

PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE RADIOIMUNOENSAIO COM DUPLO ANTICORPO PARA DETERMINAÇÃO DO HORMÔNIO DE CRESCIMENTO EM PLASMA E HIPÓFISE DE RATO

*Pedro Achilles¹, Antonio Carlos de Carvalho Carneiro²,
Celso Guimarães Júnior³ e Roberto Carlos Burini⁴*

Laboratório de Pesquisas Bioquímicas do
Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Botucatu, São Paulo, Brasil

RESUMO

Foram descritas as etapas envolvidas na padronização do método de radioimunoensaio para determinação dos níveis de hormônio de crescimento no plasma e na hipófise de ratos, mediante técnica do duplo anticorpo. O método baseia-se no deslocamento, pelo hormônio presente na amostra, do hormônio marcado radioativamente com I^{125} conjugado com o primeiro anticorpo (soro de macaco anti GH de rato); o complexo hormônio primeiro anticorpo é precipitado pelo segundo anticorpo (soro de coelho anti-gama globulina de macaco). O precipitado insolúvel é submetido à contagem radiativa a qual é comparada com uma curva padrão do hormônio para verificação da concentração desta substância. Foram descritos os processos de obtenção do segundo anticorpo, radioiodinação do hormônio e purificação do hormônio iodinado. Os testes efetuados, apresentaram valores de 70% no rendimento da radioiodinação e 88.7% de pureza no hormônio iodinado. A precipitabilidade máxima do sistema foi de 84.6%, sendo que com diluições de 1:250 do hormônio marcado e de $1:4 \times 10^4$ do primeiro anticorpo obteve-se índice de precipitabilidade de 26.9%. Estes valores são bastante satisfatórios em comparação aos dados apresentados pela literatura. A aplicação do método na análise do GH de plasma e hipófise de ratos Wistar adulto-jovens normais forneceu os seguintes valores: 82 ± 28 ng/ml e 63 ± 15 ng/mg, respectivamente.

Manuscrito modificado recebido: 7-5-84.

1 Professor Assistente Doutor do Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, UNESP, Botucatu, SP 18610, Brasil.

2 Professor Assistente Doutor do mesmo Departamento.

3 Bolsista da FAPESP.

4 Professor Adjunto, Livre Docente do Departamento de Clínica Médica.

INTRODUÇÃO

O interesse pelo conhecimento dos níveis de hormônio de crescimento sofreu impulso renovado após a divulgação clássica de Yalow e Berson (1, 2) referente à dosagem de hormônios peptídeos mediante técnica de radioimunoensaio. As técnicas de bioensaio até então utilizadas, foram demonstradas como não totalmente específicas para a molécula do hormônio e, também, de sensibilidade insuficiente para a detecção dos níveis sanguíneos do hormônio de crescimento. Por isso, quando comparado às técnicas de bioensaio e imunoeletroforese o radioimunoensaio apresenta maior sensibilidade e melhor reprodutibilidade de resultados.

O desenvolvimento satisfatório da técnica de radioimunoensaio do hormônio de crescimento é dependente da qualidade química dos reagentes protéicos utilizados e do rendimento dos processos de marcação e purificação do hormônio radioactivo e, escolha da quantidades adequadas dos anticorpos participantes da reação.

Este trabalho congrega dados referentes às diversas fases envolvidas na padronização do método de radioimunoensaio para determinação dos níveis de hormônio de crescimento em plasma e hipófise de ratos, mediante técnica do duplo anticorpo. O método baseia-se na separação da forma livre do antígeno da outra forma conjugada com o primeiro anticorpo (soro de macaco contendo anti-GH de rato). Esta separação é realizada pelo segundo anticorpo (soro de coelho antigamaglobulina de macaco). O precipitado resultante é formado pelo complexo antígeno-anticorpo, o qual é submetido à contagem radiativa. Este método constitui adaptação daquele proposto por Greenwood, Hunter e Glover (3) utilizando-se hormônio marcado com Na I^{131} . A participação quantitativa dos componentes da reação foi estabelecida de modo a proporcionar maior sensibilidade do método associadamente ao menor consumo de cada um dos reagentes.

MATERIAL E METODOS

1. *Plasma e Hipófise*

Foram utilizados sangue e hipófise de 30 ratos machos da linhagem Wistar. Os animais foram sacrificados por decapitação, sem anestesia. O sangue, proveniente do pescoço foi recolhido em tubo contendo anticoagulante (liquêmine Roche) e, a seguir, centrifugado 10 minutos a 1,500 rpm. O plasma decantado foi congelado até o momento da análise.

