 cpm/tubo de reação. Para um ensaio envolvendo 200 tubos testes, seriam suficientes 10^6 cpm. Como pode ser visualizado na Figura 4.2, apenas uma fração do pico de SM-B^o indene pode ser usada, fornecendo contagens suficientes. Este fato possibilita o emprego da fração de alta pureza.

5.2 – Das Análises

As análises realizadas por cromatoelektroforese, revelam a migração da SM-B^o íntegra que, por sua vez, permaneceu na zona das proteínas séricas, as quais se coram pelo azul de bromofenol.

Este fato se deve à mobilidade da SM-B que, na cromatoelektroforese em papel localiza-se na região de α -globulinas⁽⁹⁸⁾.

Hormônios como a insulina e o de crescimento humano, que adsorvem bem à celulose, marcados pela Cloramina-T, quando analisados pela Cromatoelektroforese, apresentam a fração indene na origem, a danificada migra na região das proteínas séricas por perder a capacidade de adsorção do papel, e a de iodo livre migra em direção ao anodo^(41,42,92).

O hormônio danificado, encontra-se na região das α_2 macroglobulinas e albumina sérica, mas na cromatoelektroforese, não há uma resolução eficiente da separação de proteínas séricas⁽⁹²⁾. Em geral, os métodos eletroforéticos, com a notável exceção da eletroforese em gel, não são sensíveis às alterações sofridas pelas frações que se tornam danificadas⁽⁴²⁾.

Como é mostrado na Figura 4.8, os três primeiros picos não estão bem resolvidos, e devem ser docorrentes de Sm-B^o em forma de agregados moleculares, íntegra e danificada, sendo o quarto pico, região do iodo livre, bem distanciado dos demais e na direção do anodo.

A Figura 4.9 e 4.12 atestam a eficiência da purificação em Sephadex G-25 e G-75 respectivamente, onde a participação do segundo pico devido ao iodo livre, é mínima. O baixo conteúdo de iodo livre na análise da fração, revela a pureza desta, conseguida já na primeira purificação.

A Figura 4.10 mostra a localização do iodo livre na direção da região do anodo, na análise da fração número 11, correspondente ao segundo pico da primeira purificação. Nota-se nesta figura um pequeno pico na região do corante, que deve ser atribuído à SM-B* que não foi totalmente separada do iodo livre durante o processo de eluição da amostra em Sephadex G-25.

As auto-radiografias demonstram a presença da radioatividade nas regiões enegrecidas, e são correspondentes aos picos de atividades obtidos nos perfis gráficos das Figuras 4.8, 4.9 e 4.10.

Na Figura 4.13 visualiza-se vários picos na região de iodo livre, que podem ser condizentes com a presença de iodo em formas diversas de polímeros⁽⁵⁴⁾.

A estabilidade da fração de SM-B* indene, é analisada nas Figuras 4.14, 4.15 e 4.16. A SM-B demonstrou ser adequada ao uso após 1 mês de sua marcação, estocada a 4°C.

A estabilidade da fração indene é maior do que aquela de agregados moleculares, conforme pode ser analisado pelas Figuras 4.16 e 4.17.

A análise de mistura de marcação pela eletroforese em gel de poli(acrilamida), representada na Figura 4.18, revela a pequena parcela de fração danificada ou resultante de agregados moleculares formados durante o processo de iodação. Esta fração permanece no gel de amostra, a fração de SM-B indene localiza-se, em relação ao anodo, na região pré-albumina, e o iodo livre anteriormente à fração indene, também em relação ao anodo.

As Figuras 4.19, 4.22, 4.23 e 4.24 demonstram a pureza radioquímica das respectivas amostras, alcançadas pelas purificações, confirmando os resultados obtidos pela cromatoeletroforese.

A Figura 4.20 demonstra a presença de fração indene de SM-B na análise de frações de agregados moleculares que foram separados pela cromatografia em Sephadex G-75. Estes agregados moleculares parecem ser apenas polímeros da molécula de SM-B, não possuindo alterações significativas em sua molécula que justificassem um comportamento eletroforético diferente do observado. Entretanto, a estabilidade da fração de agregados moleculares é menor que aquela da fração indene.

As Figuras 4.25 e 4.26 demonstram a estabilidade notável das frações analisadas nas Figuras 4.22 e 4.23 respectivamente.

Os resultados da Tabela IV.3 evidenciam a alta pureza das frações de SM-B indene, chegando a ser de praticamente 100%, após a repurificação da amostra.

A Figura 4.27 demonstra a localização da SM-B* ligada ao anticorpo, que permaneceu no gel da amostra, enquanto que a fração indene livre se encontra no segundo pico. A Figura 4.28 demonstra a localização da SM-B* indene livre, na análise da mesma amostra da Figura 4.27, onde não se adicionou anticorpo. Observa-se que a preparação é bem pura sem existência de outros picos de atividade.

