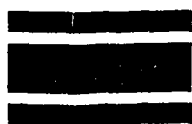




BR9939131



CNEN/SP

ipen Instituto de Pesquisas
Energéticas e Nucleares

AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO

INIS-BR -- 3743

**DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE
RADIOIMUNOENSAIO PARA A DETERMINAÇÃO DE
PRÓ-INSULINA HUMANA E SUA APLICAÇÃO
NO ESTUDO DO DIABETES MELLITUS TIPO II
ASSOCIADO À OBESIDADE**

MARTHA DO NASCIMENTO

Tese apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de Doutor em Ciências
na Área de Tecnologia Nuclear.

Orientadora:
Dra. Vânia Caira Borghi

30 - 44

São Paulo

1996

L

**TESE REALIZADA NOS LABORATÓRIOS DO INSTITUTO
DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES E NO
LABORATÓRIO DE NUTRIÇÃO HUMANA E DOENÇAS
METABÓLICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO.**

ABREVIATURAS

Bq	Bequerel. Uma desintegração por segundo.
cpm	Contagem por minuto.
CV	Coeficiente de variação.
CT	Corante traçador
DMD	. . .	Dose mínima detectável
DP	Desvio Padrão.
EGPA	. .	Eletroforese em gel de poliacrilamida.
HbA1c	. .	Hemoglobina glicosilada
HPLC	. .	Cromatografia Líquida de alta resolução
IMC	. . .	Índice de massa corpórea
Kg	10 ³ gramas
mCi	Milicurie.
mg	10 ⁻³ gramas.
mL	Mililitro. 10 ⁻³ litros.
OMS	. . .	Organização Mundial de Saúde
PEG	. . .	Polietileno-glicol.
RIE	Radioimunoensaio
Rm	Migração eletroforética relativa
WHO	. . .	World Health Organization
µg	10 ⁻⁶ gramas.
µCi	3,7 x 10 ⁴ desintegrações por segundo.
µL	Microlitro. 10 ⁻⁶ litros.
µUI	Micro unidade internacional

DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE RADIOIMUNOENSAIO PARA A DETERMINAÇÃO DE PRÓ-INSULINA HUMANA E SUA APLICAÇÃO NO ESTUDO DO DIABETES MELLITUS TIPO II ASSOCIADO À OBESIDADE.

MARTHA DO NASCIMENTO

RESUMO

A disponibilidade de um imunoensaio para a dosagem de pró-insulina é importante para definir seu significado fisiológico e fisiopatológico em humanos. A concentração de pró-insulina no soro está elevada em pacientes com Diabetes Mellitus Tipo I e Tipo II portanto, um aumento na sua concentração pode servir como indicador precoce de disfunção da célula β . Recentemente, foram encontrados no Diabetes Tipo II, um aumento na concentração de pró-insulina e seu derivado de conversão 31,32-des, correlacionado com pressão sanguínea diastólica como um fator de risco para doenças cardiovasculares.

No entanto, o desenvolvimento de um radioimunoensaio (RIE) sensível e específico para a pró-insulina tem sido difícil devido à sua concentração baixa e aos intermediários de conversão presentes no soro. Além disso, outros peptídeos, como a insulina e o peptídeo-C, reagem cruzadamente no ensaio.

Este trabalho descreve o desenvolvimento de um RIE para pró-insulina altamente específico, empregando proinsulina biossintética humana (hPI) como imunógeno, padrão e traçador.

A pró-insulina foi radioiodada empregando-se o método do iodogen e apresentou grande estabilidade após purificação em QAE-Sephadex A-25. A eficiência da purificação, assim como a estabilidade do traçador foram analisadas pela

eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA).

O antissoro foi obtido em cobaia com injeções subcutâneas repetidas em múltiplos sítios, constituídas de volumes iguais de pró-insulina (50 µg em salina) e adjuvante de Freund (completo para a imunização primária e incompleto para as imunizações subseqüentes). O sangue total foi colhido duas semanas após o terceiro reforço e o antissoro foi avaliado quanto à sua reação cruzada com a insulina e o peptídeo-C. Como o antissoro não foi suficientemente específico para pró-insulina ele foi adsorvido contra insulina e peptídeo-C conjugados a Sepharose- 4B CNBr ativada, após o que, não apresentou reação cruzada com a insulina e o peptídeo-C (<0,01%) e reconheceu a junção entre a cadeia B da insulina e o peptídeo-C (65,66-split-pró-insulina).

O RIE foi realizado empregando-se um sistema de ensaio em não-equilíbrio que permitiu a medida da pró-insulina em 28 h, otimizando as concentrações dos reagentes, as condições de reação de ligação e o procedimento de separação da pró-insulina livre e ligada ao antissoro.

O antissoro ou soro normal de cobaia para o branco (50 µL) e a hPI padrão ou soro desconhecido (200 µL) foram incubados a 4°C por 24 h. Em seguida, acrescentou-se a ¹²⁵I-hPI (50 µL, aproximadamente 10.000 cpm) e incubou-se o ensaio por mais 3 h. Acrescentou-se em seguida, o soro normal de cobaia, segundo antissoro e PEG e incubou-se por mais um período de 1 h a 23°C. O precipitado foi coletado por centrifugação a 3500 G por 15 min a 4°C.

A técnica de separação do RIE, segundo antissoro assistido pelo PEG, reduziu não somente o tempo de incubação do ensaio, mas também foi crítica para a completa separação da pró-insulina ligada da livre.

O controle de qualidade realizado para este RIE mostrou que o ensaio é específico, preciso e acurado, permitindo a realização de ensaios válidos.

A sensibilidade do RIE desenvolvido é semelhante à da maioria dos ensaios descritos nos trabalhos publicados, permitindo o diagnóstico de casos de hiperproinsulinemia, como insulinomas e insuficiência renal crônica.

Entretanto, como a maioria daqueles métodos, nosso ensaio não foi

suficientemente sensível para medir os níveis de pró-insulina em indivíduos normais sem o emprego de técnicas de concentração. A técnica de extração e concentração empregando cartuchos de Sep-Pak C₁₈ e concentrador Savant Speed-Vac mostrou-se simples, rápida e acurada permitindo o processamento de várias amostras simultaneamente.

O radioimunoensaio desenvolvido foi aplicado no estudo do diabetes mellitus Tipo II associado à obesidade. Verificou-se que a obesidade não esteve relacionada com o aumento na concentração sérica de pró-insulina intacta em pacientes com diabetes Tipo II. Os níveis de pró-insulina e relação molar PI/I aumentados nos pacientes diabéticos obesos ou de peso normal confirmaram a existência de uma desordem no processo de secreção das células β no diabetes mellitus Tipo II.

Embora o nosso radioimunoensaio não identifique o derivado de conversão 31,32-des pró-insulina, ele pode ser utilizado no estudo das disfunções das células β pancreáticas.

DEVELOPMENT AND PADRONIZATION OF RADIOIMMUNOASSAY TECHNIQUE FOR HUMAN PROINSULIN AND ITS APPLICATION IN THE STUDY OF TYPE II DIABETES MELLITUS ASSOCIATED TO OBESITY.

MARTHA DO NASCIMENTO

ABSTRACT

The availability of immunoassay methodology for proinsulin is important to define its physiological and pathophysiological significance in humans. Serum concentrations of proinsulin are elevated in patients with Type II Diabetes Mellitus (NIDDM) and recently diagnosed Type I, so a raised circulating concentration of proinsulin may serve as an early indicator of β -cell dysfunction. Recently, in NIDDM, the serum concentrations of proinsulin and its B-chain-C-peptide junctional split form, des (31-32), were found to correlate with diastolic blood pressure, a risk factor for cardiovascular disease.

The development of a sensitive and specific radioimmunoassay (RIA) methodology for proinsulin has been difficult due to its low concentration in serum and the presence of proinsulin conversion intermediates in fluids and tissues. Also other potentially cross-reactive peptides, including insulin and C-peptide, can interfere in the assay.

This work describes a highly specific human proinsulin RIA developed by using biosynthetic human proinsulin (hPI) as immunogen, standard and tracer.

Proinsulin was radioiodinated by the iodogen method, presenting great stability after QAE-Sephadex A-25 purification. The efficiency of the purification as well as the stability of the tracer were analysed with 7% polyacrilamide gel electrophoresis (PAGE).

The antiserum was raised in a guinea pig with repeated subcutaneous injections formed from equal volumes of proinsulin (50 μ g in saline) and Freund's adjuvant

(complete for the primary immunization and incomplete for subsequent injections) in multiple sites. Total blood was taken two weeks after the third booster and the antiserum was evaluated for cross-reactivity with insulin and C-peptide.

As the antiserum was not sufficiently specific for proinsulin it was adsorbed against insulin and C-peptide conjugated to Sepharose-4B CNBr activated to improve its specificity. The antiserum purified does not cross-react with insulin and C-peptide (<0,01%), recognizing the junction between the insulin B-chain and C-peptide (65,66-split-proinsulin).

The RIA was carried out using a non-equilibrium system that allows the measurement of proinsulin in 28 h by optimizing the concentrations of reactants, the conditions for the binding reaction and the procedure for separating bound and free proinsulin.

Antiserum or normal guinea pig serum for the blanks (50 μ L) and hPI standards or serum (200 μ L) were incubated at 4°C for 24 h. Afterward, the ¹²⁵I-hPI (50 μ L, approximately 10.000 counts/min) was added and incubated for another 3 h. This was followed by addition of normal guinea pig serum, second antibody and PEG and a further 1 h incubation at 23°C. Precipitates were collected by centrifugation at 3500 G for 15 min. at 4°C.

Regarding the RIA separation technique, the addition of PEG to the second antibody not only reduces significantly the incubation time but seems to be critical for the complete separation of bound and free proinsulin as well.

When performed the quality control, this RIA shows specificity, accuracy and precision, allowing the performance of valid assays.

The sensitivity of the RIA described is extremely close to that reported in the published methods. Therefore, its sensitivity and its wide working range proved suitable for the diagnosis of hyperproinsulinaemic states e.g., insulinomas and chronic renal failure.

Like most of those methods our assay is not sufficiently sensitive to measure fasting proinsulin levels in healthy individuals without the use of concentration techniques. The employed extraction and concentration techniques by using Sep-Pak

C₁₈ cartridges and Savant Speed-Vac concentrator were simple, fast and accurate.

The RIA developed was applied in the of type II diabetes mellitus associated to obesity. We found that obesity wasn't associated to the elevation of serum intact proinsulin concentration in type II diabetic patients. The higher concentration of serum proinsulin and PI/I ratio, observed in type II diabetic patients, obese or normal weight, confirmed the existence of a disorder in the β -cell secretory demand in type II diabetes mellitus.

Although our RIA doesn't identify the 31,32-des conversion intermediates, it can be used in the study of islet β -cell dysfunction.

ÍNDICE

1. Introdução	001
2. Materiais	
2.1. Materiais e equipamentos	014
2.2. Reagentes biológicos	016
2.3. Produtos químicos	017
2.4. Soluções	
2.4.1. Soluções empregadas na obtenção do antissoro anti-pró-insulina.....	018
2.4.2. Soluções empregadas na caracterização dos antissoros anti-pró-insulina	019
2.4.3. Soluções empregadas na purificação dos antissoros anti-pró-insulina	019
2.4.4. Solução empregada na determinação da concentração de insulina acoplada a Sepharose 4B-CnBr ativada	020
2.4.5. Soluções empregadas na radioiodação da pró-insulina	021
2.4.6. Soluções empregadas na purificação da pró-insulina radioiodada	021
2.4.7. Soluções empregadas na eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA)	021
2.4.8. Soluções empregadas no radioimunoensaio de pró-insulina	023
3. Métodos	
A- Preparo e controle de qualidade dos reagentes biológicos específicos do radioimunoensaio	
3.1. Obtenção de antissoro policlonal anti-pró-insulina humana	
3.1.1. Animais	025

3.1.2. Esquema de imunização	025
3.2. Avaliação dos antissoros anti-pró-insulina humana	
3.2.1. Evolução da resposta	027
3.2.2. Determinação do título dos antissoros	027
3.2.3. Determinação da especificidade dos antissoros	027
3.2.4. Purificação dos antissoros	029
3.2.5. Caracterização dos antissoros	030
3.3. Preparo do traçador	
3.3.1. Análise qualitativa da pró-insulina não radioiodada	031
3.3.2. Técnica de radioiodação	031
3.3.3. Cálculo da atividade específica do traçador	032
3.3.4. Purificação da pró-insulina radioiodada	032
3.3.5. Análise da imunorreatividade	033
3.3.6. Análise da pureza do traçador	034
3.3.7. Análise da estabilidade do traçador	036
3.4. Preparo do padrão de pró-insulina e da curva dose resposta do radioimunoensaio	037
B- Determinação das condições ótimas para o radioimunoensaio	
3.5. Determinação do tempo de incubação do ensaio	038
3.6. Determinação da técnica de separação ideal do radioimunoensaio	039
3.7. Determinação da ótima diluição do antissoro e do traçador	040
3.8. Determinação do meio de incubação da curva dose resposta	041
3.9. Obtenção de soro isento de pró-insulina	041
3.10. Estudo comparativo dos padrões de pró-insulina	042

3.11. Radioimunoensaio de pró-insulina	
3.11.1. Sequência operacional	042
3.11.2. Determinação da concentração de pró-insulina em amostras de soro humano	043
3.12. Controle de qualidade do radioimunoensaio	
3.12.1. Especificidade	045
3.12.2. Exatidão	046
3.12.3. Precisão	046
3.12.4. Sensibilidade	047
3.13. Análise da técnica de extração da pró-insulina do soro humano	047
3.14. Análise da técnica de concentração do soro	049
3.15. Aplicação clínica do radioimunoensaio	
3.15.1. Coleta das amostras de soros normais e com secreção insulínica alterada	049
3.15.2. Validação do radioimunoensaio	049
3.15.3. Aplicação do radioimunoensaio no estudo do Diabetes Mellitus Tipo II	050
3.15.4. Análise bioquímica das amostras	051
3.15.4.1. Dosagem da insulina	052
3.15.4.2. Dosagem do peptídeo-C	053
3.15.5. Dosagem da pró-insulina	053
3.15.6. Análise estatística	053

4. Resultados

A- Preparo e controle de qualidade dos reagentes biológicos

específicos do radioimunoensaio

4.1. Avaliação dos antissoros anti-pró-insulina humana

- 4.1.1. Evolução da resposta e determinação do título dos antissoros 055
- 4.1.2. Purificação dos antissoros 055
- 4.1.3. Caracterização dos antissoros 056

4.2. Preparo e controle de qualidade do traçador

- 4.2.1. Análise qualitativa da pró-insulina não radioiodada 058
- 4.2.2. Técnica de radioiodação e cálculo da atividade específica do traçador 059
- 4.2.3. Purificação da pró-insulina radioiodada e análise da imunorreatividade 061
- 4.2.4. Análise da pureza do traçador 062
- 4.2.5. Análise da estabilidade do traçador 063

B- Determinação das condições ótimas para o radioimunoensaio

- 4.3. Determinação do tempo de incubação do ensaio 066
- 4.4. Determinação da técnica de separação ideal do radioimunoensaio 066
- 4.5. Determinação da diluição otimizada do traçador 069
- 4.6. Determinação do meio de incubação da curva dose resposta 069
- 4.7. Estudo comparativo dos padrões de pró-insulina 070
- 4.8. Controle de qualidade do radioimunoensaio
 - 4.8.1. Especificidade 072
 - 4.8.2. Exatidão 073
 - 4.8.3. Precisão 073

4.8.4. Sensibilidade	077
4.9. Análise da técnica de extração da pró-insulina do soro humano	079
4.10. Análise da técnica de concentração do soro	079
4.11. Validação do radioimunoensaio	080
4.12. Aplicação do radioimunoensaio no estudo do Diabetes Mellitus Tipo II associado à obesidade	084
5. Discussão	
A- Preparo e controle de qualidade dos reagentes biológicos específicos do radioimunoensaio	
5.1. Avaliação dos antissoros anti-pró-insulina humana	090
5.2. Preparo e controle de qualidade do traçador	093
B- Determinação das condições ótimas para o radioimunoensaio	
5.3. Obtenção de soro isento de pró-insulina e análise do padrão do radioimunoensaio	095
5.4. Determinação da técnica de separação ideal do radioimunoensaio	095
5.5. Controle de qualidade do radioimunoensaio	096
5.6. Análise da técnica de extração e concentração da pró-insulina do soro	098
5.7. Validação do radioimunoensaio	098
5.7.1. Indivíduos normais	099
5.7.2. Insuficiência renal crônica	100
5.7.3. Insulinoma	101
5.8. Aplicação do radioimunoensaio no estudo do Diabetes Mellitus Tipo II associado a obesidade	102

6. Conclusões	107
7. Referências bibliográficas	109
8. Anexo	128

1. INTRODUÇÃO

A pró-insulina foi, inicialmente, descrita por Steiner e cols. em 1967 em tumor de célula β humano (1,2) e em tecido de ilhota de rato (2) como a molécula precursora da síntese intracelular da insulina, sendo identificada, a seguir, na urina e na circulação por imunoenaios (3-8).

O isolamento deste precursor em grandes quantidades e a determinação de sua estrutura primária por Chance e cols. em 1968 (9) revelaram uma cadeia única polipeptídica de aproximadamente 9100 daltons contendo 86 aminoácidos. Nesta cadeia, uma seqüência de 35 aminoácidos conectava a porção amino terminal da cadeia A com aquela carboxi terminal da cadeia B da insulina. Estudos posteriores demonstraram que este peptídeo de conexão, denominado peptídeo-C, era clivado durante o processo de síntese com perda de dois pares de resíduos básicos levando à formação de insulina e do próprio peptídeo-C, biologicamente inativo, os quais eram co-secretados pela célula β pancreática (9-11).

A pró-insulina, por sua vez, é formada nas células β pancreáticas a partir de um polipeptídeo de aproximadamente 11.500 daltons, a pré-pró-insulina, que corresponde a uma extensão de 23 aminoácidos na porção amino terminal da cadeia B da insulina (12). Este pré-segmento é removido no retículo endoplasmático rugoso por clivagem proteolítica dando origem à molécula da pró-insulina que é então translocada para o aparelho de Golgi em cujos grânulos, é finalmente, convertida em insulina e peptídeo-C (13).

Nagamatsu e Grodsky demonstraram que a exposição prévia das ilhotas do pâncreas à glicose, ativa o mecanismo de conversão da pró-insulina através de uma clivagem proteolítica na seqüência de aminoácidos Arg 31, Arg 32 e Lys 64, Arg 65 (14).

Duas endopeptidases ativas catalizam esta clivagem: PC2(Tipo II) e PC3(Tipo I). A endopeptidase PC2 age preferencialmente na junção entre a cadeia A da insulina e o peptídeo-C, resultando na formação do intermediário de conversão

Arg65, Gly66-split proinsulina, enquanto a endopeptidase PC3 age preferencialmente na junção entre a cadeia B da insulina e o peptídeo-C, produzindo Arg32,Glu33-split proinsulina. A atividade das endopeptidases são reguladas por um gradiente ácido entre o aparelho de Golgi e os grânulos secretórios e por íons cálcio (15). Após o estímulo pela glicose ocorre um aumento na biossíntese de pró-insulina com um aumento coordenado na biossíntese de PC3, indicando ser a PC3 a endopeptidase chave que regula o processamento da pró-insulina (16).

Subsequentemente, os intermediários de conversão são clivados novamente pela carboxypeptidase-H onde, a perda de um resíduo dibásico de aminoácido resulta na formação do intermediário de conversão Lys64,Arg65-des ou Arg31,Arg32-des pró-insulina (17). Em seguida, há uma nova clivagem com a perda de dois pares de resíduos básicos levando à formação de insulina e peptídeo-C (Figura 1).

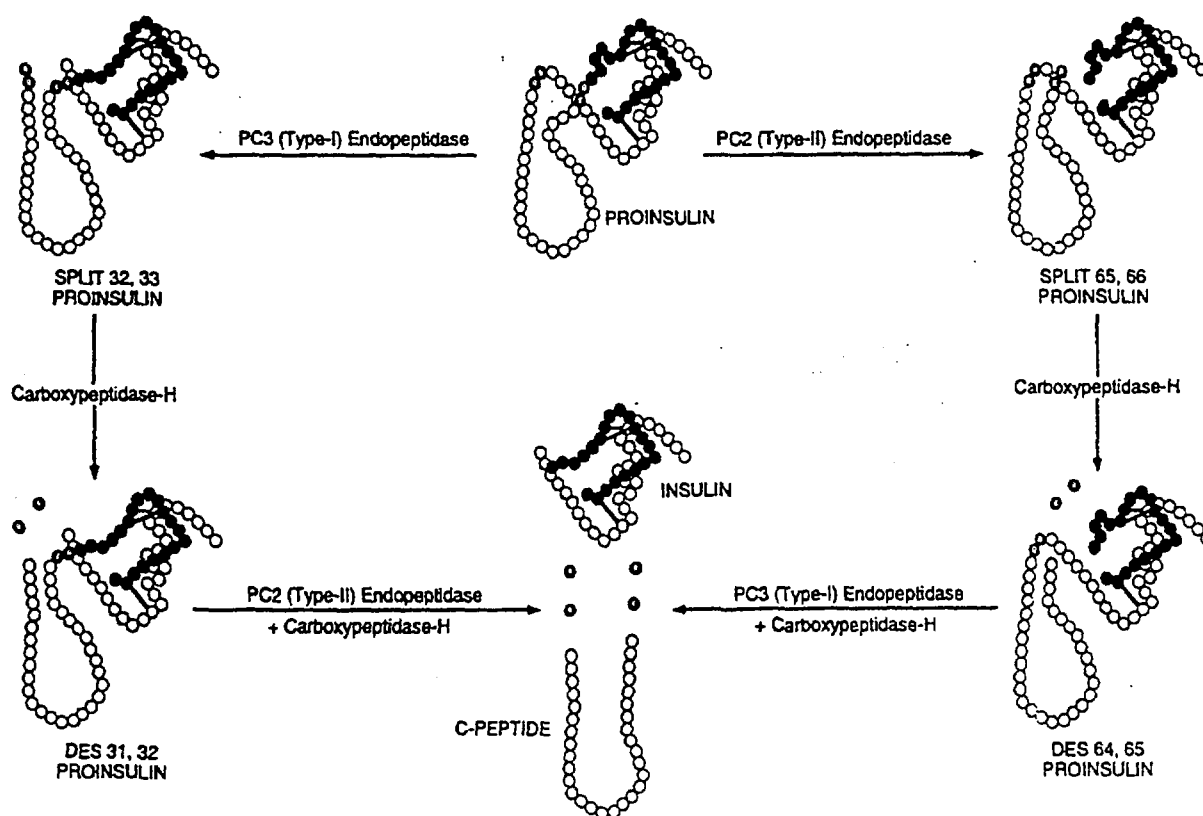


Figura 1- Mecanismos de conversão da pró-insulina humana nas células β pancreáticas.
Fonte: Diabetes 43:511-517, 1994.

Estudos "in vitro e "in vivo" revelaram que ocorre clivagem preferencialmente na ligação Arg32, Glu33 da pró-insulina proporcionando uma relação de aproximadamente 3:1 entre a Arg31, Arg32-des pró-insulina e a Lys64, Arg65-des pró-insulina (18).

Aproximadamente 2,5% da pró-insulina escapa do processo de clivagem e portanto, uma quantidade relativamente pequena deste precursor hormonal pode ser detectada nos grânulos maduros e na circulação sanguínea (19).

Estudos realizados administrando-se pró-insulina por via subcutânea indicaram que houve formação de aproximadamente 10% de intermediários de conversão (64,65-des e 31,32-des pró-insulina) que apresentaram atividade biológica, a pró-insulina, no entanto, não foi processada no compartimento vascular (18).

A potência hipoglicêmica da pró-insulina foi avaliada em vários estudos (20-22) que foram revistos por Galloway e cols., que observaram que a potência metabólica da pró-insulina humana foi de aproximadamente 15%-25% em relação à da insulina (23).

O processo de "clearance" da pró-insulina e de seus intermediários de conversão, estudado por Tillil e cols. (21) empregando cachorros, revelou que este processo foi de 19%, 22% e 37% para pró-insulina, 31,32-des e 64,65-des pró-insulina, respectivamente, em relação à insulina. Estudos em humanos demonstraram que o "clearance" correspondeu a 20%-30% em relação ao da insulina (24), implicando portanto, na meia vida maior da pró-insulina e seus intermediários de conversão comparados à molécula de insulina.

Este processo ocorre preferencialmente nos rins (25) e estudos realizados por Zilker e cols. (26) indicaram que 61% ocorreram por via renal e 39% por processo extrarenal. O processo extrarenal ocorre predominantemente no fígado que é, também, o maior responsável pelo "clearance" da insulina (27).

Em estados de resistência à insulina, o "clearance" pode estar diminuído, dificultando a determinação das causas responsáveis pela alteração na concentração de insulina periférica, se devidas a mudanças na secreção, no "clearance" ou em ambos (28,29). Portanto, a análise dos níveis periféricos de insulina não podem

ser adotados para refletir alterações na secreção de insulina pelas células β pancreáticas (30).

O peptídeo-C por outro lado, fornece informações a respeito das mudanças na secreção de insulina, mas se trata de um hormônio biologicamente inativo. Por causa de sua meia vida relativamente longa e de sua distribuição em compartimentos periféricos, sua concentração pode subestimar a secreção de insulina em situações onde sua concentração aumentar rapidamente e superestimar sua secreção quando ocorrer uma diminuição rápida (31).

Portanto, a disponibilidade de uma metodologia para medir a concentração de pró-insulina sérica era importante para definir seu significado fisiológico e fisiopatológico em humanos. Porém, a baixa concentração da pró-insulina circulante aliada ao fato de conter as estruturas da insulina e do peptídeo-C com os quais está antigenicamente relacionada, dificultou a determinação exata da pró-insulinemia. Esta determinação esteve ainda sujeita a outras incertezas devido à presença de diferentes formas moleculares da pró-insulina que representam os intermediários de sua conversão.

Os métodos inicialmente desenvolvidos para estimar a pró-insulinemia humana se baseavam numa abordagem indireta. Eles separavam a pró-insulina da insulina através de técnicas cromatográficas adequadas e mediam sua imunorreatividade em radioimunoensaio de insulina, empregando padrões de insulina ou de pró-insulina de origem animal ou mesmo humana.

Dessa forma, os primeiros relatos da literatura empregando técnicas de filtração em gel e radioimunoensaios de insulina se referem à pró-insulina circulante como sendo cerca de 20% da insulina total imunorreativa em indivíduos normais (32,33), elevando-se para até 50% duas horas após a administração de glicose (4). Posteriormente, esta estimativa foi reduzida para 15% no trabalho de revisão realizado por Rubenstein e cols. (34), empregando um padrão de pró-insulina.

Outro tipo introduzido de separação entre a pró-insulina e a insulina foi o da degradação pelo emprego de uma protease específica, sendo a pró-insulina determinada em radioimunoensaio de insulina (35). Entretanto, demonstrou-se que a

degradação da insulina era parcial e que a insulina não degradada contribuía para a superestimativa da pró-insulina (36).

Apesar desses métodos serem muito trabalhosos e inadequados para a análise de um grande número de amostras, eles foram amplamente utilizados na década de 70.

Determinou-se, nesses trabalhos, que a relação molar entre a pró-insulina e a insulina (PI/I) permaneceu inalterada em indivíduos normais, obesos, na tolerância à glicose prejudicada, na gravidez e no diabetes gestacional.

Em contraste, foi encontrada uma percentagem aumentada de pró-insulina no diabetes tipo II (diabetes não-insulino-dependente) (17,36,37), na hiperglicemia associada com hipoinsulinemia (38), na obesidade associada a intolerância a carboidratos (39) e em insuficiência renal crônica (40,41). Provavelmente no último exemplo, a alta proporção de pró-insulina em relação à insulina seja devida ao papel crítico dos rins como órgão principal envolvido em sua depuração (25).

A maioria dos pacientes com insulinoma avaliados por técnicas similares, também exibiu níveis de pró-insulina marcadamente elevados (8,32,33,35,42-44) mesmo quando a insulinemia se manteve normal ou até diminuída, condições em que a medida da pró-insulina tem valor diagnóstico (45).

Valores de pró-insulinemia igualmente aumentados foram descritos na hiperpró-insulinemia familiar (46-48) que é uma condição herdada de modo autossômico dominante. Essa condição é caracterizada pela síntese da molécula de pró-insulina estruturalmente anormal que não é convertida à insulina.

Outra técnica desenvolvida e empregada durante a década de 70 para a determinação da pró-insulina foi o radioimunoensaio indireto em duas etapas desenvolvido por Heding (49) a partir de 1976 que envolvia, inicialmente, a ligação da insulina e da pró-insulina a anticorpos anti-insulínicos imobilizados em uma fase sólida seguida de remoção do peptídeo-C livre. Numa segunda etapa, a pró-insulina era quantificada pelo emprego de anticorpos anti-peptídeo-C.

Apesar dessa técnica ser demorada e muito trabalhosa, ela foi empregada por Heding (49,50) para a determinação da pró-insulinemia em indivíduos

normais e diabéticos Tipo I que apresentaram níveis de pró-insulina mais elevados do que os indivíduos normais.

Uma técnica similar foi desenvolvida por Ward e cols. (51) que extraíram a pró-insulina do plasma com antissoro anti-peptídeo-C humano e PEG. Subsequentemente, a pró-insulina foi separada do imuno-precipitado e ensaiada no radioimunoensaio de insulina, usando padrão de pró-insulina.

Essas técnicas, porém, mostraram-se inadequadas já que foi demonstrado que qualquer contaminação do imunoprecipitado com peptídeo-C livre resultaria em valores erroneamente elevados de pró-insulina.

Embora esses estudos tivessem proporcionado achados importantes, os métodos foram incapazes de separar a pró-insulina de seus intermediários de conversão. Além disso, o uso de padrões inadequados como a insulina e extratos não homogêneos de pró-insulina lançaram dúvidas sobre as conclusões obtidas até então (52).

Entretanto, somente a partir de 1981 com a produção de pró-insulina humana, empregando tecnologia de DNA recombinante (53), é que sistemas de radioimunoensaio homólogos deste pró-hormônio puderam ser desenvolvidos (54-59), pois até então, a quantidade de pró-insulina humana altamente purificada disponível era insuficiente para se obter e caracterizar anticorpos sensíveis e específicos.

Da mesma forma, o padrão de pró-insulina humana original, preparado em 1970 na Universidade de Chicago (60) já havia sido substituído em 1984 por três outras preparações equipotentes, sendo uma delas pró-insulina DNA recombinante (61). Em 1986 foi estabelecido, pela Organização Mundial de Saúde, o primeiro Reagente Internacional de Referência para pró-insulina humana, empregando também a pró-insulina biossintética (62).

Cohen e cols. (54), em 1985, foram os primeiros a utilizar pró-insulina humana biossintética empregando um radioimunoensaio direto. A técnica de cromatografia de afinidade foi usada para extrair a pró-insulina e seus intermediários de conversão e obtiveram um anticorpo específico contra a junção entre a cadeia B da insulina e o peptídeo-C que fora purificado para não reconhecer insulina ou

peptídeo C. Este método determinou, portanto, a pró-insulina intacta e seu intermediário de conversão 65,66-split pró-insulina.

Por meio desta metodologia pôde-se observar que, 60 min após a administração oral de glicose, houve um aumento de, aproximadamente, três vezes no nível de pró-insulina do plasma de indivíduos normais.

Deacon e Conlon (55) tentaram simplificar o procedimento empregando um anticorpo específico contra a junção entre a cadeia B da insulina e o peptídeo-C, e que não apresentou reação cruzada com a insulina ou com o peptídeo C. Este método determinou a pró-insulina intacta e seu intermediário de conversão 65,66-des pró-insulina. Como o ensaio não foi suficientemente sensível para medir a pró-insulina em indivíduos normais, 1 mL de soro foi extraído com etanol e a pró-insulina foi concentrada em sistema Savant Speed Vac.

Embora os resultados também indicassem um aumento nos níveis de pró-insulina após o estímulo pancreático, os valores observados foram consideravelmente maiores do que os descritos por Cohen e cols. (54).

Em 1986, Cohen e cols. desenvolveram um outro radioimunoensaio empregando anticorpos específicos contra a junção entre a cadeia B da insulina e o peptídeo-C e a cadeia A da insulina e o peptídeo-C que foram purificados para não reconhecer o peptídeo-C. Devido à sensibilidade do método ser insuficiente para a dosagem de pró-insulina em indivíduos normais, empregou-se cromatografia de afinidade para extrair a pró-insulina do soro.

Esse método foi utilizado na dosagem de pacientes com insulinoma e no estudo de *hiperproinsulinemia familiar*. Quando se empregou anticorpos contra ambas as junções A-Peptídeo C e B-peptídeo C em um ensaio simultâneo, observou-se que o intermediário de conversão encontrado predominantemente no soro humano foi o 32,33-split pró-insulina.

Recentemente, este radioimunoensaio foi empregado, também, por Oohashi e cols. (63) para o estudo de um caso de *hiperproinsulinemia familiar*.

Hampton e cols. também obtiveram um antissoro específico que não reconheceu a insulina ou o peptídeo-C após purificação, porém, este não foi

caracterizado quanto à reação cruzada com os intermediários de conversão (57). Os resultados obtidos no estudo em jejum de indivíduos normais, diabéticos Tipo II e insulinoma indicaram que, embora o ensaio não fosse suficientemente sensível para dosar a pró-insulina em normais, houve um aumento na relação molar pró-insulina/insulina nos grupos estudados em relação aos indivíduos normais.

