



**AVALIAÇÃO DO MÉTODO DE RADIOIMUNOENSAIO NA DOSAGEM DO  
HORMÔNIO DE CRESCIMENTO NO PLASMA HUMANO**

*OLGA ZAZUCO HIGA, IRACÉLIA TORRES DE TOLEDO E SOUZA,  
BERNARDO LÉO WAJCHENBERG, HEIDI PINTO e  
RÔMULO RIBEIRO PIERONI*

**PUBLICAÇÃO IEA N.º 290**  
Abril — 1973

**INSTITUTO DE ENERGIA ATÔMICA**  
Caixa Postal 11049 (Pinheiros)  
**CIDADE UNIVERSITÁRIA "ARMANDO DE SALLES OLIVEIRA"**  
SAO PAULO — BRASIL

**AVALIAÇÃO DO MÉTODO DE RADIOIMUNOENSAIO NA DOSAGEM DO  
HORMÔNIO DE CRESCIMENTO NO PLASMA HUMANO**

**Olga Zazuco Higa, Iracélia Torres de Toledo e Souza  
Bernardo Léo Wajchenberg, Heidi Pinto e  
Rômulo Ribeiro Pieroni**

**Departamento de Radiobiologia  
Instituto de Energia Atômica  
São Paulo - Brasil**

**Publicação IEA Nº 290  
Abril - 1973**

**Instituto de Energia Atômica**

**Conselho Superior**

Eng.º Roberto N. Jafet – Presidente  
Prof.Dr.Emilio Mattar – Vice-Presidente  
Prof.Dr.José Augusto Martins  
Dr.Affonso Celso Pastore  
Prof.Dr.Milton Campos  
Eng.º Helcio Modesto da Costa

**Superintendente**

Rômulo Ribeiro Pieroni

# AVALIAÇÃO DO MÉTODO DE RADIOIMUNOENSAIO NA DOSAGEM DO HORMÔNIO DE CRESCIMENTO NO PLASMA HUMANO

Olga Zazuco Higa, Iracélia Torres de Toledo e Souza  
Bernardo Léo Wajchenberg, Heidi Pinto e  
Rômulo Ribeiro Pieroni \*

## RESUMO

Foram padronizadas as diferentes fases para o radioimunoensaio do hormônio de crescimento humano (HCH) no plasma:

- a) Marcação do HCH com  $^{125}\text{I}$ ;
- b) Purificação do hormônio marcado através da eletroforese em gel de amido e coluna de gel Sephadex G-75;
- c) Teste da imunoreatividade do hormônio marcado (incubação com o anticorpo específico);
- d) Separação do hormônio livre (F) do hormônio ligado ao anticorpo (B).

Demonstrou-se que o carvão ativado com cobertura plasmática é um excelente e simples agente para a separação de F e B.

O tratamento estatístico dos dados obtidos demonstrou a especificidade, excelente precisão e exatidão da metodologia, que permitiu uma nítida discriminação das concentrações do HCH no plasma de indivíduos com níveis baixo e elevado do hormônio.

## Introdução

Os métodos de microensaio, pelos altos padrões de sensibilidade e especificidade revelados assim como por sua aplicabilidade a um extenso número de compostos biológicos, têm sido preferentemente empregados em pesquisas endocrinológicas.

Para obtenção de informações quantitativas de elementos bioquímicos, tais como hormônios, enzimas, vitaminas, etc. presentes em tecidos ou fluídos biológicos, empregam-se atualmente as técnicas de microensaio, que exploram exatamente a extrema sensibilidade das medidas radioativas e a especificidade das reações imunológicas.

Esses métodos, denominados por Yalow e Berson<sup>1</sup> como RADIOIMUNOENSAIOS, baseiam-se essencialmente na reação de um antígeno marcado com radioisótopo e de seu anticorpo específico e tem sido os preferidos, sempre que se trata de medir com precisão hormônios protéicos e polipeptídicos, comprovadamente antigênicos em animais de laboratório<sup>2</sup>.

O presente trabalho focaliza um hormônio protéico, que se comporta como excelente antígeno e com o qual ótimos antisoros podem ser obtidos através de sua utilização na imunização de cobaias: o HORMÔNIO DE CRESCIMENTO HUMANO (HCH).

---

\* Setor de Radioimunoensaio, Departamento de Radiobiologia, Instituto de Energia Atômica.

O radioimunoensaio empregando HCH marcado com  $^{125}\text{I}$  e seu anticorpo específico, tem se revelado, potencialmente, como capaz de uma maior especificidade e maior sensibilidade, adequando-se pois à medida de concentrações bastante pequenas, como é o caso do HCH no plasma ( $6 \times 10^{-13} \text{ M}$ )<sup>3</sup>.

A plena realização desse potencial, porém, requer uma apreciação cinética da reação do HCH e anticorpo, assim como das características do hormônio marcado.

Para a ilustração dessas afirmativas, a Fig. 1 mostra a série de reações de competição que se desenvolve no radioimunoensaio. Nela podemos observar que o hormônio marcado com  $^{125}\text{I}$  reage com o anticorpo específico, resultando na formação do complexo hormônio marcado-anticorpo. Se o hormônio não marcado é adicionado ao sistema, automaticamente competirá com o hormônio marcado na união com uma quantidade fixa de anticorpo, passando a formar o complexo hormônio não-marcado-anticorpo, reduzindo-se conseqüentemente a quantidade de anticorpo que pode participar da formação do complexo marcado.

Em outras palavras, a razão entre o hormônio marcado ligado ao anticorpo ("bound"-B) e o hormônio marcado livre ("free"-F), ou seja, B/F, cai progressivamente na proporção do aumento da concentração do hormônio não-marcado no meio.

Na execução do ensaio, B e F serão determinados e a razão B/F será transferida para um gráfico, registrando nas abcissas as quantidades conhecidas e crescentes do padrão do hormônio, com o que é obtida uma curva-padrão representada na Fig. 2.

A concentração hormonal no plasma é assim determinada pela comparação do B/F observado nas amostras, com aquele obtido com as soluções padrão.

Para a determinação correta dos componentes B e F, usam-se técnicas especiais que permitam separar o anticorpo complexado, do antígeno marcado livre, para que um deles, ou ambos, torne-se passível de quantificação. As técnicas empregadas exploram ora as afinidades adsorptivas dos hormônios livres<sup>4,5,6,7</sup>, ora as precipitações seletivas dos complexos antígeno-anticorpo por um sal<sup>8</sup>, por um segundo anticorpo<sup>9</sup> ou ainda por um anticorpo unido a um polímero insolúvel<sup>10</sup>. Há ainda a técnica de exclusão molecular<sup>11</sup>, que permite separar os complexos formados das pequenas moléculas do antígeno livre.

No presente trabalho foi adotada para esta fase a primeira técnica citada, utilizando como adsorvente específico do hormônio livre o carvão ativo recoberto com plasma, em virtude da possibilidade de trabalhar-se com grandes volumes de incubação, a facilidade para a obtenção do adsorvente assim como a rápida adsorção do hormônio livre a esse produto.

Em função da padronização da técnica em estudo, fizemos uma série de avaliações críticas durante o seu desenvolvimento, orientadas principalmente no sentido da verificação dos seguintes parâmetros fundamentais: especificidade, sensibilidade, precisão e exatidão, cujos conceitos básicos são dados resumidamente abaixo.

**Especificidade** — É absolutamente imprescindível no ensaio radioimunológico que o hormônio plasmático endógeno e o hormônio padrão reajam de forma idêntica com os antisoros, devendo outras substâncias presentes no plasma permanecerem inativas ou terem sua

