

08403 31135

ISSN 0701 3084



**CNEN/SP**

**ipen** Instituto de Pesquisas  
Energéticas e Nucleares

GOVERNO DO BRASIL

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA DOS PROCEDIMENTOS DE IMUNIZAÇÃO  
PARA OBTENÇÃO DE ANTICORPO ANTI-PRÓ-INSULINA  
HUMANA PARA RADIOIMUNOENSAIO**

**Martha do NASCIMENTO, Vânia Caira BORGHI, Maria Helena BELLINI,  
Carlos Henrique MESQUITA e Bernardo Léo WAJCHENBERG**

**IPEN-Pub-374 /**

**AGOSTO/1992**

**SÃO PAULO**

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA DOS PROCEDIMENTOS DE IMUNIZAÇÃO  
PARA OBTENÇÃO DE ANTISORO ANTI-PRÓ-INSULINA HUMANA  
PARA RADIOIMUNOENSAIO**

**Martha do NASCIMENTO, Vânia Caira BORGHI, Maria Helena BELLINI,  
Carlos Henrique MESQUITA e Bernardo Léo WAJCHENBERG**

**COORDENADORIA DE BIOENGENHARIA**

**Série PUBLICAÇÃO IPEN**

**INIS Categories and Descriptors**

**C45.00**

**RADIOIMMUNOASSAY**

**INSULIN**

**PEPTIDE HORMONES**

**ANTIBODIES**

**IMMUNE SERUMS**

---

**IPEN-Doc-4305**

**Aprovado para publicação em 24/04/92**

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

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA DOS PROCEDIMENTOS DE IMUNIZAÇÃO PARA  
OBTENÇÃO DE ANTICORPO ANTI-PRÓ-INSULINA HUMANA PARA  
RADIOIMUNOENSAIO\***

**Martha do NASCIMENTO, Uânia Caira BORGHI, Maria Helena  
BELLINI, Carlos Henrique MESQUITA, Bernardo Léo  
WAJCHENBERG**

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

**RESUMO**

Dois esquemas de imunização foram empregados para o desenvolvimento de um antissoro anti-pró-insulina humana para radioimunoensaio, injetando-se subcutaneamente pró-insulina (PI) biossintética (Elli Lilly, USA) em sítios múltiplos da região dorsal de cobaias. No primeiro esquema, empregaram-se 50 ug de PI e as injeções de reforço foram administradas 4 semanas após a imunização primária e então com intervalos de 3 semanas. No segundo esquema, foram injetados 250 ug de PI e os reforços foram feitos sete, nove e 18 semanas após. Os títulos dos antissoros foram estimados durante o período de imunização. Três semanas após o primeiro reforço, coletou-se o sangue total dos animais e os antissoros foram avaliados com relação a reação cruzada com insulina e peptídeo-C. Como os antissoros não foram suficientemente específicos para a PI, eles foram purificados e então submetidos ao estudo de sua cinética de precipitação e de sua avidéz. Ambos os esquemas apresentaram resultados equivalentes. Os títulos atingiram um valor máximo em aproximadamente oito a nove semanas. O antissoro produzido utilizando-se 50 ug de PI apresentou uma reação cruzada maior com a insulina, enquanto que a reatividade com o peptídeo-C foi da mesma ordem nos dois grupos de antissoros. A avidéz também foi muito variável nesses grupos, sendo que os três antissoros que apresentaram constantes de afinidade ( $K_a$ ) maiores, necessitaram de 24 hs a 4°C para atingirem ligações máximas com a  $^{125}I$ -PI. Entretanto, somente um desses antissoros (do primeiro grupo) foi adequado para o radioimunoensaio. Este estudo enfatiza as dificuldades em se estabelecer comparações entre diferentes procedimentos de imunização, especialmente nos casos em que antissoros mais ávidos são necessários.

(\*) Trabalho realizado em colaboração com o Laboratório de Investigação Médica (LIM 25) da Faculdade de Medicina da USP, São Paulo, Brasil e apresentado no "IX Congreso Argentino de Medicina Nuclear-IV Jornadas del Cono Sur de la Asociación de Sociedades de Biología y Medicina Nuclear"-Buenos Aires-Argentina, de 14 a 18 de outubro de 1991.

**A COMPARATIVE ASSESSMENT OF IMMUNIZATION PROCEDURES  
FOR DEVELOPMENT OF ANTIPROINSULIN ANTISERA  
FOR RADIOIMMUNOASSAY\***

**Martha do NASCIMENTO, Uânia Cairá BORGHI, Maria Helena  
BELLINI, Carlos Henrique MESQUITA, Bernardo Leo  
WAJCHENBERG**

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

**ABSTRACT**

Two schedules of immunization were employed for developing antiproinsulin antisera for radioimmunoassay. Biosynthetic human proinsulin-hPI (Elli Lilly, USA), was injected subcutaneously in guinea pigs in multiple sites. In the first schedule were used 50 ug of hPI and the booster injections were administered 4 weeks after the primary immunization and then at 3-week intervals. In the second schedule was used 250 ug of hPI and boosters were done 7, 9 and 18 weeks later. The antibody titers were testing throughout the immunization period. Three weeks after the first booster, total blood was taken from all animals and the antisera were evaluated for cross-reactivity with biosynthetic human insulin and C-peptide from Lilly. As the antisera were not sufficiently specific for hPI they were purified and assessed for kinetic of precipitation and avidity. Both immunization schedules gave comparable responses. Titters rose to their maximum in about 8 to 9 weeks. The antisera generated by the use of 50 ug of hPI presented higher cross-reactivity with insulin while the reactivity with C-peptide was of the same order in both antiserum groups. The avidity was very variable in the two groups and the three most sensitive antisera required 24 h at 40C for achieving maximum binding with the <sup>125</sup>I-hPI. However, only one antiserum (from the first group) was suitable for the radioimmunoassay. This study emphasizes the difficulties of making valid comparisons between different immunization procedures, especially in the cases when highest avidity is required.

(\* Work performed in collaboration with the "Laboratório de Investigação Médica (LIM 25) da Faculdade de Medicina da USP, São Paulo, Brasil, and presented at "IX Congreso Argentino de Medicina Nuclear - VI Jornadas del Cono Sur de la Asociación de Sociedades de Biología y Medicina Nuclear", held in Buenos Aires, Argentina, October, 14-18, 1991.

