MÉTODOS DE SATURAÇÃO/COMPETIÇÃO:

Introdução ao Radioimunoensaio e técnicas similares

Luísa Cyrne & H. Susana Marinho

Departamento de Química e Bioquímica
Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

2002

ÍNDICE

Introdução **1**

Fundamento dos métodos de saturação/competição **1**

Métodos Radioimunológicos - Radioimunoensaio (RIA): **3**

Caracterização dos componentes que participam na reacção: soluções padrão 4

Caracterização dos componentes que participam na reacção: antigénio marcado radioactivamente 5

Caracterização dos componentes que participam na reacção: antisoro 6

Título de um antisoro 6

Especificidade do antisoro 7

Afinidade de um anticorpo 9

Caracterização dos componentes que participam na reacção: características da amostra 11

Caracterização dos componentes que participam na reacção: métodos de separação do antigénio livre e do antigénio ligado 11

Parâmetros de controlo nos métodos radioimunológicos **13**

Determinação da precisão de um método radioimunológico 14

Determinação da sensibilidade de um método radioimunológico 16

Variações do método radioimunológico **16**

Métodos imunoradiométricos (IRMA) 16

Enzimoimunoensaio (EIA) e método imunoenzimático (IEMA) 18

ELISA competitivo 19

ELISA com duplo anticorpo 19

ELISA indirecto 21

Aplicações **21**

Bibliografia **22**

Abreviaturas **22**

Introdução

Nos fluídos biológicos dos mamíferos, nomeadamente no sangue e na urina, circulam, em pequenas quantidades, vários compostos de natureza proteica e não proteica. Entre estes compostos incluem-se as hormonas esteróides e glicoproteínas. O doseamento destes compostos foi primeiramente efectuado por processos químicos, ou por processos biológicos, utilizando animais de laboratório. No entanto, os ensaios químicos, que exigiam uma quantidade de amostra muito grande e, por vezes, um processo de extracção ou purificação antes do doseamento final, eram muito morosos, pouco específicos e, ainda, pouco rigorosos. Os ensaios biológicos exigiam frequentemente um tempo longo de observação até se poder obter uma resposta mas, embora mais específicos que os ensaios químicos, revelavam uma fraca sensibilidade.

A disponibilidade de isótopos radioactivos tornou possível o desenvolvimento dos métodos radioimunológicos. A marcação de moléculas com isótopos radioactivos permitiu a sua detecção, mesmo quando em pequena quantidade, utilizando para isso equipamento adequado. Por outro lado, o desenvolvimento de técnicas imunológicas permitiu manter a especificidade dos métodos biológicos. Em 1960, Yallow[1] e Berson [1] desenvolveram um método de doseamento da insulina, baseado numa reacção de competição do anticorpo anti-insulina com a insulina marcada com um isótopo radioactivo e insulina não marcada. Neste método, a concentração a utilizar de insulina marcada é determinada previamente, de modo a estar presente em concentrações saturantes para o respectivo anticorpo. Na mesma altura em que estes ensaios foram realizados, Ekins [2] descreveu um método de ensaio para o doseamento da tiroxina (T4) no soro. Este método é baseado num princípio idêntico ao anterior, utilizando em vez do anticorpo, uma proteína de ligação específica da T4 que é a TBG – globulina de ligação à tiroxina ("thyroxine-binding-globulin").

Estes métodos são geralmente denominados **ensaios radioimunológicos** ou **radiocompetitivos** na medida em que utilizam compostos marcados com radioisótopos, e anticorpos, ou proteínas de ligação, como reagentes específicos [3]. Em 1965, Rothenberg [4] utilizou ainda o mesmo princípio, mas usando como reagentes específicos enzimas. Posteriormente, foram também utilizados como reagentes específicos membranas celulares [5] e receptores celulares [6].

Fundamento dos métodos de saturação/competição

Os métodos de saturação/competição, baseiam-se na competição de um composto marcado - **ligando marcado** - e esse mesmo composto não marcado - **ligando não marcado** - para os pontos de ligação de um composto específico – reagente específico. A interacção dos três componentes essenciais no ensaio pode esquematizar-se como indicado na Figura 1.

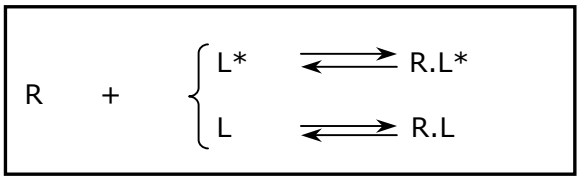

Figura 1 – Esquema da interacção entre o ligando marcado, ligando não marcado e reagente específico num método de saturação/competição. R, reagente específico; L, ligando não marcado; L*, ligando marcado; RL, complexo reagente específico-ligando não marcado; RL*, complexo reagente específico-ligando marcado.

[1] Rosalyn Yalow recebeu em 1977 o prémio Nobel em Fisiologia e Medicina, pelo seu trabalho no desenvolvimento de radioimunoensaios de hormonas peptídicas (ver http://www.nobel.se/medicine/laureates/1977/press.html).

A concentração do reagente específico utilizado tem que ser menor que a do ligando marcado, de modo a limitar a sua disponibilidade para se complexar com este. Se se adicionarem quantidades crescentes de ligando não marcado ao sistema reagente específico/ligando marcado, haverá competição para os sítios de ligação do reagente específico, diminuindo a quantidade do ligando marcado complexado. Separando a fracção que tem os complexos ligando-reagente específico (marcado ou não marcado) - fracção ligada (B - "bound") - da fracção com os ligandos marcado e não marcado livres - fracção livre (F - "free") - é possível determinar uma relação entre as duas fracções, construindo uma curva padrão em função da quantidade de ligando não marcado adicionado, tal como está exemplificado na Figura 2 [7].

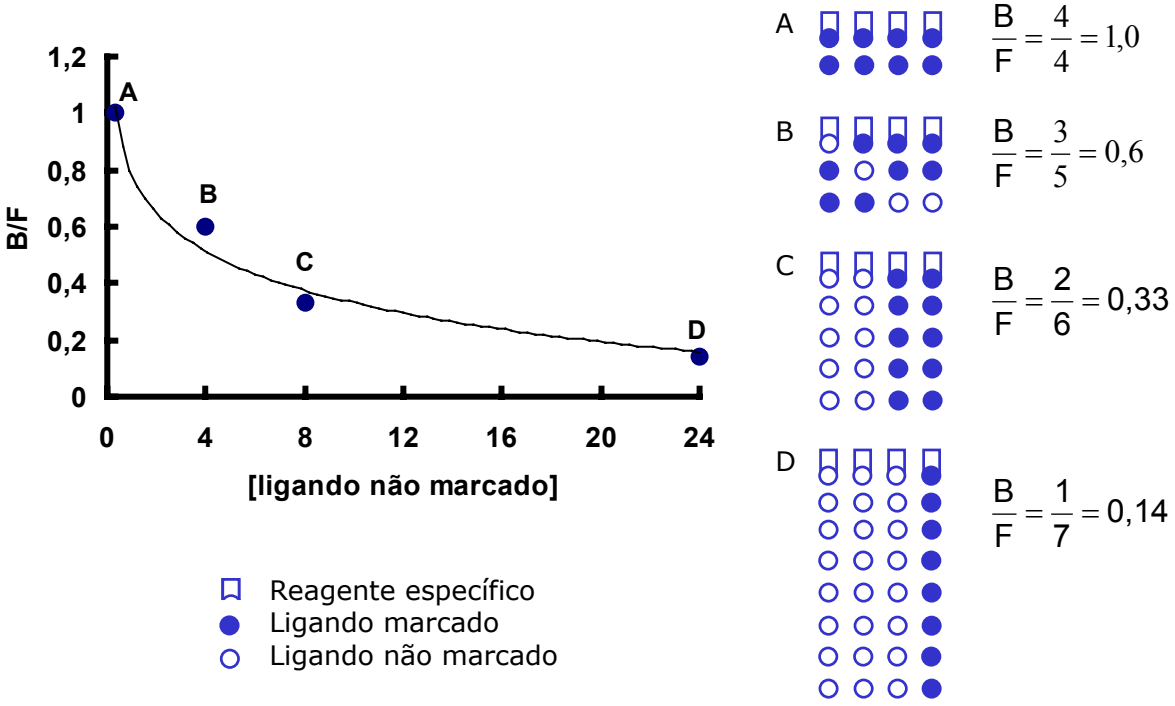

Figura 2. Representação esquemática de um ensaio de saturação/competição e da respectiva curva padrão.

Conhecendo-se a razão entre a fracção ligada e a fracção livre do ligando, representada por B/F, é possível determinar a quantidade de ligando numa amostra a partir da respectiva curva padrão.

Apesar dos métodos radiocompetitivos terem sido desenvolvidos utilizando inicialmente compostos marcados com um radioisótopo e anticorpos ou proteínas de ligação como reagentes específicos, actualmente utilizam-se também outros reagentes específicos e marcam-se os compostos com outro tipo de reagentes para além dos isótopos radioactivos [7]. Por outro lado, a marcação deixou de ser feita só no ligando, podendo também ser feita no reagente específico. Neste caso, o ensaio deixa de ser de saturação/competição passando a ser apenas um ensaio de saturação. Consoante o tipo de reagente específico, tipo de marcação e composto marcado usados, os ensaios adquiriram uma denominação específica. No Quadro 1 encontram-se sumarizados alguns desses ensaios mais comuns.
Visto que o fundamento dos diferentes métodos é o mesmo, far-se-á uma caracterização mais detalhada do radioimunoensaio e no final caracterizar-se-ão os métodos mais usados, referenciando as diferenças, vantagens e desvantagens relativamente ao radioimunoensaio.

Quadro 1. Representação e características de diferentes métodos de saturação/competição. RIA ("radioimunoassay"), IRMA ("immunoradiometric assay"), EIA ("enzymoimmunoassay"), IEMA ("immunoenzymatic assay"), FIA ("fluoroimmunoassay"), IFMA ("immunofluorometric assay").

Tipo de ensaio	Reagente específico	Tipo de marcação	Composto marcado
RIA Radioimunoensaio	Anticorpo	Isótopo radioactivo	Antigénio
IRMA Imunoradiométrico	Anticorpo	Isótopo radioactivo	Anticorpo
Radiocompetitivo	Proteínas de ligação específicas	Isótopo radioactivo	Antigénio
Radiocompetitivo	Receptor celular	Isótopo radioactivo	Antigénio
EIA (ELISA) Enzimoimunoensaio	Anticorpo	Enzima	Antigénio
IEMA Imunoenzimático	Anticorpo	Enzima	Anticorpo
FIA Fluoroimunoensaio	Anticorpo	Composto fluorescente ou luminescente	Antigénio
IFMA Imunofluorimétrico	Anticorpo	Composto fluorescente ou luminescente	Anticorpo

Métodos Radioimunológicos - Radioimunoensaio (RIA):

Tal como se pode ver a partir do Quadro 1, no radioimunoensaio o reagente específico é o anticorpo, o agente de marcação é o isótopo radioactivo e o composto marcado é o antigénio. Neste caso, a reacção pode ser esquematizada como indicado na Figura 3.

