

Avaliação e padronização de método para determinação de níveis de insulina total e livre em plasma contendo anticorpos antiinsulina*

IRACÉLIA TORRES DE TOLEDO E SOUZA¹, BERNARDO LÉO WAJCHENBERG²

I – INTRODUÇÃO

Desde que Yalow e Berson⁽¹²⁾ introduziram o método de radioimunoensaio para a determinação da insulina plasmática, coletou-se uma quantidade enorme de informações acerca da concentração de insulina imunorreativa (IRI) no plasma de indivíduos normais e diabéticos não tratados com insulina.

Quando pacientes recebem insulina comercial bovina ou também associada a porcina, desenvolvem, sistematicamente, decorridos poucos meses, anticorpos antiinsulínicos⁽³⁾, passando o seu plasma a conter uma mistura de insulina livre e insulina ligada ao anticorpo.

Devido à presença de anticorpos, não é possível determinar a quantidade de insulina imunorreativa pelo método convencional, pois os anticorpos antiinsulínicos endógenos interferem na reação entre a radioinsulina, insulina endógena e anticorpos-antiinsulínicos obtidos em cobaia, introduzidos no sistema para a feitura do radioimunoensaio.

Sendo de interesse clínico o conhecimento da concentração de insulina efetivamente disponível periféricamente, ou seja, a forma livre, esta só será quantificável por radioimunoensaio desde que se afaste previamente da reação o complexo insulina-anticorpo endógeno.

Com esse objetivo, foram desenvolvidos diversos métodos de separação de insulina livre e total, recorrendo-se a procedimentos diversos, tais como: 1) ultracentrifugação⁽²⁾, que requer instrumentação cara; 2) filtração em gel⁽¹¹⁾, que não permite processar, simultaneamente, número elevado de amostras; 3) extração com álcool (álcool-ácido)⁽⁶⁾,

com o inconveniente de elevar o valor dos resultados de insulina livre, provavelmente em virtude de se liberar parte da fração ligada ao anticorpo; 4) precipitação do complexo antígeno-anticorpo ou do próprio anticorpo com polietileno-glicol, de peso molecular 6.000 ("PEG")⁽¹⁰⁾.

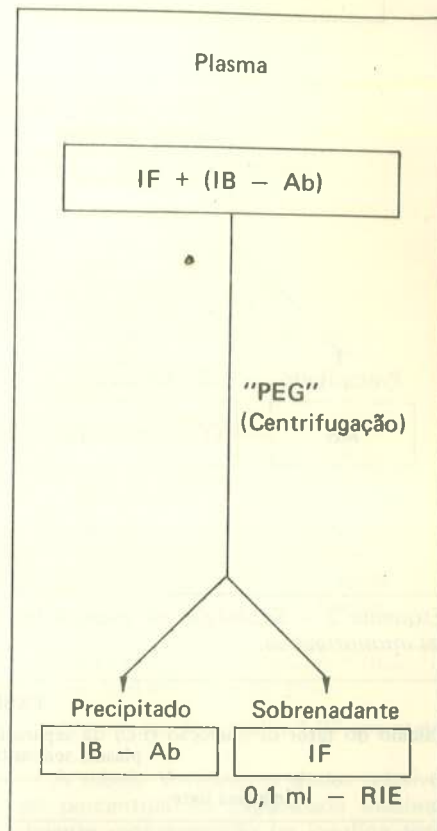
Em virtude da experiência acumulada com o uso de "PEG" na separação dos complexos antígeno-anticorpo dos hormônios livres, encaminhamos nossa preferência para o emprego de "PEG" seguindo o método proposto por Nakagawa *et al.*⁽¹⁰⁾ para a quantificação dos níveis de insulina livre e total em plasma de indivíduos diabéticos em tratamento insulínico, por radioimunoensaio (RIE).

