



**APLICAÇÃO DO MÉTODO DO RADIOIMUNOENSAIO NA DOSAGEM  
DA INSULINA NO PLASMA HUMANO**

*IRACÉLIA TORRES DE TOLEDO E SOUZA,  
OLGA ZAZUCO HIGA, BERNARDO LÉO WAJCHENBERG,  
HEIDI PINTO e RÔMULO RIBEIRO PIERONI*

**PUBLICAÇÃO IEA N.º 289**

Abril — 1973

**INSTITUTO DE ENERGIA ATÔMICA**  
Caixa Postal 11049 (Pinheiros)  
CIDADE UNIVERSITÁRIA "ARMANDO DE SALLES OLIVEIRA"  
SÃO PAULO — BRASIL

**APLICAÇÃO DO MÉTODO DO RADIOIMUNOENSAIO NA DOSAGEM  
DA INSULINA NO PLASMA HUMANO**

**Iracélia Torres de Toledo e Souza,  
Olga Zazuco Higa, Bernardo Léo Wajchenberg, Heidi Pinto e  
Rômulo Ribeiro Pieroni**

**Departamento de Radiobiologia  
Instituto de Energia Atômica  
São Paulo - Brasil**

**PUBLICAÇÃO IEA Nº 289  
Abril - 1973**

---

**Instituto de Energia Atômica**

**Conselho Superior**

Eng.º Roberto N. Jafet – Presidente  
Prof.Dr.Emilio Mattar – Vice-Presidente  
Prof.Dr.José Augusto Martins  
Dr.Affonso Celso Pastore  
Prof.Dr.Milton Campos  
Eng.º Helcio Modesto da Costa

**Superintendente**

Rômulo Ribeiro Pieroni

# APLICAÇÃO DO MÉTODO DO RADIOIMUNOENSAIO NA DOSAGEM DA INSULINA NO PLASMA HUMANO

Iracélia Torres de Toledo e Souza,  
Olga Zazuco Higa, Bernardo Léo Wajchenberg, Heidi Pinto e  
Rômulo Ribeiro Pieroni

## RESUMO

Para o radioimunoensaio da insulina no plasma humano empregamos:

- 1 - Marcação da insulina porcina com  $^{125}\text{I}$ .
- 2 - Purificação da insulina marcada por cromatografia de adsorção em celulose ou eletroforese em gel de amido e posteriormente em coluna de exclusão molecular (Sephadex G-50 fino)
- 3 - Teste de imunoreatividade da insulina marcada e ligação ao anticorpo.
- 4 - Separação do hormônio livre ( F ) do ligado ao anticorpo ( B ) usando carvão ativado recoberto com plasma.

A relação B/F plotada contra a massa de insulina fria permite obter a curva padrão onde são lidas as concentrações de insulina plasmática.

As características da seqüência operacional avaliadas através da exatidão, especificidade e precisão, foram adequadas permitindo quantificar níveis de insulina plasmática desde condições basais até níveis de hiperinsulinemia em todo espectro da patologia insular pancreática.

## INTRODUÇÃO

A insulina, à semelhança de outros hormônios protéicos, tem sua quantificação em materiais biológicos dificultada pela baixa concentração e pelo fato de não contar em sua estrutura com radicais característicos que permitam reações químicas próprias. Os métodos biológicos, embora sensíveis, não são muito específicos nem precisos<sup>1</sup>.

O doseamento da insulina somente se tornou acessível à rotina quando se associaram as características de especificidade de certas reações imunológicas às extremas sensibilidade e precisão das medidas da radioatividade, ou seja, através das técnicas genericamente denominadas de radioimunoensaio<sup>1-2-3-4-5</sup>.

Os princípios do ensaio radioimunológico se esteiam numa série de reações de competição<sup>1-2-6</sup> esquematicamente representadas na fig. 1, onde  $\text{Ag}^*$  representa o hormônio marcado com o isótopo de iodo, antígeno específico para a união com o anticorpo Ab. Colocando-se ambos em contato, estabelecer-se-á um equilíbrio dinâmico entre o complexo antígeno-anticorpo  $\text{Ag}^*\text{-Ab}$  | onde  $\text{Ag}^*$  está sob a forma ligada (B - "bound") | e seus elementos constitutivos Ab e  $\text{Ag}^*$ , o último constituindo a forma livre (F - "free") do hormônio marcado.

A adição ao sistema ora descrito de hormônio não marcado Ag (hormônio "frio") vai deslocar da formação de  $\text{Ag}^*\text{-Ab}$  uma fração de  $\text{Ag}^*$  proporcional às quantidades relativas de Ag (daí as expressões competição, deslocamento, inibição competitiva, empregadas na literatura).

Determina-se a quantidade de hormônio, em amostras de concentração desconhecida, comparando-se a inibição competitiva produzida pelo teor do desconhecido com a determinada, no mesmo sistema antígeno-anticorpo, por quantidades conhecidas e progressivas de hormônio "frio" (curva de calibração, padronização).

O poder competitivo e, conseqüentemente, a massa a determinar, é apreciada através da relação B/F, ou seja, mercê da razão entre as quantidades de hormônio marcado, ligado ao anticorpo e livre.

Um sistema como o descrito, no entanto, somente será útil se for possível separar, de maneira prática e eficiente, as frações livres e combinadas de hormônio marcado, indicador da reação de competição que é a base do método.

Para um ensaio radioimunológico é mister dispor dos reagentes essenciais do método, a saber:

- A) Hormônio "frio" e marcado;
- B) Anticorpo anti-insulina;
- C) Um sistema de separação da insulina marcada livre ( F ) e complexada ou combinada ( B ).

