

BR8921111
INIS-BR--1617

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**PADRONIZAÇÃO DO RADIOIMUNOENSAIO DE CALCITONINA COM REAGENTES
PRODUZIDOS NO IPEN PARA SUA APLICAÇÃO NO DIAGNÓSTICO
PRECOCE DO CARCINOMA MEDULAR DA TIREÓIDE**

ELIZABETH KINUYO GIMBO

*Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Mestre em Tecnologia Nuclear.*

Orientador: Dr. Paolo Bertolini

SÃO PAULO
1989

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**PADRONIZAÇÃO DO RADIOIMUNOENSAIO DE CALCITONINA COM REAGENTES
PRODUZIDOS NO IPEN PARA SUA APLICAÇÃO NO DIAGNÓSTICO
PRECOCE DO CARCINOMA MEDULAR DA TIREÓIDE**

ELIZABETH KINUYO GIMBO

**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Mestre em Tecnologia Nuclear.**

Orientador: Dr. Paolo Bertolini

SÃO PAULO

1989

Dissertação realizada nos laborau
tórios da Divisão de Medicina
(TBM) do Instituto de Pesquisas
Energéticas e Nucleares (IPEN)
de São Paulo

Aos meus pais

Aos meus irmãos

Ao Estanislau

*Ao Dr. Paolo Bartolini,
pelo constante apoio, estímulo,
espírito crítico na orientação
deste trabalho,
meu especial agradecimento*

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Roberto Fulfaro,
Ao Dr. José Roberto Rogero,
Ao Prof. Dr. Rui Ribeiro Franco,
Ao Prof. Dr. Sérgio P.A. Toledo,
Ao Prof. Dr. José Carlos Barbêrio,
Ao Dr. Gian-Maria A.A. Sordi
Ao Dr. Ewaldo M.K. Russo,
A Irene Schwarz, M.Sc.
A Maria Teresa C.P. Ribela, M.Sc.

pela orientação, participação, críticas, sugestões
e apoio, na realização desta dissertação,

Aos colegas da Divisão de Medicina,
A todos que direta ou indiretamente
colaboraram para a realização deste trabalho,

À FAPESP que me concedeu a Bolsa de Mestrado no pe-
ríodo de 1986 a 1988.

O meu agradecimento.

PADRONIZAÇÃO DO RADIOIMUNOENSAIO DE CALCITONINA COM REAGENTES
PRODUZIDOS NO IPEN PARA SUA APLICAÇÃO NO DIAGNÓSTICO PRECOCE
DO CARCINOMA MEDULAR DA TIREÓIDE.

ELIZABETH KINUYO GIMBO

RESUMO

A produção de reagentes para o Radioimunoensaio de Calcitonina humana foi desenvolvida em nosso laboratório, a partir de uma gentil doação do produto sintético da CIBA (Basel, Suíça). Esta preparação foi usada para a produção de antissoro em coelhos e cobaias e para a radioiodação de acordo com dois métodos diferentes que utilizam a Cloramina T: Clássico e Estequiométrico.

O uso do Sephadex G-50 na purificação do hormônio radioiodado, nos forneceu um traçador livre de contaminantes de alto peso molecular. A repurificação em gel de poliacrilamida nos ofereceu uma ^{125}I -hCT de alta especificidade que apresentou ligações específicas, a antissoros de boa qualidade, da mesma ordem daquelas obtidas com traçadores importados (~45% B).

Alguns antissoros foram obtidos em coelhos e cobaias, mas apenas um (antissoro GP₂-IPEN) pôde ser usado em uma diluição (1:4000) que nos proporcionou curvas de alta sensibilidade (Dose Mínima Detectável < 70 pg/ml) apresentando, porém, valores de ligações específicas muito baixas (7 - 10%). Por estas razões, para realizar uma padronização e um contro-

le de qualidade adequados desta técnica, foi usado em antissoro gentilmente doado pelo Instituto Karolinska (Estocolmo, Suécia). Portanto, utilizando uma diluição maior deste antissoro (1:8000) foram obtidos maiores valores de ligação específica (20 - 30%), de sensibilidade (< 30 pg/ml) e uma satisfatória precisão do ensaio.

Consideramos este estudo o primeiro passo na completa produção de reagentes para Radioimunoensaio de Calcitonina humana, que no presente momento, depende somente da obtenção de um antissoro de alta avidéz. Estudos posteriores deverão ser realizados para melhor definir a exatidão do método e sua aplicação clínica adequada no "screening" da forma familiar do Carcinoma Medular da Tireóide. Enfatizamos também o fato que, sendo nossos recursos muito limitados, todo o trabalho foi realizado com grande economia, utilizando, onde foi possível, as técnicas já padronizadas e os conhecimentos já previamente adquiridos nesta área de trabalho.

THE DEVELOPMENT OF A HUMAN CALCITONIN RADIOIMMUNOASSAY, WITH
"IN HOUSE" REAGENT PRODUCTION, FOR APPLICATION TO THE EARLY
DIAGNOSIS OF MEDULLARY THYROID CARCINOMA.

ELIZABETH KINUYO GIMBO

ABSTRACT

Reagent production for human Calcitonin (hCT) Radio-immunoassay (RIA) was carried out in our laboratory starting from a kind donation of human synthetic preparation from CIBA (Basel, Switzerland). This product was used for anti-hCT antibody production in rabbits and guinea-pigs and for radioiodination, according to two different methods: classical and stoichiometric Chloramine T techniques.

The use of Sephadex G-50 in tracer purification allowed the obtainement of ^{125}I -hCT free of high molecular weight contaminants. A repurification on polyacrylamide gel electrophoresis provided ^{125}I -hCT of higher specific activity that presented specific bindings, to good quality antisera, of the same order of imported tracers (~ 45%).

Different antisera were obtained in rabbits and guinea-pigs, but only one (GP₂-IPEN) could be used in such a dilution (1:4000) to provide highly sensitive curves (minimal detectable concentration < 70 pg/ml) presenting, however, very low specific bindings (7-10%). For this reason, in order to be able to set up a regular quality control of our hCT-RIA technique, an antiserum kindly donated by the Karolinska

Institute (Stockholm, Sweden) was used. This way, through the use of an higher antibody dilution (1:8000), higher specific bindings (20-30%), higher sensitivities (< 30 pg/ml) and satisfactory precision were obtained.

We consider this study a first approach to a complete national production of hCT-RIA reagents that, at present moment, depends practically only from the obtainement of a high avidity anti-hCT antiserum. More has to be done on accuracy and correct clinical application of this assay to the screening of the familial form of Medullary Thyroid Carcinoma. We also emphasize the fact, due to our limited financial possibilities, all the work was carried out with great economy, taking advantage of previously set up techniques and of the experience already acquired in this field of work.

ABREVIATURAS

IPEN	- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
hCT	- Calcitonina humana
RIE	- Radioimunoensaio
CMT	- Carcinoma Medular da Tireóide
EGPA	- Eletroforese em gel de poliacrilamida
Ag	- Antígeno
Ac	- Anticorpo
cpm	- Contagem por minuto
rpm	- Rotações por minuto
BG	- Radiação de fundo
Rm	- Distância de migração eletroforética relativa
SAB	- Soro Albumina bovina
PEG	- Polietileno-glicol
OMS	- Organização Mundial da Saúde
DMD	- Dose mínima detectável
ED ₅₀	- Dose que produz 50% de queda na resposta relativa à dose zero
B	- Fração de Ag marcado ligado ao Ac
B ₀	- B correspondente ao ponto de dose zero
V ₀	- Volume de exclusão molecular
V _e	- Volume de eluição
V _T	- Volume Total
ACQ	- Amostra Controle de Qualidade
σ	- Desvio-padrão
C.V.	- Coeficiente de Variação

- E - Coeficiente de extinção
- UV - Irradiação luminosa com comprimento de onda no intervalo de luz Ultra-Violeta (185-325 nm)
- μg - 10^{-6} gramas
- μCi - $3,7 \times 10^4$ desintegrações por segundo
- mCi - Milicurie
- Bq - Bequerel. Uma desintegração por segundo
- μl - microlitro. 10^{-6} litros

SUMÁRIO

	Pág.
I. INTRODUÇÃO E PROPÓSITO	01
II. MATERIAIS E MÉTODOS	13
1. Materiais	
1.1. Equipamentos e materiais permanentes ...	13
1.2. Reagentes e Soluções	15
1.2.1. Reagentes empregados na Iodação, Purificação e Ensaio	15
1.2.2. Reagentes empregados na Produção de Antissoro	16
1.2.3. Reagentes empregados na Eletrofo rese em gel de poliacrilamida 7% (EGPA 7%)	17
1.2.4. Material Biológico	19
1.3. Animais utilizados na produção de anti <u>s</u> soro	20
2. Métodos	
2.1. Marcação da hCT sintética com ^{125}I	20
2.1.1. Iodação pelo Método Clássico	21
2.2.2. Iodação pelo Método Estequiométr <u>i</u> co, modificado	22
2.2. Purificação da Calcitonina radioiodada (^{125}I -hCT) e análise da mistura de rea ção	26

2.2.1. Purificação da Calcitonina radioiodada (^{125}I -hCT) em coluna de Sephadex	26
2.2.2. Cálculo da Recuperação	28
2.2.3. Cálculo do Rendimento da marcação.	29
2.2.4. Cálculo da Atividade Específica do mercado	32
2.2.5. Cálculo do Coeficiente de distribuição (Kd)	32
2.3. Repurificação da Calcitonina radioiodada por Eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) 7%	33
2.3.1. Polimerização do gel	33
2.3.2. Aplicação da Amostra e Eletroforese	34
2.3.3. Extração, eluição e análise do gel	35
2.4. Eletroforese e Densitometria da Calcitonina não-marcada (Calcitonina fria).....	37
2.4.1. A Eletroforese de Amostras de Calcitonina	37
2.4.2. Leitura densitométrica	38
2.4.2.1. Cálculo da Migração Relativa (Rm)	39
2.4.2.2. Cálculo da Área dos Picos	39
2.4.3. Cálculo do Coeficiente de Extinção (E) da Calcitonina	40

2.5. Produção de Antissoro em animais de laboratório	40
2.5.1. Preparação do Antissoro anti-Calcitonina	40
2.5.2. Análise do título dos antissoros.	43
2.6. Seleção das condições ótimas para o ensaio	45
2.6.1. Padronização do Tempo e Temperatura de incubação	48
2.6.3. Teste da imunorreatividade da Calcitonina purificada e repurificada	48
2.6.4. Escolha da quantidade de marcado a ser usado	49
2.6.5. Escolha do título do antissoro ..	50
2.7. Técnica de Radioimunoensaio	51
2.7.1. Preparação do Padrão-IPEN	51
2.7.2. Radioimunoensaio de Calcitonina..	54
2.7.3. Determinação de concentração das amostras	55
2.7.4. Avaliação da qualidade dos ensaios obtidos	57
2.7.4.1. Dose Mínima Detectável (D.M.D.)	57
2.7.4.2. Precisão	58
2.7.4.2.1. Perfil de Precisão	59
2.7.4.3. Exatidão	59

III. RESULTADOS	60
1. Análise qualitativa e quantitativa da preparação de Calcitonina sintética humana (CIBACALCINA ^(R))	60
1.1. Determinação qualitativa em EGPA com leitura não-destrutiva por densitometria UV	60
1.2. Determinação do Coeficiente de Extinção (E) da Calcitonina humana, análise quantitativa e teste de pureza	63
2. Preparação da Calcitonina marcada com ¹²⁵ I... ..	64
2.1. Marcação, purificação em Sephadex G-25F e G-50M e Controle de Qualidade da ¹²⁵ I-hCT	64
2.2. Atividades específicas (A.E.) obtidas ..	70
2.3. Imunorreatividade da ¹²⁵ I-hCT estocada em duas condições: -35°C e liofilizada..	71
2.4. Repurificação da ¹²⁵ I-hCT em EGPA 7% ...	73
2.5. Caracterização dos picos A, B, C, D e E após repurificação em EGPA 7%	74
2.6. Comparação eletroforética entre a ¹²⁵ I-hCT-IPEN e outras de diferentes procedências	76
2.7. Alteração da mobilidade eletroforética da ¹²⁵ I-hCT devido à iodação	77
3. Otimização das condições do ensaio	
3.1. Comparação de técnicas diferentes de separação entre o antígeno livre e o ligado ao anticorpo	81

3.2. Influência do tempo de incubação na imunorreatividade do marcação	83
3.3. Influência da repurificação na imunorreatividade da ¹²⁵ I-hCT	85
4. Produção do Antissoro anti-hCT	
4.1. Avaliação da técnica de imunização e do período de colheita do antissoro	85
4.2. Determinação do título dos antissoros obtidos no IPEN	87
4.3. Comparação entre antissoros de diferentes procedências	93
5. Análise das Curvas de RIE obtidas e relativo Controle de Qualidade	99
5.1. Curvas obtidas utilizando os reagentes preparados no IPEN	99
5.2. Curvas de RIE obtidas com o antissoro anti-hCT doado pelo Instituto Karolinska e estudo da precisão dos ensaios	102
5.2.1. Reprodutibilidade intra-ensaio...	107
5.2.2. Reprodutibilidade inter-ensaio...	108
5.3. Calibração do Padrão-IPEN e controle da exatidão dos ensaios realizados	109
IV. DISCUSSÃO	113
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	122

I. INTRODUÇÃO

Evidências de um segundo hormônio regulador de cálcio plasmático foram primeiramente observadas por Copp et alii^(11,12) em 1961, quando eles notaram que a perfusão de alta concentração de cálcio no aparato tireóide-paratireóide de cão causou um aumento de um potente fator hipocalcêmico e conseqüentemente uma queda rápida de cálcio plasmático. Denominaram esse fato de Calcitonina, uma vez que estava envolvido no controle do nível de cálcio nos fluidos corpóreos.

A fonte de Calcitonina (CT) presumia-se ser as glândulas paratireóides. Posteriormente, novos experimentos confirmaram a existência desse fator hipocalcêmico e a origem tireoidiana foi sugerida por Hirsch et alii⁽³³⁾. Foster et alii, em 1964, observaram que em cão não era possível separar adequadamente as paratireóides das tireóides e seus estudos em cabras estabeleceram que a CT era secretada pela glândula tireóide⁽²⁴⁾.

A CT é um hormônio protéico de cadeia simples apresentando um peso molecular de 3.418 daltons. É secretada pelas células parafoliculares da tireóide de mamíferos (células C) e pela glândula último-branquial, em certas espécies como aves e peixes. Trabalhos de Pearse & Polak⁽⁵⁰⁾ mostraram que as células C são embriologicamente originárias da crista

neural e migraram para a região da bolsa branquial posterior para formar o último corpo branquial. No homem, o último corpo branquial incorpora-se aos lobos laterais da tireóide e representa a localização intratireoideana das células parafolliculares. Isto indicaria que a CT e possivelmente outros hormônios produzidos pelas células da série APUD deveriam ser considerados parte do sistema neuroendócrino. (23,52)

Sabe-se que a CT está envolvida na homeostase do cálcio e fósforo, agindo de forma antagônica ao hormônio da paratireóide (PTH), ou seja, atua diminuindo a concentração sérica do cálcio quando o organismo se encontra em estado de hipercalcemia e por conseguinte baixa também os fosfatos; a sua principal ação parece ser a inibição da reabsorção óssea. (7,10,11,21,26,46,52,65)

Nos primeiros anos após a descoberta da CT houve um avanço muito rápido na elucidação da química da CT, isolada do homem e de outras espécies de mamíferos e mamíferos inferiores.

As estruturas das moléculas de CT isoladas de seis diferentes espécies foram determinadas (Fig. 1) e o êxito da síntese da CT porcina, humana e de salmão resultou numa maior utilização desses peptídeos para investigações clínicas, fisiológicas e farmacológicas.

Atualmente, já foi determinada a seqüência de aminoácidos de 7 espécies diferentes: bovina, ovina, porcina, humana, rato, enguia, salmão I, II e III. Cada CT estudada apresentou 32 aminoácidos com apenas uma ponte dissulfeto entre os resíduos de Cisteína das posições 1 e 7, na porção N-

PORCENTAGEM DE
HOMOLOGIA

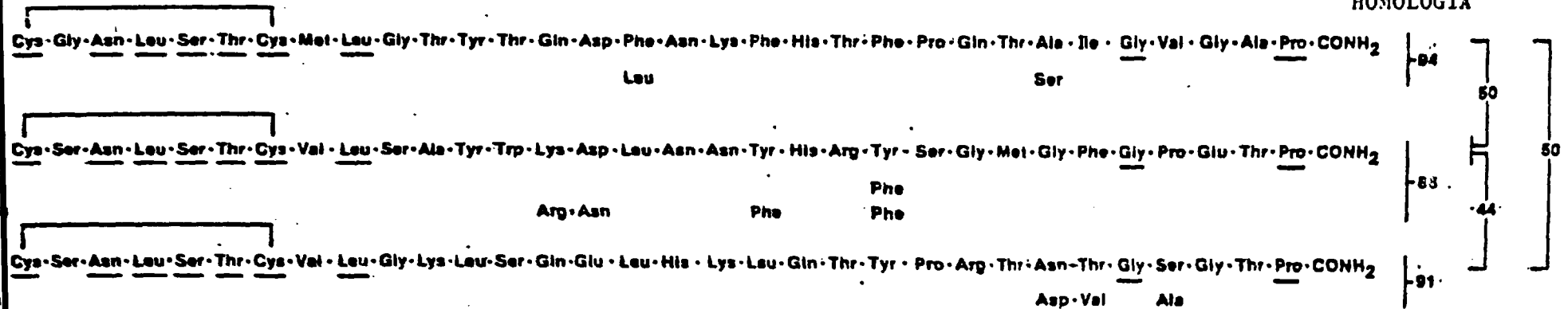


Figura 1: Seqüência completa de aminoácidos das Calcitoninas humana, ovina e de salmão. A substituição dos aminoácidos exigidas para a Calcitonina de rato, bovina, porcina e de enguia estão abaixo das respectivas seqüências homólogas. A porcentagem de homologia intraclasses das Calcitoninas é de 88 a 94% e inter-classe é de 44 a 50%.

-terminal de molécula e um resíduo de Prolina na posição 32 da porção carboxi-terminal. Das 5 espécies primeiramente estudadas (humana, bovina, ovina, porcina e salmão I), observou-se uma homologia em apenas 9 posições na porção N-terminal onde a homologia entre elas é maior^(19,21,52).

Apesar da grande variação na seqüência dos aminoácidos uma considerável semelhança se manteve quanto à conformação da molécula. Isto explica porque cada CT é ativa nas espécies mamíferas que foram ensaiadas. Observou-se também que houve uma considerável conservação com respeito à carga e posição dos resíduos hidrofóbicos e hidrofílicos na molécula. Resíduos hidrofóbicos, por exemplo, Tyr, Phe e Leu ocorrem em intervalos regulares ao longo da molécula (posições 4, 9, 12, 16, 19 e 22). Phe e Tyr são sempre encontrados na posição 22. As cargas dos aminoácidos também apresentam um certo grau de conservação: os resíduos ácidos estão confinados nas posições 15 ou 30; os resíduos básicos se encontram distribuídos mais amplamente. A Tyr é particularmente importante do ponto de vista da iodação: na CT ovina há 3 Tyr, na CT bovina há 2 Tyr (posição 12 ou 19). Nas CT porcina e humana há apenas uma Tyr na posição 12 e na componente maior da CT de salmão há uma Tyr na posição 22⁽⁵²⁾.

A CT se apresenta em altas concentrações no sangue e no tecido tireoidiano de pacientes com Carcinoma medular da tireóide (CMT)^(21,25,26,28,30,52,65,66) e isto tornou possível o estudo do tamanho molecular da CT imunorreativa (iCT). Em condições patológicas o hormônio exibe um certo grau de heterogeneidade^(1,7,21,32,40,43,47,53). As formas he-

terogêneas parecem ser compostas de CT monomérica (CT-M) e há pelo menos 3 formas maiores de peso molecular entre 7.000 e 12.000 daltons. Um componente maior, a forma "big", parece ser formada de agregados de CT-M que podem ser convertidos para a forma monomérica após redução e alquilação. Além das formas agregadas e polímeras, poderia-se ter também a CT ligada às proteínas do plasma por ligações não-covalentes, pois algumas dessas proteínas têm demonstrado afinidade pela CT sintética, e outras formas provavelmente resultam da formação de pontes dissulfeto entre CT-M.

Poucos estudos têm sido realizados sobre o tamanho molecular da iCT em indivíduos normais, uma vez que sua concentração no sangue é muito baixa. Ainda não está bem elucidada qual forma de iCT se encontra aumentada em indivíduos normais após estímulo com cálcio. No homem a CT é secretada pelas células C na forma de preprocalcitonina, com um peso molecular de 14.500 daltons⁽⁷⁾. Este pré-prohormônio se origina mediante mecanismo alternativo pós-transcricional de formação de RNA mensageiro, que leva nas células C da tireóide à Calcitonina e no hipotálamo ao CGRP (Calcitonin-gene related peptide)⁽⁵⁸⁾. Um pequeno peptídeo da parte C-terminal da molécula do precursor é denominado de PDN-21^(7,58) de acordo com a terminologia de Tatemoto & Mutt (1981). O PDN-21, também denominado de Katalcalcina, está presente no plasma em concentrações equimolares com a CT. Esse peptídeo parece apresentar ação hipocalcêmica, mas não foi ainda confirmado.^(7,21,43)

A preparação existente no mercado internacional e nacional para uso terapêutico não é a humana, mas sim a de

salmão⁽⁵⁹⁾, que se observou ser mais potente no homem do que a CT de outras espécies de mamíferos, por causa da resistência dessa proteína à inativação quando em circulação⁽⁵²⁾.

A Calcitonina humana (hCT) pode ser obtida através de extração⁽⁵²⁾ ou síntese. Estudos realizados com esta última preparação demonstraram que a seqüência íntegra é necessária para a expressão da Atividade Biológica⁽²¹⁾. Recentemente, a hCT foi também sintetizada em bactérias mediante técnica de DNA-recombinante, tendo sido determinada a seqüência completa do seu gene do cromossomo de nº 07^(36,37).

Trabalhos de Willians^(68,69) sugeriram a origem do CMT nas células C da tireóide, e por estudos destes tumores em várias espécies observaram as mesmas características histológicas entre elas. O CMT foi identificado como uma entidade clínico-patológica por Hazard et alii⁽³⁰⁾ em 1959, representando cerca de 3 a 10% dos carcinomas tireoideanos. Apesar dessa incidência relativamente baixa, despertou muito interesse em áreas multidisciplinares (endocrinologia, oncologias, histopatologia, genética) devido a certas características próprias: a) o CMT deriva das células C da tireóide, cuja origem é neuroectodermal, b) o CMT produz uma variedade de substâncias bioativas, dentre elas a CT e c) a maioria dos casos de CMT ocorrem esporadicamente, mas há uma forma familiar herdada de modo autossômico, podendo se apresentar associado a outras patologias e as lesões não-endócrinas^(21,23,24,65).

Portanto, como esse câncer pode-se apresentar na forma hereditária, é necessária a realização de controles periódicos^(23,51,28) em indivíduos de alto risco, que são os pa

rentes consangüíneos da pessoa em que a doença já se manifestou. A determinação da concentração de CT no sangue mediante Radioimunoensaio (RIE) representa assim uma das poucas técnicas existentes que permitem o diagnóstico de um tipo de câncer em estágio tão precoce que pode ser completamente curado mediante cirurgia: a tireoidectomia⁽²⁸⁾.

Melvin et alii⁽⁴²⁾ detectaram a presença de carcinomas minúsculos em onze indivíduos considerados clinicamente normais, todos pertencentes a uma mesma família: indivíduos de alto risco. Graze et alii⁽²⁸⁾ acompanharam durante 7 anos, mediante determinações semestrais, 107 indivíduos de alto risco, sendo que 33 deles, que seriam de outra forma considerados clinicamente normais, apresentaram níveis anormais de CT. Todos esses 33 indivíduos foram tireoidectomizados e em exames microscópicos da tireóide, 32 apresentaram hiperplasia das células C, sendo que 20 destes já demonstravam evidências de CMT.

A aplicação desses controles periódicos levou a uma diminuição progressiva da idade em que foram detectados níveis anormais de CT, com clara diminuição até completa eliminação no número de casos com metástases evidentes no momento da cirurgia. É importante salientar que a porcentagem de pacientes com a forma familiar do CMT tem aumentado, uma vez que em programas de rastreamento o encontro da variedade familiar aumenta significativamente⁽²³⁾.

Em 1968, alguns grupos^(14,64) demonstraram que os soros e extratos dos tumores de pacientes com CMT apresentavam um elevado nível de CT. Através de extrações de CT de

tumores, houve a possibilidade de estudar a química, fisiologia e farmacologia de um hormônio cuja existência se desconhecia até o início da década de 60.

Inicialmente, as dosagens de CT de pacientes com CMT eram realizadas por bioensaios. Havia vários métodos descritos e todos avaliavam a habilidade do hormônio produzir hipocalcemia em ratos, através da administração, via-parenteral, de soluções-padrão e soluções-testes^(29,46,52). O sangue era então colhido após administração dessas soluções e após intervalos de tempo apropriados era efetuada a determinação da concentração de cálcio. Porém esses métodos careciam de sensibilidade e de praticabilidade. Posteriormente, um outro método foi desenvolvido utilizando o mecanismo da inibição da reabsorção óssea, estimulada pelo PTH⁽²⁹⁾. Essa técnica era relativamente laboriosa e custosa e logo foi substituída pelo método de imunoensaio.

Em 1959, reconhecendo a necessidade de se dispor de um método sensível e específico que possibilitasse a dosagem dos hormônios peptídicos, Yalow e Berson⁽⁶⁾ introduziram os métodos radiométricos para determinar a reação Antígeno-Anticorpo (Ag-Ac).

A aplicação e o desenvolvimento da técnica de Radioimunoensaio (RIE) revolucionou a Endocrinologia e posteriormente outras áreas como Virologia e Toxicologia tornando possível a mensuração de diversas substâncias, e o entendimento de mecanismos fisiológicos e patológicos no campo de gastro, hemato, nefro, onco e farmacologia.

O princípio do RIE^(6,27) baseia-se na reação com

petitiva entre o Ag marcado isotopicamente (Ag^*) e não-marcado (Ag) para ocuparem os sítios de ligação de um ligante específico, o Anticorpo (Ac), formando o complexo Ag-Ac. Nesta reação a quantidade de produto Ag^* -Ac formado é inversamente proporcional à quantidade adicional do Ag não-marcado. Assim, quanto maior a quantidade de Ag não-marcado no meio da reação, menor a quantidade de Ag marcado que se ligará ao Ac. A curva-Padrão é construída mantendo-se constante a quantidade de Ac e Ag^* correspondente, por adição de Padrões de Ag não-marcado em concentrações crescentes, o que ocasionará uma diminuição proporcional da ligação daquele marcado para formação do complexo Ag^* -Ac. Dessa forma, pode-se determinar a quantidade de Ag de uma amostra desconhecida fazendo-se uso dessa Curva-Padrão.

As técnicas de RIE exigem a produção de Anticorpos capazes de se ligarem especificamente à substância que se deseja quantificar. Os primeiros antissoros anti-CT foram produzidos em cobaias e coelhos, com extrato de CMT^(10,52,64). Geralmente uma pequena porcentagem dos animais imunizados, depois de um período relativamente longo, produz um antissoro que possa ser usado em RIE, ou seja, um antissoro contendo anticorpos de especificidade apropriada, com uma alta constante de afinidade e com um título suficiente para um razoável número de ensaios.

Com o advento do RIE para a CT porcina^(18,63) e sua aplicação em estudos fisiológicos, foram descritos subsequentes ensaios para a CT humana^(10,16,65), bovina, ovina e de

salmão. A aplicação desses RIE específicos trouxe-nos muitas informações sobre a secreção desses hormônios e o significado fisiológico nas várias espécies estudadas. O método de RIE para hCT desenvolvido por Clarck (1969)⁽¹⁰⁾ não era suficientemente sensível para dosar CT no sangue de indivíduos normais. Em 1970, Tashjian⁽⁶⁵⁾ desenvolve um RIE mais sensível capaz de dosar CT plasmática em indivíduos normais e portadores de CMT. Métodos mais sensíveis foram desenvolvidos posteriormente^(7,16,21,25,29,31) e atualmente, com o uso de um RIE sensível e direto, a CT basal em indivíduos normais parece ser menor que 100 pg/ml. Contudo, mesmo com métodos sensíveis, muitos indivíduos normais tiveram seus níveis de CT sérica não-detectáveis.

Considerando que a CT desempenha uma função hormonal no homem, ela apresenta uma secreção em condições basais e sob estímulo. A secreção de CT é influenciada por uma variedade de substâncias como o cálcio, vários hormônios gastrointestinais e o álcool. Estudos sobre infusão de cálcio (gluconato de cálcio) foram muito usados para investigar a secreção de CT⁽⁴⁶⁾. Nesse contexto, testes provocativos envolvendo a administração de cálcio, Pentagastrina ou outro estimulante da secreção de CT, podem ser usados para a investigação sobre a população de alto risco no caso de CMT, ou quando o nível basal está com um valor que se aproxima da região crítica^(17,21,26,28,45,52,65). A resposta normal não excede 200 pg/ml a um dos testes de estímulo, ou combinados, enquanto respostas maiores devem ser melhor avaliadas. Entretanto, o elevado nível sérico de CT por si só não conduz ao diagnósti-

co de CMT pois há uma variedade de condições (neoplásicas e não-neoplásicas) onde é possível encontrar a CT elevada, principalmente em indivíduos com câncer de pulmão ou mama, metástase óssea com hipercalcemia, insuficiência renal crônica, síndrome de Zollinger-Ellison, distúrbio ósseo e mineral etc. Por estas razões o diagnóstico do CMT é baseado em exames clínicos, radiológicos e cintilográficos^(45,60) e é definitivamente estabelecido pelo achado de alto teor de CT sérica e um aumento significativo após teste de estímulo. Isto se fez necessário porque há evidências da secreção de CT extratireóide^(5, 21,52,73) pela análise de soro e urina de pacientes com tireoidectomia total. Verificaram-se concentrações de CT em muitos órgãos como timo, pulmão, bexiga urinária, trato-gastrointestinal e Sistema Nervoso Central. Isto explica porque a tireoidectomia total no homem não é acompanhada por alterações significativas de calcemia.

PROPÓSITO DO TRABALHO

Como já foi mencionado anteriormente, a aplicação do RIE de Calcitonina humana à detecção de CMT representa uma das poucas técnicas de diagnóstico realmente precoce existentes até o presente momento.

Trabalhos mais recentes^(7,19,21,44,45,53,71) têm demonstrado um interesse cada vez maior na padronização de técnicas suficientemente sensíveis, precisas e específicas pa

ra esta finalidade. Dentro desse contexto se situa o propósito do nosso trabalho: a padronização de uma técnica adequada para este tipo de determinação diagnóstica mediante reagentes todos possivelmente produzidos em nosso laboratório. No Brasil todos os "kits" para RIE de hCT são importados, apresentando custos exorbitantes e dificuldade de obtenção, sendo que também não há produção e comercialização dos principais reagentes necessários para este tipo de ensaio: antígeno frio e radioiodado e antissoro específico de alta afinidade. Além da preparação do traçador ($^{125}\text{I-hCT}$), do Padrão secundário (hCT-CIBA) e do 1º AC de avidéz suficiente, uma das metas principais do nosso trabalho foi a padronização de uma técnica de purificação do produto marcado capaz de permitir suficiente ligação específica ao anticorpo, importante fator para a obtenção da precisão e da sensibilidade necessária. Devemos ressaltar que esta sensibilidade no caso de RIE de CT é muito maior (da ordem de 10 a 50 pg/ml) daquela necessária para outros tipos de RIE, constituindo-se uma das maiores dificuldades da presente padronização.

Na literatura referente a este tipo de ensaio, as técnicas de purificação de $^{125}\text{I-hCT}$ mais comumente usadas são: purificação em gel de filtração^(13,16,31), em gel de troca-iônica^(7,9,19) e mais recentemente em HPCL^(38,44) (High Performance liquid chromatography) e por cromatofocalização⁽⁷⁰⁾. Em nosso laboratório resolveu-se utilizar para este fim, a técnica de EGPA^(15,39) (Eletroforese em gel de Poliacrilamida) devido especialmente à sua altíssima capacidade de resolução, praticabilidade, flexibilidade e à existência já amplamente adquirida^(3,57) na utilização desta metodologia.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

1. MATERIAIS

1.1. Equipamentos e materiais permanentes

- Agitador Magnético Modelo 257 da FANEM, Brasil.
- Agitador Mecânico do tipo "Vortex" marca Phoenix, mod. AT 56, Brasil.
- Agitadora - Incubadora Dubnoff GCA Co, USA.
- Balança Semi-Analítica mod. P 1000N, com precisão de 0,1 g, Mettler, Zurique, Suíça.
- Balança analítica mod. H20T, com precisão de 0,01mg, Mettler, Zurique, Suíça.
- Balança-Analítica, com precisão 0,001 mg, Mettler, Zurique, Suíça.
- Bomba peristáltica marca LKB, mod. 4912A, Estocolmo, Suécia.
- Bomba de vácuo mod. XX-6000000 Millipore. USA.
- Coletor de frações automático marca LKB, mod. Ultrorac 7000, Estocolmo, Suécia.
- Centrífuga refrigerada automática, mod. Super Speed RC-2B, Scrvall, Conn, USA.
- Coluna Cromatográfica de vidro 1,5 x 15 cm, Pharmacia,

Uppsala, Suécia.

