

APRIMORAMENTO DA TÉCNICA DE MARCAÇÃO DE PRÓ-INSULINA
BIOSSINTÉTICA HUMANA PARA USO EM RADIOIMUNOENSAIO.

MARTHA DO NASCIMENTO, VÂNIA CAIRA BORGHI
BERNARDO LEO WAJCHENBERGX

COORD. DE BIODENGENHARIA DO INST. DE PESQ. ENERGÉTICAS E
NUCLEARES / CNEN-SP E LAB. DE INVEST. MÉDICA 25 DA FMJSPX.

RESUMO

Realizaram-se modificações na técnica de marcação da pró-insulina humana (hPI) visando a obtenção de um traçador com atividade específica (AE) maior e consequentemente um aumento na sensibilidade do radioimunoensaio (RIE): emprego de tubos de polipropileno, revestidos com Iodogen dissolvido em diclorometano e evaporados sob atmosfera de N₂. Esses tubos foram utilizados por até 15 meses e os traçadores apresentaram AE e grau de pureza elevados, sendo estáveis por até 3 meses.

INTRODUÇÃO

A sensibilidade e especificidade de um RIE é dependente da qualidade do traçador empregado. Portanto, é importante que a integridade da molécula proteica seja preservada após a radioiodação. O método ideal para a radioiodação de antígenos para RIE deve ser de fácil execução e reprodutível, produzindo traçadores com AE e imunorreatividade elevadas e adequados para uso por períodos longos.

O método de marcação pelo Iodogen [1], além de obedecer a esses critérios, já havia sido empregado por outros autores para a obtenção do traçador do RIE da hPI [2].

Embora os traçadores obtidos anteriormente em nossos laboratórios por esta técnica tenham se apresentado imunorreativos e estáveis [3], a necessidade de se obter traçadores com AE mais elevada, levou à introdução de algumas modificações no preparo dos tubos de Iodogen, visando aumentar a sensibilidade do RIE.

MATERIAIS E MÉTODOS

A hPI bioquímica doada pela Eli Lilly Company, EUA (lot nº 509-EM4) foi marcada empregando-se o método de Fraker e Speck [1] modificado por Deacon e Conlon [2]. Os tubos de marcação foram recobertos com 16 µg de Iodogen (Sigma, EUA), lacrados com parafina e estocados em dessecador a -40°C.

As modificações na técnica de marcação implicaram na substituição dos tubos de ensaio revestidos com Iodogen, de vidro por tubos de polipropileno e do solvente do Iodogen, clorofórmio pelo diclorometano. O método de evaporação do solvente também foi alterado, de evaporação espontânea sob corrente de ar para evaporação sob atmosfera de nitrogênio, ambas realizadas a temperatura ambiente.

Imediatamente antes da marcação os tubos foram lavados com o tampão fosfato de sódio 0,05M, pH 7,4 para remover qualquer resíduo despreendido do cloroglicoluril [4]. Cinco microgramas da hPI dissolvidas em 100 µl daquele mesmo tampão fosfato foram incubados com 1 µCi de Na¹²⁵I (37 MBq) durante 5 minutos no tubo de iodação em banho de gelo.

O rendimento das marcações foi determinado como a porcentagem de radioatividade preci-

pitada pelo ácido tricloroacético (TCA) a 10% [5].

A mistura de reação da marcação foi purificada por cromatografia em coluna de QAE-Sephadex A-25 (Pharmacia, Suécia) de dimensões de 30 x 1,0 cm a 4°C [2].

A coluna foi equilibrada com tampão Tris-HCl 0,08 M, NaCl 0,08M, pH 8,6 contendo 1% de albumina bovina (SAB) fração U "RIA grade" (Sigma, EUA) e a amostra foi eluída sob fluxo de 15 ml/h com um gradiente linear formado por 150 ml do tampão de equilíbrio e 150 ml do mesmo tampão contendo NaCl 0,3 M. Foram coletadas frações de 2,5 ml cada, das quais foram retiradas alíquotas de 100 µl para a determinação da radioatividade em contador gama.

