

# CONSTANTE DE AFINIDADE EM RADIOIMUNOANÁLISE

M. AMÉLIA FERRA, C. NOBRE LEITÃO

Química, Centro de Investigação Oncológica (INIC). Serviço de Gastrenterologia. Instituto Português de Oncologia de Francisco Gentil. Lisboa.

## RESUMO

Os autores determinaram os valores da constante de afinidade  $K$ , pelo gráfico de Scatchard e pela representação de Michaelis-Menten em 3 kits existentes no mercado para o doseamento da gastrina sérica. O valor de  $K$  define a estabilidade do complexo antigénio-anticorpo e tem implicações na caracterização de alguns parâmetros do sistema de análise: sensibilidade e saturação do anticorpo.

## SUMMARY

### Affinity Constant in Radioimmunoassay

Values for the affinity constant were determined, in three kits, for seric gastrin, following the Scatchard plot and Michaelis-Menten representation. The determination of the affinity constant,  $K$ , is of great value for it defines the antigen-antibody complex stability and it gives information about some aspects of the analysis system: sensitivity and antibody saturation.

## INTRODUÇÃO

Os doseamentos feitos por radioimunoanálise (RIA) têm cada vez maior aceitação nos laboratórios de Química Clínica, para a determinação quantitativa de uma grande variedade de hormonas, medicamentos, etc.<sup>1</sup>

Normalmente não é possível aos laboratórios em que se executam RIA, construir os seus próprios métodos de análise, recorrendo por isso ao uso de *kits* comerciais disponíveis no mercado. No nosso laboratório apenas realizamos doseamentos seguindo protocolos previamente estabelecidos (*kits* comerciais), onde os tempos de reacção e as concentrações de antigénio e anticorpo estão previamente estabelecidos.

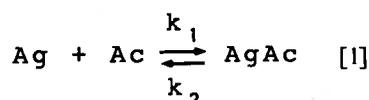
O conhecimento da constante de afinidade  $K$  do anticorpo para o antigénio permite-nos avaliar a respectiva força de ligação (avidez do anticorpo)<sup>2,3</sup>.

O objectivo do presente trabalho é a determinação da constante de afinidade  $K$ , para as respectivas reacções de três *kits* comerciais, usados no doseamento de rotina da gastrina sérica, e assim verificar a força de ligação dos antigénios aos anticorpos.

Esta determinação pode ser também considerada como um método de controlo de qualidade<sup>4,5</sup>.

## MATERIAL E MÉTODOS

Considerações teóricas: A reacção primária entre o antigénio e o anticorpo, no caso de antigénio univalente e anticorpo também univalente, onde uma molécula de antigénio reage apenas com uma molécula de anticorpo e vice-versa, obedece à Lei de Acção da Massa, de 1.ª ordem<sup>6,7</sup>, de acordo com a equação:



em que  $Ag$  representa o ligando (antigénio ou outra molécula a ser ligada),  $Ac$  o ligante (anticorpo, ou receptor), e  $AgAc$  o complexo ligando-ligante (ou complexo antigénio-anticorpo). Trata-se de uma reacção química de 2.ª ordem e  $k_1$  e  $k_2$  são as constantes de velocidade das reacções de associação e dissociação, respectivamente.

Em qualquer reacção química, quando se atinge o equilíbrio, as quantidades de reagentes e produtos da reacção existentes, obedecem à relação:

$$K = \frac{(AgAc)}{(Ag) \cdot (Ac)} \quad [2]$$

em que  $K$  é a constante de equilíbrio e  $(AgAc)$ ,  $(Ag)$  e  $(Ac)$  são as actividades das espécies,  $AgAc$ ,  $Ag$  e  $Ac$ , respectivamente<sup>10</sup>.

A constante de equilíbrio  $K$  está relacionada com as constantes de velocidade pela equação:  $K = k_1/k_2$ .