Yoshioka e cols. desenvolveram um radioimunoensaio específico empregando um anticorpo contra a junção entre a cadeia B da insulina e o peptídeo-C que reconheceu tanto o intermediário de conversão 65,66-split quanto o 64,65-des pró-insulina na mesma proporção (58). Estudando os níveis de pró-insulina do soro após o teste de estímulo pancreático seus resultados também indicaram um aumento nos níveis de pró-insulina após a administração de glicose em indivíduos normais, assim como uma elevação desproporcional de pró-insulina em relação à insulina em diabéticos Tipo II, tanto em jejum quanto após o estímulo, quando comparados com não diabéticos.

A proporção de moléculas de pró-insulina ou intermediários de conversão encontrada nesses estudos em pacientes com diabetes Tipo II foi, geralmente, da ordem de 20 a 30% em relação à insulina. Entretanto, o emprego de diferentes populações de pacientes e diferentes metodologias empregadas dificultou a comparação entre eles.

Bowsher e cols. (59) obtiveram um radioimunoensaio específico empregando dois anticorpos específicos; um contra a junção entre a cadeia A da insulina e o Peptídeo-C e outro, contra a junção entre a cadeia B da insulina e o Peptídeo-C, e estudaram a pró-insulina em indivíduos normais e após estímulo pancreático. Os resultados também indicaram um aumento nos níveis de pró-insulina após o estímulo pancreático, e baseados na diferente especificidade dos anticorpos, concluíram que o intermediário de conversão 32,33-split pró-insulina compreendeu uma porção significativa da pró-insulina circulante após o estímulo com glicose.

Esse radioimunoensaio foi utilizado por Ipp e cols. (64) que observaram um aumento nos níveis de pró-insulina em pacientes com insulinoma.

Haffner e cols. (65) empregando, também, este radioimunoensaio para

medir a pró-insulina e um outro radioimunoensaio específico para insulina, empregando anticorpo anti-insulina que não reconhece a pró-insulina, observaram que a pró-insulina estava fortemente relacionada com o aumento de triglicérides no soro e aumento da pressão arterial em indivíduos não diabéticos, sugerindo que a pró-insulina pode ser empregada como um indicador de descompensação metabólica em indivíduos pré-diabéticos.

Esse mesmo grupo estudou a síndrome de resistência à insulina que é caracterizada por níveis de HDL colesterol baixos, níveis de triglicérides elevados, hipertensão e tolerância à glicose prejudicada. Os indivíduos não diabéticos com a síndrome de resistência à insulina não somente apresentaram hiperinsulinemia como marcador de resistência à insulina, mas também, apresentaram um aumento na concentração de pró-insulina em relação à insulina, o que pode refletir uma falência relativa ou o mal funcionamento das células β (66). Os autores sugerem que a pró-insulina pode ser não somente um marcador de falência das células na etiologia do diabetes Tipo II, mas também, pode estar associada com o aumento de risco cardiovascular em indivíduos diabéticos ou não.

As bases do radioimunoensaio foram enunciadas por Berson e Yalow a partir de 1957 (67) e culminaram com o desenvolvimento de um RIE para a determinação de insulina no plasma humano em 1959 (68).

O princípio do radioimunoensaio baseia-se na competição entre determinado antígeno marcado isotopicamente (traçador) e o mesmo antígeno não marcado (padrão ou desconhecido) pelos sítios de ligação de seus anticorpos específicos, formando um complexo antígeno-anticorpo.

Como nesse sistema as concentrações de traçador e de antígeno são mantidas constantes, constroem-se curvas de calibração adicionado-se, ao sistema, concentrações variáveis e conhecidas de antígeno padrão. Conseqüentemente, a proporção de complexo radioativo formado (antígeno marcado-anticorpo) é inversamente proporcional à concentração de antígeno não marcado.

Dessa forma, a concentração de um antígeno específico é determinada, em amostras de extratos ou fluídos biológicos (soro, plasma, urina, etc.),

pela leitura direta na curva de calibração obtida pela incubação simultânea das amostras e dos padrões com o traçador e o anticorpo específico. Compara-se, portanto, o efeito inibitório do antígeno presente na amostra ensaiada na ligação do traçador ao anticorpo específico com o mesmo efeito inibitório dos padrões conhecidos.

Os elementos essenciais para a realização de um radioimunoensaio consistem, portanto, no preparo do traçador e das soluções padrão, na obtenção do antissoro específico e na escolha de técnicas adequadas para, após o término da reação, separar as frações livre e ligada ao anticorpo.

A separação é seguida pela determinação da radioatividade de uma ou de ambas as frações em contador de cintilação adequado. A partir das contagens obtidas, constrói-se graficamente a curva dose-resposta onde os valores da concentração das amostras ensaiadas são lidos pela comparação de sua radioatividade com a dos padrões de concentração conhecida (69,70).

A importância deste método reside, de um lado, em permitir a dosagem de pequenas concentrações de determinadas substâncias, da ordem de até nano e picogramas, na presença de elevadas concentrações de outras, como ocorre na corrente sanguínea. Por outro lado, a determinação qualitativa das substâncias é altamente específica, decorrente do caráter imunológico da reação.

Portanto, as características principais do radioimunoensaio, sua sensibilidade, especificidade e precisão elevadas, aliadas à sua praticabilidade para ensaiar convenientemente grande número de amostras biológicas, permitiram seu rápido desenvolvimento e seu amplo emprego nos últimos 30 anos.

Apesar da grande contribuição desse avanço tecnológico, a medida da pró-insulinemia continuou complexa, pois, devido à possível reação cruzada do antissoro com os intermediários de conversão, amostras que contenham uma mistura de moléculas íntegras e intermediárias fornecerão resultados diferentes, dependendo do antissoro empregado. Além disso, principalmente em condições normais, quando os níveis da pró-insulina endógena, freqüentemente, se encontram abaixo do limite de detectabilidade dos ensaios, há necessidade de se extrair a pró-insulina do soro e concentrar as amostras antes de suas dosagens.

Com a evolução dos imunoenaios, outros métodos baseados nos princípios do radioimunoensaio (RIE) foram desenvolvidos visando a aumentar sua sensibilidade, tais como os ensaios imunorradiométricos (IRMA), imunoenzimáticos (EIA) e imunoquimiométrico (ICMA).

Hartling e cols. (71) em 1986, desenvolveram um ensaio imunoenzimático empregando anticorpos anti-insulina e anti-peptídeo-C que detectou tanto a pró-insulina quanto os intermediários de conversão 31,32-des e 64,65-des pró-insulina. O estudo de pacientes com insulinoma mostrou que, nestes casos, ocorre um aumento de pró-insulina em relação aos indivíduos normais e revelou a estabilidade da pró-insulina em amostras de soro estocadas a -20°C por período de 1 ano.

Em 1989 Sobey e cols. (72) descreveram um método imunorradiométrico mais sensível empregando anticorpos monoclonais altamente específicos contra a pró-insulina intacta e seus intermediários de conversão, 65,66-split e 32,33-split.

Estudando indivíduos normais e com diabetes Tipo II, obesos e não obesos, observaram que, no diabetes, aproximadamente 50% de todas as moléculas relacionadas com a insulina foram constituídas por pró-insulina intacta e 32,33-split pró-insulina e que a relação entre elas foi de 1 para 3. Quanto aos indivíduos normais, esta proporção foi de aproximadamente 25%, mesmo para os indivíduos obesos (73).

Esta metodologia foi empregada por Temple e cols. (74) que observaram que a pró-insulina intacta e o intermediário de conversão 32,33-split reage cruzadamente em relação molar de 1 para 1 com a insulina em radioimunoensaios comerciais que empregam anticorpos policlonais.

Portanto, se a pró-insulina e seus intermediários de conversão forem interpretados como sendo insulina no radioimunoensaio convencional de insulina, a atividade biológica menor destes pró-hormônios poderia mascarar o verdadeiro significado da insulina encontrada no diabetes Tipo II.

Nagi e cols. (75), utilizando este mesmo IRMA verificaram que, em pacientes diabéticos Tipo II, a pró-insulina e a 32,33-split pró-insulina compreendeu aproximadamente 60% de todas as moléculas relacionadas à insulina e que, nesses

pacientes, estas moléculas estavam relacionadas com fatores de risco cardiovascular associado com hipertensão, triglicérides aumentados e níveis de HDL colesterol diminuídos.

Recentemente, Ostrega e cols. (76) validaram o IRMA desenvolvido por Sobey e cols. através de comparação empregando cromatografia líquida de alta resolução (HPLC). Eles concluíram que a maioria dos derivados de conversão da pró-insulina identificados como 32,33-split pró-insulina tratava-se, na verdade, de 31,32-des pró-insulina e que esta forma foi encontrada predominantemente no soro de indivíduos normais ou pacientes com diabetes Tipo II.

Reaven e cols. (77) utilizando o ensaio imunoenzimático que detecta a pró-insulina intacta e seus intermediários de conversão 31,32-des e 64,65-des pró-insulina, observaram que a resposta das células β em pacientes com diabetes Tipo II era anormal, sendo que as causas deste defeito ainda não foram esclarecidas.

Amostras de soro analisadas em HPLC mostraram que a pró-insulina intacta compreende aproximadamente 40% do total de moléculas relacionadas a pró-insulina e a forma derivada 31,32-des compreende aproximadamente 50-60% da pró-insulina total, tanto para indivíduos normais quanto para diabéticos Tipo II (77,78).

Uma nova metodologia para a dosagem de pró-insulina é o ensaio imunométrico (ICMA) que foi desenvolvido por Kao e cols. (79) que reconhece a pró-insulina intacta mas que não diferencia seus intermediários de conversão.

O método foi aplicado na determinação de pró-insulina em pacientes com insuficiência renal crônica e no diagnóstico de insulinoma. Observou-se que 70% dos pacientes com insuficiência renal apresentavam valores de pró-insulina acima do normal e que a pró-insulina não somente é útil para o diagnóstico de insulinoma, mas que este diagnóstico pode ser mais acurado do que o obtido com a análise da insulina e do peptídeo-C.

Pode-se concluir, pelo que foi exposto, que existem vários aspectos que ainda não foram esclarecidos no estudo do diabetes e que, cada vez mais, a pró-insulina e seus intermediários de conversão se definem como um marcador da disfunção da célula β assim como estão relacionados a fatores de risco cardiovascular em

população não diabética.

Visto que não existem conjuntos diagnósticos disponíveis no mercado, o presente trabalho tem por objetivo o desenvolvimento e a padronização de um radioimunoensaio específico para a determinação da pró-insulinemia humana. A determinação da pró-insulinemia em indivíduos normais e com níveis elevados de pró-insulina (insulinomas e insuficientes renais crônicos) permitirá a validação do radioimunoensaio e este será aplicado no estudo de indivíduos com diabetes tipo II associado à obesidade.

2. MATERIAIS

2.1. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

- Agitador magnético com placa aquecedora, modelo 258, marca Fanem, São Paulo.
- Agitador mecânico do tipo "vortex", modelo 251, marca Fanem, São Paulo.
- Balança analítica, modelo H2OT, com precisão de 0,01 mg, marca Mettler, Zurique, Suíça.
- Balança semi-analítica, modelo P1000N, com precisão de 0,1 g, marca Mettler, Zurique, Suíça.
- Bomba peristáltica, modelo 59-4698-01-AB, marca Pharmacia, Uppsala, Suécia.
- Bomba de vácuo, Millipore, modelo XX-6000000, E.U.A.
- Cartuchos de octadecil-silica, Sep-Pak C₁₈, Waters Chromatography, marca Millipore, Massachusetts, E.U.A.
- Centrífuga refrigerada automática, modelo Spin VI, marca Incibrás, São Paulo.
- Centrífuga refrigerada automática, modelo Super Speed RC-2B, marca Sorvall, Conecticut, E.U.A.
- Centrífuga evaporadora Speed-Vac SS4, marca Savant, E.U.A.
- Coletor de frações automático, modelo Frac-200, marca Pharmacia, Uppsala, Suécia.
- Coluna cromatográfica de vidro de 1,0 x 30,0 cm, marca Pharmacia, Uppsala, Suécia.
- Concentrador Speed-Vac SS4, marca Savant Instruments, Farmingdale, N.Y.,

Federal da Alemanha.

- Filtro com poros de 0,25 μm de diâmetro, marca Millipore, Massachusetts, E.U.A.
- Membrana adesiva "Parafilm", marca American National Can, Greenwich, Inglaterra.
- Freezer de baixa temperatura (-20°C), marca Prosdócimo, São Paulo.
- Freezer de baixa temperatura (-40°C), marca Metalfrio, São Paulo.
- Fonte de alta tensão, modelo GPS 200/400, marca Pharmacia Uppsala, Suécia.
- Impressora, modelo Laser Jet III, marca Hewlett Packard, Minneapolis, E.U.A.
- Lâmpada fluorescente de 15 W, marca Philips, São Paulo.
- Microcomputador, modelo AT-386, marca Samsung, Minneapolis, E.U.A.
- Micropipetas de 10, 20, 25 μL , marca Dade, Flórida, E.U.A.
- Peagômetro, modelo B 374, marca Micronal, São Paulo.
- Pipetas automáticas reguláveis de vários volumes, marca Eppendorf, Hamburgo, Alemanha.
- Pipetas tipo Pasteur, construídas nas oficinas do IPEN-CNEN/SP, São Paulo, Brasil.
- Pipetas sorológicas e volumétricas de vários volumes, marca Pyrex, São Paulo.
- Provetas de vários volumes, marca Pyrex, São Paulo.
- Refrigeradores, marcas Prosdócimo, Consul e Metalfrio, São Paulo.
- Repipetador automático, marca Eppendorf, Hamburgo, Alemanha.
- Seringas descartáveis de 10 mL, marca Ibras-CBO, São Paulo.
- Seringas de 10 μL , marca Hamilton, Reno, E.U.A.
- Suporte para filtros, marca Millipore, Massachusetts, E.U.A.
- Tubos cilíndricos de vidro de 5 x 110 cm, construídos nas oficinas do IPEN-

2.2. REAGENTES BIOLÓGICOS

- Adjuvante completo de Freund, Difco Laboratories, Detroit, E.U.A.
- Adjuvante incompleto de Freund preparado em nossos laboratórios
- Albumina bovina (AB) fração V Ria Grade em pó, Sigma Chemical Company (nº A-7888), St. Louis, E.U.A.
- Gama globulina bovina, Sigma Chemical Company, St. Louis, E.U.A.
- Antissoro monoclonal anti-insulina humana, Linco Research Inc, St. Louis, E.U.A. (Lot SP 21-4).
- Segundo anticorpo produzido em cabras, anti-gama globulina de cobaia, por Pel-Freez System Laboratories (Lote nº 12890-3CC).
- Pró-insulina humana biossintética (padrão primário de Referência Internacional) fornecido pelo "National Institute for Biological Standards and Control-NIBSC", Reino Unido (código 84/611).
- Pró-insulina (Lote nº 509-EM4), insulina (Lote nº 615-7U7-208) e peptídeo-C (Lote nº A18-TU8-44D) humano biossintético obtidos por doação da Elli Lilly Laboratories, E.U.A.
- Derivados de conversão da pró-insulina: split (32,33), split (65,66), des (31,32) e des (64,65) obtidos por doação da Elli Lilly Laboratories, E.U.A.
- Insulina porcina tipo III (lote nº MLS3.142) obtida por doação da Biobrás Bioquímica do Brasil, Montes Claros, MG, Brasil.
- Insulina porcina padrão do conjunto diagnóstico (RIE) fornecido pela CIS Bio International, France.
- Conjunto diagnóstico (RIE) para dosagem de Peptídeo-C, fornecido pela DPC (Diagnostic Products Corporation), E.U.A.

2.3. PRODUTOS QUÍMICOS

- Acetonitrila, p.a, Merck, São Paulo.
- Ácido bórico, Merck, São Paulo
- Ácido tricloroacético, Merck, São Paulo.
- Ácido acético glacial, Merck, São Paulo.
- Ácido clorídrico, p.a., Merck, São Paulo.
- Ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), p.a. Carlo Erba, São Paulo.
- Ácido trifluoroacético, p.a., Merck, São Paulo.
- Acrilamida 97%, Bio Rad, Califomia, E.U.A.
- Arlancel A
- Azul de bromofenol, Merck, São Paulo.
- Brometo de cianogênio, Sigma, E.U.A.
- Carvão ativado p.a., artigo 2186, Merck, São Paulo
- Carbonato de sódio p.a., Merck, São Paulo
- Citrato de sódio p.a., Merck, São Paulo
- Cloreto de sódio, p.a., Merck, São Paulo.
- Coomassie brilliant blue R-250, Sigma, E.U.A.
- Etanol, p.a., Merck, São Paulo
- Fosfato de sódio monobásico e dibásico, p.a., Merck, São Paulo.
- Folín-Ciocalteau, Merck, São Paulo.
- Glicina , p.a., Merck, São Paulo.
- Glicose, p.a., Merck, São Paulo.
- Hidróxido de sódio, p.a., Carlo Erba, São Paulo.
- Iodogen, p.a., Sigma, E.U.A.

- N,N,N',N'-tetrametilenodiamina (TEMED), p.a., Bio Rad, California, E.U.A.
- Óleo mineral Nujol, Schering Plough, Rio de Janeiro.
- Polietilenoglicol 8000, Sigma, E.U.A.
- Riboflavina, Roche, São Paulo.
- Sepharose 4B, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suécia.
- Sacarose em cristais, p.a., Merck, São Paulo.
- Sulfato de cobre p.a., Merck, São Paulo
- Tetraborato de sódio, Reagen, São Paulo
- Thimerosal, Sigma Chemicals Company, St. Louis, E.U.A.
- Tris-hidroximetil-aminometano (TRIS), p.a., Merck, São Paulo.

2.4. SOLUÇÕES

2.4.1. SOLUÇÕES EMPREGADAS NA OBTENÇÃO DO ANTICORPO ANTI-PRÓ-INSULINA.

- Solução fisiológica:

Cloreto de sódio9 g

Água destilada q.s.p.....1 L

- Adjuvante incompleto de Freund

Óleo mineral.....9 partes

Arlacel A.....1 parte

A solução foi autoclavada e congelada até o seu uso.

2.4.2. SOLUÇÕES EMPREGADAS NA CARACTERIZAÇÃO DOS ANTISSOROS ANTI- PRÓ-INSULINA:

- Fosfo-salina (fosfato de sódio 0,01M, pH 7,6, NaCl 0,15M e thimerosal 0,01%):

Fosfato de sódio monobásico . H₂O.....0,18 g
 Fosfato de sódio dibásico . 2 H₂O.....1,55 g
 Cloreto de sódio.....8,5 g
 Thimerosal.....0,1 g
 Água destilada q.s.p.....1 L

- Fosfo-salina-EDTA 0,01M

EDTA 0,1M.....10 mL
 Fosfo-salina q.s.p.....100 mL

2.4.3. SOLUÇÕES EMPREGADAS NA PURIFICAÇÃO DOS ANTISSOROS ANTI-PRÓ-INSULINA.

- Hidróxido de sódio 2 M

Hidróxido de sódio.....8 g
 Água destilada q.s.p.....100 mL

- Tampão borato de sódio 0,1 M; NaCl 0,5M pH 8,1

Tetraborato de sódio . 10 H₂O.....2,89 g
 Ácido bórico.....4,39 g
 Cloreto de sódio.....29,23 g
 Água destilada q.s.p.....1 L

- Tampão borato de sódio 0,1 M; NaCl 0,5 M; Glicina 0,2M pH8,0

Tetraborato de sódio . 10 H₂O.....2,89 g
 Ácido bórico.....4,39 g
 Cloreto de sódio.....29,23 g
 Glicina.....15,0 g
 Água destilada q.s.p.....1 L

- Tampão Acetato de sódio 0,1 M; NaCl 0,5 M pH 4,0

Acetato de sódio.....1,23 g
 Ácido acético glacial.....2,37 mL
 Cloreto de sódio.....29,23 g
 Água destilada q.s.p.....1 L

**2.4.4. SOLUÇÃO EMPREGADA NA DETERMINAÇÃO DA
 CONCENTRAÇÃO DE INSULINA ACOPLADA À SEPHAROSE
 4B-CnBr ATIVADA.**

Solução A:

Carbonato de sódio.....10 g
 Hidróxido de sódio 0,5M.....100 mL

Solução B:

Sulfato de cobre . 5H₂O.....2,5 g
 Citrato de sódio 5%.....100 mL

As soluções A e B foram misturadas no momento do uso na proporção de 50/1 (v/v).

2.4.5. SOLUÇÕES EMPREGADAS NA RADIOIODAÇÃO DA PRÓ-INSULINA

- Tampão fosfato de sódio 0,05M, pH 7,4:

Fosfato de sódio monobásico . H₂O.....0,1311 g

Fosfato de sódio dibásico . 7 H₂O.....1,0864 g

Água destilada q.s.p.....100 mL

2.4.6. SOLUÇÃO EMPREGADA NA PURIFICAÇÃO DA PRÓ-INSULINA RADIOIODADA (cromatografia em QAE-Sephadex A-25).

- Tampão Tris-HCl 0,08M; 0,08M NaCl pH 8,6, contendo 1% de AB.

Tris.....9,67 g

Cloreto de sódio.....4,68 g

Água destilada q.s.p.....1 L

- Tampão Tris-HCl 0,08M; 0,3M NaCl pH 8,6, contendo 1% de AB.

Tris.....9,67 g

Cloreto de sódio.....17,53 g

Água destilada q.s.p.....1 L

2.4.7. SOLUÇÕES EMPREGADAS NA ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA:

- Ácido clorídrico 1 N:

Ácido clorídrico p.a.....9 mL

Água destilada q.s.p.....100 mL

- Solução A, pH 8,9:

TRIS.....	36,60 g
TEMED.....	0,23 mL
Ácido clorídrico 1 N.....	48 mL
Água destilada q.s.p.....	100 mL

- Solução C:

Acrilamida.....	28 g
Bis-acrilamida.....	0,74 g
Água destilada q.s.p.....	100 mL

- Solução E:

Riboflavina.....	4 g
Água destilada q.s.p.....	100 mL

- Solução F:

Sacarose.....	20 g
Água destilada q.s.p.....	100 mL

- Solução para polimerização (poliacrilamida a 7 %):

Solução A.....	1 mL
Solução C.....	2 mL
Solução E.....	1 mL
Água destilada.....	4 mL

- Tampão TRIS-glicina 0,4 M, pH 8,3:

TRIS.....	6 g
Glicina.....	28,8 g
Água destilada q.s.p.....	100 mL

Diluído 10 vezes em água destilada imediatamente antes do uso.

- Solução de azul de bromofenol:

Azul de bromofenol.....	0,1 mg
Água destilada.....	100 mL

- TCA a 12,5 %:

Ácido tricloroacético.....	12,5 g
Água destilada.....	100 mL

- Solução de "coomassie blue" a 0,2%:

"Coomassie blue".....	0,20 g
Etanol p.a.....	45 mL
Ácido acético glacial.....	10 mL
Água destilada q.s.p.....	45 mL

- Solução de "coomassie brilliant blue R-250" a 0,05%:

Solução de "coomassie blue" a 0,2%.....	10 mL
Ácido acético a 7%.....	30 mL

- Solução descorante (ácido acético a 7 %):

Ácido acético glacial.....	7 mL
Água destilada q.s.p.....	100 mL

**2.4.8. SOLUÇÕES EMPREGADAS NO RADIOIMUNOENSAIO DA
PRÓ-INSULINA:**

- Tampão fosfato de sódio 0,04 M, pH 7,4 (Tampão de ensaio)

Fosfato de sódio monobásico . H ₂ O.....	1,05 g
Fosfato de sódio dibásico . 7 H ₂ O.....	8,74 g
Thimerosal.....	0,20 g
Água destilada q.s.p.....	1 L

- Tampão fosfato de sódio 0,025 M , EDTA 0,02 M pH 7,5 (Tampão de separação)

Fosfato de sódio monobásico . H ₂ O.....	0,55 g
Fosfato de sódio dibásico . 7 H ₂ O.....	5,63 g
EDTA.....	7,44 g
Thimerosal	0,20 g
Água destilada q.s.p.....	1 L

3. MÉTODOS

A- PREPARO E CONTROLE DE QUALIDADE DOS REAGENTES BIOLÓGICOS ESPECÍFICOS DO RADIOIMUNOENSAIO.

3.1- OBTENÇÃO DE ANTÍSSORO POLICLONAL ANTI-PRÓ-INSULINA HUMANA

3.1.1. ANIMAIS

O antissoro policlonal específico para uso no radioimunoensaio foi obtido empregando-se a técnica de imunização descrita por Vaitukaitis e cols. (80). 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 pró-insulina e de adjuvante de Freund. Utilizou-se adjuvante de Freund completo na primeira imunização, e incompleto nas injeções de reforço.

3.1.2. ESQUEMA DE IMUNIZAÇÃO

Empregaram-se dois esquemas de imunização. No primeiro esquema, cinco animais foram imunizados com 50 µg de pró-insulina e no segundo esquema, 10 animais foram imunizados com uma dose cinco vezes maior (250 µg) do imunógeno. Essas mesmas doses foram repetidas nas injeções de reforço (Figura 2).

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 por via intraperitoneal de 3 ml de glicose 50% aos animais remanescentes, para evitar uma mortalidade maior.

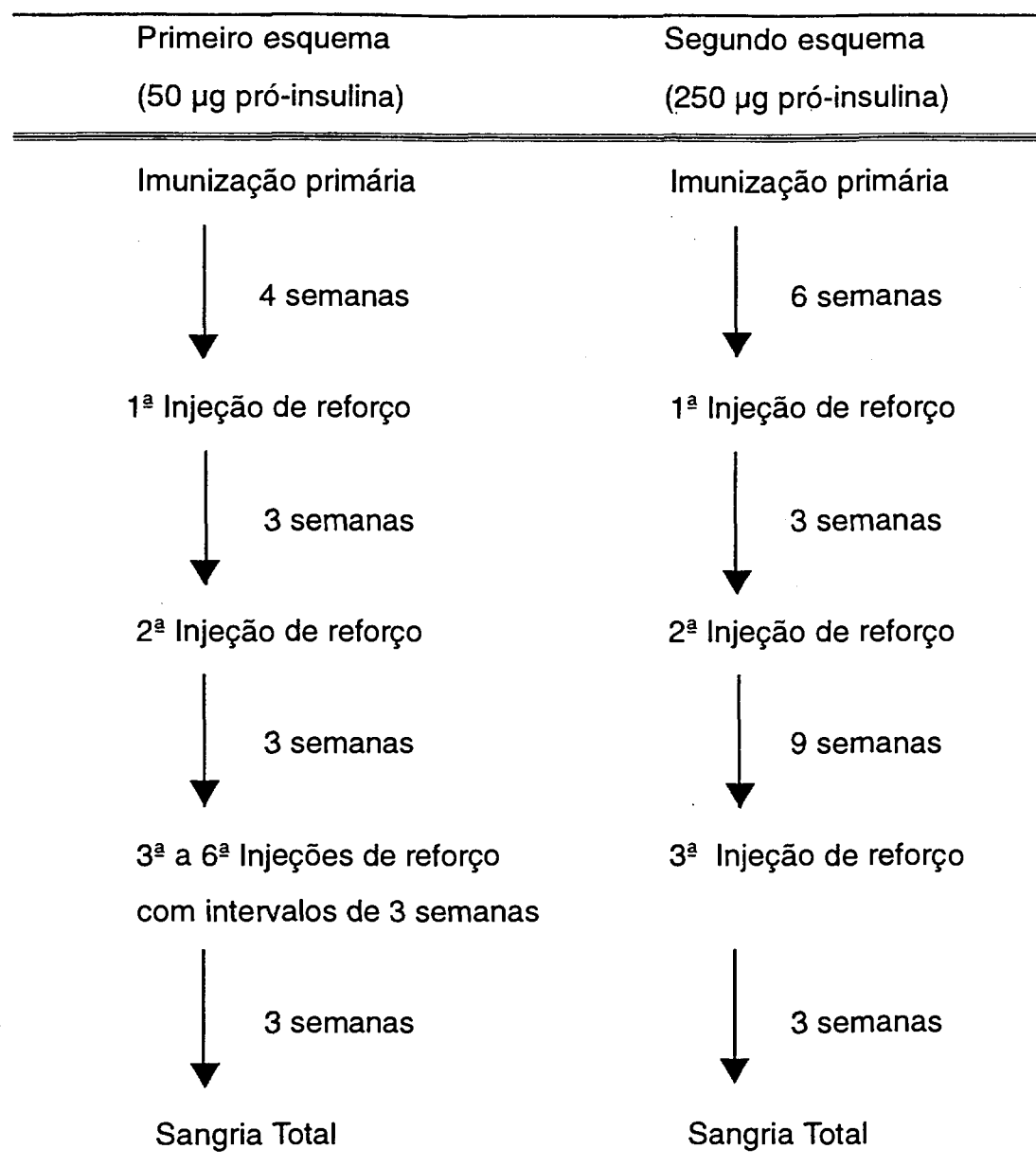


Figura 2- Esquemas de imunização empregados na obtenção dos antissoros anti-pró-insulina.

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.

3.2. AVALIAÇÃO DOS ANTÍSSOROS ANTI-PRÓ-INSULINA HUMANA

3.2.1. EVOLUÇÃO DA RESPOSTA

A evolução da resposta dos antíssoros ao longo do tempo de imunização foi avaliada, incubando-se cada antíssoro (100 µL na diluição de 1:100) com o traçador ^{125}I -hPI (100 µL contendo aproximadamente 10.000 cpm) por 24 h a 4°C em tampão fosfo-salina contendo EDTA 0,01 M e 0,1% de soro normal de cobaia (volume final de 300 µL).

Os anticorpos ligados ao traçador foram precipitados pela adição de um segundo antíssoro de cabra, anti-gama globulina de cobaia, seguidos de incubação por mais 24 h a 4°C. Após centrifugação durante 20 min. a 1880 G, os sobrenadantes foram descartados vertendo-se os tubos, e a radioatividade do precipitado foi determinada em contador gama automático. A eficiência do contador Abbott, EUA estabelecida pelo fabricante foi de 65% (81).

3.2.2. DETERMINAÇÃO DO TÍTULO DOS ANTÍSSOROS

Os antíssoros obtidos ao longo do tempo de imunização foram titulados no sistema de ensaio descrito no item 3.2.1. A incubação, no entanto, foi realizada por 72 h nas diluições variando de 1:100 a 1:256.000.

3.2.3. DETERMINAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DOS ANTÍSSOROS

A especificidade dos antíssoros foi analisada em curvas de título, na presença de insulina (500 mUI/L) e de peptídeo-C (10 pmol/mL).

Como os antíssoros não foram suficientemente específicos para a pró-insulina, eles foram adsorvidos contra Insulina-Sepharose e Peptídeo-C-Sepharose empregando-se cromatografia de afinidade.

3.2.3.1. Preparo da Sepharose 4B-CNBr ativada e acoplamento à insulina e ao peptídeo-C.

A Sepharose 4B foi ativada de acordo com o método descrito por Cuatrecasas e Anfinsen (82). A resina foi colocada em béquer contendo o mesmo volume de água destilada, colocado sobre um agitador magnético, e o pH foi constantemente monitorado através de um eletrodo de pH colocado na suspensão. O CNBr foi adicionado na proporção de 150 mg por grama de resina seca e rapidamente titulou-se a reação com NaOH 2 M elevando-se o pH para aproximadamente 11. A temperatura foi mantida constante em torno de 20°C empregando-se um banho de gelo. O tempo aproximado de reação foi de 8-12 min. Quando o pH manteve-se constante (pH 11), foi acrescentada grande quantidade de gelo à suspensão que foi transferida para funil de Buchner sob vácuo e lavada com tampão borato 0,1 M pH 8,1 frio. Assim que o tampão foi aspirado vedou-se a saída do funil com parafilm e adicionou-se a solução de proteína a ser acoplada (3,6 mg de insulina e 1,0 mg de peptídeo-C por grama de resina seca (54). Em seguida, a suspensão foi transferida para um frasco e permaneceu sob agitação a 4°C pelo período de um "overnight".

Após o acoplamento, o tampão foi substituído pelo tampão de acoplamento acrescido de glicina 0,2 M pH 8,0 para o bloqueio dos grupos ativos remanescentes e permaneceu sob agitação por mais um "overnight" a 4°C. Procedeu-se, então, à retirada da proteína adsorvida à Sepharose e do agente bloqueante, com lavagens sucessivas empregando-se os tampões borato e acetato de sódio num total de 500 mL de cada tampão por grama de gel.

Determinou-se a existência de insulina nos filtrados obtidos após cada etapa de lavagem, através da detecção em espectrofotometria U.V. em 276 nm, até que a presença de insulina não fosse mais detectada. O peptídeo-C não pôde ser analisado já que sua molécula não contém aminoácidos aromáticos que contribuam para a absorbância na região ultra-violeta (83).

A concentração de insulina imobilizada à Sepharose após o acoplamento, foi avaliada empregando-se o método de Lowry modificado (84).

3.2.3.2. Determinação da insulina imobilizada à Sepharose

A suspensão de insulina-Sepharose foi lavada com água destilada para a retirada do tampão borato e a seguir centrifugada por 3 min. a 300 G. A seguir, 1 mL de resina foi ressuspensa em 1 mL de água destilada e a concentração protéica foi determinada. O mesmo processo foi aplicado à Sepharose não ativada que foi empregada na construção da curva de dose resposta.

A curva de dose resposta foi construída dissolvendo-se insulina biossintética humana (5mg/mL) em solução de HCl 0,005 N que foi adicionada à Sepharose não ativada obtendo-se uma série de amostras contendo 0,1 a 1,0 mg/mL.