Após a decapitação, o crânio foi aberto e a hipófise posterior separada da hipófise anterior "in situ". Imediatamente após a remoção, a adenohipófise foi pesada em balança analítica (Mettler modelo H₁₅ - Zürich, Swiss).

O tempo foi cronometrado a partir do momento do descolamento da hipófise anterior da sela túrcica. O peso da glândula foi registrado aos dois, três, quatro e cinco minutos, para avaliar a perda de peso devida à evaporação de água do tecido. Aplicando-se a equação da reta aos valores das pesagens sucessivas foi possível a obtenção do peso da adenohipófise no momento da ressecção (tempo zero).

A extração do hormônio hipofisário foi feita de acordo com a técnica

de Birge *et al.* (4), com ligeiras modificações. Imediatamente após a pesagem, a hipófise foi homogeneizada em 0.5 ml de solução NaOH 0.01 N, a 0 - 4°C. O homogeinato foi centrifugado 30 min a 2,500 rpm a 0 - 4°C. Retirou-se alíquota de 0.2 ml do sobrenadante a qual foi diluída 1:10 com solução de albumina tamponada, constituindo o extrato hipofisário, o qual foi estocado em congelador (-15°C) até o momento da análise. A análise foi realizada em 6 grupos de extrato (5 hipófises/grupo os quais foram diluídos 1:2 x 10⁴ e dosados de acordo com o protocolo final (Tabela 1).

2. *Hormônio Padrão e Primeiro Anticorpo*

Estas substâncias foram gentilmente cedidas pelo NIAMDD (National Institute of Arthritis, Metabolism and Digestive Diseases) Bethesda, MD, EUA. As diluições dos reagentes foram feitas de acordo com as recomendações contidas no protocolo enviado (Rat Pituitary Hormone Distribution Program).

3. *Segundo Anticorpo*

O segundo anticorpo foi obtido a partir do sangue de coelhos imunizados por injeções subcutâneas, de solução contendo 20 mg de gama-globulina de *Maccacus rhesus*, em solução de NaCl 0.90/o, formando mistura em partes iguais com o adjuvante de Freund completo. A mistura foi acrescida de uma gota de penicilina e uma gota de estreptomicina. O controle de sensibilização dos coelhos foi feito pela análise periódica dos anticorpos existentes no soro mediante técnica de imunodifusão após precipitação protéica pelo sulfato de amônio. As imunizações foram realizadas inicialmente, a cada 15 dias até o obtenção de títulos de anticorpos em níveis satisfatórios e, a seguir, a frequência de imunização passou a ser mensal, com injeção de 8 mg de gamaglobulina. Após o estabelecimento de níveis adequados de anticorpos, a sangria dos coelhos era realizada em intervalos de 7 - 10 dias após a última imunização.

4. *Radioiodinação do Hormônio*

Após sucessivas iodinações estabeleceram-se as seguintes proporções entre os reagentes: 1 mCi I¹²⁵ (≥ 150 mCi/mg), 100 µl tampão fosfato 0.05 M, 25 µl solução de GH (200 ng/ml), 20 µl solução cloramina T (2.6 mg/ml) em tampão fosfato 0.05 M, 50 µl solução metabissulfito de sodio (4.85 mg/ml) em tampão fosfato 0.05 M, 100 µl solução KI (10 mg/ml) em tampão fosfato 0.05 M e uma gota de plasma humano misturado com azul de bromofenol (plasma azul).

5. *Purificação do Hormônio Iodinado*

Em tempo não superior a quatro minutos a partir da iodinação, a solução contendo o hormônio iodinado foi aplicada em una coluna de Sephadex G-100 (pharmacia - Uppsala - Sweden), 23 x 0.8 cm previamente saturada com 2 ml da solução de albumina sérica bovina 20/o seguida pela passagem de 1 ml de KI, 10 mg/ml. Após aplicação do hormônio a coluna

