



CNEN/SP

ipen Instituto de Pesquisas
Energéticas e Nucleares

VA

CARACTERÍSTICAS E NORMAS TÉCNICAS DO CONJUNTO DE
REATIVO ("kit") PARA O DOSEAMENTO DE INSULINA
HUMANA, POR RADIOIMUNOENSAIO

Carlos Henrique Mesquita, Constância Pagano Gonçalves Silva e Margarida Mizue Hamada

IPEN - PUB -- 84

PUBLICAÇÃO IPEN 84

NOVEMBRO/1985

SÃO PAULO

PUBLICAÇÃO IPEN 84



ISSN 0101-3084

NOVEMBRO/1985

**CARACTERÍSTICAS E NORMAS TÉCNICAS DO CONJUNTO DE REATIVO
("kit") PARA O DOSEAMENTO DE INSULINA HUMANA,
POR RADIOIMUNOENSAIO**

Carlos Henrique Mesquita, Constance Pagano Gonçalves Silva e Margarida Mizue Hamada

DEPARTAMENTO DE PROTEÇÃO RADIOLÓGICA

**CNEN/SP
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
SÃO PAULO - BRASIL**

Série PUBLICAÇÃO IPEN

INIS Categories and Descriptors

C45.00

INSULIN
RADIOIMMUNOASSAY

CARACTERÍSTICAS E NORMAS TÉCNICAS DO CONJUNTO DE REATIVO ("kit") PARA O DOSEAMENTO DE INSULINA HUMANA, POR RADIOIMUNOENSAIO

Carlos Henrique Mesquita, Constância Pagano Gonçalves Silva e Margarida Mizue Hamada

RESUMO

Descrevem-se as características metodológicas do conjunto de reativos para a dosagem de insulina por radioimunoensaio preparado no IPEN-CNEN/SP.

Foram avaliados sucintamente: a atividade específica da insulina- ^{125}I , a constante de afinidade K da reação antígeno-anticorpo, a comparação entre dois procedimentos de purificação da radioinsulina, a dose mínima detectável pelo radioimunoensaio, a cinética de degradação da radioinsulina imunorreativa, o perfil de precisão do ensaio, o efeito da temperatura de incubação no desempenho do radioensaio e os valores de normalidade.

THE INSULIN RADIOIMMUNOASSAY kit PREPARED BY IPEN-CNEN/SP TECHNICAL SPECIFICATIONS

ABSTRACT

The specifications and methodological aspects of the insulin radioimmunoassay kit produced by IPEN-CNEN/SP are described.

The limitations, taking care and the followings quality control parameters or procedures are discussed: specific radioactivity, comparison between two insulin- ^{125}I purification procedures, affinity constant "K" of the antigen-antibody reaction, minimal detectable dose (MDD), kinetics degradation of the radioinsulin, radioassay imprecision profile, radioassay performance temperature dependence and normal values histogram.

1 - INTRODUÇÃO

A dosagem do nível sérico da insulina tem sido utilizada com muita frequência na diagnose e pesquisa médica moderna.

Dentre as técnicas mais utilizadas para a quantificação da concentração de insulina, o radioimunoensaio (RIE) tem sido preferido devido a sua extrema simplicidade operacional e qualidade metodológica⁽¹⁾.

Tradicionalmente, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, CNEN/SP tem-se destacado como uma das principais instituições do país na difusão da metodologia dos RIE^(7,13,20,22). Nesse

sentido, propusemo-nos a ampliar esta contribuição mediante a produção dos reagentes básicos necessários para o doseamento da insulina, viabilizado na forma de conjuntos de reativos ou "kit".

O propósito deste trabalho é relatar as características metodológicas do "kit-insulina", os cuidados especiais na sua utilização e descrever suas limitações.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 - Insulina-¹²⁵I

2.1.1 - Marcação da Insulina com ¹²⁵I

A insulina é radioiodada pelo método subestequiométrico da Cloramina T descrito por Freychet e col.⁽⁴⁾. Apenas marcações com rendimentos superiores a 60% são utilizadas para fornecimento.

2.1.2 - Purificação da Insulina-¹²⁵I

O substrato marcado com ¹²⁵I foi purificado em:

- a) Coluna cromatográfica de dimensão 1 x 30 cm (diâmetro, altura) preenchida com sephadex G-50 fino (partículas tamanho 20-80 µm)⁽²¹⁾.
- b) Coluna com dimensões 0,7 x 4 cm (diâmetro, altura) de celulose Whatman CF 11 (medium length Libres, ash max 0,015%) de acordo com Yalow e Berson⁽¹⁾. Uma pequena alíquota de insulina purificada por este processo é cromatografada em uma coluna de sephadex G-50 para a avaliação do seu grau de pureza, utilizando-se o mesmo procedimento do item "a" acima descrito. A seguir a insulina-¹²⁵I é diluída em Tampão Veronal 0,05M pH 8,6 com 0,33% de soro albumina bovina (BSA) de modo a se obter a radioatividade volumétrica de aproximadamente $2,4 \times 10^6$ cpm/ml e conservada no congelador (-20°C).

2.1.3 - Determinação de Atividade Específica da Insulina-¹²⁵I

A atividade específica do produto marcado é determinada pelo método do auto deslocamento descrito por Morris⁽¹¹⁾.

2.2 - Anticorpo Anti-insulina

2.2.1 - Produção do Anti-soro Anti-insulina

O anti-soro, anti-insulina foi preparado segundo, os procedimentos descritos por Yalow⁽²³⁾ e utilizado no radioimunoensaio na diluição final de 1:150 000.

2.2.2 - Anti-soro Utilizado nos Ensaios

O anti-soro foi diluído em Tampão Veronal 0,05M pH 8,6 + 0,33% de BSA, numa diluição de 1:50 000 e conservado a -20°C.

2.3 - Soros de Referência (Padrões)

2.3.1 - Preparação da Mistura de Soros Humanos Isenta de Insulina (Soro STRIP)

Na preparação de soros de referência (padrões) utilizou-se uma mistura de soros humanos ("pool"), selecionados de pessoas consideradas normais, na qual extraiu-se a insulina presente. A extração da insulina endógena foi realizada utilizando-se carvão ativado, segundo a técnica descrita por Heyns⁽⁶⁾.

2.3.2 - Preparação de Soluções Séricas Concentradas de Insulina

Solução α : é preparada a partir da insulina cristalizada, mediante o seguinte protocolo:

Pesar 1000 μg da insulina porcina cristalizada
Adicionar 50 μl de solução de HCl 1N
Completar volume para 1000 μl com água destilada
Concentração final = $25 \times 10^6 \mu\text{U/ml}$.

Solução β :

Aliquotou-se 5 μl da solução α e diluiu-se em 12,5 ml de soro "strip". A concentração final da solução β corresponde a $10^4 \mu\text{U/ml}$ ^(*).

2.3.3 - Preparação dos soros referenciais para definir a curva de dose resposta (curva padrão).

