

BR8714470

INIS BR--589

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

RADIOIMUNOENSAIO DO HORMÔNIO TRIIODOTIRONINA (T_3) NO SORO.
DESENVOLVIMENTO DE UMA TÉCNICA DE FASE SÓLIDA E
COMPARAÇÃO COM DUAS TÉCNICAS DE FASE LÍQUIDA:
POLIETILENO GLICOL (PEG) E DUPLO ANTICORPO

MARGARIDA MIZUE HAMADA

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

Orientadora: Dra. Constância Pagano Gonçalves da Silva

SÃO PAULO

1985

RADIOIMUNOENSAIO DO HORMÔNIO TRIIODOTIRONINA (T_3) NO SORO.

DESENVOLVIMENTO DE UMA TÉCNICA DE FASE SÓLIDA E

COMPARAÇÃO COM DUAS TÉCNICAS DE FASE LÍQUIDA:

POLIETILENO GLÍCOL (PEG) E DUPLO ANTICORPO

MARGARIDA MIZUE HAMADA

RESUMO

Estabeleceu-se um sistema de radioimunoensaio de hormônio triiodotironina (T_3) pela técnica de "Fase Sólida", imobilizando-se anticorpo, anti- T_3 em tubos de polipropileno pré recobertos com glutaraldeído polimerizado em meio alcalino. O recobrimento dos tubos foi realizado pela reação dos grupos amino do anticorpo com resíduos de aldeído que recobrem as paredes dos tubos, tendo sido estudadas as variáveis seguintes: concentração, pH, tempo e temperatura de incubação do glutaraldeído e anticorpo.

Avaliou-se a qualidade dos tubos recobertos pelo seu desempenho metodológico no radioimunoensaio (RIE), analisando os diversos parâmetros do ensaio, a saber: a dose mínima detectável, a ligação inespecífica ("NGB"), " $X_{50\%}$ ", inclinação da curva ("Slope"), precisão intra e inter ensaio, exatidão do método e dígito de mérito.

Comparou-se esta técnica com outras duas, a técnica de "Duplo Anticorpo" e de "Solução PEG". Na apreciação dos resultados concluiu-se que os parâmetros obtidos foram semelhantes para as três técnicas, indicando que os tubos recobertos são adequados para serem utilizados no RIE nas condições estabelecidas.

Os intervalos de valores da concentração de T_3 no soro de indivíduos hipotireoideos e hipertireoideos e a faixa de normalidade de T_3 foram determinados para a técnica de "Fase Sólida".

A qualidade e as características dos reagentes utilizados nos RIEs foram avaliadas. O rendimento e perfil radiocromatográfico da marcação, a atividade específica e a estabilidade do $^{125}I-T_3$, resultados da análise de Scatchard (a constante de afinidade "K" e concentração molar " q_0 ") e a especificidade do anticorpo foram comparáveis àqueles citados nas bibliografias pertinentes.

RADIOIMMUNOASSAY FOR TRIIODOTHYRONINE IN SERUM. DEVELOPMENT OF
THE SOLID PHASE TECHNIC AND COMPARISON WITH TWO LIQUID PHASE
RIA SYSTEMS: THE POLYETHYLENE GLYCOL (PEG) AND DOUBLE ANTIBODY
METHODS

MARGARIDA MIZUE HAMADA

ABSTRACT

We have established a solid phase radioimmunoassay (RIA) system for triiodothyronine (T_3), by immobilizing triiodothyronine antibodies on the inner wall of reaction tubes. The antibody-coated tubes were made via reaction of antibody with glutaraldehyde residue pre coated on the inner wall of the tubes by alkaline self-polymerization. Reaction parameters such as concentration, pH, incubation temperature and incubation time for the glutaraldehyde and the antibody in the coating tubes were studied.

The quality of the coated tubes was tested through its performance in RIA methodology, by analysing the following RIA parameters: minimum detectable dose (MDD), nonspecific binding (NSB), " $X_{50\%}$ ", slope of the standard curve, intra and inter assay precision, accuracy of the method and figure of merit.

The experimental data were compared with two phase liquid radioimmunoassay system, the PEG solution and the double antibody techniques. The solid phase RIA results obtained were comparable to those of the PEG solution and the double antibody RIAs, indicating that the antibody coated tubes are adequate for use in solid phase T_3 RIA under the established conditions.

The serum levels of T_3 in hypothyroid and hyperthyroid patients and the normal values range were determined for solid phase RIA system.

The quality and characteristics of the reagents used in the RIA were analysed. The efficiency of the radiodination procedures, the radiochromatogram analysis of the $^{125}\text{I}-T_3$, the affinity constant of the antigen-antibody reaction "K", the antibody concentration " q_0 " (Scatchard analysis), and the specificity of the antibody are in good agreement with those found in the literature.

ÍNDICE

	PÁGINA
I. INTRODUÇÃO E PRÓPOSITO.....	01
II. EQUIPAMENTOS, REAGENTES E PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	11
1. Equipamentos.....	11
2. Reagentes.....	12
3. Procedimentos Experimentais.....	16
3.1. Marcação de T_3 com ^{125}I	16
3.2. Purificação da Triiodotironina Radioiodada em Coluna de Sephadex.....	17
3.3. Rendimento da Marcação de Hormônio.....	18
3.4. Determinação da Atividade Específica do ^{125}I - T_3	19
3.5. Obtenção do Anti-soro, Anti- T_3	20
3.5.1. Preparação do Conjugado T_3 -SAB.....	20
3.5.2. Preparação do Anti-soro.....	21
3.6. Separação das Imunoglobulinas G (IgG) do Anti-soro , Anti- T_3	21
3.7. Preparação dos Tubos de Fase Sólida.....	23
3.8. Avaliação nas Características do Anticorpo.....	24
3.8.1. Determinação da Diluição Adequada do Anticorpo	24
3.8.2. Especificidade.....	25
3.8.3. Caracterização da Constante de Afinidade e Concentração Molar do Anti-soro.....	27
3.9. Preparação da Mistura de Soro Humano Isento de T_3 . "SO RO STRIP".....	28
3.10. Preparação dos Seros de Referência (Padrões) de T_3 ...	28
3.11. Protocolo de Radiomunoensaio do T_3 pela Técnica de "Fase Sólida".....	29

ÍNDICE

	PÁGINA
3.12. Outras Técnicas de Radioimunoensaio de T_3	29
3.12.1. Protocolo do RIE do T_3 pela Técnica do "Du- plo Anticorpo".....	31
3.12.2. Protocolo do RIE pela Técnica de " Solução de 2 ^o "	31
3.13. Curva Padrão.....	34
3.14. Avaliação dos Ensaio Realizados.....	34
3.14.1. Dose Mínima Detectável.....	34
3.14.2. Precisão do Ensaio.....	35
3.14.2.1. Perfil de Precisão Intra-ensaio...	35
3.14.2.2. Perfil de Precisão Inter-ensaio...	35
3.14.3. Exatidão.....	35
3.14.4. Dígito de Mérito.....	35
3.15. Cálculos Utilizados na Avaliação dos Resultados.....	36
3.16. Caracterização da Faixa de Normalidade.....	36
3.17. Determinação dos Níveis Séricos de T_3 em Pacientes Hipotireoideo e Hipertireoideo.....	38
III. RESULTADOS.....	39
1. Triiodotironina Marcada com $^{125}I - ^{125}I-T_3$	39
1.1. Purificação do T_3 Radioiodado.....	39
1.2. Rendimento da Marcação do Hormônio com ^{125}I	39
1.3. Determinação da Atividade Específica.....	44
1.4. Estudo da Estabilidade do $^{125}I-T_3$, Conservado em Pro- pileno Clícol 50%.....	44
2. Obtenção do Anti-soro.....	44

ÍNDICE

PÁGINA

2.1. Quantidade de T_3 Conjugado ao soro Albumina Bovina (SAB)	44
2.2. Preparação do Anti-soro.....	47
2.3. Separação das Imunoglobulinas G (IgG) do Anti-soro, Anti- T_3	47
2.4. Estudo das Condições Adequadas para o Recobrimento dos Tubos com Anticorpo (Tubos de "Fase Sólida").....	47
2.4.1. Efeito do pH na Polimerização do Glutaraldeído nas Paredes dos Tubos.....	47
2.4.2. Efeito da Concentração do Glutaraldeído no Recobrimento dos Tubos.....	50
2.4.3. Efeito da Temperatura no Recobrimento dos Tubos.....	50
2.4.4. Tempo de Incubação para Recobrimento dos Tubos	50
2.5. Avaliação das Características do Anti-soro.....	54
2.5.1. Determinação da Diluição Adequada do Anticorpo para Recobrimento dos Tubos.....	54
2.5.2. Especificidade do Anti-soro, Anti- T_3 Utilizado	54
2.5.3. Caracterização da Constante de Afinidade e Concentração Molar do Anti-soro.....	54
3. Resultados das Características das Curvas Padrão.....	58
4. Características Metodológicas dos Ensaios.....	62
4.1. Dose Mínima Detectável.....	62
4.2. Precisão do Ensaio.....	67
4.2.1. Perfil de Precisão Intra-ensaio.....	67
4.2.2. Perfil de Precisão Inter-ensaio.....	67
4.3. Exatidão.....	75

ÍNDICE

	PÁGINA
4.4. Dígito de Mérito.....	75
5. Caracterização da Faixa de Normalidade.....	76
6. Níveis Séricos de T_3 em Pacientes Hipotireóideo e Hiperti- reóideo.....	79
IV. DISCUSSÃO.....	81
1. Marcação da Triiodotironina com ^{125}I	81
1.1. Análise do Perfil Cromatográfico do Substrato Marcado	81
1.2. Determinação da Atividade Específica do $^{125}I-T_3$	81
1.3. Estabilidade do $^{125}I-T_3$ Armazenado em Solução de Pro- pileno Glicol 50%	82
2. Características do Anticorpo.....	83
2.1. Diluição Apropriada do Anticorpo, Anti- T_3	83
2.2. Especificidade do Anti-corpo, Anti- T_3	84
2.3. Constante de Afinidade "K" e Concentração Molar "q" do Anticorpo.....	85
3. Características Físico-Químicas.....	85
3.1. Separação das Imunoglobulinas G(IgG) do Anti-soro, An- ti- T_3	85
3.2. O pH Apropriado da Solução na Polimerização do Gluta- raldeído na Parede do Tubo.....	86
3.3. A Ligação Inespecífica no Sistema de "Fase Sólida"...	88
3.4. Efeito da Concentração e da Temperatura de Incubação do Glutaraldeído no Recobrimento dos Tubos.....	88
3.5. Efeito do Tempo e da Temperatura de Incubação na Imo- bilização do Anticorpo.....	89

ÍNDICE

	PÁGINA
Características Metodológicas do Ensaio.....	89
4.1. Características das Curvas Padrão.....	89
4.2. Estimativa da Dose Mínima Detectável - DMD.....	90
4.3. Análise da Precisão do Método (Perfis Intra-ensaio e Inter-ensaio).....	90
4.4. Avaliação dos Parâmetros Metodológicos das Três Técnicas.....	91
4.5. Resultados da Concentração das Amostras Dosadas - Exatidão do Método.....	92
Caracterização da Faixa de Normalidade e Níveis Séricos de T_3 Encontrados em Pacientes com Hipotireoidismo e Hipertireoidismo.....	93
Vantagens e Desvantagens da Técnica de "Fase Sólida".....	95
CONCLUSÕES.....	96
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98

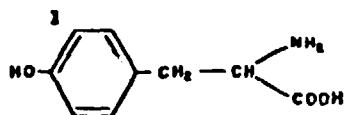
I. INTRODUÇÃO

A glândula tireoide exerce, fisiologicamente, uma importância excepcional sobre o organismo no ser humano. Dentre as suas atividades destacam-se a produção e secreção dos hormônios triiodotironina (T_3) e tiroxina (T_4), os quais são considerados metabolicamente ativos dentre os produtos secretados pela glândula tireoidiana.

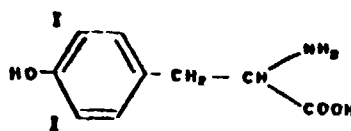
Estes hormônios tireoidianos são produzidos pelo estímulo do eixo hipotálamo-hipofisário-tireoidiano. O hipotálamo secreta o hormônio liberador de tireotrofina (TRH), estimula a pituitária anterior para que ocorra a síntese e liberação da tireotrofina (TSH) hipofisária. A tireotrofina (TSH) liberada atua sobre a glândula e faz com que a célula tireoidiana libere os hormônios (T_3 e T_4). Por sua vez, a síntese e secreção do TSH são reguladas, de acordo com o mecanismo de retroalimentação negativa, pelos níveis de hormônios tireoidianos circulantes.

As células da tireoide captam iodeto do líquido extracelular por um mecanismo ativo. O iodeto incorporado pela tireoide é organizado rapidamente, fixando a aminoácidos contidos na tireoglobulina (proteína armazenada na substância coloidal do folículo tireoidiano) para sua utilização na síntese de T_3 e de T_4 .

Entre os aminoácidos encontram-se moléculas de tirosina na qual se fixa o átomo de iodo. Pela ação enzimática responsável pela oxidação, a peroxidase, forma-se a monoiodotirosina (MIT) e diiodotirosina (DIT) (Figura 1).



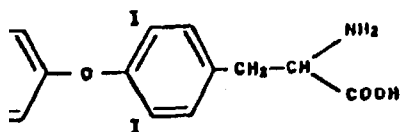
Monoiodotirosina



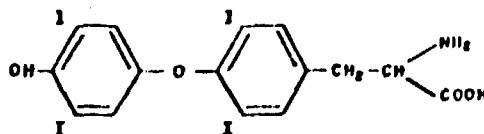
Diiodotirosina

1 - Fórmulas estruturais de monoiodotirosina e diiodotirosina

A formação de T_3 e T_4 se dá pelo acoplamento de dois resí-
duos, com a perda de um radical alifático e formação de um grupamen-
to aril-éter iodado (Figura 2) (52,68,83).



Triiodotironina (T_3)



Tiroxina (T_4)

2 - Fórmulas químicas dos hormônios triiodotironina e tiroxina

Estes hormônios são liberados mediante proteólise enzimática
liberados por proteínas plasmáticas (TBG, TBPA e albumina). O trans-
porte destes hormônios se dá em sua quase totalidade por meio da ligação
à fração albumina e TBPA também ligam e transportam estes hormôni-
os com menor afinidade que TBG. Estas proteínas estão ligadas ao T_3
com afinidade do que ao T_4 , e como resultado o T_3 apresenta uma meia-
vida biológica mais curta bem como uma ação mais rápida e forte que o
(81,83)

O T_3 é metabolicamente três a quatro vezes mais ativo que o T_4 e apesar da sua baixa concentração na circulação sanguínea, aproximadamente 70 vezes menos que o T_4 , contribui substancialmente na atividade metabólica tireoidiana (15,52,83).

A maior parte do T_3 circulante (76%) é derivado da monodesiodação do T_4 em tecidos periféricos, sendo apenas uma pequena quantidade produzida na tireóide. Cerca de 85% do T_4 metabolizado diariamente é desiodado ao T_3 e ao seu isômero, a 3,3',5' triiodotironina (T_3 reverso, rT_3). O restante é perdido, aparentemente como tiroxina e seus conjugados, ou metabolizado pela desaminação e descarboxilação da cadeia lateral de alanina, a ácido tetraiodoacético (TETRAC) (5,12,67,69).

Similarmente T_3 e rT_3 são desiodados a 3,3' diiodotironina (3,3' T_2), sendo o rT_3 também desiodado a 3,5' diiodotironina (3,5' T_2). Por outro lado, pode ocorrer a formação de ácido triiodoacético (TRIAC) pela descarboxilação ou desaminação destas triiodotironinas (18).

O método utilizado na determinação sérica do T_3 deve, portanto ser específico, pois a interferência destes compostos que guardam certa identidade com a molécula de T_3 pode superestimar o valor deste hormônio presente no soro.

Desde a identificação do T_3 em 1952⁽³²⁾, diversos métodos foram desenvolvidos para a determinação da sua concentração no soro. O método inicialmente desenvolvido envolvia, seqüencialmente, a extração das tironinas (T_3 e T_4) do soro, separação do T_3 do T_4 por cromatografia em papel e quantificação do iodo ligado ao T_3 (T_3I) pelo método químico. Pini⁽⁶⁶⁾ em 1957 estimou a média da concentração do T_3I nos indivíduos normais em 150 ng/dl, e como o iodo constitui 57% do peso molecular de T_3 , a média da concentração de T_3 no soro foi de 257 ng/dl. Por um método similar, MacLag⁽⁵⁵⁾ em 1957 avaliou a concentração desse hormônio em 500 ng/dl. Entretanto, esta técnica mostrou-se pouco sensível e reprodutível, além de ser

tediosa e demorada não sendo, portanto, aplicável à rotina da dosagem de T_3 .

Naumann e col⁽⁶¹⁾ em 1967 e Sterling e col⁽⁸⁴⁾ em 1969 adaptaram o método de ensaio por ligação da competição protéica de Murphy - Ratte (CPBA)⁽⁶⁰⁾ para quantificação de T_3 e encontraram, respectivamente, 330 e 220 ng/dl de T_3 no soro de indivíduos normais. Este método também requeria o processo de extração das iodotironinas do soro e separação do T_3 do T_4 por cromatografia em papel para posterior mensuração do T_3 . Esta técnica fornecia concentrações de T_3 superiores às existentes no soro, provavelmente, por causa da separação incompleta do T_3 do T_4 e ao processo de desiodação do T_4 , a qual conduz a formação de T_3 durante a fase de cromatografia⁽⁵¹⁾. Por outro lado esta técnica requeria tempo e volume de soro grande.

Em vista destes resultados Dussalt e col⁽²¹⁾ em 1971, desenvolveram a técnica de cromatografia em dupla coluna para determinação de T_3 . Eles observaram que, quando corrigidos por artifícios metodológicos, o intervalo de concentração de T_3 no soro em indivíduos normais variava entre 25 a 203 ng/dl, com uma média de 98 ± 38 ng/dl. Mas, além de ser uma técnica complexa e demorada, a larga correção por artifícios metodológicos causava sérios problemas⁽¹³⁾.

No início da década de 70, Mitsum e col^(53,64) desenvolveram a cromatografia líquida-gasosa para determinação de T_3 e encontraram uma concentração de 137 ng/dl, enquanto que Hagen e col^(33,34) pelo método de duplo isótopo estimaram um valor médio de 226 ng/dl. Entretanto, experimentos com estas técnicas tem permanecidos limitados, pois além de trabalhossos, requerem instrumentos especializados⁽¹³⁾.

O maior desenvolvimento na metodologia da dosagem de T_3 foi encontrado por Brown e col⁽⁶⁾ em 1972. Eles relataram o primeiro sucesso na obtenção do anti-soro, anti- T_3 , imunizando coelhos com T_3 conjugado a um veneno.

posto maior, o succinilato de polisina. Apesar deste anticorpo não ser adequado, por apresentar uma reação cruzada de cerca de 5% com T_4 , necessitando, portanto das fases de extração e cromatografia similar àquela usada por Sterling⁽⁸⁴⁾, esta descoberta representou uma contribuição importante, pois as iodotironinas não são antigênicas na sua forma natural.

Desde então, muitos progressos foram alcançados utilizando-se uma variedade de processos químicos para ligar covalentemente o T_3 a outras moléculas maiores, para a imunização, a saber: albumina, tireoglobulina, polilisina, obtendo-se assim anticorpo, anti- T_3 altamente específica^(7,16,25,26,49,53).

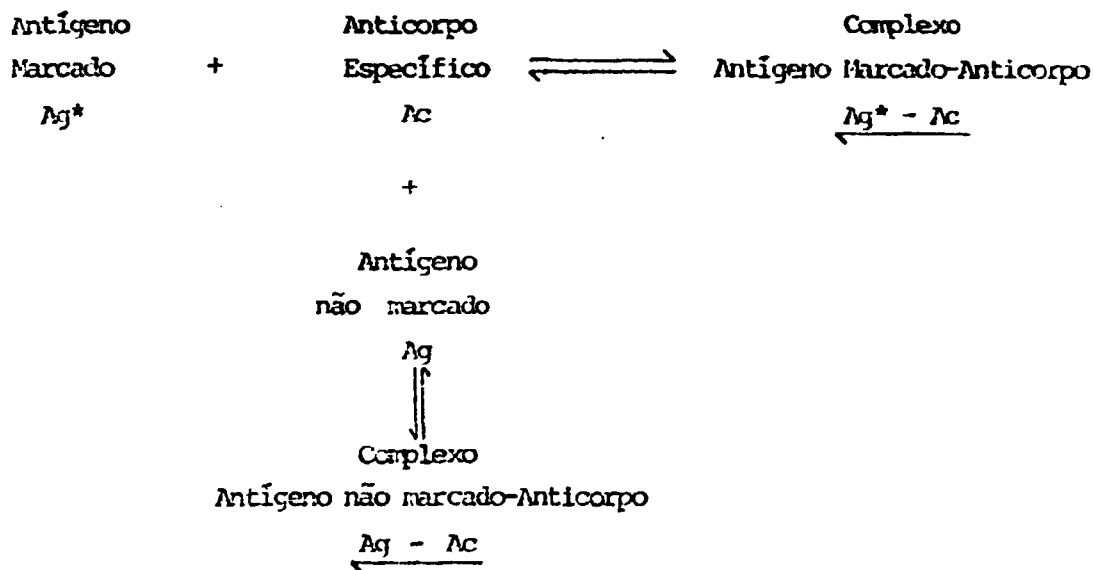
Estes resultados conduziram ao desenvolvimento do radiomunoensaio (RIE)^(3,28) para dosagem de T_3 total no soro. Os primeiros resultados obtidos na sua determinação apresentaram valores notadamente diferentes. Chopra e col⁽¹⁷⁾ estimaram a concentração de T_3 no soro de indivíduos normais no intervalo entre 100 a 170 ng/dl, enquanto Charib e col⁽²⁶⁾ encontraram uma média de 218 ± 55 ng/dl. Essas diferenças ocorreram por causa da interferência da proteína ligadora do T_3 no soro que pode limitar a eficiência do T_3 na reação com o anticorpo.

No entanto, adicionando-se na mistura de incubação do RIE, substâncias como tetraclorotironina⁽⁵⁴⁾, salicilato de sódio⁽⁵⁰⁾, mertiolate⁽²⁹⁾ e ácido anilino naftaleno sulfônico (ANSN)⁽¹⁵⁾ para bloquear as proteínas ligadoras de T_3 do soro, encontraram-se variações pequenas nas estimativas do valor médio da concentração de T_3 no soro de indivíduos normais. Assim, o valor médio variou entre 110 a 145 ng/dl com intervalo de 50 a 210 ng/dl⁽¹³⁾.

Alguns investigadores não convencidos da exatidão de um simples RIE de T_3 total, desenvolveram métodos mais trabalhosos de RIE que requerem extração do soro^(7,86), mas os resultados pelos dois métodos não foram significativamente diferentes⁽¹³⁾.

No presente, o método mais utilizado na sua dosagem é o radioimunoensaio ⁽¹³⁾, que se caracteriza por ser altamente preciso, específico e sensível e ainda oferece a praticabilidade exigida, tornando-o exequível ⁽²⁸⁾.

O princípio do radioimunoensaio baseia-se na competição entre antígeno marcado isotopicamente (Ag^*) e não marcado (Ag) pelo anticorpo (Ac), formando complexo antígeno-anticorpo. Essa reação de competição obedece a lei de ação das massas e pode ser representada pela equação:



Nesta reação a quantidade de produto antígeno marcado-anticorpo ($Ag^* - Ac$) é dependente da quantidade adicional do antígeno não marcado. Assim, quanto maior a quantidade de antígeno não marcado no meio da reação, menor a quantidade de anticorpo que estará disponível para a ligação com o marcado. Mantendo constante a quantidade de anticorpo e de antígeno marcado correspondente, a adição de padrões de antígeno não marcado em concentrações crescentes, ocasionará um deslocamento proporcional daquele marcado a partir do complexo antígeno-anticorpo, obedecendo a lei de ação das massas. Dessa forma, pode-se determinar a quantidade de antígeno de uma amostra desconhecida, fazendo-se o uso de uma curva dose x resposta (quantidade de Ag versus $Ag^* - Ac$).

radioatividade da fração Ag^+Ac).

Os resultados essenciais para o EIS, consistem, portanto, 1) no preparo do antígeno marcado e das soluções padrões (antígeno não marcado usado como referência em concentração crescente), 2) na obtenção do anticorpo específico e 3) na escolha de técnicas adequadas que permitam a separação do complexo antígeno-anticorpo do antígeno livre após atingirem o equilíbrio da reação*.

Os critérios para a seleção de uma técnica de separação entre as frações "ligadas" e "livres" devem atender os aspectos seguintes:

- a) eficiência da separação conduzindo a pequenos valores de erro de classificação,
- b) praticabilidade (simplicidade operacional, rapidez, etc)
- c) economia e
- d) confiabilidade (precisão, exatidão, especificidade e sensibilidade).

Os diversos métodos de separação empregados baseiam-se nas diferenças de configuração molecular entre o antígeno ligado e o livre⁽⁴⁰⁾. Há técnicas baseadas nas afinidades adsorptivas dos antígenos livres^(39,75,92), na migração diferencial do complexo formado e da fração livre^(27,41,93) ou nas precipitações seletivas dos complexos antígeno-anticorpo por um sal^(11,77), por um solvente orgânico⁽²⁰⁾ ou por um segundo anticorpo^(35,80,88). Existem ainda as técnicas que adsorvem ou complexam o anticorpo em material de fase sólida, como por exemplo, a adsorção em tubos plásticos ou complexação com dextran^(9,10,71).

A dosagem do T_3 é utilizada em ampla escala no campo da endo

* É nesse ítem que o presente trabalho se concentra.

crinologia, no diagnóstico do hipertiroidismo e hipotiroidismo.

A importância econômica e social da dosagem de T_3 sérico, já de ser acentuada pelo seguinte exemplo: Nas seções de RIE dos laboratórios clínicos modernos o T_3 abrange aproximadamente 15% de toda a sua rotina. Apesar dessa incontestável importância, lamentavelmente, em nosso meio a maior parcela do consumo de reagentes utilizados na sua dosagem é ainda de procedência importada. A necessidade da importação dos reagentes tem sido justificada pelas dificuldades tecnológicas de suas preparações.

Dentre as técnicas de RIE mais utilizadas atualmente para quantificação de T_3 destacam-se a denominada de "Solução PEG" ⁽²⁰⁾ de "Duplo Anticorpo" ⁽⁸⁸⁾ e de "Fase Sólida" ⁽⁹⁾. Estas três técnicas diferem entre si no processo de separação da fração do antígeno livre do complexo antígeno-anticorpo.

Na técnica da "Solução PEG" utiliza-se a propriedade do polietileno glicol de precipitar, mediante centrifugação, moléculas do tamanho das gamaglobulinas, conseqüentemente, o complexo antígeno-anticorpo.

Na técnica do "Duplo Anticorpo", um segundo anticorpo, anti-gamaglobulina é usado para precipitar o complexo primário. A ligação entre o primeiro e o segundo anticorpo forma complexo de proporções moleculares que permite a sua precipitação. Este recurso tem a característica de apresentar alta afinidade pois, o segundo anticorpo reconhece especificamente as gamaglobulinas do primeiro anticorpo dentre as demais proteínas do meio sérico da amostra. No entanto, este método necessita também de centrifugação e de um período adicional de incubação, na qual se processa a ligação do segundo anticorpo com o primeiro.

Alguns autores combinam estas duas técnicas utilizando como solução de precipitação a mistura do PEG com o segundo anticorpo ⁽³⁷⁾. Esta alternativa une basicamente as boas características de ambas, ou seja, a

ta afinidade, baixo nível de reação cruzada e praticamente não necessita da segunda fase de incubação, embora ainda requiera fase laboratorial de contrifugação.

Na técnica da "Fase Sólida", o anticorpo é fixado em polímeros insolúveis, por exemplo, na parede do tubo de reação ^(10,45,65,71). A fixação dos anticorpos à superfícies sólidas pode ser feita por simples adsorção física ^(8,10) ou por ligação química covalente ^(45,65,71,76). Com neste caso a reação antígeno-anticorpo se realiza na fase sólida, a separação da fração livre do complexo é feita por simples decantação da fase líquida. É considerado o método de separação mais prático e eficaz da fração livre da ligada ⁽¹³⁾. As vantagens desta técnica são inúmeras, a saber: é laboratorialmente mais simples, não necessita de centrifugação como as demais, exige o mínimo de operações e grande rapidez de trabalho, permitindo assim que inúmeras determinações sejam realizadas rapidamente. Pode ser utilizada por qualquer laboratório que possua um medidor de radioatividade e geralmente apresenta melhor perfil de precisão nos resultados.

Observa-se na literatura uma preocupação crescente quanto aos aspectos metodológicos que conduzem à simplificação da dosagem de hormônios ^(2,24,45,76,79). A razão desta tendência é que parcela ponderável das sociedades modernas fazem hoje uso da metodologia dos radioensaios, principalmente os de "Fase Sólida". Schmidt e col ⁽⁷⁹⁾ relatam que na República Federal da Alemanha aproximadamente 40 milhões (60%) de seus habitantes são submetidos anualmente à prova desses radioensaios.

Apesar de todas essas evidências, aparentemente muito pouca atenção tem sido dispensada a certas fases experimentais da preparação dos tubos de "Fase Sólida" e suas propriedades ⁽²⁾, particularmente em nosso país.

PROFÓSITO DO TRABALHO

O objetivo deste trabalho é estabelecer aspectos teóricos e práticos da metodologia da preparação dos tubos de "Fase Sólida" para a dosagem de triiodotironina (T_3), avaliando o seu desempenho metodológico no radioimunoensaio, quanto aos critérios de confiabilidade do ensaio relatando-se a precisão do ensaio (perfis intra e inter-ensaio), exatidão, especificidade, a dose mínima detectável (DMD) e a validade e características dos reagentes básicos utilizados.

II. EQUIPAMENTOS, REAGENTES E PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

1. EQUIPAMENTOS

- 1.1. Balança analítica marca Mettler, modelo H20R, Zurich - Suíça.
- 1.2. Agitador magnético marca Fischer Scientific Co., modelo 16, U.S.A.
- 1.3. Coluna cromatográfica de dimensão 0,6 x 30 cm (diâmetro x altura) marca LKB, Suécia.
- 1.4. Coletor de frações automático marca LKB, modelo Ultrarac 7000. Suécia.
- 1.5. Bomba peristáltica marca IKB, modelo 4912 A, Suécia.
- 1.6. Centrífuga automática com unidade de refrigeração Doren-HB2 Tipo PR-6000 da International Equipment Company, Needham Heights, Massachusetts, E.U.A.
- 1.7. Sistema automático de detecção de radiação com cintilador de NaI(Tl) tipo poço de 3 x 2 polegadas marca Nuclear Chicago, U.S.A.
- 1.8. Agitador Vortex-Genie modelo K-550-G marca Scientific Industries Inc. - Springfield, Mass., U.S.A.
- 1.9. Computador marca IBM/370 modelo 155 do CTD - Departamento de Desenvolvimento de Dados da Comissão Nacional de Energia Nuclear - CNEN.
- 1.10. Pipetas automáticas marca CTD/CTD, da Cofre Indústria e Comércio, Ltd. U.S.A.

1.11. Espectrofotômetro marca ZEISS PM - 11 da Carls Zeiss, Alemanha.

1.12. Bomba de vácuo da Millipore Filter Corporation, Massachusetts ,
U.S.A.

1.13. Tubos de ensaio 12 x 75 mm, de polipropileno, Vidrolabor, São Paulo.

2. REAGENTES

2.1. Triiodotironina empregada na preparação de soro de referência (padrões) e na obtenção do anticorpo, anti- T_3

3,5,3' - L-triiodotironina da Sigma Chemical Company, St. Louis ,
Mo., E.U.A.

