BR7701199

PREPARO DE RADIOINSULINAS PARA RADIOIMUNOENSAIO: COMPARAÇÃO ENTRE O MÉTODO CLÁSSICO DA CLORAMINA-T E LACTOPEROXIDASE

Heidi Pinto, Bernardo Léo Wajchenberg, Iracélia T. T. Souza,
Antonio Carlos Lerário e Rômulo Ribeiro Pieroni

PUBLICAÇÃO IEA 472 CABRR – AMRR 3	ABRIL/1977

PUBL. IEA 472 ABRIL/1977
CABRR – AMRR 3

PREPARO DE RADIOINSULINAS PARA RADIOIMUNOENSAIO: COMPARAÇÃO ENTRE O MÉTODO CLÁSSICO DA CLORAMINA-T E LACTOPEROXIDASE

Heidi Pinto, Bernardo Léo Wajchenberg, Iracélia T. T. Souza,
Antonio Carlos Lerário e Rômulo Ribeiro Pieroni

CENTRO DE APLICAÇÕES BIOMÉDICAS DE RADIOISÓTOPOS E DE RADIAÇÕES
(Área de Aplicações Médicas de Radioisótopos e de Radiações)

INSTITUTO DE ENERGIA ATÔMICA
SÃO PAULO – BRASIL

APROVADO PARA PUBLICAÇÃO EM DEZEMBRO/1976

CONSELHO DELIBERATIVO

Klaus Reinech – Presidente
Roberto D'Utra Vaz – Vice-Presidente
Helcio Modesto da Costa
Ivano Humbert Marchesi
Admar Cervellini
Regina Elisabete Azevedo Beretta
Flávio Gori

SUPERINTENDENTE

Rômulo Ribeiro Pieroni

INSTITUTO DE ENERGIA ATÔMICA
Caixa Postal 11.049 (Pinheiros)
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
SÃO PAULO – BRASIL

NOTA: Este trabalho foi conferido pelo autor depois de composto e sua redação está conforme o original, sem qualquer correção ou mudança.

PREPARO DE RADIOINSULINAS PARA RADIOIMUNOENSAIO: COMPARAÇÃO ENTRE O MÉTODO CLÁSSICO DA CLORAMINA-T E LACTOPEROXIDASE*

Heidi Pinto, Bernardo Léo Wajchenberg, Iracélia T. T. Souza,
Antonio Carlos Lerário e Rômulo Ribeiro Pieroni

RESUMO

Descrevemos aqui um estudo realizado em nossos laboratórios, utilizando lactoperoxidase e Cloramina-T para radioiodação de insulina, de modo a obtermos ensaios mais sensíveis e Ins-^{125}I melhor imunoreativa. A mesma quantidade de insulina de porco, 4 μg, altamente purificada, reagiu com 2 μl de ^{125}I (1 mCi) por:

1 — O método clássico da Cloramina T de Hunter e Greenwood;

2 — O método enzimático de Thorell, modificado.

No primeiro caso a quantidade de agente oxidante foi de 1 μg/ μg de insulina de porco; no segundo caso, utilizamos 25 μg de lactoperoxidase/4 μg de insulina de porco, sendo que a ativação da enzima foi feita com a adição de 300 ng de água oxigenada, duas vezes, em intervalos de 2 minutos.

Após a iodação utilizamos carvão-dextrana para o teste de rendimento de marcação e notamos que houve uma incorporação de 50% do radioiodo adicionado, em ambos os métodos.

A purificação foi feita utilizando-se um sistema duplo "gel de amido e gel Sephadex" e um sistema simples de BioGel P-60. Foram feitos ensaios para testar imunoreatividade da insulina marcada e após 3 dias de incubação a relação B/F (Ag-Ab/Ag) foi cerca de 50% mais alta para a insulina iodada pelo método enzimático e purificada no sistema duplo, chegando-se a 99% de "pureza" do hormônio.

As curvas dose-resposta, mostraram maior sensibilidade e precisão para a Ins-^{125}I marcada com lactoperoxidase e purificada no sistema duplo, dando melhor descriminação para níveis de hipoinsulinemia.