Dado que a actividade de qualquer espécie em solução é igual ao produto do coeficiente de actividade pela respectiva concentração, a equação [2] é equivalente a:

$$K = \frac{[AgAc] \cdot f_{AgAc}}{[Ag][Ac] \cdot f_{Ag} \cdot f_{Ac}} \quad [3]$$

Para espécies neutras os coeficientes de actividade têm valores próximos da unidade, pelo que a equação [3] se reduz a:

$$K = \frac{[AgAc]}{[Ag] \cdot [Ac]} \quad [4]$$

em que  $[Ag]$ ,  $[Ac]$  e  $[AgAc]$  são as concentrações molares de  $Ag$ ,  $Ac$  e  $AgAc$  e  $K$  é a constante de equilíbrio para a reacção global (que é o efeito combinado das velocidades de associação e dissociação). Esta constante  $K$  relaciona quantitativamente, no equilíbrio, as concentrações do ligando livre  $[Ag]$ , ligando ligado  $[AgAc]$  e os locais de receptor não ocupados, dados por  $[Ac]$ . Trata-se portanto de uma constante física, característica da ligação entre o ligando e o ligante<sup>1,2,4</sup>.

**Material:** Utilizámos 3 kits existentes no mercado para o doseamento da gastrina sérica:

— os kits GASK e GASK-PR da CIS (International Cis-France), o kit para doseamento da gastrina sérica da DPC (Diagnostic Products Corporation — USA) que designamos adiante por kits A, B e C, respectivamente. Para cada um dos kits fizemos os doseamentos, seguindo metodologia proposta pelo fabricante.

**Metodologia do cálculo:** No presente trabalho utilizámos o gráfico de Scatchard, que foi introduzido em RIA por Berson e Yallow<sup>11</sup> e o método de saturação baseado na representação de Michaelis-Menten<sup>1,2,12</sup>. Scatchard<sup>13</sup> caracterizou o estado de equilíbrio para estas reacções com a seguinte equação:

$$R = K (q - b) \quad [5]$$

onde  $q$  é a concentração total (inicial) da molécula ligante (anticorpo —  $Ac$ ),  $b$  a concentração total do ligando ligado

(antigénio —  $Ag$ ) e  $R$  a razão das fracções do ligado/livre, para o ligando ( $B/F$ ). Fazendo um gráfico, com os valores experimentais de  $R$  em função de  $b$ , conhecido como gráfico de Scatchard, obtém-se uma linha recta com declive igual a  $-K$ , que intercepta o eixo dos  $x$  no ponto  $q$ , ou seja, a quantidade de anticorpo presente na reacção<sup>1,2,13,14</sup>, e o eixo dos  $y$  no ponto igual ao produto  $Kq$ .

Um método alternativo para a determinação do valor de  $K$  da reacção antigénio-anticorpo, é o método de saturação sugerido por Odell e Col.<sup>15</sup> baseado na representação Michaelis-Menten da Lei de Acção da Massa, para a determinação da constante de enzimas. Quantidades idênticas de ligante, são progressivamente saturadas por adição de quantidades crescentes de ligando, obtendo-se uma curva de saturação, para o respectivo sistema ligante-ligando, a partir do traçado do gráfico das concentrações de  $AgAc$  em função de  $Ag$  total. A concentração do ligando livre correspondente a 50% de saturação do ligante é o recíproco de  $K$ <sup>1,2,12</sup>.

Nos cálculos dos sistemas de equilíbrio, foram feitas algumas considerações de natureza experimental:

- a hormona não marcada (hormona fria) e a hormona marcada (hormona quente) comportam-se idênticamente na reacção<sup>5,11</sup>;
- as únicas reacções que têm lugar, são as reacções reversíveis entre moléculas de anticorpo e de antigénio, não estando envolvidas reacções secundárias<sup>7,8,16</sup>;
- todas as moléculas reagem biunivocamente<sup>7,9</sup>;
- não há erro experimental na separação das fracções livre e ligada<sup>5,9</sup>;
- o equilíbrio não é perturbado na separação das fracções livre e ligada<sup>9</sup>.