2.2. Diiodotironina empregada na marcação (T_2)

3,5 - L-diiodotironina da Sigma Chemical Company, St. Louis Mo.,
E.U.A.

2.3. Substâncias análogas a triiodotironina utilizadas no estudo de especificidade

2.3.1. Triiodotironina reverso (rT_3)

3,3',5' triiodotironina da Sigma Chemical Company, St. Louis,
Mo., E.U.A.

2.3.2. Diiodotironina (T_2)

3,3' diiodotironina da Sigma Chemical Company, St. Louis ,
Mo., E.U.A.

2.3.3. Tiroxina (T_4)

3,5,3',5' tetraiodotironina da Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo., E.U.A.

2.3.4. Ácido tetraiodoacético (TETRAC)

3,5,3',5' ácido tetraiodoacético da Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo., E.U.A.

2.3.5. Ácido triiodoacético (TRIAC)

3,5,3' ácido triiodoacético da Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo., E.U.A.

2.3.6. Diiodotirosina (DIT)

3,5 - Diiodo-L-tirosina da Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo., E.U.A.

2.3.7. Monoiodotirosina (MIT)

3-Iodo-L-tirosina da Sigma Chemical Company St. Louis Mo., E.U.A.

2.4. Tampão Fosfato 0,2M pH 7,4

Monohidrogenofosfato de sódio ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$), Merck S.A. .. 58,02 g
 Dihidrogenofosfato de sódio ($NaH_2PO_4 \cdot 12H_2O$), Merck S.A. 5,28 g
 Água destilada q.s.p. 1 1

2.5. Tampão Fosfato 0,02M pH 7,4

Diluição do tampão anterior 1:10

2.6. Tampão Fosfato 0,05M pH 11,9

Monohidrogenofosfato de potássio (K_2HPO_4), Merck S.A. 8,3 g
 Água destilada q.s.p. 1 1

Acerto do pH foi feito com NaOH 1N

2.7. Tampão Veronal 0,05M pH 8,6

Ácido dietil barbitúrico ($C_8H_{12}N_2O_3$), Merck S.A.	1,884 g
Barbital sódico ($C_6H_{11}N_2NaO_3$), Merck S.A.	8,200 g
Água destilada	q.s.p. 1 1

2.8. Tampão Veronal 0,025M pH 8,6

Diluição do tampão anterior 1:2

2.9. Solução saturada de sulfato de amônio

Sulfato de amônio (NH_4) SO_4 , Merck S.A.	796,50 g
Água destilada	q.s.p. 1 1

2.10. Bicarbonato de Sódio 0,1M

Bicarbonato de Sódio ($NaHCO_3$), Merck S.A.	8,401 g
Água destilada	q.s.p. 1 1

2.11. Cloramina T (Cl - T)

Cloramina T ($C_7H_7ClN_3O_2S \cdot 3H_2O$), Merck S.A.	5,25 g
Tampão fosfato de sódio 0,2M pH 7,4	q.s.p. 1 1

2.12. Metabissulfito de Sódio

Metabissulfito de sódio ($Na_2S_2O_5$), Merck S.A.	10,5 g
Tampão fosfato de sódio 0,2M pH 7,4	q.s.p. 1 1

2.13. Solução Fisiológica

Cloreto de sódio (NaCl), Merck S.A.	8,765 g
Água destilada	q.s.p. 1 1

2.14. Propileno Glicol, 50%

Propileno glicol	500 ml
Água destilada	500 ml

2.15. Iodo radioativo

Na^{125}I , livre de carregador e redutor, adquirido da New England Nuclear, U.S.A.

2.16. Sephadex G-25 fino (partícula tamanho 20-80 μ), da Pharmacia Fine Chemicals AB Uppsala, Sweden.

2.17. Azul de bromofenol da Merck S.A. - Indústrias Químicas Rio de Janeiro.

2.18. "Plasma azul" - plasma corado com azul de bromofenol

2.19. 1 Ciclohexil-3 (2-morfolinoetil) carbodiimida: meta-*p*-tolueno sulfonato ($\text{C}_{21}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$) da Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo., E.U.A.2.20. Dimetilformamida ($\text{HCON}(\text{CH}_3)_2$) da Merck A.G., Darmstadt, Alemanha.

2.21. Soro albumina bovina fração V. da Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo., E.U.A.

2.22. Adjuvante completo de Freund, da Difco Laboratories, Detroit, Mi., E.U.A.

2.23. Adjuvante incompleto de Freund, da Difco Laboratories, Detroit, Mi., E.U.A.

2.24. Carvão ativado da Merck S.A. - Indústrias Químicas, Rio de Janeiro.

2.25. Mertiolate (Timerosal) da Eli Lilly do Brasil, São Paulo.

2.26. Anticorpo antigamaglobulina de coelho, obtido em carneiro no IPEN-CNEN/SP, São Paulo.

2.27. Polietileno Glicol 6000 (PEG), adquirido da Indústrias Atlas, São Paulo.

2.28. Ácido anilino naftaleno sulfônico (ANS) da Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo., E.U.A.

2.29. E.D.T.A. - sal disódico de ácido etilenodiamintetracético dihidratado da Merck A.G., Darmstadt, Alemanha.

2.30. Glutaraldeído 25% da Merck A.G., Darmstadt, Alemanha.

3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.1. Marcação de T_3 com ^{125}I

A metodologia empregada baseou-se na descrita por Hunter⁽⁴²⁾, utilizando como agente oxidante a Cloramina T(Cl-T) para síntese de $^{125}I-T_3$ partindo de diiodotironina (T_2) e ^{125}I . Para tanto, 1 mg de T_2 foi dissolvido em 5 ml de propileno glicol 50%, adicionando-se 25 μ l de NaOH 1N. Aliquotas dessa solução foram pipetadas em tubos de vidro e mantidas a $-20^{\circ}C$ até a ocasião da marcação.

A radioiodação foi efetuada adicionando-se em tubos de ensaio de 12 x 75 mm com fundo cônico, 20 μ l da suspensão feita em 0,25 M pH 7,4, 1 μ l

3 ul (37 MBq; 1 mCi) de Na^{125}I , 5 ul de solução T_2 descrita acima, contendo 1 ug de T_2 e, em seguida, 10 ul de solução de Cl-T em tampão fosfato 0,025 M pH 7,4 (52,5 ug de Cl-T). Após 40 segundos a reação foi interrompida com 10 ul de solução de metabissulfito de sódio em tampão fosfato (105 ug de metabissulfito de sódio), seguido de 50 ul de propileno glicol 50%. Os reagentes foram adicionados em intervalos de tempo curtos, sob agitação suave e contínua com o auxílio de um pequeno fragmento de aço inoxidável mantido no tubo de marcação em rotação por agitador magnético.

A seguir, a mistura da reação foi percolada por uma coluna de Sephadex G-25 fino com o auxílio de micropipeta automática, para a purificação.

3.2. Purificação da Triiodotironina Radiolodada em Coluna de Sephadex

No preparo da coluna, o gel de Sephadex G-25 fino foi previamente entumescido com tampão fosfato de potássio 0,05 M pH 11,9, durante 24 horas. Foram feitas quatro trocas, com aspiração do sobrenadante, utilizando-se uma bomba de vácuo. A seguir preencheu-se uma coluna de vidro de 25 cm de altura por 0,6 cm de diâmetro com o Sephadex.

O substrato marcado foi purificado em uma coluna de Sephadex, assim preparada, seguindo-se basicamente os procedimentos descritos por Kjedal e col⁽⁴⁶⁾.

Imediatamente após a adição da mistura da marcação, a eluição foi feita com o tampão fosfato 0,05 M pH 11,9 e frações de 2 ml foram colhidas com o auxílio de um coletor automático LKB, mantendo fluxo de 40 ml/h com uma bomba peristáltica. Logo após a coleta de cada tubo, adicionou-se uma gota de HCl 6N com uma pipeta de Pasteur, para neutralizar a solução, pois os hormônios marcados são instáveis em soluções alcalinas. Foram coletadas 50 frações e de cada uma dessas frações alíquotou-se 10 ul para análise

no contador gama a fim de traçar o perfil de radiocromatograma e determinar o pico correspondente ao T_3 marcado.

As frações correspondentes ao pico de T_3 marcado foram misturadas e armazenadas a -20°C em soluções de propilenoglicol 50%.

Para verificar a estabilidade do $^{125}\text{I}-T_3$ armazenado, foram retiradas alíquotas em intervalos de tempos variáveis, sendo recromatografadas sempre nas mesmas condições mencionadas para purificação e, paralelamente, efetuou-se a radiocromatografia por eletroforese. Para tanto, aplicou-se a uma fita de papel Whatman 3 MM, colocada em sentido horizontal sobre um suporte dentro de uma cuba de eletroforese, uma alíquota de $^{125}\text{I}-T_3$ misturada em 10 μl de "plasma azul". A eletroforese foi desenvolvida em tampão fosfato 0,02 M pH 8,6 empregando-se 2 mA por fita, interrompendo-se quando a mancha azul se distanciar 5 cm de origem. As fitas foram secas à temperatura ambiente e cortadas em intervalos de 1 cm, iniciando-se 2 cm antes do ponto de aplicação. A radioatividade de cada segmento foi determinada no contador gama, traçando-se assim o perfil de cromatograma.

3.3. Rendimento da Marcação do Hormônio

Os componentes presentes na mistura da marcação são adsorvidos ao Sephadex com diferentes afinidades, apresentando assim diferentes coeficientes de partição ^(4,43). Estes foram identificados pela posição dos picos de atividade no cromatograma e as áreas correspondentes à cada componente foram avaliadas pela integral da área determinada por cálculos numéricos ⁽³⁰⁾, particularmente utilizando o sistema computacional AMACROM, disponível no Departamento de Processamento de Dados do IPEN-CNEN/SP.

Para os cálculos de rendimento da marcação foram levados em consideração as áreas correspondentes a cada componente.

A porcentagem do rendimento da marcação é dada por:

$$\left[\frac{\text{Área do pico de } T_3 \text{ marcado}}{\text{Área total do cromatograma}} \right] \times 100$$

$$\frac{A_{T_3} + A_{T_4}}{A_{T_3} + A_{T_4} + A_I} \times 100$$

onde:

A_{T_3} = área correspondente ao pico de T_3

A_{T_4} = área correspondente ao pico de T_4

A_I = área correspondente ao iodo não reativo

A porcentagem de $^{125}\text{I-T}_3$ formado na marcação é dada por:

$$\frac{A_{T_3}}{A_{T_3} + A_{T_4} + A_I} \times 100$$

3.4. Determinação da Atividade Específica da $^{125}\text{I-T}_3$

A atividade específica foi determinada pelo método de auto deslocamento⁽⁵⁹⁾, incubando-se quantidades crescentes do hormônio marcado com quantidades constantes do anticorpo e demais condições de ensaio similares àsquelas empregadas para os padrões.

Para esta determinação, foi feita primeiramente uma curva padrão, e a seguir foram incubadas amostras radioativas contendo 5, 10 e 20 vezes a radioatividade utilizada no ensaio, sem adição da massa fria, ou seja T_3 não marcado. A leitura da massa de T_3 existente nas amostras radioativas foi feita utilizando a curva padrão. A resposta $Y = B/T$ foi calculada para cada quantidade (radioatividade) do T_3 marcado, onde B representa a contagem relativa ao complexo $[T_3 - \text{Ac}]$ (T_3 marcado ligado ao anticorpo) e T a contagem total presente no sistema de reação e comparou-se por interpolação com os respectivos valores dos padrões. A seguir, traçou-se o gráfico

em papel milimetrado, tendo nas ordenadas as relações B/T e em abscissas as concentrações de T_3 da amostra radioativa. Efetuou-se a regressão linear entre a radioatividade total utilizada na incubação e a respectiva massa estimada. A intersecção da reta com o eixo das ordenadas corresponde a massa do hormônio radioativo que foi utilizado para definir a curva padrão.

A atividade específica é calculada pelo valor do coeficiente angular da reta, multiplicada por um fator adequado para conversão da unidade apropriada (Bq/g).

3.5. Obtenção do Anti-soro, Anti- T_3

3.5.1. Preparação do conjugado T_3 - SAB

Devido ao baixo peso molecular do T_3 e por não ser antigênico na sua forma natural ⁽¹³⁾, o T_3 foi conjugado ao soro albumina bovina (SAB), utilizando a técnica de carbodiimida ⁽¹⁾ antes da injeção, para que respostas imunológicas consistentes fossem obtidas. Assim, 30 mg de 1 ciclohexil-3 (2-morfolinoetil) carbodiimida meta-p-tolueno sulfonato "MORFO-CDI" foram adicionados a uma solução de 50 mg de soro albumina bovina em 25 ml de água destilada. A seguir 20 mg de triiodotironina e 10.000 cpm de $^{125}\text{I}-T_3$ dissolvidos em 5 ml de dimetilformamida foram adicionados gota a gota a essa solução, sob agitação suave e contínua, mantendo o pH da mistura constante em 5,5 com HCl 0,01 M ou NaOH 0,01 M. Após 10 minutos de incubação em temperatura ambiente, adicionou-se 10 mg de "MORFO-CDI". A solução foi conservada em temperatura ambiente sob constante agitação, na ausência de luz, durante 18 horas. A mistura da reação foi dialisada em água destilada corrente por 72 horas.

Paralelamente, uma mistura da reação contendo T_3 , $^{125}\text{I}-T_3$ e "MORFO-CDI", mas na ausência de SAB foi preparada pelo mesmo procedimento.

O número de resíduos de T_3 incorporado a cada molécula

SAB foi estimado pela radioatividade não dialisável da mistura de conjugação, fazendo-se primeiramente uma correção entre esta radioatividade presente nesta mistura e aquela encontrada na diálise da mistura livre de SAB.

3.5.2. Preparação do anti-soro

Os anti-soros foram obtidos em coelhos, utilizando-se a técnica de imunização baseada em múltiplas injeções intradérmicas dorsais^(90,91).

Selecionaram-se 3 coelhos para imunização e estes tiveram inicialmente seu dorso cuidadosamente raspado. Após 24 horas, inoculou-se 2 ml de uma emulsão de partes iguais de adjuvante completo de Freund e 150 ug do conjugado T₃-SAB em solução fisiológica. A emulsão foi distribuída aproximadamente em 50 "botões" intradérmicos, conforme esquema da figura 3. Este procedimento foi repetido em intervalos de 15 dias, aproximadamente, substituindo-se a partir da segunda dose de reforço, o adjuvante completo de Freund por adjuvante incompleto.

Após a terceira dose de reforço, retirou-se, no máximo, 10 ml de sangue de cada coelho. O sangue foi mantido por duas horas em banho maria a 37°C e a seguir centrifugado a 1000 g. O sobrenadante (soro) foi separado para o estudo de título. As amostragens foram repetidas após 8 a 10 dias de cada nova dose de reforço. Selecionou-se, para posteriores experimentos, o anti-soro que apresentou as melhores características.

3.6. Separação das Imunoglobulinas G (IgG) do Anti-soro, Anti-T₃

A fim de purificar o anti-soro selecionado, isolaram-se as imunoglobulinas pela técnica de precipitação pelo sulfato de amônio⁽⁸²⁾. Uma solução saturada de sulfato de amônio foi adicionada gota a gota, sob agitação contínua, até que se completasse uma proporção de 33% em 10 ml de anti-soro. A solução foi mantida sob suave agitação durante aproximadamente

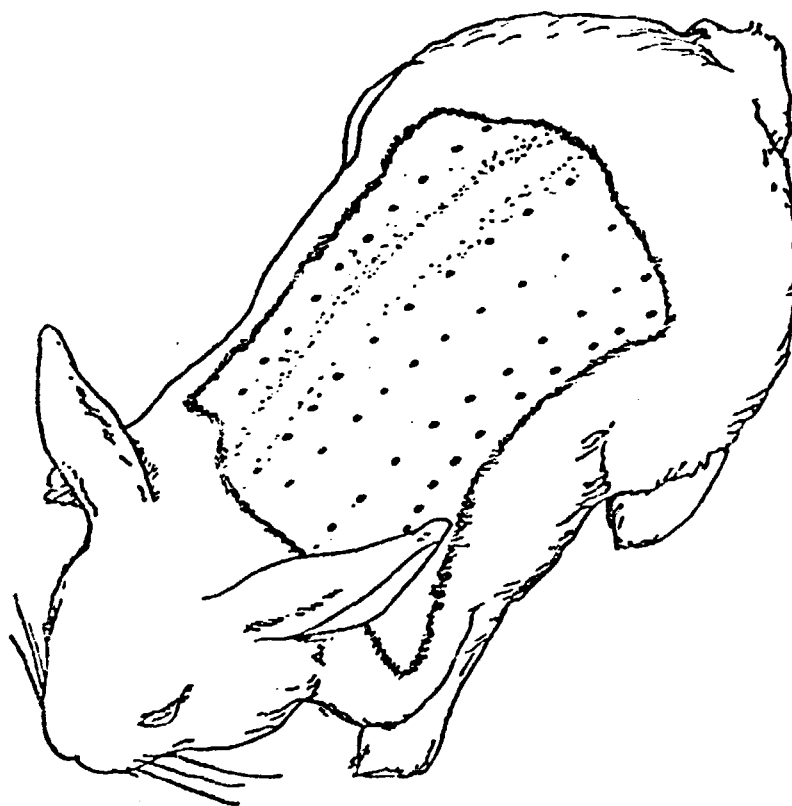


Figura 3 - Esquema de distribuição em múltiplos sítios da emulsão no dorso raspado do coelho. Os pontos pretos na área raspada representam "botões" de injeções intradérmicas de 40 μ l

20 horas, sendo estes procedimentos realizados a 20°C. A seguir, a solução foi centrifugada por 15 minutos a 2.500 g e o sobrenadante decantado. O precipitado foi então solubilizado em 10 ml de bicarbonato de sódio 0,1 M e dialisado contra 2 litros do mesmo tampão bicarbonato por 24 horas a 4°C.

A concentração de proteína do extrato foi determinada, medindo-se a absorvância em 280 nm.

3.7. Preparação dos Tubos de Fase Sólida

O anti-soro, anti-T₃ purificado foi aderido às paredes de tubos de polipropileno de 12 x 75 mm, utilizando glutaraldeído para pré-recobrimento dos tubos, e assim efetivar a reação dos resíduos do glutaraldeído das paredes dos tubos com o anticorpo.

Adicionou-se 1 ml de solução de glutaraldeído 2% em água destilada e acertou-se o pH da solução para 9,5 com NaOH 1N. Após repouso durante 4 horas em temperatura ambiente, decantou-se essa solução, lavando-se 3 vezes com tampão veronal 0,025 M pH 8,6 para retirar o excesso de glutaraldeído. Secaram-se os tubos a 4°C. A seguir adicionou-se 1 ml de anticorpo diluído em tampão veronal 0,05 M pH 8,6, com título capaz de complexar a proximadamente 25% do traçador radioativo. Os tubos foram deixados em repouso em temperatura de 4°C durante 24 horas para efetivar a reação dos resíduos de aldeído, nos tubos plásticos, com grupo amino do anticorpo. Então, a solução foi decantada e os tubos lavados com tampão veronal 0,025 M pH 8,6 por três vezes, seguindo-se de incubação por 30 minutos com solução de SAB 0,5% neste mesmo tampão, repete-se o processo de lavagem e leva-se à secar a 4°C. A figura 4 ilustra as fases experimentais:

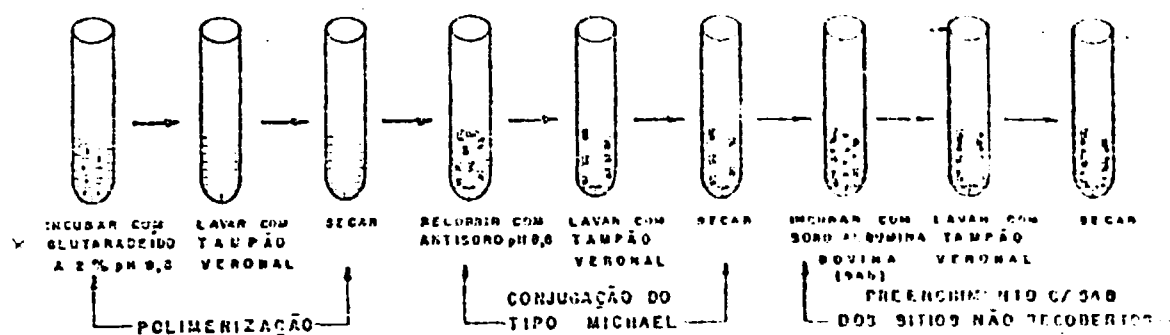


Figura 4 - Esquema de preparação dos tubos de fase sólida, utilizando o glutaraldeído para pré recobrimento dos tubos.

Estudos foram realizados, utilizando-se glutaraldeído em diferentes concentrações e pH e variando-se a temperatura e tempo de incubação no recobrimento dos tubos.

Paralelamente, utilizou-se outro procedimento no qual o anticorpo foi aderido às paredes de tubos de polipropileno por simples adsorção. Para isto, adicionou-se 1 ml da mesma solução de anticorpo em tubos de polipropileno sem tratamento com glutaraldeído e repetiram-se os procedimentos já mencionados, conforme a figura 5.

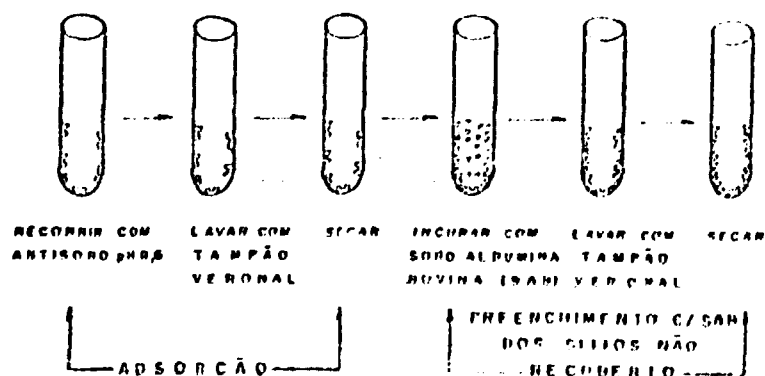


Figura 5 - Esquema de preparação dos tubos por simples adsorção

3.8. Avaliação nas Características do Anticorpo

3.8.1. Determinação da diluição adequada do anticorpo

Para determinação da diluição adequada do anticorpo foram

aderidos aos tubos de polipropileno: anticorpo, anti- T_3 nas diluições de 1/10, 1/50, 1/100, 1/500, 1/1000, 1/2000, 1/5000 e 1/10000 seguindo os mesmos procedimentos utilizados na preparação dos tubos de fase sólida. A seguir, foram incubados com 40.000 cpm do traçador, nas condições similares do ensaio.

A diluição do anticorpo, que proporcionou uma ligação em torno de 25% com o traçador, foi escolhida para a preparação dos tubos de fase sólida.

3.8.2. Especificidade

A especificidade do anti-soro, anti- T_3 foi avaliada pelo grau da reação cruzada com os possíveis interferentes. Realizaram-se ensaios, nos quais substituíram-se os padrões de T_3 por padrões de substâncias com estruturas moleculares que guardam certa identidade com as moléculas de T_3 , a saber:

3,3', 5' T_3 (rT_3)

3,5,3',5' T_4

3,3' T_2

3,5,3',5' ácido tetraiodoacético (TETRAC)

3,5,3' ácido triiodoacético (TRIAC)

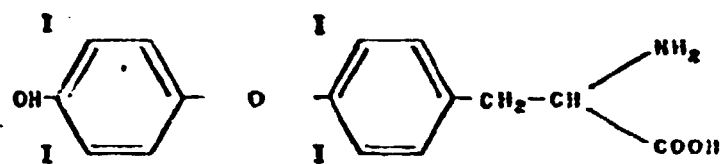
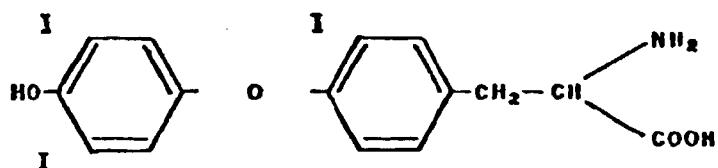
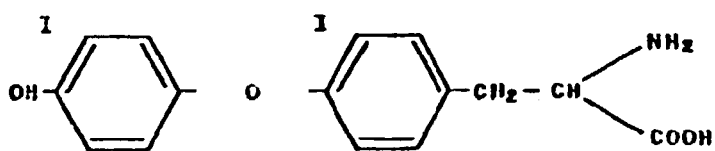
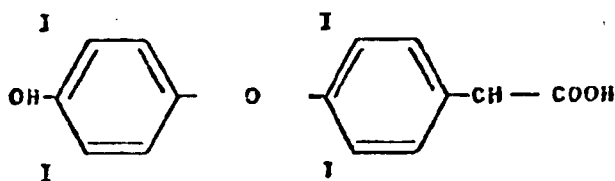
3 moniodotirosina (MIT)

3,5 diiodotirosina (DIT),

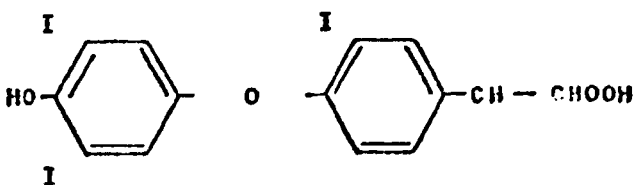
cujas fórmulas estruturais encontram-se na figura 6.

Utilizaram-se quantidades variando de 1 ng a 1000 μ g (1 μ g a 1000 mg/dl) na preparação dos padrões destes compostos e determinou-se a concentração necessária de cada composto para deslocar 50% do complexo $^{125}\text{I}-T_3$ -anticorpo.

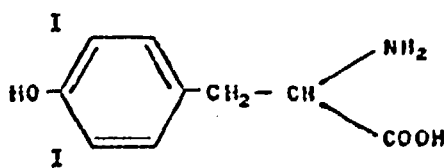
O índice de reação cruzada de cada composto foi adotado como sendo a relação entre a concentração de T_3 requerida para deslocar 50% do

3,5,3',5' Tiroxina (T_4)3,3',5' Triiodotironina (T_3 reverso)3,3' Diiodotironina (T_2)

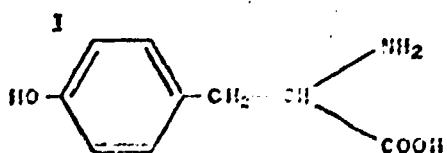
3,5,3',5' Ácido tetraiodoacético (TETRAC)



3,5,3' Ácido triiodoacético (TRIAC)



3,5 Diiodotirosina (DIT)



3 Moniodotirosina (MIT)

Figura 6- Fórmulas estruturais de compostos análogos a T_3

complexo $^{125}\text{I}-\text{T}_3$ -anticorpo e a concentração do composto análogo que desloca 50% do composto do complexo $^{125}\text{I}-\text{T}_3$ -anticorpo, descontando-se o nível do não específico (NSB) *.

3.8.3. Caracterização da constante de afinidade e concentração molar do anti-soro

Caracterizou-se a constante de afinidade ou equilíbrio (K) e concentração molar (q) do anti-soro pelo método de Scatchard⁽⁷⁶⁾.

3.9. Preparação da Mistura de Soro Humano Isento de T_3 . "Soro Strip"

Na preparação dos soros padrões utilizou-se uma mistura de soros humanos, especialmente selecionados de pessoas consideradas normais. Extraiu-se o T_3 endógeno presente nessa mistura utilizando-se carvão ativado em excesso⁽³⁹⁾, onde o T_3 presente no soro é adsorvido pelo carvão.

Em um litro do soro humano adicionou-se 0,37 MBq (10 μCi) de $^{125}\text{I}-\text{T}_3$ e 100 g de carvão ativado. Deixou-se sob constante agitação em temperatura ambiente durante duas horas, e mantido em rotação com agitador magnético mediante a introdução de uma barra magnética no recipiente. Então, o carvão foi separado do soro por centrifugação a 5000 rpm durante 1 hora. As operações de centrifugação e decantação foram repetidas por mais três vezes.

A eficiência da extração foi determinada, medindo-se a atividade de $^{125}\text{I}-\text{T}_3$ presente no soro após o tratamento e este deve ser menor do que 1% da atividade inicialmente adicionada na mistura.

* NSB é o "branco" da reação, isto é, a resposta da reação na ausência do anticorpo.

3.10. Preparação dos Soros de Referência (Padrões) de T_3

Os padrões foram preparados a partir de 3, 5, 3'-L-triiodotironina na concentração de 100 $\mu\text{g/ml}$ (solução estoque) conforme o seguinte protocolo:

Pesar 1 mg de T_3

Dissolver com 50 μl da solução NaOH 1N

Adicionar 5 ml de propileno glicol

Completar volume para 10 ml com soro "STRIP"

No preparo da solução β tomou-se 10 μl desta solução e diluiu-se em 10 ml de soro "STRIP", que corresponde a uma concentração final de 100 ng/ml .

Os soros de referência para definir a curva padrão foram preparados mediante o seguinte esquema:

SORO REFERÊNCIA 1000 ng/dl

Solução β	1000 μl
Soro STRIP	q.s.p. 10 ml

SORO REFERÊNCIA 500 ng/dl

Solução β	500 μl
Soro STRIP	q.s.p. 10 ml

SORO REFERÊNCIA 250 ng/dl

Solução β	250 μl
Soro STRIP	q.s.p. 10 ml

SORO REFERÊNCIA 100 ng/dl

Solução β	100 μl
Soro STRIP	q.s.p. 10 ml

SORO REFERÊNCIA 50 ng/dl

Solução B	50 ul
Soro STRIP	q.s.p. 10 ml

SORO REFERÊNCIA 20 ng/dl

Solução B	20 ul
Soro STRIP	q.s.p. 10 ml

SORO REFERÊNCIA 0 ng/dl

Utilizou-se o próprio Soro STRIP

3.11. Protocolo de Radioimunoensaio do T_3 pela Técnica de "Fase Sólida"

Para verificar a qualidade dos tubos recobertos com anticorpo, realizou-se o radioimunoensaio utilizando estes tubos.

Reagentes Empregados:

- tubos de fase sólida preparados segundo o item 3.7.
- soro de referência de T_3 (padrões)
- $^{125}\text{I}-T_3$ diluído em tampão veronal 0,05 M pH 8,6 com 0,035% de ANS e 0,01% de timerosol de modo a se obter a concentração radioativa de 40.000 cpm/ml, aproximadamente.

Procedimento:

O protocolo do radioimunoensaio de T_3 pela técnica de "Fase Sólida", adotado neste trabalho encontra-se esquematizado na figura 7.

3.12. Outras Técnicas de Radioimunoensaio de T_3

Para fins comparativos realizou-se RIE de T_3 , utilizando técnicas já tradicionalmente utilizadas no nosso laboratório, a saber: "Duplo Anticorpo" e "Solução PEG".

Aliquotar 100 μ l dos soros padrões ou amostras
nos tubos previamente recobertos com anti-soro



1 ml do T_3 - ^{125}I



Agitar



Incubar por 4 horas a temperatura ambiente



Decantar sobrenadante



Medir radioatividade do complexo

Figura 7 - Protocolo experimental do RIE de T_3 pela técnica de "Fase Sólida"

3.12.1. Protocolo do RIE do T_3 pela técnica do "Duplo Anticorpo"

Reagentes Empregados:

- a) Soro de referência de T_3
- b) $^{125}\text{I}-T_3$ diluída em tampão veronal 0,05 M pH 8,6 com 0,35% de ANS e 0,02% de timerosal, para se obter uma atividade correspondente a 40.000 cpm por 100 μl
- c) Anticorpo, anti- T_3 diluído 1/10000 em tampão veronal 0,05 M pH 8,6 com 3% de EDTA e 0,02% de timerosal.
- d) Anticorpo antigamaglobulina de coelho (2º anticorpo proveniente do carneiro) e usado na diluição 1/160 em tampão veronal 0,025 M pH 8,6 com 3% de EDTA e 0,02% de timerosal.