TABELA 1

PROTOCOLO FINAL PARA DOSAGEM DO HORMÔNIO DE CRESCIMENTO EM AMOSTRAS DE PLASMA
E EXTRATO HIPOFISÁRIO DE RATOS

	Tubo No.	Tampão μl	Horm. padrão ou amostra μl	Ac ₁ (1:10 ³) μl	Horm. iodinado μl	Ac ₁ (1:4x10 ⁴) μl	Heparina (1,000 USP/ml)	"Carrier" (1:500)	Ac ₂ μl
CT	1 - 2	—	—	—	50	—	—	—	—
LNE	3 - 4	350	—	—	50	—	25	50	150
	5 - 6	200	—	100	50	50	25	50	150
	7 - 8	300	—	—	50	50	25	50	150
	9 - 10	200	100 (0.125)*	—	50	50	25	50	150
	11 - 12	200	100 (0.25)	—	—	—	—	—	—
	13 - 14	200	100 (0.50)	—	—	—	—	—	—
	15 - 16	200	100 (1.0)	—	—	—	—	—	—
	17 - 18	200	100 (2.0)	—	—	—	—	—	—
	19 - 20	200	100 (4.0)	—	—	—	—	—	—
Plasma	21 - 22	290	10	—	—	—	—	—	—
Extrato hipófise	23 - 24	200	100	—	—	—	—	—	—

CT = Contagem total.

LNE = Ligação não específica.

Tampão = Tampão fosfossilino pH= 7,6 contendo EDTA 0.025 M e albumina sérica bovina 1%.

Ac₁ = Primeiro anticorpo.

Ac₂ = Segundo anticorpo.

"Carrier" = Soro de *M. rhesus*.

* = Quantidade de hormônio (ng) contendo em 100 μl .

** = Previamente diluído 1:2 x 10⁴.

foi eluída com tampão barbital 0.05 M concomitantemente com a coleta de frações de 0.5 ml em tubos contendo uma gota de solução de albumina sérica bovina 15% diluída em tampão barbital 0.05 M.

As frações foram submetidas ao contador de radiação gama tipo poço (Siemens do Brasil). De um modo geral, obtém-se três picos radioativos: o primeiro corresponde ao agregado polipeptídico, material de pouca imunoreatividade; o segundo, corresponde ao hormônio de crescimento radioiodinado, a ser usado no radioimunoensaio, e, o terceiro, contém as moléculas menores. O material correspondente ao primeiro e ao terceiro picos foram desprezados.

6. *Testes do Rendimento da Iodinação e da Pureza do Hormônio Iodinado*

Em tubos de ensaio separados contendo alíquota do hormônio iodinado não purificado ou amostras das frações purificadas de maior contagem radioativa (2o. pico) diluídas 1/250 com tampão fosfato 0.05 M, foram adicionados (a cada um dos tubos): 2.4 ml de tampão fosfossilina e 0.5 ml de solução de carvão Norit A, 100 mg/ml em tampão barbital 0.05 M. As soluções foram imediatamente agitadas durante um minuto e centrifugadas 15 minutos a 1,000 rpm. Os sobrenadantes e precipitados foram submetidos à contagem radioativa.

A percentagem do rendimento da iodinação foi calculada a partir da relação entre as contagens do precipitado e as do precipitado + sobrenadante, obtidas da amostra não purificada. A percentagem da pureza das frações coletadas foi obtida pela relação acima aplicada nas amostras purificadas, isto é, que passaram pela coluna de Sephadex.

7. *Teste da Precipitabilidade do Hormônio Iodinado e Escolha da Diluição do Primeiro Anticorpo*

Para este teste faz-se reagir hormônio de crescimento iodinado em diluições diferentes (1:100; 1:250 e 1:500) com o primeiro anticorpo em várias diluições (1:10³; 1:10⁴; 1:2x10⁴; 1:4x10⁴ e 1:8x10⁴) na presença de quantidades fixas de heparina (25 µl de solução 1,000 USP/ml), "carrier" (50 µl de solução 1:500) e, excesso de segundo anticorpo não diluído (200 µl). A adição dos reagentes é feita na ordem descrita completando-se o volume final para 725 µl com tampão fosfato pH 7.6 contendo EDTA. Após a adição do primeiro anticorpo os tubos são mantidos a 4°C durante 3 dias sendo a seguir acrescentados os demais reagentes; o ensaio é então incubado durante 24 horas (a 4°C). Encerrada esta fase, os tubos são centrifugado 30 min a 2,500 rpm, 4°C. O precipitado é ressuspenso em 0.5 ml de tampão fosfossilino contendo EDTA e novamente centrifugado nas mesmas condições anteriores. O precipitado contém o hormônio iodinado precipitado na reação, cuja detecção é feita mediante contagem radiativa.

