



2 CONGRESSO  
GERAL DE  
ENERGIA NUCLEAR

24 A 29 DE ABRIL DE 1988

ANAIS - PROCEEDINGS

PREPARAÇÃO, PURIFICAÇÃO E ESTOCAGEM DE RADIOINSULINAS

Iracelia Torres de Toledo e Souza  
Daniel Giannella Neto  
Bernardo Léo Wajchenberg

Departamento de Processamento  
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES  
COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR  
São Paulo - SP

Sumário

Desenvolvemos a técnica de radioiodação controlada de insulina de porco pelo método de Hunter e Greenwood com as modificações sugeridas por Roth. Este método foi comparado com a radioiodação usando Iodogen. O Iodogen reage em fase sólida com a mistura aquosa de  $I^-$  e proteína. Obtivemos, nos 2 métodos, insulina de porco marcada com atividade específica satisfatória e estudamos as características do radioimunoensaio.

Abstract

Stoichiometric iodination of porcine insulin was performed to the general method of Hunter and Greenwood with modifications recommended by Roth. These method was compared with radioiodination using Iodogen. Films of Iodogen react rapidly in the solid phase with aqueous mixtures of  $I^-$  and proteins. For two methods satisfactory activity of the labeled porcine insulin was obtained and the characteristics of the radioimmunoassay were studied.

## INTRODUÇÃO

O método clássico da cloramina T para a marcação de polipeptídeos, quando se deseja alcançar alta atividade específica (Ae), pode conduzir a preparações marcadas com imunorreatividade e estabilidade diminuídas, presumivelmente em virtude da exposição da proteína ao excesso deletério dos agentes oxidantes (Cloramina T) e redutores (metabissulfito de sódio). Para obviar estes inconvenientes padronizamos e comparamos 2 métodos de preparação de radioinsulinas. Ambos procedimentos são realizados em condições moderadas, evitando-se o excessivo contato com os reagentes e consequentemente, menor agressão à molécula proteica. Objetivou-se a obtenção de radioinsulinas com alta atividade específica da molécula no sentido de manter a estabilidade e imunoreatividade expressas pelas ligações inespecíficas e máxima com o anticorpo específico na ausência de antígeno.

### IODAÇÃO CONTROLADA DA CLORAMINA T:

Utilizamos o método clássico de Hunter e Greenwood(4) com as modificações sugeridas por Roth(3) que preconiza lenta e progressiva adição de quantidades controladas de cloramina T, nas exatas proporções das massas envolvidas e não em excesso, como convencionalmente. A fim de não ultrapassar a quantidade estequiométrica de cloramina T avaliamos a cinética da reação a cada nova adição de agente oxidante. A adição de pequena quantidade de um redutor (metabissulfito de sódio) evitará o prosseguimento ulterior da reação.

### IODOGEN:

Foi descrito primeiramente por Fraker e Speck(2) como um reagente para iodação de proteínas e membranas celulares. O Iodogen (1,3,4,6-tetracloro-3a-6a-difenilglicoluril) intervem na iodação rápida em fase sólida (potencialmente menos destrutiva) em solução aquosa de  $I^-$  e proteína. Pelo fato de ser pouco solúvel em água é preparado em solvente orgânico, distribuído em tubos que serão usados para a reação de iodação e secos à temperatura ambiente. Forma-se um fino filme na base. Pode-se preparar previamente os tubos de reação para uma estocagem de até 6 meses. O Iodogen permanece na fase sólida durante a reação de iodação e o hormônio é difundido na área em que está contido o reagente. A reação é interrompida pela simples remoção do produto marcado do tubo de reação.

### PURIFICAÇÃO DO PRODUTO MARCADO:

Sendo a insulina um hormônio peptídico de caráter básico e baixo peso molecular, pode ser adsorvida à celulose através de grupos funcionais do adsorvente(1) e ser eluída por eluente adequado. As radioinsulinas obtidas pelos 2 métodos de marcação, foram purificadas por este sistema

### MATERIAL E MÉTODOS:

Nos 2 métodos de marcação utilizamos a mesma quantidade de insulina de porco (4 $\mu$ g) e  $^{125}I$  de 125-I.

#### RADIOAÇÃO CONTROLADA DA CLORAMINA T:

No tubo de iodação adicionamos 35 $\mu$ l de Tampão Fosfato 0,3M pH 7,5; 1mCi de 125-I; 4 $\mu$ l de insulina de porco (4 $\mu$ g em q.s.p. ácido clorídrico 0,01N) e 15 $\mu$ l de cloramina T (0,6 $\mu$ g em q.s.p. Tampão Fosfato 0,3M pH 7,5). Determinamos o percentual de radioatividade pela precipitação com ácido tricloroacético TCA 10%. Em geral foram necessárias 2 adições de cloramina T para se obter o rendimento adequado da reação. No total adicionamos apenas 1 $\mu$ g de cloramina T. Após a adição de 5 $\mu$ l de metabissulfito de sódio (1 $\mu$ g em q.s.p. Tampão Fosfato 0,3M pH 7,5) adicionamos 100 $\mu$ l de BSA 25% (bovine serum albumin em Tampão Fosfato).