Soro referência 200 $\mu\text{U/ml}$

Solução β 200 μl

Soro "STRIP" q.s.p. 10 ml

Soro referência 100 $\mu\text{U/ml}$

Solução β 100 μl

Soro "STRIP" q.s.p. 10 ml

Soro referência 50 $\mu\text{U/ml}$

Solução β 50 μl

Soro "STRIP" q.s.p. 10 ml

Soro referência 25 $\mu\text{U/ml}$

Solução β 25 μl

Soro "STRIP" q.s.p. 10 ml

Soro referência 10 $\mu\text{U/ml}$

Solução β 10 μl

Soro "STRIP" q.s.p. 10 ml

Soro referência 0 $\mu\text{U/ml}$

Utilizou-se o próprio soro "STRIP".

A seguir dividiu-se o conteúdo de cada frasco em alíquotas de 1 ml (2 ml de soro referência de 0 $\mu\text{U/ml}$) e foram conservados a -20°C .

2.3.4 - Caracterização dos Valores de Normalidade

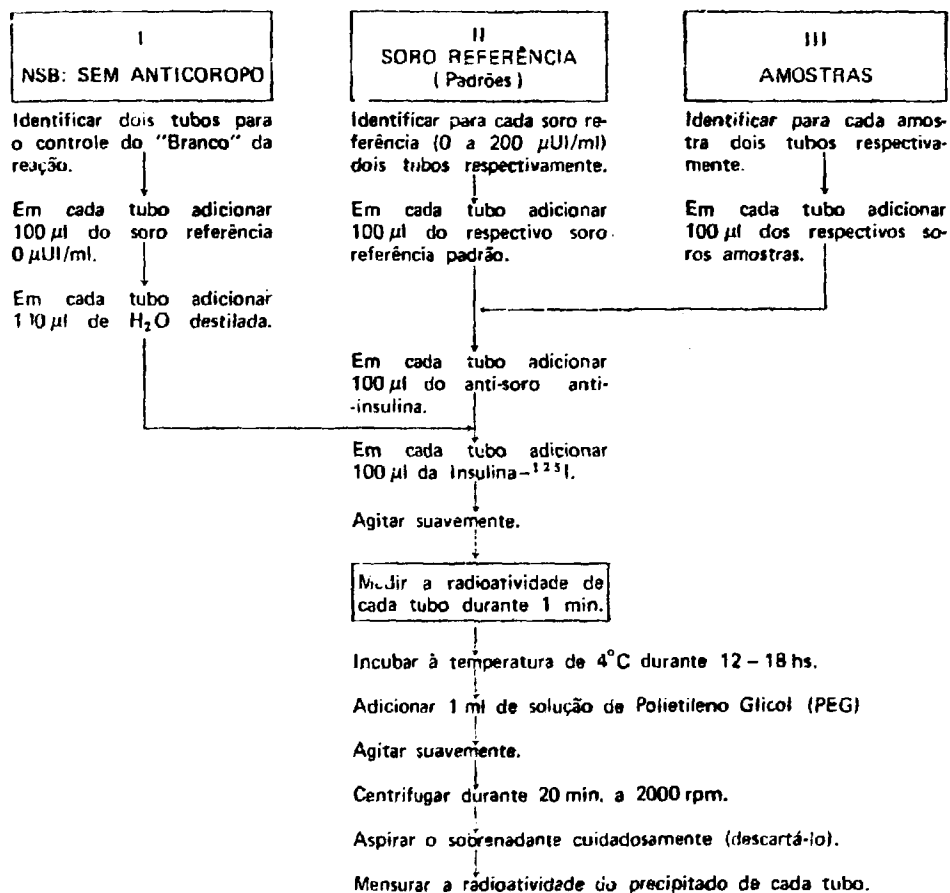
Foram dosados 26 soros de pessoas consideradas normais, amostrados em jejum.

(*) $\mu\text{U/ml}$ - Unidade de concentração da insulina que representa Micro Unidades Internacionais por Mililitro. Terminologia usada pelos profissionais da área.

Para dois destes 26 indivíduos acima referidos foram administrados 75 g (via oral) de glicose e colheram-se amostras nos seguintes tempos após ingestão do estimulante: 30 min., 60 min., 90 min., 120 min., 180 min.

2.4 - Protocolo do Radioimunoensaio da Insulina

O protocolo geral do radioimunoensaio adotado no "kit" encontra-se esquematizado na Figura 1.



(*) NSB representa o nível de ligações não específicas que ocorrem entre a insulina independentemente da participação do anti-soro.

Figura 1 — Protocolo Geral do Radioimunoensaio do "kit" Insulina.

2.5 - Processamento dos Dados

Os cálculos relativos à avaliação da atividade específica da insulina-¹²⁵I, da análise de Scatchard⁽¹⁸⁾ isto é caracterização das constantes: K, q e $K_n q_n$ definidas no item 3.2.1, da dose mínima significativa, dos perfis de precisão e dos simulados para diferentes temperaturas foram processados em computador IBM/370 utilizando-se o sistema GARLA^(9,10) disponível no Departamento de Processamento de Dados do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares — CNEN/SP.

3 - RESULTADOS E COMENTÁRIOS

3.1 - Características da Insulina- ^{125}I

Os dados a seguir reúnem os resultados do comportamento da radioinsulina purificada em coluna de sephadex G-50 e em coluna de celulose Whatman, CF 11. A Figura 2 mostra os radiocromatogramas do extrato marcado processado com e sem a purificação em coluna de celulose CF 11.

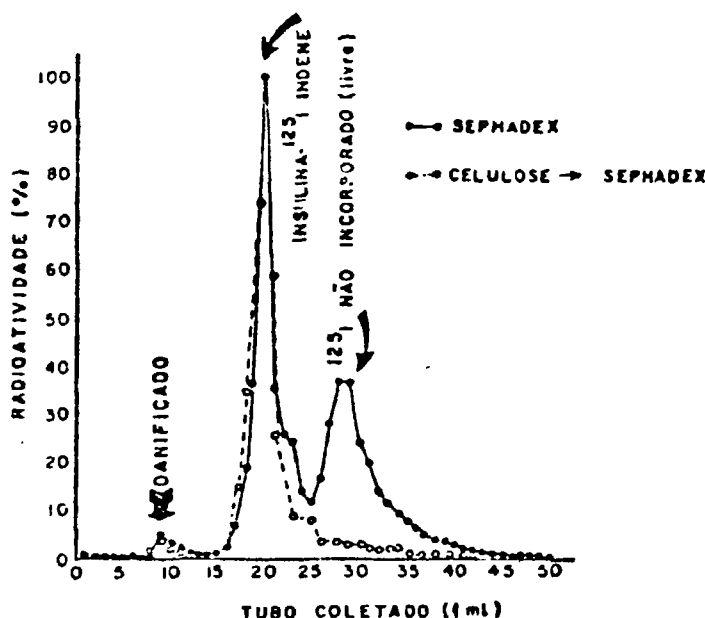


Figura 2 — Radiocromatogramas de Extratos Marcados de Insulina- ^{125}I .

Como se observa, a insulina- ^{125}I purificada em celulose é praticamente pura pois a fração indene correspondeu a quase totalidade da radioatividade frente daquela denominada "danificada" e a do ^{125}I -livre.

