

B09229167

ISSN 0101-3084



CNEN/SP

ipen Instituto de Pesquisas
Energéticas e Nucleares

GOVERNO DO BRASIL

**PRODUÇÃO DE REAGENTES BIOLÓGICOS PARA RADIOIMUNOENSAIO:
SEGUNDO ANTICORPO**

Vânia Caira BORGHI, Sandra Rosa da SILVA, Maria Helena BELLINI e Lin Hui LIN

IPEN-Pub-361

FEVEREIRO/1992

SÃO PAULO

**PRODUÇÃO DE REAGENTES BIOLÓGICOS PARA RADIOIMUNOENSAIO:
SEGUNDO ANTICORPO**

Vânia Caira BORGHI, Sandra Rosa da SILVA, Maria Helena BELLINI e Lin Hui LIN

DEPARTAMENTO DE APLICAÇÕES EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**CNEN/SP
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
SÃO PAULO – BRASIL**

Série PUBLICAÇÃO IPEN

INIS Categories and Descriptors

C62.00

RADIOIMMUNOASSAY
ANTIBODIES
REAGENTS
IMMUNE SERUMS
HORMONES
IMMUNOGLOBULINS

IPEN - Doc - 4124

Aprovado para publicação em 09/10/91

Nota: A redação, ortografia, conceitos e revisão final são de responsabilidade do(s) autor(es).

PRODUÇÃO DE REAGENTES BIOLÓGICOS PARA RADIOIMUNOENSAIO:
SEGUNDO ANTICORPO (X)

Vânia Caira BORGHI, Sandra Rosa da SILVA, Maria Helena
BELLINI e Lin Hui LIN

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR - SP
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Caixa postal 11049 - Pinheiros
05499 - São Paulo - BRASIL

RESUMO

Uma boa técnica de separação de radioimunoensaio (RIE) é essencial para desenvolver ensaios precisos para aplicação clínica. O método do duplo anticorpo é o mais amplamente empregado, satisfazendo a maioria dos critérios de aplicabilidade. Entretanto, sua desvantagem principal é o seu custo elevado, que muitas vezes leva ao emprego de reagentes menos onerosos, mas que não são tão eficientes. Portanto, nossa instituição está produzindo experimentalmente um segundo anticorpo para ser empregado em radioimunoensaios hormonais, em que o primeiro anticorpo é gerado em coelhos. Quatro carneiros foram imunizados com a imunoglobulina preparada em nosso laboratório (Silva e Borghi, Publicação IPEN 294, 1990). Seus antissoros foram avaliados em um sistema de RIE de tireotrofina humana, empregando-se reagentes obtidos do "National Hormone and Pituitary Program (USA)", em comparação com um antissoro de referência de qualidade conhecida, produzido em cabra pela Radioassay Systems Laboratories - RSL (USA). Após a quarta injeção de reforço esses animais desenvolveram antissoros com título similar aquele exibido pelo produto comercial, apresentando inclusive, valores mais altos. Esses antissoros agora estão sendo examinados quanto às suas condições ótimas de precipitação antes de serem armazenados para futuro uso e distribuição.

(X) Trabalho apresentado no "II Congresso Latinoamericano de Biotecnologia" - Havana - Cuba, de 7 a 11 de Agosto de 1990.

PRODUCTION OF BIOLOGICAL REAGENTS FOR RADIOIMMUNOASSAY:
SECOND ANTIBODY (X)

Uânia Caira BORGHI, Sandra Rosa da SILVA, Maria Helena
BELLINI e Lin Hui LIN

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR - SP
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Caixa Postal 11049 - Pinheiros
05499 - São Paulo - BRASIL

ABSTRACT

A good radioimmunoassay (RIA) separation technique is essential to develop precise assays for clinical application. The double antibody method is one of the most widely employed, satisfying the majority of the criteria of suitability. However, its high cost is its main disadvantage, which leads to employ less expensive reagents, there are not so efficient. Therefore, our institution is producing experimentally a second antibody to be used in hormonal assays, in which the first antibody is raised in rabbits. Four sheeps were immunized with the rabbit immunoglobulin prepared at our laboratory (Silva and Borghi, Publicação IPEN 294, 1990). Their antisera were evaluated by the human thyrotropin RIA employing materials provided by the National Hormone and Pituitary Program (USA), in comparison with a reference antiserum of known quality, produced in goat by the Radioassay Systems Laboratories - RSL (USA). From the fourth booster injection the animals developed antiserum with titer similar to that exhibited by the commercial product, even presenting higher values. These antisera are now being examined for the optimal conditions of precipitation before be packed for future use and distribution.

(X) Paper presented at the "2nd Latin-American Congress of Biotechnology", held in Havana-Cuba, August 07-11, 1990.

INTRODUÇÃO

O radioimunoensaio (RIE) é uma técnica analítica que emprega quantidades diminutas de radioatividade e anticorpos específicos para medir substâncias existentes em microquantidades no organismo, tais como hormônios, vírus, drogas, vitaminas, antígenos tumorais e outras (1).

As bases do RIE foram enunciadas por Berson e Yalow em 1957 (2) e culminaram com o desenvolvimento de um ensaio para a medida de insulina no plasma humano em 1959 (3). As características principais desta técnica, sua sensibilidade e especificidade elevadas, determinaram seu rápido desenvolvimento e seu amplo emprego em análises clínicas nos últimos 20 anos.