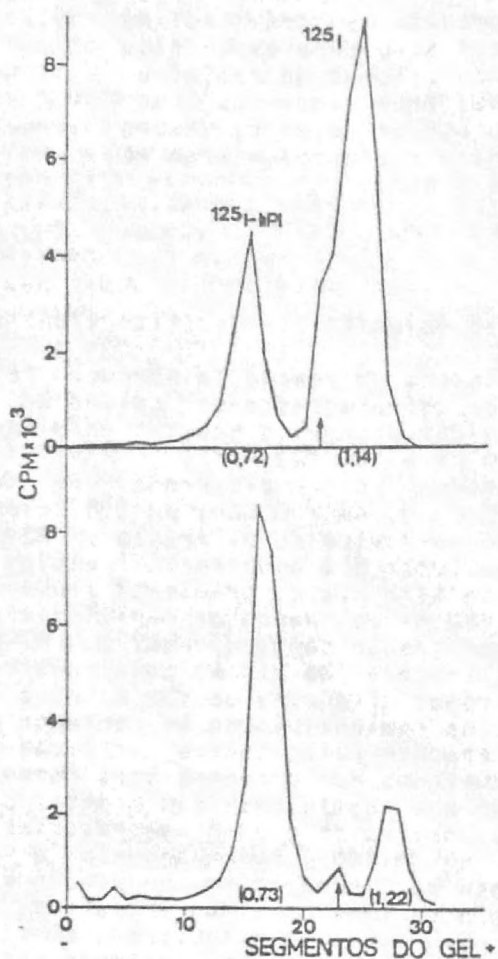
As frações relacionadas aos picos principais revelados nos cromatogramas foram avaliadas por sua reatividade com o antissoro OP em excesso obtido em nossos laboratórios [6], (diluição de 1:100), empregando-se o mesmo procedimento de RIE relatado por Deacon e Conlon [2]. As frações mais imunorreativas foram reunidas, divididas em alíquotas e mantidas a -20°C até seu emprego como traçador nos ensaios.

A pureza dos traçadores foi estimada pela precipitação com TCA e sua AE, foi calculada a partir do rendimento da marcação, considerando a massa do pró-hormônio radioiodado e a atividade do Na¹²⁵I utilizada [7].

Alíquotas da hPI recém radioiodada, recém purificada e separada como traçador do RIE ao longo do tempo de sua estocagem foram analisadas pela eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) a 7%, de acordo com o método de Davis [8] modificado. Os géis foram cortados em segmentos de 0,3 cm e tiveram sua atividade determinada em contador gama.

Calculou-se o valor da migração eletroforética relativa (R_m) dos componentes revelados em cada gel e estimou-se o valor percentual desses componentes, relacionando-se as contagens da área em que se localizaram seus picos e a contagem total do gel.

Além disso, a pureza menor deste último foi também devida à presença de um componente não-imunorreativo, que migrava junto com o corante traçador, compreendendo aproximadamente 13% da atividade total do gel. Ambos os traçadores mantiveram-se praticamente inalterados ao longo de aproximadamente 60 dias de armazenamento a -20°C .



Marcado (nº)	125I-hPI (%)	CT (%)	125I (%)
2	26,64	18,29	63,85
9	72,90	5,48	15,96

Figura 1. Eletroforetogramas da ^{125}I -hPI radioiodada não purificada: antes (marcado nº2, acima) e após (marcado nº9, abaixo) as modificações realizadas no preparo dos tubos de iodogen. Os valores de R_m do componente principal (^{125}I -hPI) e do ^{125}I de cada gel são indicados entre parênteses e as setas indicam a posição do CT, enquanto que os valores percentuais de cada componente são apresentados abaixo da figura.

