

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
SECRETARIA DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**ELABORAÇÃO E AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE PROGRAMA
COMPUTACIONAL DESTINADO AO CONTROLE DE QUALIDADE DE
ENSAIOS RADIOLIGANTES. APLICAÇÃO AO RADIOENSAIO DE INSULINA**

Carlos Henrique de Mesquita

**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
"Mestre na Área de Concentração em
Tecnologia Nuclear Básica".**

Orientador: Dra. Constância Pagano Gonçalves da Silva

**São Paulo
1983**

AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ELABORAÇÃO E AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE PROGRAMA COMPUTACIONAL
DESTINADO AO CONTROLE DE QUALIDADE DE ENSAIOS RADIOLIGANTES.
APLICAÇÃO AO RADIENSAIO DE INSULINA

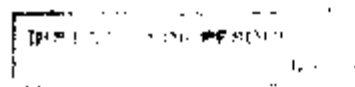
Carlos Henrique de Mesquita

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
"Mestre na Área de Concentração em
Tecnologia Nuclear Básica".

Orientadora: Dra. Constância Pagano Gonçalves de Silva



SÃO PAULO
1983



Aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Constância Pagano Gonçalves da Silva, pela orientação incansável, atenta e eficiente.

Ao Dr. Júlio Kieffer pelo constante apoio e inúmeras sugestões.

Ao Dr. Antonio Soares Gouvea, pela colaboração em fases da codificação do programa GARLA e na análise de sistema.

À Dra. Olga Mafra Guidicini, responsável pela primeira fase de orientação na minha formação de Pós-Graduação.

Ao Dr. Armando de Aguiar Pupo, ao qual devo meus conhecimentos referentes na demarcação de insulina.

Ao Prof.Dr. Fausto Walter de Lima pelo esforço em sempre propiciar condições de ensino, formação e pesquisa.

Aos senhores (as) :

Dra. Constância Pagano Gonçalves da Silva;
Dr . José Carlos Barbério;
Dr . Júlio Kieffer ;
Dr . Lício Marques de Assis;
Dr . Paulo Roberto Leme e
Dr . Romulo Ribeiro Pieroni.

aos quais devo todo o reconhecimento na minha formação e atividade na Área de Tecnologia Nuclear.

Aos colegas :

Margarida Mizue Hamada, Mônica Beatriz Mathor, José Augusto Carrinho Antonio e Rubens de Souza, pela inestimável colaboração laboratorial e sugestões.

À Thereza Timo Iaria, Marina Rodrigues Dourado e Maria de Fátima Alvim, pela dedicada cooperação na fase de datilografia.

A todos que direta e indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

Meus Sinceros Agradecimentos.

ELABORAÇÃO E AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE PROGRAMA COMPUTACIONAL DESTINADO AO CONTROLE DE QUALIDADE DE ENSAIOS RADIOLIGANTES, APLICAÇÃO AO RADIOENSAIO DA INSULINA.

CARLOS HENRIQUE DE MESQUITA

R E S U M O

Elaborou-se um programa computacional para avaliar diversos parâmetros dos ensaios radioligantes. O programa foi redigido em Fortran-IV e possui estrutura modular.

Na versão atual o programa está projetado para efetuar diversos cálculos pertinentes às atividades dos radioensaios. A curva padrão é ajustada ao modelo empírico de quatro parâmetros segundo processo i-terativo de Marquardt e ponderada de acordo com critério de Rodbard⁽⁵⁵⁾. A dose mínima detectável (DMD) é estimada por critério que considera dispersão da medida ao nível de concentração igual a zero calculada teoricamente pelo modelo matemático da função potência, a qual considera as dispersões das medidas (precisão intra-ensaio) de todas as amostras e padrões ensaiadas. A análise de Scatchard ('Scatchard plot') é efetuada para um componente ligante, aceitando-se porém, até cinco componentes, incluindo-se um componente inespecífico e insaturável. A atividade específica é calculada pelo método do auto-deslocamento incluindo-se nesse procedimento as considerações de Morris⁽⁴⁷⁾. O sistema computacional processa dados pertinentes à análise termodinâmica mediante o fornecimento da temperatura de incubação e a respectiva constante de afinidade 'K' da reação, calculada em fases anteriores do processamento de dados. A partir dos parâmetros estimados da análise termodinâmica: entalpia e entropia da reação, o programa elabora curvas padrão teóricas para qualquer nível de temperatura de incubação, permitindo que o radioanalista selecione o intervalo que melhor satisfaça às exigências das dosagens.

Outros dados de caracter genérico à metodologia dos radioisótopos também podem ser processados pelo sistema proposto, a saber: análise de radiocromatogramas, teste do qui-quadrado e estimativa do erro de pipetagem.

Utilizou-se neste trabalho o radioimunoensaio da insulina com a finalidade de demonstrar a utilização do programa e avaliar a qualidade de suas informações.

Na apreciação desses resultados concluiu-se que os parâmetros obtidos foram semelhantes àqueles citados na bibliografia pertinente.

DEVELOPMENT AND EVALUATION OF THE PERFORMANCE OF A
COMPUTER PROGRAM FOR THE QUANTITY CONTROL OF RADIO
LIGANT ASSAYS, APPLICATION TO THE RADIOASSAY OF INSULIN.

CARLOS HENRIQUE DE MESQUITA

ABSTRACT

A computer program was developed to evaluate several parameters of interest in radioligant assays. The program was written in FORTRAN-IV having a modular structure.

The present version is designed to compute a number of parameters pertinent to the activities of the radioassays. The standard curve is fitted to the empirical model which has four parameters following Marquardt i -iterative scheme. The curve is weighted according to Rodbard criterion⁽⁵⁵⁾. The minimum detectable dose (MDD) is estimated by a criterion which considers the standard deviation of the experimental data measured with respect to the zero concentration, theoretically computed by the power function. This function considers the standard deviations of all samples and standards being assayed. The Scatchard plot is drawn for one binding component, but it is suitable for up to five components including that non-specific and non saturated one. The specific activity is computed by the self-displacement method including the corrections suggested by Morris⁽⁴⁹⁾. The computer program processes data pertinent to the thermodynamic analysis through the incubation temperature and its respective reaction affinity constant "K". Starting from the estimated enthalpy and entropy of the reaction, the program produces theoretical standard curves for any level of incubation temperature. This allows the analyst to select the interval which best attends the dosage needs.

Other general data pertinent to the radioisotope methodology can also be processed by the present program, such as radiochromatogram analysis chi-square test and the estimate the error during the procedures of pipetting.

In order to demonstrate the use and the quality of the informations given by the program, a radioimmunoassay

of insulin was carried out. The results obtained are in good agreement with those found in the literature.

Índice

	<u>Página</u>
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 - O radioensaio (RIE) proposto por Berson e Yalow.....	1
1.2.- Métodos correlatos ao radioimunoensaio.....	3
1.3 - A denominação "Análise por saturação" proposta por Ekins.	6
1.4 - Crítica a denominação "Análise por saturação".....	8
1.5 - A importância atual dos radioensaios.....	9
1.6 - O Controle de qualidade de parâmetros dos radioensaios...	10
1.7 - Propósito do trabalho.....	12
2. ASPECTOS TEÓRICOS E PRÁTICOS DOS ENSAIOS RADIOLIGANTES.....	15
2.1 - A avaliação cromatografica do indicador radioativo.....	15
2.2 - O ligante específico Q.....	18
2.3 - A curva de scatchard, cálculo da concentração "Q" e da constante de equilíbrio "K" da reação.....	21
2.4 - Aspectos termodinâmicos aplicados aos radioensaios.....	25
2.5 - Modelos matemáticos para o ajuste da curva de dose respos ta.....	30
2.5.1 - Modelos teóricos.....	30
2.5.2 - Modelos empíricos para o ajuste da curva padrão.	31
2.6.- O perfil de imprecisão das medidas.....	37
2.7 - A dose mínima detectável - DMD	40
2.8 - Determinação da atividade específica, método do auto des- locamento.....	40
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
3.1 - Equipamentos.....	42
3.2.- Reagentes.....	43
3.3 - Procedimentos experimentais da radiomarcção da insulina.	45
3.4 - Preparo da coluna de Sephadex e purificação da insulina iodada.....	45
3.5 - Obtenção e preparação do ligante Q (Antisoro).....	46
3.6 - Preparação da mistura de soros humano isento de insulina soro "strip".....	47
3.7 - Preparação de soluções séricas concentradas de insulina..	47
3.8 - Preparação dos soros de referências para definir a curva de dose resposta (Curva padrão).....	48

	<u>Página</u>
3.9 - Reconstituição dos componentes liofilizados.....	49
3.10- Controle da estabilidade do medidor de radioatividade , teste do qui-quadrado.....	49
3.11- Protocolo geral do radioimunoensaio da insulina.....	50
3.12- Processamento geral dos dados experimentais, o código com putacional GARLA.....	50
4. RESULTADOS.....	52
4.1 - Teste do Qui-Quadrado.....	52
4.2 - Avaliação do perfil radiocromatografico da insulina ¹²⁵ I	53
4.3.- Resultados da análise da curva de dose-resposta de um ra dioimunoensaio tipo - insulina imunorreativa, entrada dos dados para o programa GARLA.....	63
4.3.1 - Dados da curva padrão ~ Quadro (A).....	64
4.3.2 - Dados das amostras doseadas - Quadro B	64
4.3.3 - Dados para o cálculo da atividade específica - Quadro C	64
4.3.4 - Estimativas para os cálculos de K (Constante de afinidade) e q (Concentração do ligante) Quadro D.....	68
4.4 - Caracterização do perfil de imprecisão das dosagens.....	68
4.5 - Traçados da curva de dose-resposta em tres escalas e análise de variância para apreciação da qualidade do ajuste.....	75
4.6 - Resultados de concentração das amostras doseadas.....	91
4.7 - Estimativa da dose minima detectável - DMD.....	91
4.8 - Determinação da atividade específica da insulina ¹²⁵ I... ..	91
4.9 - Determinação das constantes de afinidade pelo método de Scatchard e Priori e Rosental.....	102
4.9.1 - Caracterização da heterogeneidade do ligante Q.	102
4.9.2 - Determinação das constantes K ₁ , q ₁ e K ₂ q ₂	102
4.9.3 - Curva de dose-resposta teórica estimada a partir de K ₁ , q ₁ e K ₂ q ₂ para teste de consistência....	112
4.9.4 - Traçado gráfico da curva de Scatchard - B versus B/F.....	112
4.10- Aspectos termodinâmicos da reação insulina + anticorpo anti-insulina.....	112
4.10.1- Traçado gráfico da relação T ⁻¹ (°K) versus R. log e K.....	117

	<u>Página</u>
4.10.2- Repercussão da temperatura de incubação sobre o traçado da curva padrão.....	117
4.11- Estudo da reprodutibilidade de parâmetros do radioensaio da insulina.....	117
4.12- Distribuição do tempo gasto para processar os dados numéricos.....	122
5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	129
5.1 - A utilidade do programa GARLA.....	129
5.2 - O teste do Qui-Quadrado.....	132
5.3 - Análise do perfil cromatográfico do substrato marcado.	133
5.4 - Caracterização do perfil de imprecisão do ensaio.....	133
5.5 - Traçados da curva de dose-resposta (curva padrão).....	135
5.6 - Resultados de concentração das amostras doseadas.....	136
5.7 - Estimativa da dose mínima detectável - DMD.....	137
5.8 - Determinação da atividade específica da insulina ¹²⁵ I..	138
5.9 - A constante de afinidade K, concentração molar e do antisoro e o produto $K_n Q_n$ dos sítios não específicos.....	139
5.10- Aspectos termodinâmicos da reação insulina +antisoro anti-insulina.....	141
5.11- Considerações gerais sobre a reprodutibilidade de parâmetros do radioensaio da insulina.....	142
5.12- Conclusões.....	142
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	144

1. INTRODUÇÃO

A determinação da concentração de substâncias em níveis traços sempre foi meta dos investigadores ligados à biometria. Nas últimas décadas muito se tem evoluído nesse campo devido, principalmente, a dois fatores interligados: o grau elevado de desenvolvimento da tecnologia eletrônica e a utilização de traçadores radioativos.

Dentre os métodos modernos de maior confiabilidade destaca-se o radioquímico, por causa da elevada sensibilidade da medida física da radioatividade utilizada como elemento de quantificação. A análise por ativação neutrônica e a diluição isotópica, associadas com as técnicas subestequiométricas são extremamente eficientes na determinação de elementos e íons traços⁽⁶⁾. A complexidade estrutural de muitos dos compostos orgânicos encontrados nas secreções internas, o desconhecimento e a falta de domínio em fases de suas reações químicas, constituem fatores limitantes daquelas técnicas.

Até o início da década de 60, a quantificação do teor de muitos dos fluídos biológicos dependia dos bioensaios que mediam o efeito determinado pela introdução da substância prova em sistema biológico adequado.

O bioensaio é limitado à execução de poucas amostras e reduzido número de replicatas, carecendo frequentemente de reprodutibilidade e especificidade⁽⁷⁾. A seqüência operacional (protocolo) dos bioensaios é relativamente desprovida de unidade para a quantificação dos diferentes compostos⁽⁷⁾.

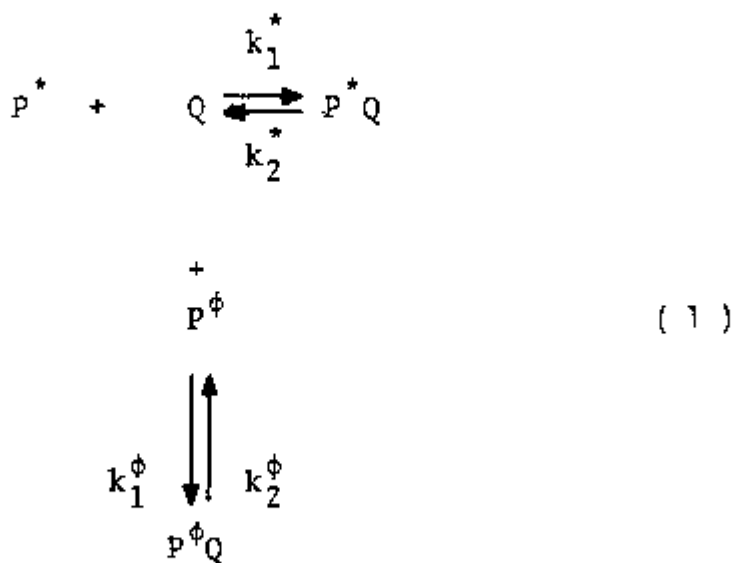
A demanda cada vez mais premente na área da bioanálise exigia da praxe científica a disponibilidade de métodos tecnológicos mais avançados e seguros.

1.1. O RADIOENSAIO (RIE) PROPOSTO POR BERSON E YALLOW

Berson e col.⁽⁴⁾ em 1955, estudando aspectos cinéticos da insulina marcada com ^{131}I , selecionou dois grupos de amostragem. O primeiro era formado por elementos que haviam si

do submetidos a tratamento com insulina bovina enquanto que os do segundo grupo nunca a haviam tomado. Observaram que o desaparecimento da insulina-¹³¹I na circulação do primeiro grupo era significativamente mais lento. A análise eletroforética dessas amostras revelou a presença de radioatividade na faixa correspondente às γ -globulinas, o que os levaram a suspeitar que o radioiodo ainda estava ligado à insulina e que esta teria se complexado com uma γ -globulina específica (anticorpo). O aparecimento dessa γ -globulina devia estar relacionado com a mobilização do sistema imunitário em consequência da introdução, no organismo, de insulina heteróloga, cuja estrutura química acusa pequena diferença de aminoácidos, mas suficiente para ativar o sensível e específico sistema imunitário. Como evolução dessas observações, em 1960, Berson e Yalow⁽²⁾ relataram um novo método de dosagem de insulina, utilizando reação de competição entre insulina marcada e não marcada contida em soluções de referência e amostras, frente a um complexante específico (γ -globulina anti-insulina gerada pela inoculação programada de insulina heteróloga em cobaias). O novo método foi denominado pelos seus autores de Radioimunoensaios.

O princípio básico do radioimunoensaio se resume na reação de competição de antígeno marcado com radioisótopo adequado e antígeno não marcado contido em soluções padrão ou segundo o esquema:



onde P^* representa o antígeno marcado, P^ϕ o homólogo não marcado, também, denominado de frio, Q é o reagente específico (anticorpo) e P^*Q ou $P^\phi Q$ os complexos formados. Nessa reação a concentração de Q (anticorpo) é convenientemente limitada, de sorte que a concentração do complexo P^*Q , após a interrupção da reação é inversamente dependente da concentração de P^ϕ adicionado. Fazem parte do jargão dessa metodologia os termos:

B + representa a concentração dos complexos formados, isto é, $B = |P^*Q| + |P^\phi Q|$

F + é a concentração das frações de P encontradas na forma livre, isto é, $F = |P^*| + |P^\phi|$

B/F + corresponde à razão entre as concentrações B e F. Sendo essa razão adimensional, é normalmente calculada medindo-se separadamente a radioatividade do complexo P^*Q e a da fração livre P^* .

T = B + F.

1.2. MÉTODOS CORRELATOS AO RADIOIMUNOENSAIO

A idéia de usar um anticorpo específico vingou, entretanto outras espécies de complexantes também podem apresentar especificidade adequada às ligações citadas.

No mesmo ano da publicação do clássico trabalho de Yallow e Berson, o físico Ekins⁽¹⁶⁾ do "Middlesex Hospital Medical School" de Londres demonstrou a possibilidade de quantificar a tiroxina sérica mediante a utilização de uma proteína carreadora presente na circulação sanguínea. Seu método foi denominado de Ensaio por Competição à Proteína Conjugadora, abreviadamente conhecido como CPB (Competitive Protein Binding), sendo essa técnica amplamente utilizada aos hormônios esteróides, os quais não são diretamente imunogênicos. A técnica de competição à proteína conjugadora aplicada aos esteróides foi objeto central do "2nd Symposium: Steroid Assay by Protein Binding" realizado em Geneve em 1970⁽¹⁶⁾.

No decorrer da década de 60 uma variedade de ligantes específicos foram empregados com sucesso. Em 1965 Rothernberg⁽⁶³⁾ experimentou com êxito a utilização de enzimas específicas (Ensaio Radioenzimáticos). Mais recentemente, Lefkowitz, Roth e Pastan⁽⁴⁰⁾ estudaram o emprego de membranas celulares, enquanto Korenman e Sanborn⁽³⁷⁾ utilizaram os receptores celulares onde o componente imunitário não era totalmente satisfatório. Estas técnicas foram cognominadas de Ensaio Radioreceptores. Miles e Hales⁽⁴⁶⁾ em 1968 descreveram uma variação interessante do radioimunoensaio: utilizaram o anticorpo marcado ao invés do antígeno, abrindo novas fronteiras para os ensaios radioligantes. Esta nova proposição foi denominada de Ensaio Imunoradiométrico, ou abreviadamente de Irma, segundo seus criadores. Este método foi posteriormente abordado exten^{samente} no Simpósio sobre Radioimunoensaio e Técnicas Correlatas na Medicina Clínica e Pesquisa promovido pela Agência Internacional de Energia Atômica, realizado em Istambul⁽³³⁾.

A tabela I reúne uma síntese comparativa de três categorias de ligantes. Observe-se que tais avaliações nem sempre devem ser tomadas apenas quanto a algumas aparentes vantagens entre si, tendo-se em vista que a utilização de cada uma dessas espécies quase sempre é complementar. Esses aspectos constituíram tema de apresentação do simpósio "Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine" organizado pela Agência Internacional de Energia Atômica em Berlim em 1977⁽³⁴⁾.





TABELA I



Características gerais de três espécies de ligantes comumente utilizadas nos radioensaios




	Antisoro	Proteína Carreadora	Receptor
Aplicação	Vasta	Limitada	Limitada
Constante de Afinidades K	Muito Elevada	Elevada	Muito Elevada
Especificidade Estrutural	Muito Elevada	Elevada	Elevada
Especificidade Biológica	Variável	Elevada	Muito Elevada
Tempo de Obtenção	Meses	Minutos (simples diluição)	Horas
Acondicionamento	Muito Estável	Muito Estável	Instável

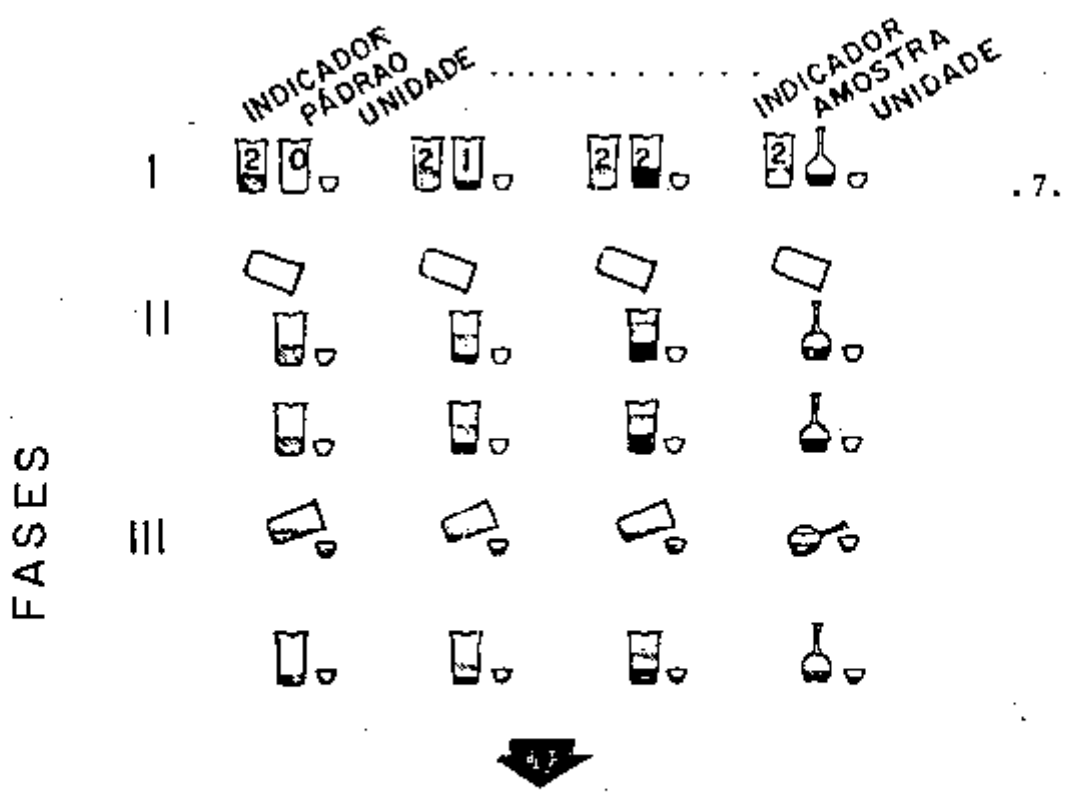
1.3. A DENOMINAÇÃO 'ANÁLISE POR SATURAÇÃO' PROPOSTA POR EKINS

O texto ora desenvolvido, evidencia uma celeuma de denominações para ensaios que pertencem a uma mesma unidade metodológica. Ekins⁽¹³⁾ foi o primeiro investigador a chamar explicitamente a atenção para este aspecto. No seu entender o cerne fundamental de todas essas técnicas mencionadas reside no estado de saturação de um dos componentes da reação e utilizou-se de um modelo físico trivial para exemplificar a sua argumentação: o jarro d'água e o corpo. A figura 1 é uma interpretação do princípio da Análise por Saturação proposta por Ekins e pioneiramente aplicado por Berson e Yallow⁽²⁾ no radioimunoensaio clássico.

Em "I" da figura 1 mostra-se um conjunto de volumes conhecidos (padrões)  e uma amostra  cujo volume se deseja conhecer. Ao mesmo tempo dispõem-se do indicador  bem como dos recipientes que devem ter seu volume adequadamente pequeno (na figura 1 é representado por  e para facilidade de cálculos considerar-se-ã tendo volumes unitários).

Em "II" adiciona-se o volume do indicador aos volumes padronizados e ao volume amostra desconhecido. A seguir em "III" enche-se o conteúdo do volume unitário : Como se observa nessa fase, o ensaio deve ser padronizado de modo que sobre algum resíduo no conteúdo  no final da operação "III". Dando seqüência, estabelece-se a razão de volumes entre as frações contidas em cada um dos recipientes.

No exemplo em pauta, o volume da amostra, no princípio desconhecido é agora estimado por interpolação mediante a utilização da curva ilustrada na figura 1, o qual acusou o valor de 1,5 unidades de volume. Deve-se notar que os componentes homólogos  e  e o combinado  fornecem o mesmo valor da razão B/F e na prática somente uma das três razões é necessária. Desde que esta metodologia está dirigida à quantificação de substâncias em concentrações da ordem de 10^{-5} molar ou 10^{-7} molar, torna-se ôbvio a necessidade da adição do indicador ou traçador radioativo, em vista da relativa facilidade em quantificá-lo. Daqui por diante quando se referir aos valores pertinentes ao traçador radioativo, este será destacado com o sinal "*" enquanto o material não marcado (frio) com o símbolo "c".



FRASCO	NA FASE III						RAZÃO $\frac{B}{F}$		
	$\frac{B}{U}$			$\frac{F}{U}$			$\frac{B}{F}$		
	$\frac{B}{U}$	$\frac{B}{U}$	$\frac{B}{U}$	$\frac{F}{U}$	$\frac{F}{U}$	$\frac{F}{U}$	$\frac{B}{F}$	$\frac{B}{F}$	$\frac{B}{F}$
0	1,00	0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00	-	1,00
1	0,66	0,33	1,00	1,33	0,66	2,00	0,50	0,50	0,50
2	0,50	0,50	1,00	1,50	1,50	3,00	0,33	0,33	0,33
AMOSTRA	0,57	?	1,00	1,43	?	?	0,40	?	0,40

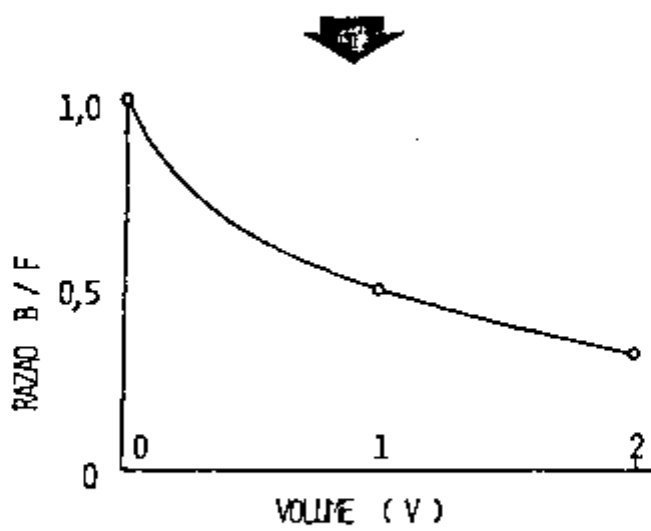


Figura I - Esquema da análise por saturação segundo analogia com a determinação de volumes.

1.4. CRÍTICA A DENOMINAÇÃO "ANÁLISE POR SATURAÇÃO"

Admitindo-se que a reação fundamental que esquematiza os ensaios descritos (equação 1) seja regida pela lei da ação das massas de primeira ordem, cineticamente de 2a. ordem^(56,58), conclui-se que:

$$\frac{k_1^\phi}{k_2^\phi} = K^\phi = \frac{P^\phi Q}{P^\phi Q} \quad (2)$$

e analogamente,

$$\frac{k_1^*}{k_2^*} = K^* = \frac{P^* Q}{P^* Q} \quad (3)$$

onde os valores de k e k^* correspondem às constantes de associação e dissociação com os seus respectivos índices. K^ϕ e K^* são as constantes de equilíbrio, também denominadas de constantes de afinidades⁽⁷⁰⁾.

A simples análise das equações 2 e 3 evidencia que a quantidade do ligante Q mobilizado na reação é função das concentrações iniciais de P^ϕ mais P^* fornecidas ao sistema e deste modo, no esquema da figura 1, "▽" não corresponde a um volume com proporções fixas, mas sim a um compartimento elástico cujo volume final depende da "pressão" sobre ele. Em outras palavras, isto significa que a saturação absoluta só ocorre quando se adiciona quantidade infinitamente grande de P (composição de $P^\phi + P^*$). Entretanto, em sua defesa, Ekins⁽¹⁴⁾ argumenta que as constantes de equilíbrio K da reação desses ensaios são relativamente grandes de modo que esse efeito não chega a comprometer a idéia de saturação.

Alternativas à denominação Análise por Saturação aparecem na literatura^(14,15,35,58,75,76), a saber:

- Ensaios por competição
- Ensaios radioligantes
- Radioensaios

A figura 2 mostra algumas das diversas opções desses ensaios e suas características.

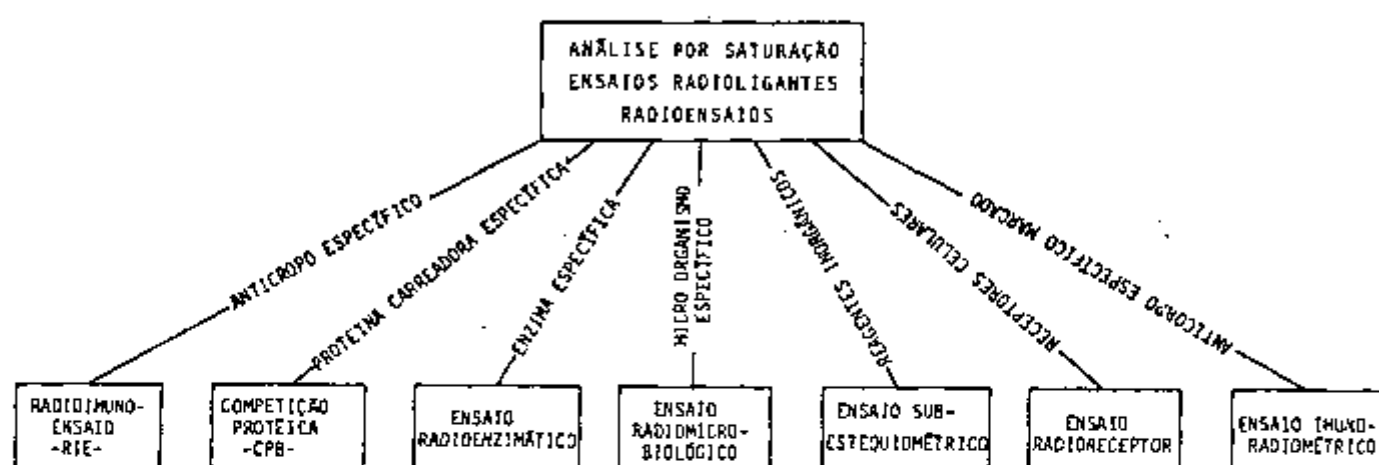


Figura 2 - Algumas das técnicas propostas dos ensaios por saturação

Nesta dissertação serão empregadas as expressões de "ensaios radioligantes", "radioensaios" ou "análise por saturação" com idêntico significado e conteúdo.

1.5. A IMPORTÂNCIA ATUAL DOS RADIOENSAIOS

Desde que se estabeleceu o princípio dos ensaios radioligantes, com os trabalhos pioneiros de Berson e Yalow e Ekins, em 1960, aumentou progressivamente o número de substân

cias que podem ser precisamente medidas por essa metodologia . A aplicação desses ensaios trouxe elevada contribuição à microanálise e como corolário à pesquisa clínica, diagnose médica, medicina legal, dentre outras atividades.

Uma lista parcial de substâncias correntemente mensuradas pelos ensaios radioligantes é mostrada na tabela II.

Atualmente, esta metodologia goza de grande prestígio permitindo afirmar que ela corresponde à solicitação laboratorial clínica dentre das de maior volume nos centros populacionais mais desenvolvidos. A fim de aquilatar a importância social pode-se citar dois exemplos significativos: nos Estados Unidos da América é prática de rotina quantificar a concentração do hormônio estimulante da tireóide (TSH) e Tiroxina (T_4) de crianças recém nascidas a fim de corrigir um eventual cretinismo*. Nesse mesmo país adota-se quantificar o teor de bleomicina em animais abatidos para fins de consumo da população. Esses dois exemplos por si refletem a importância e serviços que esta metodologia vem assumindo. Práticas como essas e semelhantes, em futuro muito próximo deverão ser estendidas a outras nações e outras substâncias.

1.6. O CONTROLE DE QUALIDADE DE PARÂMETROS DOS RADIOENSAIOS

O estudo da confiabilidade de qualquer método de medida sempre é objeto da atenção de todo analista e, particularmente, as medidas que envolvem o risco de vida do elemento humano deixa responsabilizado de modo especial os profissionais que atuam nessa área.

O controle de qualidade (CQ) de todo processo de produção ou de medições é regido pelas leis e princípios da probabilidade e da estatística. Em algumas circunstâncias o trabalho realizado para o CQ pode levar ao desenvolvimento dos próprios conceitos estatísticos e a extensão deles a outros setores do conhecimento. Por exemplo, extensa teoria estatística

* Projeto desta natureza vem sendo promovido pelo Ministério da Saúde junto à Escola Paulista de Medicina - Hospital São Paulo.

TABELA II

Substâncias mensuradas por ensaios radioligantes (Relação parcial)

HORMÔNIOS PEPTÍDICOS	HORMÔNIOS NÃO PEPTÍDICOS	SUBSTÂNCIAS NÃO HORMONAIAS
Insulina Hormônio do Crescimento (GH) Hormônio Adrenocorticotrófico (ACTH) Hormônio da Paratireóide (PTH) Glucagon Hormônio Estimulante da Tireóide (TSH) Gonadotrofina Coriônica Humana (HCG) Hormônio Folículo Estimulante (FSH) Somatotrofina Coriônica Humana (HCS) Prolactina Secretina Hormônio Luteinizante (LH) Vasopressina Angiotensina Oxitocina Bradicinina Tireoglobulina Hormônio Estimulante de α - Melanócito (α MSH) Hormônio Estimulante de β - Melanócito (β MSH) Gastrina Calcitonina Peptídeo C	Aldosterona Testosterona Diidrotestosterona Estradiol Estrona Estriol 2-Hidroxiestrone Prostaglandinas Triiodotironina (T_3) Tiroxina (T_4) Progesterona Medroxiprogesterona 17-Hidroxiprogesterona	Fator intrínseco Digoxina, Digitoxina Morfina Monofosfato de Adenosina Cíclico (cAMP) Monofosfato de Guanosina Cíclico (cGMP) Inosina 5 Fosfato Cíclico (cIMP) Monofosfato de Uridina Cíclico (cUMP) Antígeno da Hepatite B (antígeno Austrália -HBA) Esterase C_1 Frutose 1,6 difosfatase Antígeno Carcinoembriônico (CEA) Fator Reumatóide Imunoglobulina Humana (IgG) Ácido Fólico Neurofisina Globulina Tiroxina-Ligante (TBG) Anti-Toxina Tetânica

foi desenvolvida em função dos bioensaios, principalmente por Bliss⁽⁶⁾ e Finney⁽¹³⁾.

Nesse sentido, os radioensaios apresentam situações peculiares que se revestem de tal importância a ponto de tomar praticamente um terço do volume dos temas dos últimos simpósios internacionais específicos^(32,33,34,35).

A análise dos diferentes parâmetros envolvidos nos ensaios radioligantes é relativamente complexa e laboriosa já tendo recebido a atenção de numerosos investigadores^(23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76).

Assim, formularam-se diversos sistemas computacionais (programas) destinados a avaliar isoladamente alguns dos parâmetros dos radioensaios^(11,12,17,41,46,48,52,54,56,57,58,60,62,65,73,74). A tentativa de unificá-los apresenta sérias dificuldades em virtude da falta de unidade estrutural, das diferenças de linguagens e da própria filosofia adotada em suas redações.

1.7. PROPÓSITO DO TRABALHO

Por essas razões, julgou-se oportuno e até mesmo necessário tentar elaborar um sistema computacional unificado capaz de avaliar a maioria dos parâmetros dos radioensaios.

Para tanto, estruturou-se um sistema computacional redigido em Fortran-IV com características modulares destinado à estimativa das características e da qualidade dos parâmetros seguintes:

- 1- Controle da estabilidade do medidor de radioatividade. Teste do qui-quadrado.
- 2- Análise do perfil radiocromatográfico dos substratos marcados ao ajuste dos dados experimentais.
- 3- Análise da curva de dose-resposta dos radioensaios, apreciando:
 - 3.1- caracterização do perfil de imprecisão das dosagens,

- 3.2 - Automatização do traçado da curva de dose-resposta nas escalas 'linear-linear' , linear logarítmica e logito-logarítmica.
- 3.3- cálculos dos resultados de concentração de amostras doseadas, indicando-se o seu valor mais provável, o intervalo de confiança do resultado ao nível de 0,05 e o coeficiente de variação no resultado,
- 3.4- caracterização da dose mínima detectável (DMD),
- 3.5- estimativa do erro de aliquotagens.
- 4- Determinação da atividade específica do radiotraçador segundo o método do auto-deslocamento.
- 5- Determinação das constantes de afinidade pelo método de Scatchard e Priori e Rosenthal:
 - 5.1- caracterização da heterogenidade do ligante Q,
 - 5.2- determinação das constantes de afinidade $K_1, K_2, K_3, \dots, K_n$,
 - 5.3- determinação das concentrações do ligante Q ($q_1, q_2, q_3, \dots, q_n$),
 - 5.4- traçado gráfico da curva de dose-resposta teórica (concentração versus B/T) estimada a partir das constantes ($K_1, K_2, K_3, \dots, K_n$) e ($q_1, q_2, q_3, \dots, q_n$) para verificar a consistência experimental daquelas constantes,
 - 5.5- traçado gráfico da curva de Scatchard (concentração do ligado B versus razão B/F).
- 6- Análise termodinâmica da reação:
 - 6.1- determinação da entropia,
 - 6.2- determinação da entalpia,
 - 6.3- traçado gráfico da relação ($T^{-1} (^{\circ}C)$ ver sus $R \cdot \log_e K$),

.14.

6.4- verificação da influência da temperatura de incubação sobre a capacidade de ligação entre os reagentes P e Q e suas consequências no andamento da curva padrão (dose-resposta).

Para verificar a exeqüibilidade do programa e aquilatar sua competência, escolheu-se como radioimunoensaio tipo, o da insulina.

2. ASPECTOS TEÓRICOS E PRÁTICOS DOS ENSAIOS RADIOLIGANTES

Neste capítulo serão abordadas as bases teóricas de um conjunto de aspectos pertinentes aos radioensaios que devem ser interpretadas como apontamentos, pois constam de uma coletânea de informações que embora sigam uma linha racional na oferta das informações, não constituem um corpo homogêneo de doutrina, de prática e de completeza.

No capítulo anterior destacou-se a existência de diversas alternativas metodológicas dos radioensaios, entretanto deve-se considerar que na atualidade o radioimunoensaio é a principal opção utilizada.

O radioimunoensaio adquiriu notável importância científica e prática que fez justificar a entrega do Premio Nobel de medicina em 1977 a um de seus propositores: a física Rosalind Yallow. Deste modo ficou-se forçosamente condicionado a focalizar com mais freqüência as citações relativas a essa técnica.

2.1. A AVALIAÇÃO CROMATOGRÁFICA DO INDICADOR RADIOATIVO

Os radioensaios fazem uso de traçador ou indicador radioativo e com freqüência não se dispõe dessa substância adequadamente pura e ocorre nela estar presente:

- Fração do componente marcado na forma indene
- Fração do radioisótopo não incorporado à molécula
- Fração da molécula danificada ou imprópria para o uso
- Substâncias outras.

É comum proceder-se à separação dessas frações mediante os recursos de processos que geram um perfil cromatográfico semelhante àquele mostrado na figura 3, o qual indica a

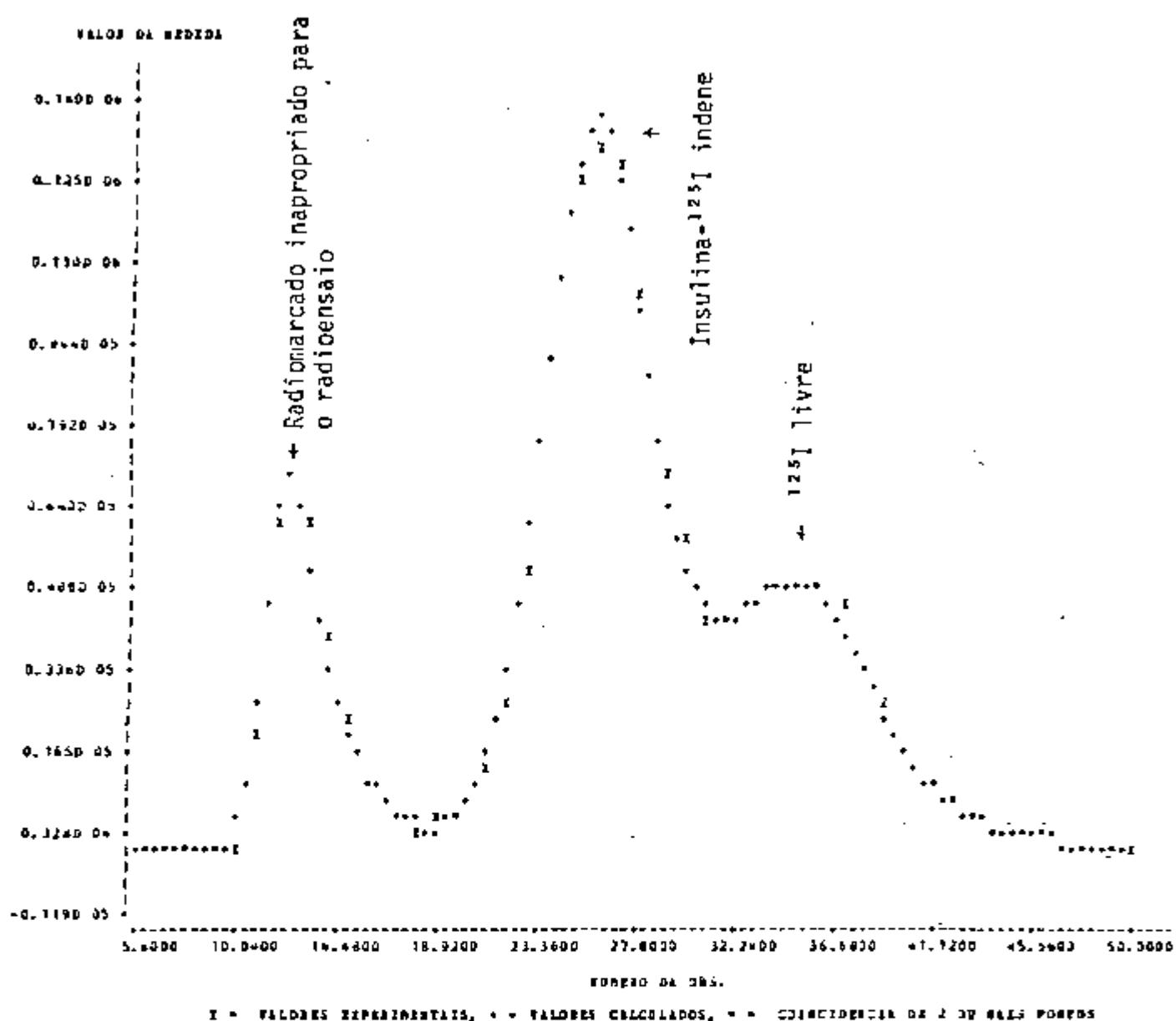


Figura 3 - Perfil de radiocromatograma de uma amostra de insulina-I¹²⁵.

Figura adaptada de Gouvea e Mesquita (24)

localização das frações radioativas, a quantidade relativa de cada uma delas e a capacidade do sistema discriminá-las.

Gouvea e Mesquita⁽²⁴⁾ desenvolveram um sistema computacional denominado de Anacrom que propicia a análise quali-quantitativa do perfil cromatográfico. O sistema Anacrom fazendo uso da variação da derivada primeira calculada em cada ponto experimental do cromatograma, identifica o início e o fim de cada pico. Dois picos são considerados parcialmente sobrepostos quando o ponto inicial do segundo pico coincide com o último ponto do pico imediatamente anterior. Cada intervalo de ajuste inclui todos os picos parcialmente sobrepostos (figura 4).

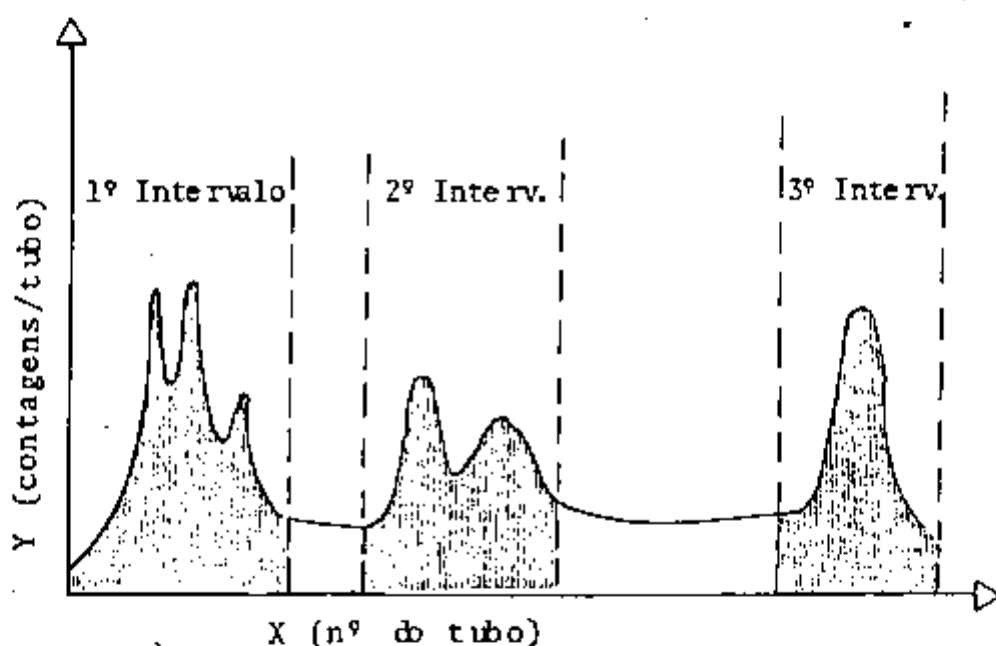


Figura 4 - Esquema de perfil cromatográfico contendo três intervalos de ajustes.

Para o ajuste de cada intervalo previamente identificado, o sistema Anacrom dispõe da combinação de funções gaussianas e da função gaussiana modificada pela inclusão de uma parte exponencial conforme descrita por Lederer⁽³³⁾ (figura 5).