A Tabela I reúne dados comparativos de parâmetros do radioimunoensaio calculados a partir das duas fontes de radioinsulina: purificada em sephadex e em celulose. Os resultados desta tabela apontam a purificação pela celulose como a mais adequada pois, com esse processo obteve-se índice mais elevado da capacidade de ligação (Bo/T)^(*), constante de afinidade "K" mais elevada sem comprometer o desempenho geral dos demais parâmetros.

Tabela I
Análise Comparativa das Características da Radioinsulina- ^{125}I Purificada em
Sephadex G-50 e em Celulose CF 11

PARÂMETRO	PURIFICAÇÃO	
	SEPHADEX	CELULOSE
Atividade específica	253 Ci/g	229 Ci/g
Constante de afinidade K	$38 \times 10^9 \text{ L/Mol}$	$48 \times 10^9 \text{ L/Mol}$
Bo/T	27%	37%
NSB (não específico)	5%	5%
*50%(**)	30 uUI/ml	40 uUI/ml
Inclinação da curva ('Slope')	0,95	1,0

(*) Bo/T é a razão do nível da radioatividade do complexo anticorpo-insulina ^{125}I pela radioatividade total T da Insulina- ^{125}I adicionada no tubo de reação, na ausência de insulina fria (padrão 0).

(**) *50% representa a concentração do hormônio frio necessário para deslocar o valor de B/T ao nível de 50% do inicial (Bo/T).

3.1.2 - Atividade Específica da Insulina- ^{125}I

A Figura 3b mostra os resultados da atividade específica da Insulina- ^{125}I marcada, em sete ensaios. O valor médio daqueles resultados foi de 196 ± 33 Ci/g. Esse valor permite-nos estimar que a incidência de átomos de ^{125}I por molécula de insulina é da ordem de $0,5$ ^{125}I /molécula, indicando-se que a atividade específica da insulina fornecida é de no mínimo 130 Ci/g e no máximo 260 Ci/g.

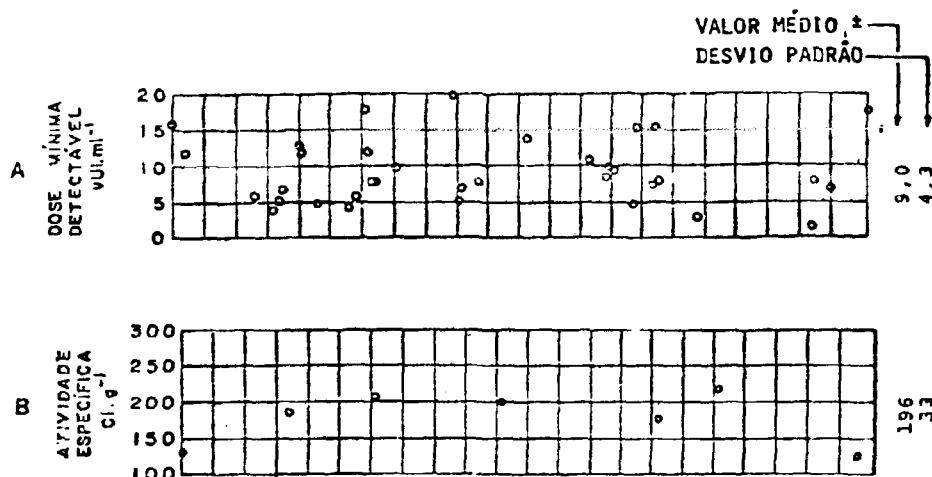


Figura 3 - Estudo Sistemático ao Longo de 220 Dias da Dose Mínima Detectável em 35 Radioensaios (A) e da Atividade Específica da Radioinsulina Referente a Sete Radiomarcações (B).

3.1.3 - Prazo de Validade da Insulina- ^{125}I

A Figura 4 mostra, ao longo de 124 dias, o comportamento cinético da degradação de três amostras da Insulina radioiodada e conservadas em temperaturas a -20°C .

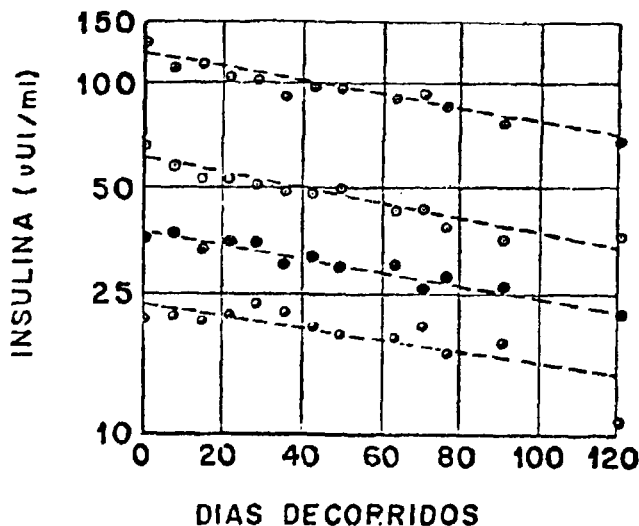


Figura 4 - Determinação da Concentração Química de Três Amostras de Insulina- ^{125}I em Diferentes Níveis de Radioatividade.

- → amostra contendo inicialmente 230.000 cpm
- ◻ → amostra contendo inicialmente 110.000 cpm
- → amostra iodada fria (^{125}I -Insulina)
- ◐ → amostra contendo inicialmente 60.000 cpm

As três retas exponenciais se ajustaram à equação $C(t) = C_0 e^{-\delta t}$ onde "t" representa o tempo decorrido, δ é a constante de degradação cujo valor médio foi de 0,0045, C_0 a concentração inicial e $C(t)$ a concentração relativa ao dia "t". De acordo com esse tipo de decaimento químico da concentração, o prazo de validade pode ser estimado pela expressão:

$$P_v = \frac{\ln I}{\delta} \quad (1)$$

onde: I é a fração indene da radioinsulina, isto é, da radioatividade total "T" somente a fração "I" corresponde a fração imunorreativa.

Particularmente, adotamos como condição de validade o tempo em que o produto marcado atinge o nível de 80% de sua integridade inicial e portanto mediante a aplicação da expressão (1) o prazo de validade da insulina é da ordem de 50 dias.

3.2 - Características do Anti-soro Anti-insulina Porcina Empregado

3.2.1 - Constante de Afinidade, Heterogeneidade do Anti-soro e Concentração Molar

A Figura 5 mostra o resultado gráfico da análise de Scatchard na qual associa a razão B versus $B/F = \frac{B/T^*}{1 - B/T}$ permitindo daí inferir a constante de afinidade "K" e a concentração molar "q" do anti-soro.

O comportamento não linear da curva da Figura 5 sugere que o anti-soro empregado deve conter mais de um tipo de sítio de ligação.