## INTRODUÇÃO

A maior dificuldade no desenvolvimento de um sistema de radioimunoensaio é aquela em se obter antissoros com as características necessárias de avidéz e especificidade. Há muitos fatores que contribuem para esta dificuldade, mas a quantidade disponível do antígeno e sua capacidade imunogênica são considerações importantes. Por isso, existem maneiras diferentes de se imunizar um animal, tais como: variando a dose, a frequência, o local da injeção e a espécie animal a ser imunizada, bem como empregando ou não adjuvante.

A técnica de injeções intradérmicas múltiplas, descrita por Vaitukaitis e colaboradores em 1971 (1), oferece vantagens reais em economia do imunógeno, rapidez da resposta imune e necessidade de poucas injeções de reforço. Esta técnica foi empregada por vários grupos para a obtenção de antissoros anti-pró-insulina humana, imunizando cobaias (2,3) e cabras (4,5) com injeções do imunógeno variando de 40 a 100 ug.

Outros autores empregaram doses maiores imunizando cobaias (6) e carneiros (7) com injeções do imunógeno variando de 100 a 200 ug e injeções de reforço de até 300 ug (6).

Entretanto, alguns autores têm demonstrado que essas doses são insuficientes para induzir a produção de antissoros anti-insulínicos em cobaias, sugerindo doses mínimas de 250 a 500 ug (8) ou doses de 1 mg (9).

Hurn e Landon (10) têm sugerido que um descanso prolongado entre as doses de reforço poderia ser benéfico, especialmente com relação a avidez do antissor. Além disso, Hurn e Chantler (11) também recomendam interromper o esquema de imunização dos animais por alguns meses, antecedendo a última injeção de reforço.

Este trabalho apresenta uma avaliação comparativa entre dois esquemas de imunização empregados para a obtenção de antissoros anti-pro-insulina humana em cobaias. Utilizou-se a técnica de injeções múltiplas com pequenas doses do antígeno (50 ug) e essa mesma técnica com doses maiores (250 ug) e associadas a um período de descanso após a última injeção de reforço.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Peptídeos

Pró-insulina (PI), insulina e peptídeo-C humanos biossintéticos gentilmente doados pela Eli Lilly and Company, USA.

### Tracador

<sup>125</sup>I-Pró-insulina (aproximadamente 6.45 MBq/ug) preparada em nossos laboratórios (12), utilizando-se tubos revestidos com Iodogen.

### Obtenção dos antissoros

Cobaias machos, albinas (220 g) foram injetadas subcutaneamente em sítios múltiplos da região dorsal com 2 ml de uma emulsão formada por volumes iguais de solução fisiológica contendo hPI e de adjuvante de Freund. Utilizou-se

adjuvante de Freund completo (Difco Laboratories, USA) na primeira imunização e incompleto nas injeções de reforço.

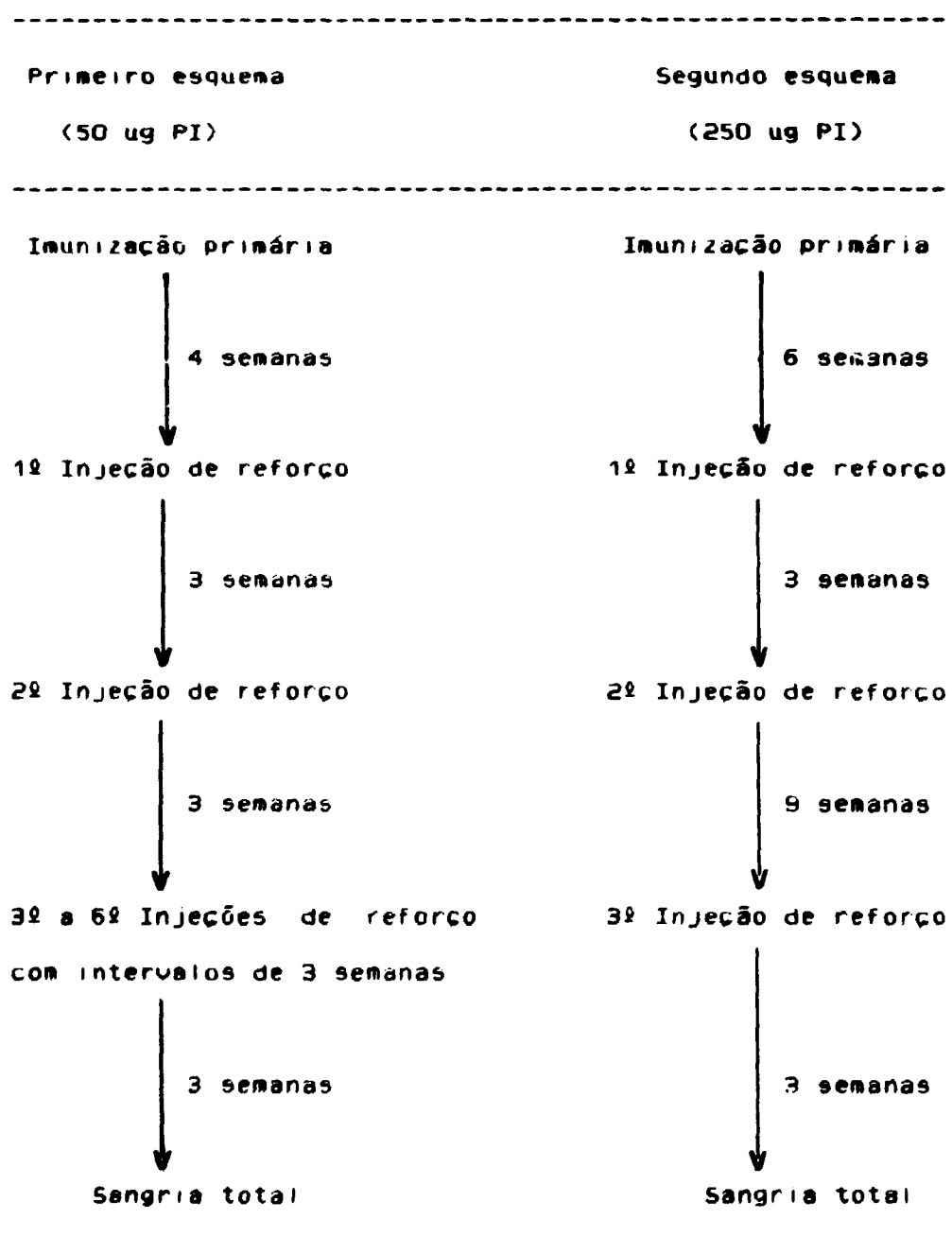
Foram empregados dois esquemas de imunização. No primeiro esquema, cinco animais foram imunizados com 50 ug de PI, cujos resultados preliminares já haviam sido relatados (13). No segundo esquema, 10 animais foram imunizados com uma dose cinco vezes maior (250 ug). Essas mesmas doses foram repetidas nas injeções de reforço, cujos esquemas de imunização estão apresentados na Figura 1.

