

BR90-24193

INIS-BR--2232

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

PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE RADIOIMUNOENSAIO PARA A  
DETERMINAÇÃO DA GASTRINA HUMANA E  
SUA APLICAÇÃO CLÍNICA

MARIA GLORIA PEIG GINABREDA

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

Orientadora: Dra. Vânia Caira Bough

SÃO PAULO

1989

Dissertação realizada nos laborat6-  
rios da Divis6o de Medicina (TM)  
do Instituto de Pesquisas Energ6ti-  
cas e Nucleares (IPEN).

*Aos meus pais*

*À memória do*

*Prof. Dr. Agostinho Bettarello*

À Dra. Vânia Caira Borghi, pela segura orientação que tornou possível a realização desta dissertação.

Ao Dr. Claudio Rodrigues

À Dra. Dulce Reis Guarita

Ao Dr. Flair José Carrilho

À M.Sc. Irene Schwarz

Ao Dr. José Murilo Robilotta Zeitune

Ao Dr. José Roberto Rogero

Ao Dr. Luiz Ernesto de Almeida Troncon

À Dra. Luiza Romanello

À M.Sc. Maria Teresa Carvalho Pinto Ribela

Ao Dr. Paolo Bartolini

À Sra. Paula Goldenstein Strassman

Ao Dr. Roberto Fulfaro

Ao Dr. Wellington Monteiro Machado

pela orientação, participação e apoio na realização deste trabalho.

À Srta. Rosângela R. Arkaten pela ajuda técnica.

Aos colegas do Departamento de Aplicações em Ciências Biológicas, especialmente os da Divisão de Medicina, pela colaboração e estímulo.

Aos colegas da Disciplina de Gastroenterologia Clínica do Departamento de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pelo apoio e incentivo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela bolsa concedida.

A todos os que direta ou indiretamente colaboraram na realização deste trabalho.

nosso sincero agradecimento.

PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE RADIOIMUNO-  
ENSAIO PARA A DETERMINAÇÃO DA GASTRINA  
HUMANA E SUA APLICAÇÃO CLÍNICA

MARIA GLORIA PETIG GINABREDA

RESUMO

Desenvolveu-se e padronizou-se um sistema de radioimunoensaio para a determinação de gastrina empregando-se gastrina humana sintética para a radioiodação e preparo de soluções padrão bem como anticorpo específico produzido em coelhos.

O hormônio foi marcado com  $^{125}\text{I}$  pela técnica da Cloramina T e purificado por cromatografia de troca aniônica em QAE-Sephadex A-25, sendo determinada sua atividade específica. O traçador assim obtido foi submetido a análise de pureza pela eletroforese em gel de poliacrilamida e precipitação de proteínas pelo ácido tricloroacético. Foi avaliada sua estabilidade em função do tempo de estocagem, tendo sido também comparado com o traçador fornecido por um conjunto diagnóstico comercial, no que diz respeito a sua pureza e adequação para uso no radioimunoensaio.

Os ensaios foram realizados incubando-se gastrina radioiodada, gastrina padrão preparada em plasma isento deste hormônio (de zero a 500 pmol/l) ou amostras a serem dosadas com o anti-soro por 4 dias a  $4^{\circ}\text{C}$ .

A separação entre a gastrina livre e a ligada ao anticorpo foi feita pela adsorção do hormônio livre ao carvão, cuja concentração ideal foi determinada previamente. Plasma isento de gastrina foi obtido a partir de plasma velho de Banco de Sangue submetido à extração com carvão.

Quando realizado o controle de qualidade, este radioimunoensaio apresentou-se específico, exato, preciso e sensível, permitindo a execução de ensaios válidos. Sua validade foi ainda confirmada pela nítida discriminação não só das concentrações de gastrina em indivíduos com níveis muito baixos (gastrectomizados) e extremamente elevados (síndrome de Zollinger-Ellison) como também das concentrações de gastrina naqueles indivíduos portadores de outras afecções, tais como doença de Chagas, anemia perniciosa e insuficiência renal crônica.



STANDARDIZATION OF THE RADIOIMMUNOASSAY  
TECHNIQUE FOR THE DETERMINATION OF HU-  
MAN GASTRIN AND ITS CLINICAL APPLICATION

MARIA GLORIA PEIG GINABREDA

ABSTRACT

It was developed and standardized a system of radioimmunoassay for the determination of gastrin, employing synthetic human gastrin for radioiodination and preparation of standard as well as specific antibody raised rabbits.

The hormone was labeled with  $^{125}\text{I}$  by the Chloramine T technique and purified by anion exchange chromatography in QAE-Sephadex A-25, being determined its specific activity. The tracer thus obtained was submitted to analysis of purity by polyacrilamide gel electrophoresis and precipitation of proteins by trichloroacetic acid. Its stability evaluated according to the time of storage, being its purity and adequation for the use in radioimmunoassay also compared to a tracer obtained from a commercial diagnosis kit.

The assays were performed by incubation of radioiodinated gastrin, standard gastrin prepared in plasma free from this hormone (from zero to 500 pmol/l) or samples to be assayed with the antiserum for 4 days at 4°C. The separation between the free gastrin and the gastrin

bound to the antibody was carried out by adsorption of the free hormone to the charcoal, whose ideal concentration was previously determined. Plasma free from gastrin was obtained from time-expired blood bank plasma submitted to extraction with charcoal.

When performed the quality control, this radioimmunoassay was shown specific, accurate, precise and sensitive, allowing the performance of valid assays. Its validation was even confirmed by clear discrimination not only of the gastrin concentrations in subjects with very low levels (gastrectomized) and extremely high levels (Zollinger-Ellison syndrome) as well as gastrin concentrations in subjects with other diseases, such as Chagas disease, pernicious anemia and chronic renal failure.

## ABREVIATURAS

- EGPA - Eletroforese em gel de poliacrilamida
- R<sub>m</sub> - Distância de migração eletroforética relativa
- TCA - Ácido tricloroacético
- SAB - Soro albumina bovina
- SAH - Soro albumina humana
- cpm - Contagens por minuto
- rpm - Rotações por minuto
- mCi - MiliCurie  $3,7 \times 10^7$  desintegrações por segundo
- G-<sup>125</sup>I - Gastrina radioiodada
- DM - Dose mínima detectável
- C.V. - Coeficiente de variação
- $\bar{x} \pm DP$  - Média  $\pm$  desvio padrão
- Med - Mediana
- $\bar{x} \pm EPM$  - Média  $\pm$  erro padrão da média
- dpm - Desintegrações por minuto

## INDICE

	PÁGINA
1. INTRODUÇÃO E PROPÓSITO .....	01
2. MATERIAIS E MÉTODOS	
2.1. Equipamentos e materiais .....	10
2.1.1. Equipamentos .....	10
2.1.2. Reagentes e soluções .....	11
2.1.3. Materiais biológicos .....	14
2.2. Preparo do traçador .....	15
2.2.1. Radiiodação .....	15
2.2.2. Purificação do hormônio radioiodado .....	16
2.2.3. Análise da qualidade da gastrina a ser radioiodada e da eficiência das técnicas de iodação e purifica- ção .....	17
2.2.3.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida ....	18
2.2.3.2. Precipitação de proteínas pelo TCA .....	20
2.2.3.3. Teste de imunorreatividade .....	21
2.3. Determinação das condições ótimas para o radioensaio. ....	22
2.3.1. Obtenção do plasma isento de gastrina: plasma li- vre .....	22
2.3.2. Preparo da curva padrão .....	22
2.3.3. Obtenção das amostras de soro ou plasma a serem do- sadas .....	23
2.3.4. Determinação da ótima diluição do anti-soro .....	23
2.3.5. Método de separação do ensaio: determinação da con- centração ideal de carvão. ....	24

2.4. Radioimunoensaio de gastrina .....	25
2.4.1. Seqüência operacional .....	25
2.4.2. Determinação das concentrações das amostras .....	27
2.5. Avaliação das características do traçador .....	28
2.5.1. Estabilidade .....	28
2.5.2. Atividade específica .....	28
2.5.3. Comparação do traçador IPEN com o traçador comercial .....	29
2.6. Controle de qualidade .....	29
2.6.1. Especificidade .....	29
2.6.2. Exatidão .....	30
2.6.3. Precisão .....	32
2.6.4. Sensibilidade .....	32
2.7. Aplicação clínica .....	33
2.7.1. Determinação da concentração de gastrina em amostras de soro ou plasma .....	33
2.7.2. Determinação da gastrinemia em indivíduos normais e em portadores de diferentes afecções .....	33
3. RESULTADOS	
3.1. Preparo do traçador .....	34
3.1.1. Análise qualitativa da gastrina a ser radioiodada ..	34
3.1.2. Radioiodação .....	34
3.1.3. Purificação do hormônio radioiodado .....	38
3.2. Determinação das condições ótimas para o radioimunoensaio .	45
3.2.1. Obtenção do plasma isento de gastrina .....	45
3.2.2. Determinação da ótima diluição do anti-soro .....	48

3.2.3. Método de separação do ensaio: determinação da con - centração ideal de carvão .....	48
3.3. Radioimmoensaio de gastrina .....	48
3.4. Avaliação das características do traçador .....	53
3.4.1. Estabilidade .....	53
3.4.2. Atividade específica .....	53
3.4.3. Comparação do traçador IPEN com o traçador comer- cial .....	58
3.5. Controle de qualidade .....	64
3.5.1. Especificidade .....	64
3.5.2. Exatidão .....	64
3.5.3. Precisão .....	64
3.5.4. Sensibilidade .....	74
3.6. Aplicação clínica .....	74
3.6.1. Determinação da concentração de gastrina em amostras de soro ou plasma .....	74
3.6.2. Determinação da gastrinemia em indivíduos normais e em portadores de diferentes afecções .....	78
4. DISCUSSÃO .....	
4.1. Preparo e controle de qualidade do traçador .....	87
4.2. Determinação das condições ótimas para o radioimmoensaio e controle de sua qualidade .....	92
5. CONCLUSÕES .....	99
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	101
7. APÊNDICE .....	111

## 1. INTRODUÇÃO

A gastrina, um dos hormônios polipeptídicos gastrointestinais, é secretada pelas células G situadas nas glândulas pilóricas da mucosa antral e da mucosa duodenal proximal<sup>10,28</sup>. Responsável principal pela estimulação da secreção ácida gástrica, participa também na regulação do crescimento da mucosa gástrica.

Além dessas duas funções principais, a gastrina provoca uma série de efeitos sobre o epitélio e o músculo liso do aparelho gastrointestinal, entre os quais cabe destacar a contração do esfíncter inferior do esôfago, estimulação das contrações musculares gástricas e da secreção enzimática do pâncreas<sup>29,50,74,77</sup>. Contudo, estes efeitos normalmente provêm de doses farmacológicas ou de hipersecreção anômala da gastrina e apesar de não deverem ter importância fisiológica podem ter significado patológico.

Embora em 1905 EDKINS<sup>20</sup> já tivesse denominado gastrina ao princípio contido em extratos de mucosa antral que estimulavam a secreção ácida em gatos, a presença concomitante da histamina nesses extratos não permitiu que ela fosse considerada como uma entidade própria. Novos trabalhos foram realizados até que, em 1964, GREGORY e TRACY<sup>28</sup> isolaram uma forma pura de gastrina a partir da mucosa antral de porco. Posteriormente, conseguiu-se determinar a estrutura deste polipeptídeo<sup>27</sup> e realizar sua síntese<sup>3</sup>.

A gastrina humana possui diferentes formas moleculares com comprimentos de cadeia variáveis<sup>57,73,83</sup>, sendo que a nomenclatura adotada para designar estas formas consiste na letra G seguida do número de resíduos de aminoácidos da cadeia polipeptídica. As principais formas deste hormônio presentes tanto no sangue quanto na mucosa antral e duode

nal são a G-34, seguida da G-17 e G-14 (Tabela 1). Duas formas maiores e biologicamente inativas também foram identificadas no sangue e em extratos tumorais: o componente I<sup>60</sup> e uma forma de gastrina de peso molecular maior do que a G-34<sup>85</sup>.

A gastrina pode ainda apresentar ou não sulfatação no seu único resíduo de tirosina (Tabela 1). A forma sulfatada e a não-sulfatada parecem apresentar diferenças em suas atividades biológica<sup>37</sup> e imunológica<sup>58</sup>. Entretanto, recentemente alguns autores como MULHOLLAND e cols.<sup>50</sup> afirmam serem equipotentes em relação à estimulação da secreção ácida gástrica.

Na circulação, a G-34 é a forma predominante<sup>41,57,72,83,86</sup> sendo responsável por 60% da gastrina total<sup>41</sup>, seguida da G-17. As demais formas encontram-se em concentrações muito pequenas. Acredita-se porém que as formas predominantes, G-34 e G-17, tenham a mesma potência biológica<sup>22</sup>.

No que diz respeito à distribuição deste hormônio no trato gastrointestinal, onde predomina a G-17<sup>16,41,73</sup>, a gastrina encontra-se presente em concentração mais elevada na mucosa antral do que na duodenal. Porém, devido ao fato desta última ser mais volumosa, julga-se que os dois locais contenham aproximadamente a mesma quantidade deste hormônio.

A predominância de diferentes formas na circulação e nos tecidos pode ser explicada pela maior vida média da G-34<sup>77</sup> e pelo fato da G-17 ser a forma na qual o hormônio é armazenado nos grânulos das células G<sup>73</sup>. A gastrina, assim como outros hormônios, é sintetizada a partir de formas maiores que por clivagem enzimática dão origem àquelas de peso molecular menor<sup>50,73,77</sup>.



Tabela 1 - Sequência de aminoácidos das formas moleculares principais da gastrina humana.

Forma	Peso	Aminoácido																																				
molecular	molecular	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34			
G-34	3839	Pyro	Leu	Gly	Pro	Gly	His	Pro	Ser	Leu	Val	Ala	Asp	Pro	Ser	Lys	Lys	Gln	Gly	Pro	Trp	Leu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Ala	Ala	Tyr	Gly	Trp	Met	Asp	Phe	NH <sub>2</sub>		
G-17	2098																																					
G-14	1647																																					

As linhas tracejadas indicam a homologia das formas G-17 e G-14 em relação à G-34

Gastrina não sulfatada, R = H

Gastrina sulfatada, R = SO<sub>3</sub>H

A atividade biológica da gastrina é conferida pela seqüência pentapeptídica C-terminal, a qual é compartilhada com outro hormônio gastrointestinal, a colecistoquinina. Portanto, esses hormônios têm em comum uma série de ações biológicas e a principal diferença entre eles parece ser a potência de seus efeitos nos órgãos alvo<sup>55,74</sup>. Esta seqüência constitui também o principal determinante antigênico, comum a todas as formas<sup>42,59,63,82</sup>. Relatos sobre a especificidade de anticorpos de gastrina sugerem a existência de um determinante N-terminal secundário<sup>18</sup> e de um terceiro determinante que contém partes de ambas as regiões C e N-terminais<sup>17</sup>.

A gastrina humana difere da de outros mamíferos pela substituição de um ou dois aminoácidos na porção média da cadeia polipeptídica. Estas diferenças parecem não alterar sua ação biológica em outras espécies<sup>72,84</sup>.

Todos os mecanismos que levam à liberação da gastrina agem mediante estimulação química da célula G. Entre os principais agentes estimulantes encontram-se os produtos da digestão protéica, o café, o vinho, o cálcio e os reflexos vagais. Entre os principais inibidores pode-se citar a secretina e a diminuição do pH intragástrico<sup>74</sup>.

Apesar da descoberta da gastrina datar da primeira década deste século, o avanço no conhecimento de sua ação fisiológica foi muito lento devido a dificuldades existentes na sua purificação e posterior quantificação.

Inicialmente, a gastrina era dosada por bioensaio medindo-se sua potência pela estimulação da secreção ácida em testes realizados com ratos, cães ou gatos<sup>39</sup>. O bioensaio apresentava boa precisão, porém faltava-lhe sensibilidade e especificidade. Seu nível de sensibilidade era muito baixo para a determinação da gastrinemia em indivíduos normais<sup>74</sup>.

Com o advento dos ensaios imunológicos e mais precisamente do radioimunoensaio em 1959<sup>79</sup>, estas dificuldades foram superadas, aliando-se nesta técnica elevada sensibilidade com a especificidade inerente do sistema imunológico. O radioimunoensaio permite a dosagem de pequenas quantidades de determinada substância, na presença de elevadas concentrações de muitas outras, como ocorre na corrente sanguínea e nos extratos.

O princípio do radioimunoensaio baseia-se na competição entre o antígeno marcado isotopicamente ( $Ag^*$ ) e não marcado ( $Ag$ ) pelos sítios de ligação de seus anticorpos específicos ( $Ac$ ) formando complexo antígeno-anticorpo ( $Ag^*-Ac$ ) ( $Ag-Ac$ ). Esta reação obedece à lei de ação das massas e está ilustrada na Figura 1. Como as quantidades de traçador e de anticorpo são mantidas constantes, constroem-se curvas de calibração adicionando-se concentrações variáveis de antígeno padrão ao sistema de incubação. Nesse sistema, a proporção de complexo radioativo formado ( $Ag^*-Ac$ ) é inversamente proporcional à quantidade de antígeno não marcado.

A concentração do antígeno ensaiado pode ser determinada em amostras sanguíneas ou em extrato de tecido pela leitura direta em curva de calibração obtida pela incubação simultânea das amostras e dos padrões, com o traçador e o anticorpo específicos (Figura 2). Desta forma, compara-se o efeito inibitório do padrão na ligação do traçador ao seu anticorpo, com o efeito inibitório do antígeno contido nas amostras de concentração desconhecida<sup>9</sup>.

No que diz respeito à gastrina, sua síntese bem como o preparo de anticorpos específicos levaram ao desenvolvimento de um radioimunoensaio para sua medida no final da década de 60<sup>42,52</sup>. A partir de então, vários relatos de ensaios de gastrina são encontrados na literatura<sup>38,65,66,69,73,82,86</sup>.

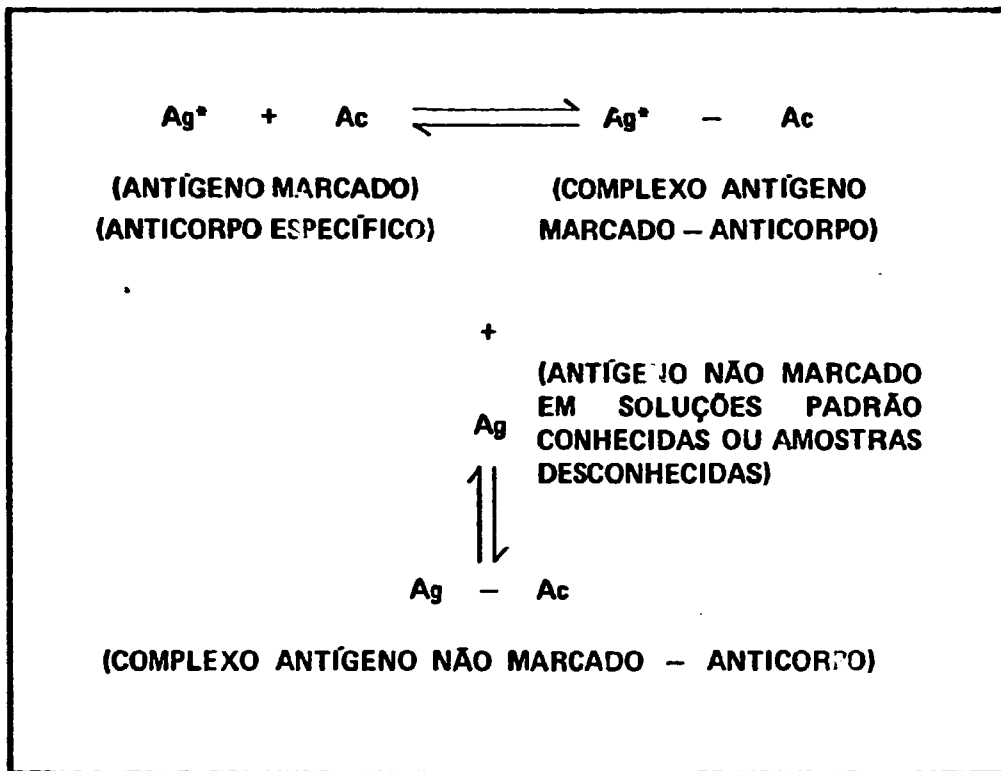


Figura 1 – Reação de competição que caracteriza o radioimunoensaio.

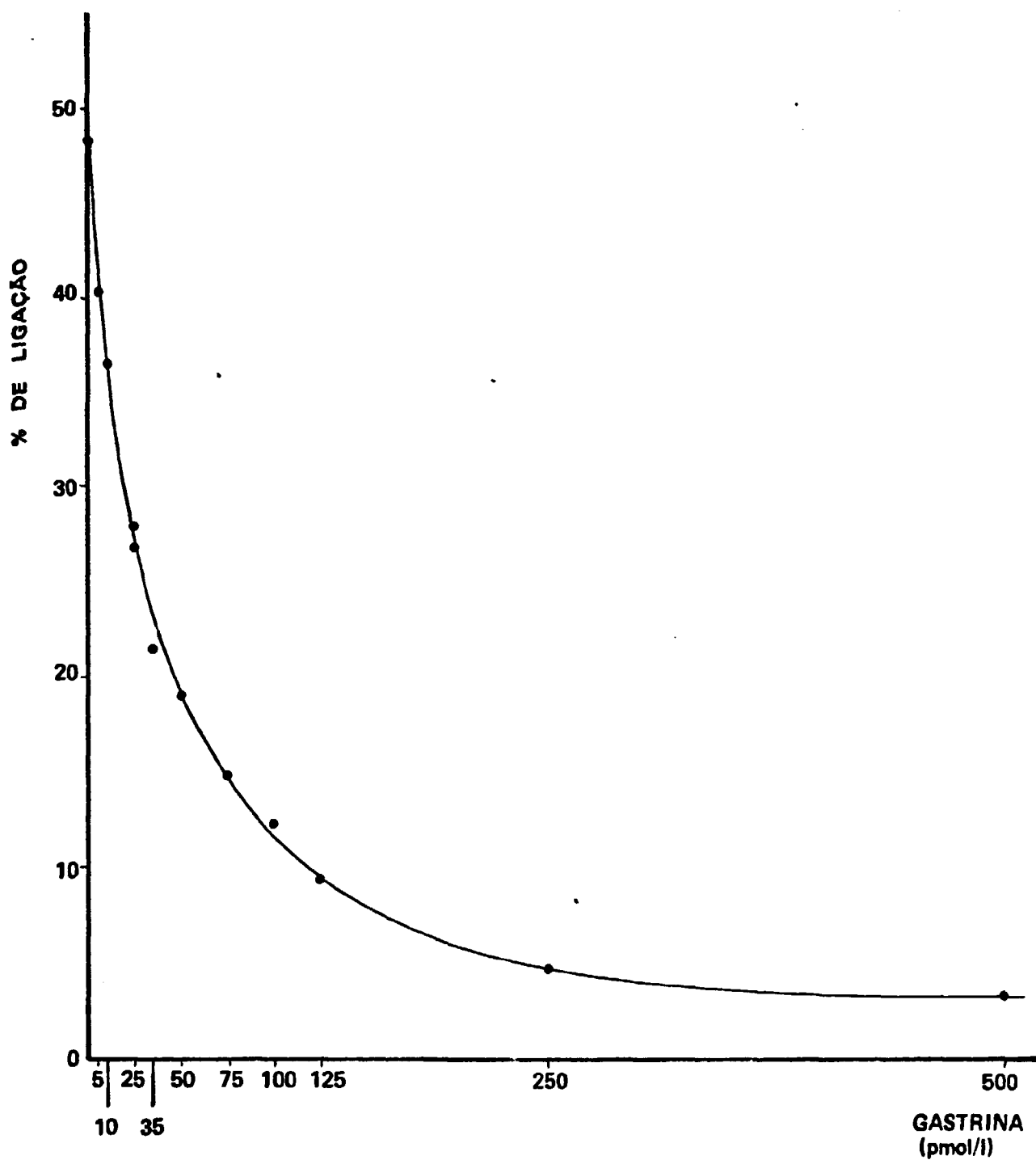


Figura 2 - Exemplo típico de uma curva padrão obtida no radiomunoensaio de gastrina, realizada com o traçador proveniente da 2<sup>a</sup> radioiodação.

O radioimunoensaio de gastrina possibilitou o conhecimento da fisiologia e patofisiologia deste hormônio<sup>50,53,64,78</sup> tornando-se uma ferramenta indispensável nos estudos relativos ao mecanismo de sua liberação, de sua biossíntese bem como da interação com seus receptores. Estes conhecimentos propiciaram, portanto, grandes esclarecimentos a respeito do funcionamento do trato gastrointestinal, sobretudo no que concerne à fisiologia do estômago, sugerindo inclusive novas terapias<sup>50</sup>. O referido radioimunoensaio proporcionou ainda, valiosa colaboração no diagnóstico e tratamento de tumores<sup>55</sup>.

Embora não empregada ainda na rotina clínica, talvez por ser um exame muito oneroso, a determinação da gastrinemia por radioimunoensaio é indicada em pacientes com úlcera duodenal, sendo especialmente importante na avaliação de pacientes com úlcera recorrente<sup>71</sup>, bem como no acompanhamento de doenças associadas à hipergastrinemia entre as quais cabe destacar a anemia perniciosa, gastrite atrófica, hiperplasia de células G, e antro retido<sup>50</sup>. Porém, a principal aplicação clínica deste radioimunoensaio, encontra-se na constatação de tumores insulares pancreáticos (síndrome de Zollinger-Ellison), em que é indispensável para o estabelecimento do diagnóstico definitivo<sup>35,43,71</sup>.

## PROPÓSITO

O presente trabalho tem por objetivo o desenvolvimento e a padronização de um radioimunoensaio sensível e específico para a determinação de gastrina visando sua aplicação em clínica médica.