Atualmente, nos países em desenvolvimento, cerca de 500 hospitais, universidades e laboratórios de análises clínicas realizam estes ensaios em alguma proporção (4). No Brasil, com raras exceções, a execução do RIE ainda depende da importação de seus reagentes biológicos, quer seja à granel ou na forma de conjuntos diagnósticos, o que resulta num preço elevado deste exame.

A maioria dos RIEs são similares na etapa inicial de incubação do anticorpo com o antígeno marcado isotopicamente e com o antígeno padrão ou com a amostra desconhecida. Entretanto, eles diferem quanto ao método utilizado na etapa final para separar o antígeno ligado ao anticorpo daquele livre (1), que é a principal fonte de imprecisão destes ensaios.

O método de separação denominado de duplo anticorpo, que emprega um segundo anticorpo para precipitar o complexo antígeno-anticorpo, é um dos mais utilizados, satisfazendo os critérios de eficiência, praticabilidade e aplicação geral (5).

O segundo anticorpo é produzido imunizando o animal de uma outra espécie com a imunoglobulina G (IgG) da espécie animal que gerou o primeiro anticorpo, fornecendo um antissoro capaz de precipitá-lo. Quando adicionado ao RIE, este antissoro converte o complexo solúvel antígeno-anticorpo em uma forma insolúvel, que pode ser facilmente separada do antígeno livre pela centrifugação, seguida de decantação ou aspiração.

Dessa forma, o segundo anticorpo separa completamente a fração ligada daquela livre sem alterar o equilíbrio da reação inicial antígeno-anticorpo, havendo pouca interferência pelo antígeno livre, ou seja, apresentando ligação inespecífica baixa. Ele pode ser empregado em diferentes RIEs, com volumes de incubação variados e que compreendam um grande número de amostras. Entretanto, sua desvantagem principal é o seu custo elevado, que muitas vezes conduz ao emprego de reagentes menos onerosos, mas que não são tão eficientes para a separação dos RIEs.

Realizou-se portanto, no presente trabalho a produção de segundo anticorpo, a ser empregado nos diversos RIEs realizados em nossos laboratórios, cujos primei-

6

ros anticorpos são gerados em coelhos. O preparo deste segundo anticorpo visa a produção local de reagentes biológicos de RIE para substituir os produtos importados.

MATERIAIS E MÉTODOS

Utilizaram-se quatro ovinos deslançados, cordeiros, do sexo masculino, provenientes do Instituto de Zootecnia da Secretaria da Agricultura de São Paulo (IZSA), que permaneceram alojados no Biotério de animais de grande porte do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP), (tabela I). Após um período de adaptação de 15 dias, coletaram-se amostras de sangue e de fezes para a realização de exames hematológico e parasitológico, na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP (FMVZ/USP), a fim de verificar o estado geral de saúde dos animais.

Dois animais (146 e 163), cujos exames haviam apresentado resultados positivos para nematóide (até 1050 ovos de Strongyloidea sp por grama de fezes) e protozoário (até 2950 oocistos de coccídeos), foram tratados com vermífugo à base de sulfa e de albendazole. Durante o tratamento, o animal 146 também apresentou problemas nas vias aéreas superiores, sendo medicado com antibiótico. Esses animais só foram submetidos à experimentação após terem sido recuperado plenamente. Os resultados de seus últimos exames laboratoriais estão indicados na tabela II, cujos valores são compatíveis com o padrão de normalidade para ovinos descrito na literatura (6).

A imunização dos ovinos foi realizada empregando-se IgG de coelho obtida em nossos laboratórios através do fracionamento do soro com sulfato de sódio, seguido de cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose (7).

Foram realizadas injeções subcutâneas de 2 ml de uma emulsão formada por volumes iguais de solução fisiológica contendo IgG (500 ug) e de adjuvante de Freud completo, distribuídos em 20 pontos da região paraesternal dos animais. Essas injeções foram repetidas com intervalo de 20 dias, colhendo-se pequenas amostras de sangue pela veia jugular, 10 dias após cada injeção de reforço, para a avaliação do imunossoro dos carneiros anti-IgG de coelho.

Duas sangrias de volumes maiores foram realizadas pela mesma via a cada quatro injeções de reforço, compreendendo cerca de 1,5 litros obtidos em duas colheitas espaçadas de três dias. Após cada uma dessas sangrias de grandes volumes os animais foram submetidos a um período de descanso, respectivamente de 70 e de 140 dias, antes de serem imunizados novamente.

Os antíssoros provenientes das diferentes sangrias foram avaliados quanto ao seu título em comparação com um segundo anticorpo de qualidade conhecida, produzido em cabra por Radioassay Systems Laboratories - RSL - (lote 2R2 MBC) e distribuído por ICN Biomedicals, Inc., USA, num sistema de RIE de tireotrofina humana (hTSH). Este RIE foi desenvolvido em nossos laboratórios empregando a técnica de separação pela precipitação com polietileno-glicol (8), que é um reagente mais barato mas não tão eficiente como segundo anticorpo para a separação do RIE de

hTSH.