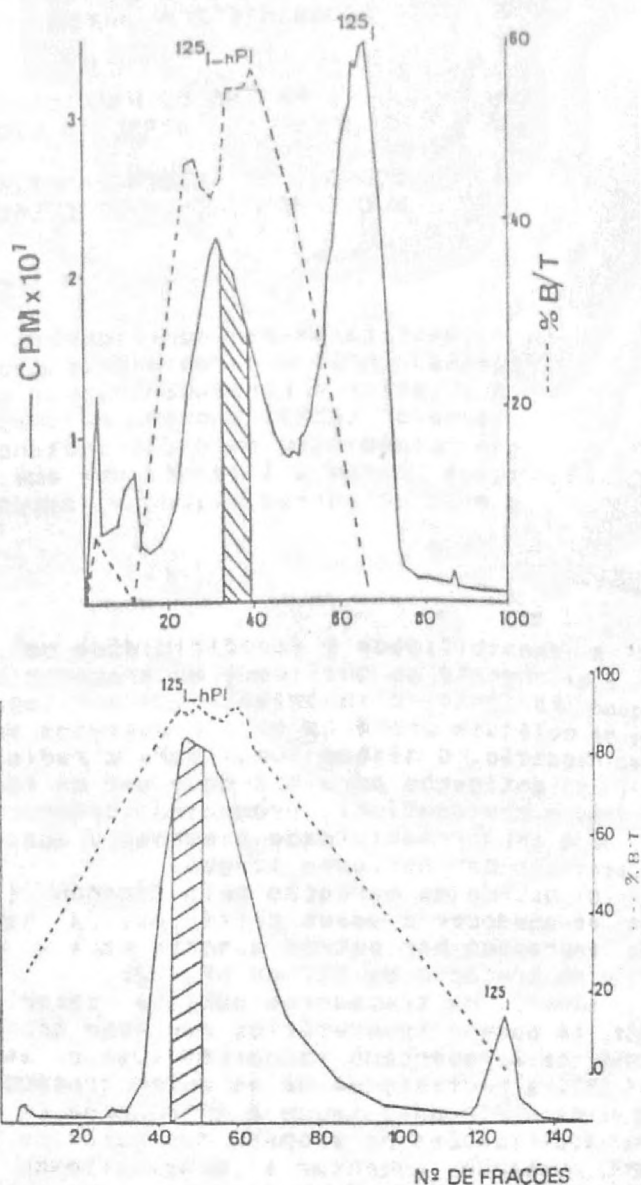


Figura 2. Cromatogramas da purificação de ^{125}I -hPI em QAE-Sephadex A-25 referentes ao marcado nº 2 (acima) e nº 9 (abaixo), mostrando a radioatividade (—) e a imunoreatividade (---) das frações. As áreas hachuradas correspondem às frações reunidas para serem empregadas como traçador do RIE.

Tabela II. Valores da percentagem de pureza dos traçadores analisados pela precipitação com TCA (n=8) e pela EGPA (n=5), com seus valores de R_m .

Traçador (nº)	% Pureza		R_m
	TCA	EGPA	
1	87,39		
2	85,10	76,38	0,75
3	90,89	70,97	0,72
5	94,94		
8	96,67		
9	90,70	97,84	0,69
11	86,41	86,40	0,63
12	96,69	81,99	0,74

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela I apresenta os resultados obtidos em 12 radioiodações da hPI, sendo as quatro primeiras realizadas em tubos de vidro revestidos com o Iodogen dissolvido em clorofórmio e evaporado espontaneamente sob corrente de ar. Os valores médios \pm DP dos rendimentos variaram de $29,97 \pm 10,12\%$ para $80,72 \pm 10,10\%$, enquanto que aqueles da AE variaram de $56,70 \pm 23,93$ uCi/ug para $161,91 \pm 19,42$ uCi/ug.

Apesar deste aumento a AE correspondeu a um grau de iodação menor do que um átomo de ^{125}I por molécula de hPI.

Observou-se também reprodutibilidade elevada nas marcações realizadas com os tubos de Iodogen provenientes do 6^o lote ao longo de 15 meses (marcações de n^o 8 a 12), cujos rendimentos apresentaram um valor médio \pm DP de $80,82 \pm 8,99\%$ (CV de 11,13%), sendo a AE média \pm DP foi de $162,41 \pm 16,55$ uCi/ug (CV de 10,19%).

Tabela I. Resultados da radioiodação da hPI pelo método do Iodogen.

Marcação n ^o	Lote dos tubos de Iodogen	Tubos	Solventes	Evaporação	Tempo de estocagem dos tubos (dias)	Rendimento (%)	AE (uCi/ug)
1	1 ^o	vidro	clorofórmio	ar	1	30,89	61,78
2	"	"	"	"	53	45,99	91,98
3	2 ^o	"	"	"	-	23,53	30,12
4	"	"	"	"	137	19,45	38,90
5	3 ^o	polipropileno	diclorometano	N ₂	2	90,01	180,00
6	4 ^o	"	"	"	-	87,58	175,16
7	5 ^o	"	"	"	2	64,03	128,06
8	6 ^o	"	"	"	6	87,97	176,00
9	"	"	"	"	163	86,06	172,00
10	"	"	"	"	390	79,33	158,66
11	"	"	"	"	442	63,88	127,76
12	"	"	"	"	464	86,88	173,80

A Figura 1 mostra os eletroforetogramas de duas alíquotas da hPI recém radioiodada e ainda não purificada, obtidas, respectivamente, antes e após as modificações introduzidas no preparo dos tubos de Iodogen. Nesses perfis eletroforéticos são observados três picos radioativos, correspondentes a ^{125}I -hPI, a um componente que migra junto com o corante traçador, azul de bromofenol e ao ^{125}I livre. Pela análise comparativa desses perfis, confirma-se a obtenção de um rendimento maior após o aprimoramento da marcação (72,90% contra 26,64% para o pico correspondente à ^{125}I -hPI).

