



I Congresso Geral de Energia Nuclear

Rio de Janeiro, 17 a 20 de Março de 1986

ANAIS - PROCEEDINGS

RADIOAÇÃO CONTROLADA DA INSULINA DE PORCO COM CLORAMINA T PARA RADIOENSAIOS

Iracelia Torres de Toledo e Souza

Daniel Gianella Neto

Bernardo Leo Wajchenberg

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
Comissão Nacional de Energia Nuclear - SP

Sumário

Desenvolvemos a técnica de radioiodação controlada de insulina de porco pelo método de Hunter e Greenwood (método clássico da cloramina T) com as modificações sugeridas por Roth (adições de quantidades sucessivas e limitadas de cloramina T). Obtivemos hormônio marcado com atividade específica satisfatória e estudamos as características do radioimunoensaio, baseado na competição de insulina de porco ^{125}I e insulina fria para anticorpo específico.

Abstract

Stoichiometric iodination and purification of porcine insulin was performed to the general method of Hunter and Greenwood (classical chloramine T) with modifications recommended by Roth (chloramine T is added in limiting amounts in multiple small additions). Satisfactory specific activity of the labeled hormone was obtained and the characteristics of the radioimmunoassay, based on the competition of the ^{125}I labeled porcine and cold insulin for specific antibody were studied.

INTRODUÇÃO

Os radioensaios, como em todo ensaio competitivo, não exigem uma identidade entre hormônio marcado e não marcado, pois a condição necessária para a validade desta técnica é que o hormônio marcado se ligue ao anticorpo ou receptor específicos e que a ligação seja inibida por hormônio não marcado. Entretanto a qualidade e características da preparação marcada são importantes na determinação da sensibilidade e reprodutibilidade do ensaio. O método clássico da cloramina T para marcação de polipeptídios pode conduzir a preparações marcadas com imunoreatividade e estabilidade diminuídas com redução da afinidade por parte das células receptoras, e maior afinidade para sítios não específicos (2), presumivelmente em virtude da exposição da proteína a excesso de agente oxidante, cloramina T, ou redutor metabissulfito de sódio, ou ainda por ter incorporado mais de um átomo de iodo (125-I) por molécula. Para obviar estes inconvenientes utilizamos o método de Hunter e Greenwood (1) com as modificações sugeridas por Roth (4), lenta e progressiva adição de cloramina T em quantidades controladas, nas exatas proporções das massas envolvidas e não em excesso, como convencionalmente. A fim de não ultrapassar a quantidade estequiométrica de cloramina T acompanhamos a cinética da reação através de amostragens sucessivas que permite avaliar o progresso do rendimento. A adição de uma pequena quantidade de um redutor (metabissulfito de sódio) evitará qualquer ulterior reação oxidativa. Sendo a insulina um hormônio peptídico de caráter básico e baixo peso molecular, pode ser adsorvida a celulose através de grupos funcionais do adsorvente e ser eluída por eluente adequado.

Tivemos como objetivo a obtenção de insulina de porco marcada com 125-I (125-I - pIns) com alta atividade específica e elevado grau de pureza com a manutenção de sua atividade imunológica.

MATERIAL E MÉTODOS

Adicionamos os reagentes no tubo de iodação, à temperatura ambiente, na seguinte sequência: 35 ul de Tampão Fosfato 0,3M pH 7,5, 1,1, mCi de 125-I e 4ul de insulina de porco (1mg/ml em ácido clorídrico 0,01N), 15 ul de cloramina T (40ug/ml em Tampão Fosfato). A seguir transferimos uma pequena alíquota do material de marcação para um tubo contendo 1ml de Tampão Fosfato e 1ml de uma solução a 10% de ácido tricloroacético (TCA), para determinarmos após centrifugação, o percentual de radioatividade precipitado pelo TCA. Em nossos laboratórios obtivemos nesta fase 43% em média de incorporação de 125-I. Uma nova adição de cloramina T (10ul) foi suficiente para um rendimento de reação adequado, em torno de 70%. No total adicionamos apenas 1ug de cloramina T. Após a adição de 5ul de metabissulfito de sódio (200ug/ml em Tampão Fosfato) adicionamos 100ul de BSA 2,5% (bovine serum albumin em Tampão Fosfato).

