

ISSN 0101-3084

**CNEN/SP**

---

**ipen** *Instituto de Pesquisas  
Energéticas e Nucleares*

DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO CLÍNICA DO  
RADIOIMUNOENSAIO DE GASTRINA HUMANA

Maria Glória Peig Ginabreda, Vânia Caira Borghi e Agostinho Betarello

PUBLICAÇÃO IPEN 196

AGOSTO/1988

SÃO PAULO

PUBLICAÇÃO IPEN 196

AGOSTO/1988

**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO CLÍNICA DO RADIOIMUNOENSAIO  
DE GASTRINA HUMANA**

**María Glória Peig Gínabreda, Vânia Caira Borghi e Agostinho Betarello**

**DEPARTAMENTO DE PROTEÇÃO RADIOLÓGICA**

**IPEN – CNEN/SP  
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES  
SÃO PAULO – BRASIL**

**Série PUBLICAÇÃO IPEN**

**INIS Categories and Descriptors**

**C62.00**

**DIAGNOSTIC TECHNIQUES**

**GASTRIN**

**RADIOIMMUNOASSAY**

---

**IPEN - Doc - 3064**

**Aprovado para publicação em 25/07/88.**

**Note: A redação, ortografia, conceitos e revisão final são de responsabilidade do(s) autor(es).**

## DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO CLÍNICA DO RADIOIMUNOENSAIO DE GASTRINA HUMANA

Maria Glória Peig Ginabreda, Vânia Cairra Borghi e Agostinho Setarello

### RESUMO

A determinação dos níveis circulantes de gastrina é fundamental para o diagnóstico e seguimento de diferentes distúrbios gastrointestinais. Este trabalho descreve o radioimunoensaio deste hormônio desenvolvido de acordo com o método de Russell e cols. e sua aplicação clínica na determinação de gastrinemia de jejum em indivíduos normais, gastrectomizados, chagásicos, portadores de insuficiência renal crônica (IRC), anemia perniciosa (AP) e síndrome de Zollinger-Ellison (ZE). Utilizou-se gastrina humana sintética para a radioiodação e preparo de soluções padrão bem como anti-soro específico produzido em coelhos. O hormônio foi marcado com  $^{125}\text{I}$  pela técnica da Cloramina T e purificação por cromatografia de troca aniônica em QAE-Sephadex A-25, obtendo-se atividade específica média ao redor de 200 uCi/ug. Os ensaios foram realizados incubando-se gastrina- $^{125}\text{I}$ , gastrina padrão (de zero a 500 pmol/l) ou as amostras a serem dosadas com o anti-soro por 4 dias a 4°C. Separou-se a gastrina livre da ligada ao anticorpo pela adsorção desta última ao carvão. Os indivíduos normais apresentaram gastrinemia variável de 2 a 74 pmol/l, sendo esta variação maior nos chagásicos (de 6 a 261 pmol/l). Níveis elevados de gastrina foram determinados em pacientes com IRC (variando de 12 a 350 pmol/l), AP (variando de 160 a 680 pmol/l) e em um paciente com ZE (1010 pmol/l), enquanto que níveis muito baixos foram confirmados em pacientes gastrectomizados (de 1 a 6 pmol/l).

### DEVELOPMENT AND CLINICAL APPLICATION OF HUMAN GASTRIN RADIOIMMUNOASSAY

#### ABSTRACT

The determination of human gastrin levels in the blood is very

important for diagnosis of gastrointestinal disorders. This work describes the radioimmunoassay of gastrin developed according to Russell et al. and its clinical application measuring fasting levels of this hormone in normal subjects, gastrectomized, chagasics, patients with chronic renal failure (CRF), pernicious anemia (PA) and Zollinger-Ellison syndrome (ZES). Synthetic human gastrin was used for radioiodination as standard, while the specific antibody was raised in rabbits. Gastrin was radioiodinated by a modification of the chloramine T technique and purified by anion exchange chromatography in QAE-Sephadex A-25 to a specific activity around 200 uCi/ug. The assays were performed by incubation of  $^{125}\text{I}$ -gastrin, standard gastrin (zero to 500 pmol/l) or unknown samples with the antiserum for 4 days at 4°C. The antibody bound and free  $^{125}\text{I}$ -gastrin was separated by adsorption of the latter to the charcoal. The basal gastrin values of normal subjects ranged from 2 to 74 pmol/l, being these levels higher in the chagasics (from 6 to 261 pmol/l). Higher levels of gastrin were determined in patients with CRF (from 12 to 350 pmol/l), PA (from 160 to 680 pmol/l) and with ZES (1010 pmol/l), while very low levels were confirmed in gastrectomized (from 1 to 8 pmol/l).