A Figura 2 exhibe perfis cromatográficos típicos da purificação da ^{125}I -hPI em QAE-Sephadex A-25, marcada em tubos de Iodogen antes e depois da técnica de seu preparo ser aperfeiçoada. Nesses cromatogramas são indicadas as ligações das frações correspondentes aos picos principais com o antissoro em excesso. O maior rendimento obtido após as modificações introduzidas no preparo dos tubos de Iodogen é também corroborado pela análise desta figura, em que se observa uma diminuição significativa do pico correspondente ao ^{125}I livre, presente na mistura de reação da marcação. Além disso, seu perfil cromatográfico é muito semelhante aquele exibido no trabalho de Deacon e Conlon [2], cuja metodologia foi seguida.

A melhor adequação dos tubos de Iodogen preparados a partir daquelas modificações é também evidenciada pela pureza dos traçadores, que apresentaram valores mais elevados, principalmente quando comparados pela análise eletroforética (Tabela II). A pureza variou de 82 a 98% para os traçadores de n^o 5 em diante contra 71 e 76% para aqueles anteriores.

A pureza determinada pela precipitação com TCA a partir das modificações (traçador n^o 5) apresentou um valor médio \pm DP de $92,62 \pm 4,34\%$ (CV de 4,68%) contra $87,79 \pm 2,38\%$ (CV de 2,71%) para os traçadores provenientes das marcações anteriores.

A Figura 3 revela o estudo comparativo da estabilidade dos traçadores pela EGPA, obtidos antes (n^o 2) e após (n^o 9) a otimização do preparo dos tubos de Iodogen. Esses traçadores foram analisados durante seu armazenamento a -20°C por pelo menos o período correspondente a uma meia-vida física do ^{125}I .

Pela análise desta figura pode-se confirmar os resultados exibidos na Tabela II, em que se evidencia uma pureza maior para o traçador de n^o 9, proveniente da marcação realizada no tubo de polipropileno revestido com Iodogen. Observa-se, portanto, que logo após a purificação, o traçador n^o 9 estava completamente isento de ^{125}I livre, enquanto que este radioisótopo compreendia 7% da atividade total do traçador n^o 2.

