

IRACELIA TORRES DE TOLEDO E SOUZA \*

$\frac{27}{1}$

HETEROGENEIDADE DA INSULINA PLASMÁTICA  
HUMANA: TÉCNICAS DE SEPARAÇÃO DOS  
COMPONENTES IMUNORREATIVOS E  
DOSAGEM POR RADIOIMUNOENSAIO.



Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS na Área de Fisiologia.

\* Técnico de Nível Superior Especializado em Energia Nuclear - NSE IV do Centro de Aplicações Biomédicas de Radioisótopos e de Radiações do Instituto de Energia Atômica - (Autarquia vinculada à Secretaria da Cultura, Ciência e Tecnologia e associada à Universidade de São Paulo.)

SÃO PAULO

1977

*Ao Prof. Dr. Bernardo Léo Wajchenberg  
Orientador*

*Ao Prof. Dr. Rômulo Ribeiro Pieroni  
Superintendente do Instituto de Energia Atômica de São Paulo*

*Ao Prof. Dr. Paulo Savaya  
Professor Emérito da Universidade de São Paulo*

*Ao Prof. Dr. Júlio Kieffer  
Chefe de Pesquisa da Comissão Nacional de Energia Nuclear e responsável  
pela seção de radioisótopos do Laboratório Central do Hospital das Clí-  
nicas da F.M.U.S.P.*

*Ao Prof. Dr. Ary Domingos do Amaral  
Chefe do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da USP*

*Ao Prof. Dr. Rui Ribeiro Franco  
Chefe do Centro de Treinamento em Energia Nuclear do I.E.A.*

*À Dra. Rosalyn S. Yalow  
Chief of Nuclear Medicine Service, Veterans Administration Hospital and  
Department of Medicine, Mt. Sinai School of Medicine, New York*

*À Dra. Heidi Pinto e à bioquímica Célia Colli  
Pesquisadoras do Centro de Aplicações de Radioisótopos e Radiações do  
Instituto de Energia Atômica*

*Aos médicos Fernando Prestes César, Antonio Carlos Lerário e Helena  
Wachislicht, pesquisadores da Unidade de Diabetes e Supra-Renal da La-  
Clínica Médica do Hospital das Clínicas da F.M.U.S.P.*

*Nossos Agradecimentos.*

## RESUMO

Quando o plasma é filtrado em Sephadex G-50 fino, a insulina imunorreativa é recuperada em dois picos: "insulina pesada", componente de peso molecular maior, e "insulina leve", componente de peso molecular menor cujos volumes de eluição correspondem a proinsulina e insulina de porco  $^{125}\text{I}$ , respectivamente. Em caso de insulinoma suspeito foi detectada a presença de outra forma de insulina imunorreativa, "insulina superpesada", e a zona de eluição corresponde à da albumina sérica. Os eluatos correspondentes às insulinas "leve, pesada e superpesada" foram ensaiados por radioimunoensaio, usando insulina humana cristalina como padrão, insulina de porco  $^{125}\text{I}$  como traçador e soro antiinsulina. O anticorpo obtido em cobaias mostrou-se sensitivo, potente e adequado para o ensaio. A reatividade da insulina e proinsulina foi provada contra o anticorpo. A proporção relativa dos vários componentes da insulina imunorreativa total no plasma foram experimentadas nas condições basais em cinco indivíduos normais e no paciente JSC com insulinoma, antes e após o estímulo com glicose em todos, e tolbutamida no paciente JSC.

## SUMÁRIO

	página
1. INTRODUÇÃO E PROPÓSITO.....	1
2. PROGRAMAÇÃO EXPERIMENTAL.....	4
2.1. Radioimunoensaio.....	4
2.2. Fracionamento, em gel Sephadex G-50 fino, da insulina plasmática, para a separação dos componentes imuno <u>r</u> reativos.....	5
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	7
3.1. Radioimunoensaio.....	7
3.2. Fracionamento de amostras de plasma em gel Sephadex G-50 para caracterização dos componentes imuno <u>r</u> reativos da insulina plasmática.....	11
4. RESULTADOS.....	18
4.1. Radioimunoensaio.....	18
4.2. Fracionamento de amostras de plasma em gel Sephadex G-50 fino para caracterização dos componentes imuno <u>r</u> reativos da insulina plasmática.....	27
5. DISCUSSÃO.....	43
6. CONCLUSÕES.....	49
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

## ABSTRACT

When human plasma is filtered on Sephadex G-50 fine, insulin immunoreactivity is recovered in two peaks: "Big insulin", the higher molecular weight component and "Little insulin", the lower molecular component, having elution volumes that correspond to those of porcine proinsulin  $^{125}\text{I}$  and porcine insulin  $^{125}\text{I}$  respectively. The presence of a another form of immunoreactive insulin "Big Big insulin" was detected from an insuloma suspect and its elution pattern corresponding to serum albumin. The eluates correspondent to "Big" and "Little" insulin as well as "Big Big" component were assayed by radioimmunoassay using crystalline human insulin as a standard, porcine insulin  $^{125}\text{I}$  as tracer and antiinsulin serum. The antibody, raised in guinea-pigs, was sensitive and potent being adequate for the assay. The reactivity of insulin and proinsulin was tested against the antibody. The relative proportions of several components of total immunoreactive insulin in plasma were studied in basal conditions in five normal subjects and in the patient JSC with pancreatic insulin-secreting tumor as well as after glucose stimuli in all and tolbutamide in JSC.

## 1. INTRODUÇÃO E PROPÓSITO

A concentração da insulina no plasma, em resposta a estímulos variados, tem sido estudada extensivamente desde o advento do radioimunoensaio. Entretanto, a natureza do hormônio circulante não está inteiramente esclarecida.

O reconhecimento na circulação, de múltiplas formas de vários hormônios peptídicos tem estimulado a investigação de componentes hormonais de tamanhos diferentes e apresentando imunorreatividade de grau variável.

Os hormônios peptídicos, em virtude de seus níveis plasmáticos baixos, apresentavam sérias dificuldades de caracterização. Os métodos biológicos utilizados para estudos desses hormônios careciam de sensibilidade, especificidade e precisão<sup>(1)</sup>. O emprego do radioimunoensaio (baseado na competição do hormônio que se quer medir e sua forma "marcada" para o anticorpo específico) para mensuração dos hormônios peptídicos no plasma e o desenvolvimento de métodos de fracionamento de proteínas, dotados de resolução cada vez maior, facultaram novos meios visando elucidar a natureza dos hormônios circulantes.

Estudos prēvios relativos à natureza da insulina circulante mostraram ser inteiramente análoga à insulina cristalina pancreática<sup>(2, 3,4)</sup>.

Steiner et al<sup>(5)</sup> estabeleceram que a insulina é sintetizada, nas ilhotas de Langerhans, como uma cadeia única polipeptídica, de peso molecular 9000, proinsulina, convertida, intracelularmente, em insulina.

A proinsulina apresenta reação cruzada com o soro antiinsulina mas tem menor potência biológica do que a insulina<sup>(5,6)</sup>.

Roth et al<sup>(7)</sup> demonstraram que a insulina plasmática humana imunorreativa é separada em Sephadex G-50 fino em dois componentes que reagem com o soro antiinsulina. Propuseram o termo "big insulin" ou "insulina pesada" (IP) para o componente de maior peso molecular (cerca de 9000), correspondendo principalmente a proinsulina, e "little insulin" ou "insulina leve" (IL) para o componente eluido com a insulina cristalina, apresentando peso molecular da ordem de 6000.

Rubenstein et al<sup>(8)</sup>, também, fracionando plasma e urina por filtração em Sephadex G-50 fino obtiveram material imunorreativo semelhante à insulina cristalina, recuperado na fração de peso molecular 9000, ou seja, na região da "insulina pesada".

Após a ingestão de glicose, a proporção relativa de "insulina leve" aumenta na circulação em 15 a 30 minutos, baixando logo depois,

enquanto que a "insulina pesada" aumenta decorridos 90 a 120 minutos após a sobrecarga oral<sup>(9)</sup>.

Adicionando-se insulina de porco, cristalina, purificada (insulina pancreática) ao plasma, toda ela é recuperada na região da "insulina leve". Mesmo quando a insulina pancreática é adicionada ao plasma contendo quantidades significantes de "insulina pesada" o hormônio adicionado é recuperado somente no pico da "insulina leve"<sup>(1)</sup>.

Yalow e Berson<sup>(10)</sup>, por filtração em Sephadex G-50 fino de amostra de plasma de um paciente com insulinoma, observaram a presença de componentes imunorreativos, em relativa abundância, na zona de eluição precedendo a "insulina pesada" e correspondendo a albumina humana <sup>131</sup>I. Designaram este componente como "Big Big insulin" (insulina super-pesada), sugerindo que poderia ser o precursor da proinsulina. Em filtração e ultracentrifugação mostrou um peso molecular de 100.000<sup>(10)</sup>.

Em virtude do elevado interesse em se conseguir determinar as proporções desses diferentes componentes, bem como de outras substâncias com estrutura química semelhante à insulina, propusemo-nos a padronizar o método de fracionamento por filtração em Sephadex e técnica de quantificação por radioimunoensaio das diversas frações da insulina plasmática em condições normais e em um paciente com secreção inapropriada de insulina, por insulinoma, pelo conhecimento prévio, de que nesta condição patológica existem níveis plasmáticos elevados de frações imunorreativas com o soro antiinsulínico.



## 2. PROGRAMAÇÃO EXPERIMENTAL

Para alcançar nossa proposição fez-se necessário:

- 1.- Marcação do hormônio e o preparo do soro antiinsulina para obtenção dos reagentes essenciais (antígeno marcado e anticorpo específico) para aplicação do método do radioensaio ao estudo da insulina plasmática.
- 2.- Fracionamento em coluna de exclusão molecular Sephadex G-50 fino da insulina plasmática para a separação dos seus componentes imunoreativos.

### 2.1. RADIOIMUNOENSAIO

Para a execução do método do radioensaio são necessários o hormônio marcado puro e o anticorpo específico. A concentração de hormônio em amostras desconhecidas é calculada por comparação da reatividade imunológica com soluções de referência contendo massas conhecidas deste hormônio.

A avaliação das características das diferentes fases ope

racionais necessárias para a dosagem da insulina no plasma (radioimunoensaio) foi desenvolvida em trabalhos anteriores<sup>(11,12,13,14)</sup> dos quais resultou a conclusão de que seria um método exato, específico, dotado de excelente reprodutibilidade.

Nesta fase de nosso trabalho passamos a preparar o soro antiinsulina baseados no princípio de que os hormônios peptídicos se têm mostrado antigênicos em animais de laboratório, existindo porém uma considerável variabilidade no grau de antigenicidade. A cobaia é particularmente útil para se obter o soro antiinsulina porque a insulina de cobaia difere por um grande número de aminoácidos, 17, da molécula da insulina humana ou de porco<sup>(15)</sup>, sendo que a insulina humana difere da de porco por um aminoácido apenas, na cadeia B.

O requisito essencial para um radioimunoensaio sensível é a obtenção de anticorpo que reaja com o hormônio, com energia de ligação apreciável, refletindo-se essencialmente na queda inicial da curva dose-resposta. Pelo fato de não se conhecer nenhuma forma para estimular a produção de anticorpos específicos, são por tentativas é que poderemos obtê-los, quanto maior for o número de animais imunizados maior será a probabilidade de se obter um anticorpo satisfatório.

## 2.2. FRACIONAMENTO, EM GEL SEPHADEX G-50 FINO, DA INSULINA PLASMÁTICA, PARA A SEPARAÇÃO DOS COMPONENTES IMUNORREATIVOS.

Quando o plasma é passado através de uma coluna de poros granulosos, do gel de Sephadex, as moléculas aparecem nos efluentes em ordem decrescente de seu tamanho. Assim, a separação dependerá da distribuição dos pesos moleculares da mistura que se quer fracionar, cada tipo de Sephadex separando proteínas com diferentes pesos moleculares.