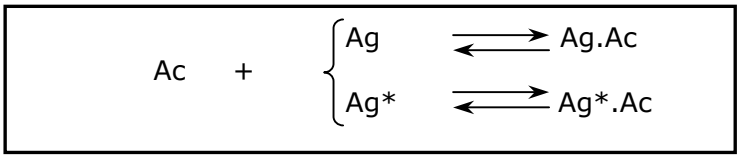

Figura 3. Esquema da interacção entre o antigénio marcado, antigénio não marcado e anticorpo no radioimunoensaio. Ac, anticorpo; Ag, antigénio não marcado; Ag*, antigénio marcado; Ag.Ac, complexo antigénio não marcado-anticorpo; Ag*.Ac, complexo antigénio marcado-anticorpo.

Mantendo constantes as concentrações do antigénio marcado e do anticorpo, e variando a concentração do antigénio não marcado, obtêm-se quantidades diferentes do complexo anticorpo-antigénio marcado. A partir de uma curva padrão idêntica à representada na Figura 2, é possível obter a concentração de um composto numa dada amostra.

O desenvolvimento dos métodos radioimunológicos trouxe várias vantagens sobre os métodos até aí utilizados para o doseamento de determinados compostos como, por exemplo:

- **sensibilidade** - o método radioimunológico tem a capacidade de dosear pequenas quantidades de uma molécula, visto que utiliza material marcado com isótopos radioactivos mensuráveis com aparelhos próprios de grande sensibilidade.
- **especificidade** - o método radioimunológico tem a possibilidade de dosear só a molécula que interessa, desde que utilize um antisoro específico para a mesma.
- **precisão** - o método radioimunológico é um método muito preciso, podendo trabalhar-se com erros relativos da ordem dos 1% a 2%, dependendo a precisão das características dos vários compostos utilizados no ensaio e o modo como ele decorre.
- **exactidão** - o método radioimunológico tem a possibilidade de determinar de um modo bastante exacto a quantidade da molécula presente a dosear.

Para que os métodos radioimunológicos tenham estas vantagens, é necessário caracterizar cada componente que participa na reacção, para melhor desenvolvimento do método:

- soluções padrão (antigénio não marcado) - Ag
- antigénio marcado - Ag*
- antisoro/anticorpo específico – Ac
- amostra

Para além destes compostos, também é necessário definir qual o método de separação que se deve utilizar para separar as fracções do antigénio livre e do antigénio ligado. Além das características que estes parâmetros devem ter, o tempo e a temperatura de incubação da reacção também são factores importantes a ter em conta aquando do desenvolvimento do método radioimunológico, de modo a optimizar o ensaio.

Caracterização dos componentes que participam na reacção: soluções padrão

As soluções padrão são soluções do antigénio que se pretende dosear, devidamente quantificadas e aferidas. A preparação e calibração destas soluções são extremamente importantes pois contribuem para o rigor do ensaio. É a partir das soluções padrão que se estabelecem as curvas padrão com as várias concentrações do antigénio. O padrão deve ser idêntico, ou muito semelhante, ao antigénio não marcado que vai ser doseado no sistema (antigénio das amostras desconhecidas).

A não identidade com as substâncias que vão ser doseadas pode ser devida a vários factores:

- variações naturais, como a "big" insulina, fragmentos de outras proteínas e outras substâncias;
- espécies diferentes;
- produtos que resultam da degradação causada, por exemplo, pelo armazenamento ou até da própria preparação;
- erros sintéticos, quando o padrão é preparado com compostos obtidos a partir de síntese química (por exemplo, os esteróides).

A estabilidade dos antigénios usados como padrão é muito importante, visto que é necessário usá-los nos ensaios por um grande período de tempo. Há algumas substâncias que interferem na não identidade do padrão com a substância a dosear, como, por exemplo, a heparina (substância usada normalmente quando se fazem colheitas de sangue para a análise) e os tampões utilizados para a preparação das soluções de antigénio.

Caracterização dos componentes que participam na reacção: antigénio marcado radioactivamente

O antigénio marcado com um radionuclido é um dos componentes fundamentais para a execução dos métodos radioimunológicos. Como muitos antigénios são polipéptidos que contêm resíduos tirosil, eles podem ser facilmente marcados com um isótopo radioactivo, como o iodo ^{125}I (ver Figura 4). Além deste isótopo, os antigénios marcados também podem ser obtidos após marcação com ^{3}H ou ^{14}C. Nestes casos faz-se a substituição de um dos átomos da molécula pelo átomo isótopo.

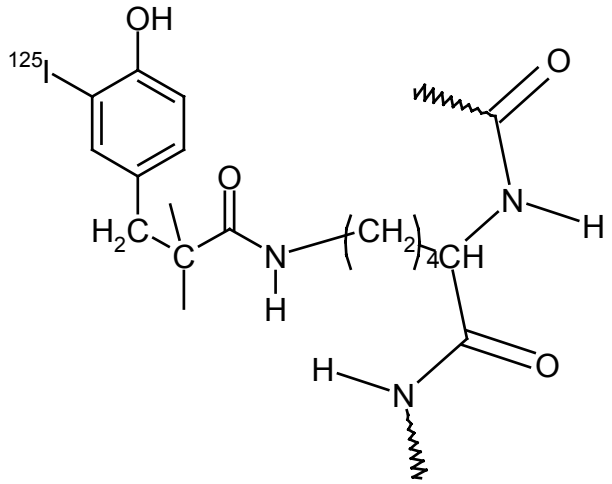

Figura 4. Substituição de um átomo de hidrogénio por um átomo de ^{125}I no anel aromático de um resíduo de tirosina. Este tipo de substituição é feito na presença de um agente oxidante como, por exemplo, a cloramina T.

Para a marcação de uma molécula normalmente usa-se ^{125}I, uma vez que a radiação γ tem uma energia mais alta, o que permite a sua determinação directamente a partir do tubo da amostra, enquanto que com amostras marcadas com ^{3}H ou ^{14}C (radiação β) é necessário a utilização de líquidos de cintilação, o que torna a técnica mais elaborada e, também, mais cara.

O antigénio utilizado para a marcação deve obedecer às mesmas características que o antigénio utilizado como padrão. Após a marcação, o antigénio marcado Ag* deve ser purificado, para eliminar quer o radionuclido que não reagiu, quer o antigénio desnaturado pela reacção e, ainda, outros reagentes que serviram para a reacção de marcação se efectuar. Além de se purificar, também se deve testar a imunoreactividade do antigénio marcado. Se o antigénio ao ser marcado radioactivamente perde as características imunológicas do Ag original, não serve para o método radioimunológico, pois não vai haver a reacção de competição com o Ag não marcado para o anticorpo, tal como está exemplificado na Figura 5.

A sensibilidade do método radioimunológico está relacionada com a actividade específica do antigénio marcado[2]. Se a actividade específica do antigénio é baixa, a actividade medida em cada tubo é muito pequena e o erro de contagem é grande. Por outro lado, as actividades específicas elevadas têm inconvenientes, pois a introdução de um maior número de átomos (no caso do ^{125}I) por molécula, torna mais diferente o antigénio marcado do antigénio original, o que pode alterar mais facilmente as suas características imunológicas. Além disso, é mais fácil haver alteração química de cada molécula de antigénio devido à ionização de grupos funcionais pela radiação.

---

[2] actividade específica é a radioactividade por unidade de massa do antigénio sendo as unidades mais usadas o mCi/mmol ou cpm/µg.

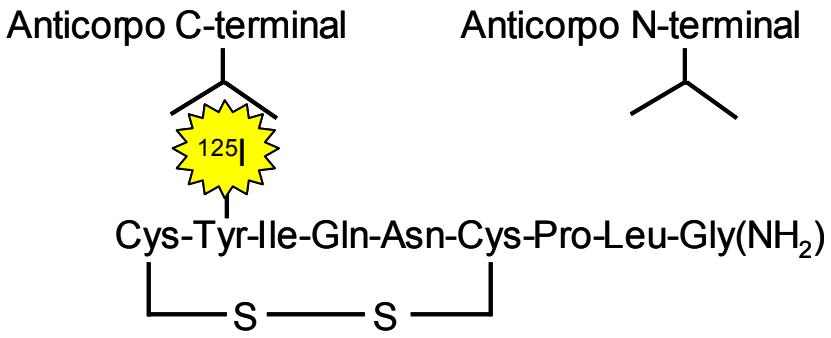

Figura 5. Ilustração de como uma substituição por ^{125}I pode afectar a especificidade de um ensaio, no caso da oxitocina. Se o antisoro contém duas populações de anticorpos, que reconhecem as regiões C- e N-terminal, respectivamente, e se o iodo altera completamente a antigenicidade da região C-terminal, então só os anticorpos que reconhecem a região N-terminal são eficazes no ensaio. A reacção de competição com oxitocina marcada e não marcada para os anticorpos terá um comportamento diferente, não podendo esta mistura de anticorpos ser utilizada no doseamento da oxitocina pelo método radioimunológico [7].

Caracterização dos componentes que participam na reacção: antisoro

O antisoro/anticorpo é um dos componentes fundamentais para a execução dos métodos radioimunológicos, sendo responsável pela especificidade do ensaio. Quando temos um antisoro e o queremos utilizar num método radioimunológico, é necessário caracterizá-lo para o radioimunoensaio específico desejado. Para isso, é necessário determinar o seu título, especificidade e afinidade [7].

Título de um antisoro

Pode definir-se o título de um antisoro como a concentração óptima do anticorpo no ensaio, de modo a obter-se o máximo de precisão e sensibilidade. Para a determinação do título do antisoro é necessário fazer uma curva de titulação do antisoro. Para isso, incubam-se quantidades conhecidas de antigénio marcado com várias diluições do antisoro. Separando as fracções do antigénio livre (F) e do antigénio ligado (B) e determinando a radioactividade em cada fracção, pode representar-se num gráfico as percentagens das contagens da fracção ligada (%B) em função da diluição do antisoro, tal como está representado na Figura 6.