À resina em suspensão, acrescentou-se 0,4 mL da solução descrita no item 2.4.2 e a suspensão permaneceu sob agitação por 20 min. à temperatura ambiente. Em seguida, acrescentou-se 0,2 mL de reagente de Folin-Ciocalteau 1N que permaneceu incubando por mais 120 min. Após a retirada do sobrenadante, a resina foi lavada com 1 mL de água destilada que foi reunida ao sobrenadante inicial. Em seguida determinou-se a densidade óptica a 750 nm e a concentração de insulina acoplada foi determinada empregando-se a curva de dose resposta.

3.2.4. PURIFICAÇÃO DOS ANTISSOROS

O conjugado proteína-Sepharose foi empregado na cromatografia de afinidade para a purificação dos antissoros anti-pró-insulina.

Os antissoros foram incubados por 18 h com 0,5 mL do conjugado insulina-Sepharose por mL de antissoro, seguido por uma incubação adicional com o Peptídeo-C-Sepharose (0,3 mL/mL de antissoro) de 18 h a 4°C sob agitação (54). O antissoro foi separado da resina por centrifugação a 300 G por 3 min., armazenado a -20°C e empregado no radioimunoensaio.

3.2.5. CARACTERIZAÇÃO DOS ANTISSOROS

A avidéz dos antissoros purificados foi estimada por construção de curvas dose resposta do radioimunoensaio em equilíbrio, calculando-se suas constantes de afinidade (K_a) pela análise de Scatchard (85), com a ajuda do programa computacional "Statistical Graphics System" para a redução dos dados (86).

Essas curvas foram construídas empregando-se pró-insulina padrão (100 μ L) nas concentrações variando de 0,016 a 16 pmol/mL e 100 μ L de tampão de ensaio (volume final de 300 μ L). As amostras foram incubadas por 96 h a 4°C, seguidas de incubação adicional por 24 h com o segundo antissoros. O precipitado foi coletado por centrifugação a 1500 G durante 30 min. a 4°C.

Os antissoros que apresentaram os valores de K_a mais elevados, foram submetidos à análise de sua cinética de precipitação, permanecendo incubados por período que variou de 1 a 126 h a 4°C com emprego de polietileno glicol 20% para a separação da fração ligada. Os dados obtidos foram analisados utilizando-se um programa computacional para análise compartimental e cinética, ANACOMP versão 1.0 (87).

A seguir, determinou-se os valores percentuais da reação cruzada desses antissoros com a insulina, peptídeo-C e com os intermediários de conversão da pró-insulina: 65,66-split, 32,33-split, 64,65-des e 31,32-des.

Esses valores foram estimados a partir das curvas dose resposta, como a razão da concentração de pró-insulina pela concentração de insulina, peptídeo-C e dos intermediários de conversão da pró-insulina, necessários para o deslocamento de 50% do traçador. As curvas dose resposta foram construídas em tampão em sistema de ensaio em não-equilíbrio e separadas pelo segundo antissoros assistido pelo PEG, conforme descrito no ítem 3.11.1.

3.3. PREPARO DO TRAÇADOR

3.3.1. ANÁLISE QUALITATIVA DA PRÓ-INSULINA NÃO RADIOIODADA

A qualidade da pró-insulina não radioiodada foi analisada pela eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) para fins de controle da estabilidade do pró-hormônio.

A pró-insulina (65µg) foi dissolvida em tampão fosfato de sódio 0,05M pH 7,4 e submetida a EGPA conforme descrito no item 3.3.6.

3.3.2. TÉCNICA DE RADIOIODAÇÃO

A pró-insulina humana biossintética foi marcada empregando-se o método de Iodogen desenvolvido por Fraker e Speck (88) e modificado para obtenção de traçadores com maior atividade específica (89).

Os tubos de iodação de polipropileno foram recobertos com 16 µg de iodogen dissolvido em 200 µL de clorofórmio posteriormente evaporado sob atmosfera de nitrogênio à temperatura ambiente, lacrados com parafilme e estocados em dessecador a -40°C.

Imediatamente antes da marcação, os tubos foram lavados com 200 µL de tampão fosfato de sódio 0,05 M pH 7,4. Cinco microgramas da pró-insulina dissolvidas em 100 µL do mesmo tampão fosfato foram incubados com 37 MBq de Na¹²⁵I (1 mCi) durante 5 min. no tubo de iodação em banho de gelo.

O rendimento das marcações foi determinado pela percentagem de radioatividade precipitada com ácido tricloroacético (TCA) a 10% (90).

3.3.3. CÁLCULO DA ATIVIDADE ESPECÍFICA DO TRAÇADOR

A atividade específica (AE) do traçador, expressa em Bq/ μ g, foi calculada a partir do rendimento da marcação, considerando a massa do pró-hormônio radioiodado e a atividade do Na¹²⁵I utilizada (91).

3.3.4. PURIFICAÇÃO DA PRÓ-INSULINA RADIOIODADA (¹²⁵I-hPI)

O pró-hormônio radioiodado foi purificado por cromatografia de troca aniônica em coluna de QAE-Sephadex A-25 de acordo com o método descrito por Deacon e Conlon (55).

O gel (6 g) foi previamente intumescido com solução fisiológica durante 30 min. à temperatura ambiente, seguido de 2 h com tampão TRIS-HCl 0,08 M; NaCl 0,08 M, pH 7,0 em banho fervente. Em seguida, após atingir a temperatura ambiente, o tampão foi substituído por outro de pH 8,6 e o gel foi então empacotado em coluna de vidro de dimensões de 30 cm de altura e 1 cm de diâmetro, em sistema refrigerado a 4°C.

A coluna foi lavada com volume suficiente de tampão Tris-HCl 0,08 M; NaCl 0,08 M; pH 8,6 contendo 1% de albumina bovina até atingir a saturação. Esta foi confirmada pela dosagem da concentração da albumina bovina em espectrofotometria U.V. em 280 nm antes e após a passagem do tampão pela coluna.

A mistura de reação foi aplicada à coluna, lavando-se o tubo de iodação com 200 μ L do tampão de eluição. A coluna 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.

Coletaram-se 120 frações de 2,5 ml cada, das quais foram retiradas alíquotas de 50 μ L. Essas alíquotas foram colocadas individualmente em cones de papel alumínio para determinação da radioatividade em contador gama. A partir das contagens obtidas traçaram-se os cromatogramas em escala linear, relacionando-se a radioatividade, expressa em cpm, com o número da fração.

3.3.5. ANÁLISE DA IMUNORREATIVIDADE

As frações relacionadas aos picos principais revelados nos cromatogramas foram avaliadas por sua imunorreatividade pela incubação com o antissoro anti-pró-insulina em excesso (diluição final de 1:300) bem como sua pureza pela precipitação com TCA e pela análise em EGPA, conforme descrito adiante no item 3.3.6.

Neste ensaio foram pipetados 100 μ L de tampão de ensaio contendo 0,1% de albumina bovina, 100 μ L de 125 I-pró-insulina (contendo aproximadamente 10.000 cpm) e 100 μ L de antissoro, perfazendo um volume total de 300 μ L. Para cada fração foi determinado também o valor do “branco” ou seja, o valor referente à ligação inespecífica (ligação na ausência de antissoro). Este valor foi subtraído da correspondente ligação específica de cada fração. Nestes tubos, o antissoro foi substituído por soro normal de cobaia. Este teste foi realizado em duplicata.

Após incubação de 24 h, os anticorpos ligados ao traçador foram precipitados pela adição de 100 μ L de gama globulina bovina a 1% e 1 mL de PEG a 10%. O precipitado foi coletado por centrifugação a 1500 G durante 30 min. a 4°C e o sobrenadante foi aspirado com a ajuda de bomba de vácuo. Em seguida, o precipitado foi dissolvido com 300 μ L de NaCl 0,3 M, e novamente precipitado com 1 mL de PEG a 10%.

As frações que apresentaram elevada ligação específica com o antissoro em excesso, baixa ligação inespecífica e maior percentagem de pureza quando analisadas pela precipitação com TCA, foram reunidas e diluídas com tampão de ensaio contendo 1% de albumina bovina, divididas em alíquotas de 0,5 ml e mantidas a -20°C, sendo utilizadas como traçadores nos radioimunoensaios.

3.3.6. ANÁLISE DA PUREZA DO TRAÇADOR

A qualidade da pró-insulina marcada bem como a eficiência da técnica de iodação e purificação foram analisadas pela precipitação com TCA e pela eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA). Analisou-se a pró-insulina imediatamente após a marcação e após a sua purificação.

3.3.6.1. Precipitação de proteínas pelo TCA

Alíquotas da pró-insulina obtida após radioiodação e das frações referentes aos principais picos radioativos do cromatograma, foram submetidas ao teste de precipitação de proteínas pelo TCA a 10% (90).

A radioatividade dessas amostras foi determinada antes de serem precipitadas, considerando-se este valor como sendo a radioatividade total das mesmas. A seguir, adicionou-se a cada amostra 1 mL gelado de TCA a 10%, resultando, portanto, uma solução final de TCA a 5%. As amostras foram então homogeneizadas e centrifugadas a 1.300 G durante 5 min. obtendo-se, assim, um precipitado com volume de, aproximadamente, 0,1 mL. O sobrenadante foi aspirado com a ajuda de bomba de vácuo, e logo depois foram adicionados 0,9 mL de solução de NaOH 2N que dissolveram o precipitado mediante agitação.

Finalmente, as amostras foram levadas novamente ao contador, estimando-se a radioatividade das proteínas precipitadas.

Calculou-se, então, a percentagem média de precipitação dessas proteínas, visto este teste ser realizado sempre em triplicata.

3.3.6.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA)

A EGPA foi desenvolvida de acordo com o método de Davis (92).

A solução de polimerização do gel de poliacrilamida a 7% foi preparada empregando-se as soluções A, C e E na proporção descrita no item 2.4.7.

Utilizou-se tubos cilíndricos de vidro de 5 mm de diâmetro interno por 110 mm de comprimento, vedando-se uma das extremidades com membrana adesiva do tipo "Parafilm". Os tubos foram dispostos em estante apropriada, de forma a serem mantidos na posição vertical.

A solução de polimerização (poliacrilamida a 7%) foi transferida com pipeta automática para os tubos, mantendo-se uma altura uniforme de aproximadamente 9 cm em todos eles. Para evitar a formação de menisco na extremidade superior dos géis, adicionou-se cerca de 100 μL de água destilada sobre a solução de forma a assegurar obtenção de bandas perfeitamente horizontais na separação eletroforética.

A seguir, para permitir a polimerização do gel, os tubos foram expostos cerca de 7 cm de uma lâmpada fluorescente de 15 W durante 45 min. a 4°C. Finda sua polimerização, a água destilada foi retirada com a ajuda de papel absorvente e as amostras foram aplicadas por meio de pipetas automáticas.

Adicionou-se cerca de 30 μL da solução F para aumentar a densidade das amostras e evitar sua mistura com o tampão de corrida antes do início da eletroforese. Acrescentou-se, também, 10 μL da solução de azul de bromofenol para indicar o final da corrida (corante traçador-CT). As amostras resultantes foram então homogeneizadas por meio de pipeta automática.

Após a retirada do "Parafilm" da extremidade, os tubos foram posicionados verticalmente na cuba eletroforética e, o espaço acima das amostras de cada tubo foi completado com tampão TRIS-glicina 0,04 M, pH 8,3. Esse mesmo tampão foi empregado para a corrida eletroforética.

A corrida foi efetuada com corrente anódica de 2 mA por gel a 4°C, sendo interrompida quando a banda do corante traçador chegou até cerca de 3 cm da extremidade inferior do gel.

Finda a eletroforese, os géis foram removidos dos tubos de vidro através de injeção de água contínua, empregando-se seringa plástica com agulha de aço inoxidável, de modo a desprender toda a superfície do gel do tubo.

Os géis não radioativos foram colocados em TCA a 12,5% por 30 min. para a precipitação das proteínas, corados com "coomassie blue" a 0,05% e descorados com ácido acético glacial a 7%. Logo após, foram lidos diretamente no densitômetro na região ultravioleta, com feixe de luz no intervalo de 220 a 310 nm. O perfil de absorbância por comprimento do gel foi obtido através de um registrador regulado com velocidade em 1 mm/s, acoplado ao densitômetro.

Os géis contendo amostras radioativas foram cortados em fragmentos de 3 mm com a ajuda do "gel-slicer". Cada segmento foi envolto em papel alumínio e colocado em tubo de contador para a determinação de sua radioatividade. Os perfis eletroforéticos foram traçados em escala linear sendo calculada a radioatividade de cada pico em relação à radioatividade total do gel.

O cálculo do valor da migração eletroforética relativa (R_m) dos componentes revelados em cada gel foi realizado em relação à migração do azul de bromofenol.

3.3.7. ANÁLISE DA ESTABILIDADE DO TRAÇADOR

Com o traçador obtido em uma das diferentes radioiodações, realizou-se estudos da sua estabilidade em função do tempo de estocagem a -20°C decorridos 1, 2 e 3 meses após a radioiodação. Avaliou-se sua pureza pela EGPA e sua adequação para ser empregado nos ensaios, através dos parâmetros relativos ao radioimunoensaio, ligação inespecífica e específica, dose média efetiva (ED_{50}) e a sensibilidade.

3.4. PREPARO DO PADRÃO E DA CURVA DOSE RESPOSTA DO RADIOIMUNOENSAIO

Os padrões disponíveis para o emprego na curva dose resposta do radioimunoensaio foram preparados em nossos laboratórios seguindo-se os procedimentos descritos abaixo:

- 1- solução estoque da pró-insulina biossintética produzida pela Eli Lilly and Company e estabelecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como o primeiro padrão primário de Referência Internacional (62), (código 84/611).

A ampola contendo 6 µg de pró-insulina liofilizada foi reconstituída com 1 mL de água destilada, separada em 10 alíquotas de 100 µL cada as quais foram armazenadas a -40°C. Obteve-se uma solução com concentração final de 639 pmol/mL.

- 2- solução estoque da pró-insulina biossintética fornecida pela Eli Lilly and Company como padrão secundário (código A18-TS9-17).

Esse padrão foi dissolvido no tampão de ensaio contendo 1% de albumina bovina, separado em alíquotas e armazenado a -40°C.

Obteve-se uma solução com concentração final de 1065 pmol/mL.

- 3- solução estoque da pró-insulina biossintética fornecida pela Eli Lilly and Company empregada na obtenção do traçador e dos antissoros anti-pró-insulina (código 509-EM4).

Esse padrão foi dissolvido no tampão de ensaio contendo 1% de albumina bovina, separado em alíquotas e armazenado a -40°C.

Obteve-se uma solução com concentração final de 1065 pmol/mL.

Para a obtenção do padrão na diluição requerida para os pontos da curva dose resposta, pipetou-se 30 µL da solução padrão (cód. A18-TS9-17;

cód. 509-EM4) em tubo contendo 2 mL de soro isento de pró-insulina ou 30 µL da solução padrão (cód. 84/611) em tubo contendo 1,2 mL do mesmo soro. Como resultado, obteve-se o primeiro ponto da curva (16 pmol/mL) que foi, a seguir, submetido a uma diluição seriada de 1/4. A curva dose resposta foi, então, desenhada com as seguintes concentrações do padrão: 0,004; 0,016; 0,063; 0,25; 1,0; 4,0; 16 pmol/mL.

B. DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS PARA O RADIOIMUNOENSAIO

A análise das curvas dose resposta obtidas neste estudo foram realizadas pelo emprego do programa computacional para radioimunoensaio, Riakalk versão 1.0 (93). Além disso, as curvas foram submetidas à análise de regressão linear empregando-se o programa computacional estatístico PRIMER (94). Os parâmetros estimados pelo programa, inclinação e intersecção da reta, foram comparados empregando-se o teste t de Student.

3.5. DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO DO ENSAIO

Visando a obter ensaios com sensibilidade elevada, realizou-se uma análise comparativa entre sistemas em equilíbrio e em não-equilíbrio, que, de per sí, são mais sensíveis.

O antissoro foi incubado com o traçador em sistema de ensaio em equilíbrio de 24 e de 126 h, e em não-equilíbrio por 24 h com o padrão e mais 3 h, ou mais 6 h com o traçador.

Nessas curvas, 100 µL do antissoro foi incubado a 4°C com 100 µL da pró-insulina padrão e com 100 µL da ¹²⁵I-hPI contendo, aproximadamente, 10.000 cpm.

O ensaio foi realizado em triplicata, e a ligação inespecífica dele foi determinada incubando-se tubos onde o antissoro estava ausente.

A separação do ensaio foi realizada segundo Deacon e Conlon (55), empregando-se 100 μ L de gama globulina bovina (10mg/mL) e 1 mL de PEG a 20%. O precipitado foi coletado por centrifugação a 1750 G durante 30 min. a 4°C.

3.6. DETERMINAÇÃO DA TÉCNICA DE SEPARAÇÃO IDEAL DO RADIOIMUNOENSAIO.

Relatos da literatura se referem à separação do radioimunoensaio de pró-insulina pelas técnicas de precipitação da fração ligada pelo PEG (55), pelo segundo antissoro (54,56,58) e pela combinação deste antissoro assistido pelo PEG (57 e 59).

Devido à necessidade de importação do segundo anticorpo e a disponibilidade do PEG 6000 em nossos laboratórios, realizou-se um estudo comparativo dessas três técnicas e da determinação das condições ideais de emprego de cada uma delas.

Esse estudo foi realizado com o antissoro e com o traçador incubados em equilíbrio por 96 h a 4°C. Nessas condições, foram estimados os valores das ligações específicas (Bo) e inespecíficas (NSB) ocorridas entre eles.

Inicialmente, foi determinada a concentração ideal do PEG 6000, seguindo-se o procedimento descrito por Deacon e Conlon (55) e acrescentando-se uma etapa adicional de lavagem da fração precipitada, conforme padronizado para o RIE de hTSH (95).

A seguir, foi determinado o tempo ideal de reação com o segundo anticorpo. As curvas de título foram obtidas incubando-se 100 μ L do antissoro anti-pró-insulina com 100 μ L do traçador e 100 μ L de tampão de ensaio contendo 0,1% de albumina bovina durante 24 h a 4°C. O segundo antissoro foi diluído nesse mesmo tampão, porém, contendo 1 % de soro normal de cobaia no lugar de albumina bovina e incubados por mais 24 h a 4°C.

Determinado o título, procedeu-se à investigação do tempo de incubação ideal do segundo anticorpo, após períodos de incubação variando de 1 a 24 h a 4°C.

Objetivando diminuir os valores de NSB e, conseqüentemente, obter ensaios mais sensíveis com aceleração do tempo de separação do ensaio, avaliou-se o emprego daquele segundo antissoro combinado com diferentes concentrações de PEG, incubados por períodos variando de 1 a 24 h.

Essa separação foi realizada segundo Bowsheer e cols. (59), empregando-se 1 mL de PEG 8000, 100 μ L do segundo antissoro (1:9) e 100 μ L do soro normal de cobaia (1:400).

Após terem sido determinadas as condições ideais para o emprego de cada uma dessas 3 técnicas de separação, realizou-se um estudo comparativo de seu emprego na separação das curvas dose resposta do radioimunoensaio incubadas no sistema de ensaio em não-equilíbrio.

O estabelecimento dos critérios para o emprego da técnica do segundo antissoro assistido pelo PEG na separação da curva dose resposta obtida empregando-se soro isento de pró-insulina, foi concluído pela avaliação do título do segundo antissoro, na presença de concentração do soro normal de cobaia variando de 1:100 a 1:500.

3.7. DETERMINAÇÃO DA DILUIÇÃO OTIMIZADA DO ANTISSORO E DO TRAÇADOR.

Depois de ter sido estabelecido o sistema de ensaio em não-equilíbrio, determinado o tempo de incubação com o traçador e estabelecida a melhor técnica de separação, realizou-se o estudo da concentração ideal de antissoro e de traçador a serem empregadas no radioimunoensaio.

Determinou-se, para cada traçador, a ótima diluição do antissoro incubando-se 100 μ L de 125 I-pró-insulina contendo aproximadamente 10.000 cpm, 100 μ L de tampão de ensaio e 100 μ L de antissoro nas diluições de 1:100 a 1:64.000, durante 3 h a 4°C. O ensaio foi realizado em triplicata e sua ligação inespecífica foi determinada incubando-se tubos onde o antissoro estava ausente.

Após o período de incubação, o hormônio livre foi separado do ligado ao anticorpo pelo método do segundo antissoro assistido pelo PEG, seguido de

incubação por mais 1 h a 23°C, centrifugação e contagem do precipitado.

A ótima diluição do antissoro foi aceita como aquela que forneceu uma ligação de aproximadamente 30% com o traçador.

A ótima diluição do traçador foi analisada incubando-se o antissoro a 4°C em sistema de ensaio em não-equilíbrio por 24 h com 100 µL da pró-insulina padrão e por mais 3 h com 100 µL da ¹²⁵I-pró-insulina contendo aproximadamente 5.000, 10.000 e 15.000 cpm. A separação do ensaio foi realizada pelo método do segundo antissoro assistido pelo PEG seguido de incubação por 1 h a 23°C, centrifugação e contagem do precipitado.

3.8. DETERMINAÇÃO DO MEIO DE INCUBAÇÃO DA CURVA DOSE RESPOSTA

A fim de se manter a uniformidade das condições de incubação entre as amostras desconhecidas e os padrões, foram comparadas curvas dose resposta do radioensaio preparadas em soro humano normal, tampão de ensaio contendo 0,1% de albumina bovina e em soro humano normal isento da pró-insulina (verificar item 3.9).

Nessas curvas, 100 µL do antissoro foi incubado a 4°C, em sistema de não-equilíbrio por 24 h com 100 µL da pró-insulina padrão, e por mais 3 h com 100 µL do traçador contendo aproximadamente 10.000 cpm. A separação do ensaio foi realizada pelo método do segundo antissoro assistido pelo PEG, seguido de centrifugação e contagem do precipitado.

3.9. OBTENÇÃO DE SORO ISENTO DE PRÓ-INSULINA

O soro humano obtido em banco de sangue, foi tratado com carvão ativado a 5%, permanecendo sob agitação durante 30 min. a 4°C (96). A seguir, o soro foi centrifugado a 2500 G durante 1 h a 4°C para a remoção do carvão. Essa precipitação foi repetida 3 vezes, após o quê, o soro foi filtrado através de membrana de Millipore

com diâmetro de 0,45 μ para remoção das partículas finas do carvão. O soro contendo 0,01% de tiomersal foi separado em alíquotas que foram armazenadas a -20°C até sua utilização nas curvas de dose resposta do radioimunoensaio.

3.10. ESTUDO COMPARATIVO DOS PADRÕES DE PRÓ-INSULINA

Realizou-se um estudo comparativo das curvas de dose resposta obtidas a partir do uso dos três padrões de pró-insulina preparados: código 84/611, A18-TS9-17 e 509-EM-4 (item 3.4)

Nessas curvas, 50 μ L do antissoro foi incubado a 4°C, em sistema de não-equilíbrio por 24 h com 200 μ L da pró-insulina padrão e por mais 3 h com 50 μ L do traçador contendo, aproximadamente, 10.000 cpm. A separação do ensaio foi realizada pelo método do segundo antissoro pelo PEG seguido de centrifugação e contagem do precipitado.

Estimou-se a potência radioimunológica dos padrões secundários 509-EM4 e A18-TS9-17, em relação ao padrão de referência 84/611, pela relação entre os valores de ED₅₀.

O padrão código 509-EM4 armazenado a -20°C foi analisado dois anos após seu preparo em comparação com o mesmo padrão recém-preparado.

3.11. RADIOIMUNOENSAIO DE PRÓ-INSULINA

3.11.1. SEQUÊNCIA OPERACIONAL

Os ensaios foram realizados pela incubação, durante 24 h a 4°C, de uma mistura de reação contendo pró-insulina padrão na concentração de 0,004 a 16 pmol/mL preparada em soro isento de pró-insulina, ou igual volume das amostras com teor desconhecido de pró-insulina, e antissoro na diluição apropriada. Em seguida, acrescentou-se a ¹²⁵I-pró-insulina contendo aproximadamente 10.000 cpm, seguido de incubação por mais 3 h a 4°C.

O antissoro e o traçador foram diluídos no tampão de ensaio contendo 0,1% de albumina bovina.

Após este período, procedeu-se à separação da pró-insulina livre daquela ligada ao anticorpo conforme descrito na Tabela 1. O segundo antissoro, soro de cobaia normal e o PEG foram diluídos no tampão de separação (fosfato de sódio 0,025 M contendo EDTA 0,02 M pH 7,5) contendo 0,1% de albumina bovina.

No ensaio foi determinado, também, o valor do “branco” ou seja, o valor referente à ligação inespecífica e o valor da dose zero.

O ensaio para definir a curva de dose resposta foi realizado em triplicata enquanto que as amostras sanguíneas foram ensaiadas em duplicata.

3.11.2. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PRÓ-INSULINA NAS AMOSTRAS DE SORO HUMANO

Após a separação do ensaio e determinação da radioatividade dos tubos, calculou-se a percentagem de ligação da ^{125}I -pró-insulina ao anticorpo específico em relação à radioatividade total. Estes valores de ligação foram corrigidos pela subtração da ligação inespecífica.

Empregou-se o programa computacional para radioimunoensaio, RIAKALK, para a análise dos parâmetros NSB e B_0 , dose efetiva para valor de 50% da resposta máxima (ED50) e dose mínima detectável (DMD) correspondente ao valor de B_0 subtraído de 2,5 desvios padrão.

A concentração das amostras desconhecidas foi determinada pelo programa tendo como base, a leitura nesta curva dose resposta.

Tabela 1- Protocolo do radioimunoensaio de proinsulina.

	NSB	Bo	Padrões	Desconhecidos
Soro isento de pró-insulina	200 µL	200 µL	—	—
Antissoro	—	50 µL	50 µL	50 µL
soro de cobaia normal	50 µL	—	—	—
Padrões	—	—	200 µL	—
Amostras	—	—	—	200 µL
Incubação de 24 h a 4°C				
125I-pró-insulina (10.000 cpm)	50 µL	50µL	50 µL	50µL
Incubação de 3 h a 4°C				
100 µL segundo antissoro				
100 µL soro de cobaia normal (1:100)				
1 mL PEG 10%				
Incubação de 1 h a 23°C				
Centrifugação a 3500 G por 30 min. a 4°C				
Inversão dos tubos e contagem dos precipitados				

3.12. CONTROLE DE QUALIDADE DO RIE

O radioimunoensaio desenvolvido foi avaliado através da análise dos seguintes parâmetros: especificidade, exatidão, precisão e sensibilidade (97-100).

3.12.1. ESPECIFICIDADE

Para verificar a identidade entre o hormônio presente nas amostras sanguíneas e o hormônio padrão, uma amostra com elevado teor endógeno de pró-insulina, procedente de um indivíduo portador de insulinoma, foi submetida ao radioimunoensaio nas seguintes diluições: 1:1,5; 1:2; 1:4; 1:8; 1:16.

As diluições foram realizadas em soro isento de pró-insulina de acordo com o descrito na Tabela 2, e para cada diluição foram ensaiadas dez replicatas. Foi calculada a média dos 10 resultados obtidos para cada diluição e seu desvio padrão, bem como as concentrações obtidas a partir do produto de cada média pelo fator de diluição respectivo.

Calculou-se, também, a correlação linear entre os volumes de amostra e as concentrações médias obtidas empregando-se o programa computacional estatístico PRIMER e examinou-se a significância do coeficiente de correlação obtido.

Tabela 2- Preparo das diluições referentes a avaliação da especificidade do método.

Diluição	Volume de amostra (mL)	Volume de soro isento de pró-insulina (mL)
1:1,5	1,5	0,7
1:2	1,2	1,2
1:4	0,6	1,8
1:8	0,3	2,1
1:16	0,15	2,25

3.12.2. EXATIDÃO

Realizou-se a avaliação da recuperação da pró-insulina adicionada em quantidades crescentes a uma mistura de soros de indivíduos normais com concentração de pró-insulina previamente determinada (0,026 pmol/mL), conforme indicado na Tabela 3. Essa análise foi realizada em decuplicata.

A recuperação das diferentes amostras foi estimada pela diferença entre o valor médio determinado a partir da curva dose resposta e o valor teórico (obtido pela soma da concentração de pró-insulina já presente no soro e da pró-insulina padrão adicionada). Calculou-se, também, a recuperação percentual média para cada amostra e seu desvio padrão.

Determinou-se o coeficiente de correlação entre os valores teóricos e os obtidos e examinou-se sua significância empregando-se o programa computacional estatístico PRIMER.

Tabela 3- Concentrações de pró-insulina adicionadas a uma amostra de pró-insulinemia conhecida (0,026 pmol/mL).

Pró-insulina adicionada	
μL	pmol/mL
1	0,016
4	0,063
16	0,250
63	1,000
250	4,000

3.12.3. PRECISÃO

A avaliação da reprodutibilidade intra-ensaio deste método foi analisada num mesmo ensaio através de um número elevado de replicatas (n=15) de amostras controle com diferentes teores de pró-insulina. Devido à impossibilidade de se obter

um volume suficiente de soros de pacientes, principalmente com valores elevados de pró-insulina para compor essas amostras, elas foram preparadas a partir da pró-insulina padrão biossintética, visto que, a avaliação da especificidade do método revelou identidade perfeita entre esta pró-insulina e aquela endógena.

As amostras controle foram preparadas em soro isento de pró-insulina contendo o padrão nas concentrações de 0,04; 0,1 e 0,3 pmol/mL, as quais foram aliqüotadas e armazenadas a -20°C. Calculou-se a concentração média e o desvio padrão para cada nível, bem como seu respectivo coeficiente de variação.

A reprodutibilidade inter-ensaio foi avaliada pela dosagem das mesmas amostras empregadas no estudo da reprodutibilidade intra-ensaio. Essas amostras foram dosadas em duplicata em quinze ensaios diferentes. O valor médio para cada nível foi calculado, bem como seu desvio padrão, permitindo a determinação do coeficiente de variação.

3.12.4. SENSIBILIDADE

Os parâmetros relacionados à sensibilidade dos ensaios foram estimados pelo emprego do programa computacional RIAKALK versão 1.0. Esses parâmetros se referem às ligações inespecíficas (NSB) e da dose zero (B_0), dose efetiva para valor de 50% da resposta máxima (ED_{50}) e dose mínima detectável (DMD), correspondente ao valor de B_0 subtraído de 2,5 desvios padrão. Esses dois últimos parâmetros (ED_{50} e DMD) refletem a sensibilidade dos ensaios.

3.13. ANÁLISE DA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO DA PRÓ-INSULINA DO SORO

Como a sensibilidade da curva dose resposta não permitiu a leitura direta de amostras séricas de indivíduos normais, extraiu-se a pró-insulina do soro antes de concentrá-la em sistema "Savant Speed-Vac SS4".

Empregou-se a metodologia adotada por Cohen e cols. (56) a qual utiliza cartuchos de octadecil-silica Sep-Pak C₁₈, após modificações e otimização (101).

Excluiu-se três etapas de lavagem com 20% ACN : 0,8% TFA : 79,2% H₂O; 20% diclorometano e 100% de ACN empregadas pelo autor para a remoção de substâncias que interferiam com o processo de liofilização da amostra extraída e posterior dissolução do resíduo.

Nesse método modificado, os cartuchos foram lavados com 5 mL de acetonitrila (ACN) e, a seguir, com 5 mL de água. As amostras séricas foram introduzidas nos cartuchos com auxílio de seringa sob fluxo gravitacional de 0,3 mL/min.

A seguir, os cartuchos foram submetidos a uma etapa de lavagem com 5 mL de uma solução contendo 99% H₂O: 15% ácido trifluoroacético (TFA). A pró-insulina foi então eluída do cartucho com 5 ml de uma solução contendo 40% ACN : 59,4% H₂O : 0,6% TFA.

A recuperação da extração da pró-insulina do soro humano foi avaliada em cinco replicatas empregando-se o traçador ¹²⁵I-hPI contendo aproximadamente 200.000 cpm em 1 mL de soro. Estimou-se a atividade do traçador presente na mistura de soro aplicada e imediatamente recolhida do cartucho.

Este estudo foi repetido empregando-se a pró-insulina não marcada, adicionada a 1 mL de soro isento de pró-insulina nas concentrações de 0,016; 0,031; 0,062 e 0,125 pmol/mL. Cada amostra foi extraída em duplicata e o eluato, contendo a pró-insulina, foi recolhido em tubos de polipropileno (13 x 100 mm) siliconizados. A solução eluente foi evaporada no sistema "Savant Speed-Vac SS4" e o precipitado obtido foi ressuspenso para metade do volume original (0,5mL) com tampão de ensaio contendo 0,1% de albumina bovina. A concentração da pró-insulina foi estimada pelo radioimunoensaio, empregando-se a curva dose resposta preparada no mesmo tampão de ensaio.

O coeficiente de correlação, entre as concentrações de pró-insulina adicionadas e as concentrações obtidas após a extração, foi determinado e examinada sua significância, empregando-se o programa computacional estatístico Primer.

3.14. ANÁLISE DA TÉCNICA DE CONCENTRAÇÃO DO SORO

Foram empregadas amostras séricas de 16 voluntários normais, extraídas em cartuchos de Sep-Pak C₁₈, concentradas 2 vezes no sistema "Savant Speed-Vac SS4" e submetidas à dosagem no radioimunoensaio de pró-insulina.

A reprodutibilidade do método de extração e concentração foi avaliada empregando-se amostras controle de soro isento de pró-insulina contendo 0,05 pmol/mL de pró-insulina padrão.