**KIT A**

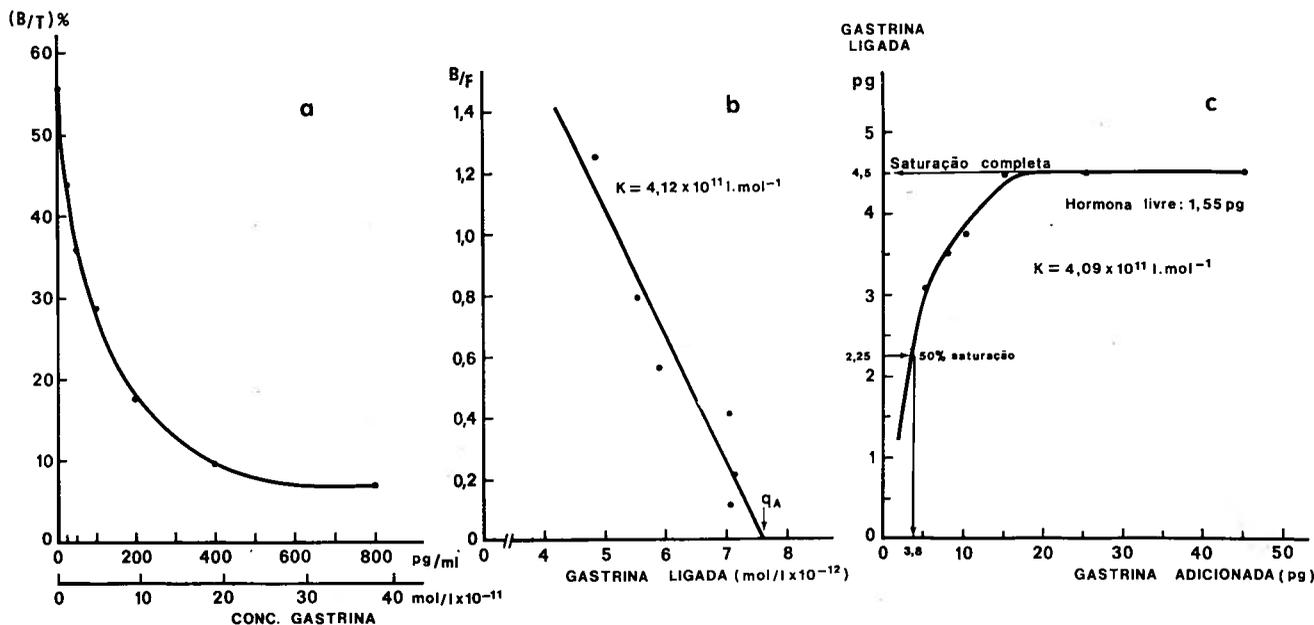


Fig. 1—Kit A: a) Curva Padrão  
 b) Gráfico de Scatchard  
 c) Curva de saturação da representação de Michaelis-Menten

**RESULTADOS**

Para cada um dos kits A, B, C, determinámos as respectivas curvas padrão, (B/T)%, em função de [Ag], e com n=10, para cada concentração padrão (Fig. 1a, 2a e 3a).

a) Gráfico de Scatchard — Para o traçado do gráfico de Scatchard, calculámos em cada kit, para cada concentração padrão, a razão B/F (fracção ligada/fracção livre), e a quantidade de gastrina ligada (gastrina marcada e gastrina não marcada) em l.mol<sup>-1</sup> de solução reagente (Quadro 1, 2 e 3).

Foram considerados os valores da actividade específica da gastrina marcada em  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ , a eficiência do contador usado e o *decay* da gastrina marcada desde a data de marcação até à data da análise.