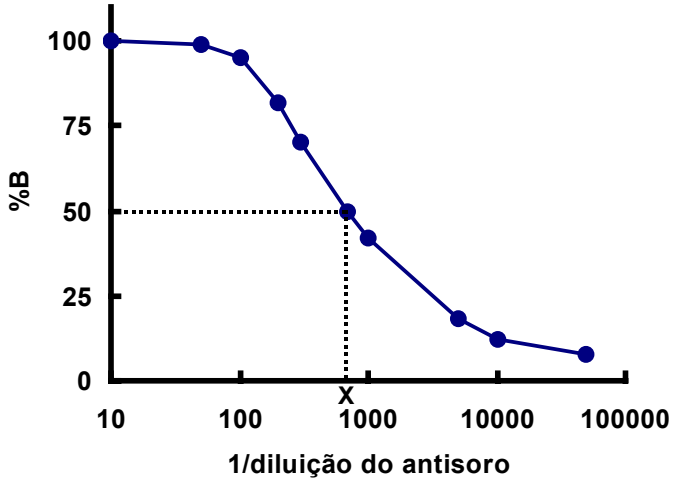

Figura 6. Curva de titulação de um antisoro. O valor X da diluição do antisoro corresponde a 50% de ligação, sendo neste caso o valor do título do antisoro.

A escolha da diluição do anticorpo a usar em RIA, a partir da curva de titulação, pode ser feita de várias maneiras, baseando-se cada uma em premissas que nem sempre são verdadeiras. Alguns autores afirmam que as condições óptimas de precisão e sensibilidade no ensaio de RIA são obtidas quando se usa uma diluição do antisoro em que há 50% de antigénio marcado ligado, na ausência de antigénio não marcado, tal como está ilustrado na Figura 6. Outros autores utilizam como título do seu anticorpo, a diluição do antisoro que corresponde a uma percentagem de ligação de metade da diferença entre o valor máximo de ligação e o valor mínimo de ligação da curva de titulação.

Embora estes critérios sejam utilizados em muitos laboratórios, o modo mais correcto a seguir é aquele que se baseia nos resultados obtidos a partir das curvas de precisão, preparadas após a utilização de várias diluições do anticorpo. Assim, deverá ser escolhida a diluição do anticorpo que corresponde ao melhor perfil de precisão.

Especificidade do antisoro

Já se sabe que um anticorpo reage especificamente com o seu determinante antigénico, de modo a formar um complexo antigénio-anticorpo. Como o radioimunoensaio é baseado na competição dos determinantes antigénicos das moléculas marcados e não marcadas para os locais de ligação existentes em número limitado do anticorpo, todas as moléculas que competem para esses locais influenciarão os resultados obtidos.

A competição para os locais de ligação, sem ser feita pelo antigénio que está a ser ensaiado, pode resultar da presença na amostra de:

- fragmentos do antigénio biologicamente inactivos, ou antigénio parcialmente desnaturado contendo o determinante antigénico intacto;

- compostos contendo grupos estruturais idênticos ou muito semelhantes ao determinante antigénico;

Por outro lado, quando se utilizam anticorpos policlonais é preciso ter em conta que estes não são monoespecíficos, sendo por isso capazes de reagir com compostos análogos, metabolitos ou fragmentos do antigénio.

A preparação de antisoros específicos é, por vezes, muito difícil, dado que num dado antisoro podem coexistir anticorpos que reconhecem vários antigénios. Vejamos os seguintes exemplos:

⇨ Supondo que se tem um antisoro que pode ser usado especificamente em RIA para o antigénio Ag3, mas que contém anticorpos contra outros antigénios Ag1, Ag2. Neste caso, formam-se os seguintes complexos Ag.Ac, durante a reacção de incubação:

Ac1.Ag1 Ac2.Ag2 Ac3.Ag3

Para o doseamento de Ag3, a reacção com o anticorpo Ac3 é feita na presença do antigénio Ag3 e Ag3*

$$Ac3.Ag3^* + Ag3 \rightleftharpoons Ac3.Ag3 + Ag3^*$$

Este antisoro é específico para o doseamento do Ag3 por radioimunoensaio, **desde que os anticorpos Ac1 e Ac2 não se liguem ao antigénio Ag3 e Ag3*, e os antigénios Ag1 e Ag2 não se liguem ao Ac3, específico para Ag3**. Este antisoro pode também ser utilizado para ensaios específicos de Ag1 e Ag2, **desde que não haja reacção cruzada entre estes antigénios e os anticorpos para os quais não são específicos**.

⇨ Se o antisoro reagir segundo o esquema:

$$Ac3.Ag3^* + \begin{cases} Ag1 \rightleftharpoons Ac3.Ag1 + Ag3^* \\ Ag2 \rightleftharpoons Ac3.Ag2 + Ag3^* \\ Ag3 \rightleftharpoons Ac3.Ag3 + Ag3^* \end{cases}$$

Neste caso o antisoro que contém o anticorpo Ac3 não pode ser usado num ensaio radioimunológico específico para o doseamento de Ag3. O anticorpo Ac3 liga-se ao antigénio marcado Ag3*, mas esta ligação é competitiva, não só com o antigénio Ag3 não marcado, como também com os antigénios Ag2 e Ag1. Neste antisoro, embora só haja anticorpos para Ag3, eles não são específicos e portanto não podem ser usados em ensaios específicos.

Um antisoro policlonal absolutamente específico de um antigénio é um caso ideal, visto que qualquer animal tem em circulação numerosos anticorpos antes de ser imunizado com um determinado antigénio. Além disso, também a resposta do animal à imunização é feita com uma população de anticorpos com a característica comum de ligação a esse antigénio. Só no caso dos anticorpos monoclonais é possível obter um antisoro específico com apenas um anticorpo específico para o respectivo antigénio.

Na prática, a especificidade de um antisoro para um antigénio pode ser determinada a partir da construção de múltiplas curvas padrão. Para isso, para o mesmo antigénio marcado, para o qual se julga ter o antisoro específico, utilizam-se o antisoro e diferentes antigénios não marcados, obtendo-se assim curvas de especificidade, tal como as representadas na Figura 7.

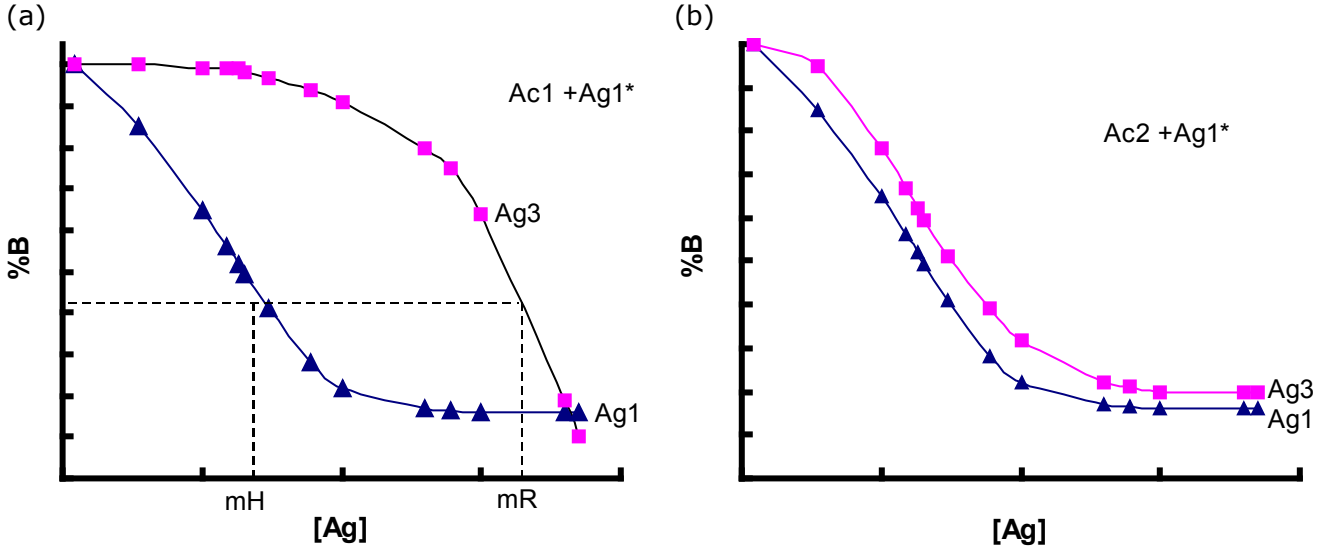

Figura 7. Curvas de especificidade de dois antisoros que contêm os anticorpos Ac1 (a) e Ac2 (b) para os antigénios Ag1 e Ag3. (a) Com o antisoro Ac1 não há praticamente reacção cruzada de Ag3 com Ag1 – o antisoro Ac1 é específico para o doseamento de Ag1. (b) com o antisoro Ac2, o Ag3 não marcado desloca o Ag1* marcado de uma forma idêntica ao Ag1 não marcado - o antisoro não é específico para o doseamento de Ag1.

Antigénios que mostrem curvas padrão idênticas ou coincidentes (Figura 7b), são imunologicamente semelhantes, havendo portanto uma reacção cruzada destes antigénios com o anticorpo. É de notar que o facto de dois antigénios serem imunologicamente semelhantes, não indica necessariamente que sejam idênticos, ou até que tenham a mesma actividade biológica. Por outro lado, há antigénios com propriedades biológicas semelhantes que podem não dar reacção cruzada com o antisoro específico de uma delas. O grau de

especificidade de um anticorpo pode ser dado pelo valor da percentagem da reacção cruzada [8], a qual é dada por:

$$\frac{mH}{mR} x\, 100 \qquad (1)$$

em que mH é a massa de antigénio padrão que reduz de 50% a ligação máxima e mR a massa de antigénio não padrão que reduz de 50% a ligação máxima (Figura 7a).

Afinidade de um anticorpo

Para cada determinante antigénico há como resposta imunológica uma gama de diferentes anticorpos. Destes anticorpos formados, uns ligam-se melhor ao antigénio que outros. A afinidade de um anticorpo pode ser definida como a avidez com que o anticorpo se liga ao antigénio, e pode exprimir-se pela constante de equilíbrio da reacção antigénio-anticorpo [9].

