



22 a 27 de abril de 1990

ANAIS - PROCEEDINGS

OBTENÇÃO DE ANTÍSSORO PARA RADIOIMUNOENSAIO DE PRÓ-INSULINA HUMANA: RESULTADOS PRELIMINARES.

Martha do Nascimento¹
 Vânia Caira Borghi¹
 Maria Helena Bellini¹
 Bernardo Leo Wajchenberg²

¹ Departamento de Aplicações em Ciências Biológicas
 Divisão de Medicina
 Comissão Nacional de Energia Nuclear - IPEN-CNEN/SP

² Disciplina de Endocrinologia e Metabologia da
 Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

Na tentativa de se obter um antissoro anti-Pró-Insulina (PI) para radioimunoensaio, foram imunizadas cinco cobaias jovens através de injeções subcutâneas de 50 µg de PI humana biossintética (Eli Lilly and Company, USA), seguidas de reforço a cada 3 semanas com colheita de sangue 14 dias após. Após a 1ª injeção um único animal veio a óbito e a partir da 10ª semana, três cobaias desenvolveram antíssoros com títulos de 1:15.000, 1:1.500 e 1:300; enquanto que apenas um animal apresentou título menor do que 1:300. O estudo da especificidade desses três antíssoros mostrou reatividade cruzada apenas com a insulina, cujos anticorpos foram removidos pela adsorção com insulina-Sepharose. Entretanto, os antíssoros foram pouco sensíveis, sendo apenas adequados para o radioimunoensaio de amostras de pacientes com níveis elevados de pró-insulinemia. Esquemas alternativos de imunização, visando a obtenção de antíssoros mais sensíveis, são discutidos.

ABSTRACT

In attempt to the production of antiproinsulin antisera for the radioimmunoassay, five guinea pigs received 50 µg of biosynthetic human proinsulin (Eli Lilly and Company, USA) injected subcutaneously. Booster injections were administered at 3 weeks intervals and blood was taken 14 days after the injection. One out of five guinea pigs died after the first injection. Just after the 10th week, three guinea pigs developed antisera with titers of 1:15.000, 1:1.500 and 1:300 and one of them presented titer lower than 1:300. The evaluation of the specificity of those three antisera showed cross-reactivity only with insulin, which antibodies were adsorbed against insulin-Sepharose. However, the antisera were not sufficiently sensitive for the assay of endogenous proinsulin from healthy subjects, being only suitable for the measurement of circulating proinsulin in patients with hyperproinsulinemia. Alternative schedules of immunization in order to obtain more sensitive antisera are discussed.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de um radioimunoensaio para uma substância específica depende primeiramente da disponibilidade de um antissor contendo anticorpos com afinidade, título e especificidade apropriados (1). Diz-se frequentemente que a produção de tais antissoros é mais uma arte do que ciência (2) e vários métodos têm sido empregados na tentativa de se obter antissoros adequados. Entretanto, numerosos fatores podem influenciar o provável sucesso, desde a imunogenicidade do antígeno e a espécie animal imunizada até o emprego ou não de adjuvantes.

A obtenção de antissoros anti-pró-insulina tem sido dificultada não apenas pelo fato deste precursor hormonal conter os determinantes antigênicos da insulina e do peptídeo C e por tanto, reagir cruzadamente com estes peptídeos, como também pela necessidade de serem altamente sensíveis para detectarem concentrações baixas de pró-insulina circulante (3).

Somente a partir de 1981, com a produção de pró-insulina humana por tecnologia de DNA recombinante (4), é que anticorpos policlonais sensíveis e específicos foram obtidos e caracterizados (5,6,7), pois até então, a quantidade de pró-insulina humana purificada disponível era insuficiente para ser usada como imunógeno.

Mais recentemente, foram também produzidos e caracterizados anticorpos monoclonais contra a pró-insulina humana biossintética (8,9,10), os quais têm sido empregados em ensaios imunorradiométricos e em técnicas imunohistoquímicas para a determinação e a localização, respectivamente, deste pró-hormônio.