O uso de técnicas que separam simultaneamente todos os componentes presentes na amostra, permitem a um só tempo a estimativa de cada componente da amostra. Como se pode comprovar na análise de amostras pelo PAGE, praticamente não existe fração de agregados moleculares ou danificadas nos eluatos correspondentes ao polipeptídeo indene, justificando-se o emprego da CEF, mesmo considerando uma provável separação incompleta, o que não interferiria com a análise, devido à sua participação de pequena monta.

Os valores registrados na análise pela cromatoeletroforese e pelo gel de poli(acrilamida), comprovam a eficiência dos métodos de purificações empregados. Em vista dos resultados obtidos, persistimos no emprego deste método de preparação do antígeno marcado, embora o uso de coluna cromatográfica nessas dimensões torne a técnica mais trabalhosa.

A atividade específica média de $54,1 \pm 3,6 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$, apresentada na Tabela IV.4, mostra uma boa atividade específica que permite a realização de ensaios com alta sensibilidade como se verá no item 5.4. Este método de cálculo de atividade específica é preciso^(16,57) e tem a vantagem de relacionar a atividade da amostra com relação à massa correspondente imunorreativa, uma vez que a sua determinação se faz por meio de reação imunológica, usufruindo-se da capacidade de complexação com o anticorpo. Com o uso de preparações com esta atividade específica, a massa de Somatomedina B marcada com ^{125}I , utilizada no ensaio foi de apenas aproximadamente 59 pg., considerando-se a atividade específica da preparação $54,1 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$, a eficiência do aparelho 70% e a contagem da preparação marcada empregada 5000 cpm. Essa pequena quantidade de traçador usada não interfere na sensibilidade do ensaio, tornando possível a quantificação de pequenas concentrações de antígeno.

5.3 – Das Avaliações das Condições Ótimas

Conforme foi discutido no item 3.5.1 e mostrado na Tabela IV.5, escolheu-se a quantidade de traçador a ser usada no ensaio, que desse 5000 cpm, fato que possibilita maior diluição do anti-soro, sem prejuízo na praticabilidade de detecção da radioatividade.

Na escolha da diluição ótima do anti-soro, mostrado na Figura 4.29, o ponto de ligação de 50% foi encontrado na diluição do anti-soro de 1:180000. Observa-se na mesma figura, que em excesso de anticorpo, a ligação é de 98%, denotando a alta imunorreatividade da preparação.

A análise dos dados da Tabela IV.6 pela análise de variância e o teste de Tukey, não acusam a diferença significativa após o 3º dia de incubação, razão pela qual o período de incubação escolhido foi de 4 ou 5 dias, para dar uma margem de segurança. Nota-se a manutenção da capacidade imunorreativa ao longo do teste, o que revela a estabilidade da preparação também no que concerne à manutenção de imunorreatividade da preparação.

Com relação à Tabela IV.7, a escolha da diluição do 2º anticorpo deve-se ao fato desta diluição proporcionar maior eficiência na separação, conforme pode ser visualizado. A maior diluição que consegue separar as frações de forma eficaz, deve ser escolhida, uma vez que o excesso de 2º anticorpo ou do tampão diluente causa diminuição na eficiência de separação das frações⁽⁴⁹⁾.

A separação pelo método do duplo anticorpo é prática, facilitando o seu emprego em rotina clínica. A especificidade da reação, torna possível uma excelente separação, com pouca participação de ligações inespecíficas⁽⁴¹⁾, da ordem de 5%, conforme mostra a Tabela IV.8, que não interferem na qualidade do ensaio.

Cumpre ressaltar que a possibilidade de efetuar o ensaio das amostras e padrões em condições análogas, deve-se ao fato do soro ser usado em diluições extremas. Outro fator decorrente desse fato e que deve ser considerado devido a sua importância, é a possibilidade de se evitar efeitos não específicos de proteínas plasmáticas normalmente observados em amostras de concentração plasmática elevada⁽⁹¹⁾.

O fato de se usar soros em diluição elevada, evita também a degradação de SM-B* pelos componentes da amostra, durante o período de incubação⁽⁹⁵⁾. Este fato assegura um meio homogêneo entre os padrões e soros, e portanto propicia comportamento análogo entre amostras e padrões, o que é um fator ideal em radioimunoensaio^(94,95).

A determinação da sensibilidade do ensaio, pelo método gráfico^(41,49) conforme apresentado na Figura 4.30, apresentou resultado próximo àquele mostrado no item 4.5.3, com valores de 0,37 e 0,31 ng/ml respectivamente.

Estes valores devem ser multiplicados por um fator 5000 para se encontrar a sensibilidade de determinação de SM B em soros humanos, uma vez que estão diluídos por este fator no ensaio.