## INTRODUÇÃO

A gastrina, um dos vários hormônios polipeptídicos gastrointestinais, é o responsável principal pela estimulação da secreção ácida gástrica, participando também na regulação do crescimento da mucosa gástrica. Este hormônio é secretado pelas células G situadas nas glândulas pilóricas da mucosa antral e da mucosa duodenal principal.

Embora Edkins em 1905 (1) já tivesse denominado gastrina ao princípio ativo contido nos extratos de mucosa gástrica, capaz de estimular a secreção ácida em gatos anestesiados, somente em 1964, Gregory e Tracy (2) conseguiram isolar este hormônio da mucosa antral de porco, em forma pura, sendo determinada posteriormente sua estrutura e obtida sua síntese.

A gastrina humana (hG) possui diferentes formas moleculares com comprimentos de cadeia variáveis, sendo as principais formas circulantes a hG-34 ("big" com 34 resíduos de aminoácidos), a hG-17 ("little

com 17 aminoácidos) e a hG-14 ("mini" com 14 aminoácidos), dentre outras.

No soro ou plasma humanos, mais de 60% da gastrina encontra-se sob a forma hG-34 (3), seguida da hG-17; sendo que as demais formas encontram-se em concentrações muito pequenas (4). Acredita-se porém que as formas predominantes, hG-34 e hG-17, sejam equipotentes (5).

A gastrina circulante ainda existe sob as condições não sulfatada e sulfatada, cujas estruturas moleculares parecem apresentar diferenças em suas atividades biológicas (6) e imunológica (7).

A atividade biológica da gastrina é conferida pela sequência pentapeptídica C-terminal, a qual é compartilhada com outro hormônio gastrointestinal, a colecistoquinina (8). Esta sequência constitui também o principal determinante antigênico da molécula, que é comum a todas as formas circulantes.

Anticorpos específicos dirigidos contra o peptídeo C-terminal estimam, portanto, a atividade total da gastrina e permitem a realização de ensaios que refletem com maior precisão sua atividade fisiológica.

A síntese da gastrina humana possibilitou o desenvolvimento de um radioensaio para sua medida, no final da década de 60 (9,10). A partir de então, vários relatos de ensaios de gastrina são encontrados na literatura (11-13).

A determinação da gastrinemia por radioensaio é portanto muito utilizada no diagnóstico e acompanhamento de vários distúrbios gastrointestinais, sendo que em alguns casos, como na síndrome de Zollinger-Ellison, este exame é indispensável para estabelecer o diagnóstico definitivo (14).

O presente trabalho descreve o desenvolvimento de um radioensaio de gastrina altamente sensível e específico, empregando-se um traçador cuidadosamente preparado, com grande estabilidade após purificação em QAL-Sephadex (15), e um anticorpo específico. Finalmente, a validade deste ensaio é confirmada pela sua aplicação clínica na determinação da gastrinemia em indivíduos gastrectomizados, anagásicos, portadores de insuficiência renal crônica, anemia perniciosa e síndrome de Zollinger-Ellison em comparação com indivíduos normais.

## MATERIAIS E MÉTODOS

O radioimunoensaio de gastrina foi desenvolvido de acordo com o método descrito por Russel e cols. (13) empregando-se gastrina humana sintética para radioiodação (hG-17) e preparo do hormônio padrão (68 / 439), obtidas respectivamente do "Research Plus Laboratories" (Denville, U.S.A.) e do "Medical Research Council" (London, U.K.). O anticorpo específico (1611), reagente com a porção C-terminal da gastrina, foi produzido em coelhos e fornecido pelo Dr. J.H. Walsh, "University of California" (Los Angeles, U.S.A.). Este anticorpo reage com todas as formas moleculares do hormônio e apresenta fraca reação cruzada com os peptídeos da colecistoquinina (16).