Com a filtração do plasma em Sephadex G-50 fino, a insulina endógena imunorreativa é recuperada em dois picos: uma fração é eluída em tubos correspondentes ao peso molecular 9000, zona primariamente de eluição da proinsulina ("insulina pesada"), e outra fração de insulina, com maior imunorreatividade, sendo eluída nos tubos correspondentes ao peso molecular 6000, zona de eluição da insulina cristalina de porco ou humana ("insulina leve")<sup>(7)</sup>. Pode ser encontrado também, porém raramente e em casos de insulinoma, uma fração de insulina imunorreativa na zona de eluição da albumina sérica, correspondendo a "insulina superpesada".

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. RADIOIMUNOENSAIO

Para aplicação do método de radioimunoensaio em eluatos de plasma fracionados em Sephadex G-50 fino, a insulina e a proinsulina de porco foram radioiodadas de acordo com o método de Hunter e Greenwood<sup>(16,17)</sup> com as modificações sugeridas por Yalow e Berson<sup>(18)</sup>, como utilizado em trabalhos anteriores<sup>(11,12,13,14)</sup>.

O soro antiinsulina de porco foi preparado por meio de imunizações sucessivas em cobaias.

Utilizamos como técnica de separação do complexo insulina radioativa-anticorpo (bound-B) do antígeno marcado livre (free-F) pela adsorção do hormônio livre à fase sólida de uma suspensão de carvão-dextrana-70, na proporção de 10:1<sup>(19)</sup>.

##### 3.1.1. Antígeno marcado.

Os antígenos marcados foram purificados em gel de amido e coluna de exclusão molecular Sephadex G-50 fino, segundo a técnica já descrita e por nós utilizada (11,12,13,14).

### 3.1.2. Anticorpo específico.

O anticorpo específico foi preparado por imunização em cobaias com insulina de porco (40 U/ml) e glucagon comercial ("Lilly") emulsionados no adjuvante de Freund, na proporção de 1:1:2, homogeneizados até obtenção de uma mistura cremosa.

Para cada cobaia a ser imunizada aplicaram-se 3 doses da emulsão em injeções subcutâneas, com intervalo de duas semanas entre cada uma delas.

Evitou-se a reação hipoglicêmica adicionando-se o açúcar ao alimento e água, a serem ingeridos pela cobaia nas 24 horas após a injeção, além do próprio glucagon, da mistura imunizante, pela sua propriedade glicogenolítica.

Quinze dias após a terceira dose, retiramos o sangue, por punção cardíaca. O soro, separado desse sangue por centrifugação, teve seu título determinado, ou seja, procurou-se a maior diluição na qual o anticorpo se liga a quantidades constantes de insulina marcada.

Preparamos diluições de 1:100, 1:1000, 1:10000

1:100000 do soro das cobaias imunizadas, em diluente padrão (tampão-veronal 0,025 M com 0,25% de albumina humana "Merck", à que se acrescentaram o soro de cobaia normal 1% e insulina marcada 1000 cpm/ml) observando-se a ligação do antígeno ao anticorpo pela determinação da relação do antígeno radioativo ligado (B) ao livre (F), após 24 horas de reação à temperatura de 4°C.

A imunização foi continuada somente nos animais que apresentavam título crescente de anticorpo. Esses animais (três cobaias) receberam um reforço de 0,5 ml da emulsão imunizante, cada quinze dias, durante dois meses. Dez dias após foi realizada nova sangria e o soro diluído a 1:1000 (solução estoque) em solução de cloreto de sódio 0,9%, contendo mertiolato, como conservativo a 1:10000.

### 3.1.2.1. Título do anticorpo.

Para observarmos a energia de ligação de soros antiinsulínicos disponíveis preparamos diluições de 1:50000, 1:100000 e 1:150000 do antisoro, usando insulina de porco <sup>125</sup>I como traçador.

### 3.1.2.2. Seleção do anticorpo.

A partir da solução estoque (diluição 1:1000) do soro das três cobaias que reagiram ao antígeno, foram realizadas curvas-padrão preparadas com insulina humana, recristalizada seis

vezes, e insulina de porco  $^{125}\text{I}$ , como traçador, sendo a diluição do anticorpo a 1:150000, no volume final de incubação. Escolhemos esta diluição porque nas provas de título, após o reforço de imunização, apresentou uma relação B/F adequada (ao redor de 1) para as três cobaias, conforme será mostrado posteriormente.

Para medida de concentrações baixas de hormônio (insulinemia basal) torna-se necessário uma diluição posterior do antisoro para maior sensibilidade que é dependente da constante de equilíbrio da reação antígeno-anticorpo (lei da ação das massas). Nessas condições, deveremos obter o mesmo B/F, ainda que elevando em dobro a radioatividade, o qual correspondeu a um valor de 0,5. Para tal, utilizamos insulina humana padrão nas concentrações de 0,005 a 0,05  $\mu\text{g}/\text{ml}$  e diluições de antisoro a 1:300000, 1:450000 e 1:600000 na presença de 500 e 1000 cpm/ml de insulina de porco  $^{125}\text{I}$ .

A maior diluição do antisoro, determinando uma queda satisfatória da relação B/F Vs {H}<sup>\*</sup> e concentração de traçador suficientemente pequena, para leitura satisfatória (1000 cpm/ml), será a adequada para um ensaio sensível, em baixos níveis de insulina.

Nas condições habituais de trabalho, o anticorpo selecionado (cobaia nº 3) e sua diluição adequada (1:150000) foram utilizados na reação de competição entre antígeno marcado e frio, para a quantificação dos componentes imunorreativos, separados em Sephadex G-50 fino, por radioensaio.

\* {H} = concentração de hormônio padrão (não marcado)

### 3.2. FRACIONAMENTO DE AMOSTRAS DE PLASMA EM GEL SEPHADEX G-50 PARA CARACTERIZAÇÃO DOS COMPONENTES IMUNORREATIVOS DA INSULINA PLASMÁTICA.

O gel Sephadex G-50 fino (lote nº 9787, tamanho da partícula 20-80  $\mu$ , do laboratório "Pharmacia", Uppsala - Suécia) foi intumescido em tampão -veronal 0,025 M, pH 8.6, durante 30 dias.

A coluna cromatográfica com 9 mm de diâmetro interno e 600 mm de comprimento (série "LKB 4200"), com sistema de refrigeração - externa, foi empacotada com gel intumescido em tampão -veronal 0,025 M pH 8.6, com um período de 5 dias de preparo.

Para a alimentação da coluna, utilizou-se uma bomba peristáltica "LKB", modelo 4912, a uma velocidade suficiente para a resolução satisfatória das amostras através da coluna (12 a 18 horas por amostra).

Após a aplicação da amostra, na coluna, utilizamos veronal-albumina (tampão -veronal 0,025 M, pH 8.6, contendo 0,25% de albumina "Merck") como eluente e coletamos frações de 1 ml no coletor de frações "UltraRac 7000", na câmara de refrigeração correspondente.

Empregou-se um coletor automático para obtenção de alíquotas iguais dos eluatos da coluna.



3.2.1. Fracionamento de plasma com traçadores radioati-  
vos: albumina humana  $^{131}\text{I}$ , proinsulina de porco  
 $^{125}\text{I}$ , insulina de porco  $^{125}\text{I}$  e

Inicialmente, uma amostra de plasma (1 ml) foi enriquecida com albumina humana  $^{131}\text{I}$ , proinsulina de porco  $^{125}\text{I}$  e  $^{125}\text{I}$  para observarmos, por meio de picos de atividade, determinados em contador de cintilação tipo "poço" (Nuclear Chicago), os tubos de eluição em que era recuperada a proinsulina de porco  $^{125}\text{I}$ .

Procedeu-se a novo fracionamento, nas mesmas condições, substituindo a proinsulina de porco  $^{125}\text{I}$  por insulina de porco  $^{125}\text{I}$ .

Com estes dois fracionamentos obtínhamos a localização dos tubos correspondentes aos efluentes da proinsulina e insulina de porco  $^{125}\text{I}$ , em relação a albumina humana  $^{131}\text{I}$  e  $^{125}\text{I}$  indicativos de substância de elevado e reduzido peso molecular, respectivamente, e assim excluídos da coluna logo no início e no fim do período de coleção dos efluentes.

Em um novo fracionamento, onde o plasma foi enriquecido com todos os traçadores: albumina humana  $^{131}\text{I}$ , proinsulina e insulina de porco  $^{125}\text{I}$  e  $^{125}\text{I}$ , os picos de atividade foram coincidentes com os fracionamentos parciais anteriores.

Para melhor resolução da coluna, trabalhamos sem-

pre nas condições já indicadas, ou sejam, pequeno volume de plasma (1 ml), Sephadex G-50 fino intumescido por 30 dias, para completa expansão do gel, coluna de 9 mm por 600 mm a 4°C, levando cinco dias para ser preparada.

A coluna foi sempre equilibrada e desenvolvida com o mesmo diluente usado no ensaio (veronal-albumina).

3.2.2. Concentração de insulina imunorreativa em eluatos da coluna de Sephadex G-50 fino de amostras de plasma de indivíduos normais e do paciente JSC (insulinoma).

No fracionamento de amostra de plasma, para a quantificação dos componentes imunorreativos da insulina, aplicamos 1 ml desta (enriquecida com pequena quantidade de albumina humana  $^{131}\text{I}$ , insulina de porco  $^{125}\text{I}$  e  $^{125}\text{I}$ ) e coletamos frações de 1 ml que foram medidas no contador de cintilação tipo "poço" para localizar a albumina plasmática, a região da insulina e o pico do iodeto radioativo.

As frações entre a albumina plasmática e o pico do iodeto foram estocadas a 4°C, até análise posterior.

Para o estudo da proporção de insulinas "pesada e leve", em normais, utilizamos cinco indivíduos, indicados na Tabela A, coletando três amostras de plasma: basal, 60 e 120 minutos, após a in-

TABELA A

## DADOS CLÍNICOS DOS CONTROLES NORMAIS ESTUDADOS

PACIENTE número e iniciais		IDADE (anos)	SEXO	PESO (kg)	ALTURA (cm)
1	IS	18	M	63,5	1,75
2	ES	36	F	48,0	1,52
3	MB	18	F	54,6	1,68
4	MJ	21	F	55,0	1,57
5	LS	24	F	51,8	1,67

gestão de 100 g de glicose oral em solução a 25%.

Do paciente JSC, com insulínoma, comprovado cirurgicamente (tumor da cauda do pâncreas) coletamos 04 amostras de plasma (60 e 120 minutos após a ingestão oral de 100 g de glicose e basal, e oito minutos após a injeção intravenosa de um grama de tolbutamida, em dois minutos).

As amostras de plasma foram fracionadas na mesma coluna de Sephadex G-50 fino mantendo constante o fluxo de eluição, num período de 18 horas por amostra.

Para o ensaio, cujos princípios e métodos já foram descritos para a insulina plasmática<sup>(11,12,13,14)</sup>, preparou-se uma série de tubos contendo num volume final de 2,5 ml por tubo: veronal-albumina, insulina de porco <sup>125</sup>I 1000 cpm/ml, soro antiinsulina na diluição final de 1:150000, soro normal de cobaia 1% e insulina humana recristalizada 0,01-1 mug/ml (curva-padrão) ou uma alíquota de 0,2 ou 0,4 ml do filtrado em Sephadex G-50 fino.

Para provar a imunorreatividade da proinsulina perante o antisoro utilizado, preparamos duas curvas-padrão (peso-volume) usando proinsulina de porco e insulina humana como padrão, respectivamente, insulina de porco <sup>125</sup>I como traçador e soro antiinsulina de porco.

Para compararmos a imunorreatividade das insuli-

nas "pesada e leve", preparamos, em duplicata, a partir de uma mistura de insulinas "pesada e leve" obtidas do plasma do insulinoma, no Sephadex G-50 fino, diluições de acordo com a Tabela B e cujos resultados foram colocados na curva-padrão de proinsulina de porco e insulina humana, respectivamente.

Calculamos a concentração correspondente a cada diluição (lida na curva-padrão correspondente) e lançamos em ordenada de gráfico linear contra valores de diluição decrescente de insulinas "pesada e leve" (prova da diluição como requisito necessário para avaliação de especificidade da fração coletada).