## REAÇÕES DE COMPETIÇÃO QUE CONSTITUEM A BASE DO RADIOIMUNOENSAIO

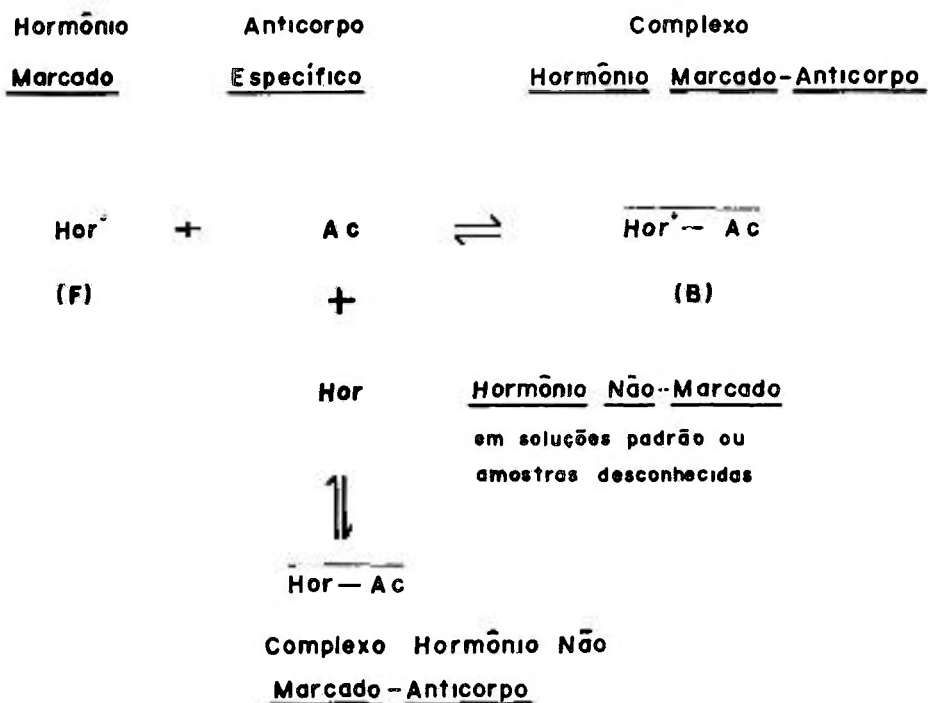


FIGURA 1

CURVA PADRÃO PARA O ENSAIO RADIOIMUNOLÓGICO DO  
HORMÔNIO DE CRESCIMENTO HUMANO

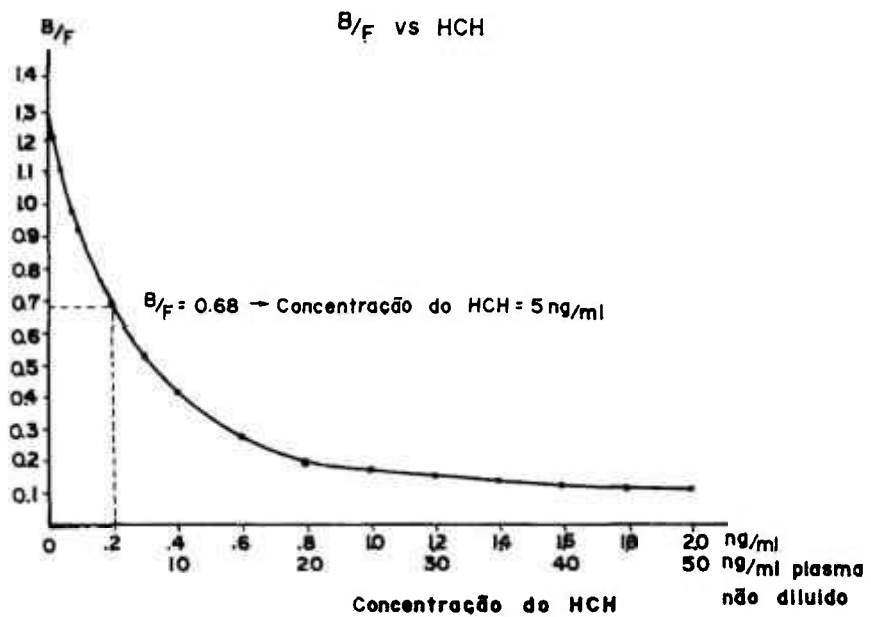


Figura 2

ação controlada<sup>1 2</sup> Para testar esta reatividade semelhante, recorreremos à dosagem de uma amostra plasmática com elevado teor de HCH, em diferentes diluições, sendo cada uma destas comparada à curva padrão.

**Sensibilidade** — A condição primeira para que se tenha um radioimunoensaio sensível é a presença de um antisoro que reaja com o hormônio a energia elevada. Esta energia de interação reflete-se essencialmente no declive da curva-padrão<sup>2</sup>.

**Precisão** — No que diz respeito à precisão do método, ponto importante é que a quantidade de hormônio marcado (em termos de massa), seja pequena quando comparada à quantidade de hormônio não-marcado a ser medido. Em nossa experiência levamos em consideração esse ponto e aplicamos para a avaliação do fator precisão, o método de uso corrente em ensaios bioquímicos, ou seja, a verificação da reprodutibilidade de um mesmo resultado em diversas amostras de um mesmo material. A precisão do método foi assim avaliada pelo coeficiente de variação em dosagens intra-ensaio (condições de rotina) e inter-ensaio (determinações em diferentes dias)<sup>1 3</sup>.

**Exatidão** — Este parâmetro foi estudado pelo acréscimo de quantidades definidas e progressivamente crescentes de plasma a uma solução-padrão de HCH previamente quantificada<sup>1 3</sup>.

## MATERIAL E MÉTODOS

– Hormônio de crescimento humano – Hormônio na forma cristalina, dissolvido em HCl 0,005 M, pH 2 - 3, a uma concentração de 1 mg/ml, para a marcação com  $^{125}\text{I}$  e, a uma concentração de 1  $\mu\text{g/ml}$ , para a solução padrão.

–  $^{125}\text{I}$  – Radioiodo na forma de  $\text{Na}^{125}\text{I}$ , livre de carreador e redutor, de concentração maior do que 200 mCi/ml.

– Soluções tampão: Veronal 0,025 M e 0,05 M, pH 8,6; fosfato 0,2 M pH 7,4; borato 0,02 M, pH 8,6 e 0,3 M, pH 8,0.

– Gel Sephadex G-75 – Entumescido com agitação em tampão veronal 0,025 M. (1 g em 15 ml).

– Gel de amido – Preparado de acordo com o método de Smithies<sup>14</sup>.

– Solução de cloramina T – 2,65 mg por ml de tampão fosfato 0,2 M.

– Solução de metabissulfito de sódio – 4,8 mg por ml de tampão fosfato 0,2 M.

– Solução de veronal-albumina – 2,5 mg de albumina humana por ml de tampão veronal 0,025 M.

– Diluente padrão – Solução de veronal-albumina com 1% de soro de cobaia.

– Suspensão de carvão (Norit-Grade A) – 100 mg por ml de tampão veronal 0,025 M (suspensão obtida por agitação contínua).

– “Plasma azul” – Plasma humano corado com azul de bromofenol.

## MARCAÇÃO DO HCH

Com as precauções usuais na manipulação de material radioativo, a iodação do hormônio foi efetuada em tubo de ensaio de 75 mm por 10 mm, empregando-se o método de Hunter e Greenwood<sup>15</sup>, com modificações de Yalow e Berson<sup>16</sup>.

As quantidades empregadas de iodo radioativo e HCH variavam de acordo com a atividade específica empregada (50 a 100 mCi/mg). Usando micropipetas descartáveis (Clay Adams), os reagentes foram adicionados na seguinte ordem e quantidades:

Tampão fosfato 0,2 M, pH 7,4	20 $\mu\text{l}$
$\text{Na}^{125}\text{I}$	1 - 10 $\mu\text{l}$
Solução de HCH (1 mg/ml)	2 - 5 $\mu\text{l}$
Solução de cloramina T	20 $\mu\text{l}$
Solução de metabissulfito de sódio	20 $\mu\text{l}$
“Plasma azul”	40 $\mu\text{l}$

O intervalo entre as adições foi de apenas alguns segundos e a mistura entre os reagentes foi efetuada através de um leve sopro na micropipeta, após cada adição. A mistura foi imediatamente removida do tubo, e aplicada ao sistema de purificação.

A eficiência da marcação foi avaliada através de duas técnicas:

- a) Adsorção em carvão — Uma amostra do hormônio marcado ( $\sim 1 \mu\text{l}$ ) foi colocada em tubo de ensaio contendo 2,4 ml de tampão veronal 0,025 M e 0,1 ml de plasma de banco de sangue. O tubo foi agitado rapidamente em "Vortex" e 1 ml da suspensão de carvão (1 mg/ml) foi adicionado. Após agitação, centrifugou-se a 2.000 rpm, por 20 minutos, a 4°C. O sobrenadante decantado e o sedimento foram contados no detector de cintilação, tipo poço, para radiação gama, e a partir da atividade total, obtivemos a porcentagem do hormônio marcado que fica adsorvido ao carvão.
- b) Cromatoeletroforese — Para a análise eletroforética aplicou-se a uma fita de papel "Toyo 514", aproximadamente 10  $\mu\text{l}$  de uma preparação iodada, contendo 2  $\mu\text{l}$  de "plasma azul". A eletroforese foi desenvolvida em tampão veronal 0,05 M, pH 8,6, empregando-se 2 mA por fita, a 300 V. O final da corrida foi determinada quando as proteínas séricas (cor azul) se localizavam a uma distância aproximada de 5 cm da origem, o que correspondeu a um tempo médio de 60 minutos.

Terminada a corrida, secou-se a fita a 37°C ou a temperatura ambiente. A distribuição do iodo entre o HCH marcado, HCH degradado e iodo livre, foi quantificado determinando-se as atividades dos seguintes segmentos da fita:

- 1 - da origem até 2,5 cm desta, que corresponde ao  $\text{HCH-}^{125}\text{I}$  puro.
- 2 - da origem até 5 cm desta, excluindo o segmento inicial, correspondendo à faixa de migração das proteínas séricas coradas incluindo o  $\text{HCH-}^{125}\text{I}$  degradado.
- 3 - o restante da fita, correspondente à zona de migração do iodeto livre.

A seguir, o preparado iodado, com rendimento considerado satisfatório, foi submetido aos seguintes processos de purificação:

#### a) Eletroforese em gel de amido

O gel de amido preparado de acordo com o método de Smithies<sup>14</sup> foi colocado no molde apropriado e mantido a baixa temperatura (5-10°C) por aproximadamente 12 horas, para uma boa solidificação. Em cada fenda do gel foram aplicados 40  $\mu\text{l}$  da mistura iodada.

A eletroforese foi desenvolvida no sentido vertical, a 90-100 V, a 4°C por 12 horas, em tampão borato 0,3 M, pH 8,6.

Quando a coloração azul das proteínas séricas se situava na metade da extensão da placa (aproximadamente após as 12 horas indicadas), o processo era interrompido. Ambas as superfícies do gel eram então colocadas em contacto com filmes raio X (Kodak-Royal Blue), sendo interposta uma camada de "parafilm". O tempo de exposição dos filmes era de 10-15 minutos, sendo os mesmos revelados imediatamente.

A partir das autorradiografias, as placas de gel foram seccionadas na zona correspondente ao hormônio radioativo, em 3 segmentos (a - b - c). Cada segmento foi congelado no mínimo por 3-4 horas. Depois do congelamento, o HCH-<sup>125</sup>I foi eluído pela adição de 1 ml de veronal 0,02 M, comprimindo-se suavemente o gel. O eluato foi posteriormente repurificado em gel Sephadex G-75.

- b) Filtração em coluna de exclusão molecular - O gel foi empacotado em coluna de vidro 35 x 1 cm, tendo-se vedado sua extremidade com pequena quantidade de lã de vidro.

O hormônio marcado obtido da purificação anterior (segmento "b"), contendo 0,2 ml de "plasma azul" foi aplicado à coluna. A eluição foi feita com veronal-albumina, coletando-se frações de 1 ml. Os diversos eluatos foram controlados através do contador de radiação gama "Tobor", a fim de localizar os picos de atividade com as respectivas frações. O HCH-<sup>125</sup>I localiza-se no 2º pico. (fig. 5)

O teor de pureza do hormônio purificado foi avaliado através das mesmas técnicas utilizadas no teste para a determinação da eficiência da iodação: cromatoeletroforese e adsorção em carvão, sendo a última a mais utilizada após a demonstração da equivalência das duas técnicas.

