

# Desenvolvimento do radioimunoensaio para a dosagem da triiodotironina (T<sub>3</sub>) por técnica de fase sólida\*

MARGARIDA MIZUE HAMADA, CARLOS HENRIQUE DE MESQUITA, CONSTÂNCIA PAGANO GONÇALVES DA SILVA

## INTRODUÇÃO

O radioimunoensaio (RIE) é um dos métodos mais utilizados atualmente na rotina de dosagens de substâncias contidas nos fluidos biológicos. Provavelmente mais de 100 mil dosagens são realizadas mensalmente no Brasil fazendo-se uso do RIE. Sua aplicação estende-se pela medicina humana e veterinária, principalmente nos campos da Endocrinologia, Cancerologia, Toxicologia, Gastrenterologia, Bacterologia e outros.

Uma metodologia de tão ampla escala deve satisfazer os critérios seguintes:

1. Praticabilidade (simplicidade, rapidez).
2. Confiabilidade (precisão, exatidão, especificidade, sensibilidade).
3. Economia (custo/benefício).

Encontram-se na literatura diversas propostas técnicas<sup>(2, 7, 10)</sup> que procuram satisfazer esses itens e dentre elas a técnica denominada de "fase sólida" destaca-se como a mais eficiente<sup>(2)</sup>. Em nosso meio, lamentavelmente, a maior parcela do consumo de reagentes do RIE (*kits*) que usam a fase sólida é ainda de procedência importada. Essa importação é, até agora, justificada pelas dificuldades tecnológicas na obtenção e fixação do anti-soro na matriz de fase sólida (tubo de plástico, esfera de plástico etc.).

O propósito deste trabalho é desenvolver uma técnica de fase sólida em nosso meio e para isto selecionou-se o RIE para a dosagem do T<sub>3</sub> (triiodotironina) como modelo, pois é um radioimunoensaio típico e um dos hormônios de maior solicitação clínica.

## MATERIAIS E MÉTODOS

O anti-soro anti-T<sub>3</sub> foi obtido em coelho mediante múltiplas injeções intradérmicas dorsais do imunógeno, em cerca de 50 sítios, com reinjeções espaçadas no tempo em intervalos de 15 dias. Devido ao baixo peso molecular do T<sub>3</sub> e por não ser imunogênico na sua forma natural<sup>(3)</sup>, o imunógeno foi preparado conjugando-se

T<sub>3</sub> com soro albumina bovina (SAB), utilizando-se a reação com carbodiimida<sup>(1)</sup>.

Na injeção da primeira dose o complexo imunogênico (T<sub>3</sub>-SAB) foi misturado em coadjuvante de Freund (Difco) completo (com BCG) e nas doses de reforço subsequentes misturou-se o imunógeno em adjuvante de Freund incompleto (sem BCG). Após 10 dias da terceira dose de reforço, aproximadamente 55 dias do início da imunização, retiraram-se cerca de 10ml de sangue de cada animal. O sangue foi mantido por duas horas em banho-maria a 37°C e a seguir foi centrifugado a 1.000G. O sobrenadante (soro) foi separado e isolaram-se suas imunoglobulinas por precipitação com sulfato de amônia. As amostragens de sangue foram repetidas após oito a 10 dias de cada dose de reforço. Selecionou-se para uso nos experimentos deste trabalho o anti-soro que apresentou as melhores características, que foram:

1. Constante de afinidade  $K = 0,92 \times 10^{10}$  / mol.
2. Concentração molar aparente no tubo igual a  $0,42 \times 10^{-9}$  mol/l.
3. Especificidade avaliada pelo índice de reatividade cruzada com os seguintes valores: (T<sub>3</sub>--> 100%), (T<sub>4</sub>--> 0,05%), (rT<sub>3</sub>--> 0,0008%), (T<sub>2</sub>--> 0,006%), (Tetrac--> 0,004%), (Triac--> 0,02%), (DIT--> 0,0001%) e (MIT--> 0,0001%).

O anti-soro assim obtido apresentou características semelhantes ao anti-soro gentilmente fornecido pelo Dr. Ewaldo M. K. Russo<sup>(9)</sup>, que serviu para os nossos primeiros experimentos.