Neste trabalho, são descritos os resultados preliminares da produção de um antissor policlonal contra a pró-insulina humana biossintética, objetivando o desenvolvimento de um radioimunoensaio homólogo e específico para este precursor hormonal.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais e Inoculações:

Utilizaram-se cinco cobaias machos, albinas, de peso homogêneo em torno de 220 g e criadas no biotério do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQUSP). Os animais foram injetados subcutaneamente em múltiplos locais da região dorsal com 2 ml de uma emulsão formada por volumes iguais de solução fisiológica, contendo 50 µg de pró-insulina humana biossintética (lote nº 509EM4, Eli Lilly and Company, USA) e adjuvante de Freund. Empregou-se adjuvante de Freund completo (Difco Laboratories, USA) na primeira imunização e incompleto nas demais (preparado em nossos laboratórios com Arlacel A e óleo mineral Nujol na proporção de 1:10); seguindo-se o método de produção

de antissoros descrito por Vaitukaitis e cols. (11)

Como após a primeira injeção uma cobaia veio a óbito, passou a ser oferecida água contendo 5% de glicose às remanescentes, a fim de se prevenir hipoglicemia.

Quatro semanas após a primeira imunização os animais receberam a primeira injeção de reforço, sendo a seguir reimunizados em intervalos de 3 semanas. Duas semanas após cada injeção de reforço foram colhidos 2 ml de sangue por punção cardíaca, sendo o soro separado por centrifugação e estocado a -20°C .

Avaliação da resposta dos animais:

Os antissoros foram avaliados a partir da primeira imunização, empregando pró-insulina radioiodada em nossos laboratórios (12), preparada com o mesmo antígeno empregado nas inoculações.

Determinou-se a ligação de cada antissoros (100 μl na diluição de 1:100) com o traçador (100 μl contendo aproximadamente 10.000 cpm), incubados por 24 horas a 4°C em tampão fosfato de sódio 0.01 M, pH 7.6 contendo 0.15 M NaCl, 0.01M EDTA e 0,1 % de SAB (volume final de 300 μl). Os anticorpos ligados ao traçador foram precipitados pela adição de um segundo antissoros de cabra, anti-gama globulina de cobaia (Radioassay System Laboratories, USA, 100 μl na diluição de 1:4); seguida de incubação por mais 24 horas. Após centrifugação (1500 x g por 30 minutos a 4°C), a radioatividade precipitada foi determinada em contador gama automático (com eficiência de 85%); calculando-se a porcentagem de radioatividade ligada em relação à atividade total (B / T). Os animais foram sacrificados e o sangue total colhido quando a ligação de seus antissoros com o traçador se manteve estável.

Avaliação dos antissoros: título, sensibilidade e especificidade:

Os antissoros que apresentaram maior ligação com o traçador foram titulados no mesmo sistema de incubação, na diluição de 1:100 a 1:256.000 (100 μl), em função do tempo de imunização.

A sensibilidade dos antissoros obtidos na última sangria foi avaliada por meio de titulação na presença de 0.4 pmol de pró-insulina não marcada, diluída no tampão de incubação (100 μl). Os antissoros que apresentaram maior título foram empregados na construção da curva padrão do radioimunoensaio, para análise dos parâmetros que refletem a sensibilidade do ensaio: dose efetiva para 50% da resposta máxima (ED_{50}), dose mínima detectável (DMD) e inclinação da curva padrão ("slope" -SL). Na realização dessas curvas os antissoros foram incubados inicialmente por 48 horas com a pró-insulina não marcada (concentração de 0,02 a 20 pmol/ml) e por mais 24 horas com o traçador (volume final de 300 μl), sendo a separação realizada pela mesma técnica do duplo anticorpo.

A especificidade dos antissoros foi também analisada em curva de titulação, na presença de peptídeo C humano biossintético (lote n A18-TU8-44D, Eli Lilly and Company, USA) na concentração de 10 pmol/ml e de concentração elevada de insulina porcina (5 U/l; lote nº MLS 3142, Biobrás Bioquímica do Brasil).