Como no primeiro esquema de imunização, após a injeção primária, uma das cinco cobaias veio à óbito, passou a ser oferecida água contendo 5% de glicose às demais. Mesmo com este procedimento, não se pôde evitar no segundo esquema de imunização a morte de cinco animais, uma hora após a injeção primária. Portanto, foi necessária a aplicação via intraperitoneal de 3 ml de glicose 50%, aos animais remanescentes, para evitar uma mortalidade maior.

Decorridas três e cinco semanas, respectivamente, após as injeções primárias do primeiro e segundo esquemas de imunização, foram colhidas amostras de sangue, por meio de punção cardíaca, para a análise do título de seus antissoros. Duas semanas após as injeções de reforço, foram colhidos 2 ml de sangue de todos os animais, pela mesma via e com a mesma finalidade.

Três semanas após a última injeção de reforço, o sangue total (aproximadamente 25 ml) foi colhido desses animais e os antissoros foram avaliados quanto à sua reação cruzada com a insulina e o peptídeo-C.

**Figura 1-** Esquemas de imunização empregados na obtenção dos antissoros anti-PI.



### Purificação dos antissoros

Como os antissoros não foram suficientemente específicos para a pró-insulina, eles foram adsorvidos contra insulina-Sepharose e peptídeo-C-Sepharose.

A Sepharose 4B (Pharmacia, Sweeden) foi ativada em nossos laboratórios na proporção de 150 mg de CNBr (Sigma, USA) por grama de resina (14) e o acoplamento foi de 3,6 mg de insulina e 1,0 mg de peptídeo-C por grama de resina seca (6). Os antissoros foram incubados por 18 hs com a insulina-Sepharose (0,5 ml por ml de antissoro), seguidos de mais 18 hs de incubação com o peptídeo-C-Sepharose (0,3 ml/ml de antissoro) a 4°C, sob agitação lenta e contínua, após o que foram armazenados a -20°C.

### Avaliação dos antissoros: Evolução da resposta, título, especificidade, avidéz e cinética de precipitação

A evolução da resposta dos antissoros, ao longo do tempo de imunização, foi avaliada incubando-se cada antissoro (100 ul na diluição de 1:100) com o traçador (100 ul contendo aproximadamente 10.000 cpm), por 24 hs a 4°C em tampão fosfato de sódio 0,01 M, pH 7,6 contendo NaCl 0,15M, EDTA 0,01M e 0,1% de soro albumina bovina -SAB (volume final de 300 ul).

Os anticorpos ligados ao traçador foram precipitados pela adição de um segundo antissoro de cabra, anti-gama globulina de coala (Pel-Freez, USA), seguidos de incubação por mais 24 hs a 4°C. Após a centrifugação, a radioatividade do precipitado foi determinada em contador gama automático (Abbott Laboratories, USA).

Os antissoros obtidos ao longo do tempo de imunização foram titulados no mesmo sistema de ensaio, porém incubados durante 72 hs nas diluições variando de 1:100 a 1:256.000.

A especificidade dos antissoros, antes e após sua purificação, foi também analisada em curvas de título, na presença de insulina (500 mU/l) e de peptídeo-C (10 pmol/ml).

A avidéz dos antissoros purificados foi estimada construindo-se curvas padrão de radioensaio em equilíbrio, calculando-se suas constantes de afinidade ( $K_a$ ) pelo "Scatchard plot", com a ajuda do programa computacional "Statistical Graphics System" versão 2.6 para a redução dos dados.

Essas curvas foram construídas empregando-se pró-insulina padrão nas concentrações variando de 0.016 a 16 pmol/ml e tampão de ensaio fosfato de sódio 0.04 M, pH 7,4 contendo 0,1% de SAB e 0,02% de tiomersal (volume final de 300  $\mu$ L). As curvas foram incubadas por 96 hs a 4°C, seguidas de incubação adicional por 24 hs com o segundo antissoro. O precipitado foi coletado por centrifugação a 1500 g durante 30 minutos a 4°C.

Os antissoros que apresentaram os valores de  $K_a$  mais elevados, foram submetidos a análise de sua cinética de precipitação, permanecendo incubados por período que variou de 1 a 126 hs a 4°C, empregando-se polietileno glicol 20% para a separação da fração ligada. Os dados obtidos foram analisados pelo programa computacional ANACOMP versão 1.0.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dois esquemas de imunização forneceram resultados semelhantes com relação a elevação do título dos antissoros. Os títulos máximos foram obtidos em torno de oito a nove semanas, após o que permaneceram praticamente constantes (Figura 2).

Embora Havrankova e Petit (8) também tivessem obtido antissoros anti-insulina com títulos elevados em torno de 9 semanas, apenas as cobaias imunizadas com doses maiores do imunógeno (250 e 500 ug) desenvolveram antissoros adequados para o radioensaio deste hormônio.

As Figuras 3 e 4 apresentam, respectivamente, as curvas de título dos antissoros obtidos nas diferentes sangrias, realizadas durante o primeiro e o segundo esquemas de imunização. Observou-se que, apenas os animais ODT (1º esquema) e NM (2º esquema) apresentaram seus títulos significativamente diminuídos, por ocasião da última sangria.

A figura 5 apresenta as curvas de título de todos os antissoros provenientes da última sangria. Os respectivos títulos, correspondentes a uma ligação com 50% do traçador, estão indicados na Tabela I. O título mais elevado, de 1:8.000, fornecido pelo antissoro da cobaia OP imunizada com 50 ug de PI, é maior do que aquele obtido por Deacon e Conlon (2) que também empregaram cobaias, dose e esquema de imunização similares.

O mesmo pôde ser constatado com relação aos antissoros obtidos por outros autores que imunizaram cobaias (6), cabras (4,5) e carneiros (7), porém, empregando doses maio-

res do imunógeno, a partir de 100 ug.

Entretanto, os antissoros gerados pelo uso de doses menores do imunógeno, administradas em número maior e com intervalos frequentes, apresentaram maior reação cruzada com a insulina do que os outros, enquanto que a reatividade cruzada com o peptídeo-C foi da mesma ordem em ambos os grupos de antissoros (Figura 6 e 7).

Apesar de todos os antissoros terem se tornado altamente específicos depois de purificados, eles apresentaram avidéz muito variável (Tabela II).