O traçador radioativo (<sup>125</sup>I-T<sub>3</sub>) foi preparado segundo a técnica da reação com cloramina-T, conforme protocolo de marcação já descrito por Hamada *et al.*<sup>(4, 5)</sup>. A fração cromatográfica contendo o <sup>125</sup>I-T<sub>3</sub> foi diluída em solução de propilenoglicol a 50% e armazenada em temperatura de -20°C. Para fins de ensaio, o <sup>125</sup>I-T<sub>3</sub> foi diluído em tampão veronal 0,05M pH 8,6 com 0,35% de ANS (ácido anilino naftaleno sulfônico, da Sigma Chemical Co.) e 0,01% de timerosol (Eli Lilly do Brasil) em

concentração radioativa de 950Bq/ml (26nCi/ml).

As soluções padrão para definir a curva de dose-resposta (curva padrão do RIE) foram preparadas a partir de 3,5,3'-L-triiodotironina (Sigma Chemical Co.) na concentração inicial de 100ng/ml (solução estoque) em solução de propilenoglicol e soro isento de T<sub>3</sub> (soro *strip, pool* de soro humano pré-tratado com carvão ativado) na proporção de 1:1. A partir desta solução/estoque preparam-se os demais soro de referência da curva padrão nas seguintes concentrações: 0, 25, 50, 100, 250, 500 e 1.000ng/dl, usando-se o soro *strip* como diluente.

A fixação do anti-soro anti-T<sub>3</sub> nos tubos de polipropileno (fase sólida) foi obtida seguindo o protocolo descrito por Kim *et al.*<sup>(7)</sup> com algumas adaptações<sup>(4)</sup>.

Neste procedimento utilizou-se o glutaraldeído diluído a 2% em solução aquosa de NaOH em pH 9,5, depositando 1ml desta solução em cada tubo de ensaio. Após repouso durante 4 horas em temperatura ambiente decantou-se essa solução. Em seguida lavou-se cada tubo por três vezes com tampão veronal 0,025M pH 8,6 para retirar o excesso de glutaraldeído. Nessas operações obtêm-se resíduos polimerizados de glutaraldeído aderidos às paredes do tubo de ensaio. A seguir adicionou-se 1ml de anticorpo diluído em tampão veronal 0,05M pH 8,6 de modo a conseguir ligação de 25% com os 950Bq do traçador radioativo. Com o nosso anti-soro foi necessário diluí-lo a 1/1.000. Os tubos foram incubados durante 24 horas em temperatura de 4°C para efetivar a reação dos resíduos de aldeído do glutaraldeído com grupos amino da molécula do anticorpo. Após estas operações a solução foi decantada e os tubos foram lavados com tampão veronal 0,025M pH 8,6 por três vezes, seguindo-se a incubação por 30 minutos com solução de SAB 0,5% neste mesmo tampão. Repetiu-se o processo de lavagem e levou-se à secura a 4°C para preencher os sítios não recobertos com anticorpo. Os tubos assim preparados foram estocados à tempe-

\* Trabalho realizado no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares — Comissão Nacional de Energia Nuclear (Ipen-Cnen/SP).

Pedidos de separata: Margarida M. Hamada — Cidade Universitária Armando Salles de Oliveira — Travessa R, 400 — Caixa Postal 11.049 — 05508 — São Paulo-SP.

ratura de aproximadamente 4°C (ambiente de geladeira). Deste modo suas propriedades mantiveram-se por um período de pelo menos quatro meses.

Para verificar a qualidade desses tubos de fase sólida realizou-se o RIE seguindo o protocolo abaixo:

1. Aliquotar 100µl dos soros padrões ou amostras nos tubos previamente recobertos com anti-soro.
2. Adicionar 1ml do T<sub>3</sub>-<sup>125</sup>I.
3. Agitar.
4. Incubar por 4 horas à temperatura ambiente.

5. Decantar o sobrenadante.

6. Medir a radioatividade do complexo.

Para fins comparativos realizou-se paralelamente o RIE de T<sub>3</sub> utilizando-se técnicas já tradicionalmente empregadas em nosso laboratório, a saber: técnica do "duplo anticorpo"<sup>(10)</sup> e técnica da "solução PEG"<sup>(8)</sup>.