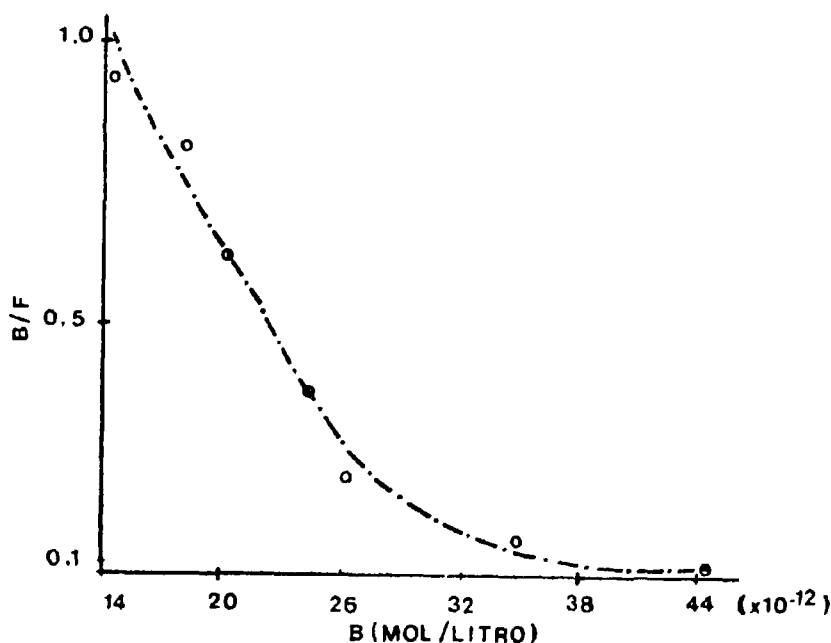


Figura 5 - Traçado da Curva de Scatchard do Ensaio da Insulina Incubado a 4°C. O Sinal '+' corresponde ao Valor Teórico Calculado a Partir dos Valores de K_1 , q_1 e $K_n q_n$ Constantes na Tabela II. O Sinal 'x' Corresponde ao Valor Experimental.

(*) B/T é a razão do nível de radioatividade do complexo anticorpo-Insulina- ^{125}I pela radioatividade total T adicionada. F corresponde a fração da Insulina- ^{125}I não ligada ao anticorpo.

Os dados experimentais contidos na Figura 5 se ajustaram adequadamente ao modelo analítico de dois tipos de sítios de ligação, expresso pela função.

$$\frac{B/T}{1 - B/T} = \frac{K_1 q_1}{1 + K_1 [x] \cdot (1 - B/T)} + K_n q_n \quad (2)$$

representativo de duas populações de moléculas das quais uma específica e saturável e outra não específica e insaturável. Nesta equação K_1 representa a constante de afinidade propriamente dita, " q_1 " a concentração molar das moléculas de anti-soro, $[x]$ a concentração de insulina empregada no ensaio e $K_n q_n$ o produto representativo das ligações denominadas de "não-específica"⁽¹⁵⁾.

3.2.2 - Efeito da Temperatura na Capacidade Imunor. ativa

A Tabela II mostra os resultados das constantes K_1 e do produto $K_n q_n$ de três ensaios efetuados respectivamente a 4°C, 20°C, e 37°C, utilizando os mesmos reagentes. Os valores de K_1 mostraram-se comparáveis àqueles relatados em literatura⁽⁸⁾. Dessas dados infere-se que a reação da insulina com o seu anti-soro é fortemente influenciada pela temperatura pois a diferença da capacidade de ligação refletida pelo valor da constante K_1 foi ponderável. Como consequência, sugere-se especial atenção quanto a manutenção da temperatura nas diversas fases da dosagem (período de incubação, centrifugação).

Tabela II

Resultados da Constante de Afinidade K_1 do Sítio Específico e do Produto $K_n q_n$ das Ligações não Específicas. Abaixo indica-se a Concentração Molar Calculada do Anti-soro Utilizado na Reação

TEMPERATURA	CONSTANTE DE AFINIDADE K_1 (l/mol)	$K_n q_n$ (NÃO ESPECÍFICA)
4°C	86×10^9	47×10^{-3}
20°C	84×10	65×10^{-3}
37°C	30×10^9	59×10^{-3}

Concentração do anti-soro = 23×10^{-12} mol/l.

Em virtude do elevado valor de K_1 obtido à temperatura de 4°C frente as demais temperaturas preferiu-se padronizar o protocolo do ensaio àquela temperatura (4°C). Na Figura 6 é demonstrado o efeito da temperatura de incubação no comportamento da curva padrão do radioensaio. Como se nota, as temperaturas de incubação mais baixas geram curvas-padrão mais sensíveis.

3.2.3 - Prazo de Validade

De acordo com experimentos ainda não compilados a validade do anti-soro conservado em congelador (aproximadamente -20°C) é de pelo menos 1 ano.

3.3 - Características dos Soros de Referência (padrões)

3.3.1 - Exatidão

A Tabela III mostra os resultados de concentração dos 6 soros de referência dosados em três laboratórios conceituados.

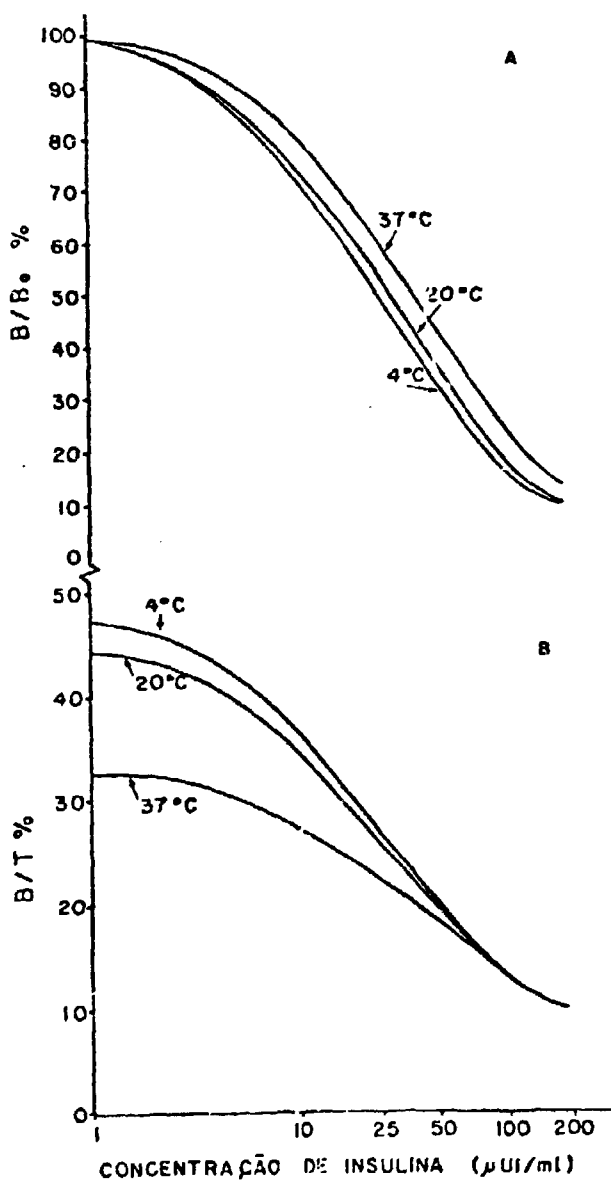


Figura 6 - Efeito da Temperatura de Incubação do Radioensaio no Comportamento do Traçado da Curva Padrão. Em "A" Mostram-se as Curvas-padrão Traçadas com Ordenada $B/B_0\%$ e em "B" Traçadas com Ordenada $B/T\%$.