Portanto, este RIE foi adaptado para a técnica de separação pelo duplo anticorpo seguindo-se as especificações de uso do anticorpo RSL: adição de 1% de soro de coelho normal no tampão de ensaio, correspondendo a uma quantidade de 0,016% de IgG carreadora (9) acima do mínimo recomendado por RSL de 0,005% e emprego de 0,1 ml do segundo anticorpo com incubação por 90 minutos, sendo o mínimo recomendado por RSL de 1 hora, à temperatura ambiente.

O antígeno para marcação, hTSH-I-6 (AFP-8770B) e hTSH-I-7 (AFP-8644B), e o primeiro anticorpo produzido em coelho anti-hTSH-3 (AFP-C611818) foram obtidos do National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, USA, estabelecendo-se a diluição deste antissoro que liga 50% do antígeno marcado. Nessas condições foram construídas curvas de título dos segundos anticorpos obtidos nas várias sangrias nas diluições, que variaram de 1:2 até 1:32, estabelecendo-se os títulos que forneceram uma precipitação máxima da fração ligada do ensaio, numa região de platô (ligação antígeno marcado-primeiro anticorpo em torno de 50%).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A formação de grânulos nos locais de injeção do imunógeno foi visualizada nos animais poucos dias após a imunização primária (figura 1).

Vinte dias após o primeiro período de descanso, o ovino 146 apresentou um cálculo uretral que foi extraído por meio de uma intervenção cirúrgica com remoção do apêndice vermiforme no Hospital Veterinário da FMUZ/USP. Conseqüentemente este animal não recebeu a sexta injeção de reforço e só depois de completamente recuperado é que foi submetido novamente à experimentação.

No trigésimo dia do segundo período de descanso, o ovino 285 também apresentou urolitíase, porém com ruptura de bexiga e coleção de urina a nível de sub-cutâneo na porção ventral do abdome e membros pélvicos. Por indicação médico veterinário, o animal foi sacrificado naquele Hospital, ocasião em que foram colhidos 1,5 litros de sangue da veia jugular. Nesse mesmo período, o ovino 249 veio subitamente a óbito, não sendo possível colher seu sangue e nem realizar a autópsia para a determinação da causa de sua morte.

Após esse incidente, foram realizados exames hematológico e parasitológico de fezes nos ovinos restantes, 146 e 163, cujos resultados apresentados na tabela III confirmaram o estado de saúde normal desses animais. Entretanto, vinte dias após o segundo período de descanso, o ovino 146 apresentou recidiva de urolitíase, que devido a sua localização necessitou ser removida por uma segunda intervenção cirúrgica, uretrocistotomia e castração do animal. Devido a seqüela do próprio procedimento cirúrgico este ovino deixou de ser experimentado.

Até o aparecimento do primeiro cálculo no ovino 146, todos os animais estavam sendo alimentados apenas com ração, cujo excesso de carboidratos pode ter desencadeado este problema. Desde então, passou-se a oferecer verde, capim, junto com a ração e a partir do segundo período de descanso o verde constituiu a única fonte de alimento dos animais. Em caso de falta de verde acrescentou-se à ração cloreto de amônio, na dose de 200 miligramas por peso do animal, a fim de acidificar a urina impedindo a formação de cristais.

A figura 2 apresenta a evolução dos títulos dos antissoros dos ovinos no período em que foram imunizados com a IgG de coelho. As respectivas curvas de título dos antissoros de cada animal estão representadas nas figuras 3 a 6 em comparação com aquela do antissoro importado RSL.

Como pode ser observado na figura 2, os animais que foram submetidos a tratamento antes de serem imunizados (163 e 146), apresentaram uma resposta tardia para a indução de anticorpos adequados, cujos títulos somente puderam ser estimados após a 4ª injeção de reforço (figuras 3 e 4 respectivamente). Nessa ocasião, o animal 285 já apresentava antissoro com título de 1:8, enquanto que os

demais apresentavam antíssoros com título mais baixo, de 1:3. Esses títulos aumentaram após as imunizações que sucederam os períodos de repouso, atingindo valores de 1:7 para o animal 163 após a 7ª e o 11ª reforços, de 1:8 e 1:9, respectivamente, para os animais 249 e 285 após o 6ª reforço e de 1:5 para o animal 146 após sua recuperação (7ª reforço).

Esse efeito do descanso sobre a produção de anticorpos já havia sido verificado por Chapman e cols. (10) em jumentos imunizados com IgG de coelho, que também apresentaram títulos mais elevados.

Quando que comparados com o antissoros de referência RSL, observou-se que o antissoros do animal 146 apresentou curva de título semelhante logo após a 4ª injeção de reforço (figura 4), enquanto que os antíssoros dos animais 163 e 249 exibiram essa similaridade somente após o 6ª reforço (figuras 3 e 5 respectivamente). O animal 285 (figura 6), que induziu mais precocemente a formação dos anticorpos logo após o 2ª reforço, revelou a partir do reforço seguinte títulos até mais elevados do que aquele recomendado pela RSL, de 1:5 (11).

Entretanto, observando-se as figuras 4 e 6 pode-se constatar a acentuada queda ocorrida no título dos antíssoros desses animais quando adoeceram (curva 9 do animal 146) e até vieram a óbito (curva 8B do animal 285), devido a urolitíase causada pela alimentação exclusiva com ração.