TABELA B

DILUIÇÕES DE UMA MISTURA DE INSULINA LEVE (IL)  
E UMA MISTURA DE INSULINA PESADA (IP)

TUBOS NÚMERO	VOLUME DA MISTURA		VERONAL-ALBUMINA  $\mu\text{l}$	DILUIÇÃO FINAL  $\mu\text{l}$
	IL	IP		
	$\mu\text{l}$			
1	400		-	1:6,25
2	300		100	1:8,33
3	200		200	1:12,5
4	100		300	1:25

## 4. RESULTADOS

### 4.1. RADIOIMUNOENSAIO

#### 4.1.1. Antígeno marcado: eficiência da marcação.

A insulina e proinsulina de porco, marcadas com  $^{125}\text{I}$ , apresentaram rendimentos percentuais que variaram de 60 a 70% (Tabela I).

Na Figura 1, está a autoradiografia da eletroforese em gel de amido dos hormônios imediatamente após a iodação. A fração 2, normalmente utilizada, é depurada dos componentes danificados e iodo livre por passagem em Sephadex G-50 fino. Na cromatografia de exclusão molecular (Sephadex G-50 fino), a pureza final desses hormônios variou de 94 a 98% (Tabela II).

#### 4.1.2. Anticorpo específico.

##### 4.1.2.1. Título do anticorpo.

TABELA I

CONTROLE DA EFICIÊNCIA DE MARCAÇÃO DA INSULINA DE PORCO  $^{125}\text{I}$  E PROINSULINA DE PORCO  $^{125}\text{I}$

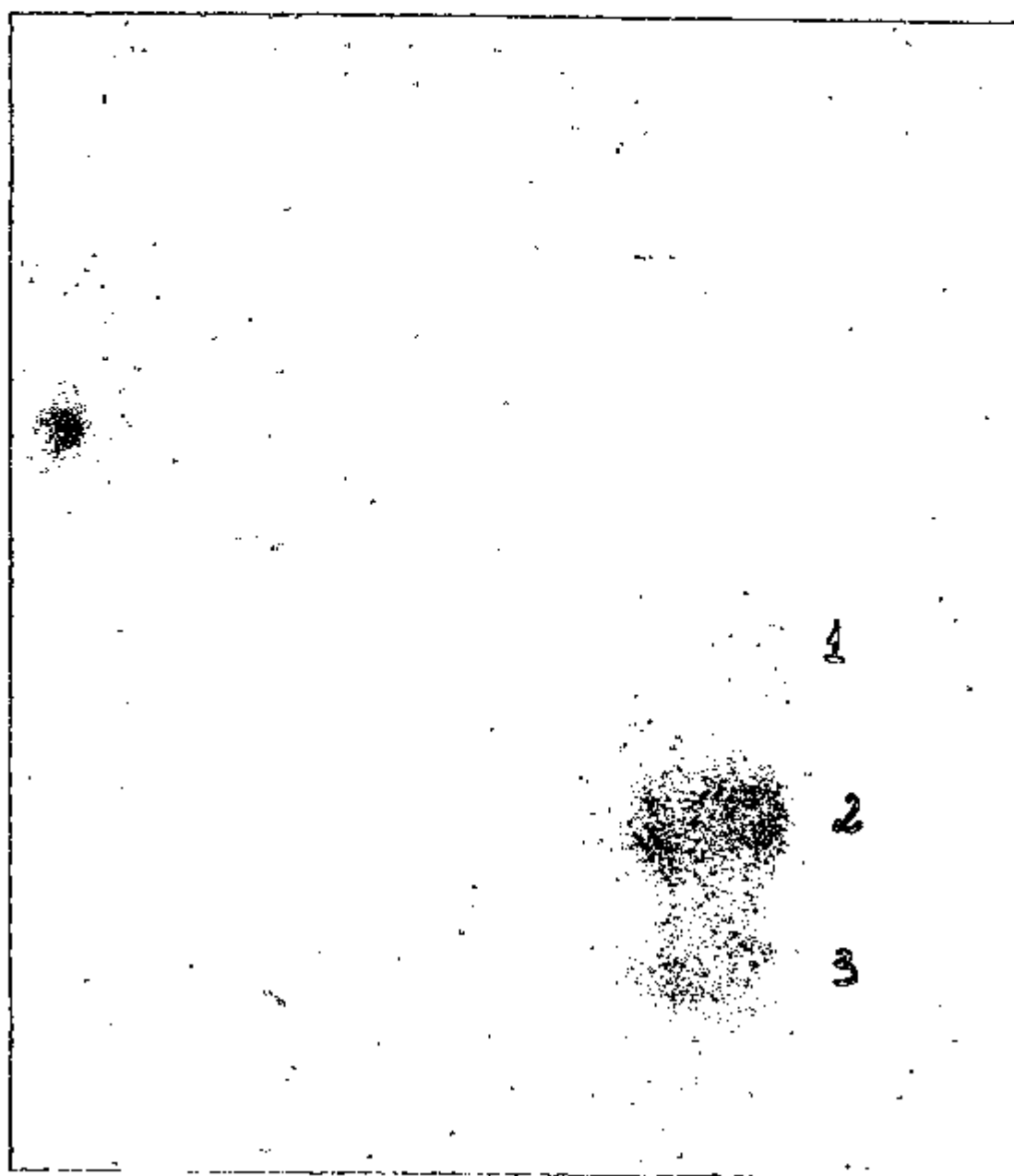
PARTIDA NÚMERO	EFICIÊNCIA PORCENTUAL DE MARCAÇÃO	
	INSULINA $^{125}\text{I}$	PROINSULINA $^{125}\text{I}$
1	66	67
2	70	70
3	70	60
4	60	65
5	60	60



## FIGURA 1

AUTO-RADIOGRAFIA DE ELETROFORESE EM GEL DE AMIDO DE PROINSULINA DE PORCO  
 $^{125}\text{I}$  E INSULINA DE PORCO  $^{125}\text{I}$ , IMEDIATAMENTE APÓS A IODAÇÃO .

ORIGEM



PROINSULINA  $^{125}\text{I}$

INSULINA  $^{125}\text{I}$

TABELA II

CONTROLE DE PUREZA DAS FRAÇÕES DE INSULINA E PROINSULINA DE PORCO <sup>125</sup>I  
 SEPARADAS POR ELETROFORESE EM GEL DE AMIDO (COMPONENTE 2, FIGURA 1) E  
 POSTERIOR CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE SEPHADEX G-50 FINO

PARTIDA	DISTRIBUIÇÃO DOS VALORES PORCENTUAIS DE PUREZA NAS DIFERENTES FRAÇÕES ELUIDAS					
	INSULINA <sup>125</sup> I			PROINSULINA <sup>125</sup> I		
NÚMERO	ELUATOS			ELUATOS		
	NÚMERO	NÚMERO	NÚMERO	NÚMERO	NÚMERO	NÚMERO
	1	2	3	1	2	3
1	96	98	98	94	95	95
2	97	98	98	95	95	95
3	96	97	97	94	94	95
4	94	96	97	95	96	96
5	95	97	98	94	95	95

A Tabela III reúne os dados numéricos da relação B/F das diluições do soro das três cobaias que apresentaram título adequado de antisoro.

A Tabela IV reúne os dados numéricos da relação B/F das diluições 1:50000, 1:100000 e 1:150000, preparadas com o soro das três cobaias que, previamente experimentadas quanto ao título de anticorpos, receberam reforço de imunização.

#### 4.1.2.2. Seleção do antisoro.

Na Figura 2 está indicada a relação entre a concentração de insulina humana {H} e o correspondente B/F obtida com os antisoros das três cobaias que apresentaram títulos crescentes de anticorpo. Observamos que o anticorpo da cobaia de nº 3 apresentou uma relação B/F adequada 1,16 na ausência de hormônio frio, inclinação da curva de valores mais baixos de {H} - sensibilidade boa e, além disso, este antisoro permitiu medidas satisfatórias de {H} até 1,00 mug/ml ou seja, apresentou, na diluição utilizada, suficiente precisão. Portanto, a cobaia nº 3 foi escolhida como fonte de antisoro porque este apresentava sensibilidade e precisão satisfatórias nas condições de trabalho.

Na Figura 3 está indicado o estudo das diluições maiores de antisoro (1:300000, 1:450000 e 1:600000) e concentração baixa de traçador (500 e 1000 cpm/ml). Como se poderá notar a diluição de 1:600000 foi a mais adequada para estudos de concentrações

TABELA III

PROVAS DE TÍTULO DOS ANTISOROS PRODUZIDOS EM COBAIAS IMUNIZADAS COM INSULINA DE PORCO CRISTALIZADA\* (B = ANTÍGENO RADIOATIVO LIGADO , F = ANTÍGENO RADIOATIVO LIVRE)

COBAIAS	DILUIÇÕES			
	1:100 B/F	1:1000 B/F	1:10000 B/F	1:100000 B/F
1	7,68	5,19	2,58	0,22
2	7,07	2,58	0,95	0,19
3	7,43	4,25	1,44	0,19

\* Primeiro ensaio: duas semanas após a terceira imunização das cobaias, 24 horas de reação com insulina de porco  $^{125}\text{I}$ .

TABELA IV

PROVAS DE TÍTULO DOS ANTISOROS PRODUZIDOS EM COBAIAS QUE RECEBERAM REFORÇO DE IMUNIZAÇÃO\*. TRAÇADOR INSULINA DE PORCO  $^{125}\text{I}$ . (B = ANTÍGENO RADIOATIVO LIGADO, F = ANTÍGENO RADIOATIVO LIVRE)

COBAIAS	DILUIÇÕES		
	1:50000	1:100000	1:150000
NÚMERO	B/F	B/F	B/F
1	2,48	1,90	1,34
2	2,39	1,50	1,00
3	2,45	1,70	1,09

\* Segundo ensaio: dois meses após o início da imunização de reforço.

## FIGURA 2

## SELEÇÃO DOS ANTISOROS

COMPARAÇÃO DOS SOROS ANTIINSULINA DAS TRÊS COBAIAS QUE APRESENTARAM TÍTULOS CRESCENTES DE ANTICORPO, NA DILUIÇÃO DE 1:150000, PARA VALORES DE INSULINA HUMANA PADRÃO ENTRE 0,01 A 1,00  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