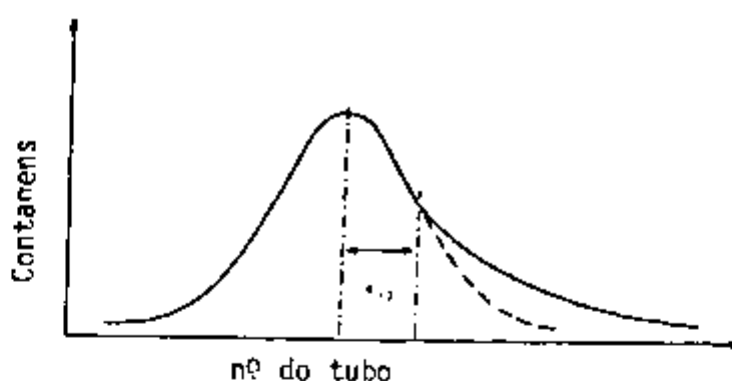


Figura 5 - Esquema de pico cromatográfico ajustado a uma função gaussiana com modificação exponencial à direita (24)

2.2. O LIGANTE ESPECÍFICO Q.

A sensibilidade e a especificidade dos ensaios radioligantes dependem predominantemente da avidéz da reação entre o ligante específico Q e o composto P e, conseqüentemente, para se obter resultados satisfatórios será necessário dispor de fonte adequada de Q.

Os procedimentos laboratoriais ainda mantêm acentuado caracter empírico quanto ao procedimento da obtenção de ligantes biológicos e naturalmente, a literatura é farta quanto aos esquemas propostos^(31,50,61).

Recentemente, foi mostrada a possibilidade de obtenção de antisoros monoclonais^(31,61) e graças a essa nova perspectiva, muito brevemente, permitirá obter-se ligantes Q altamente melhorados quanto à especificidade e afinidade para reagir com o composto P a ser dosado.

Ao se dispor de qualquer espécie de ligante Q específico, deve-se caracterizar o seu título. Esta análise é efetuada mediante a incubação de quantidades fixas de traçador, previamente selecionadas, com quantidades progressivamente mais diluídas do componente Q. Após a paralização da reação, processa-se a separação das frações livre (F) e ligada (B) construindo-se a curva de diluição: nível de diluição versus razão B/F.

A figura 6 ilustra um resultado típico da caracterização do título de um antisoro. O título do ligante Q é adotado como a diluição que causa o deslocamento da razão B/F ao nível efetivo de um (B/F=1), isto é, 50% do traçador se complexa com o ligante Q.

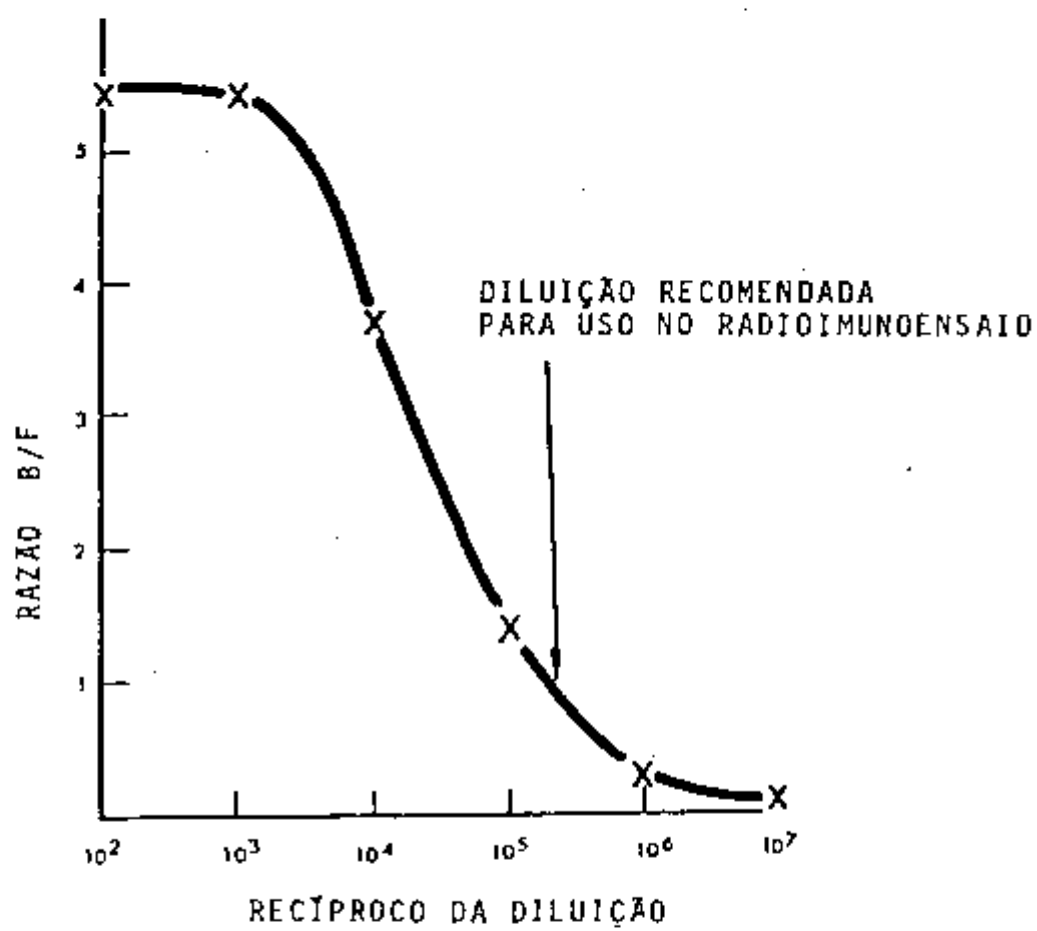


Figura 6 - Curva de título de um determinado antiserio.
Figura adaptada (54).

Ao se projetar a seqüência operacional do radioensaio e as alíquotas dos reagentes a serem tomadas (protocolo do ensaio) o analista se fundamenta em considerações teóricas e práticas. Defronta-se com objetivos a atender. Em alguns casos é necessário que um particular radioensaio seja o mais sensível possível. Por outro lado, encontra-se circunstâncias onde é preferível atender o requisito de boa precisão em níveis de concentração relativamente altas da substância em prova. Estes radioensaios, assim projetados, geralmente, não são muito sensíveis. Em contrapartida, os radioensaios especialmente projetados para serem muito sensíveis carecem de possuir faixa ampla de leitura com a adequada precisão. Cabe ao analista decidir entre os dois compromissos citados.

Ekins^(13,14,15) com a finalidade de orientar na projeção de radioensaios estudou extensivamente as condições de otimização dos radioensaios. Demonstrou alicerçando-se na hipótese de que a precisão das medidas de concentração é dependente do nível de inclinação da curva de dose resposta e do erro na medida da radioatividade, que as concentrações adequadas dos reagentes do radioensaio poderiam ser estimadas pelas expressões que envolvem o recíproco da constante de equilíbrio K^* . Ao mesmo tempo, aquele autor, demonstrou que ao se utilizar aquelas concentrações, o radioensaio se tornaria mais sensível quando o título do antisoro a ser usado fosse aquele que resultasse B^*/T^* igual a 0,5 (alternativamente $B^*/F^* = 1$).

+ $P^* = 4 K^{-1}$ (concentração do traçador radioativo)
 $q = 3 K^{-1}$ (concentração do ligante específico)

2.3. A CURVA DE SCATCHARD, CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO "Q" E DA CONSTANTE DE EQUILÍBRIO "K" DA REACÃO

A compreensão e o domínio dos princípios dos ensaios radioligantes descritos por modelos matemáticos é essencial para a padronização racional e a interpretação de seus resultados. Esses aspectos foram exaustivamente explorados por Berson e Yallow^(3,75,76), Ekins^(13,14,15), Rodbard e col.^(58,59) e Walker e Keane^(34,72).

Uma boa prática neste tipo de análise consiste, inicialmente, em partir de modelos matemáticos, possivelmente mais simples, alicerçando-se em premissas básicas. Posteriormente, quando necessário, estende-se a análise para modelos mais complexos estudando-se o efeito do descarte de algumas das premissas. Feldman e Rodbard⁽¹⁸⁾ iniciam suas análises pressupondo que a reação básica dos ensaios radioligantes concorde com as seguintes premissas:

1. O componente P deve estar presente de modo homogêneo, consistindo de uma única espécie química.
2. O ligante específico Q deve estar presente homogeneamente em uma única espécie química.
3. P e Q são univalentes, isto é, a molécula de P poderá reagir com uma única molécula de Q e nenhuma outra espécie de combinação poderá ocorrer.
4. Não ocorre nenhum efeito alostérico ou cooperativo, isto é, P e Q reagem de acordo com a lei da ação das massas (reação cinética de segunda ordem).
5. P^ϕ e P^* possuem as mesmas propriedades físico-químicas a despeito da presença do elemento radicativo em P^* .
6. P^ϕ , P^* e Q reagem até atingir o equilíbrio da reação.
7. As frações químicas complexada (B) e livre (F) podem ser separadas perfeitamente sem ocorrer a perturbação do equilíbrio da reação.

8. A razão B/F pode ser perfeitamente determinada.

Alicerçados nessas premissas, pode-se esquematizar a reação dos ensaios por saturação conforme as equações 1, 2 e 3 e que devidamente exploradas resultam na clássica equação de Scatchard⁽⁶⁶⁾:

$$B/F = Kq - KB \quad (4)$$

onde q é a concentração inicial do ligante específico Q. Esta relação é representada graficamente por uma reta conforme esquema da figura 7.

A equação 4 foi primeiramente introduzida na análise da atração de pequenas moléculas protéicas (e íons) por Scatchard⁽⁶⁶⁾ e mais recentemente aplicada aos radioimunoensaios por Berson e Yallow^(75,76).

A reta de Scatchard permite estimar a magnitude da constante de afinidade K e a concentração q do ligante Q.

A figura 7 mostra o efeito na curva de dose x resposta quando se utilizam diferentes concentrações de 'q' ou o efeito do valor de 'K' quanto à sensibilidade do ensaio.

Os dados experimentais da análise de Scatchard nem sempre resultam na relação linear esperada e várias são as razões dessa discrepância, dentre as quais destacam-se:

- I. Inespecificidade do sistema de separação das frações químicas B e F, isto é, quando não se observa a premissa nº 8.
- II. Interrupção da reação antes de ser atingido o equilíbrio (não observância da hipótese nº 6).
- III. Distúrbio do equilíbrio da reação pela ação do sistema de separação das frações B e F (quebra da hipótese nº 7).
- IV. Adição retardada do traçador radioativo. Quando a adição do traçador P* é efetuada após o equilíbrio entre o ligante Q e o composto P^φ, com vistas a se obter maior sensibilidade no ensaio⁽⁵⁹⁾.

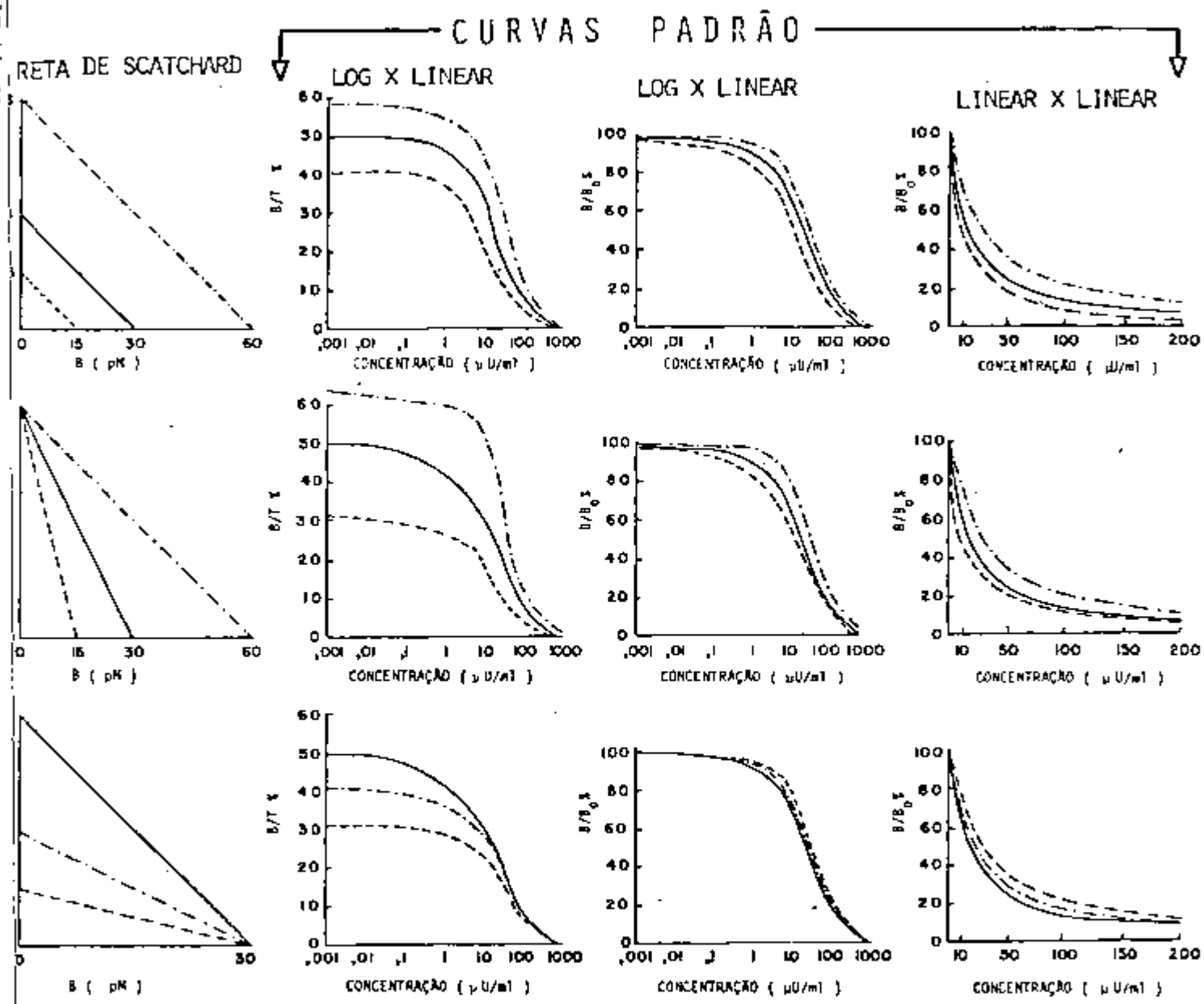


Figura 7 - Efeito da variação dos valores da constante de afinidade 'K' e da concentração 'q' do ligante no tracado da curva de dose resposta, estimada pela análise de Scatchard e lançadas em diferentes escalas.

- V. Distorsão da escala de B em função da inobservância da hipótese nº 5, isto é K^{ϕ} é diferente de K^* .
- VI. Existência de vários grupos (independentes entre si de ligantes Q com diferentes valores de K, isto é, quando não se verifica a hipótese nº 2).

Particularmente, esta última causa da não linearidade dos pontos experimentais na análise de Scatchard, se deve a complexidade biológica que é matriz na obtenção do componente Q^(1,8,41,50,58,62). A figura 8 mostra o esquema de uma curva de Scatchard em que existem duas populações de Q (Q₁ e Q₂) saturáveis e outra terceira (Q₃) não saturável.

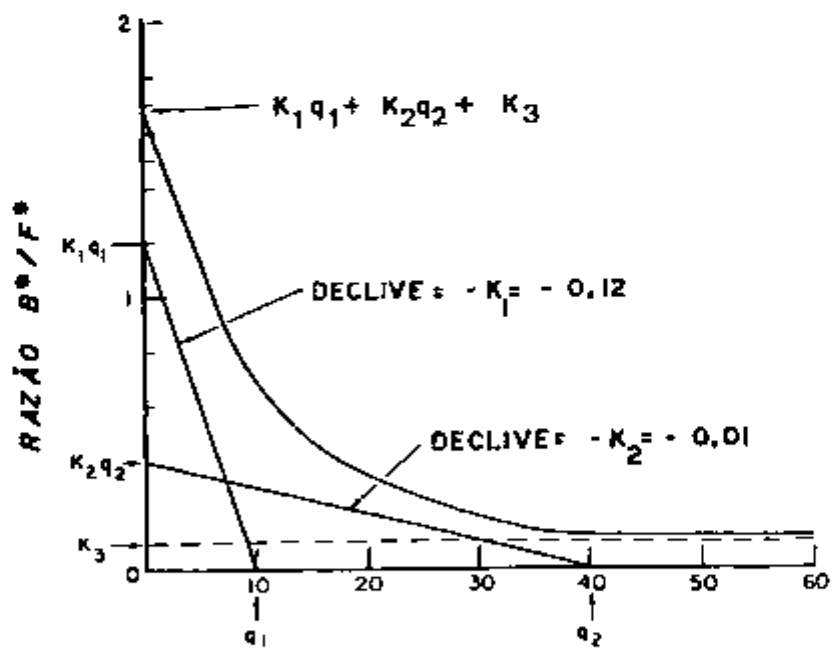


Figura 8 - Curva de Scatchard não linear devido a presença de três grupos de Q, dois saturáveis e um não saturável.

Figura adaptada (58).

Priori e Rosenthal⁽⁵²⁾ formularam um procedimento de regressão não linear⁺ para os cálculos das estimativas das constantes K e q como os descritos pela figura 8. Esses autores experimentaram submeter seus dados experimentais[§] adotando três tipos de variáveis dependentes (no eixo das ordenadas) a saber: B/T, logaritmo de B/F e B/F, optando-se, neste trabalho, pela primeira alternativa em razão de ter encontrado menor heterocedasticidade na variância dos resultados.

2.4. ASPECTOS TERMODINÂMICOS APLICADOS AOS RADIOENSAIOS

Os resultados da curva de Scatchard também permitem inferir algumas informações sobre a natureza das interações termodinâmicas entre os reagentes P e Q.

A variação da magnitude da constante de afinidade K em função da temperatura é usada para esse fim.

A energia livre padrão da reação é calculada por^(36,72),

$$\Delta G_o = - R.T.\log K \quad (5)$$

onde R é a constante universal dos gases, igual a 1,93, por outro lado,

$$\Delta G_o = \Delta H_o - T.\Delta S \quad (6)$$

sendo ΔH_o a variação total de energia ou entalpia, ΔS_o a variação da entropia da reação e T a temperatura ($^{\circ}K$) em que a reação ocorre. Associando-se as equações 5 e 6, resulta:

$$R.\log K = \Delta H_o.T^{-1} + \Delta S \quad (7)$$

+ Utilizaram o método combinado de Newton e do gradiente.

§ Priori e Rosenthal estudavam a ligação da albumina humana com o dissulfato de estradiol.

$$\frac{B/T}{1 - B/T} = \sum \frac{q_i K_i}{1 + K_i P (1 - B/T)}$$

A equação nº 7 indica que o produto $R \cdot \log K$ relaciona-se linearmente com o recíproco da temperatura.

A intersecção da reta com o eixo das ordenadas indica a variação de entropia enquanto o nível de inclinação da reta corresponde a variação da entalpia, conforme esquema da figura nº 9^(36,72)

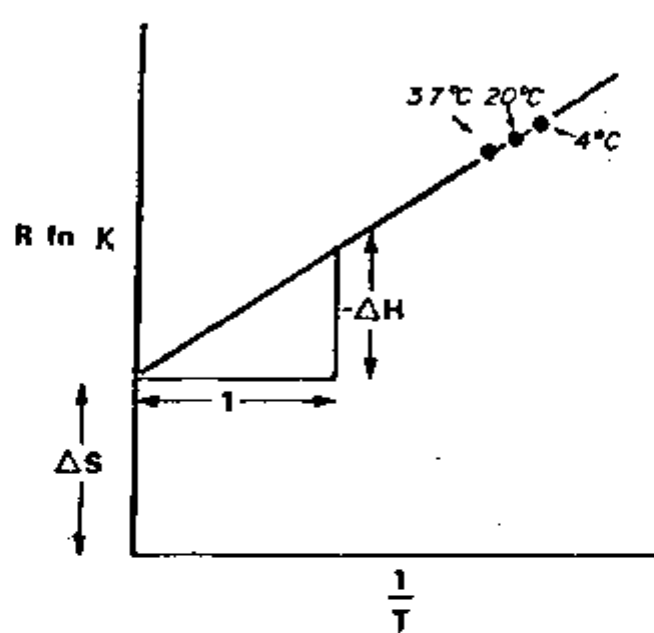


Figura 9 - Esquema para a determinação da entropia e entalpia da reação entre 'P' e 'O' segundo a relação linear entre $R \cdot \log K$ versus T^{-1}

O comportamento termodinâmico de algumas proteínas ligantes é mostrado na figura 10 enquanto a tabela III apresenta os valores representativos para alguns anticorpos e proteínas carreadoras^(36,72).

É mister mencionar que o valor da constante de afinidade K é também dependente do sistema de separação das frações B e F, da composição do tampão e de outros fatores, assim as informações extraídas da regressão de Scatchard são válidas somente para o sistema particular de ensaio utilizado^(36,72).

O estudo do efeito da temperatura na magnitude do valor de K tem suas implicações práticas e teóricas. Na padronização do ensaio e durante as atividades no laboratório deve

TABELA 171

Constante de afinidade K de alguns ligantes Q em diferentes temperaturas e os respectivos valores da entalpia ΔH e entropia ΔS

Composto P	Ligante Q	T. °C	$K \times 10^9$ l/m	ΔH Kcal/mol	ΔS Cal/mol/K
Aldosterona	anticorpo	5	5,0	-3	42
		25	3,6	(0,1)	(0,4)
		37	2,9		
Digoxina	anticorpo	5	0,88	+1,6	55
		25	1,1	(0,1)	(0,5)
		37	1,2		
		56	1,2		
Estradiol	anticorpo	6	34	-4,6	40
		25	20		
Estriol	anticorpo	4	2,1	0	51
		25	2,0	(0,1)	(0,9)
		37	2,1		
Testosterona	anticorpo	4	8,9	-1	50
		25	8,0	(0,1)	(0,3)
		37	7,3		
Tiroxina	anticorpo	4	0,69	0	48
		25	0,72	(0,2)	(1,6)
		36	0,65		
Angiotensinal	anticorpo	5	14	-9	22
		25	4,5	(0,2)	(1,2)
		37	2,5		
Angiotensinal	anticorpo	5	90	-9	27
		25	40	(0,9)	(5,7)
		37	16		
Gastrina	anticorpo	5	590	-8	32
		25	230	(0,2)	(1,5)
		37	120		
Insulina	anticorpo	5	120	-7	34
		25	68	(0,9)	(6,0)
		37	31		
Tiroxina	anticorpo	18	2,7	-9	22
		21	2,4	(1,8)	(1,3)
		24	2,1		
		27	1,9		
		37	1,0		
Cortisol	transcortina	4	0,52	-16	-10
		37	0,074		
Estradiol	citosol uterino	5	22	-16	0
		20	5,8	(2)	(12)
		37	1,0		
Progesterona	OBG	5	0,12	-10	9
		25	0,06	(1,9)	(11)
		37	0,616		

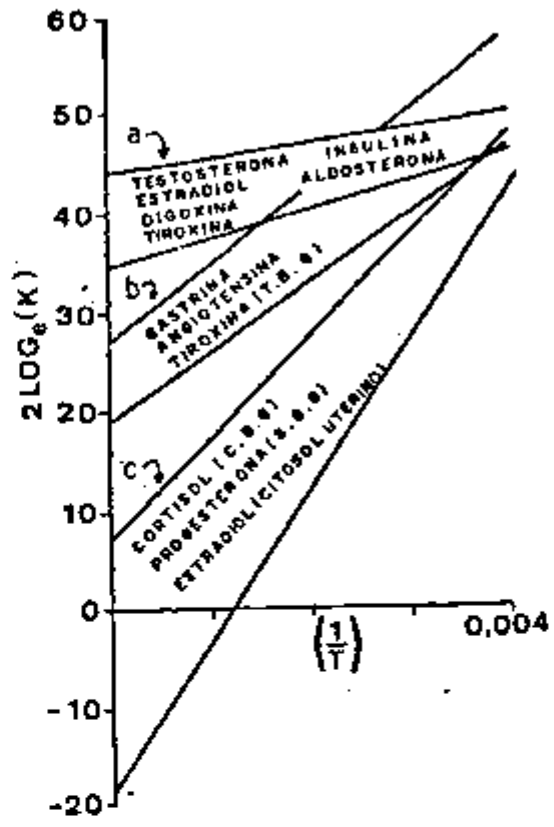


Figura 10 - Esquema das características termodinâmicas de três categorias de ligantes. Grupo a → moléculas relativamente pequenas e apolares com antisoros específicos.
Grupo b → moléculas peptídicas com antisoros
Grupo c → proteínas naturais utilizadas como ligante.

-se considerar que nos sistemas com grande componente de entalpia, será necessário manter a temperatura de incubação de modo mais reduzida possível a fim de se conseguir a máxima sensibilidade do ensaio. A temperatura no decorrer do ensaio deverá ser rigorosamente controlada. Ao contrário, quando a variação de entalpia é relativamente pequena será preferível manter a temperatura de incubação mais elevada de sorte a permitir mais

rapidamente atingir o equilíbrio da reação, sem comprometer a sensibilidade do ensaio e conseguir eventualmente menor nível de reações cruzadas próprias de proteínas carreadoras.

A redução da temperatura de 25°C para 5°C na reação da gastrina e com o antisoro anti-gastrina causa variação no valor de K^{-1} de 16 para 4 picogramas por mililitros. Um ensaio adequado desse hormônio realizado à 25°C requer aproximadamente a quantidade de antisoro equivalente a $q = 32\text{pg/ml}$ e traçador $p^* = 48\text{pg/ml}$. Esses valores seriam reduzidos a um quarto sob a temperatura de incubação de 5°C, isto é, $q = 8\text{pg/ml}$ e $p^* = 12\text{pg/ml}$ ⁽³⁶⁾.

A energia de ligação ou constante de associação depende de vários fatores e é a resultante de interações do tipo iônicas, hidrogeniônicas, van der Waals, hidrofóbicas e forças de London. As forças eletrostáticas predominam inicialmente enquanto as interações secundárias atuam quando a proximidade entre as moléculas de P e Q é da ordem de alguns angstroms. A grande energia envolvida na ligação de P e Q explica parcialmente a especificidade da reação antígeno-anticorpo.

Especula-se sobre a correlação entre as variações de entalpia e entropia com respeito a natureza da interação P e Q. Algumas evidências podem ser extraídas da figura 9 ou 10 e tabela III, onde se dividem as reações em três grupos: 'a', 'b' e 'c'.

O grupo 'a' representa a reação de moléculas relativamente pequenas e apolares com antisoros específicos. No grupo 'b' tem-se as reações com peptídeos com seus respectivos antisoros e finalmente no terceiro grupo 'c' reúne-se as reações de pequenas moléculas P com suas proteínas carreadoras ou receptoras.

O primeiro grupo 'a' revela pequenas variações de entalpia associada com altas mudanças de entropia, sugerindo que essas ligações sejam do tipo hidrofóbico ^(21,36). Por outro lado, a reação dos anticorpos com os peptídeos (grupo b) acusa elevados valores de entalpia e entropia em proporções semelhantes e nesses casos tanto as interações hidrofóbicas e de van der Waals são prováveis. Já com as proteínas naturais utiliza

zadas como ligantes no grupo 'c', verifica-se elevada variação de entalpia associada com pequenas mudanças de entropia, contrastando com o comportamento dos anticorpos (proteínas induzidas por imunização). As reações dessas proteínas, naturalmente disponíveis nos sistemas biológicos, interagem com seus alvos ligantes segundo interações de van der Waals ocorrendo aí alterações de conformação da estrutura molecular⁽³⁶⁾.

2.5. MODELOS MATEMÁTICOS PARA O AJUSTE DA CURVA DE DOSE RESPOSTA

A quantidade de análises efetuadas com os ensaios radioligantes cresce de modo acelerado na rotina dos laboratórios.

A inferência de resultados mediante o traçado manual da curva padrão (ou dose-resposta), embora simples, poderá ser inapropriada pois é morosa, eventualmente insegura e ao mesmo tempo é desprovida de maiores informações para o controle de qualidade do ensaio.

Com a atual disponibilidade dos recentes computadores, a análise dos dados dos radioensaios é efetuada de modo rápido e seguro, contornando-se assim, as limitações acima mencionadas.

No tocante à análise da curva de dose resposta é necessário a utilização de fórmulas matemáticas (modelos) que se ajustem aos dados experimentais.

A seleção do modelo matemático tanto poderá ter fundamentação teórica como empírica.

2.5.1. MODELOS TEÓRICOS

Os modelos teóricos são expressões matemáticas para o ajuste da curva padrão que são formulados a partir de considerações físico-químicas. Nestas expressões os parâmetros presentes possuem especial significado físico-químico.

O modelo de conteúdo teórico mais simplificado é aquele sujeito às restrições já mencionadas no item 2.3 é formalizado na equação nº 4 de Scatchard^(18,75,76).

Rodbard e col.⁽⁵⁸⁾ utilizam um modelo teórico deduzido a partir da lei da ação das massas e consideram a presença de dois grupos de ligantes, Q_1 e Q_2 saturáveis com constantes de equilíbrio K_1 e K_2 respectivamente e mais uma terceira população não saturável com constante de afinidade relativamente muito pequena. A aplicação desse modelo é complexa e muitas vezes nos experimentos rotineiros resultam valores dos parâmetros físico-químicos divergentes daqueles esperados.

Estas restrições limitam a utilização dos modelos teóricos na rotina do laboratório, entretanto são extremamente úteis quando se deseja padronizar protocolos de radioensaios convenientemente otimizados. Rodbard⁽⁵⁶⁾, Ekins^(14,15) e Yallow e Berson^(75,76) exploraram suficientemente esse tema.

Mediante o uso dos modelos teóricos prevê-se o comportamento do ensaio em condições diversas, a saber: variações da temperatura de incubação, tempo de incubação, concentração dos reagentes, etc. O estudo dessas variáveis em per si pode demandar tempo e custos proibitivos. Alternativamente, a recorrência da aplicação de modelos teóricos permite prever o efeito da variação daqueles componentes experimentais, de modo confiável e rápido, consumindo apenas alguns minutos de cálculos. Rodbard⁽⁵⁶⁾ fazendo uso do modelo linear da equação de Scatchard e do método de Monte Carlo⁽⁵⁶⁾ estudou as causas de imprecisão dos radioensaios e daí forneceu subsídios valiosos aos analistas que fazem uso dos radioensaios.

2.5.2. MODELOS EMPÍRICOS PARA O AJUSTE DA CURVA PADRÃO

Alternativamente aos modelos teóricos pode-se utilizar expressões matemáticas empíricas que se ajustam satisfatoriamente aos pontos experimentais, sem compromisso em procurar identidade entre os parâmetros do modelo empírico com constantes físico-químicas da reação entre P e Q.

A seleção dessa função é efetuada mediante a análise qualitativa do comportamento dos pontos experimentais, devendo satisfazer os requisitos:

- simplicidade algébrica
- deve ser aplicável no intervalo útil de leituras
- deve conter o mínimo possível de parâmetros a ajustar.

Geralmente, como se observa na figura 11, a curva de referência apresenta o aspecto sigmoidal quando traçada em gráfico de escala linear-logarítmica.

A função que interpreta essas curvas deverá conter pelo menos quatro parâmetros básicos:

- valor assintótico superior, denominado de a
- valor assintótico inferior, denominado de d
- parâmetro associado à inclinação da curva, b
- parâmetro associado à posição da curva em relação ao eixo das abcissas, c .

O aspecto sigmoidal da curva da figura 11 sugere a aplicação da função do tipo:

$$Y = \frac{a - d}{1 + \left(\frac{X}{c}\right)^b} + d \quad (8)$$

Rodbard e col.⁽⁵⁸⁾ supõem que possa ocorrer certa inadequacidade do modelo descrito pela equação 8 aos pontos experimentais da curva padrão em função de eventual grau de assimetria da curva experimental. Este efeito poderá ser corrigido mediante a incorporação de novos parâmetros na equação, conforme sugestões de Prentice⁽⁵¹⁾. Dentro dessas conjecturas Rodbard e col.⁽⁵⁸⁾ discutem a inclusão de uma série de novos parâmetros.

A tabela IV compara a aplicação de diversos modelos de ajuste da curva padrão segundo os critérios de facilidade

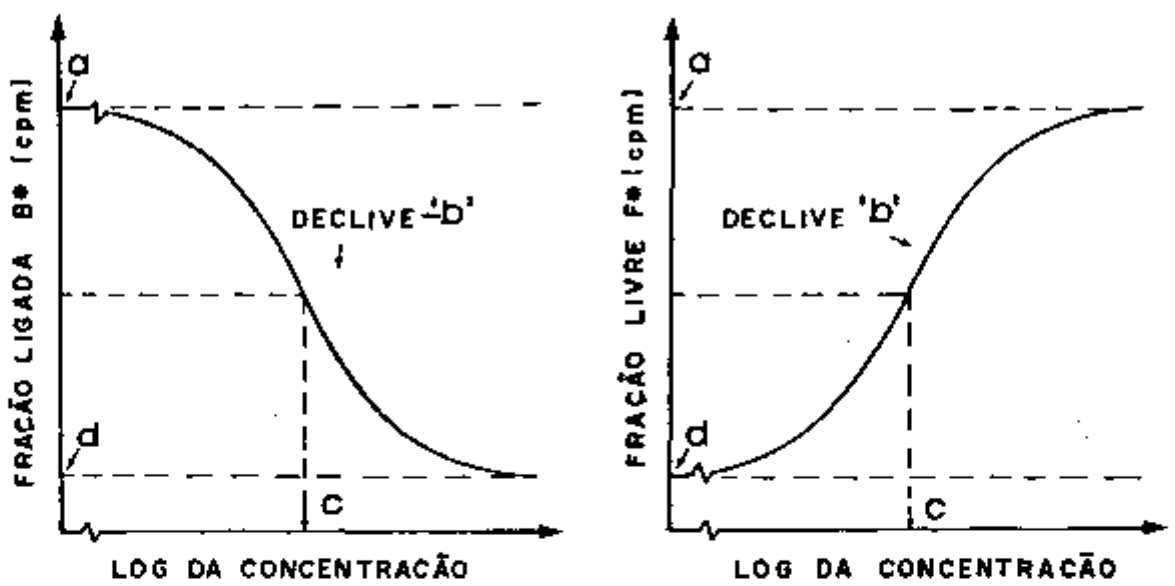


Figura 11 - Traçado típico da curva padrão dos radioensaios lançada em escala logarítmica (abscissa) versus linear (ordenada)

de gráfica, simplicidade e capacidade em fornecer informações estatísticas.

A tabela V complementa a comparação segundo outros critérios específicos.

A figura 12 ilustra outra forma de avaliar a aplicação de determinados modelos, tendo-se em conta o compromisso entre a sua complexidade e a sua capacidade de fornecer informações estatísticas para eventuais controles. Esses esquemas servem de guia para a seleção de modelos.

TABELA IV

Comparação entre diversas técnicas de análise da curva de Do se x Resposta dos Radioensaio^s segundo Rodbard e col.⁽³⁸⁾ levando-se em conta os seguintes critérios: a) Facilidade no traçado gráfico; b) simplicidade global e c) Capacidade de fornecer informações estatísticas.

QUANTO A FACILIDADE DA ANÁLISE GRÁFICA

-
1. Ponto a Ponto
 2. $1/(B/T)$ versus X
 3. $\log(Y)$ versus $\log(X+X^*)$
 4. $\text{logito}(B/B_0)$ versus $\log(X)$
 5. Lei da ação das massas (Scatchard linear)
-

QUANTO A SIMPLICIDADE

-
1. Ponto a Ponto
 2. $1/(B/T)$ versus X
 3. $\log(Y)$ versus $\log(X+X^*)$
 4. $\text{logito}(B/B_0)$ versus $\log(X)$
 5. Polinômios
 6. Logístico de quatro parâmetros
 7. Lei da ação das massas linear
 8. Lei da ação das massas complexa
-

QUANTO AS INFORMAÇÕES ESTATÍSTICAS

-
1. Logístico de quatro parâmetros
 2. logito-log (ponderado)
 3. Lei da ação das massas linear
 4. $\log(Y)$ versus $\log(X+X^*)$
 5. Polinômios
 6. Ponto a Ponto
 7. Lei da ação das massas complexa
-

TABELA V

Comparação geral de diversos métodos de análises das curvas de Dose x Resposta dos radioensaios. Figura adaptada de Rodbard e col. (58).

	Simplicidade	Linearidade	Estatística	Unif. Variância	Paralelismo	Justificativa	Gráfico	Miniprocessador	Ponderação	Regressão Linear
MODELOS EMPÍRICOS										
Ponto a Ponto	4+		-	+	+	-	+	+	+	+
Polinômios	2+	1+	-	+	+	-		+	+	
Exponenciais	+		-	+	+	-			-	
Log polinomiais	+									
IPERBÓLICOS										
Recíprocos	3+	1+	+	2-	+	+	+	+	3+	+
$\log(B/B_0)$ vs $\log(X+X^*)$	3+	2+	2+	3+	+	+	+	+	1+	+
LOGITO-LOG										
Logito vs $\log(X)$	3+	3+	3+	3-	3+	2+	+	+	3+	+
Logístico de 4 parâmetros	+		4+	+	+	3+		1+	+	
EQUAÇÃO DA AÇÃO DAS MASSAS										
Linear	3+	3+	1+	1+	1+	4+	+	+	1+	+
Complexa			-	-	-	2+		1+	+	+

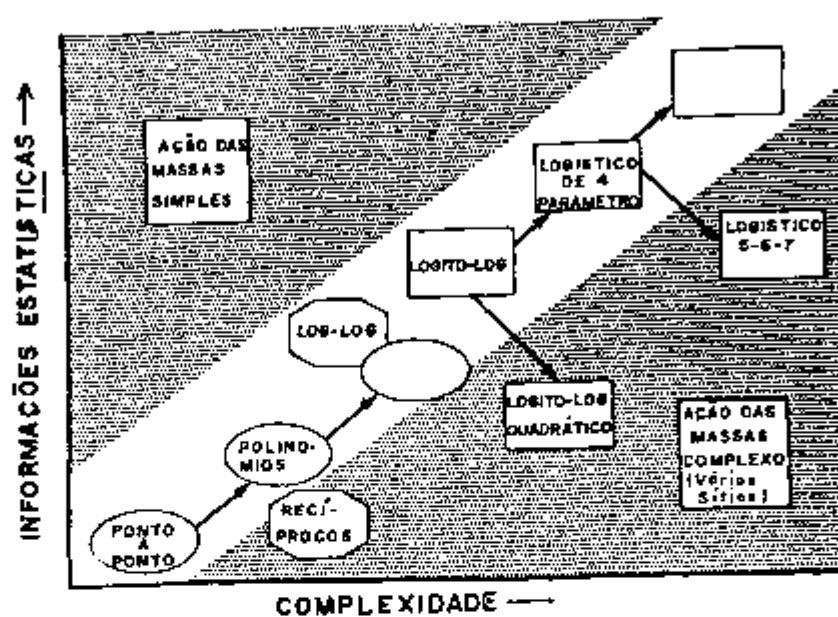


Figura 12 - Avaliação entre o nível de complexidade de cálculos e a capacidade de informações estatísticas de diversos modelos matemáticos de natureza empírica ou teórica para o ajuste da curva de Dose x Resposta dos radioensaios. A faixa branca sugere que o volume de informações estatísticas tem o seu 'preço' correspondente a complexidade envolvida. O modelo que faz uso da lei da ação das massas mantém a melhor relação entre informações/complexidade.

2.6. O PERFIL DE IMPRECISÃO DAS MEDIDAS

Rodbard⁽⁵⁶⁾ utilizando-se da teoria da propagação dos erros, da lei da ação das massas e do método Monte Carlo mostraram que a dispersão da variância na curva de dose resposta dos radioensaios, não é homogênea, isto é, não permanece constante em toda a extensão da curva.

Rodbard e col.⁽⁵⁸⁾ sugerem que a variância da medida Y (B/F, B/T, etc.) possa ser descrita pelo modelo da função potência:

$$\text{var}(Y) = e.Y^f \quad (9)$$

onde 'e' e 'f' são parâmetros calculados pelo método de regressão dos mínimos quadrados.

Adotando-se a hipótese de que a variância da medida Y não é homogênea, ou seja, ocorre a heterocedasticidade da variância, então, o ajuste dos pontos experimentais da curva padrão ao modelo matemático adotado deverá ser efetuado de modo ponderado, isto é, cada ponto deverá ter peso diferenciado no processo de ajuste.

Em geral, nas estimativas dos parâmetros 'a', 'b', 'c' e 'd' da equação 8 usa-se ponderar a contribuição de cada ponto aplicando-se a equação:

$$w_i = \text{var}(Y)^{-1} \quad (10)$$

onde w_i é o peso atribuído ao i-ésimo ponto da curva.

Dentre as vantagens desse procedimento cita-se que tanto as medidas experimentais Y da curva padrão, constituidas por poucos pontos (oito p.ex.) e das amostras (várias, 50 p.ex.) auxiliam a definição dos parâmetros 'e' e 'f', minorando assim as incertezas estatísticas (conferindo maior grãu de liberdade) na fase de regressão da função potência descrita pela equação nº 9.

A precisão intra-ensaio das determinações dos radioensaios segue os procedimentos:

- I - Calcula-se as médias \bar{Y} e $\text{var}(\bar{Y})$ de todas as amostras e padrões
- II - Calcula-se pelo método dos mínimos quadrados os parâmetros 'e' e 'f' contidos na equação 9
- III - Traça-se a curva padrão sobrepondo-se o seu intervalo de confiança calculado para qualquer ponto segundo a expressão:

$$I = \pm 2 \sqrt{\frac{\text{var}(\bar{Y})}{r}} \quad (11)$$

onde r é o número de replicatas adotadas no ensaio

- IV - Para cada I calculado em 11, determina-se o intervalo

$$Y_- = \bar{Y} - I \quad (12)$$

$$Y_+ = \bar{Y} + I \quad (13)$$

e a seguir calcula-se, pela expressão da sigmóide, a concentração X_{\pm} de acordo com a fórmula:

$$X_{\pm} = c \{ (a - d) \div (Y_{\pm} - d) - 1 \}^{1/b} \quad (14)$$

onde os parâmetros a , b , c e d foram previamente estimados e pertencem ao corpo da expressão nº 8

A figura 13 ilustra graficamente o significado de X_- e X_+ ,

- V - Calcula-se o coeficiente de variação percentual (C.V.%) segundo:

$$\text{C.V.}\% = \frac{|X_+ - X_-| \cdot 100}{2 \cdot X_Y} \quad (15)$$

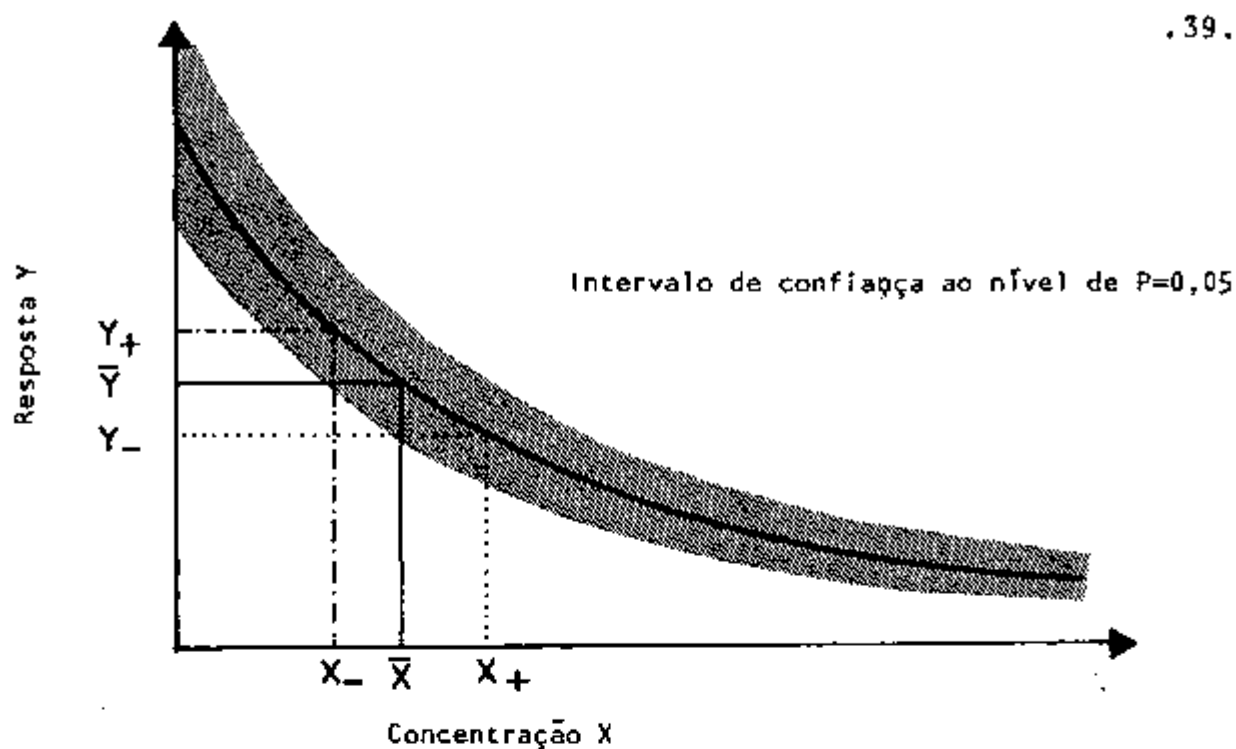


Figura 13 - Esquema da análise da precisão metodológica dos radioensaios. Exemplo da determinação do intervalo de confiança dos níveis de concentração \bar{X} .

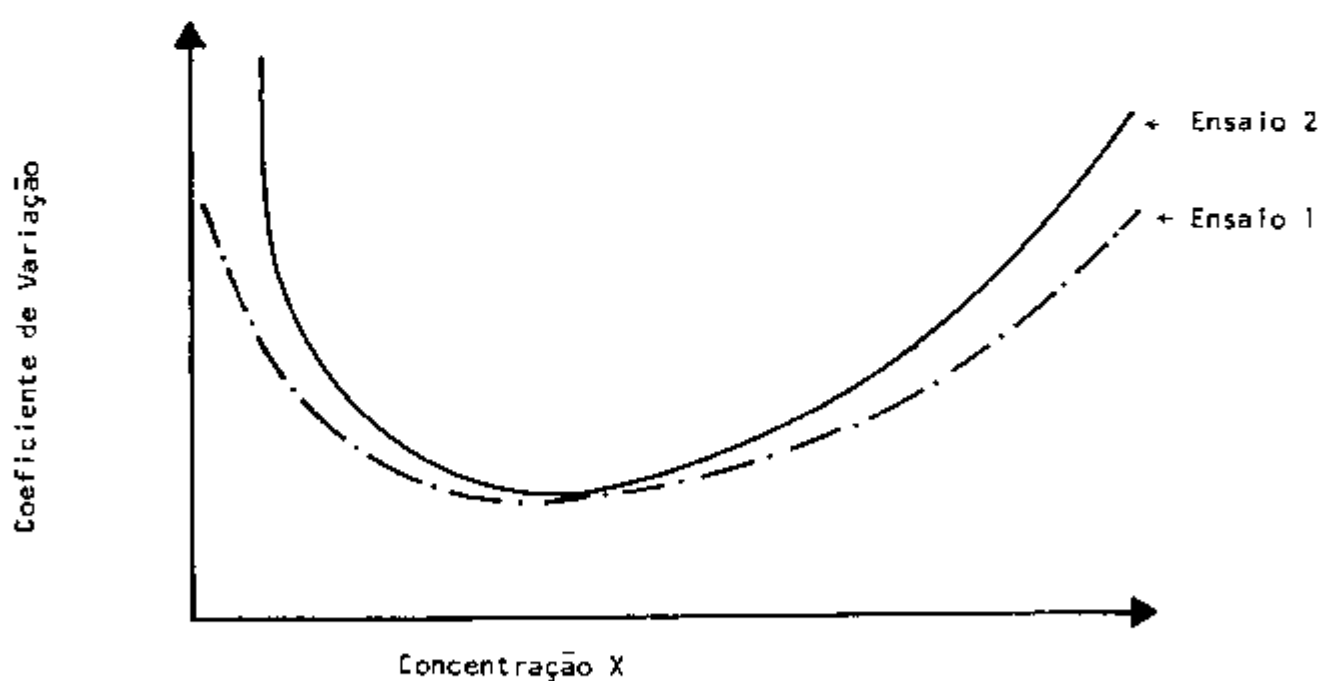


Figura 14 - Perfil de imprecisão de dois radioensaios.