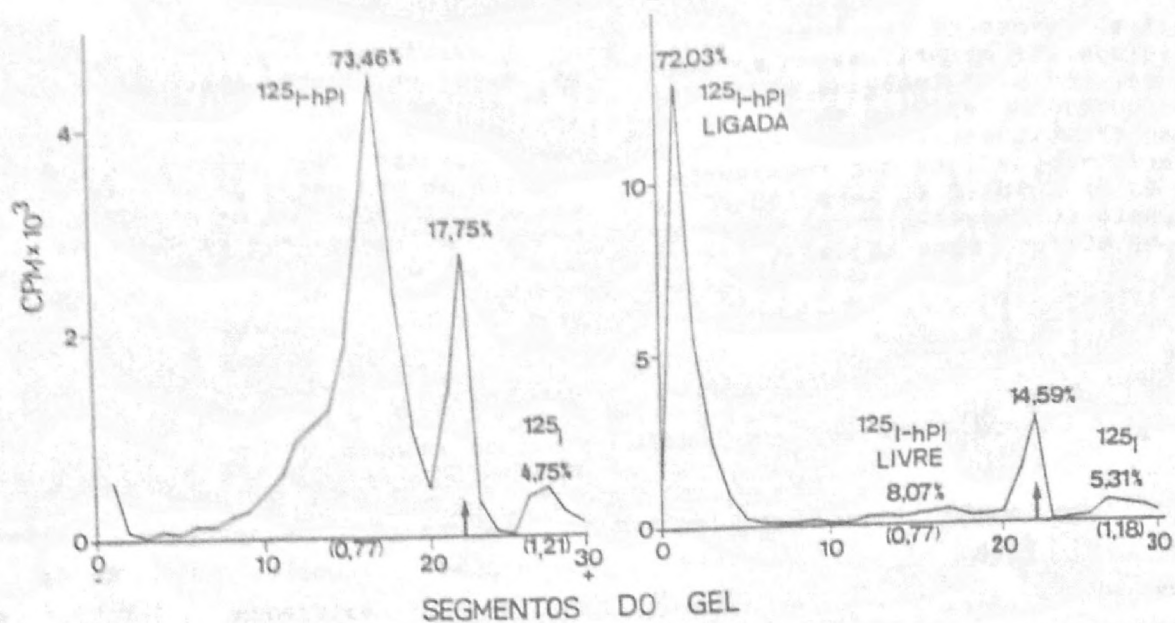
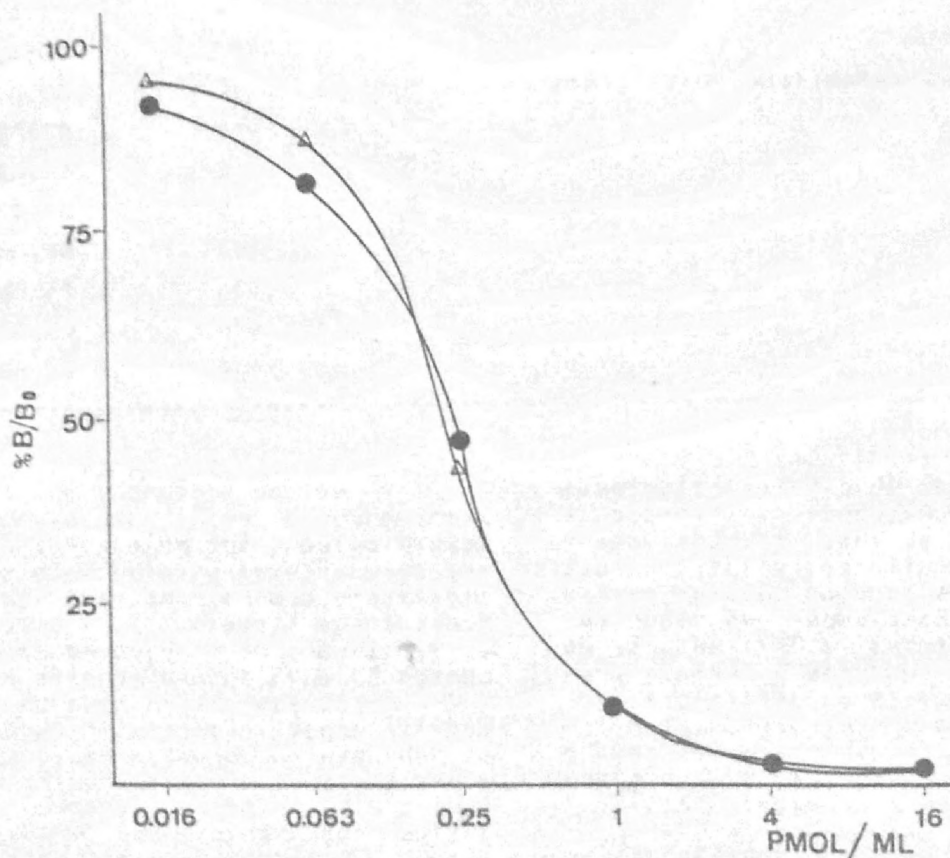


Figura 4. Separação do traçador nº 2 pela EGPA após 72 horas de incubação na ausência (esquerda) e na presença do antissoro OP em excesso (diluição de 1:100). Os valores de R_f dos componentes referentes a ^{125}I -hPI e ao ^{125}I são indicados entre parênteses e as setas indicam a posição do CI. Os valores percentuais de cada pico são indicados na figura.



