

Dosagens hormonais *in vitro* com radioisótopos. Considerações gerais e análise crítica*

Recebido para publicação em 27/8/1982.

VÂNIA CAIRA BORGHI, Centro de Aplicações Biomédicas de Radiação e Radioisótopos, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, SP.

Os radioisótopos são amplamente empregados em biologia e medicina nuclear, como fontes de irradiação ou como traçadores.

Fontes radioativas são utilizadas tanto em radioterapia (18) como em radiobiologia (14) contribuindo para o conhecimento dos efeitos da radiação a nível molecular (38), da radiosensibilidade de diversos organismos (37) e dos efeitos de substâncias radiosensibilizadoras e radioprotetoras face à exposição de diferentes doses de radiação (14).

Traçadores radioativos são empregados em medicina nuclear principalmente para fins de diagnóstico (25), sendo seu uso classificado como *in vivo* ou *in vitro* dependendo do radionuclídeo ser administrado ao organismo analisado ou entrar em contato com o material biológico fora do organismo.

O uso de radioisótopos em provas *in vitro* a partir do final da década de 50 permitiu a quantificação de substâncias existentes em micro quantidades no organismo, tais como os hormônios, não mensuráveis pelos métodos químicos e biológicos disponíveis destituídos de sensibilidade e especificidade adequadas. A determinação das concentrações plasmáticas de hormônios tireoideanos e esteróidicos, por exemplo, era realizada por técnicas químicas baseadas na solubilidade diferencial desses compostos e em suas características estruturais intrínsecas, tais como o conteúdo de iodo e o anel ciclopentanofenantreno, respectivamente (23).

As técnicas que empregam radioisótopos constituem os denominados ensaios por ligação competitiva e são utilizadas principalmente na dosagem de hormônios peptídicos e esteróidicos, sendo também aplicadas na determinação de diversas

substâncias não hormonais, como moléculas pequenas e até mesmo íônios.

As bases desses ensaios foram enunciadas por Yalow e Berson a partir de 1957 (2), culminando com o desenvolvimento de um radioimunoensaio para a determinação de insulina no plasma em 1959 (57).

I. RADIOIMUNOENSAIO

Seu princípio baseia-se na competição entre determinado antígeno (hormônio) marcado isotopicamente e não marcado pelos sítios de ligação específicos de uma proteína com capacidade ligante (anticorpo), formando complexo antígeno-anticorpo. Essa reação de competição obedece à lei de ação das massas e é ilustrada na Fig. 1 (3).

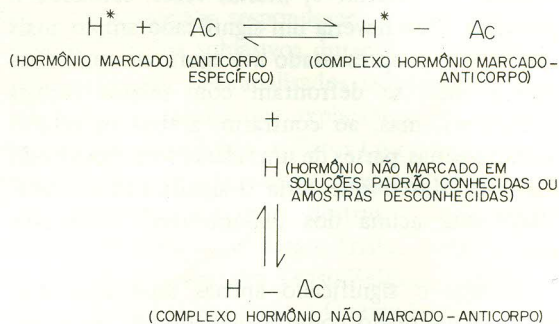


Figura 1. Reação de competição que caracteriza o radioimunoensaio.

A formação do complexo antígeno-anticorpo é proporcional à concentração de hormônio marcado (traçador) e não marcado presentes no sistema. Se quantidades de traçador e anticorpo específico são mantidas constantes, a adição de hormônio não marcado ao sistema acarreta maior formação do complexo antígeno não marcado-anticorpo e conseqüente diminuição do complexo radioativo.

*Trabalho apresentado no Simpósio Energia Nuclear em Medicina, realizado na 34a. Reunião Anual da SBPC, Campinas, SP, 07-14 de julho de 1982.

Dessa forma a concentração hormonal pode ser determinada em amostras de fluidos ou extratos biológicos pela leitura direta em curva de calibração obtida em condições similares de ensaio, incubando quantidades variáveis e conhecidas do hormônio (padrão) com quantidades fixas correspondentes do traçador e de seu anticorpo específico. Compara-se, então, o efeito inibitório do hormônio não marcado da amostra ensaiada na ligação do traçador ao anticorpo específico com o efeito inibitório dos padrões conhecidos (Fig. 2).

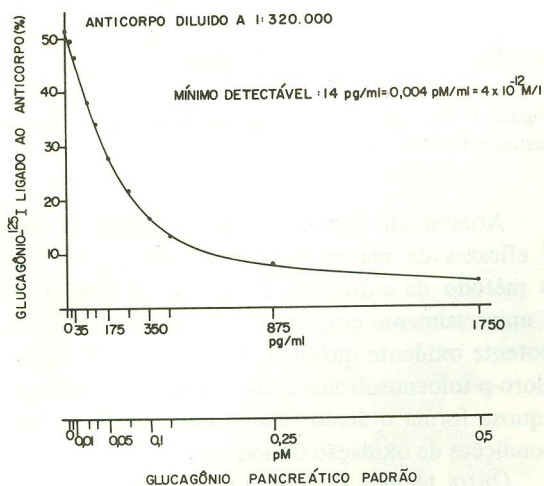


Figura 2. Curva padrão para a determinação de glucagônio pancreático no plasma humano por radioimunoensaio.

A sensibilidade, especificidade e precisão elevadas dos radioimunoensaios, bem como sua praticabilidade para ensaiar convenientemente grande número de amostras de frações de mililitro de fluidos biológicos foram responsáveis por seu rápido desenvolvimento e grande aplicabilidade.

Desta forma, quantias hormonais muito pequenas, como, por exemplo, 14 picogramas de glucagônio pancreático por mililitro de plasma humano, equivalentes a 0,004 picoles por mililitro ou a 4×10^{-12} moles por litro, são prontamente mensuráveis a partir de 0,2 ml de plasma (7).