No protocolo proposto foram incluídos ainda tubos contendo apenas o hormônio iodinado (em diferentes diluições) e, também, tubos contendo um dos pontos da curva-padrão de GH (0.25 mg/ml) associadamente a diluições diferentes do hormônio iodinado e do primeiro anticorpo. No primeiro caso as contagens ilustram a radiação de cada uma das diluições utilizadas e no segundo caso as contagens possibilitam avaliar antecipadamente o decaimento a ser mostrado pela curva padrão completa.

A observação de percentagem elevadas de precipitabilidade do sistema com a inclusão do primeiro anticorpo concentrado (1.10^3) oferece a segurança da imunoreatividade dos reagentes. A diluição do primeiro anticorpo recomendada para uso futuro é aquela correspondente à precipitabilidade de 20 - 40% do hormônio radioiodinado presente na reação.

8. Escolha da Quantidade do Segundo Anticorpo

Para a escolha do volume adequado do segundo anticorpo faz-se reagir quantidades crescentes do mesmo com concentrações fixas, anteriormente definidas do hormônio iodinado (1:250) e primeiro anticorpo ($1:4 \times 10^4$) até a obtenção da precipitabilidade máxima do sistema.

9. Protocolo de Dosagem

O método de dosagem dos níveis de hormônio de crescimento de plasma e hipófise de ratos obedeceu o protocolo contido na Tabela 1. Os tubos 1 e 2 contém apenas o hormônio radioiodinado fornecendo, portanto, apenas a radiação total do sistema. Os tubos 3 e 4 não contém 1o. anticorpo, portanto medem a ligação não imunológica servindo com "background" da reação. Os tubos 5 e 6 contém excesso do 1o. anticorpo servindo para avaliar a precipitabilidade máxima do sistema. Os tubos 7 e 8 constituem o zero da curva padrão, isto é, não contém hormônio padrão nem amostra. Os tubos de Nos. 9 a 20 contém hormônio padrão nas concentrações 0.125; 0.25; 0.50; 1.0; 2.0 e 4.0 ng/ml. Os tubos seguintes contém plasma ou extrato hipofisário ($1:2 \times 10^4$) correspondente ao agrupamento de cinco hipófises. A sequência da adição dos reagentes obedeceu à disposição mencionada na Tabela 1.

Após a adição do primeiro anticorpo o sistema foi incubado a 4°C durante 3 dias e mantido nestas condições por mais 24 horas após o acréscimo do segundo anticorpo. A seguir, os tubos sofreram o seguinte processamento:

- centrifugação a 2,000 rpm durante 30 minutos a 4°C;
- decantação do sobrenadante e ressuspensão do precipitado com 0.5 ml de tampão fosfossilina contendo EDTA e albumina bovina;
- repetição da centrifugação;
- decantação do sobrenadante e contagem radioativa do precipitado.

Todas as determinações foram feitas em duplicata e o valor apresentado corresponde à média aritmética das duplicatas.

10. Cálculo dos Resultados

As contagens obtidas nos tubos 3 - 4 (Tabela 1) são consideradas "background" e são subtraídas das contagens dos demais tubos. Uma curva-padrão é constituída a partir dos valores obtidos dos tubos 7 - 20 (Figura 1). O conteúdo de GH da amostra é determinado diretamente a partir da curva padrão pela aplicação do fator de correção correspondente à diluição sofrida pela amostra.