Os cálculos para a caracterização dos parâmetros da curva padrão, da dose mínima detectável, do perfil de precisão do ensaio, da constante de afinidade e da concentração do anti-soro no tubo de reação (diagrama de Scatchard)<sup>(11)</sup> foram efetu-

dos pelo sistema computacional GARLA<sup>(8)</sup> disponível no Departamento de Processamento de Dados do Ipen-Cnen/SP.

Com a finalidade de avaliar a qualidade do ensaio, em contexto amplo, adotou-se o seguinte critério: formulou-se um parâmetro, aqui denominado de dígito de mérito (*figure of merit, FM*) definido pelo seguinte algoritmo:

$$FM = \frac{DMD \times \text{área do perfil de precisão}}{(DMS - DMD)^2}$$

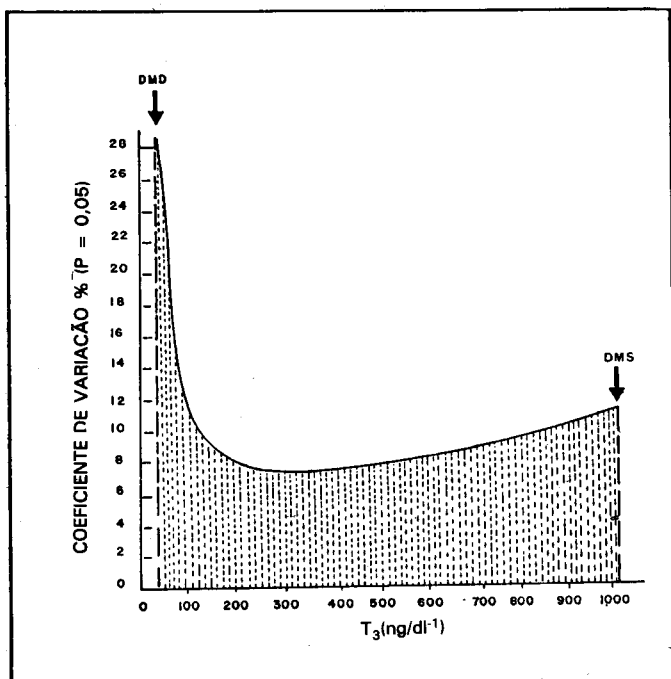


Fig. 1 — Elementos para cálculo do dígito de mérito.

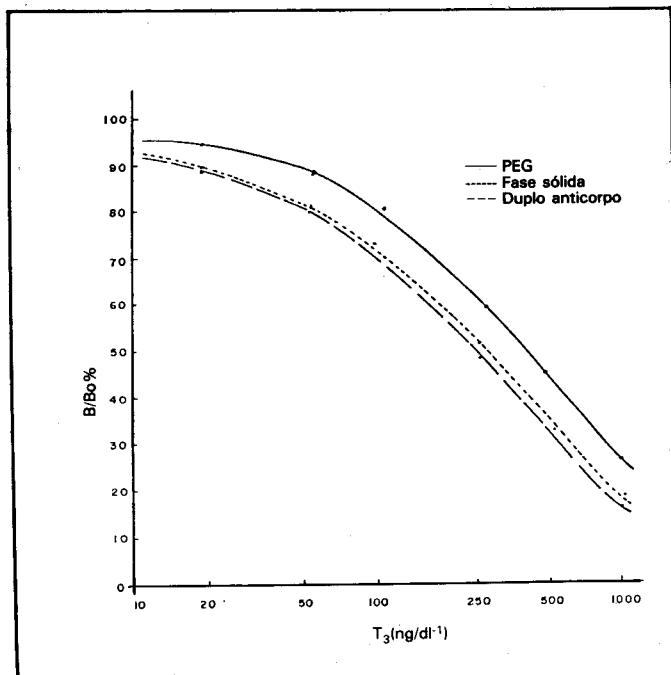


Fig. 2 — Curvas padrão dos RIEs de T<sub>3</sub> realizadas pelas três técnicas de separação da fração ligada da livre.