- Coluna Cromatográfica de vidro de 2,0 x 50 cm, construída no IPEN-CNEN, São Paulo.
- Cuba eletroforética em acrílico, Técnica Permatron, São Paulo.
- Densitômetro mod. Scan 400, Joyce Loebel, Londres, Inglaterra.
- Espectrofotômetro PQM II Carl Zeiss, Alemanha.
- Fonte de Alta Tensão, Técnica Permatron, São Paulo.
- Freezer com temperatura até -40°C , Metalfrio, S. Paulo.
- Liofilizador mod. ML-L10-3 Metal-lux, São Paulo.
- pHmetro mod. B371, Micronal, São Paulo.
- Pipetas automáticas Oxford, CA, USA.
- Pipetas automáticas reguláveis Eppendorf, Alemanha.
- Repipetador automático (Dispenser) Eppendorf.
- Registrador gráfico mod. 28000 Bryans, Londres, Inglaterra.
- Sistema automático de detecção de radiação, com cintilador de NaI(Tl) tipo poço, de 3 x 2 polegadas marca Nuclear Chicago, USA, que chamaremos de "contador-gama".
- Tubos de ensaio com 12mm de diâmetro e 75 mm de comprimento, de polipropileno, Emtel, São Paulo.
- Seringas descartáveis e agulhas "DB" de 1 e 5 ml para imunização e sangria.
- Centrífuga de mesa Mod. H da International Equipment, Mass, EUA.
- Homogeneizador "VIRTIS HOMOGENIZER 45", NY, EUA.
- Suporte para tubos, em acrílico, construído no IPEN.

- Tubos cilíndricos de vidro com 10 mm de diâmetro x 190 mm de comprimento para moldagem dos géis de poliacrilamida e de 4 x 110 mm para densitometria
- Lâmpada fluorescente de 15W para polimerização dos géis.
- Giletes e régua transparente para fragmentação dos géis.
- Microcomputador modelo I-7000 PCxtII da Itautec, S.Paulo
- Impressora Emilia PC, São Paulo.

1.2. Reagentes e Soluções

1.2.1. Reagentes Empregados na Iodação, Purificação e ensaio

- ^{125}I na forma de NaI em NaOH 0,1N, livre de carregador e redutor, adquirido da New England Nuclear-DuPont, USA. A meia-vida física desse isótopo é de 60 dias.
- Calcitonina humana sintética (CIBA, Suíça): solução de 0,5 µg/ml em HCl 0,01N ou Ácido Acético 0,01N.
- Calcitonina humana sintética (Bachem, USA): solução de 0,1 µg/ml em ácido acético, doada pelo Laboratório Fleury, São Paulo.
- Soro Albumina Bovina (SAB) "RIA-GRADE". cat. nº A 7888 - Sigma Chemicals Co. USA.
- Cloramina T (Merck): 2,5 mg/ml em Tampão Fosfato 0,05 M ph 7,4.
- Metabissulfito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) da Merck: 5,0 mg/ml em Tampão Fosfato 0,05M ph 7,4.

- Tampão Borato 0,1 M ph 8,3-0,02 g% mertiolate, contendo 0,4% de SAB "RIA GRADE" (Tampão de ensaio)
- Mertiolate (Timerosal) da Eli Lilly do Brasil, São Paulo
- Solução de NaCl 0,1 M
- Tampão Fosfato 0,05 M (diluição 1:10 da solução-estoque) contendo 0,1% de SAB "RIA GRADE" (Tampão da coluna)
- Solução de azul-dextrano (1 mg/ml) em Tampão da coluna
- Solução de KI (2 mg/ml) em Tampão da coluna
- Ácido Tricloroacético a 20%
- Gel de Sephadex G-25 Fino e G-50 Médio da Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Suécia
- Norit A - Carbon, Decolorizing, J.T. Baker Chemical Co
- Dextran-T250 - Pharmacia Fine Chemicals, AB, Uppsala, Suécia

1.2.2 - Reagentes Empregados na Produção de Antissoro

- Calcitonina humana sintética. A mesma solução preparada para a marcação.
- Adjuvante Completo de Freund. Difco Laboratórios Detroit, USA.
- Adjuvante Incompleto de Freund: 15% de Arlacel A (Sigma) com 85% de Nujol (Schering S.A.).
- Tampão fosfato-salina (PBS): fosfato 0,01 M ph 7,4, salina 0,15 M, para diluição de antissoro.

1.2.3. Reagentes Empregados na Eletroforese em gel de poliacrilamida 7% (EGPA 7%)

- Acrilamida - Bio Rad
- N,N - metileno bis acrilamida (BIS) - Bio Rad, S.Paulo
- N,N,N',N' - tetrametilenodiamina (TEMED) Bio Rad
- Riboflavina - Roche
- Sacarose - J.T. Baker
- Tris Hidroximetilamino metano (Tris básico) MERCK, S.P.
- Azul de Bromo fenol - MERCK, S. Paulo
- Glicina - Sigma
- Solução-estoque do Tampão Tris-Glicina 0,4 M ph 8,3

Tris básico - 6,8 g

Glicina - 28,8 g

H₂O dest, quantidade suficiente para (q.s.p) 1 litro

- Solução Tampão de uso: diluir 1:10 da solução-estoque

- Solução A ph 8,9

Tris básico - 36,6 g

TEMED - 0,23 ml

HCl 1N 48 ml

H₂O dest. qsp 100 ml

- Solução C

Acrilamida 28,0 g
BIS 0,735 g
H₂O dest. qsp 100 ml

- Solução E

Riblofavina 0,04 g
H₂O dest. qsp 100 ml

- Solução F

Sacarose 40 g
H₂O dest. qsp 100 ml

- Solução de Azul de Bromo Fenol (ABF)

Azul de Bromo Fenol - 0,1 g
H₂O dest. qsp 100 ml

- Solução para polimerização a 7%

Solução A - 1 ml
 C - 2 ml
 E - 1 ml
H₂O destilada 4 ml

- Tampão Borato 0,1 M ph 8,3 0,4% BSA 0,02% Merck
(Tampão de ensaio e de eluição do gel)

1.2.4. Material Biológico

- Calcitonina humana-(hCT) sintética gentilmente doada pelos Drs. Scheibli e Andreatta (CIBA-GEIGY, Basel, Suíça), empregada para radiocidação, produção de Antissoros e preparação das soluções de referência (Padrão).

- Antissoros

- . Antissoros anti-hCT produzido em cobaia, no Biotério do IPEN. Estocado na diluição 1:10 em PBS contendo 1% de soro de cobaia normal, a -20°C . Utilizado na dil. final de 1:4000 a 1:6000 em nossos ensaios.
- . Antissoros anti-hCT produzido em coelho, gentilmente cedido pela Dra. E. Bucht, do Instituto Karolinska, Suécia. Estocado na diluição 1:600 em volumes de 500 μl , a -20°C . Utilizado na diluição final de 1:8000 em nossos ensaios.
- . Antissoros anti-hCT produzido em coelho, gentilmente cedido pelo Dr. Ewaldo M.K. Russo do Lab. Fleury, São Paulo.
- . Soro de Coelho Normal ou "não-imunizado".
- . Soro de Cobia Normal ou "não-imunizado".
- . Antigama Globulina de coelho (2 θ Anticorpo) produzido em cabra, fornecido pela Radioassay. Utilizado na diluição 1:5, em PBS
- . Antigama globulina de coelho (2 θ Ac) produzido em

cabra, da Pharmacia Fine Chemicals.

1.3. Animais utilizados na produção de antissoro

- Coelhos machos albinos da raça Nova Zelândia, com 4 meses de idade
- Cobaias (Cavia porcellus) machos, com 6 meses de idade

2. MÉTODOS

2.1. Marcação da hCT sintética com ^{125}I

Para a obtenção do hormônio marcado com ^{125}I , utilizamos dois métodos, empregando a Cloramina T como agente oxidante:

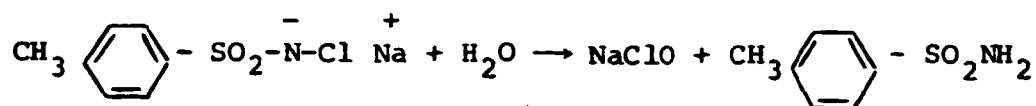
- a) Método Clássico de Hunter & Greenwood^(34,35)
- b) Método de Roth mod, ou mét. estequiométrico^(4,56).

Ambos os métodos utilizam a Cloramina T como agente oxidante. O método da Cloramina T foi introduzido em 1963 por Hunter & Greenwood e até hoje é amplamente empregado.

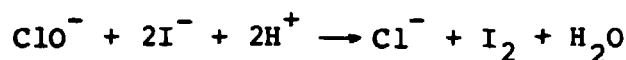
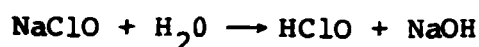
A Cloramina T é o sal sódico de N^{\ominus} monocloro derivado da p-tolueno sulfonamida, em agente oxidante, que em solução aquosa forma o ácido hipocloroso, que é o promotor da oxidação do iodeto⁽³⁴⁾ (Fig. 2).

A reação do Iodo⁽⁴¹⁾ com componentes aromáticos, como é o caso da Tirosina (Tyr) é uma reação de substituição envolvendo o ataque eletrolítico no anel aromático do amino-

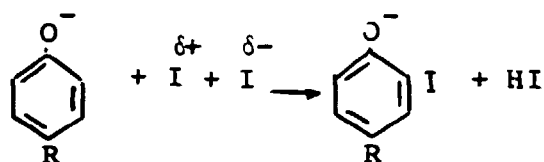
ácido. A hCT apresenta apenas um resíduo de Tyr em sua cadeia.



Cloramina T



Iodo ativo



Resíduo de Tyr Tyr iodada

Figura 2. Reação de iodação do anel tirosínico, promovida pela Cloramina T

O pH ótimo para a reação fica em torno de 7,5; acima de 8,5 a iodação pode levar à oxidação em outros grupos diferentes de Tyr, como por exemplo, a histidina.

Por esses métodos, quantidades muito pequenas de hCT (1 - 5 µg) podem ser iodadas com alta atividade específica.

2.1.1. Iodação pelo Método Clássico

As marcações devem ser realizadas obrigatoriamente

te em capela devido à volatilidade do $^{125}\text{I}_2$.

A reação é efetuada em tubo de ensaio (12 x 75mm) de fundo cônico, utilizando-se pipetas Oxford, Eppendorf e descartáveis "Clay Adams", sob agitação moderada e contínua com o auxílio de um pequeno fragmento de aço inoxidável ("microimã"). Este é mantido no tubo de marcação, em rotação por agitação magnética. Os reagentes foram adicionados na seguinte ordem e quantidades, sendo que a quantidade de Iodo variou de acordo com a Atividade Específica de cada partida. (Fig. 3)

2.2.2. Iodação pelo Método Estequiométrico, modificado

Visando minimizar os possíveis efeitos deletérios do Cloramina T e Metabissulfito usados em altas concentrações pelo Método Convencional, sobre a proteína a ser marcada e almejando incorporar de 0,2 a 1,0 átomo de iodo por molécula, podemos optar por um método mais suave: o método estequiométrico descrito por Roth⁽⁵⁶⁾, com algumas modificações introduzidas em nosso laboratório⁽⁴⁾. Por este método, a Cloramina T é adicionada em quantidades limitantes, adicionando-se pequenas quantidades por vez, sendo o grau de iodação medido pela precipitação com TCA a 20%. Após cada adição de Cloramina T, a próxima adição, se necessária, é baseada nessa mensuração.

Para cessar a reação, em geral, é suficiente diluir a solução de marcação com Tampão contendo 0,1% de SAB, que funciona como redutor mais suave que o metabissulfito.

Nesta técnica utilizamos apenas 1 µg de hCT para ser radioiodada e durante a técnica realizamos dois testes: a) teste de "Incorporação de inespecíficos com ^{125}I " ou "Tubos Controles", e b) "teste de Incorporação do ^{125}I ao hormônio", nos quais são utilizados tubos contendo 200 µl de Tampão Fosfato 0,05 M pH 7,4 contendo 0,1% SAB e 20 µl de KI (1 mg/ml) e com o auxílio dos microcapilares "Clay Adams" com as pontas em forma de bulbo, microquantidades da mistura de reação são retiradas para a execução desses testes por precipitação com TCA 20%.

O esquema da iodação por este método está demonstrado na Figura 4.

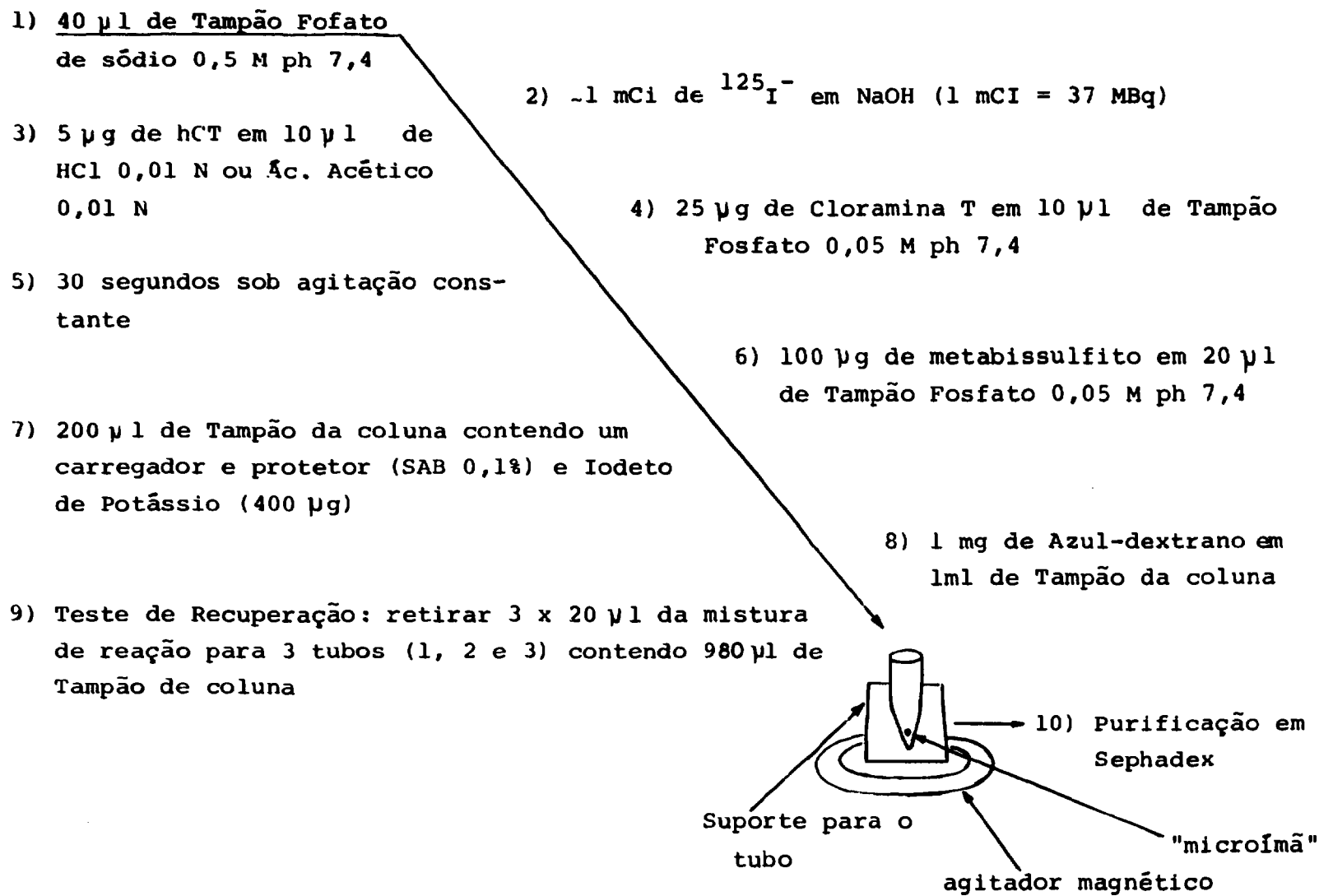


Figura 3: Esquema da iodação do hormônio protéico pelo método Clássico de Hunter & Greenwood

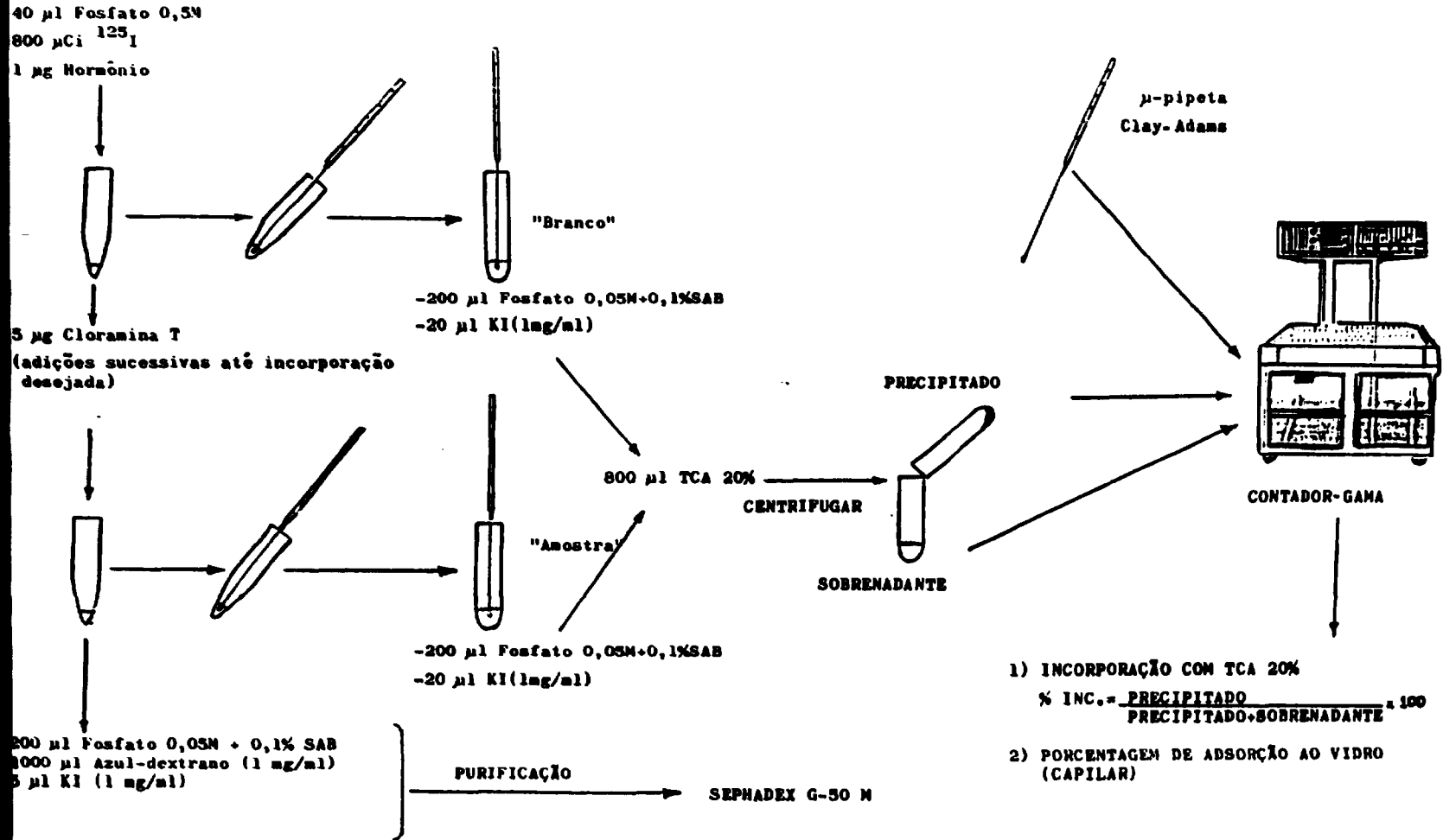


Figura 4. Esquema da iodação do hormônio proteico pelo método estequiométrico de Roth.

2.2. Purificação da Calcitonina radioiodada(^{125}I -hCT) e análise da mistura da reação

2.2.1. Purificação da Calcitonina radioiodada(^{125}I -hCT) em coluna de Sephadex

A hCT radioiodada foi purificada por Cromatografia de filtração em gel de Sephadex G-25 Fino (esferas de diâmetros de 20 - 80 μm) por analogia com as características do Bio-gel P-10 utilizado por alguns autores^(16,31) para esse fim.

No preparo da coluna, 5 g de pó seco foi previamente entumescido com Tampão 0,05 M ph 7,4 por 24 horas. Foram feitas 10 trocas de Tampão decantando ou aspirando o sobrenadante com a ajuda de uma bomba d'água e o ar presente no gel foi eliminado empregando-se uma bomba de vácuo.

A seguir montou-se uma coluna de vidro de 1,5 x 30 cm (Pharmacia) com 3 vezes o seu volume de Tampão Fosfato 0,05 M ph 7,4 0,1% SAB (Tampão da coluna). O volume (V) da coluna foi calculado utilizando a fórmula $V = \pi r^2 \times h$ onde r é o raio da coluna e h a altura do gel na coluna. A coluna foi adaptada num coletor de frações automático LKB refrigerado para evitar desnaturação da molécula protéica pela temperatura, com fluxo de 4 ml/hora ou 0,33 ml/tubo.

Após aplicação da mistura de marcação, a eluição foi feita com Tampão da coluna e as frações foram colhidas com o auxílio de uma bomba peristáltica. Foram coletadas 80 frações e de cada uma delas alíquotaram-se 20 μl para análise

no contador-gama, com a finalidade de traçar o perfil radio-cromatográfico e assim determinar o pico correspondente à Cal_u citonina marcada.

As frações correspondentes ao pico do hormônio marcado foram reunidas ("pool"), aliquotadas em volumes de 1 ml e armazenadas liofilizadas, em dessecador a -35°C ou simplesmente congeladas a -35°C ⁽¹³⁾.

Posteriormente, optou-se pela realização da purificação do marcado em uma coluna maior, de 2,0 x 47 cm, com gel de filtração Sephadex G-50 M (esferas com diâmetros de 50 - 150 μm).

No preparo dessa coluna utilizou-se 16 g de pó seco, lavando-se 10 vezes com H_2O destilada e deixou-se por 3 horas a t.a. para melhor entumescimento. A seguir ferveu-se por 1 hora em banhomaria, seguindo basicamente os procedimentos descrito pelo manual da Pharmacia.

A coluna foi montada com o gel a 60°C aproximadamente e após esfriamento o fluxo livre foi medido e com a ajuda de uma bomba peristáltica o fluxo foi mantido a 12 ml/h, a 4°C . a eluição foi feita com tampão de coluna e alíquotas de 20 μl foram analisadas num contador-gama. Analogamente ao procedimento anterior, as frações correspondentes ao pico de cal_u citonina marcada foram misturadas e estocadas.

O fluxo livre da coluna montada com o gel G-50 M variou de 1,6 a 2,0 ml/min sendo remontada quando o intervalo de tempo entre as marcações era grande, ou caso contrário, lavando-se simplesmente o gel mediante duas ou três vezes o volume da coluna de Tampão Fosfato 0,05 M ph 7,4 isento de SAB

e azida.

2.2.2. Cálculo da Recuperação

De cada fração coletada retiramos uma alíquota de 20 μ l e analisamos em um contador-gama, juntamente com as pontei-
teiras utilizadas na marcação, o tubo cônico vazio e 20 μ l de
cada tubo (1, 2 e 3) do "teste de recuperação".

A porcentagem de Recuperação (R) é dada por

$$R = \frac{T}{A} \times 100$$

de onde A = atividade total aplicada na coluna

T = atividade total recuperada nas frações.

Calcula-se A usando a seguinte fórmula:

$$A = \left[\left(S \times \frac{1000}{S} \right) \times \frac{V}{a} \times \left(\frac{V-3a}{V} \right) - X \right]$$

onde:

S = valor médio (cpm) das alíquotas de 20 μ l dos tubos
1, 2 e 3.

V = volume da mistura de reação

1000 = volume em μ l dos tubos 1, 2 e 3

a = volume retirado da mistura de reação (geralmente 20
 μ l) para preparar os tubos 1, 2 e 3

b = volume retirado de cada tubo (1, 2 e 3) analisado no
contador-gama, geralmente 20 μ l

X = soma da radioatividade (em cpm) perdidas nas pontei-
ras e tubo cônico utilizados durante a marcação.

Calcula-se T pela fórmula

$$T = \sum_{i=1}^n f \times Y_i$$

onde:

Y = radioatividade (em cpm) presente em 20 μ l de cada fração de eluato da coluna descontado o BG

n = número de frações

f = fator de diluição, dado pela relação volume da fração sobre volume da alíquota.

2.2.3. Cálculo do Rendimento da marcação

A mistura de reação apresenta vários componentes que são repartidos no Sephadex, entre o volume de exclusão molecular e o Volume interno das esferas, apresentando assim diferentes coeficientes de distribuição (Kd), que são inversamente proporcionais ao tamanho molecular e em segunda aproximação ao peso molecular⁽²⁾.

Tendo o perfil radiocromatográfico (Fig. 5) foi levada em consideração para os cálculos do Rendimento da marcação a radioatividade total de cada componente, ou seja, a área correspondente a cada pico.

A porcentagem do rendimento de marcação (%H*) é dada por:

$$\%H^* = \frac{H}{S + H + I} \times 100$$

onde:

S = radioatividade (cpm) correspondente ao pico da SAB,
que carrega I^{125}

H = radioatividade (cpm) correspondente ao pico da Calcii
tonina marcada

I = radioatividade (cpm) correspondente ao pico do Iodo
livre.

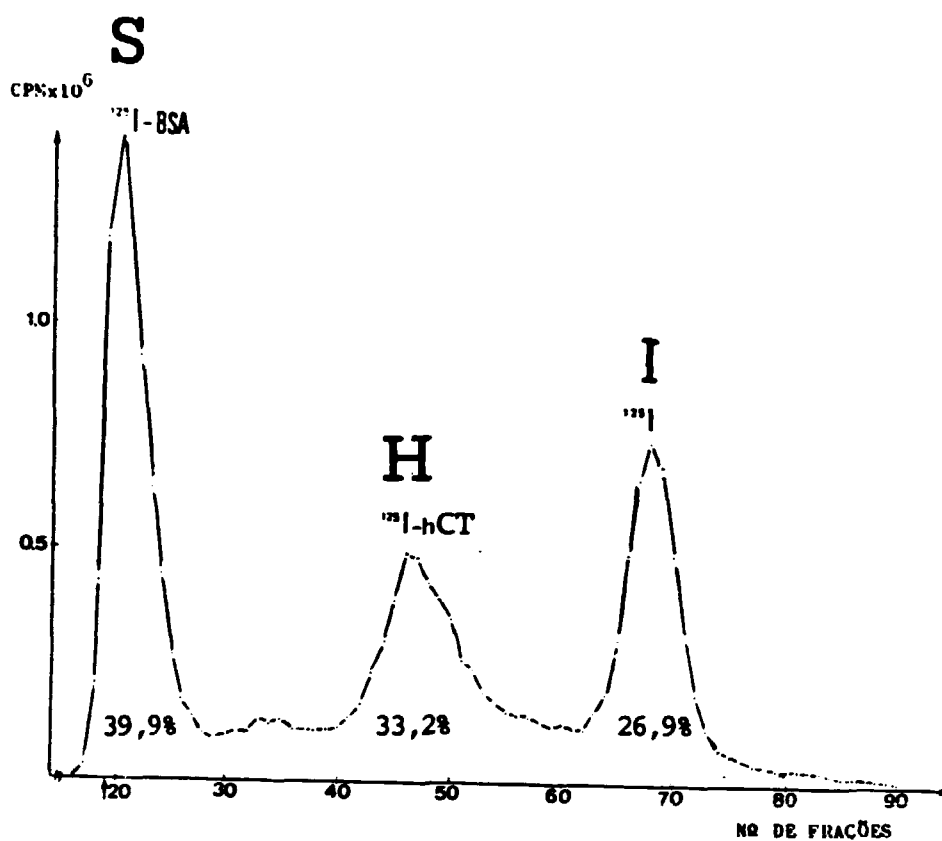


Figura 5. Radiocromatograma da purificação da ^{125}I -hCT em Sephadex G-50M, apresentando 3 picos distintos: ^{125}I -SAB (S) ; ^{125}I -hCT (H) e ^{125}I livre (I), e os respectivos rendimentos

2.2.4. Cálculo de atividade específica do marcado

O valor da Atividade Específica (A.E.) da Calcitonina marcada com ^{125}I é calculada segundo a fórmula abaixo, expressada em $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$:

$$\text{A.E.} = \frac{\text{A} \times \%H^*}{m \times 100} \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$$

onde A = atividade total do ^{125}I empregada na reação de marcação, em μCi

$\%H^*$ = porcentagem referente ao pico de Calcitonina marcada

m = massa em μg do hormônio utilizado na marcação, presente no pico H

2.2.5. Cálculo do coeficiente de distribuição (Kd)

O cálculo do Coeficiente de distribuição (Kd) é dado pela equação:

$$Kd = \frac{V_E - V_O}{V_T - V_O}$$

onde, V_E = volume de eluição do pico em exame

V_O = volume de exclusão molecular (void volume)

V_t = volume total da fase líquida da coluna, medido pelo volume de eluição do pico de ^{125}I

2.3. Repurificação da Calcitonina radioiodada por Eletrofo- rese em gel de poliacrilamida (EGPA)

O hormônio marcado foi utilizado para ensaios somente após sua repurificação eletroforética em gel de poliacrílamida 7%, em tubo cilíndrico ("rod gel") de 1 cm de diâmetro por 19 cm de comprimento, para obtenção de um marcado de maior pureza e portanto, de maior imunorreatividade.

Utilizou-se o método descrito por Davis⁽¹⁵⁾ modificado segundo Bartolini et alii⁽³⁾ no que se refere ao uso da riboflavina ao invés de persulfato de amônia no preparo da solução E.

2.3.1. Polimerização do gel

Vedaram-se as extremidades inferior de dois tubos (duplicata) com uma membrana adesiva tipo "Parafilm".

A solução de polimerização (gel a 7%) previamente preparada foi transferida cuidadosamente com pipeta Pasteur para os cilindros até altura uniforme de 16 cm. Para assegurar uma superfície perfeitamente horizontal no gel e permitir bandas regulares de separação, cerca de 100 µl de água destilada foram colocados sobre a superfície da solução afim de evitar formação de menisco na extremidade superior, onde a amostra de Calcitonina marcada foi aplicada posteriormente.

A polimerização do gel foi levada a efeito deixando os cilindros num suporte de acrílico, em posição rigoroso

samente vertical, a cerca de 7 cm da lâmpada fluorescente, durante 45 minutos a 4°C.

2.3.2. Aplicação da Amostra e Eletroforese

Realizada a polimerização, retirou-se a água da superfície do gel com a ajuda de um papel absorvente.

Uma alíquota do marcado liofilizado é ressuspendida com H₂O destilada antes do uso e é aplicado um volume de 0,5 a 1 ml da solução. O volume aplicado deve ser igual nos dois tubos, senão, igualar com tampão da coluna. Adicionar cerca de 200 µl da solução F (sacarose a 40%) e 20 µl da solução de Azul de Bromo Fenol a 0,1%, homogeneizando por inversões repetidas do tubo de vidro. Essa solução F é utilizada para aumentar a densidade da solução contendo a amostra, evitando sua mistura com o tampão Tris-glicina no início da corrida eletroforética.

Os tubos agora preparados são montados verticalmente na cuba eletroforética e com o auxílio de uma pipeta Pasteur, completa-se o volume de cada tubo com o tampão Tris-Glicina (tampão de corrida). Em seguida enchem-se os dois reservatórios da cuba com cerca de 600 ml de tampão de corrida, previamente diluído e mantido a 4°C antes do uso.

A eletroforese é efetuada em geladeira, com corrente anódica constante de 5mA/tubo e a voltagem deve permanecer por volta de 200-300V, não devendo ultrapassar esse limite, para não interferir na estabilidade da amostra.

O tempo de corrida é determinado pela migração da banda visível do corante-traçador (azul de bromofenol) até cerca de 5 cm da extremidade inferior do gel, geralmente cerca de 6 horas.

