

Iracélia Torres de Toledo e Souza

**APLICAÇÃO DO MÉTODO DO RADIOIMUNOENSAIO NA
DOSAGEM DA INSULINA NO PLASMA HUMANO**

*Tese apresentada ao Instituto de Biociências
da Universidade de São Paulo, Departamento
de Fisiologia Geral, para obtenção do título
de "Mestre em Ciências", sob a orientação
do Prof. Dr. Paulo Sawaya.*

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Instituto de Biociências

Instituto de Energia Atômica

Departamento de Fisiologia Geral

Departamento de Radiobiologia

SÃO PAULO

1972

IRACELIA TORRES DE TOLEDO E SOUZA

**APLICAÇÃO DO MÉTODO DO RADIOIMUNOENSAIO
NA DOSAGEM DA INSULINA NO PLASMA HUMANO**

Tese apresentada ao Instituto de
Bióciências da Universidade de São
Paulo, Departamento de Fisiologia
Geral, para obtenção do título de
"Mestre em Ciências" sob a orienta
ção do Prof. Dr. Paulo Sawaya.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**Instituto de Biociências
Departamento de Fisiologia Geral**

**Instituto de Energia Atômica
Departamento de Radiobiologia**

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paulo Sawaya, pela orientação desta tese, ensinamentos, estímulo e amizade.

Ao Prof. Dr. Rômulo Ribeiro Pieroni, Superintendente do Instituto de Energia Atômica, pelo apoio e interesse que tornaram possível a realização deste trabalho.

Ao Dr. Bernardo Léo Wajchenberg, pela coordenação, incentivo e cordial colaboração proporcionados na feitura desta tese.

Ao Prof. Dr. José Moura Gonçalves, Chefe do Departamento de Radiobiologia do Instituto de Energia Atômica, pelo interesse demonstrado em nossa pesquisa.

Ao Dr. Julio Kieffer, pela participação decisiva para que este trabalho se apresentasse nos moldes atuais.

À Dra. Rosalyn S. Yalow, pelos valiosos ensinamentos em radioimunoensaios durante a sua permanência no Instituto de Energia Atômica.

Às Bioquímicas Olga Zazuco Higa e Heidi Pinto, pelos múltiplos auxílios prestados na execução do trabalho.

Aos médicos da Unidade de Diabetes e Supra-renal da 1^a Clínica Médica do Hospital das Clínicas da F.M.U.S.P., pelo auxílio desinteressado e gentil nas infusões e coleta de plasmas.

À equipe do Dr. Evaldo Hermínio de Lúcia Melo, do Laboratório Central do Hospital do Servidor Público, pelas sugestões referentes à análise estatística.

A todos que contribuíram na realização deste trabalho e que involuntariamente omitimos.

INDICE

	Página
1. INTRODUÇÃO E PROPÓSITO	1
2. PROGRAMAÇÃO EXPERIMENTAL	6
3. MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1. Marcação da Insulina com ¹²⁵ I	13
3.2. Determinação da diluição apropriada do anticorpo..	18
3.3. Técnica e seqüência operacional do teor de insulina numa série de amostras de plasma humano por radimunoensaio	20
3.4. Ensaio para avaliação dos característicos da seqüência operacional selecionada para a dosagem de insulina em plasma	24
3.5. Tratamento estatístico dos resultados	25
4. RESULTADOS	26
4.1. Controle da eficiência de marcação da insulina ...	26
4.2. Purificação da insulina marcada	26
4.3. Determinação da diluição adequada do anticorpo e controle do dano da insulina na fase de incubação.	30
4.4. Curva padrão	30
4.5. Amostras de plasmas	30
4.6. Especificidade	36
4.7. Exatidão	36
4.8. Sensibilidade	36
4.9. Precisão	41
5. DISCUSSÃO	44
6. CONCLUSÕES	47
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

1. INTRODUÇÃO E PROPÓSITO

A insulina, a semelhança de outros hormônios protéicos, tem sua quantificação em materiais biológicos, dificultada pela baixa concentração e pelo fato de não contar em sua estrutura com radicais característicos que permitam reações químicas próprias.

Os métodos biológicos, embora sensíveis, não são muito específicos nem precisos.⁽¹⁾

O doseamento da insulina somente se tornou mais acessível à rotina quando se associaram as características de especificidade de certas reações imunológicas às extremas sensibilidade e precisão das medidas físicas da radioatividade, ou seja através das técnicas genericamente denominadas de radioimunoensaio⁽¹⁻²⁻³⁻⁴⁻⁵⁾.

As técnicas de radioimunoensaio, inicialmente limitadas a determinação da insulina no plasma⁽⁶⁾, tiveram seu campo de uso dilatado a um sem número de substâncias que incluem estruturas químicas as mais diversas⁽⁷⁻⁵⁾.

Graças a generalização dos conceitos fundamentais de que qualquer proteína que exiba um alto poder de afinidade (binding) por determinada substância, pode ser usada para medir a concentração desta, desde que a mesma seja possível de ser identificada pela incorporação de um radioelemento.

A mesma técnica poderá apreciar quantitativamente a proteína em termos de seus sítios de ligação (binding sites).

Os princípios do ensaio radioimunológico se esteiam numa série de reações de competição⁽¹⁻²⁻⁸⁾ esquematicamente representadas na Figura 1, onde Ag* representa o hormônio marcado, antígeno específico para a formação do anticorpo Ab. Pondo ambos em contato, estabelece-se um equilíbrio dinâmico entre o complexo antígeno-anticorpo Ag*Ab (onde Ag* está sob a forma ligada (B) e seus elementos constitutivos Ab e Ag* forma livre (F) do hormônio marcado).

A adição ao sistema, ora descrito, de hormônio não marcado Ag (hormônio "frio") vai deslocar da formação de Ag*Ab uma fração de Ag* proporcional as quantidades relativas de Ag (daí as expressões competição, deslocamento, inibição competitiva empregadas na literatura).

Determina-se a quantidade de hormônio, em amostras de concentração desconhecida, comparando-se a inibição competitiva produzida pelo teor desconhecido com a determinada no mesmo sistema antígeno-anticorpo, por quantidades conhecidas e progressivas de hormônio "frio" (curva de calibração, padronização).

Como resulta da exposição acima, o poder competitivo e, consequentemente, a massa de hormônio a determinar, é apreciada através da relação B/F, ou seja, mercê da razão entre as quantidades de hormônio marcado ligados e livre.

Para que sistemas dessa natureza possam se tornar eficientes em termos quantitativos, é mister respeitar algumas condições essenciais ligadas às próprias substâncias postas a reagir.

A quantidade de anticorpo disponível deverá ser sempre inferior a quantidade de antígeno presente (em termos de capacidade complexadora) a fim de que possa existir condições de competição entre antígeno marcado e frio.

Um compromisso adequado entre as quantidades relativas de antígeno-anticorpo corresponde a valores de B/F que se distribuem entre 0,8 a 1,2⁽⁹⁾.

Um sistema como o descrito, no entanto, somente será útil se

REAÇÕES DE COMPETIÇÃO CONSTITUINDO A BASE PARA O RADIOIMUNOENSAIO

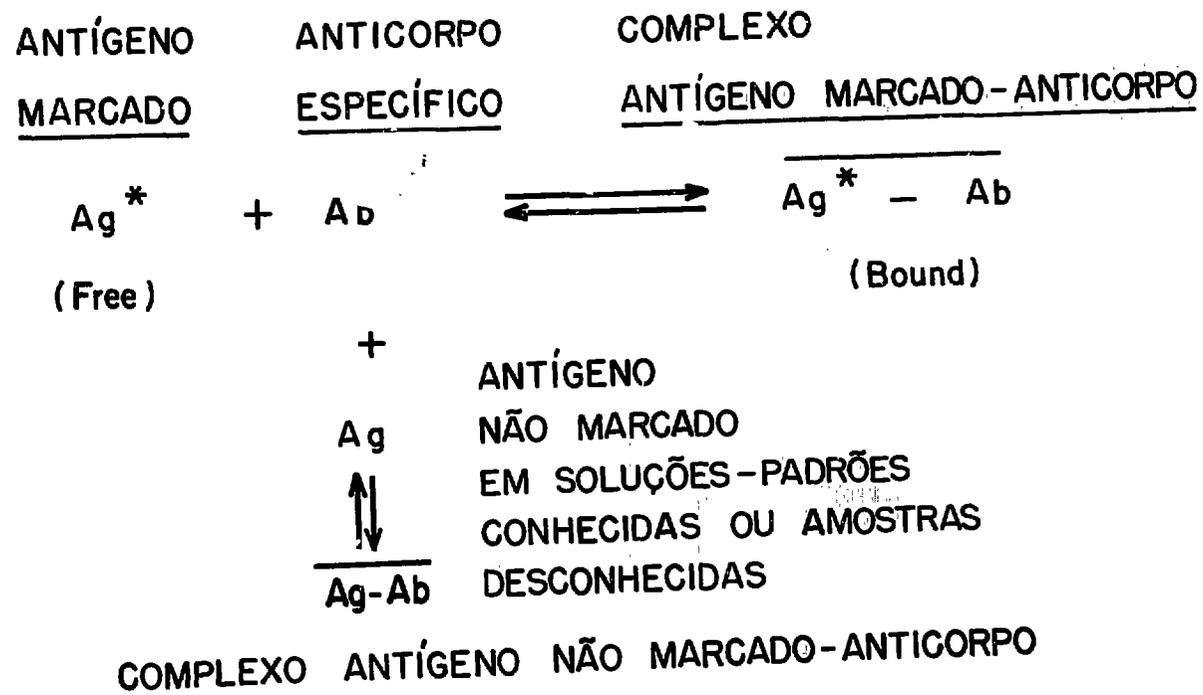


FIGURA 1

for possível separar, de maneira prática e eficiente, as frações livres e combinadas de hormônio marcado, indicador da reação de competição que é a base do método.