Apesar desses incidentes, foram obtidos desta feita imússoros de carneiros contra IgG de coelho com títulos superiores aquele preparado anteriormente em nossos laboratórios, seguindo um protocolo diferente (12) e empregado com título de 1:1 na separação de RIEs (12,13)

Esses antíssoros devem ainda ser avaliados quanto as suas características de precipitação: quantidade ideal de soro carreador não imune e tempo e temperatura necessários para a precipitação total.

Portanto, os estudos referentes a sua caracterização estão sendo conduzidos, de forma a permitir o futuro acondicionamento e distribuição desse duplo anticorpo para radioimunoensaio, produzido integralmente no país.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

1 - Confirmou-se a adequação da IgG de coelho, isolada e purificada em nossos laboratórios, para a indução de anticorpos específicos em carneiros.

2 - Os ovinos procedentes do Instituto de Zootecnia da Secretaria da Agricultura de São Paulo, bem como o protocolo de imunização empregado, mostram-se muito apropriados para a produção de imunessoro contra IgG de coelho.

3 - A alimentação à base de verde é fundamental para a preservação da saúde do animal, devendo-se evitar o fornecimento exclusivo de ração.

4 - Pelo menos quatro injeções de reforço foram necessárias para produzir boa resposta nos animais, que foram incrementadas seguindo-se os períodos de descanso.

5 - Os imunessoros dos carneiros apresentaram curvas de título similares àquelas exibidas pelo produto importado dos EUA (RSL), revelando até títulos superiores ao do antissor comercial.

6 - A produção deste reagente biológico de RIE, realizada integralmente no país poderá ser efetuada em maior escala, substituindo o emprego dos produtos importados.

AGRADECIMENTOS

As autoras agradecem ao Instituto de Zootecnia da Secretaria de Agricultura de São Paulo a doação dos ovinos (Processo S.A. nº 48.181./88) e ao National Hormone and Pituitary Program (USA) a doação dos reagentes biológicos para o RIE de hTSH. Agradecem também aos Drs. Enrico Lippiorlani e Sérgio Diniz Garcia da Faculdade de Medicina Veterinária da USP o tratamento dos animais e a realização de seus exames laboratoriais e à Dra. Maria de Lurdes Aguiar Bonadia Reichmann o alojamento dos animais no Biotério do ICB da USP.

TABELA I - Identificação e procedência dos ovinos empregados na produção do segundo anticorpo.

Nome	Nº	Raça	Procedência
Cacau	146	Morada Nova	*
Cacto	163	Morada Nova	*
Dado	249	Santa Inês	**
Debilidado	285	Santa Inês	**

* Posto de Ovinos e Caprinos de Itapetininga do IZSA.

** Centro Estadual de Pesquisa Aplicada em Sericicultura do IZSA.

TABELA II - Resultados dos exames hematológico (proteínas totais, albumina e hemograma) e parasitológico de fezes dos ovinos.

Animal nº	146	163	249	285
Exames				
PROTEÍNAS TOTAIS (g%)	6,3	5,9	5,8	5,8
ALBUMINA (g%)	3,0	2,6	2,7	3,2
SÉRIE VERMELHA:				
Hemácias x $10^6/\text{mm}^3$	9,1	9,4	8,9	9,2
Hematócrito (%)	33	33	31	34
Hemoglobina (g%)	11,4	10,9	10,7	11,5
VCM (μ^3)	36,3	35,1	34,8	37,0
HCM (μy)	12,5	11,6	12,0	12,5
CHCM (%)	34,5	33,1	34,5	33,8
SÉRIE LEUCOCITÁRIA:				
Leucócitos x $10^3/\text{mm}^3$	9,1	4,3	5,9	6,0
Neutrófilos:				
segmentados (%)	62	34	39	54
Eosinófilos (%)	5	1	1	1
Linfócitos (%)	33	57	54	43
Monócitos (%)	0	8	6	2
COCCIDIA				
(nº de oocisto)	0	0	0	0
<u>Strongyloidea sp</u>				
(ovos/g)	0	0	100	100

UCM = Volume corpuscular médio.

HCM = Hemoglobina corpuscular média

CHCM = Concentração de hemoglobina corpuscular média.

TABELA III - Resultados dos exames hematológico (hemograma) e parasitológico de fezes dos ovinos 146 e 163, após o óbito do ovino 249.

Exames	Animal nº	146	163
SÉRIE VERMELHA:			
Hemácias x $10^6/mm^3$		11,9	13,3
Hematócrito (%)		34	45
Hemoglobina (g%)		12,0	16,2
UCM (μ^3)		28,6	33,8
HCM (μg)		10,1	12,2
CHCM (%)		35,0	36,0
SÉRIE LEUCOCITÁRIA:			
Leucócitos x $10^3/mm^3$		5,2	5,1
Neutrófilos:			
segmentados (%)		38	72
bastonetes (%)		0	1
Eosinófilos (%)		8	5
Basófilos (%)		1	0
Linfócitos (%)		50	19
Monócitos (%)		3	3
COCCIDIA (nº de oocisto)		0	0
<u>Strongyloidea</u> sp (ovos/g)		0	0

UCM = Volume corpuscular médio.

HCM = Hemoglobina corpuscular média.

CHCM = Concentração de hemoglobina corpuscular média.