No esquema o ensaio 1 mostra-se mais qualificado do que o ensaio 2. A análise dessas curvas constitui importante ferramenta de justificativa na seleção de parâmetros de otimização metodológica dos radioensaios.

VI - Define-se o perfil de imprecisão intra-ensaio pela associação das funções de X_Y e do C.V.%, conforme exemplo gráfico da figura 14.

2.7. A DOSE MÍNIMA DETECTÁVEL - DMD

A sensibilidade de um método de doseamento é caracterizada pela sua capacidade em discriminar uma medida da outra. Um método é tão mais sensível quanto maior for a sua capacidade de discriminar pequenos valores da medida. A sensibilidade é portanto definida em toda a extensão da curva padrão.

No caso dos radioensaios o analista está particularmente interessado em conhecer a sensibilidade do ensaio ao nível de concentração zero da substância de prova e nesse caso a sensibilidade é denominada de 'Dose Mínima Detectável' ou abreviadamente DMD.

Yallow e Berson^(75,76) definiram essa sensibilidade de fazendo uso da intensidade da inclinação da curva padrão no ponto de concentração zero. Ekins^(14,15) pondera que a DMD deva ser quantificada pela quantidade mínima que seria estatisticamente diferenciável do nível de concentração igual a zero. Rodbard e col.⁽⁵⁸⁾ baseando-se nessa concepção de Ekins descreveu um procedimento no qual utiliza o teste 't' de Student monocaudal na sua formulação.

2.8. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ESPECÍFICA, MÉTODO DO AUTO DESLOCAMENTO

O método do auto deslocamento para a determinação da atividade específica do traçador marcado é considerado o de maior aplicação na metodologia dos ensaios radioligantes. O seu procedimento é extremamente simples. Nele, quantidades crescentes do traçador devem ser incubadas com quantidades constantes do ligante Q, em condições similares às aquelas empregadas para os padrões. Para cada quantidade (radioatividade) do traçador adicionada calcula-se a resposta $Y=B^*/T^*$ ou $Y=B^*/F^*$ e compara-se por interpolação com os respectivos valores dos padrões. A

seguiu-se a regressão linear entre a radioatividade total utilizada na incubação e a respectiva massa estimada, conforme ilustração da figura 15. A intersecção da reta com o eixo das ordenadas (massa) corresponde a massa do traçador radioativo que foi utilizada para definir a curva padrão.

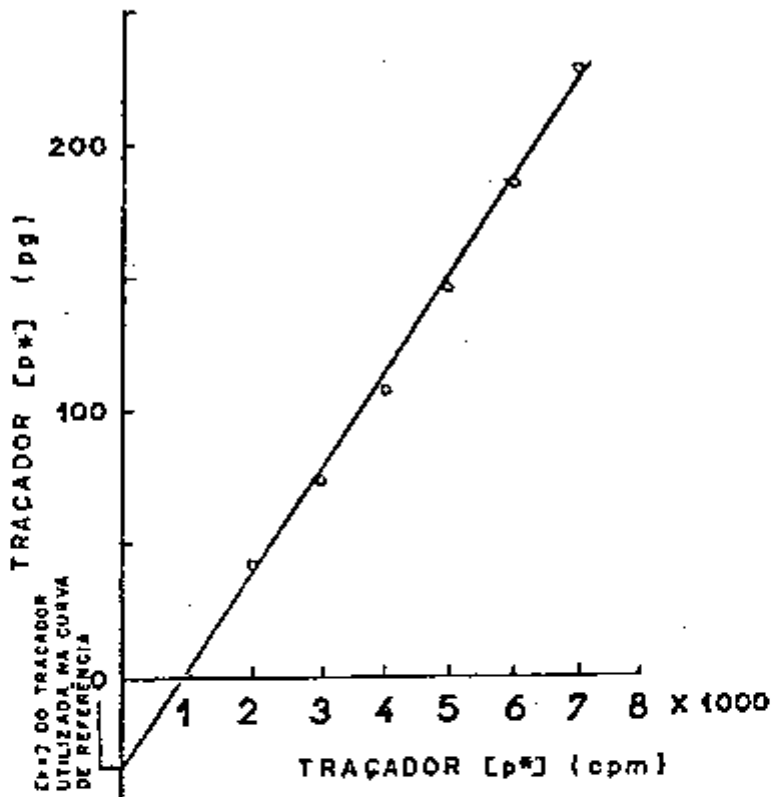


Figura 15 - Esquema gráfico da determinação da atividade específica do traçador radioativo, segundo o método do auto deslocamento descrito por Morris (47)

A atividade específica é calculada pelo valor recíproco do coeficiente angular da reta da figura 15 multiplicando-o por um fator adequado para conversão de unidades.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. EQUIPAMENTOS

- 3.1.1. Empregado na pesagem dos reagentes
Balança analítica marca Mettler, modelo H20T,
Zurique - Suíça.
- 3.1.2. Empregado no processo de radioiodação
Agitador magnético marca Fischer Scientific Co.
modelo 16, USA.
- 3.1.3. Empregados na purificação do substrato marcado
Coluna cromatográfica de dimensão 1 x 30cm (diâmetro, altura)
Coletor de frações automático marca LKB, modelo
Ultrarac 7000, Suécia.
Bomba peristáltica marca LKB modelo 4912A, Suécia.
- 3.1.4. Empregado na separação das frações livres e ligadas ao ligante específico Q (anticorpo)
Centrífuga automática com unidade de refrigeração mantida a quatro graus centígrados com rotor tipo HS-4 série 7654566 da Sorval modelo Superspeed RC-2 B, USA.
- 3.1.5. Empregado na determinação da radioatividade das amostras.
Sistema automático de detecção de radiação com cintilador de NaI(Tl) tipo poço de 3 x 2 polegadas marca Nuclear Chicago, USA.
- 3.1.6. Empregado na liofilização das substâncias
Liofilizador marca Metal-Lux modelo ML-103, Brasil.
- 3.1.7. Empregado no acondicionamento refrigerado das substâncias
Refrigerador Brastemp, Brasil, mantendo-se a temperatura de -20°C no congelador e aproximadamente 4°C na repartição resfriada inferior.

3.1.8. Empregado nos cálculos.
Computador marca IBM/370 modelo 155 instalado no
CPD-Centro de Processamento de Dados do IPEN.

3.2. REAGENTES

3.2.1. Insulina empregada na radioiodação e preparação
das soluções de referências (padrões)
Insulina porcina fornecida por Lilly Research
Laboratories, Indianopolis-USA, acompanhada das
seguintes informações:

Lote nº 615-08E-199	
Potência	+ 25,6 unidades/mg (P>0,95 24,0 a 27,4)
Proinsulina	+ < 0,001%
Glucagon	+ < 0,001%
Água	+ 7%
Zinco	+ 0,6%

A potência foi estimada por bioensaio. A pro
insulina e o glucagon foram determinados por
radioimunoensaio. O nível de zinco foi determi
nado por espectrometria de absorção atômica.
Encontrou-se pequena quantidade de insulina mo
nodesamida(3%) detectada por eletroforese em
gel de poliacrilamida.

Essa insulina, para o fim de marcação foi diluída
conforme se descreve em 3,7 na preparação da solu
ção a.

3.2.3. Tampão fosfato 0,2M pH 7,4
Dihidrogênio fosfato de sódio (NaH₂PO₄.12H₂O)..... 5,28g
.....
Monohidrogênio fosfato de sódio (Na₂HPO₄.12H₂O).
..... 58,02g
Água destilada..... 1 litro

3.2.3. Cloramina T
Cloramina T (C₇H₇ClNNaO₇S.3H₂O), Merck..... 4g
Tampão fosfato de sódio 0,2M pH7,4..q.s.p.1 litro

3.3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS DA RADIOMARCAÇÃO DA INSULINA

A iodação foi efetuada em tubo de ensaio com fundo cônico com dimensões aproximadas de 70 x 10mm, seguindo-se basicamente a técnica de Greenwood e col.⁽²⁶⁾ com pequenas modificações⁽⁵³⁾. Todos os reagentes envolvidos na fase de radiomarcacão foram adicionados ao tubo de reação de modo rápido e sob agitação moderada e contínua mediante a introdução no frasco de marcação de um pequeno fragmento de aço inoxidável mantido em rotação por agitador magnético.

O protocolo da radiomarcacão foi o seguinte:

Tampão fosfato 0,2 M.....	25µl
Insulina porcina descrita em 3.2.11.....	5µg
Solução Na ¹²⁵ I (1mCi)	1 a 3µl
Cloramina T (4mg/ml)	25µl
Aguarda-se por aproximadamente 5 a 10 segundos.	
Tiossulfato de sódio (2,4mg/ml)	30µl
Iodeto de potássio (10mg/ml)	50µl
Soro albumina bovina (25mg/ml)	50µl

A seguir, a mistura da reação foi imediatamente transferida para o topo da coluna cromatográfica preenchida com gel de sephadex G-50 (fino) com o auxílio de uma pipeta do tipo Pasteur.

3.4. PREPARO DA COLUNA DE SEPHADEX E PURIFICAÇÃO DA INSULINA IODADA

No preparo da coluna, o gel de sephadex foi entumecido primeiramente em água destilada por aproximadamente uma hora e meia em banho maria mantido à 37°C. Após esse tempo, de cantou-se a água e adicionou-se tampão fosfato mantendo-se novamente o período de uma hora e meia no banho maria à 37°C. Esse último procedimento foi repetido por mais duas vezes. Logo a seguir a coluna foi devidamente preenchida com o Sephadex assim entumecido.

Manteve-se a vazão da coluna com a bomba peristáltica em 0,1 ml/minuto com o efluente tampão fosfato.

Alguns minutos antes da introdução da mistura da marcação, adicionou-se no topo da coluna um mililitro da solução, contendo o soro albumina bovina (25mg/ml) a fim de evitar danificações e adsorção do substrato marcado às paredes da coluna. Imediatamente após a adição da mistura da marcação na coluna iniciou-se a coleta das frações de um mililitro, utilizando-se o coletor automático LKB com o fluxo mantido com tampão fosfato e com a bomba peristáltica. O compartimento refrigerado da unidade LKB foi mantido à 4°C. Colhiam-se 50 tubos ao todo. De cada um desses frascos alíquotou-se 50 microlitros para a análise do nível de radioatividade a fim de traçar o perfil do radiocromatograma. Após a identificação dos tubos que continham a insulina-¹²⁵I na forma indene diluiu-se o conteúdo desses tubos em tampão veronal. Procurou-se manter o produto final de modo a se obter a radioatividade volumétrica de aproximadamente $2,4 \times 10^6$ cpm/ml (eficiência global de contagem do equipamento de 80%). Tomaram-se várias alíquotas de um ml dessa solução, depositando-as em frascos do tipo penicilina de 15ml de capacidade para a subsequente fase de liofilização.

3.5. OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DO LIGANTE Q (ANTISORO)

O animal de experimentação escolhido foi a cobaia em função de permitir alto título de antisoro, adequada volemia e facilidade em sua manutenção em biotério.

A primeira dose consistiu da inoculação de 0,5ml da solução:

Coadjuvante completo de Freund (Difco) 0,5ml
 Insulina porcina Monotard 20 unidades 0,5ml

injetada na região da pata do referido animal⁽³⁾.

Para as subseqüentes doses de reforços injetou-se 0,5ml da solução:

Coadjuvante incompleto de Freund (Difco)... 0,5ml
 Insulina Monotard 20 unidades 0,5ml

As doses de reforços eram administradas a cada quinze dias aproximadamente. Após a quinta dose de reforço, amostrava-se o sangue de cada cobaia por punctura cardíaca. O

sangue era mantido por uma a duas horas em banho maria à 37°C e a seguir centrifugado a aproximadamente 1000g. O sobrenadante (soro) era mantido à temperatura de -20°C. A amostragem por punctura cardíaca era repetida após uma semana de cada nova dose de reforço, selecionando-se para os posteriores experimentos o antisoro que apresentou o mais alto título segundo o critério já mencionado no item 2.2. Após estabelecido o título do antisoro, alíquotava-se dez µl do soro e efetuava-se uma diluição que fosse dez vezes mais concentrada do que aquela indicada. A seguir tomavam-se várias alíquotas dessa solução concentrada do antisoro e as depositavam em frascos do tipo penicilina de 15ml para a posterior fase de liofilização.

3.6. PREPARAÇÃO DA MISTURA DE SOROS HUMANO ISENTO DE INSULINA. SORO "STRIP".

Na preparação dos soros de referências (também de nominados de soros padrão) utilizou-se uma mistura de soros humanos, especialmente selecionados de pessoas consideradas normais, colhidos em jejum na parte da manhã.

A técnica de extração da insulina endógena presente nessa mistura é a mesma descrita por Heyns⁽²⁶⁾.

Para cada litro de soro humano adicionou-se 100g de carvão Norit A, deixando-se em agitação com barras magnéticas por duas horas. Decorrido esse tempo, separava-se o carvão mediante centrifugação da mistura a 4000 rpm. Quando necessária a operação centrifugação e decantação foi repetida por mais uma ou duas vezes.

3.7. PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES SÉRICAS CONCENTRADAS DE INSULINA

Solução a

Preparada a partir da insulina porcina cristalizada, mediante o seguinte protocolo:

Pesar 800 µg da insulina porcina cristalizada.

Adicionar 50 µl da solução de HCl 1 N.

Completar volume para 800 µl com água destilada.
Concentração final = 25×10^6 µUI/ml.

Solução β

Aliquotou-se 5µl da solução α e diluiu-se em 12,5ml do soro 'strip'. A concentração final da solução β corresponde a 10^4 µUI/ml.

3.8. PREPARAÇÃO DOS SOROS DE REFERÊNCIAS PARA DEFINIR A CURVA DE DOSE RESPOSTA (CURVA PADRÃO)

Soro referência 200 µUI/ml

Solução β 200µl
Soro 'strip' q.s.p... 10ml

Soro referência 100 µUI/ml

Solução β 100µl
Soro 'strip' q.s.p... 10ml

Soro referência 50 µUI/ml

Solução β 50µl
Soro 'strip' q.s.p... 10ml

Soro referência 25 µUI/ml

Solução β 25µl
Soro 'strip' q.s.p... 10ml

Soro referência 10 µUI/ml

Solução B 10µl
Soro 'strip'q.s.p... 10ml

Soro referência 5 µUI/ml

Solução referência 10µUI/ml... 5ml
Soro 'strip'q.s.p... 10ml

Soro referência 0 μ UI/ml

Utilizou-se o próprio soro 'strip'

A seguir dividiu-se o conteúdo de cada frasco em alíquotas de 1ml (2ml para o frasco do soro referência de 0 μ UI/ml) e liofilizaram-se todas essas alíquotas em frascos tipo penicilina de 6ml de capacidade.

3.9. RECONSTITUIÇÃO DOS COMPONENTES LIOFILIZADOS

Quando necessário, os componentes que sofreram processo de liofilização foram reconstituídos segundo esquema abaixo:

Frascos	Volume de água bidistilada a adicionar
Insulina- ¹²⁵ I	12 ml
Soro anti-insulina	12 ml
Soro referência 0 μ UI/ml	2 ml
Demais soros referência	1 ml

3.10. CONTROLE DA ESTABILIDADE DO MEDIDOR DE RADIOATIVIDADE .
TESTE DO QUI-QUADRADO

Mensuraram-se duas amostras repetitivamente por 50 vezes mantendo-se as mesmas condições de calibração que posteriormente seria utilizada nas demais medidas.

A primeira amostra correspondeu a contagem de um tubo de contagem sem nenhum material radioativo, portanto indicando o nível de ruído de fundo ("background").

A segunda amostra consistiu da radioatividade de um dos tubos de reação do radioensaio contendo aproximadamente 20.000 contagens por minuto (cpm).

Os resultados relativos a essas medidas foram submetidos ao teste estatístico denominado de qui-quadrado⁽²³⁾.

Aceitou-se que o equipamento medidor de radiação estava em condições de uso quando a probabilidade de se encontrar o valor calculado do qui-quadrado (X^2) se achava no intervalo de $P(X^2) = 0,05$ a $P(X^2) = 0,95$. Simultaneamente, exigia-se que os resíduos (contagem observada menos a média das respectivas contagens) estivessem aleatoriamente dispersos em disposição gráfica (avaliação visual do analista).

3.11. PROTOCOLO GERAL DO RADIOIMUNOENSAIO DA INSULINA

Encontra-se esquematizado na figura 16 o protocolo geral do radioimunoensaio da insulina adotado neste trabalho.

Para ulterior fase de relato dos resultados experimentais, separou-se o protocolo da figura 16 em colunas e linhas. As colunas foram identificadas de I a IV, enquanto as linhas foram enumeradas de 1 a 13.

3.12. PROCESSAMENTO GERAL DOS DADOS EXPERIMENTAIS. O CÓDIGO COMPUTACIONAL GARLA

A fim de processar os dados numéricos dos radioensaios formulou-se um sistema computacional específico redigido em Fortran IV^(22,27). As instruções pertinentes a esse sistema encontram-se documentadas na programoteca do CPD-Centro de Processamento de Dados do IPEN-Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, sendo cognominado arbitrariamente de GARLA para fins de sua identificação naquela programoteca⁽²⁵⁾

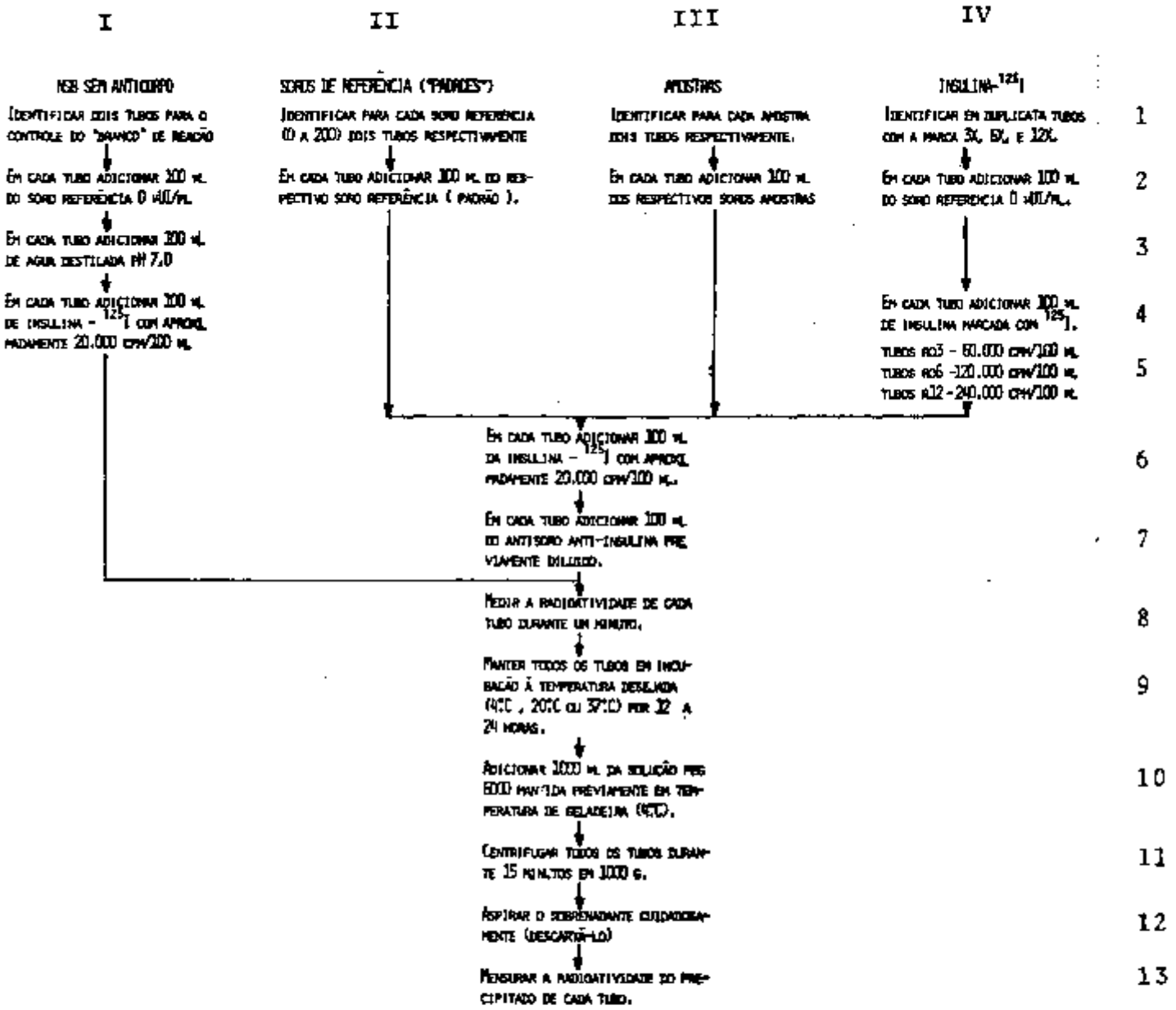


Figura 16- Protocolo experimental do radioimunoensaio da insulina.

4, RESULTADOS4.1. TESTES DO QUI-QUADRADO.

A tabela VI mostra os resultados de 50 medições do nível de ruído de fundo ("background") do equipamento utilizado em nossos experimentos.

TABELA VI

Resultados para o teste do X^2 para o medidor de radioatividade. Cada valor relacionado corresponde a contagem acumulada de ruídos em um minuto.

:							
QUI							
:							
68	102	99	90	86	86	93	
104	94	65	84	93	100	83	
99	68	85	86	103	71	81	
102	99	91	80	89	92	83	
90	98	79	92	91	108	79	
86	99	93	81	105	83	85	
99	94	89	83	83	86	78	
98							
:							
:	FIM DA ENTRADA DE DADOS						

A tabela VII é impressa pelo sistema GARLA e corresponde a uma reorganização das informações contidas na tabela VI, acrescentando-se os respectivos resíduos (contagem da *i*-ésima observação subtraindo-se o valor médio das contagens). Resíduos com sinais aleatoriamente alternados indicam boa qualidade do medidor de radioatividade.

A figura 17 dispõe graficamente os valores dos resíduos da tabela VII contra o número da observação. No topo dessa figura apresenta-se o valor médio das 50 observações (contagens), o desvio padrão segundo a distribuição de Poisson⁺, o valor do desvio padrão da distribuição de Gauss⁺⁺, o valor de X^2 e a probabilidade de ocorrência do respectivo valor do qui-quadrado.

Da análise dos dados da tabela VII e figura 17 aceitou-se que o equipamento satisfaz as exigências da prova.

A tabela VIII mostra os resultados do teste do X^2 relativo as medidas de uma mesma amostra com nível de radioatividade próximo daquele utilizado nos tubos do radioensaio. A tabela IX mostra a magnitude dos resíduos e a alternância aleatória do sinal dos resíduos. A figura 18 ilustra graficamente a dispersão dos resíduos. Nessa figura mostra-se também o valor médio das contagens, desvio padrão de Poisson, de Gauss, o valor do X^2 calculado e sua probabilidade. À semelhança do teste anterior considerou-se que o equipamento estava em adequadas condições de uso.

4.2. AVALIAÇÃO DO PERFIL RADIOCROMATOGRÁFICO DA INSULINA-¹²⁵I

A tabela X mostra o esquema de entrada dos dados ao sistema GARLA do perfil radiocromatográfico da insulina-¹²⁵I utilizada nos ensaios posteriores.

+ O desvio padrão de Poisson é definido como a raiz quadrada da média das contagens.

++ O desvio padrão mencionado é calculado segundo a expressão:

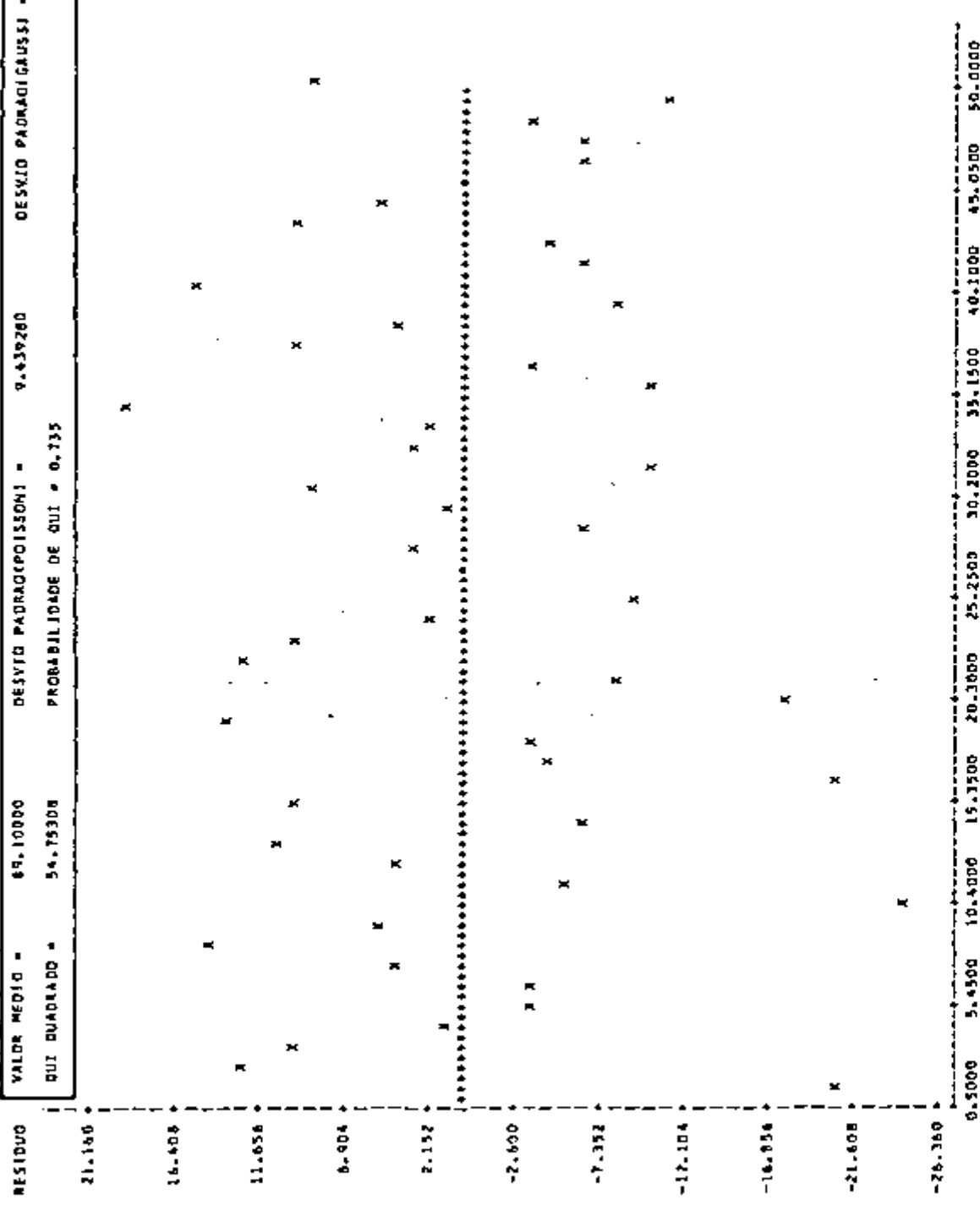
$$\text{desvio padrão} = \sqrt{\frac{(\text{cada observação} - \text{média das observações})^2}{\text{número total de observações} - \text{um}}}$$

TABELA VII

Análise do χ^2 . Avaliação das magnitudes dos resíduos e da aleatoriedade dos seus sinais (\pm).

NUMERO OBS	CONTAGEM OBSERVADA	RESIDUO
1	68.0000000	-21.1000000
2	102.0000000	12.9000000
3	99.0000000	9.9000000
4	90.0000000	0.9000000
5	86.0000000	-3.1000000
6	86.0000000	-3.1000000
7	93.0000000	3.9000000
8	104.0000000	14.9000000
9	94.0000000	4.9000000
10	65.0000000	-24.1000000
11	84.0000000	-5.1000000
12	93.0000000	3.9000000
13	100.0000000	10.9000000
14	83.0000000	-6.1000000
15	99.0000000	9.9000000
16	68.0000000	-21.1000000
17	85.0000000	-4.1000000
18	86.0000000	-3.1000000
19	103.0000000	13.9000000
20	71.0000000	-18.1000000
21	81.0000000	-8.1000000
22	102.0000000	12.9000000
23	99.0000000	9.9000000
24	91.0000000	1.9000000
25	80.0000000	-9.1000000
26	89.0000000	-0.1000000000 00
27	92.0000000	2.9000000
28	83.0000000	-6.1000000
29	90.0000000	0.9000000
30	98.0000000	8.9000000
31	79.0000000	-10.1000000
32	92.0000000	2.9000000
33	91.0000000	1.9000000
34	106.0000000	18.9000000
35	79.0000000	-10.1000000
36	86.0000000	-3.1000000
37	99.0000000	9.9000000
38	93.0000000	3.9000000
39	81.0000000	-8.1000000
40	105.0000000	15.9000000
41	83.0000000	-6.1000000
42	85.0000000	-4.1000000
43	99.0000000	9.9000000
44	94.0000000	4.9000000
45	89.0000000	-0.1000000000 00
46	83.0000000	-6.1000000
47	83.0000000	-6.1000000
48	86.0000000	-3.1000000
49	78.0000000	-11.1000000
50	98.0000000	8.9000000

VALOR MEDIO = 89.10000 DESVIO PADRAO(COISSON) = 9.439280 DESVIO PADRAO(GAUSS) = 9.978037
 QUI QUADRADO = 54.75308 PROBABILIDADE DE QUI = 0.735



X -> PONTOS EXPERIMENTAIS. * -> VALORES CALCULADOS.
 NUM. OBSERVACAO
 SOBREPOSTICAO DE 2 OBSERVACOES

Figura 17 - Análise gráfica dos resíduos contidos na tabela VII. A aleatoriedade espacial dos resíduos sugere boa qualidade do detector.

TABELA VIII

Resultados experimentais das medidas da radioatividade de uma mesma amostra para fins do teste do qui-quadrado

QUI
:

19854	20274	20113	20075	19967	19859	20227
20062	20027	19912	20013	20193	20320	19950
20371	20104	19960	19869	20039	19809	19850
20086	19969	19845	20144	19984	19941	20278
19965	19891	19971	20004	19941	19952	19891
20132	20237	19981	19772	19892	19983	20176
19922	20022	20100	19982	20181	20086	20336
20026						

:
: FIM DA ENTRADA DE DADOS

Na tabela X a palavra ANACROM indica ao sistema GARLA que os dados a seguir representam o perfil radiocromatográfico. A palavra AJUSTE corresponde a uma das opções de processamento de dados significando que o ajuste deve ser efetuado a partir das indicações pré-estabelecidas do número de picos do radiocromatograma e das estimativas dos seus parâmetros.

A figura 19 mostra o perfil radiocromatográfico experimental (pontos marcados com 'X') e calculado (pontos marcados com '+') a partir do uso da combinação de três funções gaussianas.

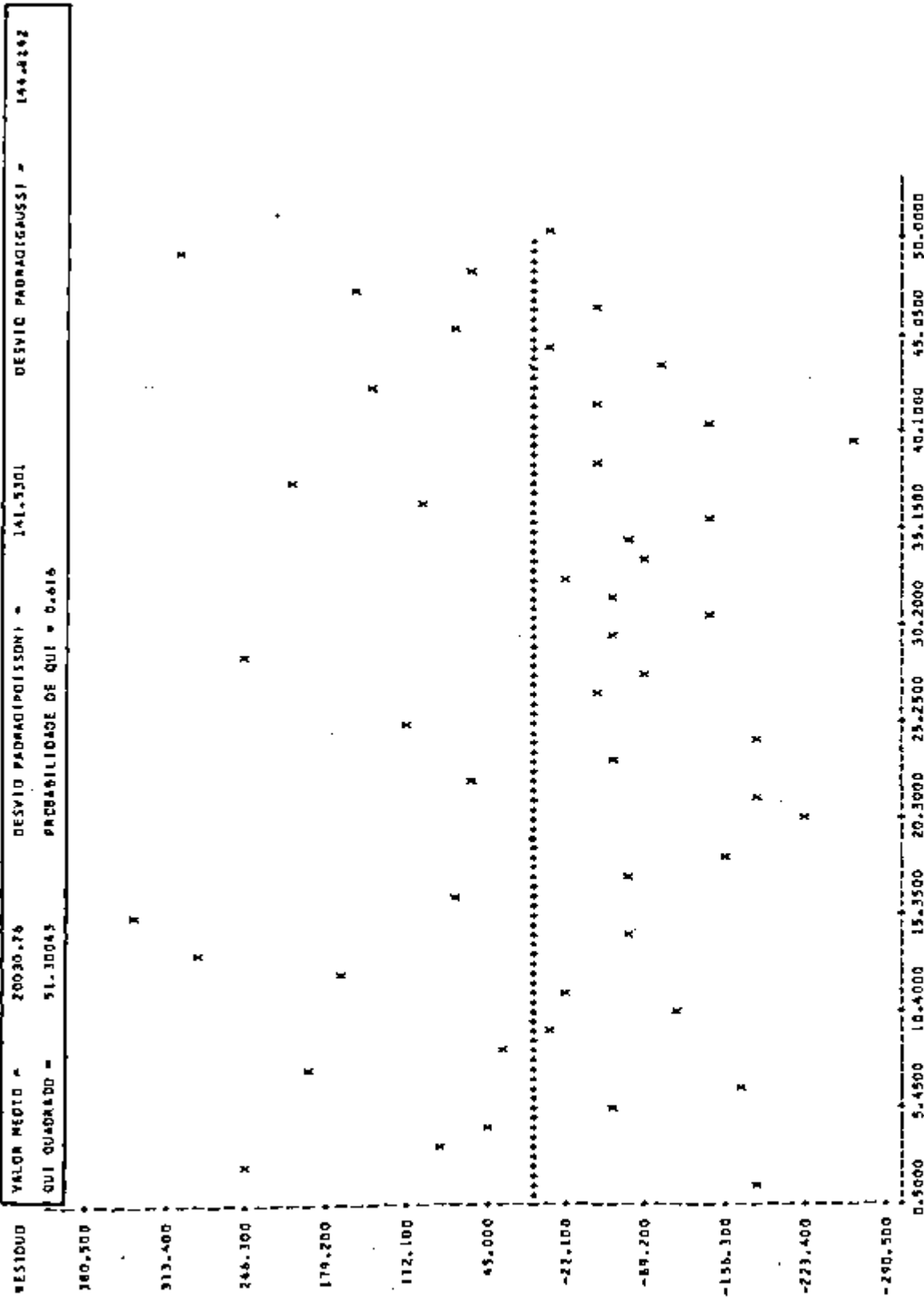
Na tabela XI reúnem-se inicialmente os dados da análise de variância para apreciação da qualidade estatística do ajuste. A seguir apresenta-se os parâmetros estimados no ajuste com seus respectivos erros padrão assintóticos. O parâmetro 'ALTURA' representa a atividade máxima do pico cromatográfico (no perfil foram encontrados três) com posição central indicada pelo parâmetro 'CENTRO'. O parâmetro 'SIGMA' está relacionado com a largura do respectivo pico cromatográfico.

A fim de complementar as informações sobre o perfil radiocromatográfico, o sistema GARLA fornece também a largura a meia altura de cada pico com seu erro padrão assintótico.

TABELA IX

Análise do χ^2 . Avaliação das magnitudes dos resíduos e da aleatoriedade dos seus sinais (\pm).

NUMERO OBS	CONTAGEM OBSERVADA	RESIDUO
1	19854.0000	-176.760000
2	20274.0000	243.240000
3	20113.0000	82.2400000
4	20075.0000	44.2400000
5	19967.0000	-63.7600000
6	19859.0000	-171.760000
7	20227.0000	196.240000
8	20062.0000	31.2400000
9	20027.0000	-3.76000000
10	19912.0000	-118.760000
11	20013.0000	-17.7600000
12	20193.0000	162.240000
13	20320.0000	289.240000
14	19950.0000	-80.7600000
15	20371.0000	340.240000
16	20104.0000	73.2400000
17	19960.0000	-70.7600000
18	19869.0000	-161.760000
19	20039.0000	8.24000000
20	19809.0000	-221.760000
21	19850.0000	-180.760000
22	20086.0000	55.2400000
23	19969.0000	-61.7600000
24	19845.0000	-185.760000
25	20144.0000	113.240000
26	19984.0000	-46.7600000
27	19941.0000	-89.7600000
28	20278.0000	247.240000
29	19965.0000	-65.7600000
30	19891.0000	-139.760000
31	19971.0000	-59.7600000
32	20004.0000	-26.7600000
33	19941.0000	-89.7600000
34	19952.0000	-78.7600000
35	19891.0000	-139.760000
36	20132.0000	101.240000
37	20237.0000	206.240000
38	19981.0000	-49.7600000
39	19772.0000	-258.760000
40	19892.0000	-138.760000
41	19983.0000	-47.7600000
42	20176.0000	145.240000
43	19922.0000	-108.760000
44	20022.0000	-8.76000000
45	20100.0000	69.2400000
46	19982.0000	-48.7600000
47	20181.0000	150.240000
48	20086.0000	55.2400000
49	20336.0000	305.240000
50	20026.0000	-4.76000000



NUM. OBSERVACAO

X -> PONTOS EXPERIMENTAIS, * -> VALORES CALCULADOS,

SUBREPOSICAO DE 1 OBSERVACAO

Figura 18 - Análise gráfica dos resíduos contidos na tabela IX. A aleatoriedade espacial dos resíduos sugere boa qualidade do detector.

TABELA X

Resultados e entrada de dados para a análise do perfil do radiocromatograma da insulina-¹²⁵I, utilizada como traçador.

```

ANACROM -> MÓDULO DO SISTEMA GARLA QUE PROCESSA DADOS DE RADIOCRO-
:          TOGRAMA
:
TEXTO PARA IDENTIFICAÇÃO DO ENSAIO
* RADIOCROMATOGRAMA DA INSULINA *
:
AJUSTE -> INDICAÇÃO AO SISTEMA DE QUE O ANALISTA QUER FAZER
:          O AJUSTE DOS DADOS SEM PRÉVIA PESQUISA DAS CARACTE-
:          RÍSTICAS DOS PICOS CROMATOGRAFICOS POIS SERÃO FORNE-
:          AS ESTIMATIVAS RESPECTIVAS
:
DADOS -> RESULTADOS EM CONTAGENS POR 0,1 MINUTO/50 MICROLITROS
:          DE CADA TUBO COLETADO
:
DADOS
123 70 87 79 58 19011 56920 111014 141216 115459 81612 106004
273039 622493 1042855 1267433 1116959 712589 329636 110519 26873
4890 5124 62761 366678 895081 924107 398153 71927 5473 203
84 78 96 62 82 75 56 104 85
:
INTERVALO ONDE SE ENCONTRAM OS PICOS E O NÚMERO DE PICOS
:
PRIMEIRO TUBO      ÚLTIMO TUBO      NÚMERO DE PICOS NO INTERVALO
:-----
:          6              36              3
:
ESTIMATIVA DA POSIÇÃO CENTRAL DO PICO E DA SUA LARGURA A MEIA ALTURA
:          -----
:                  9                  6
:                  17                 3
:                  26                 2
:
: FIM DA ENTRADA DE DADOS

```

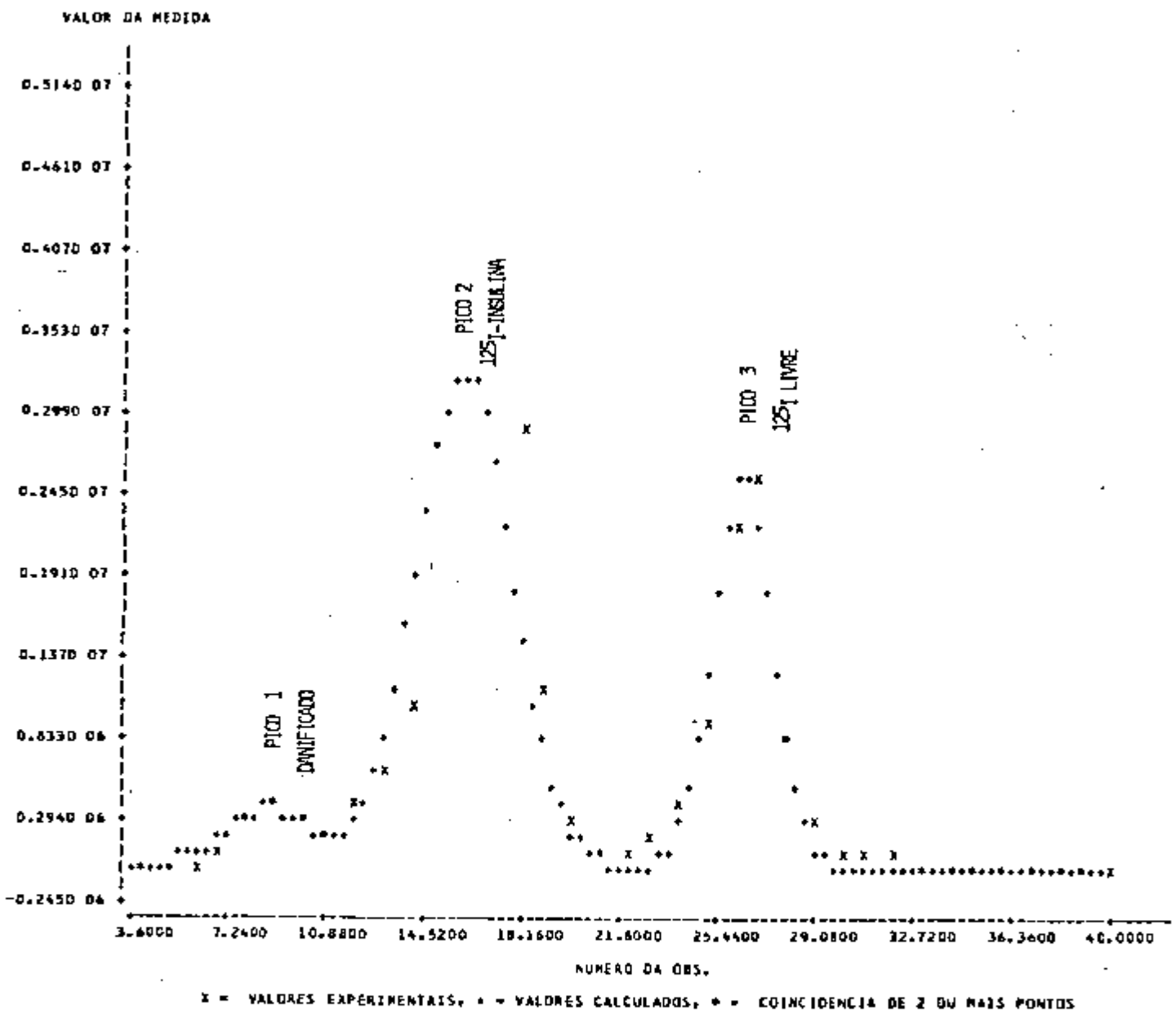


Figura 19 - Representação gráfica do radiocromatograma da insulina-¹²⁵I

TABELA XI

Avaliação comparativa entre os valores experimentais e calculados do radiocromatograma da insulina- ^{125}I e análise da aleatoriedade dos resíduos.

OBS.	VALOR OBSERVADO	VALOR CALCULADO	RESIDUO
4	79.	2027.	-1948.
5	98.	12588.	-12490.
6	5569.	53454.	-47885.
7	123476.	151394.	-27918.
8	331120.	285165.	45955.
9	355787.	357705.	-1918.
10	260665.	304587.	-43922.
11	229924.	212243.	17681.
12	386521.	273873.	112648.
13	584752.	699180.	-114428.
14	1008483.	1590311.	-581828.
15	2734008.	2667929.	66079.
16	4849255.	3245396.	1603859.
17	509157.	2859088.	-2349931.
18	2933294.	1823983.	1109311.
19	1197692.	842665.	355027.
20	248519.	281951.	-33432.
21	35098.	68369.	-33271.
22	31095.	12545.	18550.
23	232049.	15783.	216266.
24	358708.	178628.	180080.
25	938218.	972175.	-33961.
26	2193715.	2294371.	-100656.
27	2524645.	2345614.	179031.
28	834013.	1038771.	-204758.
29	306793.	199322.	107471.
30	115044.	16633.	98411.
31	50281.	674.	49607.
32	25852.	88.	25764.
33	14012.	78.	13934.
34	7940.	78.	7862.
35	5296.	78.	5218.
36	3602.	78.	3524.
37	3416.	78.	3338.
38	1452.	78.	1374.
39	612.	78.	534.
40	493.	78.	415.

TABELA XI

Análise estatística do ajuste do perfil do radiocromatograma ao modelo matemático constituído pela combinação de três funções gaussianas.

INFORMACOES ESTADISTICAS MINIMOS QUADRADOS NAO LINEAR
 MODELO SOMA DE GAUSSIANAS

FONTE	G.L.	SOMA DOS QUADRADOS	QUADRADOS MEDIOS
MODELO	9	0.462692840 14	0.514050710 11
RESIDUO	28	0.100141190 14	0.357679480 14
TOTAL INAD CORRIGIDO	37	0.562834030 14	
TOTAL ICORRIGIDO	36	0.46379090 14	

PARAMETRO	VALOR ESTIMADO	ERRO PADRAO ASSINTOTICO
PICO 1	ALTURA	356863.2916
	CENTRO	9.048786030
	SIGMA	1.563991EB9
PICO 2	ALTURA	3251340.363
	CENTRO	16.10735090
	SIGMA	1.760184476
PICO 3	ALTURA	2576264.444
	CENTRO	26.52640263
	SIGMA	1.093278159

AMPLURA & 1/2 ALT.	ERRO PADRAO ASSINT.	AREA	ERRO PADRAO ASSINT.	FWHM/CENTRO	ERRO PADRAO ASSINT.
		(CPM)	(CPM)		
3.681197824	8.634588952	1399028.525	3113727.619	0.4068167610	0.7387902427
4.142982214	0.6277704821	14345346.41	2847771.072	0.2972108512	0.39198400960-01
2.573271173	0.5550977120	7060112.385	2074340.185	0.57007921030-01	0.20944611560-01

INFORMACOES SOBRE AS AREAS

NUM. PICO	AREA (CPI)	ERRO PADRAO ASSINT.
1	6.134882559	13.71247861
2	62.50560538	10.00464685
3	30.95931202	11.11248436

co, a área integral de cada pico e a indicação do nível de resolução do sistema cromatográfico em definir cada região do perfil, parâmetro esse definido como 'FWHM/CENTRO' (FWHM é uma abreviação inglesa de 'full width half maximum').