INTRODUÇÃO

Atualmente, proteínas marcadas com iodo radioativo têm sido amplamente usadas em estudos bioquímicos.

A Cloramina-T é o agente oxidante mais usado para a substituição de iodo radioativo na molécula da insulina[2], podendo provocar danos estruturais e superiodação à molécula.

Recentemente, vários autores tem empregado lactoperoxidase para a iodação de proteínas[3,8], pois além de oxidar o iodeto a "iodo ativo", tem a vantagem de especificamente incorporar o halogênio aos radicais tirosila da molécula.

Com a finalidade de se obter radioinsulinas, com reatividade imunológica adequada, avaliada pela fixação ao excesso de antisoro específico, comparamos os dois diferentes métodos de marcação, bem como duas diferentes técnicas de purificação, considerando a "pureza" final do hormônio iodado bem como a sua imunoreatividade.

(*) Trabalho efetuado no C.A.B.R.R., Área de Aplicações Médicas de Radioisótopos e de Radiações do Instituto de Energia Atômica, Cidade Universitária Armando Salles de Oliveira, São Paulo, SP.

Estes métodos foram avaliados no estudo de valores baixos da insulinemia (hipoinsulinemia) durante a sua queda em hipoglicemias induzidas por álcool[7].

MATERIAIS E MÉTODOS

1) Insulina de porco recristalizada seis vezes (Lilly Research Labs., USA)

2) Radioiodo, na forma de Na-^{125}I da Hoechst A.G., livre de carreador, sem agentes redutores A atividade específica requerida, foi de no mínimo 200 mCi/ml.

3) BioGel P-60 (100-200 mesh), foi obtido da BioRads Labs., Los Angeles, USA.

4) Anticorpo anti-insulina foi obtido, em nossos laboratórios, em cobaios imunizados contra insulina de porco e adsorvido com glucagon.

5) Lactoperoxidase, foi obtida da Calbiochemical Co., USA e preparada como uma solução estoque de 5 μg/ μl em tampão fosfato 0,05 M pH 7,5 e estocada a -20°C.

6) Peróxido de hidrogênio 30% (Perhydrol *), obtido da Merck A.G.

7) Amido hidrolizado, obtido dos Labs. Connaught, USA.

1 – Radioiodação Enzimática da Insulina de Porco (Porcina).

A reação foi realizada a temperatura ambiente (25°C) em tubos de polietileno (11 x 68 mm) sendo os reagentes adicionados, na seguinte ordem:

- 4 μg de Insulina de porco (1 μg/ μl)
- 20 μl de tampão acetato 0,4 M pH 5,6
- 2 μl de Na-^{125}I (1 mCi)
- 5 μl de Lactoperoxidase (5 μg/ μl)
- 5 μl de H_2O_2 (300 ng) adicionados duas vezes, em intervalos de 1 minuto
- 100 μl de inibidor enzimático, que é uma solução contendo 16% de sacarose (p/v), 1% de KI (p/v), 0,02% de NaN_3 (p/v) e 0,1% de soro albumina bovina (BSA) (p/v).

2 – Radioiodação da Insulina de Porco pelo Método da Cloramina T

O método da Cloramina T foi modificado, em nossos laboratórios, com a redução da quantidade de agente oxidante (1 μg Cloramina T/ μg de Insulina), para diminuir a superiodação e a oxidação molecular. Os reagentes foram adicionados como segue:

- 4 μg de Insulina de porco (1 μg/ μl)
- 20 μl de tampão fosfato 0,5 M pH 7,5
- 2μl de Na-^{125}I (1 mCi)

– 4 μg de Cloramina T (26,5 mg/10 ml de PO_4)

– 25 μg de Metabissulfito de sódio (52,5 mg/10 ml de PO_4)

– 40 μl de plasma de Banco de Sangue, corado com azul de bromofenol ("plasma azul").

A reação foi realizada a 4°C em tubos de vidro (11 x 68 mm) e os reagentes colocados em intervalos de poucos segundos.

Uma alíquota das misturas de iodação, obtidas por ambos os métodos, foi usada para testar-se o grau de rendimento da marcação (percentual de incorporação de ^{125}I à molécula de insulina) e o seu conteúdo de insulina indene, pelo teste de adsorção ao carvão dextrana.