PURIFICAÇÃO

A purificação da insulina 125-I foi realizada pelo método de adsorção a celulose, coluna de pó de celulose Whatman, acondicionada em uma pipeta Pasteur com cerca de 0,7 cm de diâmetro. Aplicamos o material marcado no topo da coluna e aguardamos a sua total incorporação. Lavamos a coluna 10 vezes com 0,5 ml de água destilada. Exercemos certa pressão de ar (pequena pera) no topo da coluna para esgotar o volume correspondente a cada uma das eluições (iodo livre e fração danificada). A insulina 125-I foi eluída atra

vês de 4 vezes 0,5 ml de uma solução álcool-ácido (álcool etílico: ácido clorídrico concentrado: água destilada: 7,50: 0,15: 2,35 ml) coletando cada fração em tubo separado e identificado. Controlamos a pureza pela precipitação através do percentual de radioatividade precipitado pelo TCA 10% e a imunorreatividade, reação da 125-I-p Ins. com o anticorpo específico na diluição de 1:20.000, pela precipitação da forma ligada ao anticorpo com polietilenoglicol (PEG) 25%.

RESULTADOS E CONCLUSÕES

A Tabela 1 reúne os percentuais de rendimentos finais realizados em 10 marcações, avaliados pelo método do TCA. A média da atividade específica calculada em cada marcação foi de 188,9mCi/mg com amplitude de 180-204. O teste de Kruskal-Wallis aplicado, após a classificação por "scores" dos valores percentuais obtidos nos testes de pureza (Tabela 2) e imunorreatividade (Tabela 3), revelou diferença estatisticamente significativa entre os 4 eluatos tanto para o teste de pureza como de imunorreatividade. Apesar de não se obter diferença estatisticamente significativa entre os eluatos 1 e 2 do teste de pureza, observou-se diferença estatisticamente significativa entre os eluatos 1 e 2 do teste de imunorreatividade. O critério para utilização do 2º eluato baseou-se em percentuais de pureza acima de 95% e na melhor percentagem de ligação da 125 I-p Ins. ao anticorpo específico. Demonstrou-se também adequado para ensaios com receptores específicos em parede celular de eritrócitos (3).

TABELA 1

Rendimento de marcação da 125 I-p Ins.		
Partida	TCA	At. Esp.
nº	%	mCi/mg
1	77	188
2	68	184
3	77	180
4	74	204
5	73	186
6	62	181
7	71	189
8	70	200
9	62	195
10	70	182
	\bar{x} = 70,40	188,90
	SD = 5,32	8,24
	CV = 7,56	4,36

Tabela 2

Valores percentuais de pureza nos eluatos da coluna de celulose (TCA)

partida	eluatos				
	nº	1º	2º	3º	4º
1	98	97	95	91	91
2	97	97	94	90	90
3	96	97	94	90	90
4	96	95	92	90	90
5	97	96	94	90	90
6	96	96	93	89	89
7	95	96	91	89	89
8	92	95	93	88	88
9	97	98	96	91	91
10	94	96	94	90	90
	\bar{x} = 95,80	96,30	93,60	89,80	
	SD = 1,75	0,95	1,41	0,92	
	Σ "scores" = 284,5	305	174,5	56	

Tabela 3

Percentuais da ligação da 125 I-p Ins. ao anticorpo específico pela precipitação com PEG 25% nos eluatos da coluna da celulose

partida	eluatos				
	nº	1º	2º	3º	4º
1	48	50	45	40	40
2	50	55	47	43	43
3	43	48	38	35	35
4	52	60	48	45	45
5	40	45	35	30	30
6	50	54	43	39	39
7	42	46	38	34	34
8	39	45	35	28	28
9	51	56	46	42	42
10	44	50	38	30	30
	\bar{x} = 45,90	50,90	41,30	36,60	
	SD = 4,84	5,15	5,03	6,04	
	Σ "scores" = 243,5	318,5	161	97	

BIBLIOGRAFIA

1. HUNTER, W.M. AND GREENWOOD, F.C. Preparation of iodine 131 labeled human growth hormone of high specific activity. Nature, 194:495-496, May 1962.
2. LEIDENBERGER, F. AND REICHERT, L.E.Jr. Studies on the uptake of human chorionic gonatropin and its subunits by rat testicular homogenates and interstitial tissue. Endocrinology. 91 (1):135-143, Jul. 1972.
3. LEME, C.E., ROBBARD, H.W., NEGRATO, C.A., OHNUMA, L.C., WACHENBERG, B.L.E., SOUZA, I.T.T., Receptores de insulina em hemácias humanas. Arq. Bras. Endocrinol. Metabol. 23 (4) 131-137, Out. 1979.
4. ROTH, J. Peptide hormone binding to receptors: A review of direct studies in vitro. Metabolism. 22 (8): 1059-1073, Aug. 1973.