A reacção do antigénio e do anticorpo para formar o complexo é uma reacção reversível, em que Ka e Kd são, respectivamente, as constantes de associação e dissociação da reacção

$$Ac + Ag \underset{Kd}{\overset{Ka}{\rightleftharpoons}} Ac.Ag$$

De acordo com a lei da acção das massas, a constante de equilíbrio K é dada pela equação 2 em que [Ag.Ac] é concentração do anticorpo ligado ou do antigénio ligado, [Ag] é a concentração do antigénio livre e [Ac] é a concentração do anticorpo livre

$$K = \frac{[Ag.\,Ac]}{[Ag][Ac]} \qquad (2)$$

Nas condições de equilíbrio, a razão [Ag.Ac]/[Ag] [Ac] é a razão do antigénio ligado sobre o antigénio livre, que na prática é dada por B/F;

Se se fizer B/F=R, então a constante de equilíbrio pode ser dada por:

$$K = \frac{1}{[Ac]} x\, R \qquad (3)$$

$$R = K\,[Ac] \qquad (4)$$

Como [Ac] = [Ac^0] - [Ag.Ac], em que [Ac] é a concentração do anticorpo livre, [Ac^0] é a concentração do anticorpo no sistema, ligado e livre e [Ag.Ac] é a concentração do anticorpo ligado, temos que:

$$R = K\,([Ac^0] - [Ag.Ac]) \qquad (5)$$

Mas, no sistema de RIA há uma certa concentração de antigénio marcado e não marcado a reagir com o anticorpo, segundo o esquema:

$$\begin{array}{ccc} Ac + Ag & \rightleftharpoons & Ag.Ac \\ Ac + Ag^* & \rightleftharpoons & Ag^*.Ac \end{array}$$

$$K = \frac{[Ag.\,Ac]}{[Ag][Ac]} \qquad K' = \frac{[Ag^*.\,Ac]}{[Ag^*][Ac]}$$

K e K' são as constantes de equilíbrio das reacções, que são iguais, se se considerar que o antigénio marcado e não marcado têm as mesmas propriedades físicas e químicas.

Assim, a equação (5) tem que ser corrigida para as concentrações dos vários elementos em reacção. A concentração total do anticorpo no sistema agora é dada pela equação (6), em que, [Ac] é a concentração do anticorpo não ligado, [Ag.Ac] é a concentração do anticorpo ligado ao antigénio não marcado e [Ag*.Ac] é a concentração do anticorpo ligado ao antigénio marcado.

$$q = [Ac] + [Ag.Ac] + [Ag^*Ac] \qquad (6)$$

Reformulando a equação (6) ([Ac] = q - [Ag.Ac] - [Ag*Ac]) e, substituindo na equação (4) a concentração do anticorpo não ligado deste sistema, tem-se:

$$R = K(q - [Ag.Ac] - [Ag^*.Ac]) \qquad (7)$$

Mas se a concentração total do antigénio marcado e não marcado ligado ao anticorpo for dada por B_T, em que B_T é a concentração total de antigénio marcado e não marcado ligado ao anticorpo, a equação (7) pode escrever-se de um modo mais simples, em que R é a razão do antigénio ligado sobre o antigénio livre, K é a constante de equilíbrio da reacção e q é a concentração total do anticorpo no sistema de reacção:

$$R = K\,(q - B_T) \qquad (8)$$

Esta relação foi deduzida e desenvolvida por Scatchard [10] e daí, ser conhecida por equação de Scatchard. A partir da representação gráfica desta equação é possível determinar a constante de equilíbrio da reacção, que nos dá o valor da afinidade do anticorpo.

$$R = -KB_T + Kq \qquad (9)$$

Marcando em ordenadas R (B/F) e em abcissas B_T (concentração total do antigénio ligado, marcado ou não marcado), obtém-se uma representação do tipo da Figura 8, em que a ordenada na origem dá-nos a concentração total de anticorpo presente e a inclinação da recta dá-nos o valor de K (afinidade do anticorpo).

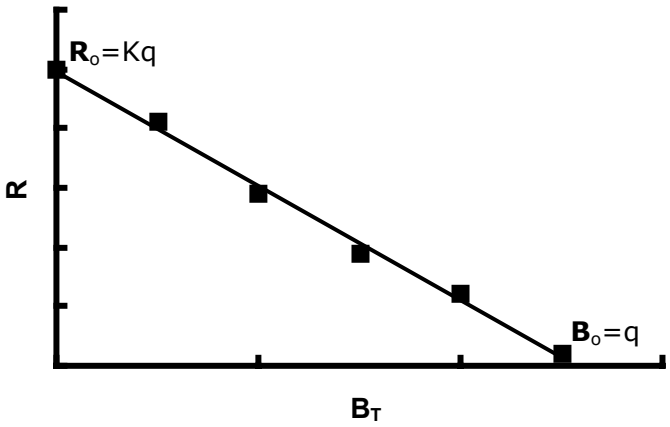

Figura 8. Representação de Scatchard para a determinação da concentração total de anticorpo presente e da afinidade do anticorpo.

Sempre que a representação de Scatchard não fôr uma relação linear isso significa que o antisoro em estudo é uma mistura de anticorpos com constantes de afinidade diferentes.

A sensibilidade dos métodos radioimunológicos está directamente relacionada com a afinidade do anticorpo. Um anticorpo de baixa afinidade tem um valor de K da ordem de 10^4 - 10^5 l mol^{-1}, enquanto que um anticorpo de alta afinidade tem valores de K da ordem de 10^{12} l mol^{-1}. Anticorpos com pouca afinidade não têm sensibilidade para poderem ser

utilizados em doseamentos, já que a adição de pequenas quantidades de antigénio pouco vai alterar o equilíbrio da reacção. Para dosear antigénios que existem em muito baixa concentração é necessário ter antisoros com anticorpos de alta afinidade.

Caracterização dos componentes que participam na reacção: características da amostra

Na maioria dos métodos radioimunológicos há uma simples adição e mistura da amostra com o antigénio marcado e o anticorpo. No entanto, há alguns casos em que isto não é suficiente, e a amostra tem que ter um tratamento inicial, antes do ensaio:

- Quando o ensaio não é suficientemente sensível e o antigénio endógeno na amostra tem que ser concentrado;
- Quando o ensaio não é suficientemente específico e o antigénio endógeno tem que ser separado de outros componentes da amostra.

O tratamento da amostra traz inconvenientes ao desenvolvimento do método de doseamento, tais como a perda de precisão, visto que há um passo adicional e a limitação do número de amostras a ser tratadas pelo operador.

Caracterização dos componentes que participam na reacção: métodos de separação do antigénio livre e do antigénio ligado

Nos métodos radioimunológicos a separação do antigénio livre e do antigénio ligado é uma das etapas fundamentais para a quantificação de qualquer composto. O complexo Ag.Ac formado durante o método radioimunológico não precipita devido à sua baixa concentração (10^{-10}-10^{-12} M). É pois necessário utilizar um método de separação, de modo a obter por um lado o antigénio não ligado (fracção livre - F) e por outro, a fracção do antigénio ligado (fracção ligada - complexo Ag.Ac-B). Apesar de já terem sido desenvolvidos vários métodos de separação, cada um deles com características próprias, há vários factores a ter em atenção, quando da escolha do método de separação [7,8]:

- o método escolhido deve permitir uma completa separação do antigénio livre e do complexo antigénio-anticorpo;
- o método deve ser económico;
- o método deve ser de execução simples e rápida, se se pretender analisar um grande número de amostras;
- o método deve ter em atenção o material e equipamento necessários para a sua execução.

Para separar as fracções livre e ligada do antigénio têm sido desenvolvidos diferentes métodos, que utilizam compostos variados [11], e que separam selectivamente o antigénio livre ou o complexo antigénio-anticorpo.

I. Precipitação do Ag livre

Para este tipo de separação utilizam-se diferentes compostos que têm uma capacidade não especifica de adsorção a pequenas moléculas, tais como:

- Carvão activado
- Resina
- Sephadex

Este tipo de separação é indicada quando se utilizam como antigénios moléculas como, por exemplo, a tiroxina e a testosterona.

II. Precipitação do complexo antigénio-anticorpo

O complexo antigénio-anticorpo pode ser separado de grandes péptidos ou de proteínas solúveis por precipitação não específica ou específica do complexo. Para precipitação não específica utilizam-se os seguintes compostos:

- PEG (polietilenoglicol)
- Etanol
- Sulfato de amónio

Para a precipitação específica utiliza-se um 2º anticorpo específico que reconhece o primeiro anticorpo, e que ao ligar-se ao complexo antigénio-anticorpo forma uma estrutura molecular suficientemente grande para ser separada após centrifugação. Na Figura 9, estão representadas esquematicamente todas as etapas de uma separação com o segundo anticorpo.

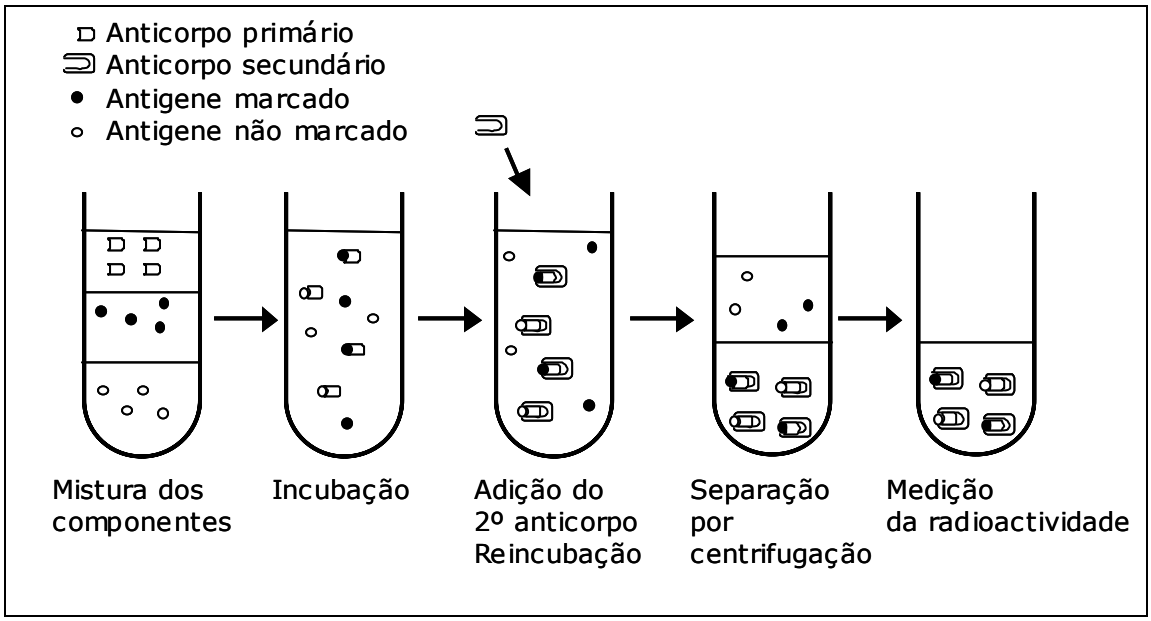

Figura 9. Representação esquemática de uma separação das fracções livre e ligada utilizando o 2º anticorpo (adaptado de [12])

III. Técnica de fase-sólida

Numa reacção imunológica o anticorpo pode estar ligado a uma fase sólida, o que vai facilitar a separação do complexo antigénio-anticorpo dos restantes compostos presentes no meio de reacção. O anticorpo pode estar ligado a diferentes tipos de suporte, sendo os mais comuns:

- Anticorpo covalentemente ligado a um suporte sólido
- Anticorpos polimerizados
- Anticorpo adsorvido à parede do tubo de reacção ("precoated tubes")

Na Figura 10, encontram-se esquematizadas as etapas de separação do complexo antigénio-anticorpo quando o anticorpo se encontra adsorvido à parede de um tubo de reacção.