Tabela III

Avaliação da Exatidão dos Soros de Referência (padrões). Laboratórios A e B Utilizam Reagentes Preparados "in loco". Laboratório C Utilizou "kit" de Reativos Importado

PADRÃO (μUI/ml)	LABORATÓRIO			MÉDIA ± 1 D.P. (C.V. %)° (μUI/ml)
	A	B	C	
	(μUI/ml)			
0	7	5	2	4,7 ± 2,5 (54%)
10	12	15	8	11,7 ± 3,5 (30%)
25	32	22	27	27,0 ± 5,0 (19%)
50	54	60	47	53,7 ± 6,5 (12%)
100	115	92	118	108,3 ± 14,2 (13%)
200	230	189	212	210,3 ± 20,6 (10%)

(*) D.P. = desvio padrão

C.V. % = coeficiente de variação percentual

Esta tabela sugere que o nível de exatidão na preparação dos soros de referência é da ordem de 10% a 30%, não descontando a variação interensaio.

3.3.2 - Prazo de Validade dos Soros de Referência

Os soros de referência conservados em congelador tem duração de pelo menos 4 meses.

3.4 - Valores de Normalidade

3.4.1 - Valores Basais

A Figura 7 mostra o histograma relativo a 26 indivíduos considerados normais amostrados em jejum. O valor médio é de $8 \pm 6 \mu\text{UI/ml}$ cuja faixa de normalidade basal é de 0 a $20 \mu\text{UI/ml}$ ao nível estatístico de $P = 0.05$.

3.4.2 - Teste Dinâmico Estimulado com Glicose

A Figura 8 mostra valores típicos para o teste de estímulo com glicose (75 g via oral).

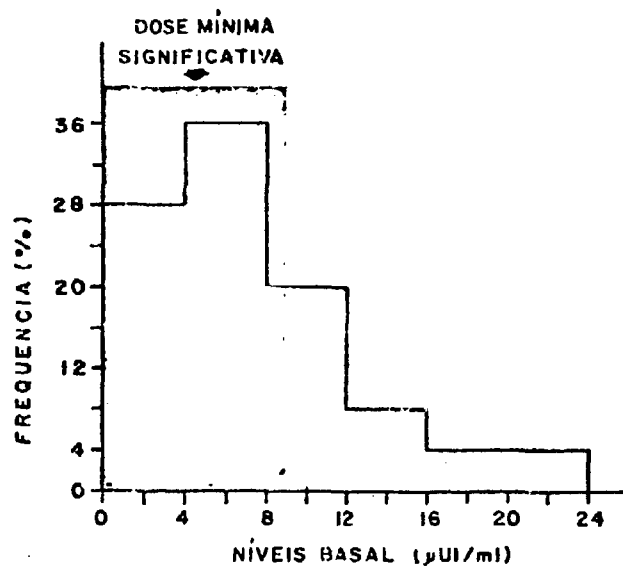


Figura 7 - Distribuição de Frequência de Valores Basais da Insulina de 26 Indivíduos Considerados Normais. A Faixa Achureada Corresponde ao Nível de Concentração Indetectável pelo Método.

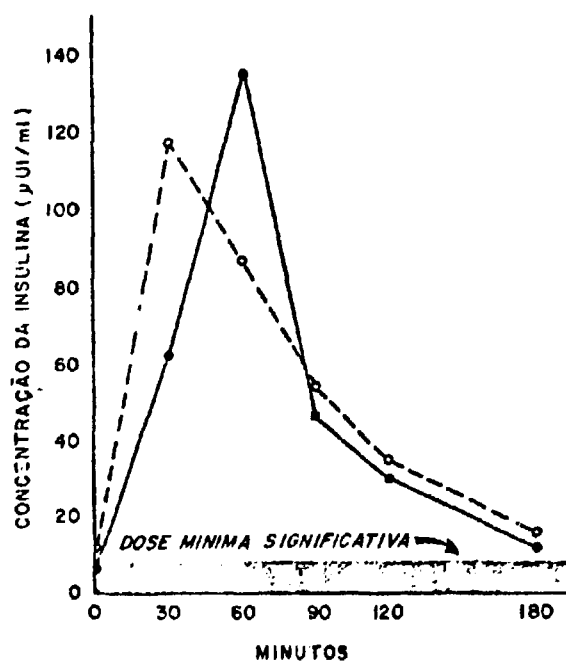


Figura 8 - Perfis de Concentrações Típicos da Prova de Estímulo com Glicose. Resultados de dois Casos.

3.5 - Aspectos Metodológicos Gerais

3.5.1 - Presença de Anti-soro Anti-insulina no Soro a ser Dosado

Com muita frequência, pacientes diabéticos com medicação de insulina heteróloga geram anti-soro contra esta insulina⁽¹⁹⁾. Este anti-soro, dependendo de sua concentração e da sua constante de afinidade, poderá interferir no resultado da insulina imunorreativa. Nesses casos, o "kit-insulina" poderá ainda ser usado desde que se elimine a presença do auto-anti-soro endógeno. Algumas técnicas podem ser utilizadas para esse propósito^(2,5,12,14,19).

3.5.2 - Volume de Soro a ser Dosado.

A solução de Polietileno Glicol (PEG) a 20% utilizada como reagente promotora da precipitação, do complexo antígeno-anticorpo necessita de uma quantidade mínima de soro para ser capaz de realizar sua função.

O volume de dosagem sugerido, (100 μ l) constitui-se em quantidade de soro adequada. Volumes séricos menores do que 100 μ l poderão comprometer a precipitação. Quando se fizer necessário diluir o soro com vistas de reduzir a quantidade de insulina, a nível compatível com os limites da curva padrão (entre aproximadamente 5 a 500 μ UI/ml), tal diluição deverá ser feita utilizando-se soro livre de insulina cuja obtenção é descrito no item 2.3.1.

3.5.3 - Efeito da Temperatura Durante a Incubação

Como se observa na Figura 6b ao se aumentar a temperatura de incubação diminui-se o nível de ligação do complexo antígeno-anticorpo. Ao redimensionar o ensaio procurando recuperar os níveis de ligação obtidos pela incubação a baixa temperatura tem-se que aumentar a concentração do anti-soro, mas como consequência perde-se a sensibilidade da curva conforme se verifica na Figura 9.

Na Figura 10 comparam-se os resultados de 43 amostras dosadas simultaneamente, nas temperaturas de 4°C, 20°C e 37°C.

Como se observa dessa figura, os resultados do ensaio com a incubação à 4°C e à 20°C apresentam razoável correlação pois a maioria de seus pontos encontram-se espalhados em torno da reta bissetriz (Relação ideal 4°C & 20°C).

Com a mesma conduta, observa-se que os resultados provenientes das incubações a 4°C e a 37°C já não mostram a qualidade da correlação entre 4°C e 20°C.

A Figura 10 sugere que ao se aumentar a temperatura de incubação perde-se a qualidade de correlação frente aos resultados da incubação de 4°C. Em função dessas observações e daquelas já mencionadas sobre a Figura 9 selecionou-se a temperatura de 4°C como a mais indicada para o radio-ensaio da insulina.