A fim de avaliar a percentagem do radiotraçador contida em cada pico, o sistema GARLA imprime para cada pico a área percentual correspondente, com o respectivo erro padrão assintótico.

A tabela XII mostra os valores numéricos comparados entre o dado experimental (valor observado) versus o valor calculado a partir do uso da combinação de três componentes de funções gaussianas. Nesta tabela mostram-se os respectivos resíduos (valor observado - valor calculado).

4.3. RESULTADOS DA ANÁLISE DA CURVA DE DOSE-RESPOSTA DE UM RADIOIMUNOENSAIO TIPO - INSULINA IMUNORREATIVA, ENTRADA DOS DADOS PARA O PROGRAMA GARLA

Neste tópico são apresentados os diferentes resultados obtidos no desenvolvimento convencional de um radioensaio-tipo, a saber: doseamento de insulina imunorreativa, cujo protocolo experimental é descrito na figura 16.

Objetivando coletar dados que permitam aquilatar da influência da temperatura sobre os diferentes parâmetros, realizaram-se três ensaios, iguais no todo, excessão feita da temperatura de incubação que foi de 4°C, 20°C e 37°C. Conseqüentemente, quando da apresentação dos resultados experimentais, serão oferecidos três conjuntos, cada qual correspondente a uma temperatura.

As tabelas XIII, XIV e XV ilustram os resultados obtidos em cada um dos radioensaios e constituem a própria entrada de dados e informações fornecidas ao programa GARLA.

As palavras em destaque servem para identificar ao programa GARLA a natureza dos dados subseqüentes.

Propositamente, subdividiram-se em quatro partes aquelas tabelas (quadros A, B, C e D) para maior facilidade de explanação dos diferentes conjuntos de dados.

4.3.1. DADOS DA CURVA PADRÃO - QUADRO (A)

Nesse quadro, a palavra 'CURP' indica ao programa GARLA que os dados e as informações abaixo encontradas pertencem ao módulo de cálculos da curva padrão (ou dose-resposta).

Os dados experimentais contidos no quadro A das tabelas XIII, XIV e XV foram obtidos pelo cumprimento das fases experimentais do protocolo experimental da figura 16, coluna (III), linhas 8 e 13 e representam respectivamente:

- a) concentrações em unidades $\mu\text{UI/ml}$ dos soros de referência (de 0 a 200 $\mu\text{UI/ml}$)
- b) radioatividade verificada na fração precipitada (linha 13 do protocolo, figura 16)
- c) radioatividade total adicionada em cada tubo de reação (linha 6 do protocolo, figura 16).

4.3.2. DADOS DAS AMOSTRAS DOSEADAS - QUADRO (B)

Cada amostra foi enumerada de AM01 a AM43. A finalidade da inclusão dessas amostras, neste trabalho, é o de fornecer maior quantidade de dados ao sistema GARLA para a avaliação da precisão intra-ensaio das dosagens.

Os dados experimentais, ao lado de cada identificação de amostra, têm a mesma procedência daqueles indicados em b e c do item 4.3.1.

4.3.3. DADOS PARA O CÁLCULO DA ATIVIDADE ESPECÍFICA - QUADRO C

Os dados aqui registrados são provenientes da coluna (figura 16), linhas 3, 5, 6 e 13. Esses dados servem para o cálculo da atividade específica, segundo os procedimentos do auto-deslocamento descrito por Morris⁽⁴⁷⁾.

O fator 0,140766 serve para transformar o resultado da atividade específica de $\text{cpm}/(\mu\text{UI/ml})$ para a unidade de Curie/grama.

TABELA XIII

Resultados experimentais (e entrada de dados para o sistema GARLA) relativos ao ensaio realizado à temperatura de 4°C (geladeira)

INSULINA ENSAIO TEMPERATURA 4 C				
CURP -> CURVA DOSE RESPOSTA				
TEXTO PARA IDENTIFICACAO DO ENSAIO				
ENSAIO INSULINA 4 C				
TOTAIS CONTADOS INDIVIDUALMENTE				
UNIDADE DE CONCENTRACAO ADOPTADA				
MICROUNIDADE/ML				
PADROES	COMPLEXADO	FR-TOTAIS		
(UUI/ML)	(CPN)	(CPN)		
0	9546	9953	19626	19958
5	8875	9073	19702	19429
10	7706	7884	19505	19655
25	5595	5882	20240	20242
50	3708	3771	20003	19995
100	2708	2851	15699	19928
200	1835	1925	20084	20456
AMOSTRAS DOSEADAS NESSE ENSAIO				
AM01	5312	5718	20025	19937
AM02	5885	6299	20284	20063
AM03	7359	7633	19876	19907
AM04	8281	7916	20004	20525
AM05	8998	9792	20134	20024
AM06	11005	10468	20014	20143
AM07	7677	7653	19832	19890
AM08	7017	7241	20136	19813
AM09	8030	7951	20019	20124
AM10	7441	7785	20171	19878
AM11	8385	8623	19704	19765
AM12	6422	6320	20030	20225
AM13	9596	10434	19805	19908
AM14	8390	8235	19959	19991
AM15	4128	4951	15901	20226
AM16	5192	6422	20107	19758
AM17	6227	6790	15983	20096
AM18	4917	4606	20186	15772
AM19	9727	9961	20148	20240
AM20	10912	10875	19963	20405
AM21	10266	9908	20273	19613
AM22	8034	7176	20214	20499
AM23	3704	3908	15889	19807
AM24	8602	8667	20032	15881
AM25	5051	5018	20263	19752
AM26	3684	3934	19919	19995
AM27	5790	5784	19618	20875
AM28	3241	3612	19552	20036
AM29	3932	3953	19798	20063
AM30	3788	4293	20311	20462
AM31	3912	4417	19891	15673
AM32	2694	2791	20103	20302
AM33	4347	3974	20245	20187
AM34	2946	2853	15817	20162
AM35	3214	3118	20074	15912
AM36	3233	3241	15876	20544
AM37	4666	4514	19878	20278
AM38	2774	2952	19817	20228
AM39	8061	8306	20789	20009
AM40	4145	4172	19252	20051
AM41	2712	2898	19736	20279
AM42	2454	2356	20082	20021
AM43	2425	2508	20185	20076
ATESP - MODULO QUE CALCULA A ATIVIDADE ESPECIFICA				
R03K	18238	17546	60750	58257
R06R	19700	20449	119932	120381
R12X	21795	23674	232132	239693
FATOR (RESULTADO EM CURIE/GRAMA)				
.140766				
SCAT				
FATOR (RESULTADOS EM MOL E LITROS)				
2.22222E-12				
ESTIMATIVAS	KELITROS/MOLI	QIPOL/LITRO		
	20069	20E-12		
	.013			
FIM DA ENTRADA DE DADOS DO ENSAIO INSULINA				

A

B

C

D

Resultados experimentais (e entrada de dados para o sistema GARLA) relativos ao ensaio realizado à temperatura de 20°C.

***** #RADIENSAO DA INSULINA # TEMPERATURA=20 C *****						
: CURVA - CURVA DE DOSE RESPOSTA						
: TEXTO PARA IDENTIFICACAO DO ENSAIO						
#RADIENSAO DA INSULINA # TEMPERATURA=20 C						
: UNIDADE DE CONCENTRACAO ADOPTADA						
MICROUNIDADE/ML						
: TOTAL DE RADIOATIVIDADE/TUBO (PP) CONTADO						
INDIVIDUALMENTE, ISTO E, TUBO POR TUBO						
:						
	RADIOATIVI- DADE NO COMPLEXADO (CPN)	RADIOATIVIDADE ADICIONADA PP # TOTAIS (CPN)				
PADROES			A			
U/ML						
0	8472	8983			20145	19934
5	8193	8194			20002	19884
10	6526	6639			19827	19864
25	4855	4965			20135	20752
50	3598	3817			20053	20244
100	2415	2827			19551	19911
200	2083	1895			19661	19308
: AMOSTRAS DOSEADAS NESSE ENSAIO						
			B			
AMD1	5259	5342			20463	20173
AMD2	4694	5357			20026	20226
AMD3	6935	6685			19943	19540
AMD4	6674	8014			20088	19984
AMD5	8278	8820			19655	20504
AMD6	8168	7950			20251	19825
AMD7	7009	7134			20205	19849
AMD8	7351	7352			19657	19716
AMD9	7481	7472			20213	20504
AM10	5614	6385			20086	20541
AM11	7423	7946			19397	19830
AM12	6069	5891			19785	19828
AM13	7749	7141			20284	20347
AM14	6407	7110			20408	19071
AM15	4951	4823			19875	19526
AM16	6173	6618			19118	20282
AM17	5062	5487			19877	19666
AM18	4347	4365			20262	20053
AM19	9328	8586			20328	20856
AM20	9533	9324			19708	19589
AM21	8288	7844			20529	20166
AM22	5820	8282			20361	20141
AM23	3470	3733			20168	19655
AM24	8554	7024			19963	19164
AM25	4759	4956			20193	20010
AM26	4203	4233			19589	20089
AM27	5807	5346			19554	19773
AM28	4109	4021			20032	20512
AM29	3428	4424			19967	20294
AM30	3616	3828			19865	19916
AM31	4296	4569			20157	20275
AM32	2790	3112			19830	20115
AM33	3265	3264			20084	20106
AM34	2672	2719			19581	19940
AM35	2963	2956			20401	19707
AM36	3159	3222			20194	20055
AM37	4583	4434			20301	19586
AM38	2884	2892			19983	20002
AM39	6156	7496			20144	20337
AM40	3994	4173			20531	19838
AM41	2482	3142			19731	20008
AM42	2100	2135			20499	19508
AM43	2403	2385	19603	20832		
: ATESP - MODULO QUE CALCULA A ATIVI- DADE ESPECIFICA DA INSULINA-125I						
			C			
R3X	16980	17257			61767	59702
R4X	17238	17393			122930	117003
R12X	26323	27878			743379	734717
: FATOR (CPN/U/ML PARA CURIE/GRAMA) D-140766						
: SCAT - MODULO QUE CALCULA AS CON- CENTRACOES DE EQUILIBRIO E CON- CENTRACOES DE REAGENTE ESPE- CIFICAS						
			D			
: FATOR (U/ML PARA PDL/LITRO) 2-22222E-12						
: ESTIMATIVAS DE (KILITRCS/MOL) (PDL/LITRO)						
	100E9	20E-12				
: FIM DA ENTRADA DE DADOS						

Resultados experimentais (e entrada de dados para o sistema GARLA) relativos ao ensaio realizado à temperatura de 37°C.

RADIOSAID DA INSULINA A TEMPERATURA 37 C				
CURVA - CURVA DE DOSE RESPOSTA				
TEXTO PARA A IDENTIFICACAO DO ENSAIO				
RADIOSAID DA INSULINA A TEMPERATURA 37 C				
UNIDADE DE CONCENTRACAO ADOTADA				
MICROUNIDADE/ML				
TOTAL DE RADIOATIVIDADE/TUBO (P) CONTADO INDIVIDUALMENTE. ISTO E: TUBO POR TUBO				
PADROES	RADIOATIVIDADE NO COMPLEXADO (CPM)		RADIOATIVIDADE ADICIONADA PA = TOTAL (CPM)	
0	7837	7620	19569	19830
5	5582	6137	20579	20287
10	5586	6133	20584	20127
25	5047	5266	19658	20351
50	4094	3649	20647	20399
100	2498	2931	20194	20094
200	1909	2107	19855	20419
AMOSTRAS DOSEADAS NESSE ENSAIO				
AM01	5220	5134	19446	20264
AM02	4529	5140	20416	19968
AM03	5736	8243	20160	20340
AM04	6128	6492	19901	19450
AM05	6820	7024	19813	20520
AM06	6737	7047	19956	19433
AM07	5869	5720	20073	19742
AM08	6827	6480	20564	19964
AM09	5576	6149	19864	20190
AM10	6112	5717	20251	20899
AM11	6561	6530	19983	20573
AM12	4951	4777	20014	19751
AM13	6890	6935	20160	20415
AM14	5982	6019	20324	19893
AM15	4102	4294	19675	20464
AM16	5826	5478	20074	19865
AM17	4983	5171	20642	20191
AM18	3823	3807	20189	19795
AM19	6991	6447	19549	19547
AM20	8161	8121	20117	19984
AM21	7302	7020	19656	19010
AM22	6086	6307	20075	19871
AM23	3293	3536	19549	20604
AM24	4183	6512	20351	20194
AM25	4906	4130	20426	19796
AM26	4014	3863	20085	20033
AM27	5265	4618	20570	20493
AM28	3807	3850	20132	20360
AM29	3265	3772	20268	20400
AM30	3449	3769	20301	19547
AM31	4247	3835	19375	20578
AM32	2703	2724	20111	19667
AM33	3460	3177	19449	19858
AM34	2421	2362	20193	20710
AM35	3293	3570	20131	19395
AM36	3993	3894	20784	19843
AM37	4993	4178	20217	20148
AM38	2821	2553	19848	19583
AM39	6337	6880	20221	19273
AM40	3953	4451	20069	19654
AM41	2735	2641	20078	19617
AM42	2404	2307	19419	20067
AM43	2285	2270	20171	19694
ATESP - MODULO QUE CALCULA A ATIVIDADE ESPECIFICA DO TRACADOR				
R3X	14796	15825	60718	59558
R6X	20594	20746	119363	116728
R12X	28662	29348	232221	227492
FATOR (CPM/400/ML) PARA CURTE/GRAMA				
0.140766				
SCATCHARD ANALISE DE				
FATOR (U E ML PARA MCL E LITRO)				
2.22222E-12				
ESTIMATIVAS DE KIETRES/MOL E OIMOL/LITRO				
	22E9		20E-12	
	0.01			
FIM DA ENTRADA DE DADOS				

A

B

C

D

4.3.4. ESTIMATIVAS PARA OS CÁLCULOS DE K (CONSTANTE DE AFINI- DADE) E q (CONCENTRAÇÃO DO LIGANTE) - QUADRO D

Devido a aplicação de método de ajuste não linear utilizado nessa fase do programa GARLA, torna-se necessário fornecer as estimativas iniciais dos valores de K e q.

No decorrer dos cálculos o módulo de cálculo específico se encarrega de encaminhar aqueles valores estimados, para valores estatisticamente mais significativos mediante processos i-terativos.

4.4. CARACTERIZAÇÃO DO PERIL DE IMPRECISÃO DAS DOSAGENS

O programa GARLA calcula inicialmente, a razão $Y = B/T$ (razão entre a radioatividade da fração complexada e a radioatividade total) de todos os valores contidos nos quadros A, B, C e D das tabelas XIII, XIV e XV respectivamente, e a seguir calcula a variância (desvio padrão ao quadrado) do valor de Y (os experimentos foram realizados em duplicata).

Os pontos definidos por Y e pela variância são ajustados à função número 9, item 2.6. As figuras 20, 21 e 22 mostram esses dados graficamente no tocante aos três ensaios vertentes.

As tabelas XVI, XVII e XVIII mostram a análise de variância do ajuste para fins de apreciação da qualidade estatística da regressão efetuada. Nestas tabelas 'S.Q.' representa a soma dos quadrados, 'Q.M.' representa os quadrados médios, isto é, $S.Q. \div G.L.$ (graus de liberdade), 'F' é o estatístico calculado pelo Q.M. (modelo) dividido pelo Q.M. (resíduo) e 'PROBF' é a probabilidade de F.

Ainda, as tabelas XVI, XVII e XVIII indicam os coeficientes 'e' e 'f' de ajuste (equação 9, item 2.6) com os seus respectivos desvios padrão, valor de 't' e probabilidade de 't'. É da prática dos ensaios de natureza biológica aceitar como valores significativos aqueles que geram valores da probabilidade de 't' menor ou igual a 0,05.

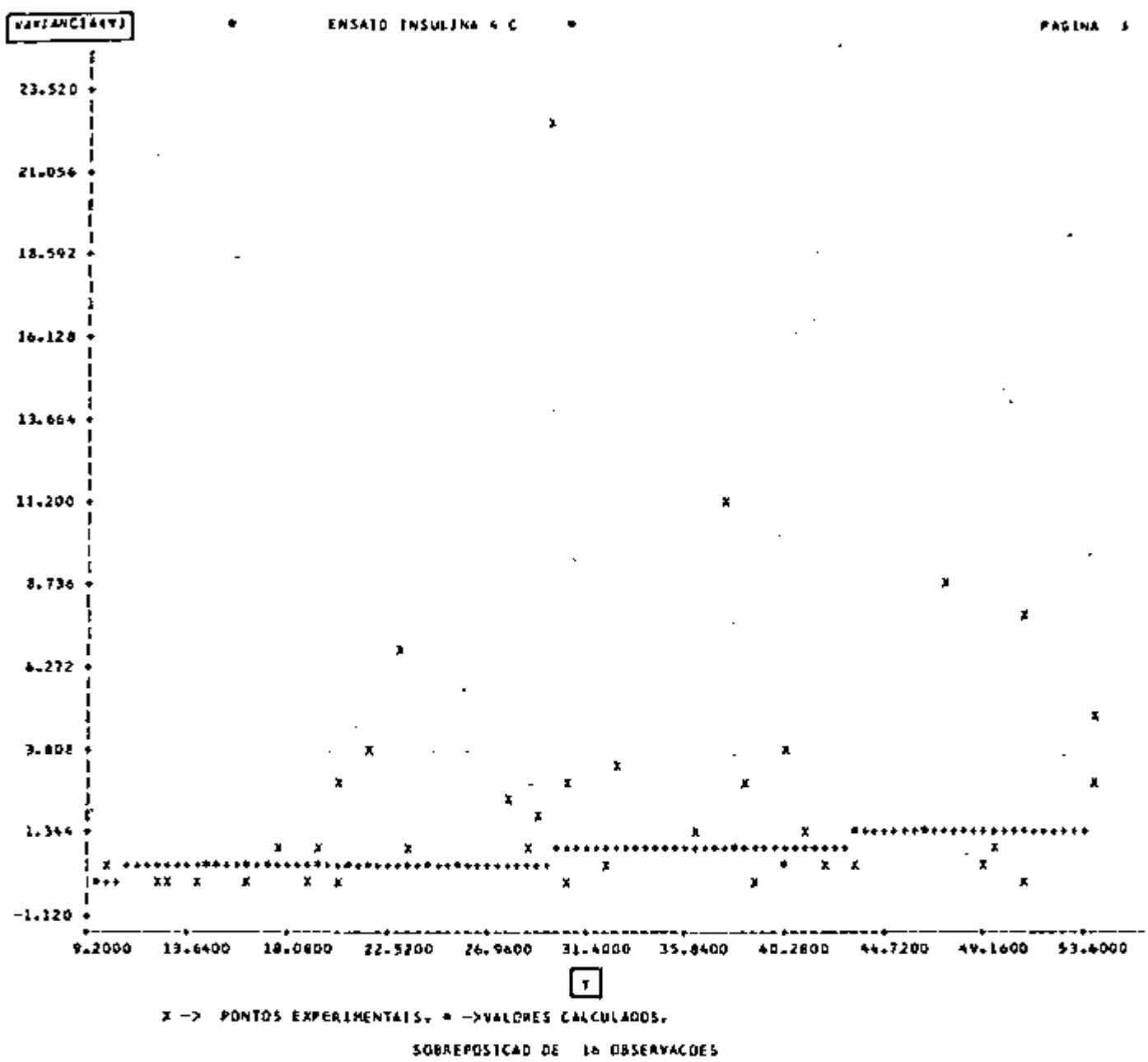


Figura 20 - Gráfico do comportamento da variância de Y em função de Y. Temperatura de 4°C.

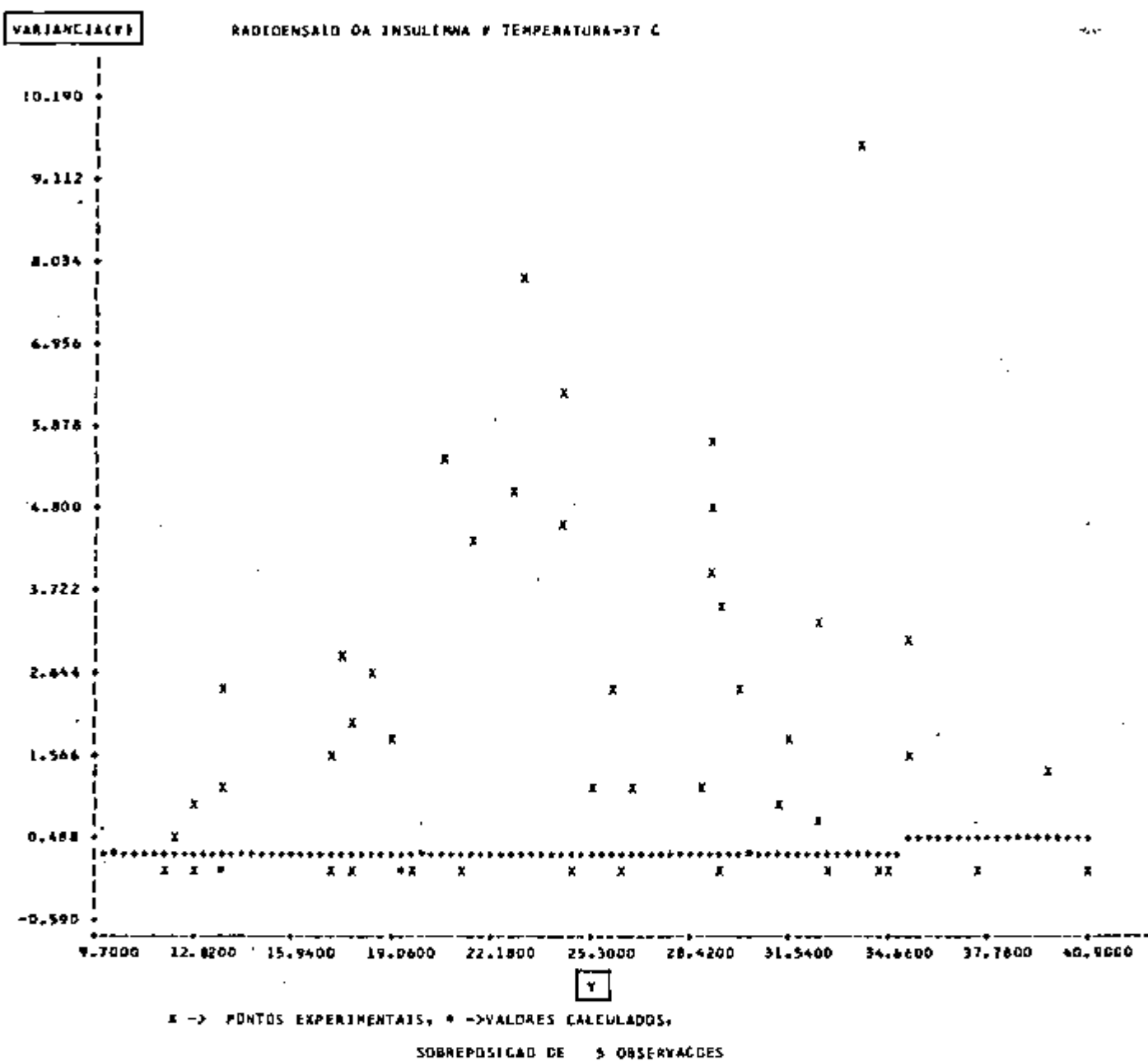


Figura 22 - Gráfico do comportamento da variância de Y em função de Y. Temperatura de 37°C

Informações estatísticas sobre o ajuste da variância de Y em função de X. Temperatura do ensaio: 4°C

- 1) Análise de variância do ajuste $\text{var}(Y) = e \cdot Y^f$
- 2) Resultados dos parâmetros de ajustes 'e' e 'f'
- 3) Valor médio da radioatividade adicionada em cada tubo de ensaio e estimativa do erro de alíquotagens.

ANÁLISE DA VARIÂNCIA - DISPERSAD

$$\text{LOG}\{\text{VAR}(Y)\} = \text{LOG}(E) + F \cdot \text{LOG}(Y)$$

FONTE	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	PROB F
MODELO	1	32.10676	32.10676	10.52	.24320-02
RESIDUO	51	155.5831	3.050649	-	-
TOTAL	52	187.6898	-	-	-

1)

PARAMETRO	ESTIMATIVA	DESVIO PADRAO	VALOR DE T	PROB T
E	0.25275870-02	0.58463850-02	0.4323333	0.6711
F	1.616996	0.4984328	3.244155	0.0024

2)

3) TOTAL MEDIO = 20012.71 ERRO DE PIPETAGEM = 1.3 x

Informações estatísticas sobre o ajuste da variância de Y em função de Y. Temperatura do ensaio: 200°

- 1) Análise de variância do ajuste $\text{var}(Y) = e \cdot Y^f$
- 2) Resultados dos parâmetros de ajustes 'e' e 'f'
- 3) Valor médio da radioatividade adicionada em cada tubo e estimativa do erro de alíquotagens.

ANALISE DA VARIANCIA - DISPERSAO

$$\text{LOG}(\text{VAR}(Y)) = \text{LOG}(E) + F \cdot \text{LOG}(Y)$$

FONTE	G.L	S.Q.	Q.M.	F	PROB F
MODELO	1	25.45506	25.45506	3.670	.5787D-01
RESIDUO	51	353.7167	6.935621	-	-
TOTAL	52	379.1717	-	-	-

1)

PARAMETRO	ESTIMATIVA	DESVIO PADRAO	VALOR DE T	PROB T
E	0.1908275D-02	0.7417818D-02	0.2572556	0.7937
F	1.644524	0.8584118	1.915775	0.0579
TOTAL MEDIO =	20004.37	ERRO DE PIPETAGEM =	1.8	%

2)

3)

Informações estatísticas sobre o ajuste da variância de Y em função de X. Temperatura do ensaio:

- 1) Análise de variância do ajuste $var(Y) = e \cdot Y^f$
- 2) Resultados dos parâmetros de ajustes 'e' e 'f'
- 3) Valor médio da radioatividade adicionada em cada tubo de ensaio e estimativa do erro de alíquotagens.

ANALISE DA VARIANCIA - DISPERSAO

$$\text{LOG(VAR(Y))} = \text{LOG(E)} + F \cdot \text{LOG(Y)}$$

FORTE	G.L.	S-Q.	Q.M.	F	PROB F
MODELO	1	1.105607	1.105607	.99860-01	.7516
RESTUO	51	564.6733	11.07203	-	-
TOTAL	52	565.7789	-	-	-

1)

PARAMETRO	ESTIMATIVA	DESVIO PADRAO	VALOR DE T	PROB T
-----------	------------	---------------	------------	--------

2) E 0.90452430-01 0.5115528 0.1768193 0.8546

F 0.4036891 1.277498 0.3159998 0.7516

3) TOTAL MEDIO = 20058.92 ERRO DE PIPETAGEM = 1.9

Na parte inferior dessas tabelas encontram-se os valores médios da radioatividade adicionada e as estimativas do erro de alíquotagem. Como esses experimentos foram realizados simultaneamente e com os mesmos reagentes e equipamentos, espera-se portanto, que a radioatividade total média e o erro de alíquotagem, correspondentemente, sejam muito próximos, o que se constata das três tabelas.

As tabelas XIX, XX e XXI mostram para cada observação o valor médio de Y ($Y = B/T$), a variância observada e calculada pela equação 9 e o resíduo (variância observada menos variância calculada). A alternância de sinais (+, -) do resíduo quando distribuída aleatoriamente indica boa qualidade do ajuste adotado.

As figuras 23, 24 e 25 mostram o perfil de imprecisão das dosagens. Dessas figuras conclui-se que o radioensaio da insulina por nós experimentado acusa maior precisão na faixa de concentração entre aproximadamente 20 a 80 $\mu\text{UI/ml}$ com erro da ordem de 10% a 15%.

4.5. TRACADOS DA CURVA DE DOSE-RESPOSTA EM TRES ESCALAS E ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA APRECIACÃO DA QUALIDADE DO AJUSTE

As figuras 26, 27 e 28 representam respectivamente as curvas padrão do radioensaio da insulina, traçadas na escala linear (concentração) versus linear ($Y = B/T$). Nas figuras 29, 30 e 31 representam-se as curvas padrão em escala logarítmica (concentração) versus linear ($Y = B/T$), enquanto as figuras 32, 33 e 34 representam os traçados das curvas padrão na escala logarítmica (concentração) versus logito ($Y = B/T$).

Os valores calculados das curvas padrão dos três ensaios foram indicados pelo sinal '+' e tiveram suas origens na aplicação da equação número 8, ítem 2.5.2.

Os dados experimentais de cada curva padrão foram submetidos à regressão dos mínimos quadrados não linear à função número 8, ítem 2.8. É praxe do programa GARLA fornecer a tabela da análise de variância para verificação estatística da

TABELA XIX

Avaliação comparativa entre os valores experimentais da variância e calculada pela função potência $var(Y) = e.Y^f$. Acompanha a análise de aleatoriedade dos resíduos.

• ENSAIO INSULINA 4 C •

PAGINA 2

RESULTADOS PARA O MODELO $\{LOG(VARIY)\} = LOG(E) + F \cdot LOG(Y)$

OBSERVAÇÃO	MEDIA Y(OBS)	VAR OBSERVADA	VAR CALCULADA	RESÍDUO
0.0	49.25714	0.7628158	1.378546	-0.6157299
5.000	45.87221	1.364629	1.228639	0.1359892
10.000	39.80987	0.1824758	0.9769763	-0.7945005
25.000	28.35084	1.001272	0.5842851	0.4365870
50.000	18.69754	0.5240106D-01	0.2878564	-0.2352553
100.000	14.02670	0.1565832	0.1808539	-0.2427069D-01
200.000	9.273534	0.3748753D-01	0.9262694D-01	-0.5513941D-01
AM01	27.60359	2.318785	6.5404319	1.778353
AM02	30.20456	2.839552	8.6251391	2.214413
AM03	37.68392	0.865430	0.8540122	-0.2446914D-01
AM04	39.98216	4.001960	0.9838222	3.018138
AM05	46.79545	8.865188	1.268894	7.596294
AM06	53.47747	4.554415	1.574924	2.679886
AM07	38.59339	0.2727139D-01	0.9291598	-0.9018884
AM08	35.66737	1.442754	0.8190528	0.6237013
AM09	39.81097	0.1811153	0.9770156	-0.7959044
AM10	38.02675	2.586233	0.9672003	1.679033
AM11	43.09122	0.5754643	1.310466	-0.5350020
AM12	31.25518	0.3308523	0.6744016	-0.3435493
AM13	50.43175	7.835574	1.432652	6.403482
AM14	1.61486	0.3550186	1.049599	-0.6445605
AM15	22.61054	6.977794	0.3913448	8.586394
AM16	29.16257	22.32080	0.5906400	21.73016
AM17	32.47465	3.448800	0.7024567	2.745651
AM18	23.02702	0.5648748	0.4260118	0.1389630
AM19	48.74609	0.4386868	1.355492	-0.5168056
AM20	53.46837	2.750718	1.575047	1.175671
AM21	50.57815	0.7352812D-02	1.438870	-1.431467
AM22	37.37566	11.22501	0.8822165	10.34280
AM23	19.18625	0.5521903	0.3001203	0.2920100
AM24	42.76864	1.363718	1.097055	0.2686628
AM25	25.16611	0.3141536	0.4653927	-0.3512391
AM26	19.08491	0.6962170	0.2975612	0.3486558
AM27	28.61075	1.630687	0.5726737	1.058013
AM28	17.30193	1.053050	0.2535215	0.7991249
AM29	19.78176	0.1242774D-01	0.3153267	-0.3028940
AM30	19.81517	2.715292	0.3161683	2.395103
AM31	21.05964	3.877849	0.3489155	3.528534
AM32	13.57420	0.6000657D-01	0.1715141	-0.1115678
AM33	20.08042	0.3114263	0.3231905	-0.1176423D-01
AM34	14.50820	0.2560719	0.1909986	0.6507333D-01
AM35	15.83483	0.6150305D-01	0.2200268	-0.1581237
AM36	16.02087	0.1200268	0.2242220	-0.1041952
AM37	22.66688	0.7352097	0.3986003	0.3366094
AM38	14.29586	0.1773460	0.1864987	-0.9158714D-02
AM39	40.62110	1.584968	1.005470	0.5755477
AM40	21.16859	0.2615730	0.3516389	-0.9026590D-01
AM41	14.01602	0.1508428	0.1806312	-0.2576441D-01
AM42	11.99377	0.1022670	0.1404018	-0.3813476D-01
AM43	12.25916	0.1089236	0.1454555	-0.3653584D-01
RC3X	30.06983	0.4691886D-02	0.6206365	-0.6154446
RO6X	16.70644	0.1573185	0.2399406	-0.8262707D-01
RI2X	9.632928	0.1189482	0.9850659D-01	0.2044761D-01

TABELA XX

Avaliação comparativa entre os valores experimentais da variância e calculada pela função potência $\text{var}(Y) = e \cdot Y^f$. Acompanha a análise de aleatoriedade dos resíduos.

RADIOENSAIO DA ISULINA * TEMPERATURA=20 C

PAG

RESULTADOS PARA O MODELO $\text{LOG}(Y) = \text{LOG}(E) + F \cdot \text{LOG}(Y)$

OBSERVAÇÃO	MEDIA Y(OBS)	VAR OBSERVADA	VAR CALCULADA	RESÍDUO
0.0	43.55941	4.525866	0.9465638	3.579302
5.000	41.08496	0.30778880-01	0.8597664	-0.8289875
10.000	33.16849	0.1280882	0.6046587	-0.4758505
25.000	24.01882	0.17454140-01	0.3556238	-0.3381447
50.000	18.34871	0.4163435	0.2294107	0.1889328
100.000	13.27525	1.703623	0.1341254	1.589447
200.000	10.25902	0.3950481	0.87786660-01	0.3072614
AM01	28.09049	0.3046492	0.4074548	-0.1025556
AM02	24.96262	4.639615	0.3788939	4.280721
AM03	34.49295	0.1580530	0.6446751	-0.4868220
AM04	36.66295	23.65527	0.7129348	22.54234
AM05	42.56625	0.4045385	0.9111338	-0.5067953
AM06	40.21735	0.27127720-01	0.8301119	-0.8025842
AM07	35.31540	0.7836368	0.6703543	0.1133025
AM08	37.34293	0.57069980-02	0.7348094	-0.7291028
AM09	36.67678	0.1105527	0.7133771	-0.6028244
AM10	29.52673	4.973124	0.4993957	4.475928
AM11	39.16970	1.623234	0.7948501	0.8283836
AM12	30.19263	0.4646825	0.5180516	-0.57169120-01
AM13	35.41681	0.2057253	0.0730228	-0.4677975
AM14	34.33814	17.32948	0.6401211	16.68936
AM15	24.80555	0.22111440-01	0.3749811	-0.3528656
AM16	22.32866	0.1815088	0.5796881	-0.3981783
AM17	26.69798	3.032519	0.4231735	2.609345
AM18	21.61063	0.49098310-01	0.2989050	-0.2648067
AM19	43.52773	11.13854	0.9454320	10.15111
AM20	47.98468	0.2588248	1.109823	-0.8109985
AM21	39.63859	1.659453	0.8105578	0.2888950
AM22	29.88708	3.395753	0.5094581	2.886295
AM23	18.19905	1.546950	0.2232983	1.373652
AM24	34.74661	7.341174	0.6526414	6.688483
AM25	24.16759	0.7200519	0.3592535	0.3667985
AM26	21.26358	0.73651710-01	0.2910517	-0.2170660
AM27	28.36704	3.538811	0.4675503	3.071281
AM28	20.05767	0.4131594	0.2644064	0.1487536
AM29	19.48286	10.71415	0.2520808	10.46705
AM30	18.71180	0.5180171	0.2358658	0.2821513
AM31	21.92392	0.7471877	0.3080642	0.4411435
AM32	14.77032	0.9820310	0.1594564	0.8221746
AM33	16.24534	0.25904880-03	0.1866947	-0.1866856
AM34	13.64089	0.49735230-04	0.1402545	-0.1402048
AM35	14.76177	0.1132635	0.1597044	-0.46440520-01
AM36	15.67006	0.78640500-01	0.1798457	-0.1032553
AM37	22.38039	0.75938010-01	0.3166139	-0.2406759
AM38	14.44541	0.34549580-03	0.1541147	-0.1537692
AM39	33.80873	18.60137	0.6239719	17.56340
AM40	20.24445	1.251168	0.2684676	0.4827003
AM41	14.14145	4.881334	0.1488181	4.732421
AM42	10.60457	0.2554378	0.92701830-01	0.1667360
AM43	11.80123	0.2221714	0.1105225	0.1116454
R3X	28.15762	1.000860	0.4629718	0.5378885
R4X	14.44402	0.3581697	0.1540904	0.2010793
R12X	11.34646	0.5635403	0.1036058	0.4556946

TABELA XXI

Avaliação comparativa entre os valores experimentais da variância e calculada pela função potência $\text{var}(Y) = e \cdot Y^f$. Acompanha a análise de aleatoriedade dos resíduos.

RADIENSAO DA INSULINA A TEMPERATURA 37 C

PAGINA

RESULTADOS PARA O MODELO $\text{LOG}(Y) = \text{LOG}(E) + F \cdot \text{LOG}(Y)$

OBSERVAÇÃO	MEDIA Y(OBS)	VAR OBSERVADA	VAR CALCULADA	RESIDUO
0.0	39.23733	1.314483	0.3979050	0.9165783
5.000	28.68782	4.886441	0.3506524	4.535786
10.000	28.80454	5.557522	0.3512277	5.206295
25.000	25.77495	0.20372210-01	0.3338192	-0.3154469
50.000	18.83439	1.750802	0.2458723	1.444930
100.000	13.47670	2.463079	0.2584763	2.204602
200.000	9.966764	0.2478883	0.2288367	0.19051810-01
AM01	26.08957	1.137024	0.3374679	0.7995565
AM02	23.98238	6.328275	0.4260780	6.602197
AM03	29.57280	2.510669	0.3544797	2.155640
AM04	32.08516	3.342326	0.3668587	2.975468
AM05	34.32593	0.18398370-01	0.3769938	-0.3585955
AM06	35.01116	3.134475	0.3800140	2.754461
AM07	29.10602	0.34985090-01	0.3527071	-0.3177220
AM08	32.51189	0.57164730-02	0.3688206	-0.3631042
AM09	29.13742	3.475568	0.3528606	3.122708
AM10	28.77223	3.970545	0.3510886	3.619476
AM11	32.28677	0.5965346	0.3677876	0.2287470
AM12	24.46190	0.1521128	0.3288052	-0.1766924
AM13	33.97415	0.32438240-04	0.3754244	-0.3753969
AM14	29.84503	0.4392341	0.3562952	-0.17061120-01
AM15	20.81826	0.18446560-02	0.3080789	-0.3062142
AM16	28.29938	1.046148	0.3487280	0.6974294
AM17	24.87526	1.080917	0.3310369	0.7498801
AM18	19.08409	0.43830210-01	0.2574496	-0.2536194
AM19	34.88332	1.542122	0.3794532	1.122669
AM20	40.60259	0.24381790-02	0.4034372	-0.4009990
AM21	37.03845	0.24427020-01	0.3887481	-0.3642211
AM22	31.02802	1.013044	0.3619304	0.6511138
AM23	17.05328	0.50201640-01	0.2839049	-0.2337033
AM24	31.31450	1.739864	0.4632758	1.376528
AM25	22.44060	4.978929	0.4175544	4.661374
AM26	19.63412	0.2463183	0.3008811	-0.54562820-01
AM27	24.06503	4.684871	0.3266411	4.138230
AM28	18.90991	0.16018300-06	0.2963506	-0.2963505
AM29	17.29967	2.844720	0.2858524	2.548827
AM30	18.13552	2.627596	0.2913903	2.536205
AM31	20.21920	5.140949	0.3048273	5.086162
AM32	13.57579	0.36654170-01	0.2592419	-0.2225827
AM33	16.89435	1.804766	0.2831693	1.521617
AM34	12.66293	0.9075402	0.2520585	0.6554617
AM35	17.38233	2.059098	0.2864431	1.812659
AM36	19.41550	0.82910580-01	0.2995241	-0.2166135
AM37	22.71679	7.842731	0.3191264	7.525605
AM38	13.49444	1.032714	0.2586137	0.7741000
AM39	33.51816	9.500008	0.3733870	9.126621
AM40	21.17192	4.350446	0.3101670	4.040315
AM41	13.55935	0.18637300-01	0.2591151	-0.2404773
AM42	11.51806	0.3099694	0.2461312	0.1438384
AM43	11.42666	0.15412570-01	0.2418152	-0.2224071
R3X	25.46085	2.366048	0.3341500	2.051888
R6X	17.51310	0.1350386	0.2874111	-0.1522724
R12X	12.67401	0.1406466	0.2517415	-0.41066960-01

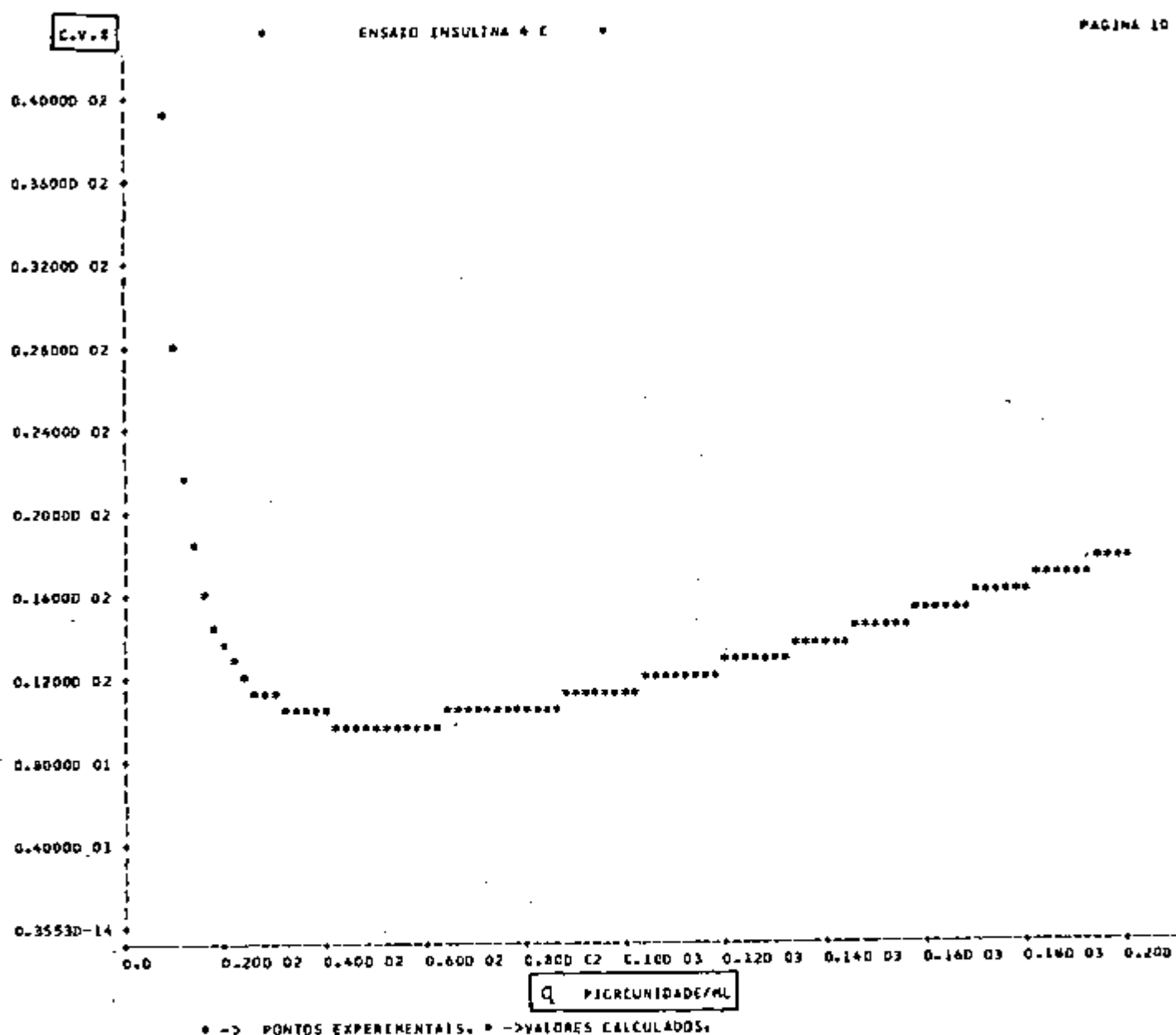


Figura 23 - Curva do perfil de imprecisão intraensaio para o radioensaio incubado à temperatura de 4°C.

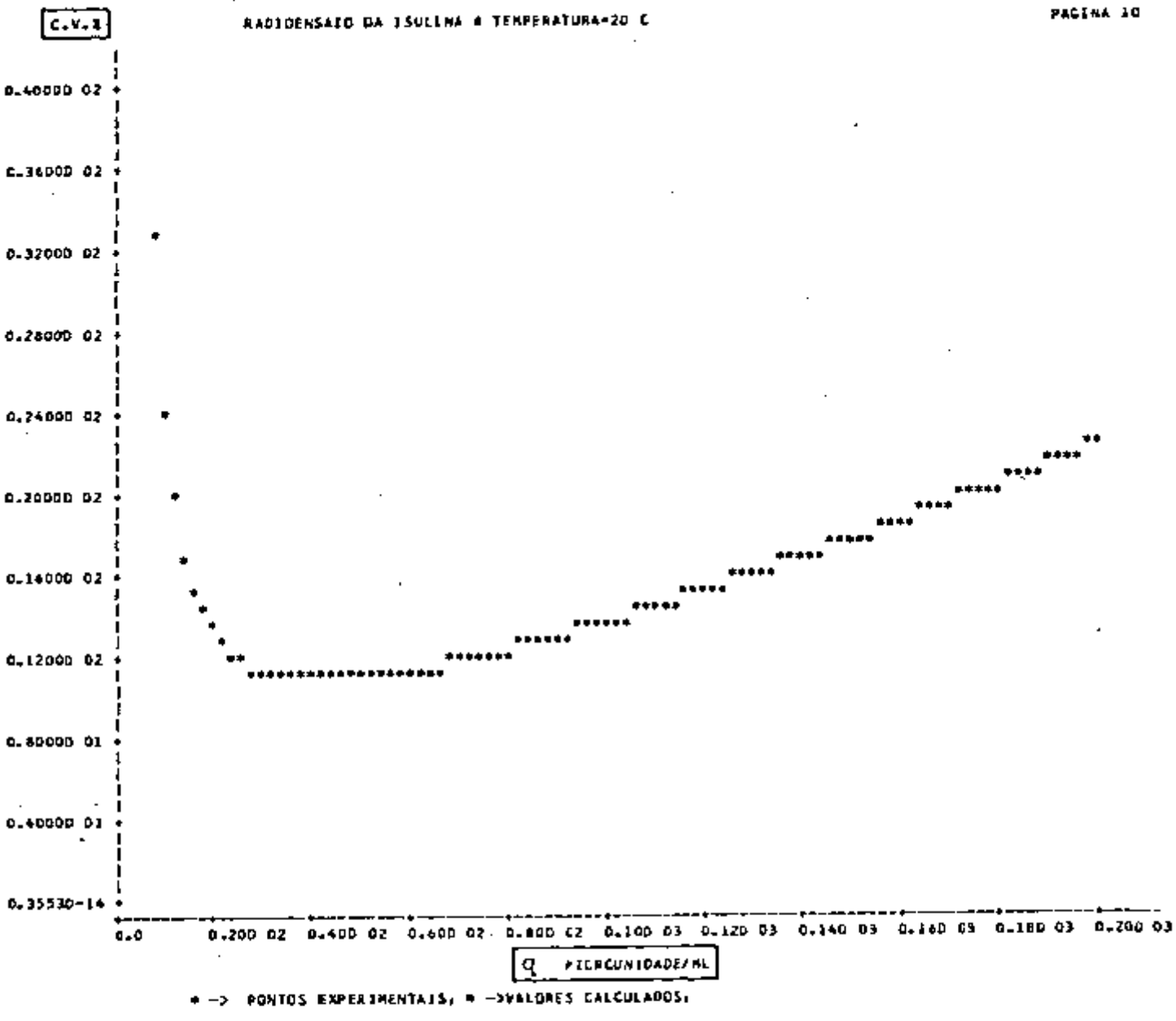


Figura 24 - Curva do perfil de imprecisão intraensaio para o radioensaio incubado à temperatura de 20°C.