## REAÇÕES DE COMPETIÇÃO CONSTITUINDO A BASE PARA O RADIOIMUNOENSAIO

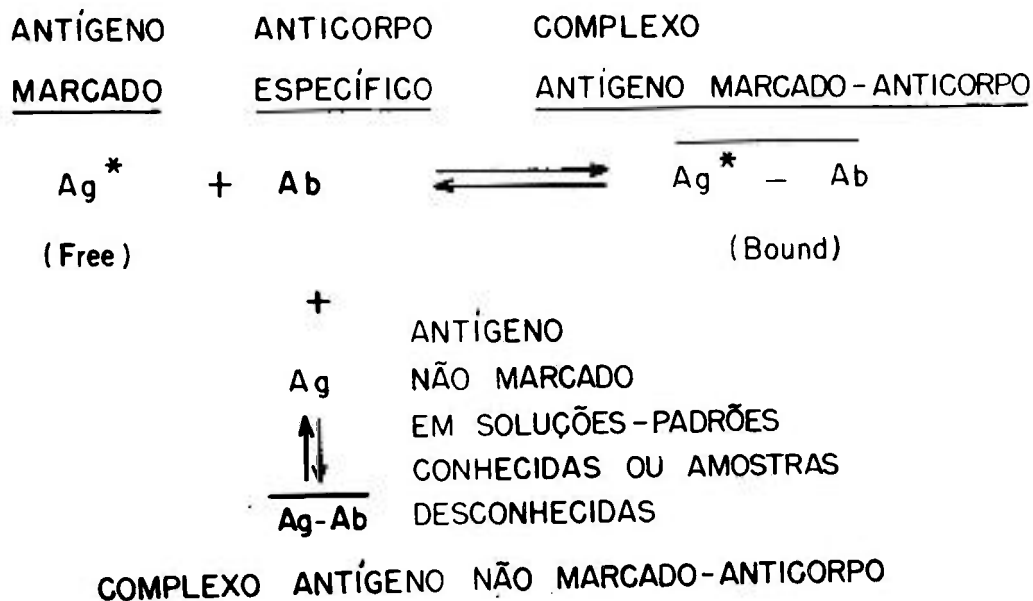


FIGURA 1

## A) Hormônio "frio" e marcado

Como fonte de insulina "fria" para a marcação, limitamo-nos a recorrer a uma das insulinas de porco recristalizada (6 vezes), disponíveis no mercado<sup>7-8-9</sup>.

Valemo-nos da insulina porcina, utilizada também no preparo do antisoro específico, por mostrar seqüência aminoácida idêntica à humana, exceto quanto à presença de alanina em lugar de treonina no carbono terminal da cadeia B<sup>3</sup>. O fato do antígeno marcado ser de origem porcina e, conseqüentemente o anticorpo corresponder à anti-insulina de porco, não impede que se usem estes reagentes para o radioimunoensaio, pois a condição necessária para a validade desta técnica é que o hormônio não marcado, que se deseja quantificar, e os padrões sejam da mesma origem, reagindo de modo idêntico ao sistema Ag\*-Ab.

A insulina radioativa foi por nós preparada para que, com o emprego de partidas recém-marcadas, pudéssemos utilizar, após purificação, radiohormônio da melhor qualidade.

O método empregado para a marcação de insulina foi o de Hunter e Greenwood: oxidação do iodo pela cloramina T<sup>10-11</sup>.

O radioelemento utilizado foi o <sup>125</sup>I, pelas inegáveis vantagens ligadas à sua emissão radioativa de baixa energia, determinando menor dano molecular, o que permite conservar-lhe as propriedades biológicas, em particular as imunitárias, essenciais dentro do esquema metodológico que nos interessa<sup>5-12</sup>, além da sua meia-vida (60 dias) relativamente longa.

Apesar dos cuidados no desenvolvimento da marcação propriamente dita, a estrutura da insulina sofre agressões, que se traduzem por fragmentos marcados (insulina danificada) presentes ao lado de moléculas intactas do hormônio, igualmente marcadas, e de iodo livre<sup>1-12</sup>.

É, pois, necessário proceder-se a uma purificação antes de empregar a insulina marcada na seqüência metodológica do ensaio.

### Métodos de purificação

1 - **Cromatografia de adsorção em celulose:** Sendo a insulina um hormônio peptídico de caráter básico e de baixo peso molecular, pode ser adsorvida à celulose através de grupamentos funcionais do adsorvente, sendo eluída por solução álcool-ácida<sup>13</sup>.

2 - **Eletroforese em gel de amido:** Este método é particularmente usado para separação de insulinas com diferente teor de iodação<sup>14</sup>. Presumivelmente, moléculas com resíduos de diiodotirosina migram mais rapidamente para o ânodo do que moléculas com grupamentos tirosil monosubstituídos<sup>12</sup>, em virtude de cada resíduo de tirosina diiodada, conferir, em pH 8 - 8,6, uma carga extra à molécula.

3 - **Cromatografia em coluna de exclusão molecular ("Sephadex"):** Esta técnica constitui uma purificação ulterior dos produtos fracionados através da eletroforese em gel de amido. A fração escolhida é cromatografada em "Sephadex" G-50 fino, eluindo-se os diversos componentes e obtendo-se insulina-<sup>125</sup>I praticamente pura.

## B) Anticorpo anti-insulina

Empregamos anticorpo preparado em cobaias imunizadas com insulina de porco comercial associada ao adjuvante de Freund.

## C) Separação das frações livres ( F ) e ligadas ( B ) do hormônio marcado

Embora existam referências a numerosos métodos, cada qual empregando alguma propriedade específica de determinados reagentes, utilizamos carvão ativado recoberto com plasma para remoção da fração livre ( F ) do meio da reação<sup>15</sup>.

### Estabelecimento da diluição apropriada do anticorpo

Antes de usar o hormônio marcado para radioimunoensaio, a preparação é testada para observar a percentagem de radioiodo e componentes danificados e sua propriedade em se ligar adequadamente ao anticorpo. É conveniente iniciar, após a purificação, incubações preliminares, sob as condições do ensaio, em diferentes diluições do anticorpo, escolhendo-se a que apresentar uma boa relação B/F, em menor tempo e pequena fração degradada durante o período de incubação. Portanto, nos testes preliminares, além de se verificar a estabilidade da preparação marcada e susceptibilidade para danificar-se durante a incubação, determina-se também a sua imunoreatividade.

A padronização da técnica envolve a verificação das condições e graus de:

a) **Especificidade** - reação idêntica dos anticorpos com o hormônio plasmático endógeno e o hormônio-padrão e verificação da inexistência de substâncias que, por qualquer mecanismo, interfiram na reação.

Para este critério seguimos as indicações de Yalow e Berson<sup>3-16</sup> que sugerem o emprego de diluições do material a estudar, com o objetivo de verificar a constância do teor de insulina, quando corrigido pelo fator de diluição.

b) **Exatidão** - recuperação de quantidades conhecidas de hormônio purificado, adicionado ao meio no qual se procede a dosagem, no caso particular, o plasma.

c) **Sensibilidade** - interação elevada do anticorpo com o hormônio que se reflete essencialmente na inclinação inicial da curva-padrão<sup>3</sup>.

d) **Precisão** - reprodução de um mesmo resultado em diversas alíquotas de um mesmo material, em condições ideais e de rotina.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Marcação da insulina com <sup>125</sup>I**: Matérias-primas essenciais: Insulina de porco recristalizada 6 vezes (Lilly Laboratories) e <sup>125</sup>I sob a forma de iodeto de sódio, com atividade variável de 200 a 300 mCi/ml (Union Carbide Corporation).