3.5.4 - Dose Mínima Significativa

O nível mínimo da concentração sérica da insulina calculado segundo os conceitos de Ekins⁽³⁾ e Rodbard e col.^{(16,17)(20)} é de aproximadamente 9 μ UI/ml conforme dados da Figura 3a.

3.5.5 - Perfil de Precisão do Ensaio

A Figura 11 mostra o perfil de precisão intra-ensaio e inter-ensaio.

Quando o ensaio é efetuado em tubos em duplicata, o nível de imprecisão das dosagens referentes ao mesmo ensaio (intra-ensaio) é da ordem de 10% na faixa de 20 a 140 μ UI/ml. Por outro lado quando a amostra é repetida em diferentes ensaios ou dias, a dispersão de seus resultados é da ordem de 36% a 15% na faixa de 20 a 140 μ UI/ml, conforme se infere das Figuras 11 e 12.

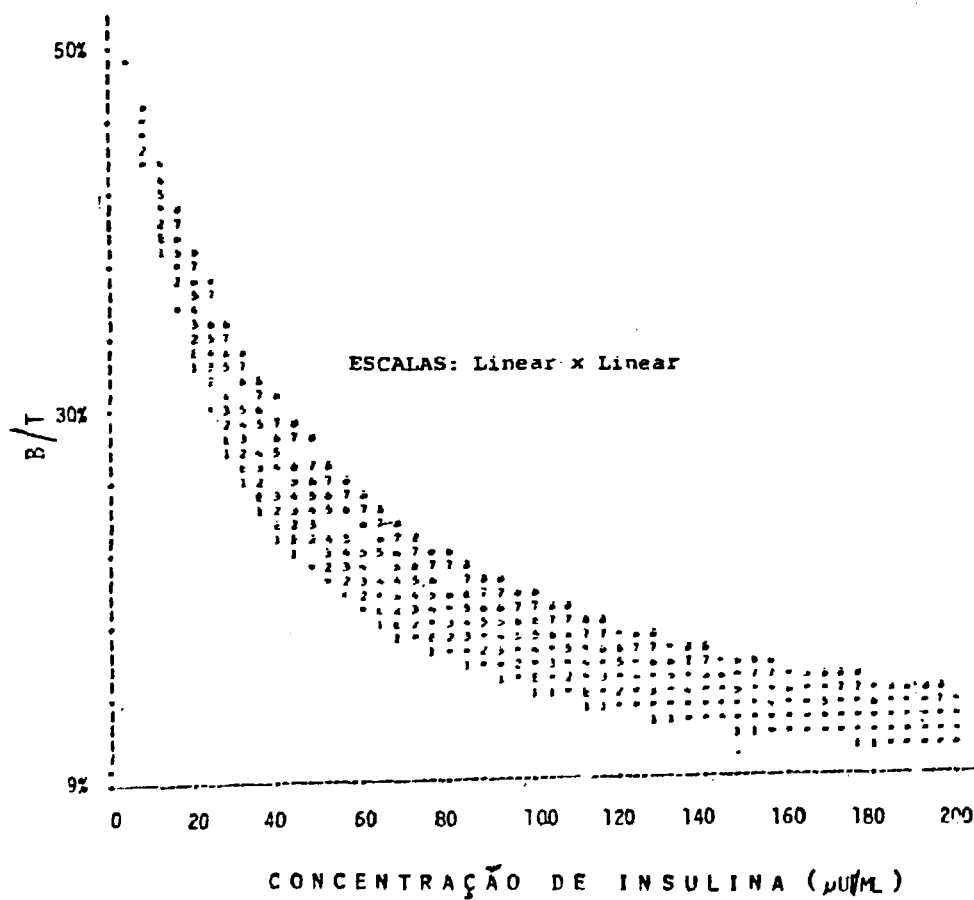


Figura 9 — Curvas-padrão Relativas a Diversas Temperaturas de Incubação Utilizando-se Concentração de Anti-soro Capaz de Complexar com 50% da Insulina Radioativa na Ausência de Insulina Fria.

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

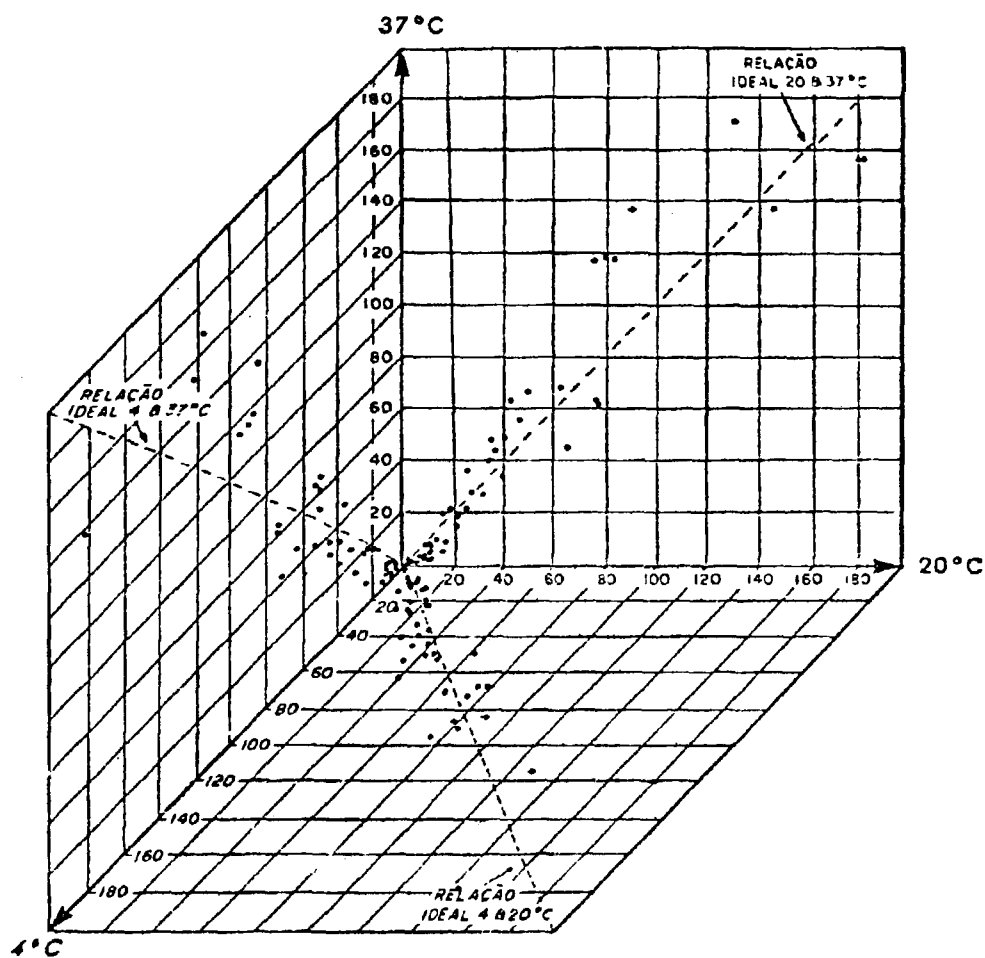


Figura 10 — Correlação de Resultados dos Radioimunoensaios da Insulina Realizados nas Três Diferentes Temperaturas.