**Tabela I-** Título dos antissoros obtidos nos dois esquemas de imunização.

Antissoro	Esquema	Título
OP	primeiro	1:8.000
NM	segundo	1:4.400
SM	primeiro	1:1.300
E2	segundo	1: 820
D1E1	segundo	1: 700
D1E2	segundo	1: 500
D2	segundo	1: 330
ODT	primeiro	1: 330
ODF	primeiro	< 1: 100

Três dos antissoros mais sensíveis, um do primeiro (OP) e os outros dois do segundo esquema de imunização (D1E1 e D1E2), quando submetidos ao estudo da cinética de precipitação, necessitaram de apenas 24 hs para atingir a ligação máxima com a  $^{125}\text{I-PI}$  (Figura 7). Dentre esses antissoros, aquele obtido no primeiro esquema (OP) é o que está sendo empregado no desenvolvimento do radioensaio de PI (12), por possuir título e avides melhores.

Tabela II- Valores da constante de afinidade ( $K_a$ ) determinados nos dois grupos de antissoros gerados pelos diferentes esquemas de imunização.

Antissoro	Esquema	$K_a$ (l/mol)
OP	primeiro	$1,00 \times 10^{10}$
D1E1	segundo	$0,69 \times 10^{10}$
E2	segundo	$0,58 \times 10^{10}$
D1E2	segundo	$0,43 \times 10^{10}$
SM	primeiro	$0,33 \times 10^{10}$
NM	segundo	$0,14 \times 10^{10}$
ODT	primeiro	$0,06 \times 10^{10}$
D2	segundo	$0,05 \times 10^{10}$

#### CONCLUSÕES:

Este estudo enfatiza as dificuldades em se estabelecer comparações entre diferentes procedimentos de imunização, especialmente nos casos em que antissoros mais ávidos

são necessários.

Não foi possível estabelecer uma comparação entre os diferentes procedimentos de imunização, empregados para a obtenção de antissoros anti-pró-insulina. Entretanto, foi possível obter um antissoro anti-PI com título e avidéz adequados para o radioensaio, pelo emprego de doses baixas do imunógeno.

Este resultado permite a imunização de um número maior de animais, apresentando uma taxa de mortalidade reduzida em decorrência da hipoglicemia, que pode ser controlada pela administração de glicose via oral.

O método de purificação dos antissoros, empregando cromatografia de imunoafinidade, se mostrou eficiente, embora resulte numa pequena queda de seus títulos.

A análise da constante de afinidade ( $K_a$ ) dos antissoros e o estudo de sua cinética, foram fundamentais para a escolha do melhor antissoro para o radioensaio.

#### AGRADECIMENTOS

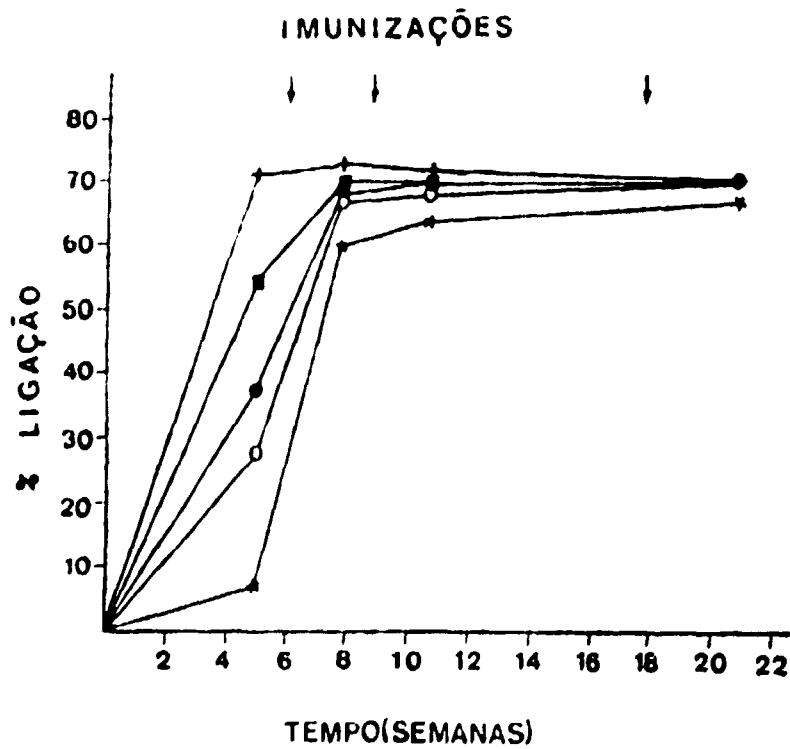
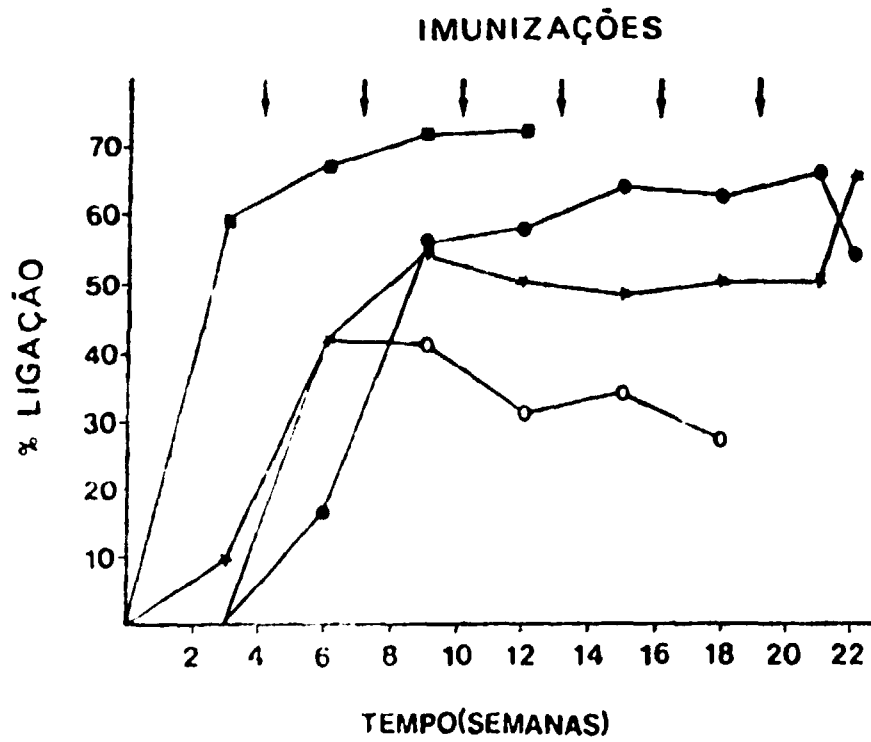
Os autores agradecem a Eli Lilly and Co.,(USA) os hormônios biossintéticos empregados neste estudo, ao CNPq o auxílio concedido (processo nº 500289/90-5) e a CAPES a bolsa de doutoramento outorgada a M. Nascimento. Agradecem também ao Dr. Henrique P.B. Barreto a valiosa colaboração.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