3 – Purificação da Insulina-^{125}I

Para purificar a preparação de hormônio marcado, a fim de livrá-lo dos componentes danificados e ^{125}I livre, não reativo, utilizamos dois sistemas:

3.1 – Eletroforese em gel de amido seguida por cromatografia em coluna de exclusão molecular (Sephadex G-50).

O gel de amido foi preparado pelo método de Smithies[5,6], usando amido hidrolizado Connaught. Como vemos na Figura 1, a autoradiografia do gel de amido mostrou três zonas distintas, adiante do "plasma azul", em direção ao anodo, sendo a mais catódica denominada zona 1 e a mais anódica, zona 3. Esta purificação separa as Ins-^{125}I pelo grau de iodação, pois cada átomo de radioiodo substituído a molécula confere uma carga negativa a mais, daí as insulinas contendo radicais tirosila disubstituídos (DIT) se localizarem preferentemente na zona 3 enquanto as menos iodadas (MIT) se encontrarem na zona 1, que também apresenta uma concentração maior de insulina não radioativa.

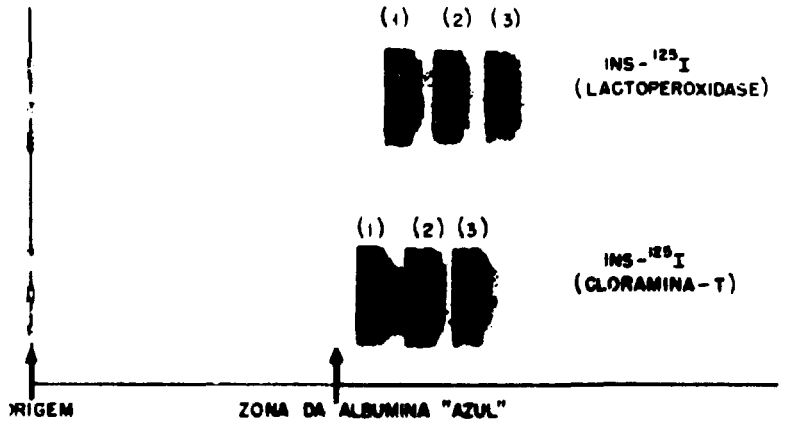


Figura 1 – Esquema de autoradiografia de Insulina-^{125}I em placa de gel de amido, após corrida eletroforética (12 hs., 100 volts) tampão borato 0,3 m, pH 8,1.

Após escolhida a zona 2 (pela menor quantidade de insulina não radioativa e menor proporção de DIT-insulinas), o hormônio marcado foi extraído do gel de amido e purificado em coluna de Sephadex G-50, previamente estumescido e equilibrado em tampão veronal 0,025 M, pH 8,6. Quando compactada, a coluna de gel foi lavada com "veronal albumina" (solução tampão de veronal 0,025 M pH 8,6 contendo 2,5% de soro albumina humana). A velocidade de fluxo foi regulada para 3 ml/hora e foram colhidos eluatos de 1 ml. Usou-se como padrão de eluição a albumina humana corada com azul de bromofenol, podendo-se notar no "perfil de eluição" que a insulina indene foi colhida logo após as albuminas humanas coradas de azul, as quais contém os elementos danificados durante a marcação.

Na Figura 2 estão indicadas as Insulinas-^{125}I marcadas com lactoperoxidase e Cloramina T, purificadas no sistema duplo "gel de amido e gel de Sephadex".