Para alcançar este fim recorreu-se a artifícios técnicos os mais variados tais como:

- Cromatoeletroforese (Yalow, Berson; Glick, Roth)⁽¹⁰⁻¹¹⁾
- Eletroforese (Hunter, Greenwood)⁽¹²⁾
- Filtração em Gel (Haber, Page e Richards; Genuth, Frohman e Lebovitz)⁽¹³⁻¹⁴⁾.
- Resina de troca iônica (Mead e Klitgaard; Yalow e Berson)⁽¹⁵⁻⁵⁾.
- Carvão ativado com dextrana (Wool e Selenkow; Herbert, Lau, Gottlieb e Bleicher)⁽¹⁶⁻¹⁷⁾.
- Talco e sílica (Rosselin, Assan, Yalow e Berson)⁽¹⁸⁾.
- Carvão ativado com plasma (Yalow)⁽²¹⁾.
- Separação por meio de fase sólida (Catt e Tregear; Wide e Porath)⁽¹⁹⁻²⁰⁻²¹⁾.
- Separação pelo método do duplo anticorpo (Hales e Randle; Morgan e Lazarow; Sckom e Talmage)⁽²²⁻²³⁻²⁴⁾.
- Separação usando sal neutro ou solvente orgânico (Chard, Martin e Landon)⁽²⁵⁾.

Malgrado a considerável cópia de trabalhos publicados sobre o assunto e o tempo transcorrido desde as comunicações iniciais, ainda existe alguma controvérsia quanto a sequência técnica mais adequada e que leve a resultados mais consistentes, reprodutíveis e consequentemente mais confiáveis.

Acresce dizer que em nosso meio é o assunto ainda pouco co

nhecido pois limita-se a um pequeno número de trabalhos dados a público. Além disso, ainda não houve comunicações relativas as vantagens do emprego das derradeiras inovações técnicas, tais como o uso de partículas de carvão ativado recobertas de plasma para a separação da fração livre (F) do hormônio marcado.

Em face das considerações expostas propuzemo-nos estudar as condições de exequibilidade em nosso meio da dosagem da insulina em plasma humano por técnica de radioensaio, visando sua padronização dentro da esquematização experimental adiante exposta e justificada a mercê dos métodos selecionados para tanto.

2. PROGRAMAÇÃO EXPERIMENTAL

Para alcançar o fim proposto era mister dispor dos reagentes essenciais do método a saber: hormônio marcado e frio, anticorpo antiinsulina e um sistema de separação da insulina marcada livre (F) e complexada (B), cada qual obedecendo a características e especificações bem definidas e muitas vezes críticas.

Cada um dos itens será analisado separadamente justificando-se a tomada de decisões.

A. INSULINA "FRIA" E MARCADA

Como fonte de insulina "fria", como matéria prima para a marcada, limitamo-nos a recorrer a uma das diferentes fontes de insulina de porco recristalizada disponíveis no mercado⁽⁹⁻¹⁶⁻²⁶⁾.

Valemo-nos da insulina porcina, por ser a mesma utilizada no preparo do anticorpo⁽⁹⁾.

O fato de ser originária de outra espécie não é crítico, em virtude da mesma apresentar seqüência aminoácida idêntica a humana, exceto a presença de alanina em lugar de treonina no carbono terminal da cadeia B⁽³⁾.

Para as curvas padrão utilizamos insulina humana preparada pelo Dr. Mirsky.

No que toca a insulina marcada, optamos pela sua marcação

em virtude de já contarmos com razoável experiência na marcação de substratos proteicos com radioiodo (albumina, gama globulinas, etc.) e por ser de toda conveniência o emprego de partidas recém marcadas, afim de poder utilizar, após purificação radiohormônio da melhor qualidade.

O método mais empregado para a marcação do hormônio é o de Hunter e Greenwood (27-28), também por nós adotado levando-se em conta o fato de ser um método de rotina em nosso meio.

Quanto ao radioelemento, optamos desde logo pelo ^{125}I , malgrado não seja ainda preparado entre nós e dependa de importação, pelas inegáveis vantagens ligadas a sua emissão radioativa de baixa energia, determinando menor dano molecular, o que permite conservar-lhe as propriedades biológicas, em particular as imunitárias essenciais dentro do esquema metodológico que nos interessa (5-29). Apesar dos cuidados utilizados no desenvolvimento da marcação propriamente dita, a estrutura da insulina sofre agressões que se traduzem a par da presença de moléculas de insulina, pela de frações moleculares igualmente marcadas (insulina danificada) e iodo livre (1-29).

É pois necessário proceder-se a uma purificação prévia antes de empregar a insulina marcada na sequência metodológica do ensaio.

A literatura especializada refere diferentes técnicas para a purificação do hormônio marcado; não havendo, no entanto, uma unanimidade de pontos de vista, resolvemos ensaiar algumas das técnicas propostas, a fim de poder eleger ao final, a que permite mais elevado nível de pureza, independentemente do rendimento, em face dos recursos locais.

Para tanto ensaiamos os três métodos adiante referidos.

1. Cromatografia de adsorção em celulose.

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 solução álcool-ácido. (30).

2. Eletroforese em gel de amido.

Este método é particularmente usado para separação de insulinas com diferente teor de iodo (31). Presumivelmente moléculas com resíduos de diiodo tirosina migram mais rapidamente para o anodo do que moléculas com grupamentos tirosil monosubstituídos (29) em virtude de cada resíduo de tirosina diiodada conferir em pH 8-8,6, uma carga negativa extra a molécula.

3. Cromatografia em coluna de exclusão molecular (Sephadex).

Esta técnica constitui uma purificação ulterior, dos produtos fracionados através da eletroforese em gel de amido.

A fração intermediária é cromatografada em "Sephadex" G-50 fino. Elue-se com solução Veronal Albumina, separando-se a fração mais pura, conseqüentemente a mais indicada, através da mesma técnica empregada para separar o hormônio livre do complexo.

Para se apreciar as vantagens relativas de cada método de purificação, se tornou necessário criar um critério de qualidade para o hormônio marcado e padronizar a técnica correspondente que repousa no emprego do reagente complexante específico.

B. ANTICORPO ESPECÍFICO

Em virtude da disponibilidade internacional de anticorpos antiinsulina de elevado título, afastou-se inicialmente qualquer tentativa de produção local, recorrendo-se a Dra. Yalow, que gentilmente nos supriu de quantidades suficientes para largo período de ensaio.

No entanto, objetivando iniciar-se um aprendizado metodológico orientado no sentido de produzir anticorpos para emprego em técnicas de competição, deu-se início a uma série de tentativas que aqui não serão relatadas por fugirem ao assunto fundamental.

C. SEPARAÇÃO DAS FRAÇÕES LIVRE (F) E LIGADA (B) DO HORMÔNIO MARCADO.

Nesse sentido, embora existam referências de numerosos mê todos, cada qual desfrutando alguma propriedade específica de determini nados reagentes, aceitamos a sugestão da Dra. Yalow, de utilizar carvão ativado recoberto com plasma para a remoção da fração livre (F) do meio de reação pelas seguintes razões.

a) a sugestão vinha de pessoa de mais alta qualificação em técnicas de radioimunoensaio, com enorme experiência neste setor;

b) em virtude de termos podido acompanhar durante um mês os trabalhos da Dra. Yalow, pudemos treinar sob sua direta orientação, a técnica em tela o que cremos nos permitiu adquiri r rapidamente um domínio da mesma. De posse dos meios que a nosso ver seriam adequados e suficientes para levar adiante nosso trabalho, resta esquematizar a sequência experimental para a concretização do nosso propósito.

A exequibilidade e seu grau resultariam, ao final, da própria sequência dos ensaios realizados e de seus resultados.

D. ESTABELECIMENTO DA DILUIÇÃO APROPRIADA DO ANTICORPO.

Antes de usar o hormônio marcado para radioimunoensaio, a preparação é testada para observar a percentagem de radioiodo e compo nentes danificados e propriedade de se ligar adequadamente ao antico rpo. É conveniente iniciar incubações preliminares, sob as condiçõ es do ensaio, em diluições diferentes, escolhendo-se a que apresenta r uma boa relação B/F em menor tempo, e pequena fração degradada.

Nos testes preliminares, além de se determinar a estabilida dade da preparação marcada e suscetibilidade para danificar-se durante a incubação, determina-se também a imunoreatividade.