FIGURA 1 - Fotografia da região paraesternal do ovino 249 dez dias após a 3ª injeção de reforço.

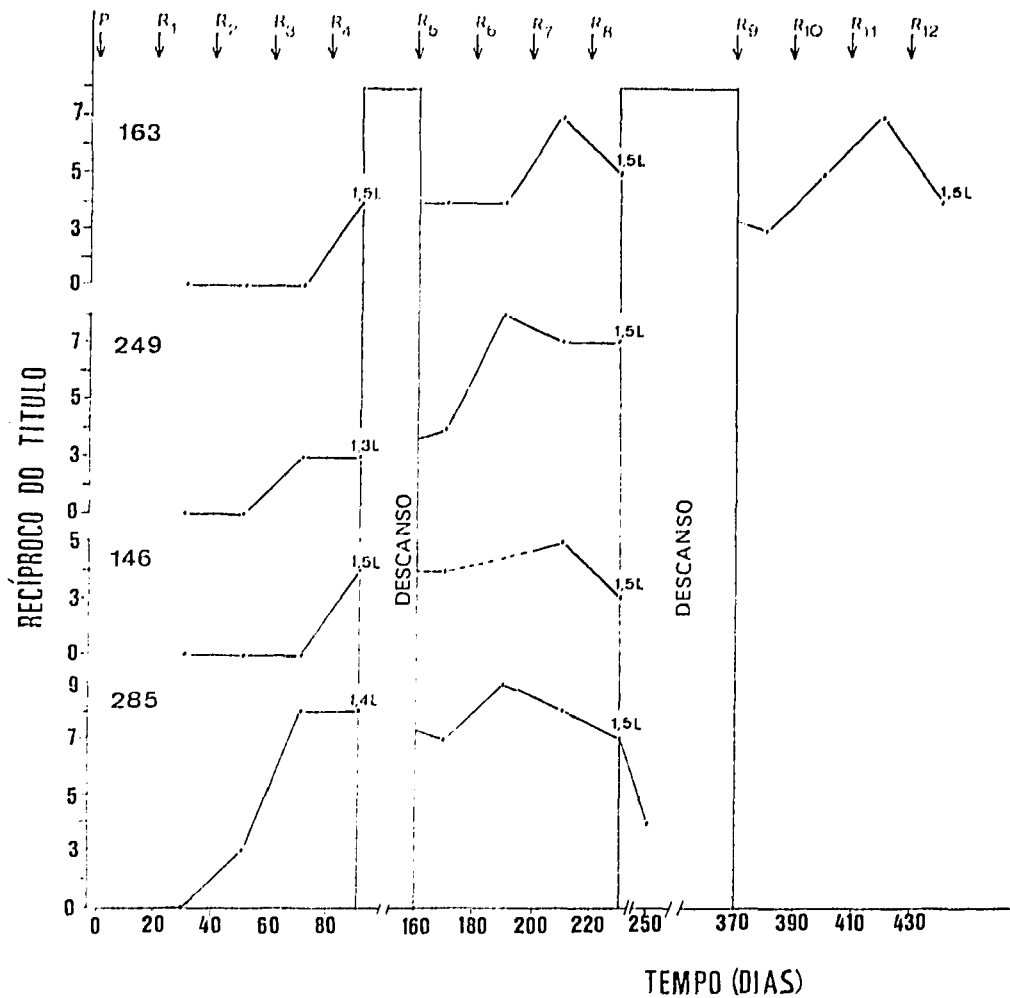


FIGURA 2 - Esquema de imunização para a produção de antissoro anti-IgG de coelho nos ovinos identificados na tabela I. As setas indicam o período das injeções primária (P) e de reforço (R₁ a R₁₂). São indicados na figura os volumes de sangue colhidos dos animais. A linha tracejada indica o período em que o ovino 146 esteve enfermo.