2.3.3. Extração, eluição e análise do gel

Terminada a corrida, o gel é extraído do tubo com auxílio de uma seringa de plástico com agulha de aço inoxidável, injetando continuamente água destilada ao mesmo tempo que a agulha é rodada dentro do tubo de maneira a desprender toda a superfície do gel. Após extração, o gel é seccionado em segmentos de 0,5 cm com a ajuda de uma lâmina e uma régua transparente, devendo-se tomar o cuidado de cortar ao meio a banda do corante-traçador. Essa padronização é importante para comparar e analisar resultados pela taxa de migração relativa (R_m) que é calculada para cada componente da amostra.

Cada segmento é colocado em cerca de 2 ml de Tampão Borato 0,1 M pH 8,3 contendo 0,4% BSA (Tampão de ensaio) para eluição durante uma noite ("overnight") a 4°C sob agitação constante num agitador mecânico.

Após eluição cada fração do gel é analisada em um contador-gama determinando-se o perfil eletroforético.

(Fig. 6)

O eluato das frações de interesse (pico A) é então diluído em tampão de ensaio, a uma contagem de 5.000 a 10.000 cpm/100 μ l para utilização nos ensaios.

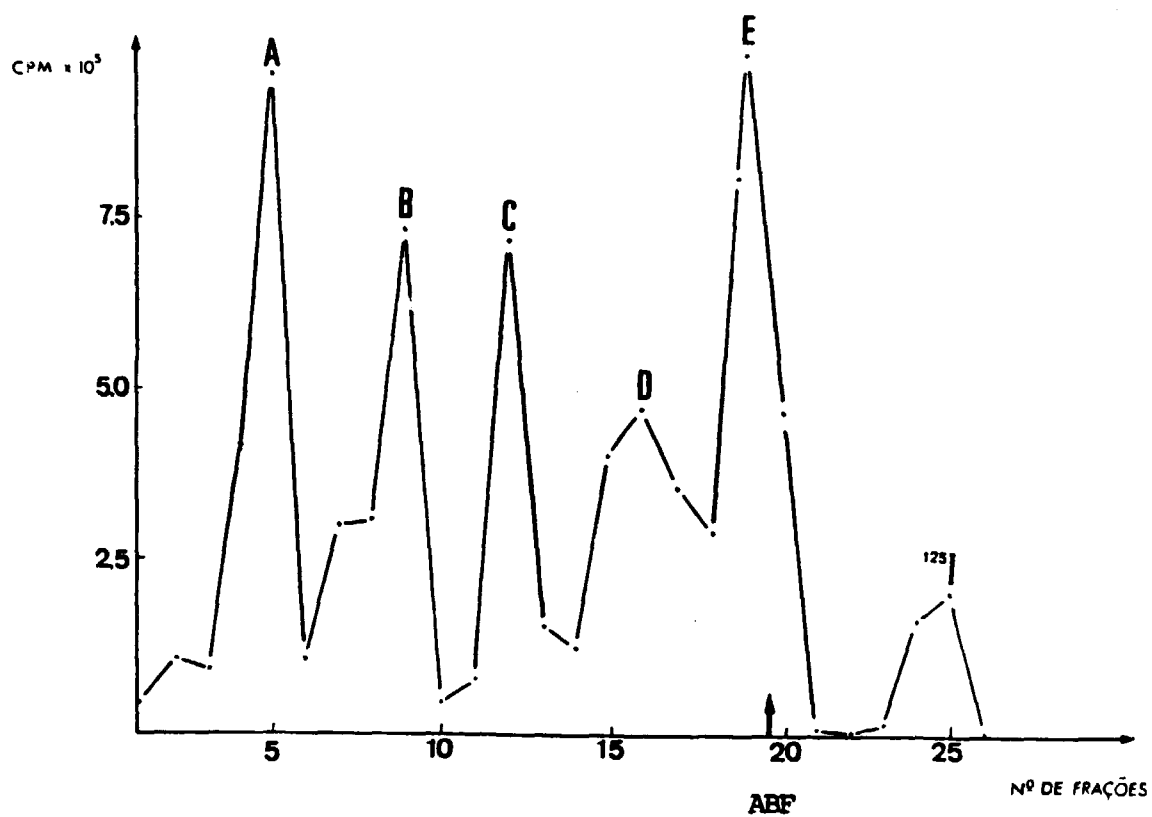


Figura 6. Perfil eletroforético da Calcitonina radioiodada (^{125}I -hCT), obtido da eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) 7% , apresentando 5 picos (A, B, C, D e E) além do pico de ^{125}I livre

2.4. Eletroforese e Densitometria da Calcitonina não-marcada (fria)

2.4.1. Eletroforese de amostras de Calcitonina

Nesse tipo de eletroforese a amostra a ser aplicada é uma solução do hormônio frio, preparada com uma determinada quantidade de Calcitonina dissolvida em 200 μ l de HCl 0,01 N, volume este aplicado no gel.

A corrida eletroforética do hormônio frio deve ser sempre acompanhada por dois géis usados como Controles:

- a) um "branco" que contém todos os elementos da amostra, excluindo a proteína, preparado ao mesmo tempo que as amostras protéicas
- b) um Gel de "referência" onde corremos 100 μ g de SAB de uma solução de 1 mg/ml. A SAB quando analisada em EGPA apresenta 3 bandas distintas correspondentes às formas monomérica, dimérica e trimérica. Como referência qualitativa para a corrida eletroforética, adotou-se a banda monomérica (SAB-M), indicadora das condições eletroforéticas, assim pequenas alterações das soluções empregadas podem modificar significativamente a mobilidade eletroforética ou a resolução das bandas protéicas.

Por ser uma técnica analítica semi-quantitativa, o tubo cilíndrico utilizado é menor (0,4 cm de diâmetro x 11 cm de comprimento) e o volume da amostra a ser aplicada não deve exceder 200 μ l, igualando-se sempre o volume final nos três tubos. A cada amostra são adicionadas cerca de 50 μ l da

solução F (sacarose a 40%) contendo corante-traçador azul de bromo fenol (ABF).

A corrida eletroforética se efetua em corrente anódica de 2 mA/gel, 200 V, a 4°C, interrompida quando o corante-traçador se encontra a cerca de 1 cm da extremidade inferior do tubo.

Os géis são removidos segundo os procedimentos já descrito para o "gel quente", colocados em tubos de ensaios de 14 x 12 cm contendo água destilada e mantidos em posição horizontal para leitura densitométrica dentro dos primeiros cinco minutos. Deve-se tomar o máximo de cuidado para não arranhar os géis durante a extração afim de evitar o aparecimento de artefatos na leitura em feixe de luz ultravioleta (UV) com intervalo de 220 a 310 nm.

2.4.2. Leitura Densitométrica

Após extração e lavagem, para eliminar ao máximo possível as substâncias interferentes, os géis foram submetidos a uma leitura direta em densitômetro, na região UV (feixe de luz no intervalo 220-310 nm) com a velocidade do papel do registrador estabelecida em 1 mm/s e 2,5 mV de amplificação, sendo a velocidade do gel frente ao feixe de luz de 25 mm/min. Obteve-se o perfil de absorvância em relação ao comprimento do gel a partir do qual calculamos os valores de migração relativa (análise qualitativa) e a área (análise quantitativa), com o auxílio de uma régua transparente com divisões de 1 mm.

O "branco" por sua vez definiu a linha base do perfil de absorvância obtido, constituindo-se um dos controles mais importantes da qualidade de polimerização e da presença de artefactos indesejáveis.

2.4.2.1. Cálculo da Migração Relativa (Rm)

A partir do eletroforetograma de absorvância em relação ao comprimento do gel, obtido pela leitura densitométrica direta, calculou-se o Rm da proteína de Referência e da Calcitonina, adotando como ponto médio das bandas protéicas o ponto máximo dos picos no perfil de absorvância.

O cálculo da migração das bandas protéicas em relação à frente eletroforética, ou Rm, é dada pela equação:

$$R_m = \frac{A}{B}$$

onde B = distância de migração do corante-traçador ABF.

A = distância de migração de cada banda protéica.

2.4.2.2. Cálculo da Área dos picos

Calculou-se a área dos picos protéicos sob a curva densitométrica, expressa em mm^2 , manualmente, definindo-se uma linha base e aproximando o pico total a um ou mais triângulos.

O valor da área dos triângulos foi obtido segundo a fórmula convencional:

$$\text{Área} = \frac{\text{base} \times \text{altura}}{2}$$

A precisão e exatidão desta técnica já foi testada no laboratório da TBM com outras proteínas.

2.4.3. Cálculo do Coeficiente de Extinção (E) da Calcitonina

A Calcitonina foi analisada quanto à sua absorvância por densitometria e espectrometria na região do U.V.

Utilizamos como Padrão uma solução de Soroalbumina bovina grau-RIA a 0,2 mg/ml em água destilada ph 7,0⁽⁵⁷⁾. A solução de Calcitonina preparada foi de 0,09 mg/ml em HCl 0,01 N num volume mínimo de 2 ml, que permite sua leitura em cubetas de quartzo nos dois aparelhos.

No espectrofotômetro foi lido nos comprimentos de onda de 230, 260 e 280 nm e no densitômetro na única faixa possível que abrange uma banda U.V. policromática de 220 a 310 nm.

A partir de cada leitura obtida nos diferentes comprimento de onda (λ), calculou-se o respectivo Coeficiente de extinção ($E_{\lambda, 1\text{cm}}^{0,1\%}$) relativo a uma solução de 1mg/ml (0,1%) ao caminho óptico de 1cm, no comprimento de onda respectivo.

2.5. Produção de Antissoro em animais de laboratório

2.5.1. Preparação do Antissoro anti-hCT

Em nosso laboratório os antissoros anti-hCT foram obtidos em cobaias e coelhos, utilizando-se a técnica de imunização baseada em múltiplas injeções intradérmicas dorsais^(66,67). Existem outras técnicas mais complexas como a inoculação do antígeno nos linfonodos⁽⁵⁹⁾, mas essas técnicas envolvendo cirurgia aumenta o risco de vida dos animais pois exigem uma certa prática cirúrgica e condições especiais para a acomodação e tratamento dos mesmos.

Os animais tiveram seu dorso cuidadosamente raspado e após 24 horas inoculou-se cerca de 1 ml de uma emulsão preparada com Adjuvante de Freund Completo (A.F.C.) e Calcitonina dissolvida em HCl 0,01 N, na proporção 1:2. Cada animal recebeu 100 µg de Calcitonina distribuída aproximadamente em 30 "botões" intradérmicos como mostra a Figura 7.

A cada período de 20-30 dias era administrada uma dose-reforço de 50 µg de hCT/animal, na região interna das pernas traseiras (região rica em gânglios linfáticos) substituindo a partir dessa 1ª dose-reforço o Adjuvante de Freund Completo pelo Adjuvante Incompleto, que não contém bacilos da tuberculose mortos. O mecanismo pelo qual atua o A.F.C. é tríplice: a) ação de depósito, retardando a absorção do Antígeno,

b) formação local de um granuloma rico em células imunocompetentes,

c) ação à distância nos órgãos formadores de anticorpos, que são os linfonodos e o baço. Portanto, os adjuvantes têm a capacidade de aumentar a imunogenicidade ou seja, a capacidade de gerar anticorpos.

As sangrias foram realizadas após 8-10 dias de

cada dose-reforço retirando-se no máximo 10 ml de sangue das coelhos pela veia marginal da orelha a 5 ml de sangue dos co baias por punção cardíaca.

O sangue coletado foi mantido por algumas horas em geladeira até retração do coágulo e a seguir o soro foi separado por centrifugação, diluído a 1:10 em Tampão PBS contendo 1% de Soro Normal do animal e estocado a -20°C .



Figura 7 - Coelho tricotomizado na região da nuca e dorso, apresentando reação inflamatória positiva nos locais das injeções ("botões") intradérmicas.

2.5.2. Análise do título dos Antissoros

As técnicas de dose-reforço e sangria foram realizadas durante vários meses até que a análise do título dos antissoros fornecesse valores adequados para uso em RIE.

O título dos antissoros foi determinado mediante incubação da Calcitonina marcada repurificada em EGPA (pico A) com o antissoro em várias diluições, durante 3 dias a 4°C, procedendo a separação das frações livre e ligada do hormônio, pelo método de adsorção com carvão (vide ítem 2.6.1).

As porcentagens de ligação específica(%B) obtidas para cada diluição foi colocada num gráfico com relação a diluição do antissoro (Fig. 8) a cada sangria, para verificar se houve um incremento significativo no título.

O título útil por nós escolhido foi aquela diluição (maior que 1:2000) que permite uma ligação específica adequada com o marcado repurificado.

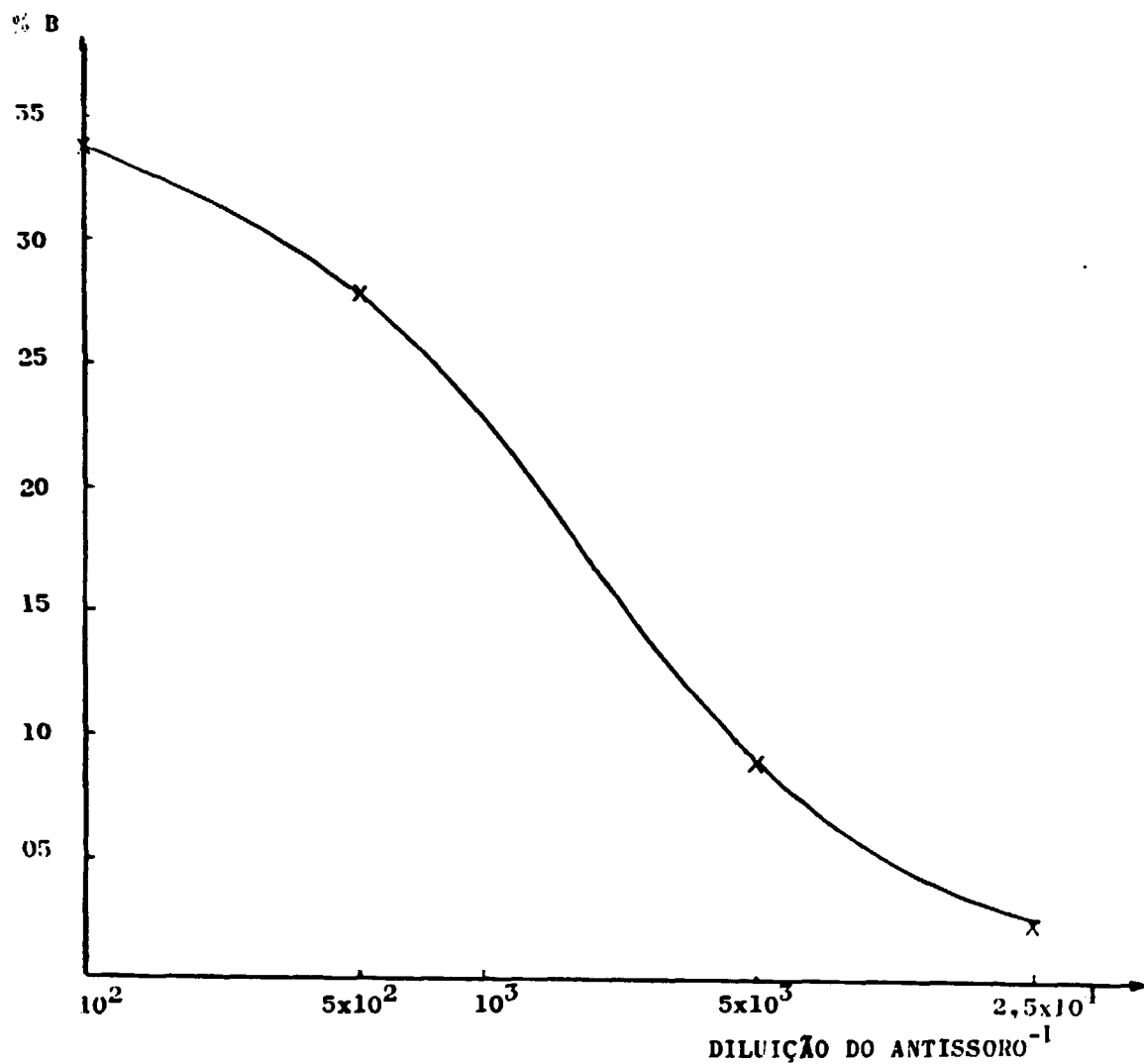


Figura 8. Curva-de-título de um Antissoro-IPEN, utilizando ^{125}I -hCT repurificada em EGPA (pico A) num ensaio de 3 dias de incubação a 4°C e separação realizada pela técnica do duplo Anticorpo.

2.6. Seleção das condições ótimas para o ensaio

2.6.1. Padronização da Técnica de separação das frações de ^{125}I -hCT livre e ligada

Para a separação das frações de ^{125}I -hCT livre e ligada foram analisadas as técnicas de adsorção com carvão-dextrano^(18,52,48), do duplo anticorpo com^(21,22) e sem⁽⁷⁾ adição de polietilenoglicol (PEG).

A técnica de separação com carvão-dextrano foi realizada segundo Tashjian⁽⁶⁴⁾ onde se utiliza 2 mg de carvão /tubo. Nesta técnica a fração livre fica adsorvida ao carvão e a fração ligada se encontra no sobrenadante. A separação do sobrenadante do sedimento é feita com o auxílio de uma pipeta Pasteur (Fig. 9). Com o objetivo de avaliar qual o melhor método (praticabilidade), que forneça bons valores de N.SB e B além de utilizar uma quantidade de 2 μ Ac capaz de tornar completa a separação da fração livre e ligada ao 1 μ AC, testamos dois métodos de separação descritos na literatura, utilizando 2 μ Ac da Radioassay diluído 1:5 em tampão fosfo-salina (PBS), alterando o mínimo possível o protocolo de incubação para podermos comparar exclusivamente os dois métodos de separação. O primeiro método⁽⁷⁾ utiliza 2 μ Ac mais soro de coelho normal, diluído 1:500 e o segundo método^(21,22) utiliza 2 μ Ac associado com PEG 7% seguido de lavagem com PEG 20% (Fig. 10).

O tampão de incubação utilizado para ambos foi o tampão borato 0,1 M ph 8,4 contendo 0,02% de mertiolate e 0,4% BSA-RIA GRADE; o 1 μ Ac, produzido em coelho, foi utiliza

do na diluição final 1:5000 adicionando o hormônio marcado li
o
filizado, ressuspendido antes do uso.

Os protocolos de incubação e separação para cada método, que chamaremos de método I, II e III, estão esquematizados na Figs. 9 e 10.

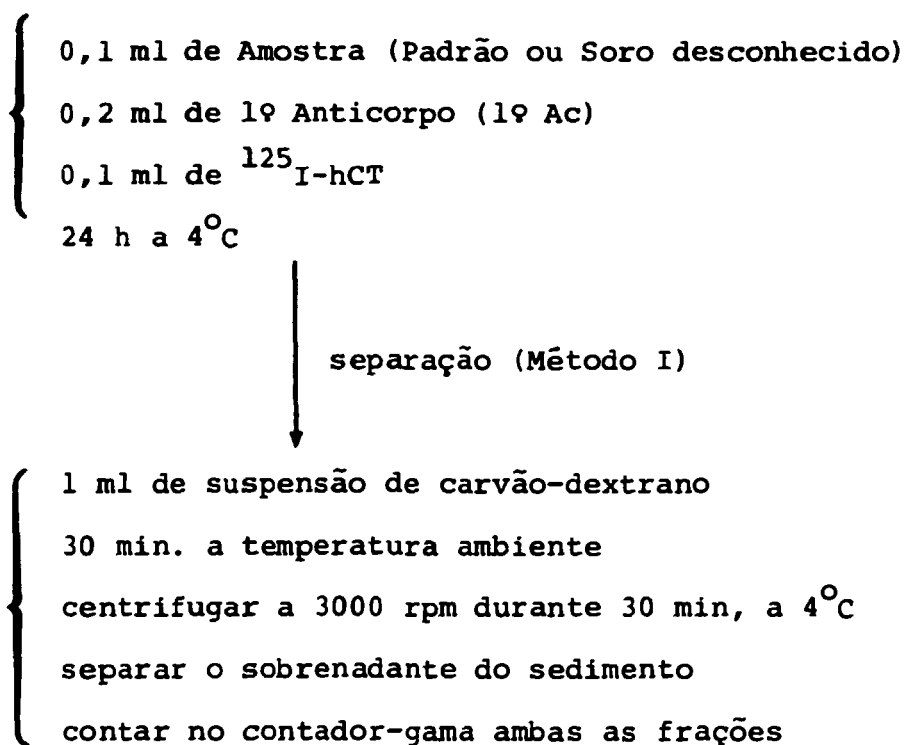


Figura 9 - Esquema de separação das frações do hormônio livre e ligado ao Anticorpo utilizando o método de adsorção com carvão-dextrano

2.6.2. Escolha do tempo e da temperatura de incubação

O tempo de incubação foi escolhido com base nos valores das ligações específicas (% B) da Calcitonina marcada com o ^{125}I Ac, para períodos de 1 e 3 dias.

Adotamos para o RIE a técnica da adição atrasada do marcado, ou seja, incubação do marcado precedida por 2 - 3 dias de incubação entre a hCT-fria presente nos padrões e soros desconhecidos com o Antissoro na diluição adequada (pré-incubação), a fins de conseguir a sensibilidade máxima possível, compatível com a avidéz do antissoro^(9,19,21,25,29,40,62).

Os ensaios foram incubados a 4°C , apesar de ser menor a velocidade da reação Ag-Ac a esta temperatura do que em temperaturas mais elevadas. Essa temperatura baixa se faz necessária para evitar possível degradação dos reagentes, visto o período longo de incubação.

2.6.3. Teste da imunorreatividade da Calcitonina marcada purificada e repurificada

Após cada iodação é necessário testar a imunorreatividade do produto obtido, ou seja, testar a capacidade ligante da Calcitonina marcada incubando-a durante 24 hs a 4°C antes de ser usada nos ensaios. Para isso foram incubados controles de Calcitonina marcada sem Ac e amostras com excesso de Ac.

Inicialmente nossos marcados foram testados com Ac de kits comerciais (INC, DPC, Nichols, Pharmacia) pois não dispúnhamos ainda de um antissoro. Com a imunização dos animais, após cerca de um ano, conseguimos de uma cobaia um antissoro com título útil (antissoro de Referência-IPEN), o qual foi usado numa diluição capaz de fornecer um certo valor conhecido da ligação (%B) em condições de incubação prefixadas e no caso do marcado ser de boa qualidade. Posteriormente, achando necessária a repurificação do marcado em gel de poliacrilamida, o teste de imunorreatividade foi realizado também nos 5 picos distintos (A, B, C, D e E) do perfil eletroforético apresentado na Fig. 6.

Após um dia de incubação processou-se a separação das frações livre e ligada, utilizando-se 2° Ac ou adsorção com carvão.

Nos tubos controles onde o 1° Ac não foi adicionado, a "ligação" ao 2° Ac nos forneceu o valor da ligação inespecífica. Se o valor da ligação ao 1° Ac estiver próximo do valor esperado, estará comprovada a qualidade (imunorreatividade) da 125 I-hCT. Caso contrário, se faz necessária uma nova marcação, a utilização de um lote diferente de hormônio frio ou a adoção de uma técnica diferente de purificação.

2.6.4. Escolha da quantidade de marcado a ser usado

Nos ensaios de Calcitonina, vários autores recomendam usar uma alíquota de marcado contendo após diluição de

5.000 a 10.000 cpm/tubo^(16,52,71). O ideal seria trabalhar com elevada atividade do traçador para minimizar o valor do desvio-padrão, mas quando isto não for possível, decidimos contar as amostras no contador gama em um tempo suficiente para acumular 10.000 contagens.

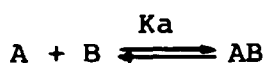
A diluição do marcado foi determinada para que ficasse dentro do possível por volta de 10.000 cpm/tubo, para que em ensaios posteriores com o mesmo marcado pudessemos usar a mesma diluição, considerando que a atividade do traçador já estaria decaindo.

2.6.5. Escolha do título do antissoro

Uma vez definida a boa qualidade e a quantidade adequada de ¹²⁵I-hCT para uso nos ensaios, foi determinada a diluição útil do antissoro obtido em nosso laboratório (ou recebido por doação) para utilização no Radioimunoensaio.

Os testes foram realizados, em triplicata, como já descrito para outro fim, no item 2.5.2. As ligações inespecíficas foram determinadas por meio de tubos controles. Foi escolhida uma diluição do antissoro que proporcionou uma %B abaixo do usual apresentando porém curvas-padrão de alta sensibilidade. Lembramos que o parâmetro sensibilidade está diretamente relacionado com a constante de afinidade (K_a) na reação Antígeno-Anticorpo e que uma vez fixada a natureza do primeiro, é diretamente relacionada à avidéz do Anticorpo. Altas %B podem ser obtidas, pela lei da ação das massas, ou com um

alto Ka ou com uma alta concentração de Ac. Somente o primeiro caso pode proporcionar altas sensibilidades.

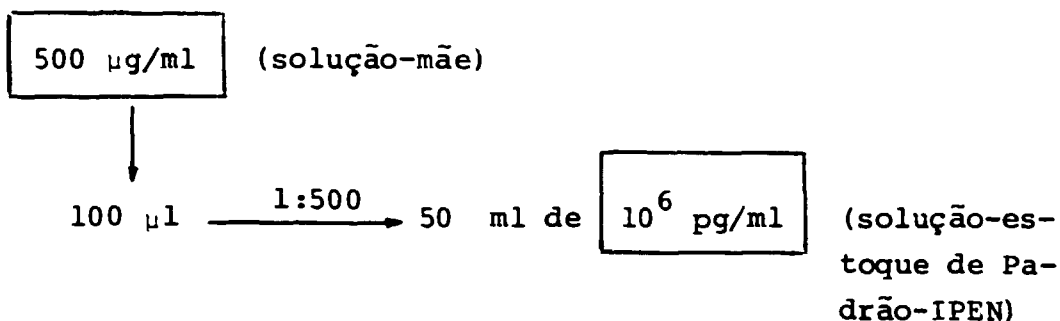


Depois de testarmos outros antissoros de diferentes procedências e de outros animais imunizados em nosso laboratório, foi escolhido para nossos ensaios, um antisoro produzido em coelho, doado gentilmente pela Dra. E. Bucht do Instituto Karolinska. Recebemos também por doação do "National Institute for Biological Standards and Control - NIBSC" o antisoro de referência da O.M.S. que será usado no futuro como verdadeiro antisoro de referência internacional.

2.7. Técnica de Radioimunoensaio

2.7.1. Preparação do Padrão-IPEN

O Padrão foi preparado a partir de uma solução de hCT sintética (CIBACALCINA[®]) na concentração de 500 µg/ml (100 µg de Calcitonina dissolvida em 200 µl de HCl 0,01 N). A partir dessa solução prepararam-se cerca de 50 ml de uma solução de 10⁶ pg/ml (solução-estoque) em Tampão Borato 0,1 M pH 8,4 contendo 5% de SAB RIA-GRADE (Tampão diluente) conforme o esquema abaixo:



A solução-estoque foi aliquotada em volumes de 1 ml, liofilizada durante 24 horas e estocada a -35°C em desidsecador, e utilizada na Curva-Padrão como ponto "Excesso de Antígeno". A partir de diluições seriadas, as soluções para definir os pontos da curva-padrão foram preparadas de acordo com o esquema apresentado na Tabela 1.

A cada ensaio realizado a solução-estoque (10^6 pg/ml) liofilizada era ressuspendida com 1 ml de água destilada e as respectivas soluções-de-referências preparadas a partir de diluições seriadas.

O Padrão-IPEN foi calibrado contra uma solução de referência, que por sua vez foi calibrado contra o Padrão primário da O.M.S. (Padrão de hCT para bioensaio, 70/234) e a Potência relativa foi calculada segundo a razão:

$$\text{Potência relativa do Padrão-IPEN} = \frac{\text{Atividade imunológica do Padrão IPEN}}{\text{Atividade imunológica do Padrão OMS}} -$$

sabendo-se que a atividade imunológica é inversamente proporcional ao valor do parâmetro ED_{50} , temos:

$$\text{Potência relativa} = \frac{\text{ED}_{50} \text{ do Padrão OMS}}{\text{ED}_{50} \text{ do Padrão IPEN}}$$

Tabela 1 - Preparação das diluições seriadas da Calcitonina, a partir de uma solução 10^6 pg/ml preparada em nosso laboratório

	Volume usado	diluição	vol. final	conc. final
10^6 pg/ml	0,05 ml	1:100	5 ml	10^4 pg/ml
10^4 pg/ml	0,2 ml	1:10	2 ml	10^3 pg/ml
10^3 pg/ml	1,0 ml	1:2	2 ml	500 pg/ml
500 pg/ml	1,0 ml	1:2	2 ml	250 "
250 pg/ml	1,0 ml	1:2	2 ml	125 "
125 pg/ml	1,0 ml	1:2	2 ml	62,5 "
62,5 pg/ml	1,0 ml	1:2	2 ml	31,2 "
31,2 pg/ml	1,0 ml	1:2	2 ml	15,6 "
15,6 pg/ml	1,0 ml	1:2	2 ml	7,8 "

Sendo a ED_{50} a dose que produz 50% de queda no valor máximo da ligação.

2.7.2. Radicimunoensaio de Calcitonina

Uma vez determinada as condições ótimas para a realização do ensaio, amostras de soros de concentração desconhecida e as soluções-de-referência previamente preparadas foram incubadas com ^{125}I Ac na diluição adequada durante 2-3 dias, a $4^{\circ}C$ (Pré-incubação). Após esse período adicionaram-se 100 μ l de marcado diluído de 5.000 a 10.000 cpm/tubo e incubou-se novamente por um período de mais 2-3 dias a $4^{\circ}C$ (Incubação). Todas as determinações foram feitas em triplicata sendo o volume de incubação de 400 μ l após adição atrasada do marcado.

Após incubação adicionou-se ^{125}I Ac e Soro Normal de Cobaia ou Coelho, na diluição 1:500 (Método de Separação II). Todos os tubos foram agitados cuidadosamente num "Vortex" e incubados por mais 20 horas a $4^{\circ}C$. Decorrido esse tempo, 2 ml de NaCl 0,1 M foram acrescentados a cada tubo antes de serem centrifugados durante 20 minutos a 4.000 rpm. Esta etapa foi introduzida visando diminuir os valores das ligações inespecíficas (NSB). Procedeu-se à decantação dos tubos, deixando-os emborcados por um período de 15 minutos sobre papel absorvente limpando-se as bordas dos mesmos com o auxílio de cotonetes. A radioatividade dos precipitados foi contada em um Contador-gama.

Os tubos controles nos quais somente estão presentes o traçador e o 2^o Ac nos fornecem a porcentagem de ligação inespecífica e o ponto zero de hCT fria nos fornece a ligação máxima (Bo) entre a Calcitonina marcada e o 1^o Ac, na ausência de competição com a Calcitonina fria.

O Protocolo de Radioimunoensaio da Calcitonina segundo E. Bucht⁽⁷⁾, com pequenas modificações está esquematizado na Tabela 2.

2.7.3. Determinação da Concentração das Amostras

A radioatividade correspondente à fração ligada ao Ac foi determinada no contador-gama por um tempo suficiente para acumular 10.000 contagens.

Foram calculadas as razões entre as contagens específicas obtidas para as diversas concentrações de Padrões e soros (B) e as contagens específicas obtidas para o ponto zero de hCT-fria (Bo), descontando-se as ligações inespecíficas (NSB) de cada ponto. Desta forma os valores obtidos foram transferidos para gráficos de papel milimetrado ou semi-log, tendo na ordenada as relações $B/Bo \times 100$ e na abscissa as concentrações conhecidas do hormônio padrão

A determinação da concentração das amostras é feita diretamente pela leitura na Curva-Padrão, manualmente ou utilizando programas de computação já existentes.

Tabela 2. Protocolo do Radioimunoensaio de Calcitonina

Tubos/nº*1	Tampão Diluente (µl)	1º Ac na dil. ótima (µl)	hCT fria (pg/ml) 100µl	hCT-fria pg/tubo	125I-hCT ~10.000 cpm (µl)	2º Ac 1:5 (µl)	Soro normal (µl)	NaCl 0,1 M (ml)	
(NSB) 1	300	--	--	---	3 100	50	450	2	4000
(Bo) 2	100	200	--	---	D 100	50	450	2	R
3	---	200	10 ⁶	100.000	I 100	50	450	2	P
4	---	200	7,8	0,78	A 100	50	450	2	M
5	---	200	15,6	1,56	S 100	50	450	2	
6	---	200	31,2	3,12	S 100	50	450	2	
7	---	200	62,5	6,25	100	50	450	2	por
8	---	200	125,0	12,5	A 100	50	450	2	15
9	---	200	250,0	25,0	400	50	450	2	M
10	---	200	500,0	50,0	400	50	450	2	I
11	---	200	1000,0	100,0	400	50	450	2	N
Soros	---	200	Desconh.	---	100	50	450	2	U
									T
									O
									S

* 1 Todos os pontos são realizados em triplicata

2.7.4. Avaliação da qualidade dos Ensaios obtidos

2.7.4.1. Dose Mínima Detectável (D.M.D.)

A D.M.D. definida como sendo a menor quantidade significativamente diferente do ponto de dose zero, a nível de confiança de $P = 0,05$, foi calculada segundo a definição de Rodbard^(54,55). Para os cálculos é necessário determinar o valor do desvio-padrão médio (s_p) entre a resposta do ponto zero e a resposta do primeiro ponto experimental significativamente diferente da resposta relativa ao ponto zero.