3.15. APLICAÇÃO CLÍNICA DO RIE

3.15.1. COLETA DAS AMOSTRAS DE SOROS NORMAIS E COM SECREÇÃO INSULÍNICA ALTERADA.

Amostras séricas de voluntários de ambos os sexos, de idade variável e que não estavam recebendo qualquer tipo de medicação, foram colhidas após jejum de 12 h. As amostras foram empregadas na validação do radioimunoensaio e no estudo da pró-insulina circulante.

Para a dosagem da glicemia e da hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}), colheu-se amostras de sangue em tubo contendo citrato e EDTA, respectivamente.

Para as demais análises (uréia, creatinina, colesterol, triglicérides, insulina, peptídeo-C e pró-insulina), coletou-se amostras de sangue sem anticoagulante em tubo seco. Após a retração do coágulo, essas foram centrifugadas a 1300 G durante 10 min. à temperatura ambiente. O soro foi separado e armazenado a -20°C.

3.15.2. VALIDAÇÃO DO RADIOIMUNOENSAIO

Empregou-se, na validação do radioimunoensaio, três grupos de indivíduos compreendendo indivíduos normais, insuficientes renais crônicos e insulinomas, cujas características clínicas são apresentadas na Tabela 4.

Os indivíduos foram considerados como normais quando a análise bioquímica do soro indicou que todos os valores encontravam-se dentro do limite de normalidade estabelecido para cada conjunto diagnóstico utilizado.

Os pacientes com insuficiência renal crônica foram analisados antes da realização da hemodiálise e a doença foi confirmada pelas concentrações elevadas de uréia e creatinina.

Os pacientes com insulínoma tiveram o tumor confirmado cirurgicamente com exceção de um paciente onde aquele não estava evidenciado.

Tabela 4- Características clínicas dos pacientes.

	Normais	Insuficientes renais	Insulinomas
n	16	20	6
Sexo (M/F)	8/8	11/9	3/3
Idade (anos)	27 ± 5	35 ± 12	38 ± 11
*IMC (Kg/m ²)	22 ± 2	22 ± 3	—

*IMC- Índice de massa corpórea

3.15.3. APLICAÇÃO DO RADIOIMUNOENSAIO NO ESTUDO DO DIABETES MELLITUS TIPO II ASSOCIADO À OBESIDADE.

Empregou-se, neste estudo, três grupos de pacientes compreendendo mulheres obesas, pacientes diabéticos Tipo II obesos e não obesos cujas características clínicas são apresentadas na Tabela 5.

A classificação dos indivíduos em obesos e diabéticos Tipo II foi realizada segundo os critérios estabelecidos pelo National Institute of Health, E.U.A. (102).

O índice de massa corpórea (IMC) foi calculado como o peso (Kg) dividido pela altura (m) ao quadrado. Foram considerados obesos, os homens cujo IMC foi superior a 27 e as mulheres cujo IMC foi superior a 25.

Os indivíduos diabéticos Tipo II (não-insulino-dependentes) foram selecionados por apresentarem glicemia igual ou superior a 140 mg/mL e HbA1c > 8,0%.

Considerou-se, ainda, que todos os pacientes apresentavam função renal normal, através da dosagem dos níveis séricos de uréia e creatinina.

As características clínicas individuais dos grupos estudados encontram-se na Tabela 4 - Anexo a Tabela 6 - Anexo.

Tabela 5- Características clínicas dos pacientes.

	Obesos	Diabéticos não obesos	Diabéticos obesos
n	22	5	7
Sexo (M/F)	0/22	3/2	2/5
Idade (anos)	36 ± 11	49 ± 4	41 ± 12
*IMC (Kg/m ²)	35 ± 6	21 ± 4	31 ± 2

*IMC- índice de massa corpórea

3.15.4. ANÁLISE BIOQUÍMICA DAS AMOSTRAS

As análises bioquímicas foram realizadas utilizando-se métodos enzimáticos para a determinação da glicose, uréia, creatinina, colesterol e triglicérides, com a ajuda do autoanalisador Technicon RA-1000-Bayer (EUA). A determinação da hemoglobina glicosilada (HbA1c) foi realizada pela técnica de cromatografia em coluna utilizando-se o conjunto diagnóstico Sigma (EUA).

As dosagens de insulina e de peptídeo-C foram realizadas em nossos

laboratórios de acordo com as técnicas descritas abaixo.

3.15.4.1. Dosagem da insulina

Empregou-se o método de radioimunoensaio (103) utilizando-se um primeiro antissoro monoclonal adquirido do laboratório Linco Research Inc. (EUA), que apresentou somente 0,2% de reação cruzada com a pró-insulina.

O traçador do ensaio, ^{125}I -insulina, foi preparado marcando-se cinco microgramas de insulina porcina (NOVO Laboratories) pelo método da cloramina T com 37 MBq (1 mCi) de ^{125}I e purificado em coluna de Sephadex G50 médio (104), apresentando atividade específica de 5,5 MBq/ μg .

Utilizou-se, como padrão do radioimunoensaio, a insulina porcina do conjunto diagnóstico fornecido pela CIS Bio International (France), sendo que a curva foi construída no intervalo de 5 a 400 $\mu\text{UI/mL}$. A separação do ensaio foi realizada pela técnica do segundo antissoro assistido pelo PEG a 6,4%.

Os resultados das dosagens fornecidos em $\mu\text{UI/mL}$ foram convertidos para pmol/mL multiplicando-se os valores pelo fator 0,00718. Estimou-se, a partir desses resultados, a relação molar pró-insulina/insulina (PI/I), parâmetro este, empregado no estudo comparativo da secreção insulínica dos pacientes analisados em relação aos indivíduos normais.

A relação molar PI/I é um índice do estado funcional das células β pancreáticas e foi calculada como a razão entre a concentração de pró-insulina e insulina.

No estudo dos insulinomas, as insulinemias foram determinadas em radioimunoensaio no qual o primeiro anticorpo policlonal apresentou reação cruzada com a pró-insulina.

3.15.4.2. Dosagem do Peptídeo-C

Empregou-se o conjunto diagnóstico comercial de radioimunoensaio fornecido pelo laboratório DPC (Diagnostics Products Corporation, EUA) cujo anticorpo apresentou reação cruzada com a pró-insulina humana variando de 18,4 a 20,0% nas concentrações de 2,5 a 10 ng/mL. A curva padrão foi construída no intervalo de 0,2 a 52 ng/mL, e a separação do ensaio foi realizada pela técnica do segundo antissoro assistido pelo PEG.

Antes de serem utilizados no radioimunoensaio, os padrões, os controles e os soros desconhecidos foram submetidos a uma precipitação com polietilenoglicol a 25% (v/v). Após centrifugação a 1700 G por 30 min., o sobrenadante foi separado e utilizado no radioimunoensaio.

Os resultados das dosagens fornecidos em ng/mL foram convertidos para pmol/mL multiplicando-se os valores pelo fator 0,331. Calculou-se, então, a relação molar insulina/peptídeo-C para completar o estudo da secreção insulínica nas situações em estudo em comparação com os indivíduos normais.

3.15.5. DOSAGEM DA PRÓ-INSULINA

A determinação da pró-insulinemia foi realizada nos pacientes com secreção insulínica alterada empregando-se o radioimunoensaio desenvolvido; porém, nos indivíduos com níveis de pró-insulina abaixo da região de confiança do ensaio aplicou-se a técnica de extração da pró-insulina pelos cartuchos de Sep-Pak C₁₈ que, após concentração, foi quantificada no radioimunoensaio.

3.15.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os diversos grupos estudados foram analisados calculando-se os valores da média \pm desvio padrão da média (DP) com a ajuda do programa computacional estatístico Instat (105). Para a comparação dos níveis médios de glicose,

insulina, peptídeo-C e pró-insulina empregou-se o test t pareado quando a distribuição entre os grupos foi paramétrica.

Quando a distribuição não foi paramétrica, ou para a análise dos valores percentuais, como é o caso da HbA1c, relação molar P/I e relação molar I/peptídeo-C, calculou-se o valor da mediana, mínimo e máximo que foram comparadas empregando-se o teste de Mann-Whitney (não paramétrico).

Em todos os testes foram considerados significantes, os valores de $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

A. PREPARO E CONTROLE DE QUALIDADE DOS REAGENTES BIOLÓGICOS ESPECÍFICOS DO RADIOIMUNOENSAIO.

4.1. AVALIAÇÃO DOS ANTISSOROS ANTI-PRÓ-INSULINA HUMANA

4.1.1. EVOLUÇÃO DA RESPOSTA E DETERMINAÇÃO DO TÍTULO DOS ANTISSOROS

Os dois esquemas de imunização nos quais empregaram-se 50 µg e 250 µg do imunógeno forneceram resultados semelhantes com relação à evolução do título dos antissoros. Os títulos máximos foram obtidos em torno de oito a nove semanas, após o quê, permaneceram praticamente constantes. Após 12 semanas, uma das cobaias imunizadas com 50 µg do imunógeno produziu antissoro anti-pró-insulina com título suficientemente alto (1:24.000) para o radioimunoensaio (106).

A análise das curvas de título dos antissoros na presença de insulina e de peptídeo-C mostraram que houve um deslocamento destas curvas para a esquerda, indicando que os antissoros não foram suficientemente específicos, necessitando portanto, serem purificados por cromatografia de afinidade (106).

4.1.2. PURIFICAÇÃO DOS ANTISSOROS

A concentração de insulina acoplada a Sepharose-4B CnBr ativada, determinada pelo método de Lowry, revelou que houve um acoplamento de $13 \pm 2\%$ (n=2) da insulina a resina.

A cromatografia de afinidade empregando essas resinas mostrou-se eficiente na purificação do antissoro adsorvido contra insulina-Sepharose e peptídeo-C-Sepharose, embora o título do antissoro tenha sofrido uma redução passando de

1:24.000 para 1:15.000.

4.1.3. CARACTERIZAÇÃO DOS ANTISSOROS

O antissoro que apresentou o melhor título (1:24.000, antes de ser purificado) foi o que também apresentou melhor avidéz pela análise de Scatchard com constante de afinidade (K_a) de $1,00 \times 10^{10}$ L/mol.

Esse antissoro, quando submetido ao estudo da cinética de precipitação, necessitou de apenas 24 h para atingir a ligação máxima com o traçador (Figura 3).

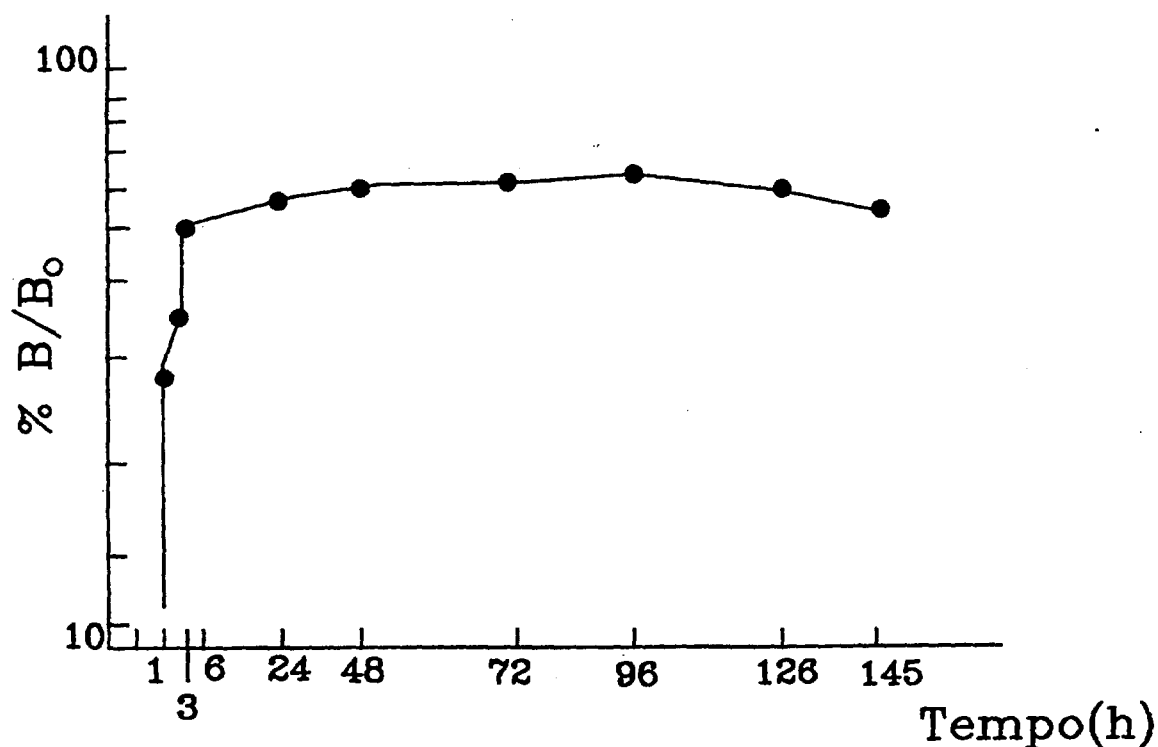


Figura 3- Efeito do tempo de incubação sobre a ligação do antissoro com o traçador a 4°C.

Os valores de reação cruzada deste antissoro com a insulina, peptídeo-C e os intermediários de conversão da pró-insulina foram obtidos pela análise da curva

de dose resposta do radioimunoensaio (Figura 4). Os valores percentuais apresentados na Tabela 6 correspondem aos percentuais de reação cruzada, calculados, relacionando-se os valores de ED₅₀ das curvas dose resposta construídas com a insulina, peptídeo-C e os 4 derivados de conversão da pró-insulina, com o valor de ED₅₀ da curva dose resposta construída com a pró-insulina padrão. Podemos observar que o antissoro reconheceu muito pouco as formas 32,33-split e 31,32-des-pró-insulina, mas apresentou 52% de reação cruzada com a forma 65,66-split-pró-insulina.

Tabela 6- Valores percentuais da reação cruzada dos peptídeos com o antissoro anti pró-insulina purificado.

Peptídeo	Reação cruzada (%)
pró-insulina	100
insulina	0,0001
peptídeo-C	0,005
65,66-split	52,0
32,33-split	6,5
31,32-des	7,1
64,65-des	N.D.*

*O peptídeo não deslocou a ¹²⁵I-pró-insulina, mesmo quando empregado em concentrações muito elevadas.

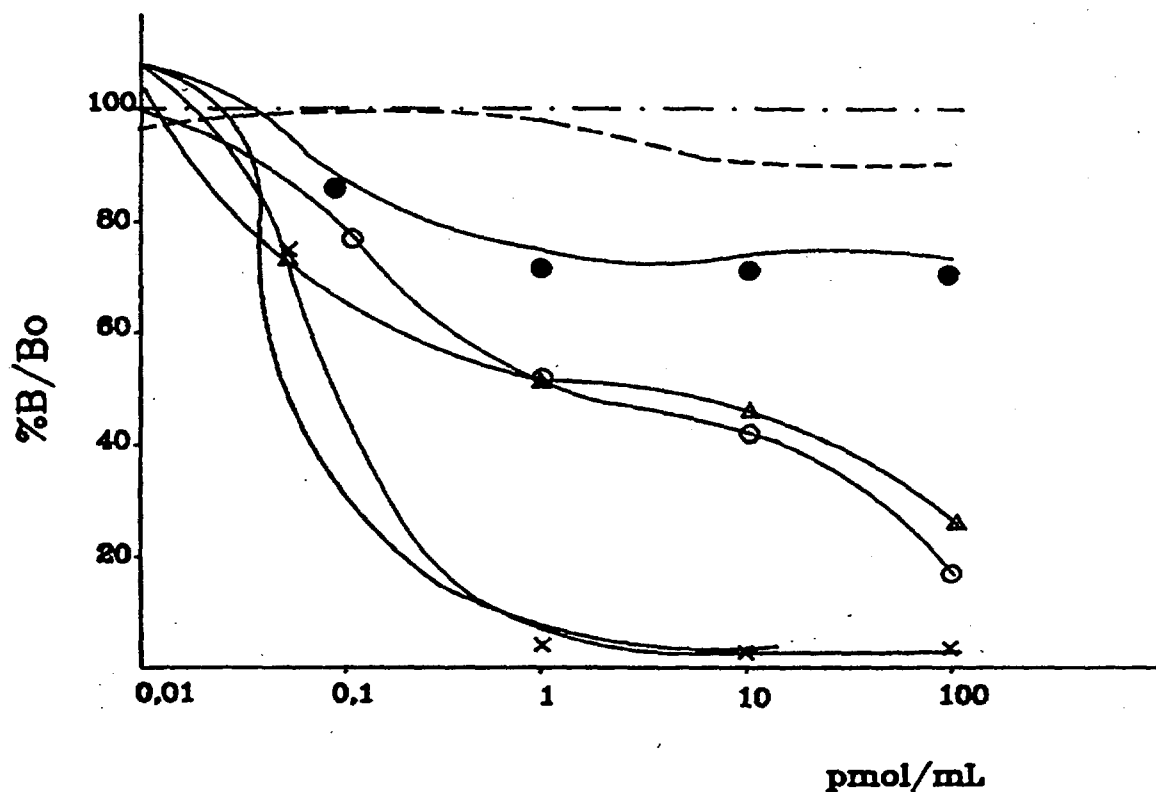


Figura 4- Deslocamento da ^{125}I -pró-insulina ao antissoro específico pela pró-insulina (—), insulina (-.-.-), peptídeo-C (-.-.-), 32,33-split (▲ — ▲), 65,66-split (X — X), 31,32-des (O — O) e 64,65-des pró-insulina (● — ●).

4.2. PREPARO E CONTROLE DE QUALIDADE DO TRAÇADOR

4.2.1. ANÁLISE QUALITATIVA DA PRÓ-INSULINA NÃO RADIOIODADA

A Figura 5 apresenta o eletroforetograma proveniente da pró-insulina não radioiodada, submetida a EGPA logo após sua aquisição, onde se observa a presença de um único componente, com valor de R_m de 0,63.

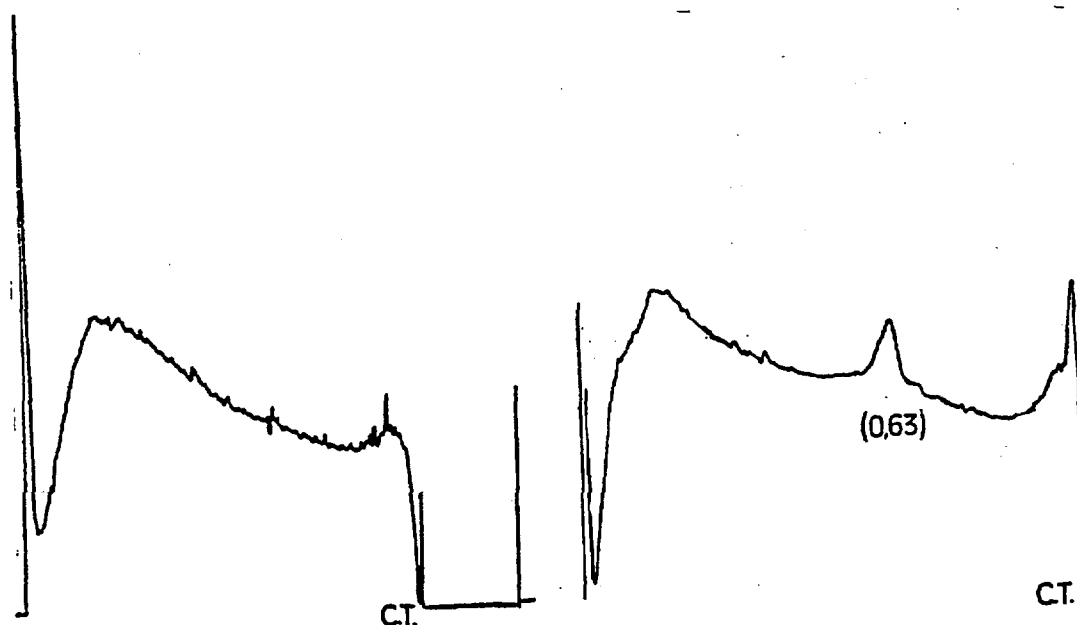


Figura 5- Eletroforese em gel de poliacrilamida da pró-insulina não radioiodada à direita, e o respectivo branco da corrida eletroforética à esquerda. O valor do R_m do seu único componente é indicado entre parênteses. CT indica a posição do corante traçador, azul de bromofenol.

4.2.2. TÉCNICA DE RADIOIODAÇÃO E CÁLCULO DA ATIVIDADE ESPECÍFICA DO TRAÇADOR

As marcações apresentaram rendimento que variou de 77,8 a 90,0% para 18 preparações com atividade específica média do traçador de $6,0 \pm 0,3$ MBq/ μ g (\pm DP), correspondendo a um grau de iodação menor do que um átomo de ^{125}I por molécula de pró-insulina.

A Tabela 7 apresenta os resultados obtidos nas radioiodações da pró-insulina.

Tabela 7- Resultados do preparo do traçador do radioimunoensaio: ^{125}I -hPI.

Marcação nº	Rendimento (%)	Atividade específica (MBq/ μg)
1	87,97	6,51
2	86,06	6,36
3	86,88	6,43
4	88,63	6,56
5	90,01	6,66
6	87,58	6,48
7	81,59	6,04
8	82,63	6,11
9	82,75	6,12
10	88,66	6,56
11	77,92	5,77
12	80,99	5,99
13	82,96	6,14
14	83,26	6,16
15	83,61	6,19
16	80,05	5,92
17	77,80	5,76
18	80,85	5,98

4.2.3. PURIFICAÇÃO DA PRÓ-INSULINA RADIOIODADA (^{125}I -hPI) E ANÁLISE DA IMUNORREATIVIDADE.

A Figura 6 exibe perfil cromatográfico típico da purificação da ^{125}I -hPI em QAE-Sephadex A-25. Nesse cromatograma são indicadas, as ligações das frações correspondentes aos picos principais com o antissoro em excesso.

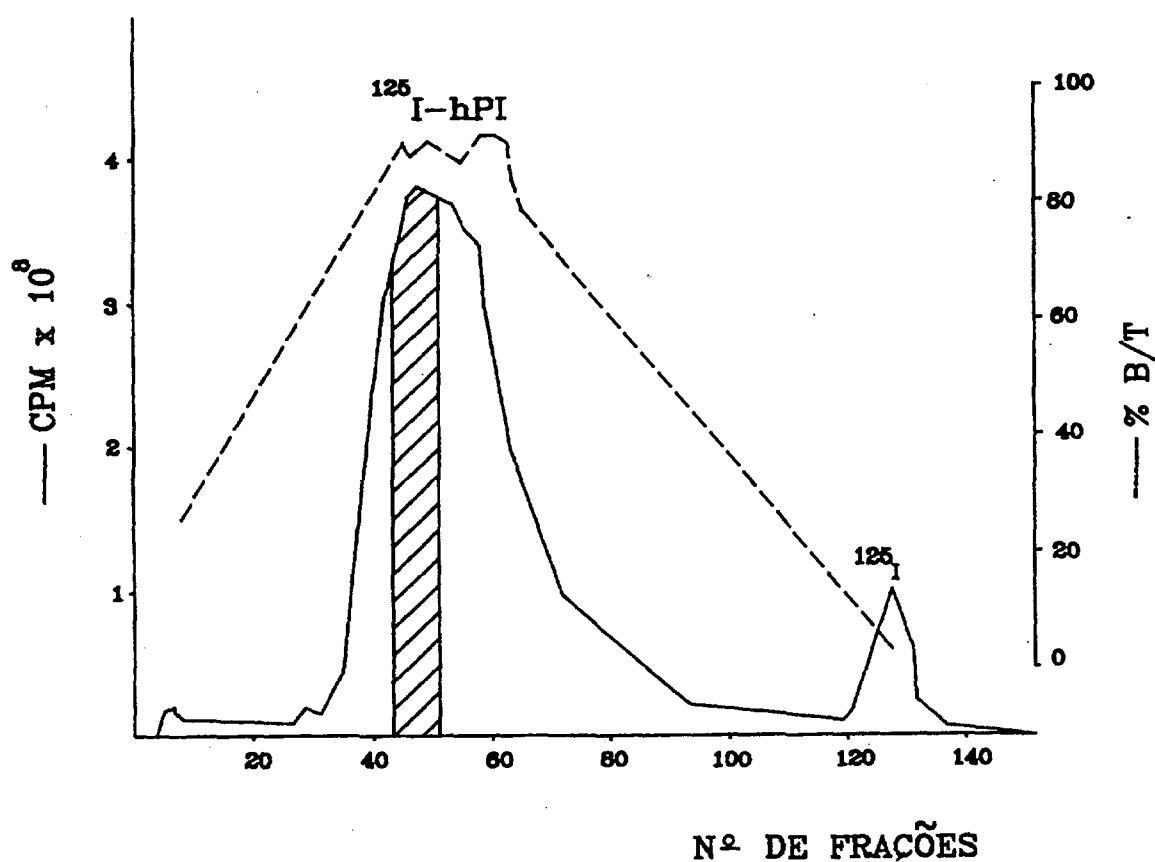


Figura 6- Cromatograma da purificação da ^{125}I -hPI em QAE-Sephadex A-25, mostrando a radioatividade (—) e a imunorreatividade (- -) das frações. A área hachurada corresponde às frações reunidas para serem empregadas como traçador do radioimunoensaio.

4.2.4. ANÁLISE DA PUREZA DO TRAÇADOR

A Figura 7 mostra o eletroforetograma proveniente de uma preparação da pró-insulina recém radioiodada e ainda não purificada. Nesse perfil eletroforético, 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.

Após a marcação, a radioatividade no pico da ^{125}I -pró-insulina representava 73% da atividade total no gel (Fig.7 (a)), aumentando para 98% após a purificação quando o iodo livre estava totalmente ausente (Fig.7 (b)).

A Tabela 8 exhibe os resultados da análise eletroforética pela EGPA dos traçadores purificados. Os demais traçadores não puderam ser analisados devido à indisponibilidade de equipamentos. Como pôde ser observada nesta tabela, a pureza determinada por esta análise apresentou um valor médio \pm DP de $85,39 \pm 4,66\%$.

A pureza estimada pela precipitação com TCA desses marcados revelou um valor médio \pm DP de $91,79 \pm 4,18\%$.

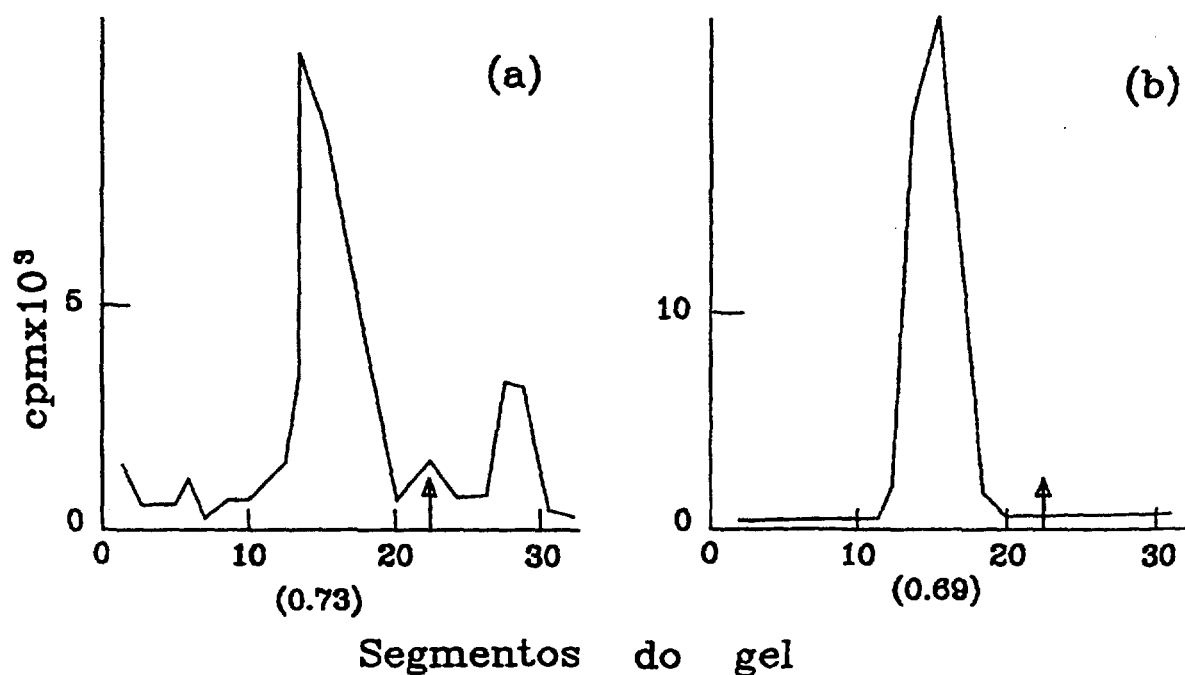


Figura 7- Eletroforetograma da ^{125}I -hPI radioiodada não purificada (a), e após a purificação (b). Os valores de Rm do componente principal (^{125}I -hPI) de cada gel são indicados entre parênteses e as setas indicam a posição do corante traçador.

4.2.5. ANÁLISE DA ESTABILIDADE DO TRAÇADOR

A Figura 8 revela o estudo comparativo da análise da estabilidade dos traçadores pela EGPA durante seu armazenamento a -20°C por, pelo menos, o período correspondente a uma meia vida física do ^{125}I .

O traçador manteve-se praticamente inalterado ao longo de, aproximadamente, 90 dias de armazenamento quando apresentou um pequeno pico de ^{125}I livre que migra à frente do corante traçador e um outro pico referente a um componente não-ímmunorreativo, que migra junto com este corante (Tabela 9).

A Figura 9 exibe as curvas dose resposta do radioimunoensaio obtidas com o mesmo traçador decorridos vários dias após seu preparo, indicando a estabilidade elevada deste traçador e sua adequação para o emprego no radioimunoensaio.

Tabela 8- Valores da percentagem de pureza dos traçadores analisados pela precipitação com TCA e pela EGPA, com seus valores de Rm respectivos.

Traçador (nº)	%Pureza		
	TCA	EGPA	Rm
1	90,70	97,84	0,69
2	95,70	86,40	0,63
3	86,41	86,40	0,63
4	96,69	81,99	0,74
7	92,02	85,31	0,76
8	91,73	80,54	0,73
9	82,38	82,27	0,75
11	93,96	82,56	0,72
13	93,86	83,42	0,77
16	94,53	87,18	0,71

Tabela 9- Resultados da análise eletroforética obtidos com o traçador ao longo de sua estocagem a -20°C .

Tempo de armazenamento (meses)	^{125}I -hPI (%)	Corante traçador (%)	^{125}I (%)
1	86,84	1,99	5,76
2	80,35	2,76	7,79
3	75,69	2,92	19,45

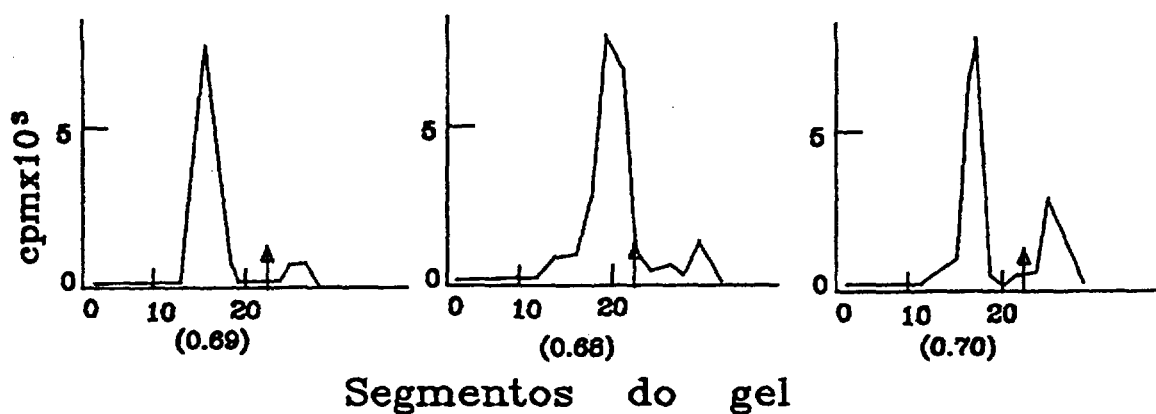
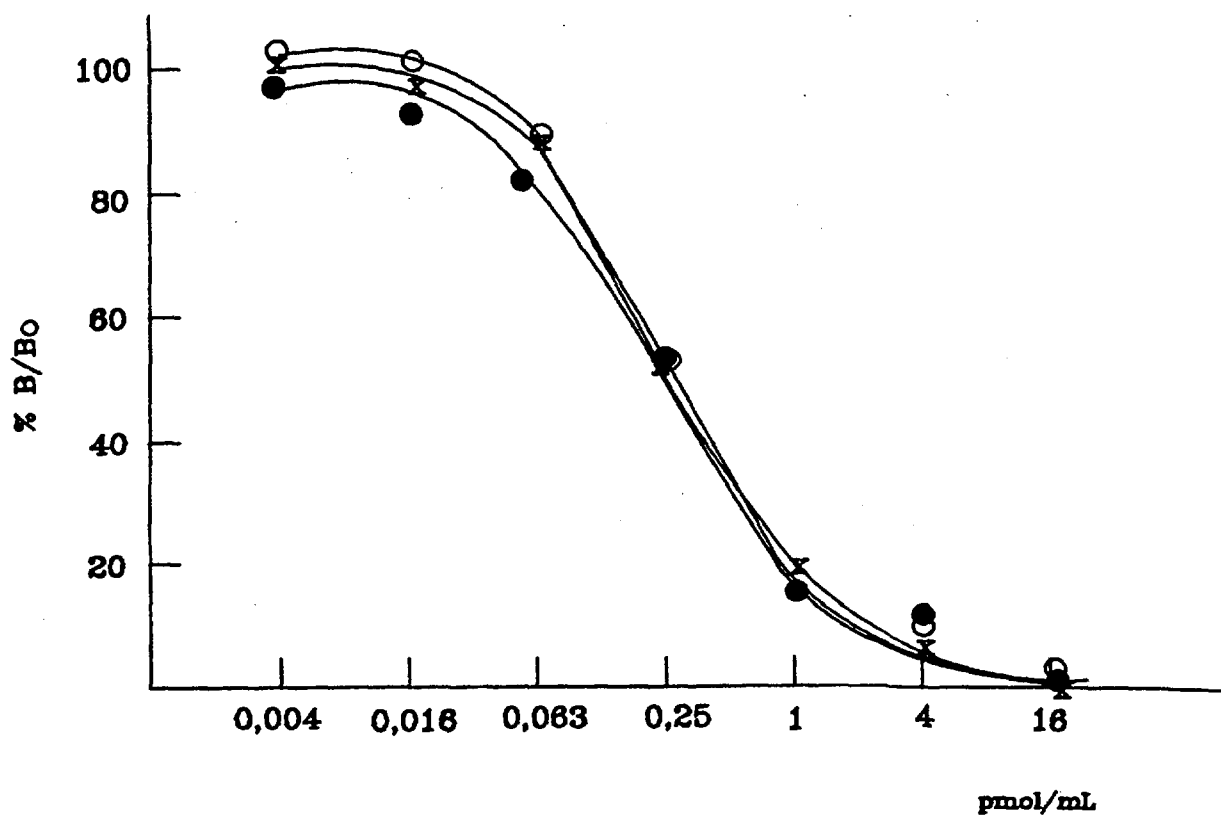


Figura 8- Eletroforetogramas do traçador ao longo de sua estocagem após um, dois e três meses da purificação (da esquerda para a direita). Os valores de R_m dos componentes referentes a ^{125}I -hPI e ao ^{125}I de cada gel são indicados entre parênteses e as setas indicam a posição do corante traçador. Os valores percentuais de cada componente são apresentados na Tabela 9.



