

# PREPARAÇÃO DA TETRAIODOTIRONINA / T<sub>4</sub> / MARCADA COM <sup>125</sup>I PARA DOSEAMENTO DA T<sub>4</sub> TOTAL NO SORO (RIA)

I. SANTOS, L. PATRÍCIO, A. RODRIGUES

Sector de Radioisótopos. Laboratório Nacional de Engenharia e Tecnologia Industrial.

## RESUMO

Neste trabalho descrevem-se, os ensaios realizados com vista à produção de T<sub>4</sub> marcada com I-125 de qualidade reprodutível no que respeita à actividade específica, pureza radioquímica e imunoreactividade. Dado que este produto se destina, juntamente com outros reagentes químicos, ao doseamento radioimunológico da T<sub>4</sub> total no soro, foi ainda estudada a sua estabilidade após marcação.

## SUMMARY

### Preparation of <sup>125</sup>I labelled thyroxine for the assay of total serum T<sub>4</sub>

The preparation of <sup>125</sup>I labelled thyroxine of good quality, in what concerns specific activity, radiochemical purity and immunoreactivity is described. This product will be used to measure the total T<sub>4</sub> in serum, by RIA, so radiochemical and immunochemical stability was also evaluated.

## INTRODUÇÃO

De entre a série de reagentes normalmente necessária ao doseamento radioimunológico de substâncias biológicas, é a qualidade do antígeno marcado, o factor que determina a maior parte dos problemas encontrados ao longo da utilização destes produtos.

Por essa razão será conveniente destacar o cuidado a ter na preparação e controlo de qualidade dos antígenos marcados com radionúclidos, quando estes se destinam a ser usados em radioimunoensaio.<sup>1</sup>

Com efeito, a preparação de um antígeno marcado de qualidade reprodutível poderá determinar o atingirem-se ou não os objectivos que orientam o *design* de um método radioimunológico e que são:<sup>2</sup>

- Elevada sensibilidade;
- Especificidade relativamente ao produto a dosear;

- Elevada precisão intra e inter-ensaio (especialmente nas zonas de interesse clínico).

Assim, o antígeno marcado deverá apresentar:

- Uma energia de ligação ao anticorpo idêntica à do antígeno não marcado. Esta energia poderá ser afectada por alterações verificadas no antígeno antes da sua marcação, durante a marcação ou ainda durante o armazenamento.
- Uma actividade específica suficientemente elevada para que se possam medir com elevada precisão e sensibilidade os níveis de concentração em que estamos interessados;
- Uma pureza radioquímica que evite o aparecimento de ligações que nada têm a ver com a ligação específica.

A preparação e controle de qualidade do antígeno marcado, necessário ao doseamento de T<sub>4</sub> total no soro, são apresentados neste trabalho.