Assim,

$$s_p = \sqrt{\frac{S_0^2 (n_0 - 1) + S_1^2 (n_1 - 1)}{(n_0 + n_1 - 2)}}$$

onde S_0 = desvio-padrão da resposta do ponto zero (Y_0)

S_1 = desvio-padrão da resposta do primeiro ponto experimental significativamente diferente do zero (Y_1)

n_0 = número de replicatas do Y_0

n_1 = número de replicatas do Y_1

A resposta mínima detectável (Y_{\min}) é assim calculada:

$$Y_{\min} = Y_0 - t \times s_p \times \sqrt{\frac{1}{n_0} + \frac{1}{n_1}}$$

onde $t = t_{95}(n_0 + n_1 - 2) = t_{95}(4) = 2,1318$ considerando $n = 3$.

A Dose Mínima Detectável, D.M.D. ou X_{\min} , é calculada a partir do Y_{\min} pela determinação da inclinação da curva ($\text{tg } \alpha$) no ponto zero:

$$X_{\min} = \text{D.M.D.} = \frac{Y_{\min}}{\text{tg } \alpha}$$

sendo

$$\text{tag } \alpha = \frac{Y_1 - Y_0}{X_1 - X_0}$$

2.7.4.2. Precisão

A avaliação da precisão dos ensaios foi realizada pela análise do coeficiente de variação intra e interensaio de pelo menos 4 amostras controle de qualidade. A referida análise relaciona cada dose com o erro (C.V. ou outro parâmetro) ligado à sua determinação.

Uma avaliação da reprodutibilidade interensaio foi obtido analisando também a variação dos ED_{50} em $n=4$ ensaios.

2.7.4.2.1. Perfil de Precisão

A reprodutibilidade intra-ensaio foi avaliada também pela dispersão dos resultados encontrados nas triplicatas dos pontos utilizados na curva-padrão, em um mesmo en

saio, através do Programa RIALKALK⁽⁵⁵⁾ adaptado ao microcomputador da ITAUTEC, presente em nosso laboratório.

2.7.4.3. Exatidão

A exatidão foi considerada ligada à precisão e ao erro sistemático ("bias") de acordo com a definição⁽²⁰⁾:

$$\text{Exatidão}^2 = \text{Precisão}^2 + \text{Erro sistemático}^2$$

Sua determinação foi realizada comparando os valores obtidos, mediante a nossa técnica, na análise de algumas amostras controle-de-qualidade, com os valores relativos às mesmas amostras declarados pelo produtor de "kits" comerciais ou determinados mediante outro sistema independente.

III. RESULTADOS

1. Análise qualitativa e quantitativa da preparação de Calcitonina sintética humana (Cibacalcina[®])

1.1. Determinação qualitativa em EGPA com leitura não-destrutiva por densitometria U.V.

A Fig. 11 apresenta o perfil densitométrico de uma amostra de Calcitonina (40 μ g) submetida à EGPA 7% em gel de 0,4 cm de diâmetro por 11 cm de comprimento.

As Figs. 12 e 13 correspondem aos perfis dos dois géis usados como controles: o "gel-branco" e o "gel-de-referência" (100 μ g de SAB) respectivamente.

O valor obtido das taxas de Migração Relativa (R_m) foi de 0,122 para a Calcitonina e de 0,700 para a SAB, quando lidos no densitômetro a uma velocidade de 1 mm/s a 2,5 mV de amplificação.

A razão entre o R_m da Calcitonina e o da SAB foi de 0,17. Esse parâmetro poderá ser usado para identificação qualitativa e não destrutiva desta proteína em EPGA, eliminando possíveis flutuações inter-ensaio.

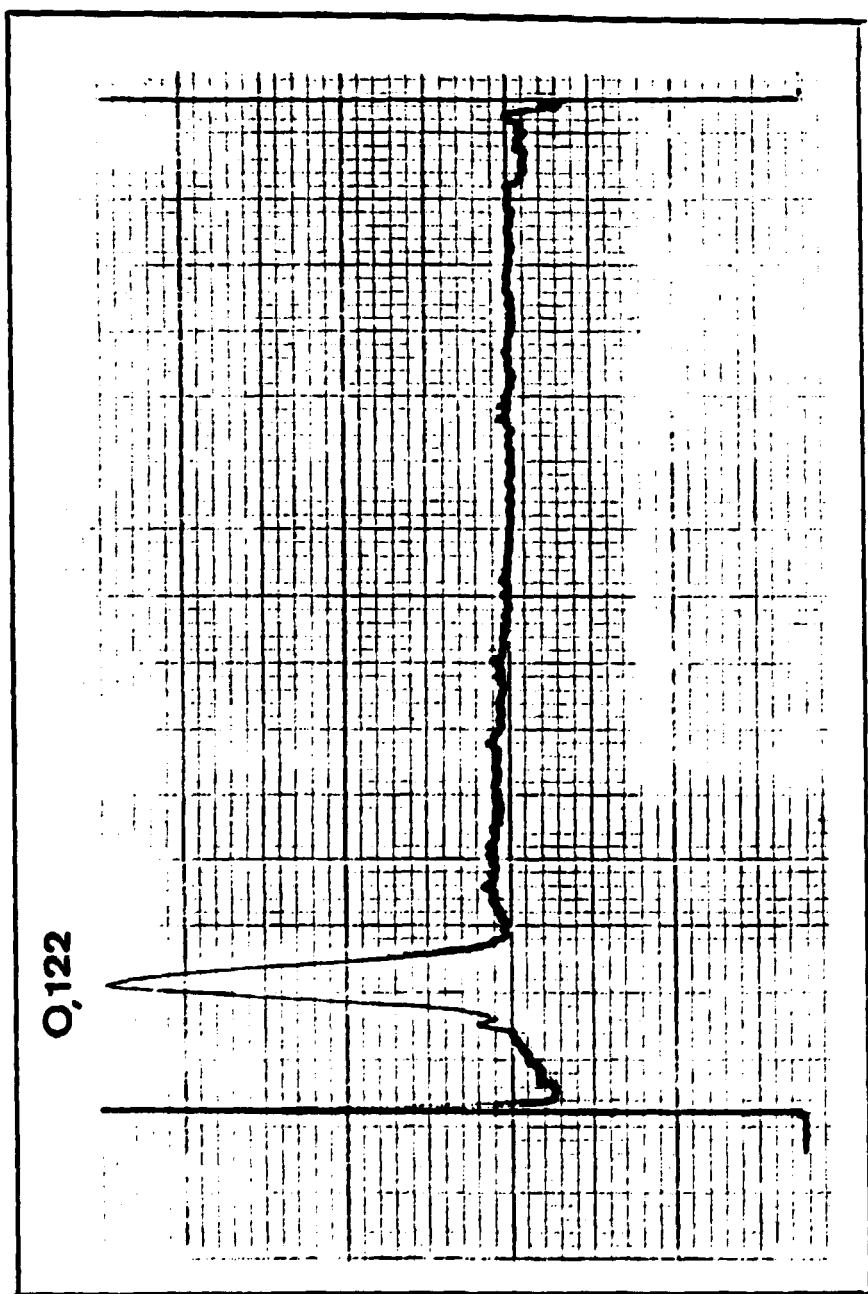


Figura 11. Densitograma da hCT-fria (40 µg) obtido após FGPA analítica.

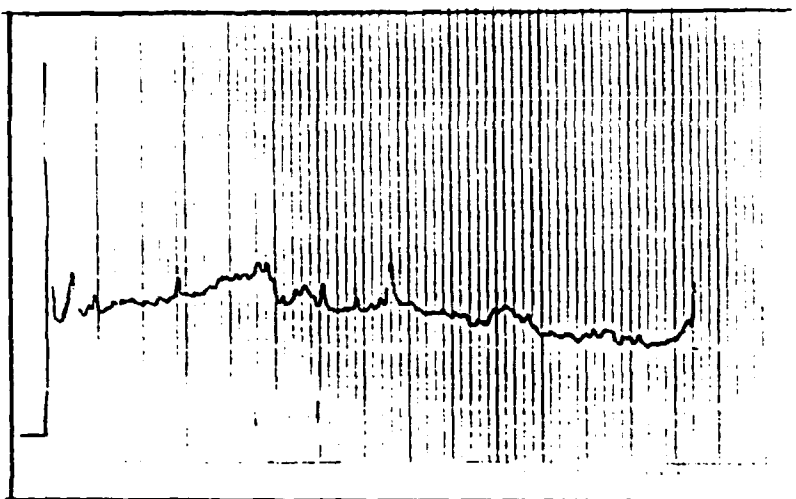


Figura 12. Densitograma do "gel branco".

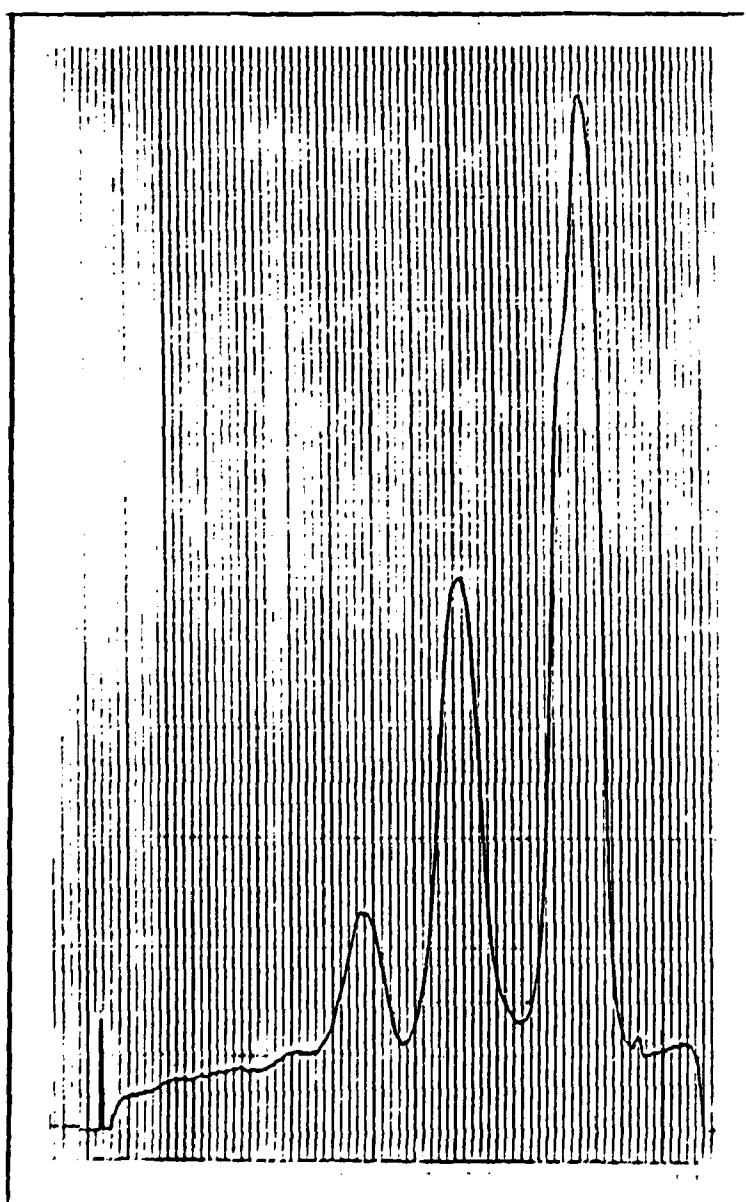


Fig 13

1.2. Determinação do Coeficiente de Extinção (E) da Calcitonina humana, análise quantitativa e teste de pureza

A Tabela 3 apresenta os valores das leituras espectrofotométrica a 230, 260 e 280 nm e densitométrica numa faixa que abrange um feixe de luz U.V. policromática de 220 a 310 nm, de uma solução 0,09 mg/ml de Calcitonina em HCl 0,01N. A partir de cada leitura obtida nos diferentes comprimentos de onda (λ) calculou-se o respectivo Coeficiente de Extinção ($E_{\lambda, 1cm}^{0,1\%}$) relativo a uma solução de 1 mg/ml (0,1%) e com caminho óptico de 1 cm, para a Calcitonina e para a SAB (0,2 mg/ml) usado como Padrão.

Tabela 3 - Coeficiente de extinção (E) obtidos por leitura espectrofotométrica e densitométrica de uma solução 0,09 mg/ml de hCT sintética

	280 nm		260 nm		230 nm		220-310nm	
	A	E	A	E	A	E	A	E
SAB (0,2 mg/ml)	0,127	0,635	0,082	0,410	1,030	5,150	0,596	2,980
h-CT (0,09 mg/ml)	0,048	0,534	0,058	0,644	0,455	5,055	0,384	4,266
SAB (0,2 mg/ml)	0,128	0,640	0,083	0,415	1,060	5,300	0,611	3,056
h-CT (0,09 mg/ml)	0,053	0,589	0,062	0,689	0,500	5,560	0,387	4,303
SAB (0,2 mg/ml)	0,123	0,615	0,079	0,395	1,025	5,125	0,603	3,015
hCT (0,09 mg/ml)	0,038	0,422	0,042	0,467	0,270	3,002	0,352	3,911

Pelos valores apresentados na Tabela 3 calculamos a média dos valores do E para as duas proteínas (n=3):

$$\text{para a SAB o } E_{1\text{cm}, 220-310}^{0,1\%} = 3,017 \pm 0,038 \text{ (CV=1,3\%)}$$

$$\text{para a hCT o } E_{1\text{cm}, 220-310}^{0,1\%} = 4,284 \pm 0,026 \text{ (CV=0,6\%)}$$

$$\text{Portanto, a razão } \frac{E \text{ hCT}}{E \text{ SAB}} = \frac{4,284}{3,017} = 1,420$$

Mediante este fator, calculado em relação ao E da SAB, será possível a determinação quantitativa e não destrutiva de hCT por densitometria U.V., utilizando simplesmente um Padrão de S.A.B. A comparação entre a quantidade de amostra aplicada e o valor determinado por densitometria, fornecerá um teste de pureza simples e rápido.

2. Preparação da Calcitonina marcada com ^{125}I

2.1. Marcação, purificação em Sephadex G-25F e G-50M e Controle de Qualidade da ^{125}I -hCT

Na Fig. 14 encontra-se um cromatograma típico da purificação em coluna de Sephadex G-25F, da Calcitonina radioiodada pelo Método Clássico da Cloramina T.

A Fig. 15 apresenta o resultado da purificação da ^{125}I -hCT em coluna de Sephadex G-50M, da Calcitonina radioiodada pelo Método estequiométrico de Roth.

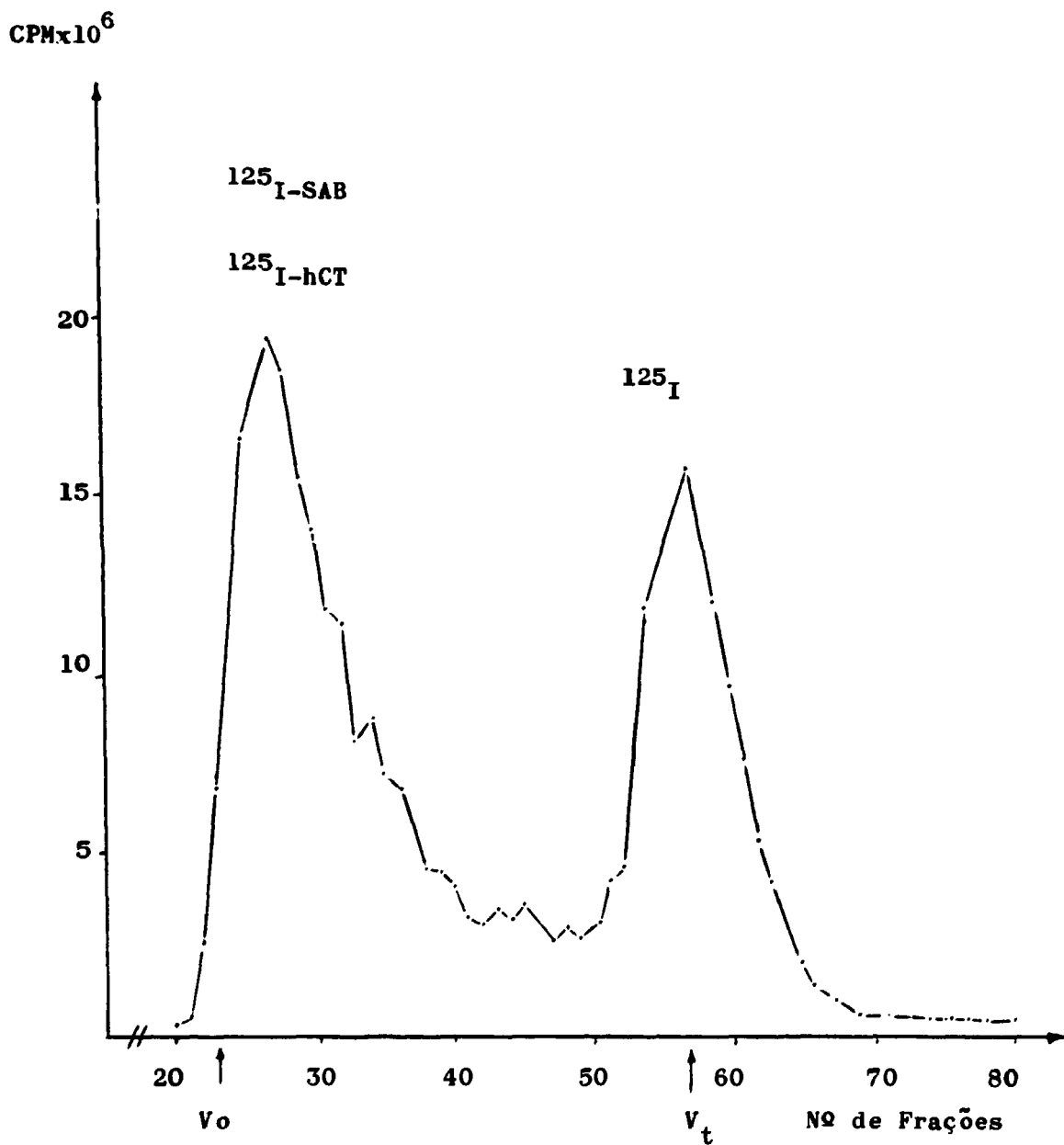


Figura 14. Radiocromatograma da purificação em Sephadex G-25Fino, da Calcitonina(CIBA)marcada com ^{125}I pelo Método Clássico.

Eluente: tampão Fosfato 0,05M ,pH=7,4 + SAB a 0,1%

Coluna: 1,5x10 cm ;Fluxo:4 ml/h

Volume das frações: 0,33 ml

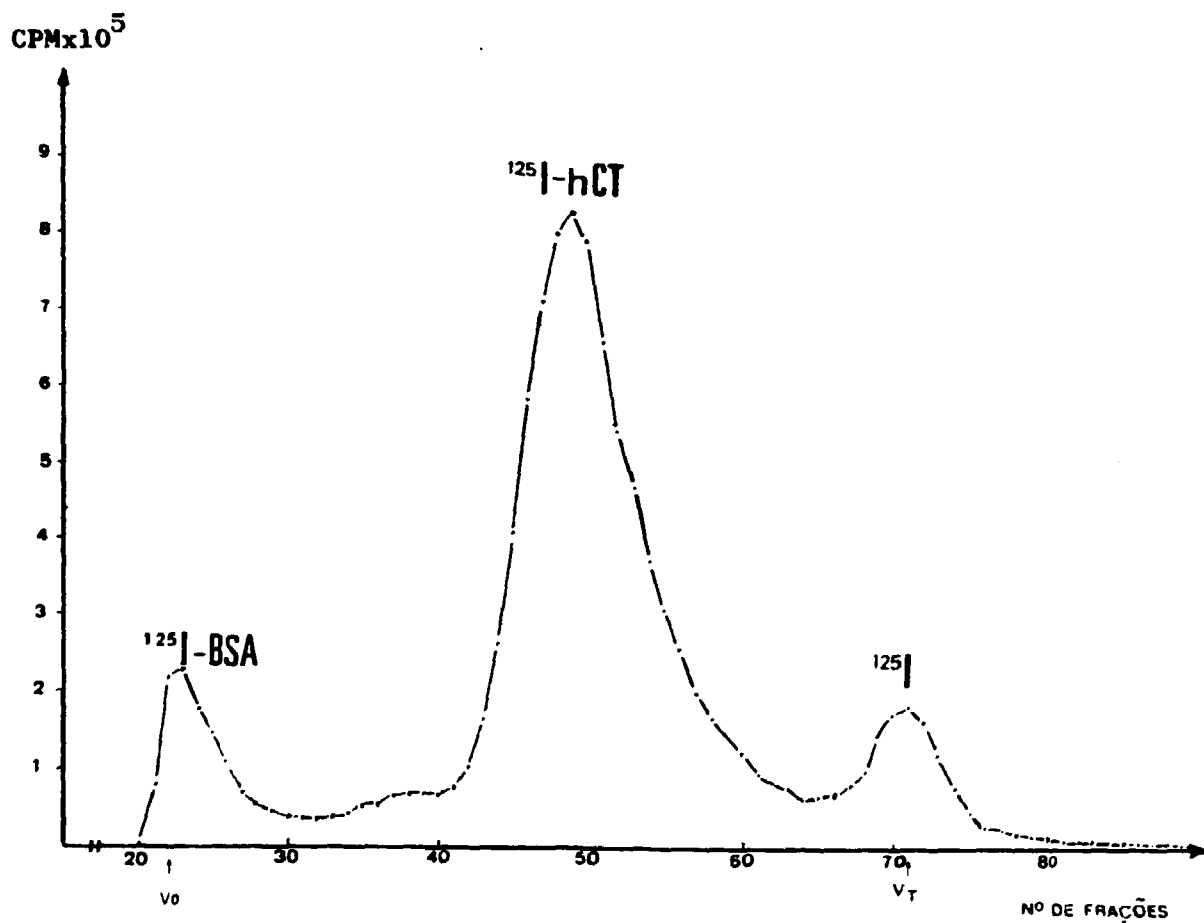


Figura 15. Radiocromatograma da Purificação em Sephadex G-50M, da hCT marcada com 1mCi de ¹²⁵I, pelo método estequiométrico.

Eluente: tampão Fosfato 0,05M pH 7,4 + 0,1% SAB

Coluna : 2,0x47cm; Fluxo: 12ml/h

Volume das frações: 2,0ml

O perfil cromatográfico obtido pela purificação da ^{125}I -hCT em Sephadex G-25F apresentou dois picos apenas: o primeiro correspondente à Calcitonina marcada, onde provavelmente também saiu eluída a radioatividade ligada à SAB, utilizada como carregador e protetor no tampão de purificação, e o segundo pico, que corresponde ao ^{125}I que não reagiu, ou seja, ao ^{125}I livre.

Já o perfil obtido na purificação em Sephadex G-50M apresentou 3 picos distintos: o primeiro corresponde à SAB marcada especificamente ou não-especificamente, o segundo ao hormônio marcado e o terceiro ao ^{125}I livre.

Nas últimas marcações realizadas, observou-se o aparecimento de um pico, anterior ao da Calcitonina marcada (Fig. 16). Acreditamos ser esse pico pertencente a um tipo de hCT agregada, visto que o produto sintético se encontrava estocado em dessecador a -35°C por um período de mais de 3 anos, desde sua doação pela CIBA-GEIGY Ltda, Basel, Suíça.

Na Tabela 4 encontram-se os valores do rendimento e Kd das 3 primeiras marcações realizadas pelo método Clássico e purificadas em Sephadex G-25F.

Tabela 4. Valores das variáveis da marcação da hCT pelo Método Clássico da Cloramina T e purificação em Sephadex G-25F

Marcação método nº	^{125}I usado (μCi)	hCT (μg)	Rend/o (%)	Recuper. (%)	Kd	imureatividade ($\mu\text{Ci}/\text{mg}$)	A.E. ($\mu\text{Ci}/\text{mg}$)	
I	C	962,8	5	47,5	83,3	0,143	+	91,5
II	C	1082,6	5	14,7	67,3	0,125	+	31,8
III	C	877,0	5	45,1	71,2	0,143	+	79,1
$(\bar{x} \pm \sigma)$		(974,1 \pm 103,3)		(35,8 \pm 18,3)	(73,9 \pm 8,3)	(0,133 +0,010)		(67,5 \pm 31,5)

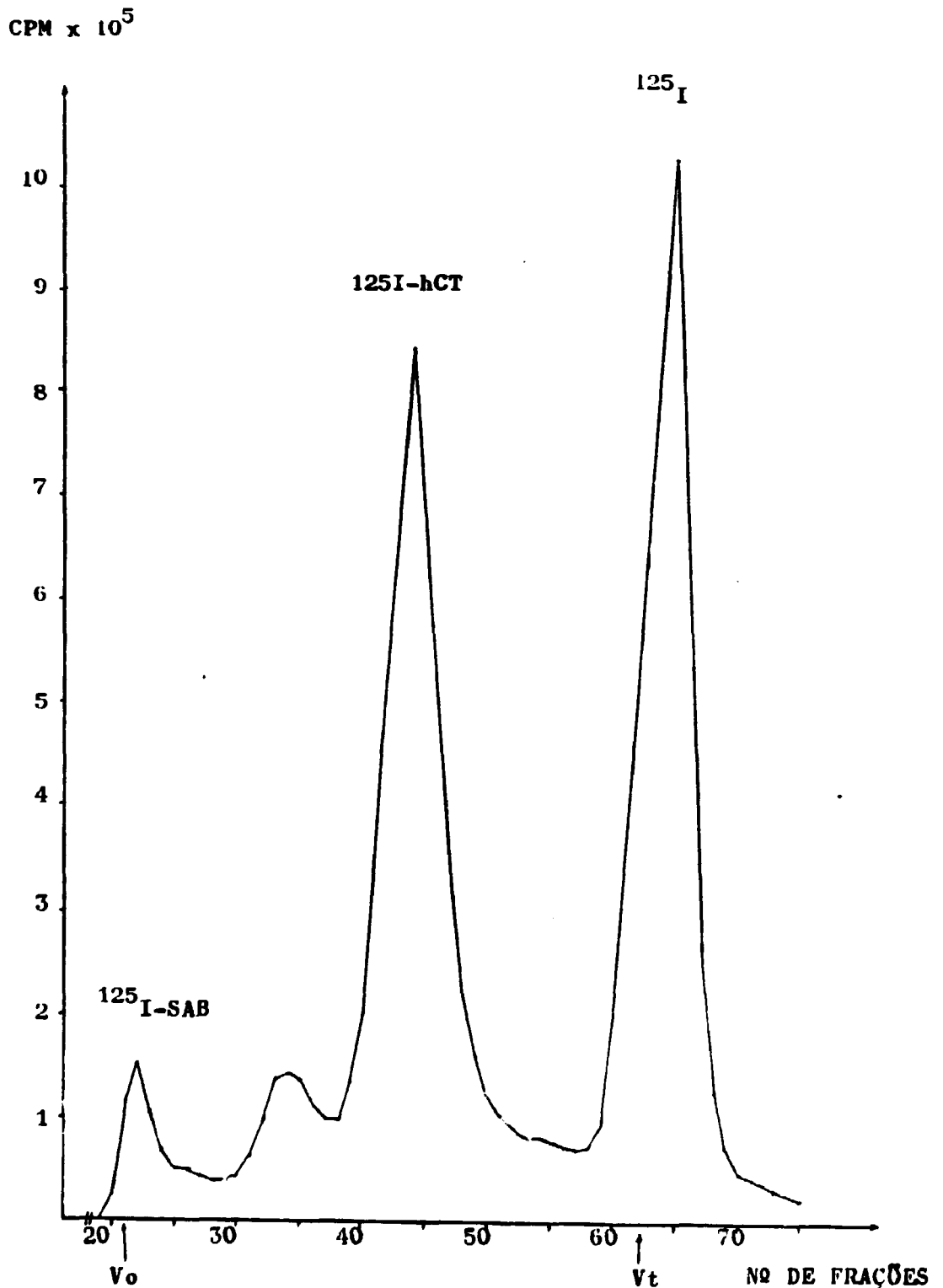


Figura 16. Radiocromatograma da purificação em Sephadex G-50M, da hCT marcada com ¹²⁵I, pelo método Clássico da Cloramina T.
 Eluente: tampão Fosfato 0,05M pH 7,4±0,1% SAB
 Coluna : 2,0x47,0cm: Fluxo 12ml/h
 Volume das frações: 2,0ml
 Tempo de estocagem da hCT-fria: 3 anos

Na Tabela 5 encontram-se os valores de rendimento de 14 das 19 marcações realizadas pelos Métodos Clássico e/ou Estequiométrico de Roth e purificações em Sephadex G-50M.

O Coeficiente de distribuição (Kd) da ^{125}I -hCT foi calculado em apenas 13 das 19 marcações realizadas, devido a pequenos acidentes ocorridos durante a coleção das frações na purificação, ou simplesmente por não ter ocorrido a iodação do hormônio. O valor médio do Kd foi de $0,583 \pm 0,06$ (CV = 10,3%).

Tabela 5. Marcações realizadas pelo método Clássico e/ou Estequiométrico e purificadas em Sephadex G-50 M

Marc. nº	Método	^{125}I (μCi)	hCT (mg)	Rend/o (%)	Recuperação (%)	Kd	imunor.	A.E. ($\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$)
1	E	623	5	71,9	97,5	0,536	+	89,6
2	E	1366	1	33,2	94,6	0,571	+	410,0
3	E	623	1	21,0	93,4	0,558	+	131,1
4	E	1024	1	27,1	95,3	0,535	-	194,1
5	E	641	1	31,0	96,7	0,585	+	198,9
6	E	581	1	23,1	86,6	0,562	+	134,3
7	E	578	1	49,2	98,1	0,562	+	284,4
8	E	615	1	24,6	95,4	0,595	+	151,3
9	E+C	691	2	44,7	97,3	0,553	+	154,4
10	E	1160	1	-	-	-	-	-
11	E	800	1	47,0	92,4	0,605	+	281,2
12	E	987	1*	-	-	-	-	-
13	C	800	1*	-	-	-	-	-
14	E	914	5*	-	-	-	-	-
15	C	830	5	25,4	95,1	0,698	+	33,4
16	C	1400	5	-	-	-	-	-
17	C	1180	5	56,9	93,7	0,705	+	96,6
18	C	1004	2,5	58,0	-	-	-	118,5
19	C	925	5	45,9	96,5	0,524	+	60,0
$\bar{x} \pm s$				39,9 \pm 15,7	94,8 \pm 3,0	0,583 \pm		160 \pm 102,6

Podemos observar que o K_d passou de 0,137 para 0,583 devido ao diferente tipo de gel de exclusão molecular usado. Em Sephadex G-25F de fato a Calcitonina marcada ($^{125}\text{I-hCT}$) é eluída em posição muito próxima do Volume de Exclusão Molecular ("Void Volume" ou V_0) enquanto no G-50M ela é eluída numa região mais específica e, portanto, com maior grau de pureza.

Pouco pode ser observado com relação aos Rendimentos e Atividades específicas, tendo sido usadas quantidades variáveis de hCT-fria. Obviamente os Rendimentos e as Atividades específicas em G-25F não podem ser considerados reais, uma vez que incluem certamente outros componentes além da $^{125}\text{I-hCT}$.

Ressaltamos que os valores da recuperação em Sephadex G-50M são altamente reprodutíveis e praticamente quantitativos, condição indispensável para qualquer tipo de estudo e consideração relativos à marcação e purificação do traçador.

2.2. Atividades específicas (A.E.) obtidas

A Tabela 5 apresenta também os valores da A.E. da $^{125}\text{I-hCT}$ em 14 das 19 marcações realizadas. A média dos valores obtidos foi de $160 \pm 102,6 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$. Este valor permite estimar que o número médio de átomos de ^{125}I por molécula de hCT foi da ordem de $0,25 \text{ }^{125}\text{I}/\text{molécula}$.

O cálculo teórico no caso da incorporação de 1

átomo de ^{125}I à uma molécula de hCT foi de 643 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ considerando o Peso Molecular da hCT igual a 3418 daltons. O valor de A.E. apresentado na literatura varia de 150 a 350 $\mu\text{Ci}/\mu\text{m}$ (9,16).