Tempo de armazenamento (dias)	NSB (%)	Bo (%)	ED50 (pmol/ml)	DMD (pmol/ml)
38	3,24	29,73	0,22	0,01
87	4,41	29,26	0,21	0,01

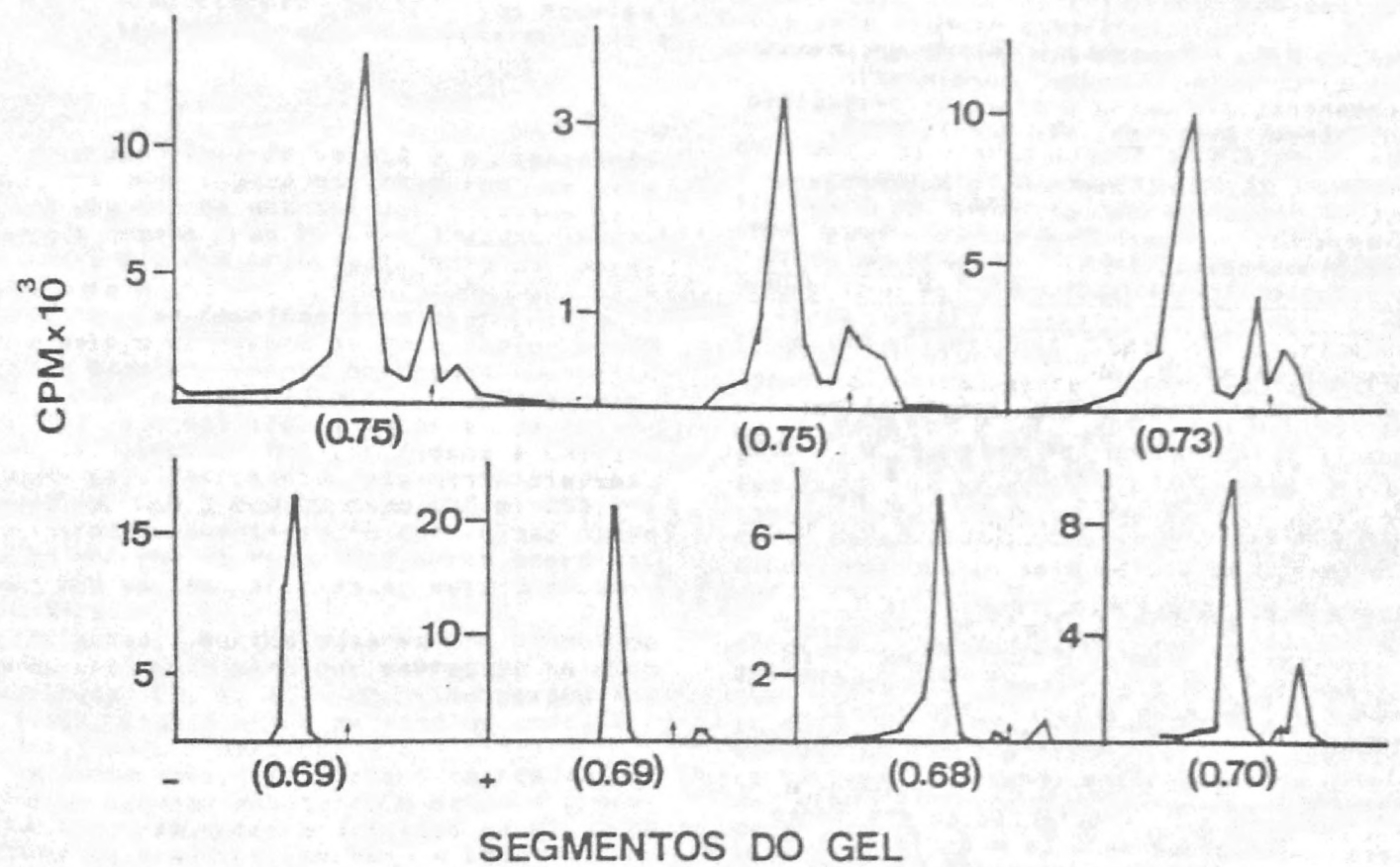
Figura 5. Curvas padrão obtidas com o traçador nº 5 após 38 (●—●) e 87 (△—△) dias de armazenamento a -20°C . O traçador foi incubado com o antissoro OP purificado (diluição final 1:15.000) em sistema em não equilíbrio e as curvas foram separadas pelo polietilenoglicol, conforme descrito adiante. Os valores dos parâmetros relativos a essas curvas, especificados adiante, estão apresentados na tabela abaixo da figura.

Apesar do traçador nº 2 ter se mostrado imunorreativo após 75 dias de estocagem, quando incubado com o antissoro em excesso e separado pela mesma análise em EGPA (Figura 4), somente após a introdução das modificações no revestimento dos tubos com Iodogen é que obtiveram-se traçadores com AE elevada, propiciando a realização de RIEs com sensibilidade apropriada [9].