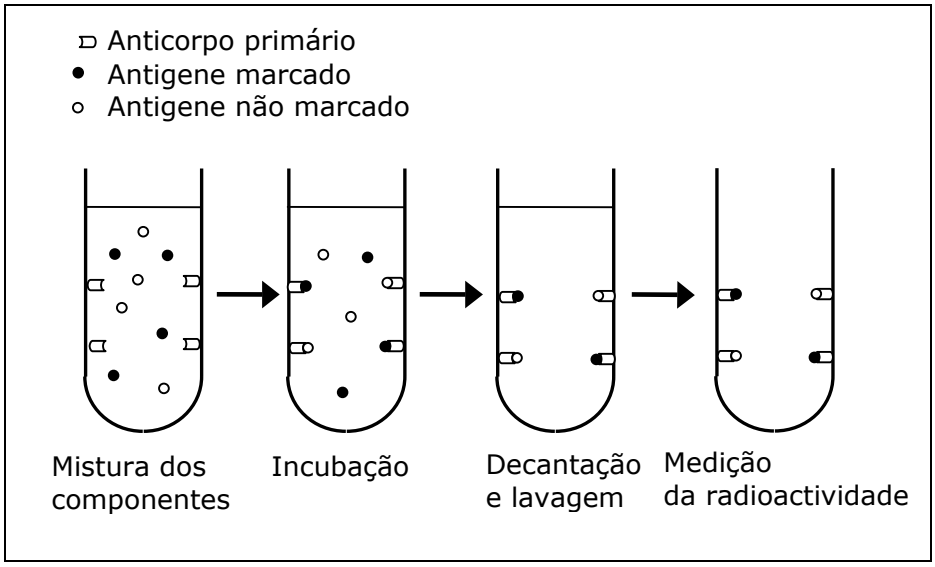

Figura 10. Representação esquemática de uma separação das fracções livre e ligada segundo a técnica de fase sólida (adaptado de [12])

Nenhum destes métodos é o método "ideal" de separação das fracções livre e ligada, apresentando cada um deles vantagens e desvantagens. Para cada ensaio a desenvolver deverá ser testado o método de separação mais conveniente e que corresponda, no final, ao ensaio mais rigoroso e mais preciso.

Parâmetros de controlo nos métodos radioimunológicos

Em qualquer ensaio para o doseamento de um composto são cometidos vários tipos de erros [13], que estão representados na Figura 11, e que podem ser subdivididos em:

- **Erros sistemáticos** - caracterizados por um afastamento constante dos valores determinados relativamente ao verdadeiro valor (*bias*) e que dão uma medida do rigor do ensaio;
- **Erros acidentais** – manifestam-se através da imprecisão de uma determinação e é quantificada pela determinação do desvio padrão, σ

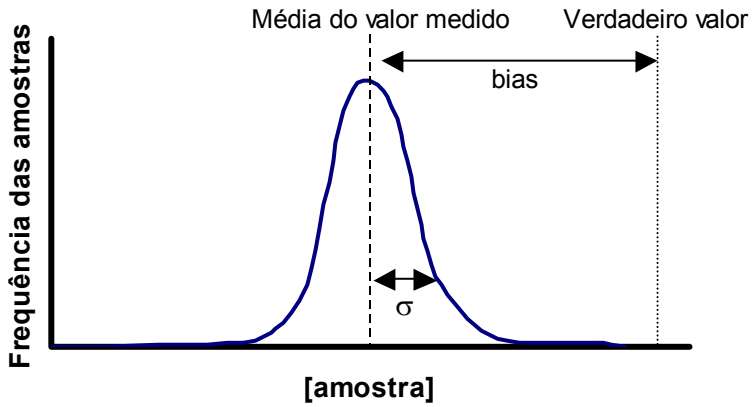

Figura 11. Representação dos erros associados à quantificação de uma amostra

Nos métodos radioimunológicos os factores que afectam o rigor são os seguintes:

- Utilização de anticorpos não suficientemente específicos (reacções cruzadas elevadas que levam a um erro na quantificação, por excesso, dos valores medidos);

- Utilização de antigénios marcados contendo impurezas radioquímicas;
- Utilização de soluções padrão indevidamente calibradas.

Os factores que afectam a precisão nos métodos radioimunológicos são os seguintes:

- Erros acidentais cometidos durante a operação de pipetagem;
- Erros de contagem do material marcado com isótopos radioactivos;
- Erros devidos a uma má separação entre o complexo ligado e o antigénio livre.

Os erros sistemáticos e acidentais nos métodos radioimunológicos podem ser controlados, se se tiver em conta as seguintes características dos diferentes reagentes que são utilizados na reacção:

- Utilizar anticorpos de boa qualidade no que se refere ao título, especificidade e afinidade;
- Utilizar antigénios marcados com elevada pureza radioquímica, imunoreactividade idêntica à dos antigénios não marcados e actividade específica adequada;
- Utilizar soluções padrão devidamente calibradas;
- Utilizar condições de reacção (tempo e temperatura) tais que permitam trabalhar em condições de equilíbrio ou perto delas;
- Utilizar métodos de separação que sejam adequados.

Já se viu atrás que as vantagens dos métodos radioimunológicos sobre outros métodos são dadas pela sua maior sensibilidade, especificidade, exactidão e precisão. Estas vantagens dependem, como também já se viu, das características dos vários componentes que entram na reacção. A precisão e sensibilidade do método para o doseamento de um determinado composto são grandezas mensuráveis que podem ser determinadas, e são valores de grande importância a ter em conta quando se faz o estudo e optimização da técnica e também para o controlo da qualidade do método.

Determinação da precisão de um método radioimunológico

A precisão (capacidade de reprodução de um ensaio com baixo erro) com que cada amostra individual é calculada utilizando o método radioimunológico depende de um grande número de factores [14,15]. Esses factores incluem características físicas da amostra (viscosidade), a qualidade das pipetas e outros instrumentos a usar e, até o modo de manipulação do experimentador. Podemos então falar de erros experimentais ou de manipulação. Além destes, há ainda os erros associados à contagem da radioactividade, que são muito importantes, visto que se está a utilizar material marcado radioactivamente.

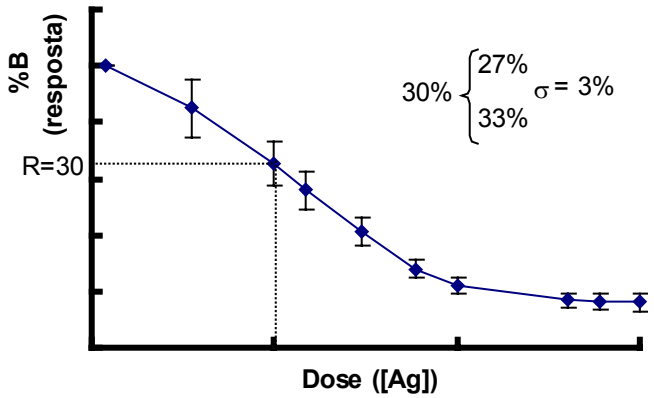

Figura 12. Representação gráfica de uma curva padrão

Tendo em conta estas fontes de erro, é natural que ao idealizar as condições do ensaio - programar e testar o ensaio - se usem concentrações de reagentes e condições de ensaio de modo a minimizar estes erros. Consideremos uma curva padrão, tal como está

representada na Figura 12. Para cada dose (concentração de antigénio padrão), temos uma série de respostas (valores de % de B) que dependem do número de replicados usados, para as quais corresponde um valor médio - R - e um desvio padrão desse valor (σR); as barras verticais do gráfico representam o desvio padrão das respostas para cada dose. Neste exemplo, para a dose D temos um valor médio da resposta de 30%, com o desvio padrão de 3%, que é obtido a partir dos valores de replicado que se fez para essa concentração da dose. Temos então que a resposta para uma dada concentração vem afectada de um erro, que é ΔR (erro da medição da resposta).

Por outro lado, a magnitude do erro da medida da concentração do antigénio D depende, não só da inclinação da curva padrão, como também de ΔR para o ponto D correspondente, tal como podemos ver representado na Figura 13.

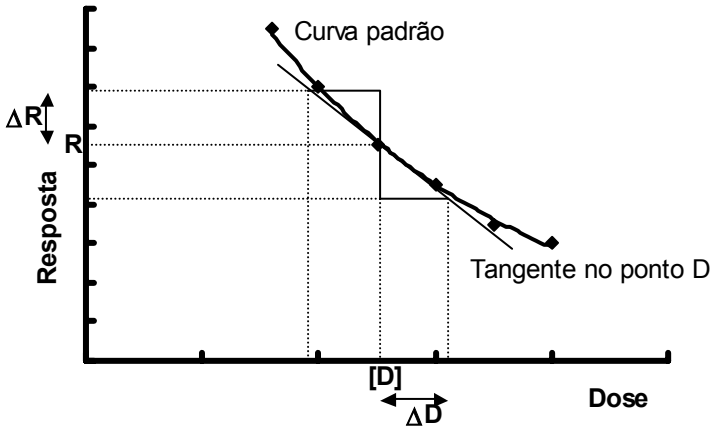

Figura 13. Relação entre os erros na resposta e na dose do antigénio. ΔD é o erro na medição do padrão e ΔR é o erro na medição da resposta; inclinação da curva =ΔR/ΔD (tangente ao ponto D da curva com resposta R).

O valor de ΔD dá-nos o erro na determinação da concentração da dose (D). Ao longo de uma curva padrão a inclinação das tangentes e os ΔR mudam para cada ponto, daí que os ΔR também vão variar em função de D. Se se determinar ΔD para cada ponto da curva padrão (precisão de cada ponto da curva padrão), pode construir-se um gráfico de ΔD em função de D, a que se chama **perfil de precisão** e que está representado na Figura 14a.

O perfil de precisão é portanto uma representação gráfica dos erros acidentais que se verificam num ensaio.

Quando num ensaio se altera a concentração de um dos reagentes (por exemplo, Ag* ou Ac), ou uma condição de desenvolvimento do ensaio (por exemplo, a temperatura ou o tempo de incubação), o perfil de precisão para essas condições vai ser diferente do perfil de precisão das condições iniciais. É, portanto, muito importante determinar os perfis de precisão quando se tem que escolher as condições de desenvolvimento do ensaio, pois a partir deles, é possível determinar quais as condições em que os erros acidentais estão minimizados, no intervalo de concentrações da dose que nos interessa.