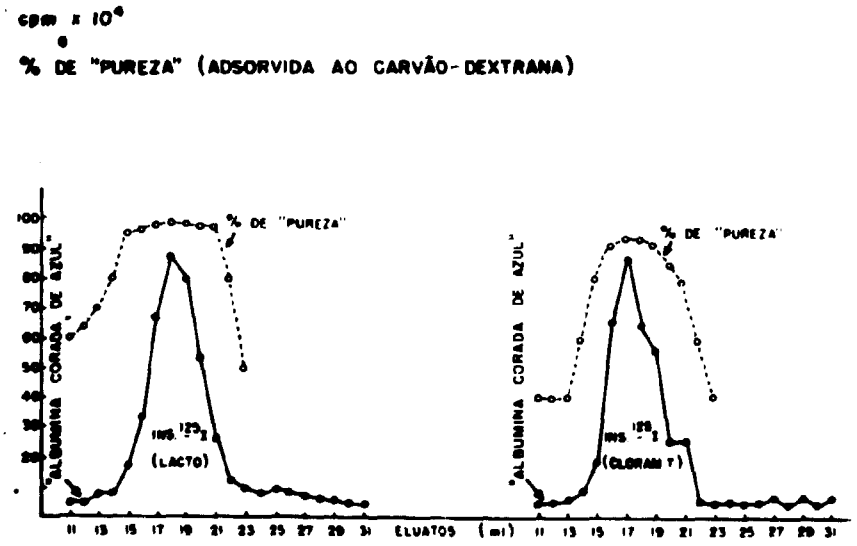


Figura 2 – Purificação da Ins-^{125}I marcada pela Lactoperoxidase e Cloramina-T, em coluna de exclusão molecular de Sephadex G-50, após prévia separação em eletroforese em gel de amido (zona 2).

3.2 – Purificação em Filtração em BioGel P-60 (100-200 mesh)

O BioGel P-60 foi entumescido em água por 72 horas, compactado em coluna de 20 x 1 cm e lavado com "veronal-albumina". Uma alíquota da mistura de iodação, com lactoperoxidase, foi colocada no gel e eluída, colhendo-se frações de 1 ml cada e mantendo-se a velocidade de fluxo de 3 ml/hora. Na Figura 3, temos o perfil de eluição da Ins-^{125}I em BioGel P-60, notando-se 3 picos de radioatividade os quais correspondem, respectivamente, aos componentes danificados que migram junto às proteínas plasmáticas (eluatos 4 a 8); radioiodoinsulinas com alto grau de "pureza" (eluatos 9 a 11) e ^{125}I livre, não reativo (eluatos 12-16).

4 – Imunoreatividade das Radioiodoinsulinas

Os testes foram feitos simultaneamente entre as insulinas iodadas pela Cloramina-T e Lactoperoxidase, utilizando-se antisoro antiinsulina, preparado em cobaios, nas diluições 1:100000, 1:200000 e 1:400000, sendo as incubações realizadas a 4°C por três dias, realizando-se testes diários para controle do comportamento físico-químico e imunológico das Insulinas-^{125}I.

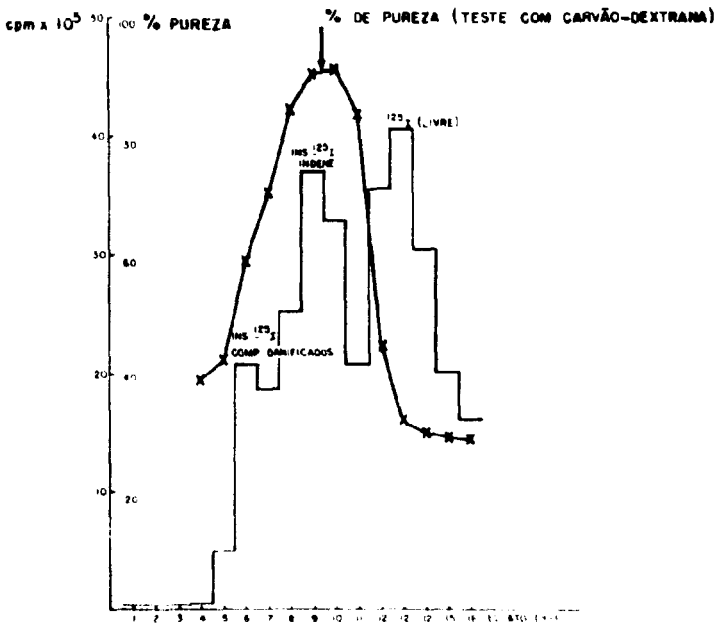
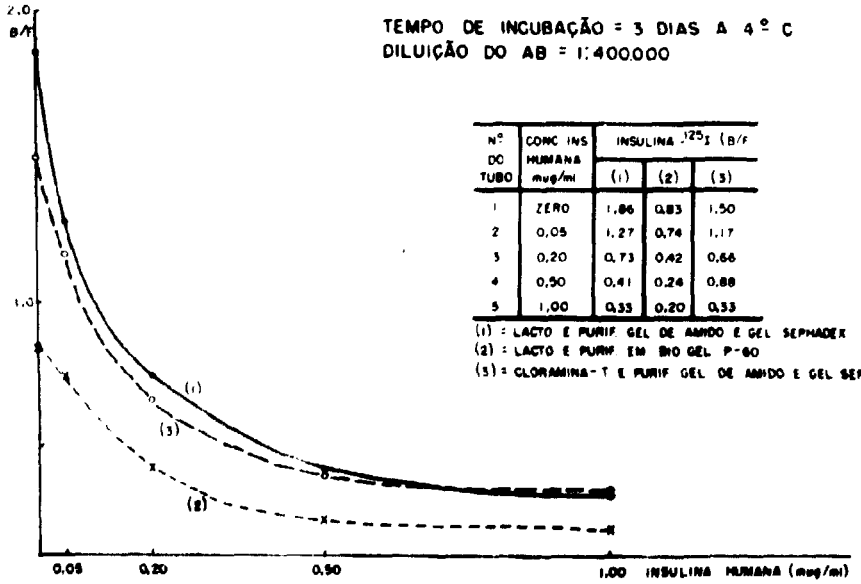