Tal objetivo prende-se não só a necessidade de se ter um maior conhecimento do hormônio em questão bem como a falta, em nosso meio, de uma metodologia de referência para sua dosagem.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. EQUIPAMENTOS E MATERIAIS

#### 2.1.1. EQUIPAMENTOS

- Balança semi-analítica, Mettler, modelo P1000N, com precisão de 0,1 g, Zurique, Suíça.
- Balança analítica, Mettler, modelo H20T, com precisão de 0,01 mg, Zurique, Suíça.
- Balança analítica, Mettler, com precisão de 0,001 mg, Zurique, Suíça.
- Agitador magnético, Fanem, modelo 257, São Paulo, Brasil.
- Agitador mecânico, Clay-Adams, modelo "ciclomixer", E.U.A.
- Bomba de vácuo, Millipore, modelo XX-6000000, E.U.A.
- Coluna cromatográfica, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suécia.
- Coletor de frações automático, LKB, modelo Ultrorac 7000, Estocolmo, Suécia.
- Bomba peristáltica, LKB, modelo 4912A, Estocolmo, Suécia.
- Espectrômetro de cintilografia gama automático, Beckman, tipo poço com cristal de NaI (Tl), que será denominado "contador-gama", Califórnia, E.U.A.
- Centrífuga refrigerada automática, Sorvall, modelo Super-speed RC-2B, Connecticut, E.U.A.
- Cuba eletroforetica de acrílico, Técnica Permatron, São Paulo.
- Fonte de alta tensão, Técnica Permatron, São Paulo.
- Densitômetro, Joyce Loebel, modelo Scan 400, Londres, Inglaterra.
- Espectrofotômetro, Carl Zeiss, modelo PMQ II, Alemanha.



- Registrador gráfico, Bryans, modelo 28.000, Londres, Inglaterra.
- "Gel-slicer", Joyce LoebI, série 264, Londres, Inglaterra.
- Pipetas automáticas Eppendorf, Hamburgo, Alemanha.
- Pipetas de precisão H.E. Pedersen, Copenhagen, Dinamarca.
- Filtro millipore, Bedford, Massachussets, E.U.A.

### 2.1.2. REAGENTES E SOLUÇÕES

#### Reagentes

- Na <sup>125</sup>I em hidróxido de sódio 0,1 N, New England Nuclear , Boston, E.U.A. Atividade específica de 15 mCi/µg.
- Cloramina T, P.A. Merck, São Paulo.
- Metabissulfito de sódio, P.A. Merck, São Paulo.
- Fosfato de potássio monobásico, Merck, São Paulo.
- Fosfato de potássio bibásico, Reagen, São Paulo.
- Tris-hidroximetil-aminometano (TRIS), P.A. Merck, São Paulo.
- Iodeto de potássio, P.A. Merck, São Paulo.
- Cloreto de sódio, Merck, São Paulo.
- Gel QAE-Sephadex A-25, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suécia.
- Soro albumina bovina, fração V, Sigma Chemical Company (No. A-8022), St. Louis, E.U.A.
- N,N,N',N' Tetrametileno diamina (TEMED), P.A. Merck, São Paulo.
- Ácido clorídrico concentrado, P.A. Merck, São Paulo.
- Acrilamida 97%, Inlab, São Paulo.
- N,N'-metileno bis-acrilamida (Bis-acrilamida), P.A. Merck, São Paulo.
- Riboflavina, Roche, São Paulo.

- Sacarose cristais, P.A. Merck, São Paulo
- Glicina, P.A. Merck, São Paulo.
- Azul de bromofenol, Merck, São Paulo.
- Fosfato de sódio monobásico, Merck, São Paulo.
- Fosfato de sódio bibásico, Merck, São Paulo.
- Ácido tricloroacético, J.T. Baker, São Paulo.
- Hidróxido de sódio, Merck, São Paulo.
- 5,5 Dietil barbiturato de sódio, P.A. Merck, São Paulo.
- Timerosal, Queel, São Paulo.
- Soro albumina humana, Santa Catarina, Rio de Janeiro.
- Carvão ativado Fro-Analysi, Merck, São Paulo.
- Carvão ativado Reinst, Merck, São Paulo.
- Carvão ativado, Sigma Chemical Company (No.C-5260), St. Louis, E.U.A.
- Dextran T 70, Sigma Chemical Company, St. Louis, E.U.A.
- Heparina, Roche, São Paulo.

### Soluções

- Tampão fosfato potássio 0,05 M pH 7,4
 

Fosfato de potássio monobásico .....	1,30 g
Fosfato de potássio bibásico .....	6,90 g
Água destilada .....q.s.p. ..	1.000 ml
- TRIS 0,05 M
 

Tris .....	6,05 g
Água destilada .....q.s.p.....	1 ml
- TRIS 0,1 M NaCl 0,5 M pH 7,0 ou 8,6
 

Tris .....	12,11 g
Cloreto de sódio .....	29,00 g
Água destilada ..... q.s.p. ...	1.000 ml

## - TRIS 0,1 M NaCl 1,0 M pH 8,6

Tris .....	12,11 g
Cloreto de sódio .....	58,00 g
Água destilada .....	q.s.p..... 1.000 ml

## - Solução A pH 8,9

Tris .....	36,60 g
TEMED .....	0,23 ml
Ácido clorídrico 1 N .....	48,00 ml
Água destilada .....	q.s.p..... 100 ml

## - Solução C

Acrilamida .....	28,80 g
Bis-acrilamida .....	0,74 g
Água destilada .....	q.s.p..... 100 ml

## - Solução E

Riboflavina .....	4,00 g
Água destilada .....	q.s.p..... 100 ml

## - Solução F

Sacarose .....	40,00 g
Água destilada .....	q.s.p..... 100 ml

## - Tampão estoque - TRIS-glicina 0,4 M pH 8,3

Tris .....	6,00 g
Glicina .....	28,80 g
Água destilada .....	q.s.p..... 100 ml

## - Tampão fosfato de sódio 0,5 M pH 7,4

Fosfato de sódio monobásico hidratado .....	8,97 g
Fosfato de sódio bibásico .....	157,97 g
Água destilada .....	q.s.p..... 1.000 ml

Diluir este tampão 1:10 para obter o Tampão fosfato de sódio 0,05 M pH 7,4

- Azul de bromofenol

Azul de bromofenol .....	1,00	mg
Água destilada .....	q.s.p....	1.000 ml

- TCA a 10%

TCA .....	10,00	g
Água destilada .....	q.s.p....	100 ml

- Hidróxido de sódio 2 N

Hidróxido de sódio .....	8,00	g
Água destilada .....	q.s.p....	100 ml

- Tampão Veronal 0,05 M pH 8,0

5,5 Dietil barbiturato de sódio .....	10,30	g
Ácido clorídrico 5 N .....	4,00	ml
Timerosal .....	0,10	g
Água destilada .....	q.s.p....	1.000 ml

- Tampão fosfo-salina pH 7,4

Fosfato de sódio monobásico hidratado .....	0,15	g
Fosfato de sódio bibásico hidratado .....	0,77	g
Cloreto de sódio .....	0,30	g
Água destilada .....	q.s.p....	100 ml

### 2.1.3. MATERIAIS BIOLÓGICOS

- Gastrina empregada para radioiodação:

G-17 não sulfatada, obtida do Research Plus Laboratories, Denville, E.U.A.

- Gastrina padrão:

G-17 não-sulfatada, proveniente do Medical Research Council (68/439), Londres, Inglaterra e obtida do Dr. S.R. Bloom, Londres, Inglaterra

- Anticorpo:

Anticorpo 1611, reagente com a porção C-terminal da gastrina. Foi produzido em coelhos e fornecido pelo Dr. J.H. Walsh da Universidade da Califórnia, Los Angeles, E.U.A. Este anticorpo reage com todas as formas moleculares do hormônio e apresenta fraca reação cruzada com os peptídeos da colecistoquinina<sup>36</sup>.

- Plasma humano, proveniente do Banco de Sangue do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

- Gastrina marcada proveniente do conjunto diagnóstico comercial Baxter Travenol Diagnostics, Inc., Cambridge, E.U.A.

## 2.2. PREPARO DO TRAÇADOR

### 2.2.1. TÉCNICA DE IODAÇÃO

Foram realizadas seis radioiodações, observando-se as devidas precauções na manipulação de material radioativo. A gastrina foi iodada de acordo com o método clássico da Cloramina T modificado por RUSSELL e cols.<sup>65</sup>, empregando-se <sup>125</sup>I na forma de iodeto de sódio, livre de carregador e agentes redutores.

A um tubo de ensaio de 12 x 75 mm com fundo cônico que continha 50 µl de tampão fosfato de potássio 0,05M, pH 7,4 adicionaram-se sucessivamente:

- a) 1  $\mu\text{Ci}$  de  $^{125}\text{I}$
- b) gastrina para radioiodação: 40  $\mu\text{l}$  da solução de concentração de 500  $\mu\text{g/ml}$
- c) Cloramina T: 10  $\mu\text{l}$  da solução de concentração de 4  $\text{mg/ml}$
- d) metabissulfito de sódio: 20  $\mu\text{l}$  da solução de concentração de 2  $\text{mg/ml}$
- e) tampão TRIS 0,05M: 200  $\mu\text{l}$
- f) iodeto de potássio: 50  $\mu\text{l}$  da solução de concentração de 10  $\text{mg/ml}$
- g) tampão TRIS 0,1M NaCl 0,5M pH 8,6, contendo 1% de SAB: 1 ml

Os reagentes dos itens b, c, d e f foram diluídos em tampão fosfato de potássio 0,05M, pH 7,4. As soluções foram adicionadas em seguida sob agitação constante. O tempo transcorrido entre a adição do agente oxidante (Cloramina T) e o agente redutor (metabissulfito de sódio) foi de 10 segundos.

A seguir, procedeu-se à purificação da mistura de reação a fim de se remover o  $^{125}\text{I}$  e outros componentes que não a gastrina- $^{125}\text{I}$  pura.

### 2.2.2. PURIFICAÇÃO DO HORMÔNIO RADIOIODADO

O hormônio radioiodado foi purificado por cromatografia de troca aniônica em coluna de QAE-Sephadex A-25 de acordo com o método descrito por RUSSEL e cols.<sup>65</sup>.

O gel (15 g) foi previamente entumescido com tampão TRIS 0,1M NaCl 0,5M pH 7,0 durante 2 horas, à temperatura de 100°C. Em seguida, foi deixado esfriar até atingir a temperatura ambiente, aspirado o tampão

e adicionado o mesmo tampão, porém com pH 8,6. Ele foi então empacotado em coluna de vidro refrigerada a 4°C, de dimensões de 1,5 x 26 cm.

A coluna foi previamente saturada com tampão de equilíbrio (TRIS 0,1M NaCl 0,5M pH 8,6, contendo 1% de SAB). Amostras deste tampão, antes e após terem sido eluídas da coluna, foram submetidas à leitura de absorvância a 280 nm a fim de se verificar a saturação da coluna.

A amostra, após ter sido aplicada na coluna, foi eluída com o mesmo tampão, porém com concentração maior de NaCl (1,0M).

Para prevenir a desnaturação da molécula protéica pela temperatura, a purificação foi realizada em sistema refrigerado a 4°C, com a ajuda de coletor automático refrigerado e bomba peristáltica, mantendo-se o fluxo de 12 ml/h e recolhendo-se frações de 2 ml cada.

Aliquotas de 10 µl de cada fração tiveram sua radioatividade determinada em contador gama, com eficiência aproximada de 80%. Foi construído então o cromatograma da gastrina-<sup>125</sup>I, registrando-se a radioatividade (expressa em cpm) no eixo das ordenadas e o número da fração coletada no eixo das abscissas.

Procedeu-se a seguir a identificação dos picos radioativos principais revelados no cromatograma, verificando-se sua imunoreatividade de pela incubação rápida com excesso de anti-soro (diluição final de 1:8.000) bem como sua pureza pela análise em EGPA e pela precipitação com TCA, conforme descrito no item 2.2.3.

### 2.2.3. ANÁLISE DA QUALIDADE DA GASTRINA A SER RADIOIODADA E DA EFICIÊNCIA DAS TÉCNICAS DE IODAÇÃO E PURIFICAÇÃO

A análise pela EGPA de alíquotas de gastrina não radioiodada, da gastrina obtida após a radioiodação e das frações referentes aos pi-

cos radioativos principais do cromatograma, permitiu confirmar a qualidade do hormônio frio bem como a eficiência das técnicas de iodação e purificação.

2.2.3.1. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (ELETROFORESE ANALÍTICA)

A EGPA foi desenvolvida de acordo com o método de DAVIS<sup>15</sup> modificado no que diz respeito à substituição do persulfato de amônio pela riboflavina no preparo da solução E.

Para o preparo da solução de polimerização do gel de poliacrilamida a 7% empregaram-se as soluções A, C e E previamente descritas no item 2.1.2., nas seguintes proporções:

- 1 ml solução A
- 2 ml solução C
- 1 ml solução E
- 4 ml água destilada

Utilizaram-se tubos de vidro de 4 mm de diâmetro interno por 110 mm de comprimento, vedando-se uma das extremidades com membrana adesiva do tipo "Parafilm". Os tubos foram dispostos em estante apropriada de forma a serem mantidos na posição vertical.

A solução de polimerização foi transferida para os tubos, mantendo-se uma altura uniforme em todos eles. Para evitar formação de menisco no gel e permitir a obtenção de bandas perfeitamente horizontais na separação eletroforética, pipetou-se cerca de 200 µl de água destilada na extremidade superior dos géis.

A seguir, os tubos foram expostos à fonte de luz fluorescente durante 45 minutos a 4°C para permitir a polimerização do



gel. Após este tempo, a água foi retirada e as amostras foram colocadas na extremidade superior do gel com ajuda de micropipetas automáticas. O volume final da amostra foi sempre igualado, completando-se com tampão fosfato de sódio 0,05M pH 7,4 até um volume máximo de 200  $\mu$ l.

A fim de aumentar a densidade da amostra, adicionaram-se cerca de 50  $\mu$ l de solução F, evitando assim sua mistura com o tampão de corrida antes do início da eletroforese, bem como 10  $\mu$ l da solução de azul de bromofenol. A amostra resultante foi então homogeneizada por inversões repetidas do tubo de vidro.

O tampão estoque TRIS-glicina, diluído até 0,04M imediatamente antes de seu uso, foi empregado como tampão de corrida da eletroforese. Para tanto, os tubos foram posicionados verticalmente na cuba eletroforética, completando-se o volume acima da amostra em cada tubo com o tampão de corrida. Preencheram-se então os reservatórios da cuba com este mesmo tampão e aplicou-se uma corrente elétrica de 2 mA por gel, sendo a eletroforese realizada a 4°C. A corrida eletroforética foi interrompida quando a banda do azul de bromofenol chegou até cerca de 1 cm da extremidade inferior do gel.

Após a eletroforese, os géis foram retirados dos tubos de vidro, empregando-se seringa plástica com agulha de aço inoxidável com injeção de água contínua, de modo a desprender toda a superfície do gel do tubo de vidro.

Os géis não-radioativos foram lidos diretamente no densitômetro na região ultravioleta, com feixe de luz no intervalo de 220 a 310 nm. Acoplado ao densitômetro encontra-se um registrador que descreve o perfil de absorvância por comprimento de gel. A velocidade do papel foi estabelecida em 1 mm/s e a diferença de potencial que determina a sensibilidade do registrador foi de 2,5 mV.

Os géis contendo amostras radioativas foram cortados em fragmentos de 3 mm com a ajuda do "gel-slicer". Cada segmento foi envolto em papel alumínio e colocado em tubo de contador para a determinação de sua radioatividade. Os perfis eletroforéticos foram traçados em escala linear sendo calculada a radioatividade de cada pico em relação à radioatividade total do gel.

Em todos os géis, o cálculo do valor da migração relativa ( $R_m$ ) dos diferentes componentes foi realizado em relação à migração do azul de bromofenol.

Os valores de  $R_m$  no gel da gastrina- $^{125}\text{I}$  e do  $^{125}\text{I}$  livre foram submetidos ao teste t de Student<sup>8</sup> a fim de comprovar a significância da diferença existente entre ambos.

#### 2.2.3.2. PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS PELO TCA

Aliquotas da gastrina obtida após radioiodação e das frações referentes aos principais picos radioativos do cromatograma, foram submetidos ao teste de precipitação de proteínas pelo TCA a 5%<sup>76</sup>.

A radioatividade dessas amostras (1 ml) foi determinada antes de serem precipitadas, considerando-se este valor como sendo a radioatividade total das mesmas. A seguir, adicionou-se a cada amostra 1 ml de TCA a 10% gelado, resultando portanto uma solução final de TCA a 5%. As amostras foram então homogeneizadas e centrifugadas a 2.500 rpm durante 5 minutos, obtendo-se assim um precipitado com volume de 0,1 ml. O sobrenadante foi aspirado com a ajuda de bomba de vácuo e logo depois foram adicionados 0,9 ml de solução de NaOH 2N que dissolveu o precipitado mediante agitação.

Finalmente, as amostras foram levadas novamente ao contador, estimando-se a radioatividade das proteínas precipitadas.

Calculou-se então a porcentagem média de precipitação dessas proteínas, visto este teste ser realizado sempre em triplicata.

Com o intuito de confirmar a semelhança dos valores de eficiência das técnicas de iodação e purificação, quando determinados pela EGPA ou pela precipitação com TCA, eles foram submetidos ao teste t de Student<sup>8</sup>, examinando-se a significância das diferenças encontradas.

### 2.2.3.3. TESTE DE IMUNORREATIVIDADE

A incubação das frações mais significativas dos perfis cromatográficos com excesso de anti-soro (1:8.000) foi realizada em tampão Veronal 0,05M pH 8,0 contendo 0,25% de SAH (tampão de ensaio), fornecendo o valor referente à ligação específica das mesmas.

Neste ensaio foram pipetados 0,6 ml de tampão de ensaio, 0,1 ml de gastrina-<sup>125</sup>I e 0,1 ml de anti-soro perfazendo um volume total de 0,8 ml. Para cada fração foi determinado também o valor do "branco" ou seja, o valor referente à ligação inespecífica (ligação na ausência de anti-soro). Este valor foi subtraído da correspondente ligação específica de cada fração. Nestes tubos, o volume de tampão foi maior (0,7 ml) mantendo-se assim o volume final. Este teste foi sempre realizado em duplicata.

Após incubação de 18 horas, a gastrina livre foi separada daquela ligada ao anticorpo pela sua adsorção ao carvão recoberto com dextran na concentração de 25 mg/tubo (vide ítem 2.3.5.).

As frações que apresentaram elevada ligação específica com o anti-soro em excesso, baixa ligação inespecífica e maior porcentagem de pureza quando analisadas pela EGPA e precipitação com TCA, foram misturadas e estocadas em tampão fosfo-salina pH 7,4 contendo 1%

de SAH a  $-20^{\circ}\text{C}$ , sendo utilizadas como traçadores nos radioimunoensaios.

### 2.3. DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS PARA O RADIOIMUNOENSAIO

#### 2.3.1. OBTENÇÃO DO PLASMA ISENTO DE GASTRINA: PLASMA LIVRE<sup>1</sup>

O plasma isento de gastrina foi obtido incubando-se aproximadamente 1 l de uma mistura de plasmas, armazenados a  $4^{\circ}\text{C}$  por mais de 3 meses, com carvão ativado Merck-Reinst a 5%. Cada incubação foi feita durante 1 hora sob agitação constante a  $4^{\circ}\text{C}$ , período após o qual o plasma foi centrifugado a 3.000 rpm durante 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , sendo desprezado o precipitado e centrifugado novamente o sobrenadante nas mesmas condições descritas, porém por um período de 1 hora.

Este procedimento foi repetido 4 vezes e finalmente o plasma resultante foi filtrado várias vezes em millipore (tamanho de poro de 800 nm) com ajuda de bomba de vácuo até obter um plasma de cor quase amarela e desprovido de carvão. O plasma livre assim obtido, foi dividido em frascos de aproximadamente 20 ml e estocado em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  até seu uso nos ensaios.

Este método de preparo de plasma livre pela adsorção da gastrina livre ao carvão, foi comparado ao método do congelamento e descongelamento diários durante 30 dias.

#### 2.3.2. PREPARO DA CURVA PADRÃO

A cada frasco da gastrina padrão contendo 1 pmol foi adicionado 1 ml de tampão de ensaio, obtendo-se assim uma concentração final de 1.000 fmol/1.000  $\mu\text{l}$ .

Com ajuda de pipetas de boa precisão, foram pipetados volumes

crescentes desta solução (de zero a 100  $\mu$ l) diretamente nos tubos de ensaio contendo 0,2 ml de plasma isento de gastrina. Obteve-se desta forma os seguintes pontos da curva padrão: 5, 10, 25, 35, 50, 75, 100, 125, 250 e 500 pmol/l.

### 2.3.3. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE SORO OU PLASMA A SEREM DOSADAS

Para a determinação da gastrinemia, as amostras sanguíneas foram obtidas dos diferentes indivíduos investigados, após jejum de uma noite. Estas amostras foram colhidas em tubos heparinizados (10 unidades/ml) ou não, sendo colocadas no gelo até retrair o coágulo e centrifugadas a 3.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. O plasma ou soro assim obtidos eram estocados a -20°C para posterior dosagem.

### 2.3.4. DETERMINAÇÃO DA ÓTIMA DILUIÇÃO DO ANTI-SORO

A ótima diluição do anti-soro a ser empregada no ensaio foi determinada para cada traçador.

Para este fim, incubaram-se durante 4 dias a 4°C, 0,6 ml de tampão de ensaio, 0,1 ml da gastrina-<sup>125</sup>I contendo aproximadamente 3.000 cpm e 0,1 ml de anti-soro em diversas diluições (de 1:1.000 a 1:150.000), perfazendo um volume total de incubação de 0,8 ml. Como sempre, foram incubados alguns tubos com ausência de anticorpo, com o intuito de determinar a ligação inespecífica do ensaio. O ensaio foi realizado em triplicata.

Após período de incubação, o hormônio livre foi separado do ligado ao anticorpo pela adição de 0,5 ml de uma suspensão de carvão Merck Pro-Analysi na concentração de 25 mg/tubo.

Foi escolhida como sendo a ótima diluição do anti-soro, a-

quela que nas condições acima referidas forneceu uma ligação de 50% com o traçador.

### 2.3.5. MÉTODO DE SEPARAÇÃO DO ENSAIO: DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO IDEAL DE CARVÃO

O método de separação escolhido neste radioimunoensaio foi o da adsorção do hormônio livre ao carvão, vistas suas propriedades adsorptivas em relação a substâncias de reduzido peso molecular<sup>30,51</sup>.

Com o intuito de padronizar qual o carvão entre os disponíveis em nosso meio, bem como qual a concentração que produziria melhor separação do complexo ligado e do hormônio livre, nos ensaios realizados em plasma, foram examinados tres carvões ativados de diferentes procedências (Sigma, Merck-Reinst e Merck Pro-Analysi). Estes carvões foram empregados nas concentrações de 1 a 40 mg/tubo, contendo 10% de dextran e 8,4% de plasma humano de Banco de Sangue, armazenado por quase um ano a -4°C.

Neste teste, os ensaios foram realizados incubando a gastrina-<sup>125</sup>I com excesso de anti-soro, com anti-soro na diluição do ensaio e sem anti-soro (branco). Após período de incubação, em cada tubo foram pipetados 0,5 ml da suspensão dos referidos componentes em tampão ensaio, preparado sem albumina sérica humana, já que esta seria substituída por aquela contida no plasma que recobre o carvão.

Este mesmo teste foi também repetido, a fim de se determinar qual a melhor concentração de carvão a ser empregada na separação de ensaios realizados em tampão. Na ocasião, já havia sido escolhido o carvão a ser empregado na separação de ensaios realizados em plasma. Foram examinadas portanto somente as diferentes concentrações do carvão escolhido. As quantidades de carvão e dextran por tubo foram as mes-

mas, aumentando a concentração de plasma para 16%, visto que neste ensaio não havia nenhuma outra fonte de albumina.

Uma vez escolhida a concentração ideal de carvão, a separação do ensaio foi realizada da seguinte forma:

- a) adicionaram-se à mistura de incubação 0,5 ml da suspensão de carvão, sendo seguida de centrifugação a 2.500 rpm, durante 20 minutos, a 4°C.
- b) aspiraram-se os sobrenadantes por meio de sucção com pipeta Pasteur e determinou-se a radioatividade das frações ligadas e livres, presentes respectivamente nos sobrenadantes e precipitados.

#### 2.4. RADIOIMUNOENSAIO DE GASTRINA

##### 2.4.1. SEQUÊNCIA OPERACIONAL

Este radioimunoensaio foi desenvolvido de acordo com o procedimento descrito por RUSSELL e cols.<sup>65</sup>. Assim sendo, os ensaios foram realizados pela incubação durante 4 dias, a 4°C, de uma mistura de reação contendo tampão de ensaio, gastrina padrão na concentração de zero a 500 pmol/l preparada em plasma isento de gastrina ou igual volume das amostras com teor de gastrina desconhecido, gastrina-<sup>125</sup>I contendo aproximadamente 3.000 cpm e anti-soro na diluição apropriada, conforme indicado na Tabela 2.

A maioria dos pontos da curva padrão foi ensaiada em triplicata enquanto que as amostras sanguíneas foram ensaiadas em duplicata.

Após este período, procedeu-se à separação da gastrina livre daquela ligada ao anticorpo conforme já descrito no item 2.3.5. deste capítulo.

Tabela 2 - Protocolo do ensaio de gastrina.

Tubo (Nº)	Amostra	Tampão ( $\mu$ l)	Plasma		G- <sup>125</sup> I ( $\mu$ l)	Anti-soro ( $\mu$ l)
			Livre ou Amostra ( $\mu$ l)	Padrão ( $\mu$ l)		
1-4	Branco	500	200	-	100	-
5-6	1/2 X	450	200	-	50	100
7-10	zero	400	200	-	100	100
11-13	5 pmol/l	400	200	1	100	100
14-16	10 pmol/l	400	200	2	100	100
17-19	25 pmol/l	400	200	5	100	100
20-22	35 pmol/l	400	200	7	100	100
23-25	50 pmol/l	400	200	10	100	100
26-28	75 pmol/l	400	200	15	100	100
29-30	100 pmol/l	400	200	20	100	100
31-32	125 pmol/l	400	200	25	100	100
33-34	250 pmol/l	350	200	50	100	100
35-36	500 pmol/l	300	200	100	100	100
37-40	zero	400	200	-	100	100
41-42	amostra A	400	200	-	100	100
.	.	.	.	.	.	.
.	.	.	.	.	.	.
.	.	.	.	.	.	.



No ensaio foi determinado também o valor do "branco" ou seja, o valor referente à ligação inespecífica. Os tubos de concentração zero da gastrina padrão, ensaiados em quadruplicata, eram colocados no início e no fim da curva padrão, perfazendo um número total de replicatas igual a 8. Em ensaios de grande número de amostras desconhecidas, estes tubos eram intercalados também entre os diferentes grupos de amostras, permitindo verificar alguma possível mudança na imunorreatividade do traçador<sup>13</sup>.

Os tubos com metade do número de contagens (1/2X) permitiram a determinação do número de contagens a ser utilizadas nos ensaios sucessivos sem alterar a ligação do ponto zero.

Nos ensaios que apresentaram um número de tubos superior a 100, foram realizadas duas curvas padrão colocadas no início e no fim respectivamente, com o intuito de permitir a determinação das dosagens com maior precisão, sendo que a concentração de gastrina de metade das amostras desconhecidas foi lida na primeira curva e a outra metade na segunda.