A padronização da técnica envolve, em nosso sentir, a ve

rificação das condições e graus de especificidade, exatidão, sensibilidade e precisão, para testar as quais planejaram-se os modelos experimentais seguintes.

a) Especificidade

Para testar esta propriedade, entendida como a quantificação individual de determinada substância, no caso o hormônio, limitamos os ensaios à comprovação, no material biológico a ser analisado, da inexistência de substâncias que por qualquer mecanismo, possam interferir na reação.

Para tanto seguimos as indicações de Yalow⁽³⁻¹⁰⁾ que sugere o emprego de diluições do material a estudar com o objetivo de verificar a constância do teor de insulina quando corrigido pelo valor de diluição.

A existência de qualquer substância capaz de reagir dentro do sistema insulina-anticorpo específico necessariamente levaria a uma falta de linearidade entre as concentrações medidas e os respectivos valores de diluição.

É óbvio que este ensaio será válido como teste de especificidade se o método for por outros aspectos, suficientemente confiável, o que cremos poder demonstrar na sequência adiante expostas.

b) Exatidão

Esta característica foi apreciada através da recuperação de quantidades conhecidas de hormônio purificado adicionados ao meio no qual se procede a dosagem, no caso particular no plasma.

Quanto mais elevada for a recuperação percentual tanto melhor será o método no que toca à exatidão.

Como limite de aceitabilidade fixamos valores de coeficiente de correlação, r significativo ao redor de $\alpha = 0,05$.

c) Sensibilidade

Um requisito para um radioimunoensaio sensível é um anticorpo que tenha interação elevada com o hormônio, que se reflete essencialmente na queda inicial da curva padrão⁽³⁾.

d) Precisão

Um método é preciso quando é compatível com a reprodução de um mesmo resultado em diversas alíquotas de um mesmo material. Mede ela conseqüentemente, a propagação dos erros experimentais e dos inerentes a técnica (especificidade, sensibilidade, exatidão) Assim sendo, é oportuno ensaiá-la em duas condições diferentes a saber:

1. Em condições ideais, ou seja, quando o operador, materiais e instrumentos são de elevada qualidade, neste caso o erro experimental será reduzido pela competência do operador, pela qualidade dos reagentes e pela precisão e adequação do instrumental (pipetas, volumétricos, balanças, medidores de atividade etc.)

Para esse nível fixamos um coeficiente de variação igual ou inferior a 10% para uma série de 20 determinações realizadas no mesmo dia de trabalho.

2. Em condições de rotina. As habituais a um laboratório de rotina. Nesse caso aceitamos como coeficiente de variação valores iguais ou inferiores a 20% para uma série de 20 determinações distribuídas em outros tantos dias de trabalho. Fixamos em 10 e 20%, efetivamente, os valores críticos para a precisão em condições ideais e de rotina por estarmos lidando com um parâmetro cujas dispersões de valores em indivíduos normais é suficientemente ampla para observar números como os referidos. No fenômeno das alterações patológicas da insulinemia, as variações são ainda maiores e conseqüentemente compatíveis com os limites fixados.

Para a verificação dos níveis de significância utilizou-se o teste t de Student⁽³²⁾.

Como complemento final, realizaram-se dosagem em

plasma humano em número superior a 3000 cobrindo situações clínicas as mais variadas e conseqüentemente amplo espectro de valores individuais. Os resultados destas séries não serão apreciadas neste trabalho apenas nos valeremos da experiência vivida para alguns comentários de caráter metodológico.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MARCAÇÃO DA INSULINA COM ^{125}I

Empregamos o método de Hunter e Greenwood (27-28) com as modificações sugeridas por Yalow e Berson⁽²⁾ utilizando como matérias primas essenciais insulina de porco recristalizada 6 vezes (Lilly Laboratories) e ^{125}I sob a forma de iodeto com atividade variando entre 200 a 300 mCi/ml (Union Carbide Corporation).

A técnica obedece a sequência seguinte e emprega os reagentes e soluções reagentes adiante relacionados.

Reagentes

- Fosfato dibásico de potássio anidro (Q.E.E.L.)
- Fosfato monobásico de potássio (Q.E.E.L.)
- Cloramina T (Merck)
- Metabissulfito de Sódio (British Drug House)

Soluções reagentes

- Tampão Fosfato 0,2M pH 7,4
- Cloramina T dissolvida em Tampão Fosfato na concentração de 2,65 mg/ml.
- Metabissulfito de sódio dissolvido em Tampão Fosfato na concentração de 4,8 mg/ml.

Quantidades e ordem de adição dos reagentes

- 1 20 ul de Tampão Fosfato 0,2M.

- 2. 5* ul de ^{125}I odo.
- 3. 5* ul de Insulina de porco.
- 4. 20 ul de Cloramina T.
- 5. 20 ul de Metabisulfito de Sódio.

* As quantidades de ^{125}I odo e Insulina de porco variam de acordo com a atividade específica que se deseja.

As quantidades de outros elementos são mantidas constantes.

Uma vez adicionado o hormônio os outros reagentes devem ser colocados rapidamente para evitar dano a insulina ^{125}I e a adsorção ao tubo de reação.

3.1.1. Controle da eficiência da marcação.

Para este teste usamos ácido dietilbarbitúrico, dietilbarbiturato de sódio (Q.E.E.L.) para o preparo do Tampão "Veronal" 0,025M pH 8,6. Carvão Norit-grade A (Amend Drug and Chemical Co.) suspenso por agitação contínua em Tampão "Veronal", na concentração de 100 mg/ml.

A uma alíquota da mistura contida no tubo de iodação, acrescentam-se 100 ul de plasma, 2,4 ml de Tampão "Veronal" e 0,2 ml da suspensão de carvão (que é o adsorvente específico do hormônio).

Agita-se bem em agitador de tubos "Vortex", centrifuga-se a 5°C e 2000 rotações por minuto durante 20 minutos em centrífuga refrigerada (I.E.C International Centrifuge).

O sobrenadante e o precipitado têm suas atividades determinadas e expressas em percentagem da atividade total.

Preparações com rendimento inferior a 50% são desprezadas. Resultados superiores a 60% são esperados.

3.1.2. Purificação da insulina marcada.

3.1.2.1. Coluna de celulose.

Prepara-se a coluna a partir de um tubo graduado de 12 cm de altura por 8 mm de diâmetro.

A coluna é preenchida com celulose Whatman (Ashless Powder Chemically W & R Balsten Ltd.) que é mantida na base com uma pequeno tampão de lã de vidro, e é compactada firmemente até a altura de 3 cm.

Uma vez adicionada a insulina ^{125}I à coluna, faz-se uma eluição com 3 porções de 2 ml de água destilada, que arrastarão a fração degradada do hormônio marcado adicionado à celulose. Para a eluição do hormônio marcado usam-se 3 porções de 0,5 ml de solução álcool-ácido (7,5 ml de álcool etílico, 0,15 ml de ácido clorídrico concentrado e 2,35 ml de água destilada). Dos eluídos correspondentes as frações de insulina ^{125}I são feitos testes de pureza, semelhante aos empregados para determinar a eficiência da marcação, passando a se expressar percentualmente a pureza registrada nas diversas amostras.

3.1.2.2. Eletroforese em gel de amido.

Prepara-se o gel de acordo com as recomendações gerais de Smithies (33-34) adaptadas as partidas de amido hidrolizado "Connought" segundo as indicações especificadas no rótulo do frasco.

Confeccionam-se as placas para eletroforese que são mantidas durante uma noite em câmara fria.

No decorrer do processo de iodação, imediatamente após a adição do metabissulfito de sódio, adicionam-se 40 ul de "plasma azul" e aplicam-se 40 ul da mistura para cada um dos sulcos feitos em gel de amido.

A mancha azul identifica a zona de migração da albumina sérica.

As diversas insulinas migram na frente da albumina.

A placa é posta na vertical e uma tensão de 100 volts é aplicada. A corrida é sustada quando o fronte azul atinge o meio da placa. A seguir, remove-se a placa de gel que é colocada em contato com filme Royal Blue da Kodak para autoradiografia; retirar após 15 minutos e revelar. Repetir com tempos de exposição variáveis até obter a melhor qualidade de informação relativa a topografia das faixas de radioatividade (Figura 2).

Os volumes de gel correspondentes as faixas de atividade são removidos para tubos de ensaio de 16 por 100mm, fechados com parafilme e mantidos congelados durante no mínimo, 3 horas.

Após descongelar, adiciona-se a cada tubo 1 ml da mistura de Veronal Albumina. (Solução de albumina humana Merck a 0,25% em Tampão - Veronal). A extração do hormônio marcado é facilitada pela compressão cuidadosa do gel com um tubo de 13 por 100 mm. Manobras violentas ou intempestivas podem danificar a proteína marcada.

A fração correspondente a faixa do meio (livre de super iodação e hormônio frio) é centrifugada para obter sobrenadante límpido que, adicionado de 0,2 ml de "plasma azul" é transferido para a coluna de "Sephadex" G-50 fino.

3.1.2.3. Coluna de "Sephadex".

Deixa-se o "Sephadex" G-50 fino (Lab. Pharmacia Upsalla - Suecia) em Tampão Veronal 0,025 M pH 8,6, no mínimo por 24 horas. Faz-se depois o empacotamento em bureta de 50 ml, sendo o gel retido por tampão de lã de vidro.