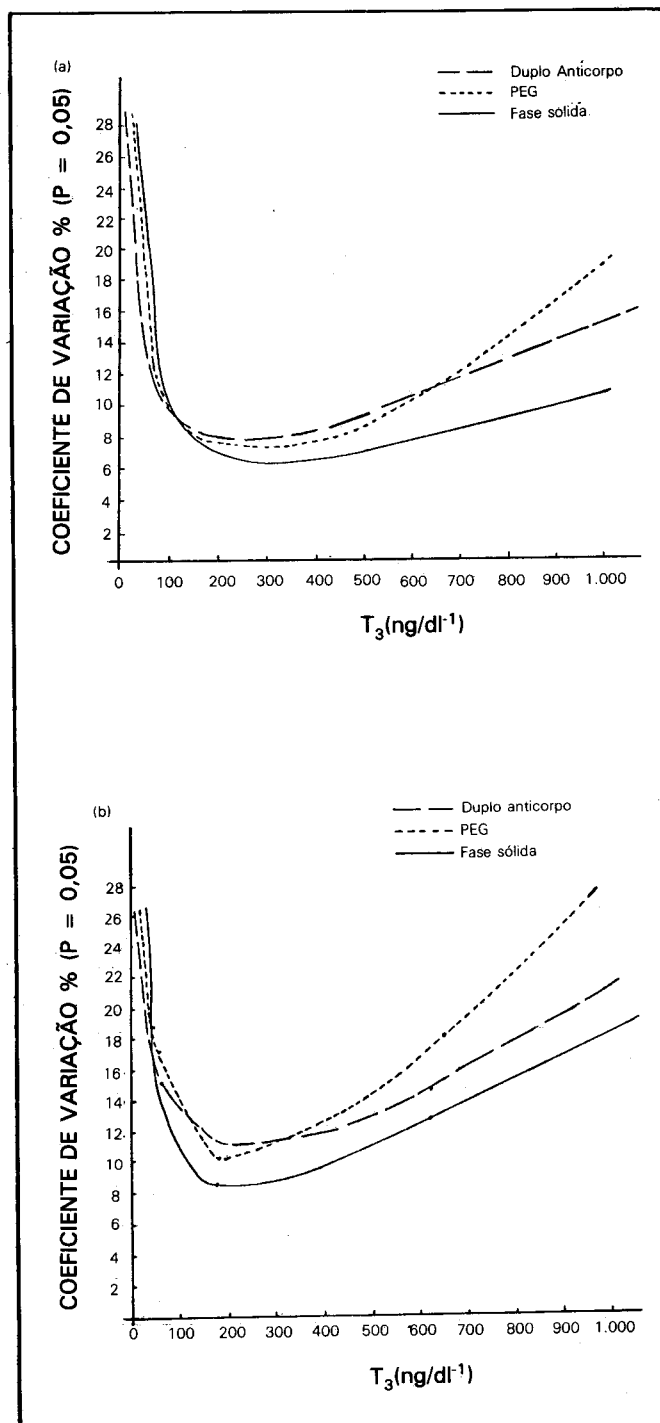


Fig. 3 — Perfil de precisão (a) intra-ensaio e (b) interensaio para cada uma das três técnicas.