Traçámos os gráficos de Scatchard para os kits A, B e C, fazendo B/F (y) em função dos respectivos valores da quantidade de gastrina ligada (x), (Fig. 1b, 2b e 3b) e calculámos as respectivas correlações lineares (kit A:  $y = 3,13 - 4,12 \times 10^{-11}x$ ;  $r = 0,951$ ;  $n = 6$ ;  $p < 0,01$ . Kit B:  $y = 1,78 - 2,59 \times 10^{-11}x$ ;  $r = 0,942$ ;  $n = 5$ ;  $p < 0,02$ . Kit C:  $y = 1,04 - 5,04 \times 10^{-11}x$ ;  $r = 0,998$ ;  $n = 6$ ;  $p < 0,01$ ).

A partir do declive de cada uma das rectas traçadas, obtivemos os respectivos valores de K em l.mol<sup>-1</sup>:

kit A —  $K = 4,12 \times 10^{11}$  l.mol<sup>-1</sup>; kit B —  $K = 2,59 \times 10^{11}$  l.mol<sup>-1</sup> e kit C —  $K = 5,04 \times 10^{10}$  l.mol<sup>-1</sup>. O valor de q concentração total do anticorpo presente, encontrado graficamente para cada um dos kits A, B e C, é respectivamente  $q_A = 7,6 \times 10^{-12}$ , mol.l<sup>-1</sup>,  $q_B = 7,0 \times 10^{-12}$  mol.l<sup>-1</sup> e  $q_C = 20,6 \times 10^{-12}$  mol.l<sup>-1</sup>.

b) Representação de Michaelis-Menten — Para cada concentração padrão determinámos a quantidade de gastrina ligada e a gastrina total adicionada (Quadros 1, 2 e 3).

A expressão gráfica da gastrina ligada, em função da gastrina adicionada, é a chamada representação de Michaelis-Menten, que nos permite determinar o valor de gastrina livre para a saturação de 50% de anticorpo (Fig. 1c, 2c e 3c). O inverso deste valor, após a sua conversão a mol.l<sup>-1</sup>, indica-nos os valores de K: kit A —  $K = 4,09 \times 10^{11}$  l.mol<sup>-1</sup>, kit B —  $K = 2,61 \times 10^{11}$  l.mol<sup>-1</sup> e kit C —  $K = 4,97 \times 10^{10}$  l.mol<sup>-1</sup>.

Este método permite-nos ainda determinar a saturação completa do anticorpo, para o título utilizado<sup>1</sup>. A saturação observa-se para o kit A com cerca de 20 pg de gastrina adicionada (o que corresponde a uma concentração padrão de 150 pg/ml), para o kit B com cerca de 65 pg de gastrina adicionada (o que corresponde a uma concentração padrão de 500 pg/ml) e para o kit C com cerca de 130 pg (o que corresponde a uma concentração padrão de 600 pg/ml). Acima dos valores referidos, para cada um dos kits, 150 pg/ml, 500 pg/ml e 600 pg/ml, o anticorpo está completamente saturado e não é possível um valor de análise correcto.

**QUADRO 1 — Kit A: Valores calculados, a partir da curva padrão (B/T)%, necessários para o traçado do gráfico de Scatchard e representação de Michaelis-Menten.**

Concentração Padrão pg/ml	(B/T)%	B/F	Gastrina Ligada pg	Gastrina Ligada mol.l <sup>-1</sup> × 10 <sup>12</sup>	Gastrina Adicionada pg
0	55,6	1,25	3,058	4,82	5,5
25	44,0	0,79	3,520	5,55	8,0
50	35,7	0,56	3,749	5,91	10,5
100	28,9	0,41	4,480	7,06	15,5
200	17,7	0,21	4,514	7,12	25,5
400	9,8	0,11	4,459	7,03	45,5
800	7,1	0,08	6,071	9,57	85,5

**QUADRO 2 — Kit B: Valores calculados, a partir da curva padrão (B/T)%, necessários para o traçado gráfico de Scatchard e representação de Michaelis-Menten.**