Figura 3 – Perfil de eluição da Insulina-^{125}I, marcada com Lactoperoxidase (pH 5,6) em coluna de Bio Gel P-60 (1 x 20 cm).

5 – Curvas Dose-Resposta para o Ensaio de Insulina (Tabela II)

Três curvas dose-resposta de insulina (Figura 4) foram realizadas mantendo constantes a diluição do antisoro (1:400000), a concentração do hormônio padrão (0,01 a 1,00 ng/ml), tempo de incubação e método de separação do complexo Ag-Ab do Ag livre não reativo. A única variável foi a Ins-^{125}I marcada e purificada em métodos diferentes, mas com um total de radioatividade de 1000 cpm/ml ou 20 pg/ml.



Nº DO TUBO	CONC INS HUMANA mcg/ml	INSULINA ^{125}I (B/T (1)	(2)	(3)
1	ZERO	1,86	0,83	1,50
2	0,05	1,27	0,74	1,17
3	0,20	0,73	0,42	0,66
4	0,50	0,41	0,24	0,88
5	1,00	0,33	0,20	0,33

(1) = LACTO E PURIF GEL DE AMIDO E GEL SEPHADEX
(2) = LACTO E PURIF EM BIO GEL P-60
(3) = CLORAMINA-T E PURIF GEL DE AMIDO E GEL SEPHADEX

Figura 4 – Curvas Dose-Resposta de Insulina-^{125}I marcada com Lactoperoxidase e Cloramina-T.

Para a dosagem de insulina nos casos de hipoinsulinemia ou seja insulinemia basal, a diluição do anticorpo foi de 1:2000000 e o total de radioatividade adicionado foi de 500 cpm/ml ou 10 pg/ml (Figuras 5 e 6).

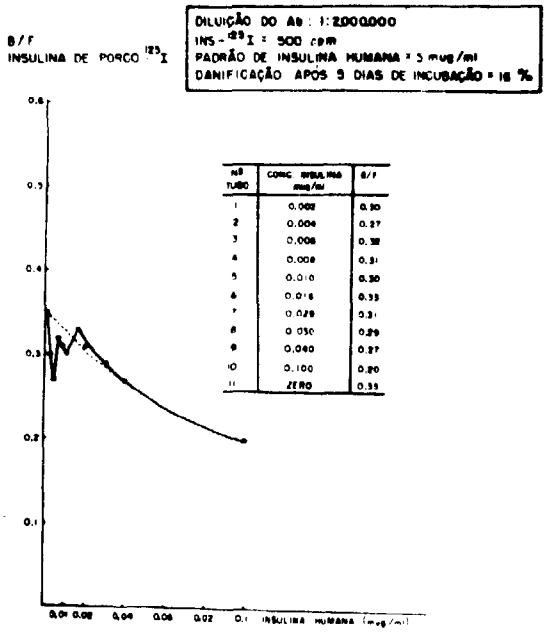


Figura 5 – Curva-Padrão de Insulina marcada com Cloramina-T.