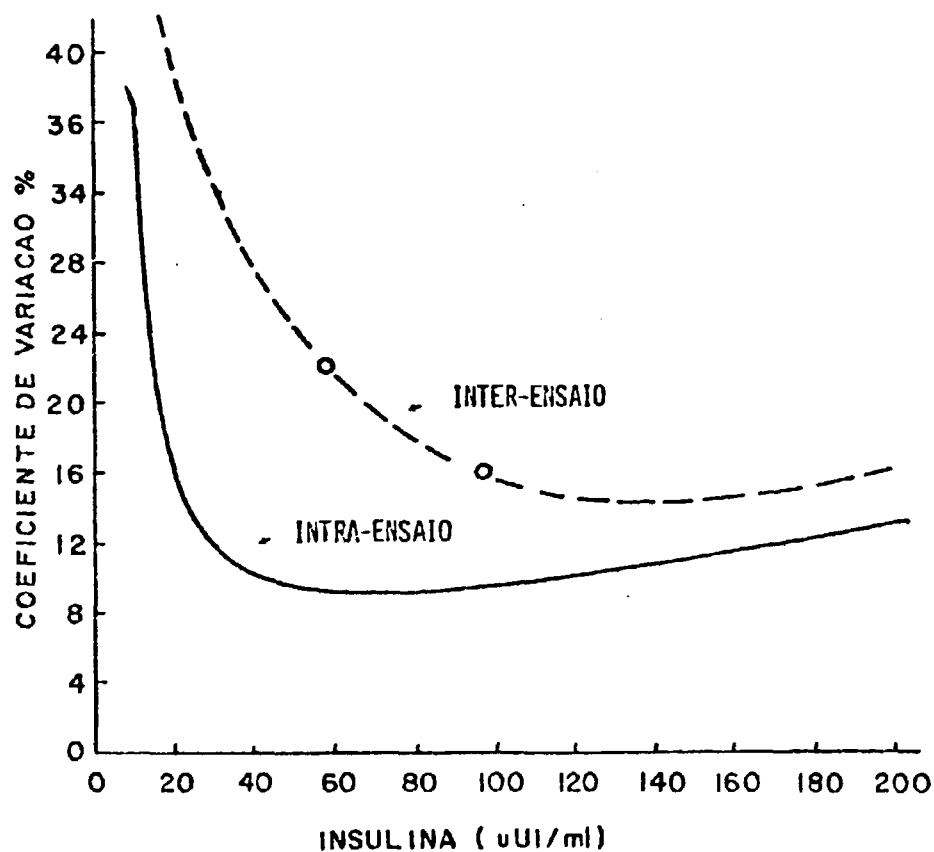


Figura 11 - Perfil de Imprecisão Intra-ensaio (média de diversos ensaios) e Inter-ensaio. A curva Representativa da Imprecisão Inter-ensaio foi Traçada a Partir de Três Pontos dos quais um Encontra-se Fora da Escala Apresentada (Baixa Concentração).

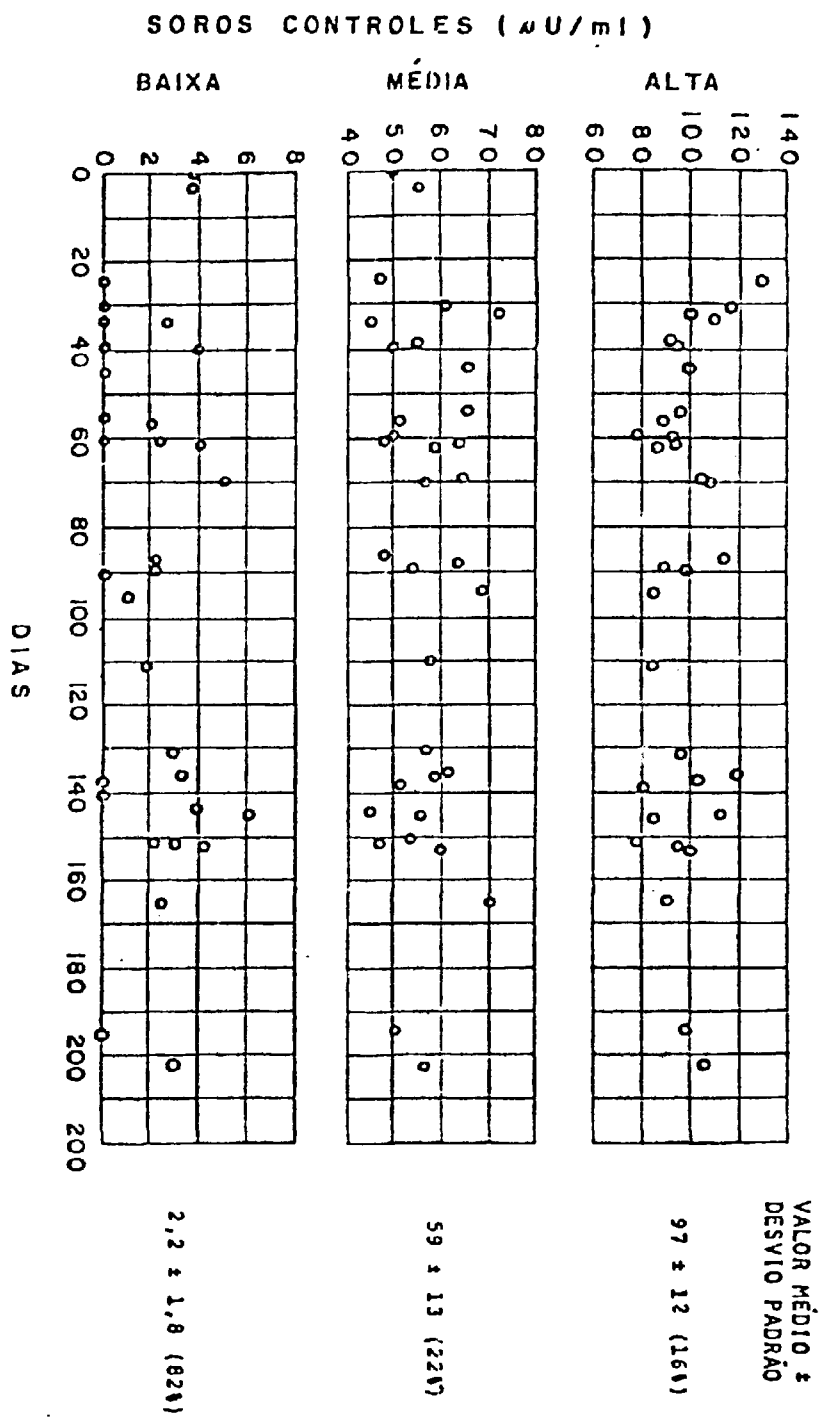


Figura 12 — Variação Inter-ensaio de Três Amostras Doseadas Sistemáticamente.

