

MÉTODO DE DOSAGEM DE HORMÔNIOS¹

Introdução

O diagnóstico de desordens endócrinas e o entendimento de como os hormônios são regulados fisiologicamente, fizeram com que vários métodos de dosagens de hormônios fossem desenvolvidos. Antes da década de 60, substâncias presentes em pequenas quantidades no sangue e em outros fluidos, eram extremamente difíceis de serem dosadas. Até então, quimio e bioensaios dessas substâncias, usualmente hormônios, eram realizados, obtendo-se respostas com pouca precisão.

A técnica utilizando anticorpo como ligante (imunoensaio) foi descrito pela primeira vez por Yallow e Berson em 1960. O trabalho de Yallow e Berson começou com os estudos sobre o comportamento do I¹³¹, marcando proteínas *in vivo*. O trabalho consistiu na injeção de insulina marcada e não marcada, verificando que o antígeno não-marcado, por competição, inibia a ligação do antígeno marcado ao anticorpo. Desenvolveram um ensaio para detectar e quantificar a insulina no soro de pacientes utilizando anticorpos antiinsulina, baseando numa nova técnica de ensaios de ligação por competição. Neste mesmo ano (1960), Ekins na Inglaterra, desenvolveu um método similar para a determinação das concentrações da tiroxina no plasma, o qual era também baseado no princípio da ligação competitiva, embora ele empregasse uma proteína carreadora ao invés de anticorpo.

Em 1971, Engvall e Perlmann determinaram quantitativamente a imunoglobulina G através da técnica de enzima imunoensaio.

A partir destes eventos, surgiram várias técnicas na medição de hormônios e outras substâncias presentes em quantidades mínimas nos fluidos corpóreos (drogas, enzimas e hormônios), sendo utilizado amplamente o radioimunoensaio no início, substituído gradativamente por outros métodos imunológicos, como os ensaios que utilizam compostos fluorogênicos, quimiluminogênicos e enzima como marcadores.

¹ Seminário apresentado na disciplina Bioquímica do Tecido Animal (VET00036) do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias pelo mestrando GIOVANNI MATEUS MALLMANN, no primeiro semestre de 2003. Professor da disciplina: Félix H. D. González.

Imunoensaios

Princípios básicos

O princípio do método do imunoensaio baseia-se em uma reação imunológica *in vitro* entre antígeno e anticorpo. Com a introdução do hormônio marcado com isótopo radioativo, este irá competir pelo mesmo anticorpo, em igualdade de condições com o hormônio natural. Praticamente todas as técnicas de imunoensaio utilizam o mesmo princípio básico, onde a quantidade de reagente marcado (antígeno ou anticorpo) quantifica o antígeno ou anticorpo não marcado na amostra. Dependendo da maior ou menor quantidade presente de hormônio, haverá maior disponibilidade de sítios de ligação do anticorpo para se ligar ao antígeno (hormônio) radioativo, dependendo da maior ou menor quantidade do hormônio a ser determinado. O mecanismo clássico do imunoensaio com hormônio ligado é representado na Figura 1.

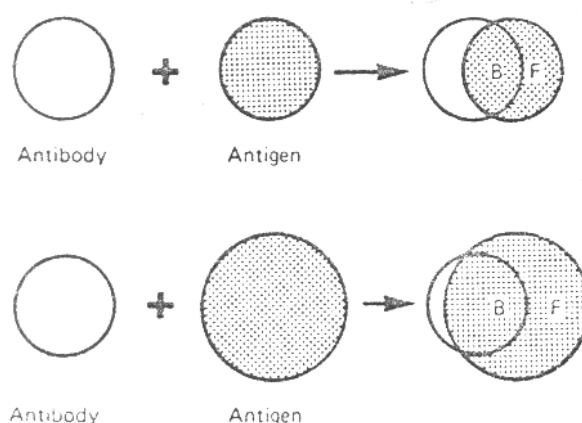
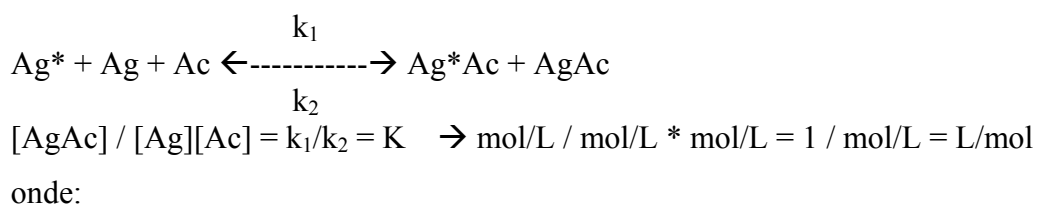


Figura 1: Princípio básico de ligação em imunoensaio.