#### TESTE DA IMUNORREATIVIDADE DO HORMÔNIO MARCADO

Para se testar a imunorreatividade do hormônio marcado, este foi submetido a um ensaio prévio de incubação, em duas condições:

- HCH-<sup>125</sup>I sem o anticorpo (solução controle);
- HCH-<sup>125</sup>I com diluições adequadas de anticorpo (soluções de traçadores), diluições essas planejadas com o fim de obter uma razão (B/F) do hormônio marcado ligado ao anticorpo (B) em relação ao hormônio marcado livre (F), no intervalo de 0,8 a 1,2.

A partir do anticorpo diluído a 1:2.000 (solução estoque) foram preparadas diluições de  $1:1 \times 10^6$ ;  $1:2 \times 10^6$  e  $1:3 \times 10^6$ , com o diluente padrão. A quantidade de HCH-<sup>125</sup>I adicionada foi a suficiente para dar 1.000 cpm por ml da solução final.

A série de soluções foi incubada a 4°C por 4-6 dias, fazendo-se testes diários com amostras de 2,4 ml da solução controle e 2,4 ml de cada traçador. A cada amostra foi adicionado 0,1 ml de plasma e após leve agitação, 1 ml da suspensão de carvão (1 mg/ml).

Os tubos foram centrifugados a 2.000 rpm por 20 minutos a 4°C. Determinaram-se as atividades de cada sobrenadante (B) e sedimento (F), em contador de cintilação (de poço) para radiação gama, integrando-se pelo menos 10.000 impulsos.

A eventual degradação do hormônio é acusada no sobrenadante da amostra da solução controle, e o seu valor porcentual foi determinado a partir da soma das atividades (sobrenadante e sedimento). O grau de ligação hormônio marcado ao anticorpo foi avaliado através da razão B/F apresentado pelas soluções de traçadores.

## TÉCNICA DO RADIOIMUNOENSAIO

Curva-padrão — Da solução padrão (1  $\mu\text{g/ml}$ ), 50  $\mu\text{l}$  foram levados a 1 ml com diluente padrão. A partir desta solução foram efetuadas as pipetagens dos padrões, em duplicata, conforme mostra o protocolo indicado na Tabela A. Levou-se o volume dos padrões pipetados a 100  $\mu\text{l}$ , com diluente padrão.

Quatro tubos (A, B, C e D) foram preparados para avaliar a ligação do HCH-<sup>125</sup>I ao anticorpo na ausência do HCH padrão e/ou plasma. No lugar destes, os tubos continham 100  $\mu\text{l}$  de diluente padrão, e foram chamados de traçadores. A média das razões B/F dos traçadores, determinados no final do ensaio, foi considerada como o B/F inicial da curva padrão. Mais dois tubos (E,F), contendo também 100  $\mu\text{l}$  de diluente padrão foram preparados para o controle da degradação do hormônio.

Nos tubos controle (do HCH padrão e dos plasmas) foram colocados 2,4 ml de diluente padrão contendo HCH-<sup>125</sup>I em uma quantidade suficiente para dar 1000 cpm por ml. Posteriormente a estas pipetagens, adicionava-se ao restante do diluente, o anticorpo específico na diluição determinada pelos testes prévios (geralmente  $1:2 \times 10^5$ ). Esta solução com o hormônio marcado e o anticorpo foi chamada de solução de incubação.

Conforme é mostrado no protocolo da dosagem (Tabela A), todos os volumes foram levados a 2,5 ml e a ordem de adição dos 2,4 ml da solução de incubação aos tubos (exceto os de controle) foi a seguinte:

- 1) Traçador A
- 2) Série de padrões de números pares
- 3) Traçador B
- 4) Amostras de plasmas desconhecidos
- 5) Traçador C
- 6) Série de padrões de números ímpares
- 7) Traçador D

Depois de agitados, os tubos foram levados à incubação a 4°C.

Da mistura do diluente padrão contendo apenas o hormônio marcado, foram separados 20 ml para o controle paralelo à dosagem (C.P.). Posteriormente à adição do anticorpo, também 20 ml foram reservados, para o estudo paralelo do comportamento do traçador na dosagem (T.P.).

Para o controle da degradação e da ligação do hormônio ao anticorpo, durante o período de incubação, retirávamos, diariamente, alíquotas de 2,4 ml dos frascos "C.P." e "T.P.". A cada alíquota foram adicionados 0,1 ml de plasma e 1 ml da suspensão de carvão (100 mg/ml). Após a centrifugação nas condições já citadas, foram determinadas as atividades dos sobrenadantes e precipitados.

De acordo com os valores acusados no procedimento do item anterior, era determinado o momento do equilíbrio da reação hormônio-anticorpo, e com isto o término da incubação, o qual estava condicionado a obtenção do valor B/F (fornecido pela amostra do frasco T.P.) no intervalo de 0,8 a 1,2, dentro de uma faixa de degradação do hormônio (fornecida pela amostra

Tabela A

## PROTOCOLO DO ENSAIO DO HCH PLASMÁTICO

TUBOS	CURVA PADRÃO		DILUENTE PADRÃO	PLASMA	DILUENTE PADRÃO + HCH- <sup>125</sup> I	DILUENTE PADRÃO + HCH- <sup>125</sup> I + ANTICORPO
	PADRÃO *HCH	PADRÃO HCH				
	μl	ng/ml				
Traçador A	—	—	100	—	—	2,4
Traçador B	—	—	100	—	—	2,4
Traçador C	—	—	100	—	—	2,4
Traçador D	—	—	100	—	—	2,4
Controle do Padrão	—	—	100	—	2,4	—
Padrão n.º 1	1	0,02	99	—	—	2,4
Padrão n.º 2	2	0,04	98	—	—	2,4
Padrão n.º 3	3	0,06	97	—	—	2,4
Padrão n.º 4	4	0,08	96	—	—	2,4
Padrão n.º 5	5	0,10	95	—	—	2,4
Padrão n.º 6	10	0,20	90	—	—	2,4
Padrão n.º 7	15	0,30	85	—	—	2,4
Padrão n.º 8	20	0,40	80	—	—	2,4
Padrão n.º 9	30	0,60	70	—	—	2,4
Padrão n.º 10	40	0,80	60	—	—	2,4
Padrão n.º 11	50	1,0	50	—	—	2,4
Padrão n.º 12	60	1,2	40	—	—	2,4
Padrão n.º 13	70	1,4	30	—	—	2,4
Padrão n.º 14	100	2,0	—	—	—	2,4
Controle do Plasma	—	—	—	100	2,4	—
Plasma	—	—	—	100	—	2,4

\* Padrão de HCH = solução de 50 ng/ml.

do frasco C.P.) de até 15%. Isto era conseguido geralmente, entre 4-5 dias de incubação.

No fim do período de incubação, os tubos que não continham plasma, ou seja, aos traçadores e padrões, adicionávamos 0,1 ml de plasma de banco de sangue. Posteriormente, a todos os tubos era adicionado 1 ml da suspensão de carvão. Depois da agitação, estes eram centrifugados a 2.000 rpm, por 20 minutos a 4°C.

Os sobrenadantes separados por decantação, bem como os sedimentos, foram contados em cintilador de troca automática, por tempo médio de 10 minutos, ou o suficiente para o acúmulo de aproximadamente 10.000 impulsos.

### CÁLCULO E CORREÇÃO DOS RESULTADOS

As atividades dos sobrenadantes obtidos dos tubos controle (padrões e plasmas) representam a fração do hormônio marcado degradado e iodo livre durante a incubação. Esta mesma atividade aparecerá, logicamente, nos sobrenadantes dos demais tubos (traçadores e plasmas dosados), somando-se à atividade correspondente ao complexo formado. Desta maneira, na determinação da relação B/F, o valor porcentual da degradação do hormônio deve ser descontado, o que é feito com a seguinte operação:

$$B/F \text{ corrigido} = \frac{B - [(B + F)] \times D}{F}$$

onde

$$D = \frac{\text{cpm do sobrenadante (tubos controle)}}{\text{cpm total}}$$

$$B = \text{cpm do sobrenadante}$$

(traçadores, padrões e plasmas dosados)

$$F = \text{cpm do precipitado}$$

Colocando-se em ordenada o B/F corrigido contra as concentrações correspondentes de HCH padrão, obtivemos os pontos para a construção da curva-padrão (fig.2). A concentração hormonal da amostra plasmática em ng/ml é calculada a partir da curva, multiplicando-se a concentração lida por 25 (fator de diluição).

### TRATAMENTO ESTATÍSTICO

O estudo estatístico dos resultados foi efetuado analisando-se os seguintes parâmetros:

**Especificidade** — para a verificação de reatividade semelhante do hormônio plasmático e do padrão, fizemos a dosagem de uma mistura plasmática com alto teor de HCH, diluída conforme a Tabela B abaixo. O volume foi levado a 2,5 ml com a mistura de incubação (HCH-<sup>125</sup>I mais anticorpo).

**Sensibilidade** — A sensibilidade do método foi avaliada através do declive de uma curva

padrão (curva dose-resposta). Esta foi construída com concentrações de HCH padrão que variaram no intervalo de 0,02 a 2 ng/ml. A diluição de  $1:2 \times 10^6$  do anticorpo foi a que, em geral, mostrou a melhor interação com o hormônio, e empregada no ensaio. O protocolo da dosagem está esquematizado na Tabela A.

Tabela B

TUBOS n.º	PLASMA $\mu$ l	VERONAL ALBUMINA $\mu$ l	DILUIÇÃO FINAL $\mu$ l
1 e 2	10	90	1 : 250
3 e 4	30	70	1 : 83
5 e 6	50	50	1 : 50
7 e 8	70	30	1 : 35
9 e 10	90	10	1 : 27

**Precisão** — De uma mistura plasmática pipetamos 20 amostras de 0,1 ml para a quantificação do HCH e o estudo da reprodutibilidade intra-ensaio. Em 20 ensaios diferentes, determinamos a quantidade de HCH de 0,1 ml da mesma mistura de plasmas, para a verificação da reprodutibilidade inter-ensaios.

**Exatidão** — A exatidão da técnica empregada foi avaliada através de 10 determinações, pela adição de quantidades crescentes de uma mistura de plasma a 50  $\mu$ l de uma solução de HCH de teor conhecido, de acordo com a tabela C.