A radioiodação da gastrina foi realizada de acordo com o método clássico da cloramina T modificado (17). O hormônio assim radioiodado foi purificado por cromatografia de troca aniônica em QAE-Sephadex A-25 (Pharmacia, Uppsala, Sweden) a 49°C seguindo-se o procedimento empregado por Russell e cols. (13).

Os ensaios foram realizados em duplicata pela incubação durante 4 dias a 49°C de u'a mistura de reação contendo 0,4 ml de tampão Veronal 0,05 M, pH 8,0 (com 0,25% de albumina sérica humana-HSA-Santa Catarina), 0,2 ml de concentrações progressivas de gastrina padrão (de zero a 500 pmol/l) preparadas em plasma isento de gastrina ou igual volume das amostras com teor de gastrina desconhecido, 0,1 ml do anti-soro na diluição apropriada e 0,1 ml da gastrina-<sup>125</sup>I.

O plasma isento de gastrina foi preparado a partir de plasma velho de Banco de Sangue extraído com carvão (Merck Reinst) a 5% (18), a fim de se eliminar todo o hormônio endógeno.

Separou-se a gastrina ligada ao anticorpo da gastrina livre pela precipitação desta última com 0,5 ml/tubo de uma suspensão de 5% de carvão (Merck Pró-Análise) recoberto com 0,5% de dextran T70 (Sigma), preparado no tampão Veronal sem HSA contendo 8,4% de plasma velho de Banco de Sangue, seguida de centrifugação a 2500 rpm por 20 minutos a 49°C.

A seguir foram aspirados os sobrenadantes por meio de sucção com pipeta Pasteur e determinada a radioatividade de ambas as fases. A porcentagem de ligação da gastrina-<sup>125</sup>I ao seu anticorpo específico foi calculada em relação à radioatividade total.

A determinação da atividade específica do traçador foi realizada pelo método do auto-deslocamento (19), tratando-se o traçador com núme-

ro múltiplo de contagens como amostras desconectadas e a sensibilidade dos ensaios foi estimada pelo cálculo da dose mínima detectável de acordo com o método descrito por Rodbard (20).

As amostras sanguíneas foram coletadas em tubos heparinizados (10 unidades/ml) ou não, sendo centrifugadas posteriormente a 4°C, e o plasma ou soro assim obtidos estocados a -20°C para posterior dosagem. Analisou-se a viabilidade do uso indistinto de plasma ou soro na determinação da gastrinemia, comparando-se os valores obtidos nesses dois fluidos biológicos em 23 indivíduos.

Foram determinados os níveis de gastrina, após jejum de uma noite, em 124 indivíduos com idade variável. Esses indivíduos foram divididos em 6 grupos compreendidos por 64 normais (de 19 a 55 anos, 39 mulheres e 25 homens), 27 chagásicos (de 21 a 60 anos, 11 mulheres e 16 homens), 13 portadores de insuficiência renal crônica (de 19 a 70 anos, 10 mulheres e 3 homens), 5 homens com anemia perniciosa (de 45 a 78 anos), 14 gastrectomizados (de 21 a 70 anos, 4 mulheres e 10 homens) e 1 homem portador da síndrome de Zollinger-Ellison (19 anos).

As comparações estatísticas em todos os experimentos foram realizadas por testes não-paramétricos (21). Foi utilizado o teste de Wilcoxon para comparar os níveis de gastrina das amostras dependentes (soro e plasma) e o teste U de Mann-Whitney para comparar os níveis da gastrinemia entre os diferentes grupos, considerando as diferenças significativas quando  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As frações correspondentes ao pico do cromatograma da purificação da gastrina-<sup>125</sup>I que apresentaram ligação elevada com o anti-soro em excesso foram misturadas e estocadas a -20°C para serem utilizadas como traçador nos radioimunoensaios (Fig. 1).

A gastrina radioiodada tem se apresentado estável por mais de três meses após seu preparo, com atividade específica média ao redor de 200 uCi/ug.

A figura 2 apresenta uma curva padrão típica de gastrina na qual se observa a sensibilidade elevada dos ensaios realizados. Pequenas variações nas quantidades do padrão causam diferenças significativas na

ligação do traçador ao anticorpo específico. A dose mínima de gastrina detectável nos vários ensaios variou de 0,0 a 2,7 pmol/l, confirmando a sensibilidade dos mesmos.