A nossa A.E. média de 160 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ teve que ser aumentada mediante técnica de repurificação (ver item 2.4) pela qual foi eliminada uma grande parte das moléculas de hCT fria.

2.3. Imunorreatividade da ^{125}I -hCT estocada em duas condições: - 35°C e liofilizada

Com o intuito de estocar nossos marcados de uma maneira mais adequada possível, sem que estes sofram algum tipo de alteração durante a estocagem, com exceção do fenômeno do decaimento radioativo, foi testada a imunorreatividade do nosso traçador mediante curva de diluição de um antissoro anti-hCT produzido em coelho. Foi usado o mesmo traçador que havia sido estocado a -35°C (^{125}I -hCT -35°C) e liofilizado (^{125}I -hCT lio).

A Fig. 17 apresenta as duas curvas obtidas com esse marcado estocado a -35°C e liofilizado, em um ensaio com 24 horas de incubação a 4°C e separação com 29 Ac. Como podemos observar, as condições de liofilização do marcado, certamente não alteraram a imunorreatividade do produto, permitindo uma forma mais prática de estocagem.

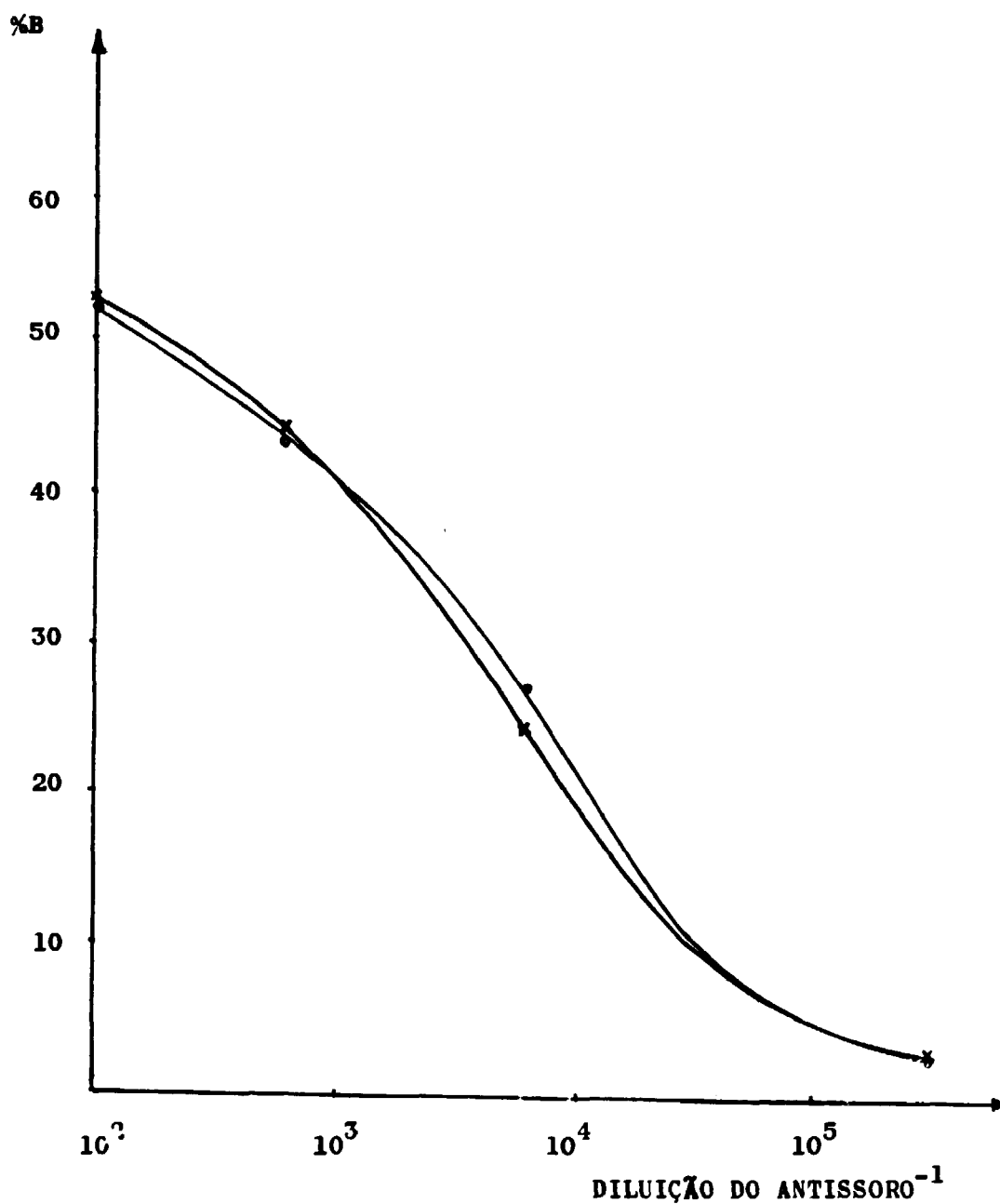


Figura 17. Teste da imunorreatividade de um traçador (^{125}I -hCT-IPEN) estocado congelado a -35°C (x) e liofilizado (o) com antissoro anti-hCT Fleury.

2.4. Repurificação do ^{125}I -hCT em EGPA 7%

A Fig. 6 apresenta um exemplo de eletroforetograma da ^{125}I -hCT submetida à EGPA 7% e mostra a presença de cinco picos, denominados A, B, C, D e E além do pico do ^{125}I -livre.

A tabela 6 apresenta a média (\bar{x}), desvio-padrão (σ) e Coeficiente de Variação (CV) dos Rm e rendimentos dos picos A, B, C, D e E obtidos na repurificação dos vários marcados, em diferentes corridas eletroforéticas.

Tabela 6. Valores da média (\bar{x}), desvio-padrão (σ) e coeficiente de variação (CV) dos Rm e rendimentos dos picos A,B,C,D,E, e ^{125}I -livre após repurificação dos vários marcados em diferentes corridas eletroforéticas (n=32)

pico	Rm				Rendimento (%)			
	\bar{x}	\pm	σ	%CV	\bar{x}	\pm	σ	%CV
A	0,278	+ 0,031	0,031	11,1	22,6	+ 14,2	14,2	62,8
B	0,505		0,064	12,7	13,1	\pm 9,6	9,6	73,3
C	0,654		0,043	6,6	20,0	\pm 11,3	11,3	56,5
D	0,817		0,034	4,2	18,6	\pm 10,5	10,5	56,4
E	0,970		0,028	2,9	35,4	\pm 21,6	21,6	61,0
^{125}I	1,262		0,134	10,6	7,3	\pm 5,4	5,4	74,0

Podemos observar a relativamente alta reprodutibilidade inter-ensaio (inter-corrida e inter-marcação) dos Rm. Isto indica uma específica identidade dos vários componentes

que se manifesta também, em parte, na comparação inter-laboratorial (ver Tabela 9)

Com relação aos rendimentos, podemos observar que o pico E (forma mais alterada) está geralmente presente em quantidade maior enquanto são aproximadamente da mesma ordem, as porcentagens relativas aos dois picos imunorreativos, A e C.

2.5. Caracterização dos picos A, B, C, D e E após repurificação em EGPA 7%

A Tabela 7 apresenta os valores das ligações inespecíficas (%NSB), total (%IB) e específica (%B), da ^{125}I -hCT não repurificada (N.R.) em EGPA, e das frações correspondentes aos picos A, B, C, D e E, obtidos na repurificação eletroforética, quando incubados com excesso de anticorpo (antissoro GP₂-IPEN na diluição 1:500); separação realizada pelo método de adsorção com carvão-dextrano.

Tabela 7. Imunorreatividade do traçador não-repurificado (N.R.) e dos picos oriundos da repurificação da ^{125}I -hCT em EGPA 7%

^{125}I -hCT	%NSB	%TB	%B
N.R.	8,7	24,5	15,8
A	8,5	31,8	23,3
B	8,6	31,4	22,8
C	6,5	36,9	30,4
D	13,4	20,3	6,8
E	8,2	9,7	1,5

Pelos dados apresentados na Tabela 7 podemos observar que os picos A, B e C se mostraram imunorreativos, apresentando valores de ligação específica bem maior que do marca do não-repurificado (NR).

Um teste análogo foi realizado utilizando 1º e 2º Anticorpo do "kit" da Immuno Nuclear Corporation (I.N.C.), com os picos A, B e C imunorreativos da ^{125}I -hCT-IPEN. Os resultados estão na Tabela 8.

Tabela 8: Imunorreatividade da ^{125}I -hCT-IPEN (N.R.) e dos picos A, B e C utilizando 1º e 2º Anticorpos do "kit" da I.N.C.

^{125}I -hCT	%NSB	%TB	%B
N.R.	11,3	36,1	24,8
A	5,1	40,6	35,5
B	10,9	44,9	34,0
C	12,6	59,1	46,5

Os picos A, B e C e a ^{125}I -hCT-N.R. apresentaram ligações específicas maiores com o 1º e 2º Anticorpo do kit comercial, quando comparados com os valores obtidos com o antissoro-IPEN.

O pico C apresentou a melhor capacidade de ligação (%B = 46,5), muito próxima do valor apresentado pelo traçador do "Kit INC" (%B = 49%). Isto forneceu a primeira con-

firmação inter-laboratorial da qualidade dos nossos traçadores e do funcionamento da técnica de repurificação em EGPA. As diferenças nas ligações específicas apresentadas na Tab. 7 e Tab. 8 são claramente devidas aos diferentes antissoros utilizados.

2.6. Comparação eletroforética entre a ^{125}I -hCT-IPEN e outras de diferentes procedências

Foram realizadas corridas eletroforéticas em EGPA 7% em gel de 0,4 cm de diâmetro por 11 e 15 cm de comprimento, com a finalidade de analisar o perfil eletroforético da ^{125}I -hCT-IPEN em comparação com outros marcados de diferentes procedências: Nichols Institute Diagnostics (^{125}I -hCT-Nichols), Diagnostic Products Corporation (^{125}I -hCT-Diagnostic) e Laboratório Fleury (^{125}I -hCT-Fleury).

A Tabela 9 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 9: Valores dos Rm obtidos com ^{125}I -hCT de diferentes procedências, quando submetidas à EGPA 7%.

^{125}I -hCT	A	B	C	D	E	^{125}I
IPEN	0,227	0,439	0,651	-	0,985	1,227
Nichols	0,200	0,486	0,657	-	1,000	-
Diagnostic	0,306	-	0,673	-	0,918	1,326
Lab.Fleury	0,237	0,447	0,658	-	0,974	1,316
$\bar{x} \pm \sigma$	0,242 \pm 0,045	0,457 \pm 0,025	0,659 \pm 0,009		0,969 \pm 0,036	1,289 \pm 0,054

Os respectivos perfis eletroforéticos estão apresentados nas Figuras 19, 20, 21 e 22.

Os perfis eletroforéticos representados pelas Figuras 20 e 22 pertencem a traçadores de "kits" comerciais importados, de ótima qualidade, porém com o prazo de validade vencido. Podemos observar que o pico A de ambos se apresenta em maior quantidade com relação aos demais picos, analogamente ao perfil obtido com o traçador-IPEN aqui analisado.

A Fig. 21 apresenta o perfil eletroforético de uma das frações obtidas da ^{125}I -hCT purificada em HPCL, gentilmente cedida pelo Laboratório Fleury. O perfil cromatográfico obtido por HPCL apresenta também vários picos, alguns deles com valores de ligação específica muito semelhantes (dados não apresentados).

2.7. Alteração de mobilidade eletroforética da ^{125}I -hCT devida à iodação

A Fig. 23 apresenta o eletroforetograma analítico de uma corrida simultânea em gel de poliacrilamina, do hormônio marcado e frio: 75 μg de hCT-fria mais 70.000 cpm de ^{125}I -hCT contidos em um volume de 200 μl .

Após a corrida o gel foi imediatamente lido em densitômetro em feixe de luz com intervalo de 220 a 310 nm e posteriormente cortados em segmentos de 0,3 cm e analisados em um contador-gama. O perfil relativo à ^{125}I -hCT foi construído sobre o gráfico da leitura densitométrica para fins comparativos. É evidente a diferente migração eletroforética

FIG. 19

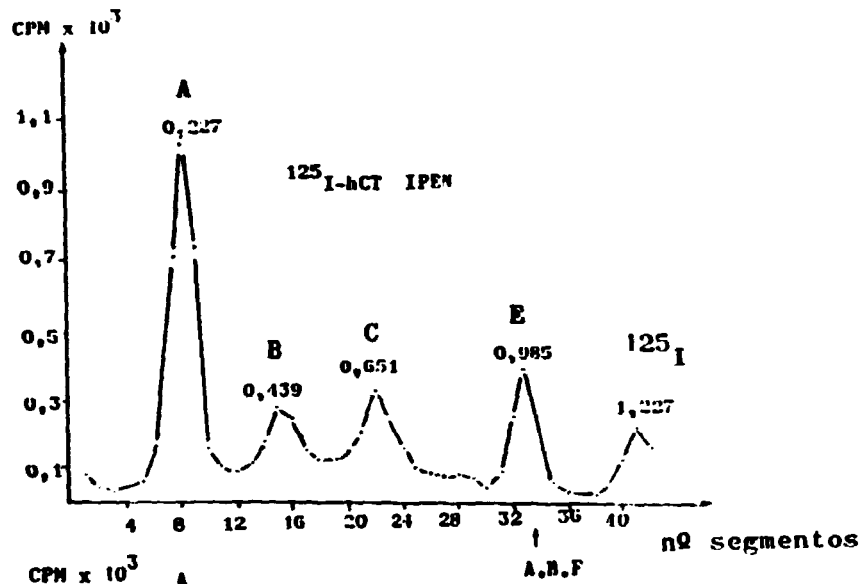


FIG. 20

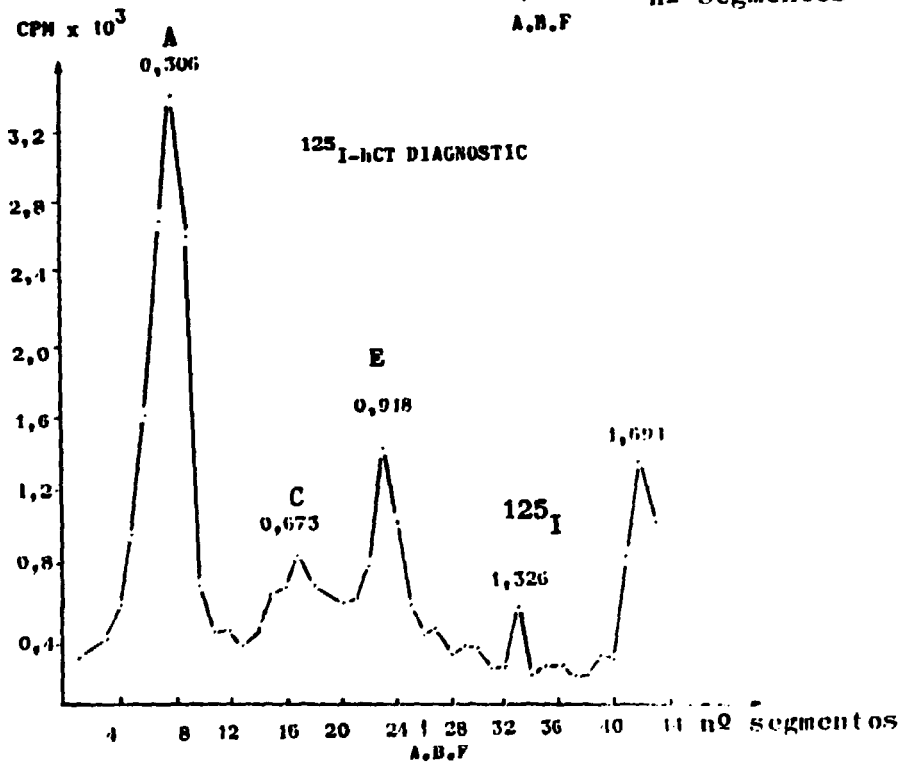


Figura 19. Perfil eletroforético da ^{125}I -hCT-IPEN, apresentando 4 dos 5 picos (A, B, C, D e E) conhecidos e pico de ^{125}I livre.

Figura 20. Perfil eletroforético da ^{125}I -hCT-Diagnostic, apresentando 4 picos com Rm conhecidos: A, C, E e ^{125}I .

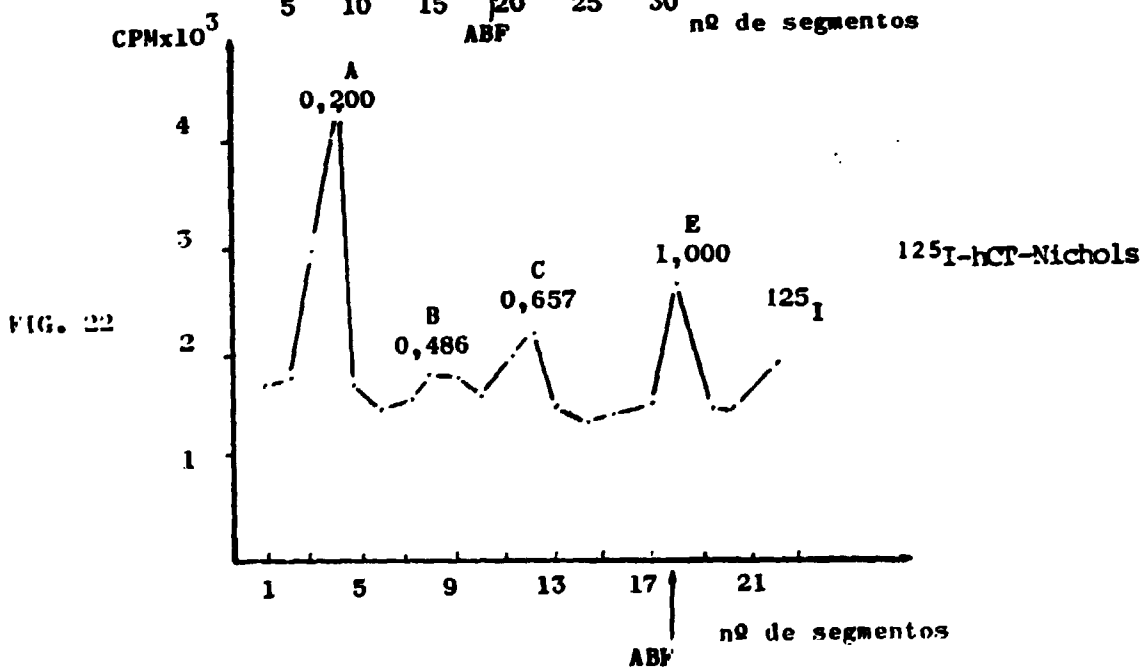
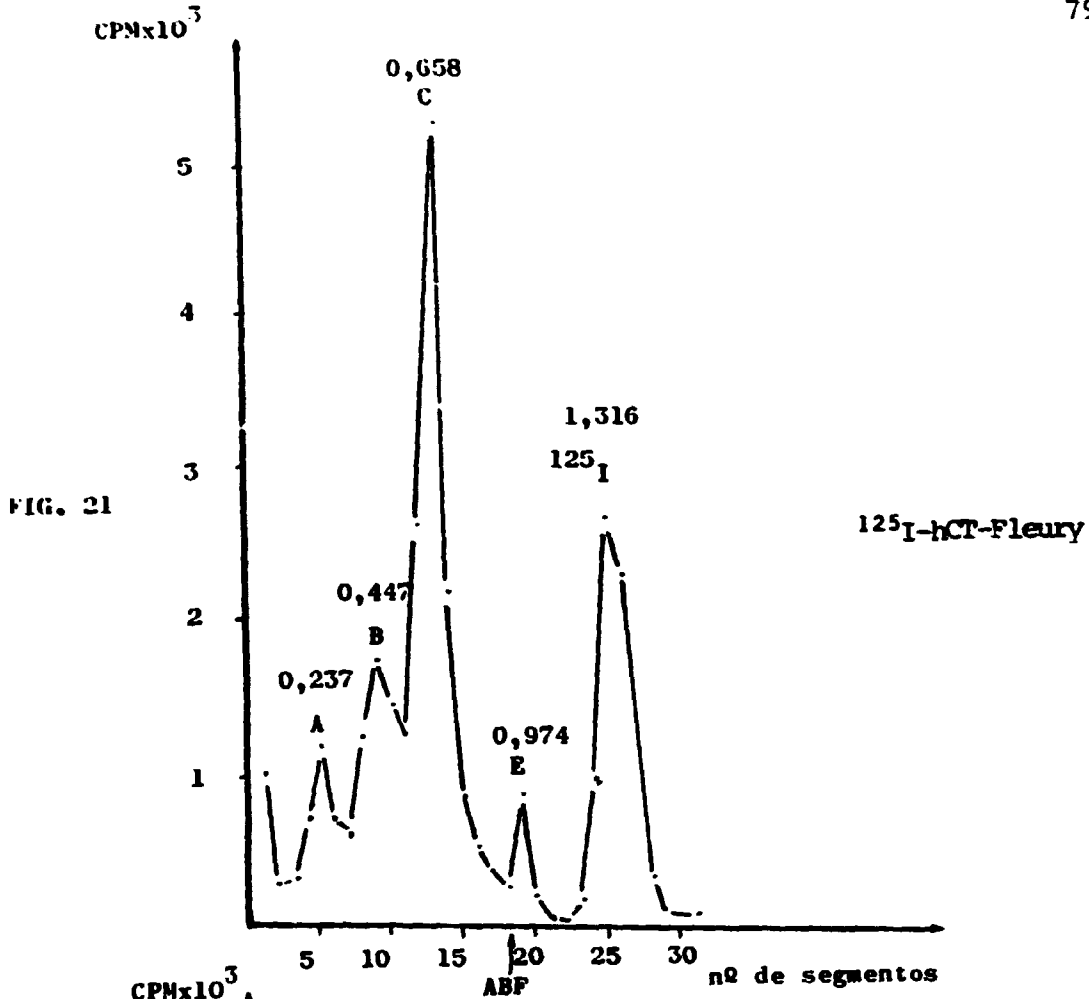


Figura 21. Perfil eletroforético da ¹²⁵I-hCT-Fleury, apresentando 5 picos identificados como A, B, C, E e ¹²⁵I livre.

Figura 22. Perfil eletroforético da ¹²⁵I-hCT-Nichols com a identificação dos picos A, B, C, E e ¹²⁵I livre.

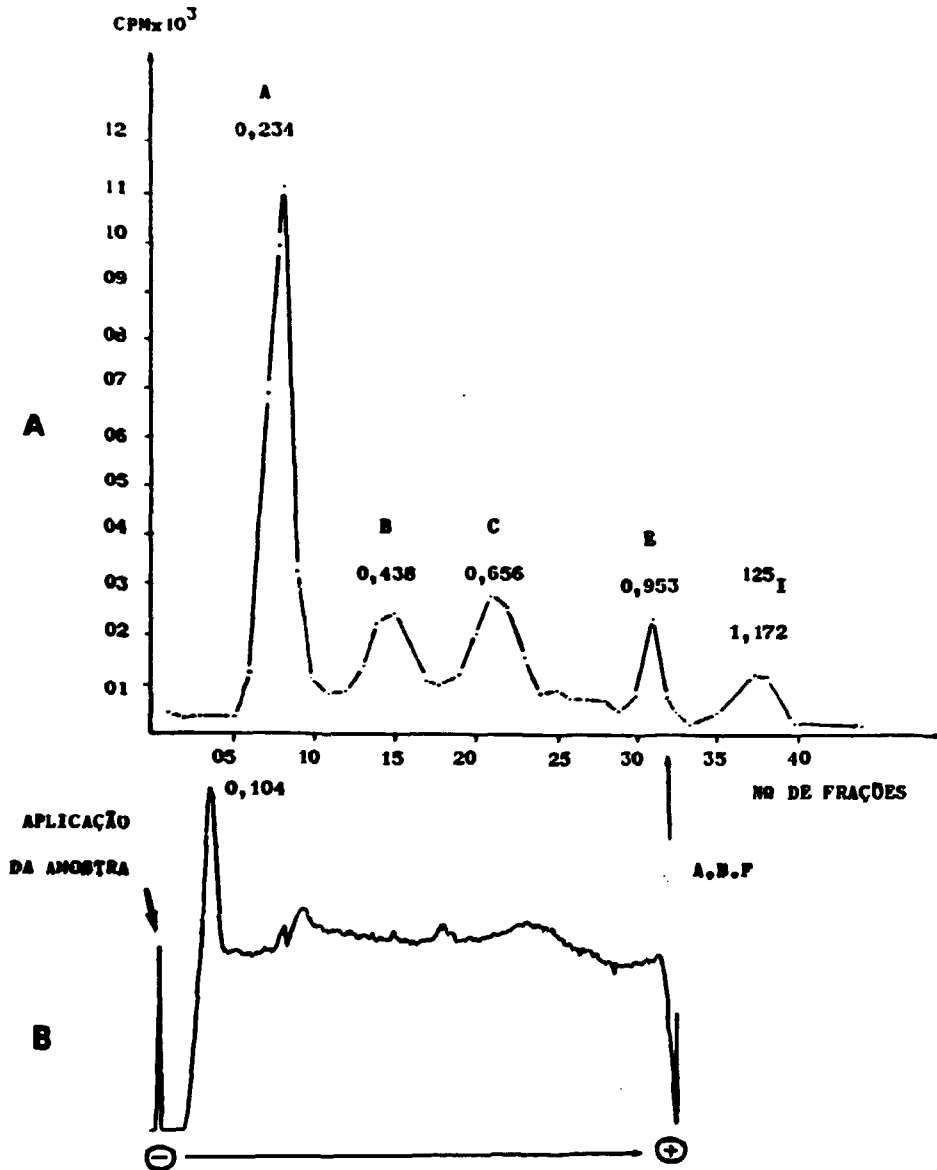


Figura 23. Perfil eletroforético da Calcitonina fria e marcada, em corrida simultânea em FGPA 7%:

A- Contagens relativa a ^{125}I -hCT (total aplicado: 70.000cpm)

B- Perfil densitométrico em U.V. da hCT-fria (total aplicado: 75 μg)

entre a Calcitonina fria ($R_m = 0,104$) e os três picos imunorreativos de ^{125}I -hCT ($R_m = 0,234; 0,438; 0,656$). Com os dados disponíveis, nada pode ser especulado com relação à natureza das alterações e à posição da ^{125}I -hCT monoiodada.

3. Otimização das condições do ensaio

3.1. Comparação de técnicas diferentes de separação entre o Antígeno livre e o ligado ao Anticorpo

Tendo já introduzido a técnica de repurificação, as baixas ligações específicas (7-10%) e os altos valores de ligações inespecíficas (6-13%) observados em nossos ensaios, poderiam estar relacionados com diversos fatores como a qualidade do marcado ou do antissoro, ou com o método de separação. Foram testados comparativamente dois métodos de separação utilizando a técnica do duplo Anticorpo, que foi considerada mais prática e eficiente em relação à técnica de adsorção com carvão-dextrano (ver método I, item 2.6. cap. II). O Método II utiliza 2 μ g Anticorpo com soro normal de coelho diluído a 1:500 enquanto o Método III utiliza 2 μ g Anticorpo associado com PEG 7%. O 1 μ g Anticorpo utilizado foi aquele produzido pelo Laboratório Fleury (único disponível no momento da realização deste estudo), capaz de fornecer ligações específicas aceitáveis na diluição final 1:5x10³. Utilizamos nesses ensaios o marcado liofilizado não-repurificado.

Os resultados são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Valores das ligações inespecífica (NSB) total (TB) e específica (B) obtidas pelos dois métodos de separação com 2º Ac

	2º Ac (μ l)	% NSB	% TB	% B
Método II	50	7,0	35,0	28,0
	100	7,1	31,3	24,2
Método III	50	3,4	18,4	15,0
	100	3,4	27,2	23,8

Analisando os resultados obtidos, observamos que o método III apresentou um valor de ligação inespecífica (NSB) mais baixa que do método II, mas também um valor de ligação específica (%B) menor, seja utilizando o volume de 50 μ l ou de 100 μ l de 2º Anticorpo. Considerando esses fatos, decidimos adotar o esquema do método II apesar do ensaio se estender por mais um dia, considerando também que o método III utiliza o dobro da quantidade de 2º Anticorpo, o qual é importado e de custo elevado.

Posteriormente, a técnica utilizada por E. Bucht (método II) foi levemente modificada em nosso laboratório, adicionando antes da centrifugação, 2 ml de NaCl 0,1 M em todos os tubos. A Tabela 11 apresenta os dados relativos aos valores das ligações específicas e inespecíficas, com e sem a etapa de lavagem com NaCl 0,1M, em ensaios com 1 dia e 3 dias de incubação, utilizando marcado-IPEN e Antissoró-Karolinska na diluição final 1:8000.

Tabela 11: Valores das ligações específicas (B) e inespecíficas (NSB) obtidas de ensaios com 1 e 3 dias de incubação a 4°C, com e sem a etapa de lavagem com 2 ml de NaCl 0,1 M.

lavagem com NaCl 0,1 M	1 dia		3 dias	
	% NSB	%B	%NSB	%B
não	7,3	15,6	6,0	20,6
sim	5,4	14,9	4,4	20,3

Pelos dados da Tabela 11 podemos observar que esta modificação técnica diminuiu consideravelmente os valores das ligações inespecíficas para níveis de 4-5%.

3.2. Influência do tempo de incubação na imunorreatividade do marcado

A Fig. 24 apresenta as curvas de título do Antisoro-GP2 em um ensaio incubado por 1 e 3 dias a 4°C. Estas curvas foram obtidas utilizando o pico A da ¹²⁵I-hCT repurificada em EGPA, o antissoro e o 2º anticorpo da Pharmacia Fine Chemicals.

Podemos observar um visível incremento nos valores da ligação específica na incubação de 3 dias a 4°C, com relação à incubação de 1 dia. Uma diluição final de 1:4000 do

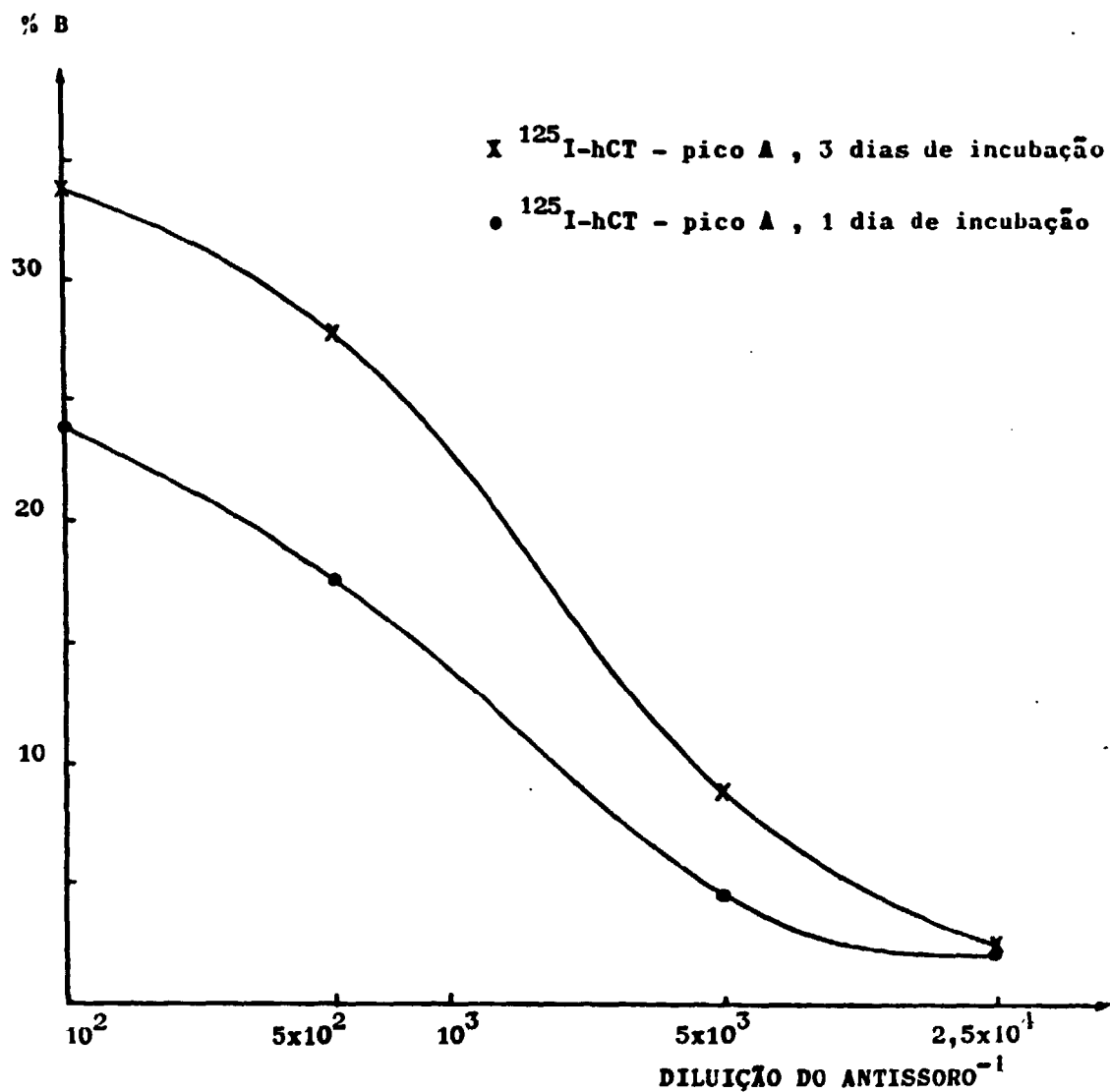


Figura 24. Curvas de título do antissoro GP₂ em um ensaio incubado por 1 e 3 dias a 49C, com marcado-IPEN repurificado em EGPA 7%; separação com 29 Anticorpo da Pharmacia.