O anti-soro e o traçador foram diluídos no próprio tampão de ensaio. Quando foi necessário diluir as amostras a serem dosadas, esta diluição foi feita empregando-se como diluente o plasma livre.

#### 2.4.2. DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DAS AMOSTRAS

Após separação do ensaio pelo carvão e determinação da radioatividade dos tubos, calculou-se a porcentagem de ligação da gastrina-<sup>125</sup>I ao seu anticorpo específico (contagens do sobrenadante) em relação à radioatividade total (contagens do precipitado somadas às contagens do sobrenadante). Estes valores de ligação foram corrigidos pela subtração da ligação inespecífica.

Colocando-se no eixo das ordenadas a porcentagem de ligação e no das abcissas as concentrações correspondentes de hormônio padrão, obtivemos os pontos que permitiram construir a curva padrão. A concentração hormonal das amostras desconhecidas foi determinada pela leitura direta nesta curva padrão.

## 2.5. AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DO TRAÇADOR

### 2.5.1. ESTABILIDADE

Com o traçador obtido em uma das diferentes radioiodações, realizaram-se estudos da sua estabilidade em função do tempo de estocagem a  $-20^{\circ}\text{C}$  decorridos 15, 30, 60 e 90 dias após a radioiodação. Avaliou-se sua pureza pela EGPA a 7% e sua adequação para ser empregado nos ensaios. Analizaram-se para tanto, parâmetros relativos ao radioimunoensaio, entre os quais cabe destacar as porcentagens de ligação inespecífica e específica, bem como a dose média efetiva, aquela que produz uma queda de 50% da ligação máxima ( $\text{ED}_{50}$ ) e a sensibilidade.

### 2.5.2. ATIVIDADE ESPECÍFICA

A atividade específica de cada traçador foi determinada pelo método do autodeslocamento<sup>48</sup>, incubando-se concomitantemente a uma curva padrão, quantidades crescentes de gastrina- $^{125}\text{I}$  (de 0,2 a 0,6 ml contendo respectivamente 6.000, 9.000, 12.000, 15.000 e 18.000 cpm) com quantidade constante de anticorpo (0,1 ml) e sem adição de gastrina padrão. A leitura da massa de gastrina contida nestes tubos de maior radioatividade foi feita também na curva padrão.

A partir da massa de gastrina determinada e do número de contagens obtido nos diferentes tubos, calculou-se a massa média de gas-

trina contida em aproximadamente 3.000 cpm.

Sendo conhecida a eficiência do contador gama empregado, estas cpm foram transformadas em dpm e finalmente em atividade ( $\mu\text{Ci}$ ).

Relacionando-se a atividade presente no tubo com a massa previamente determinada, pôde-se obter finalmente a atividade específica do traçador, expressa em  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ .

### 2.5.3. COMPARAÇÃO DO TRAÇADOR IPEN COM O TRAÇADOR COMERCIAL

A gastrina- $^{125}\text{I}$  obtida na última radioiodação foi comparada com aquela fornecida em conjuntos diagnósticos comerciais. Ambas foram submetidas à análise de pureza pela EGPA e empregadas como traçadores na realização de ensaios comparativos. Calculou-se a correlação linear entre as concentrações de amostras controle determinadas com um ou outro traçador a fim de confirmar o paralelismo de ambos os ensaios.

Quando foi realizado este teste, haviam transcorrido 75 e 45 dias respectivamente, desde o preparo do traçador IPEN e do comercial.

## 2.6. CONTROLE DE QUALIDADE

As características operacionais do radioimunoensaio de gastrina foram avaliadas através da análise dos seguintes parâmetros: especificidade, exatidão, precisão e sensibilidade.

### 2.6.1. ESPECIFICIDADE

Para verificação da identidade entre o hormônio presente nas amostras sanguíneas e o hormônio padrão, uma amostra com teor endógeno de gastrina elevado foi submetida ao radioimunoensaio nas seguintes diluições: 3:4, 1:2, 1:4, 1:8 e 1:20. Esta amostra, de gastrinemia previa

mente determinada (170 pmol/l), se refere a uma mistura de soros e plasma procedentes de dois indivíduos portadores de insuficiência renal crônica e de um indivíduo com anemia perniciosa.

As diluições foram realizadas em plasma isento de gastrina e para cada diluição foram ensaiadas dez replicatas.

A diluição dos soros foi feita de acordo com o descrito na Tabela 3. Foi calculada a média dos 10 resultados obtidos para cada diluição e seu desvio padrão, bem como as concentrações obtidas a partir do produto de cada média pelo fator de diluição respectivo.

Calculou-se também a correlação linear entre os volumes de amostra e as concentrações médias obtidas, e examinou-se a significância do coeficiente de correlação obtido.

#### 2.6.2. EXATIDÃO

Realizou-se o teste da recuperação da gastrina adicionada em quantidades crescentes a uma mistura de soros de indivíduos normais com concentração previamente determinada (17,5 pmol/l), conforme indicado na Tabela 4. Este teste foi realizado em decuplicata.

A recuperação dos diferentes tubos foi determinada pela diferença entre o valor médio determinado a partir da curva padrão e o valor teórico (obtido pela soma da concentração de gastrina já presente no soro e da gastrina padrão adicionada). Calculou-se também a recuperação percentual média para cada amostra e seu desvio padrão.

Determinou-se o coeficiente de correlação entre os valores teóricos e os obtidos e examinou-se sua significância.

Tabela 3 - Preparo das diluições referentes ao teste de especificidade do método.

Volume de amostra ( $\mu$ l)	Volume de plasma livre ( $\mu$ l)	Diluição
150	50	3:4
100	100	1:2
50	150	1:4
25	175	1:8
10	190	1:20

Tabela 4 - Concentrações de gastrina adicionadas a uma amostra de gastrinemia conhecida (17,50 pmol/l).

Gastrina adicionada	
( $\mu$ l)	(pmol/l)
1	5
2	10
5	25
7	35
10	50
15	75
20	100
25	125

### 2.6.3. PRECISÃO

Este parâmetro foi estimado pela reprodutibilidade intra e inter-ensaio do método.

A reprodutibilidade intra-ensaio foi avaliada pela dosagem num mesmo ensaio de um número elevado de replicatas ( $n = 25$ ) de três amostras com teor de gastrina elevado (80,40 pmol/l) médio (25,76 pmol/l) e baixo (5,72 pmol/l). Calculou-se a concentração média e o desvio padrão para cada nível bem como seu respectivo coeficiente de variação.

A reprodutibilidade inter-ensaio foi avaliada pela dosagem de amostras com gastrinemia semelhante às empregadas no estudo da reprodutibilidade intra-ensaio. Estas amostras foram dosadas em duplicata em 12 ensaios diferentes, realizados com cinco traçadores distintos. Outras amostras com teores de gastrina similares a estas foram dosadas em duplicata em 5 ensaios diferentes, realizados com o mesmo traçador proveniente da última radioiodação.

O valor médio para cada nível foi calculado bem como seu desvio padrão, permitindo a determinação do coeficiente de variação.

### 2.6.4. SENSIBILIDADE

Este parâmetro, avaliado em cada ensaio pela dose mínima detectável (DMD), foi determinado por dois métodos, sendo o primeiro aquele descrito por ROBBARD<sup>62</sup>, onde a DMD é a menor quantidade de antígeno que adicionada ao sistema produz uma inibição estatisticamente significativa da ligação do tubo "zero". O segundo método, citado por ALBUQUERQUE<sup>2</sup>, define a DMD como sendo a concentração correspondente a uma queda de 10% da ligação do tubo "zero" dividida por 5.

Calculou-se a correlação linear entre os valores de DMD calculados por ambos os métodos.

## 2.7. APLICAÇÃO CLÍNICA

### 2.7.1. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GASTRINA EM AMOSTRAS DE SORO OU PLASMA

Foram comparados valores da gastrina quando determinada em soro ou plasma, sendo ensaiadas concomitantemente amostras de ambos os tipos, provenientes de 23 indivíduos normais de ambos os sexos e de idade variável (Anexo 1).

Foram calculados os valores de média  $\pm$  erro padrão da média ( $\bar{X} \pm EPM$ ) bem como os valores de mediana.

Para a comparação estatística dos resultados, empregou-se teste não paramétrico de Wilcoxon<sup>67</sup> por se tratar de amostras dependentes.

### 2.7.2. DETERMINAÇÃO DA GASTRINEMIA EM INDIVÍDUOS NORMAIS E EM PORTADORES DE DIFERENTES AFECÇÕES

Foram determinados os níveis de gastrina em 124 indivíduos de ambos os sexos e de idade variável (Anexos 2-6). Esses indivíduos foram divididos em 6 grupos compreendidos por 64 normais (de 19 a 55 anos, 39 mulheres e 25 homens), 27 chagásicos com megaesôfago (de 21 a 60 anos, 11 mulheres e 16 homens), 13 portadores de insuficiência renal crônica (de 19 a 70 anos, 10 mulheres e 3 homens), 5 homens com anemia perniciososa (de 45 a 78 anos), 14 gastrectomizados (de 21 a 70 anos, 4 mulheres e 10 homens) e 1 homem portador de síndrome de Zollinger-Ellison (19 anos).

Foram calculados os valores de média  $\pm$  erro padrão da média ( $\bar{X} \pm EPM$ ) bem como os valores de mediana.

Foi utilizado o teste U de Mann-Whitney<sup>67</sup> para comparar os níveis de gastrinemia entre os diferentes grupos.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. PREPARO DO TRAÇADOR

##### 3.1.1. ANÁLISE QUALITATIVA DA GASTRINA A SER RADIOIODADA

A Figura 3 apresenta o eletroforetograma da gastrina não-radioiodada quando submetida a EGPA, mostrando a presença de um único componente com valor de  $R_m$  de 0,848.

##### 3.1.2. RADIOIODAÇÃO

A gastrina, quando submetida à EGPA imediatamente após sua radioiodação, permitiu a obtenção de eletroforetogramas característicos, conforme indicado na Figura 4. Nesta figura são observados dois picos radioativos correspondentes à gastrina- $^{125}\text{I}$  e ao  $^{125}\text{I}$  livre. Os valores de  $R_m$  desses componentes obtidos nos diferentes eletroforetogramas, bem como seus valores médios e os respectivos desvios padrão estão expressos na Tabela 5. Nesta tabela são também assinaladas as datas das diferentes radioiodações.

Como era de se esperar, o valor médio de  $R_m$  da gastrina- $^{125}\text{I}$  (1,016), é maior do que o obtido na gastrina fria (0,848). Não foi possível aplicar uma análise estatística para comparação desses resultados devido ao único valor de  $R_m$  da gastrina não-radioiodada. Este valor é também significativamente menor do que aquele apresentado pelo  $^{125}\text{I}$  livre (1,124),  $p < 0,001$ .

Os rendimentos estimados pelo cálculo do valor porcentual do pico da gastrina- $^{125}\text{I}$  com relação à radioatividade total no gel, forneceram valores que não diferiram significativamente daqueles determinados pela precipitação com TCA ( $p < 0,001$ ). O valor médio e respectivo desvio



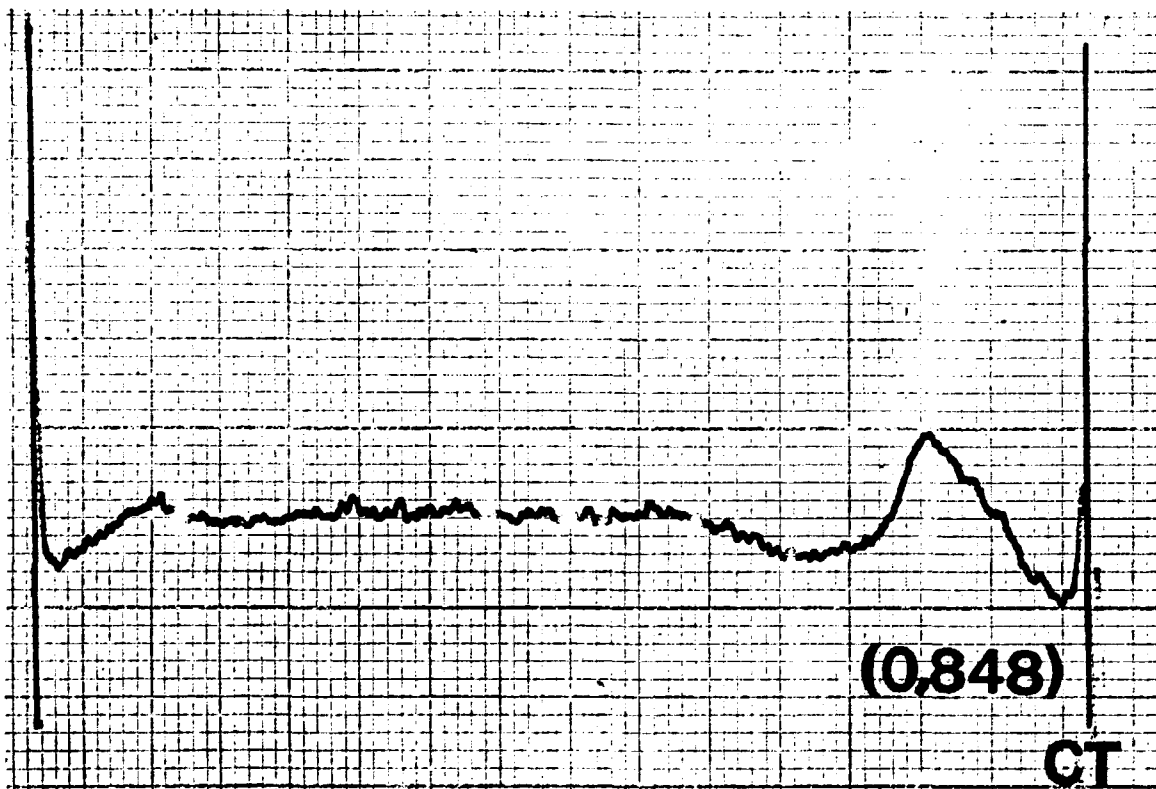


Figura 3 - EGPA da gastrina não-radioativa o valor da migração relativa do componente principal é indicado em parênteses. C.T. indica a posição do corante traçador, azul de bromofenol.

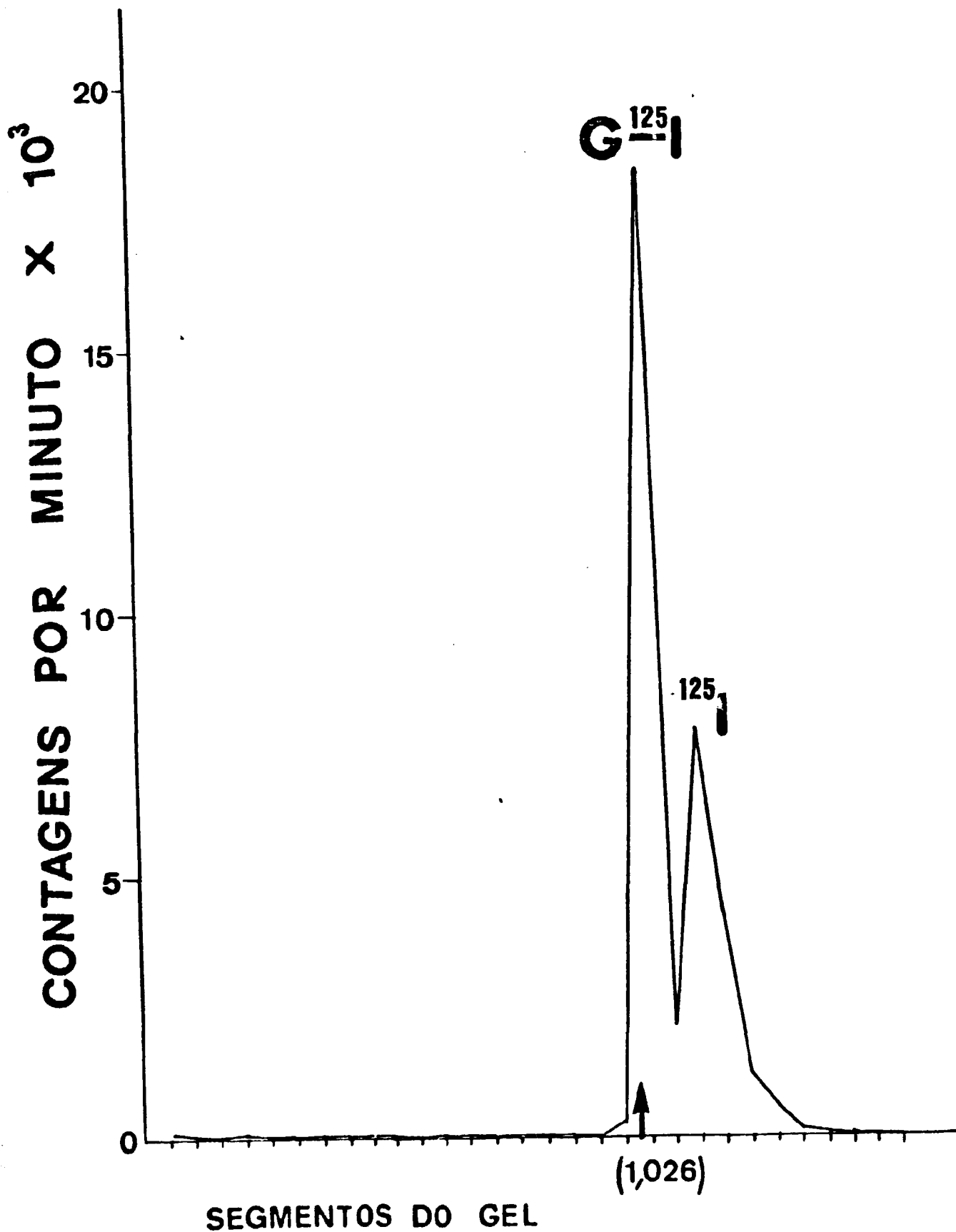


Figura 4 - Eletroforetograma típico da gastrina radioiodada não purificada, referente à 2ª radioiodação. O valor da migração relativa do componente principal é indicado entre parênteses. A seta indica a posição do corante traçador, azul de bromofenol.

Tabela 5 - Valores de Rm obtidos nas eletroforeses, em gel de poliacrilamida a 7%, da gastrina-<sup>125</sup>I e do <sup>125</sup>I livre resultantes das diferentes radioiodações.

Radioiodação (Nº)	Data	Rm	
		Gastrina- <sup>125</sup> I	<sup>125</sup> I
1	26/02/86	1,024	1,122
2	24/07/86	1,026	1,128
3	29/04/87	1,000	1,133
4	22/07/87	1,024	1,146
5	12/01/88	1,024	1,122
6	18/07/88	1,000	1,095
$\bar{X} \pm DP$		1,016 $\pm$ 0,013	1,124 $\pm$ 0,017

padrão determinados em seis radioiodações foi de  $58,09 \pm 8,35\%$  quando estimado pela EGPA e de  $52,10 \pm 9,68\%$  quando estimado pelo TCA conforme é observado na Tabela 6.

### 3.1.3. PURIFICAÇÃO DO HORMÔNIO RADIOIODADO

A Figura 5 exibe um perfil cromatográfico típico da purificação da gastrina- $^{125}\text{I}$  em QAE-Sephadex A-25. Os três picos radioativos principais observados nessa figura (I a III) foram obtidos nas seis diferentes purificações.

A Tabela 7 apresenta os resultados da imunorreatividade e pureza das frações correspondentes a esses três picos resultantes das seis radioiodações. Apenas as frações do segundo pico apresentaram valores de ligação inespecífica baixos ( $\bar{X} \pm \text{DP} = 2,40 \pm 0,35\%$ ), de ligação específica com excesso de anti-soro elevados ( $\bar{X} \pm \text{DP} = 82,93 \pm 4,93\%$ ) e precipitação pelo TCA acima de 90% ( $\bar{X} \pm \text{DP} = 94,80 \pm 3,75\%$ ); indicando serem estas as frações formadas pela gastrina- $^{125}\text{I}$  pura e imunorreativa. Estas foram misturadas e estocadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para serem empregadas como traçadores nos radioimunoensaios.

As frações referentes ao primeiro e ao terceiro pico forneceram valores de ligação inespecífica elevados ( $\bar{X} \pm \text{DP} = 49,73 \pm 9,94\%$  e  $35,04 \pm 27,23\%$ ), de ligação específica baixos ( $\bar{X} \pm \text{DP} = 3,84 \pm 1,02\%$  e  $4,07 \pm 4,42\%$ ). Com relação às porcentagens de precipitação pelo TCA, as frações do primeiro pico apresentaram um valor médio e respectivo desvio padrão significativo  $77,60 \pm 4,82\%$ , enquanto que as frações do terceiro pico apresentaram um valor médio e respectivo desvio padrão de  $16,91 \pm 4,49\%$ .

As Figuras 6, 7 e 8 mostram, respectivamente, os eletroforetogramas das frações correspondentes a esses 3 picos obtidos na purificação

Tabela 6 - Resultados comparativos dos rendimentos obtidos nas diversas radioiodações, estimados pela EGPA e pela precipitação com TCA.

Radioiodação (Nº)	% EGPA	% TCA
1	53,90	41,08
2	57,05	46,80
3	74,34	66,42
4	56,26	59,50
5	50,28	44,70
6	56,74	54,11
$\bar{X} \pm DP$	58,09 $\pm$ 8,35	52,10 $\pm$ 9,68

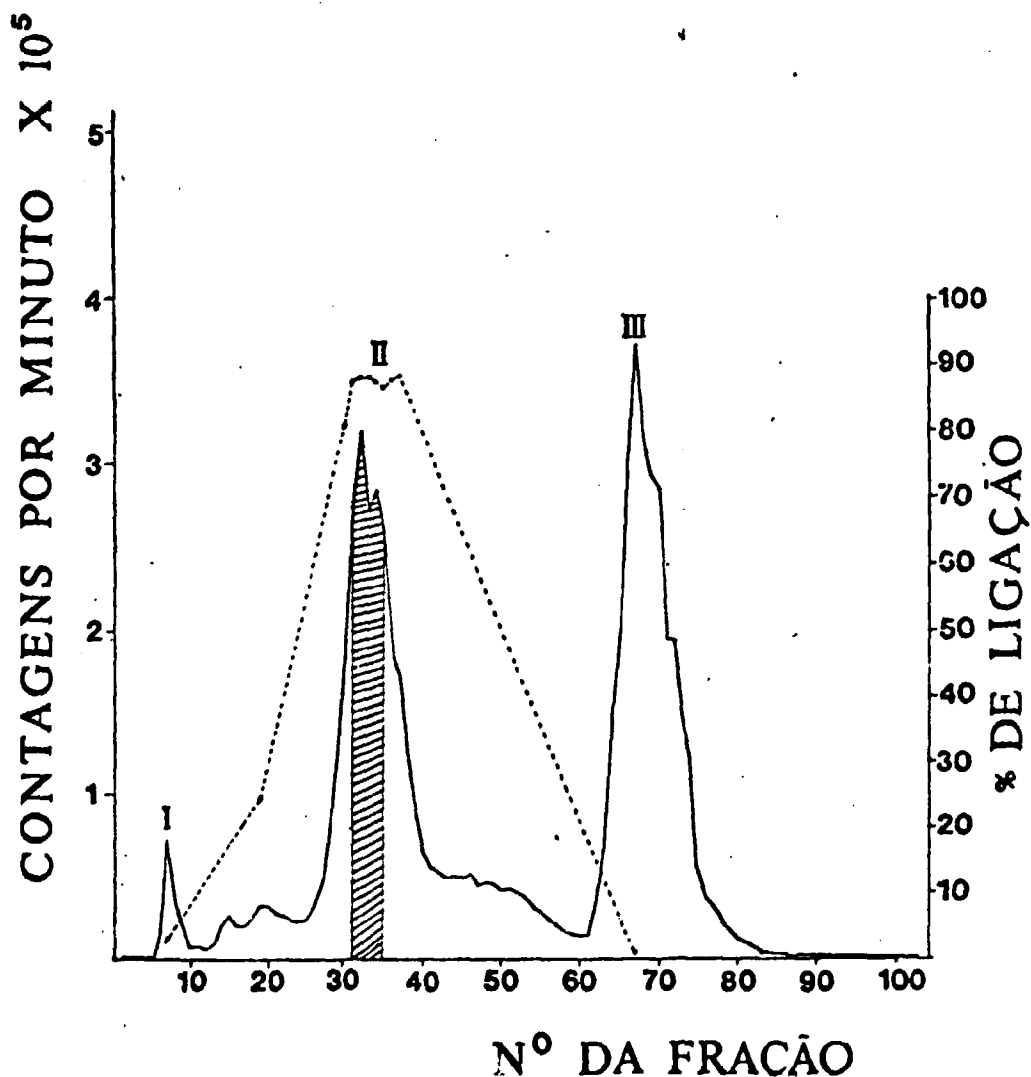


Figura 5 - Cromatograma da purificação da gastrina-<sup>125</sup>I em QAE-Sephadex A-25, referente à 2<sup>a</sup> radioiodação. A linha contínua expressa a radioatividade das frações em contagens por minuto e a linha descontínua apresenta a porcentagem de ligação da gastrina-<sup>125</sup>I ao seu anticorpo específico, empregado em excesso. A área hachurada corresponde às frações que foram misturadas e estocadas a -20°C para serem usadas como traçador nos radioimunoensaios.

Tabela 7 - Resultados dos testes da imunorreatividade (% de ligação) e pureza (% de precipitação pelo TCA) das frações correspondentes aos picos mais significativos obtidos na purificação de gastrina-<sup>125</sup>I, resultante de seis diferentes radioiodações.