Concentração Padrão pg/ml	(B/T)%	B/F	Gastrina Ligada pg	Gastrina Ligada mol.l <sup>-1</sup> × 10 <sup>12</sup>	Gastrina Adicionada pg
0	37,34	0,60	5,153	4,88	13,8
20	32,88	0,49	5,195	4,92	15,8
60	27,99	0,39	3,542	5,24	19,8
150	20,40	0,26	5,875	5,56	28,8
500	10,85	0,12	6,922	6,55	63,8
1500	5,52	0,06	9,042	8,55	163,8

**QUADRO 3 — Kit C: Valores calculados, a partir da curva padrão (B/T)%, necessários para o traçado gráfico de Scatchard e representação de Michaelis-Menten.**

Concentração Padrão pg/ml	(B/T)%	B/F	Gastrina Ligada pg	Gastrina Ligada mol.l <sup>-1</sup> × 10 <sup>12</sup>	Gastrina Adicionada pg
0	41,84	0,72	5,308	6,28	12,69
25	38,63	0,63	6,833	8,08	17,69
50	35,60	0,55	8,077	9,55	22,69
100	31,06	0,45	10,153	12,01	32,69
200	23,84	0,31	12,560	14,85	52,69
600	11,28	0,13	14,967	17,70	132,69
1200	8,075	0,09	20,404	24,13	252,69

**DISCUSSÃO**

As características fundamentais de RIA, ou de qualquer outra análise de ligação estão relacionadas com a força de ligação do composto formado (avidez do ligante-ligando), indicada pelo valor da constante de afinidade K, ou pelo valor pK ( $pK = \log 1/K$ )<sup>14,17</sup>.

De acordo com Thorell<sup>2</sup> e Chard<sup>4</sup>, o valor de K deverá ser elevado (em regra superior a 10<sup>9</sup> l.mol<sup>-1</sup>) pelo facto das concentrações dos reagentes presentes serem muito baixas (ordem do nanograma ao picograma).

Os valores de K e pK, determinados pelo gráfico de Scatchard ou pela representação de Michaelis-Menten são similares para cada um dos kits estudados (Quadro 4). Comparando os valores de K encontrados, constatamos que este é mais elevado no kit A (1,5 vezes o do kit B e 8 vezes o do kit C) e que os valores para os kits A e B são relativamente próximos, sendo a diferença entre estes e o kit C duma ordem de grandeza a valorizar<sup>2,4</sup>.

Em trabalhos anteriores<sup>18,19</sup>, calculámos a sensibilidade para cada um dos kits referidos: kit A=2 pg/ml, kit B=4 pg/ml e kit C=8 pg/ml. A generalidade dos autores<sup>1,3,20</sup> considera que a sensibilidade está relacionada com o valor de K e para Thorell um aumento de 10 vezes no valor de K aumenta a sensibilidade aproximadamente na mesma proporção, não havendo qualquer influência da actividade específica do radioligando. No nosso trabalho, as actividades específicas são similares: 1000  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$  para o kit A, 766  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$  para o kit B e 1000  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$  para o kit C; as sensibilidades de cada um dos kits, variam no mesmo sentido que os valores de K, mas não na razão sugerida por Thorell.

Berson e Yallow<sup>7</sup> definiram sensibilidade em RIA, como a mais pequena variação mensurável do declive da curva dose-resposta, db/d [H], onde b é a percentagem de antígeno ligado e [H] a concentração do antígeno; concluíram que a sensibilidade é limitada pelo valor de K e que é máxima para  $db/d [H] = -4K/27$ .