Antissoro-GP2, foi utilizada para a construção da relativa curva padrão (Fig. 28).

3.3. Influência da repurificação na imunorreatividade do ^{125}I -hCT

A Fig. 25 apresenta uma comparação entre a imunorreatividade da ^{125}I -hCT não-repurificada (NR) e repurificada em EGPA. É evidente a diferença entre as duas curvas, visto os valores de ligação específica que vão até 34% utilizando marcado repurificado e não-repurificado. Este fato nos levou a utilizar obrigatoriamente a ^{125}I -hCT repurificada eletroforeticamente, em todos os ensaios subsequentes.

4. Produção do Antissoro anti-hCT

4.1. Avaliação da técnica de imunização e do período de colheita do antissoro

Foram realizados dois programas de produção de antissoro anti-hCT: no primeiro, trabalhamos com cinco animais, sendo 3 cobaias machos e 2 coelhas fêmeas com idade de 6 e 4 meses respectivamente, durante mais de um ano; no segundo programa trabalhamos com 4 coelhos machos com idade de 4 meses, durante aproximadamente 7 meses.

A técnica de imunização utilizando múltiplas in-

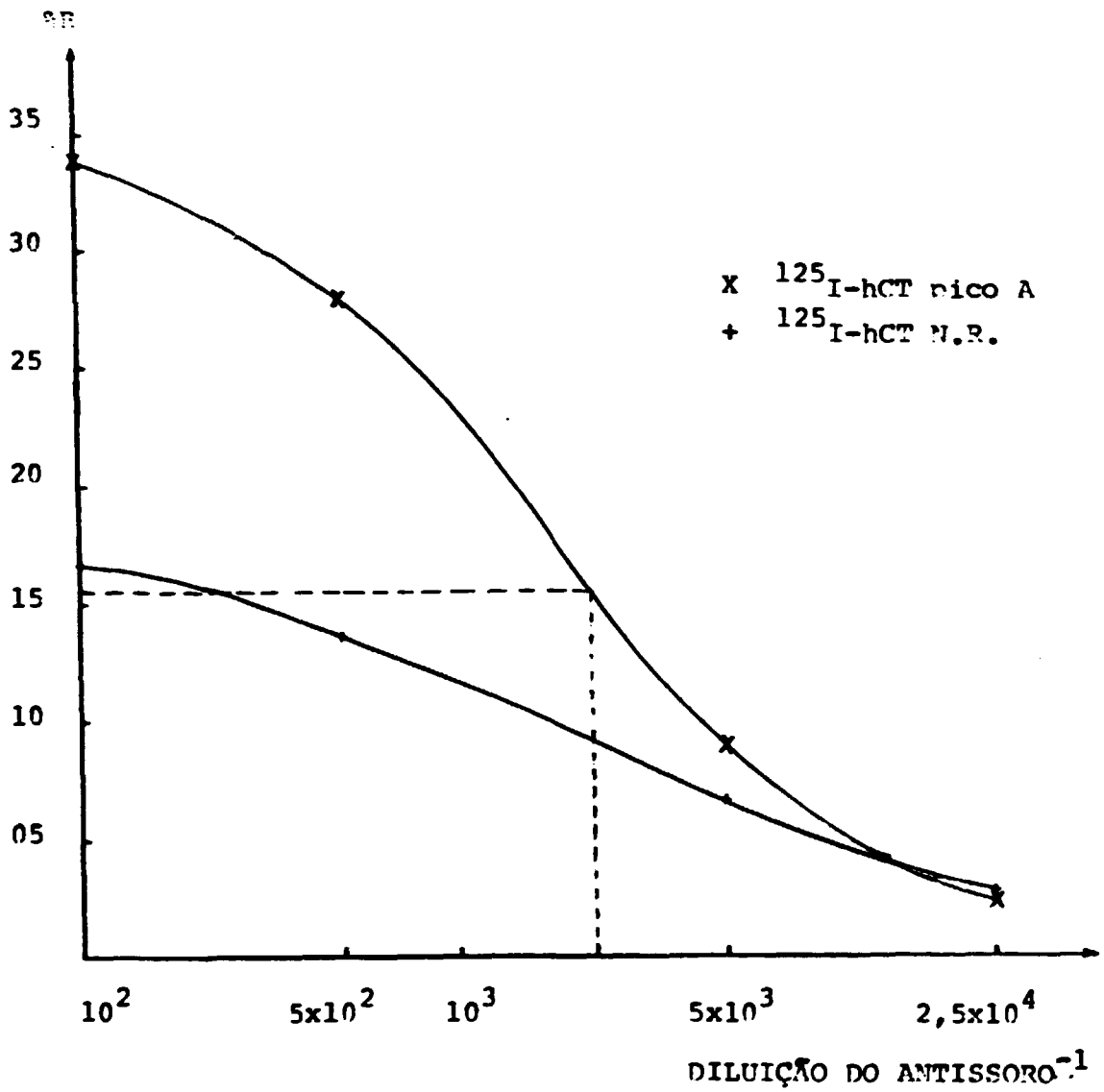


Figura 25. Imunorreatividade da ^{125}I -hCT-IPEN não-repurificada (N.R.) e repurificada em EGPA 7* (nico A): ensaio de 3 dias de incubação a 40C, com várias diluições do antissoro anti-hCT GP₂-IPEN.

jeções intradérmicas dorsais foi aquela escolhida por nós devido à maior praticabilidade e visualização da reação inflamatória nos locais das injeções (Fig. 7, item 2.5.1 cap. II). Os animais que apresentaram reação inflamatória positiva acentuada foram selecionados para o programa de imunização, continuando a receber as doses-reforço. Em nossos dois programas todos os animais continuaram a receber as doses-reforço.

Com o intuito de verificar o melhor período para a realização das punções nos animais, foi realizado um ensaio analisando amostras de antissoros colhidas após 2,9 e 22 dias da dose-reforço (Fig. 26).

A amostra de antissoro colhida após o 99 dia da injeção de dose-reforço, apresentou relativamente os melhores valores de ligação específica, confirmando os dados da literatura sobre o melhor período de colheita. Esse critério foi adotado para as punções posteriores.

4.2. Determinação do título dos antissoros obtidos no IPEN

O título dos antissoros obtidos foi determinado mediante a técnica descrita no item 2.5.2 do Capítulo II.

No 1º Programa de imunização apenas uma cobaia (GP₂) apresentou um antissoro com um título que pode ser utilizado em RIE. A Fig. 27 apresenta a resposta imunológica desse animal à Calcitonina humana sintética (CIBACALCINA[®]) durante o período de um ano.

Podemos observar que o título do antissoro GP₂

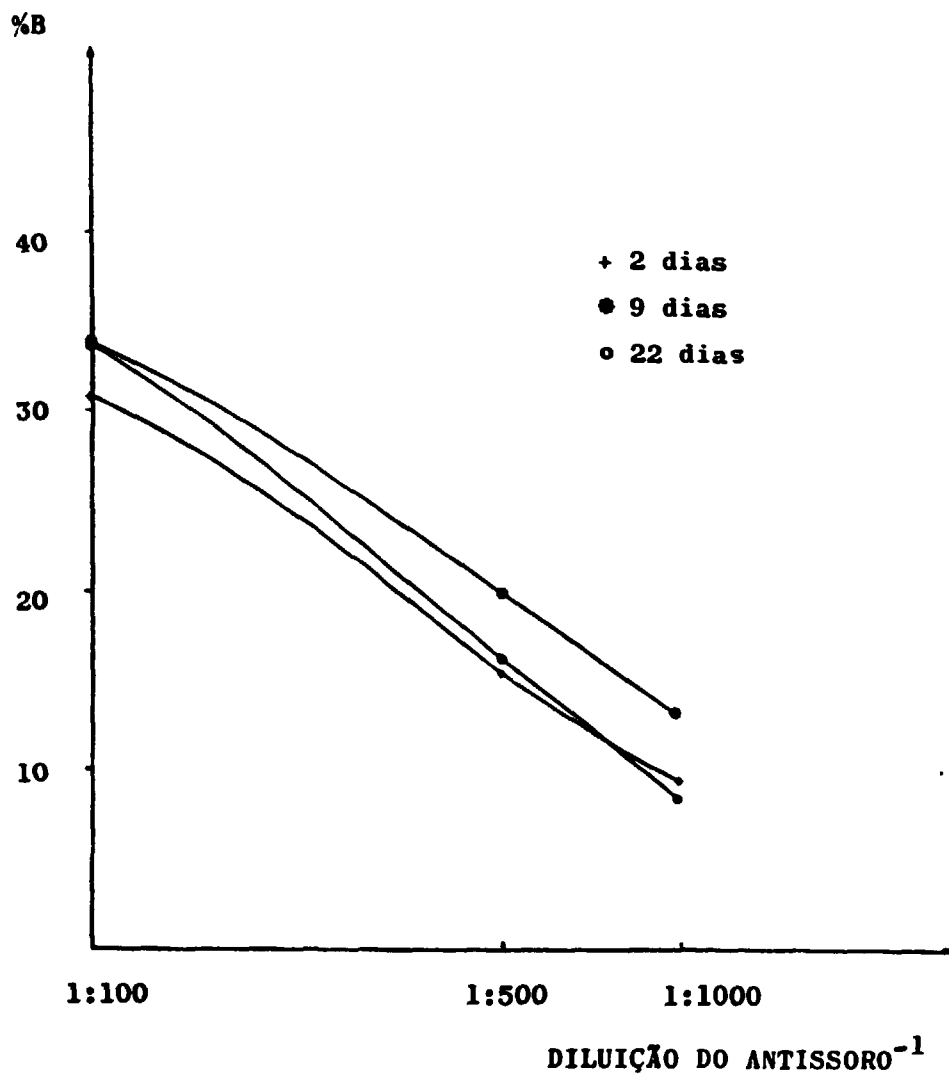


Figura 26. Titulação de amostras do antíssoro GP₂ colhidas após 2;9 e 22 dias da injeção da dose-reforço.

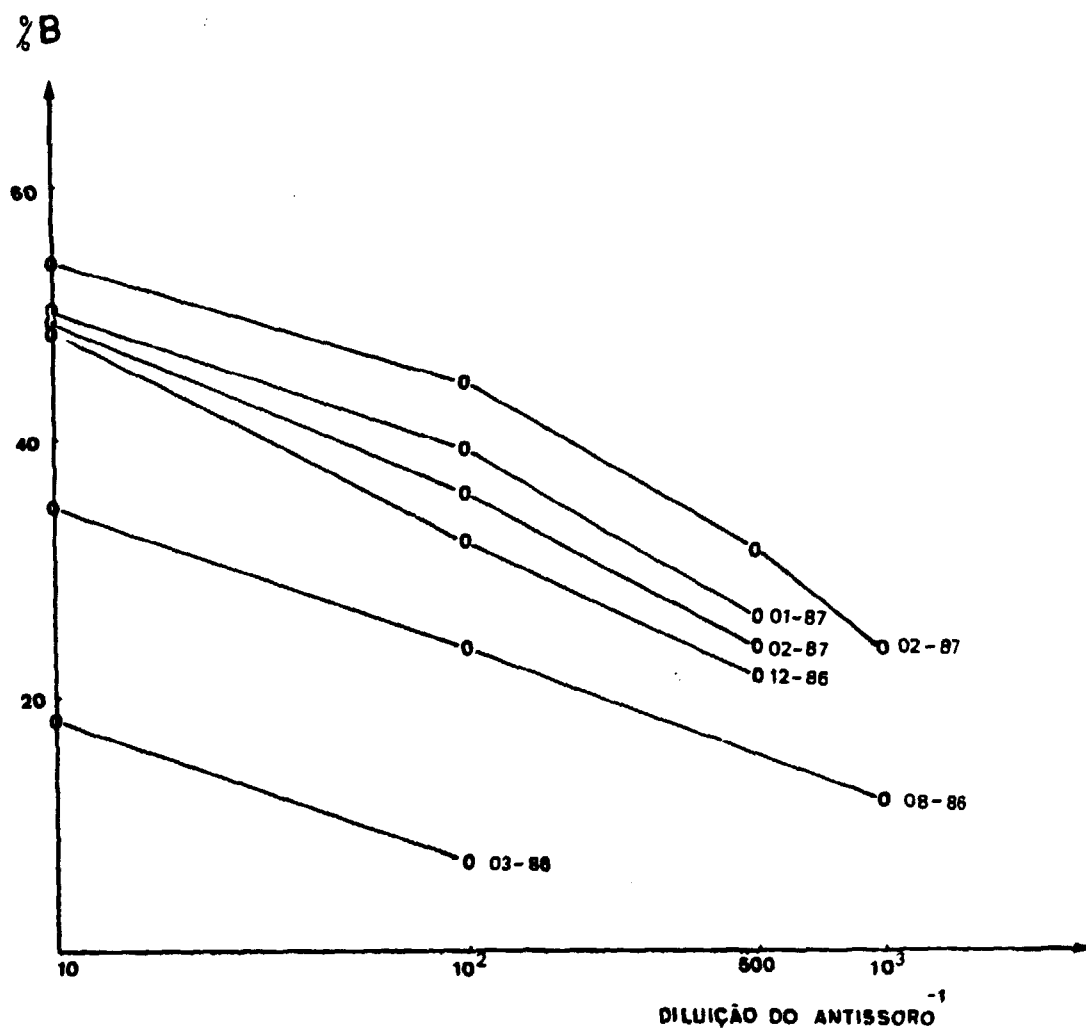


Figura 27. Resposta imunológica de uma cobaia (GP_2) à Calcitonina humana sintética (CIBA), no período de um ano (fev/86 - fev/87), recebendo dose inicial de 100 μ g e doses-reforço de 50 μ g de hCT, intra-muscular. A curva de título maior foi realizada com ^{125}I -hCT repurificada.

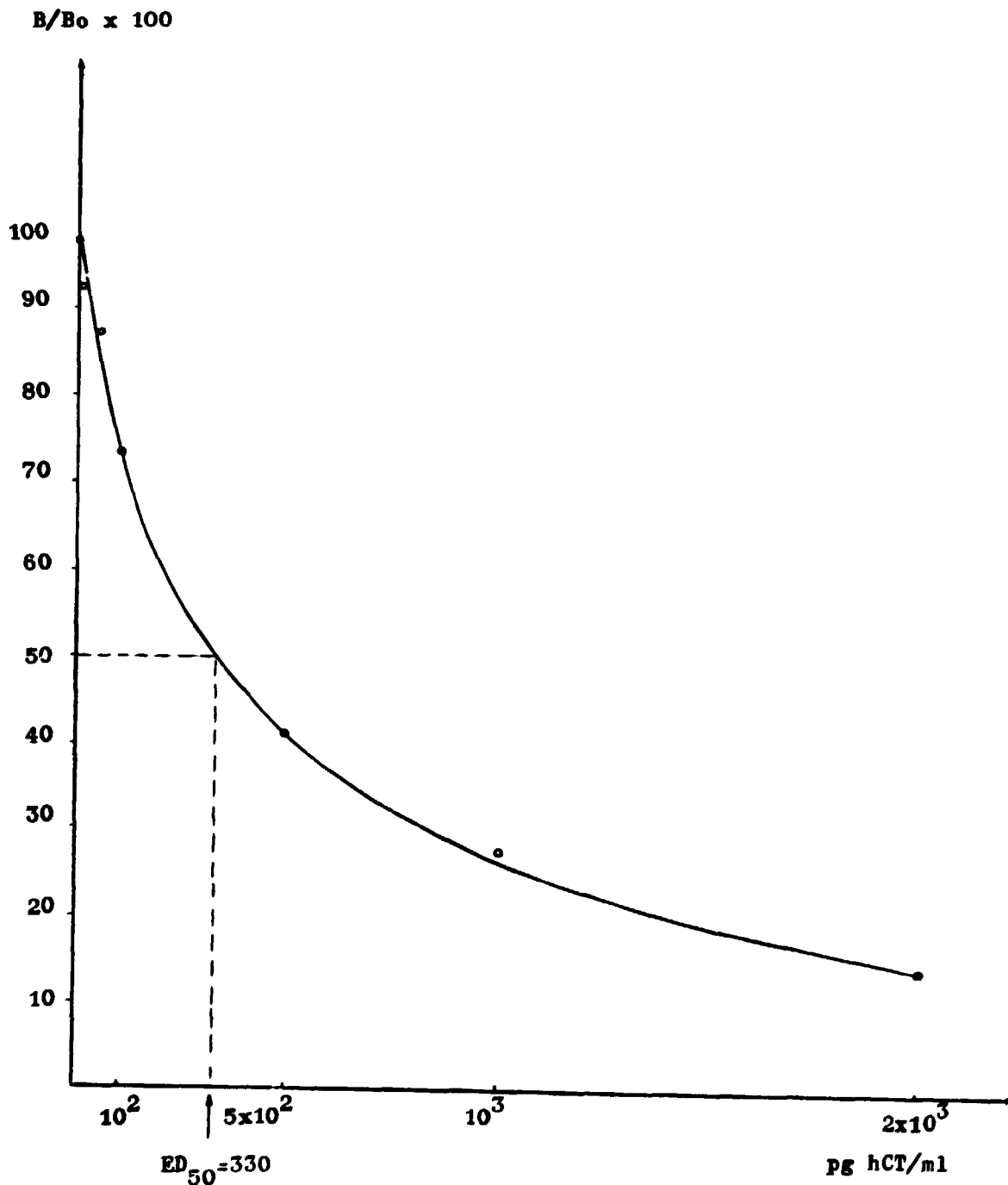


Figura 28. Curva de RIE usada para testar o antissoro-GP₂-IPEN. Marcado-IPEN repurificado em EGPA 78, em um ensaio de 3 dias de incubação a 49C e separação com 29 Anticorpo da Pharmacia. A sensibilidade (D.M.D.) calculada para esta curva foi de 74pg/ml.

apresentou um incremento significativo somente após seis meses da 1ª dose, até atingir seu valor máximo em fevereiro de 1987 (02-87). A partir desse período, o título do antissoro manteve-se praticamente constante. É interessante observar também o incremento do título com a utilização do traçador repurificado. Trata-se neste caso de uma melhora na qualidade do marcado e não do antissoro.

Na mesma Fig. 25 pode ser observada uma curva de título do antissoro GP₂: sangria de 02-87, que apresentou o maior título.

A diluição final de 1:4000, considerada útil para ensaio com base nos dados da literatura, permitiu a obtenção de uma ligação específica de aproximadamente 15%, que mesmo sendo ainda baixa, pode ser usada para a obtenção de curvas de RIE, aparentemente de boa qualidade (Fig. 28) cujo ED₅₀ e sensibilidade são comparáveis aos valores apresentados por alguns kits comerciais. Lembramos que em nossas condições, isto representava ~900 cpm no ponto de máxima ligação.

No 2º Programa de imunização, dos 4 coelhos imunizados, 2 deles (Rb₁ e Rb₂) morreram após 4 meses da 1ª dose e apenas o coelho Rb₃ apresentou um título aceitável após 7 meses da 1ª dose. A curva de título deste antissoro Rb₃ é apresentada na Figura 29. Para este antissoro na diluição final 1:6000, conseguimos uma ligação específica maior que no caso do antissoro-GP₂, porém, não foi possível obter curvas sensíveis, comparáveis àquela apresentada na Fig. 28. É evidente que a realização de curvas de RIE tornou-se um instrumento indispensável para o controle de qualidade dos anti-

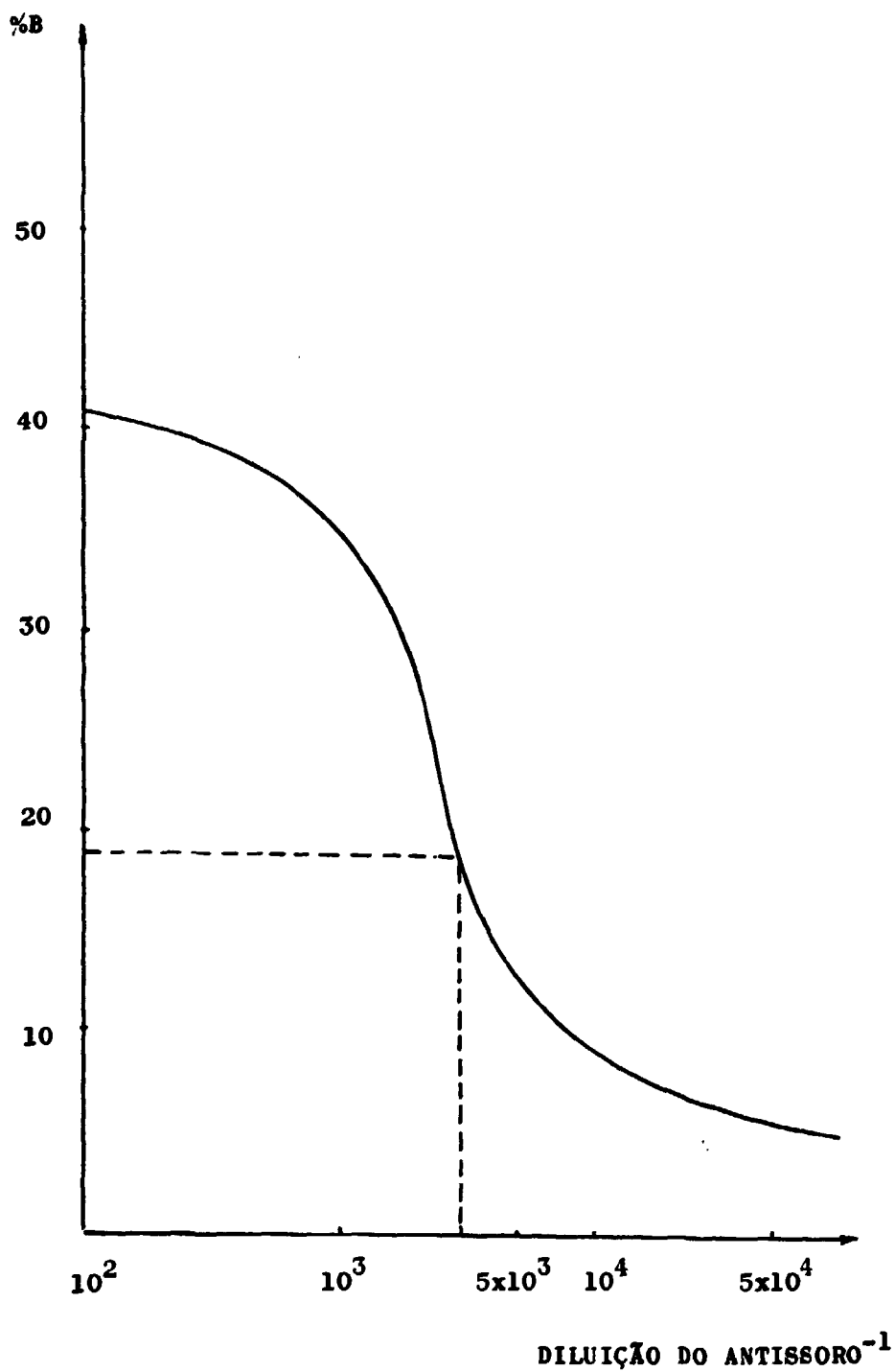


Figura 29. Curva de titulação do antissoro Rb₃-IPEN. Incubação a 49C, durante três dias, com ¹²⁵I hCT repurificada e separação com ²⁰Ac Radioassay

soros obtidos.

4.3. Comparação entre antissoros de diferentes procedências

Devido ao fato do antissoro-GP₂, produzido em nosso laboratório apresentar baixa ligação específica (da ordem de 7-10% na diluição final 1:4000) e por não dispor de um outro antissoro anti-hCT com um título melhor para uso em RIE, solicitamos a doação de dois antissoros anti-hCT, ambos produzidos em coelho, gentilmente cedidos pelo Dr. Ewaldo M. K. Russc do Laboratório Fleury, São Paulo, e pela Dra. Elisabeth Bucht do Instituto Karolinska, Suécia.

Os antissoros-IPEN (GP₂ e Rb₃), antissoro-Fleury e antissoro-Karolinska, utilizados em várias etapas do nosso trabalho, foram comparados em um estudo intra-ensaio construindo as respectivas curvas de título (Fig. 30).

Pode-se ver que o antissoro Fleury apresenta as maiores ligações específica em geral, enquanto o antissoro-Karolinska é comparável na região de diluição 1:10³ - 1:4x10³. Os antissoros-IPEN (GP₂ e Rb₃) apresentam claramente ligações inferiores.

Para cada antissoro foi escolhida uma diluição que fosse a máxima compativelmente com a obtenção de uma ligação específica aceitável para a construção das respectivas curvas-padrão. Apesar das boas ligações específicas demonstrada pelos 4 antissoros, apenas dois deles, os antissoros GP₂-IPEN e Karolinska apresentaram avidez suficiente pelo Antígeno, for

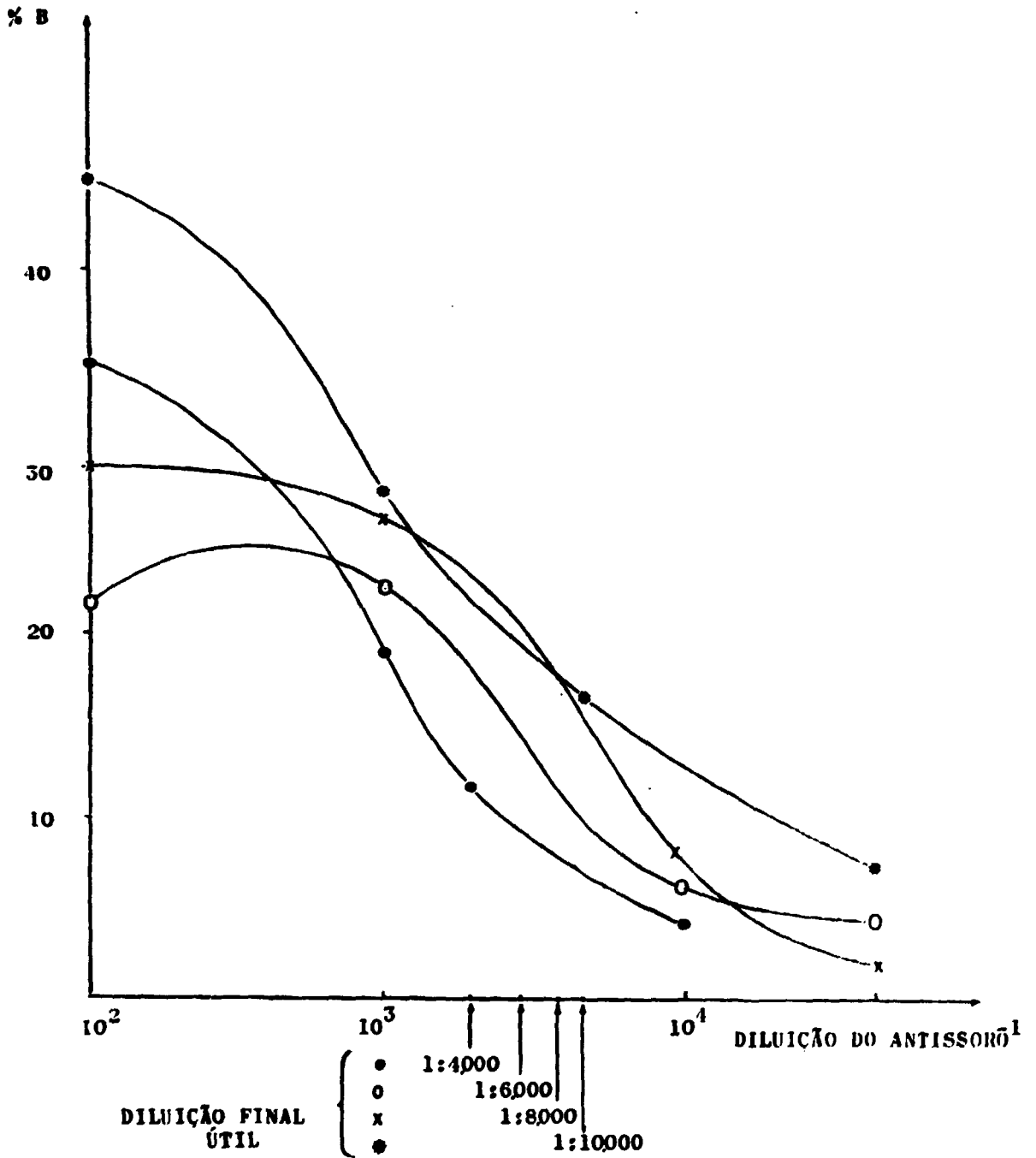


Figura 30. Comparação entre as curvas de titulação de 4 diferentes antissoros: GP₂(•) e Rb₃-IPEN(o) Fleury(*) Karolinska(x) . Incubação com ¹²⁵I-hCT-IPEN repurificada, durante 3 dias a 49C.

necendo Curvas-Padrão de alta sensibilidade, quando incubados com o nosso marcador.

A Fig. 31 apresenta 3 Curvas-Padrão com os dois antissoros mencionados: GP₂ na diluição-final 1:2000 e 1:4000, foram realizadas com adição atrasada do mercado repurificado, a fins de conseguir a sensibilidade máxima possível compatível com a avidéz desses antissoros. A solução padrão foi preparada em nosso laboratório com o produto sintético da CIBA. A Tabela 12 nos fornece os dados relativos a essas curvas: valor da ligação máxima do hormônio marcado com o antissoro (%B/T) sensibilidade do ensaio, ED₅₀, valor de inclinação da curva em proximidade do ponto de dose zero e desvio-padrão (σ₀) das respostas relativas ao ponto de dose-zero.