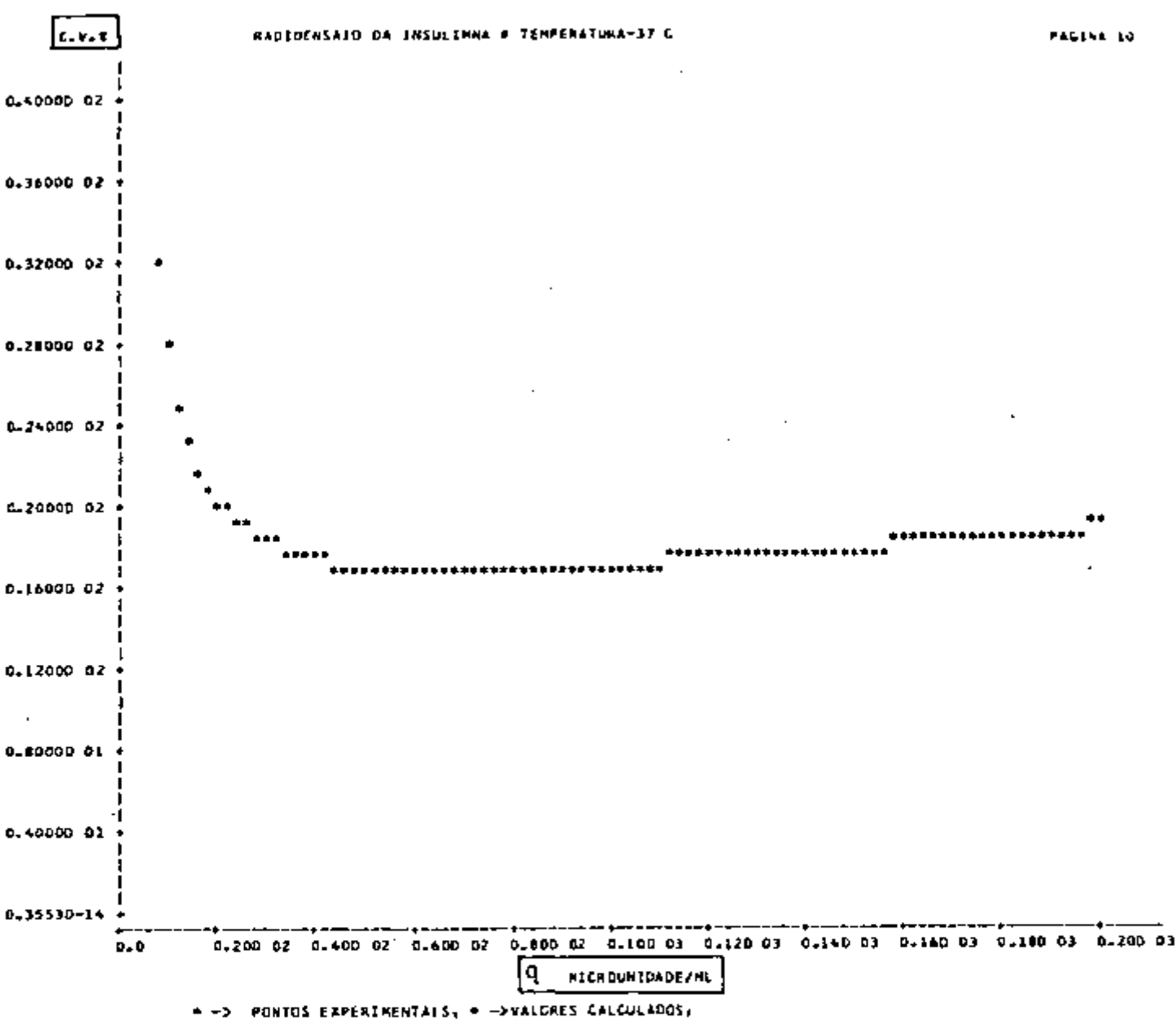


Figura 25 - Curva do perfil de imprecisão intraensaio para o radioensaio incubado a temperatura de 37°C

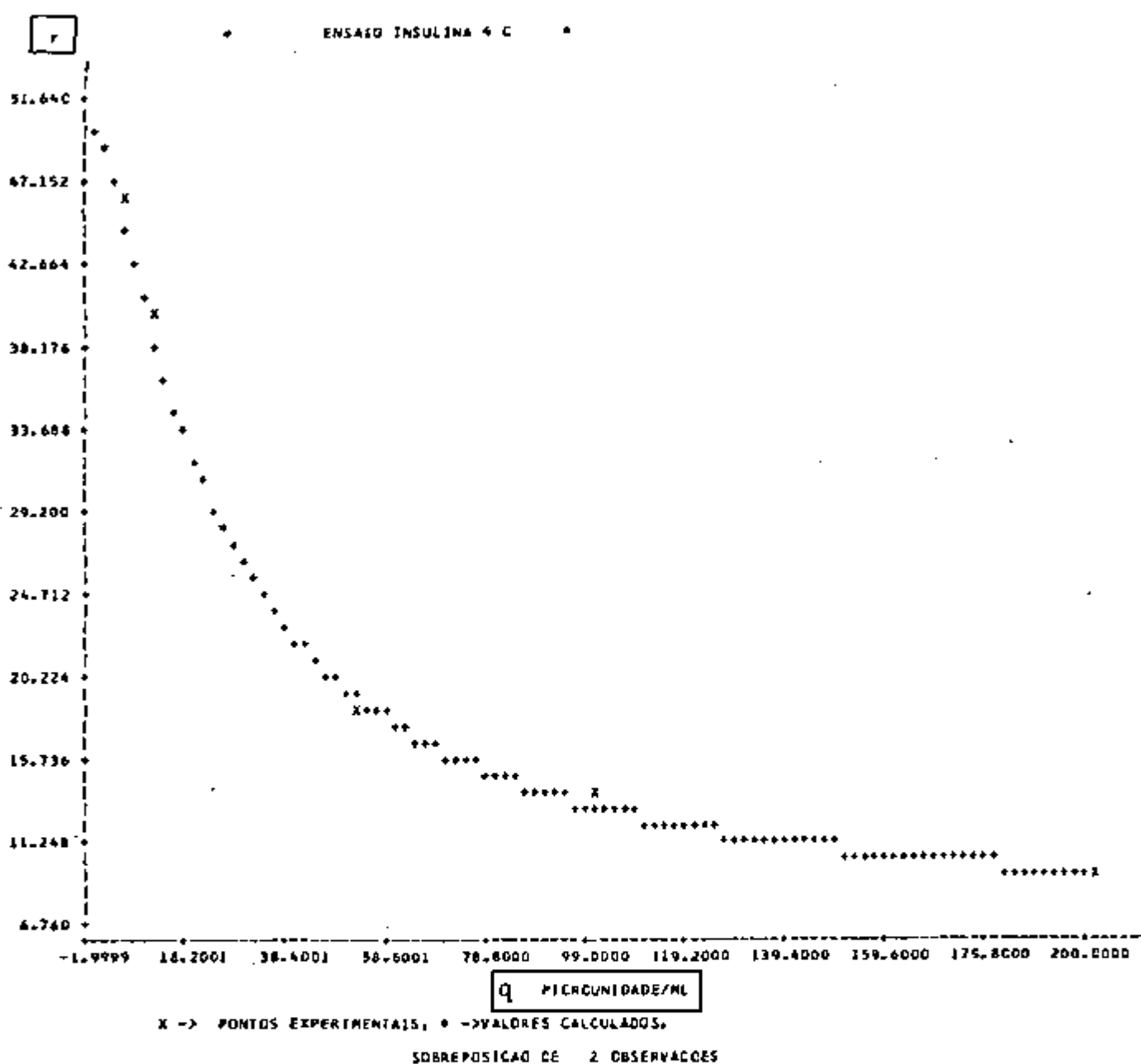


Figura 26 - Curva de dose resposta para o ensaio de insulina realizado à 4°C. Curva traçada em escalas lineares tanto para Y como para q .

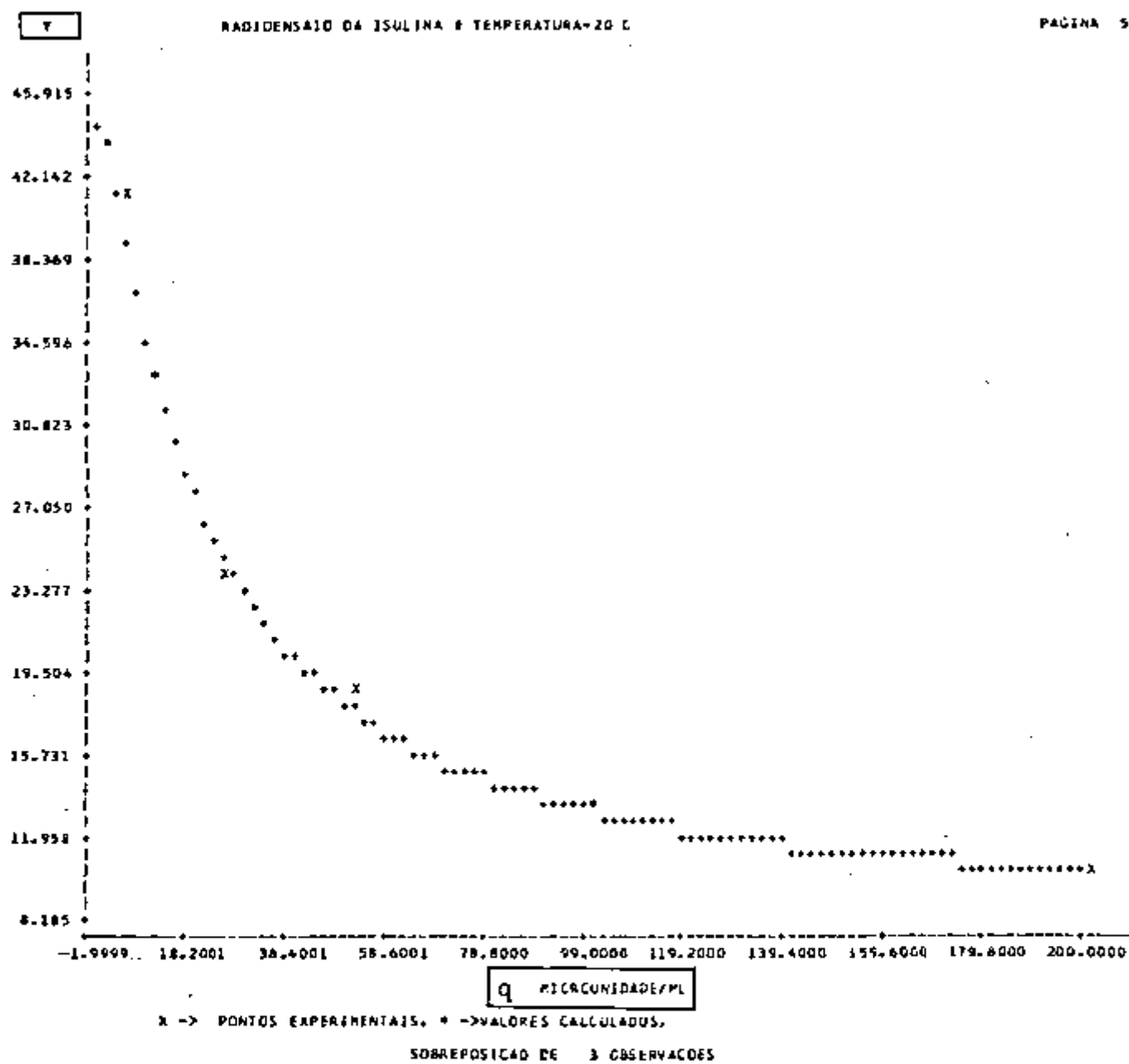


Figura 27 - Curva de dose resposta para o ensaio de insulina realizado a 20°C. Curva traçada em escalas lineares tanto para Y como para q.

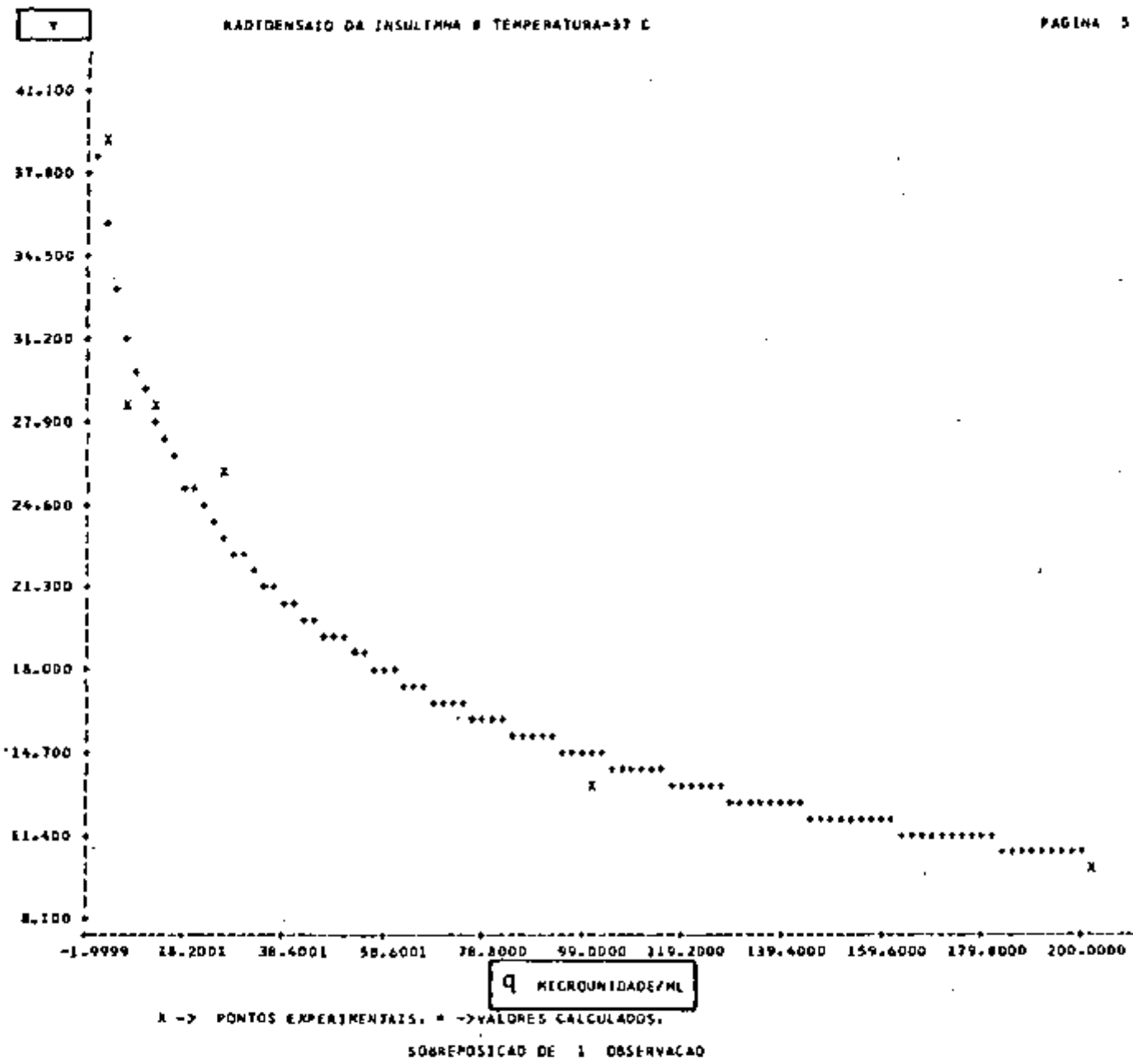


Figura 28 - Curva de dose resposta para o ensaio de insulina realizado à 37°C. Curva traçada em escalas lineares tanto para Y como para q.

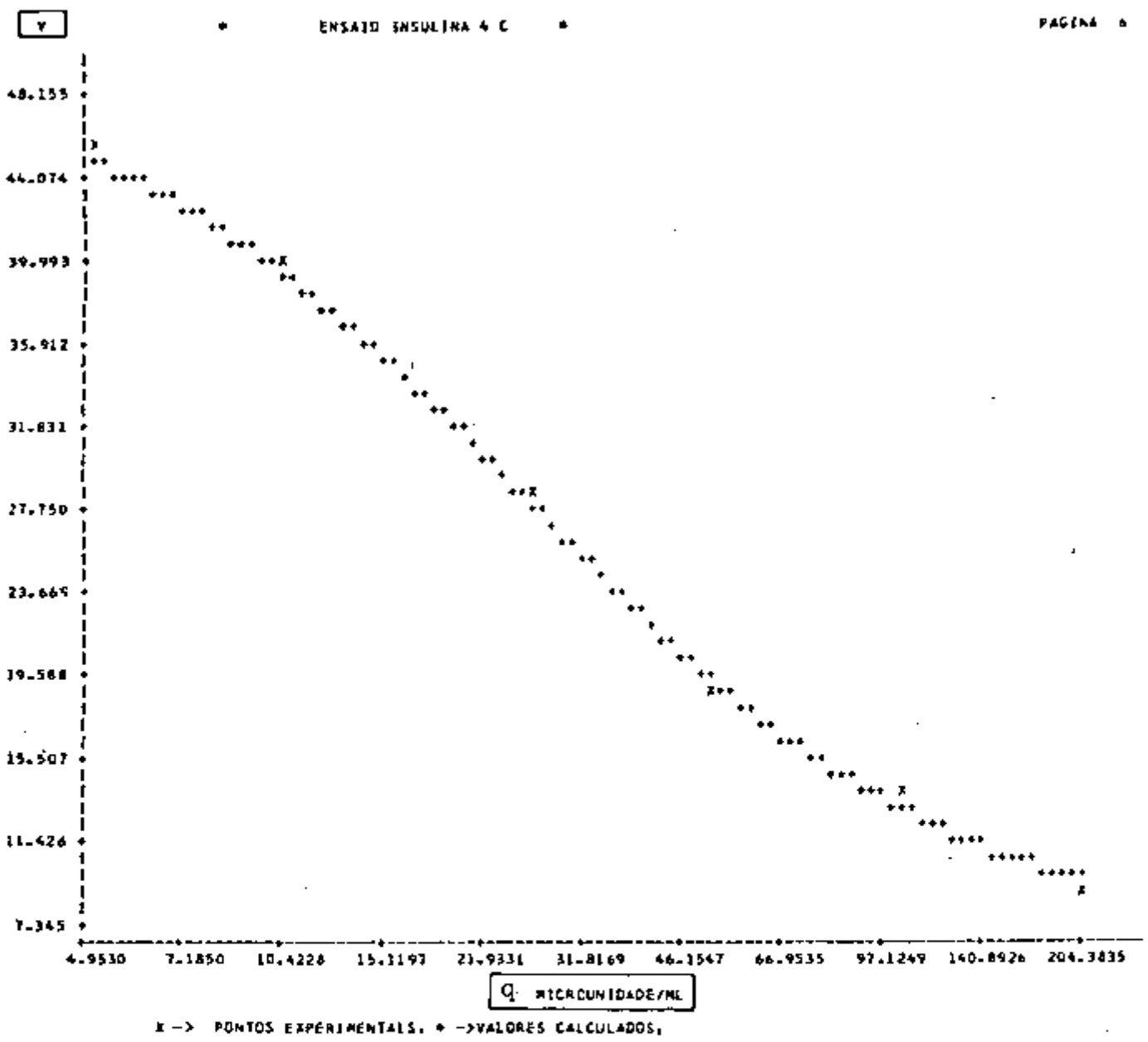


Figura 29 - Curva de dose resposta para o ensaio de insulina realizado a 4°C. Curva traçada em escala linear para 'y' e logarítmica para 'q'.

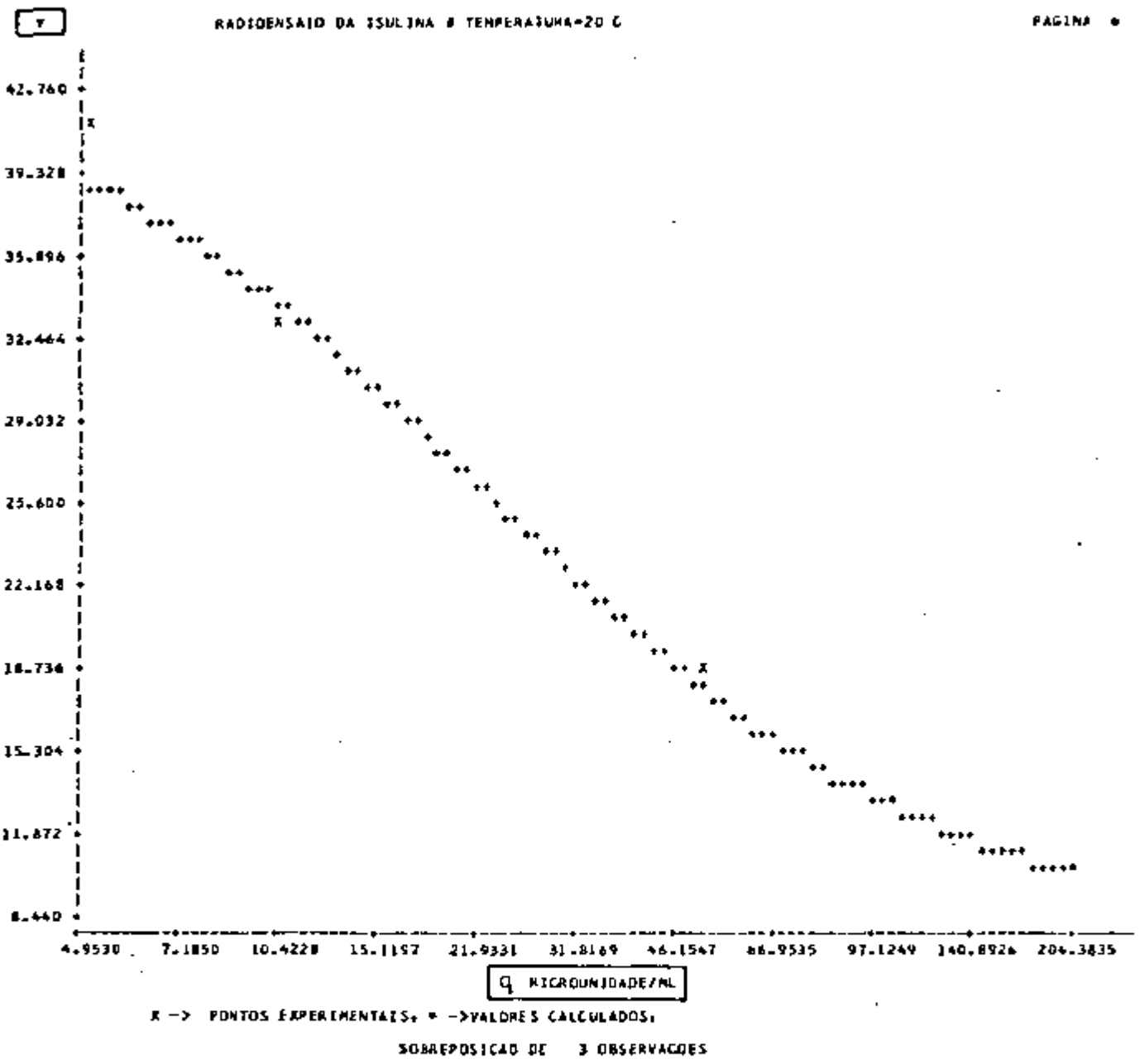


Figura 30 - Curva de dose resposta para o ensaio de insulina realizado a 20°C. Curva traçada em escala linear para 'Y' e logarítmica para 'q'.

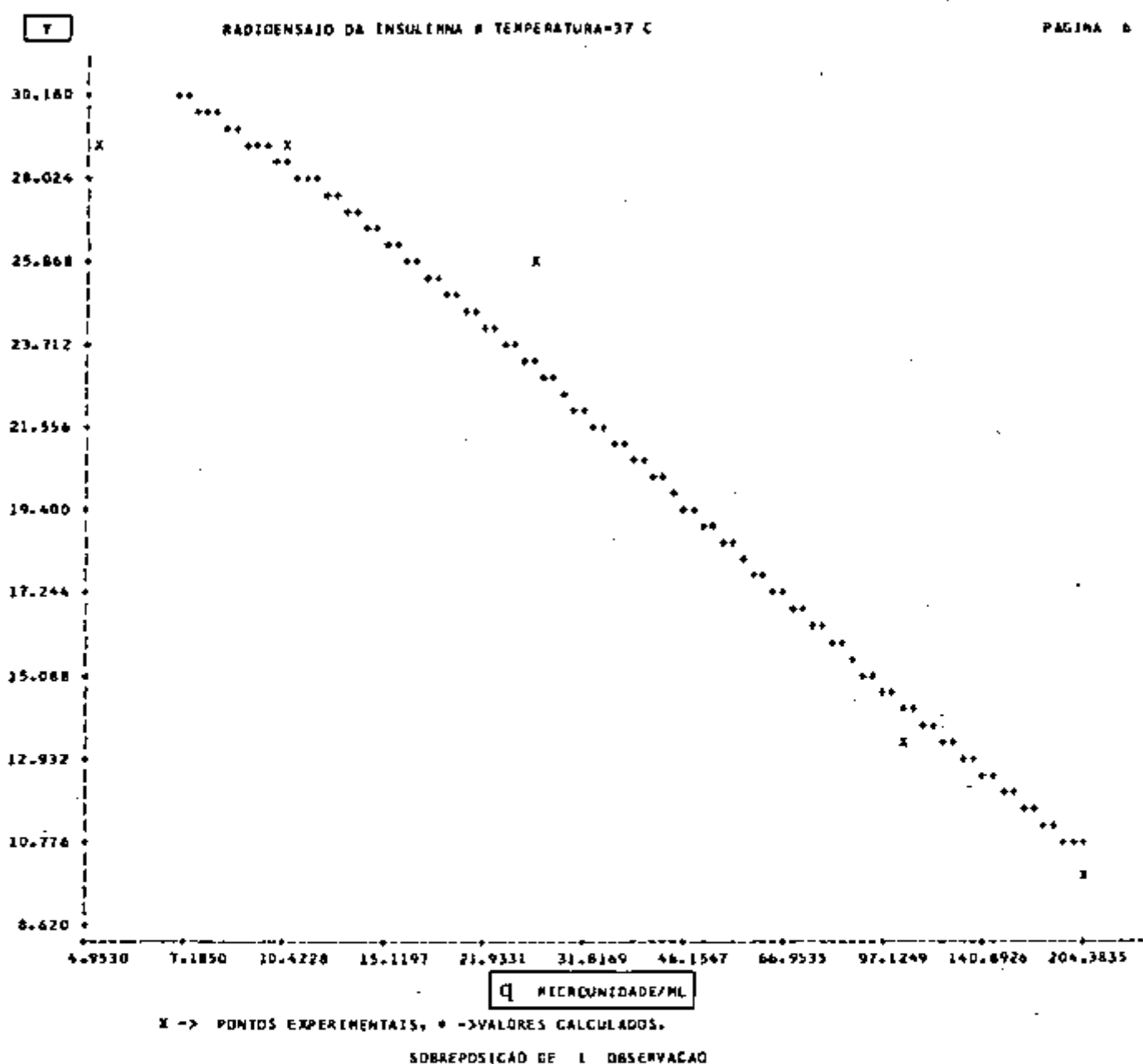


Figura 31 - Curva de dose resposta para o ensaio de insulina realizado à 37°C. Curva traçada em escala linear para 'Y' e logarítmica para 'q'.

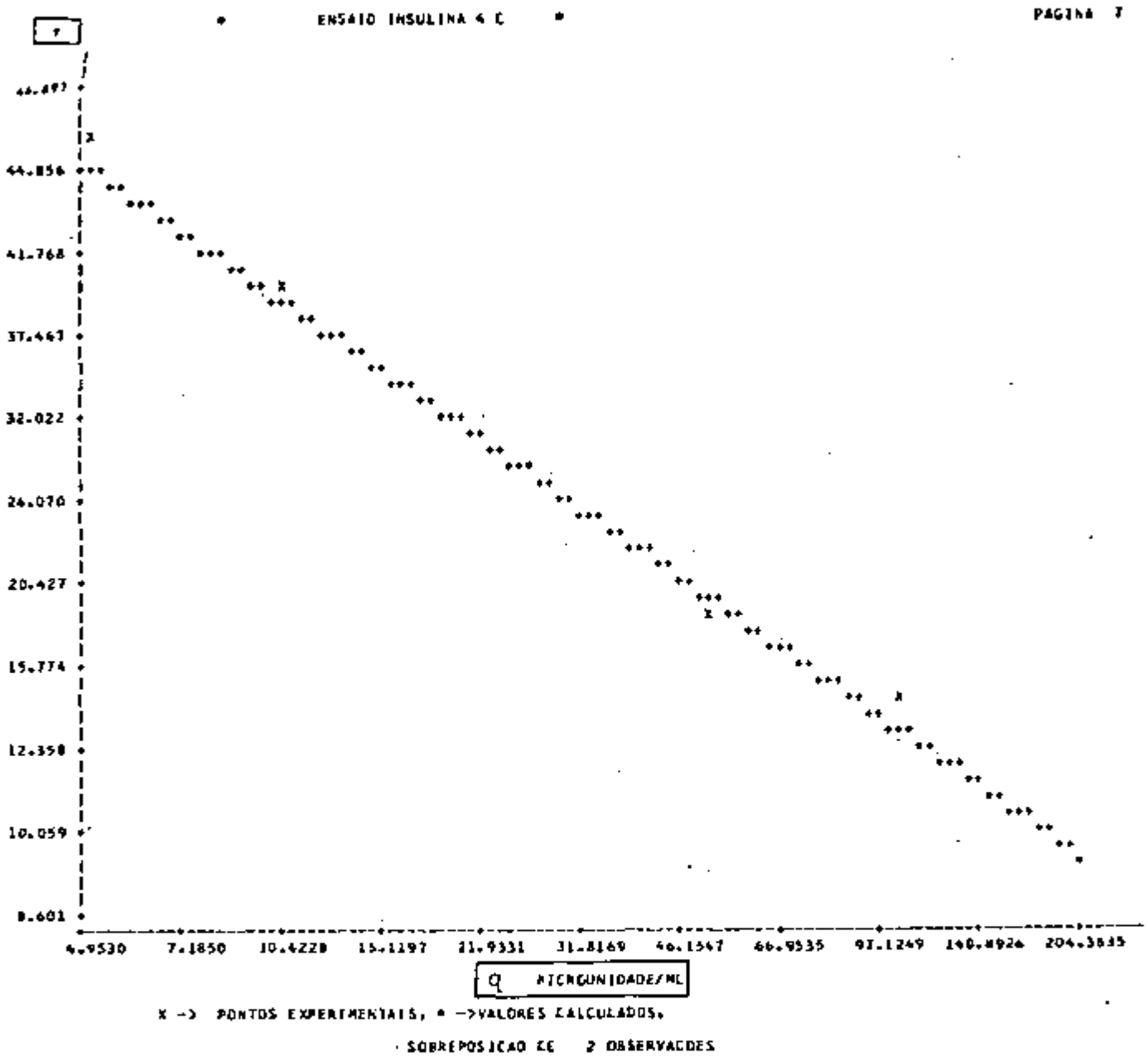


Figura 32 - Curva de dose resposta para o ensaio de insulina realizado à 4°C. Curva traçada em escala logito para 'Y' e logarítmica para 'q'.

RADIDENSAO DA ISULINA a TEMPERATURA=20 C

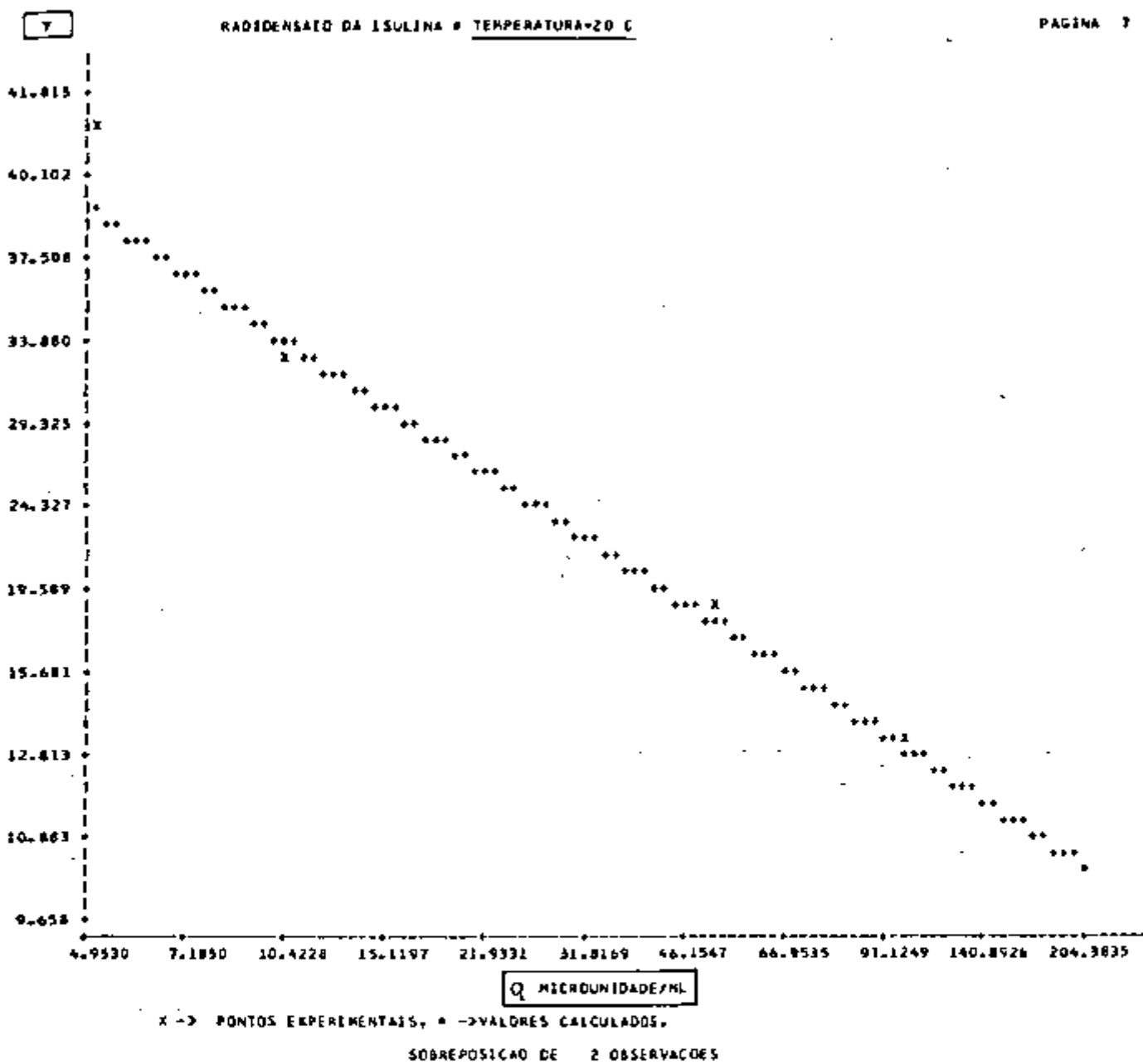


Figura 33 - Curva de dose resposta para o ensaio de insulina realizado a 20°. Curva traçada em escala logito para 'Y' e logarítmica para 'q'.

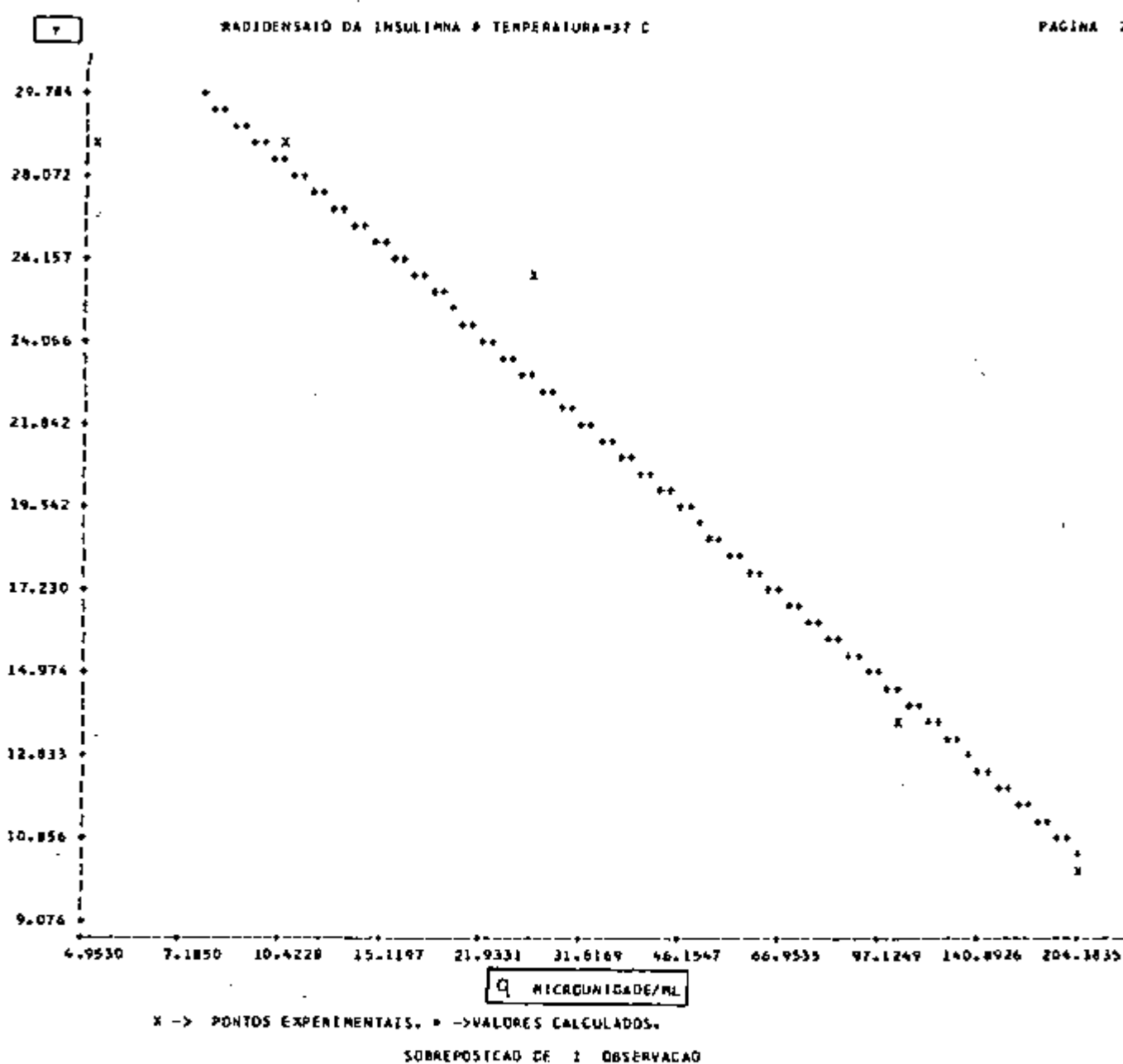


Figura 34 - Curva de dose resposta para o ensaio de insulina realizado à 37°C. Curva traçada em escala logito para 'Y' e logarítmica para 'q'.

qualidade do ajuste. As tabelas XXII, XXIII e XXIV mostram os resultados da análise de variância dos ajustes dos três experimentos efetuados (ensaios submetidos às temperaturas de incubação de 4°C, 20°C e 37°C).

Os coeficientes "a", "b", "c" e "d" da equação número 8 foram indicados para cada curva padrão sob a denominação respectiva de 'Y(ZERO)', 'SLOPE', 'X(50%)' e 'NSB', pois tratam-se de denominações com conteúdo mais mnemônico aos analistas dessa área.

Nas tabelas XXII, XXIII e XXIV encontram-se para cada nível de concentração o valor médio de cada $Y = B/T$, o respectivo Y calculado pela aplicação da equação 8, item 2.5.2 (a razão entre Y calculado e o coeficiente "a", a razão percentual entre o Y observado e o coeficiente "a" ou Y(ZERO) e finalmente o resíduo (Y(observado) menos Y(calculado)) para fins de avaliação da aleatoriedade do sinal (+, -).

4.6. RESULTADOS DE CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS DOSEADAS

Nas tabelas XXV, XXVI e XXVII encontram-se para cada amostra doseada o valor médio da razão $Y = B/T$, da concentração mais provável, calculada a partir do isolamento de X na equação número 8, do intervalo de confiança ao nível de $P < 0,05$ e do coeficiente de variação percentual provável para a amostra. A figura 34a. corresponde à comparação dos ensaios nas temperaturas de 4°C, 20°C e 32°C.

4.7. ESTIMATIVA DA DOSE MÍNIMA DETECTÁVEL - DMD

Na parte inferior das tabelas XXV, XXVI e XXVII, encontram-se a estimativa calculada da dose mínima detectável para cada uma das temperaturas.

4.8. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ESPECÍFICA DA INSULINA-¹²⁵I

As figuras 35, 36 e 37 mostram a relação linear entre a radioatividade e respectivas concentrações da insulina marcada, determinadas pelo método do auto-deslocamento.

TABELA XXII

Análise estatística do ajuste da curva de dose resposta à função nº 8. Ensaio referente à 4°C.

* ENSAIO INSULINA 4 C *

PAGINA 4

INFORMACOES ESTADISTICAS MINIMOS QUADRADOS NAO LINEAR

FONTE	G.L.	SOMA DOS QUADRADOS	QUADRADOS MEIOS
MODELO	4	2844.4920	711.12300
RESIDUO	3	2.6702524	0.89008413
TOTAL (NAO CORRIGIDO)	7	2847.1623	
TOTAL (CORRIGIDO)	6	639.88545	

NUMERO DE I-TERACCES GORRIDAS= 3

CONSTANTES	VAZOR ESTIMADO	ERRA PADRAO ASSINTOTICO
Y1ZERO	50.05660147	1.914920838
SLOPE	7.240908893	0.1689602936
X150X1	25.35998037	2.723244287
N3B	6.430734624	1.480581843

CONCENTRACAO	MEIA Y(OBS)	Y(CALC)	Y(CALC)/A (X)	Y(OBS)/A (X)	RESIDUO
0.0	49.26	50.06	100.00	98.40	1.60
5.00000	45.87	44.92	89.75	91.64	-1.89
10.00000	39.81	35.60	79.12	79.53	-0.41
25.00000	28.35	28.44	56.81	56.64	0.17
50.00000	18.70	19.58	39.08	37.35	1.73
100.00000	14.03	13.16	26.28	28.02	-1.74
200.00000	9.27	9.55	19.09	18.53	0.56

TABELA XXIII

Análise estatística do ajuste da curva de dose resposta à função nº 8. Ensaio referente à 20°C.

RADIOENSAIO DA INSULINA @ TEMPERATURA=20 C

PAGINA 4

INFORMACOES ESTADISTICAS MINIMOS QUADRADOS NA D LINEAR

FONTE	G.L.	SOMA DOS QUADRADOS	QUADRADOS MEDIOS
MODELO	4	2674.3556	668.58890
RESIDUO	3	2.4564089	0.81880297
TOTAL (NAO CORRIGIDO)	7	2676.8120	
TOTAL (CORRIGIDO)	6	615.03517	

NUMERO DE J-TERACEES OCORRIDAS= 4

CONSTANTES	VALOR ESTIMADO	ERRO PADRAO ASSINTOTICO
Y(ZERO)	44.46848389	1.762926232
SLOPE	1.174036824	0.1680700978
X(SD)	21.98861147	2.785034558
NSB	7.836136193	1.420143552

CENCONTRACAO	MEDIA Y(OBS)	Y(CALC)	Y(CALC)/A (%)	Y(OBS)/A (%)	RESIDUO
0.0	43.56	44.47	100.00	97.96	2.06
5.00000	41.08	38.99	87.69	92.39	-4.70
10.00000	33.17	34.07	76.61	74.54	2.02
25.00000	24.02	24.77	55.71	54.01	1.70
50.00000	18.40	17.95	40.36	41.37	-1.02
100.00000	13.28	13.13	29.53	29.85	-0.33
200.00000	10.26	10.39	23.36	23.07	0.29

TABELA XXIII

Análise estatística do ajuste da curva de dose resposta à função nº 8. Ensaio referente à 37°C.

RADIOENSAIO DA INSULINA A TEMPERATURA=37 C

PAGINA 4

INFORMACOES ESTADISTICAS MENINOS QUADRADOS NAO LINEAR

FORTE	G.L.	SOMA DOS QUADRADOS	QUADRADOS MEDIOS
MODELO	4	3974.9531	993.73826
RESIDUO	3	15.000181	5.0001270
TOTAL (NAO CORREGIDO)	7	3989.9535	
TOTAL (CORREGIDO)	6	611.50383	

NUMERO DE ITERACOES OCORRIDAS= 9

CONSTANTES	VALOR ESTIMADO	ERRO PADRAO ASSINTOTICO
Y(ZERO)	38.31704503	1.075132747
SLOPE	0.6761653788	0.7381035377D-01
X150%	48.25233958	6.585428614
NSB	0.0	1.457840090

CONCENTRACAO	MEIA Y(OBS)	Y(CALC)	Y(CALC)/A (E)	Y(OBS)/A (E)	RESIDUO
0.0	39.24	38.32	100.00	102.40	-2.40
5.00000	28.69	31.51	82.24	76.87	7.37
10.00000	28.80	28.49	74.35	75.17	-0.83
25.00000	25.77	23.35	60.94	67.27	-6.33
50.00000	18.83	18.93	49.40	45.15	0.24
100.00000	13.48	14.53	37.42	35.17	2.75
200.00000	9.97	10.60	27.66	26.01	1.65

TABELA XXV

Resultados de concentração das amostras submetidas ao ensaio realizado à 4°C.