Paralelamente, foi dosada 0,1 ml da mesma mistura de plasma, para a quantificação do HCH neste volume e determinação da concentração teórica das diluições. A recuperação do hormônio foi determinada de acordo com o esquema da Tabela C.

Tabela C

TUBOS	SOLUÇÃO C $\mu$ l	PLASMA P.A. $\mu$ l	VERONAL ALBUMINA $\mu$ l	RESULTADOS	
				TEÓRICO	OBSERVADO
1 e 2	50	10	40	1/10 M	Obt - C
3 e 4	50	20	30	2/10 M	Obt - C
5 e 6	50	30	20	3/10 M	Obt - C
7 e 8	50	40	10	4/10 M	Obt - C
9 e 10	50	50	0	5/10 M	Obt - C

M - 100  $\mu$ l de plasma P.A.

Obt - obtido para cada tubo.

## RESULTADOS

### I) MARCAÇÃO DO HCH COM $^{125}\text{I}$ .

Efetuada a radioiodação pelo método da cloramina T de Hunter e Greenwood<sup>15</sup>, modificado por Yalow e Berson<sup>16</sup>, os rendimentos obtidos foram bastante altos, conforme é demonstrado na Tabela I. O rendimento médio foi de 71%.

### II) CONTROLE DA EFICIÊNCIA DA IODAÇÃO.

A Tabela II mostra os resultados obtidos na aplicação das técnicas da cromatoeletroforese<sup>1</sup> e adsorção em carvão<sup>7</sup>, numa mesma amostra obtida logo após a iodação do hormônio. Por ela podemos observar resultados bastante aproximados dos 2 processos, na indicação do teor de HCH- $^{125}\text{I}$ . Os índices de  $^{125}\text{I}$  só puderam ser indicados quando se tratou da técnica da cromatoeletroforese, a única entre ambas apta a discriminá-lo (fig.3).

### III) PURIFICAÇÃO DO HORMÔNIO MARCADO

Para a purificação do hormônio marcado, pré-condição de extrema importância para a obtenção do hormônio íntegro, sem resíduos degradados e iodo livre, foram utilizados dois métodos: eletroforese em gel de amido e filtração em gel Sephadex G-75.

Através da autorradiografia do gel de amido (fig.4) selecionamos o segmento imediatamente à frente da mancha mais lenta (fração b), onde presumivelmente teremos hormônio marcado com predominância de um átomo de I/mol<sup>17</sup>, condição requerida para uma boa sensibilidade do ensaio.

A Tabela III expressa o grau de pureza do HCH- $^{125}\text{I}$  separado por eletroforese em gel de amido (frações a,b,c). No sentido de obter-se hormônio mais puro, as frações hormonais foram repurificadas em coluna de gel Sephadex G-75. Os valores percentuais de pureza das frações separadas variaram de 90 a 97%.

Tabela I

CONTROLE DO RENDIMENTO DA MARCAÇÃO DO HCH- $^{125}\text{I}$

DATA	ATIVIDADE ESPECÍFICA mCi/mg	RENDIMENTO PORCENTUAL DA MARCAÇÃO %
10/12/70	96	83
15/02/71	100	67
07/05/71	47	64
13/09/71	92	74
04/10/71	88	73
17/01/72	80	79
27/01/72	82	68
10/05/72	78	62
20/02/72	96	72

Iodações do HCH efetuadas com a.e. altas (100 mCi/mg) e baixas (47 mCi/mg) mostraram grande eficiência nas marcações. O rendimento médio foi de 71%.

TABELA II

COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS DA CROMATOELETROFORESE  
E ADSORÇÃO EM CARVÃO, NA IDENTIFICAÇÃO DOS ELEMENTOS  
FORMADOS NA IODAÇÃO DO HCH 3/72

TÉCNICA	DISTRIBUIÇÃO PORCENTUAL DAS ATIVIDADES		
	HCH- <sup>125</sup> I íntegro	HCH- <sup>125</sup> I degradado	<sup>125</sup> I livre
Cromatoeletroforese	61	6	33
Adsorção em carvão	62	38	

# PICOS DE ATIVIDADES DO CROMATOGRAMA OBTIDO NO CONTROLE DO HCH-<sup>125</sup>I POR ELETRO- FORESE EM PAPEL

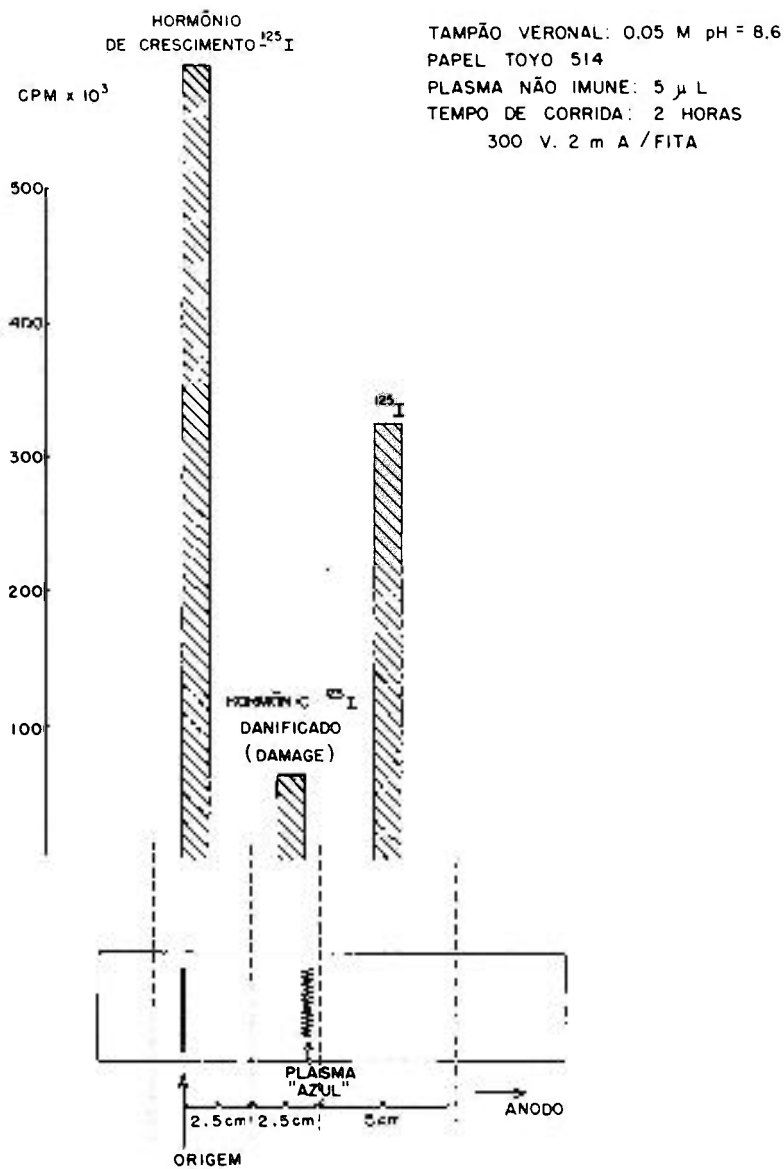


Figura 3

AUTORADIOGRAFIA DO HCH -  $^{125}\text{I}$   
PURIFICADO POR ELETROFORESE EM  
GEL DE AMIDO.

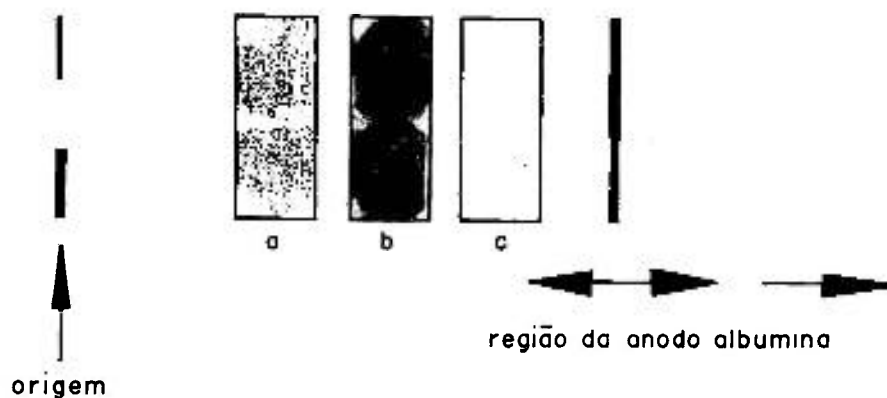


FIGURA 4 — Hormônio aplicado ao gel de amido imediatamente após a iodação. A zona do gel correspondente ao hormônio purificado foi dividida em 3 segmentos, para a separação do HCH- $^{125}\text{I}$  de acordo com o grau de iodação. A recuperação do hormônio marcado do gel foi cerca de 60 %

Tabela III

**CONTROLE DAS FRAÇÕES DE HCH-<sup>125</sup>I PURO SEPARADAS POR  
ELETROFORESE EM GEL DE AMIDO E POSTERIOR CROMATOGRAFIA  
EM COLUNA DE EXCLUSÃO MOLECULAR (SEPHADEX)**

PARTIDAS	DISTRIBUIÇÃO DOS VALORES PORCENTUAIS DE PUREZA NAS DIFERENTES FRAÇÕES ELUÍDAS	
	PURIFICAÇÃO EM GEL DE AMIDO	REPURIFICAÇÃO EM GEL SEPHADEX
1/71	a) 86 b) 87 c) 85	92 93 90
3/71	a) 90 b) 90 c) 87	95 97 96
2/72	a) 85 b) 91 c) 90	94 94 95

O quadro expressa o grau de pureza do HCH-<sup>125</sup>I separado por eletroforese em gel de amido (frações a, b, c). No sentido de obter-se hormônio mais imunorreativo, as frações hormonais foram repurificadas em gel Sephadex G-75.

Uma alíquota da mistura obtida na iodação do HCH, sem prévia purificação por eletroforese em gel de amido e submetida à purificação em coluna de exclusão molecular, forneceu o cromatograma representado na Fig.5, demonstrando a boa resolução do Sephadex G-75 na separação do HCH-<sup>125</sup>I. As frações degradadas são eluídas no início, o hormônio íntegro logo a seguir, sendo o iodo não reagente retido por mais tempo em consequência de seu tamanho reduzido.