4 - CONCLUSÕES

- 1 - O reagente marcado possui aproximadamente 0,5 átomo de ^{125}I por molécula de insulina.
- 2 - A atividade específica da radioinsulina é de $196 \pm 33 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$.
- 3 - O prazo de validade da Insulina- ^{125}I é de 50 dias.
- 4 - O anti-soro empregado apresenta constante de afinidade igual a $85 \pm 13 \times 10^{-9} \text{ l/mol}$ a 4°C .
- 5 - Seguindo-se o protocolo proposto a concentração molar do anti-soro na reação é de $20 \pm 14 \text{ pmol/l}$.
- 6 - A temperatura de incubação apropriada é a de 4°C .
- 7 - A exatidão dos soros de referência (padrões) é de 10% a 30%.
- 8 - Os valores de normalidade a nível sérico basal é de $8 \pm 6 \mu\text{UI/ml}$ correspondente a faixa de 0 a $20 \mu\text{UI/ml}$ ao nível de $\alpha = 0,05$.
- 9 - A imprecisão dos resultados de um mesmo ensaio (imprecisão intra-ensaio) é de aproximadamente de 10% na faixa de concentração de 20 a $140 \mu\text{UI/ml}$.
- 10 - A imprecisão dos resultados de dosagens efetuados em diferentes dias (imprecisão inter-ensaio) é de 36% a 15% na faixa de 20 a $140 \mu\text{UI/ml}$.
- 11 - O nível de dose mínima detectável é de aproximadamente $9,0 \pm 4,3 \mu\text{UI/ml}$.

AGRADECIMENTOS

Durante as fases experimentais e do processamento de dados, este trabalho contou com a inestimável cooperação do acadêmico José Augusto Carrinho Antonio ao qual expressamos os nossos agradecimentos e amizade.

Agradecemos a Srta. Maria de Fátima Alvim a sua dedicação, presteza e paciência dispensada na datilografia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BERSON, S. A. & YALOW, R. S. General methodology. In: YALOW, R. S. *Methods in radioimmunoassay of peptide hormone*. Amsterdam, North-Holland, 1978. p.14-17.
2. BERSON, S. A. & YALOW, R. S. Immunoassay of plasma insulin. *CIBA Coll. Endocrinol.*, 41:182, 1962.
3. EKINS, R. & NEWMANN, B. Theoretical aspects of saturation analysis. In: RESEARCH methods in reproductive endocrinology: Karolinska 2nd symposium on steroid assay by protein binding, held in Geneva, 1970. p.11-38.
4. FREYCHET, P.; ROTH, J.; NEVILLE JR, D. M. Monoiodoinsulin: demonstration of its biological activity and binding to hot cells and liver membranes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 43:400-8, 1971.

5. HEDING, L. G.; KASPERSKA.; CZYZYKOWA, T. C. Peptide and proinsulin after oral glucose. *Acta Med. Scand.* (in print).
6. HEYNS, W.; VAN BAELEN.; MOOR, P. Study of steroid binding by means of competitive adsorption: application to cortisol binding in plasma. *Clin. Chim. Acta*, 18:361-70, 1967.
7. HIGA, O. Z.; SOUZA, I. T. T.; WAJCHENBERG, B. L.; MARTINS, H. P.; PIERONI, R. R. Standardization of radioimmunoassay technique for determination of plasma insulin and growth hormone. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Radioimmunoassay and related procedures in medicine: proceedings of a symposium held in Istanbul, 10-14 September 1973*. Vienna 1974. V.2 p.291-307.
8. KEANE, P. M.; WALKER, W. H. C.; GAULDIE, J.; ABRAHM, G. Thermodynamic aspects of some radioassays. *Clin. Chem.*, 22(1):70-3, 1976.
9. MESQUITA, C. H. *Elaboração e avaliação do desempenho de programa computacional destinado ao controle de qualidade de ensaios radioligantes. Aplicação ao radioensaio de insulina*. São Paulo, 1973. (Dissertação de Mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares).
10. MESQUITA, C. H. & GOUVEA, A. S. GARLA: sistema computacional para a análise de ensaios radioligantes. In: GRANZOTTO, A.; GOUVEA, A.; LOURENÇO, E. M. eds. *Compilação dos resumos dos códigos nucleares disponíveis no CPD/IPEN*. São Paulo, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, junho 1981. p.71.
11. MORRIS, B. J. Specific radioactivity of radioimmunoassay tracer determined by self-displacement: a re-evaluation. *Clin. Chim. Acta* 73:312-, 1976.
12. NAGIB, N.; MESQUITA, C. H.; KIEFFER, J.; DECOUR, J. Dosagem de dióxido de guaiacol no plasma por técnica de radioimunoensaio, metodologia e comentários. In: SOCIEDADE Brasileira de Cardiologia. *Cardiologia: congresso brasileiro realizado em Curitiba 1972*. s.p.
13. NAKAGAWA, S.; NAKAYAMA, H.; SASAKI, T.; YOSHINO, K.; YING, Y.Y.; SHINOZAKI, K.; AOKI, S.; MASHIMO, K. A simple method for the determination of serum free insulin levels in insulin-treated patients. *Diabetes*, 22:590, 1973.
14. PEARSON, M. J. & MARTIN, F. F. R. The separation of plasma insulin from binding proteins using gel filtration: its application to the measurement of rate of insulin disappearance. *Diabetologia*, 6:581, 1970.
15. PRIORI, R. L. & ROSENTHAL, H. E. A statistical method for the estimation of binding parameters in a complex system. *Anal. Biochem.*, 70:231-40, 1976.
16. RODBARD, D. & LEWALD, J. E. Computer analysis of radioligant and radioimmunoassay data. In: RESEARCH methods in reproductive endocrinology: Karolinska 2nd symposium on steroid assay by protein binding held in Geneva, 1970. p.79-92.
17. RODBARD, D.; MUNSON, P. J.; DELEAN, A. Improve curve fitting parallelism testing characterization of sensitivity and specificity, validation and optimization of radioligant assay. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Radioimmunoassay and related procedures in medicine: proceedings held in Berlin, 31 October-4 November, 1977*. Vienna, 1978. V.2 p.469-514.
18. SCATCHARD, G. The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 51:660-72, 1949.

19. SOUZA, I. T. T. & WAJCHENBERG, B. L. Avaliação e padronização de método para determinação de níveis de insulina total e livre em plasma contendo anticorpos antinsulina. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.*, 27(2):81-5, 1983.
20. SOUZA, I. T. T.; HIGA, O. Z.; WAJCHENBERG, B. L.; MARTINS, H. P.; PIERONI, R. R. Aplicação do método do radioimunoensaio da dosagem da insulina no plasma humano. *Rev. Ass. Médica bras.*, 20(1):41-6, 1974.
21. THORELL, J. I. & LARSON, S. M. *Radioligand radioimmunoassay and related techniques methodology and clinical applications*. Saint Louis, The C. V. Mosby, 1978. p.32.
22. WAJCHENBERG, B. L.; SUGAVARA, S. H.; MESQUITA, C. H.; LERARIO, A. C.; WACHSLICHT, H. ; PIERONI, R. R.; MATTAR, E. Comparison of plasma progesterone assay in women by competitive protein binding (CPB) and radioimmunoassay (RIA). *Clin. Chim. Acta*, 68(1):67-72, 1976.
23. YALOW, R. S. & BERSON, S. A. Insulin. In: YALOW, R. S. comps. *Methods in radioimmunoassay of peptide hormones*. Amsterdam, North-Holland, 1976. p.168-74.