A inclinação da reta representada na Figura 4.31, foi de $-1,1724$, sendo que a ideal é igual a $\pm 1,0$ ⁽⁷⁰⁾.

5.4 – Das Características do Método

De acordo com o critério proposto por Melo* (ver Apêndice), podemos considerar o coeficiente de correlação encontrado: $r = 0,9944$ como excelente, sendo significativo para $\alpha = 0,05$. A Tabela IV.9, fornece praticamente os mesmos resultados para o soro não diluído e em diferentes diluições, quando estes são corrigidos pelo fator de diluição.

A linearidade e a alta correlação demonstrada na Figura 4.32, comprovam a inexistência de fator sérico interferente, sendo portanto uma prova da especificidade do sistema, conforme preconizado por Yalow⁽⁹¹⁾. A distribuição dos pontos quando transferidos para a curva padrão da Figura 4.33, revela o idêntico comportamento dos soros e soluções padrões, validando a eficácia da técnica proposta.

A validade da técnica, requer a recuperação quantitativa de hormônio adicionado ao plasma ou soro⁽⁹⁶⁾. A recuperação apresenta valores médios de 83%, para concentrações extremamente baixas de SM-B, na concentração de 0,21 ng/ml, e alcança 103% para valores ainda baixos, de 1,03 ng/ml, conforme registrado pela Tabela IV.10. A correlação apresentada pela Figura 4.34, foi 0,9993, valor considerado excelente.

A sensibilidade do método reflete-se pelo resultado de 0,031 ng dado pela Tabela IV.11, permitindo mensurações séricas de SM-B de 0,155 μ g, valor este que é cerca de 15 vezes menor daquele encontrado em indivíduos normais. A sensibilidade do método depende da qualidade do anti-soro usado⁽⁹⁰⁾ e da a.e. da preparação⁽⁴⁹⁾ e reflete-se essencialmente na inclinação do trecho inicial da curva padrão⁽⁴⁹⁾. As curvas padrões obtidas mostram boa inclinação nas regiões de menores massas de SM-B.

A análise da precisão do método, por meio da precisão intra-ensaio acusou valores do coeficiente de variação para valores altos, médios e baixos de SM-B de 9,7, 5,1 e 4,9%, respectivamente, conforme evidenciado pela Tabela IV.12, sendo considerado bom para os dois primeiros valores e excelente para o último. Os valores apresentados na Tabela IV.13, são compatíveis com resultados bons para os níveis médios e baixos de SM-B na análise de reprodutibilidade inter-ensaio.

Estes resultados, levam a crer que, para níveis altos de SM-B sérica, é conveniente uma maior diluição do soro, para um fator 10000, deslocando dessa forma, a leitura da concentração da amostra para as regiões centrais da curva padrão, evitando-se a falta de precisão comumente encontrada nas regiões caudais da curva padrão⁽⁷⁰⁾.

5.5 – Dos Níveis Séricos de SM-B Encontrados

Pela análise da Figura 4.35, verifica-se uma superposição dos níveis de Somatomedina B em indivíduos normo e hiposecretores de HGH. Entretanto, a técnica permitiu a discriminação das concentrações médias de SM-B nos três níveis. A concentração média de SM-B encontrada em acromegálicos, é cerca de 3 vezes maior àquela de pacientes com hiposecreção de HGH, o que é consistente com os resultados encontrados por Yalow⁽⁹⁸⁾, que utiliza o método de iodação pela cloramina-T e purificação em gel de amido com posterior repurificação em Sephadex G-50.

(*) Melo, E. L. (1970), "Tese de Livre Docência", Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

6 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Desenvolvimento da técnica de mensuração da Somatomedina B por meio de receptores de membrana celular, que permitem a sua avaliação em termos de atividade biológica.
- Estudo dos níveis de Somatomedina B em recém-natos e durante o crescimento infantil.
- Avaliação dos níveis de SM-B em pacientes com deficiência de HGH tratados com este hormônio, e correlação com a resposta clínica.
- Determinação de SM-B sérica humana por meio de radioimunoensaio e de receptores. Aplicação da metodologia para separação dos pacientes com deficiência de crescimento por carência de produção ou simplesmente por alteração da atividade biológica de Somatomedina B.
- Estudo dos níveis de SM-B em deficiência alimentar, principalmente hipoproteica.

APÊNDICE

Os critérios estabelecidos por Melo em 1970 em Tese de Livre Docência são aqui apresentados.