II – MATERIAL E MÉTODOS

O plasma de indivíduos em tratamento insulínico, por conter insulina livre e ligada a anticorpos específicos endógenos, deve ser processado para a determinação das 2 frações de insulina seguindo o esquema abaixo, que sintetiza o fracionamento de insulina livre (IF) e ligada ao anticorpo (IB–Ab), em que a adição de polietileno glicol a 25% à amostra de plasma *v/v* precipita o complexo insulina-anticorpo, utilizando-se o sobrenadante (IF) para o RIE (esquema 1).

A insulina total (IT) no plasma de pacientes tratados com insulina comercial bovina e apresentando anticorpos foi separada de acordo com o método de Nakagawa *et al.*⁽¹⁰⁾, em que o complexo insulina-anticorpo é dissociado com ácido clorídrico (esquema 2).

Para a dissociação do complexo insulina-anticorpo, a amostra deverá ter o seu pH levado para aproximadamente 2,5 com HCL. Após a incubação por 1 hora à temperatura ambiente, adicionamos "PEG" e elevamos o pH para 8,0



Esquema 1 – Separação de insulina livre imunorreativa.

com hidróxido de sódio 1N. Após centrifugação, deve-se obter um sobrenadante claro, onde se encontra a insulina total (esquema 2).

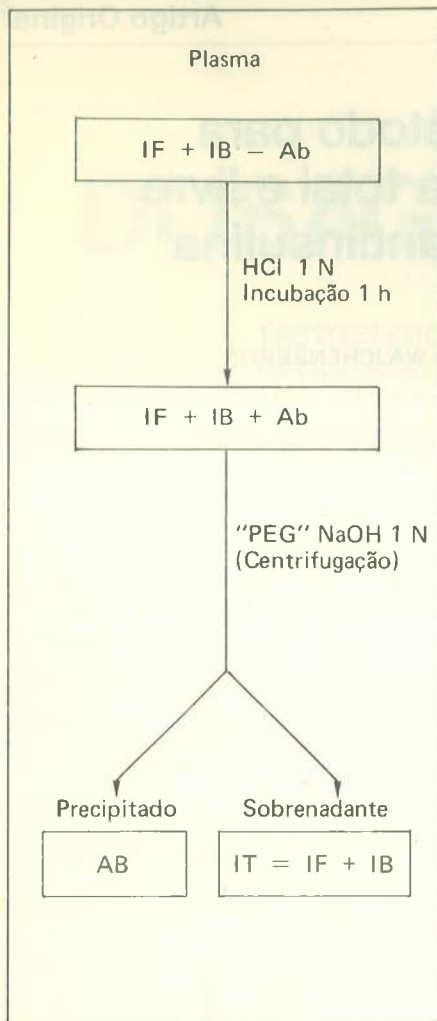
Ocasionalmente pode ocorrer turbidez, dificultando a separação das fases, o que pode ser corrigido ajustando com precisão o pH para $8,0 \pm 0,3$.

A capacidade ligante do plasma foi obtida incubando uma amostra de plasma com radioinsulina. Após a incubação, similar à do RIE, fazemos a separação da insulina ¹²⁵I ligada ao anticorpo circulante (B) e da livre, com "PEG", e medindo-se o precipitado determinamos

* Trab. do Inst. de Pesq. Energéticas e Nucleares (IPEN) e Unid. de Diabetes e Adrenal, Hosp. das Clínicas da Univ. de São Paulo.

1. Bioquím.-Farmacêutica; Doutora em Bioquím.
2. Prof.-Adjunto de Clínic. Méd., Hosp. das Clínicas da Fac. de Med. da Univ. de São Paulo.

Pedidos de separata: Dr. Bernardo Léio Wajchenberg – Unidade de Diabetes e Adrenal – Hospital das Clínicas, Caixa Postal 8.901, São Paulo, SP.