O valor ΔD representa o erro absoluto na medida de D; se considerarmos o erro relativo na medição de D, que é dado pelo coeficiente de variação,

$$CV = \frac{\Delta D \times 100\%}{D} \qquad (10)$$

também se pode construir um gráfico de perfil de precisão de CV em função de D, tal como está representado na Figura 14b.

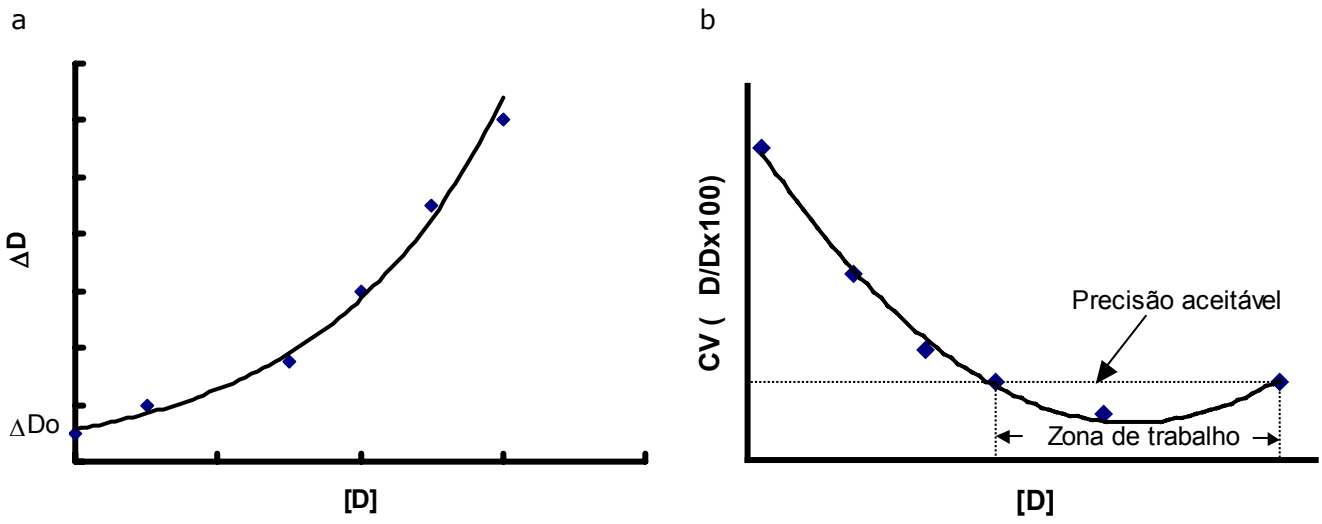

Figura 14. Perfil de precisão. a) Representação do desvio padrão da concentração da dose (antigénio) (σD) em função da concentração da dose([D]); **b)** Coeficiente da variação da concentração (dose) em função da concentração da dose ([D]).

Determinação da sensibilidade de um método radioimunológico

A sensibilidade de um método é dada pela quantidade mínima detectável por esse método. O valor para a sensibilidade de um ensaio corresponde ao erro absoluto na medição do antigénio marcado, quando a concentração do antigénio não marcado é zero (ΔD_0). O valor da sensibilidade de um ensaio é calculado a partir do perfil de precisão tal como representado na Figura 14a.

Variações do método radioimunológico

Como se viu na introdução, é possível introduzir algumas modificações ao princípio básico do radioimunoensaio, consoante o tipo de reagente específico usado, o tipo de marcação e a molécula que é marcada (ver Quadro 1). Dessas variações, destacam-se os métodos imunoradiométricos e os métodos imunoenzimáticos.

Métodos imunoradiométricos (IRMA)

Nos métodos imunoradiométricos (IRMA), embora se utilize o mesmo tipo de reagente específico e o mesmo tipo de agente de marcação que nos métodos radioimunológicos, a molécula marcada é o anticorpo [7]:

Reagente específico → Anticorpo → Ac

Ligando → Antigénio → Ag

Agente de marcação → Isótopo Radioactivo

Reagente Marcado → Anticorpo Marcado → Ac*

A reacção do método imunoradiométrico simples pode ser esquematizada como indicado na Figura 15:

$$Ag + Ac^* \rightleftharpoons Ag.Ac^*$$

Figura 15. Esquema da interacção entre o antigénio não marcado e o anticorpo específico marcado no método imunoradiométrico. Ag, antigénio não marcado; Ac*, anticorpo específico; Ag.Ac* complexo antigénio não marcado-anticorpo marcado.

Neste caso, mantendo-se constante a concentração do anticorpo marcado e, variando a concentração do antigénio não marcado, obtêm-se quantidades diferentes do complexo antigénio-anticorpo marcado. No final da reacção, o anticorpo ligado é separado do anticorpo livre e calculada a quantidade de radioactividade da fracção ligada. Neste método, os anticorpos marcados são usados para a ligação directa dos antigénios e são usados em concentrações não limitantes da reacção. Os métodos imunoradiométricos, ao contrário dos métodos radioimunológicos, não são métodos de competição, mas sim de saturação. No método imunoradiométrico simples, tal como está representado na Figura 15, visto que o anticorpo específico marcado está em excesso na reacção, quanto maior fôr a quantidade de antigénio no sistema de reacção maior a quantidade do complexo antigénio-anticorpo. Deste modo a quantidade da fracção ligada é directamente proporcional à concentração do antigénio presente na reacção. A determinação da concentração de um antigénio numa amostra é feita a partir de uma curva padrão idêntica à representada na Figura 16.

O ensaio imunoradiométrico composto, que é dos ensaios imunoradiométricos mais utilizado, é uma variação do ensaio imunoradiométrico simples no qual se utilizam dois anticorpos, ambos em excesso. Neste ensaio um dos anticorpos encontra-se ligado a uma fase sólida, ao qual se vai ligar o antigénio. O segundo anticorpo, que está marcado radioactivamente, vai também ligar-se ao antigénio, mas num local de ligação diferente da ligação do primeiro anticorpo. Na Figura 17 podemos observar o esquema representativo de um ensaio imunoradiométrico composto.

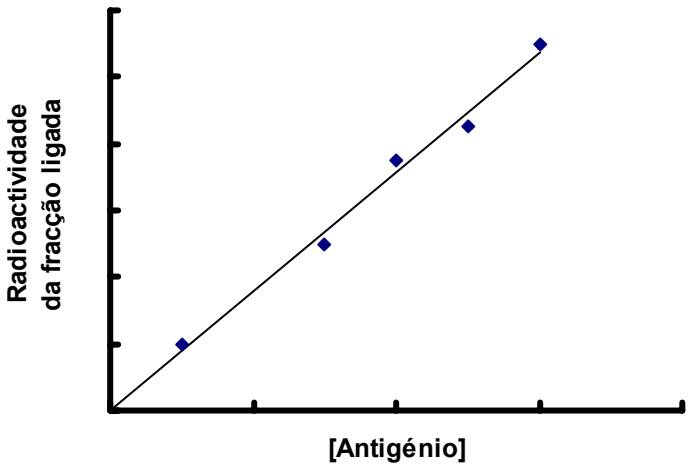

Figura 16. Representação de uma curva padrão para a quantificação de um antigénio segundo o método imunoradiométrico.

O anticorpo não marcado, ligado a uma fase sólida, reage com o antigénio presente na solução padrão ou na amostra desconhecida. Após lavagem do sistema para a eliminação do excesso de anticorpo, é adicionado o anticorpo marcado com o isótopo radioactivo à mistura de reacção. Após nova lavagem do sistema, para libertação do excesso de anticorpo marcado não ligado, é determinada a quantidade de radioactividade da fracção ligada (complexo Ac.Ag.Ac* ligado à fase sólida) que é directamente proporcional à quantidade de antigénio presente na reacção.

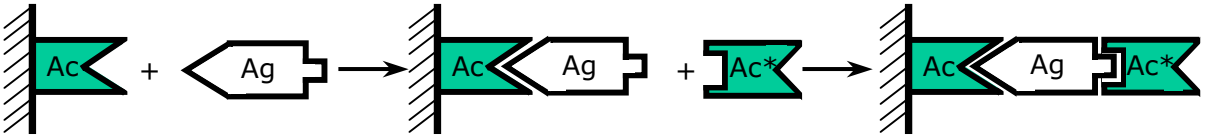

Figura 17. Esquema da interacção entre o antigénio e os anticorpos específicos marcado e não marcado no método imunoradiométrico composto. Ag, antigénio; Ac*, anticorpo específico marcado; Ac, anticorpo específico não marcado; Ac.Ag.Ac* complexo anticorpo não marcado-antigénio -anticorpo marcado ligado a uma fase sólida.

Actualmente são mais utilizados os métodos imunoradiométricos, uma vez que estes apresentam algumas vantagens relativamente aos radioimunoensaios:

- os anticorpos são moléculas normalmente muito maiores que os antigénios usados e, portanto, a reacção de marcação dos anticorpos é mais fácil; por outro lado, as moléculas marcadas são menos susceptíveis a alterações;
- quando o antigénio é difícil de marcar existe a possibilidade de marcação de anticorpos específicos;
- quando há dificuldade em obter grandes quantidades de antigénio puro, basta uma pequeníssima amostra para produzir anticorpos monoclonais, que podem ser mantidos e produzidos em grandes quantidades.