Na Tabela I estão apresentadas as concentrações de gastrina determinadas no soro e plasma dos 23 indivíduos analisados. Apesar de terem sido determinados valores mais elevados no soro, estas diferenças não foram estatisticamente significantes, indicando a possibilidade de se empregar indistintamente soro ou plasma para o radioensaio deste hormônio.

Entretanto, alguns autores como Walsh(22) e McGuigan e cols ( 23) já alertaram para possíveis problemas no ensaio de gastrina causados pela presença de heparina, optando pelo emprego de soro. Apesar disso, outros autores como Russell e cols (13) padronizaram seu radioensaio empregando sempre plasma.

Tendo em vista a falta de uniformidade entre os autores e a irrelevância das diferenças existentes entre as duas determinações não apenas estatisticamente, como também clinicamente, pode-se concluir que esses dois meios biológicos são perfeitamente adequados para a estimativa da gastrina circulante.

A figura 3 ilustra os intervalos da gastrinemia nas amostras de jejum dos seis grupos estudados. Os valores basais de indivíduos normais descritos na literatura variam em função do anticorpo utilizado. Os níveis médios aqui apresentados ( $\pm$  desvio padrão), ( $16,4 \pm 15,0$  pmol/l, variando de 2 a 74 pmol/l), são concordes com os observados por Walsh (22) utilizando o anticorpo 1296 que também reconhece todas as formas da gastrina e reage de forma similar ao anticorpo 1611 empregado em nossos ensaios. Esses valores foram estatisticamente diferentes quando comparados com aqueles determinados nos indivíduos dos demais grupos.

Como era de se esperar, o grupo gastrectomizado apresentou níveis de gastrina muito baixos,  $3,0 \pm 2,3$  pmol/l, variando de 1 a 8 pmol/l, confirmando a remoção das células G antrais e duodenais. Resultados similares já haviam sido observados por Walsh (12).

O grupo chagásico apresentou concentração de gastrina elevada,  $43,1 \pm 63,7$  pmol/l, com um intervalo amplo de 0 a 261 pmol/l. Valores elevados também foram observados por outros autores (24,25) sendo atribuídos principalmente à hiposecreção ácida gástrica observada nesses pa -

cientes (24).

A hipergastrinemia observada nos portadores de anemia perniciosa, ( $390,4 \pm 219,1$  pmol/l variando de 150 a 680 pmol/l) e de insuficiência renal crônica ( $107,2 \pm 109,0$  pmol/l, variando de 12 a 350 pmol/l) confirma relatos prévios de valores elevados nessas condições (26,27) sendo associada à acloridria. Entretanto, ainda não se estabeleceu uma conexão clara entre os níveis de gastrina e a secreção ácida gástrica nos pacientes portadores deste distúrbio renal.

O nível de gastrina extremamente elevado determinado no paciente com a síndrome de Zollinger-Ellison, causado por um tumor pancreático gastrectomizados, dão validade ao ensaio, confirmando sua aplicação na medida de concentrações clínicas.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos doutores JMR Zeitune, LEA Troncon, L Romanello e WM Machado o fornecimento das amostras para a determinação hormonal. Agradecem também à FAPESP e ao CNPq respectivamente, à bolsa de mestrado e o auxílio concedido (processo nº 405-557/87).

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. EDKINS, J.S. On the chemical mechanism of gastric secretion. Proc. R. Soc. (London) Ser. B, 74:376, 1905.
02. GREGORY, R.A. & TRACY, H. J. The constitution and properties of two gastrins extracted from hog antral mucosa. The isolation of two gastrins from hog antral mucosa. Gut., 5:103-17, 1964.
03. MCGUIGAN, J.E. Gastrin. Vitam. Horm., 32:47-88, 1974.
04. REHFELD, J.F. Radioimmunoassay of gastrin. In: BLOOM, S.R., ed. Gut hormones. New York, Churthill Livingstone, 1978. p. 145-8.
05. EYSSELEIN, V.E.; MAXWELL, V.; REEDY, T. Similar acid stimulatory potencies of synthetic human big an little gastrins in nu -