Esquema 2 – Separação da insulina total imunorreativa.

a capacidade ligante do plasma como porcentagem da radioatividade total empregada (T).

$$\text{Capacidade ligante: } \frac{B}{T} \times 100$$

2.1. Procedimento com amostra de plasma a ser ensaiada após separação da insulina livre (IF)

A 0,5ml de amostra de plasma adiciona-se 0,5ml de "PEG" 25% (solução aquosa) gelado e, após agitação e centrifugação, tomamos 100 μ l do sobrenadante (IF) do "PEG" para RIE.

2.2. Procedimento com amostra de plasma a ser ensaiada após separação da insulina total (IT)

A 0,5ml de plasma adicionamos 100 μ l de HCl 1N e, após agitação em "Vortex", incubamos por 1 hora à temperatura ambiente. Adicionamos então 0,7ml de "PEG" 25% e, após agitação em "Vortex", ajustamos o pH com 100 μ l de NaOH 1N e agitamos novamente. As proteínas de grande peso molecular (anticorpos) são precipitadas. Após centrifugação usamos 100 μ l do sobrenadante (IT) no RIE. Durante as operações de separação insulínica acumulam-se perdas que devem ser estimadas para correção apropriada. Para tanto, adicionam-se às amostras de plasma, sem anticorpo e de concentração conhecida de insulina, quantidades finitas de insulina marcada e determina-se, ao final das operações, um fator de correção para as perdas da radioatividade. Avaliamos, assim, além

do fator de correção para a diluição final e as perdas, a recuperação.

2.3. Capacidade insulino-ligante do plasma

Para esta determinação tomamos 100 μ l da amostra de plasma e procedemos à incubação somente com a radio-insulina, como já indicado.

2.4. Radioimunoensaio

Para o radioimunoensaio preparamos uma série de tubos com um volume final de 0,3ml por tubo (0,1ml – amostra ou padrão; 0,1ml de soro antiinsulina na diluição de 1:20.000, chegando-se a uma diluição final de 1:60.000, e 0,1ml de insulina ¹²⁵I (\pm 20.000 cpm).

Após a 1ª incubação de 24h com o anticorpo e 2ª incubação 24h com o traçador, utilizamos, como técnica de separação da insulina livre e ligada ao anticorpo, a precipitação da forma ligada com 0,3ml de "PEG" 25% gelado⁽⁴⁾.

O poder competitivo e, conseqüentemente, a massa do hormônio a determinar é apreciada através da relação B/T, ou seja, mercê da razão entre as quantidades de hormônios ligados e radioatividade total do traçador, descontando-se as ligações inespecíficas do traçador (NSB).

Efeito do "PEG" na curva-padrão

Preparamos uma curva-padrão como valores que se distribuem entre 3 a 200 μ U/ml e uma outra curva-padrão com as mesmas concentrações, mas diluídas com "PEG" a uma diluição final 12,5% para compararmos o percentual de ligação da insulina marcada na presença de "PEG" com diluição final que existe em cada amostra a ser ensaiada.

TABELA I

Cálculo do fator de correção (FC) da separação da insulina total e livre com 10 amostras de plasma sem anticorpos presentes

Insulina livre		Insulina total	
Adição em 0,5ml de plasma	Adição em 0,1ml do sobrenadante para RIE	Adição em 0,5ml de plasma	Adição em 0,1ml do sobrenadante para RIE
3.033	295	3.100	200
3.195	310	3.230	175
3.150	280	3.095	180
2.980	275	2.980	158
3.100	320	3.145	158
3.070	298	2.930	195
3.048	330	2.890	185
3.170	300	3.110	194
3.125	290	3.258	188
$\bar{X} = 3.112$	$\bar{X} = 296$	$\bar{X} = 3.097$	$\bar{X} = 180$
$FC_{\text{separação}} = \frac{3.112}{296} = 10,51$		$FC_{\text{separação}} = \frac{3.079}{180} = 17,10$	
$FC_{\text{volume}} = \frac{10,51}{5} = 2,10$		$FC_{\text{volume}} = \frac{17,10}{5} = 3,42$	
$FC_{\text{final}} = 2,10$		$FC_{\text{final}} = 4,42$	

* Contagens por minuto de radioinsulina adicionada.