Procedimento:

Na figura 8 encontra-se esquematizado o procedimento do RIE de T_3 pela técnica de "Duplo Anticorpo".

3.12.2. Protocolo do RIE pela técnica de "Solução PEG"

Reagentes Empregados:

- a) Soro de referência de T_3
- b) $^{125}\text{I}-T_3$ descrito do item 3.12.1
- c) Anticorpo, anti- T_3 diluído 1/10000 em tampão veronal 0,05 M pH 8,6 com 0,01% de timerosal.
- d) Solução PEG-6000 16% em tampão veronal 0,025 M pH 8,6 com 0,02% de timerosal

Procedimento:

Encontra-se esquematizado na figura 9 o protocolo do RIE de T_3 pela técnica de "Solução PEG".

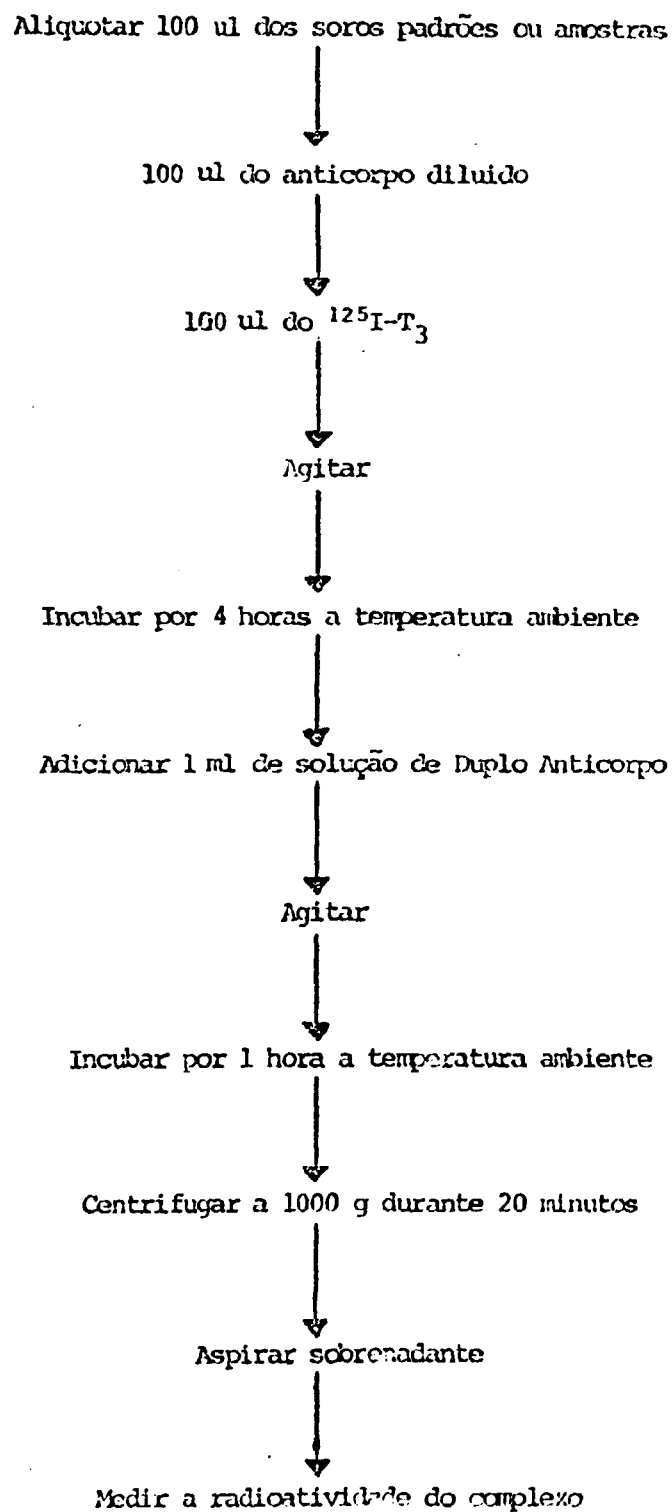


Figura 8 - Protocolo experimental do RIE pela técnica de "Duplo Anticorpo"

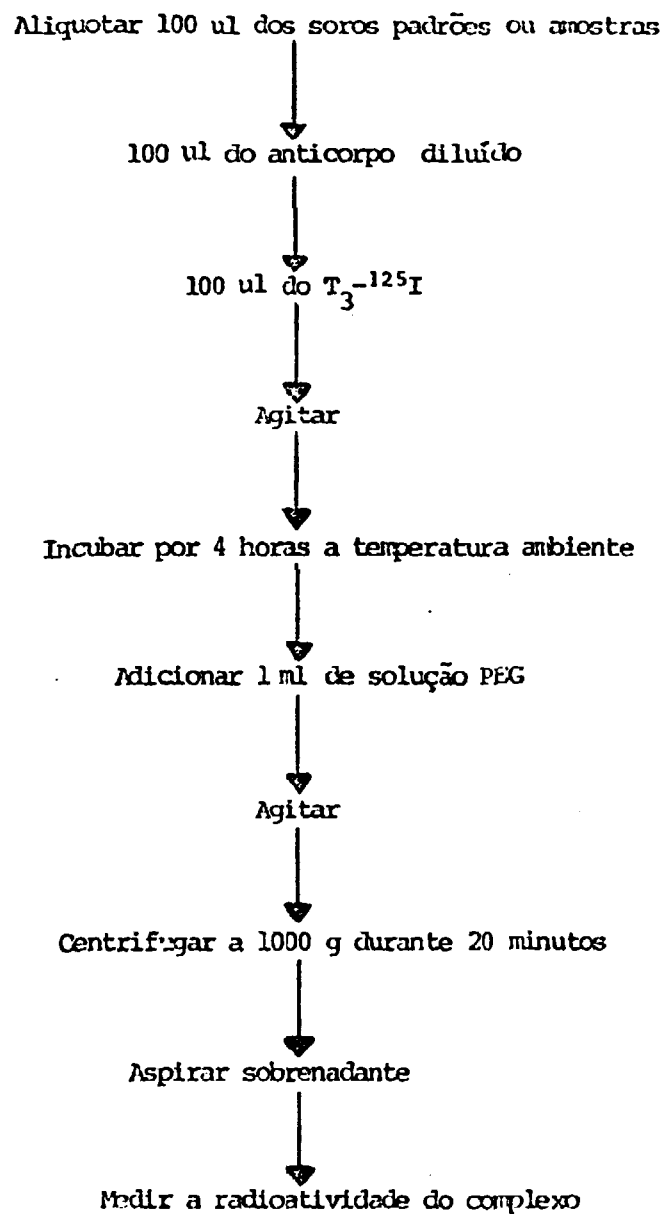


Figura 9 - Protocolo experimental do RII de
T₃ pela técnica de "solução PEG"

3.13. Curvas Padrão

Inicialmente, foram calculadas as razões entre as contagens obtidas para as diversas concentrações de padrões (B) e as contagens obtidas para o padrão 0 (B_0), descontando-se as ligações inespecíficas (NSB) de cada ponto. As curvas padrão foram traçadas em papel semi-logarítmico, tendo em ordenadas as relações $\frac{B - NSB}{B_0 - NSB} \times 100$ e em abcissas as concentrações conhecidas de hormônio.

A curva padrão foi ajustada à função de quatro parâmetros de finidas por :

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

onde:

a = valor assintótico superior, isto é, $a = B_{oc}/T(B_0$ calculado por regressão)

d = valor assintótico inferior, isto é, d = NSB (ligação não específica)

c = parâmetro associado à posição da curva em relação ao eixo das abcissas, isto é, $c = X_{50\%}$ (a concentração do T_3 que desloca efetivamente 50% do complexo $^{125}I-T_3$)

b = parâmetro associado à inclinação da curva, ou seja, a inclinação da reta quando traçado em escala log x logito

3.14. Avaliação dos Ensaio Realizados

3.14.1. Dose mínima detectável

A dose mínima detectável definida como sendo a menor quantidade estatisticamente diferenciável do nível de concentração igual a zero ao nível de limite de confiança de $P = 0,05$, foi calculada segundo os critérios de Ekins ⁽²²⁾ e Rodbard e col ⁽⁷⁴⁾.

3.14.2. Precisão do Ensaio

A avaliação da precisão do ensaio foi feita pela análise de reprodutibilidade intra-ensaio e inter-ensaio.

3.14.2.1. Perfil de precisão intra-ensaio

A reprodutibilidade intra-ensaio foi avaliada pela dispersão (coeficiente de variação) dos resultados encontrados nas duplicatas, de todas as amostras e padrões, em um mesmo ensaio.

3.14.2.2. Perfil de precisão inter-ensaio

Três amostras contendo níveis de concentração de T_3 baixo, médio e alto foram dosadas em duplicata, em ensaios consecutivos e assim avaliou-se a reprodutibilidade inter-ensaio calculando-se o coeficiente de variação dos valores encontrados.

3.14.3. Exatidão

Para o estudo de exatidão, os valores da concentração sérica de T_3 das amostras dosadas pela técnica de "Fase Sólida" foram tabelados e comparados com os resultados obtidos pelas técnicas de "Duplo Anticorpo" e "Solução PEG", técnicas estas consensualmente aceitas e utilizadas na literatura pertinente. Lançou-se, em gráfico linear com projeção tridimensional os resultados obtidos de "Fase Sólida", "Duplo Anticorpo" e "Solução PEG" do mesmo conjunto de amostra. Determinaram-se os coeficientes de regressão entre os resultados destas três técnicas, comparados entre si.

3.14.4. Dígito de Mérito (D.M.)

Para análise conjunta dos diferentes parâmetros envolvidos na caracterização do Radioimunoensaio, adotou-se como parâmetro de comparação um dígito de mérito, que refletisse a qualidade de ensaio em contexto amplo.

Considerando que a técnica mais eficiente é aquela que apresenta maior precisão nos resultados e detecta a menor quantidade do hormônio, a análise conjunta desses dois parâmetros é indicada, conforme exemplo gráfico da figura 10.

O dígito de mérito foi calculado utilizando a seguinte expressão:

$$D.M. = \frac{DMD \times \int_{DMD}^F \text{Perfil}}{(F - DMD)^2} \quad (2)$$

onde: DMD = valor de dose mínima detectável

F = valor do último ponto da concentração do hormônio da curva padrão

$\int_{DMD}^F \text{Perfil}$ = área do perfil de precisão do ensaio do ponto DMD até F. A área foi calculada por cálculos numéricos.

3.15. Cálculos utilizados na avaliação dos resultados

Os cálculos para a caracterização dos parâmetros da curva padrão, da dose mínima significativa, do perfil de precisão do ensaio, da constante de afinidade, da concentração do anti-soro no tubo de reação (Análise de Scatchard) foram efetuados pelo sistema computacional GAPLA⁽⁵⁶⁾, disponível no Departamento de Processamento de Dados do IPEM-CNEN/SP.

3.16. Caracterização da faixa de normalidade

Seguindo-se o protocolo experimental descrito no item 3.11, foram coletados 153 soros de indivíduos considerados clinicamente normais, sendo 80 do sexo feminino e 73 do sexo masculino, com idade entre 20 e 60 anos (média de 35 anos). Esses resultados foram agrupados e traçado o histograma. Atestando-se que os valores obedecem à distribuição normal, determinamos a

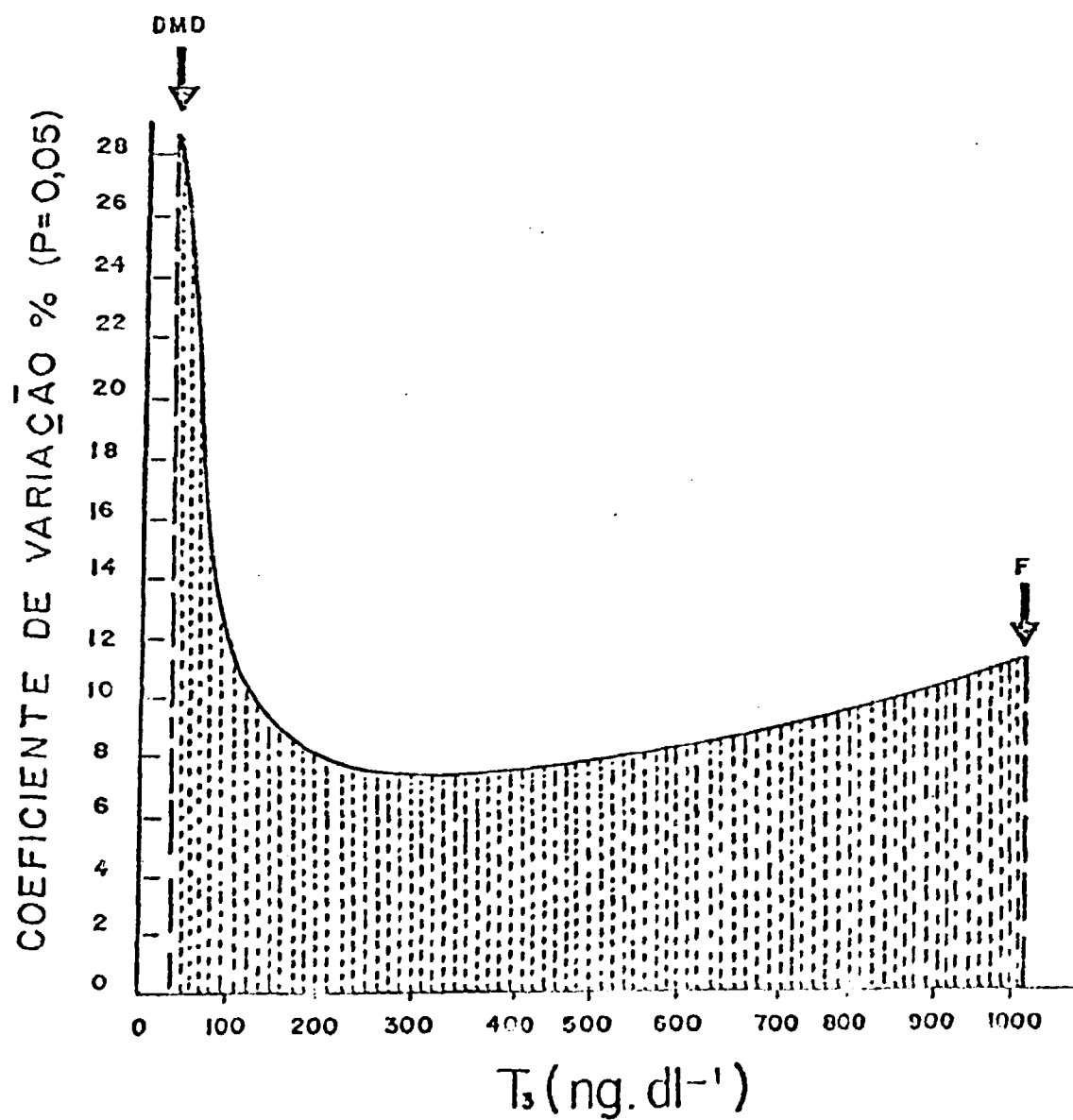


Figura 10: Elementos para o cálculo do dígito de mérito para a comparação da qualidade entre técnicas de ensaio: área do perfil de precisão de limitada pela dose mínima detectável (DMD) e o fim (F) da escala da curva padrão.

média aritmética de seus resultados e o seu desvio padrão, permitindo assim estabelecer a faixa de normalidade.

3.17. Determinação dos níveis séricos de T_3 em pacientes hipotireoideo e hipertireoideo

Selecionaram-se amostras séricas, de pacientes com hipotireoismo e hipertireoidismo. Determinou-se a concentração de T_3 em soro destas amostras e agrupou-se os resultados dos diversos níveis de concentração em torno da respectiva média.

III. RESULTADOS

1. TRIIODOTIRONINA MARCADA COM ^{125}I

1.1. Purificação do T_3 radioiodado

Na figura 11 encontra-se o cromatograma típico da separação em coluna de Sephadex G-25 fino do $^{125}\text{I}-\text{T}_3$ logo após a radioiodação, de uma das 12 marcações realizadas.

Apresentam-se três picos onde:

- a) o primeiro corresponde ao ^{125}I que não reagiu. Como pode ser visto, na figura 12, apresentou eletroforetograma idêntico ao do Na^{125}I , quando submetido à eletroforese de papel.
- b) o segundo corresponde ao T_3 marcado, o que foi comprovado pelo seu alto nível de ligação (~90%) com excesso de anticorpo, anti- T_3 , quando estes foram incubados e
- c) o terceiro ao T_4 marcado, pela sua alta ligação (~90%) com excesso de anticorpo, anti- T_4 .

A figura 13 (A) mostra o perfil resultante da análise eletroforética da fração correspondente ao pico do $^{125}\text{I}-\text{T}_3$, logo após a purificação, enquanto a figura 13 (B) apresenta o eletroforetograma da mesma amostra, após decorridos 105 dias da sua purificação.

1.2. Rendimento da Marcação do Hormônio com ^{125}I

Na tabela I encontram-se os valores das áreas dos picos 1, 2 e 3, provenientes das 12 marcações. A soma dos valores percentuais das áreas correspondentes aos picos 2 e 3, fornece a estimativa do rendimento da marcação, enquanto o valor percentual da área correspondente ao segundo pico,

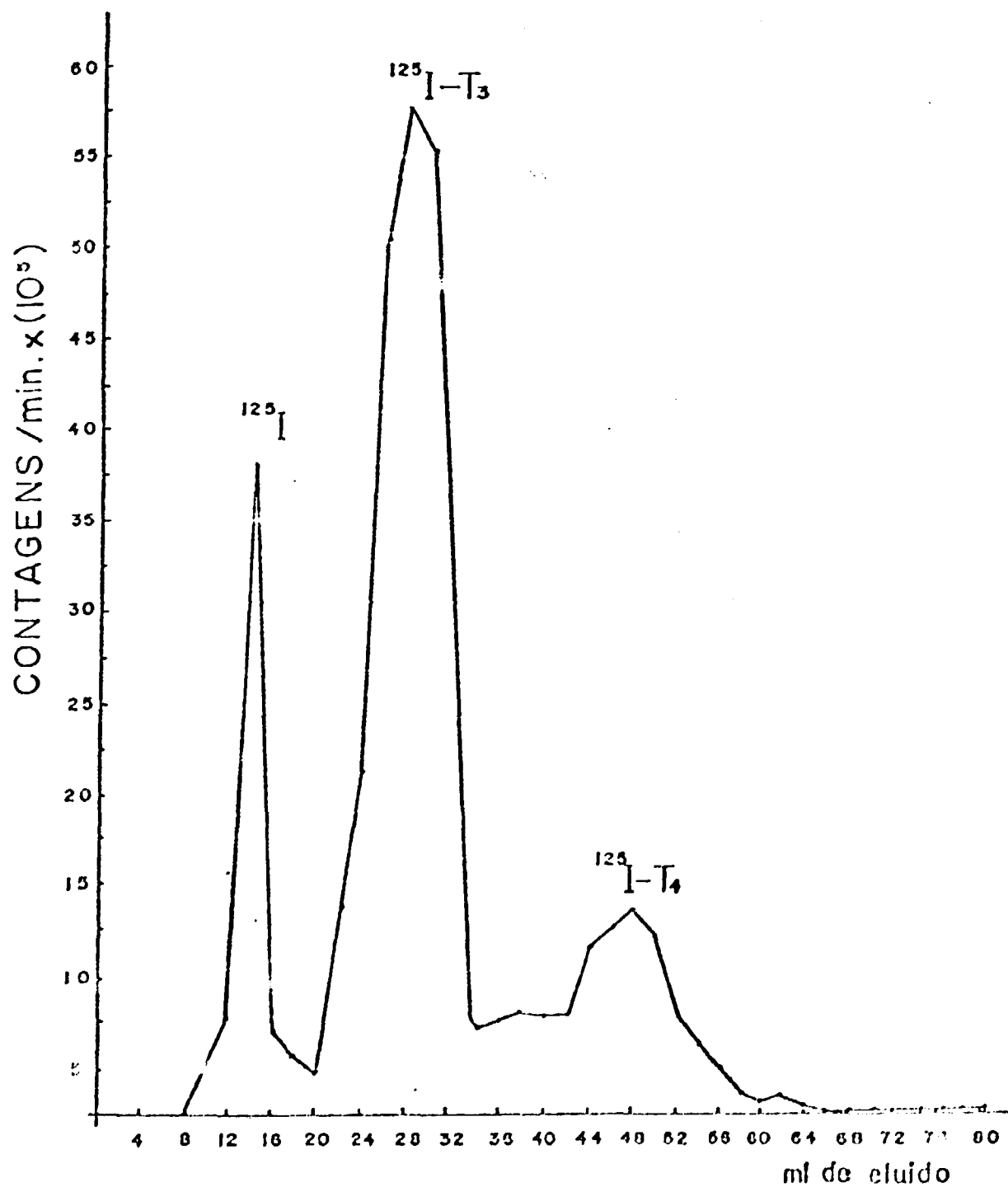


Figura 11 - Radiocromatograma de purificação em Sephadex G-25 fino do T_3 marcado com ^{125}I , com fluxo de 40 ml/hora em eluente tampão fosfato 0,05 M pH 11,9

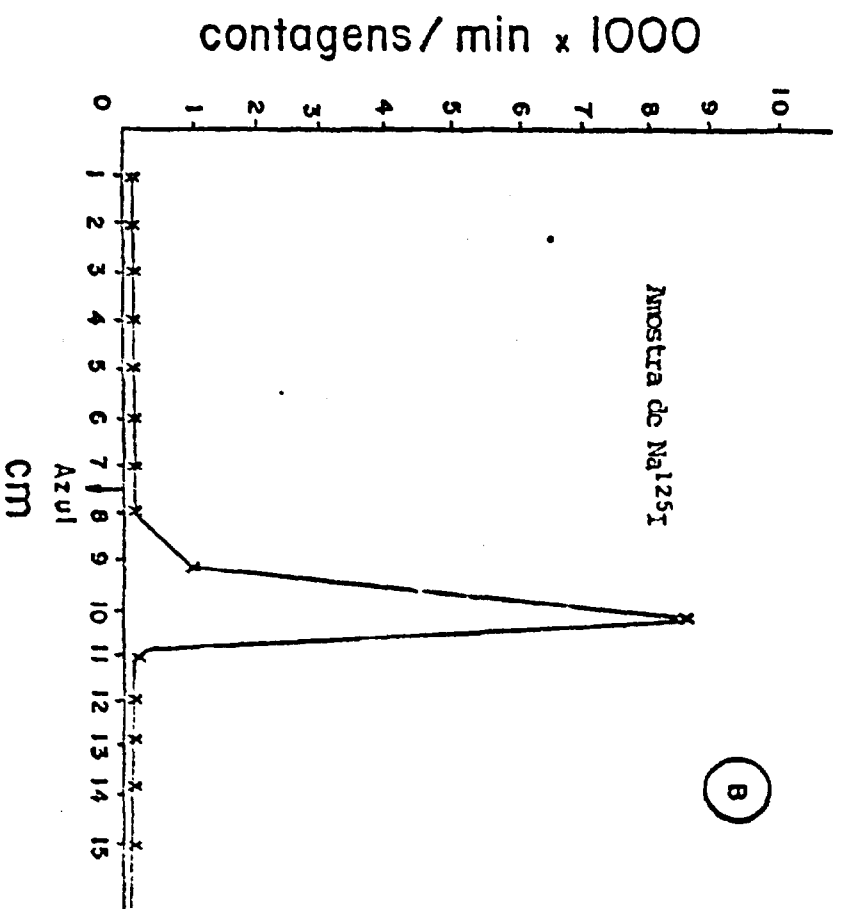
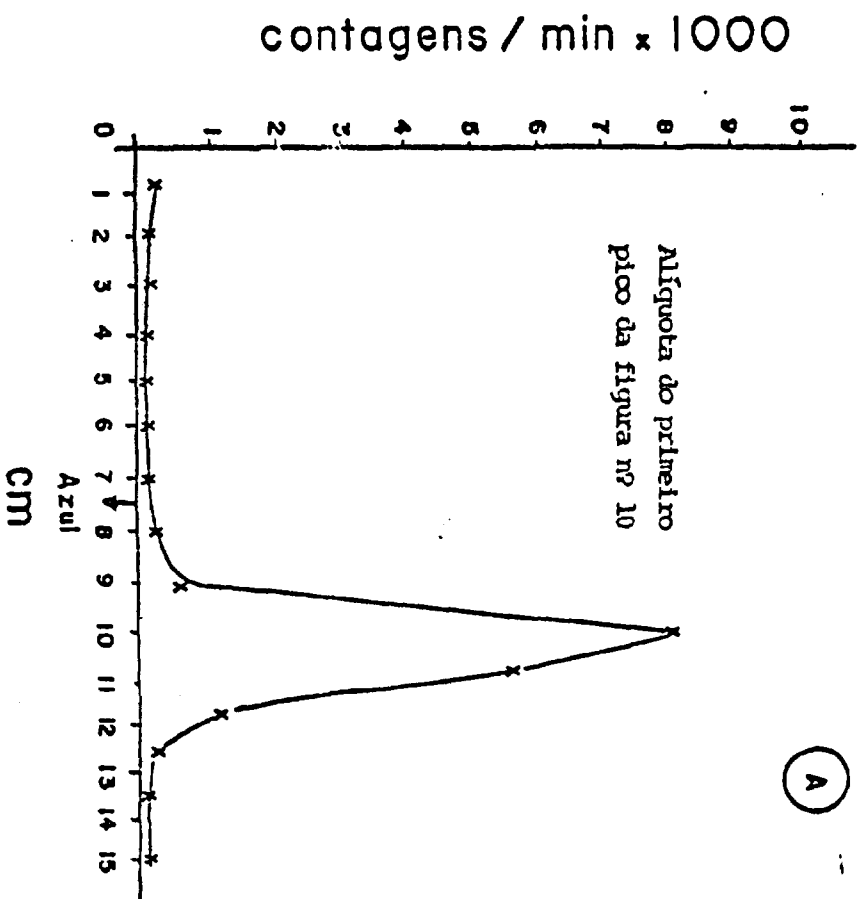


Figura 12 - Eletroforetogramas comparativos entre o I^{125}I (B) e o plco 1

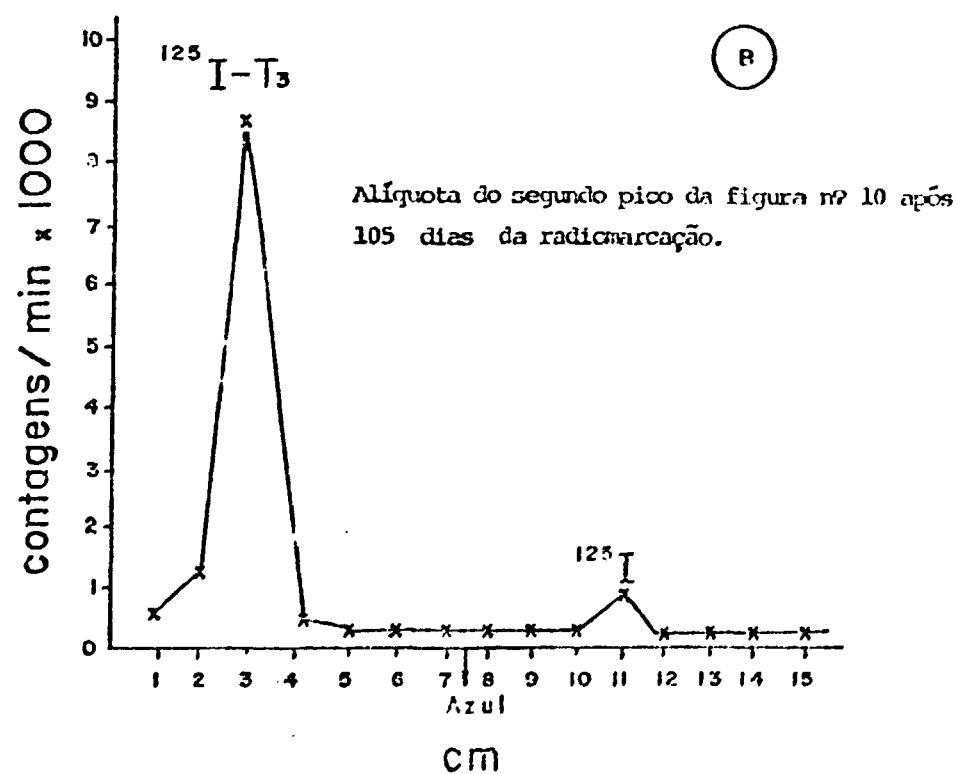
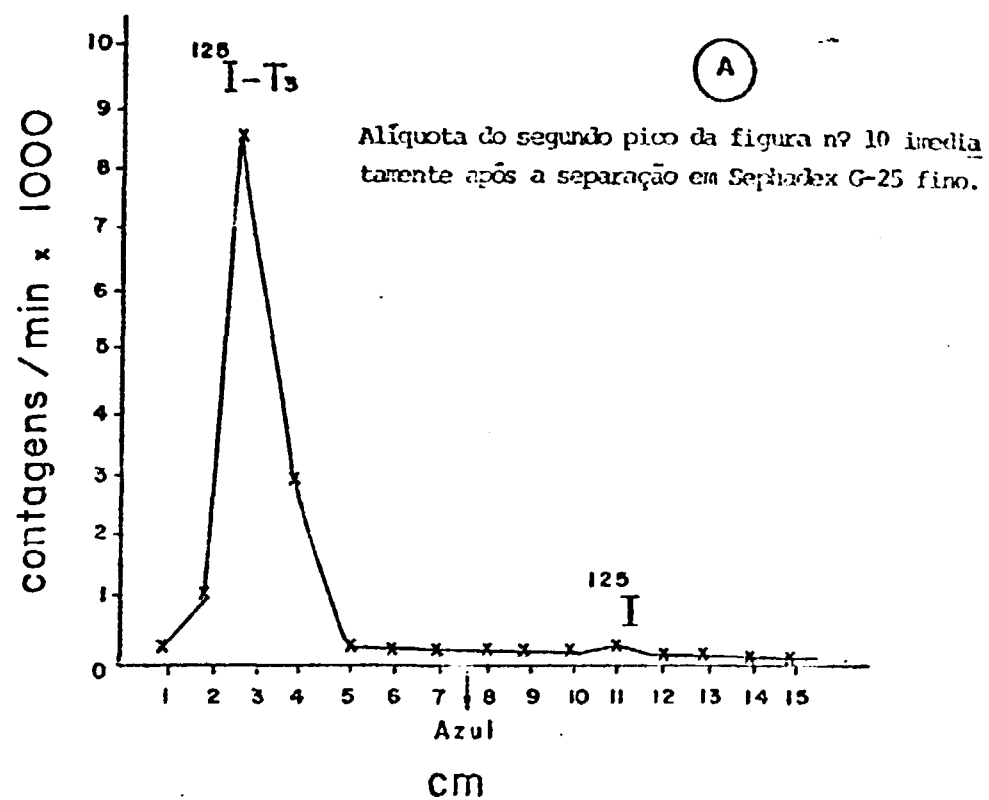


Figura 13 - Eletroforetograma do $^{125}\text{I}-\text{T}_3$ (Alíquota do pico nº 2), obtido logo após a purificação em Sephadex G-25 fino (A) e 105 dias após a purificação (B)

Tabela I- Resultados dos cálculos de áreas (%) do perfil do radiocromatograma e da atividade específica do $^{125}\text{I-T}_3$.