- mans. Gastroenterology, 84:1147, 1983 (Abstract).
06. JENSEN, S.L.; REHFELD, J.F.; HOLST, J.J.; FAHRENKRUG, J.; NIELSEN, O.V.; SCHAFFALITZKY DE MUCKADELL, O.B. Secretory effects of the gastrins on the isolated perfused porcine pancreas. Am. J. Physiol., 238:186-94, 1980.
07. REHFELD, J.F.; DE MAGISTRIS, L.; ANDERSEN, B.N. Sulfation of gastrin: effect on immunoreactivity. Regulatory peptides, 2:333-42, 1981.
08. WALSH, J.H. Gastrin. In: BLOOM, S.R. & POLAK, J., eds. Gut hormones. London, Churchill Livingstone, 1981. p. 163-70.
09. ODELL, W.D.; CHARTERS, A.C.; DAVIDSON, W.D.; THOMPSON, J.C. Radioimmunoassay for human gastrin using unconjugated gastrin as an antigen. J. Clin. Endocrinol., 28:1840-2, 1968.
10. MCGUIGAN, J.E. Immunochemical studies with synthetic human gastrin. Gastroenterology, 54:1005-11, 1968.
11. YALOW, R.S. & BERSON, S.A. Radioimmunoassay of gastrin. Gastroenterology, 58:1-14, 1970.
12. WALSH, J.H. Radioimmunoassay of gastrin. In: ROTHEFELD, B., ed. Nuclear medicine "in vitro". Philadelphia. Lippincott, 1974: p. 231-48.
13. RUSSELL, R.C.G.; FIELDING, L.P.; BLOOM, S.R.; BRYANT, M.G. Current problems in the measurement of gastrin release. A reproducible measure of physiological gastrin release. Postgrad. Med. J., 52: 645-50, 1976.
14. JAFFE, B.M.; PESKIN, G.; KAPLAN, E.L. Diagnosis of occult Zollinger-Ellison tumors by gastrin radioimmunoassay. Cancer, 23:694 - 700, 1972.

15. PEIG GINABREDA, M.G.; BORGHI, V.C.; BETTARELLO, A. Quality control of radioiodinated gastrin for radioimmunoassay. Arg. Biol. Tecnol., 31:163, 1998.
16. JAFFE, B.M. & WALSH, J.H. Gastrin and related peptides. In: JAFFE, B.M. & BERTAN, H.R., eds. Methods of hormone radioimmunoassay. New York, Academic Press, 1979. p. 435-77.
17. PEIG GINABREDA, M.G.; BORGHI, V.C.; BETTARELLO, A. Preparation of radioiodinated gastrin for radioimmunoassay. Arg. Biol. Tecnol., 30: 41, 1987.
18. BORGHI, V.C.; WAJCHENBERG, B.L.; ALBUQUERQUE, R.H. Evaluation of a sensitive and specific radioimmunoassay for pancreatic glucagon in human plasma and its clinical application. Clin. Chim. Acta, 136:39-48, 1984.
19. MORRIS, B.J. Specific radioactivity of radioimmunoassay tracer determined by self-displacement: a re-evaluation. Clin. Chim. Acta, 73:213-6, 1976.
20. RODBARD, D. Stastical estimation of the minimal detectable concentration ("sensitivity") for radioligand assays. Anal. Biochem., 90:1-12, 1978.
21. SIEGEL, S. Estatística não-paramétrica para as ciências do comportamento. São Paulo, McGraw-Hill, 1975.
22. WALSH, J.H. Clinical significance of gastrin radioimmunoassay. Semin. Nucl. Med., 5:247-54, 1975.
23. McGUIGAN, J.E. & TRUDEAU, W.L. Studies with antibodies to gastrin. Gastroenterology, 58:139-50, 1970.
24. FRONCON, L.E.A.; OLIVEIRA, R.B.; MENEGHELLI, V.C.; DANTAS, R.O.; GOUDY, R.A. Fasting and food-stimulated plasma gastrin levels in

Chronic Chagas'Disease. Digestion, 29:171-6, 1984.

25. MOTT, C.B. Avaliação funcional do pâncreas exócrino e da liberação de hormônios gastro-êntero-pancreáticos em portadores de doença de Chagas crônica. São Paulo, 1985. (Tese de livre docência, Faculdade de Medicina, Univ. São Paulo).
26. GANGULI, P.C.; CULLEN, D.R.; IRVINE, W.J. Radioimmunoassay of plasma gastrin in pernicious anemia, achlorhydria without pernicious anemia, hypochlorhydria, and controls. Lancet, 1:155-8, 1971.
27. KORMAN, M.G.; LAVER, M.C.; HANSKY, J. Hypergastrinemia in chronic renal failure. Br. Med. J., 1:209-10, 1972.