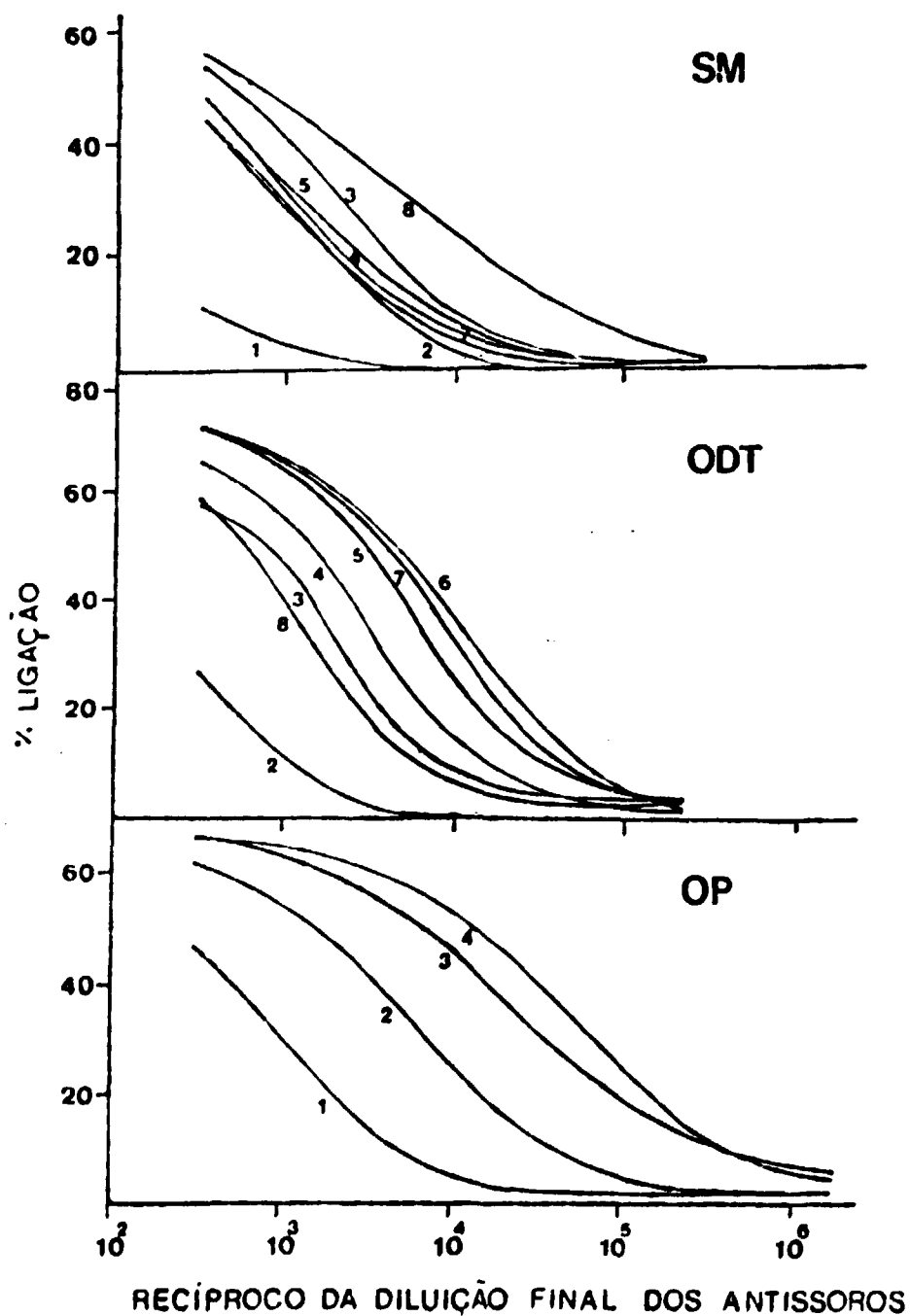
- 1- VAITUKAITIS, J., ROBBINS, J.B., NIESCHLAG, E., ROSS, G.T. A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. J Clin Endocrinol, **33**: 988-91, 1971.
- 2- DEACON C.F. e CONLON J.M. - Measurement of circulating human proinsulin concentrations using a proinsulin specific antiserum. Diabetes **34**: 491-7, 1985.
- 3- YOSHIOKA N., KUZUYA T., MATSUDA A., TANIGUCHI M., IWAMOTO Y. - Serum proinsulin levels at fasting and after oral glucose load in patients with type 2 (non- insulin-dependent) diabetes mellitus. Diabetologia **31**: 355-60, 1988.
- 4- BOWSHER R.R., APATHY J.M., FERGUSON A.L., FRANK B.H. - An improved radioimmunoassay (RIA) for proinsulin in human serum and plasma. Diabetes **36**: 94a, 1987.
- 5- COHEN R.M., GIVEN B.D., LICINIO-PAIXÃO J., PROVOW S.A., RUE P.A., FRANK B.H., ROOT M.A., POLONSKY K.S., TAGER H.S.E., RUBENSTEIN A.H. - Proinsulin radioimmunoassay in the evaluation of insulinomas and familial hyperproinsulinemia. Metabolism **35**: 1137-46, 1986.
- 6- COHEN R.M., NAKABAYASHI T., BLIX P.M., RUE P.A., SHOELSON S.E., ROOT M.A., FRANK B.H., REVERS R.R., RUBENSTEIN A.H. - A radioimmunoassay for circulating human proinsulin. Diabetes **34**: 84-91, 1985.