A eluição é feita com Veronal Albumina, coletando-se em coletor automático (Coletor Automático Arthur Thomas Co.) frações separadas de 1 ml de eluído.

O hormônio marcado purificado é eluído

AUTORADIOGRAFIA DE ELETROFORESE EM
GEL DE AMIDO DE INSULINA - ¹²⁵I
IMEDIATAMENTE APÓS IODAÇÃO



FIGURA 2

do após as proteínas séricas e os componentes danificados, mas antes do iodo livre.

Os tubos têm suas atividades determinadas em detetor de cintilação de "poço" e os picos de atividade são identificados.

As frações eluídas, correspondentes aos tubos dos picos de atividade são submetidas a controle de qualidade de segundo a mesma técnica empregada para a verificação da eficiência da marcação.

O grau de pureza de cada tubo é numericamente representado pelo valor percentual da atividade por insulina pura em relação a atividade total de cada tubo.

Identificam-se assim, os tubos correspondentes a insulina marcada e indene e, dentre eles os mais ricos em insulina pura. Esta série de tubos corresponde ao segundo pico (Figura 3).

Para o ensaio utiliza-se o material que acusou valor percentual de purificação mais elevado. Quando mais de um tubo apresentar valores próximos e elevados, seus conteúdos podem ser reunidos.

3.2. DETERMINAÇÃO DA DILUIÇÃO APROPRIADA DO ANTICORPO.

A partir de uma solução a 1/1000 do anticorpo (antiinsulina de porco preparada pela Dra. Yalow, Veterans Admin. Hospital Bronx, N.York) preparam-se diluições de títulos variáveis de até 1/400.000 empregando como diluente padrão solução Veronal Albumina a crescida de 1% de soro de cobaia e de uma quantidade de Insulina ^{125}I que contenha atividade correspondente a 1000 contagens por minuto (cpm). Essas diluições são testadas diariamente durante 3 a 4 dias (período de incubação) segundo a técnica seguinte:

A 2,4 ml de cada diluição, adicionam-se 100 μl de plas

CROMATOGRAFIA EM GEL SEPHADEX G-50
DE INSULINA DE PORCO MARCADA COM
 ^{125}I (ATIVIDADE ESPECÍFICA 300 mCi/mg)

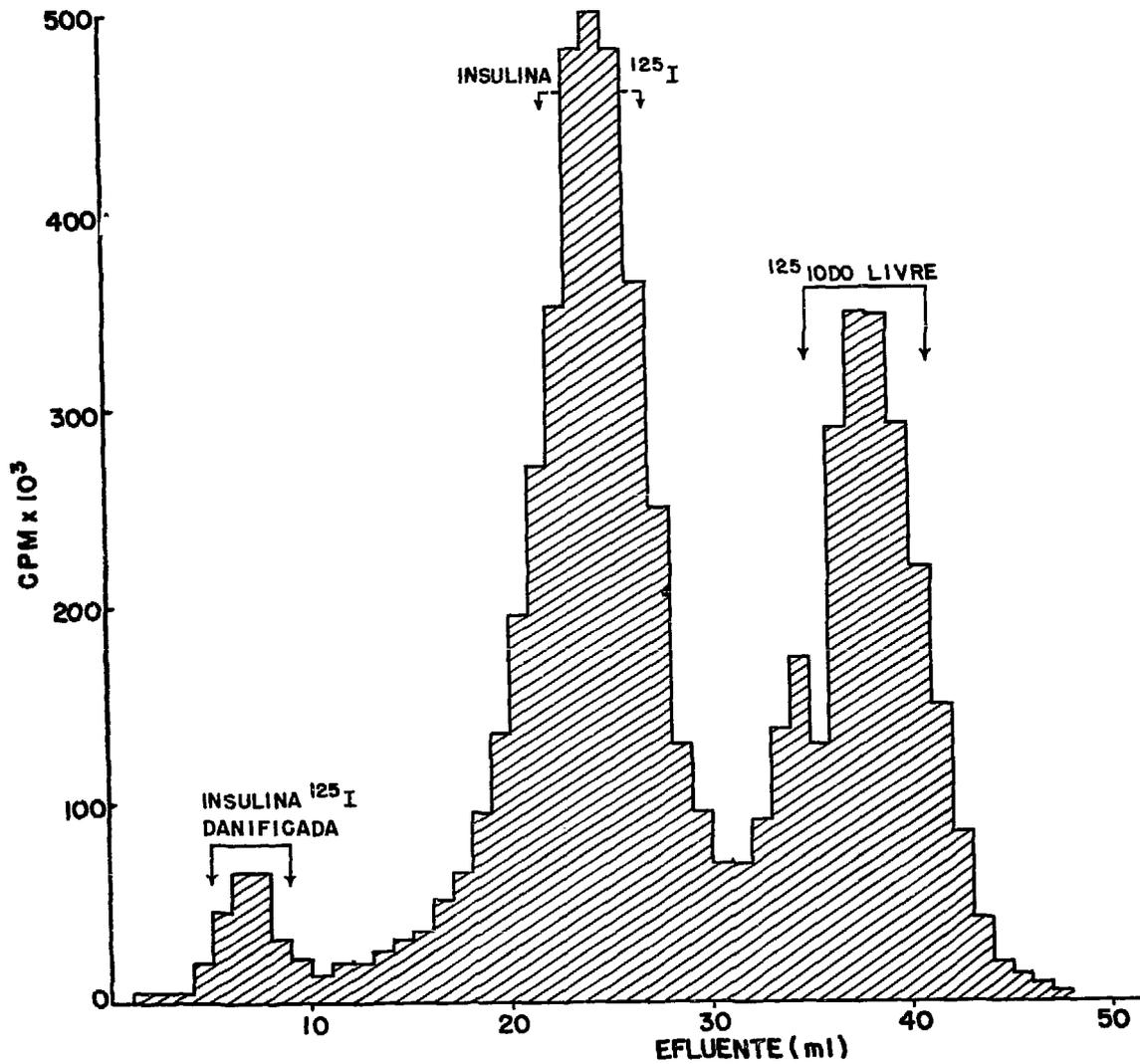


FIGURA 3

ma humano e 0,2 ml da suspensão de carvão Norit A já descrita.

Agitar em "Vortex". Centrifugar e determinar a atividade do precipitado e sobrenadante. Relacionar ambos os valores (B/F).

Paralelamente controlar a eventual degradação da insulina marcada da maneira seguinte. Adicionar a 2,4 ml da solução diluída padrão 100 ul de plasma e 0,2 ml de carvão. Agitar em "Vortex" e centrifugar.

Determinar as atividades do precipitado e sobrenadante, determinando esta última como percentual da soma das atividades.

Preparações pouco danificadas acusarão percentuais baixos. Eleger a menor diluição do anticorpo que apresentar uma relação B/F ao redor de 1,2 sem grande aumento da percentagem da danificação ao hormônio.

3.3. TÉCNICA E SEQUÊNCIA OPERACIONAL DA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE INSULINA NUMA SÉRIE DE AMOSTRAS DE PLASMA HUMANO POR RADIOIMUNOENSAIO.

Este protocolo apresenta a sequência operacional definitivamente escolhida por nós na dependência dos resultados dos diferentes ensaios aqui descritos e cuja justificativa consta dos comentários.

3.3.1. Curva padrão.

A quantificação do teor de insulina em amostras é obtida comparando-se a relação B/F das mesmas com as obtidas com quantidades conhecidas de insulina postas a reagir em condições idênticas.

Para o preparo das amostras de insulina com teor conhecido e que servirão para o preparo de curvas de calibração curvas padrão emprega-se insulina humana fornecida sob a forma de solu

ção contendo 1 ug/ml pela Escola de Medicina da Universidade de Pitts-
burgh (USA) por gentileza do Dr. Mirsky.

Esta solução será denominada de agora em dian-
te de solução estoque de insulina.

Tomar 25 u1 da solução estoque e diluir a 1 ml
com Veronal Albumina. Desta solução, preparar diluições de título va-
riável que cubram os valores correspondentes de 1 a 100 u1. Como di-
luente emprega-se solução Veronal Albumina.

As diluições são feitas em duplicata de forma
a poder dispor de 2 séries iguais. As diluições são feitas de acordo
com a tabela abaixo.

TABELA DE DILUIÇÃO DA SOLUÇÃO ESTOQUE DE INSULINA

TUBOS Nº	VOLUME INSULINA (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) u1	VERONAL ALBUMINA u1	CONCENTRAÇÃO FINAL INSULINA $\mu\text{g}/\text{ml}$
1	1	99	0,01
2	2	98	0,02
3	3	97	0,03
4	4	96	0,04
5	5	95	0,05
6	10	90	0,10
7	15	85	0,15
8	20	80	0,20
9	30	70	0,30
10	50	50	0,50
11	70	30	0,70
12	100	-	1,00

Além das 2 séries de 12 tubos, preparam-se 6 tubos, identificados pelas maiúsculas de A e F contendo 100 uI de solução Veronal Albumina e que irão servir como "brancos" para o ponto inicial das curvas de calibração (Aa D) e para o controle da degradação da insulina (Ee F).

Nos tubos controles são colocados 2,4 ml de diluente padrão e nos demais diluente padrão com o anticorpo na diluição ideal. Levar para a geladeira a 4°C para incubar durante 3 a 4 dias .