Fracções	A de ^{125}I	A de $^{125}\text{I-T}_3$	A de $^{125}\text{I-T}_4$	A de ($^{125}\text{I-T}_3 + ^{125}\text{I-T}_4$)	Atividade específica (cpm/g)*
1 ^o	23	45	32	77	93 101
2 ^o	31	40	29	69	99 77
3 ^o	24	46	30	76	87 114
4 ^o	18	59	23	82	96 93
5 ^o	29	50	21	71	135 123
6 ^o	29	45	26	71	131 99
7 ^o	25	46	29	75	107 149
8 ^o	21	53	26	79	119 95
9 ^o	26	50	24	74	142 121
10 ^o	25	48	27	75	75 97
11 ^o	30	48	22	70	129 136
12 ^o	19	53	28	81	97 114
$\bar{x} \pm s$	$25,0 \pm 4,3$	$48,6 \pm 4,9$	$26,4 \pm 3,4$	$75,0 \pm 4,3$	$110,0 \pm 21,6$

* valores respectivos do primeiro e segundo radiocromatogramas realizados.

fornece a estimativa do $^{125}\text{I-T}_3$ formado na marcação.

1.3. Determinação da Atividade Específica

A figura 14 mostra a relação linear entre os níveis de radioatividade e respectivas concentrações do T_3 marcado determinadas pelo método do autodeslocamento para o cálculo da atividade específica.

A tabela I apresenta os resultados da atividade específica do $^{125}\text{I-T}_3$, em 24 ensaios. O valor médio daqueles resultados foi de $(110 \pm 23,6)$ TBq/g (2994 ± 638) Ci/g. Este valor permite estimar que a incidência de átomos de ^{125}I por moléculas de T_3 foi da ordem de $(0,9 \pm 0,2)$ $^{125}\text{I/molécula}$.

Estes dados permitem inferir que a atividade adicionada nos tubos do: radioimunoensaio (40.000 cpm ou ~50.000 dpm) representa aproximadamente 60 pg de T_3 marcado.

1.4. Estudo da Estabilidade do $^{125}\text{I-T}_3$, conservado em propileno glicol 50%

A figura 15 mostra o comportamento cinético da decomposição do $^{125}\text{I-T}_3$ conservado em propileno glicol 50% em temperatura de -20°C , ao longo de 105 dias. Neste estudo foi utilizada a cromatoeletroforese e a coluna de Sephadex G-25. Conto e cinco dias após a marcação 90% da radioatividade de presente representava $^{125}\text{I-T}_3$ indene.

2. OBTENÇÃO DO ANTI-SORO

2.1. Quantidade de T_3 conjugado ao soro albumina bovina (SAB)

O resultado da medida do T_3 radioativo não dialisado da mistura de conjugação indicou que aproximadamente 13 moléculas de T_3 foram incorp

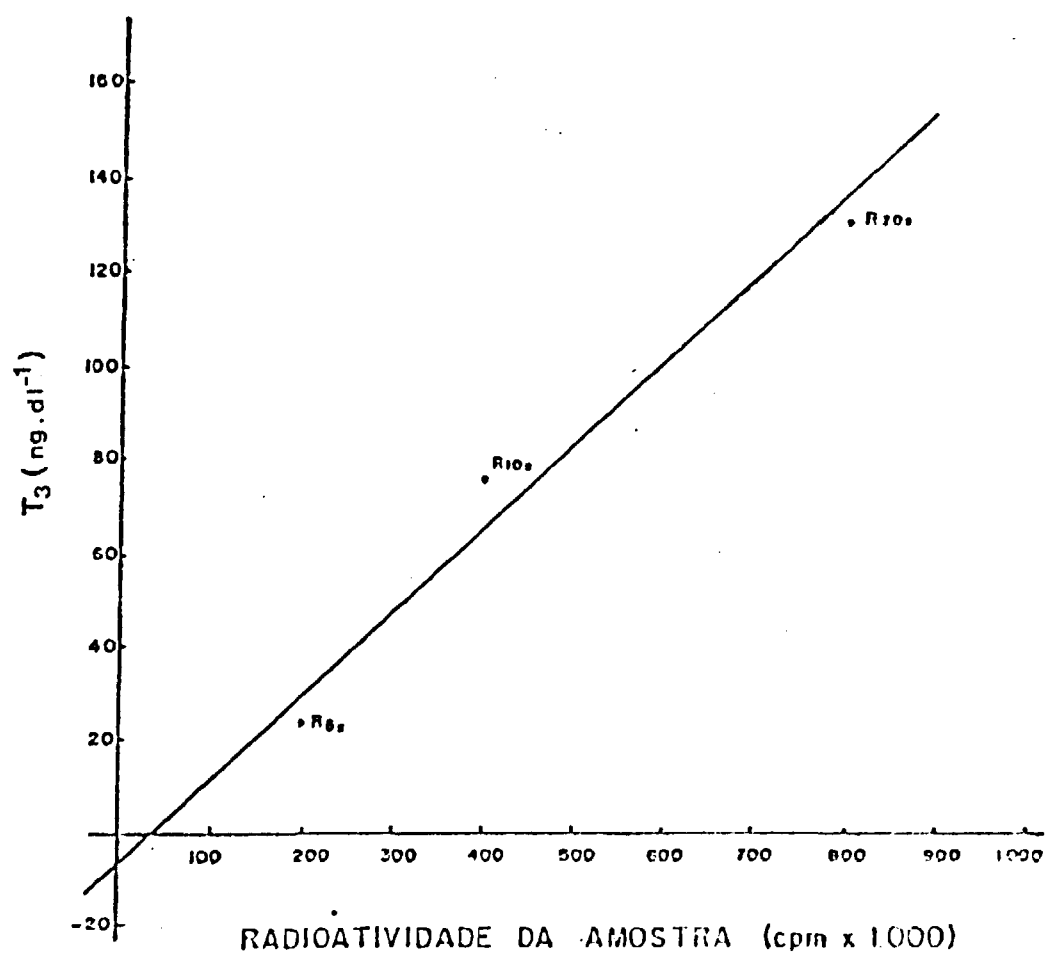


Figura 14 - Relação linear entre a radioatividade utilizada para o cálculo da atividade específica e as respectivas concentrações de T₃ marcado

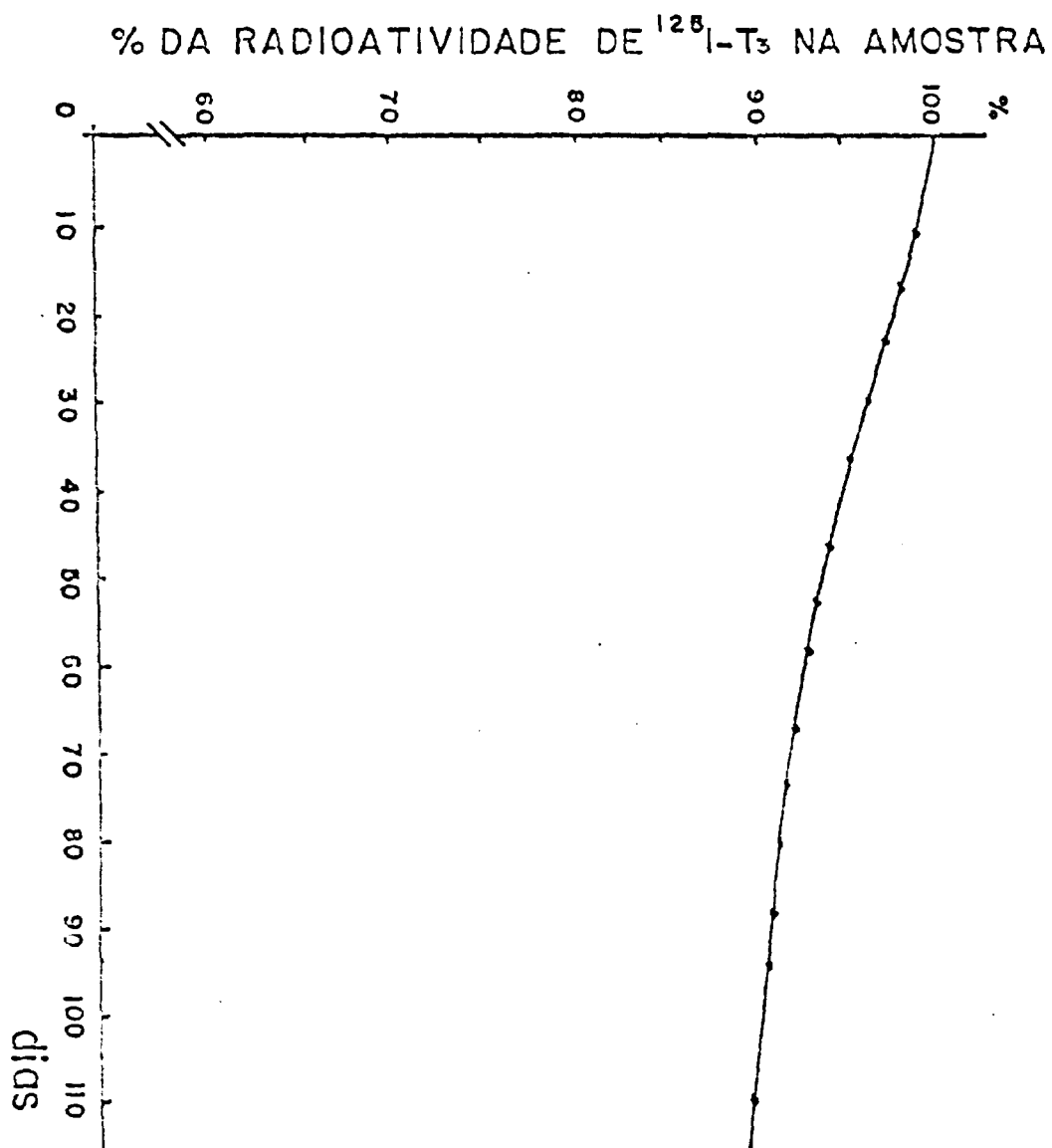


Figura 15 - Análise da pureza do $^{125}\text{I}-\text{T}_3$ conservado
em solução de propileno glicol a 50%

porados à cada molécula de SAB, o que está de acordo com a literatura (16,24).

2.2. Preparação do Anti-Soro

Após quatro meses da primeira aplicação do imunógeno obteve-se o anti-soro com título compatível aos ensaios. Dos três coelhos imunizados, somente um, mostrou-se satisfatório para fins de recobrimento dos tubos. Todos os dados relatados a seguir referem-se a esse anticorpo.

A evolução da ligação do anticorpo, anti- T_3 , nas diluições 1/50, 1/500, 1/3000 e 1/10000 com o traçador encontram-se na figura 16. Nesses estudos utilizou-se a técnica da "Solução PEG" descrita no capítulo II, figura 9.

2.3. Separação das Imunoglobulinas G (IgG) do anti-soro, anti- T_3

A concentração de proteína da solução final, obtida após precipitação com sulfato de amônio e diálise, foi de 1,3 ng/ml.

2.4. Estudo das Condições Adequadas para o Recobrimento dos Tubos com Anticorpo (tubos de "Fase Sólida")

2.4.1. Efeito do pH na polimerização do glutaraldeído nas paredes dos tubos

Na figura 17 mostra-se o efeito do pH da solução do glutaraldeído no pré-recobrimento dos tubos.

Os tubos recobertos com glutaraldeído em pH 7,0 e 3,5 não mostraram diferenças significativas com aqueles encontrados nos tubos inibidos por simples adsorção. Por outro lado, os tubos tratados com glutaraldeído em pH 9,5 apresentou maior capacidade de ligação com o traçador.

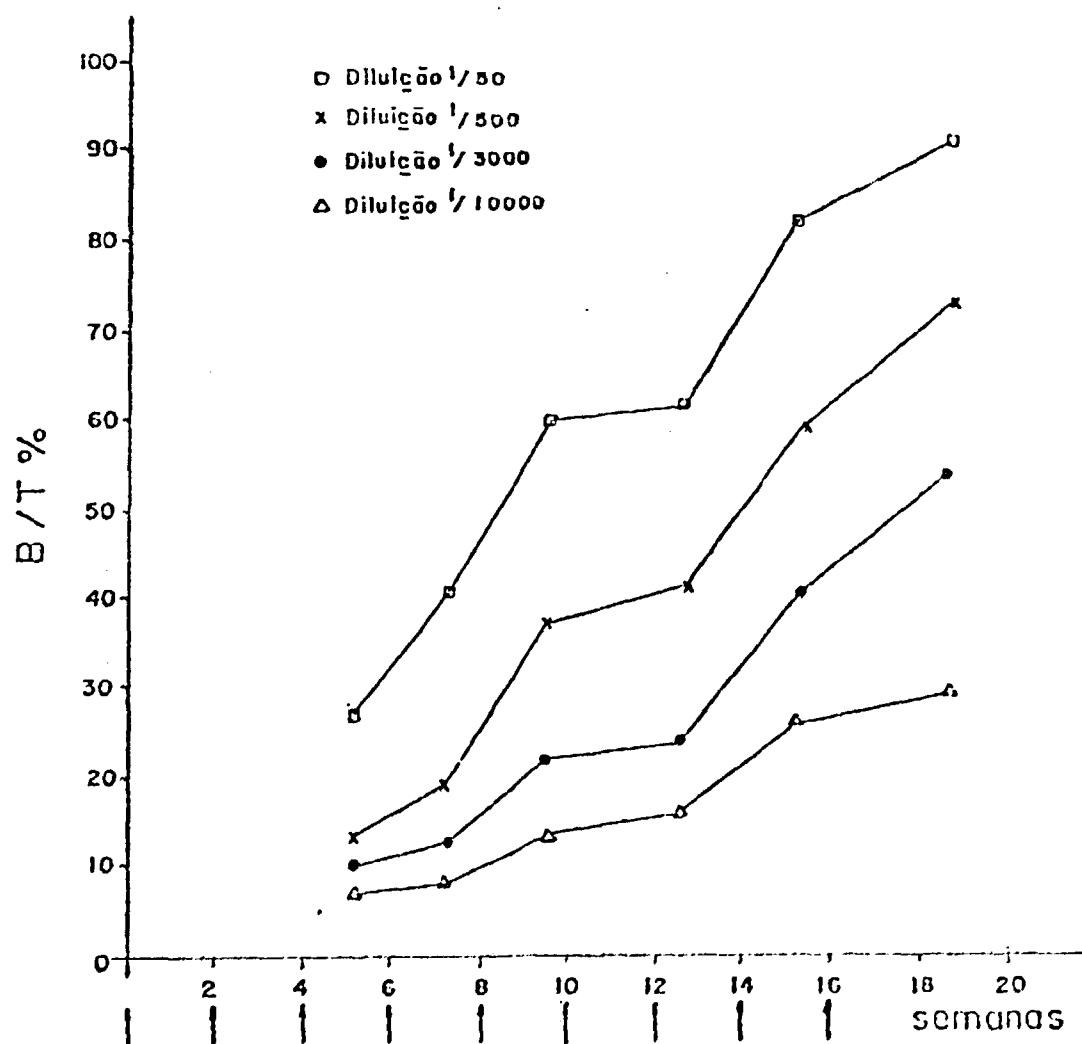


Figura 16: Evolução da ligação do anticorpo anti- T_3 com $^{125}I-T_3$. As flechas indicam a data das injeções da emulsão contendo o conjugado imunogênio T_3 -GAB.

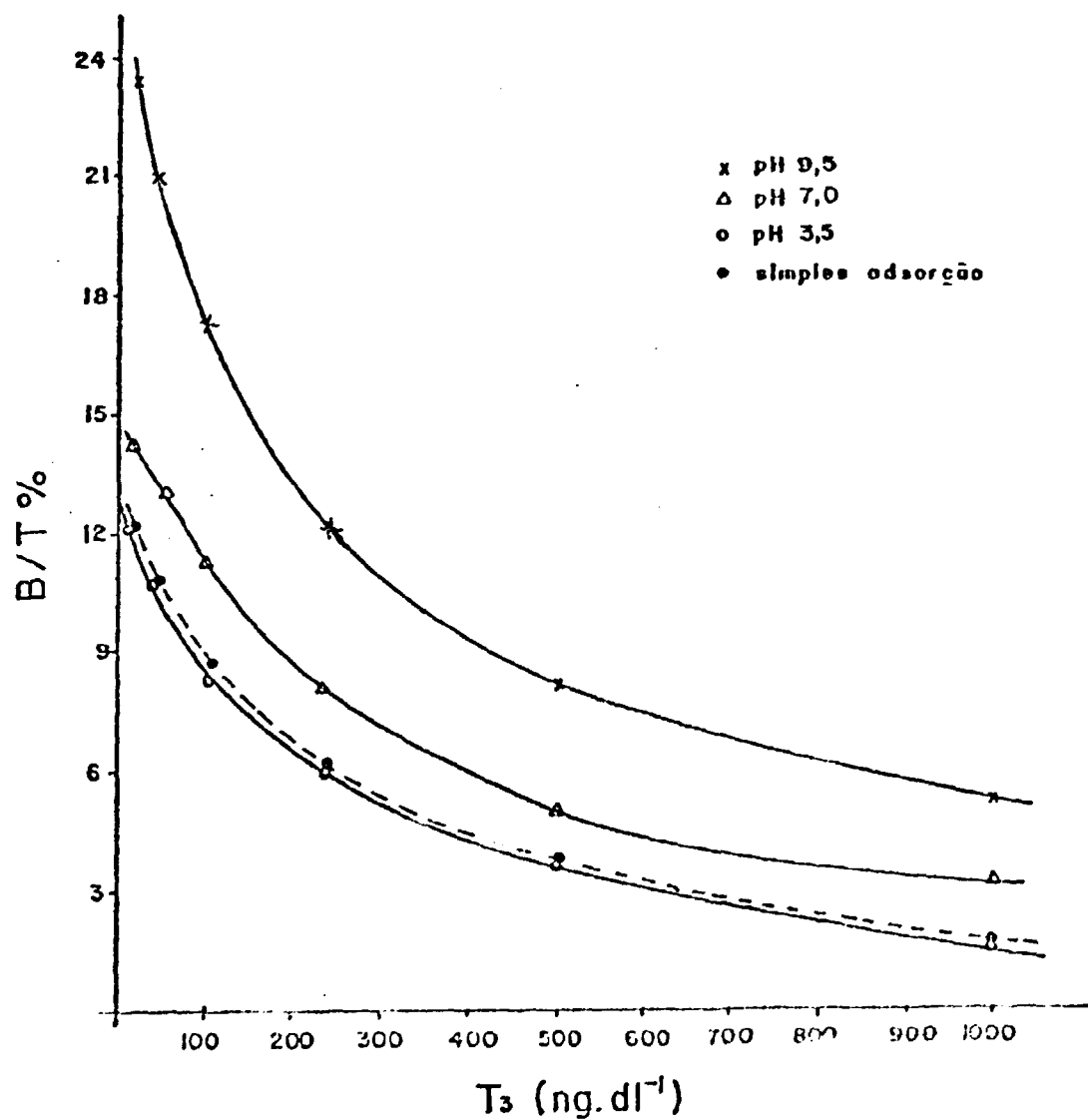


Figura 17: Curva padrão do RIE de T_3 utilizando-se glutaraldeído em diferentes pH e curva padrão do RIE de T_3 dos tubos preparados por simples adsorção.

2.4.2. Efeito da concentração do glutaraldeído no recobrimento dos tubos

O efeito da concentração do glutaraldeído para pré-recobrimento dos tubos na curva padrão do RIE de T_3 , encontra-se na figura 18. A capacidade de ligação mais alta do traçador foi obtida nos tubos tratados com glutaraldeído diluído a 10%. No entanto a diluição de 2% apresentou curva padrão com qualidade superior para a quantificação do nível sérico do T_3 .

2.4.3. Efeito da temperatura no recobrimento dos tubos

No pré-recobrimento dos tubos, a temperatura de polimerização de glutaraldeído que mostrou ser a mais eficiente foi a de 20°C. Conforme ilustra a figura 19 esta temperatura foi a que apresentou a ligação mais alta, sem comprometer a sensibilidade da curva padrão.

2.4.4. Tempo de incubação para recobrimento dos tubos

Foi necessário um mínimo de três horas para a polimerização do glutaraldeído na superfície das paredes dos tubos. Incubações no intervalo de 3 a 6 horas não mostraram diferenças significativas no processo de pré-recobrimento.

O efeito do tempo de incubação após adição do anticorpo nos tubos pré-recobertos com glutaraldeído encontra-se na figura 20. O intervalo de tempo de recobrimento que mostrou-se adequado foi entre 24 a 36 horas.

Baseados nesses resultados, os tubos de "Fase Sólida" utilizados em todos os ensaios descritos a seguir, foram preparados conforme o protocolo descrito na figura 3 do capítulo II, item 3.7, isto é, pré-recobrimento dos tubos com glutaraldeído diluído a 2% em pH 9,5, durante 4 horas a 20°C e tempo de incubação do anticorpo nos tubos pré-recobertos de 24 horas, a temperatura de 4°C.

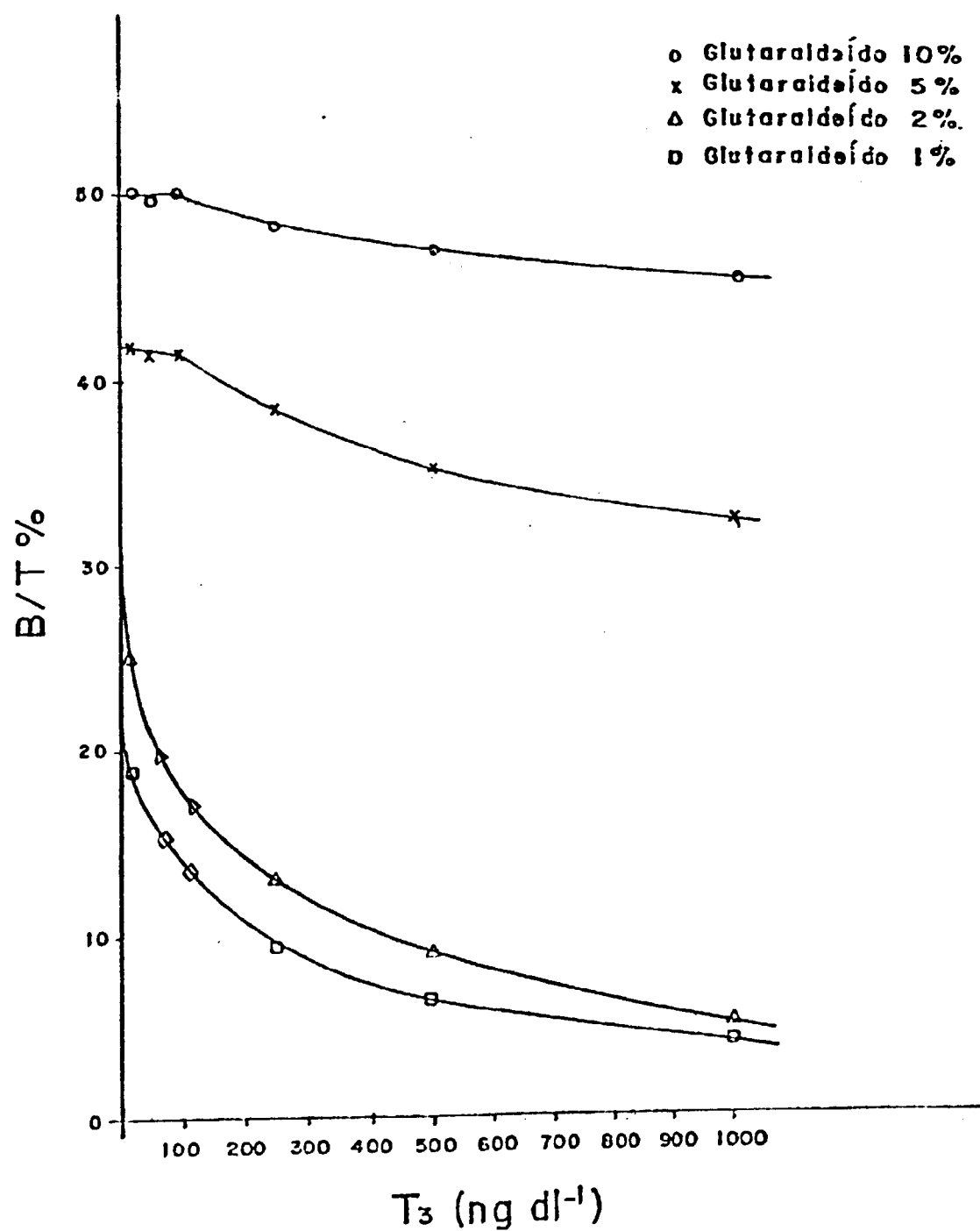


Figura 18: Efeito da concentração do glutaraldeído utilizado no recobrimen-
to dos tubos sobre a curva padrão do RIE de T_3 . Valores de B/T
sem descontar o valor do NSB (nível de ligação não específica,
i.e., nível de B/T % quando a concentração de T_3 tende a ∞).

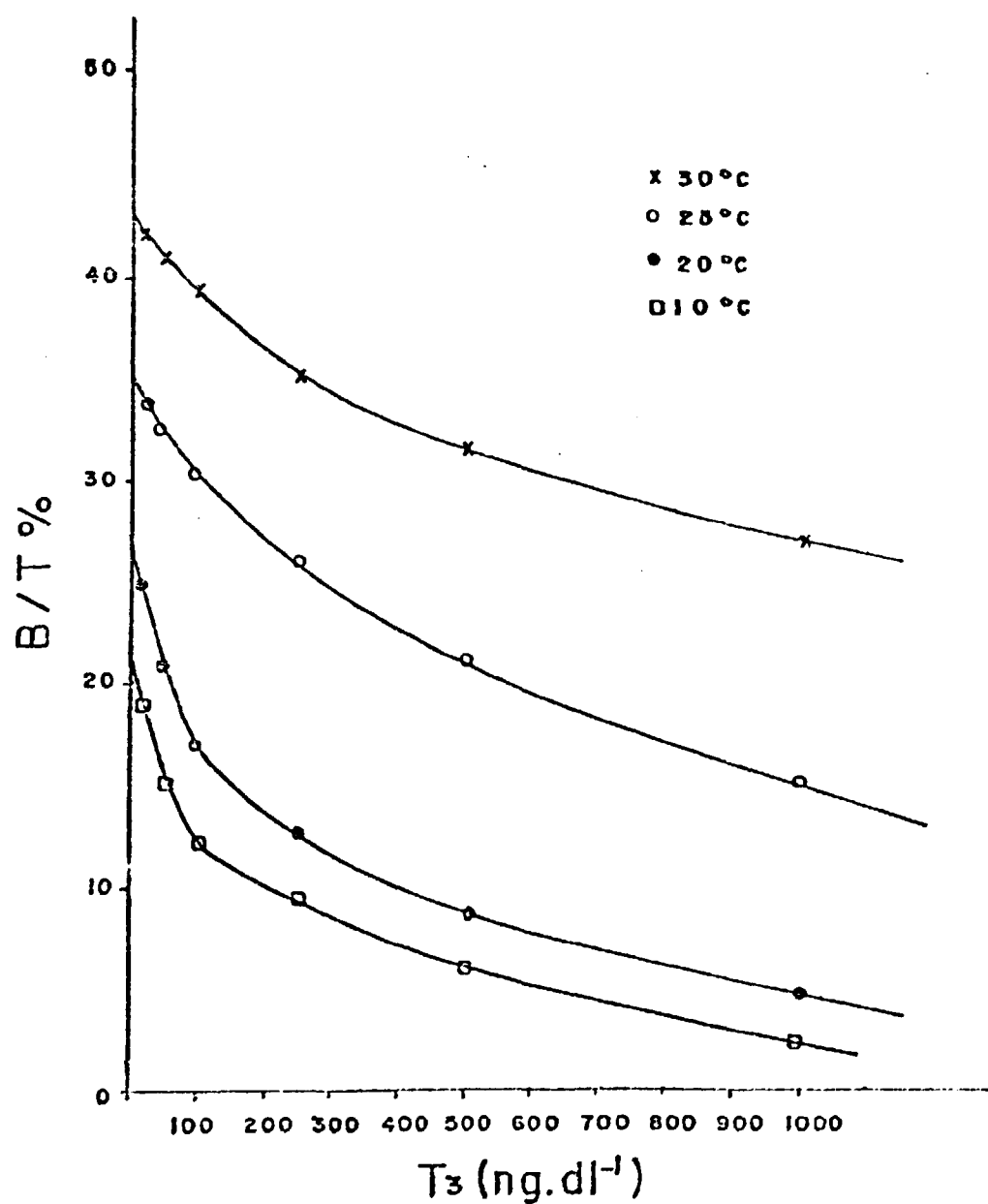


Figura 19: Efeito da temperatura na polimerização do glutaraldeído sobre a curva padrão do RIE de T₃. Valores de B/T sem descontar o NSB (vide texto da figura 17).

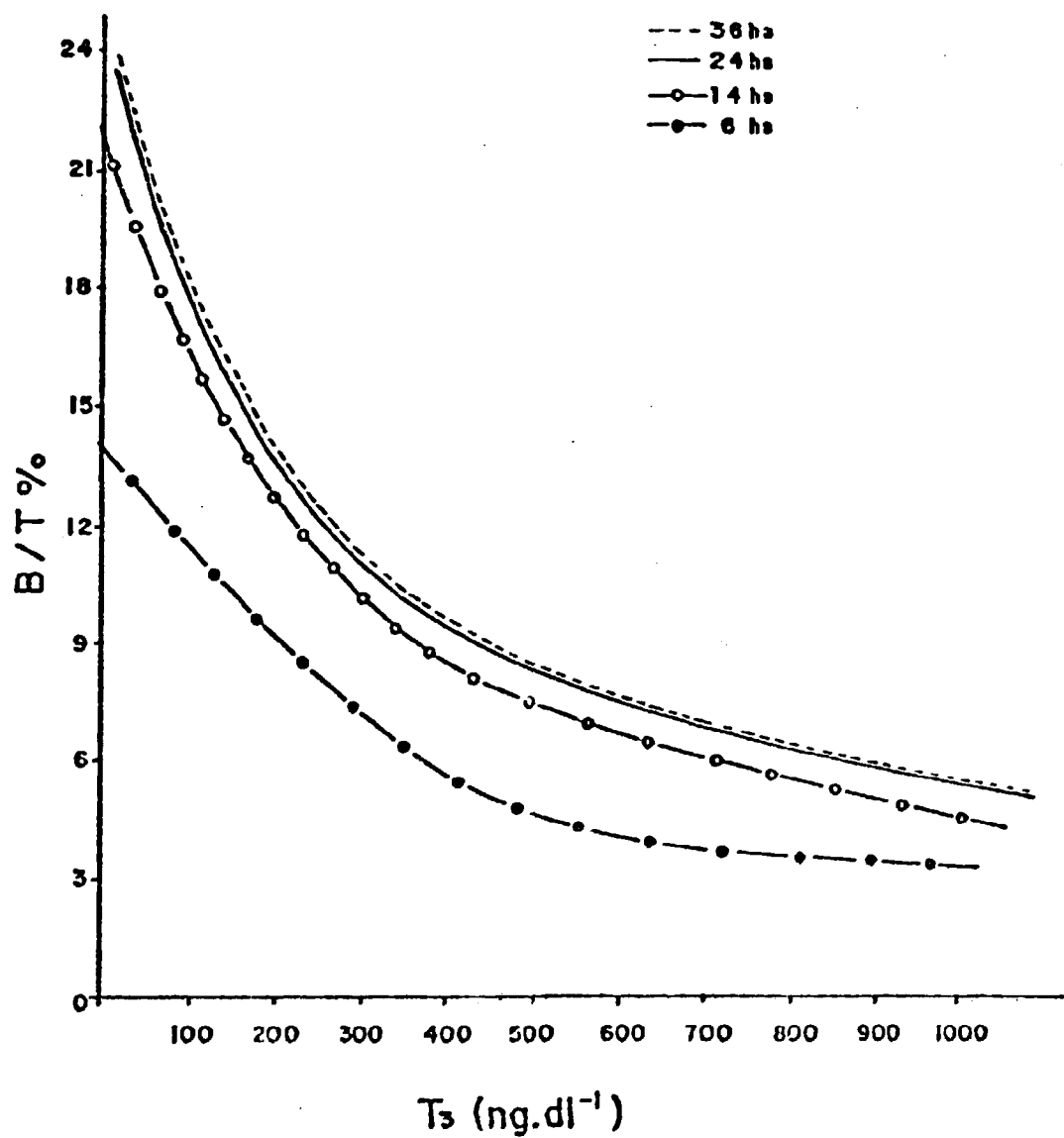


Figura 20: Efeito do tempo de incubação para recobrimento dos tubos com anti-corpo anti- T_3 na curva padrão do RIE de T_3 .