A especificidade dos radioimunoensaios permite o rápido reconhecimento pelo anticorpo de características estruturais sutis da molécula do antígeno, distinguindo, por exemplo, entre a troca de um simples átomo de hidrogênio e iodo nos hormônios tireoideanos triiodotironina (T3) e tiroxina (T4) ou entre a presença ou ausência de um

simples resíduo hidroxila nos hormônios adrenais cortisol e corticosterona, respectivamente (23).

A validade destes ensaios depende do comportamento imunológico idêntico do hormônio presente nas amostras desconhecidas e nos padrões conhecidos, não havendo necessidade de serem quimicamente análogos ou de terem o mesmo comportamento biológico.

Os elementos essenciais para a realização de um radioimunoensaio consistem, portanto, no preparo do traçador e das soluções padrão, na obtenção do anti-soro específico e na escolha de técnicas adequadas para, após o término da reação, separar o hormônio ligado do livre (3).

I.1. Hormônio Radioativo (Traçador)

O preparo do traçador implica na seleção de um radionuclídeo, na sua incorporação ao hormônio (marcação) e na purificação e avaliação das características deste traçador para o ensaio.

I.1.1. Marcação do Hormônio

I.1.1.1. Radioisótopo empregado

A escolha do isótopo baseia-se essencialmente em sua meia-vida física, facilidade de introduzi-lo no hormônio e detectar o produto marcado, atividade específica e custo.

Os radionuclídeos de meia-vida longa, como o ^{14}C e o ^3H , apesar de serem incorporados diretamente às cadeias de compostos orgânicos substituindo átomos já presentes na molécula, não modificando a estrutura desta, por não poderem ser obtidos com atividade específica elevada, não costumam ser utilizados no ensaio de hormônios pro-téicos (12), (Tabela I).

TABELA I – Radionuclídeos empregados em dosagens hormonais por ligação competitiva, segundo Tothill: The use of the scintillation counter in radioimmunoassay.

| Radio-nuclídeo | Meia-vida | Emissão | Atividade específica teórica (Ci/mg átomo) |
|------------------|-----------|------------------|--|
| ^3H | 12 anos | β | 29 |
| ^{14}C | 5700 anos | β | 0,06 |
| ^{125}I | 60 dias | $\gamma + \chi$ | 2160 |
| ^{131}I | 8 dias | $\beta + \gamma$ | 16200 |

O ^3H tem sido empregado no ensaio de hormônios esteroídicos, porém a tendência é de ser substituído pelos radioisótopos de iodo, emissores gama, cuja detecção da radiação é mais fácil e menos dispendiosa do que a radiação beta.

Os radioisótopos de iodo, ^{131}I e ^{125}I , possuidores de atividade específica elevada, oferecem vantagens sobre os demais e são os comumente empregados na marcação de hormônios protéicos.

Um átomo de ^{131}I , por exemplo, produz numa molécula de insulina taxa de desintegração maior do que a obtida se todos os 263 átomos de carbono da molécula fossem substituídos pelo ^{14}C (12).

Apesar do ^{131}I possuir atividade específica maior, sua meia-vida mais breve, o maior dano potencialmente causado ao antígeno pela radiação beta, bem como a eficiência de contagens e abundância isotópica menores obtidas com este isótopo do que com o ^{125}I favorecem o uso do ^{125}I para fins de marcação (21), (Tabela II).

TABELA II - Propriedades dos radioisótopos de iodo segundo Chervu e Murty (12).

| | ^{125}I | ^{131}I |
|--|------------------|------------------|
| Meia-vida | 60 dias | 8 dias |
| Principais fótons e abundância | 27-35 kev (144%) | 364 kev (80%) |
| Eficiência de contagem em detector de NaI | ~ 90% | ~ 45% |
| Atividade específica teórica (mCi/ μg) | 17,4 | 125 |
| Abundância isotópica em produtos comerciais | 95% | ~ 25% |
| Janela de contagem | 20-80 kev | 310-410 kev |

1.1.1.2. Marcação com radioiodo

A incorporação do radioiodo à molécula do hormônio é feita por uma reação de substituição

do hidrogênio nos grupos tirosina por um átomo de iodo (32). Para tanto, é necessário que o radioiodo, fornecido na forma de iodeto, seja convertido em iodo molecular livre (I_2) pela ação de agentes oxidantes (Fig. 3).

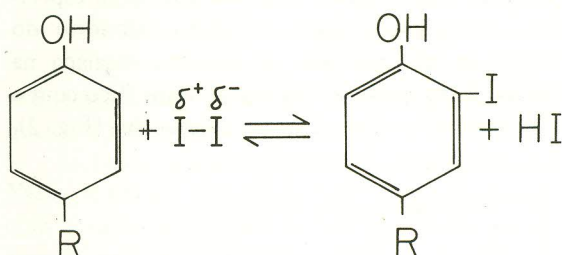


Figura 3. Equação da reação de marcação com radioiodo segundo Hunter (33).

Atualmente dispõem-se de processos simples e eficazes de marcação, destacando-se entre eles o método da cloramina T, que desde 1962 (35) é universalmente empregado. A cloramina T é um potente oxidante químico (sal sódico do N-monocloro-p-toluenosulfonamida), que em solução aquosa forma o ácido hipocloroso, promotor das condições de oxidação do iodeto.

Outra técnica de amplo uso é a radioiodação enzimática, desenvolvida a partir de 1969 (42), que emprega como agente oxidante a lactoperoxidase (proveniente de leite integral não pasteurizado).

O método eletrolítico (49), como o próprio nome indica, emprega eletrólise na conversão do radioiodeto a radioiodo livre. Entretanto, ele não é adequado para o uso em pequena escala pois requer concentrações elevadas do hormônio a ser marcado.

A técnica de marcação por conjugação, desenvolvida por Bolton e Hunter em 1973 (5), emprega molécula de éster marcada com radioiodo pelo método da cloramina T que é então conjugada ao grupo amínico livre do hormônio a ser marcado por ligação peptídica.