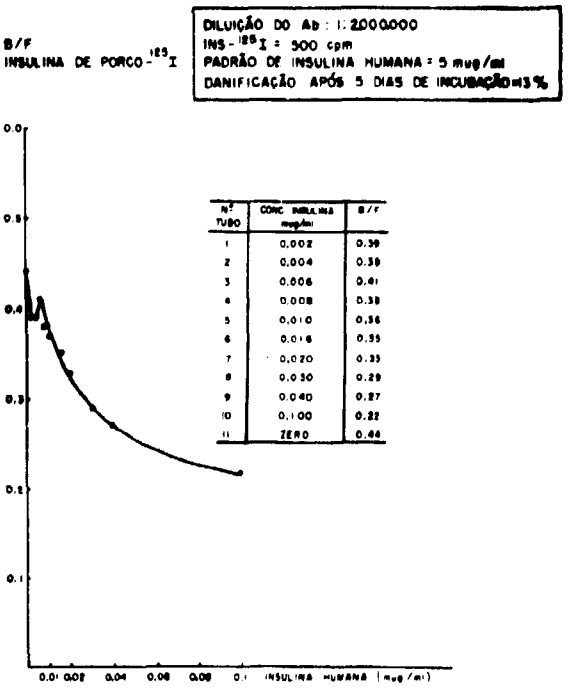


Figura 6 – Curva-Padrão de Insulina marcada com Lactoperoxidase.

RESULTADOS

Radioiodação: Na Tabela III podemos ver que a eficiência de incorporação de radioiodo à molécula de insulina foi análoga em ambos os métodos. Entretanto a imunoreatividade foi maior usando-se o método enzimático, bem como a sensibilidade da curva dose-resposta (Tabela II).

Purificação: Notamos na Tabela I que o método de purificação, ou seja, separação do hormônio-^{125}I indene dos componentes danificados e ^{125}I é tão importante quanto o método de marcação. Com efeito, a Ins-^{125}I preparada pelo método enzimático e purificada no sistema duplo (Figura 2) é bem mais pura e imunoreativa do que aquela marcada pelo método enzimático e purificada no sistema simples de filtração em coluna de BioGel P-60. Além disso, podemos notar que a radioiodoinsulina preparada pelo método enzimático e purificada nos dois sistemas, apresenta maior número de eluatos com alta concentração de hormônio indene.

Controle de qualidade do hormônio marcado: Todas as etapas de marcação e purificação foram controladas utilizando-se para isso o teste de adsorção do radiohormônio livre ao carvão-dextrana, para acompanharmos a integridade molecular, ou seja, a quantidade de hormônio marcado que foi danificada durante a incubação, sendo que no caso da insulina, não deve ultrapassar 15%, pois a fração danificada fica incluída juntamente com o complexo Ag-Ab, no sobrenadante do sistema carvão-dextrana.

Estudo das condições ótimas de reação para ensaios "in Vitro": Na Tabela II encontramos as condições essenciais para o ensaio. Na Figura 4, notamos que as Ins-^{125}I marcadas com métodos diferentes e purificadas no mesmo sistema duplo "gel de amido e gel de Sephadex", apresentam sensibilidades diferentes, avaliadas pela inclinação inicial da curva H^+ vs. B/F e as Ins-^{125}I, marcadas pelo método da Lactoperoxidase mas purificadas em 1 vs. 2 sistemas, apresentam tanto sensibilidade como precisão diferentes, sendo de melhor qualidade a Ins-^{125}I purificada no sistema duplo.

Para medida das insulinemias em níveis muito baixos, a comparação das Figuras 5 e 6 mostra claramente a maior sensibilidade com descriminação de concentrações muito baixas da curva-padrão obtida com Insulina-^{125}I obtida por iodação enzimática, para valores de Insulina humana de até 0,04 ng/ml.