TRAÇADOR: INSULINA DE PORCO  $^{125}\text{I}$  - 1000 cpm/ml

Insulina  $^{125}\text{I}$

B/F

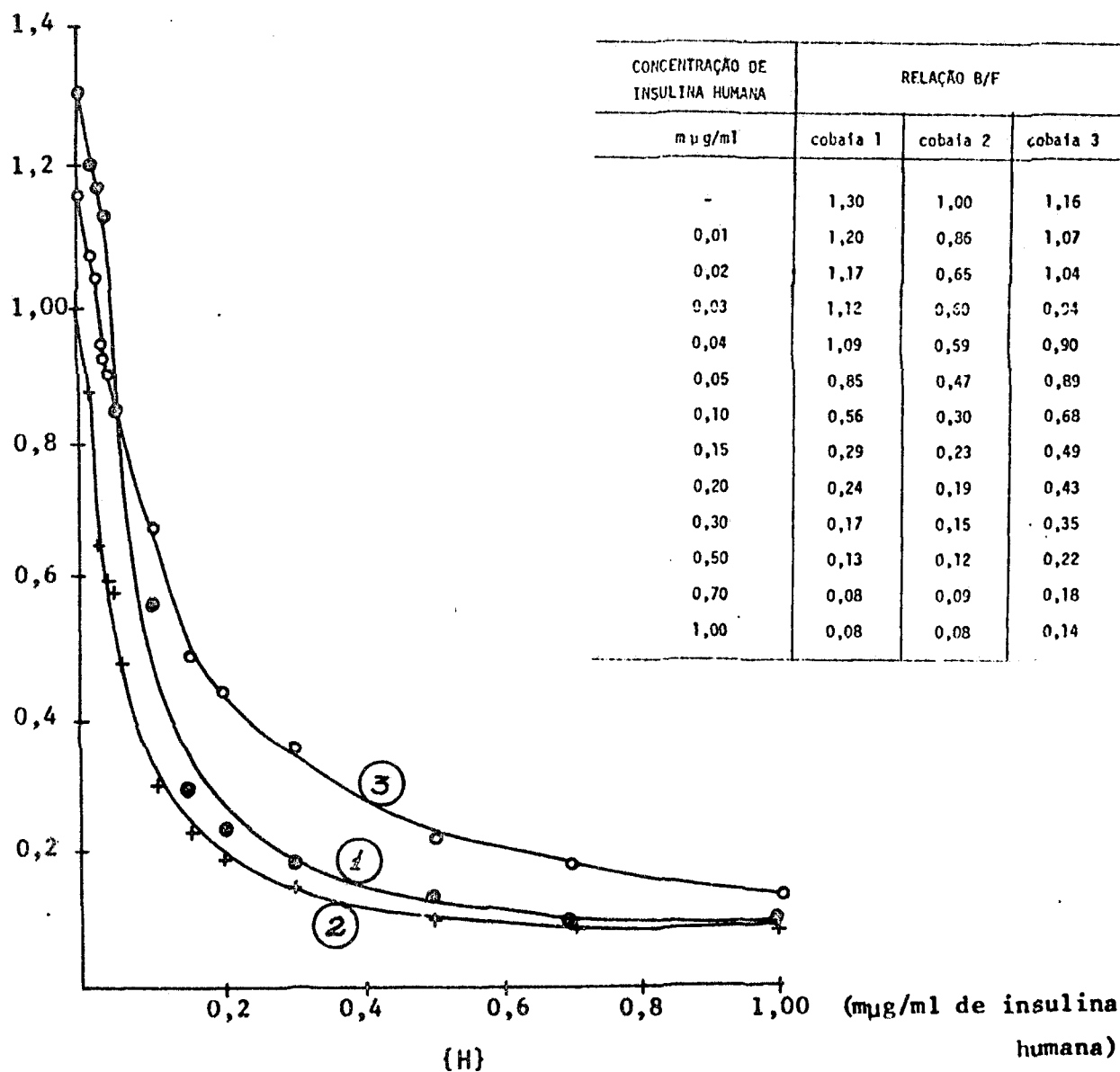
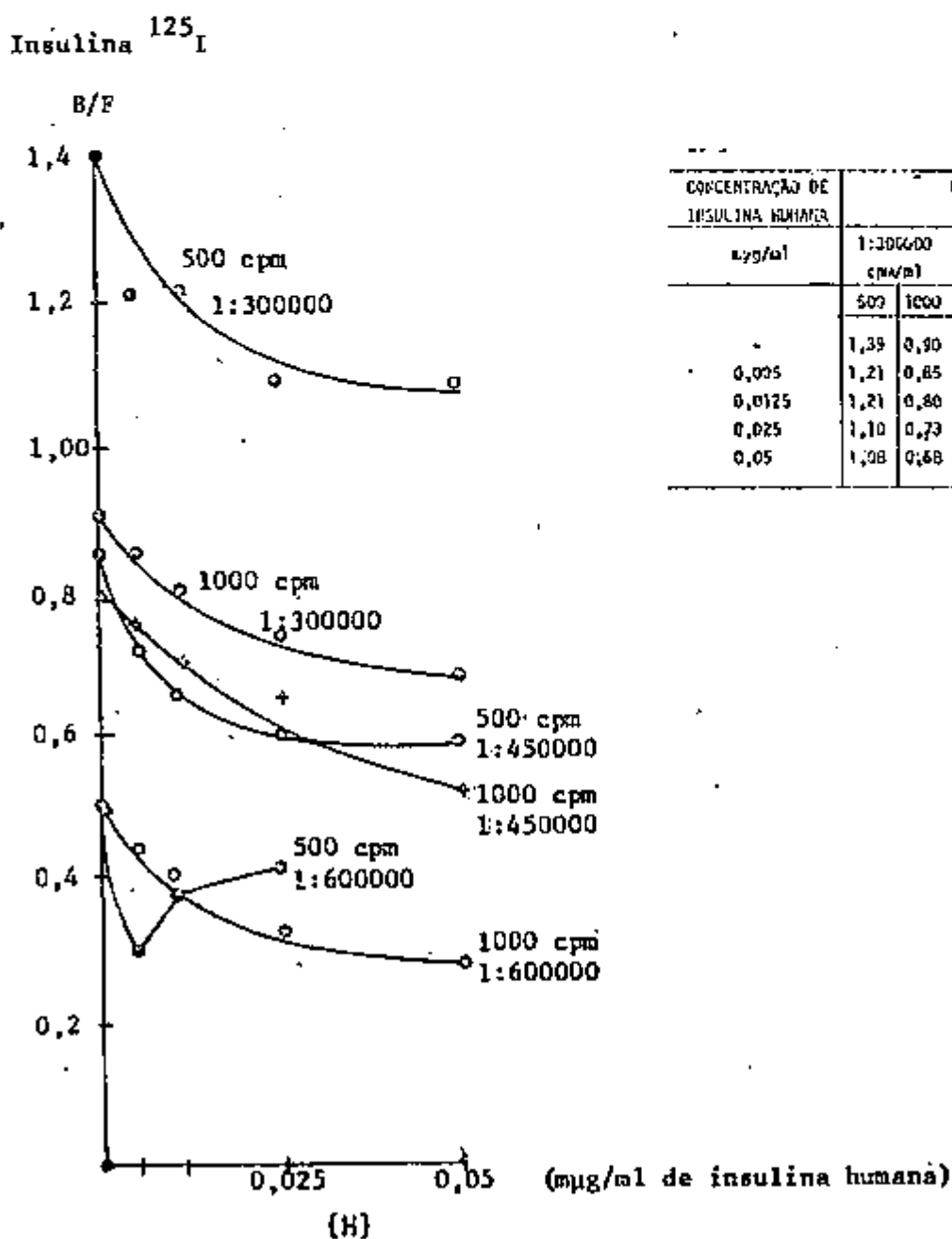


FIGURA 3

COMPARAÇÃO DAS DILUIÇÕES DO ANTISORO DA COBAIA Nº 3 PARA VALORES DE INSULINA HUMANA PADRÃO ENTRE 0,005 a 0,05  $\mu\text{g/ml}$   
 TRAÇADOR: INSULINA DE PORCO  $^{125}\text{I}$  - 500 e 1000  $\text{cpm/ml}$



CONCENTRAÇÃO DE INSULINA HUMANA $\mu\text{g/ml}$	RELAÇÃO B/F diluição					
	1:300000 cpm/ml		1:450000 cpm/ml		1:600000 cpm/ml	
	500	1000	500	1000	500	1000
-	1,39	0,90	0,65	0,79	0,50	0,48
0,005	1,21	0,85	0,72	0,75	0,30	0,44
0,0125	1,21	0,80	0,65	0,70	0,38	0,40
0,025	1,10	0,73	0,60	0,65	0,41	0,32
0,05	1,08	0,68	0,59	0,51	-	0,26

baixas de insulina (insulinemia basal), pois a relação B/F, na ausência de hormônio não marcado, foi similar para os dois níveis de traçador e correspondeu a um valor de 0,5.

#### 4.2. FRACIONAMENTO DE AMOSTRAS DE PLASMA EM GEL SEPHADEX G-50 FINO PARA CARACTERIZAÇÃO DOS COMPONENTES IMUNORREATIVOS DA INSULINA PLASMÁTICA.

##### 4.2.1. Localização da proinsulina e insulina de porco $^{125}\text{I}$ .

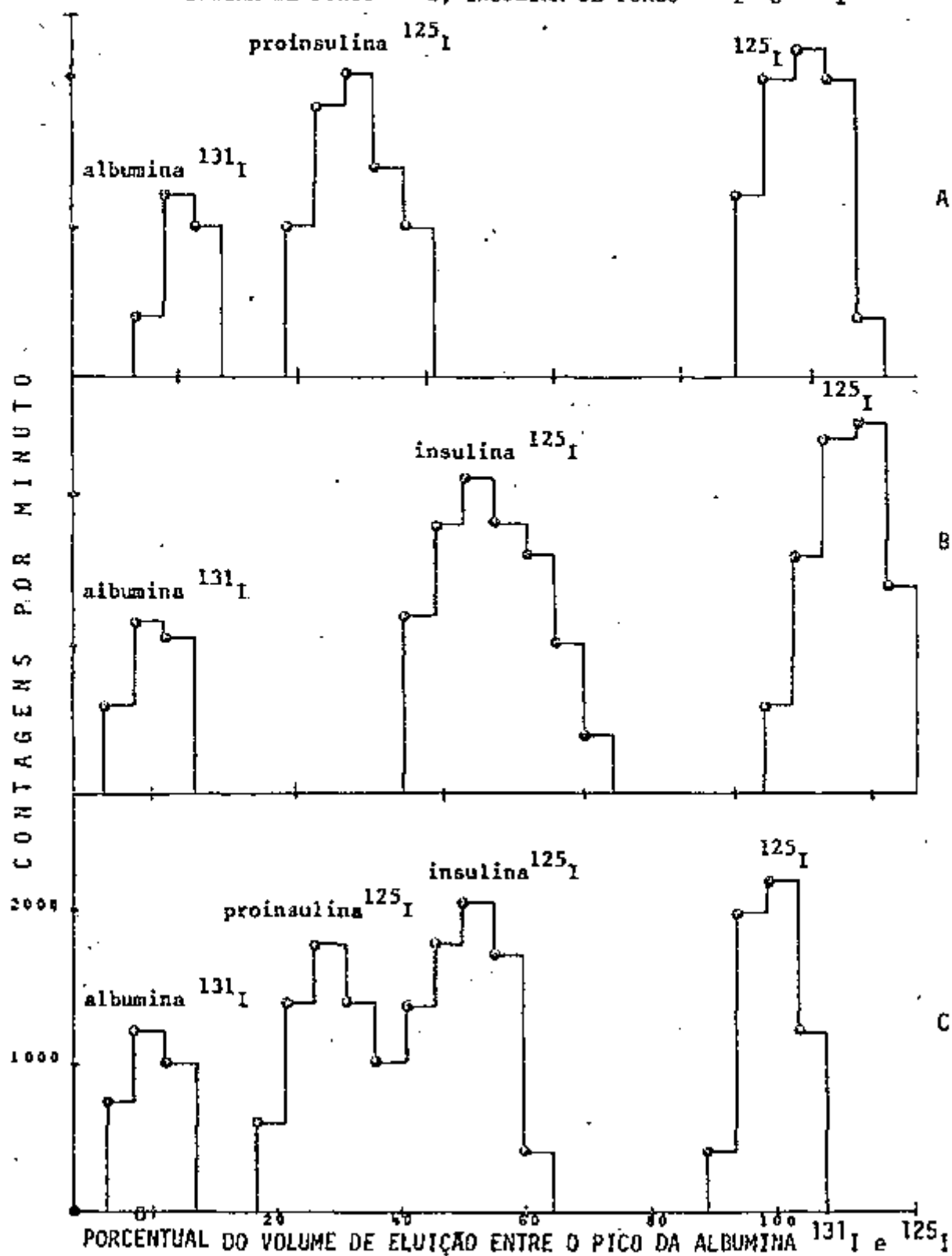
A Figura 4 representa três fracionamentos de uma amostra de plasma enriquecido com traçadores: albumina humana  $^{131}\text{I}$ , proinsulina de porco  $^{125}\text{I}$ , insulina de porco  $^{125}\text{I}$  e  $^{125}\text{I}$ ; em A representamos o fracionamento de plasma humano enriquecido com albumina humana  $^{131}\text{I}$ , proinsulina  $^{125}\text{I}$  e  $^{125}\text{I}$ . Observa-se que as substâncias são excluídas da coluna de Sephadex na ordem de peso molecular decrescente; albumina humana  $^{131}\text{I}$ , proinsulina de porco  $^{125}\text{I}$  e  $^{125}\text{I}$ , respectivamente, como seria de se esperar.