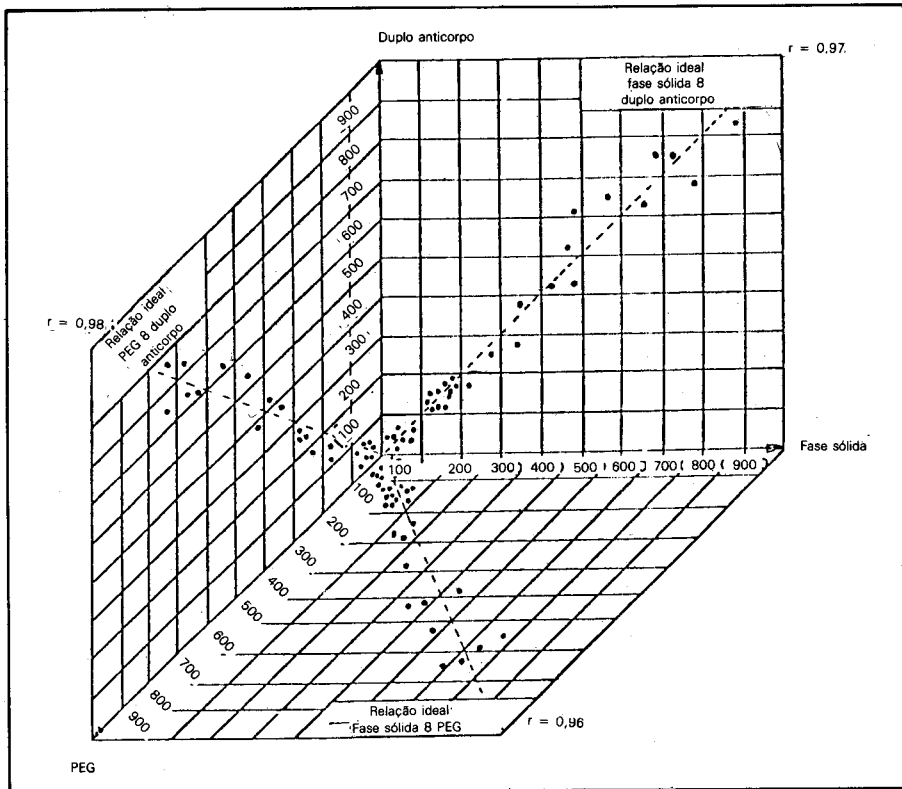


Fig. 4 — Correlação de resultados dos RIEs de  $T_3$  entre as três técnicas.

TABELA 1

Resultados dos valores dos parâmetros a, b, c e d da função de ajuste da curva padrão, i.é,

$$B/T = \frac{a - d}{1 + (X/c)^b} + d$$

e dos valores da dose mínima detectável (DMD)

Ensaio	(a) $B_0/T$ (%)	(d) NSB (%)	(c) X 50% (ng/dl)	(b) Termo exponencial —	DMD (ng/dl)
Fase sólida	24 ± 5	7 ± 2	256 ± 37	0,97 ± 0,22	17 ± 4
Duplo anticorpo	25 ± 4	5 ± 2	220 ± 46	0,93 ± 0,19	14 ± 3
PEG	27 ± 4	10 ± 2	314 ± 43	1,20 ± 0,16	22 ± 4

TABELA 2

Análise conjunta de diferentes parâmetros do ensaio para comparação da qualidade das três técnicas avaliadas

Ensaio	DMD (ng/dl)	Área do perfil de precisão	Dígito de mérito
Fase sólida	17	7.806	0,14
Duplo anticorpo	14	13.098	0,19
PEG	22	8.826	0,20

onde DMD corresponde à dose mínima detectável, a qual é estatisticamente diferenciável da concentração nula, e DMS corresponde à dose máxima significativa, estimada a partir do parâmetro NSB. Esses dois parâmetros foram calculados pelo programa GARLA<sup>(6)</sup>.

A área do perfil de precisão foi calculada por cálculo numérico. A Fig. 1 esquematiza a idéia do dígito de mérito.

Para caracterizar a faixa de normalidade foram dosados 153 soros de indivíduos considerados clinicamente normais. Avaliaram-se também amostras de pacientes considerados clinicamente como hipotireóides (cinco casos) e hipertireóides (oito casos).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Fig. 2 mostram-se as curvas padrão dos RIEs realizados pelas três técnicas: fase sólida, duplo anticorpo e solução PEG, traçadas em escala semi-logarítmica. Os valores dos coeficientes de ajuste de cada uma das curvas (segundo o modelo logístico de quatro parâmetros) encontram-se na Tabela 1.

Nas três técnicas experimentadas foram utilizados os mesmos reagentes básicos, ou seja, soros de referência, anticorpo anti- $T_3$  e  $^{125}I-T_3$  diluídos nas condições apropriadas para cada tipo de ensaio. A análise dos parâmetros mostrados na Tabela 1 sugere

que a técnica da fase sólida apresenta resultados comparáveis com as outras duas técnicas.

Na avaliação isolada de cada parâmetro, a técnica de duplo anticorpo mostrou melhores resultados quanto à ligação inespecífica (parâmetro d), valor de DMD (dose mínima detectável) e X50% (parâmetro c). No entanto, na prática, esses parâmetros estão tão próximos que essas pequenas nuances não são significativas.

A Fig. 3(a) mostra o perfil de precisão intra-ensaio para cada uma das técnicas. Dessa figura conclui-se que a precisão intra-ensaio para a técnica da fase sólida, nos valores compreendidos na faixa de 50 a 900ng/dl, foi inferior a 10%, sendo que a faixa de maior precisão encontra-se no intervalo de 200 a 400ng/dl. A precisão intra-ensaio no intervalo de 50 a 900ng/dl, para as técnicas de duplo anticorpo e solução PEG, variou de 8 a 13% e de 7 a 16%, respectivamente.