Tempo de armazenamento (dias)	NSB (%)	Bo (%)	ED ₅₀ (pmol/mL)	DMD (pmol/mL)
72	3,12	23,91	0,26	0,04
126	4,82	18,93	0,30	0,05
134	3,60	25,81	0,28	0,06

Figura 9- Curvas dose resposta obtidas com o mesmo traçador após 72 (X — X), 126 (● — ●) e 134 (O — O) dias de armazenamento a -20°C. Os valores dos parâmetros relativos a essas curvas estão apresentados na tabela abaixo da figura.

B. DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS PARA O RADIOIMUNOENSAIO

4.3. DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO DO ENSAIO

O resultado da análise realizada com o antissoro nos sistemas de ensaios em equilíbrio e em não-equilíbrio determinou que o tempo de incubação ideal com o traçador foi de 3 h.

Além disso, pôde-se confirmar a rápida cinética desse antissoro que não apresentou mudanças significantes a nível de $p < 0,05$ para a inclinação, intersecção das retas e ED_{50} em suas curvas dose resposta, quando incubados em equilíbrio por 24 h ou 126 h.

Verificou-se ainda que, a despeito dos valores de B_0 diminuídos, o sistema de ensaio em não-equilíbrio apresentou um aumento significativo na sensibilidade das curvas dose resposta. Conforme verificado pelos valores de ED_{50} diminuídos, o tempo de incubação menor com o traçador resultou numa sensibilidade ainda maior.

Nessas condições de incubação, o antissoro apresentou valores de ED_{50} e DMD de 0,22 e 0,01 pmol/mL, respectivamente, para o ensaio em não-equilíbrio de 3 h, contra 0,78 e 0,07 pmol/mL para o ensaio em equilíbrio de 24 h. Podemos observar que as curvas submetidas à regressão linear não apresentaram diferença significativa a nível de $p < 0,05$ tanto para a inclinação quanto para a intersecção das retas, indicando que as retas eram paralelas.

4.4. DETERMINAÇÃO DA TÉCNICA DE SEPARAÇÃO IDEAL DO RADIOIMUNOENSAIO.

Os resultados exibidos na Figura 10 confirmaram ser a concentração do PEG, aquela indicada pela literatura (20%) (55), concentração esta que proporcionou a precipitação máxima da pró-insulina complexada ao anticorpo com valor de NSB

dentro de limites aceitáveis (5,7%).

A investigação do tempo de incubação ideal do segundo antissoro revelou a precipitação máxima da fração ligada após 24 h de reação a 4°C (NSB de 6,7%).

Pôde-se observar, ainda nesta figura, os resultados do emprego desse segundo antissoro combinado com diferentes concentrações de PEG e com períodos de incubação variável. Observou-se uma completa precipitação da fração ligada após 1 h de incubação do segundo antissoro assistido pelo PEG a 10% com valor adequado de NSB (4,4%).

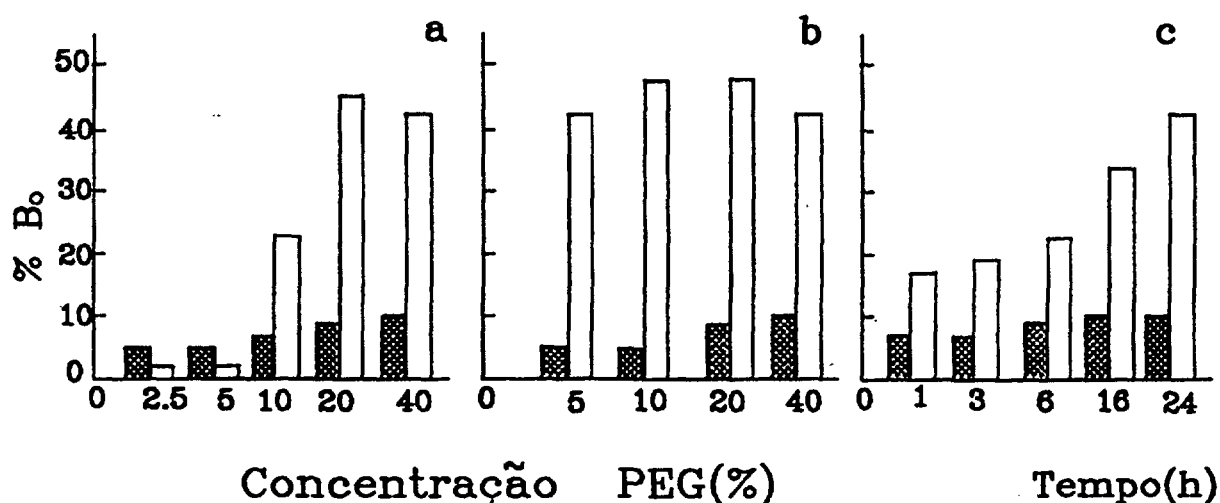


Figura 10- Valores das ligações específicas (B_0) e inespecíficas (área em negro) obtidas pelo emprego de várias técnicas de separação: (a) PEG 6000 (b) PEG assistido pelo segundo antissoro e (c) segundo antissoro.

O estudo comparativo do emprego dessas três técnicas de separação na curva dose resposta do radioimunoensaio revelou uma sensibilidade maior quando as separações foram realizadas pelo PEG a 20% ou pelo segundo antissoro assistido pelo PEG a 10%, do que com o segundo antissoro sozinho (Tabela 10). A curva separada pelo PEG assistido pelo segundo anticorpo foi superponível àquela separada pelo PEG a 20%, apresentando valores de ED_{50} de 0,19 e 0,21 pmol/mL, respectivamente,

contra 0,33 pmol/mL apresentado pela curva separada pelo segundo antissoro que foi significativamente diferente a nível de $p < 0,05$.

As curvas dose resposta submetidas à regressão linear revelaram que não houve diferenças significantes a nível de $p < 0,05$ tanto para a inclinação, quanto para a intersecção das retas obtidas, utilizando-se a técnica de separação pelo PEG ou pelo segundo antissoro assistido pelo PEG.

Entretanto, devido à necessidade de uma etapa adicional de lavagem e precipitação, requerida na separação com PEG, diminuir a praticabilidade do ensaio e poder afetar sua precisão, selecionou-se a técnica de separação pelo segundo antissoro assistido pelo PEG.

Os resultados das curvas de título obtidas empregando-se soro isento de pró-insulina, e separadas pelo segundo antissoro assistido pelo PEG na presença de concentração de soro normal de cobaia variando de 1:100 a 1:500 revelaram uma precipitação máxima da fração ligada com o segundo antissoro diluído a 1:9 e com o soro normal de cobaia diluído a 1:200.

Essas diluições foram estabelecidas para a separação dos ensaios pelo emprego desse lote particular do segundo antissoro Pel-Freez.

Tabela 10- Parâmetros estimados pelo Rikalk das curvas de dose resposta do radioimunoensaio separadas pelo emprego de PEG a 20%, segundo antissoro (2º Ac) após 24 h de incubação a 4°C e segundo antissoro assistido pelo PEG (2º Ac-PEG), após 1 h de incubação a 23°C.

Técnica de separação	NSB (%)	Bo (%)	ED ₅₀ (pmol/mL)	DMD (pmol/mL)
PEG	4,14	29,26	0,21	0,01
2º Ac	3,30	27,42	0,33	0,01
2º Ac - PEG	3,24	23,18	0,19	0,01

4.5. DETERMINAÇÃO DA DILUIÇÃO OTIMIZADA DO TRAÇADOR

Os resultados da análise da concentração ideal do traçador, pelo exame comparativo das curvas de dose resposta indicou que as variações na atividade do traçador não influenciaram os resultados das curvas dose resposta.

Visto não ter sido observada diferença significativa a nível de $p < 0,05$, tanto na inclinação, quanto na intersecção das retas nos ensaios realizados com atividades diferentes do traçador, estes foram efetuados com atividade elevada (aproximadamente 10.000 cpm por tubo), de forma a se reduzir o tempo de contagem do radioimunoensaio.

4.6. DETERMINAÇÃO DO MEIO DE INCUBAÇÃO DA CURVA DOSE RESPOSTA

A comparação do deslocamento da ^{125}I -hPI pela pró-insulina padrão na presença dos três meios analisados, soro humano normal, tampão do RIE e soro humano normal isento de pró-insulina, resultou em curvas praticamente superponíveis (Tabela 11).

As curvas dose resposta, quando submetidas à regressão linear, revelaram que as retas não apresentaram diferenças significantes a nível de $p < 0,05$ para a inclinação, intersecção, ou mesmo, para o ED₅₀.

Entretanto, selecionou-se o meio em soro humano normal isento de pró-insulina por ser o meio que mais se assemelha àquele das amostras desconhecidas.

Tabela 11- Parâmetros estimados pelo RIAKALK das curvas de dose resposta do radioimunoensaio realizadas em: A- soro humano normal B- soro humano normal isento de pró-insulina e C- Tampão do radioimunoensaio.

Curva padrão	NSB (%)	Bo (%)	ED ₅₀ (pmol/mL)	DMD (pmol/mL)
A	3,51	10,60	0,23	0,05
B	3,12	9,75	0,24	0,02
C	3,52	12,16	0,23	0,01

4.7. ESTUDO COMPARATIVO DOS PADRÕES DE PRÓ-INSULINA

A Figura 11 exibe as curvas dose resposta do radioimunoensaio obtidas empregando-se os três padrões de pró-insulina preparados.

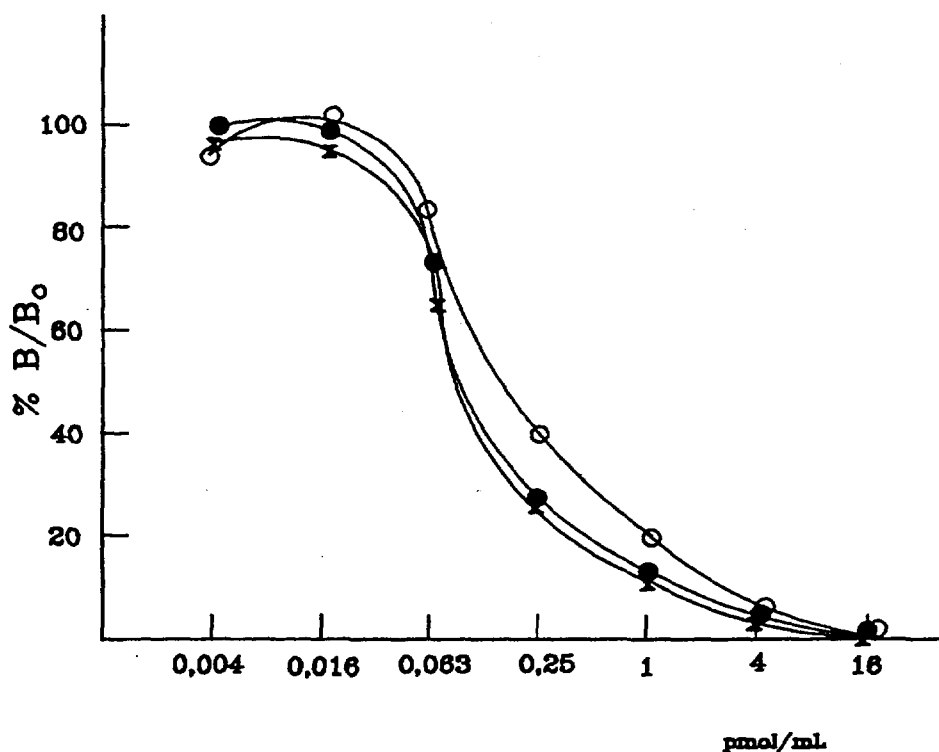
A análise de regressão linear revelou que as curvas construídas com os padrões 84/611, 509-EM4 e A18-TS9-17 não apresentaram diferenças significantes a nível de $p < 0,05$ tanto para a inclinação, como para a intersecção das retas.

Entretanto, a determinação da potência radioimunológica dos padrões secundários 509-EM4 e A18-TS9-17, em relação ao padrão de referência 84/611, estimada pela relação entre os valores de ED₅₀ indicou ter, o padrão secundário A18-TS9-17, potência imunológica menor do que aquela do padrão de referência 84/611 (Tabela 12).

Conclue-se, portanto, que o padrão 509-EM4 é adequado para substituir o padrão Primário de Referência 84/611 o qual é fornecido em pequena quantidade pela OMS.

O padrão secundário A18-TS9-17 também poderá ser utilizado para este fim, desde que se considere sua potência radioimunológica relativa ao padrão Primário.

A análise de regressão linear das curvas dose resposta construídas com o padrão recém-preparado, e após 2 anos armazenado a -20°C não apresentou diferenças significantes a nível de $p < 0,05$ para a inclinação, interceção ou para o ED_{50} , revelando a estabilidade deste padrão.



Ensaio	NSB (%)	Bo (%)	ED_{50} (pmol/mL)	DMD (pmol/mL)
A	3,65	17,2	0,10	0,003
B	3,65	17,2	0,09	0,017
C	3,65	17,2	0,15	0,001

Figura 11- Comparação de curvas padrão do RIE construídas a partir da pró-insulina: A: lote nº 84/611 (● — ●) B: Lote nº 509-EM4 (X — X) C: Lote nº A18-TS9-17 (O — O). Os parâmetros respectivos estimados pelo RIAKALK estão apresentados na Tabela abaixo da figura.

Tabela 12- Valores das potências radioimunológicas estimadas pela relação entre os valores de ED₅₀ do padrão primário (84/611) e os padrões secundários.

Lote	ED ₅₀ (pmol/mL)	potência radioimunológica
84/611	0,10	1,0
509-EM4	0,09	0,9
A18-TS9-17	0,15	1,5

4.8. CONTROLE DE QUALIDADE DO RADIOIMUNOENSAIO

4.8.1. ESPECIFICIDADE

Os valores de proinsulinemia de uma amostra com elevado teor de pró-insulina submetida a diferentes diluições são apresentados na Tabela 13.

O cálculo da média dos 10 resultados obtidos para cada diluição e seu desvio padrão, bem como as concentrações obtidas a partir do produto de cada média pelo fator de diluição respectivo, estão apresentados na Tabela 14.

O coeficiente de correlação, determinado entre os volumes de amostra e as concentrações médias obtidas, foi de 0,999, significativa para $p < 0,01$.

A Figura 12 exibe uma curva padrão do radioimunoensaio de pró-insulina indicando que os pontos correspondentes às amostras diluídas superpuseram-se à curva construída com a pró-insulina humana padrão biossintética.

4.8.2. EXATIDÃO

O estudo da exatidão desta técnica revelou recuperações variando de 79% a 126% (Tabela 15). O coeficiente de correlação, determinado entre as concentrações de pró-insulina adicionadas e aquelas de hormônio recuperado, foi de 0,999, significativa para $p < 0,001$.

4.8.3. PRECISÃO

A Tabela 16 exhibe os valores do teste da precisão intra-ensaio em que foram dosadas, num mesmo ensaio, 15 replicatas de amostras com teores de pró-insulina mais baixo, apresentando valores médios de $0,040 \pm 0,006$ pmol/mL com coeficiente de variação de 15%. O controle intermediário apresentou valores de $0,010 \pm 0,008$ pmol/mL com coeficiente de variação de 8% e o controle mais alto apresentou valores médios de $0,403 \pm 0,031$ pmol/mL com coeficiente de variação de 8%.

Na análise da precisão inter-ensaio (Tabela 17), os resultados das dosagens de amostras controle em 15 ensaios consecutivos, realizados com diferentes traçadores, apresentou valores de $0,038 \pm 0,005$ pmol/mL, com coeficiente de variação de 13% para o controle mais baixo. O controle intermediário apresentou valores de $0,079 \pm 0,010$ pmol/mL, com coeficiente de variação de 12% enquanto que o controle mais alto apresentou valores médios de $0,298 \pm 0,029$ pmol/mL, com coeficiente de variação de 10%.

Tabela 13- Valores da pró-insulinemia de uma amostra com teor elevado de pró-insulina, submetida a diferentes diluições.

Concentração de pró-insulina na amostra (pmol/mL)					
Diluição					
	1:1,5	1:2	1:4	1:8	1:16
	0,30	0,22	0,12	0,06	0,03
	0,29	0,22	0,13	0,06	0,03
	0,30	0,22	0,12	0,06	0,02
	0,29	0,24	0,12	0,06	0,03
	0,32	0,24	0,12	0,06	0,03
	0,29	0,25	0,13	0,05	0,03
	0,29	0,23	0,12	0,06	0,04
	0,30	0,25	0,13	0,06	0,03
	0,29	0,25	0,11	0,06	0,03
	0,29	0,23	0,12	0,05	0,03
Média	0,30	0,24	0,12	0,05	0,03
DP(±)	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
CV	3,1%	5,1%	4,9%	6,9%	14,9%

Tabela 14- Concentrações obtidas em cinco diluições diferentes de uma amostra com teor elevado de pró-insulina.

Fator de diluição	Concentração de pró-insulina na amostra diluída (pmol/mL)	Concentração final de pró-insulina (pmol/mL)
1:1,5	0,296	0,444
1:2	0,235	0,470
1:4	0,122	0,488
1:8	0,058	0,464
1:16	0,030	0,480
Média		0,469
DP(±)		0,015
CV		3,2%

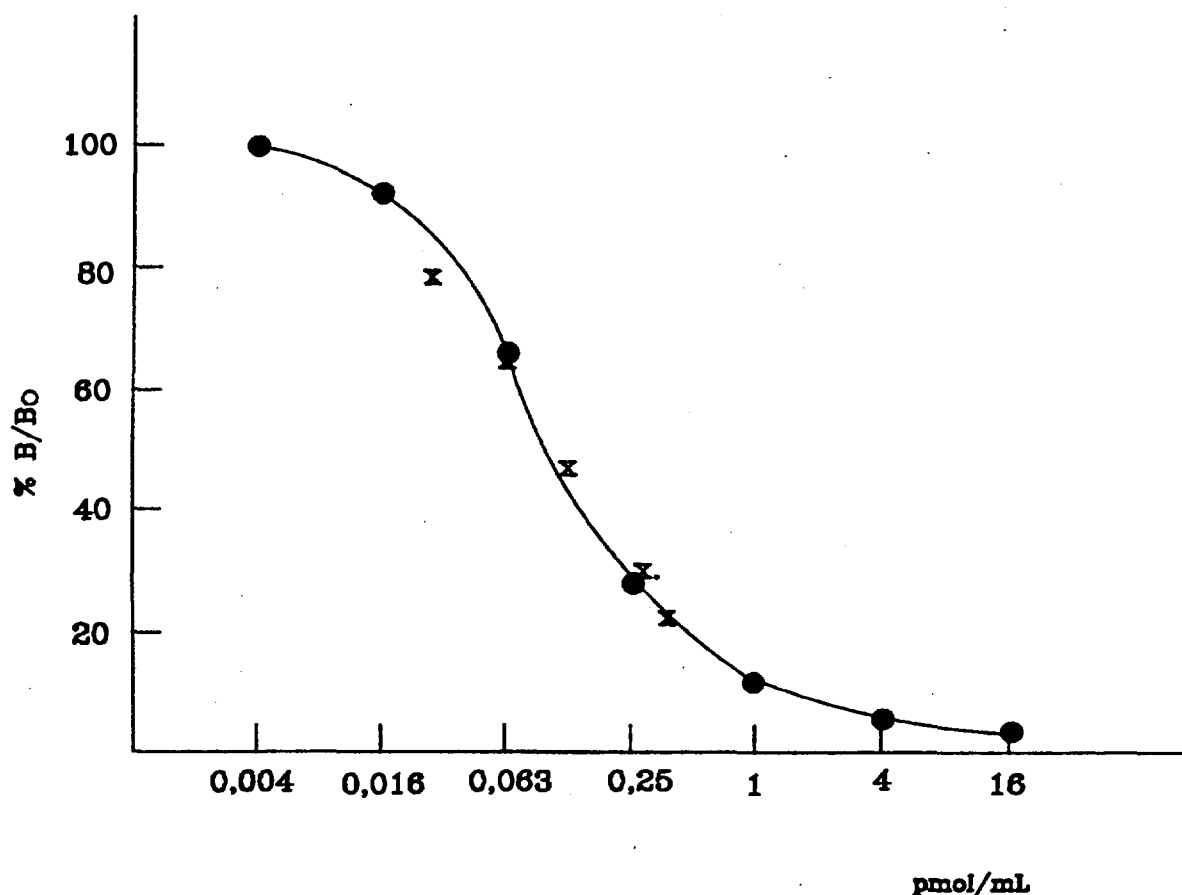


Figura 12- Efeito da diluição da amostra comparado à curva padrão de pró-insulina. (X — X) amostras diluídas

Tabela 15- Concentrações obtidas na prova de recuperação da pró-insulina, adicionando quantidades crescentes deste hormônio a uma amostra de concentração de pró-insulina conhecida (0,026 pmol/mL).

Pró-insulina adicionada (pmol/mL)	Pró-insulina determinada* (pmol/mL)	Pró-insulina recuperada (pmol/mL)	Recuperação %
—	0,026 ± 0,005	—	—
0,019	0,041 ± 0,005	0,015	79
0,063	0,089 ± 0,009	0,063	100
0,250	0,349 ± 0,042	0,323	126
1,000	0,950 ± 0,150	0,950	95
4,000	4,058 ± 0,718	4,032	100

*Média ± DP

Tabela 16- Valores da concentração de pró-insulina das amostras controle com teor baixo, médio e alto, determinados num mesmo ensaio.

	Controle baixo (pmol/mL)	Controle médio (pmol/mL)	Controle alto (pmol/mL)
	0,035	0,089	0,378
	0,036	0,093	0,393
	0,040	0,099	0,368
	0,040	0,105	0,396
	0,041	0,089	0,410
	0,054	0,101	0,473
	0,033	0,091	0,454
	0,041	0,114	0,383
	0,033	0,107	0,433
	0,037	0,089	0,393
	0,037	0,108	0,360
	0,040	0,093	0,419
	0,054	0,092	0,369
	0,045	0,095	0,402
	0,042	0,104	0,418
Média	0,040	0,10	0,403
DP(±)	0,006	0,008	0,031
CV	15%	8%	8%

Tabela 17- Valores de proinsulinemia (pmol/mL) relativos ao estudo da precisão inter-ensaio.

Nº de ensaio	Controle baixo	Controle médio	Controle alto
1	0,043	0,098	0,311
2	0,036	0,075	0,308
3	0,044	0,079	0,295
4	0,039	0,083	0,318
5	0,037	0,074	0,321
6	0,031	0,079	0,333
7	0,035	0,093	0,300
8	0,040	0,070	0,271
9	0,031	0,069	0,263
10	0,035	0,068	0,259
11	0,039	0,089	0,269
12	0,034	0,071	0,292
13	0,048	0,072	0,261
14	0,043	0,076	0,322
15	0,032	0,091	0,355
Média	0,038	0,079	0,298
DP(±)	0,005	0,010	0,029
CV	13%	12%	10%

4.8.4. SENSIBILIDADE

Uma curva dose resposta típica do radioimunoensaio e seu perfil de imprecisão são apresentados na Figura 13. Os parâmetros de sensibilidade de 20 curvas dose resposta, realizadas nas condições de ensaio estabelecidas, apresentaram boa reprodutibilidade mesmo empregando diferentes traçadores (Tabela 18). Os valores de NSB permaneceram constantes e abaixo de 4%. A sensibilidade do ensaio (DMD) variou de 0,003 a 0,017 pmol/mL ($0,008 \pm 0,004$ pmol/mL), enquanto que os valores médios de ED₅₀ foram de $0,12 \pm 0,01$ pmol/mL (média ± DP). A região de confiança da curva variou de 0,03 a 0,39 pmol/mL, com um erro menor do que 20%.

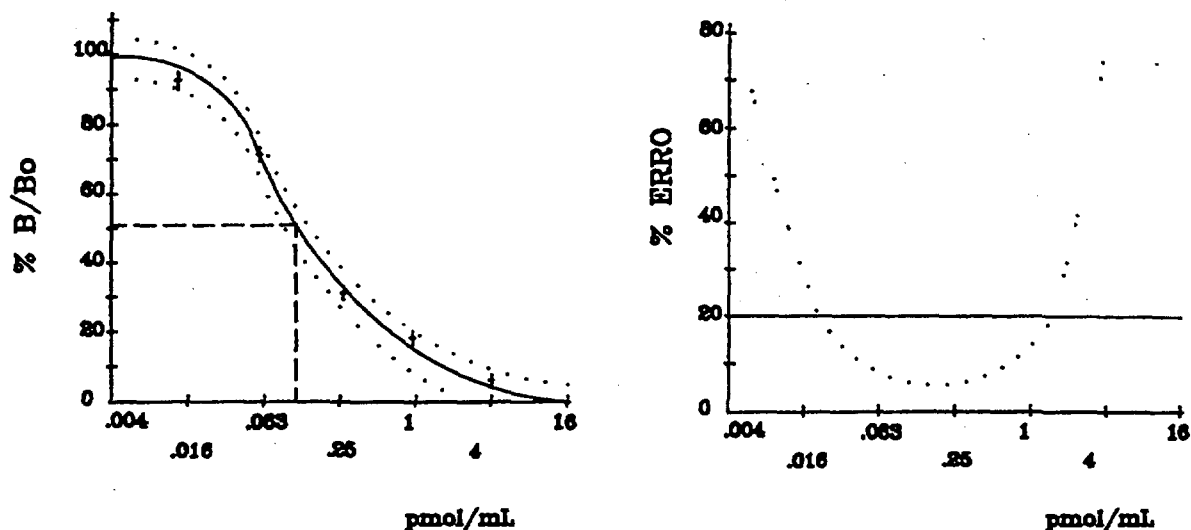


Figura 13- Curva dose resposta típica do radioimunoensaio de pró-insulina (média de determinações em triplicata - esquerda) e seu respectivo perfil de imprecisão (direita) traçados pelo RIAKALK.

Tabela 18- Parâmetros de sensibilidade das curvas padrão determinados com diferentes traçadores e calculados pelo programa computacional RIAKALK.

Ensaio Nº	NSB (%)	Bo (%)	ED ₅₀ (pmol/mL)	DMD (pmol/mL)
1	3,65	17,22	0,10	0,003
2	2,72	22,56	0,10	0,005
3	3,13	27,32	0,12	0,005
4	2,76	20,92	0,13	0,017
5	3,46	23,98	0,11	0,006
6	3,48	17,47	0,14	0,011
7	3,23	17,02	0,14	0,017
8	3,47	28,24	0,14	0,010
9	3,77	22,91	0,13	0,010
10	2,85	20,55	0,11	0,007
11	3,85	24,27	0,12	0,006
12	3,34	26,37	0,12	0,003
13	4,13	24,21	0,12	0,011
14	3,84	24,50	0,13	0,012
15	3,79	25,21	0,11	0,003
16	3,93	23,22	0,15	0,006
17	3,32	19,90	0,12	0,005
18	3,05	19,87	0,12	0,007
19	3,19	20,06	0,12	0,006
20	3,18	20,19	0,11	0,004
Média	3,41	22,29	0,12	0,008
±DP	0,39	3,20	0,01	0,004

4.9. ANÁLISE DA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO DA PRÓ-INSULINA DO SORO

A recuperação média da pró-insulina extraída do soro empregando-se cartuchos de Sep-Pak C₁₈ foi de $90 \pm 1\%$ para a ¹²⁵I-hPI, enquanto que os valores de recuperação da pró-insulina não marcada variaram de 69 a 113 % (Tabela 19). O coeficiente de correlação entre os valores teóricos de pró-insulina padrão e os obtidos após a sua extração foi de 0,999, significativa para $p < 0,001$.

Tabela 19- Valores da recuperação da pró-insulina adicionada ao soro isento de pró-insulina submetido à extração em cartuchos de Sep-Pak C₁₈.

Concentração teórica (pmol/mL)	Concentração obtida* (pmol/mL)	Recuperação (%)
0,016	$0,011 \pm 0,001$	69
0,031	$0,033 \pm 0,004$	106
0,062	$0,058 \pm 0,011$	93
0,125	$0,141 \pm 0,004$	113

* Média \pm DP

4.10. ANÁLISE DA TÉCNICA DE CONCENTRAÇÃO DO SORO

Quando submetidas ao radioimunoensaio, observou-se que as amostras de soro extraídas, lidas na região de confiança do ensaio (erro menor do que 20%), apresentaram valores de pró-insulina muito semelhantes após divisão pelo fator de concentração empregado. Os resultados da determinação da pró-insulina no soro de 18 indivíduos normais, após esse procedimento, estão apresentados na Tabela 20.

A amostra de soro controle, contendo 0,05 pmol/mL de pró-insulina

padrão, que foi extraída em 5 ensaios diferentes apresentou concentração média de $0,055 \pm 0,007$ pmol/mL, com coeficiente de variação de 12%.

Tabela 20- Concentrações de pró-insulina encontradas em soro de indivíduos normais extraído em Sep-Pak C18, antes e após divisão pelo fator de concentração.

Indivíduo	Sexo	Idade (anos)	Pró-insulina (concentrada 2 vezes)	Pró-insulina (pmol/mL)
JSSS	F	27	0,032	0,016
AAT	M	26	0,032	0,016
NSS	M	24	0,042	0,021
MASI	M	25	0,050	0,025
ALND	F	26	0,032	0,016
VLMS	F	32	0,030	0,015
DLO	F	34	0,038	0,019
JSS	M	22	0,034	0,017
MEPA	F	31	0,036	0,018
MASS	F	27	0,044	0,022
EJ	M	19	0,050	0,025
OBS	M	29	0,046	0,023
NCP	F	38	0,058	0,029
AMS	M	30	0,042	0,021
KMK	F	25	0,034	0,017
EM	M	26	0,048	0,024

Região de confiança do ensaio: 0,03-0,39 pmol/mL

4.11. VALIDAÇÃO DO RADIOIMUNOENSAIO

As Tabelas 7 - Anexo a 9 - Anexo exibem as características metabólicas individuais referentes aos grupos normais, insuficientes renais crônicos e insulinomas estudados para a validação do radioimunoensaio.

As Tabelas 21 e 22 exibem os resultados dos valores médios \pm DP ou as medianas, mínimo e máximo; e a análise estatística comparativa entre as características metabólicas dos indivíduos estudados.

As Figuras 14 e 15 ilustram os resultados médios \pm DP na forma de gráficos de barra.

No grupo de insuficientes renais crônicos observou-se, como era esperado, um aumento significativo a nível de $p < 0,01$ nas concentrações de uréia e creatinina em relação ao grupo dos indivíduos normais. Pôde-se observar, também, uma diferença significativa nos níveis de glicose, HbA1c, peptídeo-C e pró-insulina ($p < 0,01$), assim como nas relações molares PI/I ($p < 0,05$) e I/peptídeo-C ($p < 0,01$).

Observando-se os indivíduos com insulinoma, verificou-se uma diferença altamente significativa a nível de $p < 0,001$ para os níveis de glicose, insulina, peptídeo-C e pró-insulina em relação ao grupo de indivíduos normais. Esta diferença foi observada, também, na relação molar PI/I, porém a relação I/peptídeo-C permaneceu igual para os dois grupos.