Fêz-se o mesmo fracionamento, Figura 4-B, substituindo a proinsulina de porco  $^{125}\text{I}$  por insulina de porco  $^{125}\text{I}$ , notando-se, em comparação ao estudo prévio, que a insulina, por ter peso molecular menor, surge entre 40 e 60% do volume de eluição, enquanto a proinsulina apareceu entre 20 e 40%.



## F I G U R A 4

FRACIONAMENTO DE PLASMA EM SEPHADEX G-50 FINO COM  
 ADIÇÃO DOS TRAÇADORES: ALBUMINA HUMANA  $^{131}\text{I}$ ; PROIN  
 SULINA DE PORCO  $^{125}\text{I}$ ; INSULINA DE PORCO  $^{125}\text{I}$  e  $^{125}\text{I}$



Quando o plasma foi enriquecido com todos os traçadores: albumina humana  $^{131}\text{I}$ , proinsulina de porco  $^{125}\text{I}$ , insulina de porco  $^{125}\text{I}$  e  $^{125}\text{I}$  (Figura 4-C) confirmaram-se os achados parciais anteriores.

4.2.2. Concentração de insulina imunorreativa, em eluatos da coluna de Sephadex G-50 fino, de amostras de plasma de indivíduos normais e do paciente JSC (com insulinoma).

Nas Tabelas V, VI e VII estão os resultados realizados nos cinco indivíduos normais.

A Figura 5 indica o fracionamento típico da insulina plasmática em um indivíduo normal durante o teste de tolerância à glicose.

Na Tabela VIII os resultados no paciente JSC.

As Figuras 6 e 7 representam graficamente os resultados da Tabela VIII, onde o percentual de cada componente é definido como a concentração ( $\text{m}\mu\text{g}/\text{ml}$ ) de insulina imunorreativa recuperada no pico correspondente em relação à insulina imunorreativa total.

A recuperação percentual da insulina é definida como a soma em  $\text{m}\mu\text{g}/\text{ml}$  dos picos imunorreativos por volume de plasma

TABELA V

## TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE ORAL EM INDIVÍDUOS NORMAIS

PACIENTE NÚMERO	TEMPO minutos	GLICEMIAS mg/dl	IRI* mug/ml	INSULINA LEVE** mug/ml	INSULINA PESADA** mug/ml
1	0	87	1,00	0,80	0,19
	60	108	10,00	8,89	1,08
	120	90	10,00	8,45	1,59
2	0	96	0,40	0,32	0,08
	60	82	5,60	5,05	0,58
	120	62	3,75	3,25	0,52
3	0	70	0,50	0,40	0,10
	60	106	9,85	9,07	0,77
	120	74	4,55	3,91	0,62
4	0	78	0,50	0,40	0,09
	60	118	5,00	4,58	0,40
	120	86	2,00	1,70	0,29
5	0	91	1,00	0,81	0,18
	60	148	22,00	20,40	1,61
	120	104	7,00	1,53	1,15

\* Insulina imunorreativa total.

\*\* Componentes imunorreativos de insulina plasmática (insulinas pesada e leve) nos eluatos da coluna de Sephadex G-50 fino.

TABELA VI

TESTES DE TOLERÂNCIA À GLICOSE ORAL NOS INDIVÍDUOS NORMAIS  
 PORCENTUAIS DE INSULINAS "LEVE E PESADA" NOS ELUATOS DA COLUNA DE SEPHA  
 DEX G-50 FINO DE AMOSTRAS DE PLASMA

PACIENTE NÚMERO	TEMPO MINUTOS	PORCENTAGEM DA INSULINA IMUNORREATIVA TOTAL		PORCENTAGEM DE RECUPERAÇÃO DA COLUNA
		INSULINA LEVE	INSULINA PESADA	
1	0	80	20	63
	60	89	11	48
	120	84	16	59
2	0	80	20	115
	60	90	10	93
	120	86	14	78
3	0	80	20	120
	60	92	8	120
	120	86	14	102
4	0	80	20	94
	60	91	9	89
	120	85	15	99
5	0	81	19	82
	60	92	8	88
	120	83	17	75

TABELA VII

## TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE ORAL

RELAÇÃO PORCENTUAL DE INSULINA PESADA (RELATIVA À INSULINA IMUNORREATIVA TOTAL) NOS ELUATOS DA COLUNA DE SEPHADEX G-50 FINO DE AMOSTRAS DE PLASMA DE INDIVÍDUOS NORMAIS

PACIENTES NÚMERO	PORCENTAGEM DA INSULINA IMUNORREATIVA TOTAL "INSULINA PESADA"		
	basal	60 minutos	120 minutos
1	20	11	16
2	20	10	14
3	20	8	14
4	20	9	15
5	19	8	17
$\bar{X}$ *	19,8	9,2	15,2
$\pm S$ **	0,45	1,30	1,30

\* Média

\*\* Desvio-padrão

FIGURA 5

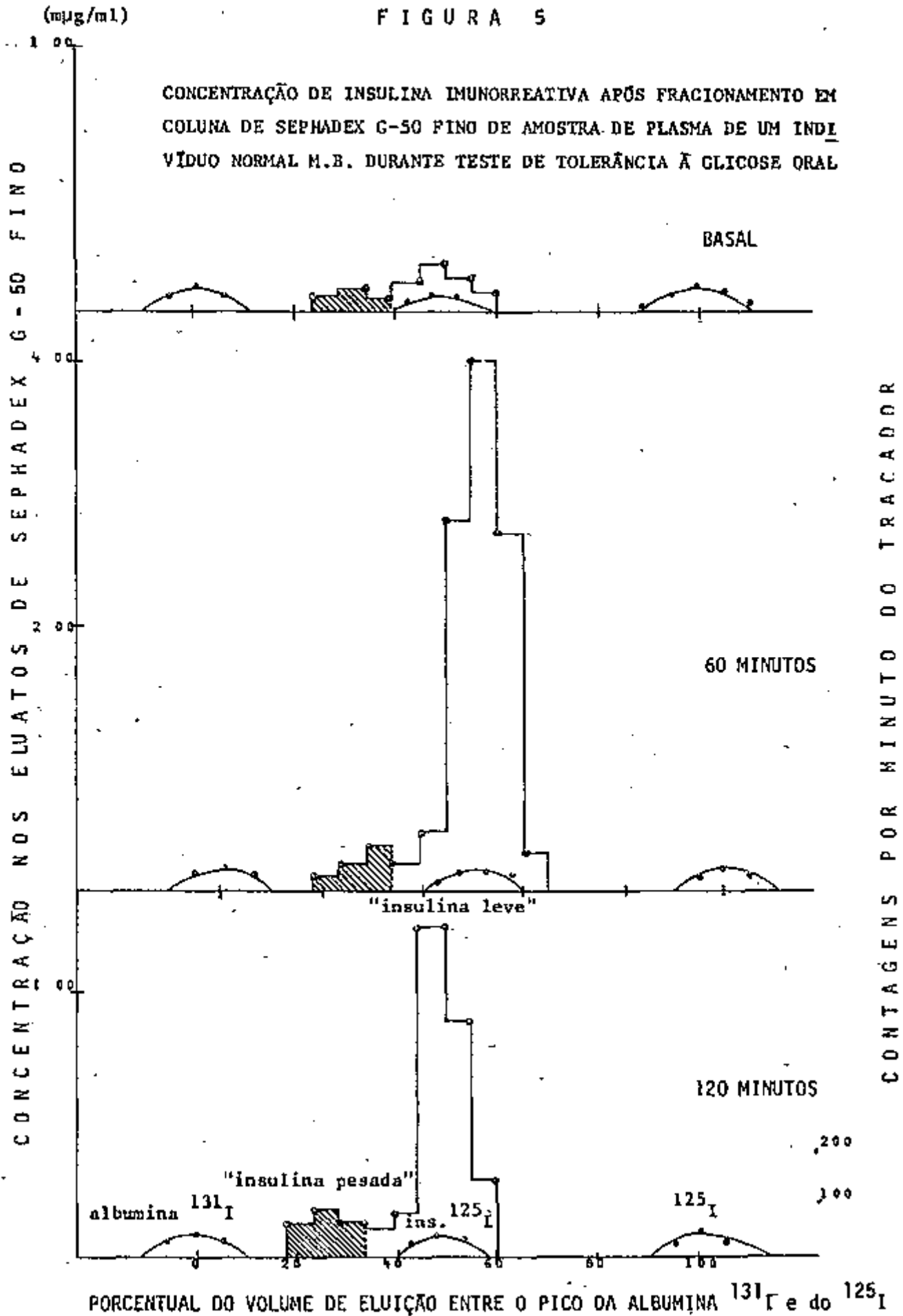


TABELA VIII

## TESTE DE TOLERÂNCIA À TOLBUTAMIDA E GLICOSE NO PACIENTE JSC (INSULINOMA)

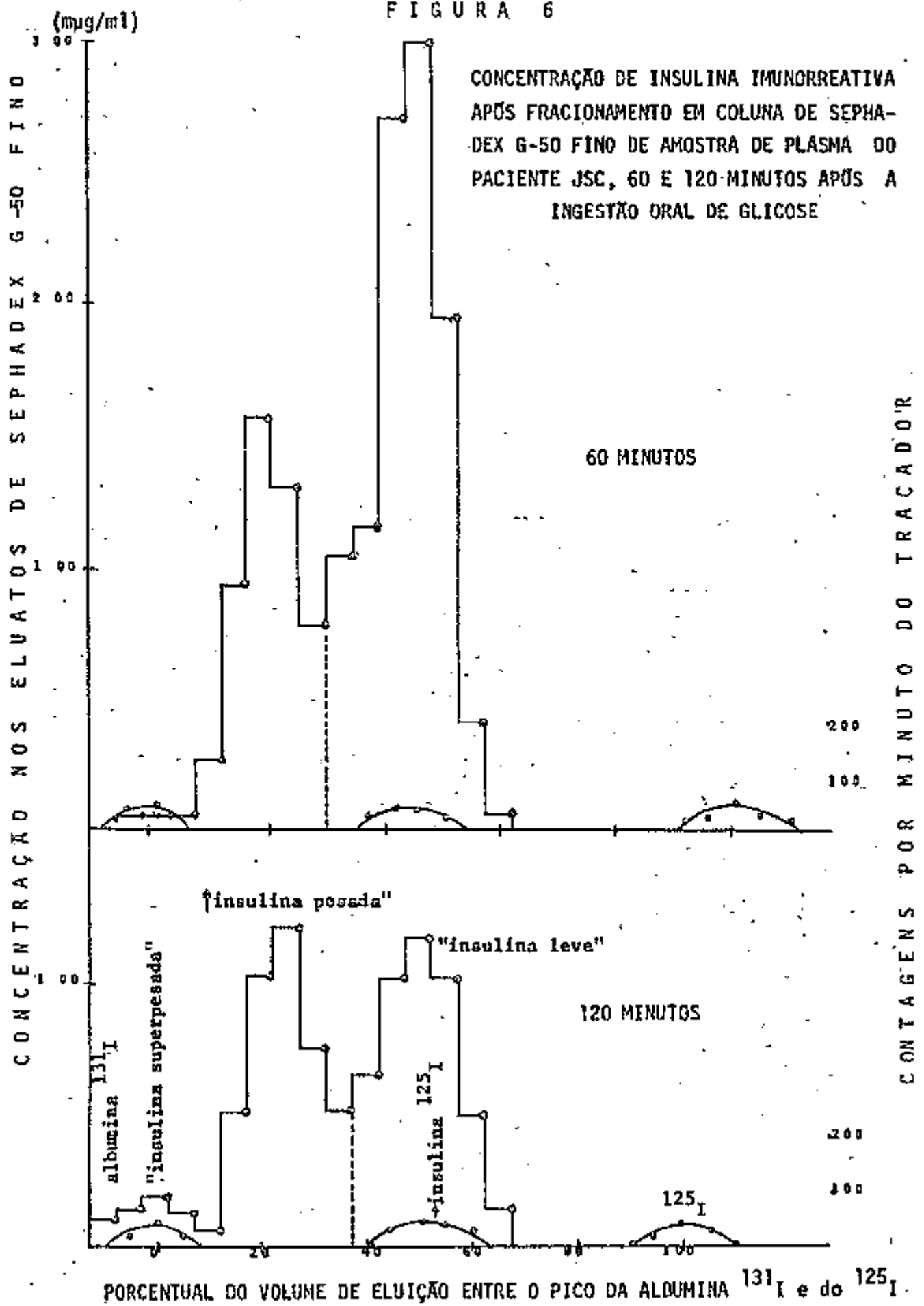
Concentração da insulina imunorreativa total e dos componentes imunorreativos da insulina plasmática (insulinas "leve, pesada e superpesada") nos eluatos da coluna de Sephadex G-50 fino