3.3.2. Amostras de plasma humano.

Os procedimentos técnicos, descritos e ensaiados neste trabalho são comprovadamente compatíveis com o processamento simultâneo de até 500 amostras de plasma.

Considerando-se que são feitos grande número de determinações simultâneas, o método foi semi-automatizado usando-se "biopette", pipetador automático e ponteiros descartáveis de polietileno no "biotip" (Schwarz/Mann) lavando as ponteiros várias vezes em água destilada e posteriormente várias vezes na amostra do próximo plasma a ser pipetado e trocando-as para cada lote de 10 a 15 tubos de plasma, procurando desta forma evitar contaminação das amostras.

Aos 100 uI de plasma de cada amostra, adicionam-se 2,4 ml de solução de diluente padrão com cerca de 1000 cpm de Insulina ¹²⁵I, contendo o anticorpo na diluição apropriada. Agita-se em "Vortex". Incubar 3 a 4 dias em geladeira a 4°C.

Para cada lote de 10 a 15 amostras de plasma, separar uma ao acaso e transferir 100 uI de plasma para um tubo que passará a ser o "controle" do período de incubação do lote.

Aos tubos controles, adicionam-se 2,4 ml de diluente padrão sem o anticorpo. Agitar em "Vortex". Incubar 3 a 4 dias em geladeira a 4°C.

Enquanto transcorre o tempo de incubação das

amostras de plasma e dos tubos para a calibração da relação B/F, realizam-se ensaios diários objetivando controlar o grau de degradação sofrida pela insulina marcada e sua capacidade de fixação ao anticorpo. Para tanto preparam-se 4 tubos contendo 2,4 ml de solução diluente padrão e mais 4 tubos contendo igual quantidade de diluente mais anticorpo na diluição escolhida.

Caso a fração degradada alcance valor igual ao superior a 10%, a incubação das amostras e padrões será interrompida desde que a relação B/F tenha alcançado valor, no mínimo, de 0,8.

Caso o valor de degradação percentual se conserve abaixo de 10%, aguarda-se mais tempo para verificar se a razão B/F alcança valores mais próximos de 1,2 que é o ideal. Na hipótese da razão B/F ser inferior a 0,8, deixar incubando mais 24 horas verificando mais uma vez o grau de degradação para que não se opere com valores percentuais superiores a 15%.

A seguir procede-se a derradeira adição que consta de 0,2 ml da suspensão de carvão Norit, que é feita em todos os tubos (amostras de plasma, padrões de insulina, controles etc.). Agitar em "Vortex". Centrifugar, separando o sobrenadante do carvão.

Proceder a determinação da atividade no carvão e no sobrenadante em detetor de cintilação de "poço", integrando-se pelo menos 10.000 impulsos com o fim de minimizar o erro decorrente da aleatoriedade do fenômeno radioativo.

Calculados os valores numéricos de B/F para cada amostra de insulina a massa correspondente de insulina é lida mediante a curva de referência recém elaborada. A massa de insulina da amostra, expressa em mug, deverá ser multiplicada por 625 ($625 = 25 \cdot 25$) para atender ao fator de diluição ($25 = 2,5 \text{ ml} / 0,1 \text{ ml}$) do plasma e pelo fator (25) de conversão para uU ($1 \text{ mug de insulina} = 25 \text{ uU}$).

O valor médio da relação B/F para cada diluição da solução de insulina é lançado na ordenada de gráfico linear contra o valor correspondente da massa de insulina expressa em mug. Os pontos

tos assim obtidos são reunidos pela curva contínua que melhor os satisfça.

3.4. ENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DOS CARACTERÍSTICOS DA SEQUÊN CIA OPERACIONAL SELECIONADA PARA A DOSAGEM DA INSULINA EM PLASMA.

3.4.1. Exatidão.

Preparar, em duplicata, 4 soluções em plasma de banco de sangue de insulina com concentrações crescentes 0,02 ; 0,04; 0,05 ; 0,10 mug. Processa-se o método descrito e calcula-se a média para cada lote.

Calcular o coeficiente de correlação (r) e teste de significância do valor r , para valores de $\alpha = 0,05$.

Com uma mistura de plasma com presumível alto teor de insulina (acme de estimulação insular por sobrecarga de glicose) procedemos a:

3.4.2. Verificação da especificidade.

Preparar 4 amostras por diluição da mistura de plasma segundo os títulos 1:25 ; 1:50 ; 1:100 ; 1:125.

Processá-los de acordo com a técnica descrita. Calcular as médias das uU/ml correspondentes a cada diluição e lançá-las em ordenada de gráfico linear contra valores de diluição decrescentes.

Na hipótese do material reagente do plasma ser imunoquimicamente igual a insulina pancreatica humana utilizada no preparo das soluções padrão, dever-se-ã obter uma diagonal a 45° reunindo os pontos do gráfico.

Calcular o coeficiente de correlação r e o T_r que será aceito para valores de $\alpha = 0,05$.

3.4.3. Sensibilidade.

Se reflete essencialmente na queda inicial da curva padrão.

3.4.4. Precisão.

3.4.4.1. Reprodutibilidade em condições ideais de trabalho.

Da mistura do plasma preparam-se e processam-se 20 amostras iguais. Os valores numéricos da concentração foram calculados, bem como o coeficiente de variação. Seu limite de aceitabilidade foi fixado em 10%.

3.4.4.2. Reprodutibilidade em condições habituais de trabalho.

Da mistura do plasma preparam-se e processam-se 20 amostras distribuídas em outros tantos dias de trabalho. Calcula-se a média dos valores de concentração de insulina, estabelecendo-se como limite de aceitação, um coeficiente de variação de 20%.

3.5. TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Recorreu-se, conforme referido nos diferentes itens deste capítulo, ao cálculo do coeficiente de correlação r , estabelecendo-se sua significância.

Para as demais situações, calcularam-se as médias, desvios padrões e coeficiente de variação.

4. RESULTADOS

Para cada uma das etapas fundamentais da técnica de dosagem da insulina plasmática, serão apresentados os resultados decorrentes dos diferentes esquemas experimentais descritos e justificados no capítulo próprio.

4.1. CONTROLE DA EFICIÊNCIA DA MARCAÇÃO DA INSULINA

A Tabela I reúne os rendimentos percentuais de várias marcações realizadas. Consta da mesma Tabela a média que resultou ser de 73%.

4.2. PURIFICAÇÃO DA INSULINA MARCADA

4.2.1. Cromatografia de adsorção em celulose.

A Tabela II reúne os resultados dos ensaios de pureza realizados, para cada partida estudada (quatro), em cada uma das frações eluídas com solução álcool-ácido. Os valores numéricos expressam a percentagem de insulina pura contida em cada eluato, consequentemente os valores mais elevados corresponde pureza maior.

4.2.2. Cromatografia em coluna de exclusão molecular ("Sephadex").

A Tabela III consigna os valores percentuais expressivos do grau de pureza das diferentes amostras eluídas da coluna de "Sephadex" para cada uma das partidas ensaiadas. Como se depreende

TABELA I

CONTROLE DA EFICIÊNCIA DE MARCAÇÃO DA INSULINA ¹²⁵I

PARTIDA Nº	EFICIÊNCIA PERCENTUAL DE MARCAÇÃO %
1	83
2	76
3	80
4	73
5	76
6	70
7	68
8	70
9	60
10	70
11	74
12	75
13	80
14	74
15	70
16	68

$$\bar{X} = 73\%$$

TABELA II

CONTROLE DE PUREZA DAS FRAÇÕES DE INSULINA ^{125}I
INDENE SEPARADAS POR ADSORÇÃO EM CELULOSE

PARTIDA Nº	INSULINA ^{125}I INDENE DISTRIBUIÇÃO DOS VALORES PERCENTUAIS DE PUREZA NOS ELUATOS COM ÁLCOOL-ÁCIDO		
	1º eluato	2º eluato	3º eluato
1	90	93	83
2	93	92	77
3	85	83	73
4	95	89	85

TABELA III

CONTROLE DE PUREZA DAS FRAÇÕES DE INSULINA ^{125}I INDENE
SEPARADAS POR ELETROFORESE EM GEL DE AMIDO E POSTERIOR
CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE EXCLUSÃO MOLECULAR(SEPHADEX)

PARTIDA Nº	INSULINA ^{125}I INDENE DISTRIBUIÇÃO DOS VALORES PERCENTUAIS DE PUREZA NAS DIFERENTES FRAÇÕES ELUÍDAS		
	1º eluato	2º eluato	3º eluato
1	96	96	96
2	96	94	94
3	98	97	97
4	96	95	95
5	97	97	95
6	97	97	97
7	98	98	98

da inspeção da Tabela os valores oscilam entre 94 e 98%, atestando o elevado grau de purificação que é alcançado.

A Tabela IV compara os valores percentuais máximos registrados para cada partida submetida a purificação por ambas as técnicas. Como decorre da análise dos resultados, os relativos a técnica de eletroforese a cromatografia em "Sephadex" apresentam valores ligeiramente superiores e principalmente, mais homogêneos.