III – RESULTADOS

A tabela I reúne os dados numéricos do fator de correção em 10 amostras de plasma de controles normais.

A adição de radioinsulina ao plasma apresentou uma média de 3.112cpm para a insulina livre (IF) e 3.079cpm para insulina total (IT). Após a separação com "PEG", obtivemos uma média de 296cpm para IF e 180cpm para IT, em uma tomada de 100 μ l, obtendo-se um fator de correção 2,10 para IF e 3,42 para a IT.

Na tabela II apresentamos a reprodutibilidade do fator de correção em 10 separações diferentes no decorrer de 1 ano. Obtivemos, para a IF, uma média \pm DP de 1,97 \pm 0,11, com o coeficiente de variação de 5,8% e, para a IT, a média \pm DP foi de 3,66 \pm 0,30, com um coeficiente de variação de 8,15%.

A tabela III designa os valores da concentração de insulina quantificada

TABELA II

Reprodutibilidade do fator de correção (FC) para o sobrenadante de "PEG" de insulina livre e total em 10 separações diferentes de plasmas normais

Insulina livre (IF)	Insulina total (IT)
1,94	3,46
2,00	3,33
2,10	3,39
1,89	4,00
1,93	3,56
2,20	3,82
1,80	3,50
1,93	4,05
2,02	3,42
1,90	4,10
<hr/>	
$\bar{X} = 1,97$	$\bar{X} = 3,66$
DP=0,11	DP=0,30
CV=5,8%	CV=8,15%

TABELA III

Concentração de insulina total (IT) e livre (IF) após separação do plasma com "PEG" e a medida diretamente no plasma (insulina direta), de indivíduos normais antes e após estímulo glicêmico

Insulina direta	Insulina livre	Insulina total
12	12	16
19	18	21
45	41	47
71	73	75
95	96	99
103	105	113
125	123	128
138	122	150
156	144	172
172	166	197
<hr/>		
$r = 0,99$	$r = 0,99$	
$r = 0,99$		
Capacidade insulino-ligante do plasma \cong NSB (1 a 5%)		

TABELA IV

Medida de insulina nos sobrenadantes de "PEG" lidos na curva-padrão usual e naquela diluída com "PEG" (12,5%)

Resultados na curva direta μ U/ml	Resultados na curva em "PEG" μ U/ml
2	6
4	8
16	32
20	64
24	72
36	80
49	92
52	104
57	116
60	124
70	128
80	148
90	170
100	200

$r = 0,99$

diretamente e no sobrenadante de "PEG" (IF e IT) de plasma normais colhidos em diversos tempos após carga de glicose oral. O coeficiente de correlação foi de 0,99 na comparação de IL x