Mais recentemente, em 1978, foram descritas por Fraker e Speck (19) marcações empregando iodo-gen, uma cloroamida virtualmente insolúvel (1,3,4,6-tetracloro-3 α , 6 α -difenilglicouril) como agente oxidante do radioiodo.

Hormônios destituídos de resíduos tirosina em suas moléculas podem ser conjugados a peptídeos portadores destes resíduos antes de serem marcados, como, por exemplo, soro albumina

bovina (SAB), ou conjugados a metil-éster de tirosina já radioiodado.

1.1.2. Purificação do Hormônio Marcado

Após marcação, a mistura de reação contém, além do hormônio marcado, vários componentes que devem ser separados, tais como o radioiodo livre que não reagiu e os produtos de degradação do hormônio. Para tanto, várias técnicas são disponíveis (12), estando relacionadas na Tabela III as mais comumente empregadas.

TABELA III – Métodos de purificação de hormônios marcados com radioisótopos.

| Métodos | Materiais empregados |
|------------------------------------|---|
| Cromatografia de adsorção (58) | Celulose |
| Filtração em gel (47) | Dextranas (Sephadex) Poliacrilamida (Bio-gel) |
| Cromatografia de troca iônica (27) | Resinas aniônicas: Dowex Amberlite DEAE Celulose CM-Sephadex SP-Sephadex QAE Sephadex |
| Eletroforese | Gel de amido (30) Gel de poliácrlamida (41) |
| Cromatografia de afinidade (45) | Concavalina A-Sepharose |

As Figs. 4 e 5 ilustram respectivamente purificação de hormônio tireotrófico (TSH) de rato, marcado com ^{125}I , por filtração em gel de Sephadex e correspondente evidenciação da pureza obtida, por eletroforese em papel (6).

O hormônio marcado e purificado deve ser produto estável, mantendo sua pureza radioquímica e imunorreatividade, permitindo assim seu uso por tempo prolongado, desde que armazenado convenientemente.

1.2. Anti-soro específico

O tempo da reação de um radioimunoensaio é função das concentrações do hormônio e de seu

anticorpo e da energia de interação, a qual é função da afinidade do anti-soro. Os anticorpos são produzidos em algumas espécies animais, sendo cobaias e coelhos os mais comumente empregados quando para medir hormônios de sangue humano (23).

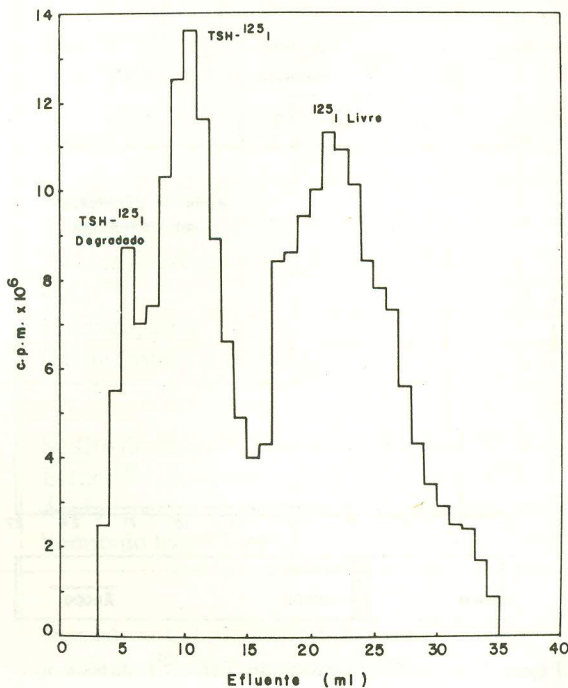


Figura 4. Cromatograma da purificação de TSH- ^{125}I em coluna de exclusão molecular (Sephadex G-75).

A especificidade, afinidade e título do anti-soro variam de animal para animal e com o número de imunizações realizadas, devendo cada anti-soro ser avaliado separadamente (51).

Hormônios de baixo peso molecular, tais como certos peptídeos e esteróides, de per si não imunogênicos são conjugados a macromoléculas, como, por exemplo, proteínas (SAB) ou compostos sintéticos, antes de serem inoculados.

A especificidade do anticorpo pelo hormônio depende dele ser espécie-específico, ou seja, de não apresentar reação cruzada com hormônios de estrutura similar ou com fragmentos hormonais que conservam seus sítios imunorreativos.

Os hormônios peptídicos em geral não apresentam reação cruzada devido às diferenças na estrutura primária de suas moléculas. Um anti-soro, por exemplo, é capaz de distinguir entre insulinas de duas espécies animais que diferem somente em um ou dois aminoácidos num total de 51 (34).

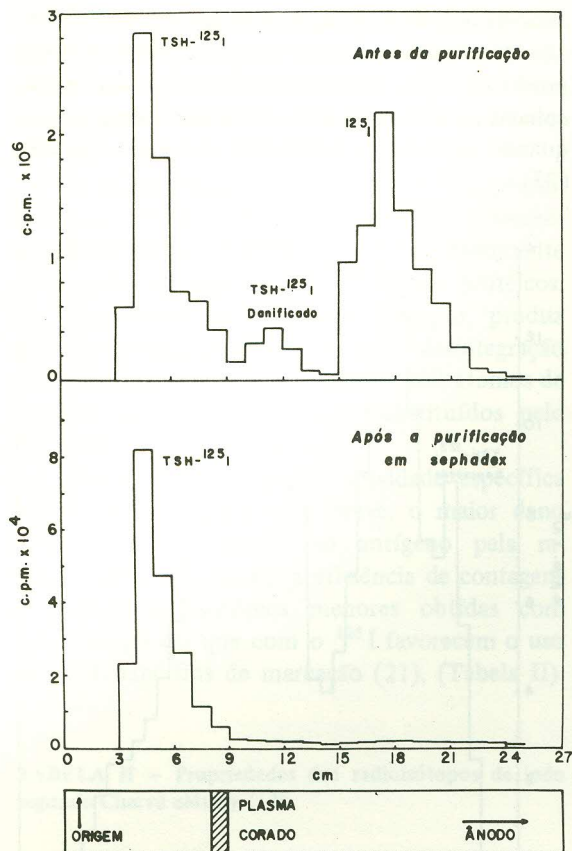


Figura 5. Eletroforetogramas do TSH- ^{125}I , antes e após sua purificação.