**Soluções reagentes**: Tampão Fosfato 0,2 M ph 7,4; Cloramina T dissolvida em tampão Fosfato, na concentração de 2,65 mg/ml; metabissulfito de sódio dissolvido em tampão Fosfato, na

concentração de 4,8 mg/ml.

Quantidades e ordem de adição dos reagentes:

- 1 - 20  $\mu$ l de tampão fosfato
- 2 - 5\*  $\mu$ l de  $^{125}$ I
- 3 - 5\*  $\mu$ l de insulina de porco
- 4 - 20  $\mu$ l de cloramina T
- 5 - 20  $\mu$ l de metabissulfito de sódio
- 6 - 40  $\mu$ l de "plasma azul" (plasma normal corado com azul de bromofenol).

**Controle da eficiência da marcação:** A uma alíquota da mistura contida no tubo de iodação, acrescentam-se 100  $\mu$ l de plasma, 2,4 ml de tampão Veronal 0,025 M pH 8,6 e 0,2 ml de suspensão de carvão em tampão Veronal, na concentração de 100 mg/ml. Agita-se bem em "Vortex", centrifuga-se a 5C, 2000 rotações por minuto, durante 20 minutos. Sobrenadante e precipitado têm suas atividades determinadas e expressas em percentagem da atividade total. Preparações com rendimento (percentagem da radioatividade total que é adsorvida ao carvão, correspondente à insulina- $^{125}$ I) inferior a 50% são desprezadas. Resultados superiores a 60% são geralmente obtidos e então utilizados no ensaio.

**Purificação da insulina marcada:**

1 - **Coluna de celulose** - Coluna de 12 cm de altura por 8 mm de diâmetro preenchida com celulose Whatman e compactada firmemente até a altura de 3 cm.

A insulina marcada é adicionada à coluna. Faz-se uma eluição com 3 porções de 2 ml de água destilada, que arrastarão a fração degradada do hormônio marcado e o iodo livre. O hormônio marcado, retido na coluna, é eluído com solução álcool-ácido (7,5 ml de álcool etílico, 0,15 ml de ácido clorídrico concentrado e 2,35 ml de água destilada).

Nos eluídos correspondentes à insulina- $^{125}$ I são feitos testes de pureza semelhantes aos empregados na eficiência da marcação, passando a se expressar percentualmente a pureza registrada nas diversas amostras.

2 - **Eletroforese em gel de amido** - Prepara-se o gel de acordo com as recomendações gerais de Smithies<sup>17-18</sup> adaptadas às partidas de amido hidrolizado "Connaught" e confeccionam-se as placas para eletroforese.

No fim do processo de iodação da insulina, imediatamente após a adição de 40  $\mu$ l de "plasma azul", aplica-se 40  $\mu$ l da mistura final para cada um dos sulcos feitos no gel de amido. A mancha azul identifica a zona de migração da albumina sérica. Aplica-se uma tensão de 100 volts à placa. As diversas insulinas migram na frente da albumina. A corrida é sustada quando o fronte azul atinge o meio da placa. Remove-se a placa de gel que é então colocada em contato com filme "Royal Blue-Kodak" para autoradiografia. Retira-se após 15 minutos e revela-se (fig. 2).

---

\* As quantidades de  $^{125}$ I e insulina de porco variam de acordo com a atividade específica que se deseja. As quantidades dos outros elementos são mantidas constantes.

Os volumes de gel correspondentes às 3 faixas de atividade são removidos para tubos de ensaio de 16 por 100 mm, fechados com parafilme e congelados por 3 horas, no mínimo.

Após descongelamento, adiciona-se a cada tubo 1 ml da mistura de Veronal-Albumina (solução albumina humana a 0,25% em tampão Veronal). A fração correspondente à faixa intermediária (livre de super iodação e do hormônio frio) é centrifugada para obter sobrenadante límpido que adicionado de 0,2 ml de "plasma azul" é transferido para a coluna de "Sephadex" G-50 fino.

3 - Coluna de Sephadex - Faz-se o empacotamento, em bureta de 50 ml, de "Sephadex" G-50 fino, entumescido em tampão Veronal. Elue-se com Veronal-Albumina, coletando-se frações de 1 ml do eluído: inicialmente as proteínas séricas e fragmentos danificados, a seguir Insulina  $^{125}\text{I}$  pura e finalmente o iodo livre\* (fig. 3).

Os tubos têm suas atividades determinadas e são identificados os picos de atividade. As frações eluídas correspondentes aos tubos dos picos de atividade são submetidas a controle de qualidade segundo a mesma técnica empregada para a verificação da eficiência da marcação. Identificam-se, assim, os tubos correspondentes à insulina marcada e indene e, dentre eles, os mais ricos em insulina pura. Esta série de tubos corresponde ao segundo pico (fig. 3).

## AUTORADIOGRAFIA DE ELETROFORESE EM GEL DE AMIDO DE INSULINA- $^{125}\text{I}$ (ATIVIDADE ESPECÍFICA: $130 \mu \text{ Ci} / \mu \text{g}$ ) IMEDIATAMENTE APÓS IODAÇÃO



FIGURA 2

\* Na figura 3 o componente de  $^{125}\text{I}$  livre se apresenta elevado em virtude da cromatografia ter sido realizada sem purificação prévia em gel de amido.