Aqueles antissoros que apresentaram reação cruzada com a insulina foram submetidos a adsorção com a mesma insulina porcina conjugada a CNBr-Sepharose 4B (Pharmacia, Sweeden), de acordo com o procedimento descrito por Cohen e cols. (13), utilizando glicina no lugar de etanolamina no tampão de conjugação. Um lote de Sepharose 4B (Pharmacia, Sweeden) foi ativado em nossos laboratórios empregando 150 mg de CNBr (Sigma, USA) por grama de resina (14).

Após a remoção dos anticorpos anti-insulina, a sensibilidade e a especificidade dos antissoros foi confirmada por seu emprego na construção de curvas padrão para pró-insulina (concentração de 5 a 500 mU/l) e peptídeo C (concentração de 0,2 e 10 pmol/ml), no mesmo sistema de ensaio em não-equilíbrio.

Empregou-se o programa computacional RIAKALK versão PC, recém implantado em nossos laboratórios (15), para a redução e análise dos dados do radioensaio.

RESULTADOS

Dos cinco animais inoculados com a pró-insulina, um deles faleceu logo após a primeira injeção. A figura 1 apresenta, conseqüentemente, a evolução das respostas dos quatro animais durante o período em que foram imunizados. Como pode ser observado nessa figura, os animais apresentaram uma resposta máxima após a 4ª imunização. As cobaias SM e ODT foram sacrificadas após a 7ª imunização, apresentando nesse período uma resposta praticamente constante. Entretanto, as cobaias OP e ODF morreram em decorrência da punção cardíaca realizada, respectivamente, após a 4ª e a 6ª imunização. Desprezou-se o antissoros da cobaia ODF que apresentou a menor ligação com o traçador, com valores inferiores a 50% na diluição de 1:100.

A figura 2 apresenta as curvas de títulos dos três antissoros analisados. Considerando o título do antissoros como a diluição no ensaio que liga 50% do traçador, observa-se que o antissoros da cobaia SM apresentou os menores títulos, com valor de 1:720 na última sangria; enquanto que o antissoros da cobaia OP revelou os maiores títulos, com valor de 1:15.000 na sangria realizada após a 4ª imunização, quando o animal veio a falecer. Apesar do antissoros da cobaia ODT ter apresentado título de 1:3180 logo após a última imunização (7ª sangria), uma semana após, quando o animal foi sacrificado (8ª sangria) o título havia baixado inexplicavelmente para 1:600.

A figura 3 exibe a sensibilidade dos antissoros obtidos na última sangria, avaliada pela curva de título como o deslocamento que ocorre na presença de uma quantidade fixa de pró-insulina não marcada. Nota-se que o antissoros da cobaia ODT foi o que apresentou o maior deslocamento ao longo de quase toda a curva; enquanto que o antissoros da cobaia OP, que havia apresentado o maior título, foi o que revelou o menor deslocamento. Esses resultados foram confirmados na curva padrão do radioensaio, cujos parâmetros analisados (ED_{50} , DMD e SL), indicados na tabela 1, mostram a maior sensibilidade do antissoros da cobaia ODT.

As curvas de titulação dos antissoros realizados na presença de concentração elevada de insulina e de peptídeo C, imunologicamente relacionados com a pró-insulina, estão exibidas na figura 4. Verifica-se que todos os antissoros testados apresentaram reação cruzada com a insulina, a qual deslocou em ordem decrescente, a curva de título dos antissoros das cobaias ODT, SM e OP. Apenas o antissoros da cobaia OP apresentou uma pequena reação com o peptídeo C.

A eficácia da remoção dos anticorpos anti-insulínicos é evidenciada na mesma figura 4, na qual também se observa após o procedimento de adsorção, uma grande diminuição nos títulos dos antissoros das cobaias ODT e SM. Devido ser pouco sensível, o antissoros da cobaia OP não foi adsorvido contra o peptídeo C.

A tabela 2 compara o emprego dos antissoros das cobaias ODT e SM purificados, na construção da curva padrão do radioimunoensaio, confirmando a maior sensibilidade do traçador na dose zero.

A figura 5 exhibe a curva padrão do radioimunoensaio de pró-insulina realizado com o antissoros da cobaia ODT, indicando que até as concentrações de 500 mU/l de insulina e de 10 pmol/ml de peptídeo C não houve inibição da ligação do antissoros ao traçador.