Hormônios esteróidicos de estrutura similar e presentes em concentração relativamente elevada podem apresentar reação cruzada com o anticorpo. Dependendo da especificidade do anti-soro empregado há necessidade de se purificar a amostra contendo o hormônio antes de ensaiá-lo.

É necessário, portanto, selecionar anti-soros específicos para o hormônio que se deseja quantificar, com constante de afinidade elevada e título suficiente para um grande número de ensaios. A diluição do anticorpo a ser utilizada é aquela que permita ligação de 50% do hormônio radioativo, na ausência de hormônio não marcado (51).

1.3. Separação das funções livres e combinadas dos hormônios

O radioimunoensaio é desenvolvido pelo preparo simultâneo de soluções padrão de concentrações conhecidas e amostras de extratos ou fluidos biológicos (soro, plasma, urina etc.) de concentrações desconhecidas do hormônio, colocadas

em tubos testes, aos quais são adicionadas quantidades fixas do hormônio marcado e do anti-soro. Após o tempo necessário para alcançar o equilíbrio (incubação), as frações livres e ligadas ao anticorpo são separadas pelo uso de técnicas apropriadas, baseadas em sua maioria nas diferenças de configuração molecular desses componentes (23).

Essas técnicas exploram diferenças de massa molecular, carga, adsorção ou propriedades de solubilidade das duas frações; precipitam especificamente o anticorpo e conseqüentemente a fração ligada ou a insolubilizam empregando anticorpos acoplados à matrizes sólidas (34). A Tabela IV relaciona os métodos usuais de separação.

Nenhum desses métodos é universalmente aplicável a todos os radioimunoensaios, devendo-se selecionar pela experimentação o método que melhor se adapta a cada substância e a cada circunstância.

Como os radioimunoensaios são aplicados tanto em pesquisa como rotina, simplicidade, custo, aplicação geral, obtenção dos reagentes e conveniência para automação são aspectos que devem ser considerados.

A separação é seguida pela determinação da radioatividade de uma ou de ambas frações, referentes ao hormônio ligado e livre. A radioatividade dos hormônios marcados com emissores de radiação gama, ^{125}I ou ^{131}I , é determinada em contador de cintilação munido de cristal de iodeto de sódio, ao passo que a de hormônios marcados com emissores beta, ^3H ou ^{14}C , é determinada em contador de cintilação líquida.

A partir das contagens obtidas constrói-se graficamente a curva padrão onde são lidos os valores da concentração hormonal das amostras ensaiadas pela comparação de sua radioatividade com a dos padrões de concentração conhecida.

Há várias formas de se traçar a curva padrão, uma delas é calculando a razão entre as contagens da fração ligada e aquelas da fração livre, ou a razão entre as contagens da fração ligada e a radioatividade total (obtida pela soma das contagens das frações ligada e livre) contra as concentrações do padrão. Pode-se ainda calcular os valores percentuais das frações ligadas ou livres contra as concentrações do padrão.

Modelos matemáticos desenvolvidos por Rodbard desde 1970 (48) permitem que os dados do radioimunoensaio sejam analisados por computadores programados.

TABELA IV – Métodos de separação do hormônio livre e ligado ao anticorpo.

| <i>Tipos de métodos</i> | <i>Métodos específicos ou materiais empregados</i> |
|---|---|
| <p><i>Migração diferencial do hormônio ligado e livre</i> Migração causada principalmente por diferenças de carga</p> <p>Migração causada principalmente por diferenças de massa molecular</p> | <p>Cromatoeletroforese em papel⁽²⁾. Eletroforese em gel de amido⁽²⁰⁾, acetato de celulose⁽³⁶⁾, poliacrilamida⁽²⁹⁾. Filtração em gel de Sephadex⁽²²⁾, Biogel.</p> |
| <p><i>Métodos de adsorção</i> Adsorção do hormônio livre</p> <p>Adsorção do hormônio ligado</p> | <p>Carvão ativado⁽²⁸⁾. Silicatos (talco, QUSO⁽⁵⁰⁾). Resinas de troca iônica (Amberlite CG 400)⁽⁴⁰⁾. Hidroxiapatita⁽⁵³⁾. Gel de fosfato de zirconilo⁽¹³⁾.</p> |
| <p><i>Precipitação seletiva do hormônio ligado</i> Precipitação por sais Precipitação por solventes orgânicos Precipitação por ácido</p> | <p>Sulfito de sódio⁽²⁶⁾, sulfato de amônio⁽¹¹⁾. Etanol⁽⁴⁴⁾, polietileno-glicol⁽¹⁵⁾, dioxano⁽⁵²⁾. Ácido tri-cloro acético após proteólise do hormônio livre⁽⁴³⁾.</p> |
| <p><i>Precipitação específica do hormônio ligado</i> Método do duplo anticorpo</p> <p>Proteínas bacterianas que ligam a gama-globulina</p> | <p>Segundo anticorpo específico para a gama-globulina do primeiro anticorpo⁽⁵⁴⁾. Estafilococcus contendo proteína A⁽³⁹⁾.</p> |
| <p><i>Insolubilização do hormônio ligado</i> Métodos de fase sólida</p> | <p>Anticorpos polimerizados⁽¹⁷⁾. Anticorpos adsorvidos a tubos plásticos⁽¹⁰⁾ ou discos⁽⁹⁾. Anticorpos covalentemente ligados a suportes (Sephadex⁽⁵⁵⁾, gel de poliacrilamida⁽²⁴⁾). Duplo anticorpo ligado à matriz sólida⁽³¹⁾.</p> |

1.4. Aplicação do radioimunoensaio

A simplicidade operacional da técnica e a facilidade com que os reagentes são obtidos permitiram o uso amplo dos radioimunoensaios para a medida de um grande número de substâncias circulantes.