* ENSAIO INSULINA + C *

AMOSTRA	Y MEDIO	CONCENTRAÇÃO	INTERVALO DE CONFIANÇA (P=5%)	C. V. %
AM01	27.6	26.58853	(23.8504 A 29.6539)	10.91
AM02	30.2	21.93082	(19.4745 A 24.6585)	11.82
AM03	37.7	12.01838	(10.0285 A 14.1792)	17.24
AM04	40.0	9.61822	(7.6956 A 11.6770)	20.70
AM05	46.8	3.33874*	(1.2406 A 5.4095)*	
AM06	53.5	0.0 *	(0.0 A 5.4095)*	
AM07	38.6	11.04298	(9.0838 A 13.1560)	18.44
AM08	35.7	14.28707	(12.2120 A 16.5514)	15.19
AM09	39.8	9.78999	(7.8636 A 11.8548)	20.38
AM10	38.0	11.64645	(9.6688 A 13.7849)	17.67
AM11	43.1	6.65149	(4.7559 A 8.6329)	29.14
AM12	31.7	19.66844	(17.3369 A 22.2462)	12.48
AM13	50.4	0.0 *	(0.0 A 5.4095)*	
AM14	41.6	8.02757	(6.1391 A 10.0377)	24.34
AM15	22.6	38.82394	(35.2127 A 42.9409)	6.99
AM16	29.2	23.69433	(21.1350 A 26.5455)	11.42
AM17	32.5	18.47725	(16.2078 A 20.9801)	12.91
AM18	23.8	35.30710	(31.9648 A 39.0985)	10.10
AM19	48.7	1.54191*	(0.0 A 5.4095)*	
AM20	53.5	0.0 *	(0.0 A 5.4095)*	
AM21	50.6	0.0 *	(0.0 A 5.4095)*	
AM22	37.4	12.35742	(10.3559 A 14.5276)	16.88
AM23	19.2	51.69796	(46.9878 A 57.1676)	9.84
AM24	42.8	6.94795	(5.0540 A 8.9343)	27.92
AM25	25.2	31.88370	(28.7897 A 35.3760)	10.33
AM26	19.1	52.16894	(47.4153 A 57.6876)	9.85
AM27	28.6	24.68132	(22.0624 A 27.6039)	11.23
AM28	17.3	61.88123	(55.9999 A 68.3609)	10.02
AM29	19.8	49.05537	(44.5851 A 54.2234)	9.82
AM30	19.8	48.91312	(44.4553 A 54.0655)	9.82
AM31	21.1	44.01523	(39.9821 A 48.6462)	9.84
AM32	13.6	94.37112	(84.8021 A 106.1276)	11.30
AM33	20.1	47.78458	(43.4270 A 52.8137)	9.82
AM34	14.5	83.70598	(75.5235 A 93.6137)	10.81
AM35	15.8	71.81666	(65.0455 A 79.8860)	10.33
AM36	18.0	70.38194	(63.7714 A 78.2448)	10.28
AM37	22.9	38.04643	(34.4959 A 42.0898)	9.96
AM38	14.3	85.93389	(77.4715 A 96.2119)	10.90
AM39	40.6	8.98568	(7.0756 A 11.0237)	21.97
AM40	21.2	43.62031	(39.6203 A 48.2108)	5.85
AM41	14.0	89.03727	(80.1762 A 99.8450)	11.09
AM42	12.0	119.45260	(106.1710 A 136.3910)	12.83
AM43	12.3	114.40277	(101.9195 A 130.1726)	12.35
RO3X	30.1	22.15190	(19.6825 A 24.8948)	11.76
RO6X	16.7	65.48995	(59.4113 A 72.6731)	10.13
RI2X	9.6	195.68319	(167.2743 A 236.2140)	17.62

* -> DOSE MINIMA DETECTAVEL = 5.4095 MICROUNIDADE/ML

TABELA XXVI

Resultados de concentração das amostras submetidas ao ensaio realizado a 20°C.

RADIOENSAIO DA ISULÉNA a TEMPERATURA=20 C

AMOSTRA	V MEDIO	CONCENTRAÇÃO	INTERVALO DE CONFIANÇA(P=5%)	C.V.%
AM01	26.1	22.11538	(19.6361 A 24.90911)	11.92
AM02	25.0	24.56514	(21.9041 A 27.57741)	11.55
AM03	34.5	9.51925	(7.7987 A 11.39761)	18.90
AM04	36.7	7.22426	(5.5934 A 8.98861)	23.49
AM05	42.6	1.85245*	(0.0 A 4.70221)*	
AM06	40.2	3.90054*	(2.3111 A 5.55271)*	
AM07	35.3	8.62055	(6.9376 A 10.45071)	20.38
AM08	37.3	6.55500	(4.9416 A 8.28841)	25.53
AM09	36.7	7.21240	(5.5799 A 8.97411)	23.53
AM10	29.5	14.00748	(13.9384 A 18.30971)	13.65
AM11	39.2	4.83926	(3.2550 A 6.51251)	33.66
AM12	30.2	15.00628	(12.5579 A 17.23581)	14.12
AM13	35.4	8.51238	(6.8337 A 10.33641)	20.58
AM14	34.3	9.45294	(7.9647 A 11.58091)	18.65
AM15	24.8	24.92840	(22.2396 A 27.97411)	11.50
AM16	32.3	12.09380	(10.2488 A 14.12601)	16.03
AM17	26.7	20.90017	(18.5076 A 23.56991)	12.16
AM18	21.6	33.84934	(30.4201 A 37.79471)	10.89
AM19	43.5	0.99354*	(0.0 A 4.70221)*	
AM20	46.0	0.0	(0.0 A 4.70221)*	
AM21	39.6	4.41582*	(2.8319 A 6.07831)*	
AM22	29.9	15.45957	(13.4240 A 17.72171)	13.90
AM23	18.1	49.12182	(44.1761 A 54.45871)	10.68
AM24	34.7	9.23789	(7.5295 A 11.10081)	19.33
AM25	24.2	26.46551	(23.4572 A 29.65541)	11.33
AM26	21.3	35.04001	(31.5036 A 39.11691)	10.86
AM27	28.4	17.87718	(15.6896 A 20.32141)	12.95
AM28	20.1	39.63824	(35.6702 A 44.24811)	10.82
AM29	19.5	42.12542	(37.9123 A 47.09031)	10.83
AM30	18.7	45.82744	(41.2345 A 51.21841)	10.85
AM31	21.9	32.81906	(29.4810 A 36.65281)	10.93
AM32	14.8	75.90732	(67.9794 A 86.18601)	12.24
AM33	16.2	61.67311	(55.2556 A 69.40651)	11.47
AM34	13.8	91.17082	(80.5125 A 104.67451)	13.25
AM35	14.8	76.00570	(67.6637 A 86.30351)	12.26
AM36	15.9	64.84403	(58.0231 A 73.10731)	11.63
AM37	22.4	31.38801	(28.1742 A 35.07011)	10.98
AM38	14.4	79.81058	(70.9144 A 90.86391)	12.56
AM39	33.8	10.26825	(8.5424 A 12.27081)	17.86
AM40	20.2	38.87430	(34.9759 A 43.39281)	10.82
AM41	14.1	83.79198	(74.2965 A 95.67041)	12.75
AM42	10.6	185.56715	(154.2574 A 232.75401)	21.16
AM43	11.8	132.52253	(114.1114 A 151.63051)	16.42
R3X	28.2	18.16473	(15.4543 A 20.63141)	12.86
R4X	14.4	79.82800	(70.9292 A 90.88481)	12.56
R12X	11.3	148.75366	(126.7417 A 179.69251)	17.80

←→ DOSE MINIMA DETECTAVEL = 4.7022 MICROUNIDADE/ML

TABELA XXVII

Resultados de concentração das amostras submetidas ao ensaio realizado à 37°C.

RADIOENSAIO DA INSULINA A TEMPERATURA=37 C

AMOSTRA	Y MEDIO	CONCENTRAÇÃO	INTERVALO DE CONFIANÇA(P=5%)	C.V.X
AM01	26.1	15.73108	(12.7247 A 19.2451)	20.72
AM02	24.0	22.61528	(16.6745 A 27.2231)	18.90
AM03	29.6	7.96002	(6.0457 A 10.2184)	26.21
AM04	32.1	4.27551	(2.9401 A 5.8657)	34.45
AM05	34.3	2.00179	(1.1032 A 3.1413)	50.91
AM06	35.0	1.47142	(0.7010 A 2.4794)	60.43
AM07	29.1	8.80106	(6.7635 A 11.1955)	25.20
AM08	32.5	3.77522	(2.5270 A 5.2890)	36.59
AM09	29.1	8.74277	(6.7137 A 11.1316)	25.27
AM10	28.8	9.43642	(7.3970 A 11.9396)	24.55
AM11	32.3	4.03499	(2.7411 A 5.5951)	35.42
AM12	24.5	20.81622	(17.1151 A 25.1374)	19.26
AM13	34.0	2.30298	(1.3384 A 3.5118)	47.19
AM14	24.8	7.49401	(5.6490 A 9.6740)	26.85
AM15	30.8	37.32100	(31.3683 A 44.3256)	17.36
AM16	28.3	10.38739	(8.1222 A 13.0458)	23.70
AM17	24.9	19.41713	(15.9095 A 23.9160)	19.59
AM18	19.1	48.81002	(41.2390 A 57.7753)	16.94
AM19	34.9	1.56479	(0.7704 A 2.5970)	58.37
AM20	40.6	0.0	(0.0 A 1.35361*)	
AM21	37.0	0.33224*	(0.0013 A 1.35361*)	
AM22	31.0	9.66432	(4.1005 A 7.5280)	30.26
AM23	17.0	87.39716	(57.1024 A 79.7167)	16.78
AM24	31.3	5.26612	(3.7661 A 7.0587)	31.26
AM25	22.4	28.92431	(24.1265 A 34.5469)	18.01
AM26	19.6	44.83558	(37.8298 A 53.1131)	17.04
AM27	24.1	22.23553	(18.3462 A 26.7828)	18.97
AM28	18.9	50.14052	(42.3789 A 59.3384)	16.91
AM29	17.3	64.34994	(54.5108 A 76.1040)	16.78
AM30	18.1	56.51660	(47.6325 A 66.8450)	16.82
AM31	20.3	40.58429	(34.1767 A 48.1373)	17.20
AM32	13.6	117.22239	(98.9826 A 139.6360)	17.34
AM33	16.9	68.55574	(58.0867 A 81.0419)	16.78
AM34	12.7	137.08555	(115.4344 A 163.9513)	17.70
AM35	17.4	63.52653	(53.8100 A 75.1288)	16.78
AM36	19.4	46.37533	(39.1513 A 54.9181)	17.00
AM37	22.7	27.67799	(23.0500 A 33.0587)	18.15
AM38	13.5	118.84464	(100.3312 A 141.6130)	17.37
AM39	33.5	2.72331	(1.6723 A 4.0241)	43.18
AM40	21.2	35.31992	(29.6443 A 41.9915)	17.48
AM41	13.6	117.54817	(99.2535 A 140.0329)	17.35
AM42	11.8	155.86532	(130.8708 A 187.1541)	18.06
AM43	11.4	171.08137	(143.2977 A 204.1020)	18.36
R3X	25.5	17.56492	(14.3087 A 21.3699)	20.10
R5X	17.5	62.24676	(52.7201 A 73.6141)	16.78
R12X	12.6	137.97191	(116.1654 A 165.0418)	17.71

*--> DOSE MINIMA DETECTAVEL = 1.3536 MICROUNIDADE/ML

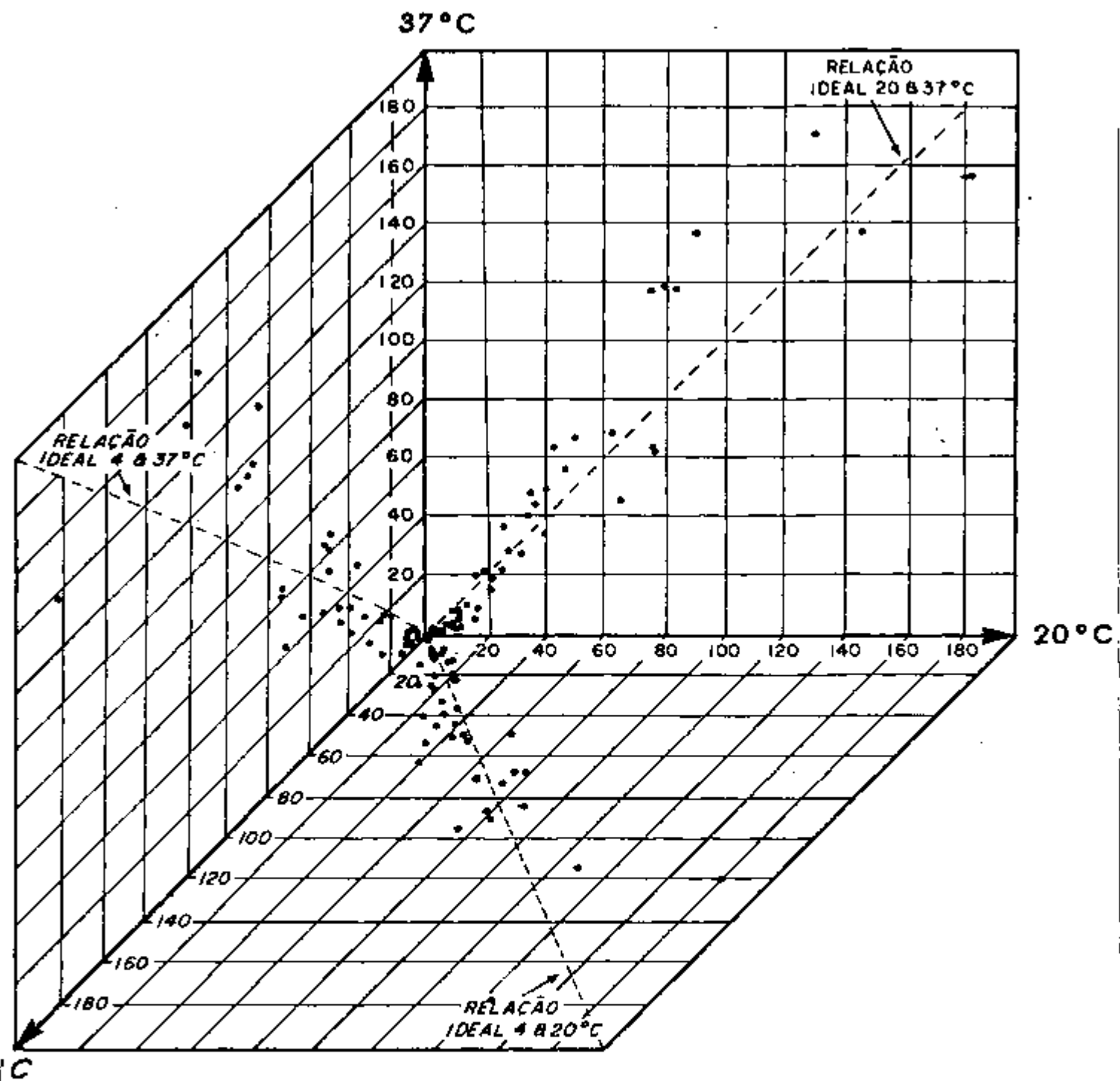


Figura 34a - Correlação de resultados dos radioimunoensaios da insulina realizados nas três diferentes temperatura.

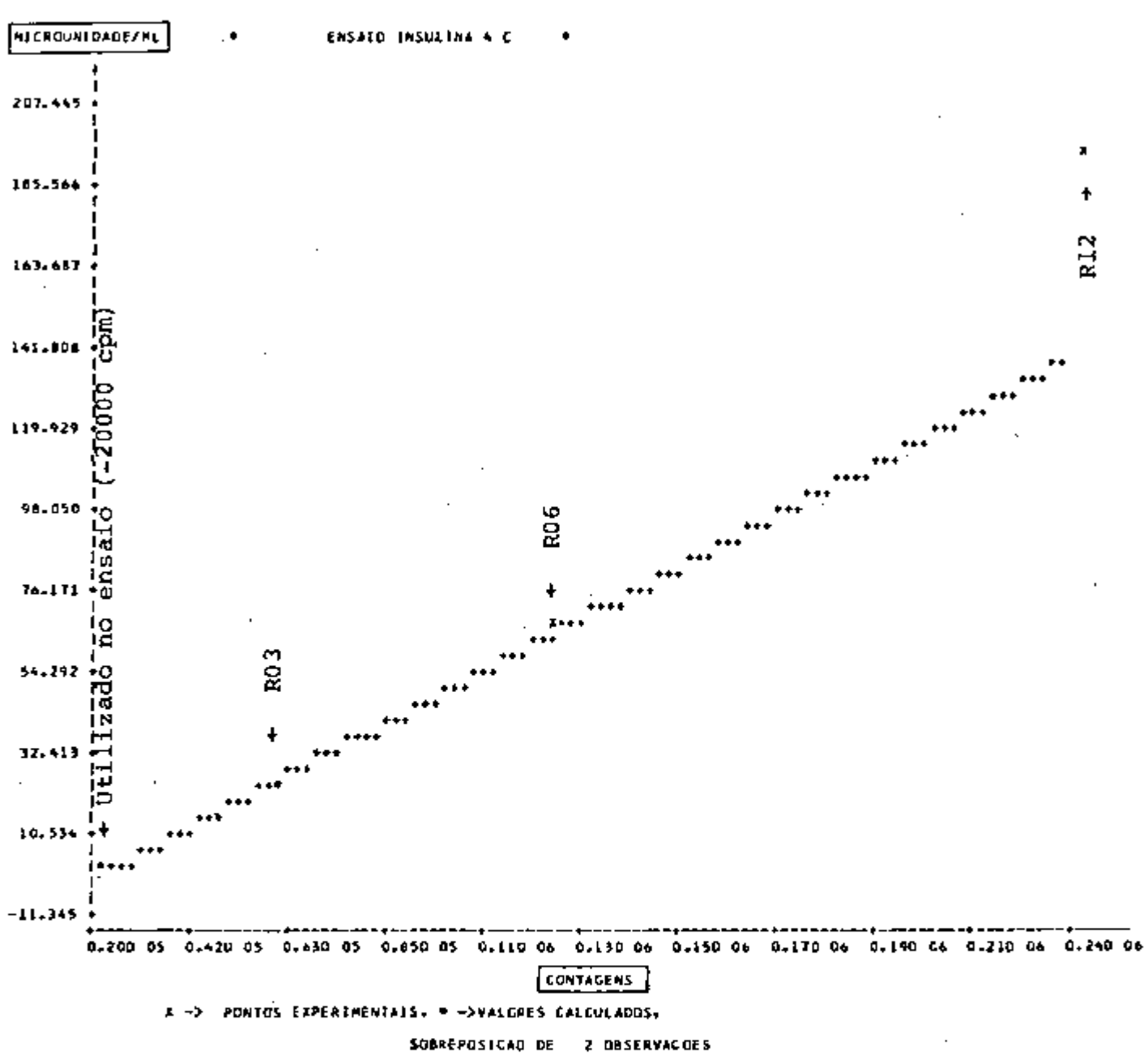


Figura 35 - Relação linear entre a atividade contida nos tubos utilizados para o cálculo da atividade específica (R03, R06 e R12) e as respectivas concentrações li das na curva de dose resposta. Temperatura 4°C.

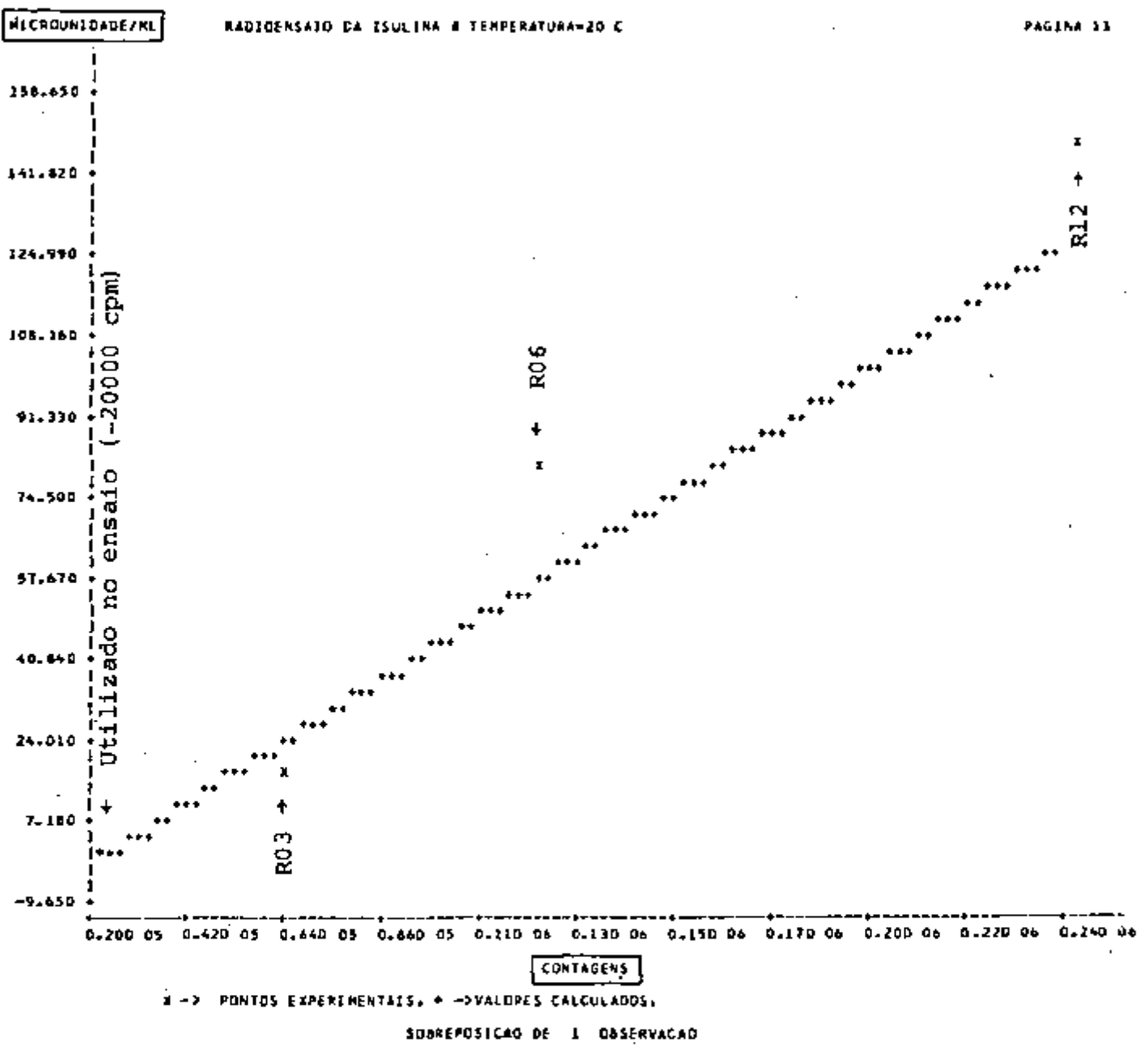
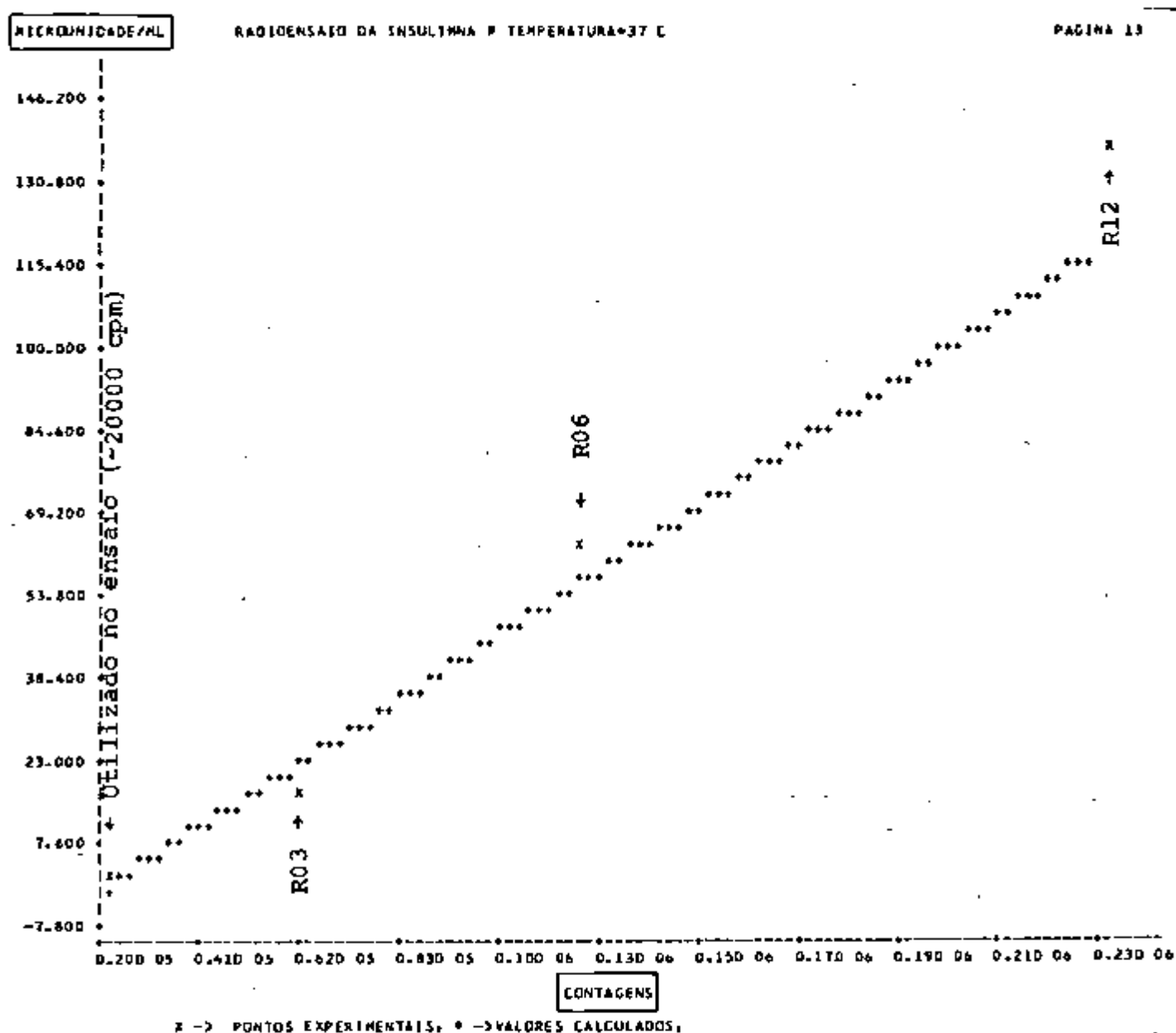


Figura 36 - Relação linear entre a atividade contida nos tubos utilizados para o cálculo da atividade específica (R03, R06 e R12) e as respectivas concentrações l_i das na curva de dose resposta. Temperatura 20°C.



As tabelas XXVIII, XXIX e XXX contêm as análises de variância dos ajustes lineares efetuados. Nestas tabelas, tanto o valor de F como os da probabilidade de F sugerem que a qualidade dos ajustes lineares foram adequados.

Abaixo do quadro da análise de variância encontram-se as estimativas da concentração da insulina- ^{125}I utilizada como traçador nos três experimentos e a atividade específica acompanhados dos respectivos desvios-padrão (incerteza na estimativa do parâmetro), do valor de 't' e da probabilidade de 't'.

Como nos três experimentos utilizou-se o mesmo radiotraçador, esperava-se que os valores pareados de $\{P^*\}$ (concentração da insulina- ^{125}I) e da atividade específica tivessem praticamente o mesmo valor.

4.9. DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES DE AFINIDADE PELO MÉTODO DE SCATCHARD E PRIORI E ROSENTHAL

4.9.1. CARACTERIZAÇÃO DA HETEROGENEIDADE DO LIGANTE Q

O comportamento não linear das curvas das figuras 38, 39 e 40 sugere que o antisoro utilizado nesses experimentos deve conter mais de um tipo de sítio de ligação. Adotou-se o modelo contendo um componente Q específico e saturável e outra população inespecífica e insaturável.

Submetendo-se os dados experimentais (B, B/F), oriundos da curva padrão, ao referido modelo (vide quadro D das tabelas XIII, XIV e XV) mediante o fornecimento das estimativas das respectivas constantes, obtiveram-se os resultados das constantes das tabelas XXXI, XXXII e XXXIII. Dos quadros da análise de variância dessas tabelas infere-se que o modelo adotado é satisfatório pois a soma dos quadrados referente ao resíduo, mostrou ser diminuto frente à soma dos quadrados relativos ao modelo ou ao do total (não corrigido).

4.9.2. DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES K_1 , q_1 e K_2q_2

Nas tabelas XXXI, XXXII e XXXIII registram-se os valores de K_1 , q_1 e do produto K_2q_2 com as res

TABELA XXVIII

Resultados do ajuste ponderado entre a média da radioatividade total adicionada nos tubos selecionados para a determinação da atividade específica versus a respectiva concentração lida na curva de dose resposta (tubos R03, R06 e R12).

ANALISE DA VARIANCIA - DISPERSAO
DETERMINACAO DA ATIVIDADE ESPECIFICA

FORTE	G.L	S.Q.	Q.M.	F	PROB F
MODELO	1	562.8326	562.8326	72.25	.1045D-01
RESIDUO	2	15.58035	7.790177	-	-
TOTAL	3	578.4130	-	-	-

PARAMETRO	ESTIMATIVA	DESVIO PADRAO	VALOR DE T	PROB T
IP*1	14.05904 µUI/ml	1.717129	8.187526	0.0114
ATIV.ESP	216.9657 CI/g	9.145374	23.72409	0.0013

TABELA XXIX

Resultados do ajuste ponderado entre a média da radioatividade total adicionada nos tubos selecionados para a determinação da atividade específica versus a respectiva concentração lida na curva de dose resposta (tubos R03, R06 e R12).

ANALISE DA VARIANCIA - DISPERSAO

DETERMINACAO DA ATIVIDADE ESPECIFICA

FONTE	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	PROB F
MODELO	1	415.9681	415.9681	21.58	.40220-01
RESIDUO	2	38.54659	19.27329	-	-
TOTAL	3	454.5147	-	-	-

PARAMETRO	ESTIMATIVA	DESVIO PADRAO	VALOR DE T	PROB T
IP#1	13.65850 μ UI/ml	1.788831	7.635433	0.0133
ATIV-ESP	238.8616 CI/g	11.71160	20.39530	0.0017

Resultados do ajuste ponderado entre a média da radioatividade total adicionada nos tubos selecionados para a determinação da atividade específica versus a respectiva concentração lida na curva de dose resposta (tubos R03, R06 e R12).

TABELA XXX

ANALISE DA VARIANCIA - DISPERSAO

DETERMINACAO DA ATIVIDADE ESPECIFICA

FONTE	G.L	S.Q.	Q.M.	F	PROB F
MODELO	1	299.7763	299.7763	52.46	.1504D-01
RESIDUO	2	11.42780	5.713901	-	-
TOTAL	3	311.2041	-	-	-

PARAMETRO ESTIMATIVA DESVIG PADRAO VALOR DE T PROB T

P*	12.35425	µUI/ml	1.760664	7.016812	0.0162
ATIV.ESP	247.7708	CI/g	14.31039	17.31405	0.0023

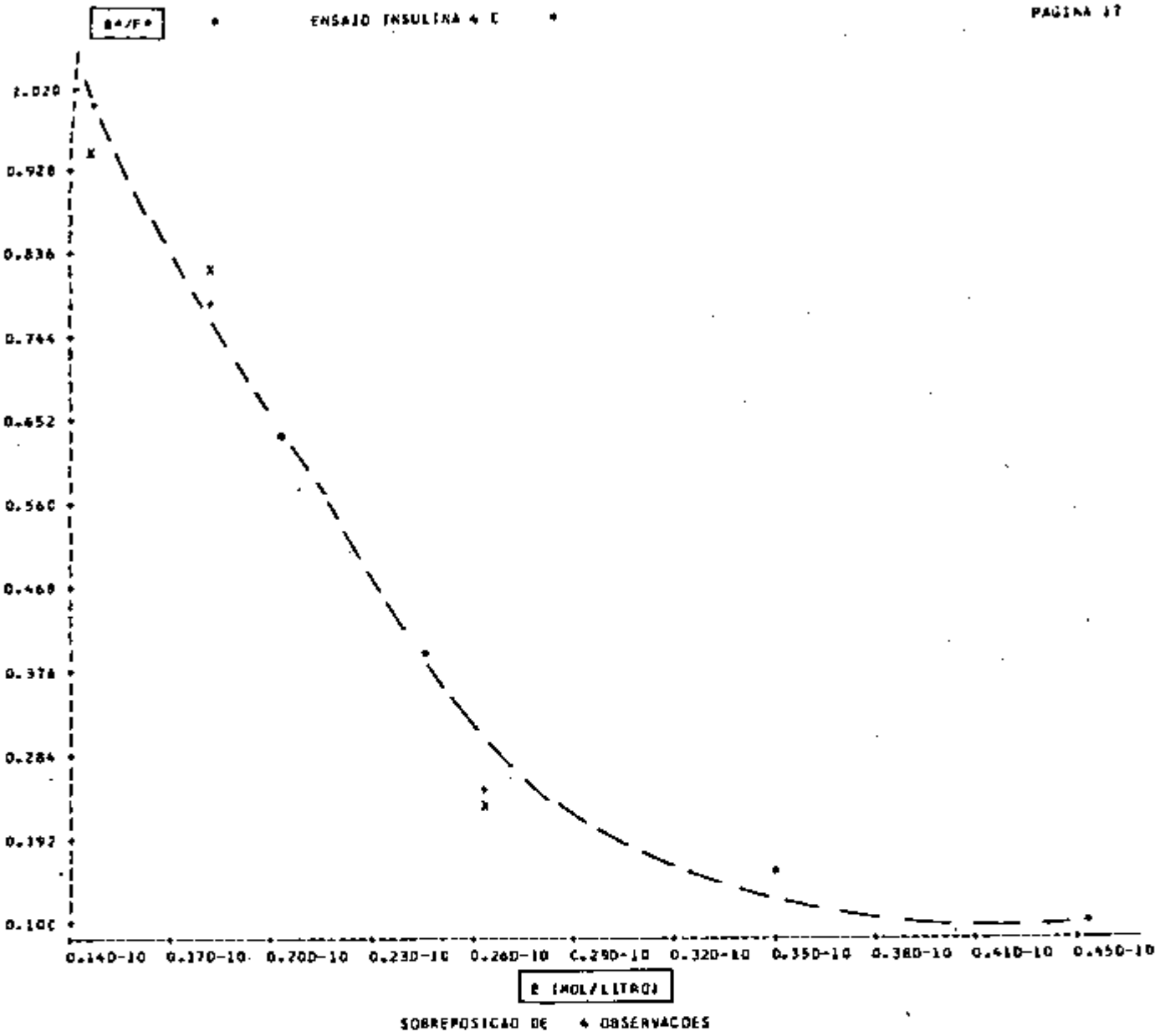


Figura 38 - Traçado da curva de Scatchard do ensaio da insulina incubado à 4°C. O sinal '+' corresponde ao valor teórico calculado a partir dos valores de K_1 , q_1 e K_2 constantes na tabela XXXI. O sinal 'x' corresponde ao valor experimental extraído dos resultados da curva de dose resposta, tabela XIX (MÉDIA Y(OBS)).

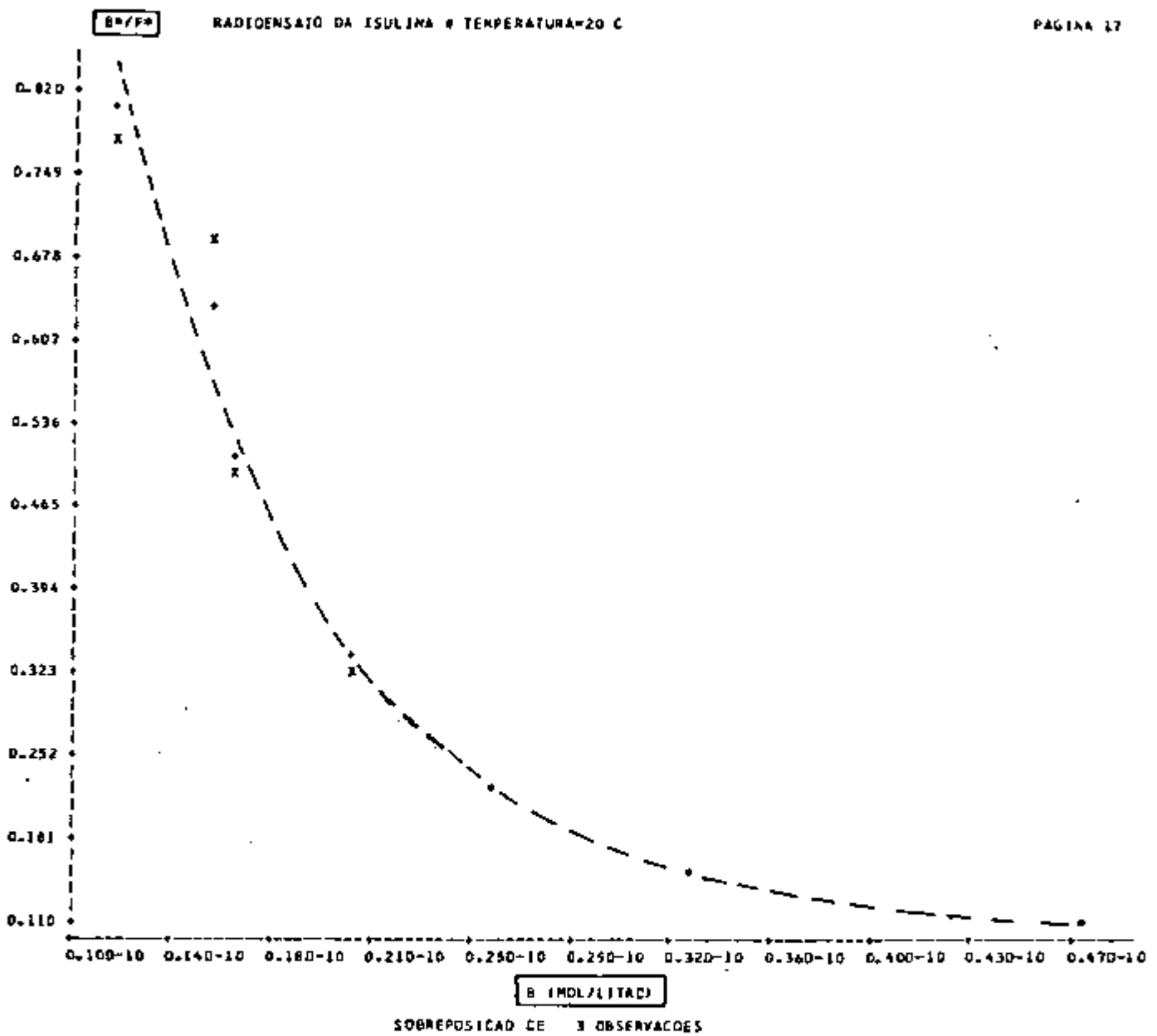


Figura 39 - Traçado da curva de Scatchard do ensaio da insulina incubado a 20°C. O sinal '+' corresponde ao valor teórico calculado a partir dos valores de K_1 , q_1 e K_2 constantes na tabela XXXII. O sinal 'x' corresponde ao valor experimental extraído dos resultados da curva de dose resposta, tabela XX (MÉDIA Y(OBS)).

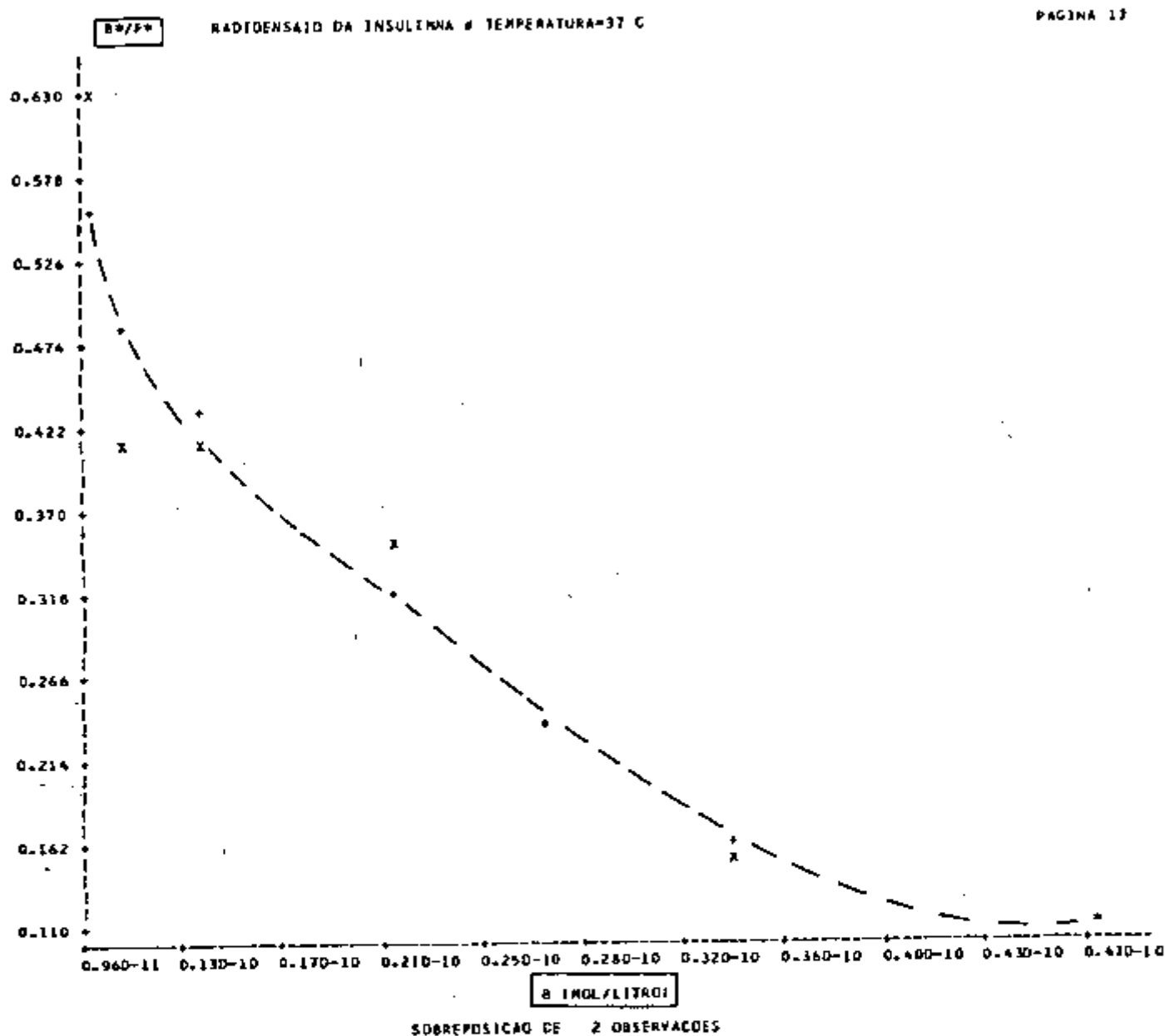


Figura 40 - Traçado da curva de Scatchard do ensaio da insulina incubado à 37°C. O sinal '+' corresponde ao valor teórico calculado a partir dos valores de K_1 , q_1 e K_2 constantes na tabela XXXIII. O sinal 'X' corresponde ao valor experimental extraído dos resultados da curva de dose resposta, tabela XXI (MÉDIA Y(OBS)).

TABELA XXXI

Resultados da análise de Scatchard (determinação das constantes de equilíbrio K e concentrações dos reagentes ligantes Q). Ensaio realizado a 4°C.

* ENSAIO INSULINA 4 C *

INFORMACOES ESTADISTICAS MINIMOS QUADRADOS NAO LINEAR

FORTE	G.L.	SOMA DOS QUADRADOS	QUADRADOS MEDIOS
MODELO	3	0.28285284	0.942842810-01
RESIDUO	4	0.252975310-03	0.630938280-04
TOTAL (NAO CORRIGIDO)	7	0.28310522	
TOTAL (CORRIGIDO)	6	0.825059500-01	

NUMERO DE EXPERIENCIAS CORRIDAS= 4

CONSTANTES	VALOR ESTIMADO	ERRO PADRAO ASSINTOTICO	
K(1)	0.86028051150 11	0.17947449100 11	
Q(1)	0.74887362890-10	0.17937877180-11	
K(2)	0.47273888010-01	0.71852080890-02	
OBSV	VALOR FORNECIDO	VALOR CALCULADO	RESIDUO
1	0.48716540 00	0.50091550 00	-0.13750120-01
2	0.44841500 00	0.43719480 00	0.11220210-01
3	0.38950250 00	0.38482670 00	0.46758110-02
4	0.28874280 00	0.28143310 00	0.53096690-02
5	0.18685630 00	0.19891360 00	-0.12057320-01
6	0.13886670 00	0.13494870 00	0.39380070-02
7	0.53940300-01	0.96055180-01	-0.11487480-03

TABELA XXXII

Resultados da análise de Scatchard (determinação das constantes de equilíbrio K e concentrações dos reagentes ligantes Q). Ensaio realizado à 20°C.

RADIOENSAIO DA ISULINA A TEMPERATURA=20 C

INFORMACOES ESTADISTICAS MINIMOS QUADRADOS NAO LINEAR

FONTE	G.L.	SOMA DOS QUADRADOS	QUADRADOS MEDIOS
MODELO	3	0.26116704	0.870556810-01
RESIDUO	4	0.249017230-03	0.607543020-04
TOTAL (NAO CORRIGIDO)	7	0.26141006	
TOTAL (CORRIGIDO)	6	0.626369470-01	

NUMERO DE ITERACOES DECORRIDAS= 3

CONSTANTES	VALOR ESTIMADO	ERRO PADRAO ASSINTOTICO
K(1)	0.04625734860 11	2107976864.
Q(1)	0.19590632530-10	0.13834708160-12
K(2)	0.65348218930-01	0.21514621270-02

OBSV.	VALOR FORNECIDO	VALOR CALCULADO	RESIDUO
1	0.43627970 00	0.44769290 00	-0.111413200-01
2	0.40958550 00	0.38641360 00	0.223171930-01
3	0.32905310 00	0.33868410 00	-0.46309800-02
4	0.24544640 00	0.24993900 00	-0.44925950-02
5	0.18533450 00	0.18255620 00	0.27783520-02
6	0.13102140 00	0.13153080 00	-0.50538990-03
7	0.99428270-01	0.99304200-01	0.12407570-03

TABELA XXXIII

Resultados da análise de Scatchard (determinação das constantes de equilíbrio K e concentrações dos reagentes ligantes Q). Ensaio realizado à 37°C.