4.3. DETERMINAÇÃO DA DILUIÇÃO ADEQUADA DO ANTICORPO E CONTROLE DO DANO DA INSULINA NA FASE DE INCUBAÇÃO

A Tabela V reúne os dados numéricos representativos do dano percentual da insulina e a relação B/F correspondentes a cada título de diluição do anticorpo para cada um dos dias de incubação (quatro).

O asterístico identifica dentro de uma mesma faixa aceitável de dano percentual (5%) o valor B/F que caracteriza a diluição mais adequada, a saber, para o caso particular da Tabela 1:300.000.

Na Tabela VI acham-se reunidos os valores de diluição selecionados para as diferentes partidas a par de seus respectivos danos percentuais e valores de B/F.

4.4. CURVAS PADRÃO

Na Figura 4 acha-se representada uma curva padrão preparada de modo a cobrir valores de insulina que se estendem de 0,01 a 1,00 $\mu\text{g/ml}$.

A Tabela VII consigna os valores em duplicata da relação B/F para cada uma das massas de insulina ensaiadas.

4.5. AMOSTRAS DE PLASMA

Uma vez preparado o ensaio, durante o período de incu

CURVA PADRÃO PARA O ENSAIO DE INSULINA HUMANA
[AS RELAÇÕES INSULINA-ANTICORPO (B)/ INSULINA
(F) NAS SOLUÇÕES PADRÃO SÃO PROJETADAS COMO
UMA FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CONHECIDA DA IN-
SULINA]

DILUIÇÃO DO ANTISORO $1: 2 \times 10^5$

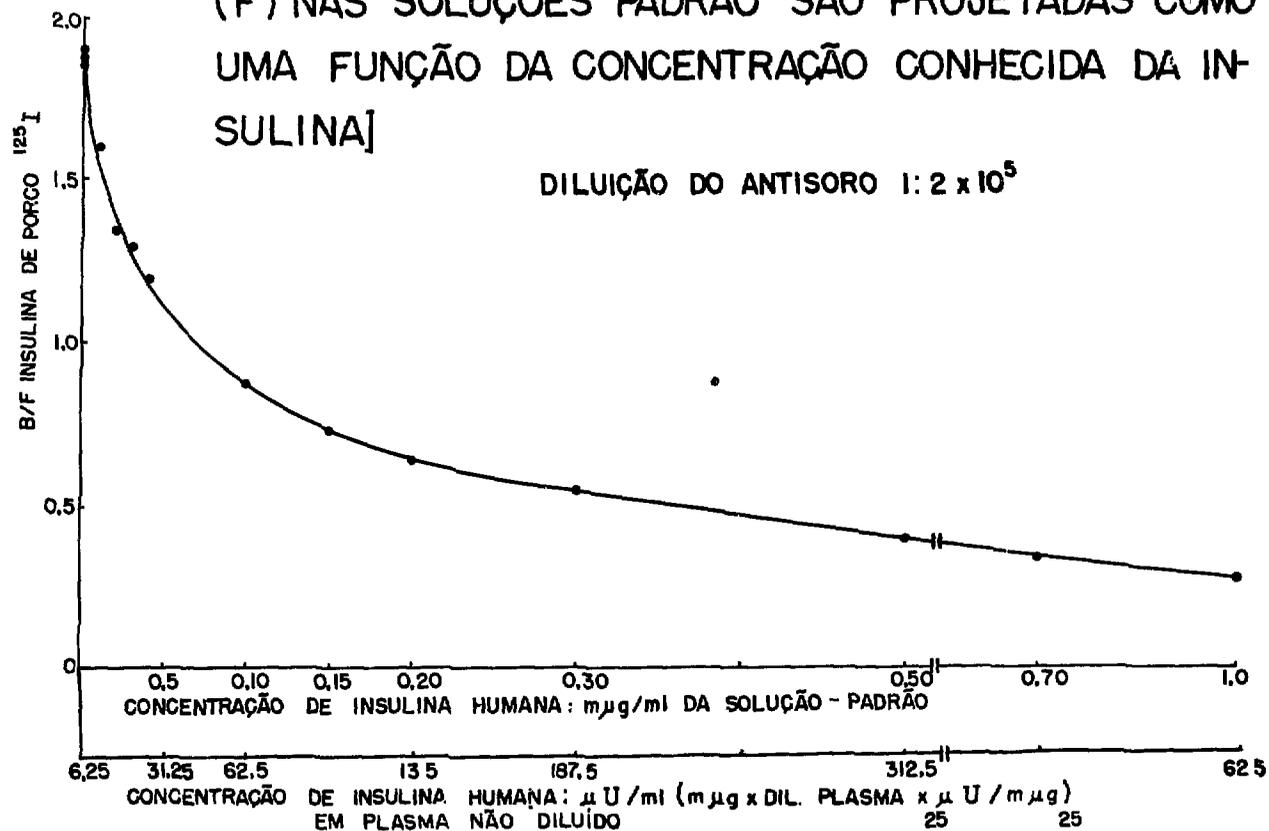


FIGURA 4

TABELA IV

COMPARAÇÃO DOS VALORES PERCENTUAIS DE PUREZAS MÁXIMAS DA INSULINA ^{125}I PURIFICADA POR COLUNA DE CELULOSE E ELETROFORESE EM GEL DE AMIDO SEGUIDA DE CROMATOGRAFIA EM "SEPHADEX"

PARTIDA Nº	COLUNA DE CELULOSE		ELETROFORESE + CROMATOGRAFIA EM "SEPHADEX"	
	% máxima	fração nº	% máxima	fração nº
1	93	2	96	1 a 3
2	93	1	96	1
3	85	1	98	1
4	95	1	96	1

TABELA V

DETERMINAÇÃO DA DILUIÇÃO ADEQUADA DO ANTICORPO PARA O INTERVALO DE INCUBAÇÃO E CONTROLE DO DANO DA INSULINA

TÍTULO DA DILUIÇÃO DO ANTICORPO	1º DIA		2º DIA		3º DIA		4º DIA	
	% DE DEGRADAÇÃO	B/F						
1: 1.10 ³	4	1,33	4	1,87	4	1,88	5	1,95
1: 2.10 ³	4	0,83	4	1,16	4	1,26	5	1,44
1: 3.10 ³	4	0,57	4	0,97	4	0,99	5	1,16*
1: 4.10 ³	4	0,41	4	0,57	4	0,70	5	0,83

* Identifica a diluição ideal dentro de uma mesma faixa de dano percentual perfeitamente aceitável.

TABELA VI

VALORES DE DILUIÇÃO SELECIONADOS PARA DIFERENTES ENSAIOS

TITULO DA DILUIÇÃO DO ANTICORPO	% DE DEGRADAÇÃO	B/F	TEMPO DE INCUBAÇÃO (dias)
1: $3 \cdot 10^3$	8	1,20	4
1: $2,5 \cdot 10^3$	9	1,40	4
1: $2,5 \cdot 10^3$	8	1,26	4
1: $2,5 \cdot 10^3$	9	1,42	3
1: $3 \cdot 10^3$	4	1,16	4
1: $2,5 \cdot 10^3$	10	1,30	3
1: $2,5 \cdot 10^3$	7	1,10	4
1: $3 \cdot 10^3$	11	1,19	4
1: $3 \cdot 10^3$	6	1,47	4
1: $3 \cdot 10^3$	10	1,26	4

TABELA VII

CURVA PADRÃO PARA VALORES DE INSULINA COMPREENDIDOS
ENTRE 0,01 a 1,0 μg ESTIMADOS COM INSULINA ^{125}I Nº1

TUBOS	CONCENTRAÇÃO INSULINA HUMANA μg	RELAÇÃO B/F		MÉDIA
		1ª série	2ª série	
A	-	1,91	1,89	1,90
B	-	1,85	1,87	1,86
C	-	1,89	1,87	1,88
D	-	1,83	1,85	1,84
1	0,01	1,59	1,61	1,60
2	0,02	1,34	1,37	1,35
3	0,03	1,28	1,32	1,30
4	0,04	1,18	1,22	1,20
5	0,05	1,09	1,11	1,10
6	0,10	0,86	0,90	0,88
7	0,15	0,70	0,74	0,72
8	0,20	0,62	0,66	0,64
9	0,30	0,53	0,58	0,55
10	0,50	0,38	0,42	0,40
11	0,70	0,32	0,36	0,34
12	1,00	0,27	0,29	0,28
CONTROLE PERCENTUAL DA FRAÇÃO DANIFICADA				
E	-	8	8	8
F	-	8	8	8

bação, realizam-se testes nos tubos preparados para tal, da percentagem de degradação da insulina ^{125}I e da relação B/F.

Na Tabela VIII temos um exemplo demonstrativo, onde se poderá verificar que o nível de degradação da insulina ^{125}I permaneceu inalterado (8%) e a relação B/F aumentou progressivamente até atingir um nível satisfatório de 1,2 no quarto dia de incubação quando o ensaio foi terminado.

4.6. ESPECIFICIDADE

A Tabela IX reúne os valores em quadruplicata expressos em uU/ml, para 4 diferentes diluições de uma mesma amostra de plasma. Constan igualmente as médias respectivas.

A Figura 5 construída com as médias acima, representa graficamente a correlação entre diluição e concentração de insulina. O valor de r resulta ser $r = 0,998$.