Tabela 12. Parâmetros obtidos nas curvas de RIE realizadas com os antissoros GP₂-IPEN nas diluições final 1:2000 e 1:4000 e o antissoro-Karolinska na diluição final 1:12.000

Antissoro	Diluição	B/T (%)	SENS. (pg/ml)	ED ₅₀ (pg/ml)	Inclinaç.	σ ₀ (%)
GP ₂	1:2000	11,0	27,5	440	0,22	5,53
GP ₂	1:4000	7,2	33,0	160	1,00	3,97
Karol.	1:12000	13,3	12,7	245	0,40	3,23

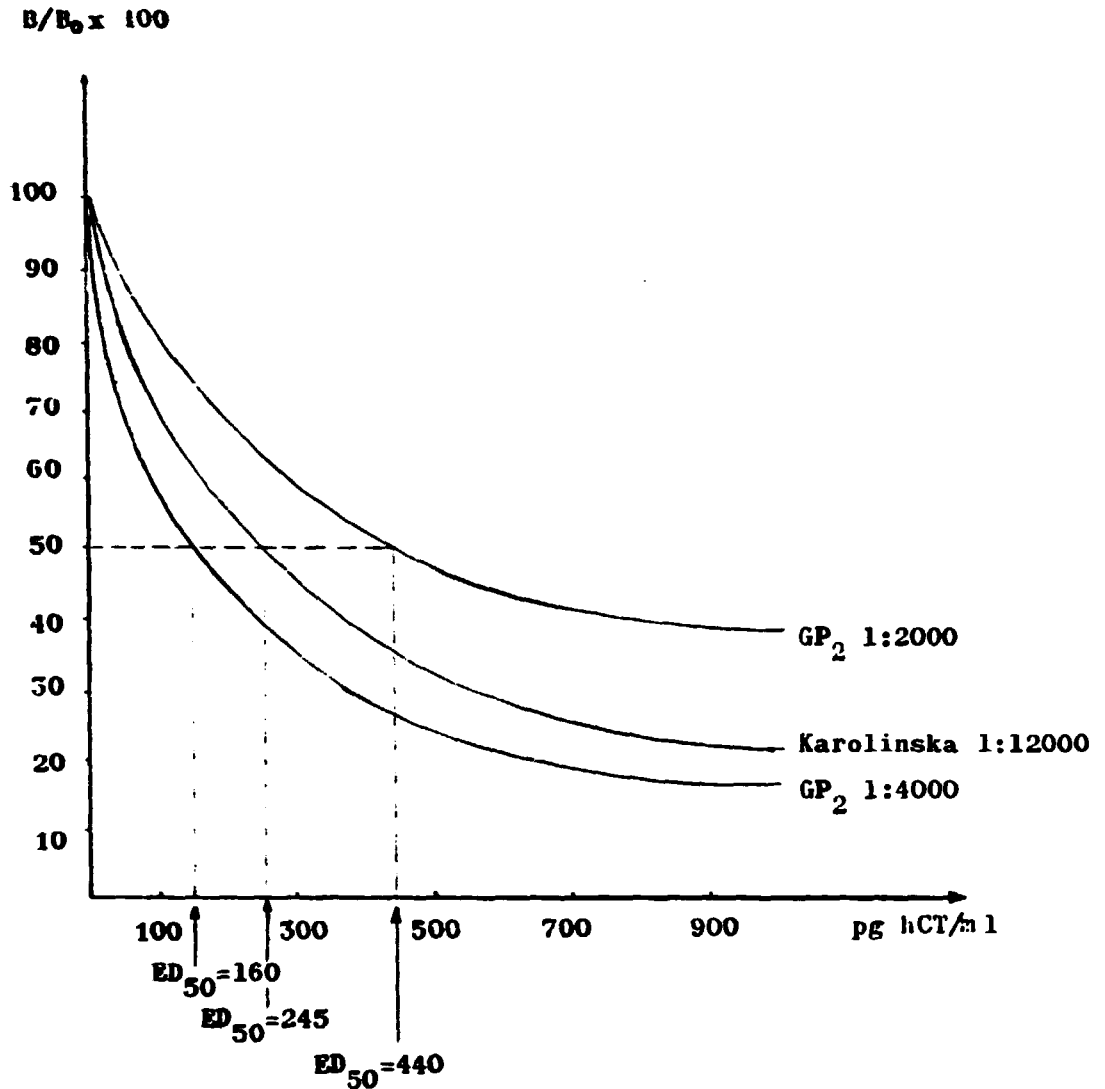


Figura 31. Curvas comparativas de Radioimunoensaio usadas como testes para o controle de qualidade dos antissoros GP_2 e Karolinska. O antissoro GP_2 foi usado em duas diluições diferentes. Pré-incubação de 3 dias, seguida de adição a trasada do marcado e incubação de mais 3 dias; separação mediante 2°Ac da Radioassay.

Podemos observar claramente nestas três curvas, o comportamento do parâmetro sensibilidade ou dose mínima detectável. Lembramos que de acordo com a definição de Ekins⁽²⁰⁾ este parâmetro depende de dois fatores: inclinação da curva e erro em proximidade do ponto zero. De fato, a curva com maior inclinação que aparentemente poderia ser considerada a mais sensível, é na realidade a menos sensível das três, provavelmente devido à sua baixíssima ligação específica que conduz a um erro maior nas determinações próximas do ponto de dose zero.

A curva relativa ao antissoró-Karolinska além de ter boa inclinação apresenta também baixo valor de desvio-padrão relativo ao ponto zero, proporcionando desta maneira, maior sensibilidade.

Após análise dessas curvas e de outras realizadas utilizando o antissoró-Fleury, que não apresentou curvas de RIE com sensibilidade suficiente neste intervalo de dosagens, chegou-se à conclusão de que tanto o antissoró-GP₂-IPEN, como o antissoró-Fleury não apresentariam curvas de RIE de qualidade aceitável. O primeiro (GP₂), mesmo proporcionando boa sensibilidade, não oferecia suficiente precisão, por causa das baixas ligações; o segundo (Fleury) embora fornecesse boas ligações, não apresentou sensibilidade suficiente provavelmente por causa da baixa avidéz (K_a) do antissoró. Por essas razões foi escolhido o antissoró-Karolinska para dar prosseguimento aos nossos estudos.

A Fig. 32 apresenta uma curva de título análoga do antissoró de referência internacional da Organização Mun-

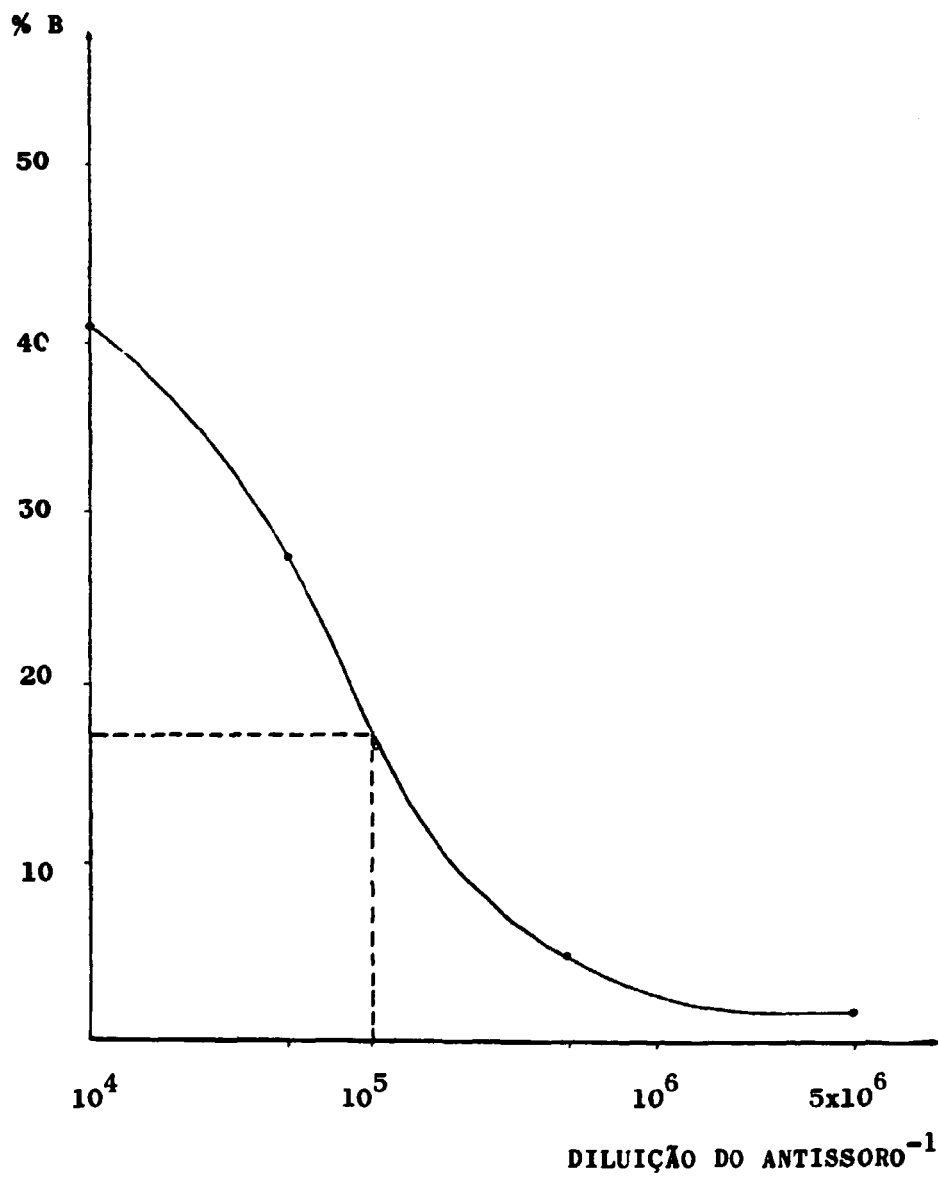


Figura 32. Curva de título do antissoro de Referência da O.M.S., realizada com traçador-IPEN repurificado, em um ensaio com 3 dias de incubação a 49C.

dial da Saúde (O.M.S.) recebido somente no fim do presente trabalho. Podemos observar que a uma diluição final de $1:2 \times 10^5$ (aproximadamente 20 vezes maior que aquelas utilizadas em nossos ensaios) ainda podemos conseguir ligações específicas úteis. Este antissoro-padrão será no futuro, o melhor instrumento para testar a qualidade dos nossos traçadores e antissoros.

5. Análise das Curvas de RIE obtidas e relativo Controle de Qualidade

5.1. Curvas obtidas utilizando os reagentes preparados no IPEN

A Fig. 28 já apresentada no item 3.2 representa uma das curvas-padrão construídas com os reagentes preparados em nosso laboratório: hCT radioiodada repurificada em EGPA 7%, Padrão-IPEN preparado a partir do produto sintético da CIBA (CIBACALCINA[®]) e antissoro anti-hCT produzido pela co-baia GP₂, utilizado na diluição final de 1:4000. Na Fig. 33 podemos observar o perfil de precisão intra-ensaio relativo à referida curva-padrão, e avaliar a baixa precisão apresentada por este sistema.

A Tabela 13 apresenta os parâmetros relativos às curvas obtidas com os reagentes-IPEN. A sensibilidade das curvas foram calculadas segundo as fórmulas descritas por Rodbard, já mencionadas no item 2.7.4. do Capítulo II.

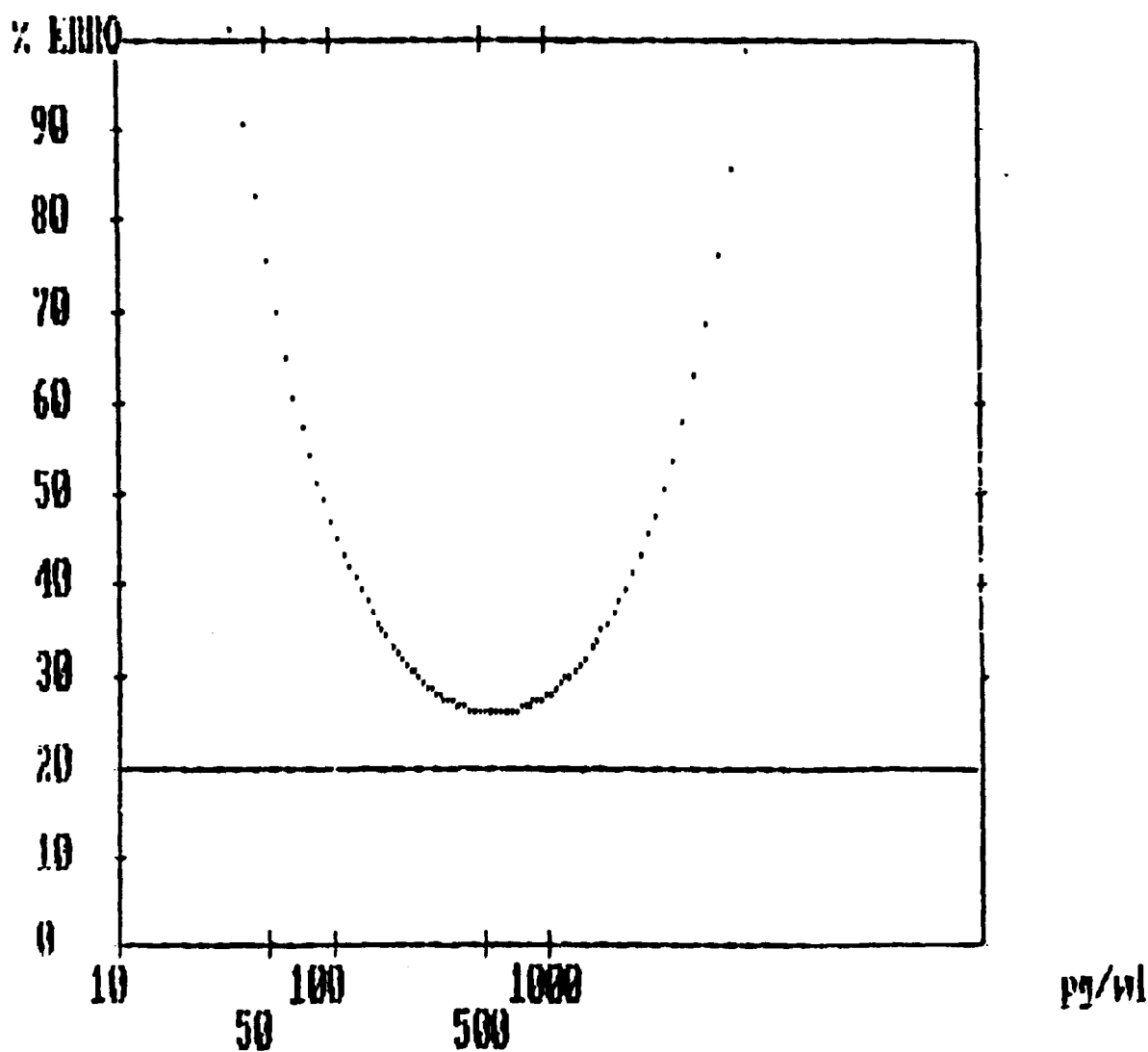


Figura 33. Perfil de Precisão intra-ensaio da curva-padrão construída com reagentes-IPEN: antissoro-GP₂ na diluição final 1:4000 , ¹²⁵I-hCT repurificada em EGPA 7% (pico A); padrão-IPEN preparado a partir do produto sintético da CIBA (CIBACALCINA)

Tabela 13 - Parâmetros obtidos nas curvas de RIE construídos com reagentes-IPEN:

^{125}I -hCT repurificada, Antissoro GP₂-IPEN e Padrão-IPEN

Antissoro GP ₂ (diluição final)	incub (dias)	sensib. (pg/ml)	ED ₅₀ (pg/ml)	%NSB	%Bo
1:4000	3	74,4	330	7,8	7,9
1:4000	3	8,9	(40)	8,2	9,7
1:4000	3 + 3	10,8	265	6,4	10,2
1:4000	2 + 2	33,0	160	7,0	7,2
1:2000	2 + 2	27,5	445	6,3	11,0
$\bar{x} \pm \sigma$		30,9 ± 26,4	300 ± 119	7,1 ± 0,84	9,2 ± 1,6
(%CV)		(85,5)	(39,8)	(11,9)	(17,3)

Na Tabela 14 estão apresentados os parâmetros relativos ao RIE de Calcitonina, declarados por alguns autores e por firmas comerciais: sensibilidade, ED_{50} , %NSB, %B, Precisão (%C.V.) intra-ensaio e inter-ensaio.

Podemos observar que o sistema-IPEN permite uma sensibilidade suficiente e comparável àquela dos "Kits" importados. A região de melhor determinação definida pelo ED_{50} está em geral, de acordo com a necessidade clínica de discriminar doses da ordem de 100 - 300 pg/ml. Como já mencionado, as ligações muito baixas, provavelmente devido à baixa avidéz do nosso antissoro, são responsáveis pela insuficiente precisão.

5.2. Curvas de RIE obtidas com o antissoro anti-hCT doado pelo Instituto Karolinska e estudo da precisão dos ensaios

A Fig. 34 apresenta um exemplo de curva-padrão construída com o antissoro-Karolinska na diluição final 1:8000, onde se observa uma sensibilidade claramente superior àquela da curva obtida com o antissoro-GP₂ perfeitamente na região de interesse clínico. A Fig. 35 apresenta o perfil de precisão intra-ensaio que demonstra claramente a maior precisão, obtida com o antissoro Karolinska na região de 50 a 1500 pg/ml com C.V. menor que 20% e na região de 110 a 1000 pg/ml com C.V. menor que 10%.

A Tabela 15 apresenta alguns parâmetros típicos das curvas de RIE, obtidos utilizando o antissoro doado pela Dra. Bucht do Instituto Karolinska.

Tabela 14 - Valores da sensibilidade, ED₅₀, NSB, Bo e C.V. intra e inter-ensaio, declarados por alguns autores e por firmas comerciais, obtidos no RIE de hCT

Autores e firmas comerciais	Sensib. (µg/ml)	LD ₅₀ (µg/ml)	NSB %	Bo %	Precisão intra-ensaio (% C.V.)	Precisão inter-ensaio (% C.V.)
Deftos (1971)	10	90	-	-	10%	20%
Bucht (1986)	8	130	2,0	27	10	16
Bumertsen (1982)	24	140	2-3	30	4-6%	10-13%
D.P.C. (1986)	16	313	0,5	33	3-8%	6-10%
Nichols (1986)	3-5	25	1,9	31,5	6-8	8-12
EnC (1984)	15	180	2,7	49,0	6-8	4-16
Cartherwood & Deftos (1984)	1,3	10	4,8	34,7	15%	31%

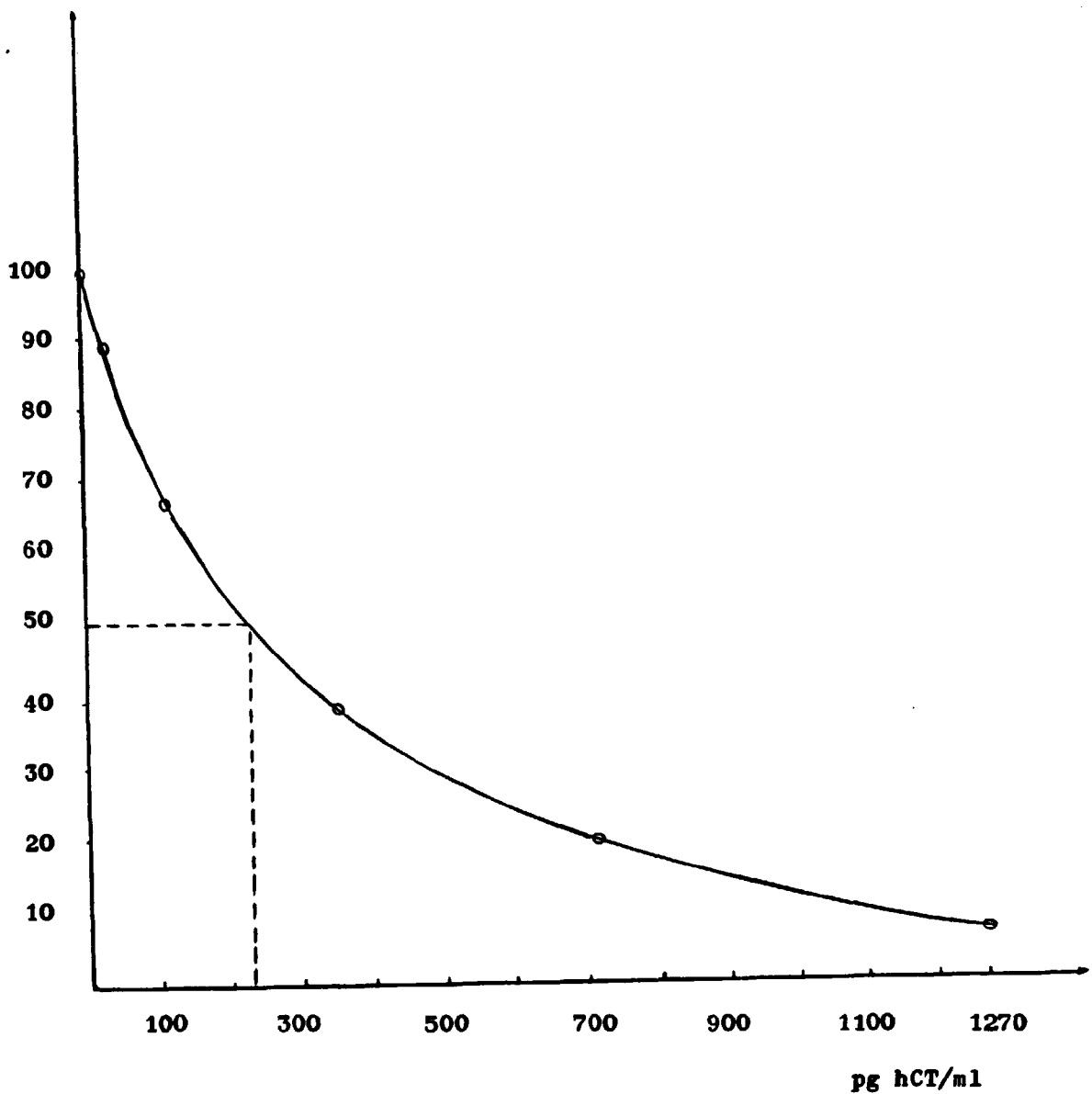
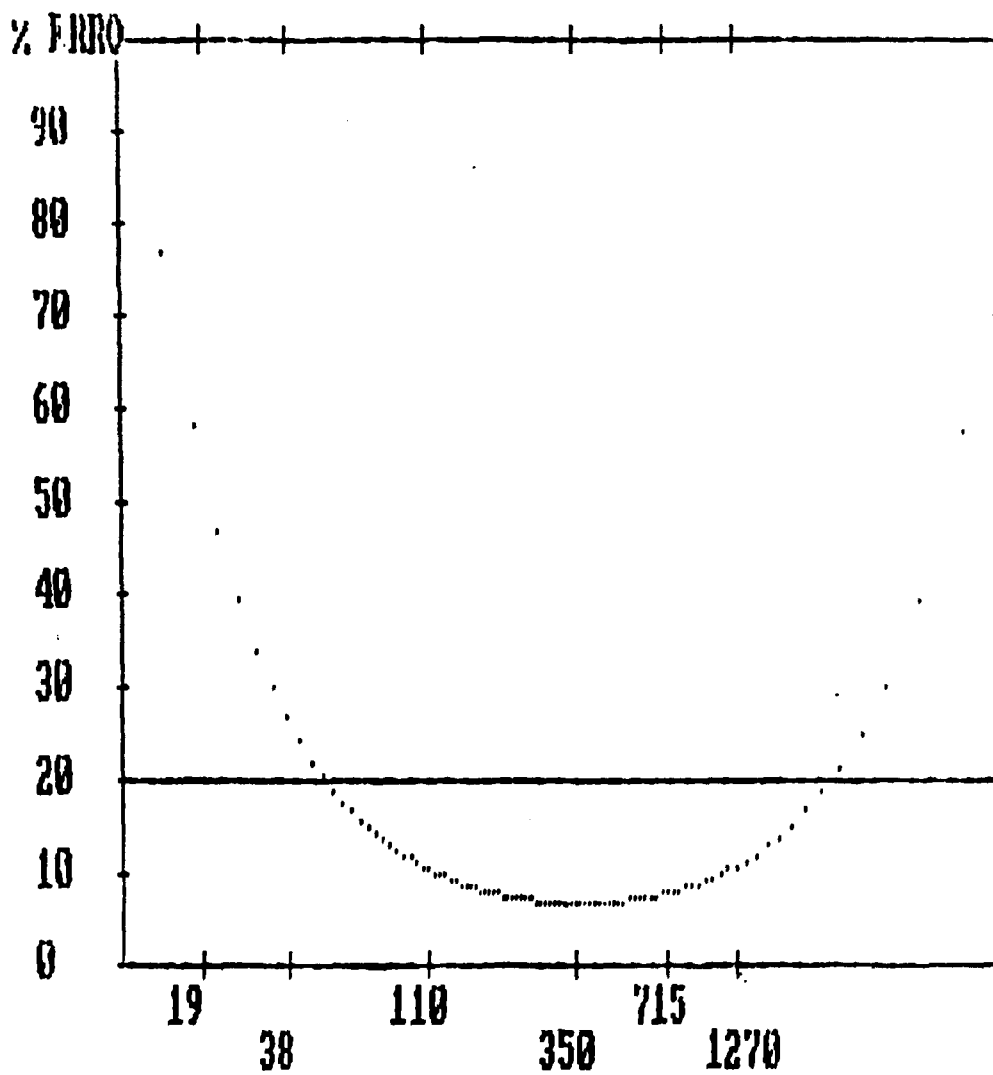


Figura 34. Curva-Padrão construída com Reagentes-IPEN e antissoro-Karolinska na diluição final 1:8000; 3 dias de pré-incubação e 3 dias de incubação com ¹²⁵I-hCT-IPEN repurificado. Separação com 2^o Ac Radioassay. Sensibilidade: 11pg/ml



Pg/11

Figura 35. Perfil de Precisão intra-ensaio da curva-padrão construída com reagentes-IPEN e antissoro-Karolinska na diluição final 1:8000

Tabela 15 - Parâmetros obtidos nas curvas de RIE construídas
com reagentes-IPEN e antissoro-Karolinska

Diluição final	Sensib.	ED ₅₀	NSB	Bo	ACQ
1:12000	12,7	250	6,0	13,3	-
1: 3000	7,8	190	13,2	21,8	-
1: 8000	(119,0)	360	13,4	21,2	-
1: 8000	29,2	255	17,8	17,9	-
1: 8000	29,9	170	15,0	28,6	325
1: 8000	11,0	225	8,6	26,9	365
1: 8000	26,5	190	11,2	34,9	292
1: 8000	27,3	275	6,7	22,4	320
1: 8000	13,6	240	8,7	23,1	330
X ± σ	17,2 ± 8,8	239,4 ± 57,1	11,2 ± 4,0	24,6 ± 5,3	326,4 ± 26,1
(%C.V.)	(51,3)	(23,8)	(35,6)	(21,7)	(8,0)

Pelos dados observados com esse antissoro e com o nosso marcado repurificado, podemos notar que os valores de ED_{50} , sensibilidade e %B são comparáveis àqueles declarados por alguns dos principais autores e por algumas firmas comerciais.

5.2.1. Reprodutibilidade intra-ensaio

Na Tabela 16 é apresentada a reprodutibilidade de 6 amostras controle de qualidade (A.C.Q.) com teores de baixo à alto de Calcitonina, dosadas, em triplicatas no mesmo ensaio, em curva análoga àquela apresentada na Figura 34.

5.2.2. Reprodutibilidade inter-ensaio

Na Tabela 17 são apresentados os resultados de reprodutibilidade de 4 amostras controle de qualidade, contendo de baixo à alto teor de Calcitonina, dosadas em quatro ensaios consecutivos, com a finalidade de avaliar a precisão inter-ensaio do método. A Tabela 17 apresenta também os valores dos parâmetros ED_{80} , ED_{50} e ED_{20} , que indicam uma maior estabilidade inter-ensaio na região de dosagem médio-alta.

Tabela 16 - Análise da precisão intra-ensaio

Amostras	%B/Bo	dose (pg/ml)	\bar{x}	σ	C.V. (%)
ACQ ₁	82,20	76,17	69,05	7,1	10,29%
	84,07	69,03			
	85,93	61,95			
ACQ ₂	81,62	78,40	72,83	6,35	8,72%
	82,72	74,10			
	84,38	65,90			
ACQ ₃	74,45	107,05	119,21	10,6	8,90%
	70,48	124,00			
	69,90	126,57			
ACQ ₄	48,56	246,12	233,63	17,76	7,6%
	49,20	241,49			
	53,40	213,29			
ACQ ₅	34,57	377,91	350,36	42,59	12,14%
	34,93	372,92			
	41,74	301,76			
ACQ ₆	22,45	589,58	574,81	20,78	3,61%
	24,08	551,05			
	22,88	583,79			

Tabela 17 - Análise da precisão inter-ensaio

Amostras	\bar{X}	σ	% C.V.
ACQ ₂	73,7	10,3	13,9
ACQ ₃	133,5	28,7	21,5
ACQ ₅	311,0	40,3	12,9
ACQ ₆	635,0	65,7	10,3
ED ₈₀	55,7	13,1	23,4
ED ₅₀	251,2	42,6	17,0
ED ₂₀	791,5	47,4	5,0

Também a precisão inter-ensaio, pode ser considerada relativamente aceitável, quando comparadas com os valores declarados na Tabela 14.

5.3. Calibração do Padrão-IPEN e controle da exatidão dos ensaios realizados

O Padrão-IPEN, preparado em nosso laboratório a partir da preparação sintética da CIBA (CIBACALCINA), foi calibrado contra o Padrão do "Kit" da Diagnostic Products Corporation (Padrão-DPC), que por sua vez foi calibrado contra o Padrão de Referência Internacional da O.M.S. (1st International Reference Preparation of hCT for Bioassay, 70/234) que re

cebemos recentemente do "National Institute for Biological Standard and Controls" - NIBSC, Inglaterra.

Foram realizados 3 ensaios nos quais construímos duas curvas: a primeira com o Padrão-IPEN e a segunda com o Padrão-DPC. Pelo valor da razão dos ED_{50} , calculou-se o fator de calibração, ou seja, a Potência Relativa do Padrão-IPEN (Tabela 18). O valor médio encontrado por esses 3 ensaios foi de $0,71 \pm 0,14$.

Tabela 18 - Valores determinados da Potência Relativa do Padrão-IPEN, em n=3 ensaios, contra o Padrão-PC

Ensaio nº	ED_{50} Padrão 1 ^{ário}	ED_{50} Padrão 2 ^{ário}	Pot. Relativa do Padrão-IPEN
1	240,6	277,0	0,87
2	153,5	238,3	0,64
3	209,6	350,0	0,61
$\bar{X} \pm \sigma$	$201,3 \pm 44,2$	$238,4 \pm 56,7$	$0,71 \pm 0,14$
(%C.V.)			(19,7)

Consideramos a preparação-IPEN como um padrão secundário, mesmo tendo sido calibrado contra um padrão comercial secundário. Obviamente, nossa próxima calibração será realizada contra o padrão primário da O.M.S., recém-recebido.

O estudo da exatidão foi realizado, comparando valores das Amostras Controle de Qualidade de teor médio (ACQ-DPC m) e alto (ACQ-DPC a) do "kit" D.P.C. e de uma amostra de teor baixo preparada em nosso laboratório (ACQ-IPEN), com os valores determinados com o sistema IPEN. Os valores de referência das ACQ-DPC são declarados pelo produtor, enquanto o valor de referência da ACQ-IPEN b, foi determinado em outro laboratório mediante sistema-DPC. Na Tabela 19 são apresentados os valores declarados ou determinados mediante sistema-DPC e os valores determinados no sistema-IPEN, sendo estes últimos, a média de pelo menos 5 ensaios consecutivos.

Tabela 19 - Análise da exatidão

Amostra	Valores declarados ou determinados mediante "Kit" comercial			Valores determinados no sistema-IPEN			IPEN/Kit	
	\bar{X}	\pm	σ	n	\bar{X}	\pm	σ	Fator
	ACQ-IPEN b	42,0	1,7		5	53,6	17,2	
ACQ-DPC-m	96,0	3,5		6	133,5	28,7		1,39
ACQ-DPC-a	363,0	19,5		6	344,2	22,9		0,95

Coef. Correlação= 0,9704
Inclinação= 0,85

Como podemos observar pelos dados obtidos neste primeiro estudo sobre exatidão, em que somente 3 amostras foram analisadas, embora num número elevado de ensaios, existe uma boa correlação entre os valores declarados ou determina-

dos pelo sistema-DPC e aqueles determinados no sistema-IPEN ($P < 0,001$). O "bias" existente, de aproximadamente 30-40% parece afetar mais a região dos valores médio-baixos. Por falta de tempo e de materiais, não foi possível, neste estudo, analisar a exatidão relativa a um número maior de soros de indivíduos normais e com alto nível de CT.