KIT C

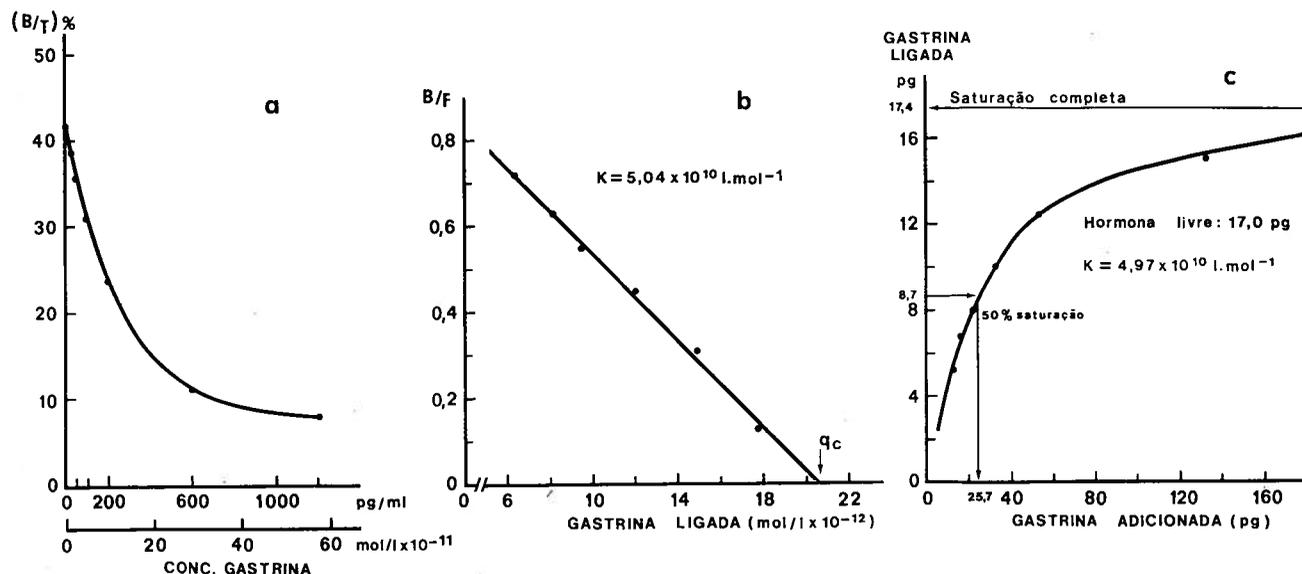


Fig. 2—Kit B: a) Curva Padrão  
b) Gráfico de Scatchard  
c) Curva de saturação da representação de Michaelis-Menten

KIT B

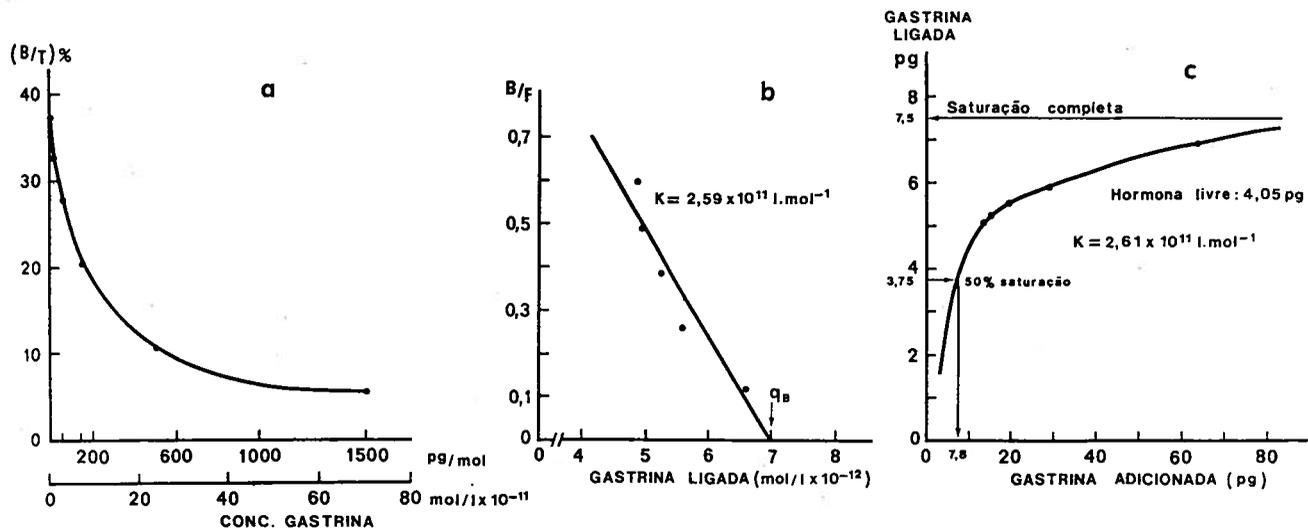


Fig. 3—Kit C: a) Curva Padrão  
b) Gráfico de Scatchard  
c) Curva de saturação da representação de Michaelis-Menten