A Figura 1 mostra a ligação do hormônio com uma quantidade determinada de anticorpo, com diferente quantidade de antígeno. A quantidade de hormônio ligado é diretamente relacionada com a quantidade de hormônio presente e a quantidade de sítios de ligação no anticorpo. Esta é uma reação reversível, onde ocorre a ligação entre hormônio e anticorpo livres formando um complexo hormônio-anticorpo, podendo ser expressa tal reação pela equação abaixo:



Ag = antígeno ou hormônio;

Ag* = antígeno ou hormônio marcado;

Ac = anticorpo do antígeno ou do hormônio;

Ag*Ac e AgAc = complexo hormônio-anticorpo marcado e não-marcado, respectivamente

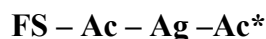
k_1 = taxa constante de associação;

k_2 = taxa constante de dissociação;

A concentração exata com que o equilíbrio é alcançado depende da energia da reação entre o antígeno e o anticorpo. A *lei da ação das massas* descreve o estado de equilíbrio, obtendo-o quando o produto das concentrações dos dois lados da equação permanecer constante.

Os hormônios marcados diferem quanto ao tipo de imunoensaio empregado, podendo ser marcado por radioiodação, enzima, fluorescência ou quimiluminescência. Geralmente os isótopos possuem uma meia vida muito curta, fazendo com que não haja resíduo contaminante para o meio ambiente.

Com o advento de anticorpos monoclonais, foi possível desenvolver diferentes metodologias (*sandwich*). Nesta técnica, o anticorpo monoclonal é absorvido ou ligado quimicamente a uma superfície sólida, como por exemplo, tubo de ensaio ou esferas de poliéster. Hormônios padrões ou amostras de soro são então adicionadas, seguidas pelo anticorpo marcado com uma região específica de ligação para o hormônio em análise. A quantidade de anticorpo marcado com ligações na fase sólida será proporcional à quantidade de hormônio na amostra resultando na formação de um complexo designado *sanduíche*:



onde:

FS – Ac é a fase sólida no qual o anticorpo efetua a ligação,

Ag é o antígeno ou hormônio em análise,

Ac* é o anticorpo marcado.

As vantagens desse tipo de ensaio é que o hormônio não precisa ser isolado para ser marcado e a técnica poderá ser utilizada na marcação de diferentes hormônios. A única limitação é na sensibilidade de detecção do traçador e a na extensão com que o traçador liga-se à parede do tubo. Esteróides simples e peptídeos de pequeno tamanho (com 15 a 20 aminoácidos) não poderão ser utilizados no ensaio. A afinidade na ligação e especificidade da grande, estável, molécula de imunoglobulina bivalente monoespecífica não perturba significativamente a ligação dos traçadores, sejam eles radioativos, enzimáticos, fluorescentes ou quimiluminescentes.

Como base na quantificação, uma curva padrão é desenvolvida com quantidades fixas de hormônio marcado e proteína ligada, incubados juntos na presença de hormônio não marcado em concentração gradual e conhecida.

Existem desvantagens no uso de radioisótopos como marcadores em imunoensaios, tais como, meia vida limitada, instabilidade dos componentes radiomarcados, equipamento de análise relativamente caro, necessidade de mão de obra qualificada e bem treinada, laboratórios especializados e lixo radioativo. Assim, foram desenvolvidos técnicas e ensaios utilizando-se marcadores não radioativos, como enzimas, agentes fluorescentes e quimiluminescentes. Imunoensaios enzimáticos podem ser tão sensíveis e precisos quanto o radioimunoensaio, sendo a especificidade dependente da qualidade do anticorpo utilizado.

A seguir serão detalhados alguns processos importantes na execução dos ensaios de imunoensaio.

