

OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO DA PRÓ-INSULINA HUMANA
DO SORO PARA DOSAGEM NO RADIOIMUNOENSAIO EMPREGANDO
CARTUCHOS DE FASE REVERSA SEP-PAK C18.

MARTHA DO NASCIMENTO, VÂNIA C. BORGI
BERNARDO L. WAJCHENBERG*
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares-IPEN-CNEN/SP
*Laboratório de Investigação Médica 25 da FMUSP
Travessa R nº 400 05508-900 São Paulo, SP

RESUMO

Este trabalho compara a recuperação do método de extração da pró-insulina humana (hPI) sérica, utilizando cartuchos de Sep-Pak C18 sob fluxos de eluição diferentes (cinco e 0,3 ml/min). Os resultados mostram que a redução no fluxo de aplicação do soro ao cartucho proporcionou uma melhora significativa na recuperação, resultando numa técnica mais precisa para a extração da hPI do soro e sua subsequente determinação pelo radioimunoensaio.

INTRODUÇÃO

A medida da pró-insulina humana (hPI) no soro de indivíduos normais tem sido dificultada devido sua concentração ser muito baixa. Recentemente Borghi e cols. descreveram um radioimunoensaio (RIE) da hPI para avaliação de insulinomas empregando traçador e antissoro específico preparados em nossos laboratórios [1]. Esse RIE foi utilizado para medir níveis baixos de hPI circulante empregando técnica de extração da hPI do soro com etanol e subsequente concentração [2].

Essa técnica de extração foi comparada com outra mais simples e rápida, que utiliza cartuchos de Sep-Pak C18, a qual se mostrou mais precisa [3].

O objetivo do presente trabalho foi o de otimizar essa técnica de extração pelo Sep-Pak C18, avaliando a recuperação da hPI do soro eluída sob diferentes fluxos.

MATERIAIS E MÉTODOS

O método de extração empregado, descrito por Cohen e cols. [4], utiliza cartuchos de octadecil-silica Sep-Pak C18 (Waters, EUA) para adsorver a hPI que é em seguida eluída com solução menos polar (Figura 1). Neste trabalho as amostras e as soluções eluentes foram introduzidas com o auxílio de uma seringa.

Foram avaliadas tanto a recuperação da hPI radiolodada (¹²⁵I-hPI), como daquela não marcada (padrão). A ¹²⁵I-hPI foi empregada em soro isento de hPI, com atividade de 200.000 cpm enquanto que a hPI padrão foi preparada no mesmo soro nas concentrações de 0,063; 0,25 e 1 pmol/ml. Essas avaliações da recuperação da hPI do soro foram realizadas comparando-se as técnicas que empregam os fluxos seguintes:

Técnica empregando fluxo de 5 ml/min.

O cartucho foi previamente lavado com 5 ml de acetonitrila (ACN) seguidos de 5 ml de água e mais 5 ml de tampão fosfato de sódio 0,04 M, pH 7,4.

As amostras de soro (2 ml diluído 1:1 em tampão) foram aplicadas e em seguida o cartucho foi lavado com 5 ml da solução H₂O 99%; TFA 1%. Estas etapas foram realizadas com auxílio de bomba de vácuo, sob fluxo de 5 ml/min.

A seguir a hPI foi eluída com 5 ml da solução ACN 40%; H₂O 59,4%; TFA 0,6% e coletada em tubo de polipropileno siliconizado em nossos laboratórios [5].

Técnica empregando fluxo de 0,3 ml/min.

O cartucho foi lavado com 5 ml de ACN seguidos de 5 ml de água. As amostras de soro não diluído foram aplicadas e em seguida o cartucho foi lavado com 5 ml da solução H₂O 99%; TFA 1%. Durante estas etapas permitiu-se que os solventes e as amostras de soro fossem introduzidas ao cartucho sob fluxo gravitacional de 0,3 ml/min [6].

A hPI foi eluída com 5 ml da solução ACN 40%; H₂O 59,4%; TFA 0,6% e coletada em tubo de polipropileno siliconizado.

Recuperação dos métodos.

Analisou-se a recuperação obtida nas duas técnicas, sob fluxos diferentes, extraído-se concomitantemente em 5 cartuchos a ¹²⁵I-hPI recém preparada e em 3 cartuchos a hPI padrão, adicionadas a "pool" de soro humano. A atividade das amostras da ¹²⁵I-hPI foi determinada antes e após sua extração enquanto que as concentrações da hPI padrão foram determinadas pelo RIE após sua extração.

No caso das amostras de hPI padrão os extratos obtidos pelo emprego de ambos os fluxos foram evaporados utilizando-se concentrador Speed-Vac SS4 (Savant, EUA), durante um período de 15 horas. As amostras resultantes foram ressuspensas para seu volume original (1 ml) no tampão de RIE (PBS 0,04M, pH7,4 contendo 0,1 % de BSA) antes de serem submetidas a esse ensaio.