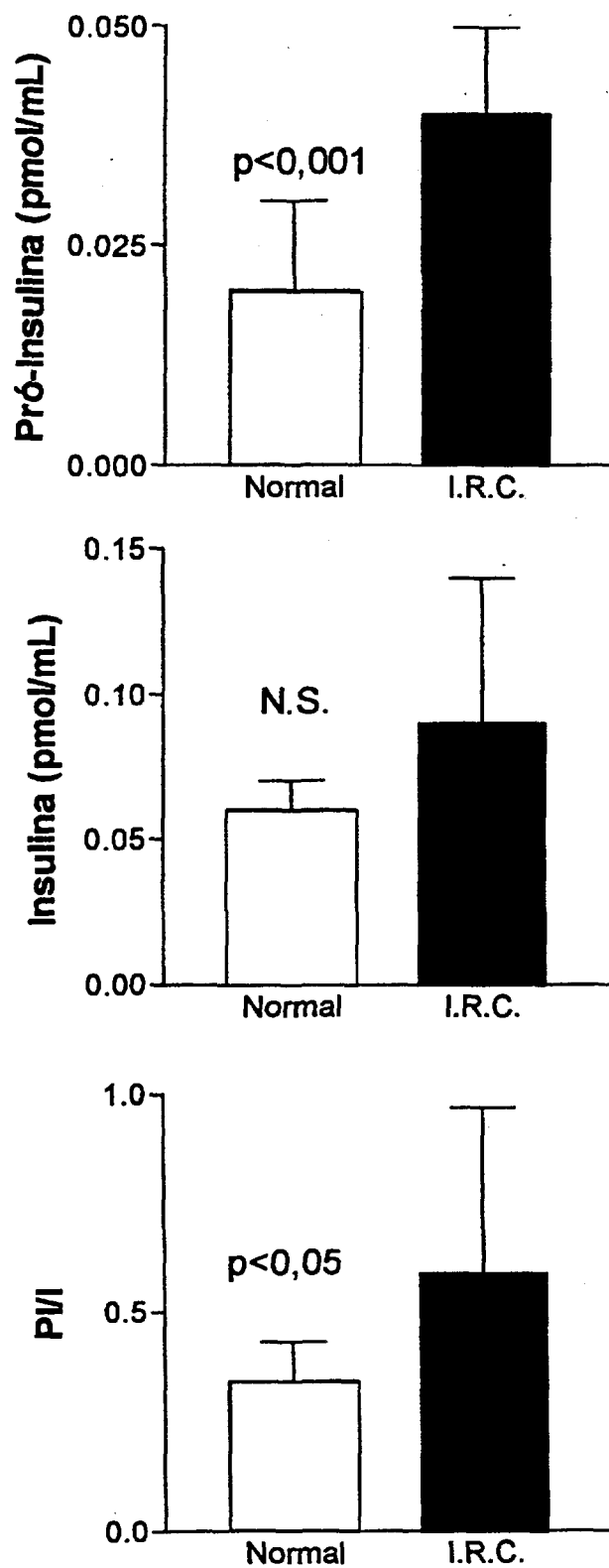


Figura 14- Concentração basal média \pm DP de pró-insulina, insulina e relação molar P/I em soro de indivíduos normais \square e pacientes com insuficiência renal crônica (IRC) \blacksquare .

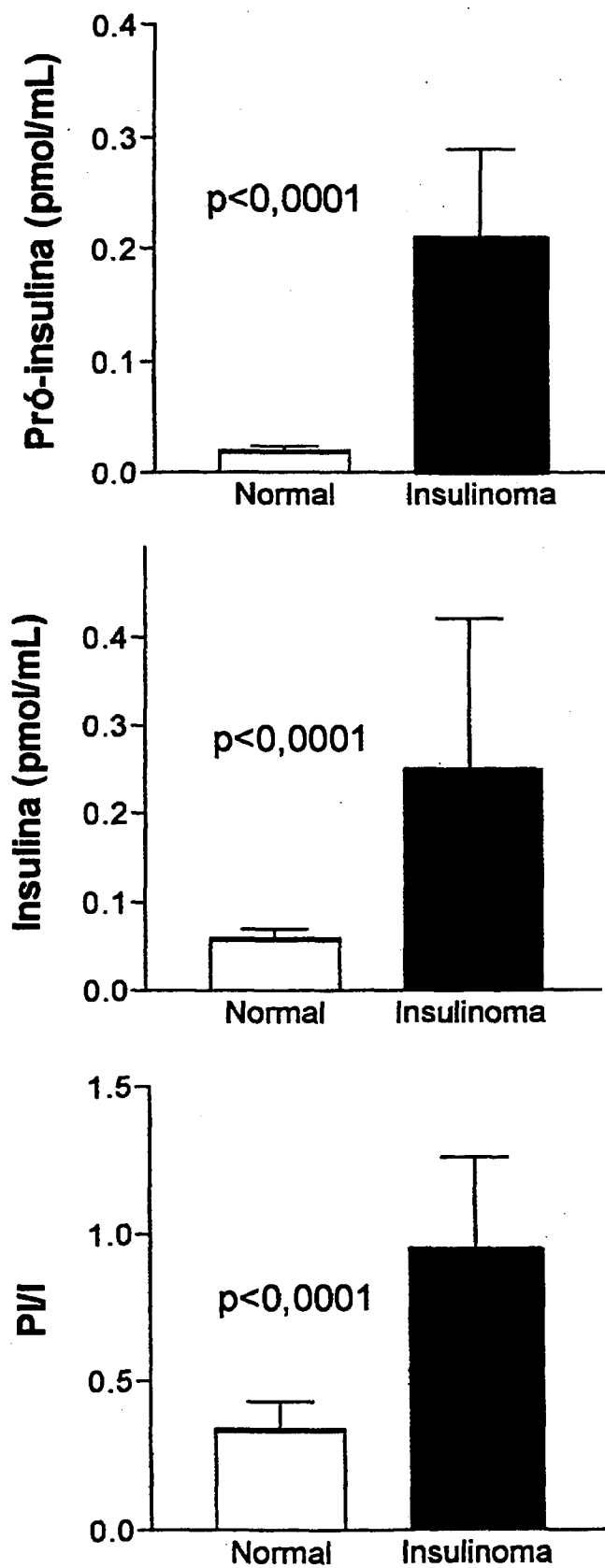


Figura 15- Concentração basal média \pm DP de pró-insulina, insulina e relação molar P/I em soro de indivíduos normais \square e pacientes com insulinoma \blacksquare .

4.12. APLICAÇÃO DO RADIOIMUNOENSAIO NO ESTUDO DO DIABETES MELLITUS TIPO II ASSOCIADO À OBESIDADE.

As Tabelas 10 a 12 - Anexo exibem as características metabólicas individuais referentes aos grupos dos obesos não diabéticos, e dos indivíduos com Diabetes Tipo II não obesos e obesos. Explica-se os valores de HbA1c ausentes para alguns pacientes devido à falta do conjunto diagnóstico.

As Tabelas 23 e 24 exibem os resultados dos valores médios \pm DP ou as medianas, mínimo e máximo, e a análise estatística comparativa realizada entre os diversos grupos estudados.

As Figuras 16 e 17 ilustram os resultados médios \pm DP na forma de gráficos de barra.

Quando os grupos controle de mulheres normais e obesas foram comparados, observou-se que houve diferença significativa a nível de $p < 0,001$ nos níveis séricos de insulina, e a relação molar PI/I apresentou diferença significativa a nível de $p < 0,05$.

Os indivíduos diabéticos Tipo II não obesos e obesos, quando comparados na mesma tabela, apresentaram, entre si, diferenças significantes a nível de $p < 0,05$ somente no nível sérico de insulina, porém a relação molar PI/I não apresentou diferença significativa.

Os resultados comparativos dos indivíduos normais com indivíduos diabéticos Tipo II não obesos revelaram diferenças significantes nos níveis de glicose ($p < 0,001$), HbA1c ($p < 0,05$) e pró-insulina ($p < 0,05$) acompanhado de diferença a nível de $p < 0,05$ para a relação molar PI/I.

O grupo de diabéticos Tipo II obesos comparado ao grupo controle dos obesos apresentou diferenças significantes a nível de $p < 0,01$ nos níveis de glicose, HbA1c, peptídeo-C e pró-insulina. O mesmo foi verificado nas relações molares PI/I e I/peptídeo-C. Entretanto, a concentração basal de insulina foi igual para os dois grupos.

Tabela 21- Comparação entre as características metabólicas dos pacientes com insuficiência renal crônica e indivíduos normais.

	Normais	Insuficientes renais	significância (p)
Uréia	26,5(15-44)	164(30-256)	<0,001
Creatinina	0,75(0,4-1,2)	11(2,3-15,6)	<0,001
Glicose	88(76-103)	97(66-130)	<0,05
HbA1c	5,3(3,8-7,0)	7,8(4,7-10,8)	<0,01
Insulina	0,06(0,04-0,08)	0,06(0,02-0,19)	NS
Peptídeo-C	0,3(0,13-0,66)	2,32(0,07-4,86)	<0,001
Pró-insulina	0,02 ± 0,01	0,04 ± 0,01	<0,001
PI/I	0,34(0,22-0,51)	0,44(0,19-1,5)	<0,05
I/pept.-C	5,3(3,8-7,0)	7,8(4,7-10,8)	<0,01

Os valores correspondem à média ± DP e a mediana, mínimo e máximo (entre parênteses).

Tabela 22- Comparação entre as características metabólicas dos pacientes com insulinoma e indivíduos normais.

	Normais	Insulinoma	significância (p)
Glicose	86,9 ± 7,43	38,8 ± 12,0	<0,0001
Insulina	0,06(0,04-0,08)	0,23(0,09-0,56)	<0,001
Peptídeo-C	0,30(0,13-0,66)	1,27(0,43-1,86)	<0,001
Pró-insulina	0,02(0,01-0,03)	0,22(0,11-0,33)	<0,001
PI/I	0,34(0,22-0,51)	0,90(0,60-1,40)	<0,001
I/pept.-C	0,20(0,08-0,32)	0,20(0,10-0,30)	NS

Os valores correspondem à média ± DP e a mediana, mínimo e máximo (entre parênteses).

Tabela 23- Comparação entre as características metabólicas dos pacientes obesos em relação aos indivíduos normais e pacientes diabéticos obesos em relação a diabéticos não obesos.

	Não diabéticos			Diabéticos		
	não obesos	obesos	p	não obesos	obesos	p
glicose	86,9 ± 7,4	91,9 ± 10,4	NS	270 ± 87	313 ± 89	NS
HbA1c	5,3(3,8-7,0)	5,6(3,8-7,7)	NS	15,1(8,3-16,4)	9,5(8,0-17,3)	NS
Insulina	0,06(0,04-0,08)	0,10(0,05-1,38)	<0,001	0,06 ± 0,01	0,09 ± 0,01	<0,05
Peptídeo-C	0,31(0,16-0,66)	0,34(0,02-1,13)	NS	0,51 ± 0,37	0,78 ± 0,49	NS
Pró-insulina	0,02(0,01-0,03)	0,02(0,01-0,04)	NS	0,03 ± 0,01	0,05 ± 0,02	NS
PI/I	0,34(0,22-0,51)	0,25(0,01-0,51)	<0,05	0,54(0,29-0,73)	0,49(0,35-1,2)	NS
I/Pept.-C	0,20(0,08-0,32)	0,33(0,10-10,4)	<0,05	0,09(0,08-0,76)	0,13(0,06-0,29)	NS

Os valores correspondem à média ± DP e a mediana, mínimo e máximo (entre parênteses).

Tabela 24- Comparação entre as características metabólicas dos indivíduos não obesos e obesos em relação aos indivíduos diabéticos Tipo II não obesos e obesos.

	Não obesos			Obesos		
	Controle	Diabéticos	p	Controle	Diabéticos	p
Glicose	88(76-103)	326(174-340)	<0,0001	91(78-109)	319(185-471)	<0,0001
HbA1c	5,3(3,8-7,0)	15,1(8,3-16,4)	<0,01	5,6(3,8-7,7)	9,5(8,0-17,3)	<0,0001
Insulina	0,06(0,04-0,08)	0,06(0,05-0,08)	NS	0,1(0,05-1,38)	0,09(0,07-0,11)	NS
Peptídeo-C	0,30(0,05-0,66)	0,59(0,09-0,99)	NS	0,42 ± 0,34	0,78 ± 0,49	<0,05
Pró-insulina	0,02(0,01-0,03)	0,03(0,02-0,05)	<0,05	0,024(0,01-0,04)	0,05(0,02-0,10)	<0,01
PI/I	0,34(0,22-0,51)	0,54(0,29-0,73)	<0,05	0,25(0,01-0,51)	0,49(0,35-1,2)	<0,001
I/Pept.-C	0,20(0,08-0,32)	0,09(0,08-0,76)	NS	0,33(0,10-10,4)	0,13(0,06-0,29)	<0,01

Os valores correspondem à média ± DP e a mediana, mínimo e máximo (entre parênteses).

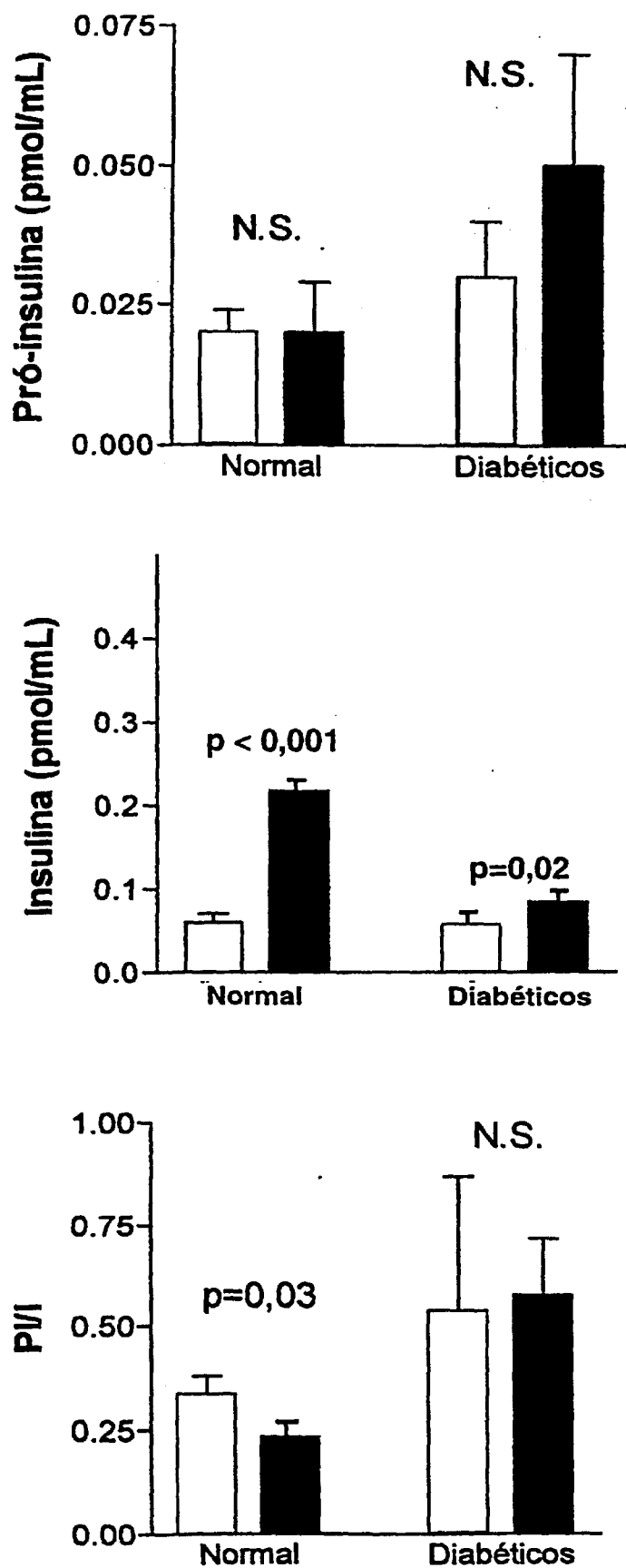


Figura 16- Concentração basal média \pm DP de pró-insulina, insulina e relação molar PI/I em soro de indivíduos não obesos \square e obesos \blacksquare .

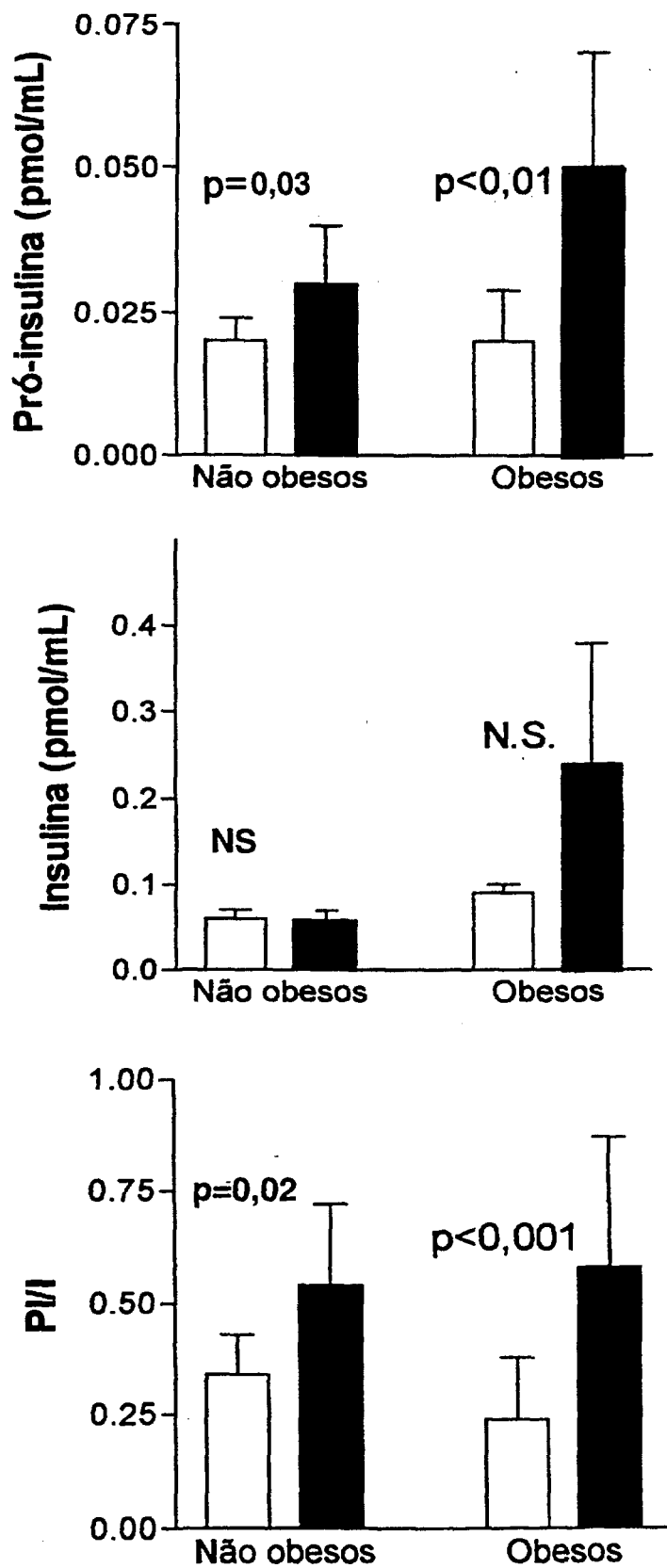


Figura 17- Concentração basal média \pm DP de pró-insulina, insulina e relação molar PI/I em soro de indivíduos normais \square e pacientes com diabetes Tipo II \blacksquare .

5. DISCUSSÃO

A- PREPARO E CONTROLE DE QUALIDADE DOS REAGENTES BIOLÓGICOS ESPECÍFICOS DO RADIOIMUNOENSAIO.

5.1. AVALIAÇÃO DOS ANTISSOROS ANTI-PRÓ-INSULINA HUMANA.

A maior dificuldade no desenvolvimento de um sistema de radioimunoensaio é a de obter-se antissoros com as características necessárias de avidéz e especificidade indispensáveis para a obtenção de radioimunoensaios sensíveis e específicos (107).

Freqüentemente, é dito que a produção de anticorpos é mais uma arte do que ciência e vários métodos têm sido empregados na tentativa de se obter antissoros adequados (107). Entretanto, numerosos fatores podem influenciar o provável sucesso dessa produção, desde a imunogenicidade do antígeno, a espécie animal imunizada, esquema de imunização, até o emprego ou não de adjuvantes.

Outro fator, que aumenta a resposta do sistema imunitário na produção de antissoros, é o emprego do adjuvante de Freund completo o qual contém bacilos da tuberculose inativados. Quando injetados juntamente com o imunógeno, este potencia a resposta do organismo contra ele já que, retarda a absorção do antígeno no local da injeção, facilita a fagocitose do imunógeno pelos macrófagos, origina a formação local de lesão granulomatosa e causa estímulo, tanto local quanto geral, do sistema retículo endotelial.

Embora poucos laboratórios tenham desenvolvido radioimunoensaios homólogos empregando antissoros contra pró-insulina biossintética (54,55,57-59), o título fornecido pelo antissoro não purificado, obtido imunizando-se cobaias com pequenas doses de pró-insulina (50 µg), foi semelhante aquele obtido por Deacon e Conlon (55). Este porém, foi menor do que aquele obtido por Yoshioka e cols. (58) que também empregaram cobaias, dose e esquema de imunização similares para a

obtenção do antissoro anti-pró-insulina.

Constatou-se que, assim como nós obtivemos títulos mais baixos imunizando cobaias com doses maiores do imunógeno, o mesmo aconteceu com relação aos antissoros obtidos imunizando cobaias (54), carneiros (57) e cabras (59), empregando doses maiores do imunógeno, a partir de 100 µg.

Esse efeito foi descrito por Vaitukaitis e cols. (80) quando produziram antissoros para hormônios peptídicos e esteroídicos com títulos altos, ministrando doses pequenas do imunógeno, emulsificado em adjuvante de Freund, em sítios intradérmicos de coelhos.

Embora não tenha sido possível estabelecer comparações entre os diferentes procedimentos de imunização, empregados para a obtenção dos antissoros, obtivemos um antissoro com título e avidéz adequados para o radioimunoensaio, pelo emprego de doses baixas do imunógeno.

Este resultado revelou que é possível 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 emprego da cromatografia de afinidade como técnica de separação de rotina iniciou-se em 1967 quando Axén e cols. (108) descreveram um procedimento de acoplamento de moléculas contendo grupos amina primários a matrizes de polissacarídeos ativadas por CNBr. Logo em seguida, Cuatrecasas (109) empregou esta técnica acoplando insulina à Sepharose ativada e demonstrou que a atividade biológica da insulina não foi alterada.

O resultado obtido no acoplamento da insulina à Sepharose ativada em nossos laboratórios ($13 \pm 2\%$) foi semelhante ao encontrado por Cuatrecasas (109) para o acoplamento do mesmo peptídeo (9%).

Porém, devido a grande toxicidade do CnBr associada a dificuldades na execução da técnica de acoplamento, acreditamos que a resina ativada obtida comercialmente seja a mais indicada, a despeito de seu custo mais alto.

Apesar de ter havido uma redução de 1:24.000 para 1:15.000 no título do antissoro purificado, ele tornou-se altamente específico após sua adsorção contra

insulina e peptídeo-C-Sepharose.

O antissoro purificado obtido não reconheceu, nem a insulina ou o peptídeo-C, mas reagiu cruzadamente com o intermediário de conversão da pró-insulina 65,66-split, indicando que o antissoro reconheceu, principalmente, a junção entre a cadeia B e o peptídeo-C.

Este resultado sugere que existe uma especificidade similar ao antissoro obtido por Cohen e cols. em 1985 (54) e ao anticorpo 18 D obtido em 1986 (56), os quais também reconheceram, principalmente, o intermediário de conversão 65,66-split-pró-insulina. Os antissoros obtidos por Deacon e cols. (55) e Yoshioka e cols. (58), embora também reconhecessem, principalmente, a junção entre a cadeia B e o peptídeo-C, apresentaram reação cruzada também com o intermediário de conversão 64,65-des-pró-insulina.

Embora a possibilidade de clivagem da pró-insulina na corrente sanguínea seja muito pequena (18), há evidências de que quantidades consideráveis de intermediários de conversão existam no sangue (77,78), complicando a medida da pró-insulina na circulação.

O desenvolvimento de ensaios imunoenzimático (71) e imunorradiométrico (72), capazes de determinar individualmente a concentração de pró-insulina intacta e seus intermediários de conversão, possibilitaram alguns conhecimentos a mais, à respeito da biossíntese da insulina.

Observou-se, nestes estudos, uma concentração muito reduzida de 65,66-split pró-insulina presente no plasma, indicando que este derivado de conversão não interfere com a especificidade do ensaio de pró-insulina. Observou-se, também, que, por causa da enzima carboxypeptidase presente no plasma, a maioria das moléculas circulantes relacionadas à pró-insulina foram a 64,65-des e a 31,32-des, com predominância da forma 31,32-des pró-insulina (110). Estes resultados foram confirmados recentemente através da análise em HPLC (76,78).

Como o antissoro obtido em nossos laboratórios identifica, principalmente, o derivado de conversão 65,66-split, e ele está presente em concentração muito reduzida no soro, podemos considerar que o radioensaio

padronizado determina, basicamente, a concentração de pró-insulina intacta.

A análise do antissoro pelo estudo de sua avidéz através da análise de Scatchard revelou valor da constante de afinidade (K_a) de 10^{10} L/mol. Este valor é concorde com o descrito na literatura para obtenção de ensaios sensíveis, que deve ser, no mínimo, da ordem de 10^9 L/mol (111). O estudo da cinética de precipitação permitiu a padronização de um ensaio mais rápido, com um tempo total de incubação de 28 h.

Esta característica diferenciou o ensaio dos demais radioimunoensaios obtidos por Cohen e cols. (54,56), Deacon e Conlon (55) e Yoshioka e cols. (58) que necessitaram de 96 a 120 h de incubação. O mesmo foi observado no radioimunoensaio desenvolvido por Hampton e cols. (57) que necessitou de 50 h de incubação, ou no ensaio obtido por Bowsher e cols. (59) que empregou 43 h de incubação, porém à temperatura ambiente.

Portanto, o emprego deste antissoro permitiu o desenvolvimento de um ensaio rápido e simples para a medida da pró-insulina em amostras séricas, sem a necessidade da separação inicial da insulina e peptídeo-C, conforme relatos da literatura (32,33,51).

5.2. PREPARO E CONTROLE DE QUALIDADE DO TRAÇADOR

O antígeno empregado na marcação deve ser extremamente puro (112) a fim de permitir o preparo de um traçador adequado para seu uso em radioimunoensaio. A pró-insulina fria, empregada neste trabalho, quando submetida à EGPA por ocasião da sua primeira radioiodação, mostrou um único componente (Figura 5), sendo confirmado, portanto, o elevado grau de pureza deste pró-hormônio.

Embora o método de marcação pelo Iodogen seja amplamente empregado na marcação de proteínas, somente Deacon e Conlon o empregaram na marcação da pró-insulina, obtendo traçadores com atividade específica de $45 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ (55).

A atividade específica determinada para 18 traçadores preparados em

nossos laboratórios apresentou valor médio de $6,0 \pm 0,3$ MBq/ μ g (168 ± 8 μ Ci/ μ g), portanto, maior do que o obtido por Deacon e Conlon. Cohen e cols. (54) e Bowsher e cols. (59) no entanto, obtiveram valores um pouco maiores, aproximadamente 210 μ Ci/ μ g, empregando o método de marcação pela lactoperoxidase.

A sensibilidade do radioimunoensaio é criticamente dependente da qualidade do traçador. Embora a purificação do monoiodo- 125 I-tyr(A14)-hPI pelo uso de HPLC tenha sido descrito (113), e Bowsher e cols. (59) tenham obtido ensaios mais sensíveis empregando este método, este aparelho não está disponível em nossos laboratórios. Além disso, este método tem a desvantagem de, o aparelho, tornar-se altamente contaminado com radioatividade.

Entretanto, o emprego de cromatografia de troca aniônica em QAE-Sephadex A-25 proporcionou o preparo de traçadores com elevada pureza, mantida mesmo após 3 meses de estocagem a -20°C . Nesse período, o traçador apresentou pequena liberação de 125 I e conservou seus valores de R_m característicos (Figura 8).

As curvas padrão obtidas com esse traçador, após longo período de estocagem, mostraram-se paralelas (Figura 9) sendo que os valores de ligação inespecífica mantiveram-se praticamente inalterados, variando de 3,1 a 3,6%, bem como os da ligação específica que oscilaram de 23,9 a 25,8%.

Os valores de ED_{50} também não sofreram variação significativa após o tempo de estocagem, variando de 0,26 a 0,28 pmol/mL. A sensibilidade dos ensaios realizados com este traçador também permaneceu inalterada variando de 0,04 a 0,06 pmol/mL.

Portanto, o uso do Iodogen, um método reprodutível, suave e barato para marcação de proteínas seguido por purificação em QAE-Sephadex A-25 resultou em traçadores com atividade específica e pureza elevadas bem como com estabilidade adequada para seu emprego no radioimunoensaio.

B. DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS PARA O RADIOIMUNOENSAIO.

5.3. OBTENÇÃO DE SORO ISENTO DE PRÓ-INSULINA E ANÁLISE DO PADRÃO DO RADIOIMUNOENSAIO.

A identidade de condições entre o hormônio padrão e as amostras desconhecidas é requisito indispensável para a realização de um radioimunoensaio específico e preciso (114). Portanto, tornou-se necessário o preparo de um soro isento de pró-insulina para diluir a pró-insulina padrão que estaria, então, em condições semelhantes às das amostras sanguíneas a serem dosadas.

O tratamento do soro com carvão ativado que foi a metodologia de escolha, além de sua praticabilidade e custo reduzido, foi também a metodologia empregada nos radioimunoensaios desenvolvidos por Deacon e Conlon (55), Hampton e cols. (57) e Bowsher e cols. (59).

Em nossos estudos, o padrão de pró-insulina preparado em tampão de ensaio contendo 1% de albumina bovina e armazenado a -40°C permaneceu estável por período de até 2 anos. Embora tenha sido descrito que o padrão fornecido pela WHO sofre perdas anuais de 4,5% quando o padrão é estocado a -20°C (115), Bowsher e cols. (59) também observaram estabilidade superior a 2 anos, quando o padrão foi preparado em tampão de ensaio contendo 0,6% de NaCl e 3% de albumina bovina e permaneceu estocado a esta temperatura.

5.4. DETERMINAÇÃO DA TÉCNICA DE SEPARAÇÃO IDEAL DO RADIOIMUNOENSAIO.

O PEG precipita proteínas de alto peso molecular e acelera a reação de ligação do antígeno ao anticorpo (116). Conseqüentemente, o PEG é amplamente utilizado em radioimunoensaios como um reagente para facilitar a separação entre o antígeno livre e o ligado. Neste estudo, o uso de PEG resultou em completa separação

em 1 h, enquanto, o tratamento com o segundo antissoro sozinho, requereu uma incubação de 24 h. Embora o uso do PEG 20% tenha produzido níveis equivalentes de Bo e de NSB em relação àqueles encontrados pelo PEG assistido pelo segundo antissoro (Tabela 10), a necessidade de uma precipitação adicional diminui a praticabilidade do ensaio e pode interferir na sua acuracidade.

A técnica de separação do ensaio adicionando PEG ao segundo antissoro foi crítica para a separação completa entre a pró-insulina ligada e a livre, além de reduzir, significativamente, o tempo de incubação do ensaio.

Os resultados indicaram que uma solução de PEG a 10% foi a concentração ideal para a completa separação da curva dose resposta do radioimunoensaio, sem afetar a ligação inespecífica do ensaio.

5.5. CONTROLE DE QUALIDADE DO RADIOIMUNOENSAIO.

Após o desenvolvimento e padronização do radioimunoensaio, submeteu-se esta técnica a um rigoroso controle de qualidade, visando a garantir, ao longo do tempo, a qualidade dos reagentes empregados bem como a detecção de alguma falha na execução técnica do método.

O controle de qualidade foi realizado pela análise dos parâmetros de especificidade, exatidão, precisão e sensibilidade do radioimunoensaio que são indispensáveis para a validação do método (97-100).

Em relação a especificidade do método, os valores da concentração de pró-insulina, determinados na amostra diluída, foram muito semelhantes quando multiplicados pelos respectivos fatores de diluição, apresentando C.V. de 3,2% (Tabela 14). A existência de correlação significativa entre o fator de diluição da amostra analisada e a pró-insulina determinada ($p < 0,001$) confirma a especificidade do radioimunoensaio.

A superposição dos pontos referentes às diferentes diluições da amostra contendo elevado teor endógeno de pró-insulina, com os da curva padrão construída a partir da pró-insulina humana biossintética (Figura 12) permitiu verificar a idêntica imunorreatividade de ambas as pró-insulinas (endógena e padrão), condição

essencial para todo radioimunoensaio.

Estes resultados são concordes com aqueles descritos por Deacon e Conlon (55) e Hampton e cols. (57) para a análise desse parâmetro do radioimunoensaio de pró-insulina, por eles, desenvolvido.

A análise da exatidão do método apresentou, também, coeficiente de correlação significativo para $p < 0,001$ entre a concentração de pró-insulina adicionada e aquela recuperada, apresentando recuperações variando de 79 a 126% (Tabela 15).

Estes valores de recuperação estão de acordo com os descritos por Hampton e cols. (57), Yoshioka e cols. (58) e Bowsher e cols. (59) para o radioimunoensaio em sistema de ensaio em não-equilíbrio.

No estudo da reprodutibilidade intra-ensaio obtiveram-se valores aceitáveis de coeficiente de variação para os três níveis considerando-se um ensaio em não-equilíbrio (Tabela 16). Os valores variaram de 8 a 15% para os controles mais alto e mais baixo respectivamente. O mesmo pode ser observado no estudo da reprodutibilidade inter-ensaio (Tabela 17), quando foram realizados ensaios com diversos traçadores obtendo-se valores de coeficiente de variação que oscilaram de 10 a 13%.