Produção de anticorpos

Os anticorpos pertence à classe das imunoglobulinas, predominantemente das gama globulinas (IgG). A molécula de IgG é composta por quatro cadeias polipeptídicas: 2 cadeias pesadas e 2 leves, simetricamente arranjadas e ligadas covalentemente por pontes de dissulfeto. A interação antígeno-anticorpo é uma combinação de ligações eletrostáticas, de hidrogênio, van der Waals e hidrofóbicas. A sequência de aminoácidos da porção ligadora da molécula de IgG determina a forma com que o antígeno irá se ligar, determinando a afinidade e a especificidade. A resposta imune pode ser dividida em primeira e segunda fases. Após a primeira exposição a um determinado imunógeno num período relativamente longo, moléculas de IgM começaram a aparecer no soro.

A segunda exposição ao imunógeno resulta em uma resposta muito mais forte, consistindo principalmente por anticorpos IgG, cuja concentração declina vagarosamente. Os anticorpos produzidos na segunda exposição apresentam uma maior afinidade para o imunógeno. Com repetidas imunizações, a afinidade do anti-soro poderá aumentar. Isto envolve a seleção na produção de imunoglobulina (células B) com alta afinidade pelo imunógeno.

Anticorpos policlonais

O antisoro policlonal contém uma mistura heterogênea de anticorpos, podendo ser somente uma pequena fração específica para os antígenos de interesse.

O anticorpo policlonal é preparado por imunização com substância que se quer determinar a purificação. Repetidas injeções dessa substância vão agir como antígeno em animal de espécie diferente da qual procede, induzindo o aparecimento de anticorpo (policlonais), que são globulinas produzidas pelo sistema imune do animal injetado, que podem ser cavalos, coelhos, ovelhas e cabras (Figura 2).

Pode-se inclusive obter anticorpo para hormônios não protéicos tais como hormônios esteróides e drogas.

Anticorpos monoclonais

Embora os anti-soros tenham sido e continuem sendo uma fonte comum de anticorpos, eles oferecem um suprimento limitado de material. Os antisoros produzidos em diferentes hospedeiros contra o mesmo antígeno não são idênticos na sua composição de anticorpos. Assim, quando um determinado antisoro esgota-se, a sua reposição é difícil de ser efetuada.

Células produtoras de anticorpo são fundidas a mielomas (plasmódios de células cancerosas com intensa capacidade de multiplicação e capacidade de sobreviver *in vitro*), formando um “hibridoma”, que é cultivado *in vitro* (Figura 2). Como é de origem clonal, todas as células de um mieloma produzem e secretam o mesmo anticorpo. As células, que produzem os anticorpos específicos contra o antígeno que interessa ao ensaio, são selecionadas e postas em meio de cultura (cultura de tecidos), produzindo grandes quantidades de anticorpo desejado. A vantagem da produção de anticorpos monoclonais *in vitro* é o controle da concentração do imunógeno e o monitoramento da produção de anticorpos, além do pequeno tempo de imunização (cinco dias). As desvantagens verificadas é o uso de um protocolo complexo envolvendo a adição de fatores de crescimento e a diferenciação e a baixa especificidade dos anticorpos produzidos, isto é, há diferenciação entre a qualidade e propriedade dos anticorpos produzidos entre diferentes mielomas.

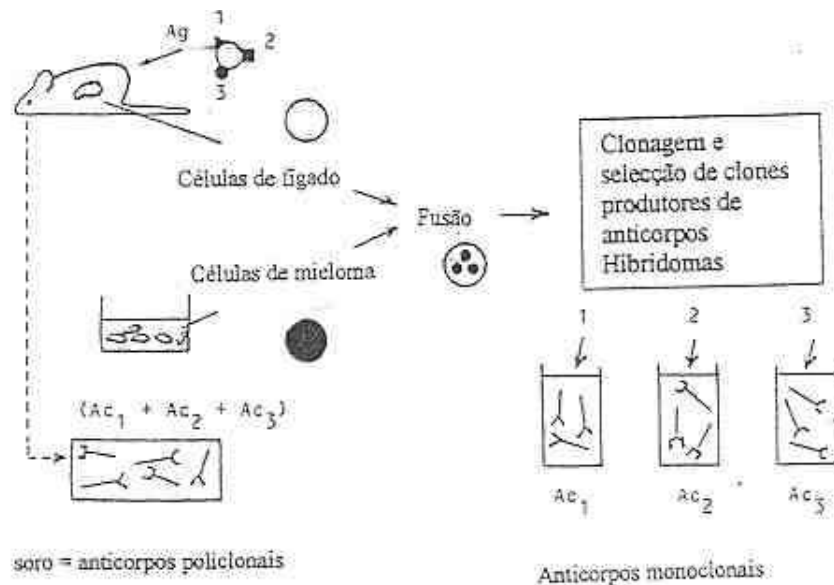


Figura 2: Produção de anticorpos mono e policlonais.