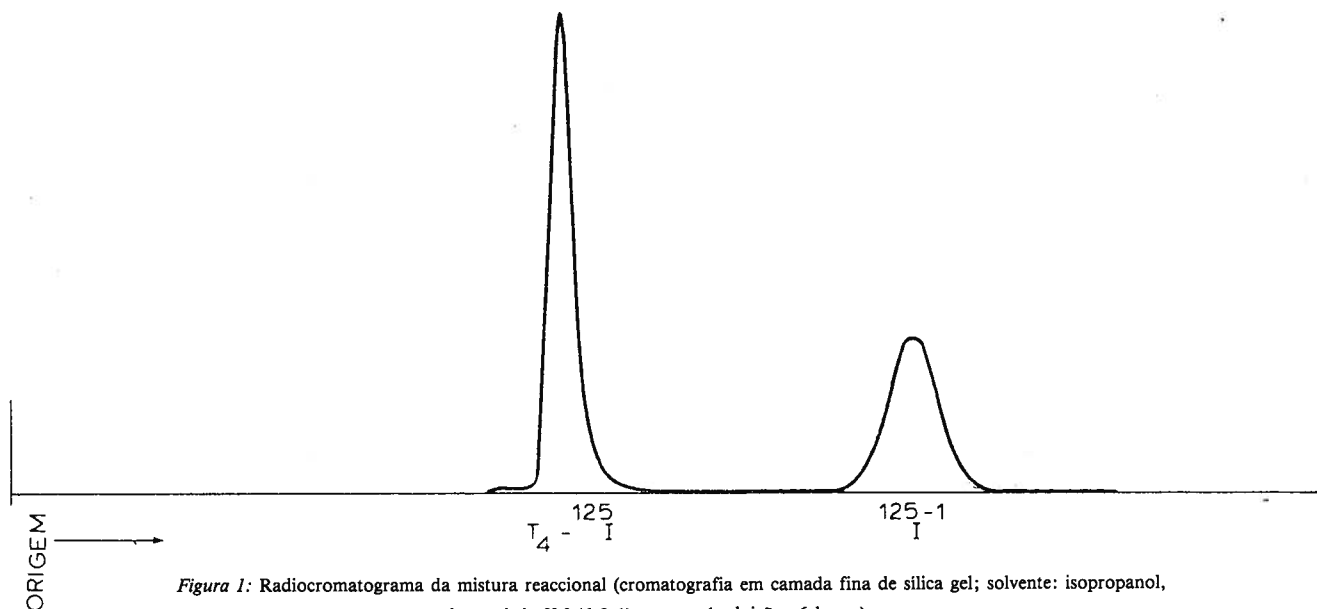


Figura 1: Radiocromatograma da mistura reaccional (cromatografia em camada fina de sílica gel; solvente: isopropanol, etanol e amônia 2M (6:2:1); tempo de eluição: 6 horas).

## MATERIAL, MÉTODOS E RESULTADOS

### 1. Reagentes

$\text{Na}^{125}\text{I}$  (IMS 30) do Radiochemical Center, Amersham; 3,5,3',5' tetraiodo-L-tironina / $\text{T}_4$ / da Sigma Chemical Co; Cloramina-T, metabissulfito de sódio e albumina do soro bovino da BDH Chemicals Lda.; Sephadex LH-20 da Pharmacia Fine Chemicals; Polygram-Sil-G da Macherey Nagel & Co.; anti- $\text{T}_4$  acoplado a uma fase sólida do LNETI, Sacavém.

### 2. Marcação da tetraiodotironina / $\text{T}_4$ /

A 10  $\mu\text{l}$  de uma solução de  $\text{T}_4$  (0,1 gr/1) em propileno glicol 50% (V/V) adicionou-se 1 mCi de uma solução ligeiramente alcalina de  $\text{Na}^{125}\text{I}$ , tamponada com 20  $\mu\text{l}$  de tampão fosfato (0,1M pH=6,2). Seguidamente adicionou-se 10  $\mu\text{l}$  de uma solução de cloramina-T (0,1 gr/1 em tampão fosfato 0,1M pH=6,2). A mistura reaccional foi agitada em vortex, e a reacção interrompida após 80 segundos pela adição de 20  $\mu\text{l}$  de uma solução de metabissulfito de sódio (0,25 g/l em tampão fosfato 0,1M pH=6,2). A mistura foi seguidamente diluída com 100  $\mu\text{l}$  de tampão fosfato.

O rendimento de marcação (55%) foi calculado por cromatografia em camada fina da mistura reaccional.<sup>3</sup> Na Figura 1 apresenta-se o radiocromatograma obtido.

### 3. Purificação da mistura reaccional

A purificação da mistura reaccional foi efectuada por cromatografia em coluna, usando sephadex LH-20,<sup>4</sup> e destinou-se a separar a  $\text{T}_4$ -I-125 do iodeto-125 livre e de possíveis produtos de degradação.

O sephadex LH-20, foi deixado a equilibrar, durante 12 horas, em tampão fosfato 0,05M pH=7,4 e com essa suspensão foi cheia até cerca de 3 ml, uma seringa plástica de 5 ml, usada como coluna.

Após aplicação da mistura reaccional procedeu-se ao seguinte ciclo de eluições:

- Tampão fosfato 0,05M pH=7,4 - 2 ml
- Água destilada - 8 ml
- Metanol: amônia 2M (99:1) - 10 ml

O iodeto-125 não ligado a  $\text{T}_4$  foi eluído na fase aquosa, enquanto a  $\text{T}_4$ -I-125 foi eluída pela mistura metanol amônia. O perfil de eluição obtido foi o indicado na Figura 2.

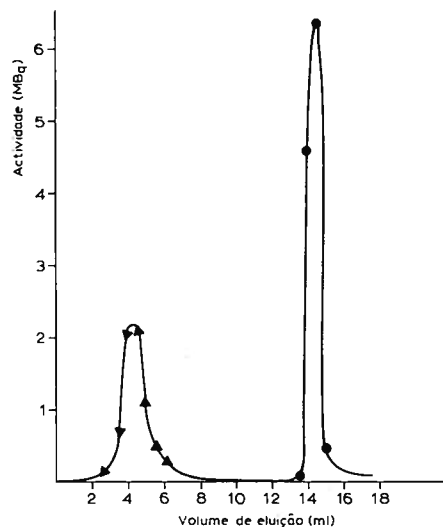


Figura 2: Perfil de eluição da  $\text{T}_4$ -I-125 usando Sephadex LH-20 (▲-▲ I-125; ●-●  $\text{T}_4$ -I-125).