RADIENSAO DA INSULINA A TEMPERATURA=37 C

INFORMACOES ESTADISTICAS MINIMOS QUADRADOS NAO LINEAR

FONTE	G.L.	SOMA DOS QUADRADOS	QUADRADOS MEDIOS
MODELO	3	0.39823815	0.13274605
RESIDUO	4	0.193270800-02	0.483177000-03
TOTAL (NAO CORRIGIDO)	7	0.40017086	
TOTAL (CORRIGIDO)	6	0.604940670-01	

NUMERO DE ITERACOES OCORRIDAS= 3

CONSTANTES	VALOR ESTIMADO	ERR PADRAO ASSINTOTICO
K(2)	0.29783783520 11	0.16292879810 11
Q(1)	0.74747563900-10	0.93716561770-11
K(2)	0.59427496370-01	0.34638656730-01

DSV	VALOR FORNECIDO	VALOR CALCULADO	RESIDUO
1	0.38528990 00	0.35723880 00	0.28051170-01
2	0.29211440 00	0.32672120 00	-0.34606760-01
3	0.29211440 00	0.30059810 00	-0.84837140-02
4	0.25706770 00	0.24261470 00	0.14452930-01
5	0.19300640 00	0.18756100 00	0.56453680-02
6	0.13532630 00	0.13763430 00	-0.23079490-02
7	0.10010510 00	0.10211180 00	-0.20067260-02

pectivas incertezas definidos pelos erros padrão assintóticos.

A seguir registram-se os valores experimentais da razão B/F, seus valores calculados teoricamente e os respectivos resíduos.

4.9.3. CURVA DE DOSE-RESPOSTA TEÓRICA ESTIMADA A PARTIR DE K_1 , q_1 E K_2q_2 PARA TESTE DE CONSISTÊNCIA

As figuras 41, 42 e 43 mostram as curvas padrão para os três ensaios, calculadas por expressão teórica (vide rodapé, ítem 2.4) contendo as constantes de ajustes K_1 , q_1 e K_2q_2 . Em todas as três figuras observa-se adequado ajuste entre os pontos experimentais ('X' ou '*') e os calculados ('+').

Complementando essas observações, verifica-se estreita semelhança entre os resultados contidos nas figuras 26, 27 e 28, reforçando portanto a provável exatidão dos resultados das constantes K e q obtidas.

4.9.4. TRAÇADO GRÁFICO DA CURVA DE SCATCHARD - B VERSUS B/F

As figuras 38, 39 e 40 mostram as curvas de Scatchard ('Scatchard plot') referentes aos três experimentos do radioimunoensaio da insulina. Estas figuras têm a finalidade de auxiliar na escolha do modelo analítico a adotar e indicam o grau de heterogeneidade do ligante Q.

Nestas figuras comparam-se os pontos experimentais ('X') e calculados teoricamente ('+') com o objetivo de testar a consistência do modelo adequado à semelhança do que se fez no ítem 4.9.3.

4.10. ASPECTOS TERMODINÂMICOS DA REACÃO INSULINA + ANTICORPO ANTI-INSULINA

A tabela XXXIV mostra a entrada de dados para o programa GARLA. A palavra em destaque 'TERM' indica o programa

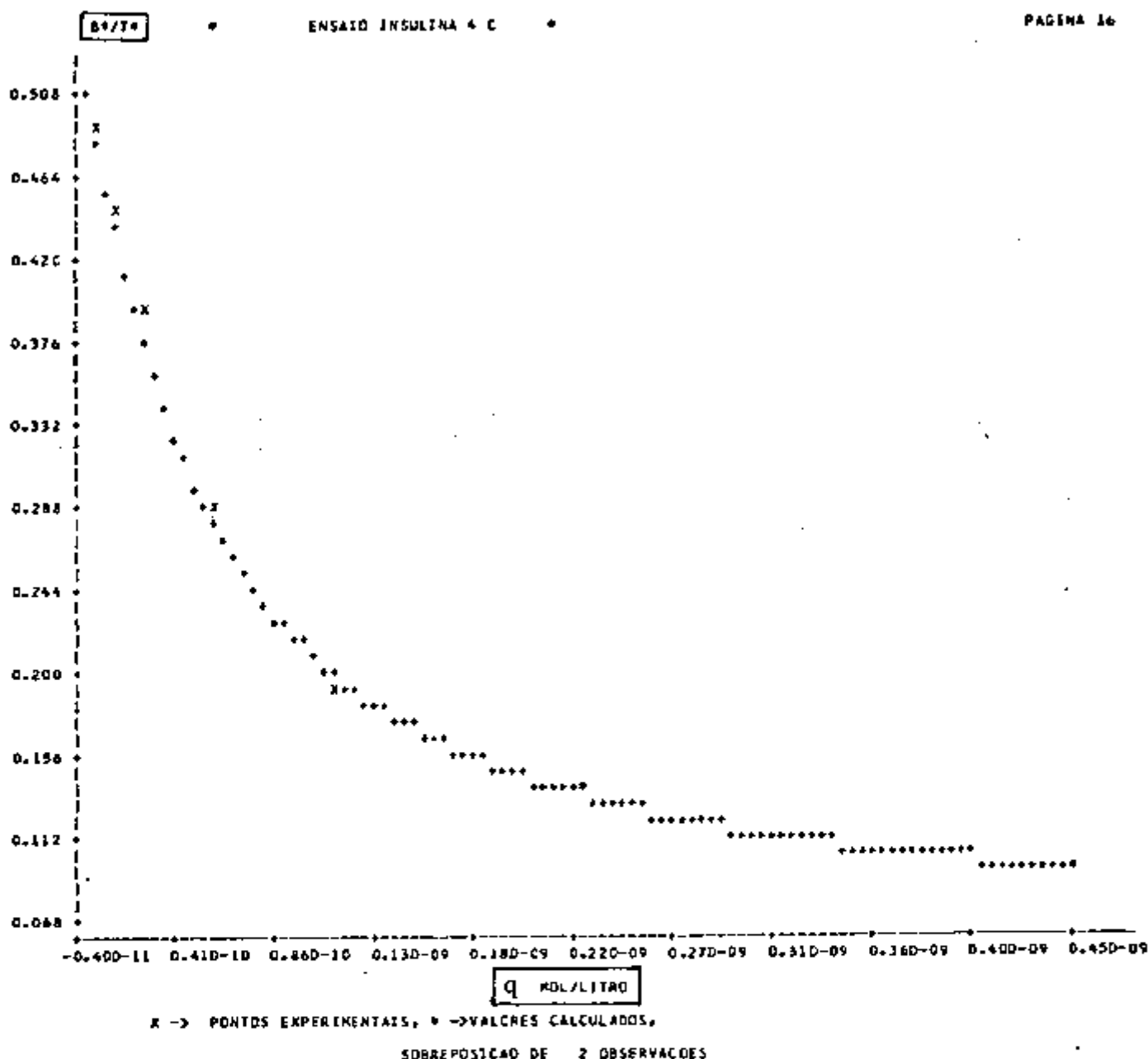


Figura 41 - Curva padrão do ensaio realizado à 4°C traçada a partir de modelo teórico levando-se em conta as constantes K_1 , K_2 e q_1 da tabela XXXI. Observar semelhança desta curva com a da figura nº 26.

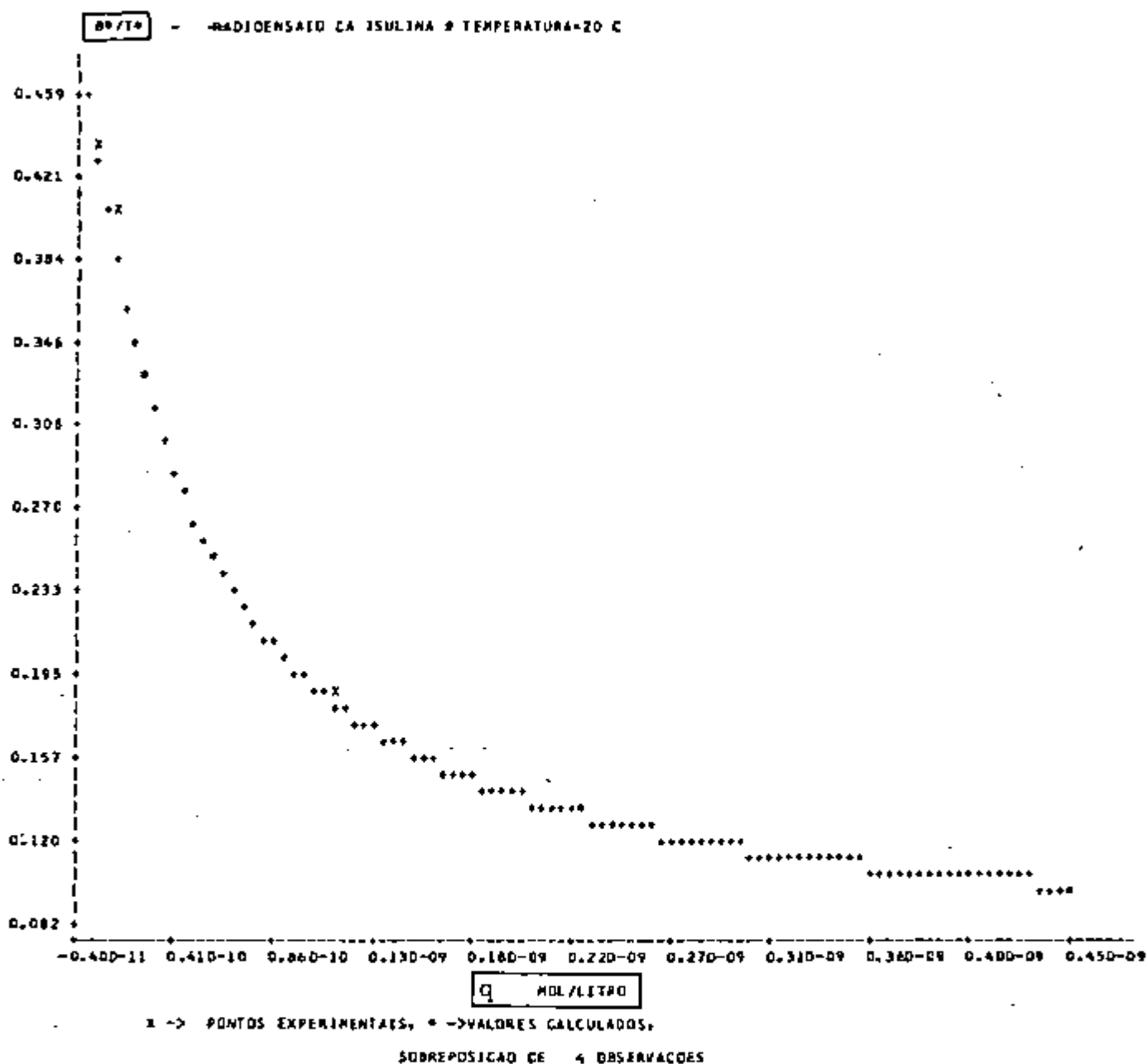


Figura 42 - Curva padrão do ensaio realizado a 20°C traçada a partir de modelo teórico, levando-se em conta as constantes K_1 , K_2 e q da tabela XXXII. Observar semelhança desta curva com a da figura nº 27.

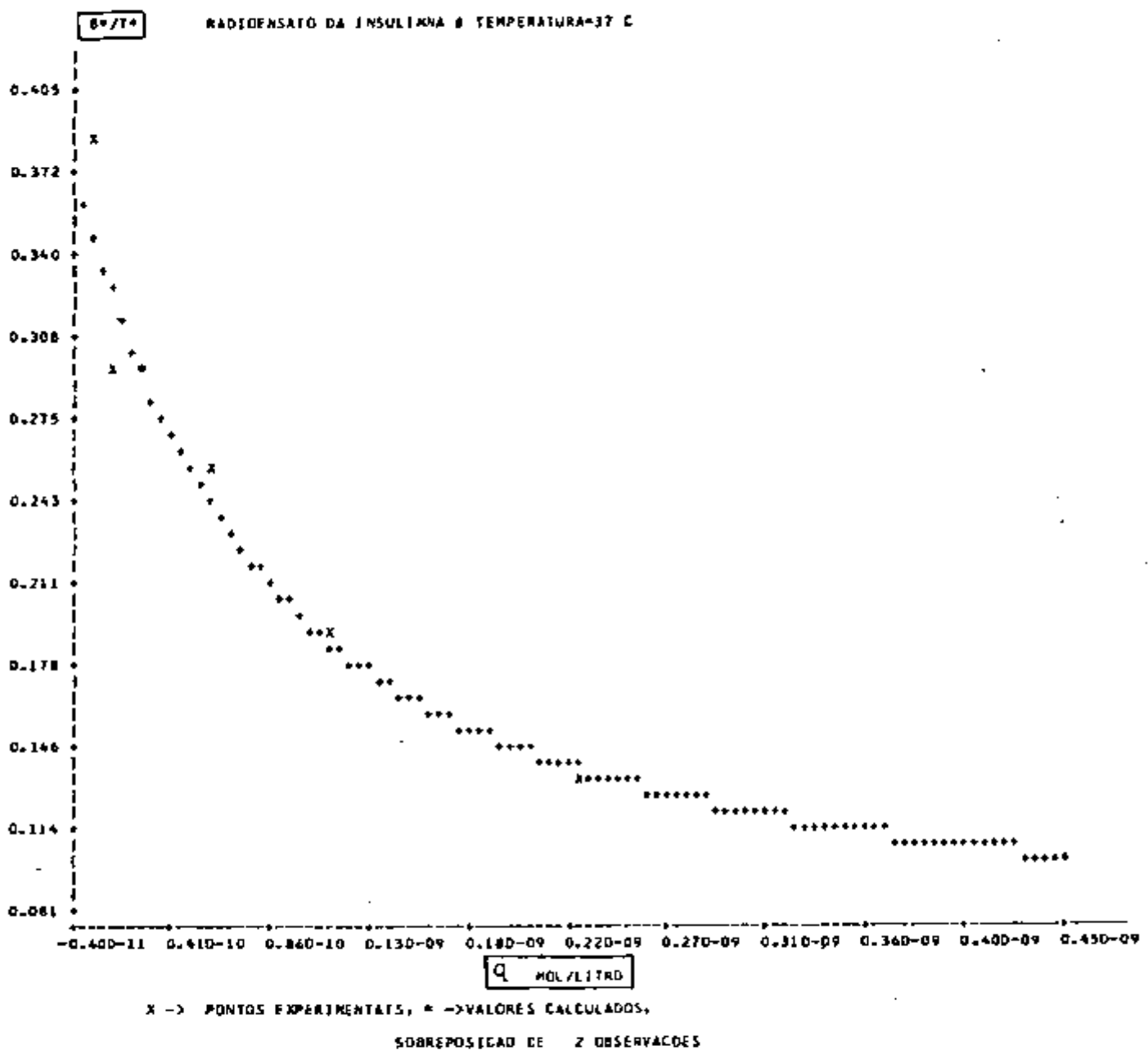


Figura 43 - Curva padrão do ensaio realizado à 37°C traçada a partir de modelo teórico, levando-se em conta as constantes K_1 , K_2 e q_1 da tabela XXXIII.

Observar semelhança desta curva com a da figura nº 28.

TABELA XXXIV

Entrada de dados para os cálculos da análise termodinâmica

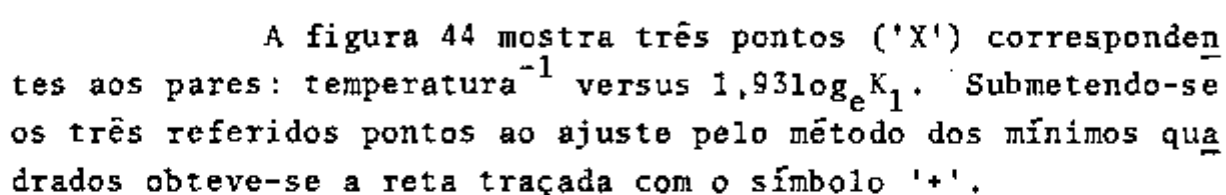
```
TERM
:
TEXTO PARA IDENTIFICACAO
*  ANALISE  TERMODINAMICA  *
:
T&K  -  TEMPERATURA( C)  E  K(LITROS/MOL)
:      -----
:              4              86.0D+9
:              20             84.6D+9
:              37             29.8D+9
:
: FIM DA ENTRADA DE DADOS
```

ma que os dados a seguir pertencem ao módulo de cálculo específico para calcular os parâmetros termodinâmicos.

A palavra 'T&K' indica ao programa que os valores a seguir correspondem respectivamente aos pares: temperatura de incubação e constante K_1 .

Os valores de K_1 contidos na tabela XXXIV são aqueles registrados nas tabelas XXXI, XXXII e XXXIII.

4.10.1. TRAÇADO GRÁFICO DA RELAÇÃO T^{-1} ($^{\circ}K$) VERSUS $R \cdot \log_e K$

A figura 44 mostra três pontos ('X') correspondentes aos pares: temperatura⁻¹ versus $1,93 \log_e K_1$. Submetendo-se os três referidos pontos ao ajuste pelo método dos mínimos quadrados obteve-se a reta traçada com o símbolo '+'.


Na tabela XXXV encontra-se a análise de variância do ajuste linear e os valores calculados da entropia e entalpia da reação, com seus respectivos desvios-padrão e probabilidade de 't' para a avaliação da consistência do ajuste.

4.10.2. REPERCUSSÃO DA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO SOBRE O TRAÇADO DA CURVA PADRÃO

As figuras 45 e 46 mostram curvas padrão teóricas, calculadas a partir da variação de K em função da temperatura. Na figura 45 as curvas são projetadas em escala linear (concentração) versus linear ($Y = B/T$), enquanto na figura 46 projetam-se as curvas em escala logarítmica (concentração) versus linear ($Y = B/T$). Nas figuras 45 e 46 as curvas traçadas com o sinal 'E', representam a curva do ensaio experimental realizado à temperatura de $4^{\circ}C$.

4.11. ESTUDO DA REPRODUTIBILIDADE DE PARÂMETROS DO RADIOENSAIO DA INSULINA

Objetivando verificar a viabilidade prática do programa GARLA para o controle de qualidade inter-ensaio, reali

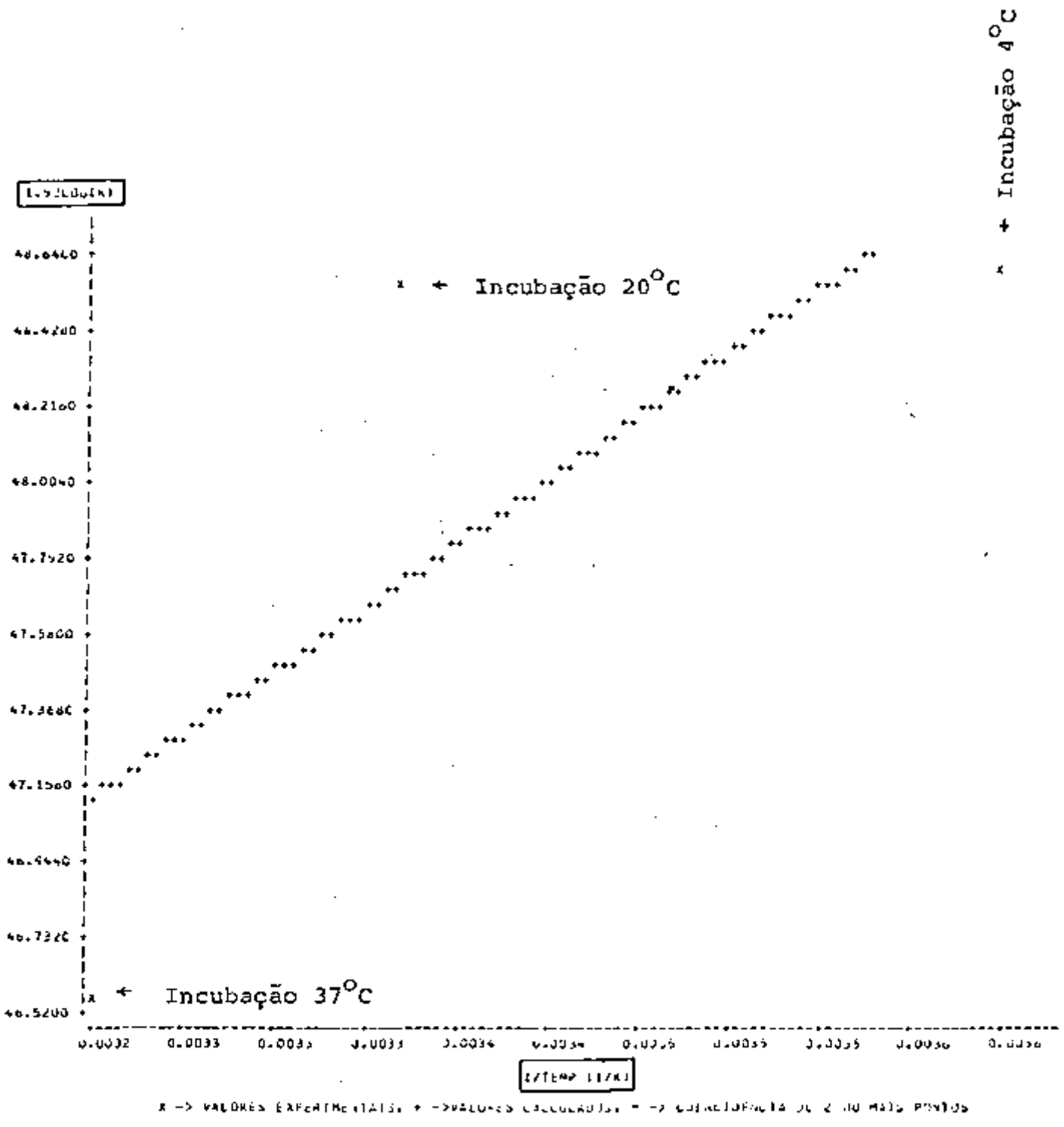


Figura 44 - Gráfico que relaciona o inverso da temperatura de incubação (em °K⁻¹) versus 1,93.logK.

TABELA XXXV

Análise de variância do ajuste linear da figura 44 e os resultados dos parâmetros de regressão: entalpia e entropia.

ANÁLISE DA DISPERSÃO - VARIÂNCIA						
FONTE	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	PRÓB. F	
MODELO	1	1.756035	1.756035	1.463	.4416	
RESÍDUO	1	1.201816	1.201816	-	-	
TOTAL	2	2.957853	-	-	-	

PARÂMETRO	ESTIMATIVA	DESVIO PADRÃO	VALOR DE T	PRÓB. T
ENTALPIA	34.15 Cal/mol/K	17.3977	1.963	0.3061
ENTROPIA	4801. Cal/mol	2021.19	1.326	0.4139

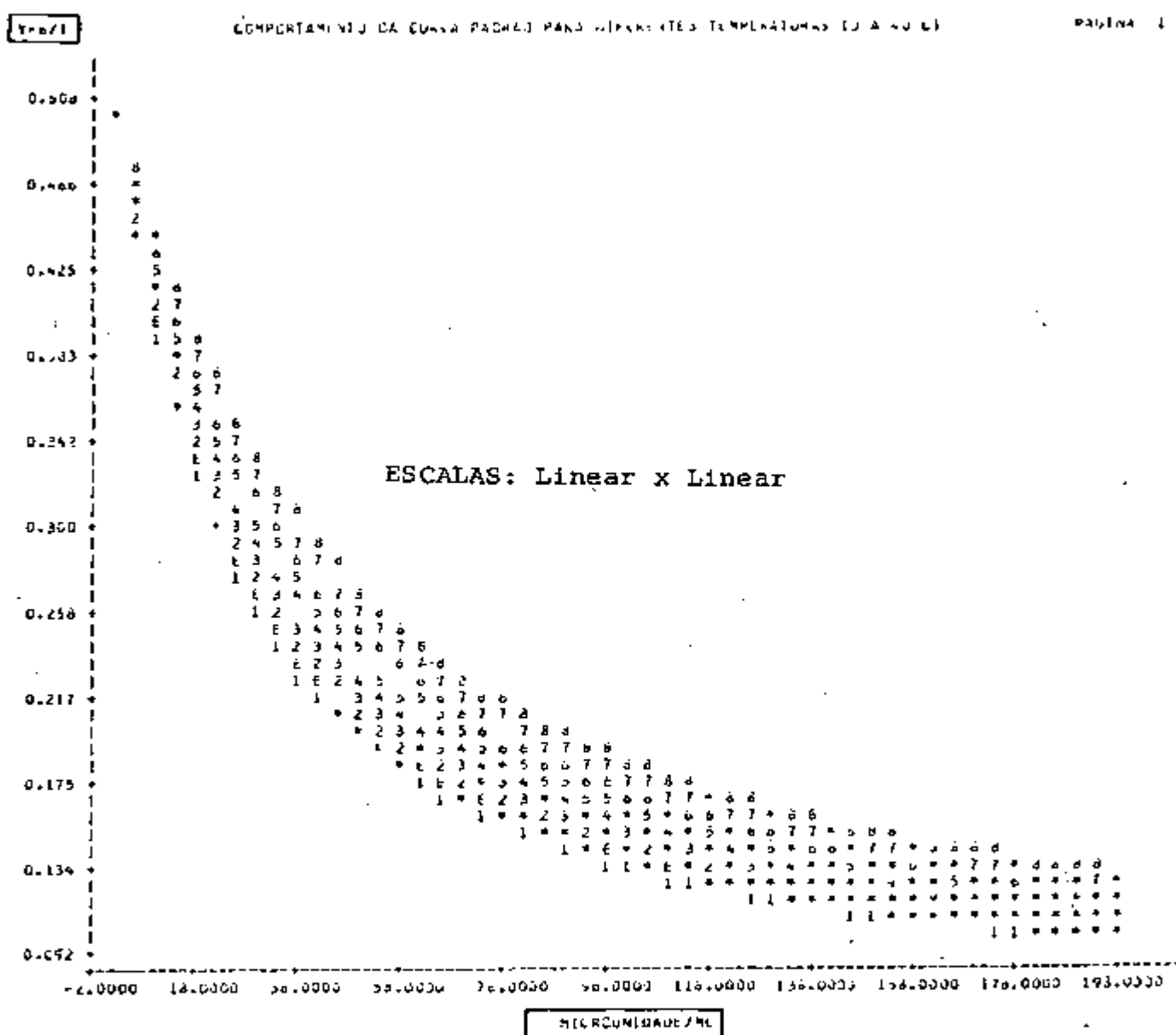


Figura 45 - Curvas de dose resposta teóricas utilizando-se do protocolo definido na figura nº 16, variando-se a temperatura de incubação.

- 1 - Incubação à 0°C
- 2 - Incubação à 10°C
- 3 - Incubação à 15°C
- 4 - Incubação à 20°C
- 5 - Incubação à 25°C
- 6 - Incubação à 30°C
- 7 - Incubação à 35°C
- 8 - Incubação à 40°C
- E - Incubação à 4°C (a mesma do ensaio)

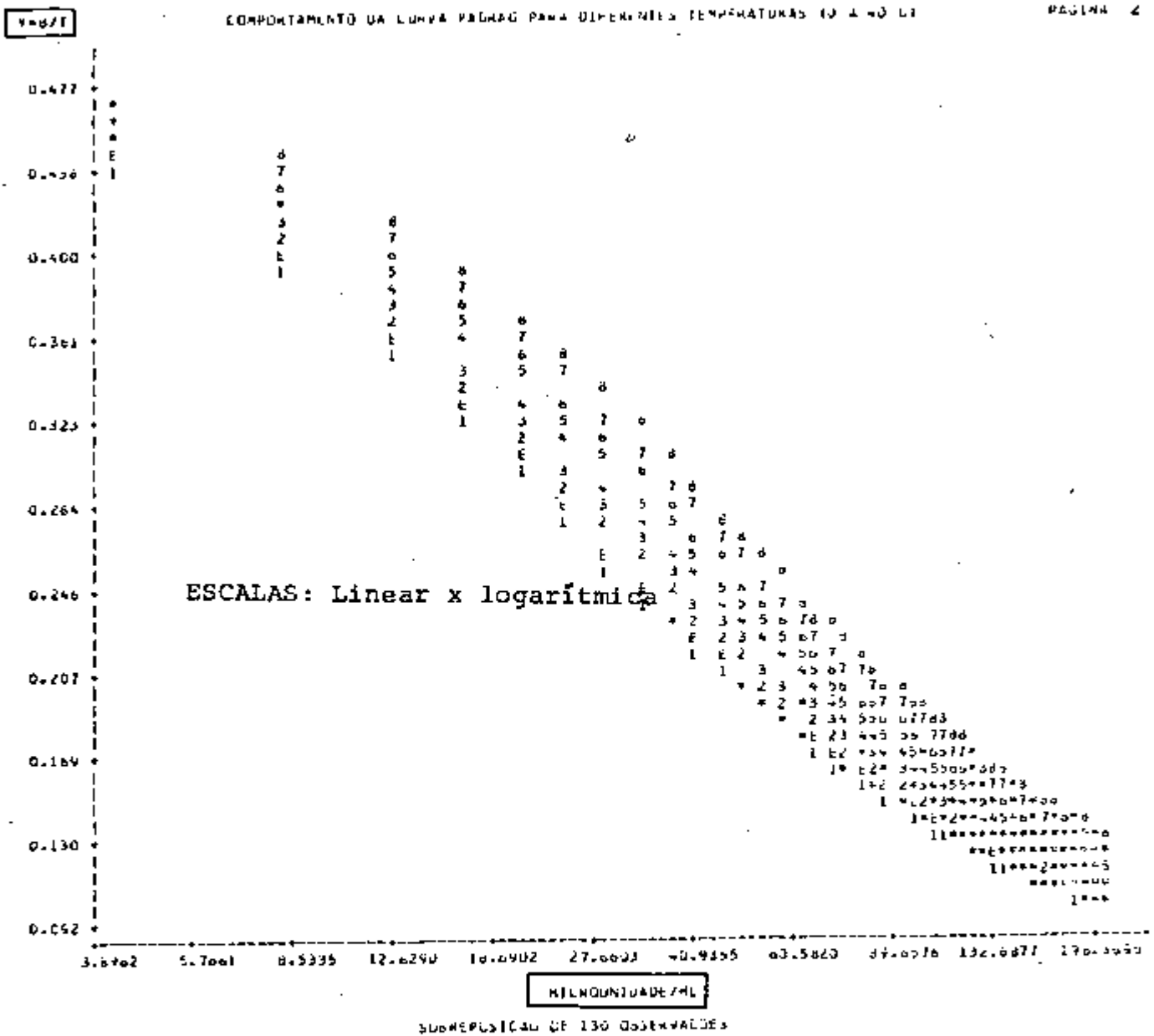


Figura 46 - Curvas de dose respostas teóricas utilizando-se do protocolo definido na figura 16, variando-se a temperatura de incubação.

- 1 - Incubação à 0°C
- 2 - Incubação à 10°C
- 3 - Incubação à 15°C
- 4 - Incubação à 20°C
- 5 - Incubação à 25°C
- 6 - Incubação à 30°C
- 7 - Incubação à 35°C
- 8 - Incubação à 40°C
- E - Incubação à 4°C (a mesma do ensaio)

zaram-se numerosas dosagens, ao conjunto das quais aplicou-se o sistema computacional no que respeita aos diferentes parâmetros.

As figuras 47, 48, 49, 50 e 51 caracterizam as dispersões inter-ensaio peculiares aos diferentes parâmetros seccionados.

Todos esses ensaios foram realizados à temperatura de 4°C, pois esta temperatura de incubação resultou ser a mais adequada (vide figuras 45 e 46).

4.12. DISTRIBUIÇÃO DO TEMPO GASTO PARA PROCESSAR OS DADOS NUMÉRICOS

A tabela XXXV mostra uma estimativa do tempo gasto pela Unidade Central de Processamento (CPU) do computador utilizado para as diversas fases de cálculos e o respectivo tempo estimado para digitar os dados numéricos experimentais.

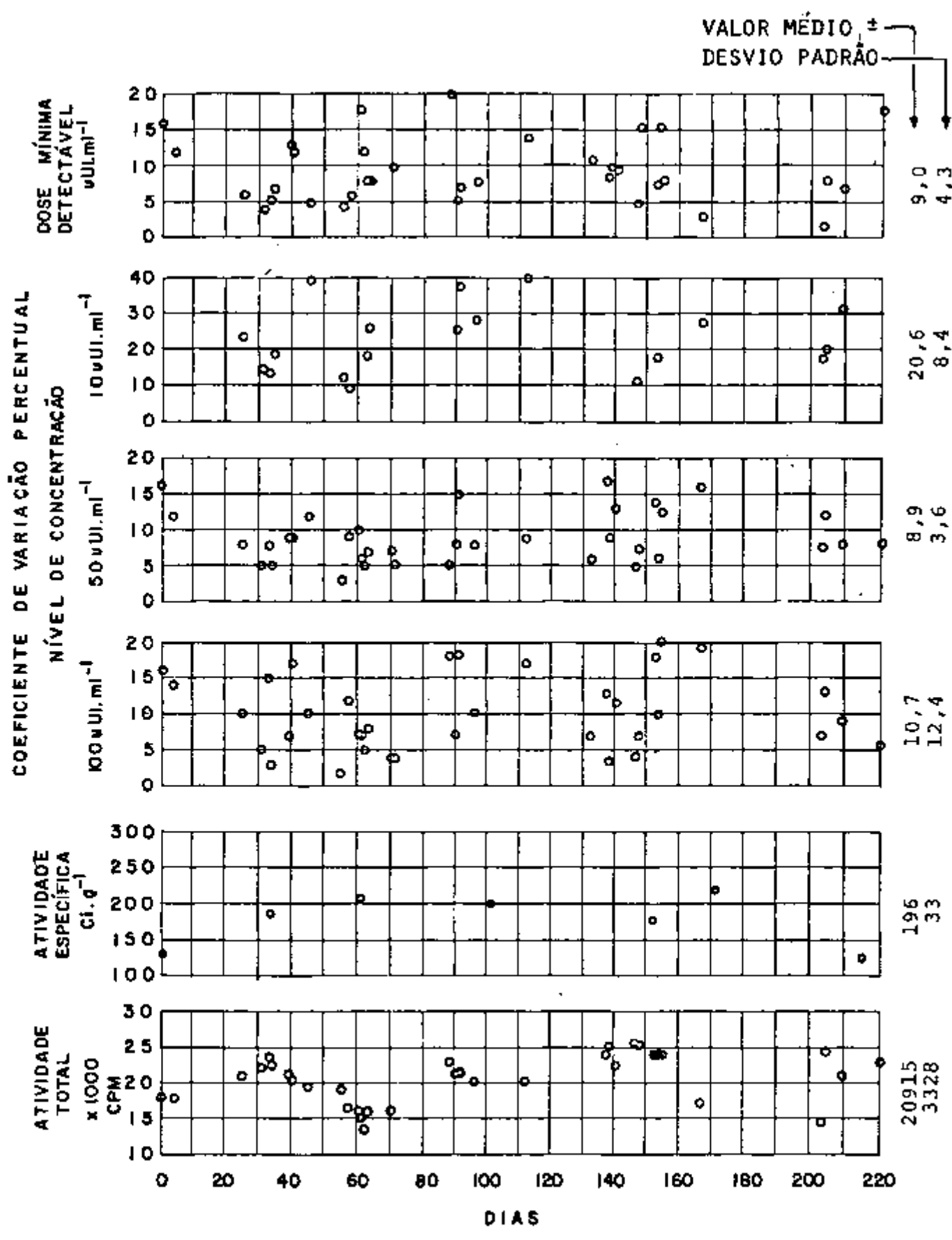


Figura 47 - Controle da dispersão inter-ensaio de alguns parâmetros do radioensaio da insulina. (continua)

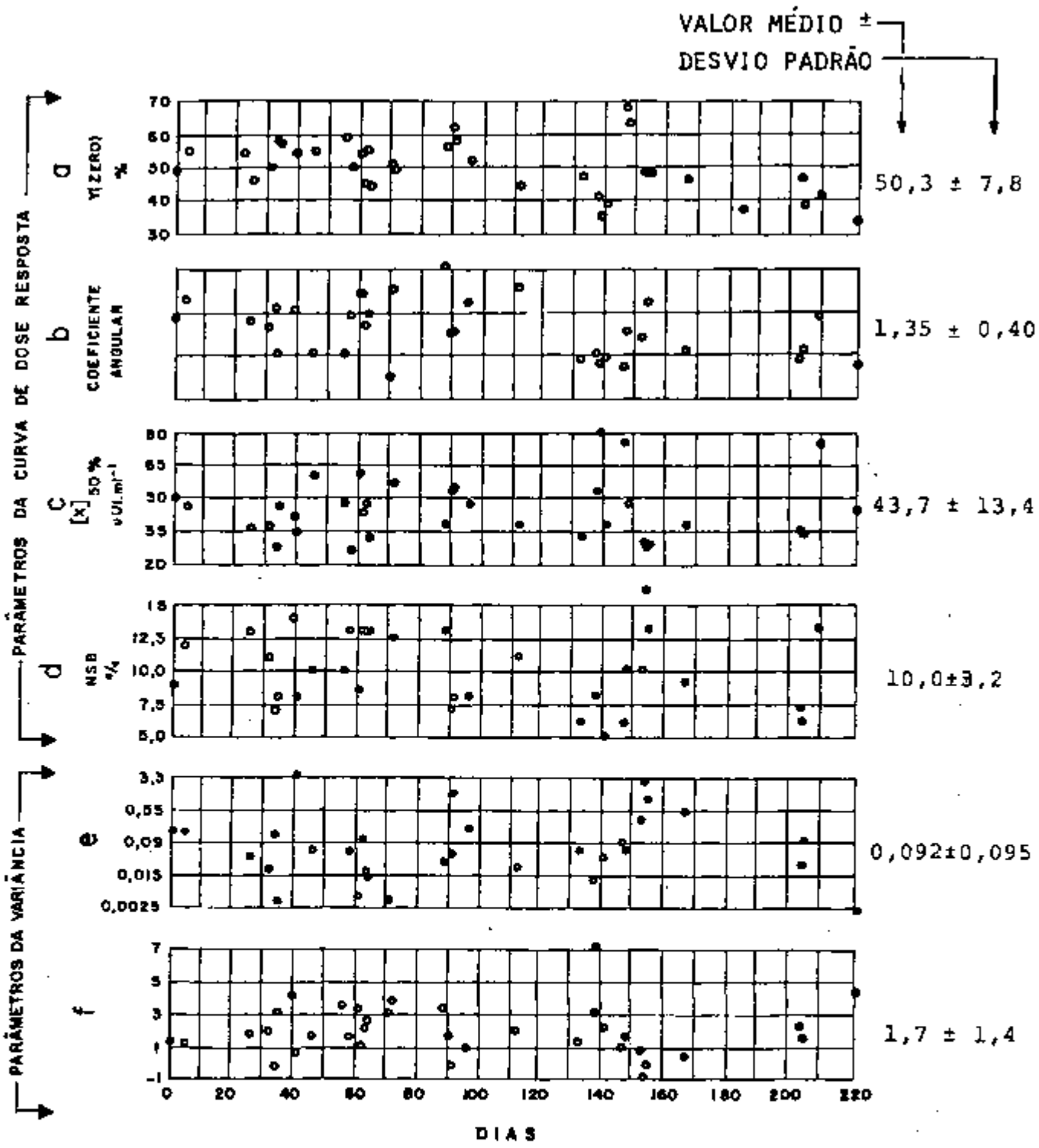


Figura 48 - Controle da dispersão inter-ensaio de alguns parâmetros do radioensaio da insulina. (continua)

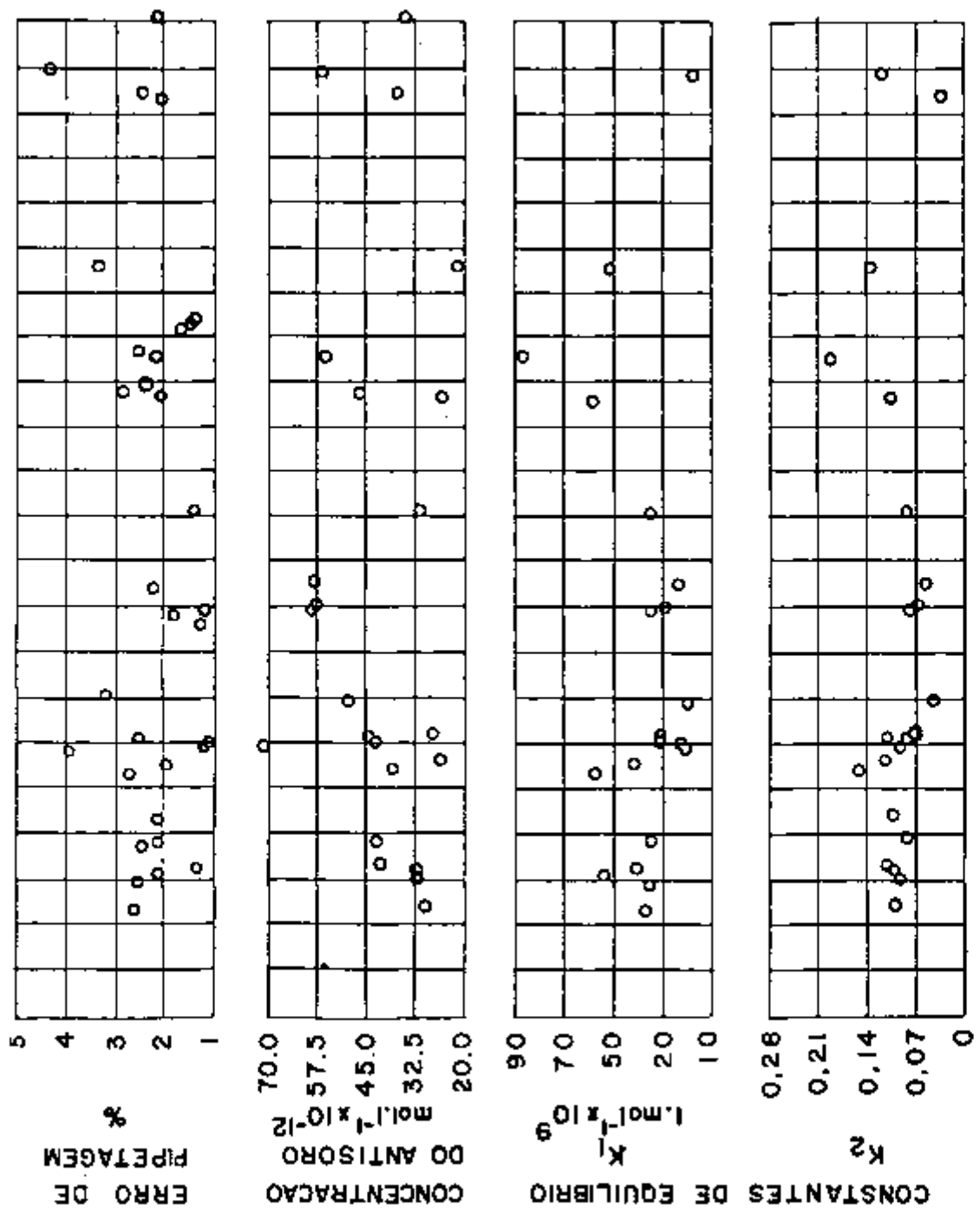
VALOR MÉDIO ±
DESVIO PADRÃO

1,9 ± 0,5 %

$20 \times 10^{-12} \pm 14 \times 10^{-12}$

$85 \times 10^{-9} \pm 13 \times 10^{-9}$

0,15 ± 0,17



DIAS

Figura 49 - Controle da dispersão inter-ensaio de alguns parâmetros do radioensaio da insulina.

VALOR MÉDIO ±
DESVIO PADRÃO

97 ± 12 (16%)

59 ± 13 (22%)

2,2 ± 1,8 (82%)

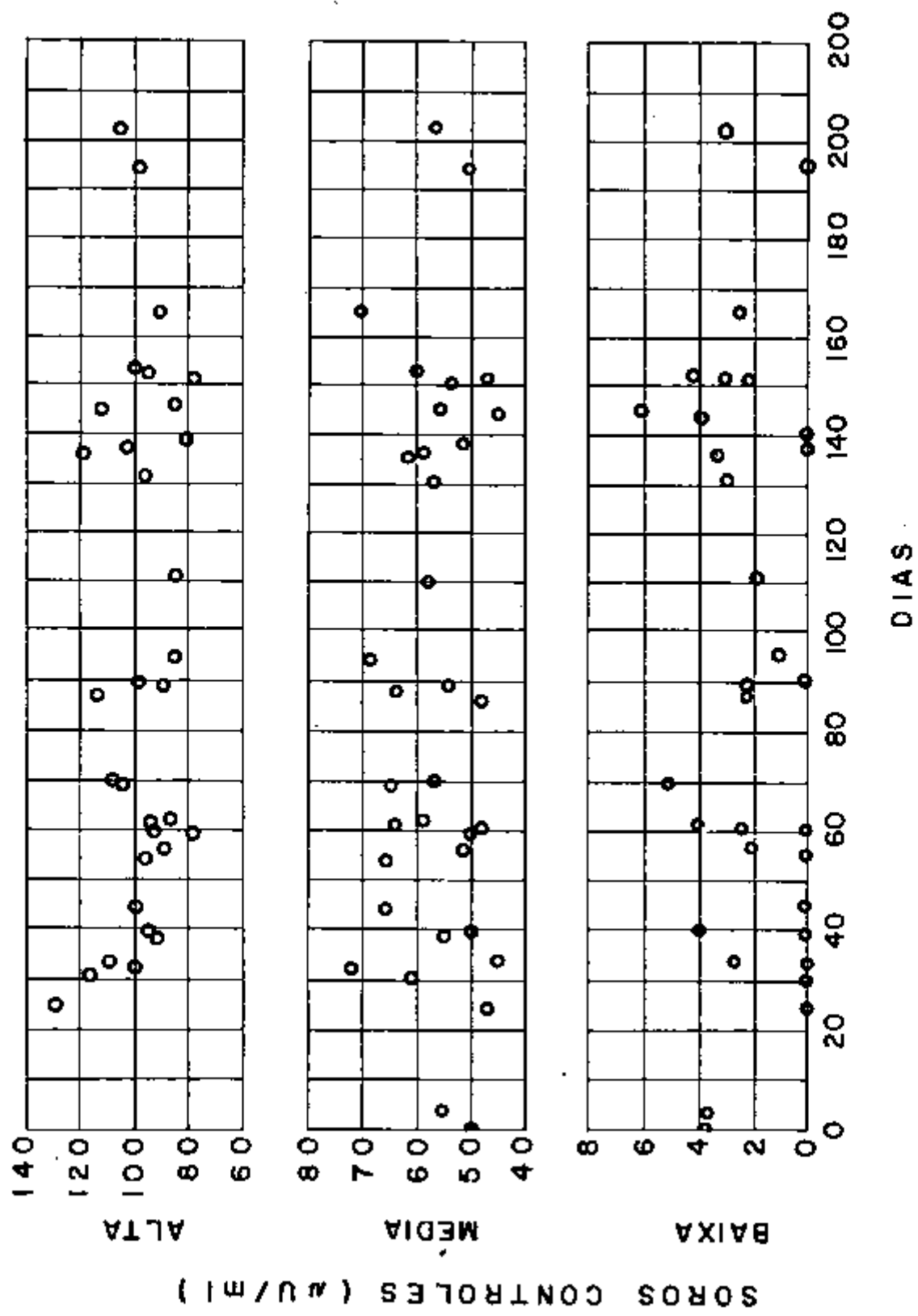


Figura 50 - Variação inter-ensaio de três amostras doseadas sistematicamente em todos os ensaios.