Calcula-se, de modo geral, que apenas um animal entre 50 é capaz de produzir soros convenientes para o imunoensaio. Anticorpos monoclonais apresentam aparentemente uma menor afinidade, porque se ligam a um epítopo ou região simples anticorpo no anticorpo.

As características analisadas são:

- título: critério quantitativo, expressa a máxima diluição final de um antisoro capaz de se ligar à mesma quantidade de antígeno marcado na ausência do antígeno não marcado. Utiliza-se, normalmente, um título capaz de ligar 50% do antígeno marcado;
- avidéz: medida de qualidade de sensibilidade do ensaio. Denota a energia da reação antígeno-anticorpo, e é similar constante de associação das reações imunológicas básicas;
- especificidade: capacidade do anticorpo diferenciar o seu antígeno de outros similares. Constitui um problema no caso dos hormônios hipofisários e dos esteróides, que podem dar reação cruzada.

Marcadores radioativos

Isótopos radioativos

Quase todos os hormônios protéicos e derivados são marcados com o I^{125} , isótopo radioativo do elemento iodo, com meia vida de 59 dias, emissor de radiação gama, sendo muito conveniente tanto para as medidas como para a comercialização, sob forma de kits, para a dosagem de hormônios por radioimunoanálise (RIA). Os

hormônios, com exceção da tireóide (T_3 e T_4), não possuem iodo em sua molécula, mas podem passar a ter sem que haja alteração de suas propriedades químicas e imunológicas. A iodação com o I^{125} , que se faz na razão de 1 átomo por molécula, se realiza por diversos processos, procurando sempre obter hormônios com alta atividade específica, devido a baixa concentração de hormônios existente nos fluidos corpóreos e evitando lesão radioquímica, isto é, danos causados às moléculas hormonais pelos efeitos das radiações ionizantes às ligações moleculares.

Para as aplicações clínicas, o alto custo por tubo de amostra analisada é compensado por seu elevado controle de qualidade.

Processo de iodação

Oxidação do NaI^{125} para a formação de I^{125} através do uso de agentes oxidantes como a cloramina T, é o método mais difundido de marcação radioquímica entre peptídeos e proteínas. Os hormônios peptídicos como as proteínas possuem quase sempre radicais tirosina em sua molécula. A molécula de iodo espontaneamente reage com os resíduos de tiroxina e histidina na superfície das proteínas. A iodação se faz por substituição do átomo de hidrogênio do anel fenólico por um átomo de iodo oxidado. A maior desvantagem desse método é que a cloramina T pode causar prejuízos durante a oxidação, de volatilizando o I^{125} , necessitando um exaustor especial que evite contaminação.

Um método enzimático para a produção de I^{125} reativo envolve o uso de lactoperoxidase e peróxido de hidrogênio. Tal método resulta em um menor prejuízo na oxidação da proteína e maior preservação do potencial imunológico, dependendo da quantidade de peróxido de hidrogênio utilizado. A introdução de mais de um átomo de iodo por polipeptídeo resulta numa mais acentuada degradação da substância radioativa durante a estocagem.

Um método utilizado na marcação do I^{125} envolve a radioiodação do reagente de Bolton-Hunter. Este reage com os grupos amino dos hormônios polipeptídicos.

A iodação com I^{131} é menos freqüente em relação ao I^{125} . A marcação com o I^{125} tem inúmeras vantagens sobre o I^{131} : maior eficiência de contagem, maior abundância de isótopos, meia-vida de 60 dias vs 8 dias, emissões menos energéticas. Para evitar perda de afinidade pelo antígeno, a atividade específica pode não ser tão boa, entretanto, na teoria, esta é uma situação desejável.

Trítio (H^3)

Pequenos antígenos, como os hormônios esteróides, não comportam, na sua estrutura, elementos como o iodo. A incorporação do trítio (H^3) na molécula destes hormônios não provoca nenhuma mudança nas propriedades química ou imunológica, mas necessita uso de contadores de radiação beta, sendo este método de análise mais laborioso que o método utilizado na determinação de I^{125} .