Enzimoimunoensaio (EIA) e método imunoenzimático (IEMA)

A utilização de enzimas na marcação de antigénios e anticorpos teve um grande sucesso para a identificação e localização dos compostos imunoreactivos em preparações histológicas [16]. Para uma aplicação em métodos quantitativos este tipo de marcação dos compostos imunoreactivos surgiu com o desenvolvimento dos ensaios imunoenzimáticos. Estes ensaios foram desenvolvidos como alternativa aos ensaios radioimunológicos para se eliminar a utilização de compostos marcados radioactivamente [17]. Os compostos marcados com enzimas participam na reacção do ensaio exactamente como os compostos marcados com isótopos radioactivos, com a separação das fracções livre e ligada no final da reacção. Todas as considerações que foram feitas na caracterização dos ensaios radioimunológicos são válidas para os ensaios imunoenzimáticos. Nos ensaios imunoenzimáticos, embora se utilize o mesmo reagente específico que nos ensaios radioimunológicos – o anticorpo – a marcação das moléculas é feita com enzimas. Consoante o tipo de molécula marcada com o enzima – o antigénio ou o anticorpo – assim se desenvolveram diversos enzimoimunoensaios (EIA) e métodos imunoenzimáticos (IEMA). Assim, nos ensaios imunoenzimáticos temos que:

Reagente específico → Anticorpo

Ligando → Antigénio

Agente de marcação → Enzima

Reagente Marcado → Antigénio Marcado ou Anticorpo Marcado

Neste tipo de ensaios têm sido utilizados diversos enzimas específicos, que podem ser facilmente acoplados a outras moléculas através de ligações covalentes. De entre eles destacam-se os seguintes enzimas:

- peroxidase de rábano (EC 1.11.1.17)
  substrato → o-fenileno diamino (OPD)

- fosfatase alcalina (AP) (EC 3.1.3.1)
  substrato → fosfato de p-nitrofenil (pNPP)

- β-galactosidase de *E.coli* (EC 3.2.1.23)
  substrato → 2,4-dinitrofenil-β-D-galactósido

Utilizando os enzimas como agentes de marcação, foram desenvolvidos diversos ensaios imunoenzimáticos que permitem detectar e/ou quantificar antigénios ou anticorpos. Nos vários procedimentos podem ser utilizados não só o antigénio marcado, como o anticorpo marcado. De entre os ensaios imunoenzimáticos destacam-se os ensaios que utilizam, quase invariavelmente, uma separação com o auxílio de uma fase sólida. Este tipo de separação tem uma função adicional que consiste em separar o enzima de marcação exógeno do enzima endógeno ou de inibidores que existam na amostra; a presença de enzima endógeno aumenta muito o branco, o que limita a sensibilidade do ensaio. Por estas razões, o ensaio que está mais difundido e que é mais aplicado é o método imunoenzimático com separação em fase sólida - **ELISA** (*Enzyme-linked immunosorbant assay*). No ELISA, o antigénio ou o anticorpo é adsorvido à parede interna do tubo de reacção (normalmente os poços das placas de 96 poços) ao qual se ligará, respectivamente, o anticorpo ou o antigénio da amostra problema. A presença e/ou a quantificação do complexo Ag.Ac é feita por desenvolvimento da reacção enzimática, após a adição do substrato. O ELISA é um ensaio muito utilizado para a detecção de anticorpos circulantes em diversas situações de doenças infecciosas.

Consoante se pretende detectar e/ou quantificar antigénios ou anticorpos assim foram desenvolvidos diferentes tipos de ELISA.

ELISA competitivo

Os antigénios podem ser quantificados usando uma variante de ELISA, denominada ELISA competitivo. Neste ensaio adiciona-se ao tubo, que contém o anticorpo adsorvido a uma fase sólida, uma mistura que contém o antigénio marcado e o antigénio não marcado, estando o antigénio marcado a uma concentração constante e limitante. Após incubação o excesso de reagentes é desprezado, o sistema é lavado para a eliminação de possíveis contaminantes e é adicionado o substrato do enzima, de modo a permitir a determinação da actividade enzimática. Como referência utiliza-se um tubo em que apenas é adicionado o antigénio marcado, o qual dará o valor máximo na determinação da actividade enzimática. Neste sistema, quanto maior for a quantidade de antigénio presente na amostra, menos antigénio marcado se irá ligar ao anticorpo. Deste modo a concentração de antigénio é inversamente proporcional à actividade enzimática determinada na mistura de reacção. A desvantagem da utilização do ensaio competitivo consiste na necessidade de se desenvolverem diferentes métodos de ligação do enzima ao antigénio, para a preparação dos diferentes antigénios marcados. Na Figura 18 encontra-se esquematizado este tipo de ensaio.

A execução desta técnica, exige o desenvolvimento de diferentes métodos de ligação do enzima a cada antigénio específico, sendo que isto torna esta técnica desvantajosa quando comparada com o ELISA com duplo anticorpo.

ELISA com duplo anticorpo

Os antigénios também podem ser detectados, ou quantificados, usando o ensaio de ELISA com duplo anticorpo. Neste ensaio, tal como no anterior, o anticorpo está imobilizado numa fase sólida disponível para reagir com o antigénio que se encontre na amostra. Após lavagem do sistema para a eliminação de possíveis contaminantes, é adicionado à mistura de reacção um segundo anticorpo marcado com o enzima, que também reconhece o antigénio. Após nova lavagem do sistema, para libertação do excesso de anticorpo marcado não ligado, é adicionado o substrato do enzima e determinada a actividade enzimática. Em condições padronizadas a actividade enzimática é proporcional à quantidade de antigénio específico presente na amostra desconhecida. A vantagem desta técnica de ELISA, é o facto

de só ser necessário desenvolver um método de ligação do enzima aos anticorpos. Na Figura 19 encontra-se esquematizado este tipo de ensaio.

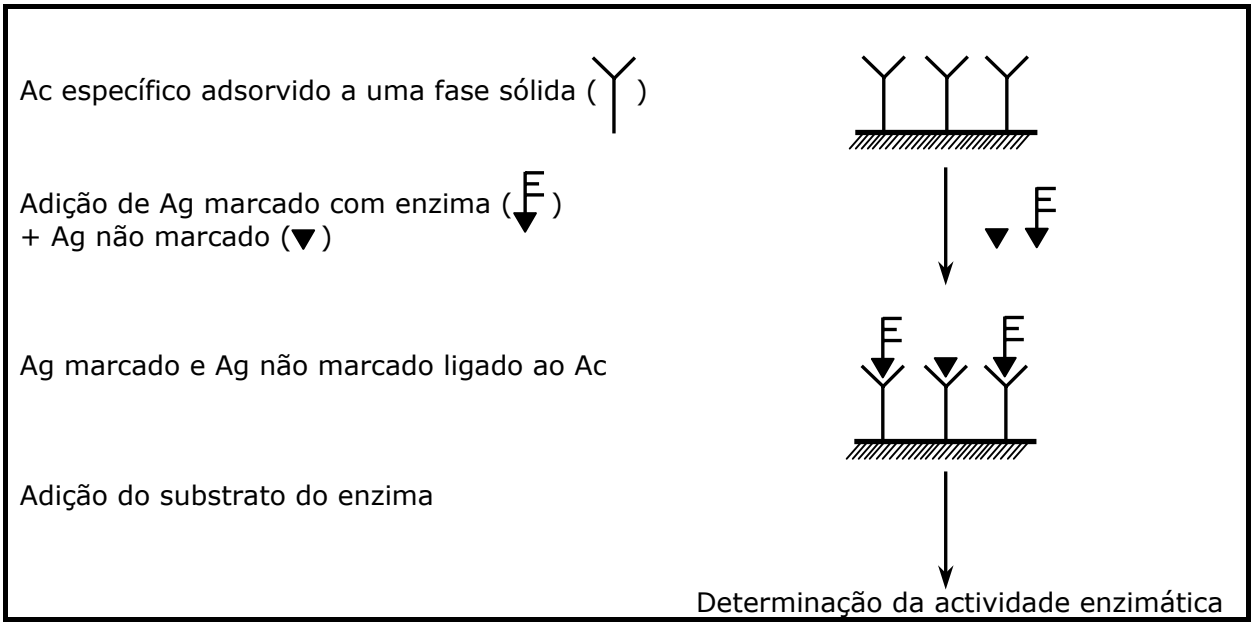

Figura 18. Representação esquemática das etapas de reacção num ensaio ELISA competitivo. Ag, antigénio; Ac, anticorpo específico. (Adaptado de [18]).

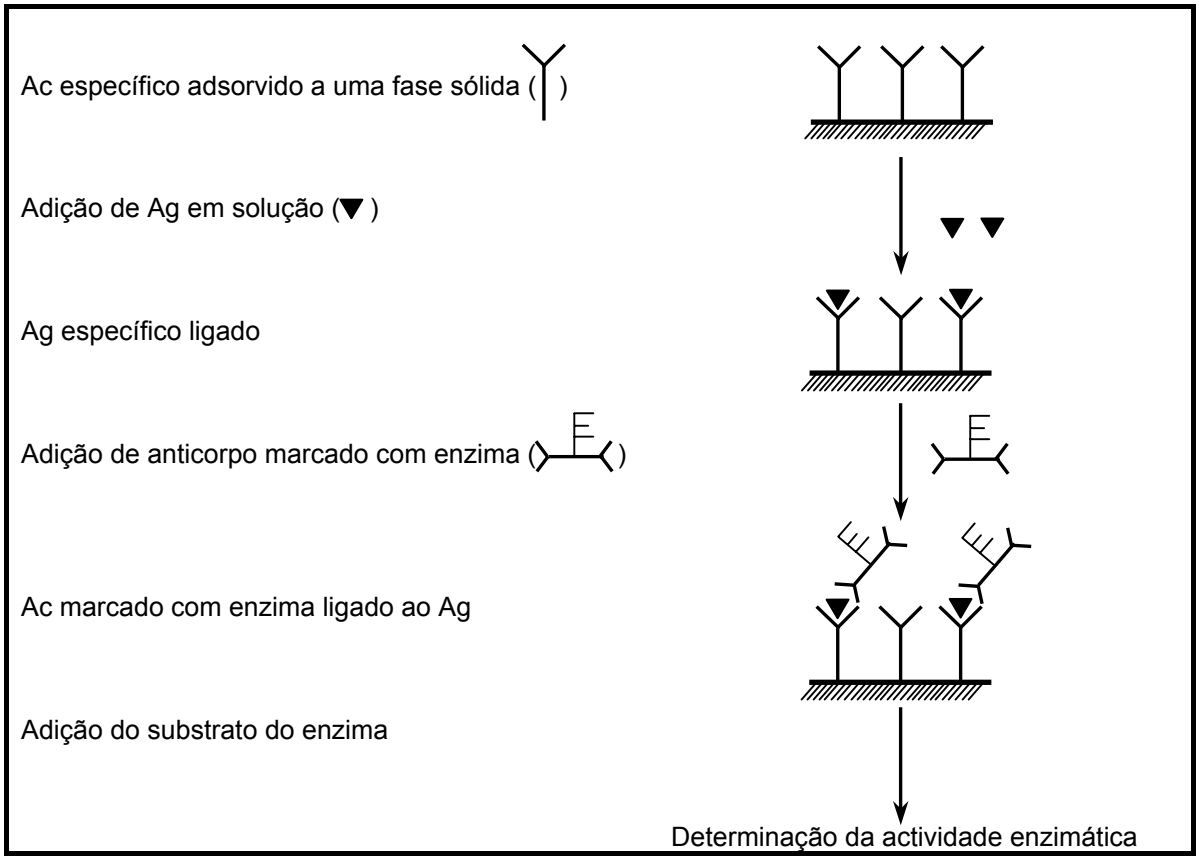

Figura 19. Representação esquemática das etapas de reacção num ensaio ELISA com duplo anticorpo. Ag, antigénio; Ac, anticorpo específico. (Adaptado de [18])

ELISA indirecto

Este ensaio pode ser usado para detectar e/ou quantificar níveis de anticorpo em amostras desconhecidas. Para isso, a amostra a testar deve reagir com o Ag específico que está ligado a uma fase sólida. Qualquer molécula de anticorpo específico liga-se ao antigénio e os restantes compostos são eliminados, após lavagem do sistema de reacção. Com a adição do anticorpo anti-imunoglobulina marcado com enzima, forma-se um complexo com qualquer molécula de anticorpo presente na amostra em estudo que se tenha ligado ao antigénio adsorvido à fase sólida. Após a lavagem do complexo, adiciona-se ao sistema o substrato do enzima e determina-se a actividade enzimática por comparação com a actividade enzimática de padrões. Em condições padronizadas, a actividade enzimática determinada é proporcional à quantidade do anticorpo específico presente na amostra desconhecida. Na Figura 20 encontra-se esquematizado este tipo de ensaio.