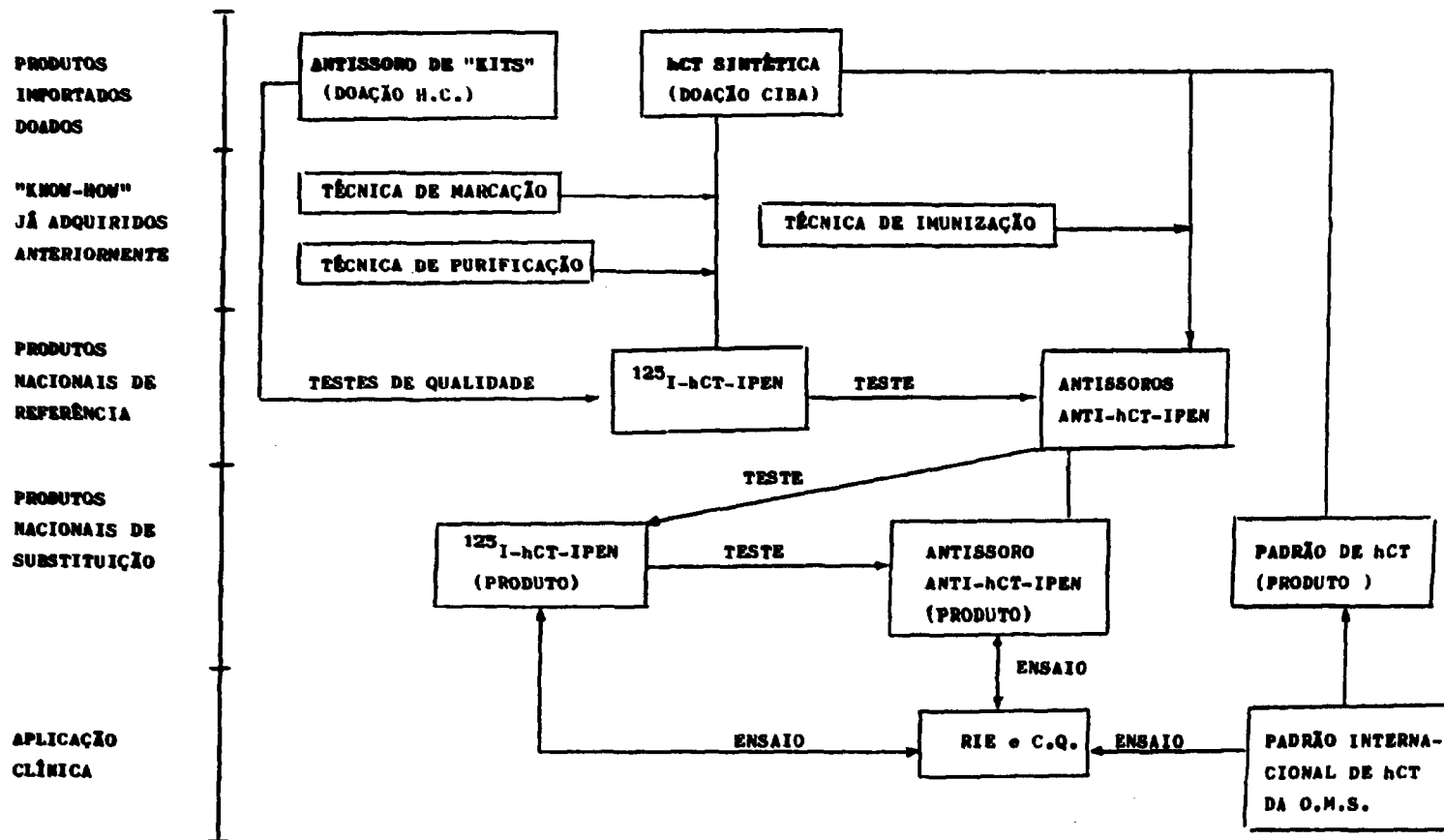


Figura 36. Origem do Controle de Qualidade na produção dos Reagentes-IPEN para o RIE de hCT. O diagrama evidencia a elevada economia de realização do trabalho, tendo compensado a falta de matéria-prima geralmente caríssima, com pequenas doações e aplicação de "know-how" já adquirido anteriormente.

IV. DISCUSSÃO

O objetivo principal do presente trabalho é a preparação dos reagentes necessários para o Radioimunoensaio de Calcitonina humana e sua utilização na padronização da referida técnica para posterior aplicação clínica ao diagnóstico precoce do Carcinoma Medular da Tireóide. Excluindo o antígeno frio (hCT sintética) cuja tecnologia de preparação foge da nossa competência, podemos afirmar que os principais reagentes necessários foram preparados aqui em nosso laboratório: Calcitonina radioiodada, padrão secundário de referência e antissoro anti-Calcitonina. Os referidos reagentes permitiram a obtenção de curvas suficientemente sensíveis para este tipo de ensaio em que a determinação é efetuada em níveis da ordem de 100 - 400 pg/ml.

No que se refere à preparação do antissoro anti-Calcitonina, por razões de custo das instalações, dos animais e dos reagentes (especialmente da Calcitonina sintética) não foi possível partir com um programa de imunização que prevísse a utilização de muitos animais. Das 3 cobaias que foram imunizadas, somente uma forneceu um título aceitável, aparentemente com boa avidéz. Do total de 5 coelhos imunizados,

também apenas um forneceu um antissoro com título útil, sem porém possibilitar a obtenção de curvas dentro do intervalo de sensibilidade necessária.

O único antissoro-IPEN, obtido em cobaia (GP₂) e utilizado neste trabalho, apresentou um título que permitiu o seu uso dentro do limite inferior dos valores de diluição apresentados na literatura. Sua utilização em ensaios posteriores poderia ter sido possível, porém não foi considerada viável devido às baixas ligações específicas (7-10%) que teriam exigido longos períodos de contagem. De fato, a dificuldade de obtenção de um antissoro de avidéz suficiente que pudesse apresentar uma alta constante de afinidade (K_a) na reação Antígeno-Anticorpo, ao ponto de permitir sensibilidades da ordem de 10-50 pg/ml, ficou comprovada durante a realização do nosso trabalho. Em nosso País, um único antissoro anti-hCT de produção nacional se demonstrou disponível e em nossas condições de ensaio não pôde proporcionar uma sensibilidade daquela ordem, embora permitisse a obtenção de ligações específicas bem maiores que o GP₂-IPEN.

Entre os antissoros importados, o único comercialmente disponível do qual nós tivemos conhecimento foi o da Cambridge Research Biochemicals (Cambridge, Inglaterra) que além de custar aproximadamente US\$ 90,00 para 250 tubos, apresentou uma capacidade de ligação quase nula quando foi testado em nosso laboratório, após mais de duas semanas da expedição, talvez em condições inapropriadas. Ao contrário, o antissoro doado gentilmente pela Dra. Elisabet Bucht, do Instituto Karolinska, de Estocolmo (antissoro-Karolinska) demons

trou ser o melhor entre todos os antissoros por nós analisados e foi escolhido para dar prosseguimento ao trabalho, enquanto não fosse solucionado o problema da produção nacional de um antissoros de qualidade claramente superior ao GP₂-IPEN.

Entre os resultados obtidos neste estudo de comparação, achamos interessante aqueles relativos ao RIE realizado com os dois antissoros, o GP₂ e o Karolinska, um dos quais (GP₂) em duas diluições diferentes (Fig. 31) e sua relação com as sensibilidades obtidas. A conceituação teórica repetidamente comentada por Ekins⁽²⁰⁾ em seus trabalhos e incluída na formulação de Rodbard sobre sensibilidade^(54,55) por nós utilizada, está aqui claramente demonstrada na prática. A sensibilidade depende do erro nas determinações próximas do ponto zero e da inclinação da curva. Na figura, de fato, pode-se observar que a curva de maior inclinação será aquela de menor sensibilidade, devido ao alto valor do desvio-padrão no ponto zero, causado pelas baixas ligações enquanto a curva mais sensível será exatamente aquela que une uma boa inclinação ao menor erro no ponto zero.

Com relação à preparação do produto marcado (Calcitonina humana sintética radioiodada) podemos afirmar que, de acordo com os resultados obtidos o produto IPEN após repurificação, é equivalente aos melhores traçadores importados disponíveis comercialmente. Utilizando antissoros de qualidade comprovada (Tabela 8) o nosso marcado repurificado apresentou uma capacidade de ligação da mesma ordem daquela apresen-

tada pelo traçador importado da mesma firma. Suas ligações ao antissoro fornecido pelo Instituto Karolinska foram também da mesma ordem (20-30%) daquelas declaradas pela Dra. E. Bucht^(7,8) responsável por sua produção e utilização naquele Instituto, chegando até 40% de ligação com o antissoro-de-referência internacional da O.M.S., na diluição final $1:2 \times 10^4$.

As técnicas de marcação que utilizam Cloramina T (Clássica e Estequiométrica) não apresentaram diferenças substanciais para este hormônio e logo foi adotada a primeira por ser mais prática e rápida.

A purificação do traçador ($^{125}\text{I-hCT}$) logo após marcações, realizada por vários autores em colunas de troca-iônica ou filtração em gel para baixos pesos moleculares, foi por nós padronizada em colunas de Sephadex G-50 M, para pesos moleculares médios, modificando assim a metodologia corrente. Isto permitiu uma melhor purificação e determinação da atividade específica pelo método da análise da mistura da reação. Comparando as Figs. 14 e 15 é claramente visível a diferença entre a posição e a forma dos dois picos de $^{125}\text{I-hCT}$, no segundo caso, evidentemente mais simétrico, em posição mais específica e conseqüentemente mais puro.

Um teste de liofilização realizado após esta primeira purificação do $^{125}\text{I-hCT}$ em Sephadex G-50 M, mostrou também resultados positivos, comprovando a completa preservação de atividade imunológica e fornecendo portanto uma forma ideal de estocagem e eventualmente, de transporte.

Do nosso ponto de vista, a técnica de repurificação do traçador em gel de poliacrilamida (EGPA 7%) é talvez a

parte mais original introduzida nesta metodologia de preparação de reagentes para o RIE de hCT. Como já foi mencionado, existem na literatura várias técnicas que permitem uma ^{125}I -hCT mais livre do produto frio (hCT) e das formas poliodadas e conseqüentemente mais próxima do hormônio monoiodado homogêneo, que apresenta características ideais de estabilidade e atividade específica. Não tendo condições de realizar uma comparação entre as referidas técnicas, optamos para a utilização da EGPA que, pelo que é de nosso conhecimento, nunca foi utilizada antes para este fim. Os resultados obtidos foram claramente positivos e as vantagens oferecidas por esta técnica são:

a) Flexibilidade e praticabilidade de execução com baixo custo operacional.

b) Rapidez de execução com tempos geralmente inferiores àqueles necessários nas técnicas cromatográficas tradicionais.

c) Possibilidade de aplicação de várias amostras, a partir de um volume mínimo (microlitros) até 2 - 3 ml, e com um número mínimo de contagens até altos valores de radioatividade (~1mCi), em cada corrida.

d) Realização simultânea de um tipo de controle de qualidade relativo à composição eletroforética do traçador em exame. Observamos a este respeito, a comparação entre traçadores de várias origens apresentada nas Figs. 19, 20, 21 e 22.

e) Possibilidade de permitir um estudo futuro de identificação dos vários picos a fim de caracterizar e purificar.

car o pico da Calcitonina monoiodada. A nossa suposição baseada nos dados apresentados na Fig. 23 é que a Calcitonina monoiodada possa tratar-se do pico A. Somente uma exata determinação de sua atividade específica, pelo método do "self-displacement" poderá porém confirmar esta hipótese.

Uma desvantagem da técnica de repurificação padronizada é a introdução de um fator de instabilidade no traçador repurificado. De fato, foi observada uma maior instabilidade do produto repurificado com relação ao não-repurificado (dados não apresentados) que merece posteriores investigações. E. Bucht⁽⁸⁾, A.H. Tashjian⁽⁶²⁾ e outros autores^(19,22,31) declaram em seus trabalhos uma instabilidade mais acentuada do produto marcado, após 3-4 semanas.

Ainda quanto ao método de purificação, vale a pena mencionar a possibilidade de utilização de técnicas mais modernas como cromatofocalização e HPLC com coluna de sílica com fase reversa. Nosso laboratório recebeu recentemente este último aparelho e esta técnica está em fase de padronização. Um dos primeiros programas relativos à sua utilização será exatamente a comparação entre a técnica de repurificação da ¹²⁵I-hCT em EGPA e HPLC.

Embora tenha uma importância indireta na realização do presente trabalho, achamos interessante ressaltar também a aplicação da EGPA à análise do antígeno puro, mediante leitura densitométrica dos géis, em luz ultravioleta (U.V.). Ela poderá ter maiores aplicações e desenvolvimento futuros,

especialmente na análise qualitativa e quantitativa da Calcitonina sintética. Não temos conhecimento de outros autores que tenham determinado o Coeficiente de extinção desta proteína por densitometria em luz U.V., o que poderá permitir estudos e comparações de pureza entre diferentes preparações, de maneira mais rápida e não-destrutiva. Lembramos de fato que a EGPA por densitometria em U.V. permite a determinação e recuperação de bandas protéicas sem necessidade de coloração, preservando portanto a atividade biológica do produto.

O estudo sobre a pureza eletroforética da hCT doada pela CIBA, juntamente com os resultados obtidos em sua determinação radioimunológica, levaram à preparação da nossa primeira solução-de-referência (Padrão-IPEN). Esta preparação liofilizada deverá permitir a análise de sua estabilidade ao longo do tempo e de sua aplicabilidade em nossos sistemas intra e interensaio de Controle de qualidade.

Quanto ao valor do fator de calibração encontrado para o Padrão-IPEN, teoricamente deveria ser aproximadamente igual a um, pois o Padrão de Referência Internacional foi preparado também com o produto sintético da CIBA. O fato de ter calibrado nossa solução-de-referência (Padrão-IPEN) contra um Padrão secundário (Padrão-DPC) pode ter ocasionado uma maior imprecisão, ou então o produto pode ter perdido parte de sua potência imunológica, devido ao longo tempo de estocagem, ou devido à técnica de liofilização. Obviamente, tendo recebido recentemente da O.M.S. o Padrão de Referência Internacional (nº 70/234) a calibração do Padrão-IPEN deverá ser repetida com relação a esta preparação primária.

Com relação à padronização das nossas curvas de RIE, lembramos o estudo realizado para a escolha de uma técnica mais eficiente de separação do antígeno livre e ligado ao anticorpo, que porém não permitiu a obtenção de ligações inespecíficas tão baixas quanto o esperado. A Dra. E. Bucht declarou para seus ensaios, valores de ligações inespecíficas da ordem de 2%⁽⁸⁾. Os nossos valores de 4-6% nos melhores ensaios, merecem uma ulterior investigação para eliminar talvez um dos principais fatores que ainda limita a precisão dos nossos ensaios.

A utilização dos perfis de precisão revelou-se um instrumento útil de controle de qualidade dos nossos ensaios e também dos nossos reagentes. Devemos porém objetivamente reconhecer que a precisão obtida, especialmente no interensaio, ainda não é satisfatória e o nosso trabalho atual está especialmente dirigido à obtenção de coeficientes de variação interensaio inferiores a 10-15%, em toda a região de dosagem. A nosso ver, a origem desta irreprodutibilidade, certamente mais elevada que aquela encontrada na padronização do RIE de outros hormônios, está especialmente relacionada à instabilidade da Calcitonina marcada ou também da fria, como pode indicar a Fig. 16. Também as altas sensibilidades necessárias para este tipo de diagnóstico nos obrigam a trabalhar em condições de alta instabilidade, devido às concentrações extremamente baixas dos reagentes⁽⁹⁾. As repetidas tentativas de solucionar este problema nos afastaram um pouco da aplicação final do presente trabalho, que deverá ser um estudo sobre a exatidão do método e sua aplicação clínica à determinação do

nível de Calcitonina em condições basais e sob estímulo. De fato, como podemos observar na Fig. 36 (última) todo o nosso trabalho foi realizado visando especialmente uma independência nacional na produção destes reagentes, a partir exclusivamente de uma doação de Calcitonina sintética humana, de ^{125}I e da aplicação de "know-how" adquirido anteriormente. Todo o nosso sistema de controle de qualidade de antissoros e traçadores foi baseado, em última análise somente sobre esta limitada disponibilidade de matéria-prima. O mesmo Padrão Internacional de Calcitonina (70/234) da OMS e o Antissoro Padrão foram conseguidos quase no final deste trabalho.

Em conclusão podemos afirmar que as metas propostas foram atingidas e em condições de muita economia. Aproveitando do "know-how" adquirido e com uma maior disponibilidade de tempo e recursos, para chegar a uma aplicação clínica altamente qualitativa, deverão ser enfrentados os problemas principais evidenciados ao longo do trabalho: instabilidade dos reagentes utilizados, altas ligações inespecíficas, baixa avidéz dos anticorpos produzidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BABÊ, M.; ESBRIT, P.; RAPADO, A. Heterogeneity of calcitonin in patients with neoplasia. Clin. Chem., 31(5): 783, 1985.
2. BARTOLINI, P. & RIBELA, M.T.C.P. Stokes radius determination of radioiodinated polypeptide hormones by gel filtration. Anal. Biochem., 174:1-5, 1988.
3. BARTOLINI, P.; ASSIS, L.M.; SCHWARZ, I.; PIERONI, R.R. An accurate determination of human growth hormone content in different pituitary extracts using a radioimmunoassay with polyacrylamide gel electrophoresis as a bound-free separation system. Clin. Chem. Acta, 79:223-36, 1977.
4. BARTOLINI, P.; BORGHI, V.G.; RIBELA, M.T.C.; SCHWARZ, I.; GIMBO, E.K.; MORGANTI, L.E.; ARAÚJO, E.A. Evaluation of the Chloramine T stoichiometric iodination of hGH, hLH, hPr1, hTSH, hCT and BSA reference preparation. Arq. Biol. Tecnol., 30:36, 1987.
5. BECKER, K.L.; SNIDER, R.H.; MOORE, C.F.; MONAGHAN, K.G.; SILVA, O.L. Calcitonin in extrathyroidal tissues of man. Acta Endocrinol., 92:746-51, 1979.
6. BERSON, S.A. & YALOW, R.S. General principles of radioimmunoassay. Clin. Chim. Acta, 22:51-69, 1968.
7. BUCHT, E. Calcitonin in human plasma, milk and seminal fluid. Immunoextraction and gel chromatography studies.

Stockholm, 1986. (Thesis, Department of Endocrinology, Karolinska Hospital, Karolinska Institute)

8. BUCHT, E. Comunicação pessoal.
9. CATHERWOOD, B.D. & DEFTOS, L.J. General principles, problems and interpretation in the radioimmunoassay of calcitonin. Biomed. Pharmacother., 38:235-41, 1984.
10. CLARCK, M.E.; BYFIELD, P.G.H.; BOYD, G.V.; FOSTER, G.V. A radioimmunoassay for human calcitonin. Lancet, 2:74, 1969.
11. COPP, D.H.; CAMERON, E.C.; CHENEY, B.A.; DAVIDSON, A.G.F.; HENZE, K.G. Evidence for calcitonin a new hormone from the parathyroid that lowers blood calcium. Endocrinology, 70:638-49, 1962.
12. COPP, D.H.; DAVIDSON, A.G.F.; CHENEY, B.A. Evidence for a new parathyroid hormone which lowers blood calcium. Proc. Can. Fed. Biol. Sci., 4:17, 1961.
13. CORRIE, J.E.T.; ABBOTT, S.R.; BROWN, N.S. Some observations and storage of radiolabeled protein hormones. In: HUNTER, W.M. & CORRIE, J.E.T., eds. Immunoassay for clinical chemistry. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1983. p. 267-70.
14. CUNLIFFE, W.J.; BLACK, M.M.; HALL, R.; JOHNSTON, I.D.A.; HUDGSON, P.; SHUSTER, S.; GUDMUNDSON, T.V.; JOPLIN, G.F.; WILLIAMS, E.D.; WOODHOUSE, N.J.Y.; GALANTE, L.; MACINTYRE, I. A calcitonin secreting thyroid carcinoma. Lancet, 2:63-6, 1968.
15. DAVIS, B.J. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. Ann. N.Y. Acad. Sci., 121:404-27, 1964.

16. DEFTOS, L.J. Immunoassay for human calcitonin. I. method. Metabolism, 20(12):1122-8, 1971.
17. DEFTOS, L.J.; BURY, A.E.; HABENER, J.F.; SINGER, F.R.; POTTS, J.T. Immunoassay for human calcitonin. II. clinical studies. Metabolism, 20(12):1129-37, 1971.
18. DEFTOS, L.J.; LEE, M.R.; POTTS, J.T. A radioimmunoassay for thyrocalcitonin. Biochemistry, 60:293-9, 1968.
19. DERMODY, W.C.; ANANTHASWAMY, R.; ROSEN, M.A.; PERINI, F.; LEVY, A.G. Immunological, biochemical and enzymic validation of radioimmunoassays specific to the amino and carboxy terminal of human calcitonin. Clin. Chem., 26(2):235-42, 1980.
20. EKINS, R.P. Basic concepts in quality control. In: IAEA ed. Radioimmunoassay and related procedures in medicine, Vienna, IAEA, 1978 p. 6-20.
21. EMMERTSEN, K. Medullary thyroid carcinoma and calcitonin. Dan. Med. Bull., 32(1):1-28, 1985.
22. EMMERTSEN, K.; MARQUERSEN, J.; JENSEN, F.T.; HANSEN, H.H. V.I.D. Radioimmunoassay of calcitonin in inextracted human serum: a sensitive method. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 42:539-44, 1982
23. EZABELLA, M.C.L. Carcinoma medular da tireóide: testes dinâmicos da secreção de calcitonina em familiares de afetados. São Paulo, 1988. (Dissertação de mestrado, Faculdade de Medicina, da Universidade de São Paulo).
24. FOSTER, G.V.; BAGHDIA NTZ, A.; KUMAR, M.A.; SLACK, E.; SOLIMAN, H.A.; MacINTYRE, I. Thyroid origin of calcitonin. Nature, 202:1303-5, 1964.

25. FRANC, B. Diagnostic approach of medullary and other calcitonin secreting thyroid carcinoma. Ann. Pathol., 4:393, 1985.
26. GAUTIVIK, K.M.; NORMANN, T.; TEIG, V.; WILLE, S.O.; BRENNHART, I.O.; CHRISTENSEN, I. Radioimmunoassay of human calcitonin in serum and tissue from healthy individuals and patients with medullary carcinoma of the thyroid gland. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 36: 323-9, 1976.
27. GOLDSMITH, S.J. Radioimmunoassay: review of basic principles. Semin. Nucl. Med., 5(2):125-52, 1975.
28. GRAZE, K.; SPILLER, I.J.; TASHJIAN, A.H. Natural history of familial medullary thyroid carcinoma. Effect of a program for early diagnosis. N. Engl. J. Med., 299: 980-5, 1978.
29. HAMILTON, C.R. Radioimmunoassay of the calcium-regulating hormones. In: ROTHFELD, M.D., ed. Nuclear medicine in vitro. Philadelphia, Lippincott, 1974. p. 285-90.
30. HAZARD, J.B.; HAWK, W.A.; CRITE, G. Medullary (solid) carcinoma of the thyroid a clino-pathologic entity. J. Clin. Endocrinol. Metab., 19:152-61, 1959.
31. HEATH, H. & SIZEMORE, G.W. Radioimmunoassay for calcitonin. Clin. Chem., 28(5):1219-26, 1982.
32. HEATH, H., BODY, J.J.; FOX, J. Radioimmunoassay of calcitonin in normal human plasma: Problems, perspectives and prospects. Biomed. Pharmacoter., 38:241-5, 1984.
33. HIRSCH, P.F. & MUNSON, P.L. Thyrocalcitonin. Physiol. Rev., 49:548-622, 1969.

34. HUNTER, W.M. Radioimmunoassay. In: WEIR, D.M., ed. Handbook of experimental immunology. Vol. 1: Immunology chemistry. 2. ed. Oxford, Blackwell, 1973, c.17, p. 1-36.
35. HUNTER, W.M. & GREENWOOD, F.C. Preparation of iodine 131 labelled human growth hormone of high specific activity. Nature, 194:495-6, 1962.
36. IVANOV, I.; TAM, J.; WISHART, P.; JAY, E. Chemical synthesis and expression of the human calcitonin gene. Gene, 59(2/3):223-30, 1987.
37. LALLEY, P.A.; SAKAGUCHI, A.Y.; EDDY, R.L.; RONEY, N.H.; BELL, G.I.; SHEN, L.P.; RUTTNER, W.J.; JACOBS, J.W.; HEINRICH, G.; CHEN, W. W.; NAYLOR, S.L. Mapping polypeptide hormone genes in the mouse: somatostatin, glucagon, calcitonin and parathyroid hormone. Cytogenet. Cell Genet., 44:92-7, 1987.
38. LAMBERT, P.W. & ROSS, B.A. Paired-in-reversed-phase high performance liquid chromatography of human and rat calcitonin. J. Chromatogr., 198:293-300, 1980.
39. LINDE, S.; HANSEN, B.; LERNMARK, A. Stable iodinated polypeptide hormones prepared by polyacrilamide gel electrophoresis. Anal. Biochem., 107:165-76, 1980.
40. MacINTYRE, I.; GIRGIS, S.I.; HILLYARD, C.J. Essential steps in the measurement of circulating levels of calcitonin. Biomed. Pharmacother., 38:230-4, 1984.
41. MAYBARRY, W.E. Iodine chemistry. In: RALL, J.E. & KOPIN, I.J., eds. Methods in investigative and diagnostic endocrinology. New York, North Holland, 1972, v.1, p. 18-9.

42. MELVIN, K.E.W. & MILLER, H.H. Early diagnosis of medullary carcinoma of thyroid gland by means of calcitonin assay. N. Engl. J. Med., 285:1115, 1971.
43. MOTTE, P.; VAUZELLE, P.; ALBERICI, G.F.; ALT-ABDELLAR, M.; BOHUON, C.; BELLET, D. Utilization of synthetic peptides for the study of calcitonin and biosynthetic precursors for calcitonin. Nucl. Med. Biol., 14(4):289-94, 1987.
44. MOTTE, P.; VAUZELLE, P.; ALBERICI, G.F.; TROALEN, F.; BOHUON, C.; BELLET, D. Radioiodination fo human calcitonin using the iodogen reagent. J. Immunol. Methods, 87:223-7, 1986.
45. MOTTE, P.; VAUZELLE, P.; GARDET, P.; GHILLANI, P.; CAILLON, B.; PARMENTIER, C.; BOHUON, C.; BELLET, D.; Construction and clinical validation of a sensitive and specific assay for serum: mature calcitonin using monoclonal antipeptide antibodies. Clin. Chim. Acta, 174:35-54, 1988.
46. MUNSON, P.L.; HIRSCH, P.F.; BREWER, H.B.; REISFELD, R.A.; COOPER, C.W.; WASTED, A.B.; ORIMO, H.; POTTS, J.T. Thyrocalcitonin. Rec. Prog. Horm. Res., 24:589-650, 1968.
47. MYHRE L. & GAUTIVIK, K.M. The use of region specific radioimmunoassays for characterization of circulating calcitonin in patients with medullary carcinoma of the thyroid gland. Acta Endocrinol., 91:449-61, 1979.
48. ODELL, W.D. Use of charcoal to separate antibody complexes from free ligand in radioimmunoassay. Methods Enzymol., 70:274-9, 1980.
49. PARTHMORE, J.G. & DEFTOS, L.J. The regulation of calcitonin in normal human plasma as assessed by immuno-precipitation and immuno-extraction. J. Clin. Invest., 58:835.41, 1975.

50. PEARSE, A.G.E. & CARVALHEIRA, A.F. Cytochemical evidence for an ultimobranchial origin of rodent thyroid C cells. Nature, 214:929-30, 1967.
51. PONDER, B.A.J.; COFFEY, R.; GAGEL, R.F.; SEMPLE, P.; PONDER, M.A.; PEMBREY, M.E.; TELENUS-BERG, M.; EASTON, D.F. Risk estimation and screening in families of patients with medullary thyroid carcinoma. Lancet, (Feb):397-400, 1988.
52. POTTS, J.T. Calcitonin. In: BERSON, S.A.; YALOW, R.S., eds. Methods in investigative and diagnostic endocrinology. Amsterdam, North Holland, 1973. v.28, p. 991-1026.
53. RACCHETTI, G.; FOSSATI, G.; COMITTE, R.; PUTIGNANO, S.; GALANTE, Y.M. Production of monoclonal antibodies to calcitonin and development of a two site enzyme immunoassay. Mol. Immunol., 24(11):1169-76, 1987.
54. RODBARD, D. & FRAGIER, G.R. Statistical analyse of radioligand assay data. Methods Enzymol., 37:3-22, 1986.
55. RODBARD, D.; MUNSON, P.J.; DELEA, A. Improved curve fitting parallelism testing characterization of sensitivity and specificity, validation and optimization of radioligand assay. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Radioimmunoassay and related procedures in medicine: proceedings of the international symposium on..., held in Berlin, Oct. 31-Nov.4, 1977. Vienna, 1978. v.1, p. 469-514.
56. ROTH, J. Methods for assessing immunologic and biologic properties of iodinated peptide hormones. Method Enzymol., 37:223-33, 1975.
57. SANTOS, A.J.G. dos Preparação de um extrato homogêneo de hormônio de crescimento humano, iso-hormônio B, e sua mar

cação com ^{125}I , para utilização em radioensaios. São Paulo, 1985. (Dissertação de mestrado, IPEN-CNEN/SP).

58. SCHIFTER, S.; WILLIAMS, E.D.; CRAIG, R.K.; HANSEN, H.H. Calcitonin gene-related-peptide and Calcitonin in Medullary Thyroid Carcinoma. Clin. Endocrinol. 25:703-10, 1986.
59. SERDENGEÇTI, S.; SERDENGEÇTI, K.; DERMAN, U.; BERKARDA, B. Salmon calcitonin in the treatment of bone metastases. Int. J. Clin. Pharma Res., 2:151-5, 1986.
60. SIGEL, M.B.; SINHA, Y.N.; VANDERLAAN, W.P. Production of antibodies by inoculation into Lymph Nodes. Methods Enzimol., 93:3-12, 1983.
61. TALPOS, G.B.; JACKSON, C.E.; FROLICH J.W.; KAMBOURIS A.A., BLOCK, M.A.; TASHJIAN, A.H. Localization of residual medullary thyroid cancer by thallium/technetium scintigraphy. Surgery, 98:1189-96, 1985.
62. TASHJIAN, A.H. Comunicação pessoal.
63. TASHJIAN, A.H. Immunoassay of thyrocalcitonin. I. The method and its serological specificity. Endocrinology, 84:140-8, 1969.
64. TASHJIAN, A.H. & MELVIN, K.E.W. Medullary carcinoma of the thyroid gland. Studies of thyrocalcitonin in plasma and tumor extracts. N. England J. Med., 279-83, 1968.
65. TASHJIAN, A.H.; HOWLAND, B.G.; MELVIN, K.E.W.; HILL, C.S. Immunoassay of human calcitonin: clinical measurement relation to serum calcium and studies in patients with medullary carcinoma. N. Engl. J. Med., 283(17):890-5, 1970.
66. TOLEDO, S.P.A. Carcinoma medular da tireóide. Rev. Hosp.

Clin., Fac. Med., Univ. São Paulo, 40(5):220-2, 1985.

67. VAITUKAITS, J.L. Production of antisera with small doses of immunogen: multiple intradermal injections. Methods Enzymol., 73:46-52, 1981.
68. VAITUKAITS, J.L.; ROBBIS, J.B.; NIESCHLAG, E.; ROSS, G.F. A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. J. Clin. Endocrinol. Metab., 33: 988-91, 1971.
69. WILLIAMS, E.D. A review of 17 cases of carcinoma of the thyroid and pheochromocytoma. J. Clin. Pathol., 18:288-92, 1965.
70. WILLIAMS, E.D. Histogenesis of medullary carcinoma of the thyroid. J. Clin. Pathol., 19:114-8, 1966.
71. WOLOSZCZUK, W. Iodogen-catalysed iodination of human calcitonin and Tyr(O)-katalcalcinand purification of their mono and di-iodinated derivatives by chromatofocussing. J. Immunol. Methods, 90:1-6, 1986.
72. WRIGHT, D.R.; WOELKEL, E.F.; TASHJIAN, A.H. Measurement of human calcitonin by affinity chromatography and radioimmunoassay. In: ABRAHAM, G.E., ed. Handbook of radioimmunoassay. New York, Marcel Dekker, 1977. p. 391-423.
73. YIAKOUNAKIS, E.; PROUKAKIS, Ch.; RAPTIS, K.; KORRES, A.; DONDAS, N.; SAMARAS, V. Calcitonin concentrations in lung cancer and non-malignant pulmonary diseases. Oncology, 44:145-9, 1987.
74. ZIEGLER, R. & RAUE, F. Variations of plasma calcitonin levels measured by radioimmunoassay systems for human calcitonin. Biomed. Pharmacother., 38:245-51, 1984.

ERRATA

I. INTRODUÇÃO pag.1 ,7ª linha : onde se lê fato leia fator

pag.4 ,4ª linha : onde se lê 9 leia 7

II. MATERIAIS E MÉTODOS

pag.27 , última linha : onde se lê coluna de tampão
leia coluna com tampão.

pag.48 ,última linha : onde se lê se leia de

pag.51 ,última linha : onde se lê abaixo leia a seguir

III. RESULTADOS

pag.67 ,Tabela 4 ,9ª coluna :onde se lê (μ Ci/mg) leia
(μ Ci/ μ g)

pag.69 ,Tabela 5 ,4ª coluna :onde se lê (mg) leia (μ g).

pag.74 ,item 2.5. ,2ª linha : onde se lê (% IB) leia
(% TB).

pag.77 ,12ª linha : onde se lê HPCL leia HPLC.

pag.77 ,título do item 2.7. : onde se lê Alteração de
leia Alteração da.

pag.83 ,item 3.2. ,4ª linha :onde se lê o antissoro e o
2º Anticorpo leia o antissoro anti-hCT GP₂-IPEN e o 2º
Anticorpo

pag.85 ,item 3.5. ,7ª linha :onde se lê eletroforetiva-
mente leia eletroforeticamente.

pag.95 ,4ª linha: onde se lê diluição final 1:2000 e
1:4000 foram realizadas leia diluição-final 1:2000
e 1:4000 e Karolinska na diluição-final 1:12000. Essas
curvas foram realizadas.

pag.95 ,4ª linha :onde se lê mercado leia marcado

pag.106 ,Tabela 15: faltou as unidades dos parâmetros
MCIS, (μ g/ml) ; ED50 (μ g/ml) ; NSB (%) ; Bo (%) e ACQ (μ g/ml)