O trítio, isótopo do hidrogênio, tem meia-vida de 12 anos, emissor de radiações beta fraca, sendo necessária a utilização de contadores de cintilação líquida. A marcação de substâncias com esse traçador é pouquíssimo utilizado no radioimunoensaio, sendo mais empregada atualmente na medicina nuclear.

Ensaio imunoradiométrico (IRMA)

É uma técnica alternativa ao radioimunoensaio em que Ac monoespecíficos radiomarcados são utilizados para quantificar o antígeno. No RIA convencional, a quantidade de anticorpo na fase sólida é limitada, sendo um reagente proporcional, e o antígeno fica em excesso na fase sólida. O emprego de anticorpo monoclonais facilita e refina o ensaio, tornando-o útil para a detecção de antígenos protéicos.

No IRMA, que utiliza o sistema de *sanduíche* de dois sítios, o antígeno é capturado pelo anticorpo da fase sólida que reage com o anticorpo marcado. Quanto maior a radioatividade, maior a quantidade de antígeno na amostra. Paralelamente, são ensaiadas diluições seriadas da amostra padrão. Comparado ao radioimunoensaio de competição, o IRMA tem tempos de incubação menores, maior precisão e teoricamente maior sensibilidade.

Os hormônios marcados devem apresentar certas características:

1) identidade química: o hormônio (antígeno) marcado com o isótopo deve-se comportar como um tramador em todas as reações químicas. Os traçadores são elementos isótopos e apresentando similar comportamento químico que o elemento estável, diferindo no núcleo com relação à massa, energia e instabilidade o que, aliás, lhe confere a propriedade de ser radioativo. O isótopo I^{125} (instável) possui as mesmas propriedades químicas que o I^{127} , emitindo radiações detectáveis e mensuráveis por aparelhos adequados. A inclusão de átomos de iodo radioativo em moléculas de vários hormônios não causou alterações físicas nem químicas, mesmo que o hormônio não possua iodo na sua estrutura básica.

2) identidade de volume: o hormônio e o traçador são distribuídos homogeneamente em um volume comum.

3) identidade de tempo: a mistura do hormônio natural e do traçador é instantânea e o período de tempo das reações subsequentes deve ser idêntico.

4) radioatividade: a energia radiativa é derivada somente do traçador, sem influência dos locais de reação. Entende-se que o traçador não perdeu nenhuma de suas ligações isotópicas originais.

Marcadores não-radioativos

Enzimáticos

Os ensaios enzimáticos (EIA) podem ser divididos em duas categorias: ensaios de amplificação do sinal e a ensaio modelador de atividade. São utilizadas enzimas, como a fosfatase alcalina e a peroxidase de raiz forte. Enzima fixada pode produzir conversão de um dos substratos adicionado em produto colorido. Dependendo do substrato, o produto colorido é solúvel ou insolúvel. Os produtos solúveis podem ser detectados colorimetricamente por um espectrofotômetro que mede a absorção de luz de determinado comprimento de onda por soluções coloridas. Os produtos insolúveis podem ser detectados com vista desarmada o microscópio.

O ensaio de imunoadsorção ligado à enzima (ELISA) é um teste comumente utilizado em laboratórios clínicos e experimentais, e vendido em forma de kits. Em geral, é um ensaio com método de captura, em que o ligante a ser detectado é capturado por anticorpos de fase sólida e, em seguida, detectado com anticorpos marcados. São utilizados anticorpos monoclonais específicos para detectar a presença do hormônio.

Fluorescência

São usados compostos fluorescentes, como isotiocianato de fluoresceína e rodamina. Os compostos fluorescentes possuem elétrons que podem ser excitados para um estado mais elevado pela absorção de luz de determinado comprimento de onda, emitindo luz com comprimento de onda maior que a absorvida. A fluorescência é a luz emitida pelos elétrons excitados quando retornam ao estado basal. Essa luz emitida pode ser observada ou detectada com o uso de instrumentos apropriados. Um fóton pode, com sua energia, excitar um átomo, molécula ou um marcador fluorescente. Após a excitação, a emissão de luz e de um determinado comprimento de onda onde o

composto irá retornar ao seu estado é elementar. O intervalo de tempo entre absorção e emissão para o composto isotiocianato de fluoresceína é menor que 1 nanosegundo.