CROMATOGRAFIA EM SEP-PAK

A
SORO CONTENDO
 ^{125}I -hPI
(200.000 CPM)



5 ML (H_2O 99%: TFA 1%)

B
SORO CONTENDO
hPI PADRÃO
(0,063, 0,25 e 1,00 PMOL/ML)



5 ML (ACN 40%: H_2O 59,4%: TFA 0,6%)

MEDIDA DA
 ^{125}I -hPI



CONCENTRAÇÃO
EM SPEED-VAC

RESSUSPENSÃO
EM TAMPÃO

MEDIDA DA hPI
PADRÃO POR RIE
RADIOIODADA (A) E PADRÃO (B)

Figura 1- Métodos de extração da hPI radioiodada (A) e padrão (B) do soro humano, empregando cartuchos de Sep-Pak C₁₈.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela I apresenta os resultados obtidos na recuperação da ^{125}I -hPI comparando-se os dois processos de extração. A recuperação foi de $71 \pm 5\%$ empregando-se o fluxo de 5 ml/min contra $90 \pm 1\%$ quando o fluxo foi de 0,3 ml/min.

A recuperação da hPI padrão (0,063 a 1 pmol/ml) variou de 85% a 38% para o fluxo de 5 ml/min (Tabela II), e de 115% a 152% para o fluxo de 0,3 ml/min (Tabela III).

Estes resultados permitem a dosagem de amostras com teores baixos de hPI, extraídas sob fluxo de 0,3 ml/min, sendo a concentração de 0,063 pmol/ml próxima dos valores de leitura das amostras concentradas.

Os resultados foram similares aqueles descritos por Cohen e cols. (4) que empregaram o mesmo fluxo de 0,3 ml/min e obtiveram valores de recuperação variando de 75 a 110% para concentrações de hPI padrão variando de 0,025 a 0,28 pmol/ml.

Tabela I. Valores da recuperação da ^{125}I -hPI adicionada a soro humano submetido a extração em cartuchos de Sep-Pak C18, sob fluxo de 5 ml/min e 0,3 ml/min.

	Fluxo	
	5ml/min	0,3 ml/min
	75,45	91,56
	77,41	89,34
	69,38	90,49
	71,99	89,66
	63,13	91,74
média	71,50	90,56
OP	5,01	0,97

Tabela II. Valores da recuperação da hPI adicionada ao soro isento de hPI, submetido a extração em cartuchos de Sep-Pak C18, sob fluxo de 5 ml/min.

concentração teórica (pmol/ml)	concentração obtida (pmol/ml)	recuperação (%)
0,063	$0,053 \pm 0,005$	84,7
0,25	$0,193 \pm 0,037$	77,3
1,00	$0,380 \pm 0,008$	38,0

Tabela III. Valores da recuperação da hPI adicionada ao soro isento de hPI submetido a extração em cartuchos de Sep-Pak C18, sob fluxo de 0,3 ml/min.

concentração teórica (pmol/ml)	concentração obtida (pmol/ml)	recuperação (%)
0,063	$0,034 \pm 0,002$	115
0,25	$0,380 \pm 0,021$	152
1,00	$1,290 \pm 0,050$	129

CONCLUSÕES

Este estudo mostra que a redução no fluxo de aplicação do soro ao cartucho de Sep-Pak C18, proporcionou uma melhoria significativa na recuperação do método, resultando uma técnica mais precisa para a extração da hPI do soro e sua subsequente determinação pelo radioimunoensaio.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a FAPESP o auxílio concedido (processo nº 91/2610-0) e ao CNPq (processo nº 405557/86-CL-FV) o auxílio e a bolsa de doutoramento outorgada à M. Nascimento.

REFERÊNCIAS

- [1] BORGHI V.C., NASCIMENTO M. e WAJCHENBERG B.L. Specific and direct proinsulin radioimmunoassay for the evaluation of insulinomas. In: Developments in radioimmunoassay and related procedures., International Atomic Energy Agency, Vienna, 1992, p. 369-379.
- [2] BORGHI V.C., NASCIMENTO M. e WAJCHENBERG B.L. Optimization of the radioimmunoassay technique for human proinsulin. Revista Española de Medicina Nuclear, 11:79., 1992.
- [3] BORGHI V.C., NASCIMENTO M. e WAJCHENBERG B.L. Comparison of two techniques for extraction of human proinsulin from serum for RIA purposes. In: XIII Congreso de la Asociación Latinoamericana de Sociedades de Biología y Medicina Nuclear. (Colombia, octubre 18-22, 1993).

[4] 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. e RUBENSTEIN A.H. Proinsulin radioimmunoassay in the evaluation of Insulinomas and familial hyperproinsulinemia. *Metabolism* 35: 1137-46, 1988.

[5] A Laboratory Manual- Cold Spring Harbor Laboratory, 1982 p. 437.

[6] Waters Sep-Pak cartridge-care and use manual. Millipore Corporation, Waters Chromatography Division, USA, 1990, Rev. 4.

ABSTRACT

In the present report it was compared two extraction methods for the concentration of human proinsulin (hPI) from serum. It was used octadecyl silica cartridges Sep Pak C18 at different flow rates (5 and 0,3ml/min). The results show a significant improvement in the recovery of the method by applying the sample at the flow rate of 0,3 ml/min. This method provides an accurate extraction of hPI and its subsequent determination in the radioimmunoassay.