Pico (Nº)	Radioio- dação (Nº)	% de Ligação		% TCA
		Inespecífica	Específica	
	1	-	-	-
	2	63,76	3,02	71,07
	3	54,84	4,40	78,95
I	4	46,21	4,85	78,42
	5	37,58	2,48	75,40
	6	46,28	4,43	84,16
	$\bar{X} \pm DP$	49,73 $\pm$ 9,94	3,84 $\pm$ 1,02	77,60 $\pm$ 4,82
	1	1,72	73,60	95,06
	2	2,36	88,16	87,58
	3	2,64	83,59	97,30
II	4	2,65	85,25	97,96
	5	2,45	84,00	96,22
	6	2,56	83,00	94,70
	$\bar{X} \pm DP$	2,40 $\pm$ 0,35	82,93 $\pm$ 4,93	94,80 $\pm$ 3,75
	1	28,41	12,95	23,05
	2	81,31	0,96	14,56
	3	39,02	2,62	15,62
III	4	44,60	5,79	12,64
	5	9,72	0,46	13,54
	6	7,20	2,32	22,05
	$\bar{X} \pm DP$	35,04 $\pm$ 27,23	4,07 $\pm$ 4,42	16,91 $\pm$ 4,49

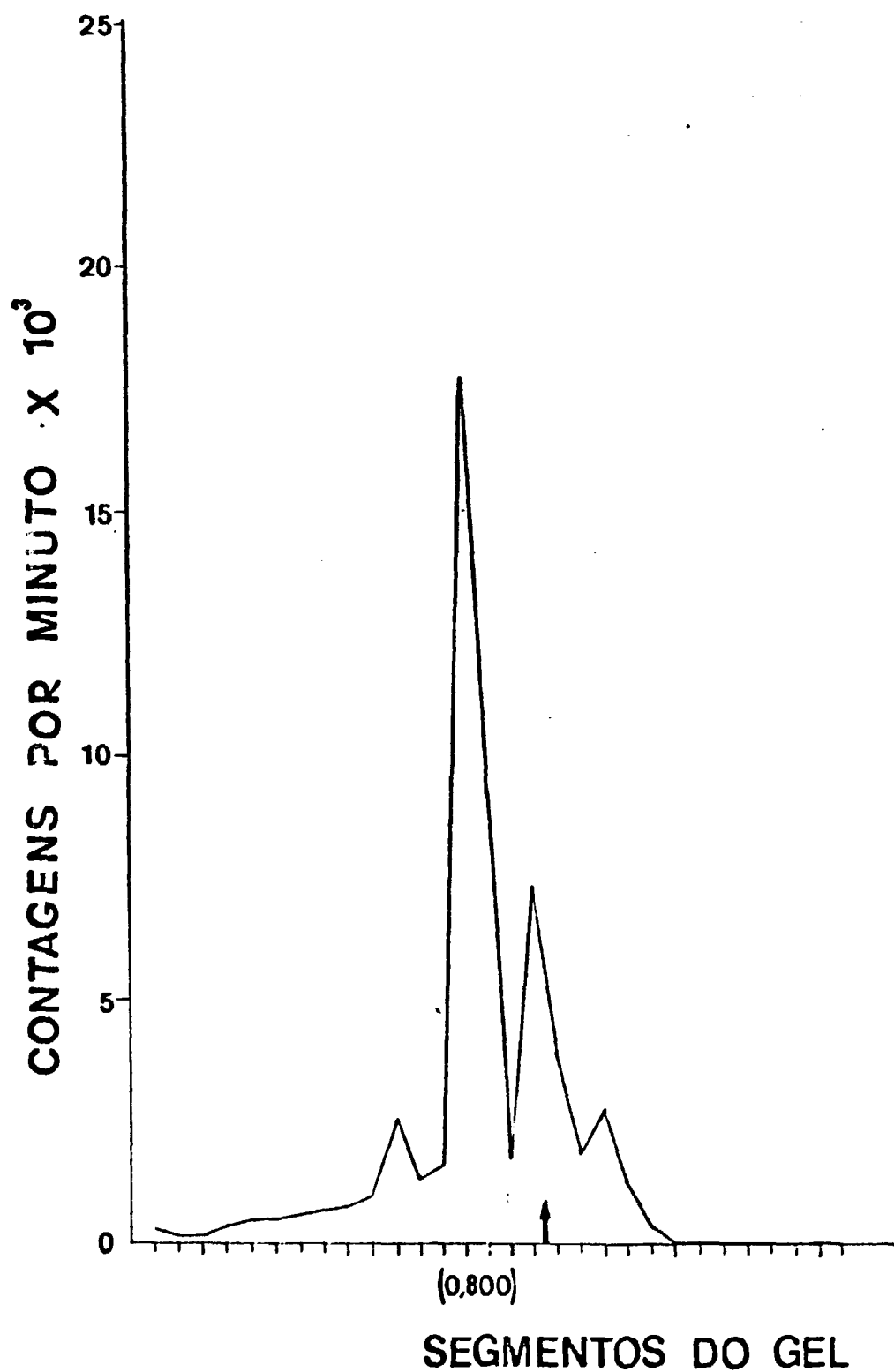
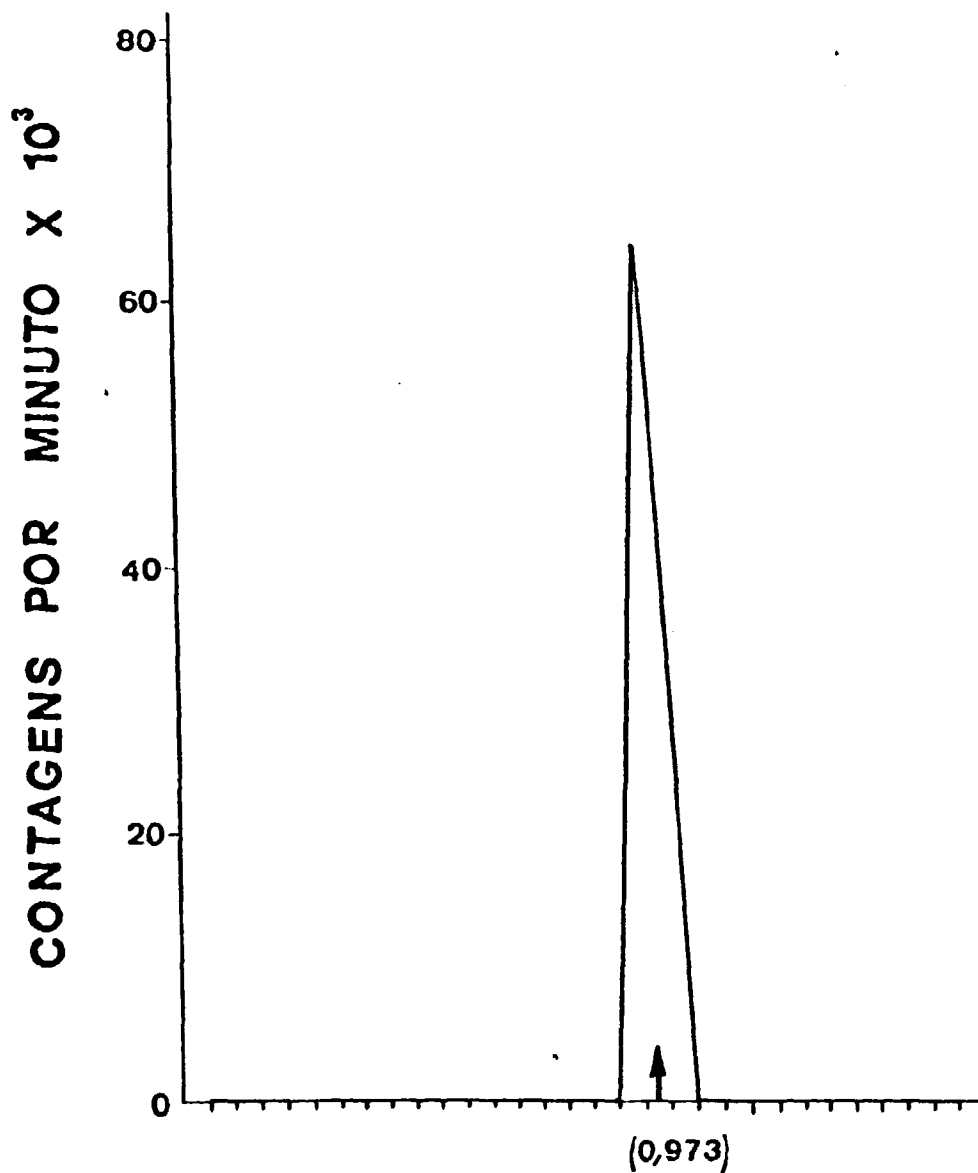


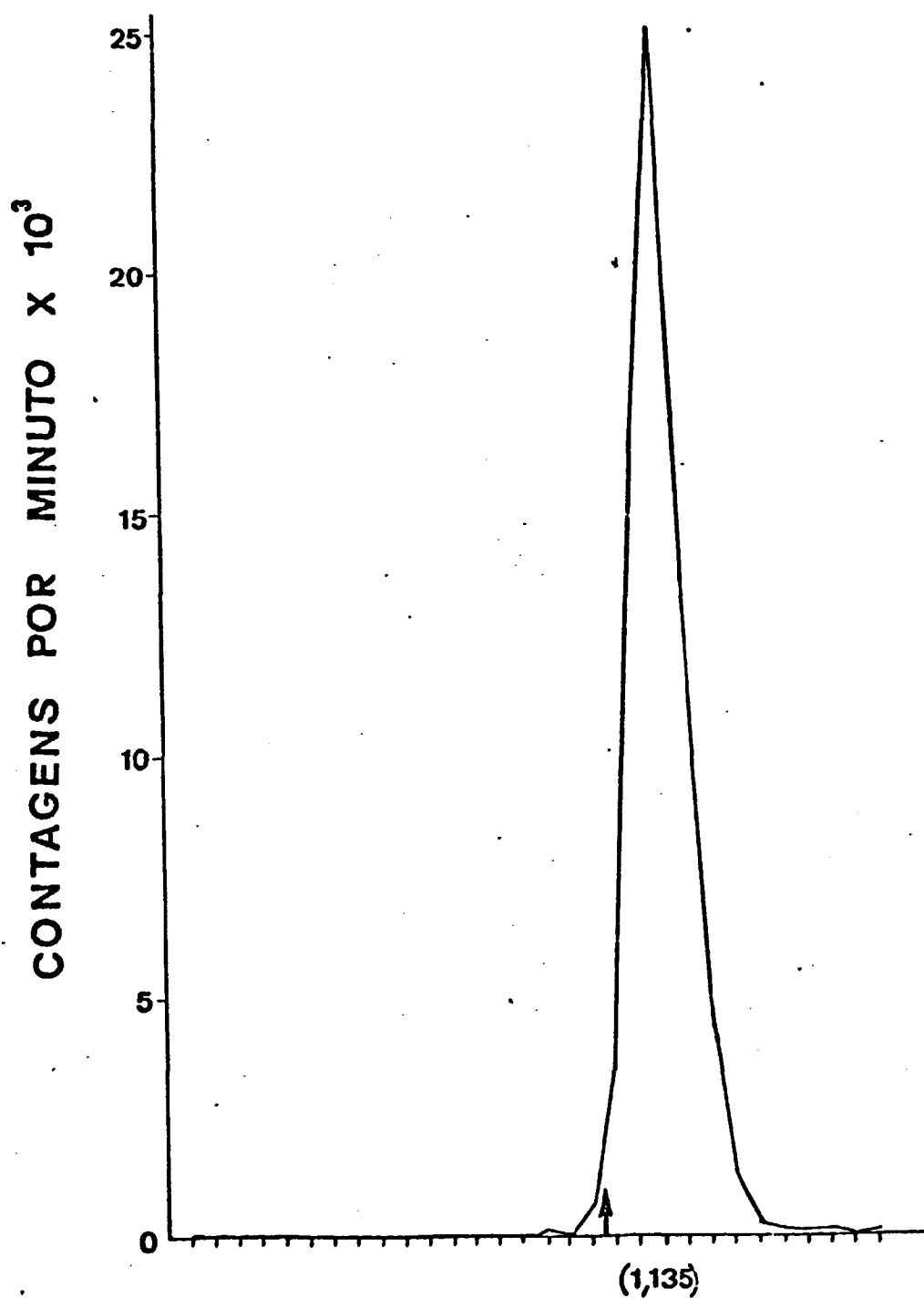
Figura 6 - Eletroforetograma da fração correspondente ao pico I obtido na purificação da gastrina-<sup>125</sup>I em QAE-Sephadex A-25. O valor da migração relativa do componente principal é indicado entre parênteses. A seta indica a posição do corante traçador, azul de bromofenol.





### SEGMENTOS DO GEL

Figura 7 - Eletroforetograma da fração correspondente ao pico II obtido na purificação da gastrina-<sup>125</sup>I em QAE-Sephadex A-25. O valor da migração relativa do componente principal é indicado entre parênteses. A seta indica a posição do corante traçador, azul de bromofenol.



### SEGMENTOS DO GEL

Figura 8 - Eletroforctograma da fração correspondente ao pico III obtido na purificação da gastrina-<sup>125</sup>I em QAE-Sephadex A-25. O valor da migração relativa do componente principal é indicado entre parênteses. A seta indica a posição do corante traçador, azul de bromofenol.

ção do hormônio marcado. O primeiro pico (Figura 6) inclui vários componentes sendo que o principal apresentou um valor de  $R_m$  médio e respectivo padrão de  $0,774 \pm 0,035$  (Tabela 8). Os outros dois picos apresentaram 1 único componente (Figuras 7 e 8) com valores médios de  $R_m$  de  $0,989 \pm 0,021$  e  $1,164 \pm 0,068$ , respectivamente (Tabela 8).

Nesta tabela são também apresentados os valores percentuais dos componentes dessas frações estimados com relação à radioatividade total no gel.

Os valores médios de pureza das frações do 2º pico, referentes a gastrina- $^{125}I$  pura e imunorreativa, não diferiram significativamente quando determinados pela precipitação com TCA ( $94,80 \pm 3,75$ ) ou pela análise em EGPA ( $97,26 \pm 1,48$ ),  $p < 0,001$ .

### 3.2. DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS PARA O RADIOIMUNOENSAIO

#### 3.2.1. OBTENÇÃO DO PLASMA ISENTO DE GASTRINA

A Figura 9 mostra a comparação do deslocamento da gastrina- $^{125}I$  pela gastrina padrão na presença de dois plasmas submetidos a diferentes tratamentos para extração da gastrina endógena (adsorção pelo carvão e congelamento e descongelamento sucessivos).

Os valores de ligação inespecífica e específica foram de 0,62 e 46,50% para o plasma tratado com carvão e de 2,17 e 26,37% para o plasma submetido a diferentes temperaturas. Os valores de  $ED_{50}$  foram de 8 e 14 pmol/l quando determinados respectivamente nas curvas padrão construídas em plasma extraído com carvão e em plasma congelado-descongelado sucessivamente. Da mesma forma, os valores respectivos de DMD, estimados pelo método descrito por Rodbard<sup>62</sup>, foram de 0,4 e 1,6 pmol/l.

Tabela 8 - Valores em Rm e de pureza dos três picos obtidos nas seis purificações quando analisados pela EGPA.

Pico (Nº)	Radioiodação (Nº)	Rm	% EGPA
I	1	-	-
	2	0,800	53,05
	3	0,733	43,94
	4	0,776	53,06
	5	0,745	57,87
	6	0,816	51,60
		$\bar{X} \pm DP$	0,774 $\pm$ 0,035
II	1	1,028	95,81
	2	0,973	98,39
	3	0,980	97,99
	4	0,978	95,94
	5	1,000	96,14
	6	0,976	99,28
		$\bar{X} \pm DP$	0,989 $\pm$ 0,021
III	1	1,238	87,81
	2	1,135	97,61
	3	1,098	98,62
	4	1,128	98,06
	5	1,262	96,04
	6	1,122	98,52
		$\bar{X} \pm DP$	1,164 $\pm$ 0,068

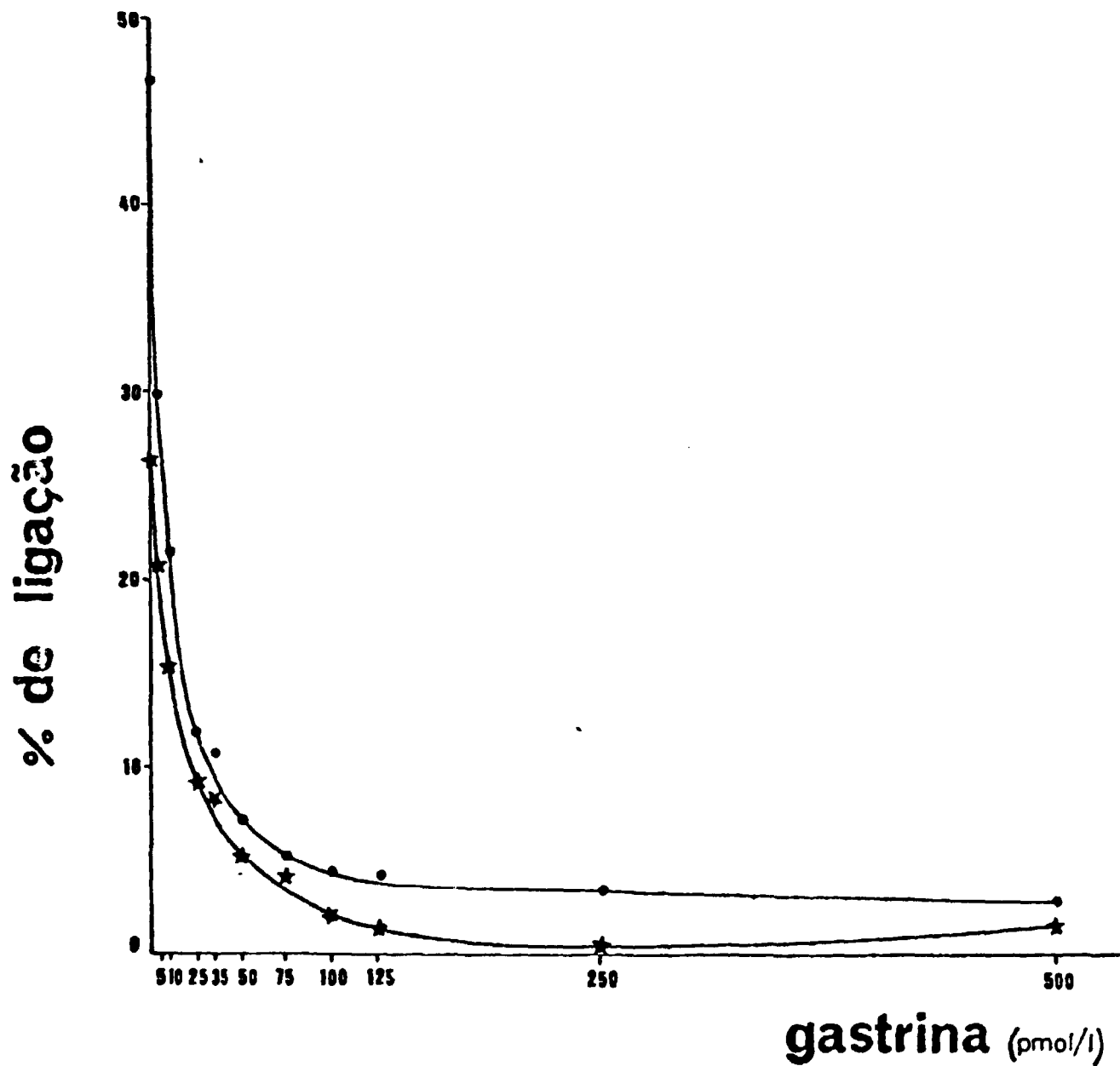


Figura 9 - Comparação de curvas padrão de radioimunoensaio realizadas em plasmas isentos de gastrina submetidos a extração com carvão (●) e ao congelamento e descongelamento sucessivos (★).

### 3.2.2. DETERMINAÇÃO DA ÓTIMA DILUIÇÃO DO ANTI-SORO

Na Figura 10 pode-se observar a determinação da ótima diluição do anti-soro a ser utilizada nos ensaios realizados com determinado traçador. Nestas condições a diluição que forneceu ligação específica de 50% com a gastrina-<sup>125</sup>I foi a de 1:22.500, fornecendo uma diluição final ou título de 1:180.000. A Tabela 9 apresenta os valores dos diferentes títulos obtidos com os seis traçadores preparados neste trabalho.

### 3.2.3. MÉTODO DE SEPARAÇÃO DO ENSAIO: DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO IDEAL DE CARVÃO

A Figura 11 mostra o efeito da concentração de carvão ativado de diferentes procedências (Sigma, Merck-Reinst e Merck Pro-Analysi) recoberto com dextran e plasma na adsorção da gastrina-<sup>125</sup>I livre.

Como pode ser observado nesta figura, os três carvões apresentaram resultados muito similares. Determinou-se para os mesmos a concentração ótima da ordem de 25 mg/tubo, concentração abaixo da qual a adsorção da gastrina-<sup>125</sup>I livre é incompleta e acima da qual a adsorção é constante. Utilizou-se nos ensaios em plasma carvão Merck Pro-Analysi, disponível em maior quantidade no laboratório.

A Figura 12 apresenta este mesmo teste para a determinação da concentração de carvão recoberto a ser empregada na separação de ensaios realizados em tampão. A concentração ideal resultou ser novamente a de 25 mg/tubo.

### 3.3. RADIOIMUNOENSAIO DE GASTRINA

Na Figura 2, pode-se observar um exemplo típico de uma curva padrão de radioimunoensaio de gastrina. No eixo das abcissas encontram-

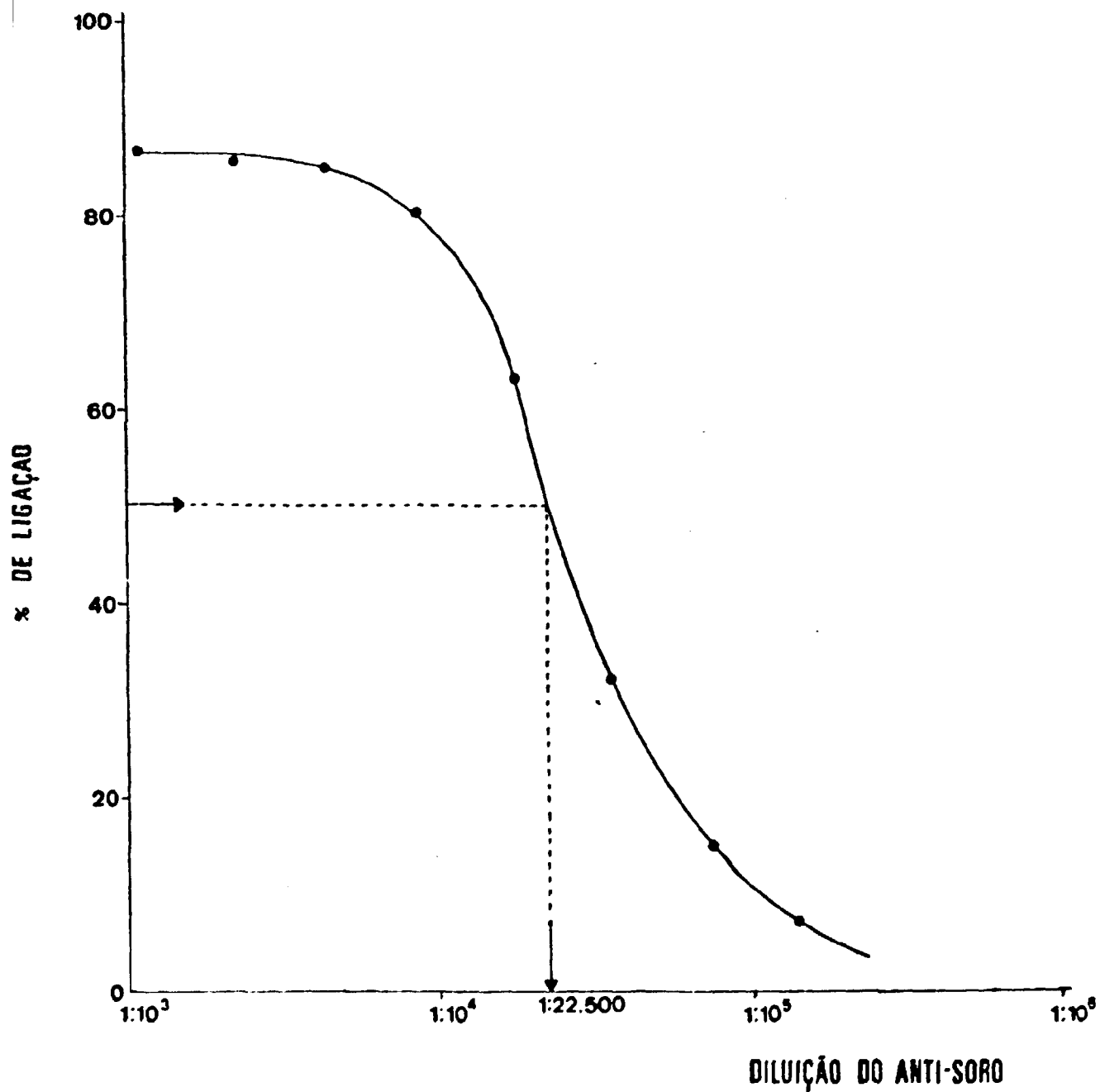


Figura 10 - Curva da determinação da diluição ótima do anti-soro realizada com o traçador proveniente da 2ª radioiodação.

Tabela 9 - Títulos de anti-soro determinados com os seis diferentes traçadores.