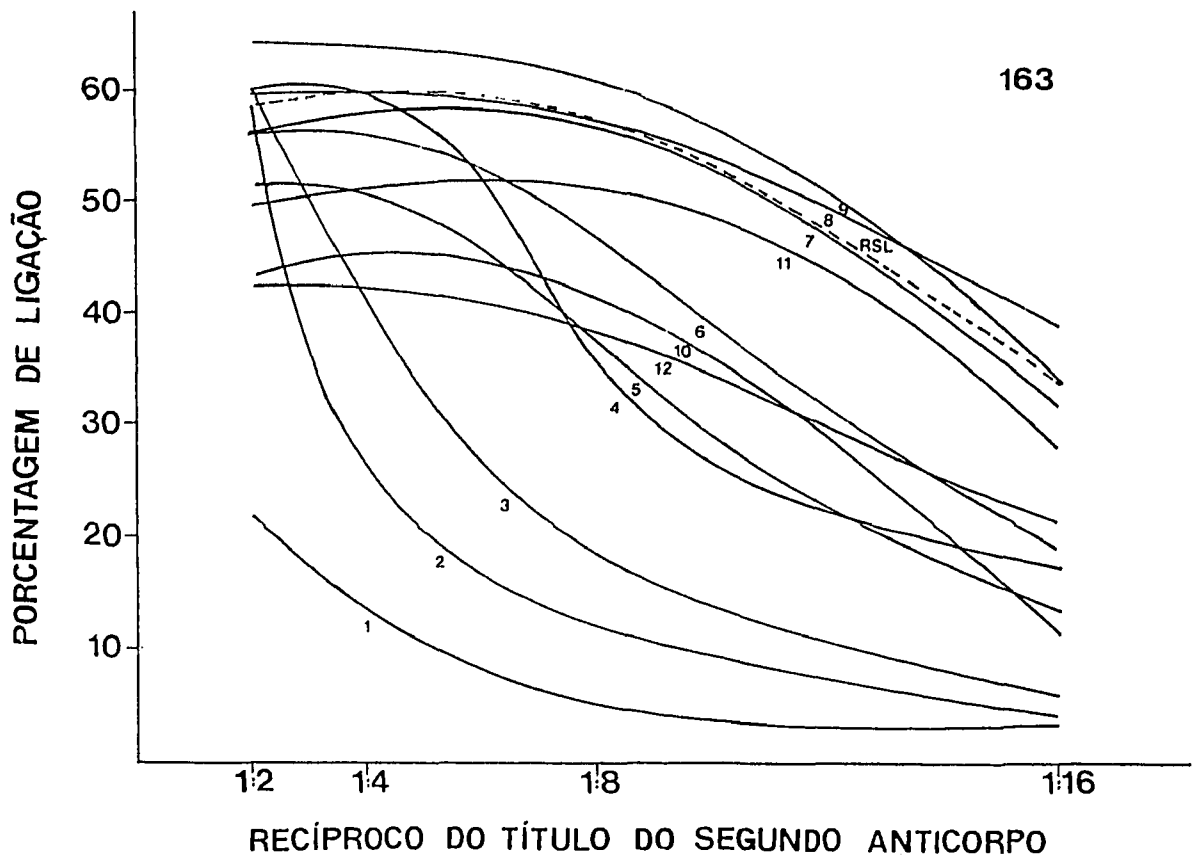


FIGURA 3 - Curvas de título dos antissoros do ovino 163 obtidos nas sangrias que sucederam as imunizações de reforço, indicadas pelos respectivos números em linhas contínuas e do antissoro de referência RSL em linha tracejada.

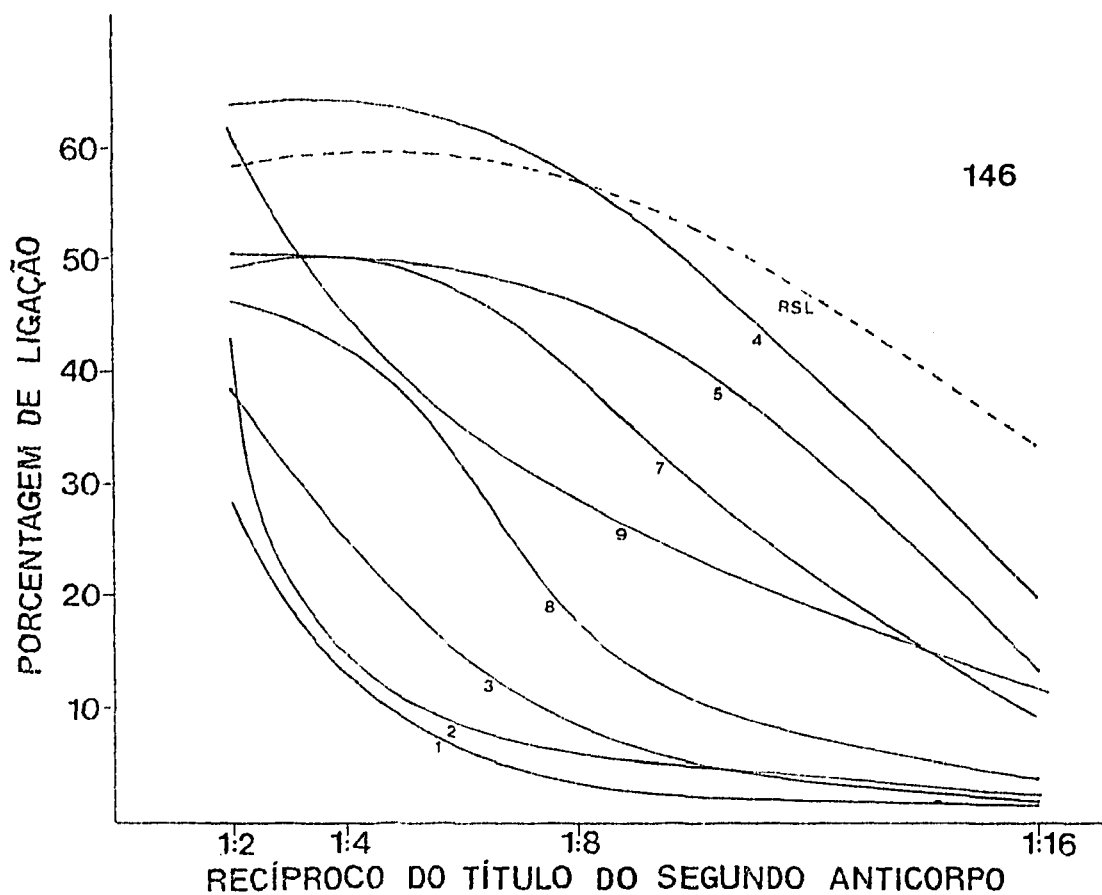


FIGURA 4 - Curvas de título dos antissoros do ovino 146 obtidos nas sangrias que sucederam as imunizações de reforço, indicadas pelos respectivos números em linhas contínuas e do antissoro de referência RSL em linha tracejada.