- 1) Para o coeficiente de correlação r :
 - a) Excelente para $0,980 < r < 1$
 - b) Bom para $0,941 < r < 0,980$
 - c) Adequado para $0,871 < r < 0,941$

- 2) Para o coeficiente de variação (C.V.)
 - a) Excelente para $0 < C.V < 0,05$
 - b) Bom para $0,05 < C.V < 0,10$

ABSTRACT

The various steps that are necessary for the setting up of Somatomedin B radioimmunoassay are presented. Radioiodination was carried out through the enzymatic method of Lactoperoxidase while the purification of the labelled was performed first of Sephadex G-25 fine and then on Sephadex G-75. It was found that a preparation of ^{125}I labelled Somatomedin B presented a radiochemical purity of 99,8%, a mean specific activity determined by the self-displacement method of $54.1 \pm 3.6 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ and a binding of 98% in the presence of antibody excess. It was also shown that the high stability of this preparation allows its use for up to one month after labelling, if it is stored in refrigerator at $+4^\circ\text{C}$.

The separation between the free and the bound antigen was achieved through the method of the second antibody after a period of incubation of 4 days at 4°C .

The statistic analysis of the method showed also its specificity, which is proved through a study of the dilution effect on human serums where endogenous Somatomedin B is determined.

The correlation coefficient between different serum volumes and the found values of the method was $r = 0.9944$. The accuracy was demonstrated by the recovery of known amounts of Somatomedin B (standard) added to serum samples. This recovery was of 83% and 103% in the case respectively of 0.21 and 1.03 ng/ml of added Somatomedin B. The correlation coefficient between the expected theoretic values and those that have been found in the recovery tests was $r = 0.9993$.

Precision was evaluated through the intra- and inter-assay reproductibility. In the first case, the variation coefficients were 9.7, 5.1 and 4.9% for the serum samples at high, medium and low Somatomedin B content respectively. In the case of inter-assay reproductibility, they were instead 11.1, 7.0 and 7.9% for the same high, medium and low contents.

The sensitivity of the method determined by discrete analysis of the first values on the standard curve was of 0.31 ng/ml.

Finally are presented the serum levels of Somatomedin B that have been found in normal subjects and in individuals with alteration in HGH secretion.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARTOLINI, P.; ASSIS, L. M.; SCHWARZ, I.; PIERONI, R. R. An accurate determination of human growth hormone content in different pituitary extracts, using a radioimmunoassay with polyacrylamide gel eletrophoresis as a bound-free separation system. *Clinica chim. Acta*, 79:223-36, 1977.
2. BERSON, S. A. & YALOW, R. S. General methodology. In: YALOW, R. S., comp. *Methods of radioimmunoassay of peptide hormones*. Amsterdam, North-Holland, 1976. p.1-36.
3. BERSON, S. A. & YALOW, R. S. Quantitative aspects of the reaction between insulin and insulin-binding antibody. *J. Clin. Invest.* 38:1996-2016, 1959.
4. BERSON, S. A.; YALOW, R. S.; BAUMAN, A.; ROTHSCHILD, M. A.; NEWERLY, K. Insulin I-131 metabolism in human subjects: demonstration of insulin binding globulin in the circulation of insulin treated subjects. *J. Clin. Invest.*, 35:170-84, 1958.
5. BOMBOY JR., J. D. & SALMON, JR.; W. D. Somatomedin. *Clin. Orthop.* (108):228-40, May 1975.