CROMATOGRAFIA EM GEL SEPHADEX G-50  
DE INSULINA DE PORCO MARCADA COM  
 $^{125}\text{I}$  (ATIVIDADE ESPECÍFICA 300 mCi/mg)

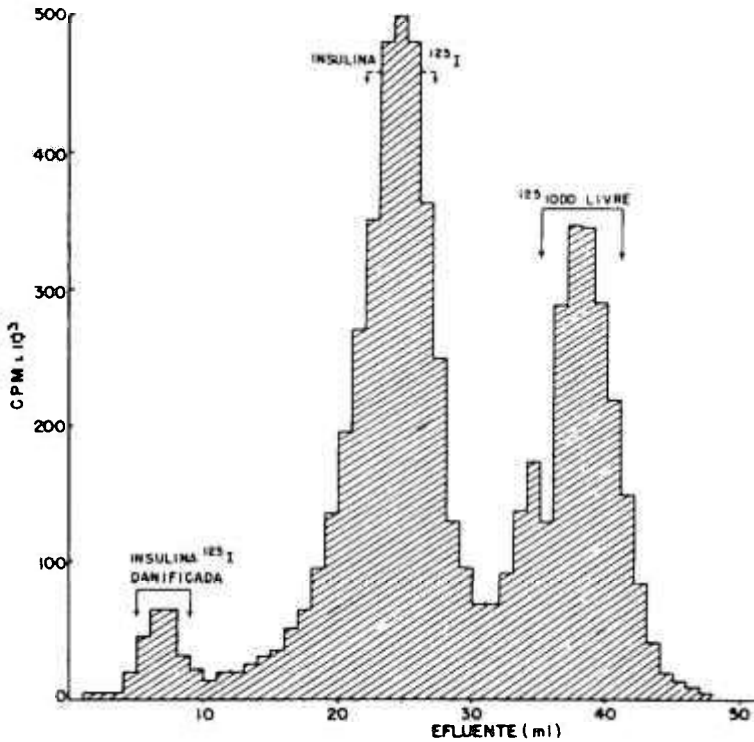


FIGURA 3

Para o ensaio utiliza-se o material que acusou valor porcentual de purificação mais elevado.

#### Determinação da diluição apropriada do anticorpo

A partir de uma solução 1/1000 do anticorpo, preparam-se diluições de títulos variáveis de até 1/400.000 empregando como **diluyente-padrão** Veronal-Albumina acrescida de 1% de soro de cobaia e de uma quantidade de Insulina- $^{125}\text{I}$  a uma atividade correspondente a 1000 contagens por minuto (cpm) por ml de volume final. Essas diluições são testadas diariamente durante 3 a 4 dias (período de incubação) segundo a técnica seguinte: a 2,4 ml de cada diluição, adiciona-se 100  $\mu\text{l}$  de plasma humano, 0,2 ml de suspensão de carvão, agita-se, centrifuga-se e determina-se a atividade do sobrenadante e precipitado. Relacionam-se ambos os valores ( B/F ).

Paralelamente, controla-se a eventual degradação da insulina marcada: adiciona-se a 2,4 ml

de diluente-padrão, 100  $\mu$ l de plasma e 0,2 ml da suspensão de carvão. Agita-se, centrifuga-se e determina-se a atividade do sobrenadante e precipitado, indicando-se esta última como percentual da soma das atividades.

Escolhe-se a maior diluição do anticorpo que apresentar uma relação B/F de 0,8 a 1,2<sup>7</sup>, sem grande aumento da percentagem de danificação do hormônio, ao término da incubação.

#### Protocolo para a determinação do teor de insulina numa série de amostras de plasma

**Curva-padrão:** Os padrões são preparados a partir de insulina humana a uma diluição de 1  $\mu$ g/ml (solução estoque). Toma-se 25  $\mu$ l desta solução, que é diluída a 1 ml com Veronal-Albumina e, a partir desta, preparam-se diluições de título variável cobrindo os valores correspondentes de 1 a 100  $\mu$ l. Como diluente emprega-se solução Veronal-Albumina. As diluições, em duplicata, são feitas de acordo com a Tabela abaixo.

TABELA DE DILUIÇÃO DA SOLUÇÃO ESTOQUE DE INSULINA

TUBOS	VOLUME INSULINA (25 m $\mu$ g/ml)	VERONAL-ALBUMINA	CONCENTRAÇÃO FI- NAL INSULINA
Nº	$\mu$ l	$\mu$ l	m $\mu$ g/ml
1	1	99	0,01
2	2	98	0,02
3	3	97	0,03
4	4	96	0,04
5	5	95	0,05
6	10	90	0,10
7	15	85	0,15
8	20	80	0,20
9	30	70	0,30
10	50	50	0,50
11	70	30	0,70
12	100	--	1,00

Preparam-se também 6 tubos, de A a F, contendo 100  $\mu$ l de Veronal-Albumina que servirão como "brancos" para o ponto inicial da curva de calibração (A a D) e para "controle" da degradação da Insulina- $^{125}$ I (E e F). Nos tubos "controles" são colocados 2,4 ml de diluente-padrão e nos demais diluente-padrão com anticorpo, na diluição escolhida, na seguinte ordem:

- 1 - Tubo A
- 2 - Tubo com padrões de número ímpar
- 3 - Tubo B
- 4 - Tubos contendo as amostras de plasma
- 5 - Tubo C
- 6 - Tubo com padrões de número par
- 7 - Tubo D.

Agitar levemente em "Vortex". Levar para geladeira a 4°C para incubar por 3 a 4 dias.

**Amostras de plasma humano:** Os procedimentos técnicos, descritos e ensaiados neste trabalho são comprovadamente compatíveis com o processamento simultâneo de até 500 amostras de plasma.

A 100  $\mu$ l de plasma de cada amostra, adiciona-se 2,4 ml de solução diluente-padrão, contendo o anticorpo na diluição apropriada. Agita-se e incuba-se a 4°C.

Para cada lote de 10 a 15 amostras de plasma, de um mesmo experimento, separa-se uma ao acaso e transfere-se 100  $\mu$ l deste plasma para um tubo que passará a ser o "controle" da degradação da Insulina- $^{125}$ I durante a incubação do lote.

Aos tubos "controles", adiciona-se 2,4 ml de diluente-padrão sem o anticorpo. Agita-se e incuba-se a 4°C.

Enquanto decorre o período de incubação, realizam-se ensaios diários objetivando controlar o grau de degradação sofrida pela insulina marcada e sua capacidade de fixação ao anticorpo. Para tanto preparam-se 4 tubos contendo 2,4 ml de diluente-padrão e mais 4 tubos com igual quantidade de diluente-padrão mais o anticorpo na diluição escolhida. Ao término da incubação procede-se à adição de 0,2 ml da suspensão de carvão ativado Norit-A, que é feita em todos os tubos. Agita-se, centrifuga-se e determina-se a atividade no precipitado (carvão) - insulina- $^{125}$ I livre e no sobrenadante - Insulina- $^{125}$ I - Anticorpo, fragmentos de insulina marcada e iodo livre.