Tabela I

Imunoreatividade da Insulina-^{125}I

Tempo de Incub.	Código do Teste*	Diluição do Antisoro	Ins-^{125}I: Lacto Purif. Gel de Amido e Gel Sephadex G-50	Ins-^{125}I: Lacto Purif. em BioGel P-60	Ins-^{125}I Clor.T Purif. Gel de Amido e Gel de Sephadex G-50
			B/F (Ag – Ab/Ag)		
1 Dia	C	–	96%	82%	91%
	B_o	1:100000	2,81	1,13	1,35
	B_o	1:200000	1,68	0,55	0,91
	B_o	1:400000	1,00	0,45	0,67
2 Dias	C	–	95%	82%	90%
	B_o	1:100000	3,44	1,24	1,44
	B_o	1:200000	2,53	0,77	1,33
	B_o	1:400000	1,62	0,63	0,78
3 Dias	C	–	95%	82%	89%
	B_o	1:100000	3,84	1,65	2,58
	B_o	1:200000	3,06	1,28	2,00
	B_o	1:400000	1,86	0,83	1,40

* C = Controle da Ins.-^{125}I (% de pureza) na ausência do anticorpo.
B_o = Máximo de ligação da insulina marcada ao anticorpo.

Tabela II

Radioimunoensaio de Insulina

1. 0,1 ml de amostra de plasma ou padrão de insulina
2. 2,4 ml de diluente padrão* contendo 1000 cpm/ml de Ins-^{125}I (20 pg) e anti-insulina na diluição adequada.
3. Incubação por 72 horas a 4°C.
4. Separação do complexo Insulina-Antiinsulina da Insulina livre com 0,2 ml de carvão dextrana**.
5. Centrifugação a 1500 g por 30 minutos.
6. Separar sobrenadante (Ins – AntiIns = B) do precipitado (Ins = F) e contar em contador Gama de cintilação.

* Diluente padrão
25 ml de soro albumina humana a 1%
10 ml de soro de cobaio
Tampão veronal 0,025 M pH 8,6, q.s.p. a 1000 ml

** Carvão-dextrana
20 g de carvão Norit A/100 ml de veronal
2 g de Dextrana T 70/100 ml de veronal
Dissolver e juntar as duas soluções.

Tabela III

Eficiência de incorporação de radioiodo à molécula de Insulina de Porco utilizando os métodos da Lactoperoxidase e Cloramina-T.

Método	Eficiência de incorporação de ^{125}I * (% da Radioatividade total)
Cloramina-T	51
Lactoperoxidase	52

* Teste feito com carvão-dextrana.

DISCUSSÃO

Este trabalho foi realizado para avaliação das características físico-químicas e imunoquímicas das Ins-^{125}I preparadas pelo método enzimático[3] em comparação ao método clássico da Cloramina T[2].

Entre os hormônios proteicos com que trabalhamos (LH, FSH, HCG, GH, Prolactina e Insulina) a insulina é o que melhor se presta a um estudo desta ordem, uma vez que apresenta grande estabilidade molecular[4]. Inicialmente, modificamos o método clássico da Cloramina T para iodação da insulina, reduzindo a quantidade do agente oxidante de 10 μg/μg de hormônio para 1 μg/μg de hormônio, realizando a reação a 4°C, com atividade específica de 200 a 300 μCi/μg. Mesmo assim, as iodoinsulinas preparadas pelo método enzimático e purificadas em 2 sistemas, para livrá-las do excesso de iodo e de componentes danificados, se revelou melhor imunoreativa (Figuras 4, 5 e 6). Com isto optamos por este método para a dosagem de plasmas com hipoinsulinemia, cuja curva-padrão é cerca de 10 vezes mais diluída do que para as dosagens habituais ,Figuras 5 e 6). Comparando-se as curvas mostradas nas Figuras 5 e 6, notamos a grande sensibilidade apresentada quando utilizamos Ins-^{125}I marcada enzimaticamente e purificada no sistema duplo.