Esta precisão foi semelhante à obtida por Bowsher e cols. (59) no radioimunoensaio em não-equilíbrio, porém utilizando temperatura de incubação mais alta, visando a diminuir o tempo de execução do ensaio. Outros autores que empregaram um tempo de incubação maior, obtiveram valores de precisão um pouco melhores, inferior a 12% (55,57,58).

Embora um dos inconvenientes do sistema de radioimunoensaio em não-equilíbrio seja a diminuição na reprodutibilidade do método (117), nossos resultados mostraram que foi possível obter um radioimunoensaio mais rápido, mesmo empregando incubação à temperatura baixa (4°C) e manter a precisão dos resultados.

A sensibilidade do radioimunoensaio desenvolvido ($0,008 \pm 0,004$ pmol/mL) foi semelhante àquela descrita por alguns autores (54-56) embora seja inferior àquela relatada por Yoshioka e cols. (58) e Bowsher e cols. (59) que obtiveram DMD de 0,002 pmol/mL e 0,0035 pmol/mL, respectivamente.

Consequentemente, como a maioria dos radioimunoensaios de pró-insulina, o presente ensaio não foi suficientemente sensível para medir os níveis de pró-insulina em indivíduos normais sem o uso de técnicas de extração, e subsequente, concentração. Entretanto, sua sensibilidade foi adequada para a medida da pró-insulina em pacientes com pró-insulinemia.

Portanto, o radioimunoensaio desenvolvido mostrou-se específico, preciso e exato pela análise de seu controle de qualidade, permitindo a realização de ensaios e obtenção de resultados válidos.

5.6. ANÁLISE DA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DA PRÓ-INSULINA DO SORO

A técnica de extração da pró-insulina utilizando cartuchos de Sep-Pak C₁₈ e sistema Savant Speed-Vac para concentrar as amostras, apresentou uma recuperação de 90% empregando a ¹²⁵I-pró-insulina e 93 -113% empregando a pró-insulina padrão. O resultado foi, portanto, melhor do que o encontrado por Cohen e cols. que obtiveram 70% de recuperação empregando a ¹²⁵I-hPI, e 75% empregando a pró-insulina padrão (56).

A boa reprodutibilidade desta técnica foi observada através do C.V. de 12% encontrado para a amostra controle em 5 extrações realizadas em ensaios diferentes, sendo empregada, portanto, como método de extração da pró-insulina presente em baixas concentrações no soro dos indivíduos normais.

5.7. VALIDAÇÃO DO RADIOIMUNOENSAIO

A validade deste radioimunoensaio foi confirmada por sua aplicação na determinação da proinsulinemia em indivíduos normais e com níveis de pró-insulina elevados, como insuficientes renais crônicos e pacientes com insulinoma.

5.7.1. INDIVÍDUOS NORMAIS

Os valores de pró-insulinemia de jejum, determinados nos indivíduos normais empregando-se a técnica de extração da pró-insulina em Sep-Pak, apresentaram valor médio e respectivo desvio padrão da média de $0,015 \pm 0,004$ pmol/mL (Tabela 20), com uma recuperação de, aproximadamente, 106% para a amostra concentrada duas vezes.

Os resultados obtidos foram semelhantes aos descritos por Deacon e Conlon ($0,015 \pm 0,009$ pmol/mL) que utilizaram anticorpo contra a junção B-peptideo-C e extração alcoólica da pró-insulina do soro (55). Cohen e cols. que também empregaram um anticorpo semelhante e extração em Sep-pak, obtiveram valores normais médios de $0,005 \pm 0,002$ pmol/mL, com uma recuperação de 75% (56) valores esses, semelhantes aos obtidos por Yoshioka e cols. ($0,006 \pm 0,003$ pmol/mL) e Bowsher e cols ($0,004 \pm 0,0003$ pmol/mL) que não empregaram técnicas de extração (58,59).

Embora Deacon e Conlon (55) e Cohen e cols. (56) tivessem empregado antissoros anti-pró-insulina semelhantes, e um radioimunoensaio de insulina que apresentava reação cruzada com a pró-insulina, eles encontraram diferentes valores de relação molar entre pró-insulina e insulina (PI/I) de 0,21 e 0,05, respectivamente.

Yoshioka e cols. (58) fez a correção desta reação cruzada da pró-insulina no radioimunoensaio de insulina e encontrou valor de relação molar PI/I de 0,16 empregando um antissoro anti-pró-insulina semelhante.

Haffner e cols. (66) encontrou um valor de relação molar de 0,9 empregando um radioimunoensaio de insulina que não reconhecia a pró-insulina e um antissoro anti-pró-insulina que reconheceu os intermediários de conversão 32,33-split e 31,32-des pró-insulina.

Nossos resultados apresentaram uma relação molar PI/I de 0,34, empregando o mesmo antissoro anti-insulina empregado por Haffner e cols., porém nosso antissoro anti-pró-insulina não reconheceu os intermediários de conversão 32,33-split e 31,32-des pró-insulina.

Temple e cols. (73) encontraram um valor de relação molar de 0,24 e

Nagi e cols. de 0,39 (75), empregando um ensaio imunorradiométrico específico para a dosagem de pró-insulina e 32,33-split pró-insulina e outro específico para a dosagem de insulina.

Estes valores revelaram, portanto, uma variação muito grande de resultados entre um ensaio e outro o que dificultou possíveis comparações.

5.7.2. INSUFICIÊNCIA RENAL CRÔNICA

O grupo de pacientes com insuficiência renal crônica apresentou aumento significativo ($p < 0,001$) no nível basal de pró-insulina em relação aos indivíduos normais com aumento na relação molar PI/I de 0,34 para 0,44. A relação insulina/peptídeo-C também aumentou de 5,3 para 7,8. Esses dados são concordes com os descritos por Jaspan e cols. que, embora tenham empregado métodos indiretos na dosagem da pró-insulina, obtiveram resultados similares (41). Kao e cols. (79), empregando ensaio imunoenzimático, também encontraram valores aumentados de pró-insulina em 70% dos pacientes estudados, concluindo que, em pacientes com insuficiência renal crônica, a pró-insulina não deve ser empregada para o diagnóstico de insulinoma.

O “clearance” da pró-insulina ocorre preferencialmente nos rins, segundo estudos realizados por Katz e cols. (25). No entanto, como o da insulina ocorre predominantemente no fígado, também era esperado que a pró-insulina fosse depurada por esta via (27).

Estudos realizados por Zilker e cols. (26) indicaram que esse mecanismo de depuração fora dos rins na presença de insuficiência renal, parece não ser suficiente. Seus resultados indicaram que houve uma redução de 2,6 vezes no “clearance” da pró-insulina onde, 39% do processo foi extrarenal e 61% renal.

Portanto, a causa provável desta elevação de pró-insulina e peptídeo-C em relação à insulina, nos pacientes com insuficiência renal, deve-se ao fato da falência dos rins em depurar estes peptídeos e o “clearance” hepático deles ser mais lento que o da insulina.

5.7.3. INSULINOMA

As concentrações basais de pró-insulina encontradas nos pacientes com insulinoma foram significativamente maiores ($p < 0,001$) do que as encontradas em indivíduos normais, apresentando uma relação molar PI/I de 0,90. Este valor é semelhante àqueles relatados na literatura (42,44,56,57,64), cujas relações molares foram de 0,77, 0,66, 0,55, 1,04 e 0,50, respectivamente, empregando, também, antissoros contra insulina que reagem cruzadamente com a pró-insulina e variados métodos de detecção da pró-insulina.

Alsever e cols. (44) indicaram que a determinação de pró-insulina e seus intermediários de conversão poderia ser útil na investigação de pacientes com insulinoma que apresentam a concentração sérica de insulina dentro dos limites de normalidade.

Ipp e cols. (64) demonstraram que pode haver flutuações na concentração de insulina independentemente da concentração de pró-insulina em pacientes com insulinoma. Portanto, ele sugere que ensaios específicos para a dosagem de pró-insulina sejam empregados preferencialmente para o exame de insulinomas. Kao e cols. (79) também confirmaram a maior acuracidade do diagnóstico de insulinoma empregando-se a dosagem de pró-insulina.

Vários fatores podem contribuir para a hiperproinsulinemia característica dos pacientes com insulinoma como: um aumento na síntese, um defeito na conversão, estocagem e mecanismo de liberação ou uma combinação destes eventos.

Evidências obtidas no estudo "in vitro" com tecido pancreático de paciente portador de insulinoma, indicaram que ocorreu uma diminuição na fase de estocagem da pró-insulina, permitindo sua secreção antes que o processo de conversão para insulina tivesse ocorrido (118).

5.8. APLICAÇÃO DO RADIOIMUNOENSAIO NO ESTUDO DO DIABETES MELLITUS TIPO II ASSOCIADO À OBESIDADE.

O processo de conversão da pró-insulina para insulina é, normalmente, muito eficiente (119,120). Entretanto, em pessoas com diabetes mellitus Tipo II, os níveis de pró-insulina e seus intermediários de conversão estão aumentados em relação à insulina (58,73,75,77,121,122).

O "clearance" da pró-insulina é mediado principalmente pelos rins e ele não sofre alterações no diabetes Tipo II desde que a função renal não esteja prejudicada (121). No diabetes Tipo II ocorre, portanto, um aumento na concentração sérica de pró-insulina e seus intermediários de conversão que induzem a uma piora na deficiência de insulina, já que, este pró-hormônio e seus intermediários de conversão são pouco ativos biologicamente se comparados à insulina (20-23), contribuindo para o desenvolvimento da hiperglicemia.

Duas hipóteses para este aumento nos níveis de pró-insulina foram sugeridas. A primeira seria a de que uma demanda aumentada na secreção de insulina devido à hiperglicemia depletaria os grânulos maduros das células β , resultando na secreção de grânulos imaturos, ricos em pró-insulina (123). Outra hipótese proposta seria a de um defeito no mecanismo enzimático de processamento da pró-insulina (121).

Alarcón e cols. (124) estudaram, recentemente, esta última hipótese empregando um modelo animal e verificaram que a hiperglicemia crônica levou a um aumento na relação PI/I, característica do diabetes Tipo II, mas que este aumento não foi resultado de um defeito enzimático no processamento da pró-insulina. A secreção aumentada de pró-insulina foi, ao contrário, uma consequência da demanda secretória aumentada sobre as células β , induzida pela hiperglicemia.

A maioria das evidências indicam que a resistência à insulina geralmente, inicia a sequência de acontecimentos que culminam no aparecimento do diabetes Tipo II, e que a obesidade é um dos mais importantes fatores causadores desta resistência (125).

O aumento nos níveis basais de insulina pode ser devido também ao fato de que a degradação hepática da insulina em obesos é diminuída. No entanto, foi demonstrado, recentemente, que ocorre um aumento na degradação da insulina pelos tecidos adiposos em animais obesos, provavelmente como um contra-mecanismo para limitar a hiperinsulinemia, ajudando a prevenir uma elevação excessiva de insulina (126).

Quando o pâncreas mantém uma resposta secretória de insulina suficientemente alta para contrabalancear a resistência à insulina, a tolerância à glicose permanece normal ou levemente aumentada. Entretanto, quando as células β começam a falhar, a tolerância à glicose deteriora-se rapidamente resultando no diabetes Tipo II.

Portanto, o desenvolvimento do diabetes Tipo II requer a presença de dois defeitos fundamentais: resistência à insulina e secreção de insulina prejudicada, que rompe o delicado equilíbrio pelo qual os tecidos alvo de insulina se comunicam com as células β e vice-versa (122,127).

Estes autores concluíram que a hiperpró-insulinemia provavelmente representa um estágio final da hiperglicemia severa, devido à super-estimulação das células β pela glicose, e que a solicitação aumentada sobre as ilhotas que já apresentam uma habilidade diminuída para responder, resulta na liberação de grânulos incompletamente processados.

Embora vários estudos tenham descrito concentrações elevadas de pró-insulina em pacientes com diabetes Tipo II (19,37-39,58,128-131), o emprego de diferentes populações de pacientes e diferentes métodos de estudos tornaram difíceis possíveis comparações entre os resultados obtidos. Além disso, a insulina foi determinada empregando-se radioimunoensaios que apresentavam até 100% de reação cruzada com a pró-insulina (74).

No presente estudo, foram avaliadas as concentrações de insulina, peptídeo-C e pró-insulina sérica, dosadas através de radioimunoensaios específicos para cada um dos peptídeos, em indivíduos no estado basal, com tolerância normal à glicose, obesos e pacientes com diabetes Tipo II. O radioimunoensaio desenvolvido identificou predominantemente a pró-insulina intacta, e o radioimunoensaio de insulina

apresentou somente 0,2% de reação cruzada com a pró-insulina.

Verificamos que em relação aos indivíduos de peso normal, os obesos apresentaram concentração de glicose normal, porém acompanhada por um aumento significativo no nível basal de insulina, características verificadas nos casos de resistência à insulina.

Os pacientes obesos não diabéticos e diabéticos apresentaram níveis aumentados de insulina quando comparados a indivíduos de peso normal tanto diabéticos quanto não diabéticos. Os níveis de pró-insulina, no entanto, foram semelhantes para os dois grupos: diabéticos e não diabéticos.

Por outro lado, houve diferença significativa na relação molar PI/I entre os indivíduos não diabéticos obesos e os de peso normal; enquanto não houve diferença entre pacientes diabéticos obesos e pacientes diabéticos de peso normal (Figura 16).

Finalmente, pacientes diabéticos de peso normal e obesos apresentaram níveis de insulina semelhantes à indivíduos não diabéticos, tanto obesos como de peso normal. Houve porém, um aumento significativo nos níveis basais de pró-insulina e na relação molar PI/I dos pacientes diabéticos obesos e de peso normal quando comparados aos indivíduos normais tanto obesos quanto de peso normal (Figura 17).

Yoshioka e cols. (58) e Shiraishi e cols. (131) empregaram um radioimunoensaio de pró-insulina semelhante ao nosso e um radioimunoensaio para insulina, fazendo a correção da reação cruzada com a pró-insulina.

Assim como os nossos resultados, Yoshioka e cols. não observaram diferenças significantes nos níveis de insulina entre os pacientes diabéticos de peso normal e os indivíduos normais. O nível de pró-insulina e a relação molar PI/I no entanto, esteve aumentada nos pacientes diabéticos.

Entretanto, Shiraishi e cols. encontraram em indivíduos obesos, um aumento significativo nos níveis basais de insulina e pró-insulina em comparação a indivíduos de peso normal. A relação molar PI/I no entanto, permaneceu igual tanto para os indivíduos obesos quanto para os de peso normal. Quando eles compararam pacientes diabéticos obesos e de peso normal houve um aumento nos níveis basais

de insulina e pró-insulina nos diabéticos obesos. A relação PI/I entretanto, foi igual para os dois grupos.

Os autores concluíram, neste estudo, que a secreção de pró-insulina estava desproporcionalmente aumentada na presença de intolerância à glicose, mas não devido propriamente à obesidade. As células β pareciam funcionar normalmente em indivíduos obesos enquanto a tolerância à glicose permanecia normal.

Saad e cols. (130), estudando a secreção de pró-insulina em soro de índios Pima não diabéticos, observaram uma diminuição na relação molar PI/I relacionado com o aumento de massa corpórea. Verificou-se, desta maneira, que a resistência crônica à insulina, encontrada nestes indivíduos, não estava associada a um aumento desproporcional no nível de pró-insulina. Além disso, foi sugerido que as ilhotas destes indivíduos processariam a insulina mais eficientemente (122).

Davies e cols. (132) empregaram um ensaio imunorradiométrico para a dosagem de pró-insulina intacta, que apresentou 66% de reação cruzada com a 65,66-split pró-insulina. Os autores observaram, em indivíduos obesos, um aumento significativo nos níveis de insulina em relação a indivíduos de peso normal. Os níveis de pró-insulina, no entanto, foram iguais com diminuição da relação molar PI/I. Os pacientes diabéticos obesos apresentaram aumento de pró-insulina, insulina e na relação molar PI/I quando comparados ao grupo controle de indivíduos obesos.

Uma possível diferença entre os nossos resultados e os de outros autores (130,132) em relação aos dados observados por Shiraishi e cols. (131), pode ser derivado do diferente grau de obesidade estudado. Shiraishi e cols. estudaram indivíduos com IMC < 30, enquanto nós e os demais autores estudamos indivíduos com maior grau de obesidade (> 30). Parece portanto, que em indivíduos não diabéticos, à medida em que aumenta o grau de obesidade, diminui a secreção de pró-insulina ou esta é processada mais eficientemente como propuseram Daniel Porte e cols. (122).

Temple e cols. (73), empregando um ensaio imunorradiométrico que identifica a pró-insulina intacta e 32,33-split e um ensaio imunorradiométrico para insulina que não reage cruzadamente com a pró-insulina, não observaram diferenças nos níveis de insulina dos pacientes diabéticos Tipo II obesos ou de peso normal em relação aos

seus respectivos grupos controle. A concentração de pró-insulina e a relação molar PI/I no entanto, estiveram aumentadas nos pacientes diabéticos Tipo II tanto obesos quanto de peso normal.

Quando os mesmos autores analisaram os pacientes diabéticos Tipo II obesos em comparação aos diabéticos Tipo II de peso normal, não encontraram diferenças significantes entre os níveis basais de insulina, pró-insulina ou na relação molar PI/I (74); resultados estes concordantes com os encontrados em nossos estudos.

Reaven e cols. (77) empregando um ensaio imunoenzimático que reconheceu também o derivado de conversão 31,32-des e 64,65-des, e um radioimunoensaio de insulina que foi corrigido para reação cruzada com pró-insulina, observaram que houve sobreposição de valores nas concentrações de insulina em indivíduos normais e pacientes com diabetes Tipo II. Houve, porém, aumentos na concentração de pró-insulina no diabetes e na relação molar PI/I.

Eles concluíram, também, que a concentração de insulina plasmática é superestimada em pacientes com diabetes Tipo II, quando medida por radioimunoensaios convencionais e que, quanto maior a concentração de glicose plasmática, maior é a contribuição da pró-insulina a qual é, geralmente, medida como insulina.

Assim como Reaven e cols., Polonsky e cols. (133), empregando ensaio imunoenzimático que reconheceu também os derivados de conversão 31,32-des e 64,65-des, observaram níveis plasmáticos de insulina semelhantes em indivíduos obesos diabéticos ou não diabéticos. A concentração de pró-insulina, no entanto, foi maior nos pacientes diabéticos com aumento, também, na relação molar PI/I.

Portanto, apesar do radioimunoensaio por nós desenvolvido não identificar o derivado de conversão 31,32-des, que juntamente com a pró-insulina intacta corresponde ao principal componente relacionado à pró-insulina circulante, foi possível empregar-se esse radioimunoensaio no estudo de pacientes diabéticos.

Os resultados observados foram semelhantes àqueles obtidos com o emprego de ensaios imunorradiométricos e imunoenzimáticos, que indicaram a existência de uma desordem no processo de secreção da pró-insulina pelas células β pancreáticas no diabetes mellitus Tipo II.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

1. Foram desenvolvidas e padronizadas as etapas do radioimunoensaio de pró-insulina humana, a saber: preparo do traçador, produção e purificação do anticorpo, padronização dos métodos de ensaio e separação.
2. Evidenciou-se que o traçador preparado neste trabalho é puro e estável.
3. O antissoro anti-pró-insulina obtido apresentou título e avidéz adequados para o desenvolvimento do radioimunoensaio e tomou-se altamente específico após adsorção contra insulina e peptídeo-C, reconhecendo a junção entre a cadeia B da insulina e o peptídeo-C (65,66-split pró-insulina).
4. O estudo da constante de afinidade (K_a) e a cinética de ligação do antissoro, permitiu uma acentuada redução no tempo de ensaio para a dosagem da pró-insulina. Isso representou um avanço em relação a outros métodos de radioimunoensaio que, tipicamente, empregam incubações a 4°C por períodos superiores a 96 h.
5. O método de separação do ensaio empregando o segundo antissoro assistido pelo PEG é um método simples e rápido para a separação da pró-insulina livre daquela ligada ao anticorpo no sistema de radioimunoensaio.
6. Como a maioria dos métodos de radioimunoensaio, nosso ensaio não foi suficientemente sensível para a dosagem de níveis normais de pró-insulina sem a necessidade de concentração prévia.

7. As técnicas de extração e concentração empregada foram simples, rápidas e acuradas, permitindo o processamento de várias amostra simultaneamente.
8. O controle de qualidade do radioimunoensaio mostrou que o método é altamente específico, reprodutível e acurado, com uma sensibilidade $\geq 0,03$ pmoL/mL (erro $< 20\%$) para a medida dos níveis de pró-insulina.
9. A validade deste radioimunoensaio foi confirmada pela nítida discriminação das concentrações de pró-insulina entre níveis normais e elevados desse pró-hormônio (insulinoma e insuficiência renal crônica).
10. O radioimunoensaio desenvolvido foi aplicado no estudo do diabetes Tipo II associado à obesidade:
 - ◆ Verificou-se que a obesidade não contribuiu para o aumento na secreção de pró-insulina em indivíduos normais e em pacientes com diabetes Tipo II.
 - ◆ Nos pacientes diabéticos Tipo II observou-se um aumento nos níveis de pró-insulina quando comparados aos indivíduos normais obesos ou de peso normal, entretanto não existiram diferenças entre os níveis de insulina sérica.
 - ◆ Portanto, a relação molar PI/I esteve aumentada no diabetes, associado ou não à obesidade, podendo ser empregado como indicador de falência das células β pancreáticas.
11. Embora o radioimunoensaio desenvolvido não identifique o derivado de conversão 32,33-des pró-insulina, encontrado no soro em proporção semelhante à da pró-insulina intacta, ele pôde ser utilizado no estudo da disfunção das células β pancreáticas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- STEINER, D.F. ; OYER, P.E.- The biosynthesis of insulin and a probable precursor of insulin by a human islet cell adenoma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 57:473-480, 1967.
- 2- STEINER, D.F.; CUNNINGHAM, D.; SPIGELMAN, L.; ATEN, B.- Insulin biosynthesis: evidence for a precursor. Science, 157:697-700, 1967.
- 3- RUBENSTEIN, A.H.; CHO, S.; STEINER, D.F.- Evidence for proinsulin in human urine and serum. Lancet, 1:1353-1355, 1968.
- 4- ROTH, J.; GORDEN, P.; PASTAN, I.- "Big" insulin: a new component of plasma insulin detected by immunoassay. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 61:138-145, 1968.
- 5- GORDEN, P. & ROTH, J.- Plasma insulin: fluctuation in the "big" insulin component in man after glucose and other stimuli. J. Clin. Invest., 48:2225-2234, 1969.
- 6- MELANI F.; RUBENSTEIN, A.H.; STEINER, D.F.- Circulating proinsulin. Diabetes, 18 (Suppl. 1):340, 1969 (abstract 50).
- 7- MELANI, F.; RUBENSTEIN, A.H.; STEINER, D.F.- Human serum proinsulin. J. Clin. Invest., 49:497-507, 1970.
- 8- GUTMAN, R.A.; LAZARUS N.R.; PENHOS, J.C.; RECANT, L.; FAJANS, S. Proinsulin (PI) and proinsulin-like material (PI-IM) in serum of patients with islet cell tumors. Diabetes, 19(Suppl 1):360, 1970 (abstract 19).

- 9- CHANCE, R.E.; ELLIS, R.M.; BROMER, W.W.- Porcine proinsulin: characterization and amino acid sequence. Science, 161:165-1617, 1968.
- 10- CLARK, J.L.; CHO, S.; RUBENSTEIN, A.H.; STEINER, D.F.- Isolation of a proinsulin connecting peptide fragment (C-peptide) from bovine and human pancreas. Biochem. Biophys. Res. Commun., 35:456-461, 1969.
- 11- OYER, P.E.; CHO, S.; PETERSON, J.D.; STEINER, D.F.- Studies on human proinsulin. isolation and amino acid sequence of the human pancreatic C-peptide. J. Biol. Chem, 246:1375-1386, 1971.
- 12- CHAN, S.J.; KLEIM, P.; STEINER, D.F.- Cell-free synthesis of rat preproinsulins: characterization and partial amino acid sequence determination. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73:1964-1968, 1976.
- 13- ORCI, L.; VASSALLI, J.; PERRELET, A.- The insulin factory. Sci. Am., 259:50-61, 1988.
- 14- NAGAMATSU, S. ; GRODSKY, G.M. - Glucose-regulated proinsulin processing in isolated islets from rat pancreas. Diabetes, 37:1426-1431, 1988.
- 15- DAVIDSON, H.W.; RHODES, C.J.; HUTTON, J.C.- Intraorganellar Ca and pH control proinsulin cleavage in the pancreatic B-cell via two distinct site-specific endopeptidases. Nature, 333:93-96, 1988.
- 16- RHODES, C.J.; LINCOLN, B.; SHOELSON, S.E.- Preferential cleavage of des-31,32-proinsulin over intact proinsulin by the insulin secretory granule type II endopeptidase. J. Biol. Chem., 267(32):22719-22727, 1992.

- 17- DOCHERTY, K. & HUTTON, J.C.;- Carboxypeptidase activity in the insulin secretory granule. FEBS Lett., 162:137-141, 1983.
- 18- GIVEN, B.D.; COHEN, R.M.; SHOELSON, S.E.; FRANK, B.H.; RUBENSTEIN, A.H.; TAGER, H.S.- Biochemical and clinical implications of proinsulin conversion intermediates. J.Clin. Invest., 76:1396-1405, 1985.
- 19- HORWITZ, D.L.; STARR, J.I.; MAKO, M.E.; BLACKARD, W.G.; RUBENSTEIN, A.H. - Proinsulin , insulin and C-peptide concentrations in human portal and peripheral blood. J. Clin. Invest., 55:1278-1283, 1975.
- 20- PEAVY D.E.; BRUNNER M.R.; DUCKWORTH W.C.; HOOKER C.S.; FRANK B.H.- Receptor binding and biological potency of several split forms (conversion intermediates) of human proinsulin. Studies in cultured IM-9 lymphocytes and in vivo and in vitro in rats. J. Biol. Chem., 260:13989-13994, 1985.
- 21- TILLIL, H.; FRANK, B.H.; PEKAR, A.H.; BROELSCH, C.; RUBENSTEIN, A.H.; POLONSKY, K.S.- Hypoglycemic potency and metabolic clearance rate of intravenously administered human proinsulin and metabolites. Endocrinology, 127:2418-2422, 1990.
- 22- REVERS, R.R; HENRY, R.; SCHMEISER, L., KOLTERMAN, O.; COHEN,R.; BERGENSTAL, R.; POLONSKY, K.; JASPAN, J.; RUBENSTEIN, A.; FRANK,B.; GALLOWAY, J.; OLEFSKY, J.M.- The effects of biosynthetic human proinsulin on carbohydrate metabolism. Diabetes, 33:762-770, 1984.
- 23- GALLOWAY J.A.; Treatment of NIDDM with insulin agonists or substitutes. Diabetes Care, 13:1209-1239, 1990.

- 24- BERGENSTAL, R.M.; COHEN, R.M.; LEVER, E.; POLONSKY, K.; JASPAN, J.; BLIX, P.M.; REVERS, R.; OLEFSKY, J.M.; KOLETERMAN, O. STEINER, K.;CHERRINGTON, A.; FRANK, B.; GALLOWAY, J.; RUBENSTEIN, A.H.- The metabolic effects of biosynthetic human proinsulin in individuals with type 1 diabetes. J. Clin. Endocrinol. Metab., 58:973-979, 1984.
- 25- KATZ, A.I. ; RUBENSTEIN, A.H. - Metabolism of proinsulin, insulin and C-peptide in the rat. J. Clin. Invest., 52:1113-1121, 1973.
- 26- ZILKER, T.R.; REBEL, CH.; KOPP, K.F.; WAHL, K.; ERMLER, R.; HEINZEL, G.; HALES, C.N.; BOTTERMANN, P.- Kinetics of biosynthetic human proinsulin in patients with terminal renal insufficiency. Horm. Metab. Res., 18 (Suppl.): 43-48, 1988.
- 27- RUBENSTEIN, A.H.; POTTENGER, L.A.; MAKO, M.; GETZ, G.S.; STEINER, D.F.- The metabolism of proinsulin and insulin by the liver. J. Clin. Invest., 51:912-921, 1972.
- 28- POLONSKY, K.S.; GIVEN, B.D.; HIRSCH, L.; BEEBE, C.; FRANK, B.H.; GALLOWAY, J.A.; VAN CAUTER, E.- Quantitative study of insulin secretion and clearance in normal and obese subjects. J. Clin. Invest., 81:435-441, 1988.
- 29- TILLIL, H.; SHAPIRO, E.T.; RUBENSTEIN, A.H.; GALLOWAY, J.A.; POLONSKY, K.S.- Reduction of insulin clearance during hyperglycemic clamp: a dose-response study in normal man. Diabetes, 37:1351-1357, 1988.
- 30- POLONSKY, K.S.- The β -cell in diabetes: From molecular genetics to clinical research. Diabetes, 44:705-717, 1995.

- 31-POLONSKY, K.S.; LICINIO-PAIXÃO, J.; GIVEN, B.D.; PUGH, W.; RUE, P.; GALLOWAY, J.; KARRISON, T.; FRANK, B.- Use of biosynthetic human C-peptide in the measurement of insulin secretion rates in normal volunteers and type I diabetic patients. J. Clin. Invest., 77:98-105, 1986.
- 32- GORDEN, P.; SHERMAN, B.; ROTH, J.- Proinsulin-like component of circulating insulin in the basal state in patients and hamsters with islet cell tumors. J. Clin. Invest., 50:2113-2122, 1971.
- 33- SHERMAN, B.M., PEK, S.; FAJANS, S.S; FLOYD, J.C.; CONN, J.W.- Plasma proinsulin in patients with functioning pancreatic islet cell tumor. J. Clin. Endocrinol. Metab., 35:271-280, 1972.
- 34- RUBENSTEIN, A.H.; STEINER, D.F.; HORWITZ, D.L.; MAKO, M.E.; BLOCK, M.B.; STARR, J.I.; KUZUYA, H.; MELANI, F. Clinical significance of circulating proinsulin and C-peptide. Recent. Prog. Horm. Res. 33:435-475, 1977.
- 35- KITABCHI, A.E.; DUCKWORTH, W.C.; BRUSH, J.S.; HEINEMANN, M.- Direct measurement of proinsulin in human plasma by the use of an insulin-degrading enzyme. J. Clin. Invest., 50:1792-1799, 1971.
- 36- STARR, J.I.; JUHN, D.D.; RUBENSTEIN, A.H.- Degradation of insulin in serum by insulin-specific protease. J. Lab. Clin. Med., 86:631-637, 1975.
- 37- MAKO, M.E.; STARR, J.I.; RUBENSTEIN, A. - Circulating proinsulin in patients with maturity onset diabetes. Am. J. Med., 3:865-869, 1977.
- 38- GORDEN, P.; HENDRICKS, C.M.; ROTH, J. -Circulating proinsulin like component in man: increased proportion in hypoinsulinemic states. Diabetologia, 10:469-474, 1974.

- 39- DUCKWORTH, W.C.; KITABCHI, A.E.; HEINEMANN, M.- Direct measurement of plasma proinsulin in normal and diabetic subjects. Am. J. Med., 53:418-427, 1972.
- 40- MAKO, M.E.; BLOCK, M.; STARR, J.I., NIELSON, E.; FRIEDMAN, E.; RUBENSTEIN, A. - Proinsulin in chronic renal and hepatic failure: a reflection of the relative contributions of the liver and kidney to its metabolism. Clin. Res., 21:631, 1973.
- 41- JASPAN, J.B.; MAKO, M.E.; KUZUYA, H.; BLIX, P.M.; HORWITZ, D.L.; RUBENSTEIN, A.H. - Abnormalities in circulating beta cell peptides in chronic renal failure: Comparison of C-peptide, proinsulin and insulin. J. Clin. Endocrinol. Metab., 45:441-446, 1977.
- 42- MELANI, F.; RYAN, W.G.; RUBENSTEIN, A.H.; STEINER, D.F. - Proinsulin secretion by a pancreatic beta-cell adenoma: Proinsulin and C-peptide secretion. N. Engl. J. Med., 283:713-719, 1970.
- 43- GUTMAN, R.A.; LAZARUS, N.R.; PENHOS, J.C.; FAJANS, S.; RECANT, L.- Circulating proinsulin-like material in patients with functioning insulinomas. N. Engl. J. Med., 284:1003-1008, 1971.
- 44- ALSEVER, R.N.; ROBERTS, J.P.; GERBER, J.G.; MAKO, M.E.; RUBENSTEIN, A.H. - Insulinoma with low circulating insulin levels: The diagnostic value of proinsulin measurements. Ann. Intern. Med., 82:347-350, 1975.
- 45- FAJANS, S.S. ; FLOYD, J.C. - Diagnosis and medical management of insulinomas. Ann. Rev. Med., 30:313-329, 1979.

- 46- GABBAY, K.H.; DELUCA, K.; FISHER, J.N.; MAKO, M.E.; RUBENSTEIN, A.H. - Familial hyperproinsulinemia. N. Engl. J. Med., 294:911-915, 1976.
- 47- GABBAY, K.H.; BERGENSTAL, R.M.; WOLFF, J.; MAKO, M.E.; RUBENSTEIN, A.H. - Familial characterization of circulating proinsulin-like material. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:2881-2885, 1979.
- 48- ROBBINS, D.C.; SHOELSON, S.E.; RUBENSTEIN, A.H.- Familial hyperproinsulinemia. Two cohorts secreting indistinguishable Type II intermediates of proinsulin conversion. J. Clin. Invest., 73:714-719, 1984.
- 49- HEDING, L.G. ; RASMUSSEN, S.M. - Direct and specific determination of human proinsulin in normal and diabetic serum. Diabetologia, 12:396, 1976 (abstract 115).
- 50- HEDING, L.G. - Specific and direct radioimmunoassay for human proinsulin in serum. Diabetologia, 13:467-474, 1977.
- 51- WARD K.W.; PAQUETTE T.L.; FRANK B.H.; PORTE D. A sensitive radioimmunoassay for human proinsulin, with sequential use of antisera to C-peptide and insulin. Clin. Chem., 32:726-733, 1986.
- 52- GRAY I.P.; SIDDLE K.; DOCHERTY K.; FRANK B.H.; HALES C.N.- Proinsulin in human serum: problems in measurement and interpretation. Clin. Endocrinol., 21:43-47, 1984.