11. Soluções Tampões

Tampão fosfato 0.5 M, pH 7.6 — para volume final de 1,000 ml dissol-

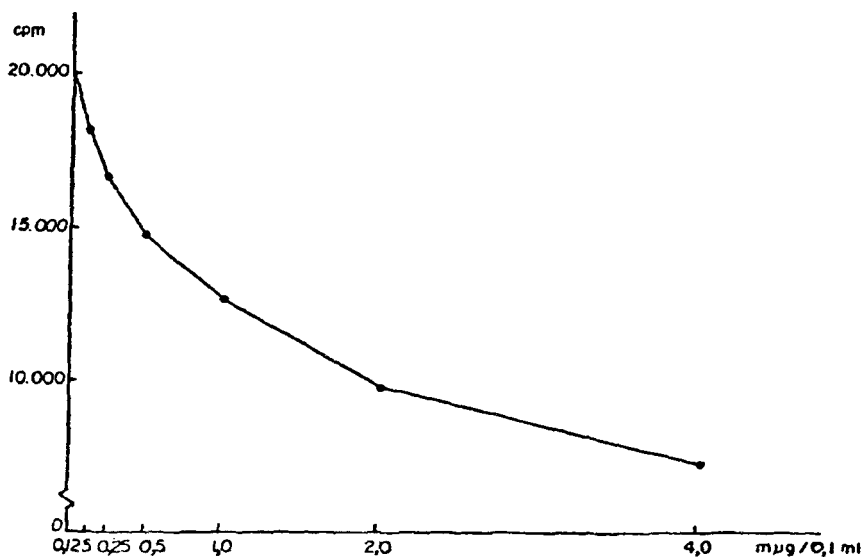


FIGURA 1

Curva padrão para determinação de hormônio de crescimento de rato

ver em água destilada 9.44 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e 61.36 g Na_2HPO_4 anidro, adicionar 0.1% de mertiolate e acertar pH com NaOH 10 N.

Tampão fosfato 0.05 M pH 7.6 – Diluir 1:10 a solução anterior e acertar pH se necessário, com Na OH 10 N.

Tampão fosfato 0.01 M pH 7.6 – Idem anterior diluindo a solução 0.05 M 1:50.

Tampão fosfossilina contendo albumina (fosfato 0.01 M, NaCl 0.15 M, albumina bovina 1%, pH 7.6) – Para volume final de 3,000 ml dissolver em água destilada 0.564 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 3.678 g Na_2HPO_4 anidro, 26.301 g NaCl e 30 g albumina sérica bovina, adicionar 0.1% de mertiolate e acertar pH com NaOH 10 N.

Tampão fosfossilina contendo EDTA (Fosfato 0.01 M, NaCl 0.15 M, albumina bovina 1%, EDTA 0.025 M, pH 7.6) – Idem tampão anterior adicionando 9.5 g de EDTA/litro. Acertar o pH com NaOH 10 N.

Tampão barbital 0.05 M, pH 8.6 – Para volume final de 1,000 ml dissolver em água destilada 9.21 g barbital e 1.65 g NaOH. Acertar o pH com NaOH 10 N.

Todos os reagentes utilizados foram preparados a partir de substâncias puras, pró-análise (P. A.).

RESULTADOS

1. *Testes de Rendimiento da Iodinação e da Pureza do Hormônio Iodinado*

Os resultados observados encontram-se na Tabela 2, notando-se a obtenção de 700/o no rendimento da radioiodinação e 88.70/o de pureza no hormônio iodinado.

2. *Teste da Precipitabilidade do Hormônio Iodinado, Escolha da Diluição do Primeiro Anticorpo e da Quantidade do Segundo Anticorpo*

Durante os experimentos verificou-se que a precipitabilidade máxima do sistema (excesso de primeiro anticorpo) foi de 84.60/o sendo que as diluições adequadas para os reagentes foi de 1:250 para o hormônio marcado e de 1: 4×10^4 para o primeiro anticorpo, que corresponderam a uma precipitabilidade de 26.90/o para o sistema completo. O volume adequado do segundo anticorpo foi 150 μ l além do que a precipitabilidade do sistema manteve-se inalterada.

3. *Valores Obtidos em Animais Normais*

O protocolo final de dosagem apresentou curva padrão do tipo mostrado na Figura 1. Mediante a aplicação desta técnica foram determinados os teores de hormônio de crescimento na hipófise e no plasma de 30 ratos machos adultos Wistar (233 – 364 g) alimentados *ad libitum* com dieta controle (200/o caseína). Os valores de GH obtidos foram 82 ± 28 (média \pm desvio padrão) ng/ml para o plasma e 63 ± 15 ng/mg para a hipófise.

TABELA 2

VALORES DOS TESTES DE RENDIMENTO DA IODINAÇÃO E PUREZA DO HORMÔNIO IODINADO

Frações	Contagens (cpm/10 min)			
	Antes da purificação	Após a purificação		
		Fração 1	Fração 2	Fração 3
Sobrenadante (S)	22,812	3,333	3,592	4,265
Precipitado (P)	53,858	23,237	28,411	27,790
Relação $\frac{P}{S + P}$	700/o*	87.40/o	88.70/o**	86.70/o

* Rendimento da iodinação.