A Figura 5 exibe curvas padrão do RIE superponíveis, obtidas com o traçador nº 5 decorridos 38 e 87 dias após seu preparo, indicando a estabilidade elevada deste traçador e sua adequação para o emprego no ensaio.

CONCLUSÕES

As modificações introduzidas no preparo dos tubos de marcação com Iodogen permitiram a obtenção de traçadores com AE maior e grau de pureza elevado, que muito contribuíram para o desenvolvimento de um RIE sensível para a determinação da pró-insulinemia humana.



traçador (nº)	tempo de armazenamento (dias)	¹²⁵ I-hPI (%)	CT (%)	¹²⁵ I (%)
2	5	73,30	12,54	7,09
"	56	76,26	17,54	7,66
"	71	75,91	13,45	10,06
9	5	97,84	----	----
"	20	86,84	1,99	5,76
"	65	80,35	2,76	7,79
"	96	75,69	2,92	19,45

Figura 3. Elektroforetogramas dos traçadores ao longo de sua estocagem: nº 2 (acima) após 5, 56 e 71 dias e nº 9 (abaixo) após 5, 20, 65 e 96 dias, respectivamente, da esquerda para a direita. Os valores de Rm dos componentes referentes a ¹²⁵I-hPI e ao ¹²⁵I de cada gel são indicados entre parênteses e as setas indicam a posição do CT, enquanto que os valores percentuais de cada componente são apresentados abaixo da figura.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Eli Lilly and Company a hPI empregada neste estudo, ao CNPq o auxílio concedido (processo nº 405557/86-CL-FU) e a CAPES a bolsa de doutoramento outorgada à M. Nascimento.

REFERÊNCIAS

- [1] Fraker P.J., Speck J.C.Jr. - Protein and cell membrane iodination with a sparingly soluble chloramide 1,3,4,6-tetrachloro 3 alfa, 6 alfa - diphenyl glycoluril. Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 849-857, 1978.
- [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] Borghi U.C., Nascimento M. e Wajchenberg B.L. - Preparation of ¹²⁵I labeled biosynthetic human proinsulin (hPI) for radioimmunoassay (RIA). XI Congreso de la Asociación Latinoamericana de Sociedades de Biología y Medicina Nuclear, 08-11 de octubre de 1989, Santiago de Chile, resumen nº 44, p. 65.
- [4] Markwell M.A.K., Fox C.F. - Surface-specific iodination of membrane proteins of viruses and eucaryotic cells using 1, 3, 4, 6 - tetrachloro - 3 alfa, 6 alfa-diphenylglycoluril. Biochemistry 17: 4807-4817, 1978.
- [5] Tower B.B., Sigel M.B., Russell E.P., Vanderlaan W.P., Rubin R.T. - The talc-resin-thrchloroacetic acid test for screening radioiodinated polypeptide hormones. Methods Enzymol., 70: 322-334, 1980.
- [6] Nascimento M., Borghi U.C., Bellini M.H. e Wajchenberg B.L. - Obtenção de antissoro para radioimunoensaio de pró-insulina humana: resultados preliminares. Anais do 32º Congresso Geral de Energia Nuclear, Rio de Janeiro, 22-28 de julho de 1990, Associação Brasileira de Energia Nuclear, Rio de Janeiro, Caderno 12 (Medicina Nuclear-Radiobiologia), 1990, p.85-94.
- [7] Englebienne P. e Slegers G. - Estimation of the specific activity of radioiodinated gonadotrophins: comparison of three methods. J. Immunol. Methods, 56: 135-40, 1983.
- [8] Davis B.J. - Disc electrophoresis. II. Methods and application to human serum proteins. Ann. N. Y. Acad. Sci., 121: 404-27, 1964.
- [9] Borghi U.C., Nascimento M. e Wajchenberg B.L. - Specific and direct proinsulin radioimmunoassay for the evaluation of insulinomas. Extended Synopses of the Internacional Symposium on Radioimmunoassay and Related Procedures: Perspectives in Developing Countries, Vienna- Austria, 26-30 August 1991, International Atomic Energy Agency, Vienna, 1990, p.83-84.

Changes in the labeling technique of human proinsulin were done viewing the attainment of a tracer with a higher specific activity (SA) and consequently a increasing in the radioimmunoassay sensitivity: employment of polypropylene vials recovered with Iodogen dissolved in dichloromethane and evaporated under nitrogen atmosphere. Those vials were used up to 15 months and the tracers showed high SA and purity, with a shelf-life of 3 months.