Todas as frações hormonais resultantes dos 2 métodos de purificação eram sempre testadas quanto ao índice de pureza do hormônio marcado ou através da cromatoeletroforese em papel ou também pela adsorção em carvão, sendo esta última a mais utilizada pela sua simplicidade.

#### IV) TESTE DA IMUNORREATIVIDADE DO HCH-<sup>125</sup>I E SELEÇÃO DE CONDIÇÕES ÓTIMAS PARA O ENSAIO.

Na Tabela IV vemos relacionadas as razões B/F e a degradação porcentual do HCH-<sup>125</sup>I, em cada um dos dias de incubação do hormônio, com diferentes diluições do anticorpo, em um dos ensaios realizados. A maior diluição do anticorpo que apresentou uma relação ótima sem grande aumento da degradação do hormônio marcado foi, no caso,  $1:2 \times 10^6$ .

#### V) ENSAIO DO HCH PLASMÁTICO.

A Tabela V relaciona os valores médios das razões B/F e as massas correspondentes de HCH padrão, em uma curva dose-resposta realizada em fev/72, que lançados no gráfico linear, determinaram os pontos para a construção de uma curva-padrão. O ponto inicial da curva foi estabelecido pelos tubos dos traçadores (A,B,C,D), onde, não há, como já indicado, massa "fria" de hormônio.

Na Tabela VI estão registrados, em 4 dosagens do HCH, a degradação porcentual do hormônio e a relação B/F do traçador, em cada um dos dias da incubação.

#### VI) TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS RESULTADOS

No estudo da especificidade da técnica empregada foram obtidos os dados da Tabela VII. Esta reúne as concentrações obtidas em 5 diferentes diluições de uma mistura plasmática com teor elevado de HCH. Verificamos que a concentração medida do hormônio, multiplicada pelo fator de diluição, permaneceu constante. O coeficiente de correlação foi de 0,998 (alfa = 0,05).

Para testar ainda a reatividade semelhante do HCH padrão e plasmático, cada uma das diluições do HCH dosado foi comparada à curva padrão. Observamos uma perfeita correspondência à curva, pois ao ajustar-se um ponto do plasma diluído (70  $\mu$ l), os pontos restantes situaram-se ao longo da mesma (fig.6).

A sensibilidade avaliada através do declive da curva-padrão, indicada na fig.6, mostrou que para pequenas variações da taxa de HCH (0 — 5 ng/ml) a relação B/F variou bastante, caindo de 1,09 a 0,72, permitindo portanto discriminar níveis baixos de HCH. A diluição do anticorpo a  $1:2 \times 10^6$  mostrou a melhor interação com o hormônio e foi empregada nos ensaios.

CROMATOGRAMA DA FILTRAÇÃO EM GEL SEPHADEX G-75  
DO HCH - <sup>125</sup>I

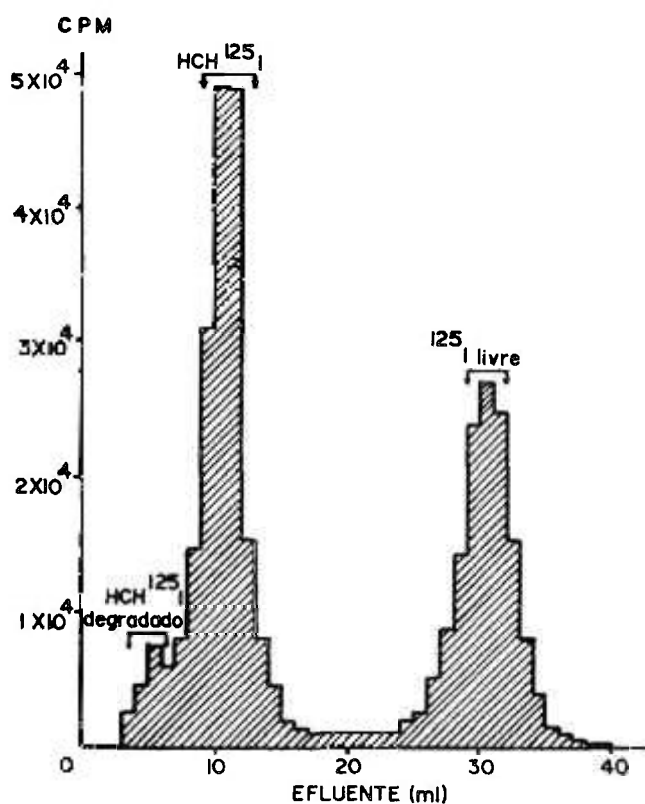


Fig. 5 - Purificação do hormônio marcado logo após a iodação. Após a eluição do hormônio degradado (1º pico), separam-se as frações correspondentes ao HCH-<sup>125</sup>I puro, com o pico máximo em geral no tubo nº 10 (2º pico).

Tabela IV

DETERMINAÇÃO DA DILUIÇÃO ADEQUADA DO ANTICORPO PARA  
O INTERVALO DE INCUBAÇÃO E CONTROLE DE DEGRADAÇÃO DO HCH-<sup>125</sup>I

PERÍODO DE INCUBAÇÃO (dias)	DEGRADAÇÃO PERCENTUAL DO HCH- <sup>125</sup> I	TÍTULO DA DILUIÇÃO DO ANTICORPO	HCH- <sup>125</sup> I + ANTICORPO RAZÃO B/F
1	7	1 : 1 x 10 <sup>6</sup>	0,63
		1 : 2 x 10 <sup>6</sup>	0,37
		1 : 3 x 10 <sup>6</sup>	0,18
2	9	1 : 1 x 10 <sup>6</sup>	1,24
		1 : 2 x 10 <sup>6</sup>	0,69
		1 : 3 x 10 <sup>6</sup>	0,26
3	9	1 : 1 x 10 <sup>6</sup>	1,40
		1 : 2 x 10 <sup>6</sup>	0,85
		1 : 3 x 10 <sup>6</sup>	0,43
4	10	1 : 1 x 10 <sup>6</sup>	1,57
		1 : 2 x 10 <sup>6</sup>	1,00
		1 : 3 x 10 <sup>6</sup>	0,60
5	11	1 : 1 x 10 <sup>6</sup>	1,57
		1 : 2 x 10 <sup>6</sup>	1,17
		1 : 3 x 10 <sup>6</sup>	0,70
6	11	1 : 1 x 10 <sup>6</sup>	1,42
		1 : 2 x 10 <sup>6</sup>	1,33*
		1 : 3 x 10 <sup>6</sup>	0,78

O asterisco identifica a diluição ideal (no caso 1 : 2 x 10<sup>6</sup>), caracterizada pelo valor B/F e dentro de uma faixa de degradação porcentual aceitável.

Tabela V

**CURVA PADRÃO PARA VALORES DE HCH COMPREENDIDOS  
ENTRE 0,02 a 2,0 ng/ml ESTIMADOS COM HCH.<sup>125</sup> | 2/72**

TUBOS	CONCENTRAÇÃO ng/ml	RAZÃO B/F		
		1ª SÉRIE	2ª SÉRIE	MÉDIA
A	—	1,05	1,04	1,03
B	—	1,08	1,08	1,08
C	—	1,13	1,07	1,10
D	—	1,12	1,10	1,11
1	0,02	1,06	1,00	1,03
2	0,04	1,02	0,96	0,99
3	0,06	0,98	0,92	0,95
4	0,08	0,91	0,89	0,90
5	0,10	0,88	0,84	0,86
6	0,20	0,72	0,70	0,71
7	0,30	0,60	0,56	0,58
8	0,40	0,52	0,48	0,50
9	0,60	0,37	0,35	0,36
10	0,80	0,33	0,31	0,32
11	1,00	0,26	0,26	0,26
12	1,2	0,24	0,22	0,23
13	1,4	0,23	0,15	0,19
14	2,0	0,17	0,13	0,15
CONTROLE PORCENTUAL DA FRAÇÃO DEGRADADA				
E	—	10	10	10
F	—	9	10	9,5

Os valores médios das razões B/F e as massas correspondentes de HCH padrão, lançados no gráfico linear, determinaram os pontos para a construção de uma curva padrão. Os traçadores (A, B, C, D) estabelecem o ponto inicial da curva (massa = 0).

Tabela VI

ESTUDO DOS NÍVEIS DE DEGRADAÇÃO DO HCH-<sup>125</sup> E DA RAZÃO B/F DURANTE 6 DIAS DE INCUBAÇÃO NA DOSAGEM DO HCH EM PLASMA HUMANO

PERÍODO DE INCUBAÇÃO (dias)	PORCENTAGEM DE DEGRADAÇÃO	HCH- <sup>125</sup> I + ANTICORPO RAZÃO B/F
1	9	0,43
2	9	0,66
3	10	0,81
4	10	0,89
5	10	0,98
6	10	1,08
1	11	0,36
2	11	0,45
3	11	0,75
4	11	0,80
5	12	0,97
6	12	1,05
1	10	0,20
2	10	0,42
3	11	0,55
4	11	0,84
5	11	1,01
6	12	1,10
1	8	0,40
2	8	0,69
3	9	0,98
4	9	1,01
5	10	1,07
6	10	1,15

A Tabela registrada, em 4 dosagens do HCH plasmático, a degradação porcentual do hormônio e a relação B/F (traçador), em cada um dos dias de incubação.

A análise da reprodutibilidade de 20 determinações e 20 ensaios de HCH, efetuada com uma mesma mistura plasmática, permitiu a avaliação da exatidão do método, cujos resultados estão indicados na Tabela VIII.

O estudo da exatidão do método foi realizado adicionando-se quantidades crescentes de plasma a uma solução padrão de HCH previamente quantificada, segundo o esquema indicado na Tabela C. Na Tabela IX podemos ver que a recuperação variou de 70,7 a 103,5%, com o coeficiente de correlação ( $r$ ) entre os valores teóricos e os obtidos foi de 0,989 ( $\alpha = 0,05$ ).