- 7- HAMPTON, S.M., BEYZAVI K., TEALE D., MARKS U.: A direct assay for proinsulin in plasma and its applications in hypoglycaemia. Clin. Endocrinol. 29: 9-16, 1988.
- 8- HAVRANKOVA, J. & PETIT, J. - Simple method for development of sensitive and specific antiinsulin antisera for laboratory use. Journal of Immunoassay 5: 131-44, 1984.
- 9- MAKULU, D.R. & WRIGHT P. - Immune response to insulin in guinea pigs. Metabolism 20: 270-81, 1971.
- 10- HURN, B.A.L., CHANTLER, J. Antisera for radioimmunoassay. In: KIRKHAM, K.E., HUNTER, W.M., eds. Radioimmunoassay methods. Section II. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1971. p.127-42.
- 11- HURN, B.A.L., CHANTLER S.M. - Production of reagent antibodies. Methods Enzymol. 70:104-43, 1980.
- 12- BORGHI, U.C., NASCIMENTO, M., WAJCHENBERG, B.L. Specific and direct proinsulin radioimmunoassay for the evaluation of insulinomas. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Radioimmunoassay and related procedures: perspectives in developing countries: international symposium on... held in Vienna, 26-30 August 1991. (IAEA-SM-324/30) (In press).

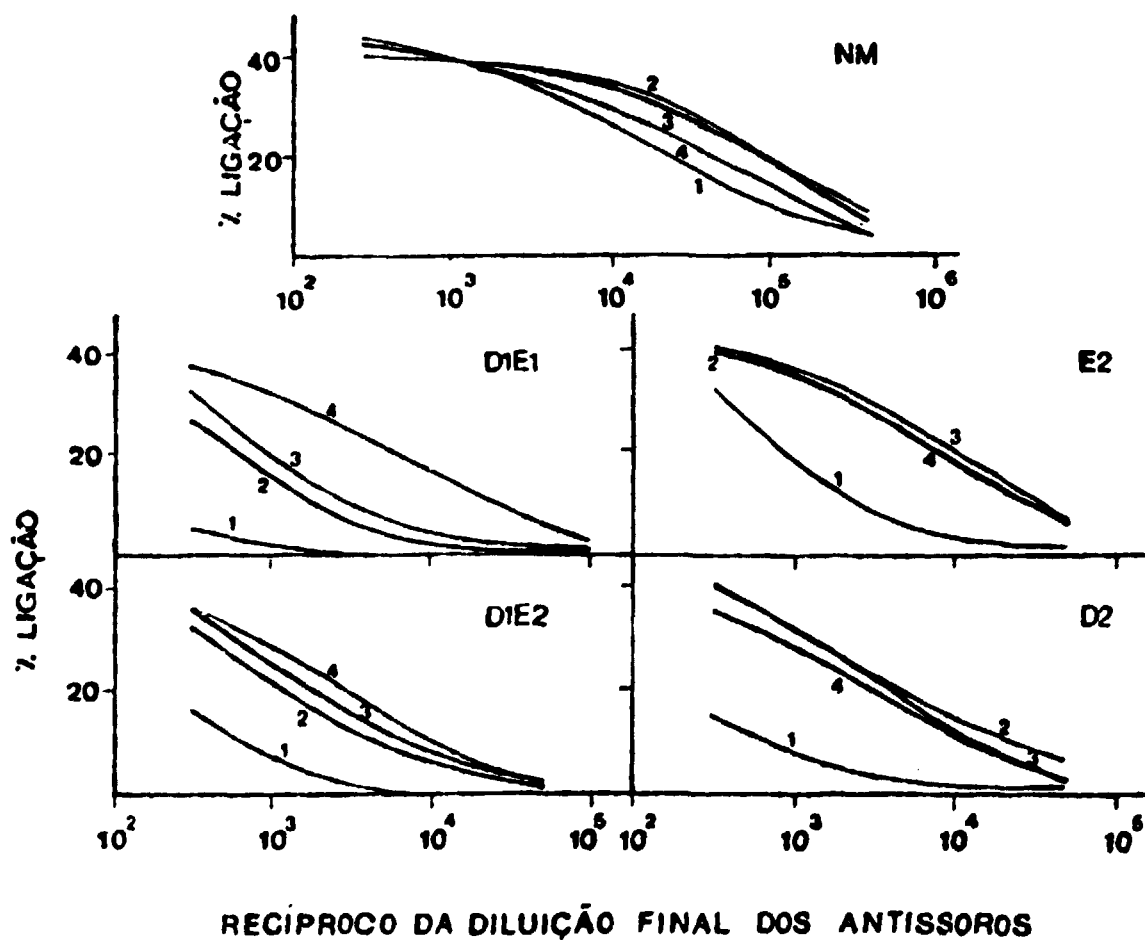
- 13- NASCIMENTO, M., BORGHI, V.C., BELLINI, M.H.,  
WAJCHENBERG, B.L. Obtenção de antissoro para  
radioimunoensaio de pró-insulina humana: resultados  
preliminares. In: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE MEDICINA  
NUCLEAR. Energia nuclear: anais do 3º congresso  
geral... Rio de Janeiro, 22 - 28 de junho, 1990.  
p. 85 - 94.
- 14- CUATRECASAS, P. & ANFINSEN, C. B.- Enzyme purification  
and related techniques. Methods Enzymol. 22:345-378,  
1971.



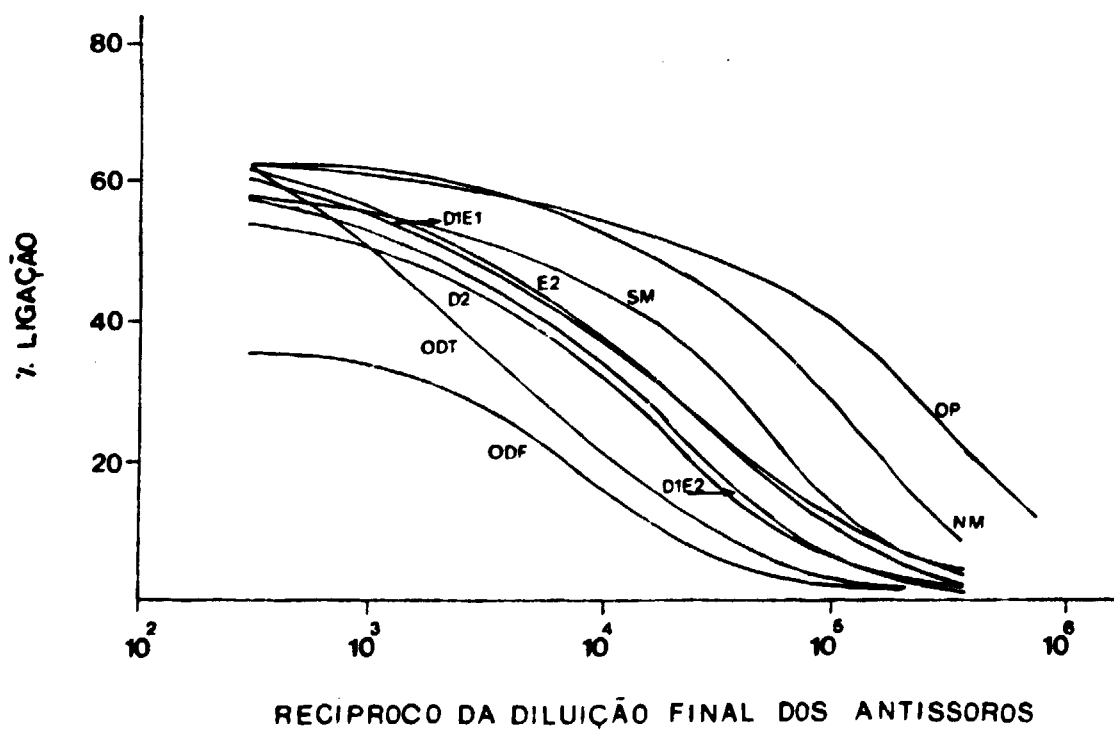
**Figura 1-** Evolução da resposta dos dois grupos de cobaias imunizadas com pró-insulina de acordo com o primeiro (acima) e segundo (abaixo) esquema de imunização. Diluição final dos antissoros de 1:300.