PROVA	TEMPO minutos	GLICEMIAS mg/dl	IRI m $\mu$ g/ml	INSULINA LEVE m $\mu$ g/ml	INSULINA PESADA m $\mu$ g/ml	INSULINA SUPERPESADA m $\mu$ g/ml
Tolbutamida	0	50	25	10,76	13,47	0,43
	8	46	29	18,96	9,78	0,35
Tolerância à glicose	60	180	50	34,36	16,00	0,34
	120	202	35	17,40	15,60	2,38

PROVA	TEMPO minutos	PORCENTAGEM DE INSULINA IMUNORREATIVA TOTAL			PORCENTAGEM DE RECUPERAÇÃO DA COLUNA
		INSULINA LEVE	INSULINA PESADA	INSULINA SUPERPESADA	
Tolbutamida	0	44	54	2	21
	8	65	34	1	33
Tolerância à glicose	60	68	31	0,7	30
	120	49	44	7,0	26

FIGURA 6

CONCENTRAÇÃO DE INSULINA IMUNORREATIVA  
APÓS FRACIONAMENTO EM COLUNA DE SEPHA-  
DEX G-50 FINO DE AMOSTRA DE PLASMA DO  
PACIENTE JSC, 60 E 120 MINUTOS APÓS A  
INGESTÃO ORAL DE GLICOSE

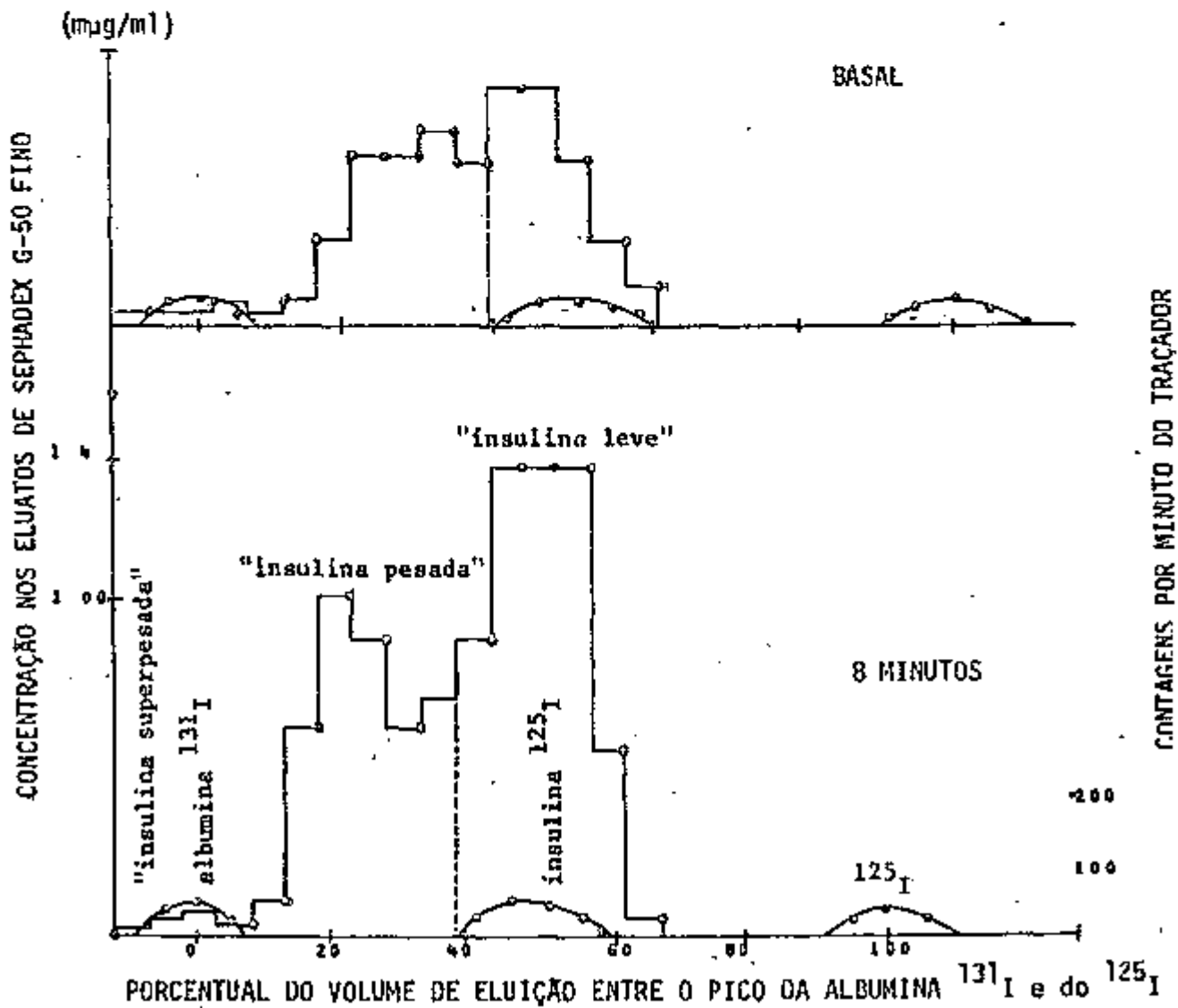


PORCENTUAL DO VOLUME DE ELUIÇÃO ENTRE O PICO DA ALBUMINA <sup>131</sup>I e do <sup>125</sup>I.



## FIGURA 7

CONCENTRAÇÃO DE INSULINA IMUNORREATIVA APÓS FRACIONAMENTO  
EM COLUNA DE SEPHADEX G-50 FINO DE AMOSTRA DE PLASMA DO  
PACIENTE JSC (BASAL E 8 MINUTOS APÓS  
INJEÇÃO INTRAVENOSA DE TOLBUTAMIDA)



aplicado à coluna de Sephadex G-50 fino em relação à concentração total de insulina em  $\mu\text{g/ml}$  obtida no ensaio do plasma não fracionado.

Pode-se observar, nas Figuras 5, 6 e 7 e Tabelas VI e VIII, que a proporção de "insulina leve" caiu da amostra de 60 a 120 minutos pós-glicose com aumento proporcional de "insulina pesada", havendo também um aumento significativo da porcentagem de "insulina superpesada" em JSC, indicando que, com o passar do tempo, após a carga de glicose, haveria uma redução da insulina "bem formada" (leve), com a eliminação de maior proporção dos precursores.

Com efeito, como se poderá notar na Figura 7, após a injeção da tolbutamida, houve, em relação ao nível basal, uma eliminação preferencial do hormônio propriamente dito ("insulina leve") e redução dos dois precursores, na amostra de 8 minutos.

Para provar a especificidade das insulinas "leve e pesada", obtida na coluna de Sephadex G-50 fino, comparadas a insulina e proinsulina, respectivamente, fizemos quatro diluições de uma mistura de "insulina leve" e outra mistura de "insulina pesada", obtidas do paciente JSC, com elevados níveis de imunorreatividade (Tabela IX, Figura 8).

A Figura 8 mostra que as diversas diluições da "insulina leve" caem ao longo da curva-padrão de insulina humana e as da "insulina pesada" ao longo da curva-padrão correspondente com proinsulina de porco. Este mesmo fato pode ser expresso como indicado na Fi-

TABELA IX

CONCENTRAÇÕES DE UMA MISTURA DE INSULINA PESADA E UMA MISTURA DE INSULINA LEVE OBTIDAS NOS ELUATOS, DA COLUNA DE SEPHADEX G-50 FINO, DE AMOSTRAS DE PLASMA DO PACIENTE JSC COM INSULINOMA, EM DIFERENTES DILUIÇÕES

FATOR DE DILUIÇÃO	INSULINA PESADA*		INSULINA LEVE**	
	B/F	µg/ml	B/F	µg/ml
1:6,25	0,54	0,94	0,32	0,94
1:8,33	0,60	0,75	0,36	0,75
1:12,5	0,64	0,47	0,44	0,47
1:25	0,71	0,25	0,52	0,25

Coeficiente de correlação  $r = 0,93$

\* Valores lidos na curva-padrão com proinsulina de porco cristalizada.

\*\* Valores obtidos na curva-padrão preparada com insulina humana cristalizada.

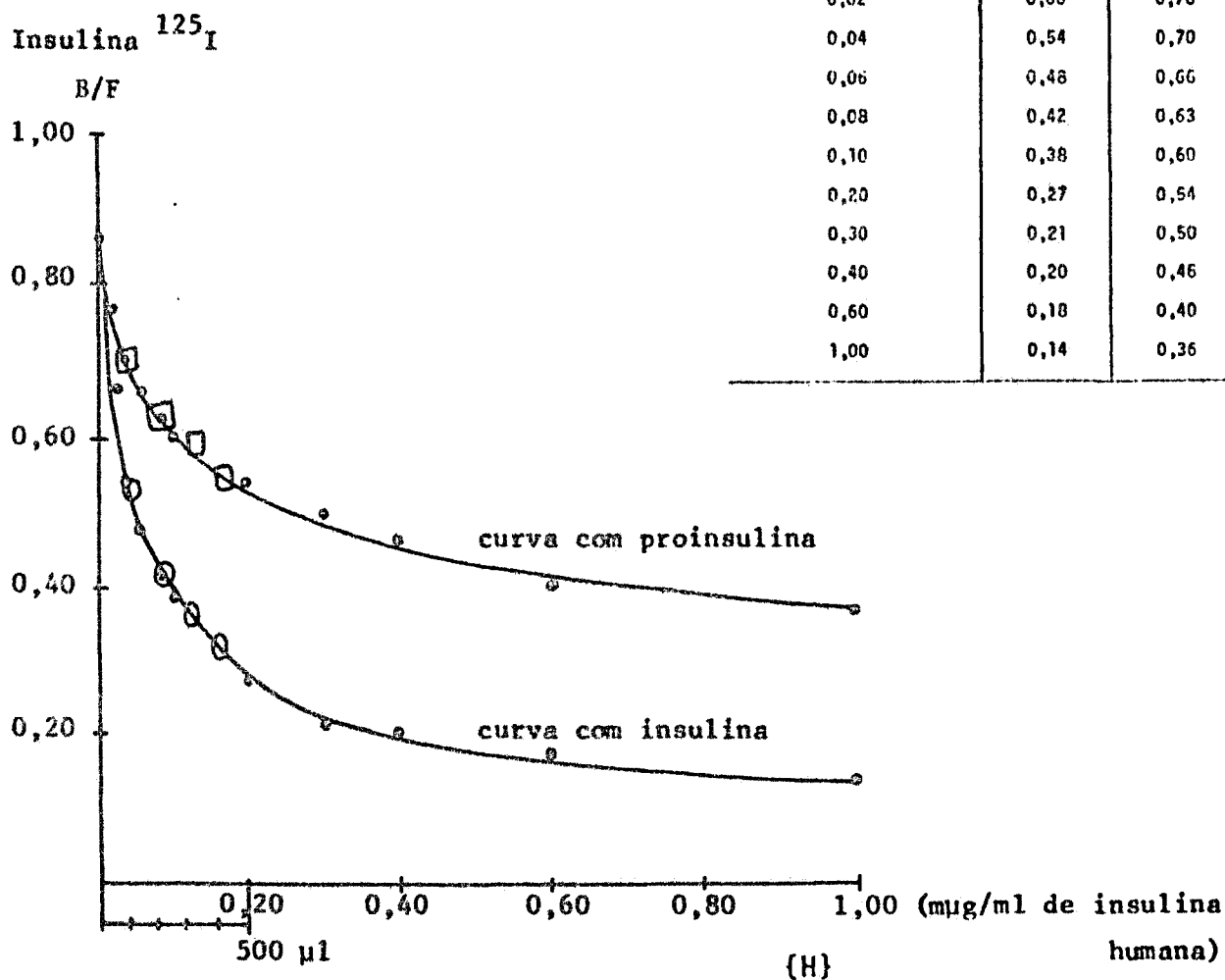
FIGURA 8

## IMUNORREATIVIDADE DAS INSULINAS "PESADA E LEVE"

B/F da insulina  $^{125}\text{I}$  é projetada como função das concentrações de insulina e proinsulina. As razões B/F das diluições caem razoavelmente na curva-padrão correspondente.