Traçador (Nº)	Título do Anti-soro
1	1:32.000
2	1:180.000
3	1:88.000
4	1:108.000
5	1:163.200
6	1:163.200



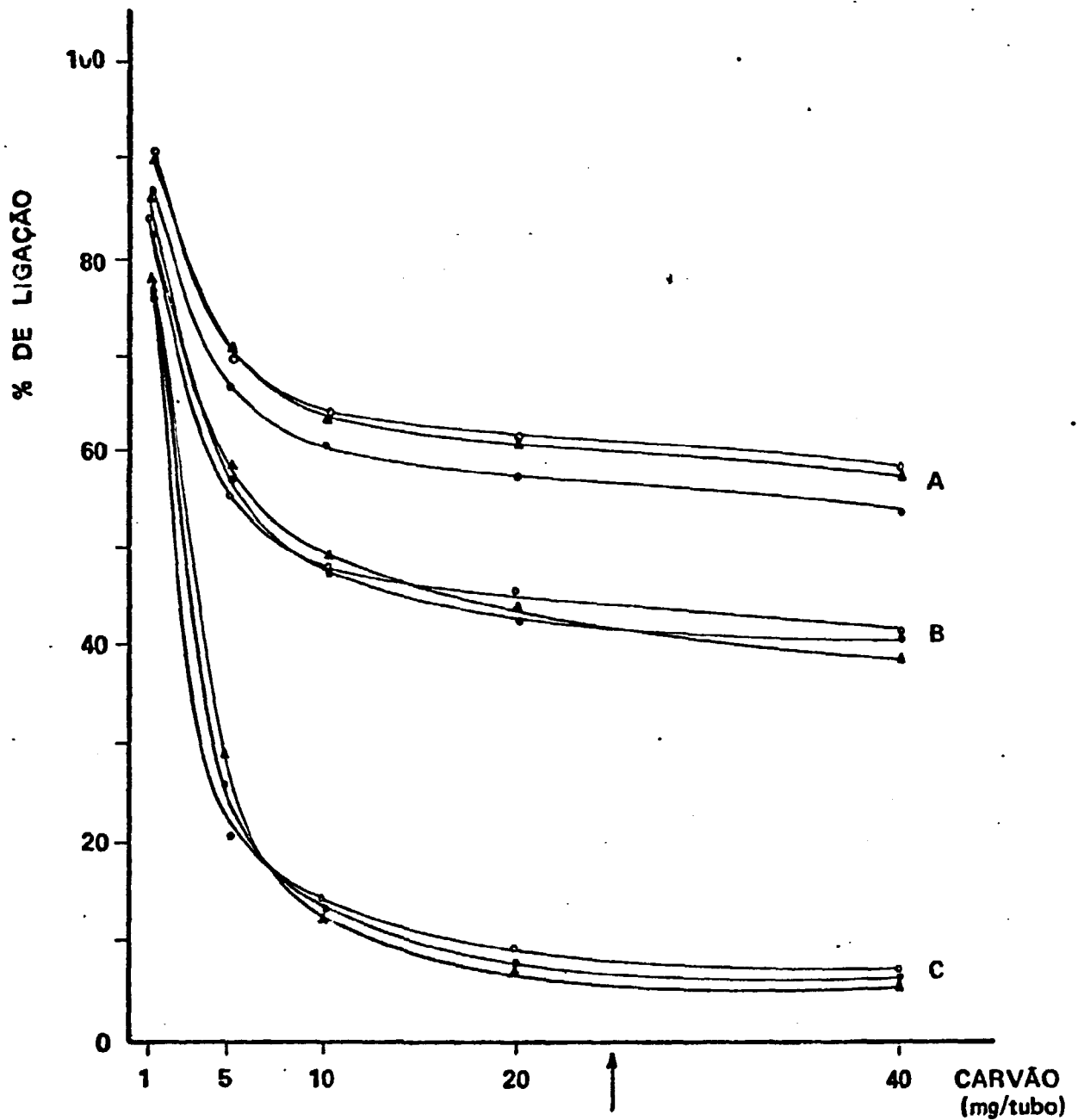


Figura 11 - Efeito da concentração do carvão recoberto, de diferentes procedências, na separação da gastrina-<sup>125</sup>I livre após incubação na presença de plasma com excesso de anti-soro (A), com anti-soro na diluição de ensaio (B) e sem anti-soro (C); indicando a porcentagem de gastrina-<sup>125</sup>I ligada nessas condições. Carvão Sigma (o), Carvão Merck-Reinst (▲) e Carvão Merck Pro-Analysi (●).

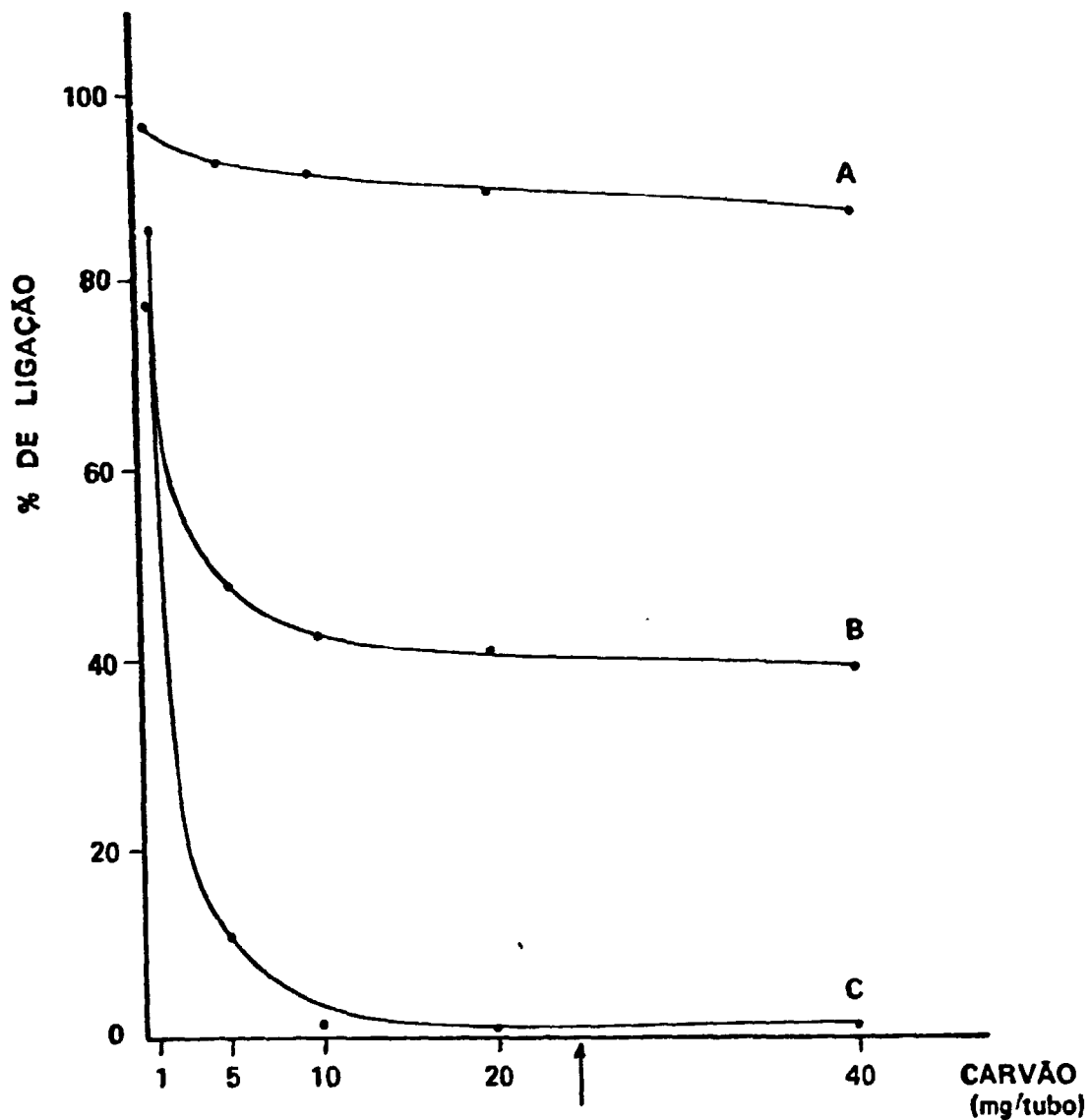


Figura 12 - Efeito das diferentes concentrações do carvão Merck Pro-Analysi recoberto, na separação da gastrina-<sup>125</sup>I livre após incubação em tampão com excesso de anti-soro (A), com anti-soro na diluição de ensaios (B) e sem anti-soro (C); indicando a porcentagem de gastrina-<sup>125</sup>I ligada nessas condições.

se as diferentes concentrações de gastrina padrão expressas em pmol/l, variando de zero a 500 pmol/l, enquanto no eixo das ordenadas encontra-se a porcentagem de ligação da gastrina- $^{125}\text{I}$  ao seu anticorpo. As curvas padrão obtidas com os diferentes traçadores têm apresentado grande sensibilidade, já que pequenos aumentos do padrão provocam grandes quedas nesta ligação.

### 3.4. AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DO TRAÇADOR

#### 3.4.1. ESTABILIDADE

A Figura 13 mostra os eletroforetogramas da gastrina- $^{125}\text{I}$  proveniente da 5.<sup>a</sup> radioiodação, quando submetida à EGPA a 7% após 15, 30, 60 e 90 dias de estocagem a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Todas as alíquotas mostraram valores de  $R_m$  bem próximos e característicos desta proteína assim como a presença de componentes únicos sem liberação significativa de  $^{125}\text{I}$  (Tabela 10).

O emprego deste traçador no decorrer desses meses de estocagem é evidenciado na Figura 14, que apresenta curvas padrão comparativas obtidas com o mesmo. Na Tabela 11 são apresentados comparativamente os valores de ligação inespecífica, específica,  $\text{ED}_{50}$  e  $\text{IMD}$  estimada pelo método descrito por Rodbard<sup>62</sup>, correspondentes a estas curvas comparativas.

#### 3.4.2. ATIVIDADE ESPECÍFICA

A Tabela 12 apresenta os resultados de atividade específica da gastrina- $^{125}\text{I}$  obtida nas seis radioiodações realizadas. Esta atividade variou de 62 a 307  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ . Considerando uma abundância isotópica de 100% para o  $^{125}\text{I}$  ( $17,2 \text{ Ci}/\text{mg}$ )<sup>23</sup> a atividade específica correspondente à substituição de 1 átomo de  $^{125}\text{I}$  por molécula de gastrina seria de

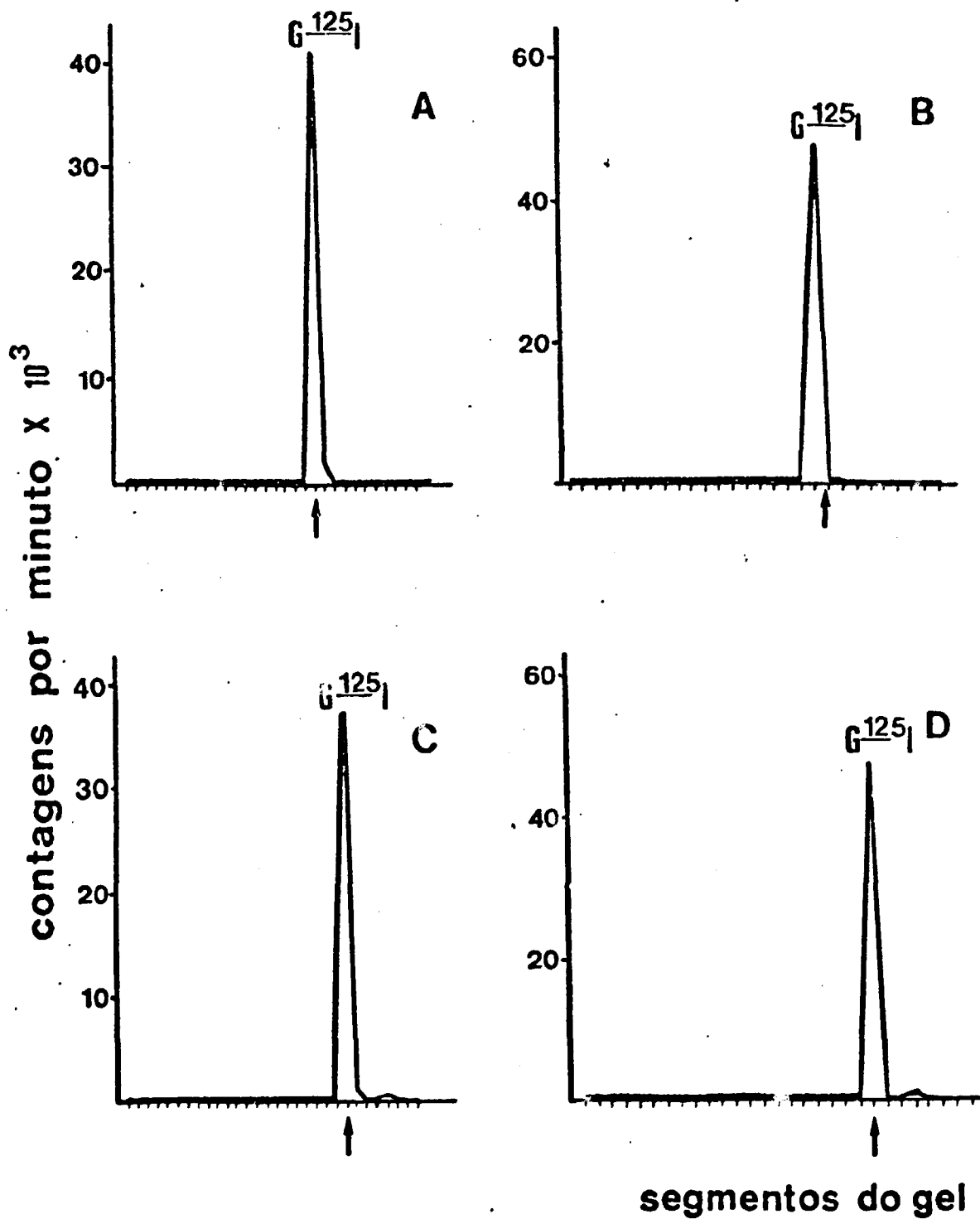


Figura 13 - Eletroforetogramas obtidos com o traçador após 15 (A), 30 (B), 60 (C) e 90 dias (D) de estocagem a  $-20^{\circ}\text{C}$ . As setas indicam a posição do corante traçador, azul de bromofenol.

Tabela 10 - Valores de Rm e de pureza do traçador após 15, 30, 60 e 90 dias de estocagem a -20°C.

Tempo de Estocagem (dias)	Rm	% EGPA
15	1,000	96,14
30	1,000	95,19
60	0,974	96,03
90	1,000	94,52

Tabela 11 - Parâmetros relativos às curvas padrão obtidas com o traçador após 15,30,60 e 90 dias de estocagem a -20°C.

Tempo de estocagem (dias)	% Ligação inespecífica	% Ligação específica	ED <sub>50</sub> (pmol/l)	DMD (pmol/l)
15	1,46	51,21	33	0,70
30	2,30	52,49	24	0,45
60	1,49	50,67	29	0,41
90	1,73	50,21	30	0,66

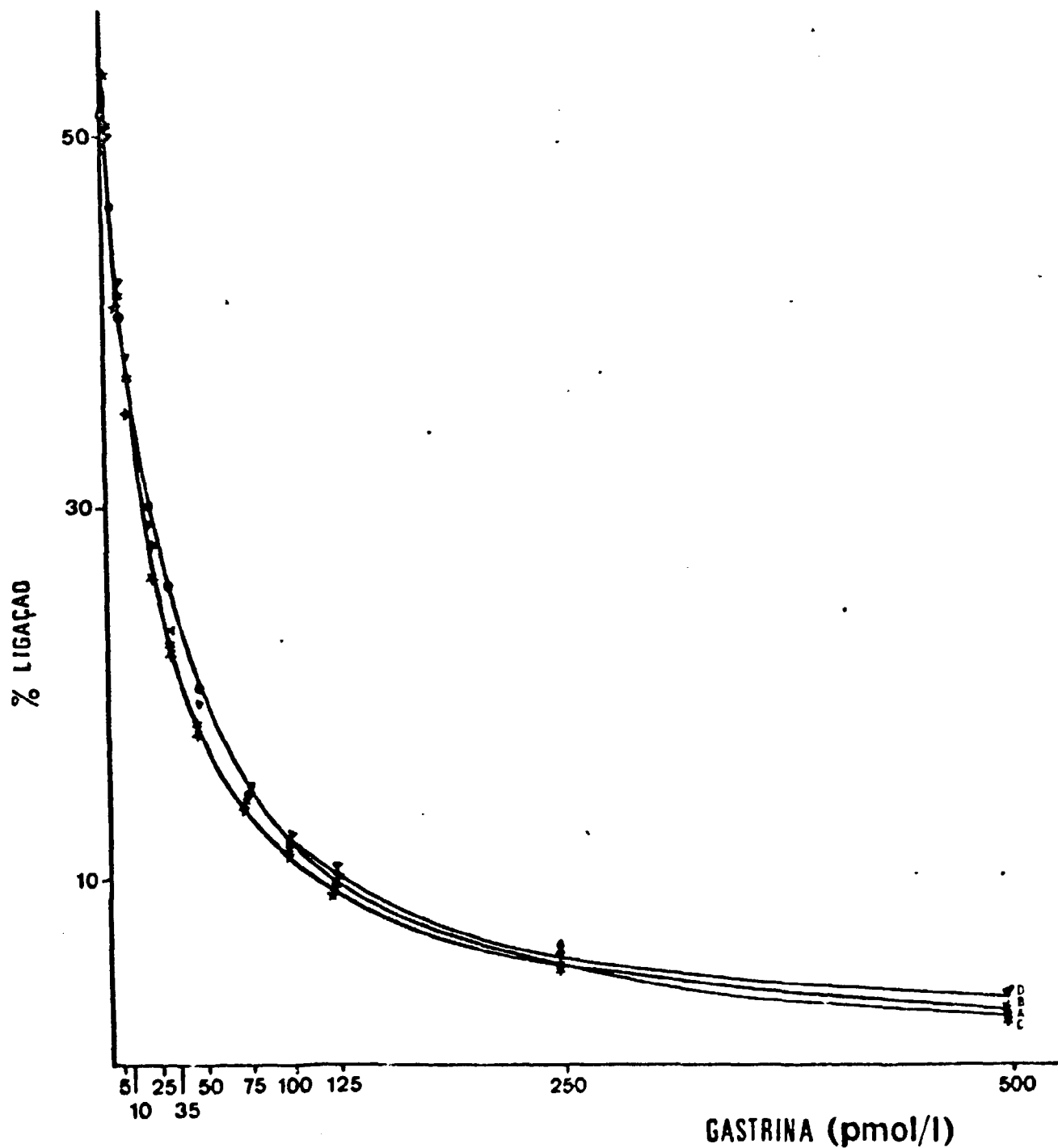


Figura 14 - Curvas padrão obtidas com a gastrina-<sup>125</sup>I decorridos 15 (A), 30 (B), 60 (C) e 90 dias (D) após seu preparo. A (●—●), B (\*—\*), C (\*—\*) e D (▲—▲).

Tabela 12 - Valores de atividade específica dos seis traçadores preparados.

Traçador (Nº)	Atividade específica ( $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ )
1	62
2	307
3	70
4	178
5	252
6	127

1025  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ . Como a atividade do  $^{125}\text{I}$  empregado nas radioiodações foi de 15 Ci/mg, seria esperada uma atividade específica de 894  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$  para a gastrina na sua forma monoiodada. Entretanto, os traçadores obtidos no presente estudo apresentaram atividade específica variando de 62 a 307  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ , correspondendo a uma substituição de 0,07 até 0,30 átomos de  $^{125}\text{I}$  por molécula de gastrina.

### 3.4.3. COMPARAÇÃO DO TRAÇADOR IPEN COM O TRAÇADOR COMERCIAL

O traçador IPEN preparado neste estudo apresentou porcentual de pureza mais elevado do que o traçador importado quando submetidos à EGPA, conforme pode ser observado nos valores apresentados na Tabela 13 e nos eletroforetogramas correspondentes (Figura 15), nos quais evidenciaram-se valores de  $R_m$  característicos da gastrina- $^{125}\text{I}$ . Nos eletroforetogramas pode-se observar apenas um componente principal com pequena liberação de  $^{125}\text{I}$ , que correspondeu a 5,78 a 23,74% de  $^{125}\text{I}$  livre para os traçadores IPEN e comercial, respectivamente.

Concluindo este estudo comparativo, a Figura 16 apresenta as curvas obtidas quando realizados concomitantemente ensaios com ambos os traçadores. Os valores relativos à ligação inespecífica, específica,  $\text{ED}_{50}$  e sensibilidade destas curvas são apresentados na Tabela 14. As concentrações de diferentes amostras controle determinadas em ambos os ensaios estão expressas na Tabela 15. Como pode ser observado, os valores são bem semelhantes quando empregado um ou outro traçador, apresentando um coeficiente de correlação linear de 0,9842, significativo para  $p < 0,001$  (Figura 17).



**Tabela 13 - Valores comparativos da pureza e Rm dos traçadores  
(IPEN é comercial) quando submetidos a EGPA e precipitação pelo TCA.**

<b>Traçador</b>	<b>Rm</b>	<b>% EGPA</b>	<b>% TCA</b>
<b>IPEN</b>	<b>0,984</b>	<b>85,00</b>	<b>96,23</b>
<b>Comercial</b>	<b>1,000</b>	<b>65,80</b>	<b>75,38</b>

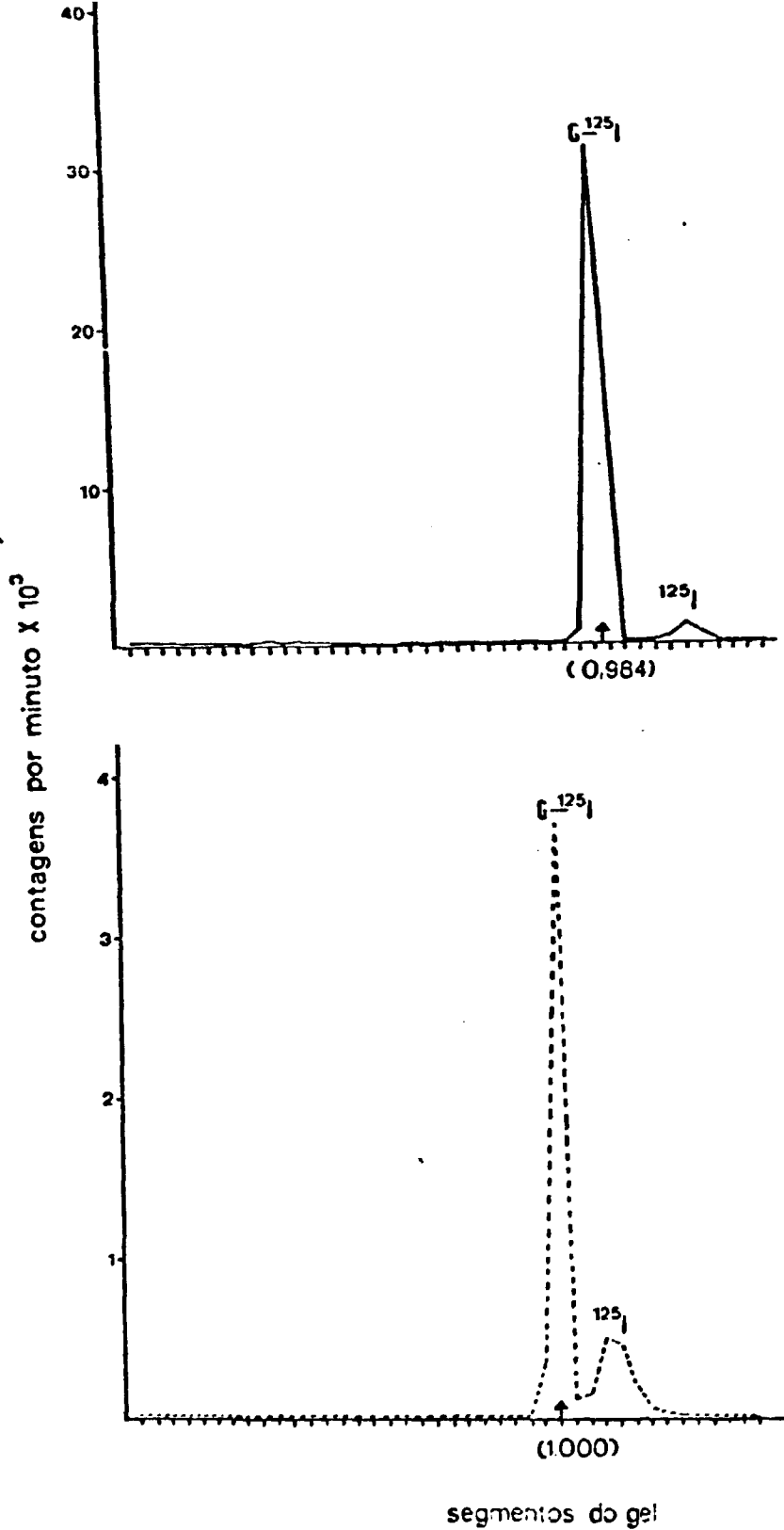


Figura 15 - Eletroforetogramas obtidos com os traçadores IPEN (—) e comercial (-----). O valor da migração relativa do componente principal é indicado entre parênteses. A seta indica a posição do corante, azul de bromofenol.

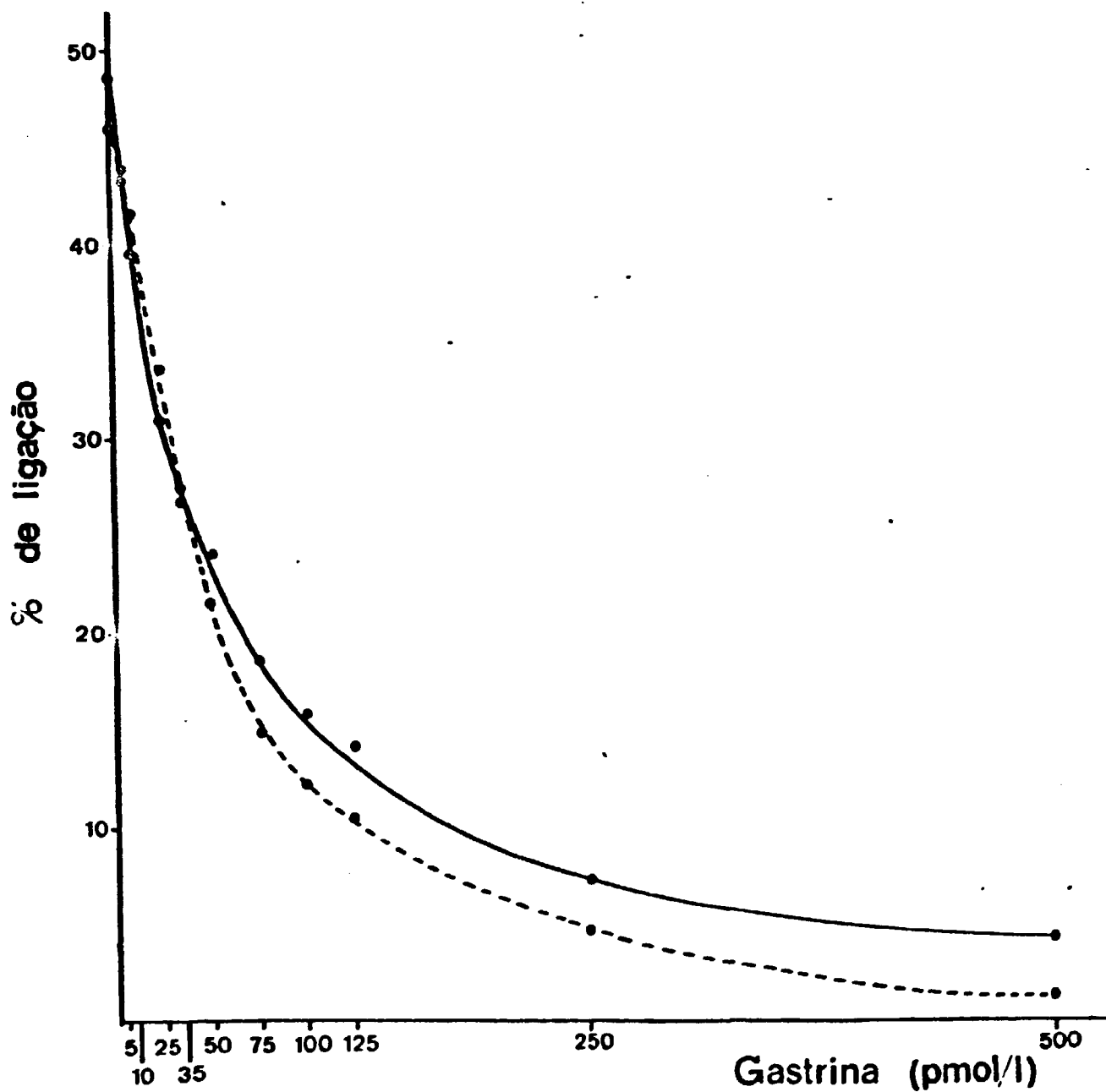


Figura 16 - Curvas padrão obtidas com os traçadores IPEX (—) e comercial (---).