Também para Ekins a sensibilidade depende do valor de  $K^{20}$ . Ekins, define sensibilidade como concentração mínima do antígeno detectável<sup>20</sup> e afirma que a sensibilidade é igual a  $4\sqrt{2} \sqrt{KSVT}$  onde S é a actividade específica do marcador, V o volume da mistura da reacção e T o tempo de contagem em minutos.

A determinação do valor de K é fundamental no estudo e comparação de kits de RIA dando-nos uma informação da

QUADRO 4—Valores de K e pK para cada um dos kits estudados.

	K Gráfico Scatchard l.mol <sup>-1</sup>	K Met. Michaelis- Menten l.mol <sup>-1</sup>	pK Gráfico Scatchard	pK Met. Michaelis- Menten
Kit A	$4,12 \times 10^{11}$	$4,09 \times 10^{11}$	— 11,61	— 11,61
Kit B	$2,59 \times 10^{11}$	$2,61 \times 10^{11}$	— 11,41	— 11,42
Kit C	$5,04 \times 10^{10}$	$4,97 \times 10^{10}$	— 10,70	— 10,70

estabilidade dos complexos formados<sup>3</sup>. Acessoriamente indica-nos a concentração do anticorpo adequada ou a usada — gráfico de Scatchard<sup>2,4,13</sup> — e a quantidade de antígeno presente que determina uma saturação completa do anticorpo — Michaelis-Menten<sup>1,2,12</sup>. Para valores de 150 pg/ml para o kit A, 500 pg/ml para o kit B e 600 pg/ml para o kit C, a saturação do respectivo anticorpo é quase completa e a imprecisão dos doseamentos com resultados próximos destes valores, para cada um dos kits, será provavelmente muito elevada pelo que não devem ser considerados na clínica<sup>18,21</sup>. No entanto, uma definição correcta da precisão de todos os doseamentos implica a construção de perfis de percisão<sup>22</sup>.

## CONCLUSÕES

É simples a determinação do valor de K em RIA, dado que pode ser feita a partir de uma curva padrão, quer pelo gráfico de Scatchard quer pela representação de Michaelis-Menten e está dentro da capacidade de todos os laboratórios de Química Clínica.

Para os kits A e B os valores de K encontrados,  $4,12 \times 10^{11}$  l.mol<sup>-1</sup> e  $2,59 \times 10^{11}$  l.mol<sup>-1</sup> são da mesma ordem de grandeza e exprimem uma estabilidade do complexo antígeno anticorpo superior à determinada para o kit C,  $5,04 \times 10^{10}$  l.mol<sup>-1</sup>.

A saturação completa do anticorpo, verifica-se para concentrações padrão de antígeno de 150 pg/ml, 500 pg/ml e 600 pg/ml para os kits A, B e C, respectivamente.