○ "insulina leve"

◻ "insulina pesada"



gura 9.

A Figura 8 também permite observar as características da imunorreatividade da proinsulina em relação a da insulina, pois para uma mesma concentração de hormônio a relação B/F da insulina de porco  $^{125}\text{I}$  foi muito diferente, aumentando a diferença com a concentração progressivamente crescente de hormônio frio.

Fazendo-se a leitura das relações B/F da proinsulina na curva-padrão de insulina obtivemos concentrações equivalentes em insulina humana, como indicado na Tabela X, e, calculando a porcentagem de reação cruzada do antisoro utilizado com a proinsulina em relação àquela com a insulina, pode-se verificar um maior percentual de reação cruzada em base molar.

## F I G U R A 9

EFEITO DA DILUIÇÃO DAS INSULINAS "PESADA E LEVE", OBTIDAS DO PLASMA DO PACIENTE JSC. DILUIÇÕES DIFERENTES LIAS NA CURVA-PADRÃO RESPECTIVA. AS CONCENTRAÇÕES CORRESPONDEM LINEARMENTE COM O FATOR DE DILUIÇÃO.

• "insulina pesada"  
+ "insulina leve"

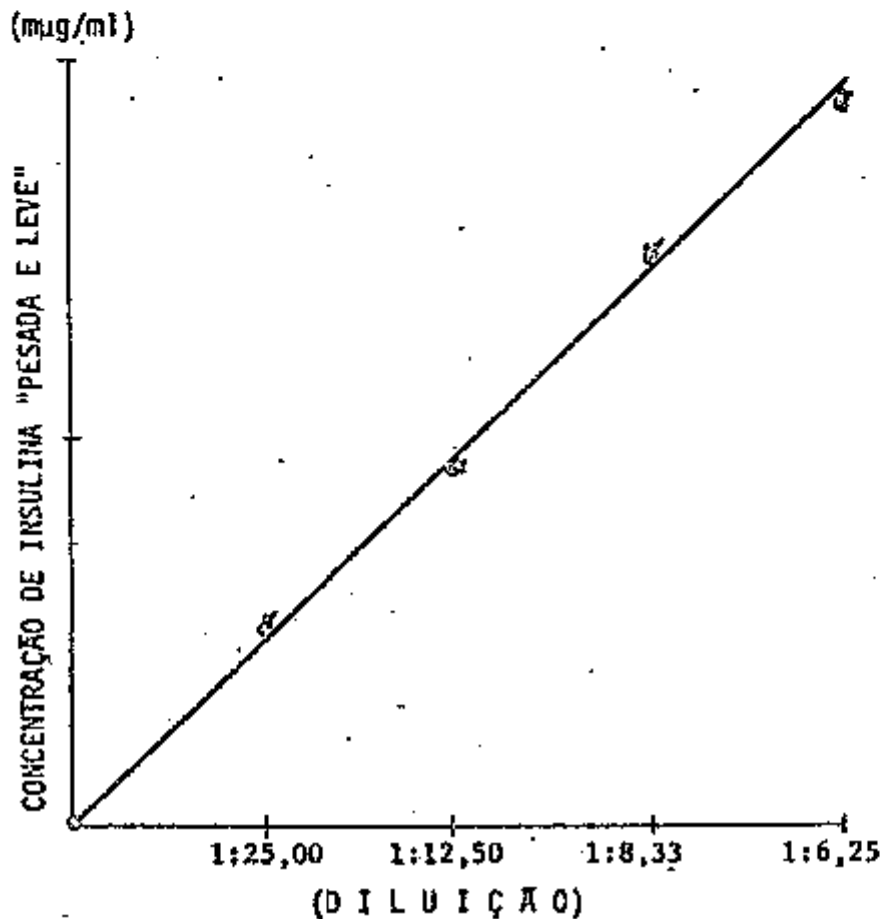


TABELA X

COMPARAÇÃO DA IMUNOREATIVIDADE DA INSULINA HUMANA E PROINSULINA DE PORCO CRISTALIZADAS FRENTE AO ANTISORO ANTIINSULINA DE PORCO, CONSIDERANDO A CONCENTRAÇÃO PESO-VOLUME (P/V), CONCENTRAÇÃO MOLAR (M) DE INSULINA HUMANA E CONCENTRAÇÃO DE PROINSULINA DE PORCO EM EQUIVALENTES DE INSULINA HUMANA

CONCENTRAÇÃO INSULINA		B/F		CONCENTRAÇÃO PROINSULINA		B/F		PORCENTUAL DE REAÇÃO CRUZADA PROINSULINA	
P/V mg/ml	{M}	INSULINA		P/V mg/ml	{M}	PROINSULINA		P/V	{M}
0,02	$0,12 \times 10^{-9}$	0,66		0,010	$0,09 \times 10^{-9}$	0,76		50	75
0,04	$0,24 \times 10^{-9}$	0,54		0,0175	$0,16 \times 10^{-9}$	0,70		44	66
0,05	$0,36 \times 10^{-9}$	0,48		0,020	$0,18 \times 10^{-9}$	0,66		33	50
0,08	$0,48 \times 10^{-9}$	0,42		0,021	$0,19 \times 10^{-9}$	0,63		28	39
0,10	$0,60 \times 10^{-9}$	0,38		0,026	$0,23 \times 10^{-9}$	0,60		26	38
0,20	$1,20 \times 10^{-9}$	0,27		0,040	$0,36 \times 10^{-9}$	0,54		20	30
0,30	$1,80 \times 10^{-9}$	0,21		0,050	$0,45 \times 10^{-9}$	0,50		16	25
0,40	$2,40 \times 10^{-9}$	0,20		0,062	$0,55 \times 10^{-9}$	0,46		15	23
0,60	$3,60 \times 10^{-9}$	0,18		0,090	$0,81 \times 10^{-9}$	0,40		15	22
1,00	$6,00 \times 10^{-9}$	0,14		0,118	$1,06 \times 10^{-9}$	0,36		11	17

## 5. DISCUSSÃO

Os princípios do ensaio radioimunológico se baseiam em reações de competição entre hormônio marcado e frio, para os locais de fixação do anticorpo específico e o resultado depende somente da interação dos reagentes, de acordo com a lei da ação das massas<sup>(20)</sup>, sendo três os requisitos essenciais para a feitura do radioimunoensaio: hormônio marcado, antisoro específico e separação das frações livre e combinada do hormônio marcado.

Os hormônios marcados, purificados em gel de amido, apresentaram na autoradiografia (Figura 1) migrações diferentes para a insulina e proinsulina de porco  $^{125}\text{I}$ . A insulina de porco  $^{125}\text{I}$  migra na frente da albumina sérica e a proinsulina atrás desta.

A eletroforese em gel de amido permite a separação de insulinas com diferente teor de iodo<sup>(21)</sup>. Presumivelmente, moléculas com resíduos de diiodotirosina migram mais rapidamente para o ânodo do que as com grupamentos tirosil monosubstituídos<sup>(22)</sup> em virtude de cada resíduo tirosina diiodada conferir, em pH 8.6, uma carga negativa adicional à molécula. Alteração similar na mobilidade eletroforética foi observada



para a proinsulina, porém as manchas não foram tão nítidas como para a insulina (Figura 1). Por outro lado, a cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-50 fino, onde as moléculas aparecem no efluente em ordem decrescente de tamanho, a proinsulina surge antes da insulina nos eluatos. A purificação por este método apresentou quase a mesma eficiência para ambos os hormônios marcados (Tabela II).

O hormônio marcado, separado dos outros componentes superiodados, portanto com maior probabilidade de manutenção da integridade imunológica e estabilidade, uma vez excluídos os componentes danificados e todo livre, pela passagem em Sephadex G-50 fino, apresenta condições ótimas para reagir com o anticorpo específico.

Para a satisfação do segundo requisito, o preparo do anticorpo foi inicialmente realizado com imunização de 30 cobaias com insulina de porco. Destes animais, 50% morreram e somente três (Tabelas III e IV) produziram antisoro com título crescente.

A cobaia de nº 3 apresentou os melhores resultados, como se pode observar com a curva-padrão (Figura 2), sendo a diluição para B/F ao redor de 1, de 1:150000. Em diluições maiores para determinação de níveis baixos de insulina ( $B/F = 0,5$ ), a diluição mais adequada foi de 1:600000 para 1000 cpm/ml de traçador (Figura 3).

No fracionamento do plasma do paciente JSC, com insulinoma, obtivemos um pequeno porcentual de "insulina superpesada" de eluição precedente a insulina "pesada" (Figuras 6 e 7), além dos dois componen-

tes da insulina plasmática ("leve e pesada") normalmente observadas nos indivíduos normais, recuperadas nos picos correspondentes à insulina e proinsulina cristalizadas, marcadas com radiofódo e com idênticos perfis de eluição (Figura 4-C).

Embora variável, o porcentual de recuperação da coluna (48 a 120%), a relação porcentual dos diversos componentes imunorreativos, em cinco indivíduos normais, não sofreu alteração.

Quando comparamos a imunorreatividade do anticorpo com insulina humana padrão e proinsulina de porco padrão, observamos menor eficiência no deslocamento do traçador pela proinsulina em relação à insulina, no sistema traçador-anticorpo  $\leftrightarrow$  anticorpo-traçador, considerando-se as concentrações de hormônio em unidades de peso-volume, porém a diferença diminui quando se consideram unidades de concentração molar (Tabela X).

Realizando-se a mistura de insulinas "pesada e leve", eluídas da coluna de Sephadex G-50 fino, as concentrações obtidas por meio das curvas dose-resposta (peso-volume), usando proinsulina de porco e insulina humana cristalizadas como padrão, respectivamente, as relações B/F das diluições caíram ao longo da curva-padrão correspondente (Figura 8) ou linearmente com o fator de diluição (Figura 9). Este fato indica ser a imunorreatividade das frações eluídas similar aos padrões cristalinos utilizados, sugerindo, pelo menos com os dois critérios, exclusão molecular e imunorreatividade com o anticorpo que a "insulina leve e pesada" têm comportamento similar à insulina e proinsulina, respectivamente.

te. Entretanto, Gutman et al<sup>(23)</sup> após obtenção das componentes "leve e pesada" da insulina imunorreativa, em coluna de Sephadex e subsequente extração por solução álcool-ácido e separação eletroforética em gel de poliacrilamida, observaram uma quantidade significativa de insulina imunorreativa migrando em posição intermediária entre a proinsulina e insulina. Após a hiperestimulação insular, em indivíduos normais, não encontraram, entretanto, formas intermediárias circulantes. Em indivíduos obesos, após estímulo com glicose associada à tolbutamida, os picos de proinsulina e insulina foram homogêneos em gel filtração mas heterogêneos em eletroforese de gel de poliacrilamida, contendo espécies intermediárias. Isto sugere que são necessários métodos mais elaborados do que gel filtração para avaliar a natureza da insulina imunorreativa em condições patológicas.

Em condições de hiperestimulação, estes mesmos autores<sup>(23)</sup> observaram (analogamente a que se poderia esperar no caso do paciente JS C) o comportamento eletroforético do intermediário, no pico da "insulina leve", ser idêntico ao da diarginil insulina de porco, ao passo que no pico da "insulina pesada" corresponderia a proinsulina desdipeptidada (dipeptídeo lisina-arginina).