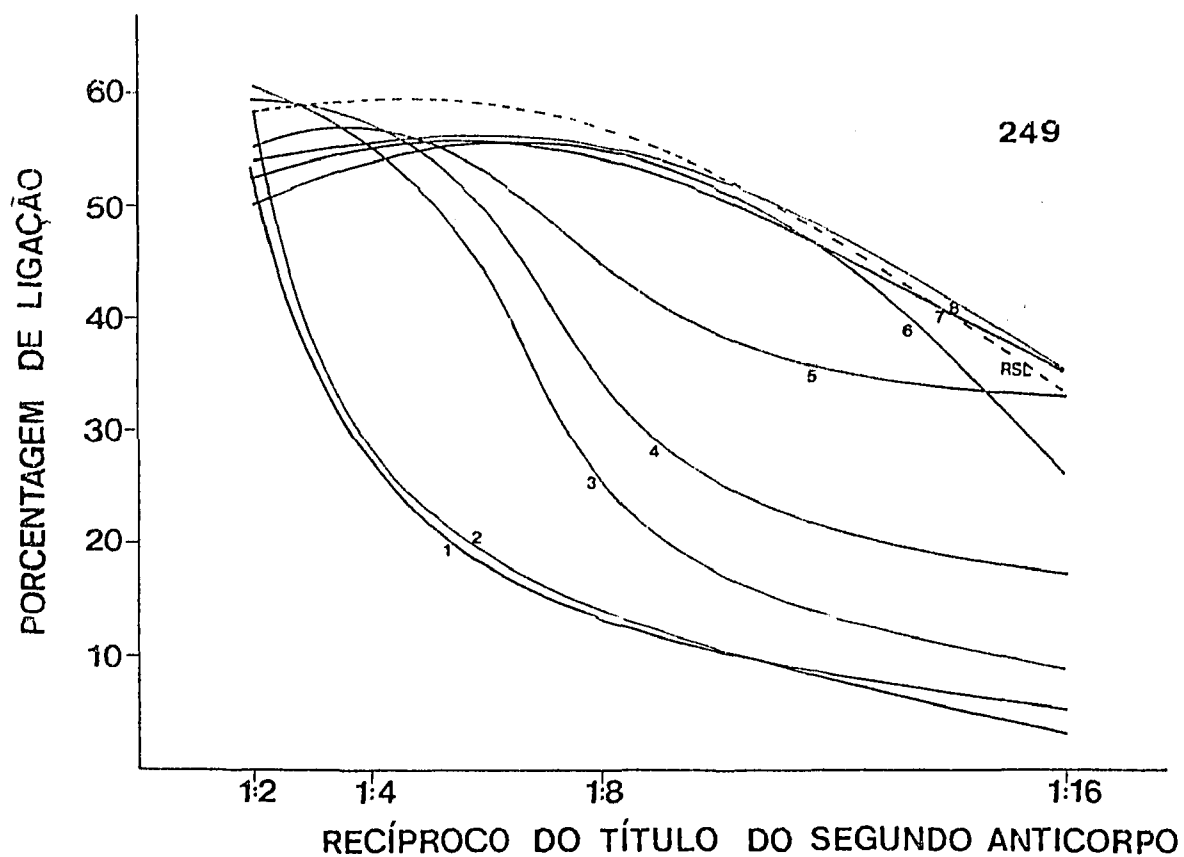


FIGURA 5 - Curvas de título dos antissoros do ovino 249 obtidos nas sangrias que sucederam as imunizações de reforço, indicadas pelos respectivos números em linhas contínuas e do antissoro de referência RSL em linha tracejada.