6. BRANDE, J. L., van den. The somatomedins and other humoral growth regulating peptides, abstract n° 3, 10th Acta Endocrinologia Congress. *Acta. endocr. (Kbh)*, 199(Suppl.): 42-5, 1975.
7. BRANDE, J. L. & DU CAJU, M. V. An improved technique for measuring somatomedin activity in vitro. *Acta endocr. (Kbh)*, 75(2):233-42, Feb. 1974.
8. BRANDE, J. L. & DU CAJU, M. V. Plasma somatomedin activity in children. *Acta endocr. (Kbh)*, 184(Suppl.):195-6, 1974.
9. BRANDE, J. L.; BUUL, S., van; HEINRICH, U.; ROON, F.; van; ZURCHER, T.; STEIRTEGEN, A. C., van. Further observations on plasma somatomedin activity in children. *Adv. metabolic Disorders*, 8:171-81, 1975.
10. BRANDE, J. L.; DU CAJU, M. V.; VISSER, H. K.; SCHOPMAN, R.; HACKENG, H. H.; DEGENHART, H. J. Primary somatomedin deficiency. Case report. *Archs. Dis. Childh.*, 49(4):297-304, Apr. 74.
11. BRANDE, J. L.; KOOTTE, F.; TIELENBURG, R.; WILK, M., van der; HUYSER, T. Studies on plasma somatomedin activity in different animal species. *Acta endocr. (Kbh)*, 75(2):243-8, Feb. 1974.
12. BRUNNINGS, K. J. Preparation and properties of the iodohistidines. *J. Am. chem. Soc.*, 69:205-8, 1947.
13. BURR, I. M.; GRANT, D. B.; SIZONENKO, P. C.; KAPLAN, S. L.; GRUMBACH, M. M. Some critical factors in double antibody radioimmunoassay systems utilizing sheep anti-rabbit precipitating sera for measurement of human serum LH, FSH and HGH. *J. Clin. Endocr.*, 29:948-56, 1969.
14. BUTT, W. R. A new method for labelling antigens for radioimmunoassay. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Panel on standardization of radioimmunoassay procedures. Vienna, 3-7 July 1972.* Vienna, 1972. (IAEA-PL-496/5). /Separata/.
15. CATT, K. J. III. Growth hormone. *Lancet*, 2:933-939, May 1970.
16. CHERVU, L. R. & MURTY, D. R. K. Radiolabeling of antigens: procedures and assessment of properties. *Semin. nucl. Med.*, 5(2):157-71, 1975.
17. CHOCHINOV, R. H. & DAUGHADAY, W. H. Current concepts of somatomedin and other biologically related growth factors. *Diabetes*, 25(10):994-1004, Oct. 1976.
18. CIANFRIGLIA, F. Current views on somatomedin (sulfation factor). *Folia endocr. (Roma)*, 26:71-84, Feb. 1973.
19. COGGLE, J. E. *Biological effects of radiation.* London, Wykeham, 1971.
20. DAUGHADAY, W. H. Regulation of skeletal growth by sulfation factor. *Adv. Intern. Med.*, 17:237-63, 1971.
21. DAUGHADAY, W. H. Somatomedin levels in human beings. *Adv. Metabolic Disorders*, 8:159-70, 1975.
22. DAUGHADAY, W. H.; HALL, K.; RABEN, M. S.; SALMON JR., W. D.; BRANDE, J. L., van den; WYK, J. J. Somatomedin: proposed designation for sulphation factor. *Nature (London)*, 235:107, 'an. 1972.

23. EKINS, R. & NEWMAN, B. Theoretical aspects of saturation analysis. In: DICZFALUSY, E., ed. *Steroid assay by protein binding: transactions of the second symposium held in Geneva on March 23-25, 1970*. Stockholm, /s.ed./, 1970, p.11-36. (Kacoliniska symposium research methods in reproductive endocrinology).
24. FLETCHER, G. H. *Textbook of radiotherapy*. Philadelphia, Lea E. Fediger, 1973.
25. FREEDLENDER, A. E. Practical and theoretical advantages for the use of 125 in radioimmunoassay. In: MARGOULIES, M., ed. *Protein and polypeptide hormones; proceedings of the international symposium, Liège, May 19-25, 1968*. Amsterdam, Excerpta Medica, 1969. p.351-3.
26. FROESCH, E. R.; MORELL, B.; ZAPF, J.; ZINGG, A. E.; MUELI, C.; SCHLUMPF, U.; HEIMANN, R.; EIGENMANN, E.; HUMBEL, R. E. NSILA-S: insulin-like properties, receptor binding activities and relationship to somatomedin. *Acta Endocr. (Kbh)*, 184(Suppl.):183-4, 1974.
27. FRYKLUND, L.; UTHNE, K.; SIEVERTSSON, H. Isolation and characterization of polypeptides from human plasma enhancing the growth of human normal cells in culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 61(3):950-6, Dec. 1974.
28. GARGILLE, C. & RAYFORD, P. Double antibody radioimmunoassay for plasma gonadotrophins. In: SUNDERMAN, F. W, comp. *Laboratory diagnostics of endocrine diseases*. St. Louis, Mo., Warren H. Green, 1971. chap. 11B, p. 161-75.
29. GIORDANO, G.; FOPPIANI, E.; MINUTO, F.; PERRONI, D. Growth hormone and somatomedin behaviour in the newborn. *Acta. endocr. (Kbh)*, 81(3):449-54, Mar. 1976.
30. GOLDSMITH, S. J. Radioimmunoassay: review of basic principles. *Semin. nucl. Med.*, 5(2):175-52, 1975.
31. GOTTSCHALK, E. & POTCHEN, J., eds. *Diagnostic nuclear medicine, section 20*. Baltimore, Md., Williams & Wilkins, 1976. (Golden's diagnostics radiology series, 20).
32. GHANT, D. B. Observations on the precipitation reaction in a double-antibody immunoassay for insulin. *Acta endocr.*, 59(1):139-49, 1968.
33. GREENWOOD, F. C.; HUNTER, W. M.; GLOVER, J. S. The preparation of 131 I-labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem. J.*, 89:114-23, 1963.
34. HALL, K. Effect of intravenous administration of human growth hormone on liphation factor activity in serum of hypopituitary subjects. *Acta endocr. (Kbh)*, 66(Suppl.):491-7, 1971.
35. HALL, K. Human somatomedin. Determination, occurrence, biological activity and purification. *Acta endocr. (Kbh)*, 163(Suppl.): 1052, 1972.
36. HALL, K.; TAKANO K.; FRYKLUND, L.; SIEVERTSSON, H. Somatomedin. *Adv. metabolic Disorders*, 8:19-46, 1975.
37. HAMPSHIRE, J.; ALTSZULER, N.; STEELE, R.; GREENE, L. J. Radioimmunoassay of canine growth hormone: enzymatic radioiodination. *Endocrinology*, 96(3):822-8, 1975.
38. HIGA, O. Z.; SOUZA, I. T. T.; WAJCHENBERG, B. L.; PINTO, H.; PIERONI, R. R. Standardization of radioimmunoassay technique for determination of plasma insulin and growth hormone. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Radioimmunoassay and related procedures in medicine: proceedings of a symposium, Istanbul, 10-14 September 1973*. Vienna, 1974, p.291-307.