Tabela 14 - Parâmetros relativos às curvas padrão obtidas com o traçador IPEN e o comercial.

Traçador	% Ligação inespecífica	% Ligação específica	ED <sub>50</sub> (pmol/l)	DMD (pmol/l)
IPEN	1,40	48,60	45	0,99
Comercial	7,30	45,90	40	0,80

Tabela 15 - Valores comparativos da concentração de gastrina (pmol/l) de amostras controle quando dosadas em curvas obtidas com o traçador IPEN e com o comercial.

Amostras controle (Nº)	Traçador IPEN	Traçador Comercial
1	7	11
2	16	19
3	19	26
4	40	45
5	48	49
6	75	75
7	100	125

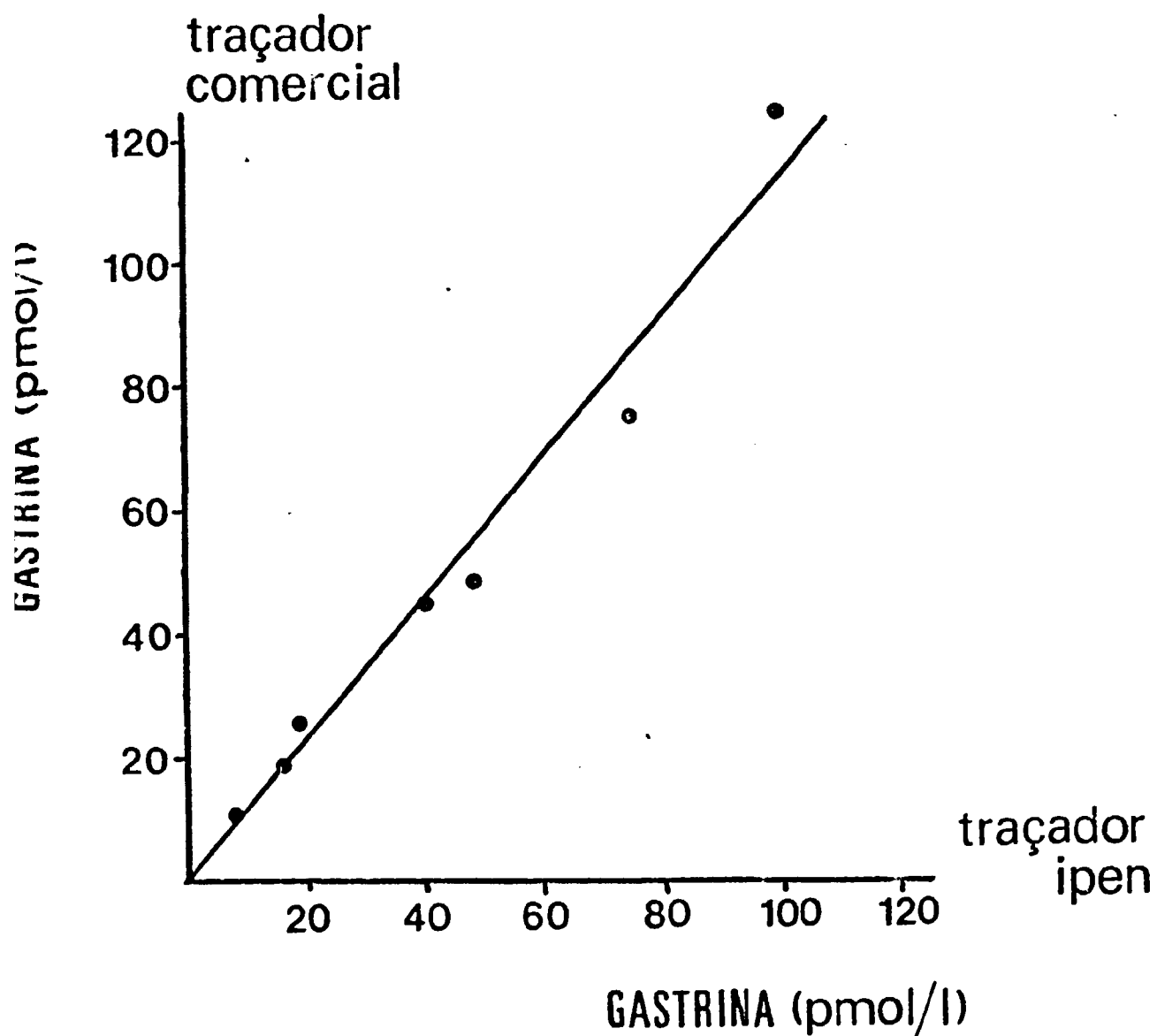


Figura 17 - Estudo da correlação dos valores de gastrinemia de amostras controle quando dosadas em ensaios realizados com os traçadores IPEN e comercial. A reta que melhor se ajusta é a definida pela equação  $y = 1,1444X + 0,1425$ .

### 3.5.1. ESPECIFICIDADE

Os valores de gastrinemia de uma amostra com elevado teor de gastrina submetida a diferentes diluições são apresentados na Tabela 16. Estes valores, quando multiplicados pelo fator de diluição forneceram resultados bem semelhantes como se pode observar na Tabela 17. Observou-se coeficiente de correlação linear de 0,9842, significativo para  $p < 0,01$  entre os volumes de amostra empregados e as concentrações de gastrina determinadas (Figura 18). A Figura 19 exhibe uma curva padrão típica do radioimunoensaio de gastrina indicando que os pontos correspondentes às amostras diluídas, superpuseram-se à curva construída com a gastrina humana padrão sintética.

### 3.5.2. EXATIDÃO

O estudo da exatidão desta técnica revelou recuperações de soluções de hormônio padrão adicionada a uma mistura de soros com teor de gastrina conhecido (17,50 pmol/l) variando de 81,84 a 100,00% (Tabela 18). O coeficiente de correlação determinado entre as concentrações de gastrina padrão adicionadas e aquelas de hormônio recuperado foi de 0,9820 sendo significativo para  $p < 0,001$  (Figura 20).

### 3.5.3. PRECISÃO

A Tabela 19 exhibe os valores do teste da precisão intra-ensaio, em que foram dosadas num mesmo ensaio 25 replicatas de amostras com teores de gastrina alto, médio e baixo. Os coeficientes de variação foram de 6,70, 3,59 e 11,86%, respectivamente.

Na Tabela 20 são apresentados os resultados das dosagens de amostras controle em 12 ensaios consecutivos, realizados com diferentes traçadores. Na Tabela 21 são expressos os resultados das dosagens de ou

Tabela 16 - Valores da gastrinemia de uma amostra, com elevado teor de gastrina, submetida a diferentes diluições.

Concentração de gastrina na amostra (pmol/l)					
Diluida	Diluida	Diluida	Diluida	Diluida	
3:4	1:2	1:4	1:8	1:20	
115	91	36	23	10	
113	91	38	19	9	
116	90	35	22	8	
113	75	37	20	10	
121	72	41	17	9	
110	85	41	20	11	
94	88	40	20	9	
124	93	37	20	7	
123	107	37	21	9	
121	95	40	21	8	
$\bar{X} \pm DP$	115,00 ± 8,77	88,70 ± 9,92	38,20 ± 2,15	20,30 ± 1,64	9,00 ± 1,15
C.V.	7,62%	11,19 %	5,63 %	8,06 %	12,78 %

Tabela 17 - Concentrações obtidas em cinco diferentes diluições de uma amostra com elevado teor de gastrina.

Volume da amostra (µl)	Fator de diluição	Concentração de gastrina na amostra diluída (pmol/l)	Concentração final de gastrina (pmol/l)
150	3:4	115,00	153,33
100	1:2	88,70	177,40
50	1:4	38,20	152,80
25	1:8	20,30	162,40
10	1:20	9,00	180,00

$\bar{X} \pm DP = 165,19 \pm 12,94$   
 C.V. = 7,84 %



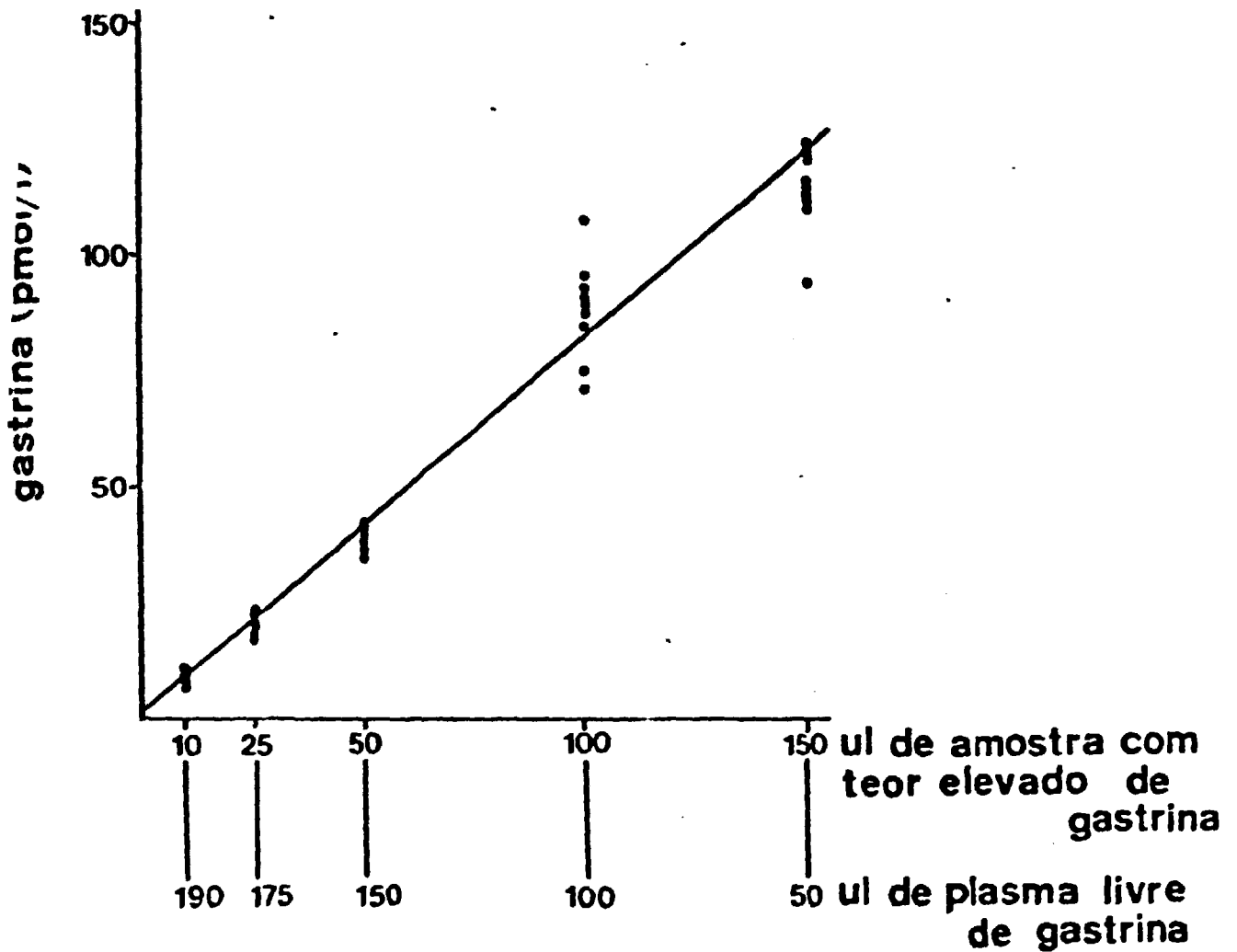


Figura 16 - Efeito da diluição sobre a concentração endógena de gastrina. A reta que melhor se ajusta é a definida pela equação  $y = 0,7874x + 1,4820$  com um coeficiente de correlação significativa de ( $p < 0,01$ ).

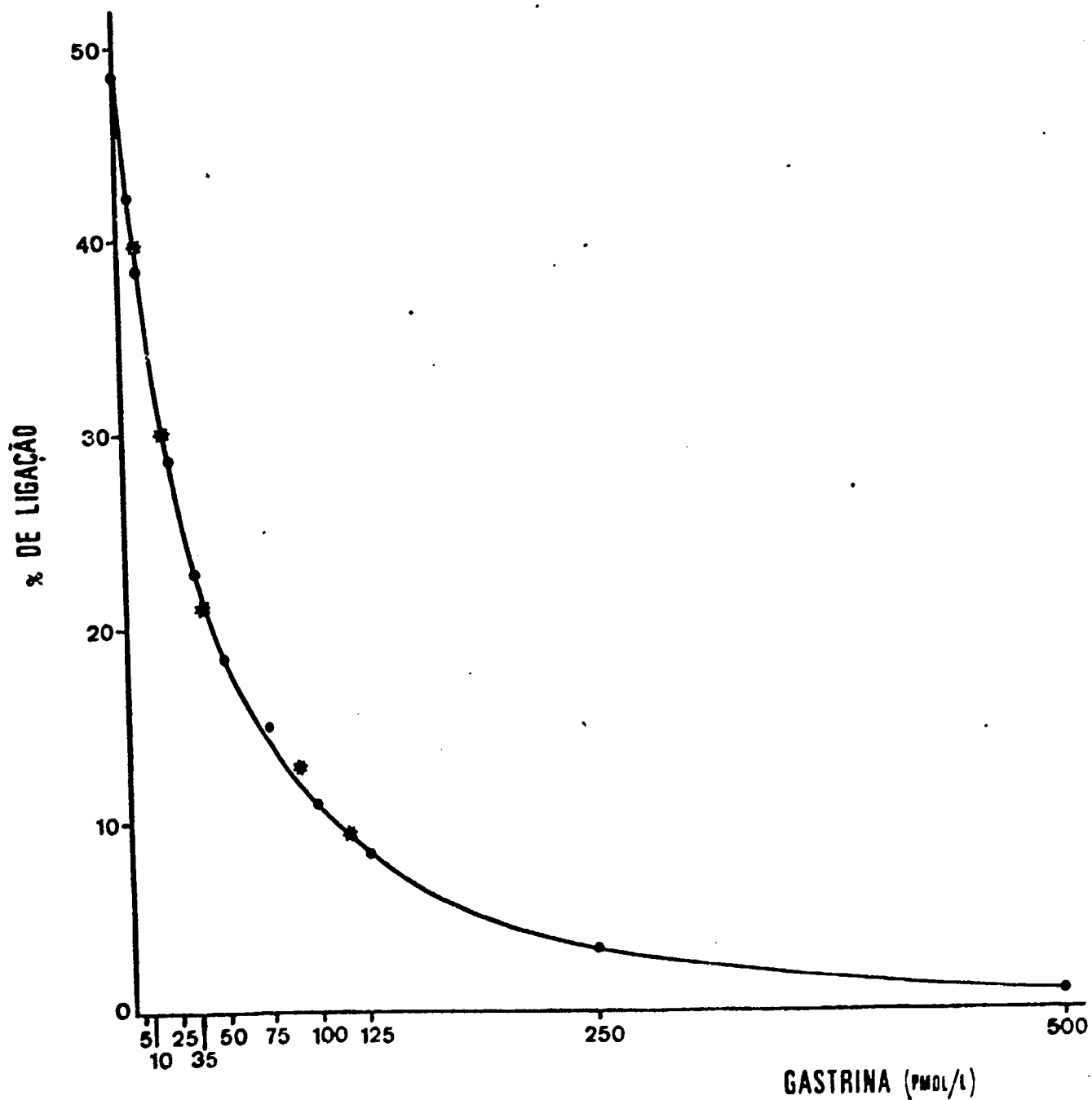


Figura 19 - Efeito da diluição da amostra comparado à curva padrão de gastrina.

Tabela 18 - Concentrações obtidas na prova de recuperação da gastrina, adicionando quantidades crescentes deste hormônio a uma amostra de gastrinemia conhecida (17,50 pmol/l).

Gastrina adicionada (pmol/l)	Gastrina determinada (pmol/l) $\bar{X} \pm DP$	Gastrina recuperada (pmol/l)	Gastrina recuperada (porcentual) $\bar{X} \pm DP$
-	17,50 $\pm$ 0,53	-	-
5	22,50 $\pm$ 0,97	5,00 $\pm$ 0,97	100,00 $\pm$ 19,46
10	26,50 $\pm$ 0,71	9,00 $\pm$ 0,71	90,00 $\pm$ 7,10
25	38,30 $\pm$ 1,57	20,80 $\pm$ 1,57	83,20 $\pm$ 6,28
35	49,10 $\pm$ 3,18	31,60 $\pm$ 3,18	90,29 $\pm$ 9,09
50	65,80 $\pm$ 3,08	48,30 $\pm$ 3,08	96,60 $\pm$ 6,16
75	83,10 $\pm$ 3,96	65,60 $\pm$ 3,96	87,47 $\pm$ 5,28
100	101,00 $\pm$ 8,65	83,50 $\pm$ 8,65	83,50 $\pm$ 8,65
125	118,80 $\pm$ 13,78	101,30 $\pm$ 13,78	81,04 $\pm$ 11,02

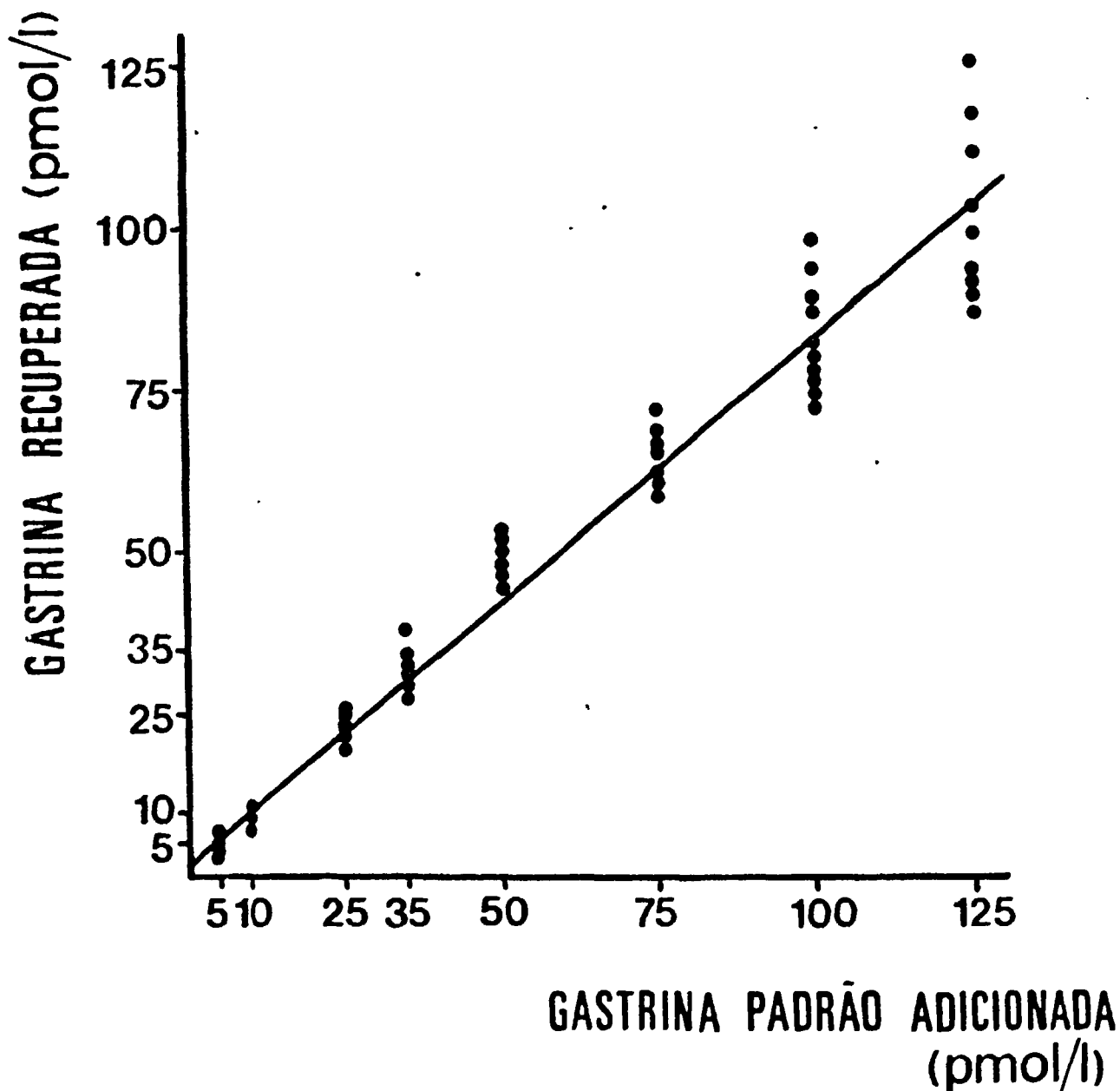


Figura 20 - Estudo da recuperação da gastrina padrão adicionada à uma mistura de soros de gastrinemia conhecida. A reta que melhor se ajusta é a definida pela equação  $y = 0,8133X + 2,4301$  com um coeficiente de correlação significativa de  $(p \leq 0,001)$ .

Tabela 19 - Valores da concentração de gastrina das amostras controle com teor alto, médio e baixo, determinados num mesmo ensaio.

Controle alto (pmol/l)	Controle médio (pmol/l)	Controle baixo (pmol/l)	
74	27	7	
89	26	6	
79	27	4	
84	25	6	
83	27	6	
76	24	5	
87	25	7	
86	26	5	
83	26	6	
86	24	5	
75	26	5	
81	25	6	
80	27	6	
77	27	6	
79	26	5	
75	26	6	
79	26	6	
78	25	5	
77	26	6	
86	27	6	
89	25	5	
71	25	6	
75	25	6	
88	26	6	
73	25	6	
$\bar{X} \pm DP$	80,40 + 5,38	25,7 + 0,92	5,72 + 0,68
C.V.	6,70%	3,59%	11,76%

Tabela 20 - Valores de gastrinemia (pmol/l), relativos ao estudo da precisão inter-ensaio realizado com diversos traçadores.

Traçador (Nº)	Controle alto	Controle médio	Controle baixo
1	78	25	5,66*
2	73	29	4
	72	28	5
	54	20	3
3	55	21	2
4	73	34	1,61 <sup>2</sup>
	42	21	1,39*
	56	31	0,78*
	63	22	0,48*
5	48	25	1,82*
	42	23	0,70*
	-	20	-
$\bar{X} \pm DP$	59,64 $\pm$ 12,97	24,91 $\pm$ 4,64	-
C.V.	21,75%	18,63	-

As concentrações seguidas de asterísco indicam o valor da DM de cada ensaio.

Tabela 21 - Valores de gastrinemia (pmol/l) relativos ao estudo da precisão inter-ensaio realizado com o traçador proveniente da 6<sup>a</sup> radioiodação.

Nº de ensaio	Controle alto	Controle médio	Controle baixo
1	81	31	7
2	67	29	7
3	83	29	7
4	80	30	8
5	77	30	6
$\bar{X} \pm DP$	77,60 $\pm$ 6,31	29,80 $\pm$ 0,84	7,00 $\pm$ 0,71
C.V.	8,13%	2,81%	10,10%

tras amostras controle em cinco ensaios consecutivos, empregando um único traçador.

Pode-se observar pela apreciação destas tabelas que a precisão intra e inter-ensaio é maior na determinação de níveis médios de gastrina, em torno de 30 pmol/l.

#### 3.5.4. SENSIBILIDADE

A Tabela 22 apresenta os valores comparativos da sensibilidade dos ensaios, expressa pelo DMD quando calculada pelos dois métodos descritos no item 2.6.4.

Cabe destacar a elevada sensibilidade deste radioensaio que se manteve em todos os ensaios realizados com os diferentes traçadores.

O coeficiente de correlação linear entre os valores de DMD calculados por um ou outro método foi de 0,8993, significativa para  $p < 0,001$ , sendo  $y = 1,1834x + 1,0720$  a equação que define a reta.

#### 3.6. APLICAÇÃO CLÍNICA

##### 3.6.1. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GASTRINA EM AMOSTRAS DE SORO OU PLASMA

Na Tabela 23 são apresentadas as concentrações de gastrina determinadas no soro e no plasma dos 23 indivíduos normais analisados. Apesar de terem sido observados valores mais elevados no soro, estas diferenças não foram estatisticamente significantes para  $p < 0,05$ .

Esta semelhança na determinação dos níveis de gastrina em um ou outro fluido foi observada em indivíduos com teores hormonais que va-



Tabela 22 - Valores de dose mínima detectável determinados com os diferentes traçadores e calculados de acordo com os métodos descritos por Rodbard (Método I) e Albuquerque (Método II).

Traçador (Nº)	DMD (pmol/l)	
	Método I	Método II
1	3,20	2,20
	7,83	9,00
	7,74	9,80
2	0,90	1,60
	0,89	2,20
	0,70	1,40
3	3,83	8,60
	1,65	4,20
	4,48	8,80
4	0,74	2,40
	1,61	3,40
	1,39	4,00
	1,80	3,80
	0,78	2,80
	0,48	2,40
	1,82	2,40

Traçador (Nº)	IND (pmol/l)	
	Método I	Método II
5	0,70	1,40
	0,45	1,40
	0,52	1,60
	0,78	0,80
	0,41	1,60
	0,66	1,40
	1,14	2,00
	1,29	1,40
6	0,90	2,60
	0,33	1,80
	0,82	1,40
	0,99	1,40

Tabcla 23 - Valores da concentração de gastrina determi-  
nados no soro e no plasma.

Indivíduos	Gastrina (pmol/l)	
	Soro	Plasma
A.V.	12	10
A.W.	77	75
C.M.	7	6
C.S.	14	14
E.A.	12	8
E.B.	18	16
G.P.	12	12
I.A.	150	150
I.C.	5	4
I.S.	34	27
K.O.	4	3
L.E.	6	5
L.H.	28	26
M.B.	11	9
N.F.	10	9
O.K.	6	3
O.R.	13	18
P.B.	11	8
R.A.	23	20
T.A.	20	14
T.C.	11	11
V.B.	7	7
Y.M.	9	7
$\bar{X} \pm EPM$	21,74 $\pm$ 6,64	20,12 $\pm$ 6,66

riaram de 3 (indivíduo K.O.) a 150 pmol/l (indivíduo I.A.).