2.5. Avaliação das características do anti-soro

2.5.1. Determinação da diluição adequada do anticorpo para recobri- mento dos tubos

O resultado da determinação da diluição apropriada do anti-
corpo para preparação dos tubos de fase sólida encontra-se na figura 21.

A diluição do anticorpo que mostrou ser adequada para propor-
cionar uma ligação com o traçador em torno de 25% foi 1/1000. O valor de li-
gação ao nível de 25% foi selecionado por desejarmos desenvolver ensaios
com maior sensibilidade.

Os tubos de fase sólida preparados por simples adsorção do
anticorpo na parede dos tubos proporcionou uma ligação máxima de 14%, como
pode ser visto na figura 21.

2.5.2. Especificidade do anti-soro, anti-T₃ utilizado

A figura 22 mostra curvas de doses-resposta obtida pelo des-
locamento do complexo ¹²⁵I-T₃-anticorpo (anti-T₃) utilizando os padrões de
T₃ e padrões de diferentes substâncias análogas ao T₃.

Na tabela II estão relacionados os resultados da avaliação
de especificidade dos ensaios, quanto ao índice de reação cruzada de subs-
tâncias análogas ao T₃ utilizando-se o anticorpo, anti-T₃ conseguido neste
experimento.

2.5.3. Caracterização da constante de afinidade e concentração nor- mal do anti-soro

A figura 23 mostra o resultado gráfico da análise de
Scatchard na qual associa a concentração do T₃ versus $\frac{B/F}{1 - B/F}$ para

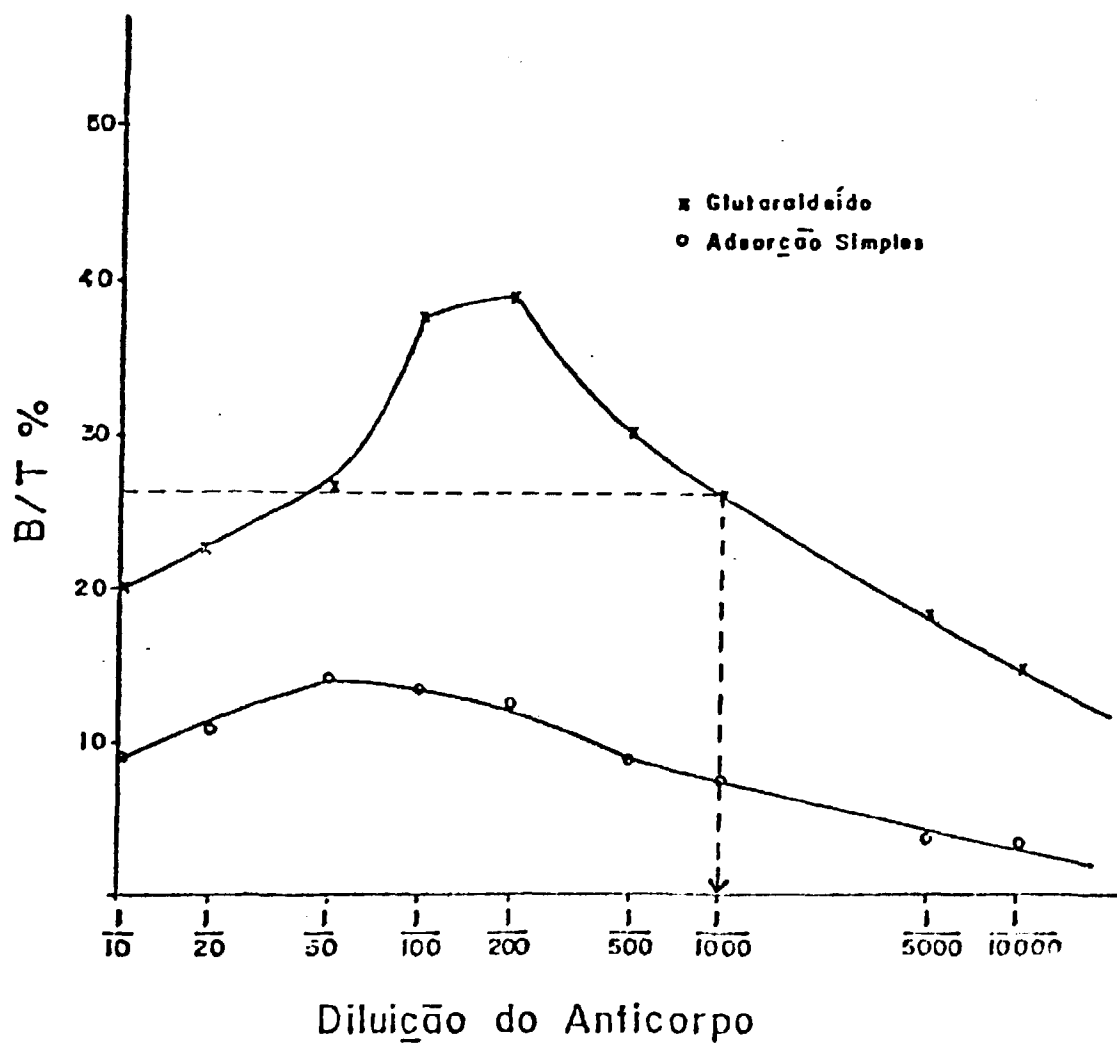


Figura 21: Determinação da diluição adequada do anticorpo para preparação dos tubos de "fase sólida".

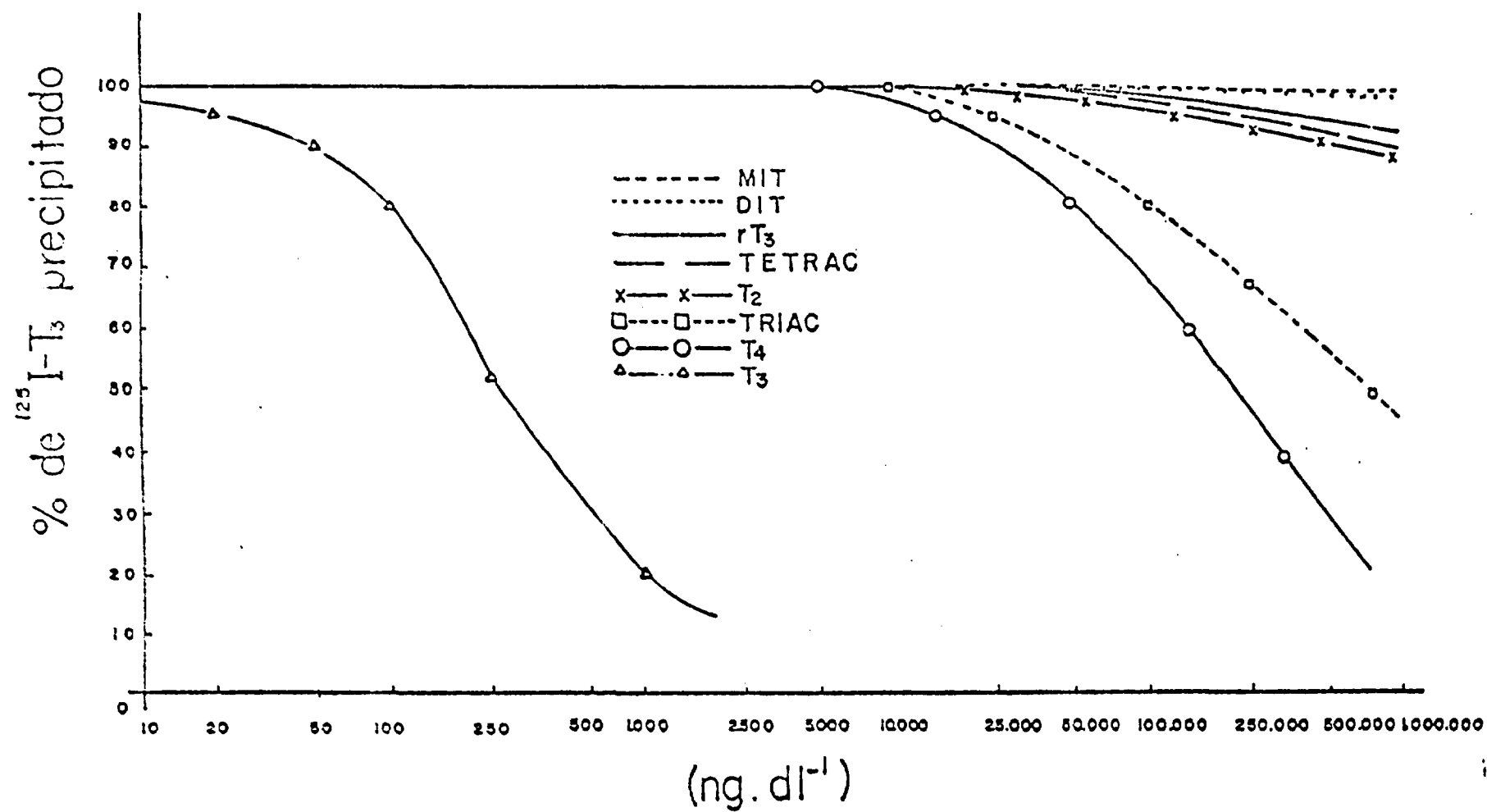


Figura 22: Curvas de dose resposta de T₃ e a reatividade cruzada com as diferentes substâncias análogas ao T₃.

Tabela II - Porcentagem de reatividade cruzada do anticorpo, anti- T_3 com as substâncias análogas a T_3

Compostos	Índice de reatividade cruzada (%)
T_3	100
T_4	0,05
rT_3	0,0008
T_2	0,006
TETRAC	0,004
TRIAC	0,02
DIT	0,0001
MIT	0,0001

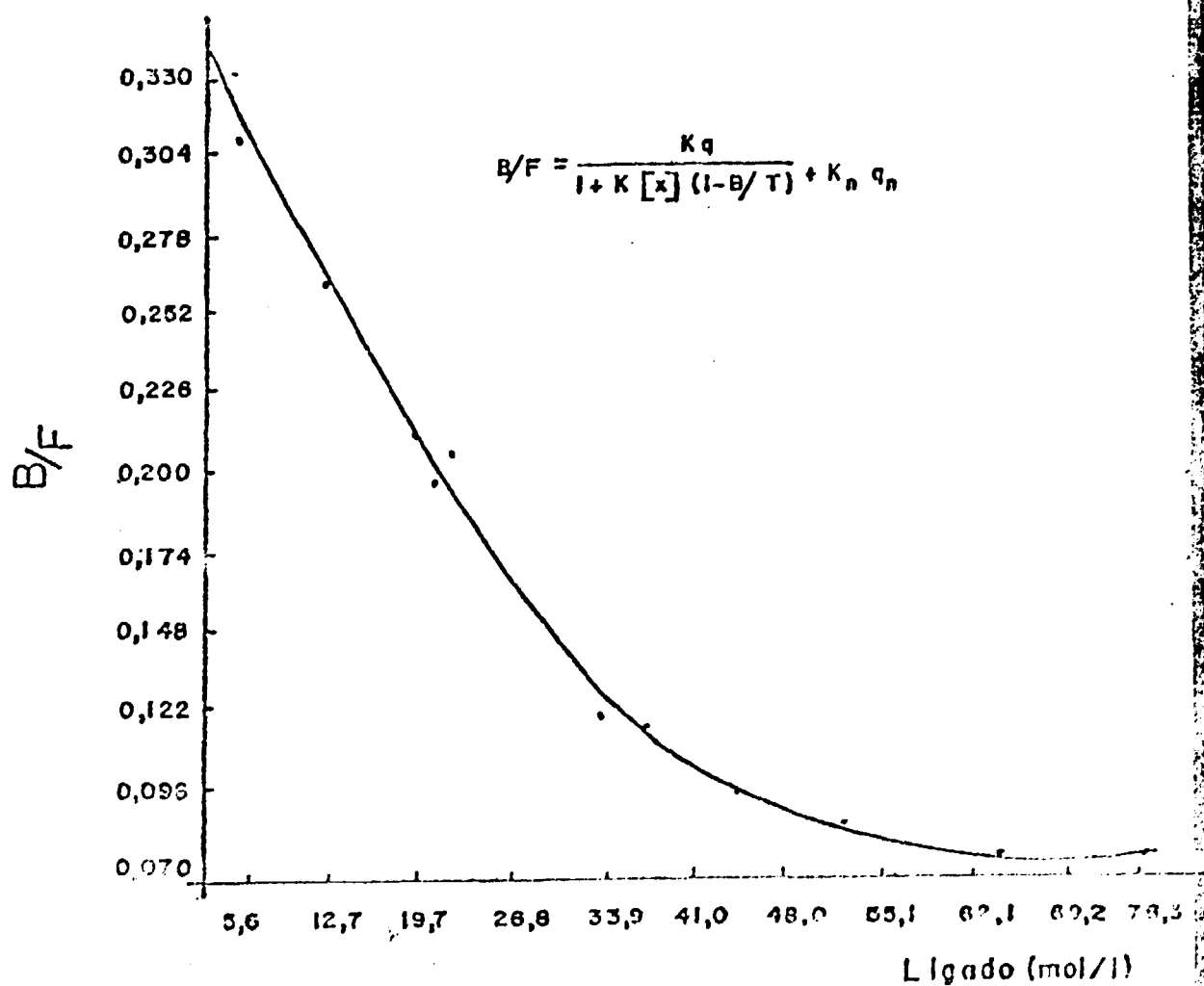


Figura 23: Traçado da curva de Scatchard do ensaio do T_3 por "Fase S111 da" para determinação da constante de afinidade (K) e concentração molar (q) do anticorpo.

tindo-se daí inferir a constante de afinidade "K" e a concentração molar "q" do anti-soro.

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

Os dados experimentais contidos na figura 23 se ajustaram adequadamente ao modelo analítico de dois tipos de sítios de ligação, expresso pela função:

$$\frac{B/T}{1 - B/T} = \frac{K_q}{1 + K [X] (1 - B/T)} + K_n q_n$$

representativo de duas populações de moléculas das quais uma é específica e saturável e outra não específica e insaturável. Nesta equação "K" representa a constante afinidade propriamente dita, "q" a concentração molar das moléculas de anti-soro, $K_n q_n$ o produto representativo das ligações denominadas de "não específica", [X] a concentração do T_3 e B/T a razão do nível de radioatividade do complexo anticorpo - $^{125}\text{I}-T_3$ pela radioatividade total adicionada (70).

O valor experimental da constante de afinidade (K) da reação T_3 - anticorpo, o produto representativo das ligações "não específica" ($K_n q_n$) e a concentração molar aparente (q) do anticorpo nos tubos de "Fase Sólida" encontram-se na tabela III.

3. RESULTADOS DAS CARACTERÍSTICAS DAS CURVAS PADRÃO

Na figura 24 mostram-se as curvas padrão, bem como a dose mínima detectável dos RIEs realizados pelas técnicas de "Fase Sólida", "Duplo Anticorpo" e "Solução de PEG", traçadas em escala semi-logarítmica.

Os valores dos coeficientes B_0/T , "Slope", " $X_{50\%}$ " e "15B" da equação número 2 utilizada para o ajuste da curva padrão encontram-se na tabela IV.

Tabela III : Resultados da constante de afinidade "K" do sítio específico ,
do produto $K_n q_n$ das ligações não específicas e da concentração
molar "q" calculadas do anti-soro aderido nos tubos de "Fase
Sólida"

Nº do ensaio	K ($\times 10^{10}$) l/mol	$K_n q_n$ ($\times 10^{-3}$)	q ($\times 10^{-9}$) mol/l
1	1,1	66	0,35
2	1,0	48	0,41
3	0,9	45	0,53
4	0,6	53	0,39
5	1,2	56	0,48
6	0,9	72	0,66
7	0,7	67	0,29
8	1,0	65	0,40
9	0,8	51	0,50
10	0,7	62	0,32
11	1,0	53	0,34
12	1,0	73	0,41
$\bar{x} \pm s$	$0,92 \pm 0,19$	$59,2 \pm 9,5$	$0,42 \pm 0,10$

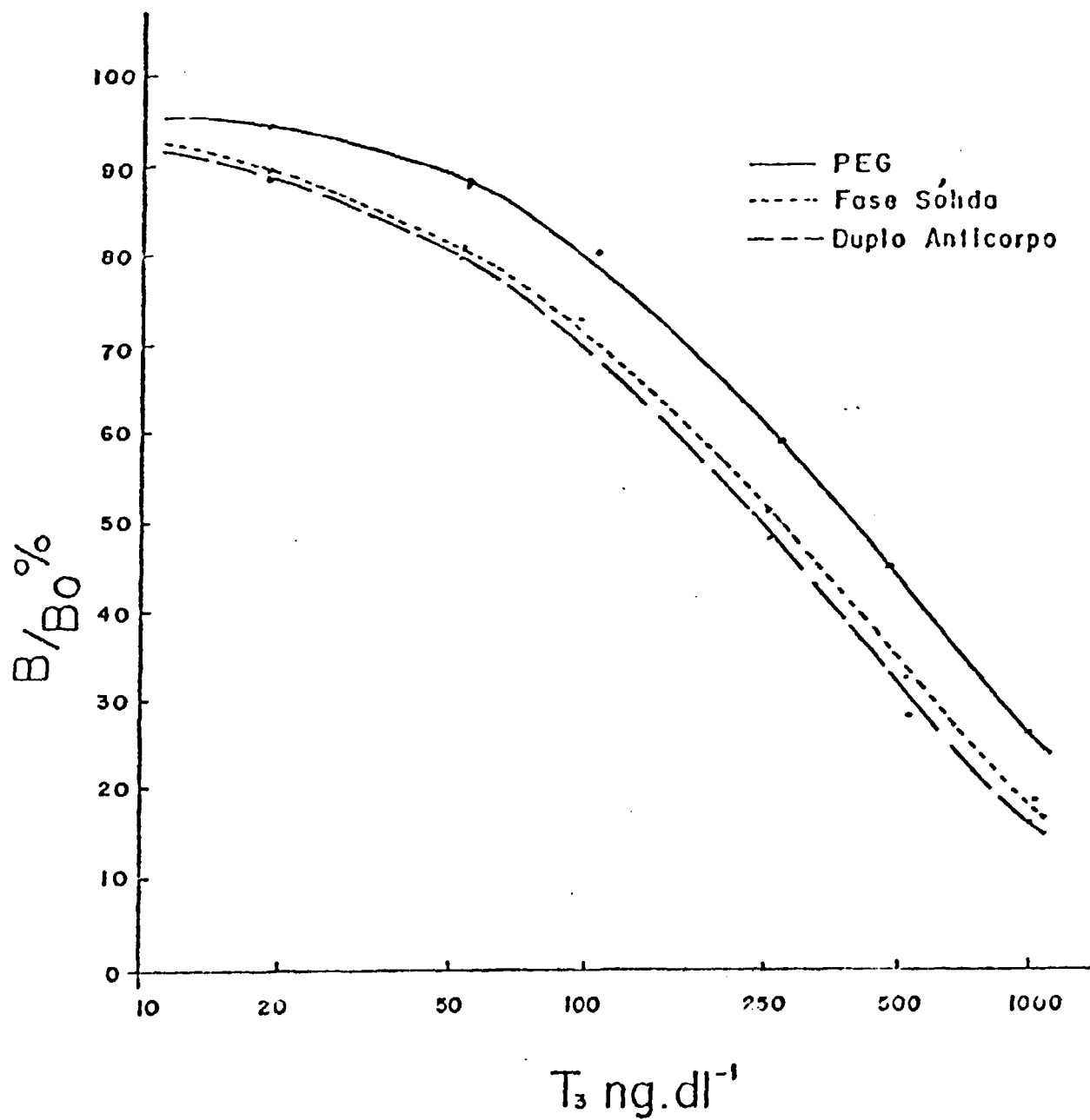


Figura 24: Curvas padrão dos RIIs de T_3 realizadas pelas três técnicas de separação da fração ligada da livre.

TABELA IV - Resultados dos valores dos parâmetros a, b, c e d da função 2 descrita no Capítulo II, item 3.13 calculados por regressão não linear para cada uma das três técnicas

Ensaio	(a) B_0/T (%)	(d) NSB (%)	(c) $X_{(50\%)}$ (ng/dl)	(b) "slope"
Fase Sólida	24 ± 5	7 ± 2	256 ± 37	$0,97 \pm 0,22$
Duplo Anticorpo	25 ± 4	5 ± 2	220 ± 46	$0,93 \pm 0,19$
PEG	27 ± 4	10 ± 2	314 ± 43	$1,20 \pm 0,16$

Nas figuras 25, 26 e 27 encontram-se as dispersões inter - ensaio peculiares a estes parâmetros.

4. CARACTERÍSTICAS METODOLÓGICAS DOS ENSAIOS

4.1. Dose Mínima Detectável

Na Tabela V encontra-se a estimativa calculada da dose mínima detectável para cada uma das técnicas, conforme dados da figura 28.

TABELA V - Resultados da estimativa da dose mínima detectável

Ensaio	Dose Mínima Detectável (ng/dl)
Fase Sólida	17 ± 4
Duplo Anticorpo	14 ± 3
PEG	22 ± 4

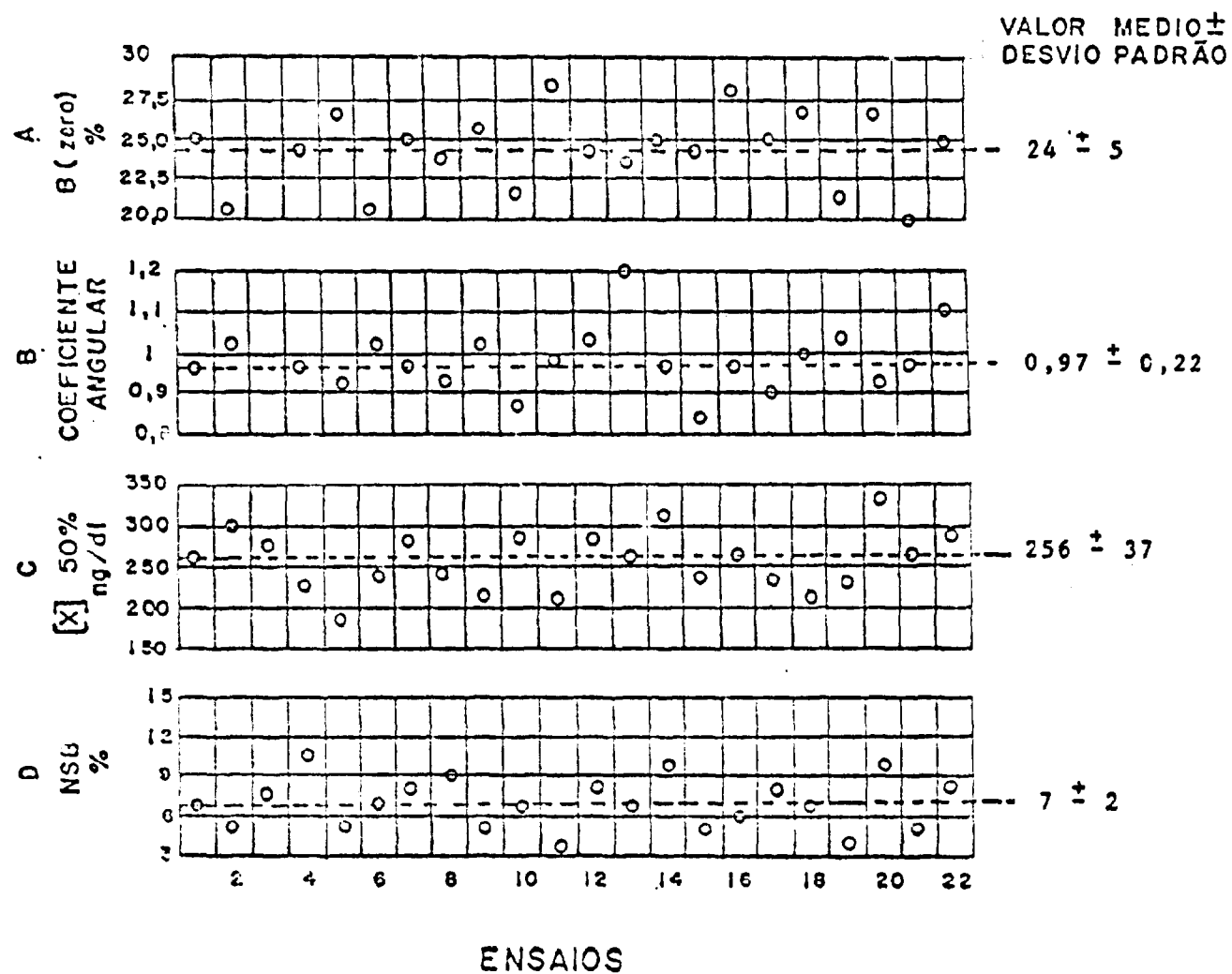
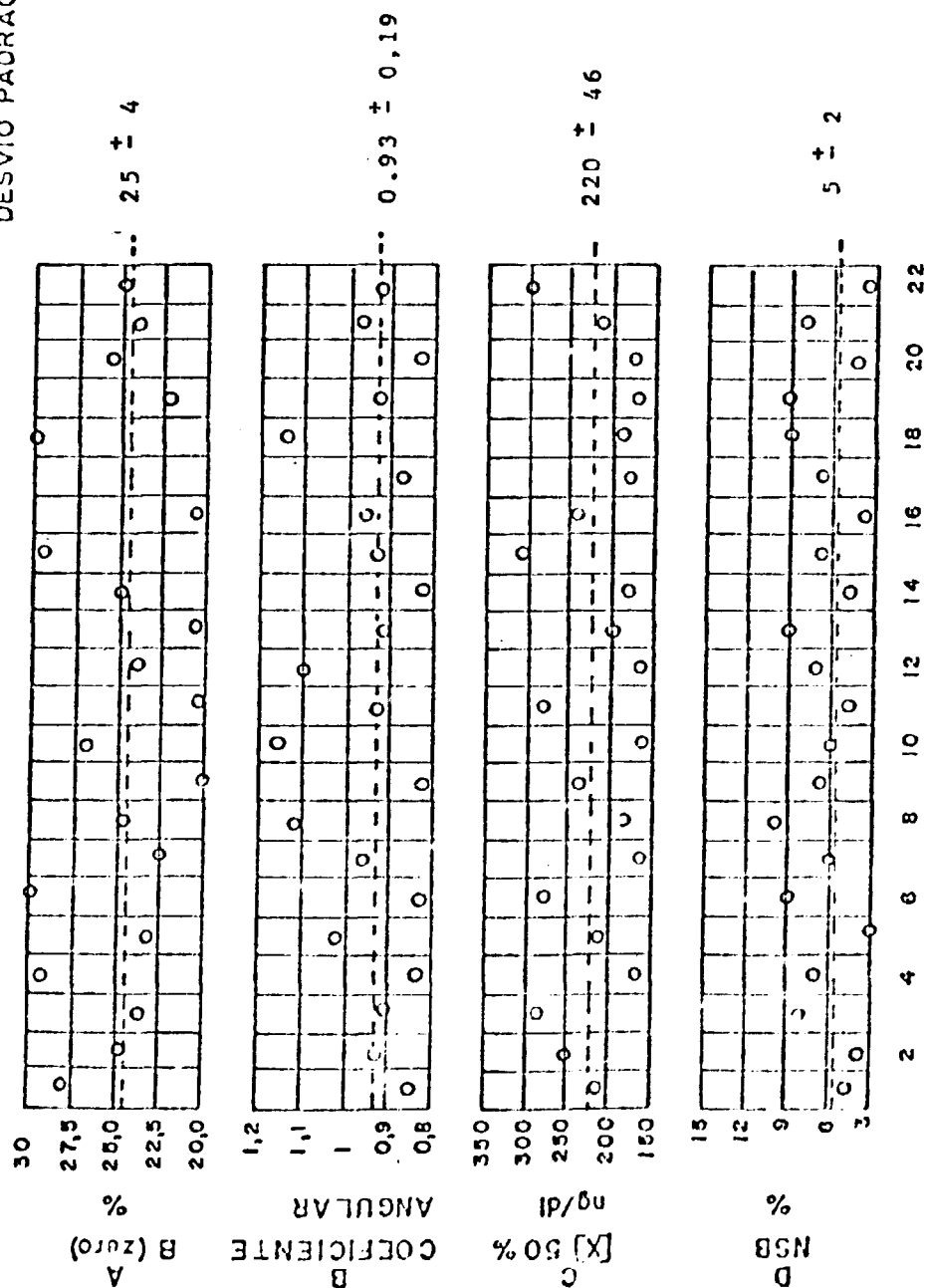


Figura 25: Dispersão inter-ensaio dos parâmetros da curva padrão do RIE de T_3 pela técnica de "Fase Sólida"

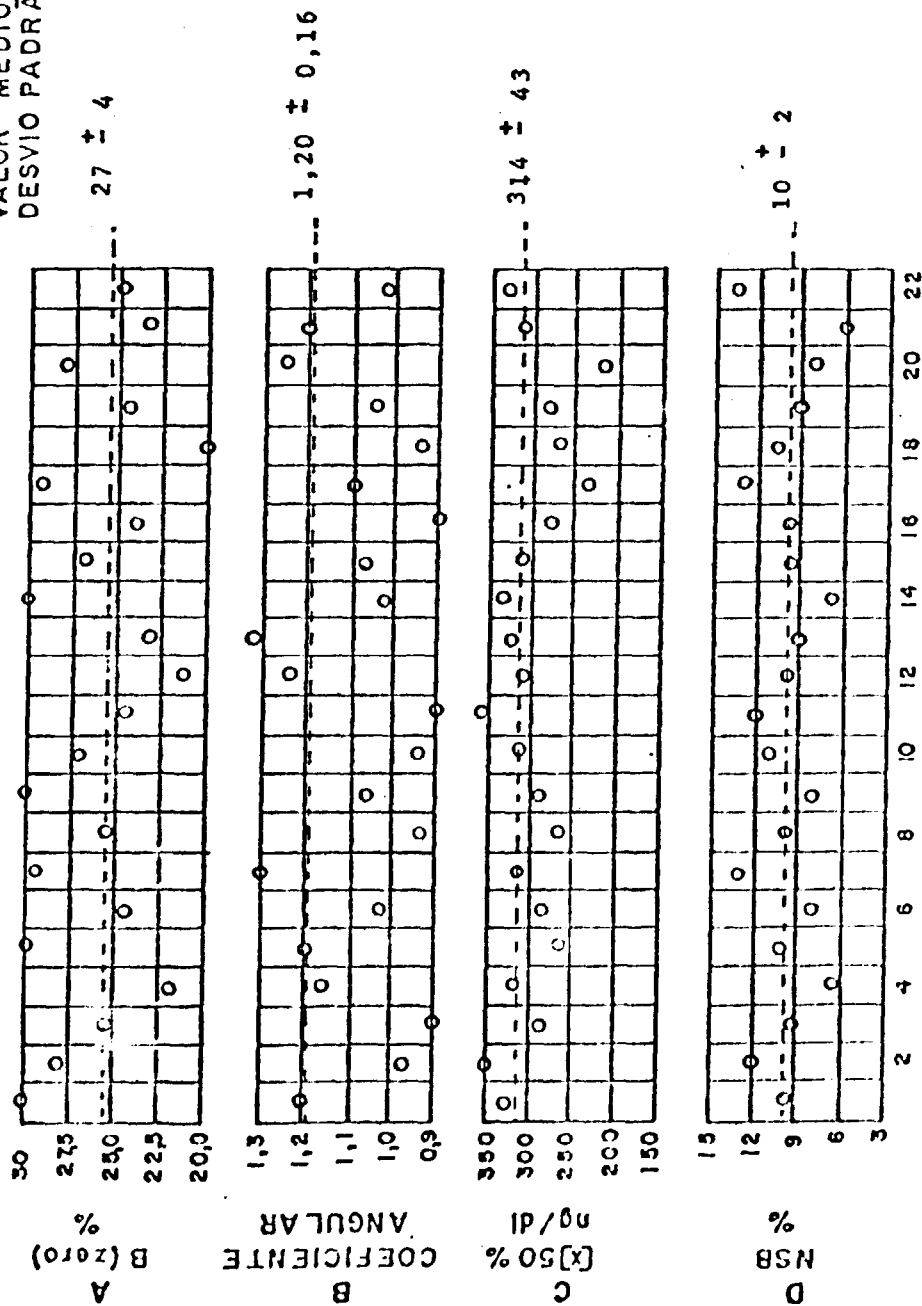
VALOR MEDIO $\pm$
DESVIO PADRÃO



ENSAIOS

Figura 26: Dispersão inter-ensalo dos parâmetros da curva padrão do RIE pela técnica de "Duplo Anticorpo".