Alguns elementos encontrados no sangue como a hemoglobina e a bilirrubina podem interferir na mensuração da fluorescência, pois emitem o mesmo comprimento de onda que a fluoresceína. Os compostos fluorescentes apresentam sensibilidade quanto à temperatura, pH, anticorpos específicos, triptofano e moléculas contendo iodo.

Luminescência

O ensaio imunoquimiluminométrico (ICMA) utiliza enzima como marcador e o substrato utilizado forma um produto instável de alta energia que rapidamente perde a sua energia adicional ao emitir um fóton e ao produzir luz. O ICMA utiliza freqüentemente éster de acridínio, embora outros compostos luminescentes são utilizados com relativa freqüência, como luminol e isoluminol. O sinal gerado no ICMA é mensurável após alguns segundos e utilizando-se um aparelho designado luminômetro, sendo também detectada mediante a exposição a um filme fotográfico o através do uso de um registrador de imagens com placa de fosforescência.

Sistemas de separação

A maior parte dos ensaios requer a mensuração da proporção total de hormônios contidos na solução, sejam eles ligados ou livres. A determinação é feita após a separação do complexo hormônio-anticorpo dos hormônios não ligados.

Atualmente, os imunoensaios podem ser classificados em três categorias, segundo o meio em que são executados.

Precipitação em fase líquida

Foi o primeiro a ser desenvolvido e amplamente utilizado nos radioimunoensaios. Envolve o uso de soluções em que os Ag marcados e Ac específicos estão dissolvidos. Amostras do soro sanguíneo contendo o Ag não marcado a ser quantificado é adicionado à solução. Para separação do complexo Ag-Ac do Ag marcado livre, usa-se o polietilenoglicol (PEG), um álcool que acelera a separação do complexo Ag-Ac dos antígenos livres.

Essa técnica está em desuso devido ao grande número de etapas manuais, os métodos de separação das frações livre e ligada da substância marcada não são

perfeitos, exigindo elevada experiência e habilidade técnica do executor do ensaio, fazendo com que a precisão do ensaio seja diminuída.

Praticamente todos os ensaios foram substituídos pelos de fase sólida ou semi-sólida, permanecendo apenas aqueles em que não se conseguiu sintetizar Ac específicos para substâncias desejadas que aderissem em placas sólidas e/ou à parede de tubos de ensaio, como exemplo tem a insulina.

Precipitação em fase sólida ou semi-sólida

Este tipo de imunoensaio é largamente utilizado pelo radioimunoensaio. Utiliza-se um material constituído de substâncias magnéticas, principalmente carvão ativado ao qual se absorve um polissacarídeo sintético (dextrano) que se deixa penetrar pelas pequenas moléculas de Ag livre que são separadas por centrifugação magnética deixando no sobrenadante o complexo Ag marcado-Ac que será posteriormente contado nos detectores de radiação gama no caso de Ag marcados com I^{125}

Em um sistema de separação carvão-dextrano deverá sempre haver agitação do líquido, que é uma suspensão de partículas grosseiras, para que ocorra uma transferência homogênea do material para os tubos. Os ensaios clínicos para determinação de cortisol, TSH, LH, FSH, hCG, T_4 , T_3 , progesterona podem utilizar tal método de separação.

Adsorção em fase sólida

Nesse processo, um dos reagentes (geralmente o Ac) é imobilizado na fase sólida, nas cavidades de placas plásticas de microtitulação, seja por adsorção (paredes do tubo), seja por conjugação covalente (matriz particulada ou superfície contínua). Após a incubação, descarta-se o sobrenadante e conta-se nos detectores os tubos que prenderam Ag marcado fixados nas paredes ou esferas.

O emprego desses ensaios facilita a lavagem, eliminando a necessidade de centrifugação, sendo mais rápida e necessita menor quantidade de reagentes.

As placas são sensibilizadas com Ag ou Ac, cuja concentração ótima deve ser empiricamente determinada para cada sistema. A placa deve ser bloqueada para evitar adsorção não-específica dos reagentes. Após as incubações, são feitas lavagens das placas com tampões apropriados, a fim de remover as substâncias não ligadas ao suporte.