DISCUSSÃO

Logo após a primeira imunização, um único animal veio a óbito, provavelmente devido a choque hipoglicêmico, visto ter sido demonstrado que a pró-insulina humana biossintética possui aproximadamente 7 e 10% da atividade biológica da insulina nativa, respectivamente, *in vivo* e *in vitro* (16).

A maioria dos antissoros obtidos apresentaram título menor do que aqueles preparados por outros autores empregando a mesma espécie animal e o mesmo esquema de imunização, que exibiram após a quarta imunização, títulos maiores do que 1:10.000 (6).

Como era de se esperar, os antissoros preparados contra a pró-insulina apresentaram anticorpos dirigidos para a porção insulínica de sua molécula. Apesar desta reação cruzada, eles tornaram-se altamente específicos após sua purificação por imunoadsorção.

Porém, a sensibilidade do ensaio (36 fmol/tubo) foi menor do que a dos ensaios realizados com os antissoros produzidos em cobaias (5,6,17) e cabras (7,18) a partir de pró-insulina biossintética, variando de 0,8 a 10 fmol/tubo.

Os resultados fornecidos pelas curvas de titulação constituíram um parâmetro válido de comparação entre os antissoros, dando uma idéia relativa de sua qualidade. No entanto, a decisão final sobre seu emprego foi determinada pela construção da curva padrão.

A sensibilidade baixa desses antissoros aliada à concentração baixa de pró-insulina circulante (19) não permitiu seu emprego no radioimunoensaio para a medida deste precursor hormonal em indivíduos normais, cujos níveis basais é da ordem de

3 a 15 fmol/ml (5,6,7). Entretanto, eles podem ser empregados no ensaio de amostras de pacientes portadores de insulínomas (17) ou mesmo de hiperproinsulinemia familiar (7), que apresentam níveis acima do limite de detecção do radioimunoensaio.

Conseqüentemente, esquemas alternativos de imunização devem ser experimentados para se otimizar a produção de anticorpos anti-pró-insulina, visando a obtenção de anticorpos com título e sensibilidade mais elevados.

Doses maiores do imunógeno podem ser avaliadas, pois, apesar de terem sido empregadas doses pequenas para certos hormônios polipeptídicos (11) e até mesmo para pró-insulina (17), alguns autores têm demonstrado que essas doses são insuficientes para induzir a produção de anticorpos anti-insulínicos em cobaias sugerindo doses mínimas de 250 a 500 µg (20 e 21). Esquemas de imunização envolvendo injeções semanais de quantidades grandes de imunógeno, emulsionado em adjuvante de Freund, também são relatados (22). Nesse sentido Cohen e cols. (5) obtiveram anticorpos adequados para o radioimunoensaio de pró-insulina em cobaias, realizando a imunização primária com 100 µg a 300 µg, em intervalos de 7 a 17 dias.

Outro procedimento a ser analisado é a interrupção do esquema de imunização dos animais por alguns meses antecedendo a última injeção de reforço, pois segundo os resultados obtidos por Hurn e Landon (2) no preparo de anticorpos anti-insulina, esta pausa aumenta sua avidéz. Além disso, outros autores também recomendam deixar um intervalo maior entre a última imunização, quando se empregam cobaias (22).

Finalmente, poderiam ser produzidos anticorpos monoclonais contra pró-insulina para o estabelecimento de um ensaio imunorradiométrico de dois *loci*, que de per se apresenta maior sensibilidade do que o próprio radioimunoensaio (23).

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Eli Lilly and Company e a Bio-brás-Bioquímica do Brasil os hormônios empregados neste estudo, bem como ao CNPq e a CAPES, respectivamente, o auxílio (processo nº 405557/86-CL-FV) e a bolsa de mestrado concedidos. Agradecem também as Dras. S. M. P. Neves e M. J. M. Alves do IQUSP a doação das cobaias e do CNBr, respectivamente.