### 3.6.2. DETERMINAÇÃO DA GASTRINA EM INDIVÍDUOS NORMAIS E EM PORTADORES DE DIFERENTES AFEÇÕES

A Figura 21 ilustra os intervalos da gastrinemia de jejum dos seis grupos de indivíduos estudados. Os valores individuais bem como os valores de média  $\pm$  erro padrão da média e as respectivas medianas estão expressos nas Tabelas 24 a 28.

As concentrações de gastrina determinadas nos grupos correspondentes aos indivíduos gastrectomizados, chagásicos, anêmicos e nefropatas foram estatisticamente diferentes daqueles encontrados no grupo dos indivíduos normais.

As diferenças foram significantes para  $p < 0,001$  em todos os grupos com exceção do chagásico, no qual as diferenças foram significantes para  $p < 0,05$ .

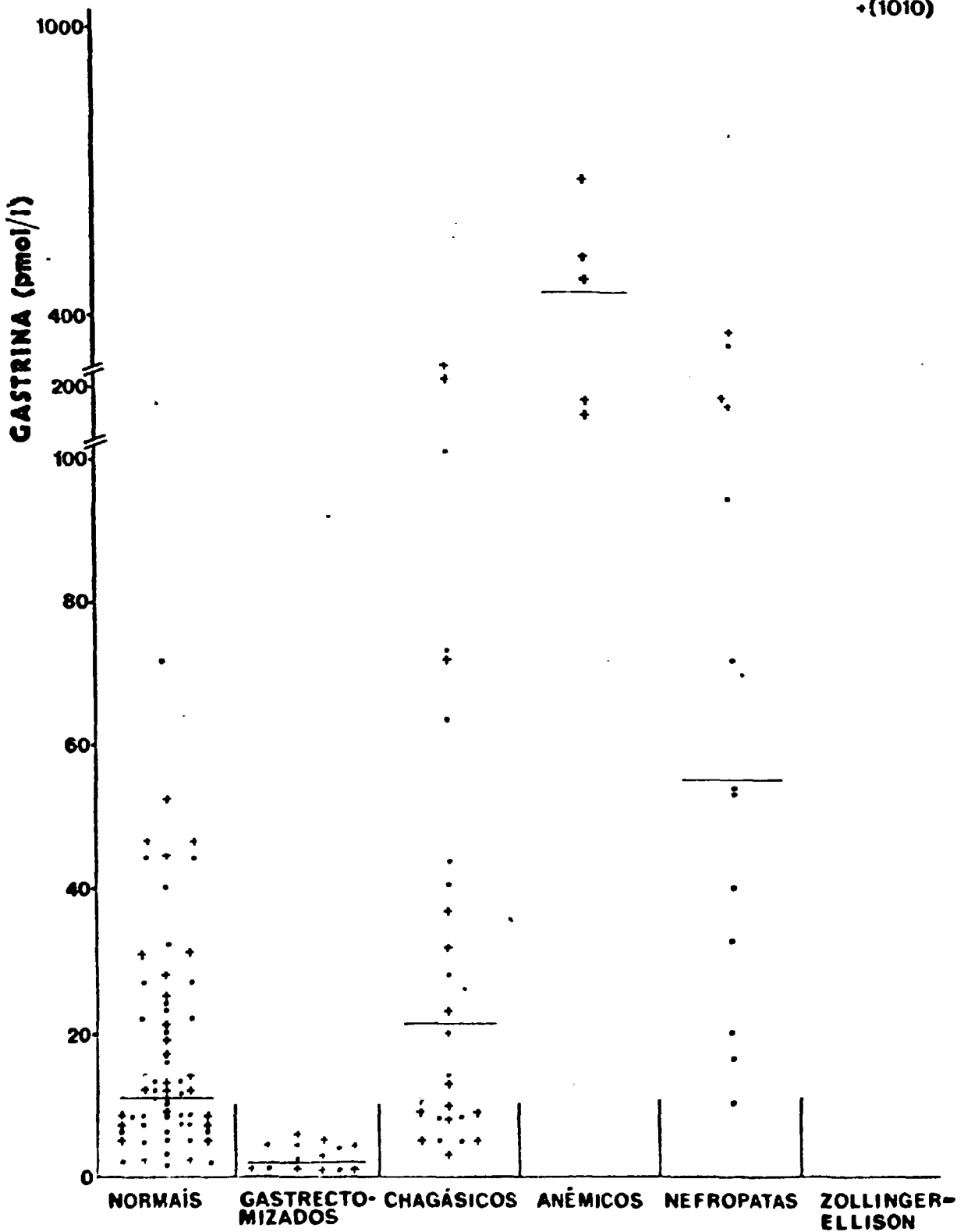


Figura 21 - Níveis circulantes de gastrina, em condições de jejum, determinados em indivíduos normais, gastrectomizados, chagásicos, portadores de anemia perniciosa, insuficiência renal crônica e síndrome de Zollinger-Ellison, indicando o valor da mediana de cada grupo. As mulheres são representadas por (-) e os homens por (+).

Tabela 24 - Valores de gastrinemia dos indivíduos normais.

Indivíduo	Gastrina (pmol/l)
A.O.	12
A.R.	47
A.S.	13
A.V.	12
B.C.	2
C.F.	3
C.M.	7
C.O.	3
C.S.	14
D.S.	12
E.A.	12
E.B.	18
E.P.	25
E.S.	7
F.S.	13
G.F.	33
G.P.	5
H.M.	42
I.C.	5
I.M.	4
I.S.	34
J.A.	45
J.B.	12
J.C.	10
J.G.	8

Indivíduo	Gastrina (pmol/l)
J.J.	25
J.N.	6
J.R.	40
J.S.	47
J.U.	53
J.Z.	6
K.O.	4
L.A.	7
L.C.	9
L.E.	6
L.G.	14
L.H.	28
L.N.	8
L.Q.	7
M.B.	11
M.C.	14
M.D.	3
M.F.	7
M.H.	5
M.P.	4
M.R.	14
M.S.	7
N.A.	42
N.F.	10
O.G.	3
O.H.	74
O.K.	6
O.R.	13

Indivíduo	Gastrina (pmol/l)
P.B.	11
P.C.	24
P.R.	34
R.A.	23
R.M.	12
S.E.	6
S.S.	25
T.A.	20
T.C.	11
V.B.	7
Y.M.	9
<b>X ± EPM</b>	<b>16,45 ± 2,06</b>
<b>Med</b>	<b>11,50</b>



Tabela 25 - Valores de gastrinemia dos indivíduos gastrectomizados.

Indivíduo	Gastrina (pmol/l)
A.C.	8
C.S.	1
D.S.	4
G.M.	4
H.B.	1
J.A.	1
J.F.	7
J.J.	1
J.S.	4
J.V.	1
M.F.	4
M.S.	2
N.S.	3
S.S.	1
$\bar{X} \pm \text{EPM}$	$3,00 \pm 0,80$
Med	2,50

Tabela 26 - Valores de gastrinemia dos indivíduos chagásicos.

Indivíduo	Gastrina (pmol/l)
A.E.	220
A.F.	25
A.M.	6
B.F.	9
C.A.	7
C.D.	7
C.M.	7
D.R.	9
E.M.	7
G.R.	73
I.R.	9
I.S.	41
J.A.	45
J.D.	26
J.E.	18
J.G.	29
J.M.	8
J.N.	261
J.R.	74
J.S..	34
J.U.	124
M.R.	65
N.B.	18
N.N.	9
S.A.	8
V.C.	11
V.G.	13
$\bar{X} \pm EPM$	$43,07 \pm 12,26$
Med	21,70

Tabela 27 - Valores de gastrinemia dos indivíduos portadores de anemia perniciosa.

Indivíduo	Gastrina (pmol/l)
A.E.	160
G.F.	480
J.P.	680
J.S.	182
T.C.	450
$\bar{X} \pm EPM$	390,40 $\pm$ 174,59
Med	457,00

Tabela 28 - Valores de gastrinemia dos indivíduos refropatas.

Indivíduo	Gastrina (pmol/l)
B.P.	350
C.C.	55
C.M.	180
C.V.	170
D.B.	56
F.S.	72
I.L.	35
J.S.	12
L.C.	22
L.P.	290
M.D.	94
M.S.	17
R.B.	40
$\bar{X} \pm EPM$	107,15 $\pm$ 29,72
Med	54,63

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1. PREPARO E CONTROLE DE QUALIDADE DO TRAÇADOR

Entre os métodos universalmente empregados para radioiodação de hormônios gastrointestinais encontra-se o da Cloramina T<sup>5,13,33</sup>, descrito por HUNTER e GREENWOOD em 1962<sup>34</sup>. A gastrina, como outros peptídeos gastrointestinais, tem sido iodada com esta técnica conforme descrito na literatura por diversos autores<sup>7,46,64,65,68,82</sup>.

O antígeno empregado na marcação deve ser extremamente puro<sup>4,32,80</sup> a fim de permitir o preparo de um traçador adequado para seu uso em radioimunoensaio. A gastrina fria empregada neste trabalho, quando submetida à EGPA por ocasião da sua primeira radioiodação, mostrou um único componente (Figura 3), sendo confirmado portanto o elevado grau de pureza deste hormônio. Seu valor de migração relativa no gel foi elevado (0,848), provavelmente por causa dos múltiplos resíduos de ácido glutâmico presentes na molécula, os quais lhe conferem forte caráter negativo<sup>73</sup>.

Devido ao seu pequeno tamanho, este hormônio após ter sido submetido às diferentes radioiodações teve seu valor de R<sub>m</sub> aumentado pela forte eletronegatividade que lhe foi atribuída pela incorporação do átomo de <sup>125</sup>I em sua molécula, apresentando valor médio de 1,016. Conseqüentemente, seus valores de R<sub>m</sub> foram muito próximos aos do <sup>125</sup>I (valor médio de 1,124), o qual, conforme já observado em nossos laboratórios em outros experimentos<sup>12</sup>, migra um pouco mais à frente do corante traçador.

O rendimento das diferentes radioiodações quando avaliado pela EGPA ou pela precipitação com TCA forneceu resultados estatisticamente similares, permitindo a determinação do rendimento pela precipitação

com TCA, que é um método bem mais simples e rápido do que a EGPA.

GANGULI e HUNTER<sup>24</sup> prepararam gastrina radioiodada com rendimentos da ordem de 40 a 55%, enquanto que STADIL e REHFELD<sup>68</sup> obtiveram rendimentos maiores, variando de 71 a 82%; WALSH<sup>73</sup> refere-se a rendimentos inferiores a 30% embora algumas vezes atinjam o valor de 80%. No presente estudo, os rendimentos foram da ordem de 50% (Tabela 6).

A purificação da gastrina-<sup>125</sup>I por cromatografia de troca iônica é citada por alguns autores como sendo o melhor método para a obtenção de traçadores monoiodados de elevada atividade específica<sup>5,36,64,73</sup>. Nas purificações realizadas neste trabalho observa-se que apenas as frações do segundo pico eram formadas pela gastrina pura (valor médio de 94,80% de precipitação pelo TCA) e imunorreativa; exibindo elevada ligação específica com excesso de anticorpo (valor médio de 82,93%).

As frações relativas ao primeiro pico, embora não apresentassem ligação específica com o anticorpo (valor médio de 3,84%), acusaram na precipitação pelo TCA a presença de proteína que não a gastrina-<sup>125</sup>I (valor médio de 77,60%), muito provavelmente a SAB presente a 1% no tampão de eluição, que carregaria parte do <sup>125</sup>I livre.

As frações do terceiro pico, as últimas a serem desadsorvidas da matriz de QAE-Sephadex pela troca com os íons cloro do tampão de eluição, eram compostas pelo <sup>125</sup>I livre propriamente dito, o que foi confirmado pela semelhança do valor obtido na precipitação pelo TCA (valor médio de 16,91%) com o valor revelado nas mesmas condições por uma amostra de <sup>125</sup>I livre (7,68%).

Ainda com relação a identificação destes picos, sua análise pela EGPA, confirmou ser o primeiro pico a SAB e serem o segundo e terceiro picos constituídos pela gastrina-<sup>125</sup>I e pelo <sup>125</sup>I livre, respectivamente. O primeiro pico, quando submetido a EGPA apresentou um compo-

nente principal com valor médio de Rm de 0,774, concorde com o valor de Rm da SAB descrito na literatura<sup>6</sup>.

Os valores de Rm do segundo e terceiro picos (valores médios de 0,989 e 1,164, respectivamente) concordam com aqueles determinados nas alíquotas do hormônio marcado não purificado, referentes à gastrina-<sup>125</sup>I e ao <sup>125</sup>I livre (valores médios de 1,016 e 1,124, respectivamente).

Os valores percentuais de distribuição de gastrina-<sup>125</sup>I no gel de poliácridamida acima de 95%, confirmam sua elevada pureza. Os valores de pureza dos traçadores quando estimados pela EGPA ou pela precipitação com TCA foram estatisticamente semelhantes, facultando novamente o emprego desta última técnica, bem mais simples e menos dispendiosa do que a EGPA.

No que diz respeito à estabilidade do traçador, cumpre salientar sua elevada pureza, mantida mesmo após 3 meses de estocagem a -20°C. Nesse período o traçador apresentou pequena liberação de <sup>125</sup>I e conservou seus valores de Rm característicos, sendo portanto desnecessária qualquer adicional purificação.

De conformidade com o descrito na literatura<sup>33</sup>, durante a estocagem do traçador ocorre perda de sua imunorreatividade, manifestada pela diminuição gradual de sua ligação e menor inclinação da curva padrão com ele obtida, alterações estas decorrentes de sua possível degradação.

As curvas padrão obtidas com o traçador após este período de estocagem mostraram-se paralelas (Figura 14), sendo que os valores de ligação inespecífica mantiveram-se praticamente inalterados, variando de 1,46 a 2,30%, bem como os da ligação específica que oscilaram de 50,21 a

52,49%. Os valores de ED<sub>50</sub> também não sofreram variação significativa após o tempo de estocagem (variando de 24 a 33 pmol/l).

A sensibilidade dos ensaios realizados com este traçador também permaneceu inalterada conforme revela a análise dos valores de IMD apresentados na Tabela 11.

Todos estes valores confirmam portanto a qualidade deste traçador.

McGUIGAN e WOLFE<sup>46</sup> aconselham preparar gastrina radioiodada, cada 60 dias aproximadamente, enquanto STADIL e REHFELD<sup>68</sup> e WALSH<sup>73</sup> observaram que este traçador mantém sua integridade imunológica por períodos superiores a 2 meses; RUSSEL e cols.<sup>65</sup> referem-se inclusive a 3 meses. A estabilidade do traçador preparado neste trabalho está plenamente de acordo com o descrito na literatura anteriormente, compreendendo inclusive o maior período de estocagem.

A atividade específica da gastrina-<sup>125</sup>I constitui também um parâmetro de muita importância para sua análise. Conforme já mencionado, a atividade específica esperada para a gastrina monoiodada seria de 894 µCi/µg, no entanto, aquela atividade específica determinada para os seis traçadores aqui preparados oscilou entre 62 e 307 µCi/µg (Tabela 12). Esta variação pode ser explicada pelo tempo muito curto de exposição do peptídeo à Cloramina T (dez segundos), que dificulta o controle da reação. Valores um pouco mais elevados foram obtidos por STADIL e REHFELD<sup>68</sup>, variando de 220 a 605 µCi/µg com média de 335 µCi/µg; McGUIGAN e WOLFE<sup>46</sup> descrevem valores entre 300 e 400 µCi/µg; RUSSELL e cols.<sup>65</sup> obtiveram um valor médio de 500 µCi/µg e GANGULI e HUNTER<sup>24</sup> obtiveram gastrina radioiodada com atividade específica média de 594 µCi/µg, não atingindo também o valor esperado para a gastrina monoiodada.

Embora a atividade específica desejada fosse aquela descrita



para a gastrina monoiodada, na prática atividades específicas menores são até mesmo preferidas, já que a presença de menor quantidade de  $^{125}\text{I}$  por molécula de peptídeo pode inclusive favorecer uma maior estabilidade do traçador, dado o menor dano causado na molécula pelo radioisótopo  $^{125}\text{I}$ . HUNTER<sup>33</sup> postula inclusive, que traçadores com atividade específica menor podem ser perfeitamente aceitáveis não apresentando perda de imunoreatividade. GANGULI e HUNTER<sup>24</sup> também não observaram alterações na imunoreatividade de traçadores obtidos com substituição de até 1 átomo de  $^{125}\text{I}$  por molécula de gastrina.

No presente trabalho, apenas os traçadores de nº 1 e 3 apresentaram valores de atividade específica muito baixos (62 e 70  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$  respectivamente), correspondendo a substituição de 0,07 e 0,08 átomos de  $^{125}\text{I}$  por molécula de gastrina. Esses traçadores foram também menos imunoreativos (títulos de anti-soro de 1:32.000 e 1:88.000, respectivamente) e forneceram curvas padrão pouco sensíveis, apresentando os valores de D:D mais elevados (Tabela 22).

Os demais traçadores, com atividade específica mais elevada, se apresentaram mais imunoreativos e permitiram a obtenção de curvas padrão muito sensíveis, conforme evidenciado pelos seus valores de D:D.

A oportunidade de poder comparar o traçador preparado neste trabalho com aquele fornecido por um conjunto diagnóstico comercial foi de grande importância para o estudo referente ao controle de qualidade do traçador. Quando analisados pela EGPA, o traçador preparado no IPEN apresentou maior grau de pureza do que o comercial, conforme valores apresentados na Tabela 13. Ambos os traçadores mostraram aparecimento de  $^{125}\text{I}$  em consequência de seu tempo de estocagem, sendo que a liberação de  $^{125}\text{I}$  pelo traçador comercial foi bem maior (Figura 15).

O maior grau de pureza do traçador IPEN foi ainda confirmado

pelo valor de ligação inespecífica obtido no ensaio com ele realizado, valor este inferior aquele obtido com o traçador comercial (Tabela 14). Além disso, os valores de ligação específica,  $ED_{50}$  e DMD, determinados nos ensaios, foram bem semelhantes quando empregado um ou outro traçador.

A grande semelhança das concentrações de gastrina das amostras controle dosadas nos ensaios realizados com ou outro traçador, corrobora também a adequação do uso do traçador aqui preparado no radioimunoensaio de gastrina. Conforme pode ser observado na Tabela 15, as diferenças existentes não foram significantes e determinou-se uma correlação linear entre os diferentes valores com coeficiente de correlação significativo ( $p < 0,001$ ). As pequenas diferenças aumentaram ligeiramente nos valores extremos, variação esta inerente à regiões extremas da curva e já observada na literatura<sup>61</sup>.

#### 4.2. DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS PARA O RADIOIMUNOENSAIO E CONTROLE DE SUA QUALIDADE

Sendo a identidade de condições entre o hormônio padrão e as amostras desconhecidas, requisito indispensável para a realização de um radioimunoensaio específico e preciso, tornou-se necessário o preparo de plasma isento de gastrina endógena para dissolver a gastrina padrão, que estaria então em condições semelhantes àsquelas das amostras sanguíneas a serem dosadas<sup>14,29,81</sup>. Embora alguns autores tivessem empregado a cromatografia de afinidade para a obtenção deste plasma<sup>64,65</sup>, o alto custo desta técnica justificou a procura de outros métodos menos dispendiosos como a adsorção da gastrina ao carvão. Este método, embora não seja seletivo para a gastrina, já que junto dela o carvão também adsorve outras substâncias de baixo peso molecular<sup>14</sup>, tem sido indicado por alguns autores<sup>14,81</sup> como sendo um método adequado e alternativo para a obtenção de

plasma isento de peptídeos de baixo peso molecular.

O tratamento do plasma velho de Banco de Sangue com carvão foi também comparado ao tratamento por congelamento e descongelamento sucessivos. Apesar de outros autores terem obtido melhores resultados com esse tratamento no preparo de plasma isento de glucagon<sup>13</sup>, o mesmo não ocorreu no preparo de plasma isento de gastrina. Conforme observado na Figura 9, a curva padrão preparada com este plasma apresentou menores valores percentuais de ligação do traçador ao anticorpo, indicando a presença de gastrina fria no meio de incubação, além da gastrina padrão.

A escolha do carvão como método de separação do radioimunoensaio é justificada pela praticabilidade e reprodutibilidade do método, bem como pela fácil obtenção e baixo custo dos reagentes. O carvão empregado foi sempre recoberto com dextran e plasma velho de Banco de Sangue a fim de assegurar seu efeito de peneira molecular, para a adsorção da fração livre do radioimunoensaio<sup>30,51</sup>. O uso de carvão na separação da gastrina livre daquela ligada ao anticorpo já foi realizado com êxito por RUSSELL e cols<sup>65</sup> e por SCHRUMPF e SAND<sup>66</sup>.

Observando a Figura 11, pode-se notar que praticamente não houve diferença entre os diferentes carvões analisados. Além disso, a concentração ideal para a separação de ensaios realizados em plasma ou tampão foi a mesma (25 mg/tubo). O fato de neste último ensaio (Figura 12), a ligação do traçador com excesso de anti-soro não apresentar queda significativa com o aumento de concentração do carvão, é devido ao anti-soro em excesso ligar toda a gastrina-<sup>125</sup>I disponível, não havendo portanto gastrina-<sup>125</sup>I para ser adsorvida por qualquer quantidade de carvão.

A cuidadosa determinação de todas as condições prévias ao desenvolvimento de um radioimunoensaio possibilitou a obtenção de curvas padrão sensíveis, conforme exemplificado na Figura 2, onde pequenos aumen-

tos na concentração de hormônio padrão provocaram quedas significativas na ligação da gastrina- $^{125}\text{I}$  ao seu anticorpo. O intervalo da concentração de gastrina desta curva (de zero a 500 pmol/l) permitiu a dosagem deste hormônio em indivíduos normais bem como naqueles com alterações da gastrinemia.

O radioimunoensaio de gastrina, como qualquer outra técnica laboratorial, foi submetido a um controle de qualidade, realizado após seu total desenvolvimento e padronização, visando garantir ao longo do tempo a qualidade dos reagentes empregados bem como a perfeita execução da seqüência operacional<sup>11,40</sup>. O principal propósito deste controle foi portanto a detecção de alguma irregularidade na execução técnica, sendo sua realização indispensável para a validação do método bem como de seus resultados<sup>11,61</sup>.

Tradicionalmente, o controle de qualidade é realizado pela análise dos seguintes parâmetros: especificidade, exatidão, precisão e sensibilidade do radioimunoensaio<sup>2,11,21,47</sup>.

Em relação à especificidade do método, os valores da concentração de gastrina determinados na amostra diluída, foram muito semelhantes quando multiplicados pelos respectivos fatores de diluição, apresentando C.V. de 7,84% (Tabela 17). A existência de correlação significativa entre o fator de diluição da amostra analisada e a gastrinemia determinada ( $p < 0,01$ ) confirma a especificidade deste radioimunoensaio (Figura 18).

Além disso, a superposição dos pontos referentes às diferentes diluições da amostra contendo elevado teor endógeno de gastrina com os da curva padrão construída a partir da gastrina humana sintética (Figura 19) permitiu verificar a idêntica imunoreatividade de ambas as gastrinas (endógena e padrão), condição esta essencial para todo radioimunoensaio.

YALOW e BERSON<sup>82</sup> bem como SCHRUMPF e SAND<sup>66</sup> já haviam analisado este parâmetro do radioimunoensaio de gastrina por eles desenvolvidos, sendo os resultados aqui apresentados concordes com aqueles descritos por esses autores.

O teste da exatidão do método apresentou também correlação linear significativa entre as quantidades de gastrina adicionada e aquela recuperada ( $p < 0,001$ ). Esta recuperação oscilou de 100,00% para a concentração mais baixa a 81,84% para a concentração mais elevada apresentando valores intermediários a estes para as demais concentrações (Tabela 18). Estes valores de recuperação estão de acordo com os já descritos por SCHRUMPF e SAND<sup>66</sup> para o radioimunoensaio de gastrina e com os descritos por BORGHI e cols.<sup>13</sup>, HIGA<sup>31</sup> e DOMINGUES<sup>19</sup> para os radioimunoensaios de glucagon, hormônio de crescimento e de somatomedina B, respectivamente.

No estudo da reprodutibilidade intra-ensaio obtiveram-se valores perfeitamente aceitáveis de C.V. para os três níveis (Tabela 19), valores estes que variaram de 3,59% para o nível médio (aproximadamente 26 pmol/l) até 11,76% para o nível baixo (aproximadamente 6 pmol/l).

No que diz respeito à reprodutibilidade inter-ensaio, quando foram realizados ensaios com diversos traçadores obtiveram-se valores de C.V. elevados, não sendo possível estimar o C.V. da amostra com teor de gastrina baixo, cujas concentrações apresentaram-se inferiores aos valores da DAD dos respectivos radioimunoensaios (Tabela 20). Esta maior variação entre as concentrações estimadas é devida a uma provável degradação da gastrina presente nas amostras controle que, por não terem sido separadas em alíquotas, foram submetidas a descongelamentos e congelamentos sucessivos por ocasião de cada ensaio.

Entretanto, quando outras amostras controle, previamente se-

paradas em alíquotas, foram dosadas em ensaios consecutivos realizados com um único traçador, os valores de C.V. das concentrações dessas amostras foram semelhantes àqueles descritos no estudo da precisão intra-ensaio (Tabela 21). Constatou-se portanto a precisão elevada das estimativas realizadas a partir deste radioensaio. Esta precisão é plenamente concorde com a descrita por outros autores para o radioensaio deste mesmo hormônio<sup>46,65,66,70,82</sup>.

A grande sensibilidade do radioensaio por nós desenvolvido é evidenciada pelos valores do limite de detecção dos ensaios, que com exceção daqueles realizados com os traçadores de atividade específica mais baixa (de nº 1 e 3), apresentaram valores de DM da ordem de 1 pmol/l (Tabela 22). Apesar de ser reconhecido que diminuindo a atividade específica do traçador pode se diminuir a sensibilidade do ensaio, o tempo diminuto da reação de radioiodação impediu que a atividade específica fosse melhor controlada contribuindo para a menor sensibilidade dos ensaios realizados com esses dois traçadores.

Existe indiscutível paralelismo entre ambos os métodos empregados no cálculo da dose mínima detectável, embora aquele descrito por RODBARD<sup>62</sup> tenha estimado doses menores. ROSENQUIST e WALSH<sup>64</sup> descrevem limites de detecção inferiores a 0,5 pmol/l enquanto RUSSELL e cols.<sup>65</sup> determinaram valores de DM da ordem de 2 pmol/l.