Tabela VII

**CONTROLE DA ESPECIFICIDADE DA TÉCNICA DOSANDO-SE MISTURA  
PLASMÁTICA COM ALTO TEOR DE HCH A DIFERENTES DILUIÇÕES**

FATOR DE DILUIÇÃO	CONCENTRAÇÃO DE HCH NO PLASMA DILUÍDO ng/ml	CONCENTRAÇÃO DE HCH NO PLASMA NÃO DILUÍDO ng/ml
1 : 250	0,20	50,00
1 : 83	0,63	52,29
1 : 50	1,04	52,00
1 : 35	1,40	49,00
1 : 27	1,90	51,30
1 : 25	1,98	49,50
$r = 0,998$		$\bar{X} = 50,92$

A Tabela reúne as concentrações obtidas em 5 diferentes diluições do plasma. Verificamos que a concentração medida do hormônio, multiplicada pelo fator de diluição, permaneceu constante. O coeficiente de correlação foi de 0,998.

# EFEITO DA DILUIÇÃO DO PLASMA COMPARADO À CURVA — PADRÃO

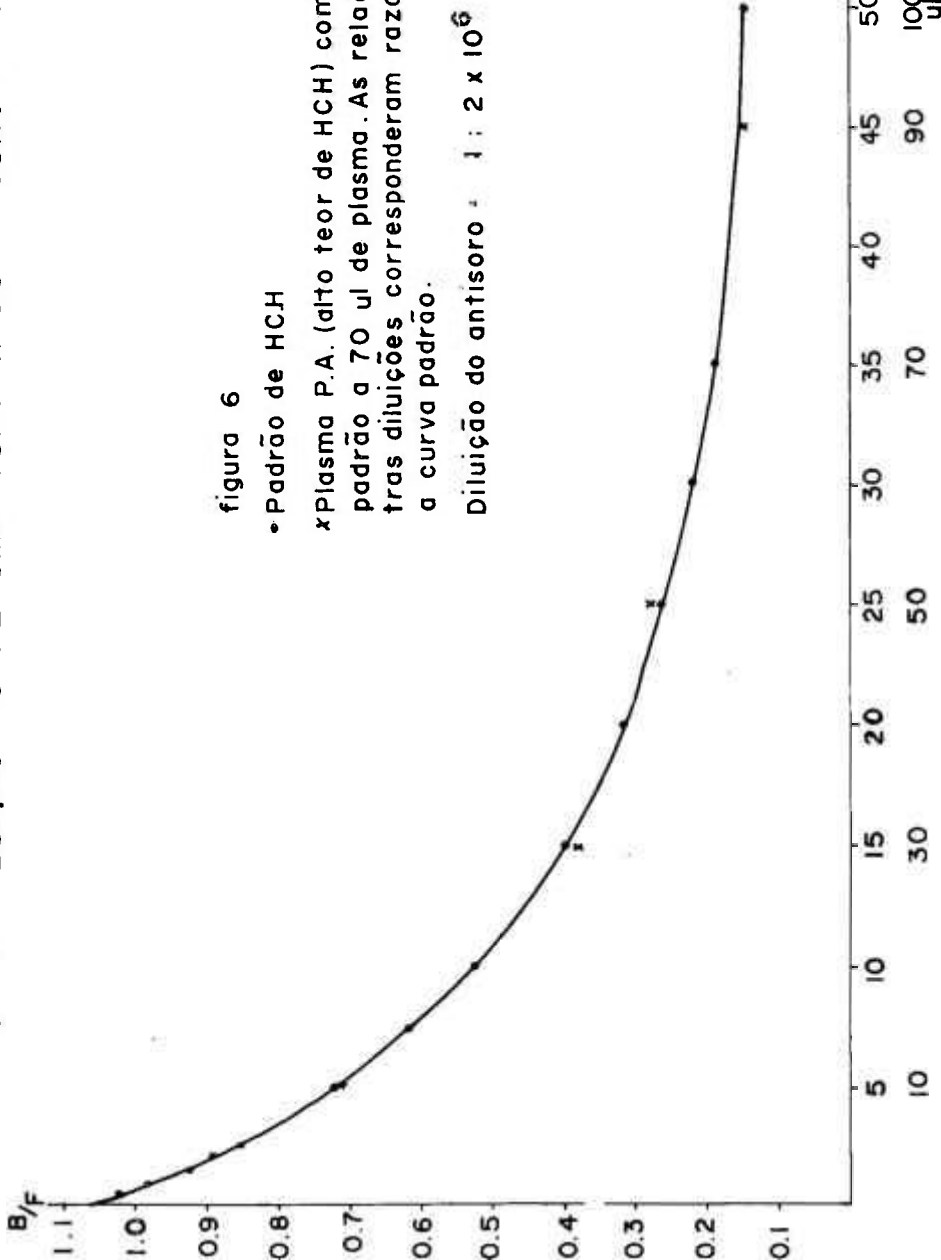


figura 6

• Padrão de HCH

x Plasma P.A. (alto teor de HCH) comparado à curva padrão a 70  $\mu$ l de plasma. As relações B/F de outras diluições corresponderam razoavelmente com a curva padrão.

Diluição do antígeno = 1 : 2 x 10<sup>6</sup>

50 ng/ml plasma não diluído  
100 plasma P.A.  $\mu$ l

Tabela VIII

**ANÁLISE DA REPRODUTIBILIDADE DE 20 DETERMINAÇÕES E 20 ENSAIOS DE HCH,  
EFETUADAS EM PLASMA COM CONCENTRAÇÃO ELEVADA DE HCH**

<p align="center">REPRODUTIBILIDADE INTRA-ENSAIO (20 amostras) ng/ml</p>	<p align="center">REPRODUTIBILIDADE INTER-ENSAIO (20 ensaios) ng/ml</p>
<p align="center">13,20 13,40 12,50 12,75 13,60 13,00 12,00 12,75 13,60 12,25 12,25 12,00 13,60 12,40 12,25 14,00 12,25 13,20 13,20 13,10</p>	<p align="center">13,40 13,20 11,00 13,00 12,50 12,75 11,75 13,75 12,25 12,50 13,60 13,40 13,00 14,00 12,00 13,20 12,40 13,10 13,75 12,00</p>
<p align="center">X = 12,85 s = 0,602 c.v. = 4,6% I.C. = 12,85 ± 1,25</p>	<p align="center">X = 12,82 s = 0,772 c.v. = 6% I.C. = 12,82 ± 1,61</p>

Resultados numéricos individuais de 40 amostras de um mesmo plasma, ensaiados em condições habituais (inter-ensaio) e condições ideais de trabalho (intra-ensaio). Calculou-se a média, o desvio-padrão, o coeficiente de variação e o intervalo de confiança desses resultados.

Tabela IX

**PROVAS DE RECUPERAÇÃO ADICIONANDO QUANTIDADES CRESCENTES  
DE PLASMA A UMA SOLUÇÃO COM CONCENTRAÇÃO  
DE HCH CONSTANTE E CONHECIDA**

TUBOS	CONCENTRAÇÃO DE C (50 $\mu$ l) ng/ml	RESULTADOS			
		VALOR TEÓRICO ng/ml	VALOR OBTIDO ng/ml	VALOR OBTIDO CALCULADO (Obt - C) ng/ml	RECUPERAÇÃO PORCENTUAL
1	6,25	4,95	9,75	3,50	70,70
2	6,25	4,95	10,25	4,00	80,80
3	6,25	9,90	16,10	9,85	99,50
4	6,25	9,90	16,50	10,25	103,53
5	6,25	14,85	20,00	13,75	92,60
6	6,25	14,85	19,00	12,75	85,85
7	6,25	18,80	25,25	19,00	95,95
8	6,25	18,80	22,80	16,55	83,60
9	6,25	24,75	28,20	22,00	88,90
10	6,25	24,75	30,00	23,75	95,95

Os resultados das provas de recuperação em diferentes quantidades de plasma dosado, mostraram valores percentuais que variaram de 70,7 a 103,5%. O coeficiente de correlação ( $r$ ) entre os valores teóricos e obtidos foi de 0,989. ( $\alpha = 0,05$ ).

## DISCUSSÃO

Para que atingíssemos os objetivos da presente investigação tivemos que trabalhar com os seguintes elementos: um hormônio marcado com radioisótopo, o anticorpo específico anti-hormônio, uma técnica adequada que permitisse a separação do complexo hormônio marcado-anticorpo, do hormônio que não se ligou ao antisoro pela saturação dos sítios de união, e ainda, submeter os resultados a um tratamento estatístico para a verificação das condições e graus de especificidade, sensibilidade, precisão e exatidão do método empregado.

Tendo em vista que o hormônio padrão e o anticorpo correspondente foram fornecidos pela National Pituitary Agency (USA), um dos aspectos mais importantes da experiência foi a preparação do hormônio marcado, cujas observações passaremos a registrar.

A radioiodação pelo método da oxidação pela cloramina T de Hunter e Greenwood<sup>15</sup> tem sido o de emprego mais corrente para a substituição do iodo na molécula protéica. Assim, empregamos para as marcações do HCH com <sup>125</sup>I o referido método, com modificações introduzidas por Berson e Yalow<sup>15</sup>. O metabissulfito de sódio é utilizado nesse processo para a redução do iodo oxidado que não tenha sido substituído no hormônio.

Uma característica deste processo é a reação realizada em um pequeno volume com reagentes a uma concentração relativamente alta. O procedimento, em nosso caso, foi bastante simplificado pelo uso de micropipetas descartáveis que, utilizadas para adicionar, misturar e transferir reagentes, permitiu uma mais rápida e simples execução. Como decorrência, pudemos obter valores do rendimento bastante altos, conforme foi demonstrado na Tabela I, indicativa das marcações do HCH com <sup>125</sup>I.

Dentre os vários agentes marcadores disponíveis, nossa escolha recaiu sobre o <sup>125</sup>I para a marcação do HCH, em vista das seguintes razões:

- fácil obtenção desse material, com ótimas características para a técnica do radioimunoensaio (isótopo livre de carreador);
- bom índice de sensibilidade na detecção desse radioisótopo, no contador de poço ligado a espectrômetro para raios gama.

Papel importante desempenhou ainda em nossa escolha o decaimento lento do <sup>125</sup>I ( $t_{1/2} = 60$  dias) que, permitindo contagens de amostras por tempo mais prolongado, pareceu-nos o agente mais apropriado para as nossas contingências experimentais, visto que a preparação do hormônio marcado, a montagem do ensaio, o indispensável período de incubação e a conclusão de contagem das amostras, geralmente em grande número, são operações que se estendem por um espaço de tempo razoavelmente prolongado e que só podem ser realizados, logicamente, após o recebimento do isótopo no laboratório.