Tabela 1 - Parâmetros dos radioimunoensaios de pró-insulina realizados com os antissoros das cobaias ODT (diluição final 1:750) e OP (diluição final 1:24.000).

| ANTISSORO | Bo* (%) | ED ₅₀ (pmol/ml) | DMD (pmol/ml) | SL |
|------------|---------|----------------------------|---------------|------|
| COBAIA ODT | 37,13 | 1,90 | 0,49 | 1,47 |
| COBAIA OP | 56,35 | 2,98 | 1,03 | 1,87 |

*Bo - ligação da dose zero.

Tabela 2 - Parâmetros dos radioimunoensaios de pró-insulina realizados com os antissoros das cobaias ODT e SM (diluição final 1:150), após a adsorção contra insulina-Sepharose.

| ANTISSORO | Bo* (%) | ED ₅₀ (pmol/ml) | DMD (pmol/ml) | SL |
|------------|---------|----------------------------|---------------|------|
| COBAIA ODT | 17,31 | 4,11 | 0,36 | 0,86 |
| COBAIA SM | 31,08 | 10,26 | 2,03 | 1,36 |

*Bo - ligação da dose zero.

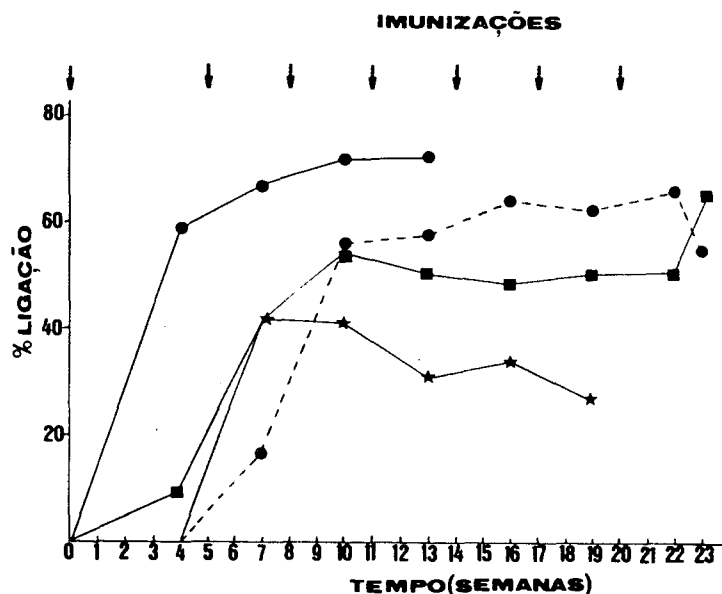


FIGURA 1- Ligação do antissoro (diluído 100 vezes) ao traçador, após a imunização das diferentes cobaias: OP (●—●), ODT (○—○), SM (■—■) e ODF (★—★). As setas indicam o período das injeções.

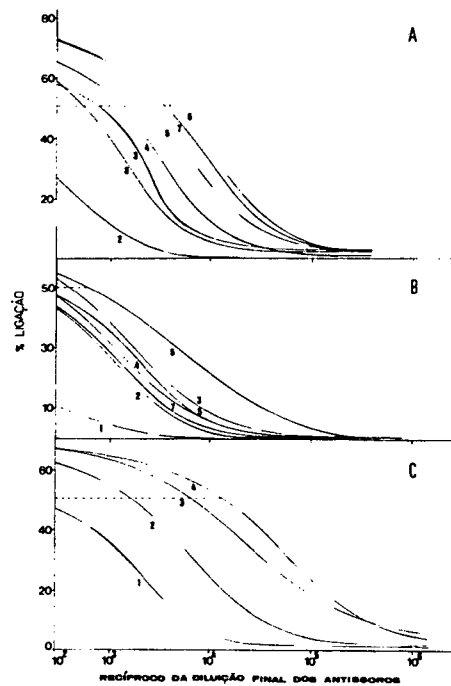


Figura 2- Curvas de título dos antissoros das cobaias ODT (painel A), SM (painel B) e OP (painel C), obtidos nas diversas sangrias que sucederam as imunizações, indicadas pelos respectivos números. A curva do antissoro da cobaiia SM obtido na 6ª sangria superpõe-se aquela referente a 4ª sangria. A linha pontilhada assinala o título dos antissoros.