** Pureza do hormônio iodinado.

DISCUSSÃO

A extração do hormônio de crescimento da hipófise, para fins de bioensaio, tem sido realizada por homogeneização em solução salina com pH alcalino (5-11). Birge *et al.* (4), ao estudar as condições ótimas para extração do hormônio, compararam a homogeneização de hipófises em hidróxido de sódio, ácido acético e tampão fosfossilino pH 7,6 e verificaram melhor extração com solução de hidróxido de sódio.

A iodinação do hormônio foi realizada pela técnica de Hunter e Greenwood (12), e Greenwood, Hunter e Glover (3) com as seguintes modificações: diminuição da quantidade de cloramina T e emprego de I^{125} em substituição ao I^{131} . A substituição do isótopo radioativo foi processada em função do I^{131} apresentar vida média relativamente curta, criando inconvenientes para sua utilização em métodos de radioimunoensaio. Por outro lado, o isótopo a ser utilizado deve apresentar elevada atividade específica uma vez que a quantidade da substância marcada isotopicamente deve ser pequena em relação a proporção com o hormônio não marcado e, além disso, a diluição do hormônio iodinado deve ser suficientemente grande (1).

A purificação do hormônio iodinado foi feita em coluna de Sephadex G 100 (tamanho da partícula = 40 – 120 μ) por permitir o fracionamento de peptídeos e proteínas de peso molecular 4,000 – 100,000. Esta faixa inclui a fração imunologicamente ativa do hormônio de crescimento de rato ao mesmo tempo que o tamanho da partícula do Sephadex permite velocidade de escoamento das frações hormonais dentro do tempo de 20 minutos preconizado por Greenwood, Hunter e Glover (3).

A literatura refere que a precipitabilidade máxima do hormônio iodinado (o que ocorre em presença de excesso de primeiro anticorpo) deve ser entre 50 a 60% (16) ou superior (17) e que, para o ensaio final, o anticorpo deve ser diluído até concentração suficiente para precipitar 35 a 55%, 15 a 30% (14) ou cerca de 25% (18) da atividade total presente no sistema. No presente trabalho a precipitabilidade máxima chegou a atingir 88,7% e diluição de $1,4 \times 10^4$ do primeiro anticorpo foi capaz de precipitar 26,9% da radioatividade total do sistema.

O tampão fosfossilino contendo albumina sérica bovina e EDTA acrescido de azida sódica foi utilizado no sistema seguindo-se recomendações do NIAMDD. Apesar do EDTA reduzir a radioatividade do precipitado e diminuir a inclinação inicial da curva padrão (14), é aconselhado o seu uso, com a finalidade de inativar o “inibidor” presente no plasma que interfere com a precipitação do sistema de duplo anticorpo (19, 20).

Segundo alguns autores os antígenos padrão e amostras a serem dosados devem ser preparados em plasma, desprovido de antígeno contendo os mesmos componentes, no mesmo tipo de diluente, para se evitar variação de resultados devida a fatores inespecíficos como composição iônica, pH, concentração de proteínas e outros. Entretanto, tem sido referido que, desde que a sensibilidade do método é adequada para medidas hormonais em pequenos volumes de plasma, ou então, em diluições plasmáticas superiores a 1:10, os efeitos não específicos apresentam-se usualmente ausentes; nestas condições, preparações dos padrões do hormônio em tampão contendo albumina sérica, geralmente, fornecem curvas-padrão semelhantes àquelas correspondentes a padrões preparados em plasma desprovido

de hormônio (2, 21). Assim, optou-se por utilizar no presente experimento: a) padrões dissolvidos em solução tampão contendo albumina sérica bovina e b) volume pequeno de amostras de plasma (10 μ l) e diluição elevada do extrato hipofisário, ajustados de modo adequado para que o decaimento obtido fornecesse leituras em pontos mais sensíveis da curva-padrão.

Os níveis plasmáticos do hormônio de crescimento de ratos referidos pela literatura, quando dosados por radioimunoensaio, pela técnica do duplo anti-corpo, são variáveis, dependendo de uma série de fatores. Assim, são mencionados os efeitos do sexo (22), da temperatura (9, 23, 24), manipulação dos animais (25), horário da colheita do sangue (11), stress (23, 26-28), sistema de colheita do sangue (22, 25) e do emprego de anestésicos (23, 25) sobre o nível do hormônio circulante. Os níveis médios do hormônio plasmático citados nos trabalhos acima variam de $20,0 \pm 6,0$ a $94,3 \pm 17,3$ ng/ml. Entretanto, os dados individuais variaram desde concentrações insignificantes até cerca de 260 ng/ml. Os valores obtidos no presente experimento para ratos normais se aproximam dos citados por Schalh e Reichlin (22), verificados em condições experimentais semelhantes.