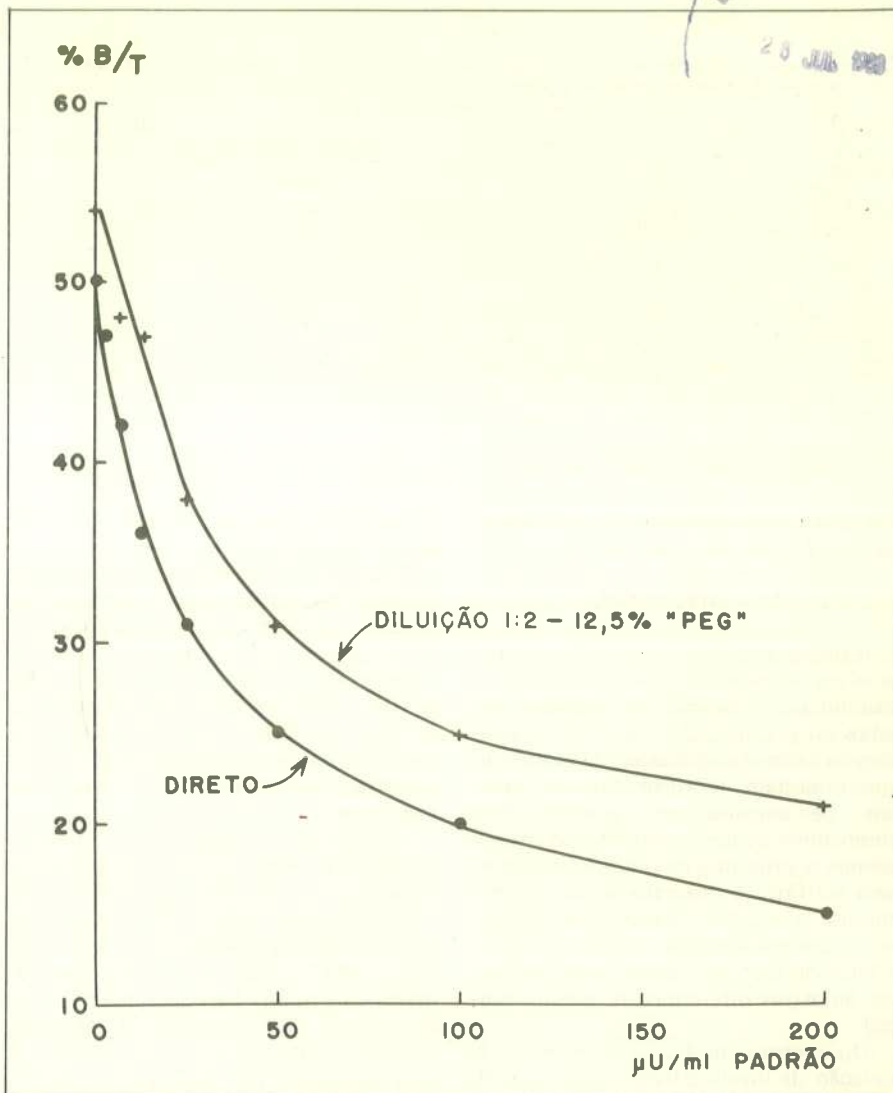


Fig. 1 - Curvas-padrão para o radioimunoensaio de insulina realizadas diretamente ("Direto") e em padrões diluídos 1:2 com "PEG" a uma concentração final de 12,5% de "PEG".

média diferente no plasma (insulina direta); IT x insulina direta e IF x IT.

Observa-se que os resultados da IL x direta são muito próximos, praticamente iguais, sendo que, para os valores mais elevados da insulinemia, a forma livre é menor do que a direta. Por outro lado, a IT foi sistematicamente maior do que a direta e livre, particularmente a níveis hormonais mais elevados.

Na fig. 1 acham-se representadas uma curva-padrão preparada de modo a cobrir valores de insulina que se estendem de 3 a 200 μ Ci/ml e outra obtida a partir da mesma solução-padrão estoque, mas diluída a 12,5% com "PEG", havendo uma correlação altamente significativa entre as 2 curvas ($r = 0,99$).

Na tabela IV estão os resultados em μ U/ml dos sobrenadantes de "PEG" lidos na curva-padrão direta e na diluída 1:2 com "PEG" ($r = 0,98$).

Pela diferença observada entre as curvas-padrão com e sem "PEG", os valores de insulina no plasma tratado com "PEG", lidos na curva-padrão usual,

mostraram ser em média 1,87 vez maiores.

A tabela V reúne os dados relativos ao percentual da capacidade insulino-ligante, concentração de insulina total (IT) e livre (IF) contidas no sobrenadantes de "PEG" em amostras de plasma de pacientes diabéticos tratados com insulina comercial e que não desenvolveram anticorpos antiinsulínicos. Os resultados são comparáveis aos obtidos em controles normais: a insulina livre variou de 2 a 3 μ Ui/ml, a total, de 3 a 12 μ U/ml e a capacidade insulino-ligante do plasma de 1 a 5%.