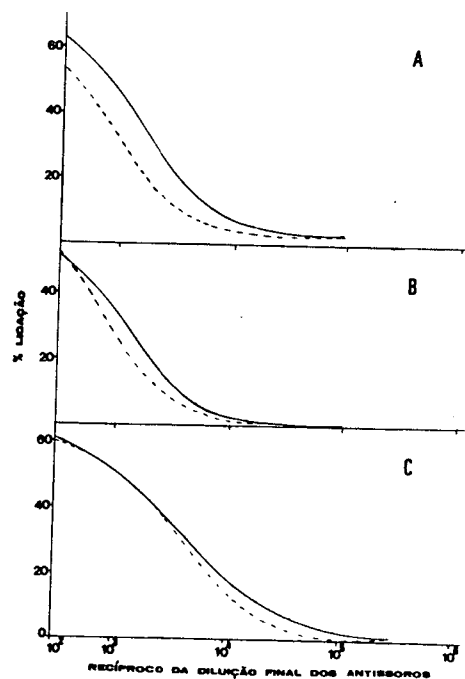


Figura 3- Avaliação da sensibilidade dos antissoros das cobaias ODT (painel A), SM (painel B) e OP (painel C) em curvas de título realizadas na ausência (linha contínua) e na presença (linha tracejada) de pró-insulina não marcada.

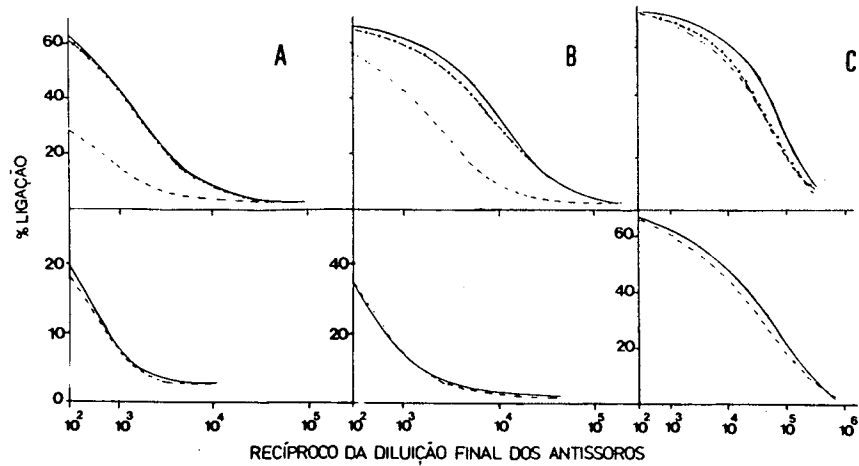


Figura 4- Avaliação da especificidade dos antíssoros das cobaias ODT (painel A), SM (painel B) e OP (painel C) em curvas de título realizadas na ausência (linha contínua) e na presença de insulina e de peptídeo C não marcados (linhas tracejadas - - - e -.-.-, respectivamente); antes (painéis superiores) e após (painéis inferiores) a adsorção dos anticorpos anti-insulina.

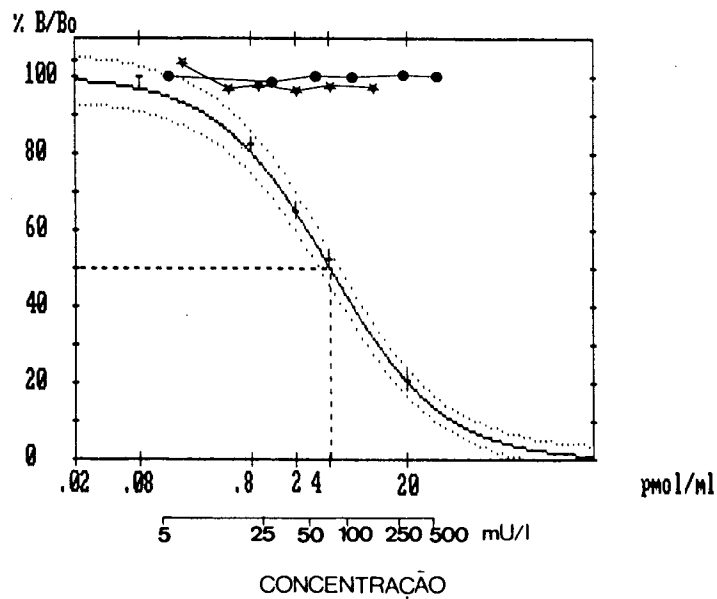


Figura 5- Efeito da pró-insulina, peptídeo C e insulina na ligação da ^{125}I -pró-insulina ao antíssoro gerado contra pró-insulina (cobaia ODT) e adsorvido contra insulina-sepharose.