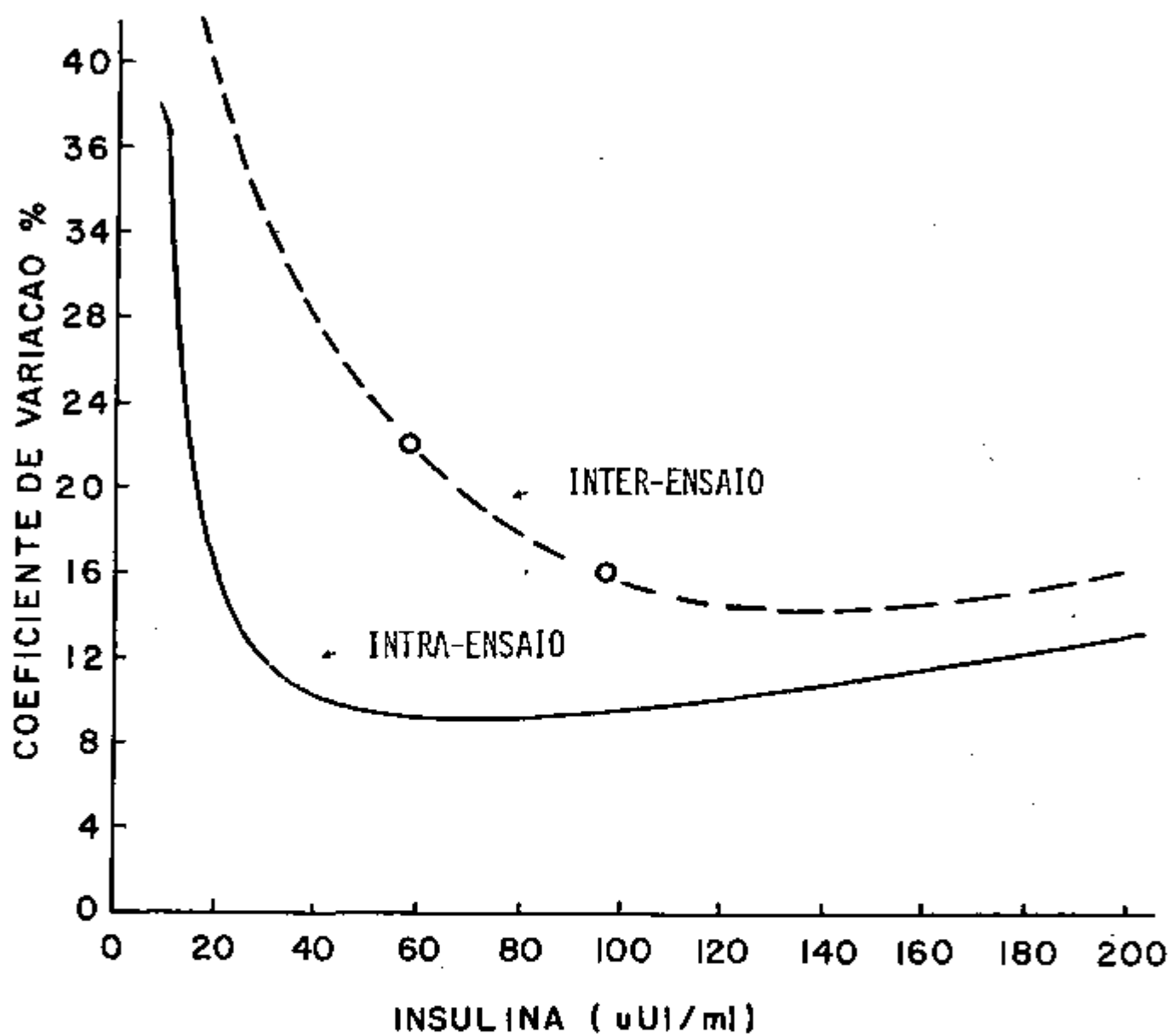


Figura 51 - Perfil de imprecisão intra-ensaio (média de diversos ensaios) e inter-ensaio (traçada por interpolação - fazendo uso dos valores médios encontrados na tabela nº 50).

TABELA XXXV

Estimativas de tempo para o processamento dos dados e de digitação

TAREFA	TEMPO DE CPU* (segundos)	TEMPO DE DIGITAÇÃO (minutos)
Dados da tabela VI	1,31	4
Dados da tabela X	1,35	6
Dados da tabela XIII	7,42	15
Dados da tabela XXXIV	0,71	2

* Abreviatura em inglês da expressão Unidade Central de Processamento.

5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

5.1. A UTILIDADE DO PROGRAMA GARLA

A metodologia dos ensaios radioligantes é multidisciplinar e portanto nela encontram-se profissionais de diferentes matizes de formações como bioquímicos, biólogos, médicos, físicos e engenheiros. É por essa cooperação profissional que se justifica o avanço renovador que essa metodologia tem alcançado, seja no campo dos reagentes, da instrumentação e da análise de dados ^(7,29,43,60).

Na análise da qualidade ou desempenho dos radioensaios observa-se a existência de dois domínios de avaliação (figura 52); a saber: o domínio subjetivo ou intuitivo e o domínio objetivo ou paramétrico. Esses dois domínios tentam refletir o mesmo universo, ou seja, a validade, qualidade ou desempenho do ensaio. São formas 'espelhadas' de avaliação.

O domínio subjetivo é rico conceitualmente, difuso e alicerçado em todo o conhecimento de quem o expressa. Um ensaio que não satisfaça os ideais do plano subjetivo não tem utilidade. Malgrado a ponderabilidade do plano de avaliação subjetivo ele pouco pode contribuir para dar a solução aos eventuais problemas que surjam no radioensaio.

A análise da qualidade do radioensaio segundo a 'ótica' do plano paramétrico é discreta, muito densa em critérios e parâmetros. Exige do radioanalista muita parcimônia na apreciação dos valores fornecidos. Dele se pode obter respostas às indagações técnicas que surjam e fornece ao analista informações específicas que podem conduzir à melhora ou à correção de 'defeitos' do radioensaio.

O analista para alcançar sucesso, maturidade e consistência em suas avaliações deverá procurar conciliar os dois domínios.

O enorme volume de cálculos e gráficos, próprios do domínio paramétrico, constitui na principal barreira aos analistas, em particular daqueles de formação da área biomédi-

ca. A título de exemplo, a tentativa de recalcular todas as informações numéricas contidas desde a tabela VI à XXXIV do capítulo de resultados, sem o auxílio de calculadoras, provavelmente se demandaria algumas dezenas de dias. Após esse tempo a propagação de erros certamente comprometeria os resultados finais.

Por razões semelhantes Norby e col.⁽¹⁹⁾ descreveram que aproximadamente 2/3 dos resultados da análise de Scatchard referidas na literatura pertinente foram calculadas erroneamente!

A tecnologia dos computadores está entre as que mais evoluíram na sociedade moderna. Isto se deve à elevada capacidade de compactação alcançada nos circuitos eletrônicos, possibilitando a construção de computadores altamente eficientes a custos cada vez mais acessíveis. Os computadores atuais são capazes de executar os cálculos aqui referidos em apenas algumas dezenas de segundos ou alguns minutos.

Mesmo tendo a disposição um computador adequado, o analista precisa de programas que são constituídos de uma sequência lógica de instruções ("software"). Depara-se na literatura com inúmeras formulações, algumas vezes oferecidas na forma de pacotes^(20, 38, 57, 68) que têm a capacidade de avaliar um ou outro aspecto do radioensaio, geralmente voltados à análise da curva padrão. Cada um desses "pacotes" possui seqüências próprias para a entrada dos dados, não havendo necessariamente, compatibilidade entre eles.

A tendência de unificação parece constituir evolução natural de programas outros, do porte dos empregados em radioensaios. A exemplo, no campo da estatística, diversos testes e cálculos de parâmetros encontram-se reunidos em códigos computacionais específicos como no sistema SAS ("Statistical Analysis System")^(1, 25), sistema MINITAB⁽²⁵⁾. Do mesmo modo na análise cinética multicompartmental o sistema SAAM é exemplo significativo. Esses exemplos correspondem a uma pequena amostragem da disponibilidade da programoteca do IPEN⁽²⁵⁾.

O "software" pode assumir diversas formas. Algumas encerram um conjunto de informações que permitem ao usuário a absorção da técnica ou tecnologia, outros ('software' em

código objeto) possibilitam seu uso, mas vedam o acesso à tecnologia empregada na concepção do mesmo^(20,38).

Grande parte desses sistemas ou "pacotes" foram desenvolvidos no exterior, são onerosos e quase sempre fornecidos em código objeto (codificação de máquina) o que os tornam verdadeiras "caixas pretas"^(20,38).

Dentro deste espírito julgou-se oportuno formular o sistema GARLA, o qual a par de constituir um todo seqüencial, garante a seus usuários a possibilidade de utilizá-lo, adaptando-o a diferentes linguagens e sistemas de computação, bem como de expandí-lo, alcançando assim posição de vanguarda.

A validade da formulação do programa GARLA só será alcançada se ele se constituir num instrumento que permita aos radioanalistas, principalmente aos da área biomédica, adentrarem no domínio das avaliações paramétricas da figura 52. O atendimento a este objetivo deverá satisfazer o compromisso custo-benefício.

A tabela XXXV mostra o tempo gasto pela CPU (Unidade Central de Processamento) e da digitação para processar os dados de cada tarefa do sistema GARLA.

A entrada dos dados foi projetada com o objetivo de ser a mais simples possível. As tabelas VI, X, XIII e XXXIV, as quais correspondem à entrada de dados, caracterizam a simplicidade da introdução dos dados. Cada conjunto de dados numéricos vem precedido de uma palavra chave, simples, mnemônica e de fácil assimilação por parte dos usuários.

5.2. O TESTE DO QUI-QUADRADO

Trata-se de teste simples e econômico, que quando satisfeito garante a qualidade das medidas da radioatividade dos ensaios subseqüentes.

A probabilidade do X^2 referente à medida da contagem de fundo acusou valor de 0,735 enquanto para a amostra de nível de 20.000 contagens por minuto acusou valor de 0,616, ambos valores situados dentro do intervalo de aceitação estatística (0,05 ; 0,95).

A distribuição de tempo total dispendido nessa prova foi da ordem de 8 minutos e evidentemente não comprometeu a exequibilidade da mesma.

5.3. ANÁLISE DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DO SUBSTRATO MARCADO

O perfil radiocromatográfico mostrado na figura 19 é comparável com aquele obtido por Souza⁽⁸⁹⁾ sugerindo que a insulina marcada utilizada em nossos ensaios se encontrava em condições adequadas.

A área do pico correspondente à insulina-¹²⁵I indene foi de 63% (tabela XI). A estimativa do rendimento de marcação foi de 69%, dos quais 63% correspondem a percentagem efetivamente utilizável.

Na coluna de resultados denominada 'AREA' da tabela XI o valor numérico indicado representa a integral de área do perfil radiocromatográfico. Admitindo-se que a eficiência de contagem do equipamento seja de 80%, então a radioatividade total contida no perfil do radiocromatograma é de 1mCi. Segundo o protocolo experimental do processo de radiomarcagem (página 45) utilizaram-se cinco microgramas de insulina porcina, desta provavelmente 94% encontram-se no pico da insulina indene, isto é, 4,7 microgramas. Esses dados permitem estimar que a atividade específica da insulina-¹²⁵I é da ordem de 134 μ Ci/ μ g.

5.4. CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE IMPRECISÃO DO ENSAIO

O perfil de imprecisão do radioensaio da insulina, aqui usado como modelo, levou em conta o comportamento da curva da variância de $Y = B/T$ e da curva de dose-resposta.

A qualidade do ajuste dos pontos experimentais da variância (Y) versus Y mostrada nas figuras 20, 21 e 22 não se mostrou estatisticamente satisfatória. Rodbard⁽⁸⁵⁾ supõe que o modelo adotado (equação nº 9, ítem 2.9) é adequado, entretanto, o número de pontos ensaiados é quase sempre precário o que explica a má qualidade do ajuste.

Os valores médios resultantes da execução de 35 radioensaios dos parâmetros 'e' e 'f' foram respectivamente:

$$e = 0,92 \pm 0,95 \quad e \quad f = 1,7 \pm 1,4$$

O valor de $f = 1,7$, sendo maior que a unidade sugere que outras causas de erro além daquela da flutuação estatística das medidas da radioatividade influenciam na imprecisão das medidas $Y = B/T$.

O perfil de imprecisão mais provável para o radioensaio da insulina é mostrado na figura 51.

Como se observa dessa figura as determinações de concentração no intervalo de $25\mu\text{UI/ml}$ a $200\mu\text{UI/ml}$ são afetadas por erro de aproximadamente 8% a 13%, quando a amostra é dosada no mesmo ensaio (precisão intra-ensaio) e erro de aproximadamente 36% a 16% quando dosadas em ensaios diferentes (precisão inter-ensaio).

Na figura 47 dispôs-se graficamente o coeficiente de variação obtido em cada ensaio, para os níveis de concentração de $10\mu\text{UI/ml}$, $50\mu\text{UI/ml}$ e $100\mu\text{UI/ml}$. Os valores médios dessa medida foram respectivamente: $20,6\% \pm 8,4\%$, $8,9\% \pm 3,6\%$ e $10,7\% \pm 12,4\%$. Esses valores são muito próximos daqueles que se podem extrair da curva média do perfil de imprecisão mostrada na figura 51. Essa concordância corrobora a validade da utilização da curva da figura 51, traçada teoricamente a partir da associação dos parâmetros e, f da curva de variância de Y (equação 9, ítem 2.6) e parâmetros a, b, c e d da curva padrão (equação 8, ítem 2.5.2).

A reprodutibilidade inter-ensaio foi estimada do sendo-se reiteradas vezes três amostras cujos resultados são mostrados na figura 50. A primeira amostra identificada como "ALTA" apresentou concentração com valor médio de $97 \pm 12\mu\text{UI/ml}$ e portanto coeficiente de variação de 16%. A segunda amostra "MÉDIA" resultou $59 \pm 13\mu\text{UI/ml}$, $CV = 22\%$ e a terceira amostra "BAIXA" acusou $2,2 \pm 1,8$ $CV = 82\%$. Na figura 51 lançaram-se esses resultados e por meio de interpolação traçou-se a curva representativa do perfil de imprecisão inter-ensaio. Como se pode inferir das duas curvas contidas na figura 51, a imprecisão

inter-ensaio é maior do que a imprecisão intra-ensaio o que já era esperado conforme observações de Rodbard (⁵⁵) e por semente lhanças com os resultados dos experimentos de Schawars (⁶⁷), Shishiba e col. (⁶⁸).

5.5. TRACADOS DA CURVA DE DOSE-RESPOSTA (CURVA PADRÃO)

O modelo matemático definido pela equação nº 8 i tem 2.5.2 mostrou-se adequado ao ajuste de regressão de todas as curvas dos ensaios efetuados.

As figuras de nº 27 a 34 mostram a qualidade gráfica do ajuste mediante a comparação entre os pontos calculados ("+") e experimentais ("X" ou " * ").

As análises de variâncias dos ajustes de regressão mostradas nas tabelas XXII, XXIII e XXIV confirmam a adequidade do modelo matemático pois os componentes do "RESIDUO" na coluna da "SOMA DOS QUADRADOS" e "QUADRADOS MÉDIOS" daquelas tabelas mostram-se diminutos frente à contribuição do "MODELO" e do "TOTAL NÃO CORRIGIDO ". Ainda, os erros padrão assintóticos de cada parâmetros (Y(ZERO), SLOPE, X(S0% NSB) foram aceitáveis.

5.6. RESULTADOS DE CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS DOSEADAS

Nas tabelas XXV, XXVI e XXVII encontram-se os resultados da concentração de 46 amostras doseadas (43 amostras séricas verdadeiras + 3 especialmente preparadas com insulina radioativa) nos três ensaios (temperatura de 4°C, 20°C e 37°C), indicando-se os respectivos intervalos de confiança ao nível de $P = 0,05$ e o coeficiente percentual de variação.

A comparação entre esses resultados pode ser melhor avaliada por meio da figura 34-A. Como se observa dessa figura os resultados do ensaio com incubação à 4°C e à 20°C apresentam adequada correlação pois a maioria de seus pontos encontram-se espalhados em torno da reta bissetriz (Relação ideal 4 & 20°C).

A comparação entre os resultados provenientes da incubação à 4°C e à 37°C já não mostra a qualidade de correlação do caso anterior. Na figura 34-A os pontos experimentais referentes a comparação dos resultados entre 4°C e 37°C acusam maior dispersão em torno da reta bissetriz (4 & 37°C) e sugerem que na faixa de concentração 'baixa' o ensaio incubado à 37°C parece superestimar os valores, enquanto para as concentrações consideradas 'altas' os resultados à 37°C parecem subestimar os valores. Finalmente, a comparação dos resultados dos ensaios incubados à 20°C e 37°C mostram resultados muito semelhantes daqueles considerados para 4°C e 37°C, embora com menor evidência das considerações de 'superestimação' dos valores.

Nos traçados da curva padrão do ensaio efetuado à 37°C figuras 28, 31 e 34 observa-se que os pontos experimentais identificados com 'X' encontram-se razoavelmente dispersos, isto é, não tão aderentes como aqueles dos ensaios realizados à 20°C e a 4°C. Esse fato, provavelmente, é o responsável

vel pela relativa discrepância dos resultados acima considerados.

5.7. ESTIMATIVA DA DOSE MÍNIMA DETECTÁVEL - DMD

As estimativas da DMD para os três ensaios foram: 5,4 μ U/ml(4°C), 4,7 μ U/ml(20°C) e 1,3 μ U/ml(37°C), conforme tabelas XXV, XXVI e XXVII.

Para o ensaio realizado com a temperatura de incubação de 4°C a melhor estimativa da DMD é de $9,0 \pm 4,3\mu\text{UI/ml}$, conforme controle da figura 47. O intervalo de confiança da DMD ao nível de $P = 0,05$ é portanto de 0,4 μ UI/ml a 17,6 μ UI/ml. A amplitude desse intervalo desestimula qualquer propósito de mostrar que o ensaio realizado à 37°C conduza a melhores valores da DMD. Mais prudentemente pode-se indicar que o nível da DMD mais provável seja da ordem de 9 μ UI/ml e que eventual influência da temperatura de incubação deverá ser esclarecida com a repetição sistemática do radioensaio em temperaturas outras além de 4°C.

Vários fatores contribuem na formação da DMD^(14,15,56) dentre os quais a flutuação da medida da radioatividade e os erros de alíquotagens. Em nossos experimentos o erro de pipetagem foi da ordem de $1,9 \pm 0,5\%$, conforme resultado indicado na figura 49. Rodbard⁽⁵⁶⁾ estima que esse erro seja de aproximadamente 1%.

A constatação de nível de erro, praticamente o dobro do esperado, poderá ter duas explicações: I) negligência ou inadequacidade do repipetador utilizado e II) variação da espessura dos tubos de ensaio (material de vidro) utilizados.

Julgamos que a segunda causa tenha maior procedência de acordo com observações de Husak e col.⁽³⁰⁾, pois a seleção de frascos de vidro possuindo exatamente a mesma espessura é economicamente inviável. A utilização de tubos de plásticos, embora mais aconselhável, não pôde ser ensaiada por falta de disponibilidade.

5.8. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ESPECÍFICA DA INSULINA-¹²⁵I

Nas tabelas XXVIII, XXIX e XXX encontram-se os valores da atividade específica calculados pelo método do auto-deslocamento para os três ensaios realizados à 4°C, 20°C e a 37°C, a saber: 217 ± 9Ci/g, 239 ± 12Ci/g e 248 ± 14Ci/g, respectivamente.

A atividade específica média daqueles três valores é de 235 ± 16Ci/g. A imprecisão inter-ensaio nessa determinação foi da ordem de 17%. Por outro lado, a imprecisão intra-ensaio média é da ordem de 5%, estimada pela média aritmética dos três desvios, 9, 12 e 14, indicados acima.

De acordo com a imprecisão inter-ensaio estima-se que o intervalo de confiança ao nível de $P = 0,05$, com dois graus de liberdade é de 164Ci/g a 302Ci/g.

Na figura 47 encontram-se resultados da atividade específica de sete radiomarcações. O valor médio daqueles resultados foi de 196 ± 33Ci/g.

Pela combinação da variância (desvio padrão ao quadrado) da estimativa intra-ensaio* com a variância inter-ensaio das sete determinações conclui-se que os fatores aleatórios que contribuem com a dispersão dos resultados da atividade específica entre as diferentes radiomarcações é da ordem de 18,9%, isto é, seguindo-se o protocolo de radiomarcação aqui utilizado espera-se que a atividade específica tenha coeficiente de variação da ordem de 18,9% ou desvio padrão de 37Ci/g. Nessas condições o intervalo de confiança ao nível de $P = 0,05$ é de 122Ci/g a 270Ci/g. De fato todos os sete resultados da figura 47 se incluem nesse intervalo.

Segundo o protocolo utilizado na radiomarcação a atividade específica teórica pode ser estimada aproximadamente como sendo 134Ci/g. A diferença entre este valor e aquele encontrado pelo processo do autodeslocamento (233Ci/g) se deve provavelmente à propagação de erros experimentais preponderan-

* Dispersão intra-marcação = $\sqrt{16^2 + 33^2} = 37\text{Ci/g.}$

temente ligada à alíquotagem da massa da insulina e da atividade posta a reagir.

Na estimativa teórica adota-se como premissa de que o hormônio marcado e o não marcado estejam semelhantemente distribuídos no perfil radiocromatográfico. Pode-se esperar que fração do hormônio na forma polimerizada não tenha o mesmo rendimento de incorporação do iodo radioativo e aquela se encontra no substrato identificado como 'danificado' no perfil radiocromatográfico e esse efeito não é considerado no cálculo da estimativa da atividade de específica teórica⁽⁵⁾.

Por outro lado, no cálculo da atividade específica, segundo os procedimentos do auto-deslocamento, adota-se a premissa de que a constante de afinidade do hormônio marcado (K^*) e do hormônio não marcado (K^ϕ) sejam iguais, isto é, $K^* = K^\phi$. Caso esta igualdade não se verifique, então o método do auto-deslocamento poderá superestimar o valor da atividade específica.

O método do auto-deslocamento tem sido alvo de consideração por diversos autores^(4,7) e particularmente em nosso meio por Bartolini e col.⁽⁵⁾ e Mesquita e col.^(4,2).

5.9. A CONSTANTE DE AFINIDADE K_1 , CONCENTRAÇÃO MOLAR E DO ANTISORO E O PRODUTO $K_{NS}Q_N$ DOS SÍTIOS NÃO ESPECÍFICOS

Em nossos experimentos as constantes de afinidade K_1 para os três experimentos realizados (4°C, 29°C e 37°C) acusaram respectivamente:

$(86,0 \pm 17,9) \times 10^9$ litros/mol, $(84,6 \pm 21,1) \times 10^9$ litros/mol e $(29,8 \pm 16,3) \times 10^9$ litros/mol

conforme resultados registrados nas tabelas XXXI, XXXII e XXXIII.

Esses valores sugerem que a imprecisão intra-ensaio foi da ordem de 30% quando estimadas nas condições estabelecidas pelo protocolo da figura 16. Muito provavelmente esse nível de imprecisão poderia ser reduzido se fossem especialmen

te intercalados maior número de pontos experimentais na curva padrão pois dessa maneira aumentar-se-ia o número de graus de liberdade do ajuste e conseqüente repercussão nos processos estatísticos utilizados.

Na figura 49 encontram-se os resultados de K_1 para a análise da dispersão inter-ensaio (temperatura de 4°C), obtidos em radioensaios realizados em dias diferentes e eventualmente com reagentes re-preparados. Nesse estudo o valor médio de K_1 foi de $(85 \pm 13) \times 10^9$ litros/mol. Desses achados pode-se concluir que o grau de imprecisão na determinação da constante de afinidade é da ordem de 15% a 30%.

O valor médio de K_1 aqui encontrado é comparável com aquele relatado na tabela III oriundo de Morgan e Lazarow⁽¹⁴⁾ para a temperatura de 5°C , e também dentro das expectativas de Ekins⁽¹⁴⁾.

Aplicando-se as expressões de Ekins^(14,15) no cálculo das concentrações ideais de "p*" e "q" conclui-se que a concentração da insulina traçadora seria de $p^* = 4/K = 47 \times 10^{-12}$ mol/litro ou 11,3 $\mu\text{UI/ml}$. A concentração molar do antisoro deveria ser da ordem de $q = 3/K = 35 \times 10^{-12}$ mol/litro.

Nas tabelas XXXI, XXXII e XXXIII encontram-se as concentrações do antisoro (q) utilizado nos três experimentos: $(25,0 \pm 2,0) \times 10^{-12}$ mol/litro, $(19,6 \pm 1,4) \times 10^{-12}$ mol/litro e $(24,7 \pm 9,2) \times 10^{-12}$ mol/litro, cujo valor médio é de $23,1 \times 10^{-12}$ mol/litro. A média do erro daqueles resultados sugere que a imprecisão intra-ensaio nessa determinação seja da ordem de $4,2 \times 10^{-12}$ mol/litro ou 18%.

Na figura 49 o valor médio na determinação intra-ensaio foi de $(26,2 \pm 6,1) \times 10^{-12}$ mol/litro indicando que a imprecisão inter-ensaio é da ordem de 20%, portanto equiparável com o erro intra-ensaio.

Por comparação com o valor médio experimental de 'q' e aquele esperado teoricamente por critério de otimização, conclui-se que a concentração utilizada está razoavelmente próxima daquela em que o radioensaio resulta otimizado^(14,15).

Os resultados da concentração da insulina traçadora utilizada nos três experimentos descritos foram respectiva

mente de $(14,0 \pm 1,7)\mu\text{UI/ml}$, $(13,6 \pm 1,8)\mu\text{UI/ml}$ e $(12,3 \pm 1,8)\mu\text{UI/ml}$ cujo valor médio é $13,3\mu\text{UI/ml}$ e se aproxima muito bem daquele calculado pela expressão de Ekins^(14,15) que é de $11,3\mu\text{UI/ml}$.

5.10. ASPECTOS TERMODINÂMICOS DA REACÃO INSULINA+ANTISORO ANTI-INSULINA

Os resultados experimentais da análise termodinâmica elaborada a partir dos valores experimentais de K_1 tomados das tabelas XXXI, XXXII e XXXIII estão registrados na tabela XXXIV, figura 44 e tabela XXXV.

Na reação insulina + anticorpo anti-insulina a variação de entropia foi da ordem de $4,8\text{Kcal/mol}$ e a entalpia de $34,15\text{ cal/mol/}^\circ\text{K}$. A imprecisão nessas estimativas foi considerável como se infere dos erros (desvio padrão) contidos na tabela XXXV. Entretanto, os valores numéricos desses parâmetros estão próximos daqueles registrados na tabela III, especialmente a estimativa da entalpia, $34,15\text{ cal/mol/}^\circ\text{K}$ encontrado versus $34\text{ cal/mol/}^\circ\text{K}$ tabelado.

A imprecisão neste valor foi de tal ordem que a coincidência encontrada pode ser considerada como mero acaso. Em avaliações que visem especificamente a obtenção de resultados mais precisos devem conter mais pontos experimentais (diversas temperaturas).

Aceitando-se como exatos os valores experimentais aqui obtidos então pode-se enquadrar a reação vertente na classificação do grupo 'a' do texto 2.4 e esquema da figura 10.

Nas figuras 45 e 46 projetaram-se as curvas de dose resposta (curva padrão) do radioensaio da insulina, a partir dos parâmetros termodinâmicos da reação. Infere-se dessas figuras que o abaixamento da temperatura de incubação resulta em curva padrão mais sensível (maior declive). Em função dessas evidências julgamos que a temperatura de incubação esteja nas proximidades de 4°C , pois normalmente corresponde ao do ambiente de geladeiras convencionais, não se correndo o risco de congelar as amostras.

5.11. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A REPRODUTIBILIDADE DE PARÂMETROS DO RADIOENSAIO DA INSULINA

As figuras 47, 49 e 50 mostram a variação inter-ensaio de vários parâmetros do radioensaio da insulina. Muitos desses parâmetros já foram apreciados durante o texto dos itens anteriores. O que é importante ressaltar é que na caracterização de um determinado parâmetro obtêm-se valores mais confiáveis quando eles são apreciados pelo valor médio de uma seqüência de ensaios do que na avaliação de um particular experimento. Por exemplo, a dose mínima detectável (DMD) estimada pela média de 35 ensaios foi de $9,0 \pm 4,3 \mu\text{UI/ml}$, valor esse compatível com o esperado teoricamente por Ekins^(14,15). Entre tanto alguns ensaios isoladamente acusam valores excessivamente baixos, como por exemplo, o registrado na tabela XXVII. Nesses casos provavelmente não decorre de melhor qualidade do ensaio mas da própria imprecisão estatística dos parâmetros 'a', 'b', 'c', 'd', 'e' e 'f' envolvidos na determinação da DMD.

Alguns dos parâmetros estimados não têm o compromisso de se manterem estáveis na avaliação inter-ensaio. Os parâmetros 'Atividade Total' da figura 47, os parâmetros 'a', 'b', 'c' e 'd' da figura 48 constituem exemplos típicos quando comparados a partir de ensaios espaçados no tempo e provenientes de um mesmo lote de reagentes. Com o decorrer do tempo o traçador radioativo é naturalmente diminuído e degradado, podendo vir a aumentar o parâmetro 'd' (NSB) e aparentemente diminuir o parâmetro 'a' ou mantê-lo constante, quando na realidade a fração íntegra do traçador (em menor quantidade) se liga cada vez mais ao antisoro. É também admissível que o parâmetro 'a' cresça no decorrer do tempo, quando o sistema de separação das frações 'B' e 'F' discrimina bem da fração 'NSB' e isto não indica que o ensaio está melhorando com o envelhecimento dos reagentes.

5.12. CONCLUSÕES

Finalizando, constatamos que o programa GARLA se constitui numa importante e confiável 'sonda' de dados, que de

vidamente analisados permitem lançar como que uma ponte entre os dois planos de avaliação esquematizados na figura 52 e descrito no texto 5.1. Esquemáticamente podemos concluir que:

1. - A utilização do programa GARLA aplicado ao radioimunoensaio da insulina gerou valores de parâmetros consoantes com os da literatura^{*}.
2. - Sua utilização é simples e suas informações são múltiplas.
3. - O programa GARLA se presta a uma rotina voltada para o controle de qualidade de radioensaios.
4. - A característica modular do programa GARLA permite efetuar diferentes tipos de cálculos e avaliações paramétricas utilizando reduzido vocabulário de palavras chaves.
5. - A característica modular do programa permite facilmente a sua ampliação.
6. - Por ter sido totalmente desenvolvido em nosso meio pode ser facilmente adaptado, e alterado por equipe de nossos laboratórios.

* Recentemente, quando já concluído este trabalho, foi o programa GARLA aplicado por Diamant⁽⁵⁾ a radioensaio de 25-Hydroxivitamina D com resultados perfeitamente de acordo com os citados na literatura internacional.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARR, J.; GOODNIGHT, J.H.; SALL, J.P.; BLAIR, H.W.; CHILKO, D.M. SAS user's guide, 1979 editor. Raleigh, N.C., 1979.
2. BERSON, S.A. & YALOW, R.S. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. J. Clin. Invest., 39:1157-75, 1960.
3. BERSON, S.A. & YALOW, R.S. Insulin. In: YALOW, R.S. comp. Methods in radioimmunoassay of peptide hormones. Amsterdam, North-Holland, 1976. p.168-74.
4. BERSON, S.A.; YALOW, R.S.; BAUMAN, A.; ROTHSCHILD, M.A.; NEWERLY, K. Insulin ¹³¹I metabolism in human subjects: demonstration of insulin binding globulin in circulation of insulin treated subjects. J. Clin. Invest., 35:170-90, 1956.
5. BARTOLINI, P.; ASSIS, L.M.; FONSECA, M.L.Q. Radioiodination of human growth hormone with characterization and minimization of the commonly defined "damage products". Clin. Chim. Acta, 110:177-85, 1981.
6. BLISS, C.I. The statistic of bioassay. New York, Academic, 1952.
7. BOWIE, L.J. Automated instrumentation for radioimmunoassay. Florida, Boca Raton, 1980.
8. CHARD, T. Observation on the uses of a mathematical model in radioimmunoassay. Section 9: mathematical treatment of data and automation. In: KIRKMAN, K.E. & HUNTER, W.M. Radioimmunoassay methods. Livingstone, Churchill, p. 595-8; 607-24.
9. DIAMANT, L.L. Dosagem de 25-Hidroxivitamina D em indivíduos normais e em pacientes portadores de doenças ósseas metabólicas. São Paulo, 1982. (Tese de doutoramento, Faculdade de medicina da Universidade de São Paulo).

10. DICZFALUSY, E. ed. Research methods in reproductive endocrinology: steroid assay by protein binding: 2nd Karolinska symposia on..., held in Stockholm, 23-25 march, 1970.
11. DUDLEY, R.A. Radioimmunoassay (RIA) data processing on programable calculations: an IAEA project. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Radioimmunoassay and related procedures in medicine, proceedings of an international symposium on..., held in Berlin, Oct. 31 - 4 Nov. 1977. 1978 V.1, p.411-22.
12. EDWARDS, P.R. & EKINS, R. Development of a microcomputer radioimmunoassay (RIA) data-processing program for distribution of the World Health Organization. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Radioimmunoassay and related procedures in medicine, proceedings of an international symposium on..., held in Vienna, 21-25 June, 1982. 1983, p.423-43.
13. EKINS, R.P. Radioimmunoassay and saturation analysis basic principles and theory. Br. Med. Bull., 30(1):3-11, 1974.
14. EKINS, R.P. Theoretical aspects of saturation analysis: review paper. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. In vitro procedures with radioisotopes in clinical medicine and research: proceedings of the symposium held in Vienna, 8-12 September, 1969. Vienna, 1970. p.325-53.
15. EKINS, R.P. & NEWMAN, G.B. Theoretical aspects of saturation analysis. In: DICZFALUSY, E. ed. Research methods in reproductive endocrinology: steroid assay by protein binding: 2nd Karolinska symposia on..., held in Stockholm, 23-25 march 1970. 1970. p.11-36.
16. EKINS, R.S. The estimation of thyroxine in human plasma by an eletrophoretic technique. Clin. Chim. Acta, 5:453-9, 1960.

17. FAURE, A.; NAMOZ, C.; CLAUSTRAT, B.; PAUTRE, C.Z.; SITE, J. Control of routine radioimmunoassay a computer program for calculation of control charts for precision and accuracy. Comput. Programs Biom., 12:105-110, 1980.
18. FELDMAN, H. & RODBARD, D. Mathematical theory of radioimmunoassay. In: ODELL, W.D. & DAUGHADAY, W.H. Principles of competitive protein binding assay. Philadelphia, Pa., J.B. Lippincott, 1972. p.158-303.
19. FINNEY, D.J. Statistical method in biological assay. London, Charles Griffin, 19
20. FISCHER, G.C. O direito do "software". O Estado de São Paulo, 13 março de 1983. p.62.
21. FLOGEL, M. & BILTONEN, R.L. The pH dependence of the thermodynamics of interaction of 3 cystidine monophosphate with ribonuclease -A. Biochem., 14:2610-5, 1975.
22. FORTRAN IV-IBM system 360/and system/370. New York, IBM,
23. GOMES, F.P. Curso de estatística experimental. 5.ed. São Paulo, Nobel, 1973.
24. GOUVEA, A.S. & MESQUITA, C.H. ANACROM. Programa computacional para análise de cromatogramas. São Paulo, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, 1981. (IPEN-INF-5).
25. GRANZOTO, A.; GOUVEA, A.S.; LOURENÇÃO, A.M. Compilação dos resumos dos códigos nucleares disponíveis no CPD/IPEN. São Paulo, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, jun. 1981. (IPEN-INF-7).
26. GREENWOOD, F.C.; HUNTER, W.M.; GLOVER, J.S. The preparation of I^{131} labelled human growth hormone of high specific radioactivity. Biochem. J., 89:114-23, 1963.

27. HEHEL, M.E. Técnicas práticas e eficientes em programação. São Paulo, USP, 1974.
28. HEYNS, W.; BAELEN, H. Van; MOOR, P. Study of steroid binding by means of competitive adsorption: application to cortisol binding in plasma. Clin. Chim. Acta., 18:361-70, 1967.
29. HUNTER, W.M. Recent advances in radioimmunoassay and related procedures. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Radioimmunoassay and related procedures in medicine: proceedings of an international symposium on..., held in 21-25 June 1982. 1983. p.3-31.
30. HUSAK, J.; ERABIN, J.; KLEINBAUER, K.; BUDIKOVA, M.; HAULIK, J. Problems of ^{125}I measurements on sample changers in nuclear medicine laboratories - apud INIS Atomindex, 10 (18):477358, 1979.
31. IVANYI, J. Monoclonal antibodies in hormone research. In: RAYNAUD, C. Nuclear medicine and biology: proceedings of the third world congress of..., held in Paris, Aug. 29-Sep. 2, 1982. 1982. p.2287-91.
32. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Radioimmunoassay and related procedures in medicine: proceedings of an international symposium held in Vienna, 8-12 sept. 1969. 1970.
33. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Radioimmunoassay and related procedures in medicine: proceedings of an international symposium held in Istanbul, Turkia, 10-14 Sept. 1973. Vienna, 1974.
34. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Radioimmunoassay and related procedures in medicine: proceedings of an international symposium, held in Berlin Oct. 31 - 4 Nov., 1977. Vienna, 1978.

35. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Radioimmunoassay and related procedures in medicine: proceedings of an international symposium, held in Vienna 21-25 June, 1982. 1983.
36. KEANE, P.M.; WALKER, W.H.C.; GAULDIE, J.; ABRAHM, G. Thermodynamic aspects of some radioassays. Clin. Chem., 22(1): 70-3, 1976.
37. KORENMAN, S. & SANBORN, B.A. Hormonal assays employing tissue reports. In: ODELL, W.D. & DAUGHADAY, W. Principles of competitive protein binding assays. Philadelphia, Pa., J.B. Lippincott, 1972. Cap. 4, p.25-6.
38. LACHTERMACHER, S. Sistemas para diagnósticos médicos. Microssistemas, 12:50-1, 1983.
39. LEDERER, M.C. (UCRL-1894, 1969) apud FELAWKA, L.T.; MOLNAR, J.G.; CHEN, J.D.; BOASE, D.G. GAMAN: a computer program for the qualitative and quantitative evaluation of Ge(Li) gamma-ray spectra. Pinawa, Manitoba, Atomic Energy of Canada, Whiteshell Nuclear Research Establishment, Jan. 1973. (AECL-4217).
40. LEFKOWITZ, R.J.; ROTH, J.; PASTAN, I. Radioreceptor assay of adrenocorticotropic hormone: new approach to assay of polypeptide hormones in plasma. Science, New York, 170: 633-5, 1970.
41. MALEN, P.G.; COX, M.G.; LONG, E.M.R.; EKINS, K.P. A multi-binding site model based curve fitting program for computation of radioimmunoassay data. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Radioimmunoassay and related procedures in medicine: proceedings of an international symposium on..., held in Berlin Oct 31-4 Nov., 1977. 1978. V.1, p.373-81.
42. MESQUITA, C.H.; HAMADA, M.M.; CARRINHO, J.A. Considerações relativas ao conceito de atividade específica de traçadores hormonais. In: ENDOCRINOLOGIA e metabologia, 15º congresso brasileiro de ..., realizado em São Paulo 24-28 de outubro de 1982. p.76. (Trabalho nº 129).

43. MICHAEL, M.C. Instrumentation in radioimmunoassay. ABRAHAM, G.E. ed. Handbook of radioimmunoassay. New York, Marcel Dekker, 1978.
44. MILES, L.E.M. & HALES, C.N. Labelled antibodies and immunological assay systems. Nature, 219:186-9, 1968.
45. MORGAN, C.R. & LAZAROW, A. Immunoassay of insulin using a two-antibody system. Proc. Soc. Exp. Biol., 110:29, 1962 apud KEANE, P.M.; WALKER, H.C.; GAULDIE, J.; ABRAHAM, G. E. Thermodynamic aspects of some radioassays. Clin. Chem., 22(1):70-3, 1976.
46. MORIN, J.F.; SAVINA, A.; CAROFF, J.; MIOSSEC, J.; LEGENDRE, J.M.; JACOLOT, G.; MORIN, P.P. Application de modeles exponentiels au traitement automatique des courbes standards in radio-immunologies. J. Fr. Biophys. Fondam. Technol., 3(1):45-8, 1979.
47. MORRIS, B.J. Specific radioactivity of radioimmunoassay tracer determined by self-displacement. A re-evaluation. Clin. Chim. Acta., 73:213-6, 1976.
48. MOTTA, M. & DEGLI, E.A. A computer program for mathematical treatment of data in radioimmunoassay. Comput. Programs Biomed., 13:121-9, 1981.
49. NORBY, J.G.; OTTOLENGHI, P.; JENSEN, J. Scatchard plot: common misinterpretation of binding experiments. Anal. Biochem., 102:318-20, 1980.
50. ODELL, W.D.; ABRAHAM, G.A.; SKOWSKY, W.R.; HESCOX, W.R.; HESCOX, M.A.; FISHER, D.A. Production of antisera for radioimmunoassays. In: ODELL, W.D. & DAUGHADAY, W.H. eds. Principles of competitive protein binding assays. Philadelphia, Pa., J.B. Lippincott, 1972. p.57-88.

51. PRENTICE, R.L. Biometrics, 32:761, 1961 apud RODBARD, D.; MUNSON, P.J.; De LEAN, A. Improved curve-fitting, parallelism testing, characterization of sensitivity and specificity, validation and optimization for radioligands assays. In: opus cit. (ref. n° 58).
52. PRIORE, L.R. & ROSENTHAL, H.E. A statistical method for the estimation of binding parameters in a complex systems. Anal. Biochem., 70:231-40, 1976.
53. PUPO, A.A. & MARREIROS, D. Dosagem de insulina pelo radioimunoensaio com duplo anticorpo. Rev. Assoc. Med. Bras., 16(5):153-6, 1970.
54. RAAB, G.M.; THOMPSON, R.; MCKENZIE, I. Variance function estimation for immunoassays. Comp. Programs. Biomed., apud INIS Atomindex, 12 (14):613384, 1981.
55. RODBARD, D. Quality control for RIA-radioimmunoassay and related procedures in medicine. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Radioimmunoassay and related procedures in medicine: proceedings of an international symposium held in Berlin, Oct. 31 - 4 Nov. 1977. Vienna, 1978. V.1, p.469-514.
56. RODBARD, D. Statistic aspects of radioimmunoassays. In: ODELL, W.D. & DAUGHADAY, W. Principles of competitive protein-binding assays. Philadelphia, Pa., J.B. Lippincott, 1971.
57. RODBARD, D.; HUSTON JR., J.; MUNSON, J.J. Basria: RIA data processing Basic programs. Nashville, In., Biom.Comp.Tech. Inf.Center, 1980.
58. RODBARD, D.; MUNSON, P.J.; DELEAN, A. Improved curve-fitting, parallelism testing characterization of sensitivity and specificity, validation and optimization for radioligands assays. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Radioimmunoassay and related procedures in medicine: proceedings of an international symposium on..., held in Berlin, 31 Oct. 4 Nov., 1977. 1978 V.1, p.469-514.

59. RODBARD, D.; RUBER, H.J.; VAITUKAITIS, J.; JACOB, H.S. Mathematical analysis of kinetics of radioligand assays. Improved sensitivity obtained by delayed addition of labelled ligand. J. Clin. Endocrinol., 33:343-55, 1971.
60. RODGERS, R.P.C. Automated assay data processing and quality control: a review and recommendations. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Radioimmunoassay and related procedures in medicine: proceedings of an international symposium on..., held in Vienna, 21-25 June 1982, 1983. p.383-409.
61. ROGERS, G.T.; RAWLINS, G.A.; KEEP, P.A.; BAESWE, K.D. Application of monoclonal antibodies to purified CEA in clinical radioimmunoassay of human serum. Br. J. Cancer, 44(3):371-80, 1981.
62. ROSENTHAL, H.E. A graphic method for the determination and presentation of binding parameters in a complex system. Anal. Biochem., 20:525-32, 1967.
63. ROTHENBERG, S.P. A radioenzymatic assay for folic acid. Nature, 206:1154-6, 1965.
64. RUZICKA, J. & STARY, J. Substoichiometry in radiochemical analysis. New York, Pergamon, 1968.
65. SANDEL, W.V. Performance of various mathematical methods for calculations of radioimmunoassays results. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Radioimmunoassay and related procedures in medicine: proceedings of an international symposium held in Berlin, Oct. 31-Nov. 4, 1977. Vienna 1978. V.1, p.373-97.
66. SCATCHARD, G. The attractions of proteins for small molecules and ions. Ann. N.Y. Acad. Sci., 51:600-72, 1949.

67. SCHAWARS, S. Strategy and organization of intralaboratory radioimmunoassay quality control. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Radioimmunoassay and related procedures in medicine: proceedings of an international symposium on..., held in Vienna, 21-25, june 1982. 1983. p.447-24.
68. SHISHIBA, Y.; IRIE, M.; YAMADA, H.; KINOSHITA, F. Quality control for insulin thyroxine TGH, cortisol, gastrin, digoxin, beta-2-microglobulin and IGE including 24 institutes in Japan. In RAYNAND, C. ed. Nuclear medicine and biology: proceedings of the 3rd world congress of held in Paris, aug. 29-sep. 2, 1982. Paris, Pergamon, 1982. V.3 p.2496.
69. SOUZA, I.T.T. Aplicação do método do radioimunoensaio na dosagem de insulina no plasma humano. São Paulo, 1972. (Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, USP). p.16-9.
70. STANLEY, J.G. Radioimmunoassay-review of basic principles. Semin. Nucl. Med., 5(2):125-52, 1975.
71. STROUPE, S.D. & WESTPHAL, V. Conformational changes in the progesterone binding globulin-progesterone complex. Biochem., 14:3296-300, 1975.
72. WALKER, W.H.C. & KEANE, P.M. Theoretical aspects of RIA. In: ABRAHAN, G.E. Handbook of radioimmunoassay. New York, Morton K. Shwartz, 1978. p.87-130.
73. WILKINS, T.A.; CHADNEY, D.C.; BRYANT, J.; PALMTROM, S.H. Non linear least square curve fitting of a simple theoretical model to radioimmunoassay dose-response data using minicomputer. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Radioimmunoassay and related procedures in medicine: proceedings of an international symposium on..., held in Berlin Oct. 31-4 Nov., 1977. 1978. V.1, p.373-81.

74. WYNNE, C.N.; DAVIDSON, D.; LUCAS, D.F.; GRIFFITHS, P.D.
Multiple on line data collection and processing for radio
immunoassay using a micro computer system. J. Clin. Pathol.,
33(5):493-9, 1980.
75. YALOW, R.S. & BERSON, S.A. General aspects of radioimmuno-
assay procedures. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY.
In vitro procedures with radioisotopes in clinical medicine
and research: proceedings of the symposium on..., held in
Vienna, 8-12, September, 1969. 1970. p.325-53.
76. YALOW, R.S. & BERSON, S.A. Introduction and general consider
ations. In: ODELL, W.D. & DAUGHADAY, W.H. eds. Princi-
ples of competitive protein binding assays. Philadelphia,
Pa., J.B. Lippincott, 1972. p.1-24.