VALOR MEDIO $\pm$
DESVIO PADRÃO



ENSAIOS

Figura 27: Dispersão Inter-ensaio dos parâmetros da curva padrão do RIE de T₃ pela técnica de "Solução PEG".

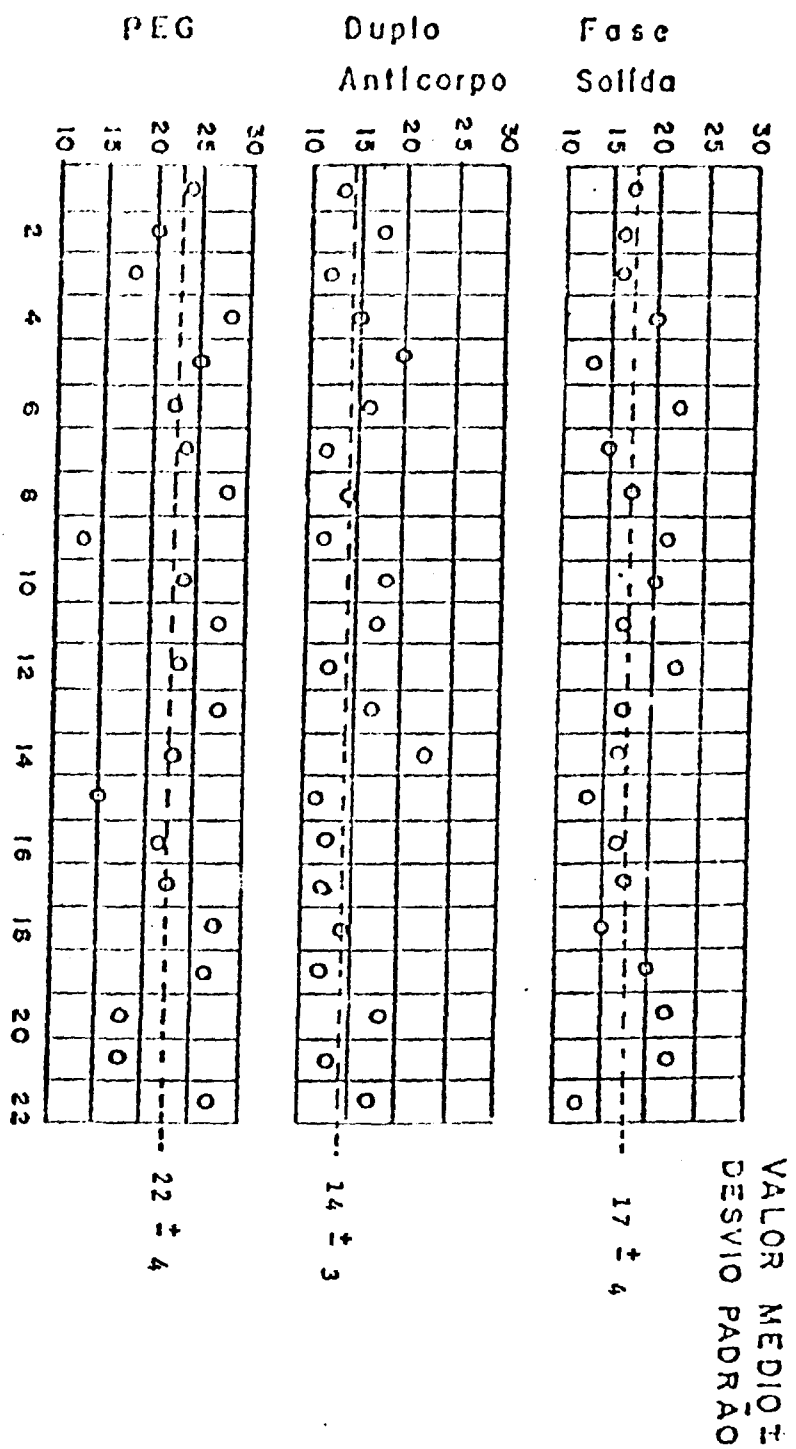


Figura 26: Dependência da intensidade da estimativa da dose mínima detectável

4.2. Precisão do Ensaio

4.2.1. Perfil de precisão intra-ensaio

A figura 29 mostra o perfil de precisão intra-ensaio para cada uma das técnicas.

Dessa figura conclui-se que a precisão intra-ensaio para a técnica de "Fase Sólida" para os valores compreendidos na faixa de 50 a 900 ng/dl foi inferior a 10%, sendo que a faixa de maior precisão encontra-se no intervalo de 200 a 400 ng/dl; enquanto a precisão intra-ensaio, no intervalo de 50 a 900 ng/dl, para as técnicas de "Duplo Anticorpo" e "Solução PEG" variou de 8 a 13% e 7 a 16%, respectivamente.

4.2.2. Perfil de precisão inter-ensaio

A figura 30 mostra o perfil de precisão inter-ensaio para cada uma das técnicas.

Nas figuras 31, 32 e 33 encontram-se as dispersões dos resultados de três amostras dosadas em diferentes ensaios.

A dispersão dos resultados encontrados na faixa de concentrações de 50 a 900 ng/dl foi da ordem de 8 a 17% para a técnica de "Fase Sólida", 11 a 20% para a técnica de "Duplo Anticorpo" e 10 a 26% para a técnica de "Solução PEG".

4.3. Exatidão

Na tabela VI encontram-se os resultados da concentração de T_3 de 39 amostras dosadas nos três ensaios (técnica de "Fase Sólida", "Duplo Anticorpo" e "Solução PEG") simultaneamente, indicando-se os respectivos intervalos de confiança no nível de $P = 0,05$. A figura 34 corresponde a comparação desses resultados. Como se observa dessa figura, os resultados das

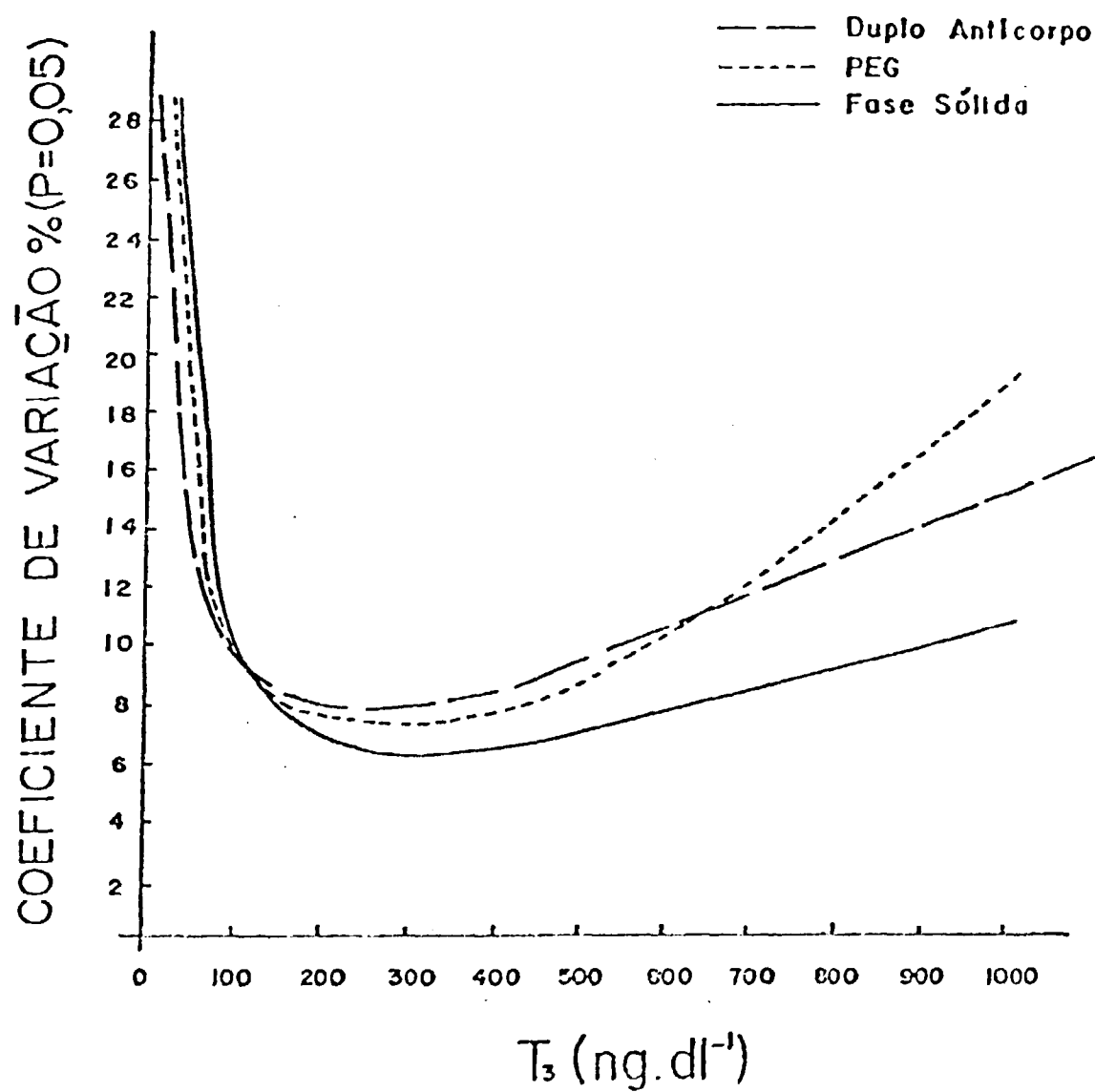


Figura 29: Perfil de precisão intra-ensaio para cada uma das três técnicas.

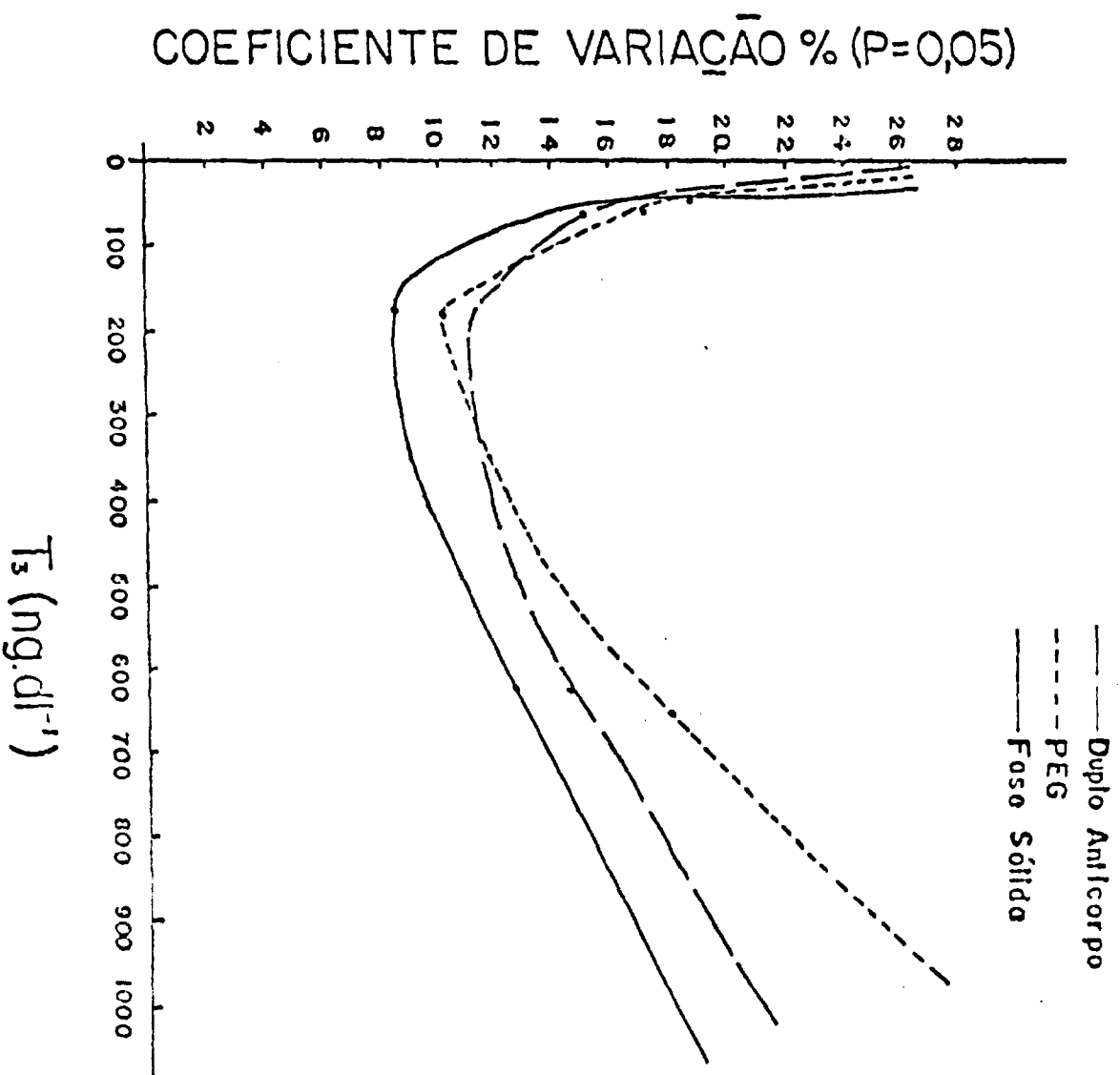


Figura 30: Perfil de precisão inter-ensayo para cada uma das três técnicas.

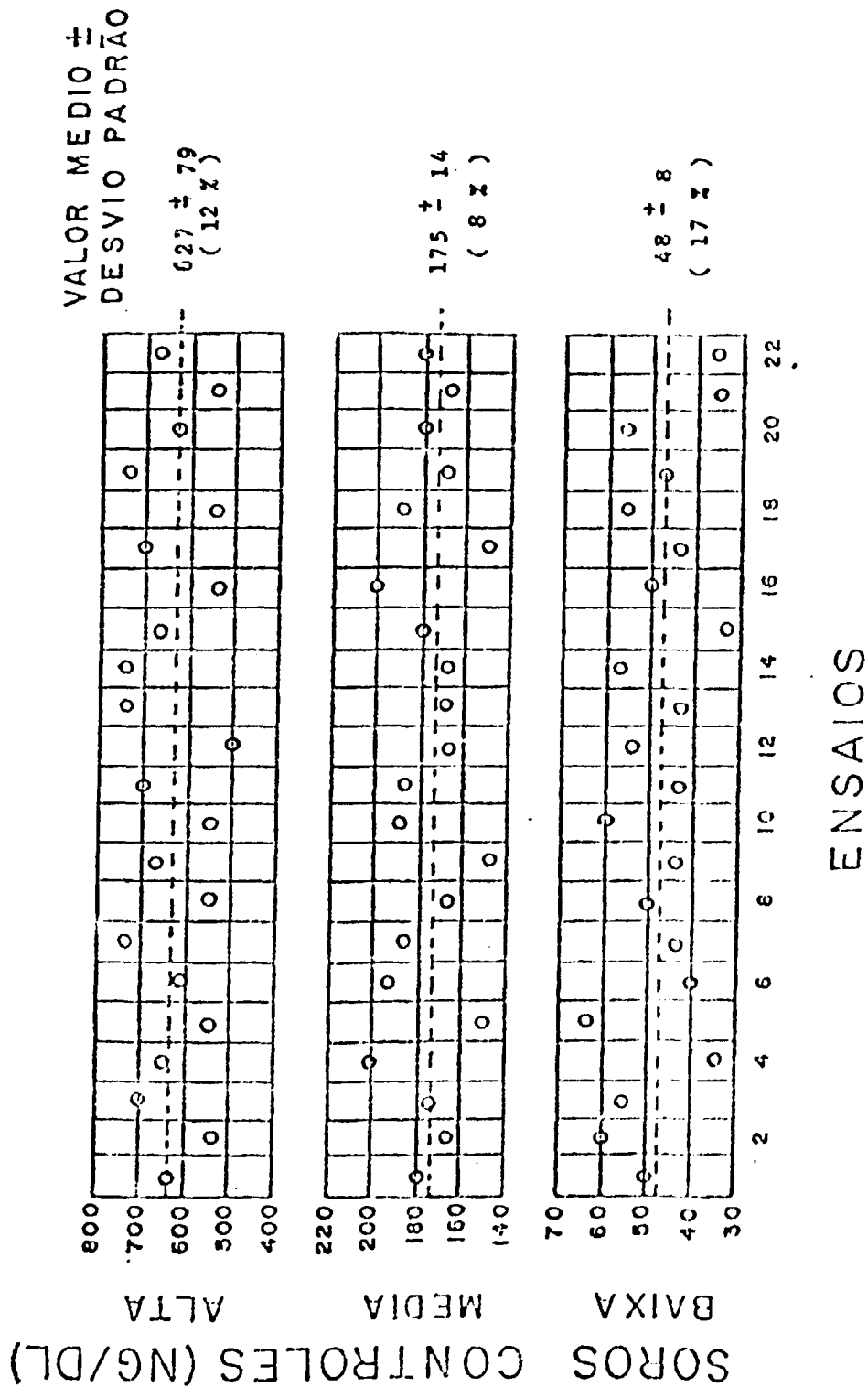


Figura 31: Variação interensalo de três amostras dosadas sistematicamente em todos os ensaios realizados pela técnica de "Fase Sólida".

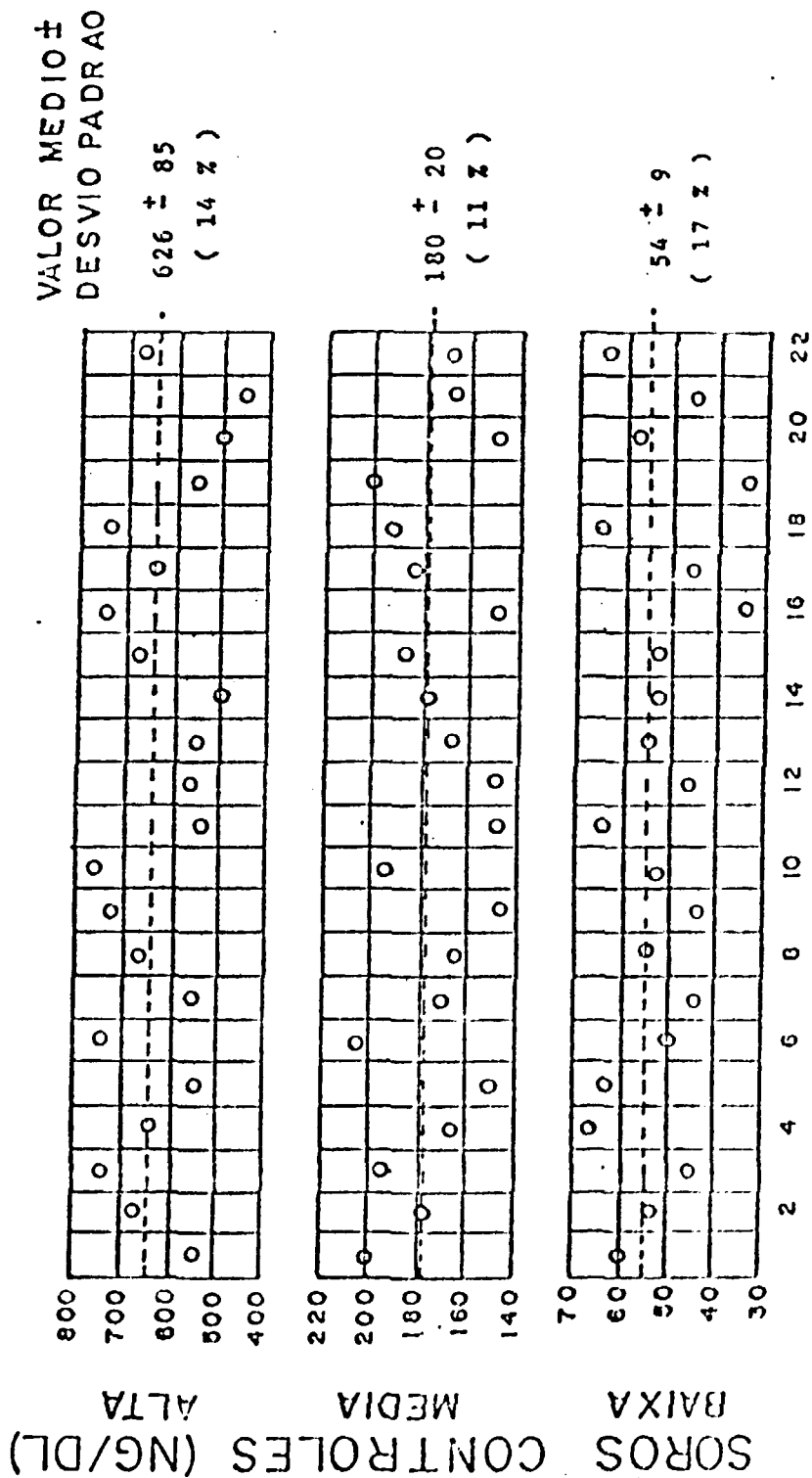


Figura 32: Variação inter-ensaio das três amostras dosadas sistematicamente em todos os ensaios realizados pela técnica de "Duplo Anticorpo".

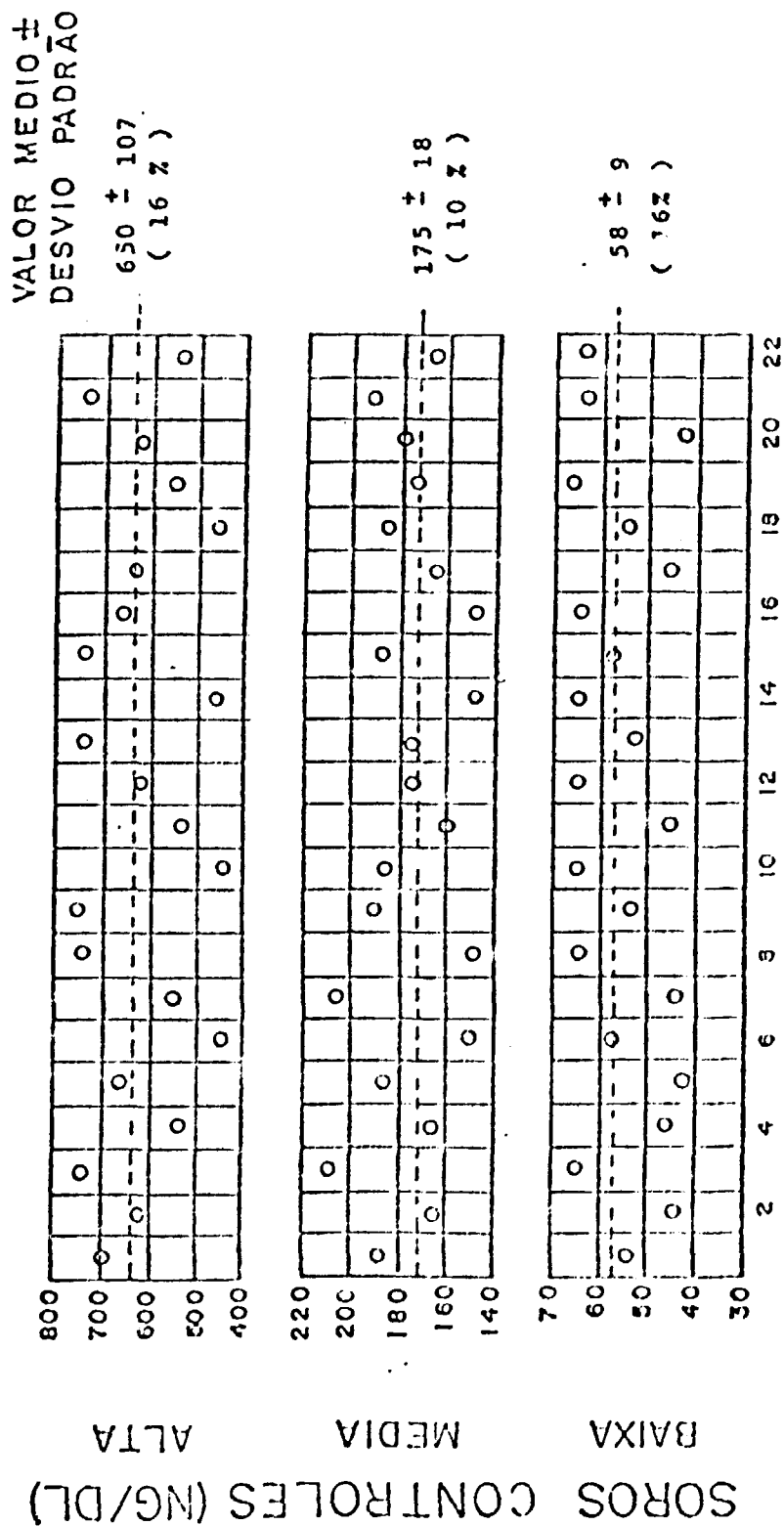


Figura 33: Variação inter-ensaio das três amostras dosadas sistematicamente em todos os ensaios realizados pela técnica de "Solução PEG".

TABELA VI - Resultados da concentração de 39 amostras dosadas pelas três técnicas e os respectivos intervalos de confiança ao nível de $p = 0,05$.

Amostra	Fase Sólida		Duplo Anticorpo		Solução Peg	
	Concentração	Intervalo de Confiança	Concentração	Intervalo de Confiança	Concentração	Intervalo de Confiança
1	20	(10 - 30)	17	(9 - 25)	31	(19 - 43)
2	137	(123 - 151)	150	(130 - 170)	140	(124 - 155)
3	191	(179 - 203)	181	(159 - 203)	178	(160 - 196)
4	148	(134 - 160)	143	(125 - 160)	170	(151 - 189)
5	574	(510 - 637)	640	(550 - 730)	620	(520 - 720)
6	228	(207 - 249)	250	(220 - 280)	236	(212 - 260)
7	34	(10 - 48)	42	(24 - 60)	50	(32 - 68)
8	136	(122 - 150)	164	(146 - 182)	152	(137 - 167)
9	149	(137 - 161)	150	(132 - 168)	139	(124 - 152)
10	190	(178 - 202)	181	(161 - 201)	170	(155 - 185)
11	890	(801 - 980)	830	(664 - 997)	920	(727 - 1113)
12	716	(650 - 780)	714	(621 - 810)	683	(567 - 800)
13	235	(220 - 250)	189	(166 - 220)	243	(221 - 265)
14	84	(73 - 95)	90	(77 - 103)	78	(66 - 90)
15	500	(430 - 550)	420	(365 - 475)	480	(419 - 543)
16	36	(22 - 50)	50	(30 - 70)	23	(12 - 34)
17	157	(141 - 172)	161	(143 - 179)	170	(155 - 185)
18	286	(257 - 315)	265	(230 - 300)	298	(265 - 331)
19	200	(188 - 212)	295	(182 - 228)	104	(166 - 202)
20	164	(150 - 180)	131	(113 - 150)	149	(131 - 167)
21	490	(450 - 540)	602	(517 - 686)	550	(467 - 632)
22	52	(33 - 70)	33	(20 - 53)	43	(31 - 55)
23	119	(107 - 130)	194	(172 - 216)	100	(87 - 113)
24	180	(165 - 195)	161	(141 - 180)	199	(181 - 217)
25	350	(310 - 400)	270	(235 - 305)	290	(258 - 322)
26	24	(10 - 38)	45	(29 - 61)	18	(0 - 40)
27	151	(130 - 170)	130	(113 - 146)	142	(126 - 158)
28	122	(110 - 133)	126	(108 - 144)	119	(105 - 133)
29	93	(85 - 110)	115	(97 - 132)	110	(93 - 122)
30	364	(327 - 400)	391	(344 - 438)	353	(310 - 396)
31	119	(105 - 132)	88	(76 - 101)	99	(82 - 109)
32	634	(560 - 705)	650	(550 - 741)	733	(617 - 864)
33	75	(62 - 88)	51	(39 - 63)	62	(46 - 78)
34	690	(615 - 760)	753	(632 - 873)	710	(589 - 831)
35	475	(420 - 520)	528	(454 - 602)	449	(371 - 507)
36	37	(20 - 54)	31	(16 - 46)	47	(35 - 59)
37	238	(215 - 260)	212	(185 - 239)	250	(215 - 285)
38	445	(400 - 500)	419	(368 - 470)	400	(361 - 451)
39	765	(698 - 867)	667	(573 - 761)	633	(543 - 735)

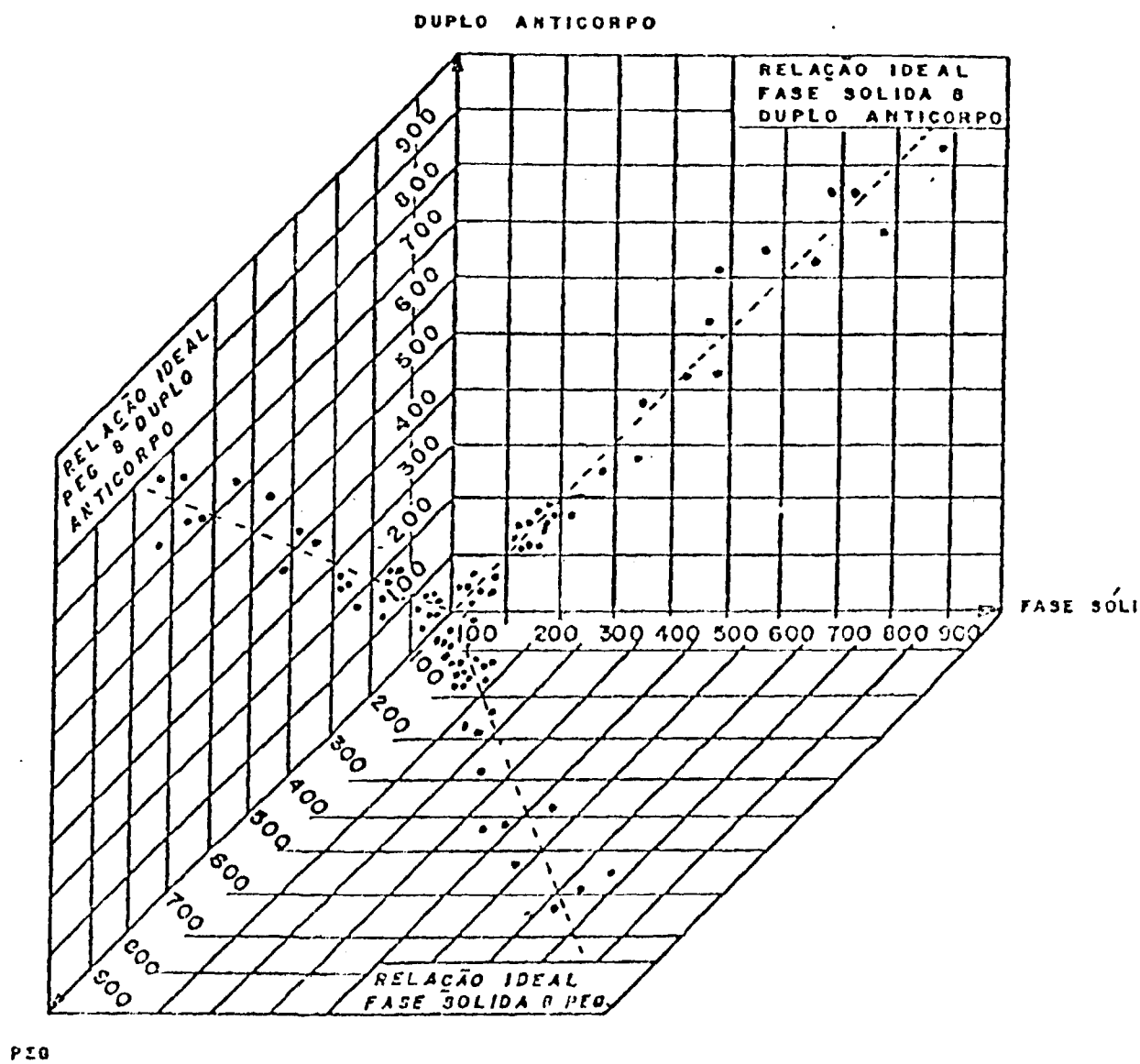


Figura 34: Correlação de resultados dos RIEs de T_3 entre as três técnicas.

mostras dosadas pelas três técnicas apresentaram entre si boa correlação, pois a maioria de seus pontos encontram-se espalhadas em torno das retas bissetrizes.