## LEGENDAS DAS FIGURAS

- Fig. 1: Cromatograma da purificação da gastrina- $^{125}\text{I}$  em QAE-Sephadex A-25. A linha contínua expressa a radioatividade das frações em contagens por minuto e a linha descontínua representa a porcentagem de ligação da gastrina- $^{125}\text{I}$  ao seu anticorpo específico, empregado em excesso. A área hachurada corresponde às frações que foram misturadas e estocadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para serem usadas como traçador nos ensaios.
- Fig. 2: Exemplo típico de uma curva padrão obtida no radioimunoensaio de gastrina.
- Fig. 3: Níveis circulantes de gastrina, em condições de jejum, determinados em indivíduos normais, gastrectomizados, diabéticos, portadores de anemia perniciosa, insuficiência renal crônica e síndrome de Zollinger-Ellison, indicando o valor médio de cada grupo. As mulheres são representadas por (=) e os homens por (+).

INDIVÍDUOS	GASTRINA (pmol/l)	
	SORO	PLASMA
M.H.	11	9
I.A.	150	150
R.A.	23	20
Y.M.	9	7
A.W.	77	75
N.F.	10	9
E.A.	12	8
I.C.	5	4
L.H.	28	26
O.R.	13	18
E.B.	18	16
A.V.	12	10
P.B.	11	9
L.E.	6	5
G.P.	12	12
T.A.	20	14
V.C.	7	7
T.C.	11	11
I.S.	34	27
C.M.	7	6
O.K.	6	3
K.O.	4	3
C.S.	14	14
MÉDIA ± DP	21,74 ± 31,84	20,12 ± 31,94

TABELA I: Valores da gastrinemia determinados no soro e plasma humanos.