Durante os últimos 20 anos sua aplicação revolucionou a endocrinologia, tornando-se ferramenta essencial na investigação científica e no diagnóstico clínico.

A habilidade em medir, por exemplo, concentrações de hormônios peptídicos no plasma da ordem de picomol (10^{-12} mol/litro) a femtomol

(10^{-15} mol/litro), na presença de concentrações um bilhão de vezes maiores de outras proteínas, possibilitou o estudo de alterações dinâmicas sutis nos níveis de hormônios circulantes em resposta a estímulos fisiológicos.

As informações assim obtidas contribuíram notavelmente para o conhecimento dos mecanismos de liberação hormonal e da fisiologia e patologia endócrinas, bem como para a caracterização de novas formas hormonais.

A Tabela V apresenta listagem significativa dos hormônios atualmente quantificados por radioimunoensaio. Essa lista aumenta a cada dia e se estende a substâncias não hormonais, tais como

drogas, vitaminas, enzimas, agentes microbianos e virais, antígenos tumorais, proteínas séricas e outras (56).

No campo da endocrinologia, a aplicação inicial do radioimunoensaio de insulina permitiu, por exemplo, a diferenciação do Diabetes Mellitus nos tipos juvenil e adulto, caracterizados respectivamente pela ausência ou atraso na secreção (23) ou por resistência à insulina secretada.

O mesmo ocorreu com os demais radioimunoensaios descritos que tiveram aplicação imediata no diagnóstico clínico. A Tabela VI exemplifica alguns radioimunoensaios hormonais de interesse clínico (16).

Mais recentemente, os radioimunoensaios foram aplicados na investigação do papel fisiológico dos hormônios liberadores e inibidores, pela mensuração desses próprios hormônios e dos hormônios por eles controlados (56).

Na década de 70 o radioimunoensaio teve importante participação na descoberta de novas formas hormonais no sangue e tecidos, tais como as espécies multimoleculares de insulina, gastrina,

hormônio paratireoideano (PTH) e corticotrofina (ACTH), denominadas com o prefixo "big" e os fragmentos hormonais como o de PTH. Essas formas podem ter ou não atividade biológica e representam ou os precursores hormonais (pró-hormônios) ou os metabólitos desses hormônios (56).

Essas descobertas forneceram subsídios para o estudo da biossíntese desses hormônios, sendo o radioimunoensaio de pró-insulina, por exemplo, útil no diagnóstico de insulinomas, situação em que esta é produzida em excesso, por síntese anômala pelo tumor.

Dentre as recentes aplicações do radioimunoensaio avultam pelas suas implicações conceituais a quantificação de hormônios peptídicos comuns ao cérebro e trato gastro-intestinal.

Empregando anticorpos contra gastrina, demonstrou-se a presença de colicistoquinina (CCK) em extratos tanto cerebrais como intestinais, que apresentou reação cruzada com os anticorpos. A CCK na córtex cerebral teria ação neuro-reguladora do apetite, inibindo a sensação de fome (56).

TABELA V – Listagem parcial dos hormônios mensuráveis por radioimunoensaio.

| <i>Hormônios peptídicos</i> | | <i>Hormônios não peptídicos</i> |
|---------------------------------------|---|---|
| <i>Hormônios hipofisários</i> | <i>Hormônios gastro-intestinais</i> | <i>Hormônios tireoideanos</i> |
| Hormônio de crescimento (GH) | Enteroglucagônio | Triiodotironina (T ₃) |
| Hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) | Gastrina | T ₃ reversa (RT ₃) |
| Hormônio melanócito estimulante (MSH) | Secretina | Tiroxina (T ₄) |
| Glicoproteínas | Motilina | <i>Hormônios Esteroidícos</i> |
| Hormônio tireotrófico (TSH) | Colecistoquinina (CCK) | Aldosterona |
| Hormônio folículo-estimulante (FSH) | Polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP) | Corticoesteróides |
| Hormônio luteinizante (LH) | Polipeptídeo inibidor gástrico (GIP) | Estrógenos |
| Prolactina (PRL) | <i>Hormônios vasoativos tissulares</i> | Andrógenos |
| Lipotrofina (LPH) | Angiotensinas | Progesteronas |
| Vasopressina | Bradicininas | βecdisona ¹ |
| Ocitocina | | |
| <i>Hormônios coriônicos</i> | <i>Hormônios liberadores e inibidores</i> | <i>Aminas biológicas</i> |
| Gonadotrofina coriônica humana (HCG) | Hormônio liberador do TSH (TRH) | Serotonina |
| Somatotrofina coriônica humana (HCS) | Hormônio liberador do LH (LHRH) | Melatonina |
| | Somatostatina | Catecolaminas |
| <i>Hormônios pancreáticos</i> | <i>Outros</i> | <i>Prostaglandinas</i> |
| Insulina (IRI) | Relaxina | |
| Glucagônio | Neuro-hormônios | |
| Polipeptídeo pancreático | Endorfinas | |
| <i>Hormônios calcitróficos</i> | Encefalinas | |
| Hormônio paratireoideano (PTH) | Substância P | |
| Calcitonina (CT) | Precusores Hormonais | |
| | Pró-insulina | |
| | Pró-hormônio paratireoideano | |

1. Hormônio da muda de artrópodes (8).

TABELA VI – Aplicação dos radioimunoensaios (RIE) hormonais no diagnóstico clínico (*diagnóstico precoce, ≠diagnose diferencial).