Para a marcação do hormônio propriamente dito, levamos em consideração que o HCH contém 8 resíduos tirosil por PM 21.000 e que cada um desses resíduos pode aceitar 2 átomos substituídos de iodo. Como o hormônio excessivamente iodado não pode reter toda a reatividade imunoquímica, foi calculada uma atividade específica (a.e.) para uma média de um átomo de I/molécula de HCH, o que é obtido quando a a.e. é de aproximadamente 115 mCi/mg<sup>16</sup>.

Terminada a adição dos reagentes, o hormônio assim marcado foi acrescido de plasma humano para que, pelo seu conteúdo protéico, fosse prevenida sua adsorção ao tubo de iodação.

O curto período de contacto do hormônio com o vidro, nos momentos que precedem sua introdução no sistema de purificação, tiveram também um papel auxiliar na limitação dessa adsorção.

O controle da eficiência da marcação foi possível através de duas técnicas que exploram a adsorção do  $\text{HCH-}^{125}\text{I}$  íntegro: o carvão recoberto com plasma<sup>7</sup> e cromatoeletroforese em papel<sup>1</sup>. Assim, no primeiro caso, a partir da atividade do adsorvente, deduzimos a quantidade percentual do hormônio puro existente na amostra. Com isto, asseguramos o uso de  $\text{HCH-}^{125}\text{I}$  com pureza superior a 90%.

No procedimento cromatoeletroforético é mostrado que, quando se semeia a uma fita de papel uma alíquota do material marcado (ao qual se junta um pouco de plasma corado), o  $\text{HCH-}^{125}\text{I}$  permanece no local da aplicação (origem) enquanto que a fração hormonal degradada e  $^{125}\text{I}$  livre migram com as proteínas séricas (fig.3).

A purificação do hormônio marcado é um procedimento indispensável realizado com a finalidade de livrá-lo do iodo radioativo não reagente e dos fragmentos hormonais degradados.

O hormônio degradado geralmente se liga ou é carregado juntamente com as proteínas do "plasma azul" acrescentado para servir como indicador da passagem das proteínas através do sistema de purificação, e com isso localizando o preparado iodado que vem logo a seguir.

Em face da importância que tem a obtenção de um hormônio perfeitamente estável e puro, utilizamos dois processos para a purificação do material experimental: eletroforese em gel de amido<sup>18,19</sup> e filtração em gel Sephadex G-75<sup>15,19</sup>.

A eletroforese em gel de amido, de comprovada eficiência, quer como método analítico, quer como técnica preparativa, foi por nós empregada por permitir a elucidação de certas características do hormônio que outros métodos de purificação não permitem observar, pois possibilita a seleção dos componentes hormonais marcados com diferentes números de átomos de iodo por molécula. Pela eluição do hormônio marcado das diferentes secções do gel, pudemos discernir as frações mais lentas das mais rápidas. Como se sabe, os componentes mais iodados caminham mais rapidamente para o ânodo podendo ser facilmente excluídos, pois exibem uma imunorreatividade reduzida e apresentam-se menos estáveis durante o desenvolvimento do ensaio.

Embora manchas individuais não sejam claramente separadas na autorradiografia do hormônio marcado purificado por gel de amido, presumivelmente aquela mais próxima ao cátodo, ou seja, da fenda da aplicação do hormônio, contém resíduos predominantemente monoiodotirosil; a mancha próxima do ânodo, presumivelmente, corresponde ao HCH iodado com resíduos diiodotirosil ou mais intensamente iodadas<sup>17</sup>. De acordo com Yalow e Berson<sup>20</sup>, a níveis muito baixos de iodação do HCH (por exemplo, 0,05 átomos de I/mol) quase todo o iodo está localizado na primeira mancha (mais próxima ao cátodo). Entretanto, para uma média de 1 átomo de I/mol, o ideal para o nosso caso, mais do que a metade do radioiodo está presente nas outras manchas. Deste modo, quando se faz a seleção do hormônio marcado a

partir da eletroforese em gel de amido, é aconselhável não escolher as regiões mais próximas ao ânodo e ao cátodo, pois as frações mais lentas incluirão moléculas de HCH não marcadas, resultando um produto com atividade específica menor do que a desejada, e as mais rápidas, moléculas mais intensamente iodadas, ainda que estas sejam de atividade específica alta, porém de menor imunoreatividade. O ideal será, portanto, o segmento imediatamente à frente da mancha mais lenta (que chamamos de "b" na Tabela III), onde presumivelmente teremos hormônio marcado com um átomo de I/mol, condição requerida para uma boa sensibilidade do ensaio.

A segunda técnica de purificação — filtração em gel Sephadex G-75 — permitiu a separação do hormônio íntegro dos componentes degradados e do I livre. O Sephadex G-75 é ideal quando se considera sua eficiência na filtração de moléculas de proporções semelhantes às do HCH e a boa resolução que dá na separação dos 3 elementos que se formam após a iodação (fig.5). Seu ponto fraco, no entanto, é não permitir a seleção de moléculas de HCH mais ou menos iodadas. Por esta razão foi por nós adotada a técnica acima descrita, em fase anterior à filtração no Sephadex. De qualquer modo, a utilização deste gel foi indispensável para que obtivéssemos uma preparação livre de componentes degradados que, na maioria das vezes, são formados no próprio momento da recuperação do HCH-<sup>1,2,5</sup> I do gel de amido.

Com vistas a **seleção de condições ótimas para o ensaio**, antes de sua utilização em qualquer dosagem, o hormônio marcado foi submetido a uma incubação preliminar com o anticorpo a diluições diferentes, para que se observasse qual o título que acusava uma ligação mais adequada. Era escolhida a maior diluição do anticorpo que apresentasse uma relação B/F em torno de 1 (08 a 1,2)<sup>21</sup>, sem grande aumento da porcentagem de degradação do hormônio, durante o período de incubação. Esta razão era geralmente conseguida com o anticorpo diluído a 1:2 x 10<sup>6</sup>, depois de 4-6 dias de incubação conforme está indicado na Tabela IV.

Testes diários foram efetuados para a medida do grau de ligação (B/F) e para a detecção de eventuais componentes degradados no meio, pois que a separação desses componentes não termina com a purificação da preparação iodada, já que o hormônio marcado pode vir a sofrer uma degradação durante a incubação com o anticorpo e/ou plasma. Parte da "degradação de incubação" é devido a ação de enzimas plasmáticas e outros fatores que estão, de alguma maneira, sob o controle do experimentador. Entretanto, alguma degradação pode ainda ocorrer espontaneamente, como conseqüência da irradiação, da iodação relativamente excessiva e da oxidação da proteína<sup>1,7</sup>.

Em nosso caso, o controle da presença desses produtos de degradação e a avaliação da quantidade do complexo formado ("bound"-B) e do hormônio livre ("free"-F) foi possível através da técnica de adsorção do carvão recoberto com plasma humano. A rápida adsorção do hormônio livre (ou HCH-<sup>1,2,5</sup> I íntegro) a esse adsorvente<sup>2,2</sup> foi o principal fator para a sua escolha como agente separador nesta técnica radioimunológica.

Ponderamos para nossa escolha algumas razões, tais como a possibilidade de trabalhar-se com grandes volumes de incubação (permitindo uma concentração menor do traçador), a facilidade para a obtenção do carvão assim como a rápida adsorção do hormônio livre a esse produto.

As propriedades adsorptivas do carvão são bem conhecidas e tem sido largamente

exploradas<sup>2,3</sup>. Porém, sua não-seletividade na adsorção de diferentes substâncias impediu sua utilização na separação de elementos que se encontrassem numa mesma solução. Recentemente, no entanto, foi descoberto que o carvão, ou outros adsorventes, quando recoberto com plasma animal, — o humano inclusive — passa a adsorver apenas moléculas de configuração e tamanho molecular menores do que aqueles do material de cobertura<sup>2,4</sup>. Por extensão, supôs-se que o carvão assim preparado poderia ser usado também para a separação de dois agentes que diferissem significativamente um do outro, em configuração e peso molecular. Tais diferenças parecem ocorrer entre o PM de hormônios livres e PM dos mesmos, quando complexados com um anticorpo.

Após estudos em que o carvão era utilizado como agente separador, verificou-se que uma de suas vantagens era a separação quase instantânea que sua presença determinava<sup>7</sup>. Em apenas alguns segundos o hormônio livre era adsorvido pelo carvão e rejeitado o hormônio ligado. Bastava, pois, em seguida removê-lo da solução (por centrifugação) para obter-se a separação do hormônio livre.

Em nosso experimento, em que utilizamos como adsorvente o carvão recoberto com plasma, empregamos volumes de incubação preparados em uma diluição de 1:25 do plasma, para um volume total de 2,5 ml, o que permitiu uma baixa concentração do traçador e uma sensibilidade satisfatória a baixas concentrações do HCH, que é o caso do plasma humano.

Além disso, o volume total de 2,5 ml foi determinado para que se prevenisse a perda de uma porcentagem significativa do sobrenadante ao sedimento do carvão. O traçador livre, uma vez adsorvido ao carvão, torna-se de difícil eluição, permanecendo no sobrenadante apenas o hormônio ligado.

No que diz respeito ao ensaio propriamente dito, cumpre destacar o que nos parece ser seu principal mérito, ou seja, que a técnica do radioensaio apresenta uma sensibilidade tal a ponto de termos podido trabalhar com altos índices de diluição. Com efeito, operamos com uma diluição de 1:25 e  $1:2 \times 10^5$ , respectivamente, do plasma dosado e do anticorpo específico, o que já por si, demonstra o alto valor do método.

Cumpre ainda ressaltar os baixos níveis de degradação observados, surpreendentes sobretudo se levarmos em conta o longo período de incubação, de até 144 horas. As Tabelas IV e VI esclarecem melhor nossas afirmações. Em todas as experiências, este nível de degradação do hormônio marcado foi avaliado pelos tubos de controle, para que uma correção conveniente pudesse ser feita nos demais tubos em que a concentração do HCH era determinada.