Os perfis de precisão interensaios mostrados na Fig. 3(b) acompanharam basicamente essas comparações, com valores mais elevados devido à inclusão de variáveis não controladas, conforme já previsto por Mesquita<sup>(6)</sup>. A dispersão interensaio foi da ordem de 8 a 17% para a técnica da fase sólida, 11 a 20% para a técnica do duplo anticorpo e de 10 a 26% para a técnica da solução PEG, quando apreciadas na faixa de 50 a 950ng/dl de  $T_3$ .

Provavelmente a maior precisão verificada na técnica da fase sólida se deve à extrema simplicidade da técnica, exigindo o mínimo de operações do analista, minimizando assim as dispersões oriundas dos erros experimentais. Na Tabela 2 estão relacionados os valores do dígito de mérito, da dose mínima detectável e da área do perfil de precisão, calculados para cada uma das três técnicas.

Alicerçados nesses resultados conclui-se que a melhor técnica corresponde à fase sólida, seguida pela técnica do duplo anticorpo e finalmente pela técnica da solução PEG, pois, segundo a expressão da fórmula do dígito de mérito, quanto menor o seu valor melhor a qualidade do ensaio. Avaliando-se o ensaio pelo enfoque da dose mínima detectável (DMD) conclui-se que a técnica do duplo anticorpo pode satisfazer melhor os resultados de pacientes hipotireóides. No entanto, os três sistemas de separação mostraram-se adequados para a quantificação dos níveis séricos de  $T_3$ .

A exatidão da técnica da fase sólida foi avaliada por comparação entre os resultados de 39 amostras de soro dosadas pelas três técnicas. A Fig. 4 ilustra essa análise comparativa. A linearidade e o alto coeficiente de correlação indicaram que as três técnicas forneceram praticamente os mesmos resultados, comprovando-se a validade da técnica da fase sólida, uma vez que se acredita na exatidão das duas outras técnicas.

Os valores médios e seus desvios padrão avaliados em diferentes populações, i.é, normais, hipotireóides e hipertireóides, foram respectivamente  $145 \pm 27$ ,  $45 \pm 24$  e  $500 \pm 197$ ng/dl. Adotando-se a hipótese de que a população de indivíduos normais obedeça uma distribuição normal (gaussiana), estabeleceu-se o intervalo nu-

mérico de normalidade ao nível estatístico de  $p = 0,05$  como sendo de 90 a 200ng/dl, com valor médio e desvio padrão de  $145 \pm 27$ ng/dl.

Quanto aos aspectos econômicos envolvidos na técnica de fase sólida, devemos considerar que o seu custo poderá ser impróprio para uma rotina de pequena escala. Devemos levar em conta que para cada dosagem será necessário o preparo de pelo menos dois tubos de ensaio descartáveis de polipropileno<sup>(9)</sup>. Por outro lado, nossa experiência mostrou que na técnica de fase sólida foi necessário dispendir de maior quantidade de anti-soro, aproximadamente 10 vezes daquela quantidade utilizada normalmente nas técnicas de fase líquida e ainda, no preparo dos tubos de fase sólida o anti-soro deve ser de melhor qualidade e de maior título. O mesmo anti-soro, quando usado nas técnicas de fase líquida, deve apresentar uma diluição ao nível de pelo menos 1/10.000 para os hormônios de baixo peso molecular, como é o caso do  $T_3$ , conforme Parsons<sup>(9)</sup>. Anticorpos do tipo monoclonal<sup>(6)</sup> provavelmente seriam mais indicados na preparação dos tubos de fase sólida.

Concluindo, o custo do anti-soro utilizado na técnica da fase sólida é mais oneroso. No entanto, em escala industrial, no preparo de kits que serão usados por diferentes laboratórios, a técnica de fase sólida é mais recomendável, pois garante ao fabricante o seu uso mais adequado, simples e conseqüentemente menos sujeito a erros.

## RESUMO

Desenvolveu-se um sistema de radioimunoensaio (RIE) do hormônio  $T_3$  pela técnica de fase sólida, imobilizando-se anticorpo anti- $T_3$  em tubos de polipropileno pré-recobertos com glutaraldeído polimerizado em meio alcalino.