### 4. Determinação da actividade específica da $\text{T}_4$ -I-125

Determinou-se a actividade específica do composto preparado usando o princípio do autodeslocamento.<sup>5</sup>

Assim, traçaram-se três curvas padrão usando a mesma quantidade de anti- $\text{T}_4$  acoplado a uma fase sólida (dil. 1:200) e quantidades crescentes de  $\text{T}_4$ -I-125.

Obtiveram-se as curvas I (24768 cpm/tubo), II (39680 cpm/tubo) e III (53325 cpm/tubo) (Fig. 3).

As diferenças em conteúdo de  $\text{T}_4$ -I-125 entre as amostras das curvas I e II e I e III eram respectivamente de 14912 e 28577 cpm/tubo podendo estes valores ser expressos em termos de n moles  $\text{T}_4$ /tubo.

O excesso médio de  $\text{T}_4$  das curvas III e II relativamente à curva I era de  $3 \times 10^{-5}$  e  $6 \times 10^{-5}$  n mole  $\text{T}_4$ /tubo, respectivamente.

## CONCLUSÕES

O método usado para a preparação da tiroxina I-125 foi o da cloramina-T, já largamente empregado na marcação de hormonas tiroideias. As quantidades de oxidante e redutor foram cuidadosamente estudadas, procurando-se com isso, obter o máximo de incorporação de iodo com o mínimo de danificação da hormona.

A análise dos resultados apresentados na Figura 4 permite-nos afirmar que não só o comportamento da T<sub>4</sub> e da T<sub>4</sub>-I-125 são idênticas, como também que o produto não marcado não apresenta alteração relativamente ao imunogénio usado para a produção dos anti-T<sub>4</sub>, pois que se tal acontecesse a curva quente (▲ - ▲) apareceria mais profunda do que a curva fria (● - ●).

A actividade específica da T<sub>4</sub>-I-125 (390-411 μCi/μg) assegura a sensibilidade e precisão necessária ao doseamento da T<sub>4</sub> total no soro.

A precisão conseguida com a utilização destes produtos é comparável à dos produtos comercialmente disponíveis Figura 5, ao longo de uma gama de concentrações compreendida entre 10 e 300 n mole/l. Esta gama de concentrações é suficientemente ampla, garantindo-nos por isso, que todas as zonas de interesse clínico são abrangidas.

A T<sub>4</sub>-I-125 preparada mostrou, ao longo do período de tempo estudado, uma estabilidade adequada visto que não se verificaram perdas de sensibilidade e precisão significativas Figura 9.

A não detecção de T<sub>3</sub>-I-125 evita que se sobrestimem os valores da T<sub>4</sub> calculados.

## BIBLIOGRAFIA

1. HUNTER, W. M.: Preparation and assessment of iodinated antigens in: Hunter, W. M.; Kirkham, K. E. eds. Radioimmunoassay Methods, Edinburgh and London: *Churchill Livingstone*. 1971; 1-117.
2. EKINS, R.: The «Precision Profile»: Its use in RIA assessment and Design. *The Ligand Quarterly* 1981; 4: 33-44.
3. MUCHA, J.; TALEN P.; ZIMÁCKOVA, M.: Determination of the Specific Activity of <sup>125</sup>I-L-Thyroxine. *Radiochem, Radiation. Letters* 1979; 41: 161-170.
4. BURGER, A.; INGBAR, S. H.: Labelling of thyroid hormones and their derivatives. *Endocrinology* 1974; 94: 1189.
5. WEEKE, J.; HÖRSKOV, R.: «Synthesis of <sup>125</sup>I Monolabelled 3,5,3' Triiodothyronine and Thyroxine of Maximum Specific Activity for RIA. *Scand, J. Clin. Lab.* 1973; 32: 357-360.
6. HUNTER, W. M.: Preparation and assessment of labelled antigen outline of requirements, In: Hunter, W. M. Corrie JET. eds. *Immunoassay for Clinical Chemistry*, Edinburgh and London (in press).
7. BELLABARBA, D. P.; PETERSON, R. F.; SLARTINGK: An improved method for chromatography of iodothyronines. *J. Clin. Endocr.* 1968; 28: 305.
8. LARSEN, P. R.: Triiodo thyronine: Review of recent-studies of its physiology and pathophysiology in men. *Metabolism* 1972; 21: 1703.

Pedido de separatas: Isabel Santos  
Sector de Radioisótopos  
Laboratório Nacional de Engenharia  
e Tecnologia Industrial  
Estrada Nacional, 10  
2685 Sacavém - Portugal