## BIBLIOGRAFIA

- ZETTNER A.: Principles of competitive binding assays (Saturation Analyses) I. Equilibrium Techniques, Clin. Chem. 1973; 19/7: 699-705.
- THORELL J.I., LARSON S.M.: Radioimmunoassay and related techniques, Saint Louis, The C.V. Mosby Company, 1978: 14-18.
- REHFELD J.F.: The influence of antiserum properties on Radioimmunoassay characteristics, In: Thorell J.I., Radioimmunoassay design and Quality Control, Pergamon Press, 1982.
- CHARD T.: An introduction to Radioimmunoassay and related techniques, Amsterdam — New York — Oxford, North-Holland, Publishing Company, 1981: 321-328.
- RODBARD D., TACEY R.L.: Radioimmunoassay dose interpolation based on the Mass Action Law with antibody heterogeneity. Analytical Biochemistry 1978; 90: 13-21.
- RODBARD D., RUDER H.J., VAITUKAITIS J., JACOBS H.S.: Mathematical Analysis of Kinetics of Radioligand assays: Improved sensitivity obtained by delayed addition of labeled ligand. J. Clin. Endocr. 1971; 33: 343-355.
- BERSON S.A., YALLOW R.S.: Immunoassay of protein hormones; dependence of sensitivity of assay on energy of antigen-antibody reaction, In: Pineus G.K.U., Thimann, Astwood E.B., The Hormones. Academic Press, New York, 1964; IV, II D: 567-572.
- KETELSLEGERS J.M., KNOTT G.D., CATT K.J.: Kinetics of gonadotropin binding by receptors of the rat testis. Analysis by nonlinear curve-fitting method, Biochemistry, 1975; 14/14: 3075-3083.
- FELDMAN H.A.: Mathematical theory of complex ligand-binding systems at equilibrium: Some methods for parameter fitting. Analytical Biochemistry, 1972; 48: 317-338.
- GLASSTONE S., LEWIS D.: Elements of Physical Chemistry. 2nd edition, McMillan Press Ltd., 1976: 507-509.
- BERSON S.A., YALLOW R.S.: Quantitative aspects of the reaction between insulin and insulin-binding antibody. J. Clin. Invest. 1959; 38: 1996.
- RODBARD D.: Mathematics and Statistics of Ligand Assays: an Illustrated Guide, In: Langen J. and Clapp J.J., Ligand Assay, Masson Publishing USA, Inc. 1981: 45-58.
- SCATCHARD G.: The attractions of proteins for small molecules and ions, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1949; 51: 660.
- YALKES W.H.C.: An approach to immunoassay. Clinical Chemistry, 1972; 23/2: 384-402.
- ODELL W.D., ABRAHAM G., RAND H.R., SWERDLOFF R.S., FISHER D.A.: Influence of immunization procedures in the titer, affinity and specificity of antisera to glycopolypeptides. Acta Endocrinol. (Copenhagen) Suppl 1969; 140: 54.
- FELDMAN H., RODBARD D., LEVINE D.: Mathematical theory of cross-reactive radioimmunoassay and ligand-binding system at equilibrium. Analytical Biochemistry, 1972; 45: 530-556.
- DOGNON A.: Physico-Chimie Medicale, 4<sup>e</sup> édition. Paris. Editions Médicales et Universitaires, 1974: 59.
- LEITÃO C.N., FERRA M.A.: RIA da gastrina sérica. Controlo de qualidade e valores séricos em indivíduos normais e em diferentes situações clínicas. Comunicação à Reunião Nacional da Sociedade Portuguesa de Gastroenterologia, Núcleo de Hepatologia e Sociedade Portuguesa de Endoscopia Digestiva, Abril 1984, Lisboa.
- LEITÃO C.N., FERRA M.A.: Estudo do controlo de qualidade em RIA a partir da constante de equilíbrio da ligação antígeno-anticorpo. Comunicação ao III Congresso Nacional de Medicina Nuclear, Abril de 1985, Coimbra.
- EKINS R., NEWMAN B.: Theoretical aspects of saturation analysis. Karolinska Symposium on Research methods in reproductive endocrinology — 2nd Symposium — Steroid Assay by protein binding, March 1979: 11-36.
- LEITÃO C.N., FERRA M.A., SIMÕES A.S.: Gastrina sérica. Suas aplicações clínicas. Med. Cir. 1981; 1: 137-140.
- EKINS R.: The Precision Profile: its use in RIA. Assessment and design. The Ligand Quarterly, 1981; 4/2: 33-44.

Pedido de separatas:  
C. Nobre Leitão  
Gastroenterologia  
Instituto Português de Oncologia  
Rua Professor Lima Bastos  
1093 Lisboa Codex