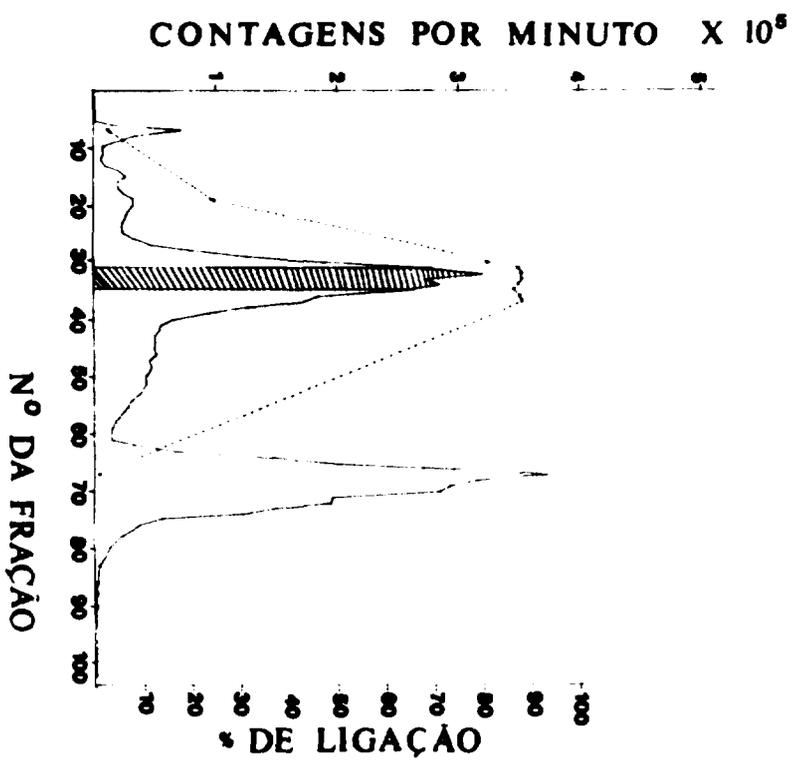


Figura 1

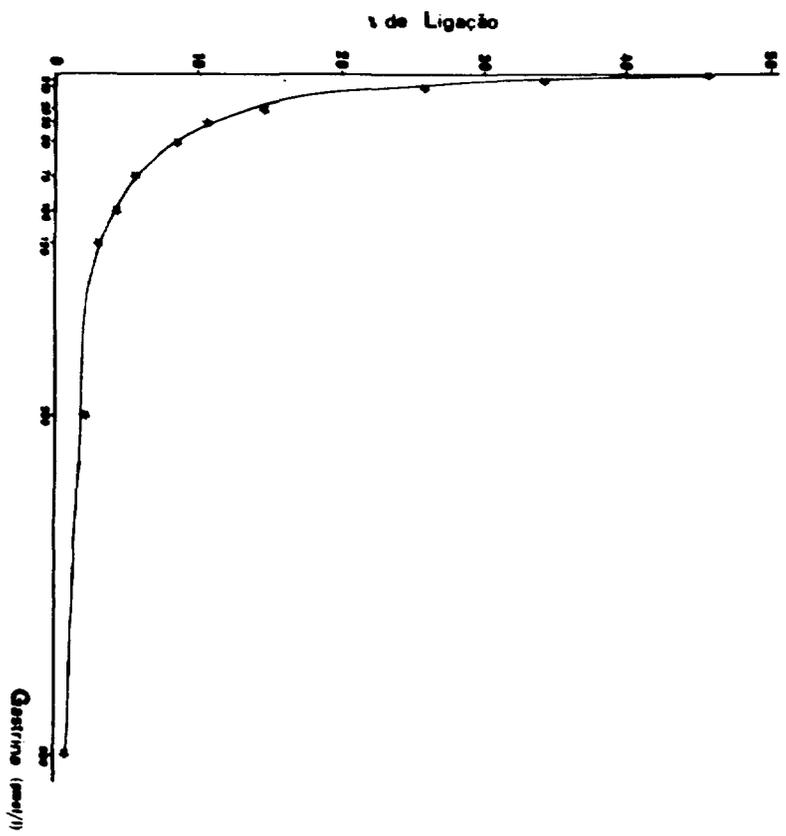


Figura 2

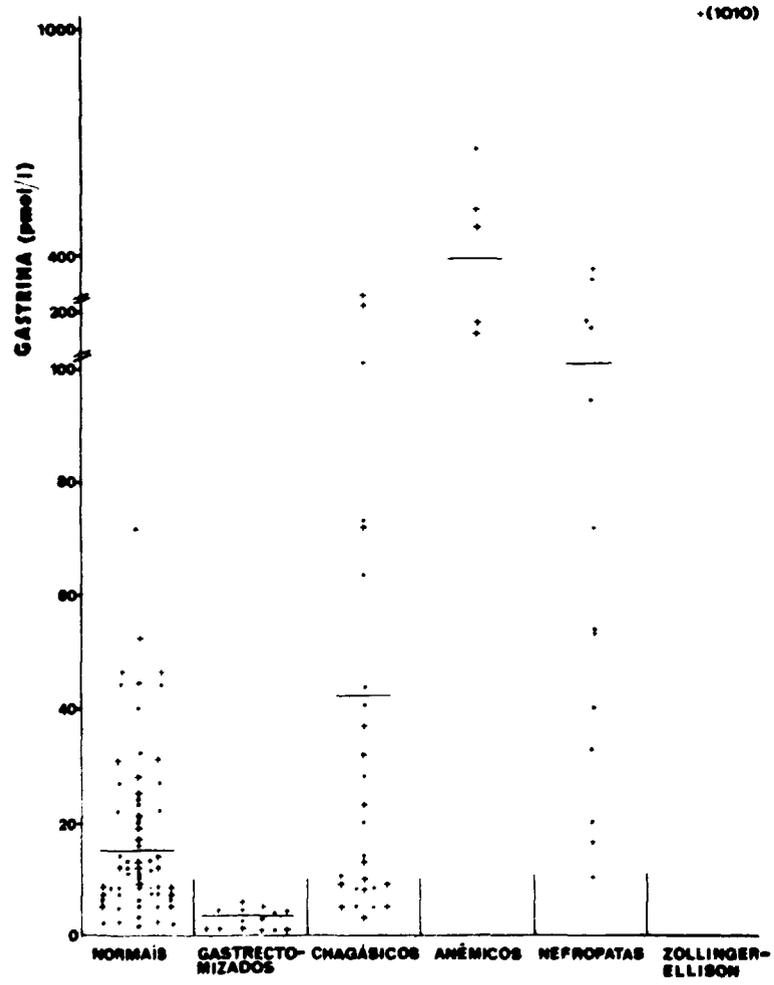


Figura 3