39. HUGHES, W. L. & STRAESSLE, R. Preparation and properties of serum and plasma proteins. XIV Iodination of human serum albumin. *J. Am. chem. Soc.*, 72:452-7, 1950.
40. HUNTER, W. M. Preparation and assessment of radioactive tracers. *Br. med. Bull.*, 30(1):18-23, 1974.
41. HUNTER, W. M. Radioimmunoassay. In: WEIR, D. M., ed. *Handbook of experimental immunology*, vol. 1: *Immunochemistry*. 2nd ed. Oxford, Blackwell, 1973. Cap. 17, p.1-36.
42. HUNTER, W. M. & GANGULI, P. C. The separation of antibody bound from free antigen. In: KIRKHAM, K. E. & HUNTER, W. M., eds. *Radioimmunoassay methods*. Edingburgh, Livingstone, 1971 p.243-57.
43. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Advances in chemical radiosensitization: proceedings of a panel on modification of radiosensitivity in biological systems... held in Stockholm, 25-29 June 1973*. Vienna, 1974. (Panel proceedings series).
44. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Biological and environmental effects of low-level radiation: proceedings of a symposium on... held in Chicago, 3-7 November 1975*. Vienna, 1976. 2 vols. (Proceedings series).
45. IZZO, J. L.; RANCONI, A.; IZZO, M. J.; BALE, W. F. Relationship between degree of iodination of insulin and its biological, electrophoretic, and immunochemical properties, *J. biol. Chem.*, 239(11):3749-54, 1964.
46. JOEL, E. W.; SCHONBERG, D. K.; ILG, W.; KELLER, E. Problems of optimization of double antibody radioimmunoassay of HLH, HFSH and HGH: "hook" phenomenon, false negative and positive patient values and linearity of values from patient plasma dilutions. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, *Radioimmunoassay and related procedures in medicine; proceedings of a symposium, Istanbul, 10-14 September 1973*. Vienna, 1974.
47. JOHNSON, A.; DAY, E. D.; PRESSMAN, D. The effect of iodination on antibody activity. *J. Immun.*, 84:213-20, 1960.
48. KABAT, E. A. & MAYER, M. M. *Experimental immunochemistry*. Springfield, Ill., Thomas, 1961.
49. KAGAN, A. Evaluation of commercial radioimmunoassay kits. *Semin. nucl. Med.*, 5(2):173-82, 1975.
50. McFARLANE, A. S. Efficient trace-labelling of proteins with iodine. *Nature (London)*, 182(4627):53, 1958.
51. MARCHALONIS, J. J. An enzymatic method for the trace iodination of immunoglobulins and other proteins. *Biochem. J.*, 113:299-305, 1969.
52. MASON, A. S. Short stature and its treatment. *Br. Med. J.*, 2:519-22, May 72.
53. MAURER, H. R. Basic principles of polyacrylamide gel electrophoresis and some recent advances of the technique. *Ann. Biol. Clin.*, 29:205-10, 1971.
54. MAYBERRY, W. E. Iodine chemistry. In: RALL, J. E. & KOPIN, I. J., eds. *The thyroid and biogenic amines*. Amsterdam, North-Holland, 1972. cap. 2, p. 3-26.
55. MERIMEE, T. J. Isolated growth hormone deficiency and related disorders. *A. Rev. Med.*, 25:137-42, 1974.