Através dos elementos que utilizamos para a análise crítica da técnica utilizada, foi verificado um comportamento satisfatório para o requisito da especificidade: conforme a Tabela VII, as concentrações do hormônio plasmático medido a diferentes diluições, forneceram o mesmo valor do plasma não diluído.

Cuidados foram tomados para manter a mesma concentração salina, pH e força iônica em todas as diluições, pois foi estudado por Yalow e Berson<sup>1</sup> que, exceto para tampão e concentração de sal, não se observou nenhum outro fator plasmático não específico, que influenciasse a reação.

Como mostra a Figura 6, as concentrações do HCH medidas caíram progressivamente com o fator de diluição. Se tal não acontecesse, o fator imunorreativo do plasma não estaria se comportando identicamente ao hormônio padrão, frustrando então um dos pré-requisitos indispensáveis para o radioensaio.

Resta ainda discutir os importantes aspectos da sensibilidade, precisão e exatidão do método, aspectos esses que, se presentes, definirão indiscutivelmente sua aplicabilidade na determinação do HCH.

A sensibilidade, assim como a precisão, é máxima sempre que a eficiência de contagem e atividade específica do hormônio marcado for também máxima, desde que a imunoreatividade do hormônio não esteja alterada por uma iodação excessiva.

O fator mais importante para a obtenção de bons índices de sensibilidade, de acordo com Yalow e Berson<sup>2,5</sup>, é a qualidade do antisoro e quanto mais elevado for o número de animais imunizados, maior será a probabilidade de obter-se um antisoro altamente sensível. A diluição de  $1:2 \times 10^6$  empregada na maioria das dosagens efetuadas mostra a alta qualidade do antisoro utilizado.

Outro aspecto ligado à sensibilidade do método reflete-se essencialmente na inclinação do trecho inicial da curva-padrão<sup>2,5</sup>. Podemos verificar que quanto maior esta inclinação, maior será o  $\Delta B/F$ , e maior será a capacidade de discriminar pequenos valores de massa de HCH, e assim, mais sensível o ensaio.

Com o anticorpo suficientemente diluído para dar uma relação B/F entre 0,8 a 1,2, na presença de uma pequena quantidade de traçador (1000 cpm/ml), obtivemos curvas-padrão que mostraram uma boa inclinação na região das menores massas de HCH (figs. 2 e 6).

Em resumo, a sensibilidade é tanto maior quando a concentração do hormônio medido se aproximar de zero, o antisoro é diluído suficientemente, e a concentração do hormônio traçador é infinitamente pequena.

A análise da reprodutibilidade de 40 determinações efetuadas em um plasma armazenado a 15°C, propiciou a ponderação da precisão da técnica estudada (Tab. VIII). De acordo com o critério proposto por Melo<sup>1,3</sup>, verificamos que os coeficientes de variação permitiram classificar a precisão do método em dois níveis:

- a) Excelente — para a reprodutibilidade intra-ensaio, quando o coeficiente de variação é menor que 5%; no nosso caso, obtivemos 4,6%.
- b) Boa — para a reprodutibilidade inter-ensaio, quando o coeficiente de variação está entre 5 e 10%; para tal situação nosso valor foi de 6%.

A oscilação crítica das dosagens na mistura utilizada foi de 11,22 a 14,44 ng/ml.

De acordo ainda com Melo<sup>1,3</sup>, considerou-se três os níveis de recuperação, como teste do parâmetro da exatidão:

- a) Excelente, para  $r = 0,98$  ou mais;
- b) Boa, para  $r = 0,941-0,98$ ;
- c) Adequada, para  $r = 0,871-0,94$ .

Assim, também para o parâmetro da recuperação obtivemos resultados excelentes, pelo alto valor do coeficiente de correlação ( $r = 0,989$ ) entre os valores teóricos e obtidos, mostrados na Tab. IX.

Portanto, a análise estatística da metodologia demonstrou sua especificidade, excelente recuperação e precisão, utilizando critérios empregados usualmente em bioquímica.

A validade da técnica permitiu nítida discriminação das concentrações de HCH no plasma de indivíduos com níveis baixos e elevados do hormônio.

### Summary

The several steps for the radioimmunoassay of human growth hormone (HGH) in the plasma were standardized:

- a) Labelling of HGH standard with  $^{125}\text{I}$ ;
- b) Purification of the labelled hormone by starch gel electrophoresis and Sephadex G-75 column;
- c) Immunoreactivity test of the labelled preparation (incubation with the specific antibody);
- d) Separation of the free hormone (F) from the antibody bound hormone (B).

It was shown that activated charcoal coated with human plasma is a reliable and simple agent for the separation of F and B.

Statistical analysis indicated that the method has specificity, excellent precision and accuracy allowing clear discrimination between HGH concentrations in the low and high ranges.

### Résumé

Le quantification de l'hormone de croissance (HGH) plasmatique humaine a été réalisé en employant la méthode de dosage radio-immunologique et en utilisant les phases suivantes:

- a) Marquage de l'hormone par le  $^{125}\text{I}$ ;
- b) Purification de l'hormone marquée sur électrophorèse de gel d'amidon et gel filtration sur Sephadex G-75;
- c) Comportement immunologique de la préparation marquée en présence de l'antisérum anti-HGH;
- d) Séparation de l'hormone libre (F) de l'hormone liée aux anticorps (B).

On a démontré que le charbon avec couverture plasmatique est un agent excellent et simple pour la séparation de B et F.

Le traitement statistique des résultats obtenus a indiqué la spécificité, l'excellent précision et l'exactitude de la technique qui permet une information cliniquement valable de la quantité de HGH.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. YALOW, R.S., BERSON, S.A. — Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J.Clin. Invest.*, 39:1157, 1960.
2. BERSON, S.A., YALOW, R.S. — Principles of immunoassay of peptide hormones in plasma. In: *Clinical Endocrinology*, Astwood, E.B. & Cassady, C.E.. Grune & Straton. New York and London, 2, p.699, 1968.
3. YALOW, R.S., BERSON, S.A. — General Principles of Radioimmunoassay. In: *Radioisotopes in medicine in vitro studies*, A.I.E.A., p.7, 1968.
4. LAZARUS, L., YOUNG, J.D. — Radioimmunoassay of HGH using ion exchange resin. *J.Clin. Endocr.Metab.*, 26:213, 1966.
5. ROSSELIN, G., ASSAN, R., YALOW, R.S., BERSON, S.A. — Separation of antibody-bound and unbound peptide hormones labeled with iodine-131 by talcum powder and precipitated silica. *Nature*, 212:355, 1966.
6. HERBERT, V., LAU, K.S., GOTTLIEB, C.S., BLEICHER, S.J. — Coated charcoal immunoassay of insulin. *J.Clin.Endocr.Metab.*, 25:1375, 1965.
7. HERBERT, V. — Coated charcoal separation of free labeled hormone from hormone bound to antibody. In: *Protein and Polypeptide Hormones*, M.Margoulies, Excerpta Medica Foundation, Amsterdam, 161, p.55, 1969.
8. GRODSKY, G.M., FORSHAM, P.H. — An immunochemical assay of total extractable insulin in man. *J.Clin. Invest.*, 39:1070, 1960.
9. MORGAN, C.R., LAZAROW, A. — Immunoassay of insulin: two antibody system: plasma insulin levels of normal, subdiabetic and diabetic rats. *Diabetes*, 12:115, 1963.
10. CATT, K.J., TREAGER, G.W. — Solid phase radioimmunoassay of HGH. *Nature*, 213:825, 1967.
11. HABER, E., PAGE, L.B., RICHARDS, F.F. — Radioimmunoassay employing gel filtration. *Analyt. Biochem.*, 12:163, 1965.
12. YALOW, R.S., BERSON, S.A. — Special problems in the radioimmunoassay of small peptides. In: *Protein and Polypeptide Hormones*, M.Margoulies, Excerpta Medica Foundation, Amsterdam, 161, p.71, 1969.
13. MELO, E.L. — Padronização laboratorial dos Lípidos Séricos, em especial em adultos normais, Goiânia, 1970 (Tese de doutoramento).
14. SMITHIES, O. — An improved procedure for starch gel electrophoresis: further variation in the serum proteins of normal individuals. *Biochem.J.*, 71:585, 1959.
15. HUNTER, W.M., GREENWOOD, F.C. — Preparation of iodine <sup>131</sup>I labeled human GH of high specific activity. *Nature*, 194:495, 1962.
16. YALOW, R.S., BERSON, S.A. — Radioimmunoassay of human growth hormone in plasma. In: *Growth Hormone*, Pecile, A. and Muller, E.E., Excerpta Medica Foundation, Amsterdam, 158, p.60, 1968.
17. YALOW, R.S., BERSON, S.A. — Topics of radioimmunoassay of peptide hormones. In: *Protein and Polypeptide Hormones*, M.Margoulies, Excerpta Medica Foundation, Amsterdam, 161, p.36, 1969.
18. GLICK, S.M., ROTH, J., YALOW, R.S., BERSON, S.A. — Immunoassay of growth hormone in plasma. *Nature*, 199:784, 1963.
19. YALOW, R.S., BERSON, S.A. — Radioimmunoassay-General. No prelo.
20. YALOW, R.S., BERSON, S.A. — Labeling of Proteins, Problems and Practices. *Trans. N.Y.Acad. Sci.*, 28:1033, 1966.
21. YALOW, R.S. — Informação pessoal, 1970.

22. PALMERI, G.M.A., YALOW, R.S., BERSON, S.A. — Adsorbent techniques for the separation of antibody-bound from the free hormone in radioimmunoassay. A ser publicado.
23. HASSLER, J.W. — Activated carbon. Chemical Publishing Co, Inc. New York. Revised Edition, 1963.
24. GOTTLIEB, C.W., LAU, K.S. WASSERMAN, L.R., HERBERT, V. — Rapid charcoal assay for intrinsic factor (IF), gastric juice insaturated B<sub>12</sub> binding capacity, antibody to IF, and serum insaturated B<sub>12</sub> binding capacity. Blood, 25:875, 1965.
25. YALOW, R.S., BERSON, S.A. — General aspects of radioimmunoassay procedures In: In vitro procedures with radioisotopes in medicine. A.I.E.A., p.455, 1970.