#### IODOGEN:

No tubo de iodação (2 $\mu$ g de iodogen preparado previamente com diclorometano como solvente) adicionamos 10 $\mu$ l de 125-I (1mCi de 125-I em q.s.p. Tampão Fosfato 0,5M pH 7,5) e 10 $\mu$ l de insulina de porco (4 $\mu$ g em q.s.p. Tampão Borato 0,05M pH 8,5). O rendimento de marcação foi obtido pela determinação do percentual de radioatividade pela precipitação com TCA 10%.

#### PURIFICAÇÃO:

A purificação da insulina de porco marcada pelos 2 métodos foi realizada através da adsorção à celulose (coluna de pó de celulose Whatmann CF 11) acondicionada até a altura de 4cm em uma pipeta Pasteur com cerca de 0,7cm de diâmetro.

Aplicamos o material marcado no topo da coluna aguardando a sua total incorporação. Lavamos 10 vezes a coluna com 0,5ml de água destilada, exercendo 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 de porco 125-I adsorvida à celulose, foi eluída através de uma solução álcool-ácido (álcool etílico:ácido clorídrico concentrado:água destilada-7,50:0,15:2,35ml) coletando-se cada fração em tubo separado e identificado. Controlamos a pureza de cada fração pelo percentual de radioatividade precipitado pelo TCA 10%.

#### ESTABILIDADE E IMUNORREATIVIDADE:

O conteúdo dos 4 eluatos da coluna de celulose foram testados para observar a percentagem de ligações inespecíficas e propriedade de se ligar adequadamente ao anticorpo específico. Para as ligações inespecíficas os tubos testes foram preparados com 0,1ml do traçador ( $\sim$ 20.000 cpm) e 0,2ml de Tampão Fosfato 0,04M pH 7,5 contendo 5 $\mu$ g/ml de albumina humana. Para a imunorreatividade 0,1ml de traçador ( $\sim$ 20.000 cpm) 0,1ml de anticorpo específico (diluição 1:20.000) e 0,1ml de Tampão Fosfato 0,04M pH 7,5 contendo 5 $\mu$ g/ml de albumina humana. Após a incubação de 24 horas a 4 $^{\circ}$  separamos a insulina livre e ligada ao anticorpo pela precipitação da forma ligada com 0,3ml de polietilenoglicol (PEG) 25%. A única variável foi a radioinsulina marcada com cloramina T e Iodogen.

#### ESTOAGEM:

Preparamos em Tampão Fosfato 0,04M pH 7,5 volumes suficientes de anticorpo específico (diluição 1:20.000) e traçador ( $2^{\circ}$  eluato da coluna de celulose) de cada radioinsulina ( $\approx$  20.000 cpm por tubo) para testar as ligações inespecíficas e imunorreatividade das radioinsulinas marcadas pelos 2 métodos para uma estocagem de até 60 dias.

#### RESULTADOS E CONCLUSÕES:

**Eficiência da Marcação:** Expressa como percentagem do total de radioatividade incorporada à fração proteica. As medianas dos rendimentos de reação (78 e 79%) e das atividades específicas (195 e 197  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ ) não foram estatisticamente diferentes entre os 2 métodos. (Tabela 1)

**Purificação:** As 4 frações eluídas da coluna de celulose apresentaram (Tabela 2) percentuais de pureza que variaram de 90 a 98% sendo que o eluato 2 apresentou mediana dos percentuais de pureza maior para a Cloramina T.

**Estabilidade e Imunorreatividade:** Testes realizados nos 4 eluatos obtidos após purificação em coluna de celulose, mostraram ligações inespecíficas próximas (em torno de 5%). A ligação máxima foi maior para o método da Cloramina T (Tabela 3).

**Estocagem:** As radioinsulinas preparadas pelos 2 métodos (3 marcações para cada método) submetidas a testes de estabilidade (ligações inespecíficas) e imunorreatividade (reação antígeno-anticorpo) utilizando o eluato 2 como traçador (Tabela 4 e figura 1) resultaram em ligações inespecíficas inalteradas e diminuição da imunorreatividade (queda do percentual de ligação B0/T) durante a estocagem de 60 dias. A percentagem da queda de ligação máxima em relação à ligação inicial foi maior para o método da cloramina T no 1 $^{\circ}$  e 30 $^{\circ}$  dia após a marcação. A percentagem de queda da ligação máxima em relação à inicial foi maior para o método da cloramina T 30 dias após a marcação, porém não houve diferenças entre os 2 métodos 60 dias após a marcação.

Ambos os métodos mostraram-se adequados para a obtenção de radioinsulina com alta atividade específica. Foi possível a utilização dos preparados até 2 meses após a marcação com manutenção das ligações não específicas baixa e máxima de no mínimo 30% sem necessidade de repurificação.