Ao mesmo tempo, quando duminuímos a quantidade de inibidor enzimático ("stopper da reação") ou aumentamos o tempo de exposição da molécula da insulina a água oxigenada (ativadora da lactoperoxidase), obtivemos curvas de dose-resposta com grande aumento de sensibilidade mas perda da precisão, o que nos leva a supor que tanto quanto num caso como no outro, aumentamos a taxa de incorporação de radioiodo à molécula (Atividade específica maior), uma vez que nos baseamos em cpm para o cálculo da adição do hormônio radioativo o que fez com que colocássemos uma quantidade menor de Ins-^{125}I no constante à massa, sem comprometimento da medida da radioatividade que continuou a mesma (1000 cpm/ml). Com isto podemos supor que o método da lactoperoxidase se revela bem mais específico no constante à reação de substituição e sem o problema de uma oxidação drástica à molécula, enquanto que o método da Cloramina T, apresenta-se menos específico para a reação de substituição, mas é possível que com uma redução drástica da quantidade de Cloramina-T usada, se consiga uma insulina marcada tanto biológica quanto imunologicamente pura[1] o que nos proporcionará um radioimunoensaio tão sensível quanto ao obtido com lactoperoxidase, pois, não haverá comprometimento da integridade molecular o que a tornará útil também para o ensaio de radioreceptores, que exige antes de tudo a integridade biológica da molécula.

ABSTRACT

Studies were performed using lactoperoxidase for insulin iodination in order to obtain better sensitive and immunoreactivity assays. Equal amounts of highly purified porcine Insulin were reacted with 2μl of ^{125}I (S A = 250μCi/μg) by:

1 -- Chloramine-T method of Hunter and Greenwood

2 – Lactoperoxidase method of Thorell modified.

Purification was performed in both BioGel P-60 or Sephadex G-50 column, after starch gel electrophoresis. Immunoreactivity assays were carried out with the labelled insulin. After 3 days incubation B/F ratio was 50% higher with lactoperoxidase iodination after both purification systems. Greater purity (99%) of the labelled hormone, was achivied from Sephedex G-50 column after starch-gel electrophoresis than BioGel P-60 column (90%).

The standard curve demonstrate higher sensitivity and precision when labelled insulin was iodinated by lactoperoxidase method giving greater discrimination for basal insulin levels.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CRESTO, J. C. & YALOW, R. S. Anomalously ascending standard curves in the radioimmunoassay of insulin, human growth hormone and ACTH. In: RADIOIMMUNOASSAY: methodology and applications in physiology and in clinical studies. Stuttgart, G. Thieme, 1974. Hormone and metabolic research, suppl. ser. n.5). p.1-7.

2. GREENWOOD, F. C.; HUNTER, W. M. & GLOVER, J. S. The preparation of I-131-labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem. J.*, Cambridge, 89:114-23, 1963.

3. MIYACHI, Y.; VAITUKAITIS, J. L.; NIESCHLAG, E. & LIPSETT, M. B. Enzymatic radioiodination of gonadotropins. *J. clin. Endocr. Metab.*, Springfield, Ill., 34:23-8, 1972.

4. SCHNEIDER, B.; STRAUSS, E. & YALOW, R. S. Some considerations in the preparation of radioiodoinsulin for radioimmunoassay and receptor assay. *Diabetes*, New York, 25:260-7, 1976.

5. SMITHIES, O. An improved procedure for starch gel electrophoresis: further variations in the serum proteins of normal individuals. *Biochem. J.*, Cambridge, 71:585-7, 1959.

6. _____. Zone electrophoresis in starch gel: group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochem. J.*, Cambridge, 61:629-41, 1955.

7. SOUZA, I. T. T.; HIGA, O. S.; WAJCHENBERG, B. L.; PINTO, H. & PIERONI, R. R. *Aplicação do método de radioimunoensaio na dosagem da insulina no plasma humano.* São Paulo, Instituto de Energia Atômica, abr. 1973.

8. THEORELL, J. I. & JOHANSSON, B. G. Enzymatic iodination of polypeptides with ^{125}I to high specific activity. *Biochim. biophys. Acta*, Amsterdam, 251:363-9. 1971.