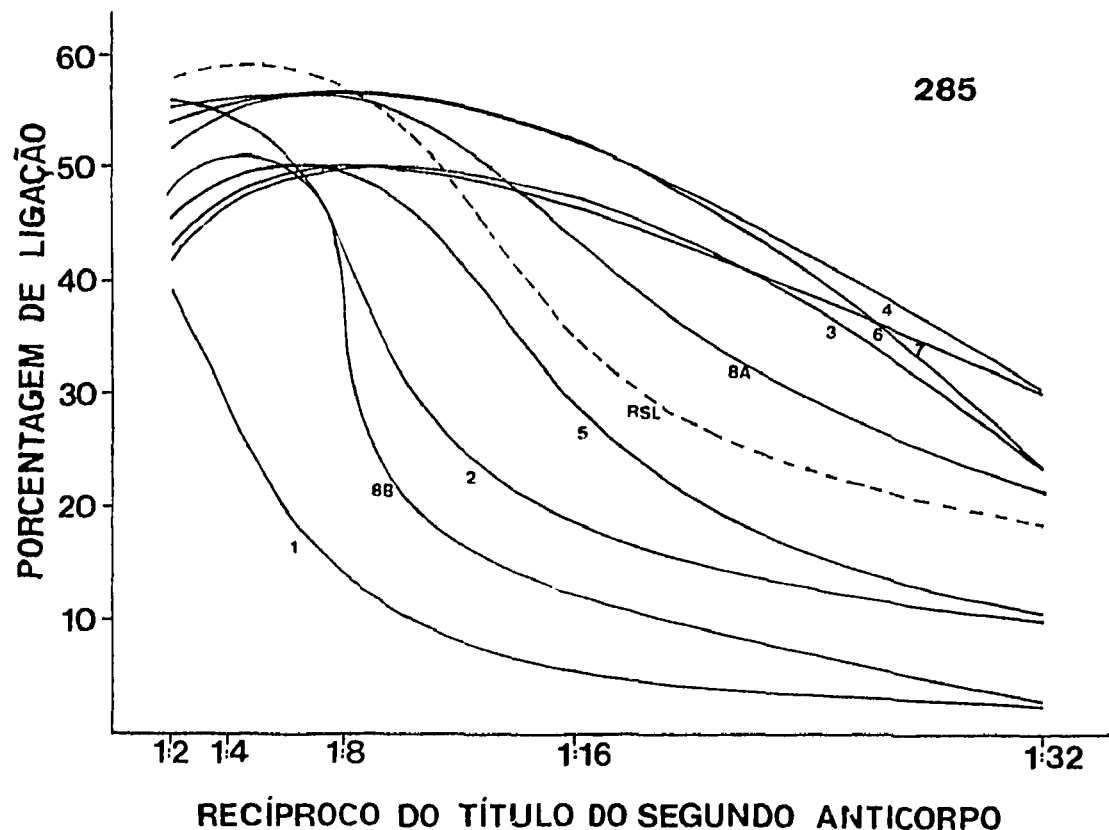


FIGURA 6 - Curvas de título dos antissoros do ovino 285 obtidos nas sangrias que sucederam as imunizações de reforço, indicadas pelos respectivos números em linhas contínuas e do antissoro de referência RSL em linha tracejada. A curva BA refere-se a primeira sangria realizada após a 8ª injeção de reforço, enquanto que a curva BB refere-se a sangria realizada 30 dias após, por ocasião da morte do animal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - BORGHI, V.C. Dosagens hormonais "in vitro" com radioisótopos. Considerações gerais e análise crítica. Cienc. Cult., 35 (10): 1456-66, 1982.
- 2 - BERSON, S.A.; YALOW, R.S. Kinetics of reaction between insulin and insulin-binding antibody. J. Clin. Invest., 36: 873-4, 1957.
- 3 - YALOW, R.S.; BERSON, S.A. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. Nature (London), 184: 1648-9, 1959.
- 4 - PIASENA, R.D.; AIREY, P.L.; GANATRA, R.D.; NOFAL, M. Radioimmunoassay for human health in developing countries. International Atomic Energy Agency Bulletin, 1: 5-9, 1989.
- 5 - RATCLIFFE, J.G. Separation techniques in saturation analysis. Br. Med. Bull., 30: 32-7, 1974.
- 6 - REICHMANN, C.E. - Contribuição ao estudo do quadro leucocitário sanguíneo de ovinos (*Ovis aries*, L.) normais, criados no estado de São Paulo. Influências de fatores raciais e etários. São Paulo, 1972. (Tese de doutoramento, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo) apud BIRGEL, E.H.; BENESI, F.J. Coords. Patologia clínica veterinária. São Paulo, Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 1982. (Apostila de curso). p. 65
- 7 - SILVA, R.S.; BORGHI, V.C. Isolamento e purificação da imunoglobulina (IgG) de coelho para a produção de segundo anticorpo para radioimunoensaio. São Paulo, Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares, 1990. (Publicação IPEN 294).
- 8 - BORGHI, V.C.; BARTOLINI, P. Desenvolvimento da técnica de radioimunoensaio para dosagem de tireotrofina (TSH) em extratos hipofisários humanos. In: Endocrinologia e Metabologia: 12º Congresso de..., Recife/Olinda, PE, 7 a 12 de setembro de 1986. p. 59.
- 9 - KRAUS, A.L.; WEISBROTH, S. H.; FLATT, R. E.; BREWER, N. Biology and diseases of rabbits. In: FOX, J. G.; COHEN, B. J.; LOEM, F. M. eds. Laboratory animal medicine. New York, N.Y., Academic Press, 1984. p. 206-40.

- 10 - CHAPMAN, R.S., MUNRO, A.C., TEMPLETON, J.G., FATORI, P. Production of second antibody for radioimmunoassay. In: HUNTER, W.M., CORRIE, J.E.T. eds. Immunoassay for clinical chemistry. London, Churchill Livingstone, 1983. p. 456-68.
- 11 - RADIOASSAY SYSTEMS LABORATORIES, INC. RSI 2nd antibody. Carson, Ca., s.d. (Catalog number 1930 - lot 2R2M06)
- 12 - BORGHI, U.C. Contribuição ao conhecimento das alterações do eixo hipotálamo - hipófise - tireóide na hipoproteïnemia experimental em ratos Wistar Albinos (Rattus norvegicus albinus). São Paulo, 1978. (Tese de doutoramento, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo).
- 13 - D'ABRONZO, F.H.; HIGA, O.Z.; LAUDANA, A.A.; LIMA, S. S. The "so. called" somatomedin B and growth hormone measured by radioimmunoassay in normal and cirrhotic individuals. Horm. Metabol. Res., 16: 435-8, 1984.