Calculados os valores numéricos de B/F, é descontado o valor porcentual da degradação do hormônio, segundo a fórmula:

$$B/F = \frac{B - [(B + F) \times D]}{F}$$

$$D = \frac{\text{cpm do sobrenadante}}{\text{cpm total}} \quad (\text{tubos controles})$$

B = cpm do sobrenadante

F = cpm do precipitado

Para cada amostra, a massa correspondente de insulina é lida na curva de referência recém-elaborada. O valor médio da relação B/F para cada diluição da solução de insulina-padrão é lançado na ordenada do gráfico linear contra o valor correspondente da massa de insulina, expressa em  $m\mu g$ . Os pontos assim obtidos são reunidos pela curva contínua que melhor os satisfaça (fig. 4).

A massa de insulina da amostra, expressa em  $m\mu g$ , deverá ser multiplicada por 625 ( $625 = 25 \times 25$ ) para atender ao fator de diluição ( $25 = 2,5 \text{ ml}/0,1 \text{ ml}$ ) do plasma e pelo fator (25) de conversão para  $\mu U$  ( $1 \text{ m}\mu g$  de insulina =  $25 \mu U$ ), indicando-se os resultados finais em  $\mu U$  de insulina/ml de plasma não-diluído.

CURVA PADRÃO PARA O ENSAIO DE INSULINA HUMANA [AS RELAÇÕES INSULINA-ANTICORPO (B)/ INSULINA (F) NAS SOLUÇÕES PADRÃO SÃO PROJETADAS COMO UMA FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CONHECIDA DA INSULINA]

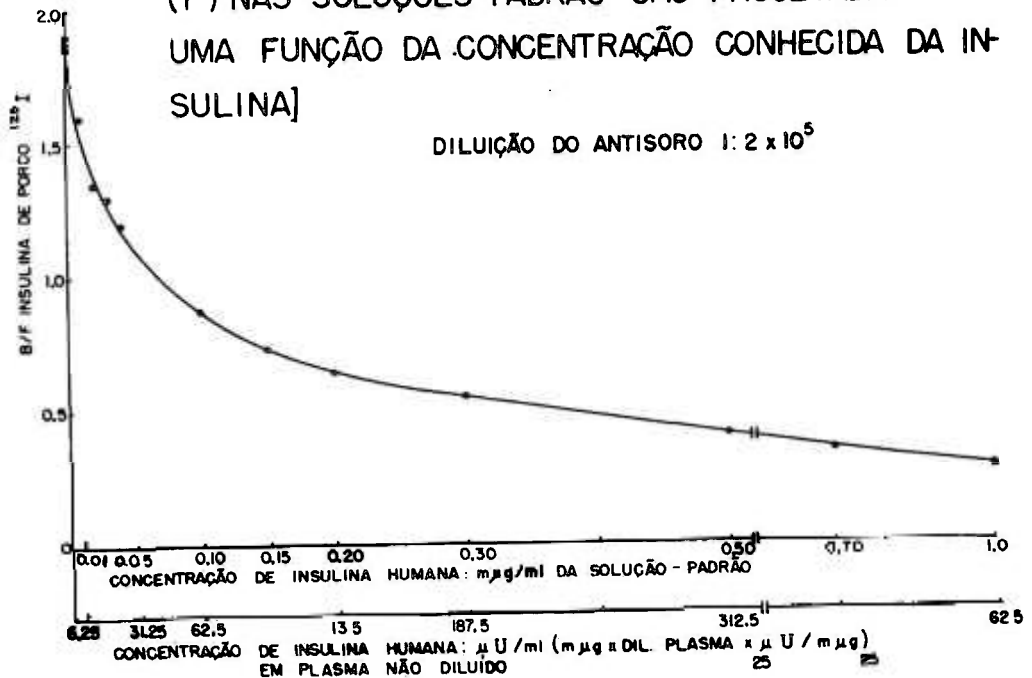


FIGURA 4

## Avaliação dos característicos da seqüência operacional para a dosagem da insulina em plasma

a) **Exatidão** - A um plasma de banco de sangue contendo 0,02  $\mu\text{g/ml}$  de insulina adiciona-se em duplicata, insulina humana em concentração crescente: 0,02; 0,04; 0,05; 0,10  $\mu\text{g}$  e calcula-se a recuperação da insulina adicionada para cada lote.

Calcula-se o coeficiente de correlação  $r$  para valores de  $\alpha = 0,05$ . A partir de uma mistura de plasma, com presumível alto teor de insulina colhida no acme de estimulação insular por sobrecarga de glicose - procedemos à verificação de:

b) **Especificidade** - Preparam-se 4 amostras, por diluição da mistura de plasma, segundo os títulos 1:25; 1:50; 1:100; 1:125, que são processados de acordo com a técnica descrita. Calculam-se as médias das  $\mu\text{U/ml}$  correspondentes a cada diluição que são lançadas em ordenada, de gráfico linear, contra valores das diluições decrescentes. Calcula-se o coeficiente de correlação  $r$  para os valores de  $\alpha = 0,05$ .

c) **Sensibilidade** - Reflete-se, essencialmente, na queda inicial da curva padrão.

### d) Precisão

1. Reprodutibilidade em condições ideais de trabalho: da mistura de plasma, com teor elevado de insulina, preparam-se e processam-se 20 amostras iguais. Calculam-se os valores numéricos da concentração e coeficiente de variação, cujo limite máximo de aceitabilidade é fixado em 10%<sup>19</sup>.

2. Reprodutibilidade em condições habituais de trabalho: da mistura do plasma acima, preparam-se e processam-se 20 amostras distribuídas em outros tantos dias de trabalho. Calcula-se a média dos valores da concentração de insulina estabelecendo-se como limite de aceitação um coeficiente de variação de 20%<sup>19</sup>.

## RESULTADOS

**Controle da eficiência de marcação da insulina porcina:** A média de 16 marcações realizadas em 1971 e 1972 resultou em rendimento de 73%, variando de 60 a 83%.

**Purificação da insulina marcada:** Por cromatografia de adsorção em celulose e pela de exclusão molecular (Sephadex) obteve-se uma pureza que variou de 73 a 95% na celulose e de 94 a 98% no "Sephadex". Mesmo após a purificação preliminar por eletroforese em gel de amido, os resultados no "Sephadex" se apresentaram dentro dos limites acima indicados, havendo no entanto a vantagem quanto à imunoreatividade.