Na tabela VII estão apresentados todos os parâmetros da regressão linear das três técnicas, conforme a figura 34.

Tabela VII - Parâmetros de regressão linear dos resultados de concentração de T_3 das 39 amostras submetidas ao RIE nas três diferentes técnicas

Regressão Linear	Intersecção	Coefficiente Angular	r
Fase Sólida x Duplo Anticorpo	5,9	0,95	0,97
Fase Sólida x PEG	8,1	0,96	0,96
Duplo Anticorpo x PEG	7,2	0,94	0,98

4.4. Dígito de Mérito

Na tabela VIII estão relacionados:

- a) valores do dígito de mérito
- b) valores da dose mínima detectável e
- c) área do perfil de precisão.

calculados para cada uma das técnicas, conforme critérios definidos no Capítulo II, item 3.14.4.

Tabela VIII - Análise conjunta de diferentes parâmetros do ensaio para comparação da qualidade das três técnicas

Ensaio	DD	$\left\{ \begin{array}{l} DD \\ F \end{array} \right.$ Perfil de Precisão	Dígito de Mérito
Fase Sólida	17	7806	0,14
Duplo Anticorpo	14	13098	0,19
PEG	22	8826	0,20

5. CARACTERIZAÇÃO DA FAIXA DE NORMALIDADE

Na tabela IX encontra-se a distribuição de frequência de valores de níveis séricos de T_3 de 153 indivíduos considerados normais.

A figura 35 mostra o histograma relativo a esses indivíduos. A média aritmética de seus resultados e o seu desvio padrão foram de 145 ± 27 ng/dl, respectivamente. Adotando-se a hipótese de que essa população obedeça à distribuição normal pode-se então estabelecer que, no nível $P = 0,05$, o intervalo de normalidade do T_3 esteja contido entre 90 a 200 ng/dl.

Tabela IX - Distribuição de frequência de valores de níveis séricos de T_3 nos indivíduos normais

Níveis séricos de T_3 ng/dl	Frequência (%)
menor que 80	-
80 — 90	3
90 — 100	3
100 — 110	4
110 — 120	6
120 — 130	7
130 — 140	12
140 — 150	19
150 — 160	14
160 — 170	12
170 — 180	9
180 — 190	6
190 — 200	4
200 — 210	1

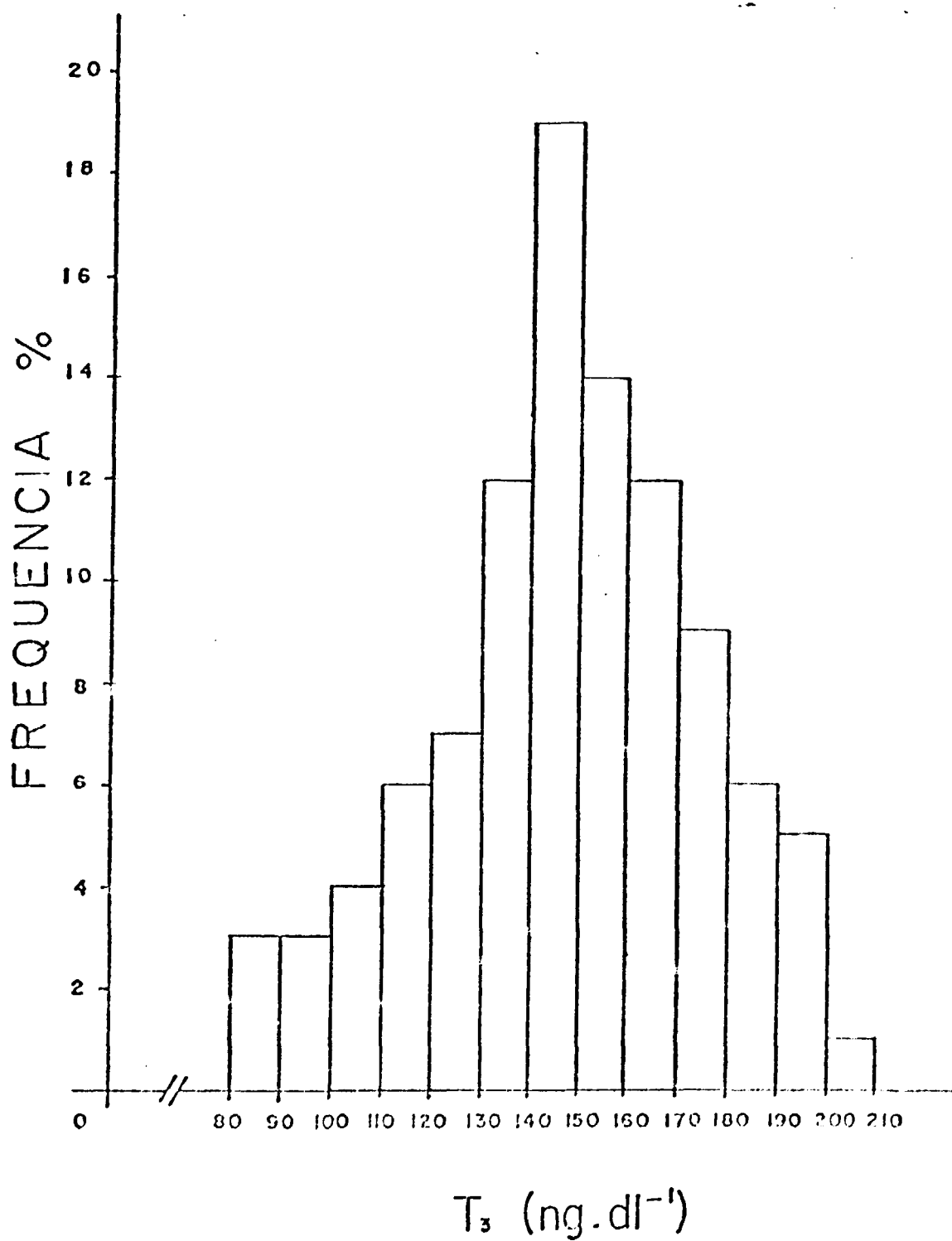


Figura 35: Histograma relativo a valores de níveis séricos de T_3 nos indivíduos normais.

6. NÍVEIS SÉRICOS DE T_3 EM PACIENTES HIPOTIREÓIDES E HIPERTIREÓIDES

Os valores de níveis séricos de T_3 em 5 pacientes com hipotireoidismo e 8 com hipertireoidismo encontram-se agrupados na figura 36, bem como os resultados de dosagens de soros de 153 indivíduos considerados normais utilizados na caracterização da faixa de normalidade.

Os valores médio e respectivos desvio padrão obtidos foram 46 ± 24 , 145 ± 27 e 500 ± 197 ng/dl para indivíduos hipotireoideo, normal e hipertireoideo.

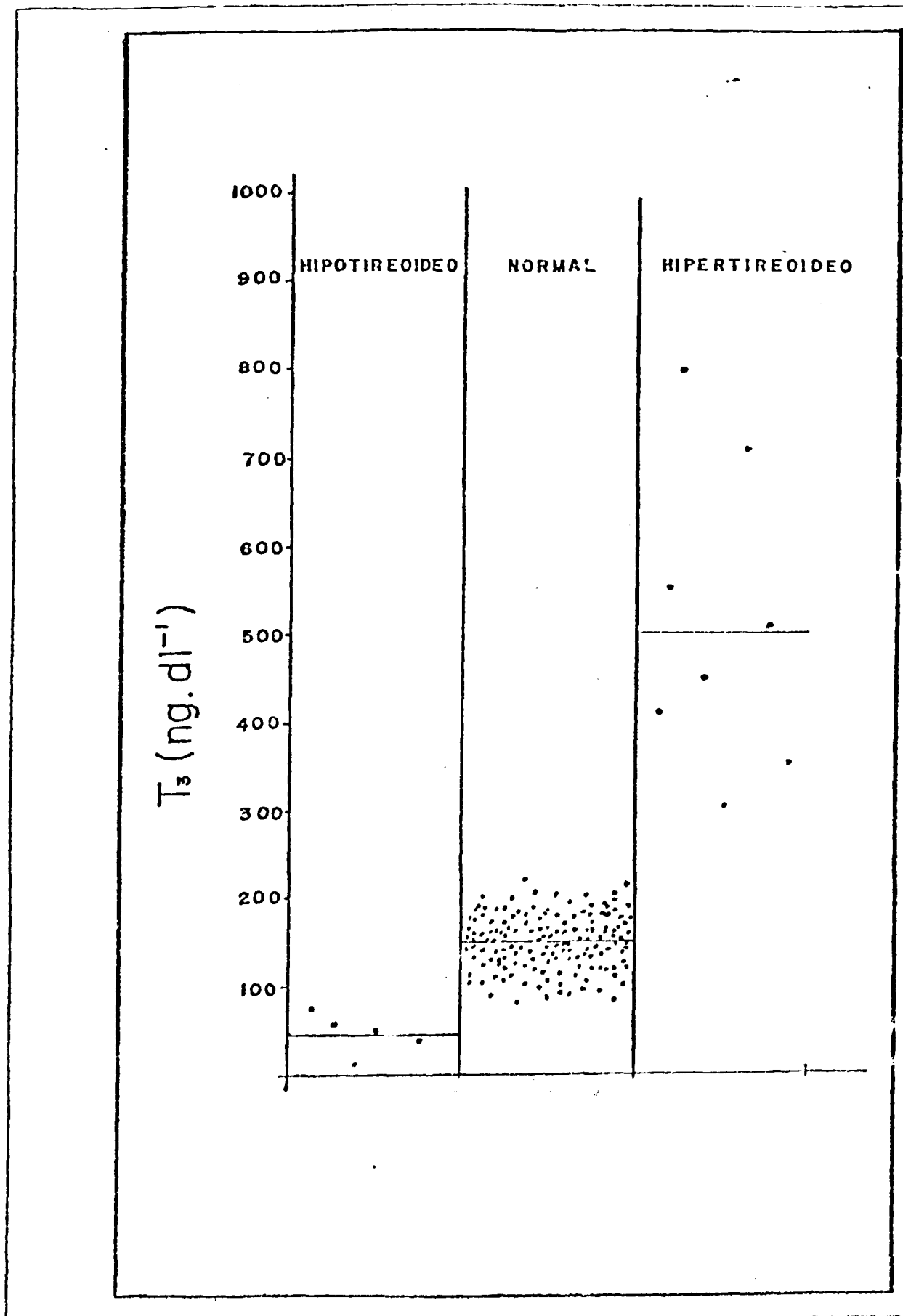


Figura 36: Níveis séricos de T_3 em indivíduos normais e em pacientes com hipotireoidismo e hipertireoidismo.

IV. DISCUSSÃO

1. MARCAÇÃO DA TRIIODOTIRONINA COM ^{125}I

1.1. Análise do perfil cromatográfico do substrato marcado

A mistura da marcação purificada em coluna de sephadex G-25 fino, utilizando-se da propriedade das iodotironinas adsorverem-se ao sephadex com diferentes afinidades^(31,43), proporcionou purificação simples, rápida e com boa resolução. Conforme a figura 11, observa-se diferenciação nítida entre os três picos, sendo o ^{125}I eluído primeiramente, seguido de $^{125}\text{I-T}_3$ e $^{125}\text{I-T}_4$. O $^{125}\text{I-T}_3$ é eluído antes do $^{125}\text{I-T}_4$ devido ao seu coeficiente de partição (K_d) mais baixo. ($K_{d_{T_3}} = 2,35$ e $K_{d_{T_4}} = 5,20$)⁽⁴⁾.

Em todas as marcações realizadas não se detectou a presença de $^{125}\text{I-T}_2$ ($K_{d_{T_2}} = 1,13$), sugerindo que a marcação parece não ocorrer no anel interno das moléculas das iodotironinas, como já observado por outros autores^(46,47).

Em 12 radioiodações realizadas sempre houve um rendimento elevado de hormônio marcado, como mostra a tabela I. A média percentual da soma dos valores das áreas dos picos correspondentes a T_3 e T_4 foi de 74,0%. Este cálculo forneceu a estimativa do rendimento da marcação, dos quais 48,6% corresponde ao $^{125}\text{I-T}_3$ formado e 26,4% ao $^{125}\text{I-T}_4$. Esses valores estão compatíveis com aqueles encontrados na literatura⁽⁴⁷⁾.

1.2. Determinação da atividade específica do $^{125}\text{I-T}_3$

Os valores da atividade específica calculados pelo método de alto deslocamento, em 24 determinações variou de 77 a 142 MBq/g (2061 a 3837 Ci/g), como apresenta a tabela I, estando de acordo com outros autores.

res (24,46). A atividade específica média daqueles valores foi de $(110,8 \pm 23,6)$ TBq/g (2994 ± 638 Ci/g), permitindo estimar que a incidência de átomos de ^{125}I por molécula de T_3 foi de $(0,9 \pm 0,2)$ ^{125}I /molécula.

Esses valores estão próximos do valor de atividade específica máxima teórico do T_3 produzido pela adição de 1 átomo de ^{125}I por molécula que é de 130 TBq/g (3500 Ci/g)⁽⁴⁷⁾.

Esta diferença entre o valor teórico e o encontrado pelo processo de autodeslocamento, embora não significativa, deve-se provavelmente à propagação de erros experimentais preponderantemente ligada à alíquotagem da massa de T_3 e da atividade posta a reagir⁽⁵⁶⁾, e que conduzem à dispersão dos resultados da atividade específica encontradas entre diferentes ensaios.

A atividade específica das radioiodotironinas produzidas pela adição de um átomo de ^{125}I não se altera com o decaimento do ^{125}I , pois quando isso ocorre a molécula residual não é mais reconhecida pelo anti-soro. Assim, a radioatividade e a quantidade de iodotironina decrescem aproximadamente na mesma razão⁽⁴⁷⁾. De fato, em nossos estudos a atividade específica mostrou-se constante ao longo de 105 dias, comprovando-se que $^{125}\text{I-T}_3$ foi produzido pela adição de 1 átomo de ^{125}I .

1.3. Estabilidade do $^{125}\text{I-T}_3$ armazenado em solução de propileno glicol 50%

O $^{125}\text{I-T}_3$ permaneceu estável durante pelo menos 100 dias, quando foi devidamente armazenado em soluções de propileno glicol 50% e mantido à temperatura de -20°C . Como mostra as figuras 13 e 15, 105 dias após a marcação 90% da radioatividade presente representava o $^{125}\text{I-T}_3$ indeno.

2. CARACTERÍSTICAS DO ANTICORPO

2.1. Diluição apropriada do anticorpo, anti-T₃

A etapa experimental mais complexa da metodologia da fase sólida é a da complexação do anticorpo à estrutura plástica, necessitando utilizar um anticorpo cujo título seja previamente conhecido e alto. Assim, determinou-se o título do anti-soro com a utilização da técnica de "Solução PEG", a qual é mais simples nessa fase experimental. A figura 21 mostra os resultados da análise de título do anti-soro obtido.

Segundo Parsons⁽⁶⁵⁾, os anticorpos dos antígenos de baixo peso molecular (< 1000 daltons), devem apresentar título da ordem de 1/10 000 em sistemas de separação em "fase líquida" para serem adequados no uso de fase sólida.

Dos três coelhos imunizados neste trabalho, somente um, aproximou-se dessas características (diluição 1/10 000).

Em nossos experimentos observamos que foi necessário utilizar o anti-soro cerca de dez vezes mais concentrado em relação às outras técnicas (PEG, Duplo Anticorpo), o que está de acordo com as previsões de Parsons⁽⁶⁵⁾. Assim, enquanto a uma diluição de 1/10 000 obteve-se uma capacidade de ligação cerca de 25% em "fase líquida", foi necessário recobrir os tubos com este anticorpo diluído a 1/1000 para conseguir a mesma ligação, conforme as figuras 16 e 21.

A "ineficiência" do uso do anticorpo neste método é devida provavelmente à incompleta adsorção do anticorpo e à retenção da imunoreatividade de alguns sítios do anticorpo uma vez aderido à superfície plástica⁽⁶⁵⁾.

Acima do limite de saturação, a quantidade do anticorpo imunoreativo adsorvido na superfície não é proporcional à quantidade da proteína

presente na solução de recobrimento^(2,65). Na figura 21 observa-se que atingiu ligação máxima na faixa de diluições entre 1/100 a 1/300. Fora deste intervalo verificou-se diminuição constante na capacidade de ligação, mesmo aumentando a concentração do anticorpo na solução de imobilização. Foi adotada a diluição de 1/1000 conforme indicado na figura 21.

2.2. Especificidade do anti-corpo, anti-T₃

O T₃ está presente em quantidade muito pequena na circulação sanguínea, junto com substâncias que possuem estruturas semelhantes à sua molécula, tais como T₄ e os produtos da desiodação ou da desaminação e descarboxilação das iodotironinas. Assim, é necessário obter anticorpo, anti-T₃ altamente específico, para sua utilização do RIE.

A especificidade do anticorpo, avaliada pela reatividade cruzada com aquelas substâncias mostrou-se satisfatória (Tabela II e figura 22). A afinidade do T₃ pelo anticorpo foi muito maior do que todos os outros compostos análogos estudados.

A reação cruzada com o rT₃ foi de apenas 0,008%, apesar de diferir do T₃ somente na posição de um átomo de iodo. Em diversos estados metabólicos como doenças sistêmicas, extremos de idade e desnutrição proteico calórica ocorre aumento nos níveis séricos de rT₃ e diminuição de T₃ (14,44,62,89). Mesmo nestas condições, com aquele nível de reação cruzada, o RIE do T₃ não sofrerá a interferência do rT₃. O T₄ que se encontra em quantidade muito maior (cerca de 70 vezes) do que o T₃ no sangue, a reação cruzada foi de 0,05%, valendo as mesmas observações.

Foram necessários 256 pg do T₃ (X_{50%}) para deslocar 50% do T₃ radioativo do complexo ¹²⁵I-T₃-anticorpo, enquanto que foram requeridas 512 ng do T₄ e 32 ug do rT₃ para se obter esse mesmo deslocamento.

As demais substâncias apresentaram também quantidades elevadas de

$X_{50\%}$ entre 1 ug a 300 ug, conseqüentemente com reação cruzada menor que 0,01%. Estes resultados estão compatíveis com aqueles descritos na literatura (16,48).

2.3. Constante de afinidade "K" e concentração molar "q" do anticorpo

A constante de afinidade "K", apresentada na tabela III, com o valor médio de $0,92 \times 10^{10}$ litros/mol é comparável com aquele obtido por Thorell e col⁽⁸⁷⁾ e também dentro das expectativas de Ekins⁽²²⁾.

Aplicando-se as expressões de Ekins⁽²²⁾ no cálculo das concentrações ideais da concentração do T_3 traçador " p^* " e da concentração molar de anti-soro " q " concluiu-se que a concentração do T_3 traçador seria de $p^* = 4/K = 0,43 \times 10^{-9}$ mol/litro ou 44 pg. A concentração molar do anti-soro deveria ser da ordem de $q = 3/K = 0,33 \times 10^{-9}$ mol/litro.

O valor médio da concentração do anti-soro " q " obtido experimentalmente foi de $(0,42 \pm 0,11)10^{-9}$ mol/litro, conforme os dados da tabela III, enquanto a média da concentração do T_3 traçador " p^* " foi de $0,58 \times 10^{-9}$ mol/litro ou 60 pg.

Comparando-se esses valores médios de " q " e " p^* " obtidos experimentalmente e aqueles esperados teoricamente por critério de otimização de Ekins⁽²²⁾, concluiu-se que as concentrações utilizadas estão razoavelmente próximas daqueles projetados pela expressão de Ekins.

3. CARACTERÍSTICAS FÍSICO QUÍMICAS

3.1. Separação das imunoglobulinas G (IgG) do anti-soro, anti- T_3

As proteínas do soro podem aderir à superfície do plástico com a mesma intensidade que o anticorpo específico⁽⁶⁵⁾, por isso isolaram-se as imunoglobulinas G (IgG) do anti-soro pela técnica de precipitação fraciona

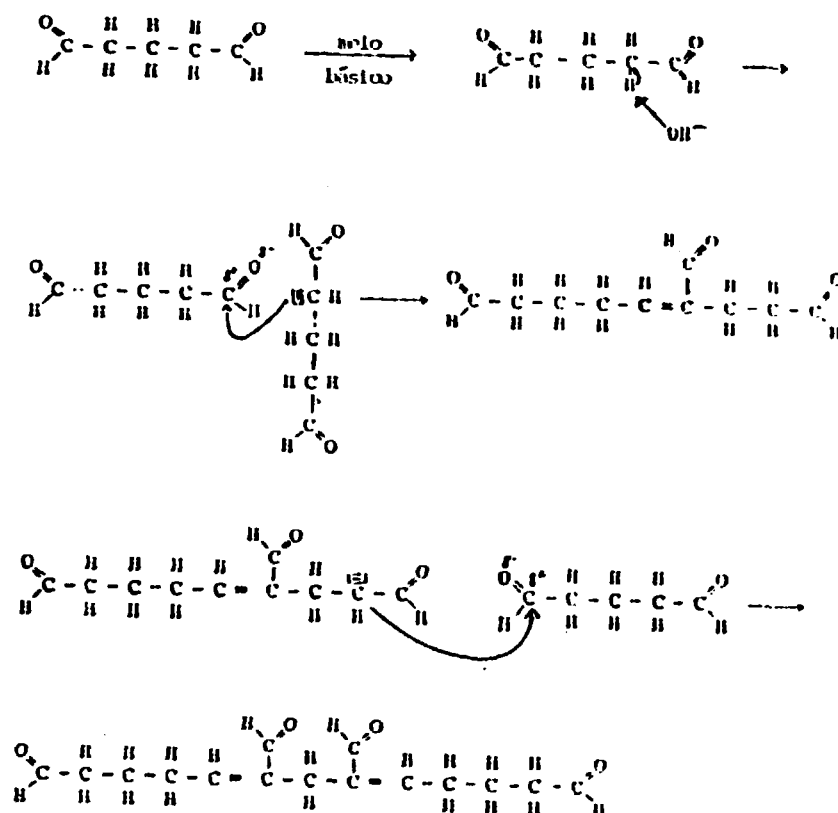
da de sulfato de amônia. Ainda que este método não ofereça uma preparação pura de IgG, adotou-se este procedimento, por ser a técnica mais simples no isolamento da IgG e pelos resultados satisfatórios encontrados em nosso trabalho e na literatura⁽⁶⁵⁾. Obteve-se assim uma melhoria no processo de recobrimento dos tubos.

3.2. O pH apropriado da solução na polimerização do glutaraldeído na parede do tubo

A imunoglobulina isolada foi aderida à parede do tubo de reação pela conjugação covalente da imunoglobulina na superfície plástica, utilizando o glutaraldeído. Este procedimento mostrou-se mais eficiente, permitindo uma fixação mais firme do anticorpo na parede e uma capacidade maior no recobrimento dos tubos do que aqueles preparados por simples adsorção, conforme os resultados da figura 17.

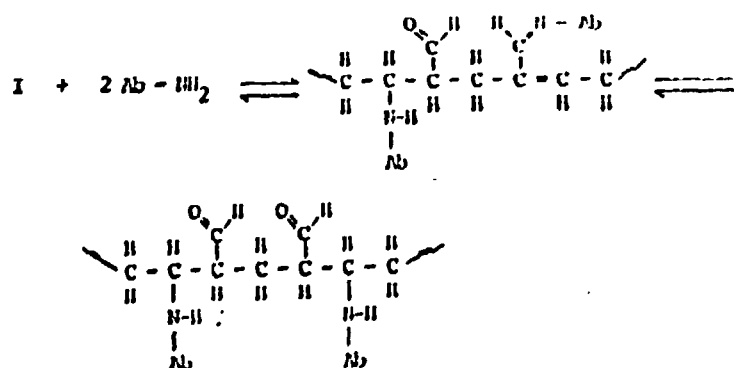
O pré-recobrimento dos tubos foi efetuado com glutaraldeído em meio alcalino. Na figura 17, verifica-se que a eficiência no recobrimento dos tubos foi significativamente maior, para aqueles tratados com glutaraldeído em pH alcalino (9,5), enquanto que em pH ácido e neutro a eficiência foi praticamente igual ao obtido por simples adsorção.

Estes resultados sugerem que o mecanismo de polimerização do glutaraldeído em meio básico, ocorre por condensação aldólica, na superfície da parede do tubo, como propõem alguns autores^(45,72).



(1)

O glutaraldeído polimerizado reage com o grupo amina (NH_2) do anticorpo, quando estes são colocados em contacto. Essa reação ocorre segundo o mecanismo da condensação de Michael ⁽⁷²⁾.



A ligação covalente entre a molécula do anticorpo e os tubos pré-tratados provavelmente ocorre por esta reação ^(45,72).

Os tubos, assim preparados, foram incubados com líquido contendo SAB para prender os sítios não reativos do plástico. COLÓIDIA - INSTRUÇÃO DE ATIVIDADE NUCLEAR SP.

3.3. A ligação inespecífica no sistema de "Fase Sólida"

A ligação inespecífica no sistema de "Fase Sólida" pode ser determinada por dois procedimentos. O mais simples, para quem prepara estes tubos, consiste em recobrir os tubos com SAB em substituição ao anticorpo e incubá-los com traçador na ausência do antígeno não marcado (branco da reação). Outro procedimento reside na adição de quantidade em excesso do antígeno não marcado nos tubos recobertos com anticorpos, e reação com o traçador. Este procedimento é mais indicado para quem recebe os tubos de "Fase Sólida" já preparados (65).

Neste trabalho, os dois procedimentos apresentaram os mesmos resultados. A ligação inespecífica variou segundo as condições de pré recobrimento dos tubos com glutaraldeído (concentração, temperatura), interferindo na qualidade da curva padrão, conforme se infere nas figuras 18 e 19.

3.4. Efeito da concentração e da temperatura de incubação do glutaraldeído no recobrimento dos tubos

Conforme as figuras 18 e 19 alcançou-se ligação mais alta do traçador quando a temperatura de polimerização foi elevada e com glutaraldeído mais concentrado. Isto é devido a formação de grande quantidade de glutaraldeído polimerizado, na parede dos tubos, aumentando-se assim, a ligação inespecífica. Entretanto, a ligação maior obtida nessas condições, não reflete a realidade de melhor desempenho do ensaio. A má qualidade da curva dose resposta e a alta ligação inespecífica desestimula qualquer propósito de afirmar que estas sejam as condições adequadas de pré-tratamento dos tubos.

A concentração do glutaraldeído que mostrou ser indicada para o recobrimento dos tubos foi 2% à temperatura de polimerização de 20°C, conforme figuras 18 e 19 e considerações já mencionadas no Capítulo III, item 2.4.2. Os tubos pré-tratados nessas condições apresentaram capacidade de

ligação (B/T) da ordem de 25% e não comprometeram a sensibilidade da curva padrão. Por outro lado, utilizando-se glutaraldeído a 1% e temperatura de 10°C, a curva mostrou comportamento semelhante, no entanto, a capacidade de ligação foi mais baixa e a ligação inespecífica foi praticamente igual àquelas encontradas para concentração de 2% a 20°C.

3.5. Efeito do tempo e da temperatura de incubação na imobilização do anticorpo

O tempo de incubação na imobilização do anticorpo que mostrou ser apropriado para a preparação dos tubos foi entre 24 a 36 horas, conforme mostra a figura 20. A temperatura de 4°C foi adotada para evitar a deterioração do anticorpo⁽⁴⁵⁾.

4. CARACTERÍSTICAS METODOLÓGICAS DO ENSAIO

4.1. Características das curvas padrão

Para fins comparativos, RIEs de "Duplo Anticorpo" e "Solução PEG" foram efetuados. Selecionaram-se estas duas técnicas por já serem utilizadas tradicionalmente em nossos laboratórios, com as características metodológicas definidas^(36,57) e consensualmente aceitas na literatura^(17,20,23,88).

Para tanto, foram utilizados os mesmos reagentes básicos nos três ensaios, ou seja os padrões (soro referências) do T₃, anticorpo anti-T₃ e ¹²⁵I-T₃, apenas diluídos nas condições próprias para cada tipo de ensaio, como descritos nos itens 3.11 e 3.12. Após a separação do complexo ¹²⁵I-T₃-anticorpo, da fração livre com seus respectivos sistemas de separação, avaliaram-se todos os parâmetros pertinentes comparando os entre si.

A análise dos valores dos parâmetros "B₀/T", "NSB", "%₅₀" e "Slope" da curva padrão dos RIEs de "Fase Sólida" encontram-se comparativos

com aqueles obtidos pelas outras duas técnicas conforme apresentados na ta
bela IV.

4.2. Estimativa da dose mínima detectável - DMD

As estimativas da dose mínima detectável (DMD) das três técnicas encontram-se na tabela V e figura 28. O intervalo de confiança da DMD ao ní
vel de $P = 0,05$ foi de 9 a 25 ng/dl, 8 a 20 ng/dl e 14 a 30 ng/dl para as
técnicas de "Fase Sólida", "Duplo Anticorpo" e "Solução PEG", respectivamen
te. Estes valores estão muito distantes daqueles encontrados em indivíduos
normais, permitindo portanto caracterizar perfeitamente os hipotireoideos.

Os dados das DMDs da tabela V não sugerem diferenças significati
vas entre a técnica de "Fase Sólida" e as demais.

4.3. Análise da precisão do método (Perfis intra-ensaio e inter-en saio)

Na análise da precisão do método, a reprodutibilidade intra-en
saio acusou variação de 6 a 10%, no intervalo de 50 a 900 ng/dl, enquanto
a precisão inter-ensaio foi de 8 a 17%, para a técnica de "Fase Sólida", con
forme figuras 29 e 30. Por outro lado, como se observa dessas figuras, as de
terminações da concentração de T_3 neste mesmo intervalo, para a técnica de
"Duplo Anticorpo" são afetadas por erro de aproximadamente 8% a 13% quando
a amostra é dosada no mesmo ensaio e erro de aproximadamente 11 a 20% quan
do dosadas em ensaios diferentes. Para a técnica de "Solução PEG", a preci
são intra-ensaio variou de 7 a 16%, enquanto a precisão inter-ensaio foi de
10 a 26%.