4.7. EXATIDÃO

A Tabela X reúne ao lado das quantidades de insulina de cada tubo as adicionadas a valores esperados, os obtidos e os respectivos dados percentuais. Calculou-se outrossim o coeficiente de correlação que resultou ser $r = 0,997$.

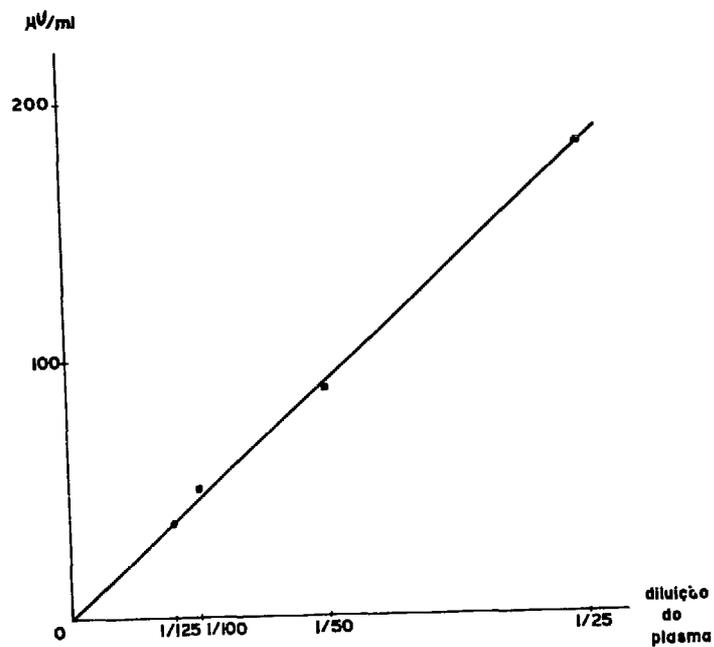
4.8. SENSIBILIDADE

Como índice de sensibilidade adotou-se o andamento inicial da curva de padronização. Quanto melhor o ângulo desta com a ordenada, maior a sensibilidade.

Com efeito, quanto maior for a inclinação da curva no seu trecho inicial correspondendo aos menores valores de massa da insulina, maior será a variação do B/F.

Esta maneira de apreciar a sensibilidade nada mais é

REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA ESPECIFICIDADE



Mistura de Plasmas

Diluições	$\mu\text{U/ml}$
1:25	182*
1:50	87*
1:100	50*
1:125	37*

* médias de 4 dosagens

FIGURA 5

TABELA VIII

ESTUDO DOS NÍVEIS DE DEGRADAÇÃO DA INSULINA ^{125}I E DA RELAÇÃO B/F DURANTE OS 4 DIAS DE INCUBAÇÃO DA DOSAGEM DE INSULINA EM PLASMA HUMANO

TEMPO DE INCUBAÇÃO (dias)	PERCENTAGEM DE DEGRADAÇÃO	INSULINA ^{125}I + ANTICORPO RELAÇÃO B/F
1	8	0,87
2	8	1,10
3	8	1,14
4	8	1,20

TABELA IX

CONTROLE DA ESPECIFICIDADE

DILUIÇÕES			
1:25 uU/ml	1:50 uU/ml	1:100 uU/ml	1:125 uU/ml
180	87	52	36
184	85	50	38
180	88	51	35
186	89	49	39
$\bar{x}=182$	$\bar{x}=87$	$\bar{x}=50$	$\bar{x}=37$

 $r = 0,998$ $Tr = 28,26$

TABELA X

PROVAS DE RECUPERAÇÃO ADICIONANDO QUANTIDADES CRESCENTES
DE INSULINA HUMANA A PLASMA COM CONCENTRAÇÃO CONSTANTE

TUBO Nº	QUANTIDADE EXISTENTE	QUANTIDADE ADICIONADA	VALOR ESPERADO	VALOR REGISTRADO	Δ %
	mug	mug	mug	mug	
1	0,02	-	0,02	0,019	99,5 105
	0,02	-	0,02	0,021	
2	0,02	0,02	0,04	0,037	93 105
	0,02	0,02	0,04	0,042	
3	0,02	0,03	0,05	0,051	102 94
	0,02	0,03	0,05	0,047	
4	0,02	0,08	0,10	0,101	101 97
	0,02	0,08	0,10	0,097	

 $r = 0,007$
 $Tr = 36,26$

do que uma simplificação subjetiva da forma analítica de testar o problema (Yalow 3-2).

4.9. PRECISÃO

Os resultados numéricos individuais, a média, desvio padrão o coeficiente de variação de 20 alíquotas de um mesmo plasma, ensaiado em condições ideais de trabalho acham-se reunidos na Tabela XI. A média resultou ser $164,3 \pm 12,2$ uU/ml e o coeficiente de variação 7,4%.

A Tabela XII reúne o mesmo tipo de dados para a mesma amostra, ensaiada em condições habituais de trabalho (rotina). A média foi de $160,0 \pm 12,2$ uU/ml e o coeficiente de variação 7,6%.

TABELA XI

ANÁLISE DA REPRODUTIBILIDADE DE 20 DETERMINAÇÕES DE INSULINA, EFETUADAS EM PLASMA, COM CONCENTRAÇÃO ELEVADA DE INSULINA, PERANTE CONDIÇÕES IDEAIS DE TRABALHO

TUBOS	CONCENTRAÇÃO DE INSULINA uU / ml
1	187
2	159
3	177
4	168
5	187
6	159
7	177
8	159
9	159
10	168
11	159
12	177
13	177
14	159
15	150
16	150
17	150
18	154
19	150
20	159

 $\bar{X} = 164,25$ $S = 12,19$ $CV = 7,4\%$

TABELA XII

ANÁLISE DA REPRODUTIBILIDADE DE 20 DETERMINAÇÕES DE INSULINA
EM MISTURA DE PLASMA, PERANTE CONDIÇÕES HABITUAIS DE TRABALHO

TUBOS	CONCENTRAÇÃO DE INSULINA uU/ml
1	160
2	149
3	155
4	149
5	149
6	151
7	149
8	170
9	151
10	170
11	160
12	151
13	170
14	151
15	185
16	151
17	170
18	158
19	160
20	190

 $\bar{x} = 160,0$

S = 12,2

CV = 7,6%

5. DISCUSSÃO

Dos diversos aspectos apresentados neste trabalho, discutiremos inicialmente a marcação da insulina.

Empregamos a modificação do método de Hunter e Greenwood como o sugerido por Yalow e Berson⁽²⁾ adicionando plasma humano, cujas proteínas serviriam para prevenir a adsorção do hormônio ao tubo de iodação, e os reagentes em sucessão a mais rápida possível.

Para se obterem marcações eficientes é aconselhável o emprego de volumes pequenos de reagentes em concentração elevada. Esta prática serve também para minimizar as perdas de hormônio por adsorção ao tubo de iodação, quando em baixas concentrações.

Um aspecto importante em radioimunoensaio é a marcação do hormônio peptídico com níveis de radioatividade que permitam uma contagem estatisticamente adequada, mantendo ao mesmo tempo uma baixa concentração de hormônio traçador, portanto atividade específica suficientemente alta (35).

Um aumento do número de substituições de radioiodo na molécula do hormônio, aumenta a atividade específica do hormônio marcado, mas por outro lado, uma super iodação tende a diminuir a imunoreatividade da preparação (5). Assim o hormônio deve ser marcado a uma atividade específica tal que seja consistente com a manutenção da integridade imunológica e estabilidade do hormônio radioativo.

Na purificação do hormônio marcado, empregamos inicialmente cromatografia de adsorção em coluna de celulose, que embora de feitura

simples, foi substituída pela cromatografia em coluna de exclusão molecular ("Sephadex") de melhor eficiência e resolução, como se poderá observar na Tabela IV comparativa dos dois sistemas de purificação.

O hormônio marcado ao ser levado a coluna Sephadex já tem os seus componentes com diferentes átomos de iodo selecionados através de eletroforese em gel de amido.

Pela Tabela III observa-se que o hormônio radioativo, após passagem em coluna de "Sephadex" apresenta uma pureza de até 98%.

Quanto a separação do hormônio livre do ligado ao anticorpo e componentes danificados, escolhemos, entre as várias técnicas de separação, a do carvão ativado recoberto com plasma, como adsorvente específico do hormônio.

Um critério para o uso de determinado adsorvente para radioimunoensaio de hormônios proteicos plasmáticos é a adsorção do hormônio livre na presença de concentração moderadamente elevada de proteínas séricas não específicas (competindo para os locais de adsorção) e a exclusão do hormônio danificado e complexo hormônio-anticorpo, nas mesmas condições.

No caso do carvão ativado, Herbert⁽³⁶⁾ menciona que a sua cobertura com uma molécula de tamanho apropriado diferente para cada hormônio, é necessária para que haja boa separação do hormônio livre permitindo que este se fixe no adsorvente passando através dos poros entre as moléculas de cobertura "peneira" que no entanto seriam pequenos para a passagem do complexo antígeno-anticorpo.

Por outro lado, Ekins⁽³⁷⁾ menciona que a cobertura de carvão ativado não oferece vantagem.