Procedimentos para análise dos dados

Atualmente, para muitos imunoenaios utilizam procedimentos automáticos, o tratamento dos dados já é feito no próprio aparelho. Para que haja confiabilidade na mensuração e tratamento dos dados, os técnicos deverão entender os programas computacionais utilizados. O tratamento dos dados é descrito em quatro etapas: calibração, mensuração, controle de qualidade e definição de uma concentração mínima detectável para o ensaio.

Calibração

Nesta etapa são utilizados calibradores contendo concentrações conhecidas da substância analisada. É de suma importância o procedimento de calibração, pois os hormônios apresentam diferentes concentrações, medidas em unidades de volume muito baixas (ng/mL), fazendo com que haja uma elevada precisão nos dados obtidos. Há pouco tempo, a calibração era realizada após cada corrida de amostras. Consistia de duas ou três replicatas, utilizando de cinco a nove concentrações de substância padrão. Atualmente, com os novos aparelhos automáticos, a calibração é realizada somente uma vez ao dia ou ao mês. Há uma grande variedade de modelos estatísticos que analisam os dados obtidos. A equação logística de quatro-parâmetros e suas modificações é a mais utilizada nos procedimentos de calibração, sendo válida para uma gama de sistemas de imunoenaios. A equação é a seguinte:

$$y = ((a - d)/(1 + (x / c)^b)) + d$$

Onde:

y é o nível medido,

a é o nível medido com dose zero para RIA e alto nível para IRMA,

b é o grau de inclinação na escala log,

c é a concentração correspondente 50% de ligação específica,

d é o alto nível medido para RIA e a dose zero para IRMA,

x é a concentração do calibrador (Figura 4).

Mensuração

Mensuração é o processo no qual a concentração de hormônio na amostra é determinada. A curva dose-resposta é a principal ferramenta utilizada para a quantificação do hormônio. Dose é concentração de hormônio na amostra e resposta é o sinal quantitativo, gerado no ensaio em resposta a uma determinada dose. É importante

que a concentração de hormônio (dose) tenha valores de resposta próximos, com um coeficiente de variação (CV) de no máximo 20%.

Controle de qualidade

Controle de qualidade é o processo que lida com a especificidade, sensibilidade, precisão, acurácia e reprodutibilidade do ensaio imunológico. A padronização dos ensaios que medem a concentração de hormônios é um problema complexo devido à falta de padronização das técnicas e metodologias empregadas nos laboratórios. O desenvolvimento de programas de qualidade entre e intralaboratórios levará a uma validação nas metodologias dos ensaios comerciais. A tentativa de automação da metodologia permite um maior controle na precisão da pipetagem, no controle da temperatura, no tempo de incubação e a análise dos dados. O objetivo de um programa de controle de qualidade é de adicionar precisão e acurácia em todos os resultados de ensaios de hormônios. Para isto, é necessário um grande banco de dados que caracterize as curvas-padrão, dose na qual 50% da substância a ser mensurada esteja ligada e a inclinação da curva.

a) Especificidade

A especificidade depende de vários fatores, sendo o mais importante o tipo de anti-soro utilizado. A especificidade para os imunoensaios de grandes proteínas como LH e FSH é relativamente difícil devido à sua pureza variável. Como exemplo podemos citar a reação de TSH com LH. O hormônio TSH bovino inibe significativamente a ligação do hormônio LH ao anticorpo, indicando que o antisoro utilizado não é específico ou que a solução apresenta, além do hormônio LH, o hormônio TSH. O sistema apresentado acima é inválido para mensurar o hormônio LH. Uma forma de contornar este problema, é o método de uso de dois anticorpos (*sanduíche*), uso de anticorpos monoclonais e policlonais no antisoro pode reduzir este problema.

b) Sensibilidade

A sensibilidade de um imunoensaio é definida como a menor quantidade confiável de hormônio detectada no ensaio. Geralmente a sensibilidade é dividida em dois tipos: a sensibilidade da curva-padrão é definida como sendo a menor quantidade de hormônios mensurável, diferente de zero e com um nível de confiança de 95%. O outro tipo de sensibilidade é a menor quantidade de hormônio que pode ser mensurada

por unidade de fluido biológico, como exemplo temos: quantidade de hormônios / mL de plasma.

c) Acurácia

É definida como a quantia exata de hormônio presente no analito. Acurácia é freqüentemente determinada por comparação de dados dos imunoenaios com outros ensaios tipo gravimetria, cromatografia líquido-gasosa e espectrofotometria de massa.

d) Precisão

São dois os tipos de precisões utilizadas: a *precisão dentro do ensaio* que determinada através de duplicatas da mesma amostra dentro do mesmo e a *precisão entre ensaios* usando a análise de replicatas da mesma amostra em diferentes ensaios. Geralmente a variação entre ensaios é maior que a variação dentro do ensaio.