Em condições basais, a "insulina pesada", nos cinco indivíduos normais estudados, correspondeu a um valor médio  $\pm$  um desvio-padrão de  $19,8 \pm 0,45\%$ . Após a sobrecarga de glicose, a componente pesada variou de 8 a  $11\% ; 9,2 \pm 1,30\%$  da concentração plasmática total aos 60 minutos, retornando aproximadamente aos valores iniciais aos 120 minutos:  $15,2 \pm 1,30\%$ . Tais resultados são concordantes aos previamente descritos.

tos (9,24).

Admite-se que a proinsulina, após ser sintetizada no ribosoma das células beta, é transportada para o aparelho de Golgi, convertida em insulina e concentrada em grânulos. A conversão para a insulina pode tomar lugar dentro desses grânulos, ao amadurecerem, antes da secreção. A sugestão de que o processo de conversão não seja completo e que um pequeno porcentual do material imunorreativo no grânulo protéico permaneça como insulina, está de acordo com a secreção de pequenas quantidades de proinsulina junto com a insulina, após o estímulo com glicose, e a proporção relativa de proinsulina dependeria do estado de maturação dos grânulos liberados. Por outro lado, deve ser considerada a possibilidade de secreção de proinsulina, ou insulina independente da formação de grânulos imaturos, ou de liberação preferencial de grânulos imaturos ou pregrânulos, apresentando um alto teor de proinsulina<sup>(25)</sup>. Isto, estaria de acordo com a hipótese da liberação de hormônio recém-sintetizado na região de Golgi ou a dissolução seletiva de grânulos recentemente formados<sup>(26)</sup>.

No paciente JSC, em relação ao basal medido, correspondente ao dia da prova com tolbutamida (Tabela VIII, Figuras 6 e 7), 54% da insulina imunorreativa total correspondiam a "insulina pesada" e 44% à componente "leve", proporção já elevada de "insulina pesada" altamente sugestiva de secreção insular anômala, havendo após 100 g de glicose, uma elevação da proporção de "insulina leve", 60 minutos após a sobrecarga e retorno aos níveis basais desta insulina (49%), no tempo de 120 minutos, mostrando que apesar de um porcentual mais elevado do componen

te proinsulina-símile a proporção relativa da "insulina pesada e leve" demonstrou a mesma dinâmica qualitativa de seus componentes, como nos indivíduos normais (Tabela VII, Figura 5), também concordante aos previamente descritos<sup>(27,28)</sup>.

Em conclusão, a presença de componentes imunorreativos da insulina, no sangue, desperta a atenção para a especificidade do radioimunoensaio utilizado para medir a insulina plasmática. Evidentemente, a insulina não é a única proteína circulante capaz de reagir com este sistema de ensaio apresentado, como já indicamos. A magnitude do erro introduzido dependerá da concentração dos diversos componentes imunorreativos como também da reatividade relativa do antisoro com estas frações.

Quanto a "insulina superpesada", por ser raramente encontrada, em concentração suficientemente elevada, sua existência não é geralmente uma complicação significativa para o radioimunoensaio de insulina<sup>(29)</sup>.

Nossos estudos indicam que o ensaio de insulina plasmática total (plasma não fracionado), utilizando "insulina leve" como padrão e um antisoro mais específico para "insulina leve", porém também reativo com "insulina pesada", produziria erros, porém estes seriam de importância fisiológica pouco significativa em virtude da menor reatividade do anticorpo utilizado com as demais componentes da insulina imunorreativa e pequena concentração da componente "pesada".

## 6. CONCLUSÕES

1. O radioimunoensaio é método indicado para a caracterização das componentes imunorreativas da insulina plasmática.
2. A eficiência de marcação da insulina de porco e proinsulina de porco são iguais ou semelhantes. A mobilidade destas é diferente em gel de amido, a proinsulina migrando após a albumina sérica e a insulina à sua frente. Por cromatografia de exclusão molecular (Sephadex G-50 fino), a proinsulina surge antes da insulina.
3. O soro antiinsulina, preparado em cobaia e usado em todas as experiências deste trabalho, mostrou ser de resposta imunológica sensível, com bom título, portanto, um reagente adequado às reações de competição.
4. A insulina humana é de melhor resolução que a proinsulina de porco frente ao mesmo soro antiinsulina.
5. A insulina plasmática, fracionada em Sephadex G-50 fino, apresenta um componente de maior imunoreatividade, "insu-

lina leve", indistinguível da insulina pancreática e que reage com o soro antiinsulina e outro componente, "insulina pesada", eluído em filtração por gel, antes do componente leve e que possui reatividade com o soro antiinsulina. No caso de insulinoma, observa-se outro componente imunorreativo, "insulina superpesada", de maior peso molecular, eluída antes da "insulina pesada", na região da albumina.

6. Nas condições experimentais de nossa pesquisa, o perfil da eluição das insulinas "pesada e leve" é similar aos da proinsulina e insulina de porco  $^{125}\text{I}$ .

7. As concentrações de amostras de insulinas "pesada e leve" caem linearmente com a diluição.

8. O ensaio de insulina plasmática total (plasma não fracionado) não está invalidado desde que os erros adicionados pela presença de proinsulina são de pequena monta, visto a pequena concentração e menor reatividade.

9. Em condições normais, a proporção de insulina pesada foi em média de 19,8; 9,2 e 15,2% no basal, 60 e 120 minutos após a sobrecarga de glicose, respectivamente.

10. O percentual de insulinas "pesada e leve" independe do porcentual de recuperação da coluna.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ~~1.~~ GORDEN, P. & ROTH, J. - Circulating insulins: "Big and Little".  
Archs Intern. Med., Chicago, 123: 237-47, 1969.
- ~~2.~~ YALOW, R.S. & BERSON, S.A. - Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. J. clin. Invest., Baltimore, 39: 1157-75, 1960.
- ~~3.~~ GRODSKY, G.M. & FORSHAM, P.H. - A immunochemical assay of total extractable insulin in man. J. clin. Invest., Baltimore, 39: 1070-9, 1960.
- ~~4.~~ BERSON, S.A. & YALOW, R.S. - Insulin in blood and insulin antibodies. Am. J. Med., New York, 40: 676-90, 1966.
- ~~5.~~ STEINER, D.F.; SPIGELMAN, L. & BRADLEY, A. - Insulin biosynthesis evidence for a precursor. Science, N.Y., 157: 697-700, 1967.
- ~~6.~~ \_\_\_\_\_ & OYER, P.E. - The biosynthesis of insulin and probable precursor of insulin by a human slet cell adenoma. Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A., Washington, 57: 473-80, 1967.



7. ROTH, J.; GORDEN, P. & PASTAN, I. - "Big Insulin": a new component of plasma insulin detected by immunoassay. Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A., Washington, 61: 138-45, 1968.
8. RUBENSTEIN, A.H.; CHO, S. & STEINER, D.F. - Evidence for proinsulin in human urine and serum. Lancet, London, 1:1353-5, 1968.
9. GORDEN, P. & ROTH, J. - Plasma insulin: fluctuations in the "Big" insulin component in man after glucose and other stimuli. J. Clin. Invest., Baltimore, 48: 2225-34, 1969.
10. YALOW, R.S. & BERSON, S.A. - "Big Big insulin". Metabolism, Baltimore, 22: 703-13, 1973.
11. SOUZA, I.T.T. - Aplicação do método do radioimunoensaio na dosagem da insulina no plasma humano. São Paulo, 1972 (dissertação de mestrado).
12. \_\_\_\_\_; HIGA, O.Z.; WAJCHENBERG, B.L.; PINTO, H. & PIERONI, R.R. \_\_\_\_\_ . Rvta. Ass. méd. bras., São Paulo, 1: 41-6, 1973.
13. \_\_\_\_\_; HIGA, O.Z.; WAJCHENBERG, B.L.; PINTO, H. & PIERONI, R.R. \_\_\_\_\_ . São Paulo, Instituto de Energia Atômica, abr. 1973. (IEA-289).
14. HIGA, O.Z.; SOUZA, I.T.T.; WAJCHENBERG, B.L.; PINTO, H. & PIERONI, R.R. - Standardization of radioimmunoassay technique for

determination of plasma insulin and growth hormone. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, Vienna. Radioimmunoassay and related procedures in medicine: proceedings of a symposium on... held in Istanbul, 10-14 September 1973. Vienna, 1974. v.1, p. 291-307.

- ~~15.~~ SMITH, L.F. - Species variation in the aminoacid sequence of insulin. Am J. Med., New York, 40: 662-6, 1966.
- ~~16.~~ HUNTER, W.M. & GREENWOOD, F.C. - Preparation of  $^{131}\text{I}$ -labelled human growth hormone of high specific activity. Nature, Lond., 194: 495-6, 1962.
- ~~17.~~ GREENWOOD, F.C. & HUNTER, W.M. - The preparation of  $^{131}\text{I}$ -labelled human growth hormone of high specific radioactivity. Biochem. J., Liverpool, 89: 114-23, 1963.
- ~~18.~~ YALOW, R.S. & BERSON, S.A. - General principles of radioimmunoassay. In: HAYES, R.L.H.; GOSWITZ, F.A. & MURPHY, B.E.P., eds. Radioisotopes in medicine: in vitro studies. Oak Ridge, Tenn., Division of Technical Information, 1968. (CONF-671111).p.7-41.
- ~~19.~~ HERBERT, V.; LAU, K.S.; GOTTLIEB, C.S. & BLEICHER, S.J. - Coated charcoal immunoassay of insulin. J. clin. Endocr., Metabol., Springfield, Ill., 25: 1375-84, 1965.

- ~~20.~~ BERSON, S.A. & YALOW, R.S.: - Quantitative aspects of the reaction between insulin and insulin-binding antibody. J. clin. Invest. Baltimore, 38: 1996-2016, 1959.
- ~~21.~~ BERSON, S.A. & YALOW, R.S. - Iodoinsulin used to determine specific activity of iodine-131. Science, N.Y., 152: 205-7, 1966.
- ~~22.~~ YALOW, R.S. & BERSON, S.A. - Topics on radioimmunoassay of peptide hormones. In: EXCERPTA MEDICA FOUNDATION, Amsterdam. Protein and polypeptide hormones: proceedings of the international symposium, Liège, Belgium, May 19-25, 1968. Amsterdam, 1969. (Excerpta medica international congress series, 161). p. 36-44.
- ~~23.~~ GUTMAN, R.A.; LAZARUS, N.R. & RECANT, L. - Electrophoretic characterization of circulating human proinsulin and insulin. Diabetologia, Berlin, 8: 136-40, 1972.
- ~~24.~~ MELANI, F.; RUBENSTEIN, A.H. & STEINER, D.F. - Human serum proinsulin. J. clin. Invest., Baltimore, 49: 497-507, 1970.
- ~~25.~~ LOGOTHETOPOULOS, J. - Electron microscopy of the pancreatic islets of the rat. Effects of prolonged insulin injections. Diabetis, New York, 15: 823-9, 1966.
- ~~26.~~ CREUTZFELDT, W.; CREUTZFELDT, C.; FRERICHS, H.; PERINGS, E. & SI-

KINGER, K. - The morphological substrate of the inhibition of insulin secretion by diazoxide. Hormone metab. Res., Stuttgart 1: 53-64, 1969.

~~27.~~ GOLDSMITH, S.J.; YALOW, R.S. & BERSON, S.A. - Significance of human plasma insulin sephadex fraction. Diabetis, New York, 18: 834-9, 1969.

~~28.~~ LAZARUS, N.R.; TANESE, T. & RECANT, L. - Proinsulin and insulin synthesis and release by human insulinoma. Diabetis, New York, 18: 340, 1969.

~~29.~~ YALOW, R.S. - Heterogeneity of peptide hormones: its implications for radioimmunoassay. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, Vienna. Radioimmunoassay and related procedures in medicine: proceedings of a symposium on ... held in Istanbul, 10-14 September, 1973. Vienna, 1974. v. 1, p. 3-22.