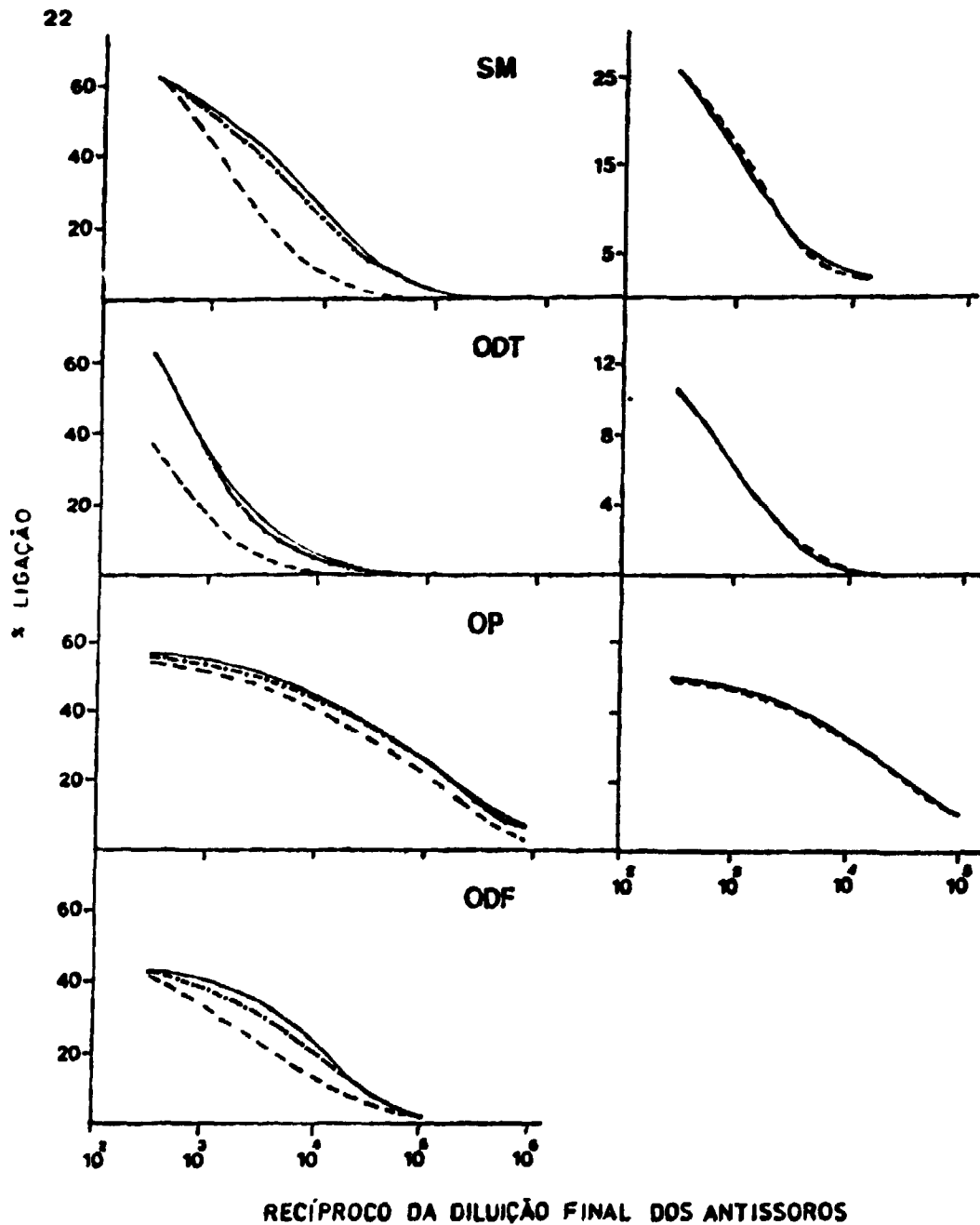
**Figura 2-** Curvas de título dos antíssoros obtidos no 1º esquema de imunização nas diversas sangrias que sucederam as imunizações, indicadas pelos respectivos números. A curva do antíssoro da cobaia SM obtido na 6ª sangria superpôs-se aquela referente a 4ª sangria.



**Figura 3-** Curvas de título dos antissoros obtidos no 2º esquema de imunização, nas diversas sangrias que sucederam as imunizações, indicadas pelos respectivos números.



**Figura 4-** Curva dose-resposta obtida plotando-se a diluição dos antissoros anti-PI humana contra a porcentagem de  $^{125}\text{I}$ -PI ligada. Esses antissoros se referem a última sangria.



**Figura 5** - Deslocamento de  $^{125}\text{I-PI}$  por PI (—), insulina (----) e peptideo-C (---), antes (esquerda) e após (direita) a purificação dos antissoros obtidos no primeiro esquema de imunização.