| <i>RIE Hormônios hipofisários</i> | <i>RIE hormônios coriônicos</i> | <i>RIE hormônios esteróidicos</i> |
|--|---|---|
| <p>GH Acromegalia * Hipopituitarismo Manismo Gigantismo LH e FSH Menopausa ≠ Hipogonadismo 1º e 2º Puberdade precoce Ovulação (infertilidade ♀) Avaliação função seminífera (infertilidade ♂) Falência espermatogênica</p> <p>PRL Amenorréia 2ª Tumor hipofisário Lactação inapropriada Distúrbios menstruais</p> <p>ACTH Síndrome ACTH ectópico Doença de Addison Moléstia de Cushing ≠ Hiper cortisolismo e insuficiência adrenocortical Resposta terapêutica</p> <p>TSH ≠ Hipotireoidismo 1º e 2º *Cretinismo em recém-nascidos Tratamento moléstia de graves</p> | <p>HCG e HCS Gravidez Tumores Avaliação integridade feto-placentária</p> <p><i>RIE hormônios calcitróficos</i> PTH e CT Hipo e hipercalcemia Carcinoma medular da tireóide Produção ectópica de CT por câncer não tireoideano</p> <p><i>RIE hormônios pancreáticos</i> IRI Hipoglicemia por tumores pancreáticos ≠ Diabetes juvenil e adulto</p> <p><i>RIE hormônios gastro-intestinais</i> <i>Gastrina</i> Tumores pancreáticos não secretores IRI Úlcera péptica Hipergastrinemia não tumoral Resposta ação alimentos Resposta ação agentes farmacológicos</p> <p><i>RIE hormônios tireoideanos</i> T₃ e T₄ Hipertireoidismo Hipotireoidismo Rt₃ Avaliação função tireoideana recém-nascidos</p> <p><i>RIE catecolaminas</i> <i>Feocromocitoma</i> <i>Hipertensão arterial</i> <i>Avaliação função medular adrenal</i></p> | <p><i>Aldosterona</i> Hipertensão arterial Avaliação sistema renina-angiotensina-aldosterona</p> <p><i>Progesterona</i> Dia da ovulação Avaliação função placentária Hiperplasia congênita virilizante das adrenais</p> <p><i>Corticoesteróides (Cortisol)</i> Síndrome de Cushing</p> <p><i>Estrógenos (Estradiol)</i> Avaliação ciclo menstrual Tumores testiculares Estudo ginecomastias Puberdade precoce</p> <p><i>Andrógenos:</i> <i>Testosterona</i> Estudo eixo hipófise – células de Leydig Avaliação hipofunção hipofisária ou gonadal Avaliação terapêutica androgênica</p> <p><i>Dihidrotestosterona (DHT)</i> Estudo pseudo-hermafroditismo ♂</p> <p><i>Dihidroepiandrosterona (DHEA)</i> Hirsutismo Adrenarca precoce Virilismo</p> <p><i>Androstenediona</i> Hirsutismo Tumores adrenais Precocidade sexual ♂ Hiperplasia congênita virilizante das adrenais</p> |

Além da CCK, outros hormônios peptídicos tais como o polipeptídeo intestinal vasoativa (VIP), a somatostatina e a substância P foram determinados por radioimunoensaio no trato gastro-intestinal e no sistema nervoso central (SC) (56).

Outras evidências de peptídeos comuns detectados por radioimunoensaio dizem respeito à

distribuição de hormônios hipofisários, tais como lipotrofina e ACTH, pelo cérebro em regiões extra-hipotalâmicas (56).

Da mesma forma, o ACTH é comum à hipófise, placenta e SNC, bem como a gastrina e o VIP são comuns ao trato gastro-intestinal, SNC e placenta (46).

Segundo Pearse (46), esses peptídeos comuns seriam secretados por células APUD (Amine Precursor Uptake and Decarboxylation) de mesma origem neuroectodermal.

II. ENSAIO POR RADIORECEPTOR

Os princípios do radioimunoensaio se estendem a outros sistemas que empregam reagentes ligantes específicos não imunes no lugar do anti-corpo.

Os ensaios por ligação competitiva podem empregar como ligantes específicos proteínas de ocorrência natural no plasma. Os ensaios radioenzimáticos, conforme o nome indica, empregam enzimas específicas e os ensaios por radioreceptores utilizam sítios receptores das células alvo dos hormônios.

As células alvo de um hormônio contêm em sua constituição macromoléculas denominadas receptores que são capazes de reconhecer o hormônio específico entre os demais e a ele se ligar, desencadeando uma série de eventos bioquímicos que conduzem à resposta biológica (4).

Todos os receptores até agora identificados são proteínas, com peso molecular variando de 100.000 a 550.000 daltons, sendo classificados em 3 classes de acordo com sua localização: de membrana, de citoplasma e de núcleo (4).

Os hormônios peptídicos, os hormônios liberadores e as catecolaminas possuem receptores situados na membrana plasmática. Os receptores de hormônios esteroídicos localizam-se no citoplasma e núcleo, ao passo que os receptores de hormônios tireoideanos estão localizados apenas no núcleo das células animais (4). A Tabela VII

Tabela VII – Localização dos sítios receptores de alguns hormônios peptídicos e esteroídicos.

| <i>Hormônios peptídicos</i> | <i>Receptores de membrana celular</i> |
|-------------------------------|---------------------------------------|
| ACTH | Córtex adrenal |
| IRI | Linfócitos |
| GH | Fígado |
| TSH | Tireóide |
| <i>Hormônios esteroídicos</i> | <i>Receptores intracelulares</i> |
| Cortisol | Fígado |
| Estrógenos | Útero, vagina e mamas |
| Andrógenos | Vesícula seminal, próstata e útero |
| Progesterona | Útero e mamas |

relaciona os receptores de alguns hormônios peptídicos e esteroídicos (23).

Os receptores empregados em radioensaios hormonais podem proceder de células intactas, com receptores porém sem serem órgãos-alvo fisiológicos (eritrócitos, leucócitos, linfócitos, fibroblastos) ou de células fracionadas de órgãos-alvo.

Os ensaios hormonais por receptores estão se tornando cada vez mais importantes na medicina atual, auxiliando no diagnóstico e tratamento de algumas doenças, principalmente de tumores.