Com efeito, existem evidências de que a ação de proteínas séricas na adsorção de hormônios, na celulose por exemplo, é antes uma inibição competitiva do que a produção de um sistema semelhante a peneira, como quer Herbert⁽³⁸⁾. Qualquer que seja o mecanismo de funcionamento das superfícies de adsorção, na presença de proteínas plasmáticas

cas ou de outro material de cobertura, o resultado de nosso trabalho revelou que o carvão ativado recoberto com plasma é adsorvente satisfatório para uma separação eficiente entre hormônio livre e complexo antígeno-anticorpo.

O hormônio danificado e o unido ao anticorpo, tem menor afinidade do que o hormônio livre para os locais de adsorção.

A ótima quantidade de adsorvente (0,2 ml de uma solução a 100 mg/ml) foi selecionada com base na adsorção máxima do hormônio livre e da exclusão do complexo antígeno-anticorpo.

Assim chegamos a concentração ótima de separação quando se utilizam diluição de plasma 1:25 correspondendo a quantidade de adsorvente de 20 mg por tubo de reação.

O ensaio de uma mistura de plasma, com teor elevado de insulina, usando carvão como adsorvente específico do hormônio, para a determinação da especificidade e precisão do método, utilizando hormônio marcado, padrões de insulina humana, permitiram a construção de curvas padrão e cálculo da concentração das alíquotas dosadas.

A variação para a precisão do método foi de 7,4% para a reprodutibilidade em condições ideais de trabalho e 7,6% em condições de rotina.

Apesar de diferentes condições de trabalho, os resultados próximos, se deve ao fato de não ter havido variação de reagentes, instrumental e operador.

6. CONCLUSÕES

1. Padronizamos um método de separação do hormônio marcado ligado ao anticorpo (B) e hormônio marcado livre (F) para a dosagem da insulina pela técnica do radioimunoensaio.
2. Dos diversos métodos de separação do hormônio marcado livre e unido ao anticorpo, testados neste trabalho, introduzimos o método do carvão ativado recoberto com plasma, constituindo uma simplificação da dosagem do hormônio.
3. A técnica empregada, avaliada através da especificidade, exatidão e precisão é adequada para quantificar níveis de insulina plasmática desde condições basais até níveis de hiperinsulinemia, geralmente após estímulo adequado.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. YALOW, R.S. and BERSON, S.A. - Immunoassay of plasma insulin. Methods of Biochemical Analysis. 12, 69 (1964).
2. YALOW, R.S. and BERSON, S.A. - General Principles of Radioimmunoassay. Radioisotopes in Medicine: in vitro studies, U.S. Atomic Energy Commission, 7 (1968).
3. YALOW, R.S. and BERSON S.A. - Principles of Immunoassay of Peptide Hormones in plasma. Clinical Endocrinology II. (Astwood, E.B. and Cassady, C.E. Edts), 699 (1968).
4. YALOW, R.S. and BERSON S.A. - Plasma insulin in man. Editorial. The American Journal of Medicine. This article reprinted from the July issue, vol. XXIX, number 1, pages 1-8, copyright (1960).
5. YALOW, R.S. and BERSON, S.A. - General aspects of radioimmunoassay procedure. In vitro procedures with radioisotopes in medicine. International Atomic Energy Agency, Vienna, 455 (1970).
6. YALOW, R.S. and BERSON, S.A. - Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. Nature 184, 1648 (1959).
7. YALOW, R.S. and BERSON, S.A. - Introduction and general considerations. (Odell, W. and Daughaday, W. Edts), 1. (1972).
8. YALOW, R.S. and BERSON, S.A. - Immunoassay of the protein hormones. In: The Hormones, 4. (Pincus, G; Thimann, K.V., and As

twood, E.B. Edts). N.York, Academic Press Inc. 557 (1964).

9. YALOW, R.S. - Veterans Administration Hospital. Bronx, N.York. Informação pessoal (1970).
10. YALOW, R.S. and BERSON, S.A. - Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J.Clin.Invest.* 39, 1157 (1960).
11. GLICK, S.M. ; ROTH, J. ; YALOW, R.S. and BERSON, S.A.-Immunoassay of human growth hormone in plasma. *Nature* 24, 784 (1963).
12. HUNTER, W.M. and GREENWOOD, F.C. - A radioimmunoassay electrophoretic assay of H.G.H. *Biochem. J.* 91, 43 (1964).
13. HABER, E. ; PAGE, L.B. and RICHARDS, F.F. - Radioimmunoassay employing gel-filtration. *Analyt. Biochem.* 12, 163 (1965).
14. GENUTH, S.; FROHMAN, L.A. and LEOVITZ, H.E.- A radioimmunoassay method for insulin using insulin¹²⁵ and gel-filtration. *J. Clin. Endocr. Metab.* 25, 1043 (1965).
15. MEAD, R.C. and KLITGAARD, H.M. - A simplified method for immunoassay of human serum insulin. *J. Nucl. Med.* 3, 407 (1962).
16. HERBERT, V.; LAU, K.S. ; GOTTLIEB, C.M. and BLEICHER, S.J. Coated charcoal immunoassay of insulin. *J.Clin.Endocr. Metab.* 25, 1375 (1965).
17. WOOL, M.S. and SELENKOW, H.A. - Charcoal-dextran radioimmunoassay of H.G.H. *Acta Endocr.* 57, 109 (1968).
18. ROSSELIN, G.; ASSAN, R. ; YALOW, R.S. and BERSON, S.A.-Separation of antibody-bound and unbound peptide hormones labelled with iodine ¹³¹ by talcum powder and precipitated silica. *Nature* 212, 355 (1966).
19. CATT, K.J. and TREGGAR, G.W. - Solid phase radioimmunoassay. *Biochem. J.* 100, 31 c (1966).

20. CATT, K.J. and TREGGAR, G.W. - Solid phase radioimmunoassay. Nature 213, 825 (1967).
21. WIDE, L. and PORATH, J. - Radioimmunoassay of proteins with the use of sephadex coupled antibodies. Biochim. et Biophys. Acta 130, 257 (1966).
22. HALES, G.H. and Randle, P.J. - Immunoassay of insulin with insulin antibody precipitate. Biochem. J. 88, 137 (1963).
23. MORGAN, C.R. and LAZAROW, A. - Immunoassay of insulin two antibody system: plasma insulin levels of normal subdiabetic rats. Diabetes 12, 115 (1963).
24. SKOM, J.H. and TALMAGE, D.W. - Non precipitating insulin antibodies. J.Clin.Invest. 37, 783 (1958).
25. CHARD, T.; MARTIN, M. and LANDON, J. - The separation of antibody bound from free peptides using ammonium sulphate and ethanol. Radioimmunoassay Methods. (Kirkham, K.E. and Hunter, W.M. Eds) 257 (1971).
26. SOELDNER, J.S. and SLONE, D. - Critical variables in the radioimmunoassay of serum insulin using the double antibody technique. Diabetes 14, 771 (1965).
27. HUNTER W.M. and GREENWOOD, F.C. - Preparation of iodine I¹³¹ labelled human growth hormone of high specific activity. Nature 194, 495 (1962).
28. GREENWOOD, F.C.; HUNTER, W.M. and CLOVER, J.S. - The preparation of ¹³¹I labelled human growth hormone of high specific radioactivity. Biochem. J. 89, 114 (1963).
29. YALOW, R.S. and BERSON S.A. - Topics on Radioimmunoassay of peptide hormones. Protein and polypeptide hormones. (Ostman, J. and Milner, R.D.G. Eds) 36 (1969).

30. YALOW, R.S. and BERSON, S.A. - Radiimmunoassay. No prelo.
31. YALOW, R.S. and BERSON, S.A. - Recent advances in immunoassay of peptide hormones in plasma. Diabetes (Ostman, J. and Milner, R.D.G. Eds) 50 (1969).
32. SMART, J.V. - Elementi di statistica medica. Centro G. Zambon dell' Università di Milano (1969).
33. SMITHIES, O. - Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults. Biochem. J. 61, 629 (1955).
34. SMITHIES, O. - An improved procedure for starch gel electrophoresis: Further variations in the serum proteins of normal individuals. Biochem. J., 71, 585 (1959).
35. BERSON, S.A.; Yalow, R.S.; GLICK, S.M. and ROTH, J. - Immunoassay of protein and peptide hormones. Metabolism 13, 1135 (1964).
36. HERBERT, V. - Coated charcoal separation of free labelled hormone from hormone bound to antibody. Protein and polypeptide hormones. (Margoulies, M. Edt) 55 (1969).
37. EKINS, R.P. - Charcoal. Protein and polypeptide hormones. (Margoulies, M. Edt) 633 (1969).
38. PALMIERI, M.A.; YALOW, R.S. and BERSON, S.A. - Adsorbent techniques for the separation of antibody-bound from free hormone in radioimmunoassay. Veterans Administration - Hospital - Bronx N.Y. No prelo.

ERRATA

APLICAÇÃO DO MÉTODO DO RADIOIMUNOENSAIO NA DOSAGEM DA INSULINA NO PLASMA HUMANO

pág.	linha	onde se lê	leia-se
1	23	sits	sites
14	15	Amennnd	Amend
18	27	1000 cpm	1000 cpm/ml
22	21	1000 cpm	1000 cpm/ml
31	fig.4-abcissa	0,5	0,05
40	tabela X	r=0,007	r=0,997