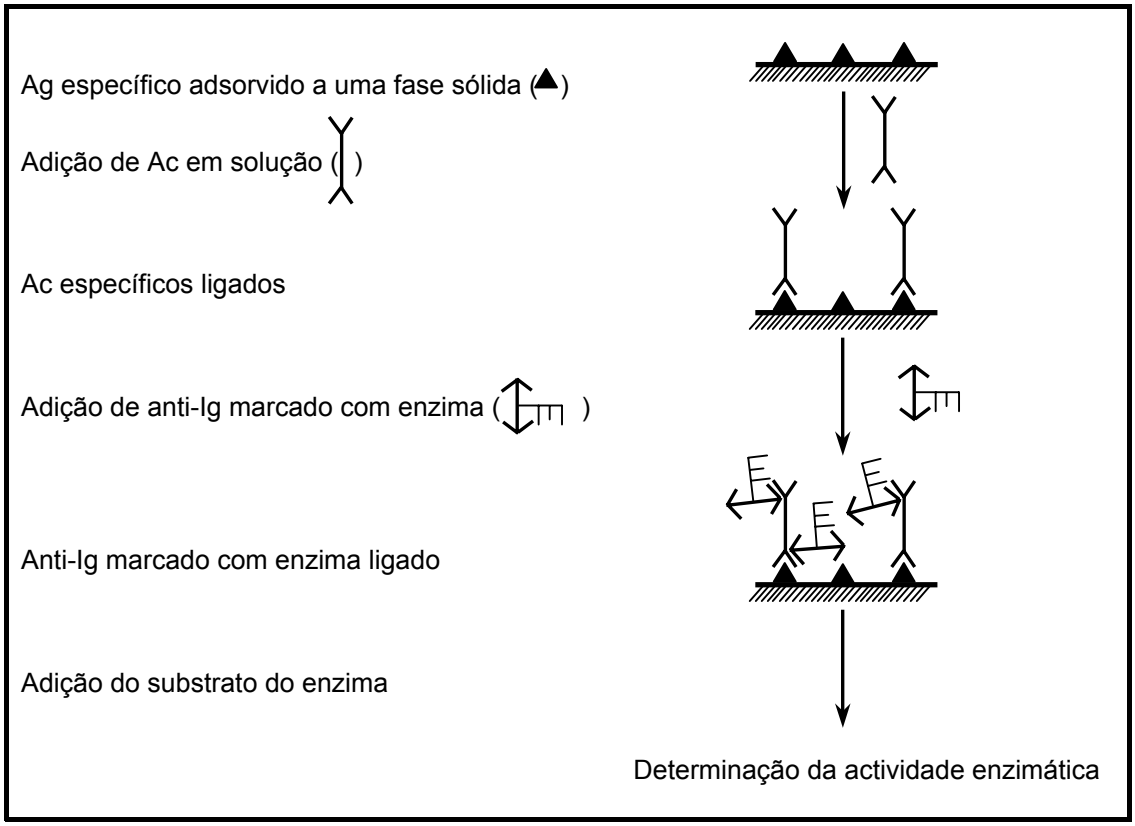

Figura 20. Representação esquemática das etapas de reacção num ensaio ELISA indirecto. Ag, antigénio; Ac, anticorpo específico. (Adaptado de [18]).

Entre as vantagens deste método no doseamento de antigénios encontra-se a sua versatilidade, uma vez que se os anticorpos primários forem produzidos na mesma espécie, é possível utilizar sempre o mesmo anticorpo secundário marcado. Por outro lado, a imunoreactividade do anticorpo primário não é modificada pela marcação pelo enzima e há um aumento da sensibilidade do ensaio pelo facto do anticorpo secundário marcado se poder ligar a vários epítopos do anticorpo primário, o que permite uma maior marcação do antigénio.

Aplicações

As técnicas de radioimunoensaio e técnicas afins têm sido utilizadas para a quantificação/detecção de inúmeros antigénios presentes em pequenas quantidades nos organismos. O diagnóstico clínico, a investigação biomédica e a toxicologia são algumas das áreas em que estas técnicas têm uma enorme aplicação. Nos dois primeiros casos, aplicação destas técnicas aos doseamentos de antigénios permite quantificar proteínas

plasmáticas (por exemplo, IgE, ferritina, transferrina, antigénio da hepatite B), hormonas (por exemplo, FSH, LH, testosterona, estradiol, T3, T4) e marcadores tumorais (por exemplo, α-fetoproteína, hormona gonadotrofina coriónica - HCG, antigénio carcinoembrionário - CEA) enquanto a sua aplicação à detecção e quantificação de anticorpos devidos a infecções, de origem bacteriana (por exemplo, Brucelose), de origem parasitária (por exemplo, toxoplasmose, amebíase) e de origem viral (por exemplo, hepatite B e C, SIDA), permite o diagnóstico de diversas doenças infecciosas. Ainda na investigação, tem sido utilizada para detectar e quantificar um enorme leque de substâncias como, por exemplo, os péptidos envolvidos na comunicação de informação do sistema neurológico, ou proteínas resultantes da expressão de genes truncados em experiências de terapia génica. Em termos de toxicologia, estas técnicas são utilizadas para a detecção de fármacos e drogas como, por exemplo, antibióticos, cocaína e esteróides anabolizantes.

Bibliografia

[1] Yallow, R.S. & Berson, S.A. (1960) Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *.J. Clin. Invest.*, **39**,1157-1175.

[2] Ekins, R.P. (1960) The estimation of thyroxine in human plasma by an electrophoretic technique. *Clin. Chim. Acta*, **5**, 453-459.

[3] Ekins, R.P. & Samols, E. (1963) Immunoassay of insulin with insulin-antibody precipitate. *Lancet*, **2**, 202.

[4] Rothenberg, S.P. (1965) A radio-enzymatic assay for folic acid. *Nature*, **206**,1154-1156.

[5] Lefkowitz, R.J., Roth, J. & Pastan, I. (1970) Radioreceptor assay of adrenocorticotropic hormone: new approach to assay of polypeptide hormones in plasma. *Science*, **170**, 633-635.

[6] Korenman, S.G. (1968) Radio-Ligand Binding Assay of Specific Estrogens Using a Soluble Uterine Macromolecule. *J. Clin. Endoc. Metab.*, **28**, 127-130.

[7] Chard, T. (1990) *An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques*, Elsevier Science Publishers, B. V. (Biomedical Division).

[8] Kirkham, K. E. & Hunter, W. M. (1971) *Radioimmunoassay Methods*, Churchill Livingstone: Edinburgh and London

[9] Odell, W.D., Abraham, G.A., Skowsky, W.R., *et al.* (1971) Production of antisera for radioimmunoassays, in *Principles of Competitive Protein-Binding Assays,* Odell, W.D. and Daughaday, W.H. (ed.), pp 57-88, J.B. Lippincott Company: Philadelphia.

[10] Scatchard, G. (1949) The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **51**, 660.

[11] Moss, A. J., Dalrymple, G. V. & Boyd, C. B. (1976) *Practical Radioimmunoassay*, The C. V. Mosby Company.

[12] *RIA today: Theory and practice in radioimmunoassay* (1984), 1272-971-01, LKB.

[13] Thorell, J. I. (1982) *Ria Design and Quality Control*, Pergamon Press.

[14] Ekins, R. P. (1974) Radioimmunoassay and saturation analysis: Basic principles and theory. *Br. Med. Bull.*, **30**, 3-11.

[15] Ekins, R.P. (1983) The precision profile: its use in assay design, assessment and quality control, In *Immunoassays for clinical chemistry*, Hunter, W.M. and Corrie, J.E.T. (eds.), pp. 76-105 Churchil. Livingstone, Edinburg, London, Melbourne & New York.

[16] Nakane, P.K. & Pierce, G.B. (1966) Enzyme-labeled antibodies: Preparation and application for the localization of antigens. *J.Histochem. Cytochem.*, **14**, 929-931

[17] Schuurs, A.H.W.M. & Van Weemen, B.K. (1977) Enzyme-immunoassay. *Clin. Chim. Acta*, **81**, 1-40

[18] Wilson, K., Goulding, K. A (1986) *Biologist's Guide to Principles and Techniques of Practical Biochemistry*, 3rd ed., Suffolk: Edward Arnold

Abreviaturas

%B – percentagem da fracção ligada relativamente ao total da radioactividade
σ - desvio padrão
ΔD – erro na medição do padrão
μg – micrograma

ΔR – erro na medição da resposta
^{125}I – iodo 125
^{14}C – carbono 14
^{3}H – trítio
Ac – anticorpo
Ag – antigénio não marcado
Ag* - antigénio marcado
Ag*.Ac – complexo antigénio marcado-anticorpo
Ag.Ac – complexo antigénio não marcado-anticorpo
AP – fosfatase alcalina
B – fracção ligada ("bound fraction")
cpm – contagem por minuto
CV – coeficiente de variação
EIA – enzimoimunoensaio ("enzymoimmunoassay")
ELISA – ensaio usando um enzima ligado a um imuno-adsorvente "enzyme-linked immunosorbant assay")
F – fracção livre ("free fraction")
FIA – fluoroimunoensaio ("fluoroimmunoassay")
FSH – Hormona estimulante dos foliculos ("follicle-stimulating hormone")
IEMA – ensaio imunoenzimático("immunoenzymatic assay")
IFMA – ensaio imunofluorimétrico("immunofluorometric assay")
IRMA – ensaio imunoradiométrico ("immunoradiometric assay")
K – constante de equilíbrio
Ka – constante de associação da reacção
Kd – constante de dissociação da reacção
L – ligando não marcado
L* - ligando marcado
LH – Hormona luteinizante ("Luteinizing hormone")
mCi – miliCurie
mmol – milimole
OPD – o-fenileno diamino
PEG – polietilenoglicol
pNPP – fosfato de p-nitrofenil
R – reagente específico
R.L – complexo reagente específico-ligando não marcado
R.L* - complexo reagente específico-ligando marcado
RIA – radioimunoensaio ("radioimunoassay")
T3 – Tri-iodotironina
T4 – tiroxina
TBG – globulina de ligação à tiroxina ("thyroxine binding globulin")