O método do Iodogen revelou-se mais simples na sua consecução que o método estequiométrico da cloramina T e é adequado na obtenção de radioinsulina com alta atividade específica permitindo utilização prolongada em radioimunoensaios do preparado iodado. Além da sua simplicidade técnica, pode permitir maior vida útil da proteína marcada. Os tubos de reação revestidos com o reagente, podem ser armazenados indefinidamente, evitando-se assim, a preparação muitas vezes tediosa dos reagentes comumente utilizados no método de marcação pela Cloramina T.

TABELA 1

## EFICIÊNCIA DA MARCAÇÃO

Partida	Cloramina T			Iodogen	
	TCA	Ae		TCA	Ae
Nº	%	µCi/µg		%	µCi/µg
1	81	205		79	197
2	78	195		77	192
3	76	190		80	200
X	78	195		79	197

$$T_{TCA} X I_{TCA} : p > 0,05 \text{ (NS)}$$

$$T_{Ae} X I_{Ae} : p > 0,05 \text{ (NS)}$$

TABELA 2

Valores percentuais de pureza nos 4 eluatos da coluna de celulose (TCA).

Partida	Cloramina T				Iodogen			
	1	2	3	4	1	2	3	4
1	98	97	95	91	96	96	92	90
2	97	97	94	90	97	96	94	90
3	96	97	94	90	96	96	93	90
X	97	97	94	90	96	96	93	90

$$T_1 X I_1 : p > 0,05 \text{ (NS)}$$

$$T_2 X I_2 : p < 0,05$$

$$T_3 X I_3 : p > 0,05 \text{ (NS)}$$

$$T_4 X I_4 : p > 0,05 \text{ (NS)}$$

TABELA 3

Razão do nível de radioatividade do complexo anticorpo-insulina de porco I25-I adicionada ao tubo de reação na ausência de insulina 'fria' (BO/T).

Partida	ELUATOS							
	Percentagem de ligação (BO/T)							
	Cloramina T				Iodogen			
Nº	1	2	3	4	1	2	3	4
1	44	46	38	34	40	42	35	31
2	43	45	36	32	37	40	33	29
3	44	47	35	33	36	39	31	28
X	44	46	36	33	37	40	33	29

T<sub>1</sub> X I<sub>1</sub> : p < 0,05  
 T<sub>2</sub> X I<sub>2</sub> : p < 0,05  
 T<sub>3</sub> X I<sub>3</sub> : p > 0,05 (NS)  
 T<sub>4</sub> X I<sub>4</sub> : p < 0,05

TABELA 4

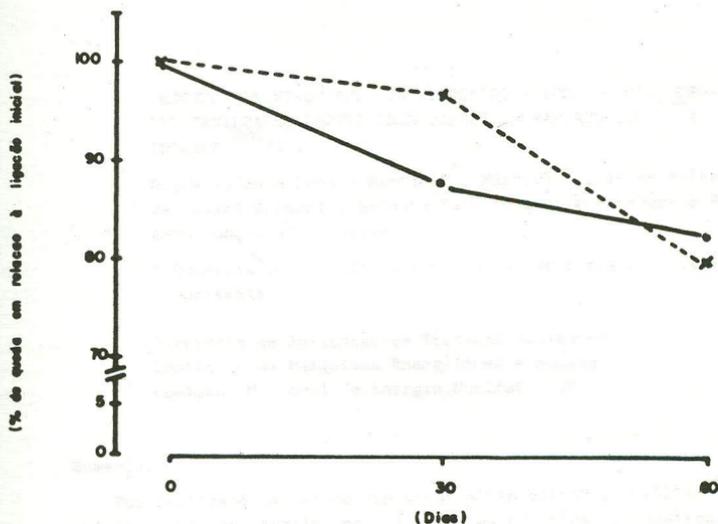
Estocagem (Eluato 2). Percentagem de ligação BO/T.

Partida	DIAS					
	Cloramina T			Iodogen		
	Nº	1	30	60	1	30
1	43	40	29	37	36	22
2	46	41	38	32	31	30
3	48	43	40	40	37	35
X	46	41	40	37	36	30

T<sub>1</sub> X I<sub>1</sub> : p < 0,05  
 T<sub>30</sub> X I<sub>30</sub> : p < 0,05  
 T<sub>60</sub> X I<sub>60</sub> : p > 0,05 (NS)

Figura 1

Porcentagem de queda da ligação máxima (30) em relação ao tempo de marcação (30 e 60 dias) com os métodos de cloramina T (—•—•) e iodogen (x-----x).



BIBLIOGRAFIA:

1. BERSON, SA and YALOW, RS. General Methodology In: Yalow,RS Methods in radioimmunoassay of peptide hormone. Amsterdam,North-Holland:14-17,1976.
2. FRAKER,P.J. and SPECK; J.C. Protein and Cell membrane iodinations with a Sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-tetrachloro-3a-6a-Diphenylglycoluril Biochem.Biophys.Res.Comm. 80: 849-857, February,1978.
3. Freychet,P; ROTH,J;NEVILLE JR.,D.M. Monoiodoinsulin: demonstration of its biological activity and binding to fat cells and liver membranes. Biochem.Biophys.Res.Comm. 43:400-408, April,1971.
4. 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.