**Determinação da diluição adequada do anticorpo e controle do dano da insulina na fase de incubação:** A Tabela I reúne os dados numéricos representativos do dano percentual da insulina e a relação B/F correspondentes a cada título de diluição do anticorpo para cada um dos dias de incubação (quatro), em um dos estudos realizados. Como se poderá observar nesta tabela, a maior diluição aceitável do anticorpo na presença de pequena percentagem de degradação (4%) foi de  $1:3.10^3$ , com um valor B/F = 1,16.

**Especificidade:** A Tabela II reúne os valores em quadruplicata expressos em  $\mu\text{U/ml}$ , para 4 diferentes diluições, de uma mesma amostra de plasma. Constam igualmente as médias

**TABELA I**

DETERMINAÇÃO DA DILUIÇÃO ADEQUADA DO ANTICORPO PARA O INTERVALO DE INCUBAÇÃO E  
CONTROLE DO DANO DA INSULINA - <sup>125</sup>I

TÍTULO DA DILUIÇÃO DO ANTICORPO	1º DIA		2º DIA		3º DIA		4º DIA	
	% DE DEGRADAÇÃO	B/F	% DE DEGRADAÇÃO	B/F	% DE DEGRADAÇÃO	B/F	% DE DEGRADAÇÃO	B/F
1 : 1 . 10 <sup>3</sup>	4	1,3	4	1,87	4	1,88	4	
1 : 2 . 10 <sup>3</sup>	4	0,83	4	1,16	4	1,26	4	
1 : 3 . 10 <sup>3</sup>	4	0,57	4	0,97	4	0,99	4	
1 : 4 . 10 <sup>3</sup>	4	0,41	4	0,57	4	0,70	4	

\* Identifica a diluição ideal dentro de uma mesma faixa de dano percentual perfeitamente aceitável.

TABELA II

## CONTROLE DE ESPECIFICIDADE

DILUIÇÕES DO PLASMA			
1 : 25	1 : 50	1 : 100	1 : 125
$\mu\text{U/ml}$	$\mu\text{U/ml}$	$\mu\text{U/ml}$	$\mu\text{U/ml}$
180	87	52	36
184	85	50	38
180	88	51	35
186	89	49	39
X = 182	X = 87	X = 50	X = 37

$$r = 0,998$$

respectivas. A fig. 5, construída com as médias acima, representa graficamente a correlação entre diluição e concentração de insulina. O valor do coeficiente de correlação resultou ser  $r = 0,998$ .


**Exatidão:** Entre os valores teóricos e os obtidos houve uma diferença percentual variando de 93 a 105%. O coeficiente de correlação resultou ser  $r = 0,997$  (Tabela III).

**Precisão:** Os resultados numéricos individuais, a média, desvio-padrão o coeficiente de variação de 20 alíquotas de um mesmo plasma, ensaiados em condições ideais de trabalho resultou ser: média  $164,3 \pm 12,2 \mu\text{U/ml}$ , sendo o coeficiente de variação de 7,4%.

Para a mesma amostra ensaiada em condições habituais de trabalho a média foi de  $160,0 \pm 12,2 \mu\text{U/ml}$  e o coeficiente de variação 7,6%.

TABELA III

PROVAS DE RECUPERAÇÃO ADICIONANDO QUANTIDADES CRESCENTES DE INSULINA HUMANA A UM MESMO PLASMA

TUBO Nº	QUANTIDADE EXISTENTE	QUANTIDADE ADICIONADA	VALOR ESPERADO	VALOR REGISTRADO	
	mµg	mµg	mµg	mµg	%
1	0,02	—	0,02	0,019	99,5
	0,02	—	0,02	0,021	105
2	0,02	0,02	0,04	0,037	93
	0,02	0,02	0,04	0,042	105
3	0,02	0,03	0,05	0,051	102
	0,02	0,03	0,05	0,047	94
4	0,02	0,08	0,10	0,101	101
	0,02	0,08	0,10	0,097	97

$r = 0,997$

### ESPECIFICIDADE EFEITO DA DILUIÇÃO DO PLASMA

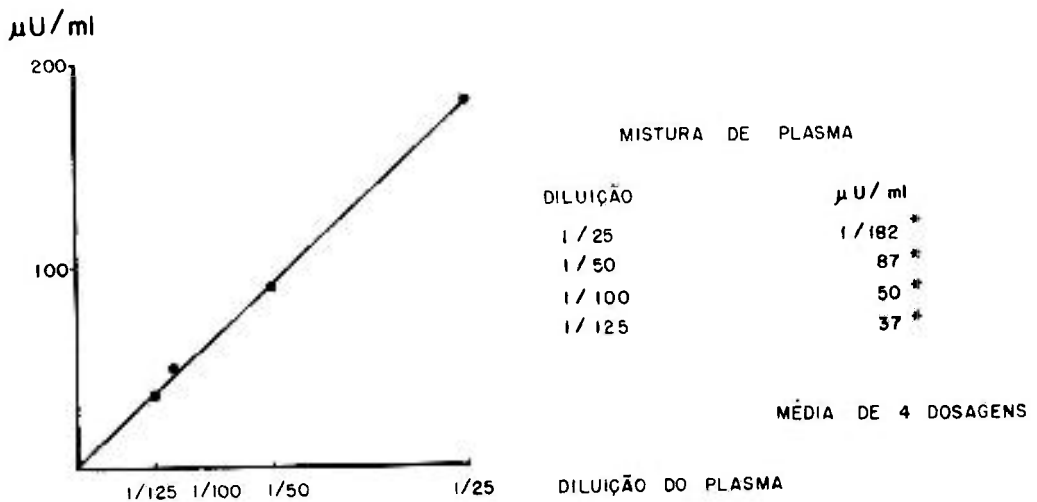


FIGURA 5

## DISCUSSÃO

Para a marcação da insulina empregamos a modificação do método de Hunter e Greenwood, como sugerido por Yalow e Berson<sup>2</sup>. Adicionando plasma humano, cujas proteínas serviriam para prevenir a adsorção do hormônio ao tubo de iodação e reduzir a sua degradação, sendo os reagentes adicionados em sucessão a mais rápida possível, permitindo-se poucos segundos entre as etapas sucessivas.

O método consiste na oxidação do iodo pela cloramina T. O  $I^2$  ou  $I^+$  se liga com grande eficiência nas posições orto dos resíduos tirosina da molécula da insulina<sup>14</sup>. O metabissulfato de sódio é utilizado para reduzir o iodo que não tenha sido substituído no hormônio, de modo que a proteína carreadora, "plasma azul", possa ser adicionada sem que haja a sua iodação.