As concentrações de pró-insulina (\dagger - \dagger) e de peptídeo C (\star - \star) são expressas em pmol/ml e a concentração de insulina (\bullet - \bullet) em mU/l.

Os resultados da curva padrão de pró-insulina estão indicados na tabela 2.

DADOS BIBLIOGRÁFICOS

1. FISHER D.A. - IN: Manual of Clinical Immunology. ROSE, N.R. e FRIEDMAN, H. (eds.). American Society of Microbiology, Washington. p.339-42, 1980.
2. HURN B.A.L., LANDON J. - IN: Radioimmunoassay Methods. K.E. Kirkham and W.M. Hunter (eds.). CHURCHILL LIVINGSTONE, Edinburg p.121-41, 1971.
3. ROBBINS D.C., HOWARD S.T., RUBENSTEIN A.H. - N.Engl.J.Med. 310(18) : 1165-75, 1984.
4. FRANK B.H., PETEE J.M., ZIMMERMAN R.E., BURCK P.J. - IN: Peptides: Synthesis-structure-function. Proceedings of the Seventh American Peptide Symposium, D.H. Rich e E. Gross(eds.), Pierce Chemical Co., Illinois, p.729-38, 1981.
5. COHEN R.M. et al - Diabetes 34:84-91, 1985.
6. DEACON C.F. e CONLON J.M. - Diabetes 34:491-97, 1985.
7. COHEN R.M. et al - Metab. 35:1137-46, 1986.
8. GRAY I.P., SIDDLER K., FRANK B.H., HAELS C.N. - Diabetes 36:684-88, 1987.
9. ROTH J. et al - Virchows Archiv. B Cell Pathol. 56:287-92, 1989.
10. MADSEN O.D., COHEN R.M., FITCH F.W., RUBENSTEIN A.H., STEINER D.F. - Endocrinology 113:2135-44, 1983.
11. VAITUKAITIS J., ROBBINS J.B., NIESCHLAG E., ROSS G.T. - J.Clin.Endocrinol. 33:988-91, 1971.
12. BORGHI V.C., NASCIMENTO M., WAJCHENBERG B.L. - Resumos do XI Congresso da ALASBIMN, 8-11 de outubro de 1989- Santiago do Chile, p.65.
13. COHEN R.M. et al - Diabetes 34:84-91, 1985.
14. CUATRECASAS P., ANFINSEN C.B. - IN: Methods in Enzymology, W.B. JAKOBY (ed.), Academic Press, N.Y. 22, p.345-78, 1971.
15. BORGHI V.C., LIN H.L., LOPES E.M., MORAES V.K. - Cien. Cult. 42(Suppl): 552-3, 1990.
16. REVERS R.R. et al - Diabetes 33:762-70, 1984.
17. COHEN R.M. et al - Diabetes 32(Suppl.1): 49A, 1983.
18. BOWSER R.R., APATHY J.M., FERGUSON A.L. e FRANK B.H. - Diabetes 36 (Suppl.1): 94A.
19. HORWITZ D.L., STARR J.I., MAKO M.E., BLACKARD W.G. e RUBENSTEIN A.H. - J.Clin.Invest. 55:1278-83, 1975.
20. HAVRANKOVA J., PETIT J.L. - J.Immunoassay 5:1131-44, 1984.
21. MAKULU D.R. e WRIGHT P. - Metab. 20:770-81, 1971.
22. HURN A.L. e CHANTLER S.M. - IN: Methods in Enzymology, Academic Press, N.Y. 70:104-43, 1980.
23. WOODHEAD J.S., ADDISON G.M., HALES C.N. - Br.Med.Bull. 30:44-9, 1974.