Na tabela VI temos os resultados em 10 amostras de plasma de pacientes diabéticos tratados com insulina comercial e que desenvolveram anticorpos antiinsulínicos. Observa-se que a percentagem de ligação da radioinsulina variou de 47 a 87%.

Os níveis de insulina basal total variaram de 160 a 3.000 μ U/ml, sendo que a insulina livre se manteve dentro do observado nos indivíduos normais, de 4

TABELA V

Concentração de insulina total (IT) e livre (IF) e percentagem de ligação em 10 amostras de plasma colhidos em jejum de pacientes diabéticos em tratamento insulínico e sem desenvolvimento de anticorpos

Amostras	IF μU/ml	IT μU/ml	Capacidade insulino-ligante do plasma	
				%
nº				
1	2	3		3
2	2	9		3
3	2	9		5
4	2	3		2
5	2	10		4
6	2	3		4
7	2	12		2
8	2	4		1
9	3	4		1
10	2	4		1

a 9μU/ml, independente dos valores alcançados pela insulinemia total.

IV – DISCUSSÃO

Na separação de insulina livre e total, os erros adicionados com as perdas de insulina por adsorção nas paredes dos tubos ou precipitação com "PEG", bem como a própria degradação da radioinsulina, poderiam, teoricamente, ser variáveis, de amostra para amostra, mas observamos pequena variação ao empregarmos o princípio da diluição isotópica para verificar a recuperação da insulina durante o seu fracionamento e, conforme se poderá observar nas tabelas I e II, o fator de correção variou muito pouco em amostras diferentes de plasma normal.

Do mesmo modo, o coeficiente de variação da insulina livre e total com 10 separações diferentes de plasma normal (reprodutibilidade interensaio) foi excelente para a insulina livre e boa para a total.

Em virtude da semelhança do fator de correção para diferentes plasmas, não realizamos o cálculo do fator em amostras isoladas e, sim, a avaliação de 10 amostras escolhidas ao acaso, em cada ensaio, para assim obter o fator de correção médio para o ensaio respectivo.

Embora teoricamente o fator de correção obtido em soros normais não possa ser utilizado para o ensaio inteiro, em virtude de concentração variável do anticorpo nas diversas amostras e da afinidade diferente dos diversos anticorpos para a insulina, nossa experiência mostra que, de maneira geral, não há diferenças significativas entre os valores do fator de correção obtidos com plasmas normais e para os diversos plasmas de pacientes, com anticorpos antiinsulínicos, no mesmo ensaio. Tal fato pode ser observado na tabela VI, em que se nota uma correlação significativa ($r = 0,77$) entre a insulina total (ou ligada ao anticorpo) e a capacidade insulino-ligante do plasma, sendo a últi-

ma determinada pela ligação total dos anticorpos presentes.

Entretanto, às vezes se observa uma discrepância entre os dois parâmetros, quando então se torna necessário obter fator de correção para cada amostra isolada. Tal situação é diversa da presente no RIE, quando empregamos o mesmo anticorpo em concentrações equivalentes para a curva-padrão e nas amostras analisadas, e assim este fator é eliminado.

A falta de correlação entre os níveis de insulina livre e total nos pacientes tratados com insulina que desenvolveram anticorpos (tabela VI) mostra uma das vantagens do método de separação com "PEG", que é a obtenção dos níveis de insulina livre sem interferência dos valores daquela ligada ao anticorpo (insulina total-insulina livre), como já fora observado por Nakagawa *et al.*⁽⁶⁾.

Embora esses AA.⁽⁶⁾ mencionem que a curva-padrão para a insulina na presença de "PEG" seria superponível àquela obtida na tampão, isso não foi confirmado por Kuzuya *et al.*⁽⁹⁾ e Heding e Karperska-Czyzykowa⁽⁷⁾, que observaram valores diferentes entre a mesma amostra lida na curva-padrão com e sem "PEG". Do mesmo modo, observamos que os valores lidos na curva-padrão com 12,5% de "PEG" foram, em média, 1,87 vez maiores do que aqueles obtidos na curva sem "PEG" (tabela IV e fig. 1).