- 53- FRANK, B.H.; PETTEE, J.M.M; ZIMMERMAN, R.E.; BURCK, P.J.- The production of human proinsulin and its transformation to human insulin and C-peptide. In: D.H. e GROOS eds. Peptides: Synthesis-structure-function. Proceedings of the Seventh American Peptide Symposium, Pierce Chemical Co., Illinois, 1981, p. 729-38.
- 54- 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.
- 55- DEACON, C.F. ; CONLON, J.M.- Measurement of circulating human proinsulin concentrations using a proinsulin-specific antiserum. Diabetes, 34:491-497, 1985.
- 56- 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.; RUBENSTEIN, A.H.- Proinsulin radioimmunoassay in the evaluation of insulinomas and familial hyperproinsulinemia. Metabolism, 35:1137-1146, 1986.
- 57- HAMPTON, S.M.; BEYZAVI, K.; TEALE, D.; MARKS, V.- A direct assay for proinsulin in plasma and its applications in hypoglycaemia. Clin. Endocrinol., 29:9-16, 1988.
- 58- YOSHIOKA, N.; KUZUIA, 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, 31:355-360, 1988.

- 59- BOWSHER, R.R.; WOLNY, J.D.; FRANK, B.H. - A rapid and sensitive radioimmunoassay for the measurement of proinsulin in human serum. Diabetes, 41:1084-1090, 1992.
- 60- RUBENSTEIN, A.H. ; STEINER, D.F. - Human proinsulin: Some considerations in the developmetn of a specific immunoassay. In: R.A. CAMERINI-DAVALOS; H.S. COLE, eds. Early diabetes, Academic Press, New York, 1970, p. 159-69.
- 61- KRUSE, V.; HEDING, L.G.; JORGENSEN, K.H.; TRONIER, B.; CHRISTENSEN, M.; THIM, L.; FRANK, B.H.; ROOT, M.A.; COHEN, R.M.; RUBENSTEIN, A. Human proinsulin standards. Diabetologia, 27:414-415, 1984.
- 62- BRISTOW, A.F. ; GAINES, DAS R.E. - Who international reference reagents for human proinsulin and human insulin C-peptide. J. Biol. Stand., 16:182-186, 1988.
- 63- OOHASHI, H.; OHGAWARA, H.; NANJO, K.; TASAKA, Y.; CAO, Q-P; CHAN, S.J.; RUBENSTEIN, A.H.; STEINER, D.F.; OMORI, Y.- Familial hyperproinsulinemia associated with NIDDM. Diabetes Care, 16 (10):1340-1346, 1993.
- 64- IPP, E.; GRIFFITHS, S.M.; BOWSHER, R.R.; TARRIS, R.H.; ZHOU, D.B.; TERLECKI, M.E.- Fluctuations in plasma proinsulin in an insulinoma. Diabetes Care, 15 (7):931-933, 1992.
- 65- HAFFNER, S.M.; MYKKANEN, L.; STERN, M.P.; VALDEZ, R.A.; HEISSERMAN, J.A.; BOWSHER, R.R.- Relationship of proinsulin and insulin to cardiovascular risk factors in nondiabetic subjects. Diabetes, 42:1297-1302, 1993.

- 66- HAFFNER, S.M.; MYKKANEN, L.; VALDEZ, R.A.; STERN, M.P.; MONTERROSA, A.; BOWSER, R.R.- Disproportionately increased proinsulin levels are associated with the insulin resistance syndrome. J. Clin. Endocrinol. Metab., 79:1806-1810, 1994.
- 67- BERSON S.E. ; YALOW R.S.- Kinetics of reaction between insulin and insulin-binding antibody. J. Clin. Invest., 36:873-874, 1975.
- 68- YALOW R.S. ; BERSON S.A.- Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. Nature, 184:1648-1649, 1959.
- 69- BERSON S.A. ; YALOW R.S.- General principles of radioimmunoassay. Clin. Chim. Acta, 22:51-69, 1968.
- 70- BORGHI V.C.- Dosagens hormonais in vitro com radioisótopos. Considerações gerais e análise crítica. Cienc. Cult., 35 (10):1456-1466, 1983.
- 71- HARTLING, S.G.; DINESEN, BO; KAPPELGARD, A.M.; FABER, O.K.; BINDER, C.- Elisa for human proinsulin. Clin. Chim. Acta, 156:289-298, 1986.
- 72- SOBEY, W.J.; BEER, S.F.; CARRINGTON, C.A.; CLARK, P.M.S.; FRANK, B.H.; GRAY, P.; LUZIO, S.D.; OWENS, D.R.; SCHNEIDER, A.E.; SIDDLE, K.; TEMPLE, R.C.; HALES, C.N.- Sensitive and specific two-site immunoradiometric assays for human insulin, proinsulin, 65-66 split and 32-33 split proinsulins. Biochem. J., 260: 535-541, 1989.
- 73- TEMPLE, R.C.; CARRINGTON, C.A.; LUZIO, S.D.; OWENS, D.R.; SCHNEIDER, A.E.; SOBEY, W.J.; HALES, C.N.- Insulin deficiency in non-insulin-dependent diabetes. Lancet, 1:293-295, 1989.

- 74- TEMPLE, R.C.; CLARK, P.M.S.; NAGI, D.K.; SCHNEIDER, A.E.; YUDKIN, J.S.; HALES, C.N.- Radioimmunoassay may overestimate insulin in non-insulin-dependent diabetics. Clin. Endocrinol., 32:689-693, 1990.
- 75- NAGI, D.K.; HENDRA, T.J.; RYLE, A.J.; COOPER, T.M.; TEMPLE, R.C; CLARK, P.M.S.; SCHNEIDER, A.E.; HALES, C.N.; YUDKIN, J.S.- The relationships of concentrations of insulin, intact proinsulin and 32-33 split proinsulin with cardiovascular risk factors in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic subjects. Diabetologia, 33:532-537, 1990.
- 76- OSTREGA, D.; POLONSKY, K.; NAGI, D.; YUDKIN, J.; COX, L.J.; CLARK, P.M.S.; HALES, C.N.- Measurement of proinsulin and intermediates. Validation of immunoassay methods by high-performance liquid chromatography. Diabetes, 44:437-440, 1995.
- 77- REAVEN, G.M.; CHEN, Y.DI; HOLLENBECK, C.B.; SHEU, W.H.H.; OSTREGA, D.; POLONSKY, K.S.- Plasma insulin, C-peptide and proinsulin concentrations in obese and nonobese individuals with varying degrees of glucose tolerance. J. Clin. Endocrinol. Metab., 76:44-48, 1993.
- 78- RODER, M.E.; VAAG, A.; HARTLING, S.G.; DINESEN, B.; LANNG, S.; BECK-NIELSEN, H.; BINDER, C.- Proinsulin immunoreactivity in identical twins discordant for non-insulin-dependent diabetes mellitus. J. Clin. Endocr. Metab.; 80:2359-2363, 1995.
- 79- KAO, P.C.; TAYLOR, R.L.; SERVICE, F.J.- Proinsulin by immunochemiluminometric assay for the diagnosis of insulinoma. J. Clin. End. Metab., 78 (5):1048-1051, 1994.

- 80- VAITUKAITIS, J.; ROBBINS, J.B.; NIESCHLAG, E.; ROSS, G.T. -A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. J. Clin. Endocrinol., 33:988-991, 1971.
- 81- ABBOTT LABORATORIES, Diagnostics Division. Operator's Manual, ANSR Gamma Counter, Chicago, Diagnostics Division, 1981, p.5.
- 82- CUATRECASAS, P. ; ANFISEN, C.B.- Enzyme purification and related techniques. In: JAKOBY, W.B. ed. Methods in Enzymology. New York, N.Y., Academic Press, 1971. v. XXII, p. 345-378.
- 83- TAGER, H.S.; RUBENSTEIN, A.H.; STEINER, D.F.- Methods for the assessment of peptide precursors. Studies on insulin biosynthesis. In: O'MALLE B.W.; HARDMAN J.G. eds. Methods in Enzymology. New York, N.Y., Academic Press, 1975. v. XXXVII, p. 327-345.
- 84- GOLOVINA, T.O.; CHREDNIKOVA, T.V.; MEVKH, A.T.; NAGRADOVA, N.K.- A convenient method for the estimation of sepharose-bound protein. Analytical Biochemistry, 83:778-781, 1977.
- 85- SCATCHARD, G.- The attractions of proteins for small molecules and ions. Ann. N. Y. Acad. Sci., 51:660-672, 1949.
- 86- STATISTICAL GRAPHICS SYSTEM. Version 2.6.
- 87- MESQUITA, C.H. Modelo para determinação da absorção de substâncias radioativas. Aplicação em radioiodosimetria e nutrição. São Paulo, 1991. Tese Doutorado - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.

- 88- FRAKER, P.J ; SPECK, J.C. Jr. - Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide 1,3,4,6-tetrachloro-3 alfa, 6 alfa-diphenilglycoluril. Biochem. Biophys. Res. Commun., 80:849-857, 1978.
- 89- NASCIMENTO, M.; BORGHI, V.C.; WAJCHENBERG, B.L.- Aprimoramento da técnica de marcação de pró-insulina biossintética humana para uso em radioimunoensaio. In: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ENERGIA NUCLEAR. Energia Nuclear: Anais do IV Congresso Geral de ... realizado no Rio de Janeiro, 5-9 de julho, 1992. Rio de Janeiro, 1992. v.2, p.653-664.
- 90- TOWER, B.B. - The talc-resin-trichloroacetic acid test for screening radioiodinated polypeptide hormones. In: Methods in Enzymology, New York, N.Y. Academic Press, 1980. v.70, p. 322-334.
- 91- ENGLEBIENNE, P. ; SLEGERS, G.- Estimation of the specific activity of radioiodinated gonadotrophins: comparison of three methods. J. Immunol. Methods., 56:135-140, 1983.
- 92- DAVIS B. J.- Disc electrophoresis. II. Methods and application to human serum proteins. Ann. N. Y. Acad. Sci., 121:404-427, 1964.
- 93- BORGHI, V. C.; LIN, H. L.; LOPES, E. M. L. e MORAES, V. K.- Avaliação do RIAKALK: um programa para microcomputadores de análise de dados do radioimunoensaio. São Paulo, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, 1992 (Publicação IPEN 362).
- 94- PRIMER- Mc Graw-Hill Inc. Version 1.0, 1988.

- 95- LIN, H.L. ; BORGHI, V.C.- Controle de qualidade de radioimunoensio para doseagem de tireotrofina em extratos hipofisários humanos. In: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ENERGIA NUCLEAR. Energia Nuclear: Anais do 4º Congresso Geral de... realizado no Rio de Janeiro, 5-9 de julho de 1992. Rio de Janeiro, 1992. v.2. p. 647-652.
- 96- ADRIAN, T.E.- Radioimmunoassay of gut regulatory peptides. In: BLOOM, S.R., LONG, R.G. eds. Methods in laboratory medicine, Praeger, New York, 1982, v.2, p.30.
- 97- ALBUQUERQUE, R.H.- Controle de qualidade em radioimunoensaio. Arq. Bras. Endocrinol. Metabol., 25:120-124, 1981.
- 98- EKINS, R.P.- Basic concepts in quality control. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Radioimmunoassay and related procedures. Proceedings of an international symposium on ... held in Berlin, 1977. Vienna, 1978. v.2, p.6-20.
- 99- MIDGLEY, A.R.; NISWENDER, G.D.; REBAR, R.W.- Principles for the assessment of the reliability of radioimmunoassay methods (precision, accuracy, sensitivity, specificity). Acta Endocrinol. (Suppl.), 142:163-184, 1969.
- 100- RODBARD, D.- *Quality control for RIA.* In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Radioimmunoassay and related procedures in medicine. Proceedings of an international symposium on ... held in Berlin, 1977. Vienna, 1978. v.2, p.21-38.

- 101- NASCIMENTO, M.; BORGHI, V.C.; WAJCHENBERG, B.L.- Otimização da técnica de extração da pró-insulina humana do soro para dosagem no radioimunoensaio empregando cartuchos de fase reversa Sep-Pak C₁₈. In: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ENERGIA NUCLEAR. Energia Nuclear: Anais do V Congresso Geral de ... realizado no Rio de Janeiro, 28 de agosto a 2 de setembro, 1994. Rio de Janeiro, 1994. v. III, p.905-908.
- 102- NATIONAL DIABETES DATA GROUP. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. Diabetes, 28:1039-1057, 1979.
- 103- HIGA, O.Z.; SOUZA, I.T.T. - Standardization of plasma insulin and growth hormone. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine. Proceedings of an international symposium on ...held in Vienna, 1974. Vienna, 1974. v. I, p.291-307.
- 104- FREYCHET, P.; ROTH, J.; NEVILLE, D.M.- Monoiodoinsulin: Demonstration of its biological activity and binding to fat cells and liver membranes. Biochem. Biophys. Res. Commun., 43:400-407, 1971.
- 105- InStat-Graphpad software . Version 2.00, 1993.
- 106- NASCIMENTO, M.; BORGHI, V.C.; BELLINI, M.H.; MESQUITA, C.H.; WAJCHENBERG, B.L.- Avaliação comparativa dos procedimentos de imunização para obtenção de antissoro anti-pró-insulina humana para radioimunoensaio. São Paulo, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, 1992 (Publicação IPEN 374).

- 107- HURN, B.A. ; LANDON, J.- Antisera for radioimmunoassay. In: KIRKHAM, K.E.; HUNTER, W.M. eds. Radioimmunoassay methods. Churchill Livingstone. Edinburgh and London, 1971, p.121-142.
- 108- AXÉN, R.; PORATH, J.; ERNBACK, S.- Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides. Nature, 214:1302-1304, 1967.
- 109- CUATRECASAS, P.- Interaction of insulin with the cell membrane: the primary action of insulin. Proc. Natl. Acad. Sci USA, 63:450-457, 1969.
- 110- HALBAN, P.A.- Proinsulin conversion intermediates: A possible source of confusion. Diabetologia, 34:202-203, 1991.
- 111- YALOW, R.S. ; BERSON, S.A.- Introduction and general considerations. In: ODELL, W.D. ; DAUGHADAY, W.H. eds. Principles of competitive protein binding assays. Philadelphia, J.B. Lippincott, 1971, p.1-24.
- 112- HUNTER, W.M.- Preparation and assessment of radioactive tracers. Br. Med. Bull., 30:18-23, 1974.
- 113- FRANK, B.H.; BURCK, P.J.; HUTCHINS, J.F.; ROOT, M.A.- The preparation of iodine-labelled biosynthetic human proinsulin. In: PETERSON, K.G.; SCHLUETER, K.J.; KARP, L., eds. Neue Insuline. Freiburg, FRG, Freiburger Graphische Betriebe, 1982, p. 45-50.
- 114- YALOW, R.S. ; BERSON, S.A.- Problems of validation of radioimmunoassays. In: ODELL, W.D. ; DAUGHADAY, W.H. eds. Principles of competitive protein binding assays. Philadelphia, J.B. Lippincott, 1971, p.374-400.

- 115- BRISTOW, A.F. ; DAS, R.E.G.- Who international reference reagents for human proinsulin and human insulin C-peptide. J. B. Standardization, 16:179-186, 1988.
- 116- CHARD, T.- Ammonium sulfate and polyethylene glycol as reagents to separate antigen from antigen-antibody complexes. In: VANVUNAKIS, K.; LANGONE, J.J. eds. Methods in Enzymology., New York, Academic, 1980, v. 70, p.280-291.
- 117- PRATT, J.J. ; WOLDRING, M.G.- Radioimmunoassay specificity and the "first-come, first-served effect". Clinica Chimica Acta, 68:87-90, 1976.
- 118- CREUTZFELDT, C.; TRACK, N.S.; CREUTZFELDT, W.- In vitro studies of the rate proinsulin and insulin turnover in seven human insulinomas. Eur. J. Clin. Invest., 3:371-384, 1973.
- 119- RHODES, C.J. ; HALBAN, P.A.- Newly-synthesized proinsulin/insulin and stored insulin are released from pancreatic B-cells via a regulated, rather than a constitutive pathway. J. Cell. Biol., 105:145-153, 1987.
- 120- SIZONENKO, S.; IRMINGER, J.C.; BUHLER, L.; DENG, S.; MOREL, P.; HALBAN, P.- Kinetics of proinsulin conversion in human islets. Diabetes, 42:933-936, 1993.
- 121- PORTE, D. ; KAHN, S.E.- Hyperproinsulinemia and amyloid in NIDDM: Clues to etiology of islet β -cell dysfunction. Diabetes, 38:1333-1336, 1989.
- 122- PORTE, D. Jr.- β -cells in type II diabetes mellitus. Diabetes, 40:166-180, 1991.

- 123- RHODES, C.J. ; ALARCÓN, C.- What β -cell defect could lead to hyperproinsulinemia in NIDDM: some clues from recent advances made in understanding the proinsulin conversion mechanism. Diabetes, 43:511-517, 1994.
- 124- ALARCÓN, C.; LEAHY, J.L.; SCHUPPIN, G.T.; RHODES, C.J.- Increased secretory demand rather than a defect in the proinsulin conversion mechanism causes hyperproinsulinemia in a glucose-infusion rat model of non-insulin-dependent diabetes mellitus. J. Clin. Invest., 95:1032-1039, 1995.
- 125- BAGDADE, J.D.; BIERMAN, E.L.; PORTE, D.JR.- Significance of basal insulin levels in the evaluation of the insulin response to glucose in diabetic and nondiabetic subjects. J. Clin. Invest., 46:1549-1557, 1967.
- 126- RAFECAS, I.; LOPEZ, J.A.F.; SALINAS, I.; FORMIGUERA, X.; REMESAR, X.; FOX, M.; ALEMANY, M.- Insulin degradation by adipose tissue is increased in human obesity. J. Clin. Endocrinol. Metab., 80:693-695, 1995.
- 127- DEFRONZO, R.A.; BONADONNA, R.C.; FERRANNINI, E.- Pathogenesis of NIDDM. A balanced overview. Diabetes Care, 15:318-368, 1992.
- 128- DEACON, C.F.; SCHLESER-MOHR; BALLMANN, M.; WILLMS, B.; CONLON, J.M.; CREUTZFELDT, W.- Preferential release of proinsulin relative to insulin in non-insulin-depend diabetes mellitus. Acta Endocrinol., 119:549-554, 1988.
- 129- WARD, W.K.; LA CAVA, E.C.; PAQUETTE, T.L.; BEARD, J.C.; WALLUM, B.J.; PORTE, D. JR.- Disproportionate elevation of immunoreactive proinsulin in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and in experimental insulin resistance. Diabetologia, 30:698-702, 1987.

- 130- SAAD, M.; KAHN, S.E.; NELSON, R.; PETTIT, R.; KNOWLER, J.; SCHWARTZ, M.W.; KOWALYK, S.; BENNET, P.; PORTE, D. Jr.- Disproportionately elevated proinsulin in Pima Indians with non-insulin dependent diabetes mellitus. J. Clin. Endocrinol. Metab., 70:1247-1253, 1990.
- 131- SHIRAISHI, I.; IWAMOTO, Y.; KUZUYA, T.; MATSUDA, A.; KUMAKURA, S.- Hyperinsulinaemia in obesity is not accompanied by an increase in serum proinsulin/insulin ratio in groups of human subjects with and without glucose intolerance. Diabetologia, 34:737-741, 1991.
- 132- DAVIS, S.N.; PIATTI, P.M.; MONTI, L.; BROWN, M.D.; BRANCH, W.; HALES, C.N.; ALBERTI, K.G.M.M.- Proinsulin and insulin concentrations following intravenous glucose challenges in normal, obese and non-insulin-dependent diabetic subjects. Metabolism, 42 (1):30-35, 1993.
- 133- POLONSKY, K.S.; GUMBINER, B.; OSTREGA, D.; GRIVER, K.; TAGER, H.; HENRY, R.R.- Alterations in immunoreactive proinsulin and insulin clearance induced by weight loss in NIDDM. Diabetes, 43:871-877, 1994.

8- ANEXO

Tabela 1- Características clínicas dos indivíduos do grupo controle normal.

Indivíduo	Sexo	Idade (anos)	Peso (Kg)	Altura (m)	*IMC (Kg/m ²)
JSSS	F	27	56,0	1,63	21
AAT	M	26	80,0	1,80	25
NSS	M	24	53,0	1,72	18
MASI	M	25	70,0	1,70	24
ALND	F	26	60,0	1,60	23
VLMS	F	32	52,0	1,50	22
DLO	F	34	64,5	1,61	25
JSS	M	22	61,9	1,71	21
MEPA	F	31	48,2	1,52	21
MASS	F	27	64,0	1,62	24
EJ	M	19	61,0	1,82	18
OBS	M	29	64,0	1,75	21
NCP	F	38	58,0	1,63	22
AMS	M	30	62,0	1,72	21
KMK	F	25	60,7	1,60	24
EM	M	26	69,2	1,75	23

*IMC= índice de massa corpórea

Tabela 2- Características clínicas dos pacientes com insuficiência renal crônica.

Pacientes	Sexo	Idade (anos)	Peso (Kg)	Altura (m)	IMC (Kg/m ²)
NT	M	48	69,4	1,68	25
JFL	M	28	51,3	1,78	16
OB	M	58	64,1	1,68	23
NSO	F	56	57,5	1,53	24
ME	M	16	49,3	1,72	17
HMS	F	21	46,1	1,62	17
JNO	M	36	68,5	1,69	24
NMT	M	48	80,0	1,68	28
RS	M	30	65,5	1,77	21
EVS	F	41	66,0	1,58	26
SMS	F	39	53,0	1,54	22
CMF	M	29	59,1	1,65	22
NP	M	46	58,5	1,72	20
CCP	F	43	45,8	1,52	20
VSS	F	21	46,6	1,51	20
EM	M	29	70,0	1,80	22
KMO	F	23	57,0	1,60	22
EASL	F	38	55,0	1,60	21
LFP	F	17	58,3	1,75	19
PK	M	43	71,0	1,66	26

Tabela 3- Características clínicas dos pacientes com insulinoma.

Pacientes	Sexo	Idade (anos)
EPB	F	52
MELV	M	32
MMG	F	42
FAV	M	20
EJCL	F	36
PFL	M	45

Tabela 4- Características clínicas das mulheres obesas

Pacientes	Idade (anos)	Peso (Kg)	Altura (m)	IMC (Kg/m ²)
SLR	38	96,1	1,65	35
MLAL	52	79,5	1,56	33
RS	17	75,0	1,59	30
ONB	52	107,2	1,60	52
VAN	40	116,7	1,67	42
EMS	38	86,6	1,60	34
MSM	50	69,8	1,51	31
RSC	25	64,0	1,44	31
SMC	40	117,6	1,71	40
YAS	44	71,4	1,55	30
MAMG	20	76,2	1,64	28
PMC	37	79,2	1,49	36
MLTJ	18	83,1	1,66	30
SVS	28	106,0	1,64	39
DPS	41	84,4	1,58	34
FCPS	34	77,6	1,59	30
VSS	33	77,0	1,57	31
LSF	27	155,0	1,73	27
AAPR	50	11,20	1,58	45
RGGA	29	100,8	1,67	36
MAOM	41	114,8	1,61	44
JJC	43	71,7	1,54	30
MGSO	30	58,8	1,49	26
VNSC	14	83,2	1,76	27

Tabela 5- Características clínicas dos pacientes diabéticos Tipo II não obesos.

Pacientes	Sexo	Idade (anos)	Peso (Kg)	Altura (m)	IMC (Kg/m ²)
JFR	M	53	57,5	1,68	20
FMM	M	45	69,5	1,66	25
TMBR	F	52	41,0	1,60	16
RPS	F	50	54,5	1,54	23
JAS	M	45	63,7	1,65	23

Tabela 6- Características clínicas dos pacientes diabéticos Tipo II obesos.

Pacientes	Sexo	Idade (anos)	Peso (Kg)	Altura (m)	IMC (Kg/m ²)
LBB	F	24	79,0	1,54	33
NMN	F	43	70,0	1,50	31
MABS	F	33	77,0	1,62	29
MPC	F	60	68,0	1,51	30
MSC	F	38	64,5	1,47	30
IBN	M	35	98,5	1,70	34
CLV	M	54	84,0	1,74	28

Tabela 7- Características metabólicas dos indivíduos do grupo controle normal.

Indivíduo	Uréia (mg/dL)	Creat. (mg/dL)	Colest. (mg/dL)	Trigl. (mg/dL)	Glicose (mg/dl)	HbA1c (%)	Pró-insulina (pmol/mL)	Insulina (pmol/mL)	Peptídeo-C (pmol/mL)	Relação Molar PI/I	Relação Molar I/Pept.C
JSSS	37	0,7	180	8,0	82	5,3	0,016	0,074	0,301	0,22	0,24
AAT	33	1,2	120	4,5	80	4,7	0,016	0,064	0,364	0,25	0,18
NSS	25	0,9	190	7,0	81	5,3	0,022	0,061	0,278	0,34	0,22
MASI	44	1,0	148	4,0	86	6,6	0,017	0,052	0,165	0,48	0,32
ALND	18	0,6	190	9,0	89	7,0	0,016	0,039	0,328	0,41	0,12
VLMS	23	0,8	180	9,0	89	4,2	0,015	0,068	0,401	0,22	0,17
DLO	21	0,6	190	9,0	90	5,1	0,019	0,059	0,341	0,32	0,17
JSS	28	0,9	180	6,0	89	3,8	0,017	0,078	0,304	0,22	0,25
MEPA	32	0,7	130	8,0	76	5,7	0,010	0,076	0,271	0,24	0,28
MASS	15	0,8	170	6,0	82	6,8	0,022	0,061	0,235	0,36	0,26
EJ	28	0,7	190	10,0	77	4,7	0,025	0,049	0,165	0,51	0,29
OBS	25	0,4	180	8,0	94	6,0	0,023	0,068	0,450	0,34	0,15
NCP	22	0,6	160	7,0	91	5,7	0,029	0,076	0,477	0,38	0,16
AMS	29	0,8	180	8,0	98	4,1	0,021	0,054	0,308	0,39	0,17
KMK	24	0,6	180	9,0	84	5,4	0,017	0,055	0,665	0,31	0,08
EM	28	0,9	180	6,0	103	5,2	0,014	0,060	0,235	0,40	0,26

Tabela 8- Características metabólicas dos pacientes com insuficiência renal crônica.

Pacientes	Uréia (mg/dL)	Creat. (mg/dL)	Glicose (mg/dL)	HbA1c (%)	Pró-insulina (pmol/mL)	Insulina (pmol/mL)	Peptídeo-C (pmol/mL)	Relação molar PI/I	Relação molar I/Pept.C
NT	164	14,8	113	9,0	0,044	0,117	4,849	0,38	0,02
JFL	49	3,5	119	5,9	0,046	0,141	1,857	0,33	0,08
OB	165	10,7	117	7,1	0,049	0,119	3,095	0,41	0,04
NSO	118	6,4	101	4,7	0,040	0,039	2,036	1,02	0,02
ME	175	13,7	93	5,7	0,042	0,028	1,449	1,50	0,02
HMS	202	12,1	97	8,3	0,031	0,041	2,152	0,76	0,02
JNO	242	11,6	95	—	0,049	0,188	2,357	0,26	0,08
NMT	164	14,8	113	9,0	0,030	0,058	2,274	0,52	0,02
RS	182	9,6	116	8,5	0,038	0,107	1,721	0,36	0,06
EVS	37	3,7	90	7,2	0,026	0,068	2,916	0,38	0,02
SMS	42	2,7	90	6,7	0,032	0,024	2,625	1,33	0,01
CMF	143	13,7	109	10,8	0,041	0,176	2,684	0,23	0,06
NP	56	4,3	106	9,8	0,033	0,172	2,529	0,19	0,07
CCP	136	6,5	—	—	0,039	0,148	0,487	0,26	0,30
VSS	30	2,3	86	7,5	0,037	0,057	0,166	0,65	0,34
EM	177	15,6	82	8,3	0,048	0,062	2,896	0,77	0,02
KMO	230	13,2	78	8,6	0,059	0,055	4,064	1,07	0,01
EASL	172	11,6	66	—	0,030	0,063	2,499	0,48	0,02
LFP	256	11,3	80	6,7	0,044	0,119	1,288	0,37	0,09
PK	137	5,8	130	7,8	0,023	0,042	0,079	0,55	0,53

Tabela 9- Características metabólicas dos pacientes com insulinoma.

Pacientes	Glicose (mg/dL)	Pró-insulina (pmol/mL)	Insulina (pmol/mL)	Peptídeo-C (pmol/mL)	Relação Molar PI/I	Relação Molar I/Pept.C
EPB	31	0,06	0,09	0,43	0,7	0,2
MELV	38	0,09	0,19	0,64	0,5	0,3
MMG	62	0,33	0,56	1,69	0,6	0,3
FAV	40	0,12	0,12	1,37	1,0	0,1
EJCL	32	0,26	0,31	1,86	0,8	0,2
PFL	30	0,26	0,26	1,17	1,0	0,2

Tabela 10- Características metabólicas das mulheres obesas.

Pacientes	Uréia (mg/dL)	Creat. (mg/dL)	Glicose (mg/dL)	HbA1c (%)	Pró-insulina (pmol/mL)	Insulina (pmol/mL)	Peptídeo-C (pmol/mL)	Relação Molar PI/I	Relação Molar I/Pept.C
SLR	24	0,6	96	6,2	0,014	0,084	0,142	0,17	0,59
MLAL	23	0,7	95	—	0,019	0,055	0,103	0,34	0,53
RS	18	0,7	84	5,7	0,021	0,142	0,019	0,15	0,86
ONB	37	0,8	102	—	0,033	0,098	0,609	0,34	0,16
VAN	25	1,0	109	5,2	0,035	0,322	0,757	0,11	0,42
EMS	26	0,6	88	6,7	0,017	0,172	0,212	0,09	0,81
MSM	26	0,9	106	6,7	0,015	0,224	0,434	0,07	0,52
RSC	27	0,8	80	4,7	0,012	0,818	0,079	0,01	10,35
SMC	—	—	97	4,9	0,030	1,378	0,083	0,02	6,60
YAS	51	0,7	106	4,1	0,021	0,299	0,831	0,07	0,36
MAMG	35	0,9	97	7,7	0,029	0,101	0,778	0,29	0,13
PMC	23	0,8	80	5,3	0,016	0,105	0,338	0,15	0,31
MLTJ	21	0,9	83	6,6	0,024	0,083	0,499	0,29	0,17
SVS	29	0,7	78	—	0,036	0,121	0,612	0,29	0,19
DPS	30	0,7	84	—	0,029	0,057	0,175	0,51	0,32
FCPS	37	0,9	86	—	0,013	0,055	0,338	0,24	0,16
VSS	—	0,8	96	5,6	0,034	0,092	0,049	0,37	1,88
LSF	—	0,6	107	3,8	0,031	0,119	1,132	0,26	0,10
AAPR	34	0,7	83	—	0,025	0,058	0,169	0,43	0,34
RGGA	25	1,0	103	—	0,040	0,119	1,119	0,34	0,11
MAOM	20	0,7	83	—	0,027	0,059	0,576	0,46	0,10
JJC	30	0,6	80	—	0,011	0,065	0,225	0,17	0,29

Tabela 11- Características metabólicas dos pacientes diabéticos Tipo II não obesos.

Pacientes	Uréia (mg/dl)	Creat. (mg/dL)	Glicose (mg/dL)	HbA1c (%)	Pró-insulina (pmol/mL)	Insulina (pmol/mL)	Peptídeo-C (pmol/mL)	Relação Molar PI/I	Relação Molar I/Pept.C
JFR	22	0,8	326	15,1	0,021	0,046	0,182	0,45	0,25
FMM	27	0,8	335	16,4	0,041	0,056	0,679	0,73	0,08
TMBR	—	0,8	174	8,3	0,040	0,056	0,589	0,71	0,09
RPS	29	0,7	175	—	0,046	0,085	0,986	0,54	0,09
JAS	20	1,0	340	—	0,021	0,073	0,096	0,29	0,76

Tabela 12- Características metabólicas dos pacientes diabéticos Tipo II obesos.

Pacientes	Uréia (mg/dl)	Creat. (mg/dL)	Glicose (mg/dL)	HbA1c (%)	Pró-insulina (pmol/mL)	Insulina (pmol/mL)	Peptídeo-C (pmol/mL)	Relação Molar PI/I	Relação Molar I/Pept.C
LBB	25	0,7	244	17,3	0,049	0,079	0,828	0,62	0,09
NMN	26	0,6	306	—	0,102	0,085	0,635	1,20	0,13
MABS	28	0,8	322	9,3	0,048	0,079	0,328	0,61	0,24
MPC	40	1,0	471	9,8	0,045	0,106	1,738	0,42	0,06
MSC	—	0,8	319	8,0	0,032	0,090	0,592	0,35	0,15
IBN	—	—	342	11,9	0,025	0,067	1,026	0,37	0,07
CLV	46	1,1	185	8,0	0,049	0,101	0,351	0,49	0,29