Em virtude de ser necessária a purificação do hormônio marcado para separá-lo do iodo que não reagiu e dos componentes danificados, a adição do plasma no processo de iodação, já em si se constitui em um processo de purificação.

Na purificação da insulina<sup>1 2 5 I</sup>, empregamos, inicialmente, cromatografia de adsorção em coluna de celulose que, embora de feitura simples, foi substituída em nosso laboratório, pela cromatografia em coluna de exclusão molecular "Sephadex", após separação do melhor componente do hormônio marcado por eletroforese em gel de amido (fração 2), de melhor eficiência e resolução.

O problema da fração danificada do hormônio, não termina com a purificação da mistura iodada inicial. Apresentará danos posteriores na incubação do plasma durante o ensaio, devido à ação de enzimas plasmáticas e outros fatores até um certo grau sob o controle do investigador. Assim, o plasma diluído, fervura de reagentes, quando possível, podem reduzir esses danos, que ocorrem mesmo na ausência de plasma, atribuídos, parcial ou totalmente, ao que se chamou "catástrofe de decaimento<sup>21</sup>", relacionada a múltiplas substituições com radioiodado na molécula de insulina, em que o decaimento de um átomo de iodo deixando a molécula do hormônio ainda marcada permite que esta sofra posterior degradação, resultando na liberação de radioiodo ou de fragmentos peptídicos.

Pelo fato de, nas condições em que se faz o radioensaio, as concentrações do antígeno hormonal e do seu anticorpo serem extremamente baixas, os complexos antígeno-anticorpo permanecem em solução, devendo ser separados do hormônio livre por técnicas especiais e daí se obter a relação B/F (hormônio complexado/hormônio livre).

As diversas técnicas usadas para esta separação se valem das atividades adsorptivas de hormônios livres ou da precipitação seletiva dos complexos por sal, segundo anticorpo, acoplamento a polímeros insolúveis, etc.

O primeiro método de adsorção a ser empregado foi o da cromatoeletroforese em fitas de papel<sup>2</sup>. O hormônio livre é adsorvido no local de aplicação enquanto o ligado ao anticorpo migra com as proteínas séricas. Esta técnica, é o único método disponível que permite separar o iodo livre dos demais componentes da reação. A separação em fitas de papel é limitada, no entanto, a um volume de 0,5 ml no máximo, enquanto os procedimentos em tubos de ensaio permitem análises de volumes 5 a 10 vezes maiores, com vantagem dos últimos quando a sensibilidade permitindo o uso de concentrações muito baixas de hormônio marcado.

Escolhemos entre as várias técnicas de separação em tubo, a do carvão ativado recoberto com plasma<sup>15</sup>. O uso deste adsorvente para radioimunoensaio de hormônios protêicos plasmáticos depende da adsorção do hormônio livre na presença de concentração moderadamente elevada de proteínas séricas não específicas (competindo para os locais de adsorção) e da exclusão do hormônio danificado e do complexo hormônio-anticorpo, nas mesmas condições.

O hormônio danificado e o unido ao anticorpo, têm menor afinidade do que a forma livre para os locais de adsorção.

Para o uso do carvão ativado, Herbert<sup>22</sup> menciona que a sua cobertura com uma molécula de tamanho apropriado diferente para cada hormônio, dextrana 70 ou 80 no caso de insulina, sendo necessária para que houvesse boa separação do hormônio livre, permitindo que este se fixe ao adsorvente, passando através dos poros entre as moléculas de cobertura - "peneira", que, no entanto, seriam pequenos para a passagem do complexo antígeno-anticorpo.

Por outro lado, Ekins<sup>23</sup> menciona que a cobertura de carvão não oferece vantagem.

Com efeito, existem evidências de que a ação de proteínas séricas na adsorção de hormônios, é antes uma inibição competitiva do que a produção de um sistema semelhante à "peneira", como quer Herbert<sup>15</sup>.

Qualquer que seja o mecanismo de funcionamento das superfícies de adsorção, na presença de proteínas plasmáticas ou de outro material de cobertura, o resultado do nosso trabalho revelou que o carvão ativado recoberto com plasma é adsorvente satisfatório para uma separação eficiente do hormônio livre e do complexo antígeno-anticorpo.

A quantidade ótima de adsorvente (0,2 ml de uma solução a 100 mg/ml)<sup>15</sup> foi selecionada com base na adsorção máxima de hormônio livre e da exclusão do complexo antígeno-anticorpo, quando se utiliza diluição de plasma 1:25, correspondendo a quantidade de adsorvente de 20 mg por tubo de reação.

Quanto às características do método, entre os fatores que determinam a máxima sensibilidade de um anticorpo, energia de interação entre hormônio e anticorpo - que se reflete essencialmente na queda inicial da curva-padrão, devemos considerar que esta energia aumenta à medida que baixa a temperatura. Nestas condições, para as incubações utilizam-se temperaturas ao redor de 4°C.

Por outro lado, deve-se usar a menor quantidade de insulina marcada, de modo que os locais de fixação dos anticorpos não estejam saturados pelo traçador, daí o emprego de hormônio com atividade específica elevada. Assim, um aumento progressivo na concentração do traçador oblitera gradualmente a região da inclinação mais aguda da curva-padrão, reduzindo a sensibilidade do ensaio. Para máxima sensibilidade devemos pois ter: concentração de hormônio (F + B) se aproximando de zero, anticorpo suficientemente diluído e concentração de traçador infinitamente pequena<sup>2</sup>.

É evidente que a menor concentração utilizada do traçador deve permitir uma contagem radioativa satisfatória em tempo de leitura não prolongado. Necessitamos então marcar o

hormônio com a maior atividade específica possível, compatível com a imunoreatividade e estabilidade do traçador<sup>20</sup>, o que no nosso estudo, variou de 200 a 300  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ .

Há, entretanto, circunstâncias em que não é necessário elevado grau de sensibilidade, por exemplo, quando medimos concentração elevada de hormônio. Passamos então a nos preocupar com a precisão. A máxima precisão é obtida quando a concentração do anticorpo e hormônio são elevados, não sendo limitada a quantidade de traçador empregada e podendo-se utilizar hormônios com atividades específicas mais baixas.

A avaliação das características da técnica utilizada, quanto à exatidão, especificidade, sensibilidade e precisão, demonstraram que o método apresenta todas as condições da mais alta confiança para ser empregado em estudos de fisiologia e patologia pancreática.