Interessante observar que o método descrito nesse trabalho permitiu detectar, em indivíduos normais pelo menos, uma quantidade significativa de insulina imunorreativa após precipitação com "PEG" (tabelas III e V), ou seja, uma diferença entre a insulina total e livre também observada por Ilkov *et al.*⁽⁸⁾ que denominaram de fração indireta da insulina, cujo significado ainda não foi definido e que poderia ser apenas um artefato de técnica (considerando o número maior de manipulações e fator de correção também maior, para medir a insulina total em relação à livre). Tal fração indireta foi também observada

em plasma de pacientes em terapêutica insulínica e que não desenvolveram anticorpos. Evidentemente, esta fração não poderá ser identificada na presença de anticorpos antiinsulínicos.

Ocasionalmente, pacientes diabéticos, em tratamento insulínico, com anticorpos presentes, apresentam níveis de insulina livre basal variáveis, chegando às vezes até 400μU/ml ou acima, estudados em múltiplas ocasiões e recebendo uma dose constante de insulina exógena, sem que se observem alterações significativas da glicemia, havendo, entretanto, uma certa correlação com a insulina total correspondente (dados não publicados). Aliás, Hayford e Thompson⁽⁵⁾ mostraram que a concentração integrada de glicose não mostra correlação significativa com a concentração integrada de insulina livre, no nictêmero, havendo, entretanto, uma correlação significativa entre a concentração integrada de insulina livre com a total. Entretanto, não são conhecidos de maneira precisa os fatores que regulam as concentrações de insulina livre e total observadas em um mesmo paciente. Em geral, em condições de equilíbrio dinâmico, a relação entre a insulina livre e ligada ao anticorpo é uma função do título dos anticorpos e das constantes de equilíbrio para as reações de ligação, mas a concentração absoluta do hormônio livre dependerá do pool total do hormônio.

A assincronia entre as concentrações de glicose e de insulina livre, no paciente diabético, em tratamento insulínico, resulta em um padrão de concentração de insulina livre inapropriada relativa às necessidades metabólicas, as concentrações de insulina livre podendo ser inadequadas para as sobrecargas dietéticas ainda que às vezes excessivas para os períodos interalimentares.

Finalmente, a possibilidade de se medir a concentração de insulina ligada ao anticorpo, em casos de difícil controle do diabetes ou em resistência à insulina, pode dar ao clínico informações para distinguir entre a resistência insulínica imune a não-imune. Com efeito, Berson e Yalow⁽¹⁾ demonstraram uma correlação entre a capacidade total ligante para insulina no plasma (insulina total) e as necessidades de insulina em pacientes com resistência imune à insulina exógena. Nestes pacientes, a capacidade ligante do plasma geralmente excede a 10.000μU/ml.

Em 3 pacientes com resistência à insulina, a insulina ligada ao anticorpo, avaliada pela diferença entre a insulina total e livre (IB - Ab), foi de 3.000, 6.700 e 10.500μU/ml, enquanto, na nossa experiência, pacientes em terapêutica insulínica sem resistência atingem, no máximo, concentração de IB - Ab, correspondente a 4.700μU/ml (dados não publicados).

TABELA VI

Concentração de insulina livre (IF) e total (IT) e percentagem de ligação da radioinsulina em 10 amostras basais de plasma de pacientes diabéticos em insulino-terapia, com desenvolvimento de anticorpos

Amostras nº	IF	IT	Capacidade insulino-ligante do plasma
	µU/ml	µU/ml	%
1	9	930	71
2	4	416	65
3	4	740	78
4	4	723	74
5	7	424	67
6	6	660	69
7	9	256	57
8	6	3.000	87
9	4	160	47
10	8	864	70

r = 0,77.