Assim, a dosagem de receptores de estrógenos e progesterona, por exemplo, é utilizada na previsão da resposta à terapia endócrina em câncer de mama avançado e na determinação de pacientes com alto risco de recorrência, sendo o tratamento escolhido em função dos resultados da presença ou ausência desses receptores (1).

A grande vantagem dos ensaios hormonais por radioreceptores frente aos radioimunoensaios é que eles traduzem a concentração de hormônios biologicamente ativos. Entretanto, eles são geralmente de 10 a 100 vezes menos sensíveis que os radioimunoensaios e os receptores biológicos são mais difíceis de se preparar que os ligantes imunológicos (51).

Portanto, a grande sensibilidade dos radioimunoensaios, aliada à fácil obtenção, estocagem e distribuição dos anticorpos, assegura a continuidade de sua vasta aplicação nas dosagens hormonais *in vitro* com radioisótopos.

REFERÊNCIAS

1. Antunes, J.R. dez.1981/jan.1982. Dosagem de receptores hormonais em câncer de mama. Um imperativo na escolha do tratamento. *Laes*, 2:29-32.
2. Bearson, S.A. e Yalow, R.S. 1957. Kinetics of reaction between insulin and insulin - binding antibody. *J. clin. Invest.*, 36: 873-874.
3. Berson, S.A. e Yalow, R.S. 1968. General principles of radioimmunoassay. *Clin. chim. Acta*, 22: 51-69.
4. Blecher, M. e Bar, R. 1981. Receptors and human disease: 2-25. Williams e Wilkins, Baltimore.
5. Bolton, A.E. e Hunter, W.M. 1973. The labelling of proteins to high specific radioactivities by conjugation to a ¹²⁵I-containing acylating agent. *Biochem. J.*, 133: 529-539.
6. Borghi, V.C. 1978. Contribuição ao conhecimento das alterações do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide na hipoproteinemia experimental em ratos Wistar albinos (*Rattus norvegicus albinus*). São Paulo. (Tese de doutoramento, Universidade de São Paulo, p. 22.)

7. Borghi, V.C., Wajchenberg, B.L. e Albuquerque, R.H. (Dados não publicados.)
8. Borst, D.W. e O'Connor, J.D. 1972. Arthropod molting hormone: Radioimmune assay. *Science*, 178: 418-419.
9. Catt, K.J., Niall, H.D. e Tregear, G.W. 1967. A solid phase disco radioimmunoassay for human growth hormone. *J. Lab. Clin. Med.*, 70: 820-830.
10. Catt, K.J. e Tregear, G.W. 1967. Solid-phase radioimmunoassay in antibody - coated tubes. *Science*, 158: 1570-1572.
11. Chard, T., Kitau, M.J. e Landon, J. 1970. The development of a radioimmunoassay for oxytocin: Radiiodination, antibody production and separation techniques. *J. Endocrinol.*, 46: 269-278.
12. Chervu, L.R. e Murty, D.R.K. 1975. Radiolabeling of antigens: Procedures and assessment of properties. *Semin. Nucl. Med.*, 5: 157-171.
13. Coffey, J.W., Nagy, C.F., Lenusky, R. e Hansen, H.J. 1974. A radioimmunoassay for plasma insulin using zirconyl phosphate gel. *Biochem. Med.*, 9: 54-61.
14. Coggle, J.E. 1971. Biological effects of radioation. Wykeham, Londres.
15. Desbuquois, B. e Aurbach, G.D. 1971. Use of polyethylene glycol to separate free and antibody-bound peptide hormones in radioimmunoassays. *J. clin. Endocr.*, 3: 732-738.
16. Di Dio, R., Barbério, J.C. e Cabelho, S.C.G.F. 1981. Protocolo da CRIESP (Central de Radioimunoensaio de São Paulo).
17. Donini, S. e Donini, P. 1969. Radioimmunoassay employing polymerized antisera. *Acta Endocrinol.*, 63, suppl. 142: 257-278.
18. Fletcher, G.H. 1973. Textbook of radiotherapy. Lea E. Fediger, Filadélfia.
19. Fraker, P.J. e Speck, J.C.Jr. 1978. Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide 1,3,4,6 - tetrachloro - 3 α , 6 α - diphenylglycouril. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 80: 849-857.
20. Franchimont, P. 1966. Dosage radio-immunologique des hormones lutéinisantes chorionique et hypophysaire. *Ann. Endocrinol.* (Paris), 27: 273-280.
21. Freedlender, A.E. 1969. Practical and theoretical advantages for the use of ^{125}I in radioimmunoassay. In Margoulies, M. org. Protein and polypeptide hormones: proceedings of the international symposium, Liège, 1968: 351-353. Excerpta Medica, Amsterdã.
22. Genuth, S., Frohman, L.A. e Lebovitz, H.E. 1965. A radioimmunological assay method for insulin using insulin - ^{125}I and gel filtration. *J. Clin. Endocr. Metab.*, 25: 1043-1049.
23. Goldsmith, S.J. 1975. Radioimmunoassay: Review of basic principles. *Semin. Nucl. Med.*, 5: 125-152.
24. Goodfriend, T., Ball, D. e Updike, S. 1969. Antibody in polyacrylamide gel, a solid phase reagent for radioimmunoassay. *Immunochemistry*, 6: 481-484.
25. Gottschalk, E. e Potchen, J. eds. 1976. Diagnostic nuclear medicine, section 20. Williams e Wilkins, Baltimore. (Golden's diagnostic radiology series, 20).
26. Grodsky, G.M. e Forsham, P.H. 1960. An immuno-chemical assay for total extractable insulin in man. *J. Clin. Invest.*, 39: 1070-1079.
27. Heber, D., Odell, W.D., Schedewie, H. e Wolfsen, A.R. 1978. Improved iodination of peptides for radioimmunoassay and membrane receptor assay. *Clin. Chem.*, 24: 796-799.
28. Hebert, V., Lau, K., Gottlieb, C.W. e Bleicher, S.J. 1965. Coated charcoal immunoassay of insulin. *J. Clin. Endocr. Metab.*, 25: 1375-1384.
29. Heideman, M.L.Jr. 1964. Separation of (^{131}I) insulin-antibody complex and of antibodies by disc electrophoresis in polyacrylamide gels. *Biochemistry*, 3: 1108-1115.
30. Higa, O.Z., Souza, I.T.T., Wajchenberg, B.L., Pinto, H.P. e Pieroni, R.R. 1974. Avaliação do método de radioimunoensaio na dosagem de hormônio de crescimento no plasma humano. *Rev. Ass. Med. Brasil*, 20: 133-142.
31. Hollander, F.C. e Schuurs, W.M. 1971. Solid phase antibody systems. Discussion. In Kirkham, K.E. e Hunter, W.M. org. *Radioimmunoassay methods*: 419-422. Churchill Livingstone, Edinburgh.
32. Hughes, W.L. 1957. The chemistry of iodination. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 70: 3-18.
33. Hunter, W.M. 1966. Iodination of proteins compounds. Radioactive Pharmaceutical, AEC Symposium Series n. 6, CONF. 651111: 245.
34. Hunter, W.M. 1973. Radioimmunoassay. In Weir, D.M. org. Handbook of experimental immunology: 1-36. Blackwell, Oxford.
35. Hunter, W.M. e Greenwood, F.C. 1962. Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature* (Londres), 194: 495-496.
36. Hunter, W.M. e Greenwood, F.C. 1964. A radio-immuno-electrophoretic assay for human growth hormone. *Biochem. J.*, 91: 43-56.
37. International Atomic Energy Agency. 1974. Advances in chemical radiosensitization: proceedings of a panel on modification of radiosensitivity in biological systems, Stockholm, 1973. Panel proceedings series), Viena.
38. International Atomic Energy Agency. 1976. Biological and environmental effects of lowlevel radiation: proceedings of a symposium, Chicago, 1975. (Proceedings series), Viena.
39. Jonson, S. e Kronvall, G. 1972. Protein A containing *Staphylococcus aureus* as anti-gammaglobulin reagent in radioimmunoassay. *Scand. J. Immunol.*, 1: 414-415.
40. Lazarus, L. e Young, J.D. 1966. Radioimmunoassay of human growth hormone using ion exchange resin. *J. Clin. Endocr. Metab.*, 26: 213-218.
41. Linde, S., Hanse, B. e Lernmark, A. 1980. Stable iodinated polypeptide hormones prepared by polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.*, 107: 165-176.
42. Marchalonis, J.J. 1969. An enzymic method for the trace iodination of immunoglobulins and other proteins. *Biochem. J.*, 113: 299-305.
43. Mitchell, M.L. e Byron, J. 1967. Use of enzyme proteolysis for the immunochemical measurement of insulin. *Diabetes*, 16: 656-663.