56. MIYACHI, Y.; VAITUKAITIS, J. L.; NIESCHALAG, E.; LIPSETT, M. B. Enzymatic radioiodination of gonadotropins. *J. clin. Endocr.* 34:238, 1972.
57. MORRIS, B. J. Specific radioactivity of radioimmunoassay tracer determined by self-displacement: a re-evaluation. *Clinica chim. Acta.*, 73:213-6, 1976.
58. MURPHY, B. E. P. Methodological problems in competitive protein binding techniques: the use of Sephadex column chromatography to separate steroids. In: DICZFALUSY, E., ed. *Steroid assay by protein binding: transactions of the second symposium held in Geneva on March 23-25, 1975*. Stockholm, *Is. ec.*, 1970. (Karolinska symposia on research methods in reproductive endocrinology). pg. 37-60.
59. NEWTON, W. T. & JAFFE, B. M. Principles underlying current radioimmunoassay techniques. In: _____ & DONATI, R. M., eds. *Radioassay in clinical medicine*. Springfield, Ill. Thomas, 1974. cap. 1, p.3-17.
60. ORSETTI, A. Buffer solutions in radioimmunology. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Panel on standardization of radioimmunoassay procedures, Vienna, 3-7 July 1972*. Vienna, 1972. (IAEA-PL-496/13). /Separata/.
61. PHILLIPS, L. S. & YOUNG, H. S. Nutrition and somatomedin. I. Effect of fasting and refeeding on serum somatomedin activity and cartilage growth activity in rats. *Endocrinology*, 99(1):304-14, 1976.
62. PIERSON, M.; GRIGNON, G.; MALAPRADE, D.; HARTEMANN, P. Activity of blood somatomedin during childhood in normal subjects and delayed growth. *Ann. Biol. Clin. (Paris)*, 34(1):11-8, 1976.
63. PIMSTONE, B.; BECKER, D.; KERNOFF, L. Growth and growth hormone in protein calorie malnutrition. *S. Afr. med. J.*, 46:2102-5, Dec. 1972.
64. PINTO, H.; WAJCHENBERG, B. L.; HIGA, O. Z.; SOUZA, I. T. T.; WERNER, R. S.; PIERONI, R. R. *Separation of high-quality iodine-125-labelled pituitary luteinizing hormone for radioimmunoassay*. São Paulo, Instituto de Energia Atômica, set. 1974. (IEA-Pub. 362).
65. PINTO, H.; WAJCHENBERG, B. L.; SOUZA, I. T. T.; LERARIO, A. C.; PIERONI, R. R. *Preparo de radioinsulinas para radioimunoensaio: Comparação entre o método clássico de Cloramina-T e Lactoperoxidase*. São Paulo, Instituto de Energia Atômica, set. 1974. (IEA-Pub. 472).
66. PRATT, J. J. & WOLDRING, M. G. Recent developments in radioimmunoassay. *J. radioanal. Chem.*, 35:45-54, 1977.
67. RAPPAPORT, H. Hormonal control of skeletal growth and maturation. *Acta. endocr. (Kbh)*, 199(Suppl.):71-2, 1975.
68. REICHERT JR., L. E. Preparation of human protein hormones for use in radioligand assays: structure-function considerations. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Radioimmunoassay and related procedures in medicine; proceedings of a symposium, Istanbul, 10-14 September 1975*. Vienna, 1974. p.59-69.
69. REIF, A. E. A simple procedure for high-efficiency radioiodination of proteins. *J. nucl. Med.*, 9(4):148-55, 1967.
70. RODBARD, D.; RAYFORD, P. L.; COOPER, J. A.; ROSS, G. T. Statistical quality control of radioimmunoassay. *J. clin. Endocr.* 28:1412-8, 1968.