Os níveis do hormônio de crescimento, na hipófise de ratos, relatados pela literatura, também são variáveis (4, 9, 11, 29, 30). São assinalados como causas de variação, a idade e o sexo dos animais (4, 29) e o horário da retirada da hipófise (11). Os teores de hormônio de crescimento hipofisário verificados no presente trabalho são similares aos resultados observados por Birge *et al.* (4) e Burek e Frohman (29) ao se considerarem animais de pesos semelhantes.

SUMMARY

RAT PITUITARY AND PLASMA GROWTH HORMONE LEVELS. STANDARDIZATION OF DOUBLE ANTIBODY RADIOIMMUNOASSAY (USING 125 I-LABELLING).

Bioassay techniques are not sufficiently sensitive to measure plasma growth hormone nor are they entirely specific for the growth hormone molecule. All these requirements are fulfilled by the radioimmunoassay technique. Successful performance of the GH radioimmunoassay technique is dependent upon the good quality of the protein reagents (antibodies) used and the great care taken in handling both the reagents and the labelled hormone. The described method is based on displacement of the radioiodinated (125 I) hormone bound to the first antibody (Ab_1 = monkey serum anti-rat's GH) by the sample hormone. The hormone Ab_1 complex is precipitated by the Ab_2 (rabbit serum anti-monkey gammaglobulin). The radiation of the insoluble precipitate is then counted and the hormone quantitated through a standard curve. In the present paper we dealt with Ab_2 obtention, hormone radiolabelling, and the purification of the radioiodinated hormone. The accomplished specific tests showed values of 70% for the hormonal radioiodination efficiency, with 88.7% of the processed hormone being recovered in the pure state. The highest precipitability value of the system was 84.6% whereas using optimal dilutions of the labelled-hormone (1:250) and Ab_1 ($1:4 \times 10^4$) this value achieved 26.9%. These results are very much in agreement with those notified in the literature. Applying the present protocol to the analysis of plasma-and anterior-pituitary-gland-GH content

from young-adult Wistar male rats kept on normal feeding schedule and rest conditions the values obtained were 82 ± 28 ng/ml (plasma) and 63 ± 15 ng/mg (pituitary), respectively.

BIBLIOGRAFIA

1. Yalow, R. S. & S. A. Berson. Introduction and general considerations. In: **Principles of Competitive Protein-Binding Assays**. (Chapter I). W. D. Odell and W. H. Daughaday. (Eds.). Philadelphia, Pa., J. B. Lippincott Co., 1971, p. 8.
2. Yalow, R. S. & S. A. Berson. Problems of validation of radioimmunoassays. In: **Principles of Competitive Protein-Binding Assays**. (Chapter XV). W. D. Odell and W. H. Daughaday (Eds.). Philadelphia, Pa., J. B. Lippincott Co., 1971, p. 375-377.
3. Greenwood, F. C., W. M. Hunter & J. S. Glover. The preparation of ^{131}I -labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem. J.*, **89**: 114-123, 1963.
4. Birge, C. A., G. T. Peake, I. K. Mariz & W. H. Daughaday. Radioimmunoassayable growth hormone in the rat pituitary gland: Effects of age, sex and hormonal state. *Endocrinology*, **81**: 195-204, 1967.
5. Srebnik, H. H., M. M. Nelson & M. E. Simpson. Reduced growth hormone content in anterior pituitaries of rats on protein-free diets. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **101**: 97-99, 1959.
6. Srebnik, H. H. & M. M. Nelson. Anterior pituitary function in male rats deprived of dietary protein. *Endocrinology*, **70**: 723-730, 1962.
7. Mosier, H. D. Jr. & R. A. Jansons. Pituitary content of somatotropin, gonadotropin and thyrotropin in rats with stunted linear growth following head X-irradiation. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **128**: 23-28, 1968.
8. Dickerman, E., A. Negro-Vilar & J. Meites. Effects of starvation on plasma GH activity, pituitary GH and GH-RF levels in the rat. *Endocrinology*, **84**: 814-819, 1969.
9. Müller, E. E., D. Miedico, G. Giustina & A. Pecile. Growth hormone immunological and biological assays in pituitary of rat under different experimental conditions. *Experientia (Basel)*, **25**: 1146-1147, 1969.
10. Pecile, A., G. Ferrario, G. Falconi & E. E. Müller. Pituitary growth hormone content and hypothalamic growth hormone releasing activity in neonatal rats after stress. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **130**: 425-427, 1969.
11. Müller, E. E., G. Giustina, D. Miedico, A. Pecile, D. Cocchi & F. W. King. Circadian pattern of bioassayable and radioimmunoassayable growth hormone in the pituitary of female rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **135**: 934-939, 1970.
12. Hunter, W. M. & F. C. Greenwood. Preparation of iodine- ^{131}I labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature*, **194**: 495-496, 1962.
13. Schalch, D. S. Use of ^{125}I -labelling in radioimmunoassays. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **121**: 1279-1280, 1966.
14. Lambert, A. E., A. Luycky, & G. R. Zahnd. Improvement of human growth hormone immunoassay using ^{125}I . *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **126**: 405-409, 1967.
15. Youton, R., I. Riesco, J. Litvak & N. Zlatar. Análisis de algunos problemas del método radioinmunológico para la medición de hormona de crecimiento. *Rev. Med. Chil.*, **99**: 572-576, 1971.
16. Greenwood, F. C. Radioimmunoassay techniques. *Clin. Sci.*, **37**: 571, 1971.
17. Nakazone, A. K. Radioimmunoensaio para Dosagem de Hormônio de Crescimento. Tese de Mestrado. Fac. Med. Vet. e Zootec. Univ. S. Paulo, 1970.