Como podemos observar, as três técnicas apresentaram precisão
intra-ensaio menor do que a precisão inter-ensaio, o que já era esperado
conforme observações de Robbards (73) e Mesquita (56).

A reprodutibilidade intra-ensaio e inter-ensaio encontrada para os três métodos está satisfatória, levando-se em conta que as amostras foram dosadas em duplicata, como são geralmente realizados na rotina de laboratórios clínicos. Esses valores de níveis de precisão são perfeitamente aceitáveis na metodologia do RIE (56).

4.4. Avaliação dos parâmetros metodológicos das três técnicas

Avaliando-se isoladamente cada parâmetro, a técnica de "Duplo Anticorpo", mostrou melhores resultados quanto à ligação inespecífica (NSB) mais baixa, valor do DMD menor e por requerer menor quantidade de T_3 para deslocar 50% do complexo $^{125}\text{I}-T_3$ ($X_{50\%}$) em relação a outras duas técnicas. No entanto, na prática esses parâmetros estão tão próximos, que estas pequenas nuances não são significativas.

Na análise da precisão do método, a técnica que mostrou maior reprodutibilidade nas determinações de concentrações do hormônio foi a técnica de "Fase Sólida", tanto para precisão intra-ensaio como para precisão inter-ensaio. Provavelmente, isto se deve a extrema simplicidade do método, exigindo o mínimo de operações do analista, como mostra o protocolo da figura 7, minimizando-se, assim, as dispersões oriundas dos erros experimentais.

Para compararmos a qualidade dos ensaios pelas três técnicas no contexto amplo, aplicou-se um algoritmo, o qual leva em conta o perfil de precisão, a DMD e a extensão da curva padrão.

Como podemos verificar pela expressão nº 2 do Capítulo II item 3.14.4. utilizada para calcular o dígito de mérito, a técnica mais adequada é aquela que apresentar menor valor do dígito de mérito, atendendo-se assim, o compromisso entre a sensibilidade e precisão do ensaio.

Os valores de dígito de mérito foram: 0,14 para "Fase Sólida",

0,19 para "Duplo Anticorpo" e 0,21 para "Solução PEG" como mostra a tabela VIII.

Alicerçados nessa avaliação conclui-se que o melhor procedimento corresponde a "Fase Sólida", seguido pelo "Duplo Anticorpo" e "Solução PEG". Nossos resultados mostram por outro lado, que o ensaio do "Duplo Anticorpo" pode satisfazer melhor os resultados na faixa de hipotireoidismo, como mostra a tabela VIII, na qual a técnica do "Duplo Anticorpo" acusa menor EMD.

No entanto, os três sistemas de separação mostraram adequados para determinação dos níveis séricos de T_3 .

4.5. Resultados da concentração das amostras dosadas - Exatidão do método

Os resultados da concentração de T_3 de 39 amostras de soro, dosadas pelas três técnicas, com os respectivos intervalos de confiança encontram-se na tabela VI.

A exatidão da técnica da "Fase Sólida" foi avaliada por comparação entre esses resultados, que pode ser melhor observada na figura 34, onde todos os valores obtidos encontram-se espalhados em torno das retas bisetritz. O coeficiente de correlação (r) entre os resultados destas três técnicas comparados entre si, encontram-se na tabela VII. A linearidade e a alta correlação indicou que as três técnicas forneceram praticamente os mesmos resultados dos níveis séricos de T_3 presente nas amostras, comprovando-se a validade da "Fase Sólida", uma vez que já se acredita na exatidão das outras duas técnicas.

5. CARACTERIZAÇÃO DA FAIXA DE NORMALIDADE E NÍVEIS SÉRICOS DE T_3 ENCONTRADOS EM PACIENTES COM HIPOTIREOIDISMO E HIPERTIREOIDISMO

A distribuição de frequência de valores das concentrações séricas de T_3 obtidos de 153 indivíduos normais encontram-se na tabela IX. Pelo histograma apresentado na figura 35, adotou-se que os valores obedecem a distribuição normal. A média aritmética de seus resultados e desvio padrão foi de 145 ± 27 ng/dl, respectivamente, estabelecendo a faixa de normalidade entre 90 a 200 ng/dl, ao nível de $p = 0,05$.

Da análise da figura 36, concluiu-se que a técnica de "Fase Sólida" discrimina os níveis séricos de T_3 de indivíduos hipotireoideo, normal e hipertireoideo.

Na tabela X encontram-se relacionados os valores de concentração de T_3 no soro de indivíduos normais, pacientes com hipotireoidismo e hipertireoidismo descritos por outros autores, em comparação com resultados encontrados neste trabalho. Eventuais variações no valor médio da concentração de T_3 , podem ser relacionadas com as variações de metodologia das características dos componentes empregados^(13,29) e de efeitos de distribuição populacional.

TABELA X - Estimativa da concentração de T_3 encontradas por diferentes pesquisadores

Autor	Concentração de T_3 no soro (ng/dl)		
	Hipotireoidismo	Eutireoidismo	Hipertireoidismo
Mitsuma (1971) ⁽⁵⁸⁾	62 $\pm$ 9	138 $\pm$ 23	494 $\pm$ 265
Lieblieh e Utiger (1971) ⁽⁵³⁾	99 $\pm$ 24	145 $\pm$ 25	429 $\pm$ 146
Larsen (1972) ⁽⁵²⁾	39 $\pm$ 21	110 $\pm$ 25	546 $\pm$ 442
Sterling e Milch (1974) ⁽⁸⁵⁾	47 $\pm$ 39	169 $\pm$ 30	838 $\pm$ 30
Burger e col (1975) ⁽⁷⁾	0 $\pm$ 80	90 $\pm$ 36	220 $\pm$ 1040
Lyunggren (1976) ⁽⁵⁴⁾	33 $\pm$ 35	115 $\pm$ 22	411 $\pm$ 142
Colli (1980) ⁽¹⁹⁾	49 $\pm$ 40	132 $\pm$ 29	420 $\pm$ 218
Koizumi e col (1980) ⁽⁴³⁾	104 $\pm$ 38	159 $\pm$ 21	522 $\pm$ 404
Este trabalho	46 $\pm$ 24	145 $\pm$ 27	500 $\pm$ 197

6. VANTAGENS E DESVANTAGENS DA TÉCNICA DE "FASE SÓLIDA"

As desvantagens observadas para a técnica de "Fase Sólida" em relação aos outros métodos foram: necessidade de maior quantidade de anticorpo, cerca de dez vezes mais, e anticorpo com título mais alto. Os anticorpos obtidos dos três coelhos mostraram-se satisfatórios para o sistema de "Fase Líquida", enquanto que somente um apresentou título suficientemente alto para ser utilizado na preparação dos tubos de "Fase Sólida", além da preparação geral de todas as etapas na técnica de "Fase Sólida" ser mais complexa do que outras técnicas.

No entanto, estas desvantagens são compensadas pela extrema simplicidade do método, laboratorialmente, para quem o recebe. A técnica possibilita, assim ao analista grande rapidez no trabalho com poucas operações e equipamentos, minimizando-se as dispersões nos resultados das dosagens devido aos erros experimentais e conduzindo a ensaios com maior precisão. A separação da fração ligada da livre se realiza por simples decantação ou aspiração, não necessitando da fase de centrifugação.

Na análise conjunta levando-se em conta todos os parâmetros, a técnica de "Fase Sólida" apresentou resultados comparáveis e algumas vezes estes foram melhores.

V. CONCLUSÕES

1. O T_3 marcado possui aproximadamente $(0,9 \pm 0,2) {}^{125}\text{I}$ por molécula de T_3 . A atividade específica do ${}^{125}\text{I}-T_3$ foi de $110,8 \pm 23,6 \text{ TBq/g}$ ($2994 \pm 638 \text{ Ci/g}$), a qual está próxima do valor da atividade específica máxima teórica do T_3 produzido pela adição de 1 átomo de ${}^{125}\text{I}$ por molécula (130 TBq/g).
2. O anticorpo, anti- T_3 utilizado neste trabalho apresentou as seguintes características: requereu diluição do anticorpo de 1/10 000 em "Fase Líquida" (PEG, Duplo Anticorpo) e 1/1000 em "Fase Sólida" para proporcionar uma ligação com o traçador ao redor de 25%; constante de afinidade de reação T_3 -anticorpo de $(0,92 \pm 0,19) \times 10^{10} \text{ l/mol}$ e reatividade de cruzada de 0,05% com o T_4 e inferior a 0,01% com as demais substâncias análogas ao T_3 estudadas.
3. Após o estudo das condições apropriadas para a preparação dos tubos de "Fase Sólida", o procedimento definitivo adotado neste trabalho foi: a) pré-recobrimento dos tubos com polimerização do glutaraldeído diluído a 2% em pH 9,5 durante 4 horas à temperatura de 20°C ; b) imobilização do anticorpo nos tubos pré-recobertos com anticorpo diluído a 1/1000 em tampão veronal 0,05M pH 8,6 incubado a 4°C durante 24 horas e c) preenchimento dos sítios não recobertos de superfície plástica com soro albumina bovina diluída a 0,5% em tampão veronal 0,025M pH 8,6 incubado a 20°C durante 30 minutos.
4. A dose mínima detectável (DMD) pela técnica de "Fase Sólida" foi de $17 \pm 4 \text{ ng/dl}$, não sugerindo diferenças significativas com aquelas encontradas pelas técnicas de "Duplo Anticorpo" de $14 \pm 3 \text{ ng/dl}$ e de "Solução PEG" de $22 \pm 4 \text{ ng/dl}$.

5. A precisão dos resultados de um mesmo ensaio (precisão intra-ensaio) da técnica de "Fase Sólida" foi de 6 a 10%, no intervalo de 50 a 900 ng/dl, enquanto as técnicas de "Duplo Anticorpo" e "Solução PEG" apresentaram variação de 8 a 13% e 7 a 16% respectivamente.
6. A precisão dos resultados de dosagens efetuadas em diferentes dias (precisão inter-ensaio) variou de 8 a 17% na faixa de concentrações de 50 a 900 ng/dl para a técnica de "Fase Sólida" enquanto que a dispersão dos resultados encontrada para a técnica de "Duplo Anticorpo" foi de 11 a 20% e para a técnica de "Solução PEG" de 10 a 26%.
7. O menor valor do dígito de mérito (D.M.) encontrado para a técnica de "Fase Sólida" (D.M. = 0,14) indicou que o procedimento mais eficiente corresponde a esta técnica, atendendo melhor o compromisso entre a sensibilidade e precisão do ensaio, seguido pelo "Duplo Anticorpo" (D.M. = 0,19) e "Solução PEG" (D.M. = 0,21).
8. Os resultados das amostras séricas de T_3 dosadas pela técnica de "Fase Sólida" apresentaram boa correlação com aqueles encontrados pelas técnicas de "Duplo Anticorpo" ($r = 0,97$) e "Solução PEG" ($r = 0,96$), comprovando-se a exatidão da "Fase Sólida", uma vez já conhecida a das outras duas técnicas.
9. Os valores de normalidade de nível sérico de T_3 foi de 145 ± 27 ng/dl, estabelecendo a faixa de 90 a 200 ng/dl, ao nível de $p = 0,05$.
10. A técnica de "Fase Sólida" permitiu discriminação dos níveis séricos de T_3 de indivíduos hipotireoideo, normal e hipertireoideo, mostrando-se adequada para a quantificação do T_3 na rotina das dosagens de rotina clínica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BAUMINGER, S. & WILCHEK, M. The use of carbodiimides in the preparation of immunizing conjugates. Methods Enzymol., 70:151-9, 1980.
2. BENEDETTO, S.; DAVID, F.; GALBIATTI, A.; MALVANO, R. Preparation of coated tubes for aldosterone radioimmunoassay (RIA): aspects related to IgG surface density. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Radioimmunoassay and related procedures in medicine: proceedings of a symposium held in Vienna, June 21-25, 1982. Vienna, 1982. p.105-10.
3. BERSON, S.A. & YALOW, R.S. General principles of radioimmunoassay. Clin. Chim. Acta., 22:51-69, 1968.
4. BLASI, F. & MASI, R.V. Absorption properties of iodotyrosines and derivatives on sephadex. J. Chromatogr., 28:33-6, 1967.
5. BRAVERMAN, L.E.; INGBAR, S.H.; STERLING, K. Conversion of thyroxine (T_4) to triiodothyronine (T_3) in athyreotic human subjects. J. Clin. Invest., 49:855-64, 1970.
6. BROWN, B.L.; EKINS, R.P.; ELLIS, S.M.; REITH, W.S. Specific antibodies to triiodothyronine hormone. Nature, 226:359, 1970.
7. BURGER, A.; SAKOFF, C.; STACHELI, V.; VALLON, M.B.; INGBAR, S.H. Radioimmunoassay of 3, 5, 3' triiodo-L-thyronine with and without a prior extraction step. Acta Endocrinol., 80:58-69, 1975.
8. CANTARERO, L.A.; BUTLER, J.E.; OSBORNE, J.W. The absorptive characteristics of proteins for polystyrene and their significance in solid-phase immunoassays. Ann. Biochem., 105:375-82, 1980.

9. CATT, K.J. & TREGEAR, G.W. A solid phase radioimmunoassay in antibody coated tubes. Science, 158:1570-2, 1967.
10. CATT, K.J.; TREGEAR, G.W.; BURGER, H.G.; SKERMER, C. Antibody coated tube method for radioimmunoassay of human growth hormone. Clin. Chim. Acta, 27:267-79, 1970.
11. CHARD, T. Ammonium sulfate and polyethylene glycol as reagent to separate antigen from antigen-antibody complexes. Meth. Enzymol., 70: 280-90, 1980.
12. CHOPRA, I.J. An assessment of daily production and significance of thyroidal secretion of 3, 3', 5' triiodothyronine (reverse T_3) in man. J. Clin. Invest., 58:32-40, 1976.
13. CHOPRA, I.J. Concentration of triiodothyronines (T_3 and reverse T_3) in serum and other body fluids. CHOPRA, I.J. ed. Triiodothyronines in health and disease. Berlin, Springer, 1981. p.58-94.
14. CHOPRA, I.J.; CHOPRA, U.; SMITH, S.R.; REZA, M.; SOLOMON, D.H. Reciprocal changes in serum concentrations of 3, 3', 5' triiodothyronine (r T_3) and 3, 5, 3' - triiodothyronine (T_3) in system illness. J. Clin. Endocrinol., 41:1043-9, 1975.
15. CHOPRA, I.J.; HO, R.S.; LAM, R. An improved radioimmunoassay of triiodothyronine in serum: its application to clinical physiological studies. J. Lab. Clin. Med., 80:729-39, 1972.
16. CHOPRA, I.J.; NELSON, J.C.; SOLOMON, D.H.; BEALL, G.N. Production of antibodies specifically binding triiodothyronine and thyroxine. J. Clin. Endocrinol. Metab., 32:299-308, 1971.

17. CHOPRA, I.J.; SOLOMON, D.H.; BEALL, G.N. Radioimmunoassay for measurement of triiodothyronine in human serum. J. Clin. Invest., 50:203-41, 1971.
18. CHOPRA, I.J.; WU, S.Y.; NAKAMURA, Y.; SOLOMON, D.H. Monodeiodination of 3, 5, 3' - triiodothyronine and 3,3',5' - triiodothyronine to 3, 3' diiodothyronine in vitro. Endocrinology, 102:1099-106, 1978.
19. COLLI, C. Níveis séricos de triiodotironina reversa (rT_3), triiodotironina (T_3), tiroxina (T_4) e de tireotrofina (TSH) na disfunção tireoidiana e no pos-parto imediato. São Paulo, 1980. (Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP).
20. DESBUQUOIS, B.; AURBACH, G.D. Use of polyethylene glycol to separate free and antibody-bound peptide hormones in radioimmunoassay. J. Clin. Endocrinol., 33:732-7, 1971.
21. DUSSAULT, J.H.; LAM, R.; FISHER, D.A. The measurement of serum triiodothyronine by double column chromatography. J. Lab. Clin. Med., 77:1039-50, 1971.
22. EKINS, R. & NEWMANN, B. Theoretical aspects of saturation analysis. Acta Endocrinol. Suppl., 147:11-36, 1970.
23. FARID, N.R. & KENNEDY, C. Assessment of a method for measuring serum thyroxine by radioimmunoassay with use of polyethylene glycol precipitation. Clin. Chem., 23:1333-4, 1977.
24. GENBICKI, M.; POLANSKA, A.; KOSOWICZ, J. T_3 and T_4 solid-phase radioimmunoassay with the specific antibodies isolated by affinity chromatography. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Radioimmunoassay and related procedures in medicine: proceedings of a symposium held in Vienna. June 21-25, 1982. Vienna, 1982. p.95-104.

25. GHARIB, H.; MAYBERRY, W.E.; RYAN, R. Radioimmunoassay for triiodothyronine: a preliminary report. J. Clin. Endocrinol., 31:709-12, 1970.
26. GHARIB, H.; RYAN, R.J.; MAYBERRY, W.E.; HOCKERT, T. Radioimmunoassay for triiodothyronine (T_3): I. Affinity and specificity of the antibody for T_3 . J. Clin. Endocrinol. Metab., 33:509-16, 1971.
27. GLICK, S.M.; ROTH, J.; YALOW, R.S.; BERSON, S.A. Immunoassay of human growth hormone in plasma. Nature, 199:784-87, 1963.
28. GOLDSMITH, S.J. Radioimmunoassay: review of basic principles. Semin. Nucl. Med., 5(2):125-52, 1975.
29. GORDON, A. & GROSS, J. An inter-laboratory comparison of total serum triiodothyronine determination. Acta Endocrinol., 83:539-48, 1976.
30. GOUVEA, A.S. & MESQUITA, C.H. ANACROM, Programa computacional para análise de cromatogramas. São Paulo, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, 1981. (IPEN-Inf-5).
31. GREEN, W.L. Separation of iodo compounds in serum by chromatography on sephadex columns. J. Chromatogr., 72:83-91, 1972.
32. GROSS, J.; PITT-RIVERS, R. The identification 3, 5, 3' triiodothyronine in human plasma. Lancet I:439-41, 1952.
33. HAGEN, G.A.; DINGUID, L.I.; KLIMAN, B.; STANBURY, J.B. Double isotope derivate assay of serum iodothyronine I. Preparation of acetyl derivatives of thyroxine and triiodothyronine. Anal. Biochem., 33:67-75, 1970.
34. HAGEN, G.A.; DINGUID, L.I.; KLIMAN, B.; STANBURY, J.B. Double isotope derivate assay of serum iodothyronine. III triiodothyronine. Biochem. Med., 7:191-2, 1973.

35. HALES, C.H. & RANDLE, P.J. Immunoassay of insulin with insulin antibody precipitate. Biochem. J., 88:137-46, 1963.
36. HAYADA, M.M. & MESQUITA, C.H. Comparação do doseamento por radioimunoensaio de triiodotironina (T_3) segundo a técnica de "Fase Sólida" e de "Solução PEG". In: SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA. Endocrinologia e Metabologia: anais do XV Congresso Brasileiro de ..., realizado em São Paulo, 24-28 outubro, 1982. São Paulo, 1982.
37. HENLEY, R. & KISGYORGY, D. Polyethylene glycol 6000 as an accelerator in a double antibody radioimmunoassay system. Med. Lab. Sci., 37: 367-9, 1980.
38. HEREERT, V.; LAU, K.S.; GOTTLIEB, C.W.; BLEICHER, S.J. Coated charcoal immunoassay of insulin. J. Clin. Endocrinol. Metab., 25:1375-84, 1965..
39. HEYNS, W.; BAELEN, H. Van; MOOR, P. Study of steroid-protein binding by means of competitive adsorption: application to cortisol binding in plasma. Clin. Chim. Acta, 18:361-70, 1967.
40. HUNTER, W.M. Radioimmunoassay. In: WEIR, D.M. ed. Handbook of experimental immunology. v.1. Immunology. 2ed. Oxford, Blackwell, 1973. Cap. 17, p.1-36.
41. HUNTER, W.M.; GREENWOOD, F.C. A radio-immunoelectrophoretic assay for human growth hormone. Biochem. J., 91:43-56, 1964.
42. HUNTER, W.M.; GREENWOOD, F.C. Preparation of iodine 131 labelled human growth hormone of high specific activity. Nature, 194:495-6, 1962.
43. JANSON, J.C. Adsorption phenomena on sephadex. J. Chromatogr., 28: 12-20, 1967.

44. KAPLAN, M.M.; SCHIMMEL, M.; UTIGER, R.D. Changes in serum 3, 3', 5' triiodothyronine (reverse T₃) concentrations with altered thyroid hormone secretion and metabolism. J. Clin. Endocrinol., 45:447-56, 1977.
45. KIM, J.R.; AWH, O.D.; KOO, H.S.; PARK, K.B. Simple immobilization of T₃ antibodies of some modifications of assay buffer systems. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Radioimmunoassay and related procedures in medicine: proceedings of a symposium held in Vienna. June, 21-25, 1982. Vienna, 1982. p.81-93.
46. KJELD, J.M.; KUKU, S.F.; DIAMANT, L.J.; FRASER, J.R.; JOPLIN, G.F. ; MASHITER, K. Production and storage of ¹²⁵I thyroxine and ¹²⁵I triiodothyronine of high specific activity. Clin. Chim. Acta, 61: 381-9, 1975.
47. KOCHUPILLAI, N.; YALOW, R.S. Preparation, purification and stability of high specific activity ¹²⁵I-labeled thyronine. Endocrinology, 102:128-35, 1978.
48. KOIZUMI, K.; MATSUDA, H.; OHGUCHI, M.; HISADA, K. An evaluation of a T₃ radioimmunoassay kit using solid phase method: SPAC T₃ RIA KIT. Kaku Igaku, 17:833-8, 1980.
49. LARSEN, P.R. Direct immunoassay of triiodothyronine in human serum. J. Clin. Invest., 51:1939-41, 1972.
50. LARSEN, P.R. Inhibition of triiodothyronine (T₃) binding to thyroxine binding globulin by sodium salicylate and its application to immunoassay of T₃ in human serum. Metabolism, 20(10):976-80, 1971.
51. LARSEN, P.R. Technical aspects of the estimation of triiodothyronine in human serum. Evidence of conversion of thyroxine to triiodothyronine during assay. Metabolism, 20:609-24, 1971.

52. LARSEN, P.R. Triiodothyronine: review of recent studies of its physiology and pathophysiology in man. Metabolism, 21(1):1073-92, 1972.
53. LIEBICH, J. & UTIGER, R.D. Triiodothyronine radioimmunoassay. J. Clin. Invest., 51:157-66, 1972.
54. LYUNGREN, J.G.; PERSSON, B.; TRYSELIUS, M. Rapid simultaneous radioimmunoassay for the measurement of triiodothyronine and thyroxine in unextracted human serum. Acta Endocrinol., 81:487-94, 1976.
55. MACLAGAN, N.F. & BOWDEN, C.H.; WILKINSON, J.H. The metabolism of thyroid hormones II. Detection of thyroxine and triiodothyronine in human plasma. Biochem. J., 67:5-11, 1957.
56. 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, 1983. (Dissertação de Mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares).
57. MESQUITA, C.H.; SILVA, C.P.G.; HAMADA, M.M. Características e normas técnicas do conjunto reativo ("kit") para o doseamento de insulina humana, por radioensaio. São Paulo, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, CNEN/SP. 1985. (IPEN-Inf-84).
58. MITSUMA, T.; NIHEI, N.; GERSHENCORN, M.C.; HOLLANDER, C.S. Serum triiodothyronine: measurements in human serum by radioimmunoassay with corroboration by gas-liquid chromatography. J. Clin. Invest., 50:2679-88, 1971.
59. MORRIS, B.J. Specific radioactivity of radioimmunoassay tracer determined by self-displacement a re-evaluation. Clin. Chim. Acta, 73:213-16, 1976.

60. MURPHY, B.E.P. & PATTEE, C.J. Determination of thyroxine utilizing the property of protein-bindings. J. Clin. Endocrinol., 24:187-96, 1964.
61. NAUMANN, J.A.; NAUMANN, A.; WERNER, S.C. Total and free triiodothyronine in human serum. J. Clin. Invest., 46:1346-55, 1967.
62. NICOD, P.; BURGER, A.; STAEHEL, V.; VALLOITON, M.B. A radioimmunoassay for 3, 3', 5', triiodo-L-thyronine in unextracted serum : method and clinical results. J. Clin. Endocrinol. Metab., 42:823-29, 1976.
63. NICOLAU, W. & MEDEIROS NETO, G. Fisiologia da glandula tireoide. In: MEDEIROS NETO, G. & NICOLAU, W. Temas atuais em tireoidologia: 1º curso da atualização em moléstias tireoidianas 7-18 abril 1974. São Paulo, Med. 1977. Cap.1 p.9-22. (Compilação das aulas ministradas).
64. NIHEI, N.N.; GERSHENGORN, M.C.; MITSUMA, T.; STRINGHAM, L.R.; CORDY, A.; KUCHMY, B.; HOLLANDER, C.S. Measurements of triiodothyronine and thyroxine in human serum by gas-liquid chromatography. Anal. Biochem., 43:433-45, 1971.
65. PARSONS, G.H. Antibody-coated plastic tubes in radioimmunoassay. Meth. Enzymol., 73:224-39, 1981.
66. PIND, K. Paper chromatographic determination of thyroid hormone (3, 5, 3'-triiodothyronine in serum without radioiodine. Acta Endocrinol., 26:263-73, 1957.
67. PITTMAN, C.S.; CHAMBERS JR., J.B.; READ, V.H. The extrathyroidal conversion rate of thyroxine to triiodothyronine in normal man. J. Clin. Invest., 50:1187-96, 1971.

68. PITT-RIVERS, R. & CAVALIERI, R.R. Thyroid hormone biosynthesis. In:
PITT-RIVERS, R. & TROTTER, W.R. eds. The thyroid gland. London,
Butterworths, 1964. p.87-112.
69. PITT-RIVERS, R.; STANBURY, J.B.; RAPP, B. Conversion of thyroxine to
3,5,3' triiodothyronine in vivo. J. Clin. Endocrinol. Metab., 15:
616-20, 1952.
70. PRIORI, R.L. & ROSENTHAL, H.E. A statistical method for the esti-
mation of binding parameters in a complex system. Anal. Biochem.,
70:231-40, 1976.
71. QUASH, G.; ROCH, A.M.; NIVELEAU, A.; GRAWCE, J.; KELOUANGKHOT, T. ;
HUPPERT, J. The preparation of latex particles with covalently
bound polyamides, IgG and measles agglutination tests. J. Immunol.
Meth., 22:165-74, 1978.
72. QUIOCHO, F.A. Immobilized proteins in single crystals. Meth. Enzy-
mol., 44:547-59, 1976.
73. ROBBARD, D. Quality control for RIA-radioimmunoassay and related pro-
cedures in medicine. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Radi-
oimmunoassay and related procedures in medicine: proceedings of an
international symp. held in Berlin, Oct. 31-4 Nov., 1977. Vienna ,
1978. v.1 p.343-55.
74. ROBBARD, D.; MUNSON, P.J.; DELEA, A. Improved curve fitting paral-
lelism testing characterization of sensitivity and specificity,
validation and optimization of radioligant assay. In: INTERNATIONAL
ATOMIC ENERGY AGENCY. Radioimmunoassay and related procedures in
medicine, proceedings of an international symp. held in Berlin, Oct.
31-Nov. 4, 1977. Vienna, 1978. p.469-514

75. ROSSELIN, G.; ASSAN, R.; YALOW, R.S.; BERSON, S.A. Separation of antibody bound and unbound peptide hormones labelled with iodine ¹³¹ by talcum powder and precipitated silica. Nature, 212:355-8, 1966.
76. SAITO, T. & NAGAI, F. Immobilization of antibody to a plastic surface by toluene 2,4 diisocyanate and its application to radioimmunoassay. Clin. Chim. Acta, 133:301-10, 1983.
77. SAITO, T. & SAXENA, B.B. A sensitive rapid and economic radioimmunoassay of human growth hormone using ethanol-ammonium acetate. J. Lab. Clin. Med., 85:497-504, 1975.
78. SCATCHARD, G. The attraction of proteins for small molecules and ions. Ann. N.Y. Acad. Sci., 51:660-72, 1949.
79. SCHMIDT, H.; STETTEN, O. Von; KELLERMAN, G.; PATZELT, H.; NAECELE, W. A new solid-phase system for immunoassay. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Radioimmunoassay and related procedures in medicine: proceedings of a symposium held in Vienna June, 21-25 , 1982. Vienna, 1982. p.111-21.
80. SKOM, J.H.; TALMAGE, D.W. Non precipitating insulin antibodies. J. Clin. Invest., 37:783-86, 1958.
81. SNYDER, S.M.; CAVALIERI, R.R.; GOLDFINE, I.D.; INGBAR, S.H.; JORGENSEN, E.G. Binding of thyroid hormones and their analogues to thyroxine binding globulin in human serum. J. Biol. Chem., 251:6489-94, 1976.
82. STELO, P. Isolation of immunoglobulin. In: WEIR, D.M. ed. Handbook of experimental immunology. Oxford, Blackwell, 1967. v.1. p.3-9.
83. STERLING, K. & LAZARUS, J.H. The thyroid and its control. Ann. Rev. Physiol., 39:349-71, 1977.

84. STERLING, K.; BELLABARBA, D.; NEWMAN, E.S.; BRENNER, M. Determination of triiodothyronine concentration in human serum. J. Clin. Invest., 48:1150-8, 1969.
85. STERLING, K. & MILCH, P.O. Thermal inactivation of thyroxine binding globulin for direct radioimmunoassay of triiodothyronine. J. Clin. Endocrinol. Metab., 38:866-75, 1974.
86. SURKS, M.I.; SCHADLOW, A.R.; OPPENHEIMER, J.H. A new radioimmunoassay for plasma L triiodothyronine: measurements in thyroid disease and in patients maintained on hormone replacement. J. Clin. Invest., 51:3104-13, 1972.
87. THORELL, M.S. & LARSEN, S.M. Pituitary-thyroid axis. In: THORELL, J. I. & LARSEN, S.M. ed. Radioimmunoassay and related techniques. Methodology clinical application. Saint Louis, C.B. Mosby, 1978. p.109-28.
88. UTIGER, R.D.; PARKER, M.L.; DAUGHADAY, W.H. Studies on human growth hormone. I. A radioimmunoassay for human growth hormone. J. Clin. Invest., 41:254-61, 1962.
89. VAGENAKIS, A.G.; BURGER, A.; PORTNAY, G.I.; RUDOLPH, M.; O'BRIEN, J. T.; AZIZI, F.; ARKY, R.A.; NICOD, P.; INGBAR, S.H.; BRAVERMAN, L.E. Diversion of peripheral thyroxine metabolism from activating to inactivating pathways during complete fasting. J. Clin. Endocrinol., 41:191-4, 1975.
90. VAITUKAITIS, J.L. Production of antisera with small doses of immunogen: multiple intradermal injection. Methods Enzymol., 73:46-52, 1981.
91. VAITUKAITIS, J.; ROBBIS, J.B.; NIESCHLAG, E.; FOSS, G.F. A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. J. Clin. Endocrinol. Metab., 33:988-91, 1971.

92. WOOL, M.S. & SELENOW, H.A. Charcoal dextran radioimmunoassay of human growth hormone. Acta Endocrinol., 57:109-14, 1968.
93. YALOW, R.S. & BERSON, S.A. Immunoassay of endogeneous plasma insulin in man. J. Clin. Invest., 39:1157-75, 1960.