Avaliou-se a qualidade dos tubos recobertos pelo desempenho metodológico no RIE, analisando os diversos parâmetros do ensaio, a saber: a dose mínima detectável, a ligação inespecífica (NSB), X50%, a inclinação da curva (slope), a precisão intra e interensaio, exatidão do método e dígito de mérito.

Os intervalos de valores da concentração de  $T_3$  no soro de indivíduos hipotiróideos e hipertiróideos e a faixa de normalidade de  $T_3$  foram determinados para esta técnica, estando de acordo com a literatura.

## SUMMARY

We have developed a solid phase radioimmunoassay (RIA) system for triiodothyronine ( $T_3$ ) by immobilizing triiodothyronine antibodies on the inner wall of reaction tubes. The antibody-coated tubes were made via reaction of antibody with glutaraldehyde residue pre coated on the inner wall of the tubes by alkaline self-polymerization.

The quality of the coated tubes was tested through its performance in the RIA methodology by analysing the following RIA parameters: minimum detectable dose (MDD), non specific binding (NSB), X50%, slope of the standard curve, intra and inter assay precision, accuracy of the method and figure of merit.

The serum levels of  $T_3$  in hypothyroid and hyperthyroid patients and the normal values range were determined for the solid phase RIA system. The results are in agreement with those found in the literature.

## REFERÊNCIAS

1. BAUMINGER, S. & WILCHEK, M. — The use of carbodiimides in the preparation of immunizing conjugates. *Methods Enzymol.*, 70:151-9, 1980.
2. BENEDETTO, S.; DAVID, F. *et al.* — Preparation of coated tubes for aldosterone radioimmunoassay (RIA): aspects related to IgG surface density. In: International Atomic Energy Agency — *Radioimmunoassay and related procedures in medicine: proceedings of a symposium held in Vienna, June 21-25, 1982*. Vienna, 1982. p.105-10.
3. CHOPRA, I.J. — Concentration of triiodothyronines ( $T_3$  and reverse  $T_3$ ) in serum and other body fluids. In: Chopra, I.J. (ed.) — *Triiodothyronines in health and disease*. Berlin, Springer, 1981. p.58-94.
4. HAMADA, M.M. — *Radioimunoensaio do hormônio triiodotironina ( $T_3$ ) no soro. Desenvolvimento de uma técnica de fase sólida e comparação com duas técnicas de fase líquida: polietilenoglicol (PEG) e duplo anticorpo*. São Paulo, 1986 (dissertação de mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares).
5. HAMADA, M.M.; MESQUITA, C.H. & SILVA, C.P.G. — Preparation, purification and stability of specific activity  $^{125}$ I-triiodothyronine ( $T_3$ ). In: Associação Brasileira de Energia Nuclear — *Anais do I Congresso Geral de Energia Nuclear, realizado no Rio de Janeiro, março, 1986*. Rio de Janeiro, 1986.
6. HEYNINGEN, V.; BROCK, D.J.H. & BARRON, L. — Monoclonal antibodies suitable for immunoassays. In: Hunter, W.M. & Corrie, J.E.T. (eds.) — *Immunoassays for clinical chemistry*. 2. ed., Edinburgh, 1983. cap. 11.4, p. 509-15.
7. KIM, J.R.; AWH, O.D. *et al.* — Simple immobilization of  $T_3$  antibodies of some modifications of assay buffer systems. In: International Atomic Energy Agency. *Radioimmunoassay and related procedures in Medicine: proceedings of a symposium held in Vienna, June, 21-25, 1982*. Vienna, 1982. p. 81-93.
8. MESQUITA, C.H. — *Elaboração e avaliação do desempenho de programa computacional destinado ao controle de qualidade de ensaios radioligantes. Aplicação ao radioensaio de insulina*. São Paulo, 1983 (dissertação de mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares).
9. PARSONS, G.H. — Antibody-coated plastic tubes in radioimmunoassay. *Meth. Enzymol.*, 73:224-39, 1981.
10. RUSSO, E.M.K.; VIEIRA, J.G.H. *et al.* — Desenvolvimento e caracterização de métodos de radioimunoensaio para dosagem de iodotironinas ( $T_4$ ,  $T_3$  e r $T_3$ ). *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.*, 26:23-8, 1982.
11. SCATCHARD, G. — The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 51:660-72, 1949.