## SUMMARY

The following steps were employed for the radioimmunoassay of insulin in the human plasma:

- 1 - Labelling of porcine insulin with  $^{125}\text{I}$ .
- 2 - Purification of the labelled insulin through cellulose adsorption chromatography or starch gel electrophoresis followed by molecular exclusion column (Sephadex G-50 fine).
- 3 - Immunoreactivity test of the labelled insulin and antibody-binding.
- 4 - Separation of free hormone ( F ) from the antibody-bound ( B ) by the use of activated-charcoal coated with plasma.

B/F ratios plotted against the correspondent insulin standards concentrations allowed us to obtain a standard-curve where the unknown plasma insulin concentrations ( $\mu\text{U}/\text{ml}$ ) were obtained.

The operational characteristics of the method were evaluated through accuracy, specificity and precision, allowing us to measure plasma insulin levels in basal and after stimulation at the whole range of pancreatic pathology.

## RÉSUMÉ

Nous avons réalisé le dosage de l'insuline humaine par la méthode radio-immunologique en utilisant les suivantes phases:

- 1 - Marquage de l'insuline avec  $^{125}\text{I}$ .
- 2 - Purification de l'insuline marquée sur chromatographie d'adsorption en cellulose ou électrophorèse de gel d'amidon et gel filtration sur "Sephadex" G-50.
- 3 - Comportement immunologique de la préparation marquée en présence de l'antiserum anti-insuline.
- 4 - Séparation de l'hormone libre ( F ) de l'hormone liée aux anticorps ( B ) en utilisant le charbon avec couverture plasmatique.

La courbe standard est obtenue après incubation avec la relation B/F et quantités progressivement croissantes des standards de l'insuline humaine.

La méthode radio-immunologique de dosage du insuline plasmatique est une analyse spécifique, sensible, rapide e qui fournit une information cliniquement valable en routine hospitalière.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - YALOW, R.S. & BERSON, S.A. – Immunoassay of plasma insulin. In: Methods of Biochemical Anal. 12 Glick, D. Ed., Interscience Publishers, New York, pag. 69, 1964.
- 2 - YALOW, R.S. & BERSON, S.A. – General Principles of radioimmunoassay. In: Radioisotopes in Medicine: in vitro studies. Hayes, R.L.; Goswitz, F.A. Murphy, B.E.P. Ed. US Atomic Energy Commission, Oak Ridge, pag. 7, 1968.
- 3 - YALOW, R.S. & BERSON, S.A. – Principles of immunoassay of peptide hormones in plasma - Clin. Endocrinol. II, Astwood, E.B. and Cassady, C.E. Eds. New York and London, pag. 699, 1968.
- 4 - YALOW, R.S. & BERSON, S.A. – Plasma insulin in man, Editorial, American J. Med. 29 : 1, 1960.
- 5 - YALOW, R.S. & BERSON, S.A. – General aspects of radioimmunoassay procedure. In: in vitro procedures with radioisotopes in medicine. International Atomic Energy Commission, Vienna, pag. 455, 1970.
- 6 - YALOW, R.S. & BERSON, S.A. – Immunoassay of the protein hormones. In: The Hormones, vol. 4, Pincus, G.; Thimann, K.V. and Astwood, E.B. Ed., Academic Press Inc., New York, pag. 557, 1964.
- 7 - YALOW, R.S. – Veterans Adm. Hosp. Bronx, New York - Informação Pessoal.
- 8 - HERBERT, V.; LAU, K.S.; GOTTLIEB, C.M. & BLEICHER, S.J. – Coated charcoal immunoassay of insulin - J. Clin. Endocr. Metab. 25 : 1375, 1965.
- 9 - SOELDNER, J.S. & SLONE, D. – Critical variables in the radioimmunoassay of serum insulin using the double antibody technic - Diabetes 14 : 771, 1965.
- 10 - HUNTER, W.M. & GREENWOOD, F.C. – Preparation of iodine<sup>131</sup> labelled human growth hormone of high specific activity - Nature 194 : 495, 1962.
- 11 - GREENWOOD, F.C.; HUNTER, W.M. & CLOVER, J.S. – The preparation of <sup>131</sup>I labelled human growth hormone of high specific radioactivity. Biochem. J. 89 : 114, 1963.
- 12 - YALOW, R.S. & BERSON, S.A. – Topics on radioimmunoassay of peptide hormones. In: Protein and polypeptide hormones, Margoulies, M., Ed. Excerpta Medica Foundation, Amsterdam, vol. 161, pag. 36, 1969.
- 13 - YALOW, R.S. & BERSON, S.A. – General principles of radioimmunoassay. Clin. Chim. Acta 22: 51, 1968.
- 14 - YALOW, R.S. & BERSON, S.A. – Recent advances in immunoassay of peptide hormones in plasma - Diabetes. Proceed. 6<sup>th</sup> Congress Internat. Diab. Fed. Excerpta Medica Found., Congress series N<sup>o</sup> 172 S, Amsterdam, pag. 50, 1969.

- 15 - PALMIERI, M.A.; YALOW, R.S. & BERSON, S.A. — Adsorbent techniques for the separation of antibody-bound from free hormone in radioimmunoassay. A ser publicado.
- 16 - YALOW, R.S. & BERSON, S.A. — Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. J. Clin. Invest. 39: 1157, 1960.
- 17 - SMITHIES, O. — Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults. Biochem. J. 61: 629, 1955.
- 18 - SMITHIES, O. — An improved procedure for starch gel electrophoresis: Further variations in the serum proteins of normal individuals. Biochem. J. 71: 585, 1959.
- 19 - MELO, E.H.L. — Hosp. Serv. Publ. - Informação pessoal.
- 20 - BERSON, S.A.; YALOW, R.S.; GLICK, S.M. & ROTH, J. — Immunoassay of protein and peptide hormones. Metab. 13: 1135, 1964.
- 21 - YALOW, R.S. & BERSON, S.A. — Labelling of proteins. Problems and practices Trans. N.Y. Acad. Sci., 28: 1033, 1960.
- 22 - HERBERT, V. — Coated charcoal of free labelled hormone from hormone bound to antibody. In: Protein and Polypeptide hormones. Margoulies, M. Ed. Excerpta Medica Foundation, Amsterdam, vol. 161, pag. 55, 1969.
- 23 - EKINS, R.P. — Charcoal - In: Protein and Polypeptide hormones. Margoulies, M. Ed. Excerpta Medica Foundation, Amsterdam, vol. 161, pag. 633, 1969.