Medidas das radiações emitidas pelos radioisótopos

Detecção da radiação

As radiações ionizantes podem ser detectadas pelos diversos fenômenos que causam na matéria, pela sua interação. Quando a matéria absorve a radiação, observam-se diversos fenômenos que expressam alterações, que podem ser observados e detectados com alto grau de sensibilidade e precisão. Quando a radiação ionizante é absorvida pela matéria podemos observar fenômenos calorimétricos, radioquímicos, de cintilação e ionização.

O radioimunoensaio utiliza-se das técnicas de cintilação de poço (cintilação sólida) para os hormônios marcados com I^{125} .

Cintilação de poço

Por volta de 1950 novos detectores de radiação foram desenvolvidos. Um destes, o tubo fotomultiplicador (PMT), pode detectar um flash fraco de luz e estimar a quantidade de luz. Um fóton de luz libera um elétron no fotocátodo que é acelerado ao primeiro dinodo, onde ele faz vários outros elétrons serem emitidos; estes elétrons são acelerados até o segundo dinodo, que é mais positivo que o primeiro e onde multiplicações posteriores tomam lugares. A maioria dos PMT tem 10 dinodo, de modo

que uma fotomultiplicação de elétrons de 10⁵ a 10⁶ vezes ocorrem do fotocátodo ao anodo.

Um desenvolvimento relacionado foi a produção de grandes cristais claros de iodeto de sódio (NaI) que cintilariam com boa eficiência quando um raio gama é absorvido. Estes cristais foram anexados diretamente ao PMT para detectar os flashes de luz fracos. Os cristais foram melhorados com a adição de uma quantidade de tálio (Tl) e são frequentemente referidos como cristais NaI(Tl), possuindo alta eficiência na detecção de raios gama.

O detector NaI(Tl) é muito sensível, devendo ser protegido da radiação de fundo. Para isso é envolvido por, no mínimo, cinco cm de chumbo. A intensidade da cintilação produzida quando um raio gama deposita sua energia no cristal é proporcional à energia do raio gama. Os elétrons emitidos no fotocátodo do PMT produzem um pulso elétrico, que é eletronicamente amplificado para que possa ser contado.

Referências

- BREUER, H.; HAMEL, D.; KRÜSKEMPER, H. L. **Methods of Hormone Analysis**, Stuttgart. 1976. 520p.
- BURDON, R. H.; KNIPPENBERG, P. H.; CHARD, T. **Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology – An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques**. 4th ed. Elsevier. 1990. 288 p.
- FELIG, P.; BAXTER, J. D.; FROHMAN, L. A. **Endocrinology and Metabolism**. 3th ed. McGraw-Hill. 1995.
- GONZÁLEZ, F.H.D. **Introdução à Endocrinologia Reprodutiva Veterinária**. Disponível por WWW em <http://www.ufrgs.br/favet/bioquimica/posgrad/endocrinolvet.pdf>, 2000.
- KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**, 5th ed. San Diego: Academic Press. 1997. p. 589 – 617.
- MOSS, A. J.; DALRYMPLE, G. V.; BOYD, C. M. **Practical Radioimmunoassay**, Mosby company, Saint Louis. 1976. 158 p.
- ROITT, I. M. **Imunologia – Série Imunológica – Biblioteca Biomédica**. Atheneu, RJ. 1976. 49 - 176 p.
- SHARON, J. **Imunologia Básica**, Ed. Koogan, RJ. 2000. 32 – 91 p.
- SUNDERMAN, F. W.; SUNDERMAN, F. W. Jr. **Laboratory Diagnosis of Endocrine Diseases**, Warren H Green, Missouri. 1971. 696 p.
- WILSON, J.D., FOSTER, D.W. (eds.) **Williams' Textbook of Endocrinology**. 8th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co., 1992.