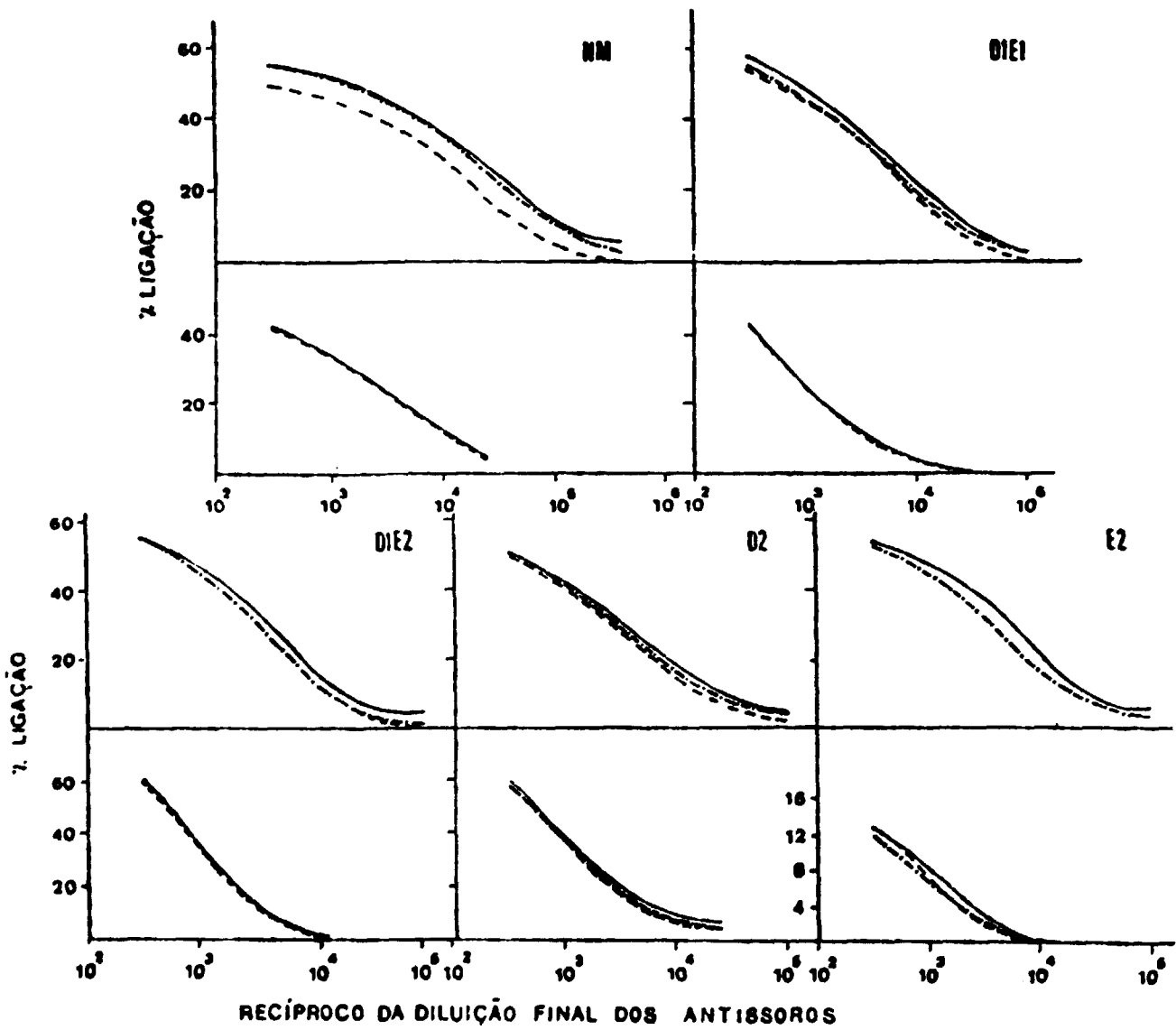
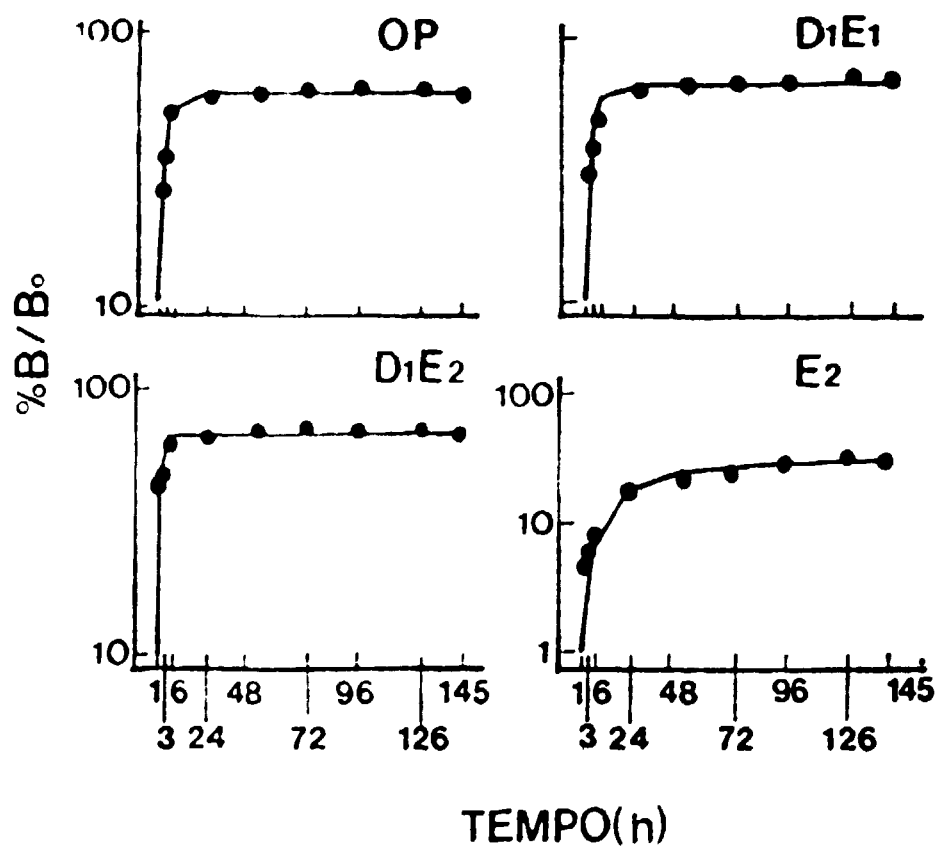


Figura 5- Deslocamento da  $^{125}\text{I}$ -PI por PI (—), insulina (----) e peptídeo-C (-·-·-), antes (acima) e após (abaixo) a purificação dos antísseros obtidos no 21 esquema de imunização.



**Figura 2-** Efeito do tempo de incubação sobre a ligação dos antissoros com a  $^{125}\text{I}$ -PI a  $4^{\circ}\text{C}$ .