18. Schalch, D. S. & M. L. Parker. A sensitive double antibody immunoassay for human growth hormone in plasma. *Nature*, **203**: 1141-1142, 1964.
19. Morgan, G. R., R. L. Sorenson & A. Lazarow. Further studies of an inhibitor of the two antibody immunoassay systems. *Diabetes*, **13**: 579-584, 1964.
20. Schally, A. V., A. Arimura & A. J. Kastin. Hypothalamic regulatory hormones. *Science*, **179**: 341-350, 1970.
21. Midgley, A. R. Jr., G. D. Niswender & R. M. Rebar. Principles for the assessment of the reliability of radioimmunoassay methods (precision, accuracy, sensitivity, specificity). *Acta Endocrinol. (Kbh) (Suppl)* **142**: 163-184, 1969.
22. Schalch, D. S. & S. Reichlin. Plasma growth hormone concentration in the rat determined by radioimmunoassay: Influence of sex, pregnancy, lactation, anesthesia, hypophysectomy and extrasellar pituitary transplants. *Endocrinology*, **79**: 275-280, 1966.
23. Kokka, N., J. F. García, R. George & H. W. Elliott. Growth hormone and ACTH secretion: Evidence for an inverse relationship in rats. *Endocrinology*, **90**: 735-743, 1972.
24. Parkhie, M. R. & H. D. Johnson. Hypothalamic growth hormone releasing factor: Release and synthesis after exposure to a high ambient temperature. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **142**: 311-315, 1973.
25. Takahashi, K., W. H. Daughaday & D. M. Kipnis. Regulation of immunoreactive growth hormone secretion in male rats. *Endocrinology*, **88**: 909-917, 1971.
26. Montes, A., F. Hervás & T. Jolin. Effects of thyroidectomy and thyroxine on plasma growth hormone and insulin levels in rats. *Hormone Res.*, **8**: 148-158, 1977.
27. Reeves, R. D., L. Dickinson, J. Lee, B. Kilgore, B. Branham & M. J. Elders. Effects of dietary composition on somatomedin activity in growing rats. *J. Nutr.*, **109**: 613-620, 1979.
28. Achilles, P., R. C. Burini, A. Y. O. Angeleli & A. O. Campana. Effect of protein-free diet on pituitary and plasma growth hormone in young rats. *Nutr. Repts. Internat.*, **26**: 945-954, 1982.
29. Burek, C. L. & L. A. Frohman. Growth hormone synthesis by rat pituitaries *in vitro*: Effect of age and sex. *Endocrinology*, **86**: 1361-1367, 1970.
30. Trenkle, A. Effect of starvation on pituitary and plasma growth hormone in rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **135**: 77-80, 1970.