Pode-se concluir portanto, que o radioensaio de gastrina desenvolvido apresentou especificidade, exatidão, precisão e sensibilidade elevadas permitindo a realização de ensaios e a obtenção de resultados válidos.

A validade deste radioensaio foi ainda confirmada por sua aplicação na determinação da gastrinemia em indivíduos normais e portadores de diferentes afecções.

A inexistência de diferença estatisticamente significativa entre os valores de gastrinemia quando determinada no soro ou no plasma de indivíduos normais, indica a possibilidade de se empregar indistintamente qualquer um desses meios biológicos para o radioensaio.

Entretanto, alguns autores como WALSH<sup>71</sup> e McGUIGAN e THUDEAU<sup>45</sup> haviam alertado para possíveis problemas no ensaio de gastrina causados pela presença de heparina, optando pelo emprego de soro. Apesar disso, outros autores como RUSSELL e cols.<sup>65</sup> padronizaram seu radioensaio empregando sempre plasma.

Tendo em vista a falta de uniformidade entre os autores e a irrelevância das diferenças existentes entre as duas determinações do ponto de vista estatístico e clínico, pode-se concluir que tanto o soro quanto o plasma são perfeitamente adequados para a determinação da gastrinemia por radioensaio.

Os valores da gastrinemia de jejum determinados nos indivíduos normais (variando de 2 a 74 pmol/l; valor médio e respectivo erro padrão da média de  $16,45 \pm 2,06$  pmol/l) são concordes com os apresentados por WALSH<sup>71</sup> que utilizou o anticorpo 1296, que também reconhece todas as formas de gastrina e reage de forma semelhante ao anticorpo 1611 empregado no presente trabalho<sup>36</sup>. STADIL e REHFELD<sup>69</sup> bem como YALOW e BERSON<sup>82</sup> descrevem valores de gastrinemia normal compreendidos entre zero e 95 pmol/l empregando anticorpos dirigidos contra a porção C-terminal, enquanto que RUSSELL e cols.<sup>65</sup> utilizando o anticorpo RCS 8 obtiveram um valor médio e respectivo desvio padrão de  $12,80 \pm 1,50$  pmol/l.

Como era de esperar, o grupo gastrectomizado apresentou níveis de gastrina muito baixos (variando de 1 a 8 pmol/l, valor médio e respectivo erro padrão de média de  $3 \pm 0,80$  pmol/l), confirmando portanto a remoção das células G antrais e duodenais<sup>73</sup>.

O grupo chagásico apresentou concentração de gastrina elevada (variando de 6 a 261 pmol/l; valor médio e respectivo erro padrão da média de  $43,07 \pm 12,26$  pmol/l). Valores elevados também foram observados por outros autores como TRONCON e cols.<sup>70</sup> e MDTT<sup>49</sup>, sendo atribuídos provavelmente à hipossecreção ácida gástrica observada nesses pacientes<sup>70</sup>.

A hipergastrinemia evidenciada em portadores de anemia perniciosa (variando de 160 a 680 pmol/l; valor médio e respectivo erro padrão da média de  $390,40 \pm 174,59$  pmol/l) e de insuficiência renal crônica (variando de 12 a 350 pmol/l; valor médio e respectivo erro padrão da média de  $107,15 \pm 29,72$  pmol/l) confirma relatos prévios de valores elevados nessas condições sendo associada à acloridria<sup>25,44</sup> e a uma inadequada inativação renal da gastrina<sup>26,54,75</sup>, respectivamente.

O nível de gastrina extremamente elevado determinado no paciente com a síndrome de Zollinger-Ellison (1010 pmol/l), causado por um tumor pancreático secretor de gastrina<sup>35</sup> e os níveis muito baixos observados nos pacientes gastrectomizados, confirmam a validade do ensaio e sua aplicação na medida de concentrações hormonais extremas, características das diferentes condições clínicas.



## 5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente estudo pode-se concluir que:

1. Foram desenvolvidas e padronizadas as diferentes etapas do radioensaio de gastrina humana que se referem desde o preparo do traçador até a realização de ensaios, a saber: radioiodação, purificação e teste da imunoreatividade da gastrina radioiodada, realização de ensaios e escolha do método de separação adequado.

2. Evidenciou-se que o traçador preparado neste trabalho é muito puro e estável, apresentando qualidade semelhante àquela dos traçadores importados.

3. Verificou-se serem a simples precipitação de proteínas pelo TCA e a eletroforese, em gel de poliacrilamida, técnicas compatíveis para a avaliação da eficiência da marcação e da pureza do traçador do radioensaio de gastrina.

4. Observou-se que o tratamento de plasma humano de Banco de Sangue com carvão é um método eficiente para a obtenção de plasma isento de gastrina.

5. Confirmou-se ser o carvão ativado recoberto com plasma e dextran, um método simples e adequado para a separação de gastrina livre daquela ligada ao anticorpo no sistema de radioensaio.

6. Demonstrou-se não haver diferença nos níveis de gastrina quando determinados por radioensaio a partir de soro ou plasma.

7. O método de radioensaio desenvolvido neste trabalho mostrou-se específico, exato, preciso e sensível.

8. A validade deste radioimunoensaio foi confirmada pela nítida discriminação das concentrações de gastrina desde indivíduos com níveis muito baixos (gastrectomizados) até níveis extremamente elevados (Zollinger-Ellison) desse hormônio.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - ADRIAN, T.E. Measurement in plasma. In: BLOOM, S.R. & LONG, R.G. eds. Radioimmunoassay of gut regulatory peptides. New York, Praeger Publishers, 1982, p. 28-35.
- 2 - ALBUQUERQUE, R.H. Controle de qualidade em radioimunoensaio. Arq. Bras. Endocrinol. Metabol., 25:120-4, 1981.
- 3 - ANDERSON, J.C.; BARTON, M.A.; GREGORY, R.A.; HARDY, P.M.; KENNER, G.W.; MACLEOD, J.K.; PRESTON, J.; SHEPPARD, R.C. Synthesis of gastrin. Nature, 204:933-4, 1964.
- 4 - ANTRES, R.Y. Iodinated tracers for radioimmunoassay: preparation and purification. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Radioimmunoassay and related procedures in medicine: proceedings of a symposium..., held in Vienna, Jun. 21-25, 1982. Vienna, 1982. p.133-46.
- 5 - ARDILL, J. Radioimmunoassay of gastrointestinal hormones. Clin. Endocrinol. Metab., 8:265-80, 1979.
- 6 - BARTOLINI, P.; MARQUES DE ASSIS, L.; FONSECA, M.L.Q. Radioiodination of human growth hormone with characterization and minimization of the commonly defined "damaged products". Clin. Chim. Acta., 110:177-85, 1981.
- 7 - BAUR, S.; BACON, V.C.; ROSENQUIST, G.L. Preparation and use of <sup>125</sup>I-labelled synthetic human (15-Leu) gastrin 1-17 I for radioimmunoassay of conventional human gastrins. Anal. Biochem., 87:71-6, 1978.
- 8 - BERQUÓ, E.S.; SOUZA, J.P.; GOTLIEB, S.D. Bioestatística, São Paulo,

Editora Pedagógica e Universitária Ltda., 1981.

- 9 - BERSON, S.A. & YALOW, R.S. General principles of radioimmunoassay. Clin. Chim. Acta, 22:51-69, 1968.
- 10 - BERSON, S.A. & YALOW, R.S. Nature of immunoreactive gastrin extracted from tissues of gastrointestinal tract. Gastroenterology, 60: 215-22, 1971.
- 11 - BIZOLLON, A. & FAURE, A. Criteres et controle de la qualité d'un dosage radioimmunologique. Lyon Pharm., 27:135-44, 1976.
- 12 - BORGHI, V.C. & WAJCHENBERG, B.L. Stability of freeze-dried glucagon for tracer preparations. Arq. Bras. Endocrinol. Metabol., 27:86-8, 1983.
- 13 - BORGHI, V.C.; WAJCHENBERG, B.L.; ALBUQUERQUE, R.H. Evaluation of a sensitive and specific radioimmunoassay for pancreatic glucagon in human plasma and its clinical application. Clin. Chim. Acta. 136:39-48, 1984.
- 14 - BRYANT, M.G. Plasma artefacts in radioimmunoassay. In: BLOOM, S.R., ed. Gut hormones. New York, Churchill Livingstone, 1978.
- 15 - DAVIS, B.J. Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. Ann. N.Y. Acad. Sci., 121:404-27, 1964.
- 16 - DOCKRAY, G.J. Gastrin overview. In: BLOOM, S.R., ed. Gut hormones. New York, Churchill Livingstone, 1978. p. 129-39.
- 17 - DOCKRAY, G.J. & TAYLOR, I.L. Heptadecapeptide gastrin: Measurement in blood by specific radioimmunoassay. Gastroenterology, 71:971-7, 1976.

- 18 - DOCKRAY, G.J. & WALSH, J.H. Anticardinal gastrin fragment in serum of Zollinger-Ellison syndrome patients. Gastroenterology, 68:222-30, 1975.
- 19 - DOMINGUES, E.N. Padronização e aplicação clínica do radioimunoensaio de somatomedina B sérica humana. Desenvolvimento do método de radioiodação enzimática. São Paulo, 1978. (Dissertação de mestrado, Instituto de Energia Atômica).
- 20 - EDKINS, J.S. On the chemical mechanism of gastric secretion. Proc. R. Soc. (London), Ser. B, 76:376, 1905.
- 21 - EKINS, R.P. Basic concepts in quality control. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Radioimmunoassay and related procedures: proceedings of a symposium..., held in Berlin, 1977. Vienna, 1978. V.2, p.6-10.
- 22 - EYSSELEIN, V.; MAXWELL, V.; REEDY, T.; WUENSCH, E.; WALSH, J.H. Similar acid stimulatory potencies of synthetic human big and little gastrins in man. J. Clin. Invest., 73:1284-90, 1984.
- 23 - FRIEDLANDER, G. & KENNEDY, J.W. Chimica Nucleare e Radiochimica. Milão, Carlo Manfredi Editore, 1965.
- 24 - GANGULI, P.C. & HUNTER, W.M. Iodination of gastrin. In: KIRKMAN, K.E. & HUNTER, eds. Radioimmunoassay methods. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1971. p.54-60.
- 25 - GANGULI, P.C.; CULLEN, D.R.; IRVINE, W.J. Radioimmunoassay of plasma gastrin in pernicious anemia, achlorhydria without pernicious anemia, hypochlorhydria and in controls. Lancet, 1:155-8, 1971.
- 26 - GILBERT, R.J. & GOYAL, R.K. The gastrointestinal system. In: EKNOYAN, G. & KNOCHEL, J.P., eds. The systemic consequences of renal failure. Houston, Gune & Stratton, 1984. p.133-75.

- 27 - GREGORY, H.; HARDY, P.M.; JONES, D.S.; KENNER, G.W.; SHEPPARD, R.C.  
Structure of gastrin. Nature, 204:931-3, 1964.
- 28 - GREGORY, R.A. & TRACY, H.J. The constitution and properties of two gastrins extracted from hog antral mucosa. Gut, 5:103-17, 1964.
- 29 - GROSSMAN, M.I. Gastrin. In: BERSON, S.A. & YALOW, R.S., eds.  
Methods in investigative and diagnostic endocrinology. Amsterdam, North-Holland, 1973. v.2B, p.1029-58.
- 30 - HERBERT, V. Coated charcoal separation of free labelled hormone from hormone bound to antibody. In: MARGOULIES, M., ed. Protein and polypeptide hormone: proceedings of the international symposium..., Liege, 1968. Amsterdam, Excerpta Medica, 1969. p.55-9.
- 31 - HIGA, O.Z. Aplicação do método de radioimunoensaio na dosagem do hormônio de crescimento humano no plasma. São Paulo, 1972. (Dissertação de mestrado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo).
- 32 - HUNTER, W.M. Preparation and assessment of radioactive tracers. Br. Med. Bull., 30:18-23, 1974.
- 33 - HUNTER, W.M. The preparation and assessment of iodinated antigens. In: KIRNHAM, K.E. & HUNTER, W.M., eds. Radioimmunoassay methods. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1971, p. 3-23.
- 34 - HUNTER, W.M. & GREENWOOD, F.C. Preparation of iodine<sup>131</sup> labelled human growth hormone of high specific activity. Nature. 194:495-6, 1962.
- 35 - ISENBERG, J.I., WALSH, J.H.; GROSSMAN, M.I. Zollinger - Ellison Syndrome. Gastroenterology, 65:140-65, 1973.

- 36 - JAFFE, B.M. & WALSH, J.H. Gastrin and related peptides. In: JAFFE, B.M. & BERMAN, H.R., eds. Methods of hormone radioimmunoassay. New York, Academic Press, 1979. p.455-77.
- 37 - JENSEN, S.L.; REHFELD, J.F.; HOLST, J.J.; FAHRENKRUG, J.; NIELSEN, O.V.; SCHAFFALITZKY DE MUCKADELL O.B. Secretory effects of the gastrins on the isolated perfused porcine pancreas. Am. J. Physiol., 238:186-92, 1980.
- 38 - KAESSE, H. & MERIADEC, B. Dosage radioimmunologique de la gastrine. Mise au point du dosage et resultats cliniques. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Radioimmunoassay and related procedures in medicine: proceedings of a symposium..., held in Istanbul, Sept. 10-14, 1973. Vienna, 1974. v.1, p.399-400.
- 39 - LAI, K.S. Studies on gastrin. Gut, 5:327-41, 1964.
- 40 - MCDONAGH, B.F.; MUNSON, P.J.; ROEBARD, D. A computerized approach to statistical quality control for radioimmunoassays in the clinical chemistry laboratory. Comput. Programs Biomed., 7:179-90, 1977
- 41 - MCGUIGAN, J.E. Gastrin. Vitam. Horm., 32:47-88, 1974.
- 42 - MCGUIGAN, J.E. Immunochemical studies with synthetic human gastrin. Gastroenterology, 54:1005-11, 1968.
- 43 - MCGUIGAN, J.E. The radioimmunoassay of gastrin. Clinical considerations. JAMA, J. Am. Med. Assoc., 235:405-6, 1976.
- 44 - MCGUIGAN, J.E. & TRUDEAU, W.L. Serum gastrin concentrations in pernicious anemia. N. Engl. J. Med., 282:358-61, 1970.
- 45 - MCGUIGAN, J.E. & TRUDEAU, W.L. Studies with antibodies to gastrin. Gastroenterology, 58:139-50, 1970.

- 46 - McGUIGAN, J.E. & WOLFE, M.M. Gastrin radioimmunoassay. Clin. Chem., 28:368-73, 1982.
- 47 - MIDGLEY, A.R.; NISMENDER, G.D.; REBAR, R.W. Principles for the assessment of the reliability of radioimmunoassay methods (precision, accuracy, sensitivity, specificity). Acta Endocrinol., Suppl., 142:163-84, 1969.
- 48 - MORRIS, B.J. Specific radioactivity of radioimmunoassay tracer determined by self-displacement: a re-evaluation. Clin. Chim. Acta, 73:213-6, 1976.
- 49 - MOTT, C.B. Avaliação funcional do pâncreas exócrino e da liberação de hormônios gastroentéro-pancreáticos em portadores da doença de Chagas crônica. São Paulo, 1985. (Tese de livre docência, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo).
- 50 - MULHOLLAND, M.W. & DEBAS, H.T. Physiology and pathophysiology of gastrin: a review. Surgery, 103:135-47, 1988.
- 51 - ODELL, W.D. Use of charcoal to separate antibody complexes from free ligand in radioimmunoassay. Methods Enzymol., 70:274-9, 1980.
- 52 - OJELL, W.D.; CHARTERS, A.C.; DAVIDSON, W.D.; THOMPSON, J.C. Radioimmunoassay for human gastrin using unconjugated gastrin as an antigen. J. Clin. Endocrinol., 28:1840-2, 1968.
- 53 - O'DORISIO, T.M. Gut endocrinology: clinical and therapeutic impact. Am. J. Med., 81:1-7, 1986.
- 54 - ONYANG, Ch.; MILLER, L.J.; DIMAGNO, E.P.; BRENNAN, L.A.; GO, V.L.W. Gastrointestinal hormone profile in renal insufficiency. Mayo Clin. Proc., 54:769-73, 1979.



- 55 - REHFELD, J.F. Gut hormones in clinical biochemistry. In: ALBERTI, K.G.M.M. & PRICE, C.P., eds. Recent advances in clinical biochemistry. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1981. p.129-51.
- 56 - REHFELD, J.F. Problems in the technology of radioimmunoassays for gut hormones. In: BLOOM, S.R., ed. Gut hormones. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1978. p.112-19.
- 57 - REHFELD, J.F. Three components of gastrin in human serum. Gel filtration studies, on the molecular size of immunoreactive serum gastrin. Biochim. Biophys. Acta, 285:364-72, 1972
- 58 - REHFELD, J.F.; DE MAGISTRIS, L.; ANDERSEN, B.N. Sulfation of gastrin: effect on immunoreactivity. Regul. Pep., 2:333-42, 1981.
- 59 - REHFELD, J.F.; STADIL, F.; RUBIN, B. Production and evaluation of antibodies for the radioimmunoassay of gastrin. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 30:221-32, 1972.
- 60 - REHFELD, J.F.; STADIL, F.; VIKELSØE, J. Immunoreactive gastrin components in human serum. Gut, 15:102-11, 1974.
- 61 - RODBARD, D. Quality control for RIA. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Radioimmunoassay and related procedures in medicine: proceedings of a symposium..., held in Berlin, 1977. Vienna, 1978. v.2, p.21-38.
- 62 - RODBARD, D. Statistical estimation of the minimal detectable concentration ("sensitivity") for radioligand assays. Anal. Biochem., 90:1-12, 1978.
- 63 - ROSENQUIST, G.L. & HOLMQUIST, A.M. The specificity of antibodies directed to porcine gastrin. Immunochemistry, 11:489-94, 1974.

- 64 - ROSENQUIST, G.L. & WALSH, J.H. Radioimmunoassay of gastrin. In: JERZY GLASS, G.B., ed. Gastrointestinal hormones. New York, Raven Press, 1980.
- 65 - RUSSELL, R.C.G.; FIELDING, L.P.; BLOOM, S.R.; BRYANT, M.G. Current problems in the measurement of gastrin release. A reproducible measure of physiological gastrin release. Postgrad. Med. J., 52:645-50, 1976.
- 66 - SCHRUMPF, E. & SAND, T. Radioimmunoassay of gastrin with activated charcoal. Scand. J. Gastroenterol., 7:683-7, 1972.
- 67 - SIEGEL, S. Non parametric statistics for the behavioral sciences, New York, McGraw-Hill, 1982.
- 68 - STADIL, F. & REHFELD, J.F. Preparation of  $^{125}\text{I}$ -labelled synthetic human gastrin I for radioimmunoanalysis. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 30:361-8, 1972.
- 69 - STADIL, F. & REHFELD, J.F. Radioimmunoassay of gastrin in human serum. Scand. J. Gastroenterol., Suppl., 9:61-5, 1971.
- 70 - TRONCON, L.E.A.; OLIVEIRA, R.B.; MENEGHELLI, U.G.; DANTAS, R.O.; GODOY, R.A. Fasting and food-stimulated plasma gastrin levels in chronic Chagas disease. Digestion, 29:171-6, 1984.
- 71 - WALSH, J.H. Clinical significance of gastrin radioimmunoassay. Semin. Nucl. Med. 5:247-54, 1975.
- 72 - WALSH, J.H. Gastrin heterogeneity: biological significance. Fed. Proc., 36:1948-51, 1977.
- 73 - WALSH, J.H. Radioimmunoassay of gastrin. In: ROTHFELD, B., ed. Nuclear medicine in vitro. Philadelphia, Lippincott, 1974. p. 231-48.

- 74 - WALSH, J.H. & GROSSMAN, M.I. Gastrin. N. Engl. J. Med., 292:1324-34, 1975.
- 75 - WESDORP, R.I.; FALCÃO, H.A.; BANKS, P.B.; MARTINO, J.; FISCHER, J.E. Gastrin and gastric acid secretion in renal failure. Am. J. Surg., 141:334-8, 1981.
- 76 - WILLIAMS, C.A. & CHASE, M.W. Chemical analyses. In: WILLIAMS, C.A. & CHASE, M.W., eds. Methods in immunology and immunochemistry. New York, Academic Press, 1968. v.2, p.249-342.
- 77 - WILLIAMS, R.H. Gastrointestinal hormones. In: WILLIAMS, R.H., ed. Textbook of endocrinology. Philadelphia, W.B. Saunders, 1981. p. 685-715.
- 78 - YALOW, R.S. Radioimmunoassay: a probe for the fine structure of biologic systems. Science, 200:1236-45, 1978.
- 79 - YALOW, R.S. & BERSON, S.A. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. Nature, 184:1648-9, 1959.
- 80 - YALOW, R.S. & BERSON, S.A. Labeling of proteins-problems and practices. Trans. N.Y. Acad. Sci., 28:1033-44, 1966.
- 81 - YALOW, R.S. & BERSON, S.A. Problems of validation of radioimmunoassays In: ODELL, W.D. & D. UGHADAY, W.H. eds. Principles of competitive protein binding assays. Philadelphia, J.B. Lippincott, 1971, p. 374-400.
- 82 - YALOW, R.S. & BERSON, S.A. Radioimmunoassay of gastrin. Gastroenterology, 58:1-14, 1970
- 83 - YALOW, R.S. & BERSON, S.A. Size and charge distinctions between endogenous human plasma gastrin in peripheral blood and heptadecapeptide gastrins. Gastroenterology, 58:609-15, 1970.

- 84 - YALOW, R.S. & STRAUS, E. Problems and pitfalls in the radioimmunoassay of gastrointestinal hormones. In: JERZY GLASS, G.B., ed. Gastrointestinal hormones. New York, Raven Press, 1980, p. 751-68.
- 85 - YALOW, R.S. & WU, N. Additional studies on the nature of big gastrin. Gastroenterology, 65:19-27, 1973.
- 86 - YUEN, R. & TI, T.K. Radioimmunoassay of gastrin. Our experience and a review of current status. Ann. Acad. Med. Singapore, 12:518-26, 1983.

## 7. APÊNDICE

Anexo 1 - Dados de identificação (sexo e idade) dos indivíduos normais.

Indivíduo	Sexo	Idade
A.V.	F	33
A.W.	M	24
C.M.	M	24
C.S.	M	28
E.A.	M	35
E.B.	F	26
G.P.	F	29
I.A.	F	32
I.C.	F	25
I.S.	F	45
K.O.	F	41
L.E.	F	27
L.H.	F	25
M.B.	F	26
N.F.	F	28
O.K.	F	33
O.R.	M	47
P.B.	M	43
R.A.	F	28
T.A.	F	28
T.C.	F	36
V.B.	F	37
Y.M.	F	26

Obs.: Os indivíduos aqui relacionados es  
tão incluídos no anexo 2, com excessão  
de A.W. e I.A.

Anexo 2 - Dados de identificação (sexo e idade) dos indivíduos normais.

Indivíduo	Sexo	Idade
A.O.	M	36
A.R.	M	24
A.S.	F	27
A.V.	F	33
B.C.	F	23
C.F.	F	20
C.M.	M	24
C.O.	M	24
C.S.	M	28
D.S.	M	36
E.A.	M	35
E.B.	F	26
E.P.	F	36
E.S.	F	29
F.S.	M	38
G.F.	M	51
G.P.	F	27
H.M.	F	41
I.C.	F	25
I.M.	F	28
I.S.	F	45
J.A.	M	32
J.B.	M	34
J.C.	M	53
J.G.	M	39
J.J.	M	38

<u>Indivíduo</u>	<u>Sexo</u>	<u>Idade</u>
J.N.	M	26
J.R.	F	21
J.S.	M	55
J.U.	M	35
J.Z.	M	25
K.O.	F	41
L.A.	M	30
L.C.	M	30
L.E.	F	27
L.G.	M	29
L.H.	F	25
L.N.	F	32
L.O.	F	40
M.B.	F	26
M.C.	F	55
M.D.	F	27
M.F.	F	29
M.H.	F	40
M.P.	F	19
M.R.	F	30
M.S.	F	55
N.A.	F	21
N.F.	F	28
O.G.	M	20
O.H.	F	35
O.K.	F	33
O.R.	M	47
P.B.	M	43
P.C.	F	44



<u>Indivíduo</u>	<u>Sexo</u>	<u>Idade</u>
P.R.	M	32
R.A.	F	28
R.M.	F	26
S.E.	F	21
S.S.	F	39
T.A.	F	28
T.C.	F	36
V.B.	F	37
Y.M.	F	26

Anexo 3 - Dados de identificação (sexo e idade) dos indivíduos gastrectomizados.

Indivíduo	Sexo	Idade
A.C.	M	50
C.S.	F	44
D.S.	F	44
G.M.	M	21
H.B.	F	58
J.A.	M	49
J.F.	M	55
J.J.	M	63
J.S.	M	61
J.V.	M	75
M.F.	M	42
M.S.	F	70
N.S.	M	44
S.S.	M	55

Anexo 4 - Dados de identificação (sexo, idade e grau de megaesôfago) dos indivíduos chagásicos.

Indivíduo	Sexo	Idade	Grau de megaesôfago
A.E.	M	45	II
A.F.	M	30	III
A.M.	M	56	II
B.F.	M	35	II
C.A.	F	24	II
C.D.	M	52	III
C.M.	F	31	II
D.R.	M	56	III
E.M.	M	33	II
G.R.	F	58	III
I.R.	F	32	III
I.S.	F	61	II
J.A.	F	49	II
J.D.	F	42	II
J.E.	M	52	I
J.G.	M	30	II
J.M.	M	50	I
J.N.	M	41	III
J.R.	M	33	III
J.S.	M	21	III
J.U.	F	39	II
M.R.	F	42	II
N.B.	M	37	II
N.N.	F	35	II
S.A.	M	21	II
V.C.	M	60	I
V.G.	F	35	I

Anexo 5 - Dados de identificação (sexo e idade) dos  
indivíduos portadores de anemia perniciosa.

Indivíduo	Sexo	Idade
A.E.	M	49
G.F.	M	68
J.P.	M	45
J.S.	M	48
T.C.	M	51

Anexo 6 - Dados de identificação (sexo, idade e taxa de creatinina) dos indivíduos nefropatas.

Indivíduo	Sexo	Idade	Creatinina (mg/dl)
B.P.	M	67	4,2
C.C.	F	20	4,0
C.M.	M	43	3,6
C.V.	M	66	6,6
D.B.	F	19	6,9
F.S.	F	40	6,3
I.L.	F	37	4,5
J.S.	F	45	2,5
L.C.	F	31	3,0
I.P.	F	70	3,0
M.D.	F	45	3,5
M.S.	F	18	3,2
R.B.	F	36	5,2