71. ROGOL, A. D. & ROSEN, S. W. Alteration of human and bovine prolectins by a chloramine T radioiodination: Comparison with lactoperoxidase-iodinated prolactins. *J. clin. Endocr. Metab.* 39:379-81, 1974.
72. ROSA, U.; PENNISI, F.; BIANCHI, R.; FEDERIGHI, G.; DONATO, L. Chemical and biological effects of iodination of human albumin. *Biochim. Biophys. Acta.*, 100:486-498, 1967.
73. ROTH, J. Peptide hormone binding to receptors: A review of direct studies in vitro. *Metabolism.* 22(8):1059-73, Aug. 1973.
74. SAENGER, P.; LEVINE, L. S.; WIEDEMANN, E.; SCHWARTZ, E.; NEW, M. I. Growth with absent growth hormone by radioimmunoassay: Letter. *J. Pediatr.*, 85(1):137-8, Jul. 1974.
75. SALMON, W. D. & DAUGHADAY, W. H. A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. *J. Lab. Clin. Med.*, 49(6) 825-36, Jun. 1957.
76. SCHIMPF, R. M.; DONNADIEU, M.; GLASINOVIC, J. C. WARNET, J. M. GIRARD, F. The liver as a source of somatomedin. *Acta endocr. (Kbh)*, 83(2):365-72, Oct. 1976.
77. SCHNEIDER, B.; STRAUS, E.; YALOW, R. S. Some considerations in the preparation of radioinsulin for radioimmunoassay and receptor assay. *Diabetes*, 25(4):260-7, Apr. 1976.
78. SCHWARTZ, T. B. ed. Receptor-active growth hormone in Laron dwarfism. *Yb. Endocr.*, 1977:40, 1977.
79. SERIF, G. S. & KIRKWOOD, S. Further properties of the soluble and mitochondrial systems. Part II. In enzyme systems concerned with the synthesis of monoiodotyrosine. *J. Biol. Chem.*, 233:109-15, 1958.
80. SIEVERTSSON, H.; FRYKLUND, L.; UTHNE, K.; HALL, K.; WESTERMARK, B. Isolation and chemistry of human somatomedins A and B. *Adv. metabolic Disorders*, 8:47-60, 1975.
81. SLEDGE, C. B. Growth hormone and articular cartilage. *Fedn. Proc.*, 32:1503-5, Apr. 1973.
82. SOMATOTROPHIN and somatomedin. *Lancet*, 2:469-70, Sep. 1972.
83. TARANTA, A.; WEISS, H. S.; FRANKLIN, E. C. Precipitating factor for aggregated γ -globulins in normal human sera. *Nature*, 189(4760):239-40, 1961.
84. THORELL, J. I. & JOHANSSON, B. G. Enzymatic iodination of polypeptides with ^{125}I to high specific activity. *Biochim. biophys. Acta*, 251:363-9, 1971.
85. UTHNE, K. Human somatomedins, Purification and some studies on their biological actions. *Acta endocr. (Kbh)*, 175(Suppl.):1-35, 1973.
86. WASTESON, A.; WESTERMARK, B.; UTHNE, K. Somatomedin A and B: demonstration of two different somatomedin like components in human plasma. *Adv. metabolic Disorders*, 8:101-13, 1975.
87. WHITAKER, J. R. Determination of molecular weights of proteins by gel filtration on Sephadex. *Analyt. Chem.*, 35(12):1950-3, Nov. 1963.
88. WYK, J. J., van; UNDERWOOD, L. E.; HINTZ, R. L.; CLEMMONS, D. R.; VOINA, S. J.; WEAVER, R. P. The somatomedins: a family of insulinlike hormones under growth hormone control. *Recent Prog. Horm. Res.*, 30:259, 1974.

89. WYK, J. J.; UNDERWOOD, L. E.; LISTER, R. C.; MARSHALL, R. N. The somatomedins. A new classe of growth-regulating hormones. *Am. J. Dis. Child.*, 126(5):705-11, Nov. 1973.
90. YALOW, R. S. Radioimmunoassay methodology; application to problems of heterogeneity of peptide hormones. *Pharmac. Rev.*, 25(2):161-78, 1973.
91. YALOW, R. S. Radioimmunoassay practices and pitfalls. *Circulation Res.*, 32/33 (Suppl.):116-25, May 1973.
92. YALOW, R. S. & BERSON, S. A. Antigen adsorption, In: _____ & BERSON, S. A. eds. *Methods in investigative and diagnostic endocrinology, vol. 2A*. Amsterdam, North-Holland, 1973. cap. 4, p.120-5.
93. YALOW, R. S. & BERSON, S. A. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J. clin. Invest.*, 39:1157, 1960.
94. YALOW, R. S. & BERSON, S. A. Special problems in the radioimmunoassay of small polypeptides. In: MARGOULIES, M., ed. *Protein and polypeptide hormones: proceedings of the international symposium, Liège, May 19-25, 1968*. Amsterdam, Excerpta Medica, 1969. p.71-6.
95. YALOW, R. S. & BERSON, S. A. Topics on radioimmunoassay of peptide hormones. In: MARGOULIES, M., ed. *Protein and polypeptide hormones: proceedings of the international symposium, Liège, May 19-25, 1968*. Amsterdam, Excerpta Medica, 1969. p.36-44.
96. YALOW, R. S. & BERSON, S. A. Validation of radioimmunoassay procedures. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Panel on radioimmunoassay procedures, 3-7 Jul. 1972*. Vienna, 1972. (IAEA-PL-496/2). /Separata/.
97. YALOW, R. S.; HALL, K.; LUFT, R. Immunoreactive somatomedin B in urine. *J. clin. Endocr. Metab.*, 41(3):638-9, Sep. 1975.
98. YALOW, R. S.; HALL, K.; LUFT, R. Radioimmunoassay of somatomedin B. Application to clinical and physiologic studies. *J. clin. Invest.*, 55(1):127-37, Jan. 1975.



INSTITUTO DE ENERGIA ATÔMICA
Caixa Postal, 11049 - Pinheiros
CEP 05508
01000 - São Paulo - SP

Telefone: 211-6011
Endereço Telegráfico - IEATOMICA
Telex - 011-23592 IENA BR