RESUMO

Os autores descrevem um método simplificado para medir insulina livre, total e ligada ao anticorpo em pacientes tratados com insulina e que apresentam anticorpos anti-insulínicos.

A insulina livre, metabolicamente ativa, é extraída do plasma com polietileno-glicol a 25%. A insulina total é extraída com a solução de polietileno glicol após a dissociação do complexo antígeno-anticorpo com HCl diluído. Alíquotas dos extratos são usadas no sistema de radioimunoensaio. A insulina

ligada ao anticorpo é a diferença entre os valores de insulina total e livre e reflete a concentração dos anticorpos insulínicos presentes. Determinou-se também a capacidade insulino-ligante do plasma, após sua incubação com radioinsulina e que se correlacionou significativamente com a insulina total nos pacientes com anticorpos antiinsulina. Os níveis de insulina livre medidos nos pacientes com anticorpos foram similares aos observados nos controles normais, independentemente dos valores da insulina total.

REFERÊNCIAS

- Berson SA, Yalow RS: 1959. Quantitative aspects of the reaction between insulin and insulin-binding antibody. *J Clin Invest* 38: 1.196.
- Berson SA, Yalow RS: 1962. Immunoassay of plasma insulin. *Ciba Coll Endocrinol* 41: 182.
- Berson SA, Yalow RS: 1964. The present status of insulin antagonists in plasma. *Diabetes* 13: 247.
- Desbuquois B, Aurbach GD: 1971. Use of polyethylene glycol to separate free and antibody-bound peptide hormones in radioimmunoassay. *J Clin Endocrinol Metab* 33: 732.
- Hayford JT, Thompson RG: 1982. Free and total insulin integrated concentrations in insulin-dependent diabetes. *Metabolism* 31: 387.
- Heding LG: 1969. Determination of free and antibody-bound insulin in insulin treated diabetic patients. *Hormone Metab Res* 1: 145.
- Heding LG, Kasperska-Czyzykowa T: C-peptide and proinsulin after oral glucose. *Acta Med Scand* (no prelo).
- Ilkov AT, Damianova MP, Koparanova OL: 1977. A precise radioimmunochemical method for determination of free insulin and insulin bound to serum proteins, including antibodies. *Acta Diabet Lat.* 14: 9.
- Kuzuya H, Blix PM, Horwitz DL, Steiner DF, Rubenstein AH: 1977. Determination of free and total insulin and C-peptide in insulin-treated diabetics. *Diabetes* 26: 22.
- Nakagawa S, Nakayama H, Sasaki T, Yoshino K, Ying Yu Y, Shinozaki K, Aoki S, Mashimo K: 1973. A simple method for the determination of serum free insulin levels in insulin-treated patients. *Diabetes* 22: 590.
- Pearson MJ, Martin FIR: 1970. The separation of total plasma insulin from binding proteins using gel filtration: Its application to the measurement of rate of insulin disappearance. *Diabetologia* 6: 581.
- Yalow RS, Berson SA: 1960. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J Clin Invest* 39: 10.

SUMMARY

Evaluation and standartization of a method for measuring free and total insulin in plasma containing antibodies to insulin.

The authors describe a simplified method for measuring free, total and antibody-bound insulin in insulin-treated patients in whom antibodies to insulin are present. Free insulin, metabolically active, is extracted from plasma with polyethylene glycol (MW: 6,000) 25% solution. Total insulin is extracted from plasma with polyethylene glycol solution after dissociation of the antibody-antigen complex with dilute HCl. Aliquots of the extracts are used in the radioimmunoassay system. Antibody-bound insulin is the difference between total and free insulin and reflects the concentration of insulin antibodies present. Insulin-binding capacity of the plasma was also evaluated after its incubation with radioinsulin and presented a significant correlation with total insulin concentration in the patients with insulin antibodies. Free insulin levels measured in insulin-treated diabetics presenting antibodies to the hormone were similar to those obtained in the normal controls independently from total insulin levels.