44. Odell, W.D., Wilber, J.F. e Paul, W.E. 1965. Radioimmunoassay of thyrotropin in human serum. *J. clin. Endocr.*, 25: 1179-1188.
45. Patriiti-Laborde, N., Yoshimoto, Y., Wolfsen, A. e Odell, W.D. 1979. Improved method of purifying some radiolabeled glycopeptide hormones. *Clin. Chem.*, 25: 163-165.
46. Pearse, A.G.E. 1977. The diffuse neuroendocrine system and the "common peptides". In Mac Intyre e Szelke, M. org. *Molecular endocrinology: proceedings of endocrinology '77*, Londres, 1977: 309-323. Elsevier/North Holland, Amsterdã.
47. Reiland, J. 1971. Gel filtration. *Meth. Enzym.*, 22: 287-321.
48. Rodbard, D. 1970. Computer analysis of radioimmunoassay and competitive protein binding assay data. *Acta Endocrinol.*, 63, suppl. 147: 79-103.
49. Rosa, U., Scasselati, G.A., Pennisi, F., Riccioni, N., Gianoni, P. e Giordani, R. 1964. Labelling of human fibrinogen with ¹²⁵I by electrolytic iodination. *Biochim. Biophys. Acta*, 86: 519-526.
50. Rosselin, G., Assan, R., Yalow, R.S. e Berson, S.A. 1966. Separation of antibody-bound and unbound peptide hormones labelled with iodine-131 by talcum powder and precipitated silica. *Nature* (Londres), 212: 355-358.
51. Skelley, D.S., Brown, L.P. e Besch, P.K. 1973. *Radioimmunoassay. Clin. Chem.*, 19: 146-186.
52. Thomas, K. e Ferin, J. 1968. A new rapid radioimmunoassay for HCG (LH, ICSH) in plasma using dioxan. *J. Clin. Endocr. Metab.*, 28: 1667-1674.
53. Trafford, D.J.H., Ward, P.R., Foo, A.Y. e Makin, H.L.J. 1976. Hydroxyapatite - A reagent for the separation of free and antibody - bound steroid during radioimmunoassay. *Steroids*, 27: 405-422.
54. Utiger, R.D., Parker, M.L. e Daughaday, W.H. 1962. Studies on human growth hormone. I. A radioimmunoassay for human growth hormone. *J. Clin. Invest.*, 41: 254-261.
55. Wide, L. e Porath, J. 1966. Radioimmunoassay of proteins with the use of Sephadex - coupled antibodies. *Biochim. Biophys. Acta*, 130: 257-260.
56. Yalow, R.S. 1978. Radioimmunoassay: A probe for the fine structure of biologic systems. *Science*, 200: 1236-1245.
57. Yalow, R.S. e Berson, S.A. 1959. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature* (Londres), 184: 1648-1649.
58. Yalow, R.S. e Berson, S.A. 1960. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J. clin. Invest.*, 39: 1157-1175.

AGRADECIMENTOS

A autora agradece ao Prof. Dr. Bernardo Léo Wajchenberg e ao Dr. Júlio Kieffer pelas sugestões, leitura e discussão do texto.

"Ciência" significa simplesmente o agregado das receitas que sempre dão certo. Tudo o mais é literatura.

Paul Valéry