Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

IDENTIFICACION DE UNA PROTEINA FIJADORA DE INSULINA POR METODO RADIOMETRICO

T E S I S

Que para obtener el título de:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO BIOQUIMICO MICROBIOLOGICO

p r e s e n t a :

FRANCISCO ACUÑA MORENO

México, D. F. 1978

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TESIS 1978
M.4

FACULTAD DE QUIMICA D.E.P.
U.N.A.M.
BIBLIOTECA

JURADO ASIGNADO

Presidente	Q.F.B.	DEA CORONADO PERDOMO.
Vocal	Q.F.B.	MA. DOLORES LASTRA AZPILICUETA.
Secretario	M. en C.	ESTHER GUTIERREZ HIDALGO.
1er. Suplente	Q.F.B.	LETICIA CARRASCO RIVERA.
2do. Suplente	Q.F.B.	ROSA BEATRIZ MARTINEZ GOMEZ.

Sitio donde se desarrolló el tema:

LABORATORIO DE ENDOCRINOLOGIA
HOSPITAL GENERAL CENTRO MEDICO LA RAZA.

Sustentante:

FRANCISCO ACUÑA MORENO.

Asesor del tema:

Q.F.B. DEA CORONADO PERDOMO.

Supervisor Técnico:

Dr. ROBERTO MEDINA SANTILLAN.

Todo mi agradecimiento y respeto para las personas que hicieron posible la realización de este trabajo.

AL H. Jurado.

Q.F.B. DEA CORONADO PERDOMO.

Q.F.B. MA. DOLORES LASTRA AZPILICUETA.

M. en C. ESTHER GUTIERREZ HIDALGO.

Q.F.B. LETICIA CARRASCO RIVERA.

Q.F.B. ROSA BEATRIZ MARTINEZ GOMEZ.

Quiero hacer patente de manera especial mi agradecimiento a la Srita. Q.F.B. Dea Coronado-Perdomo quien con su ayuda y consejos ha contribuido enormemente a mi superación profesional.

Mi más sincero agradecimiento para todo el personal del laboratorio de Endocrinología del Centro Médico La Raza, en especial al Dr. Roberto Medina Santillán y la Srita. Q.F.B. Haydée Fuentes Gallegos por haber hecho posible la realización de esta tesis.

A mis Padres:

Leonor Moreno Vda. de Acuña.

Enrique Acuña Keymolén. e.p.d.

Con profundo agradecimiento por-
su apoyo y comprensión y por - -
guiarme al camino de la rectitud,
honradez y trabajo.

A mi hermano Enrique Acuña Moreno con cariño por el apoyo constante que me ha dado para la culminación de mi carrera.

Gracias.

Con cariño a mis hermanos:

Roberto Acuña Moreno.

Miguel Acuña Moreno.

Leonor Acuña de A.

Teresa Acuña de E.

A Silvia Enriquez Zapata.

Con Amor

A mis amigos.

I N D I C E

Pág.

I.- INTRODUCCION 2

II.- GENERALIDADES

A) Historia de la insulina 4
B) Síntesis de la insulina 4
C) Secreción de la insulina 7
D) Estados diabéticos 10
E) Tratamiento de la diabetes 13
F) Formación de anticuerpos anti-insulina 16
G) Detección de anticuerpos anti-insulina 17
H) Identificación de la proteína fijadora de la insulina 20

III.- MATERIAL Y METODOS

A) Electroforesis en gel de poliacrilamida 24
B) Inmunodifusión radial 31

VI.- RESULTADOS

A) Electroforesis en gel de poliacrilamida 37

B) Inmunodifusión radial 49

V.- DISCUSION 62

VI.- CONCLUSION 65

Pág.

VII.- RESUMEN 67

VIII.- BIBLIOGRAFIA 69

I N T R O D U C C I O N

El tratamiento con insulina en el paciente-diabético, puede traer como consecuencia la posible resistencia a la insulina. Cuando los requerimientos de insulina de acción intermedia alcanzan-200 unidades o más en 24 horas, se habla de resistencia insulinica. Esta resistencia insulinica puede estar causada por el desarrollo de anticuerpos-anti-insulina exogena.

En trabajos previos realizados en el Laboratorio de Hormonas del Centro Médico La Raza se demostró la presencia de anticuerpos anti-insulina - en este tipo de pacientes pero se planteó la necesidad de caracterizar a estos anticuerpos, para - que de este modo el médico tratante pueda tener - una orientación sobre las medidas terapéuticas necesarias para el control de estos pacientes. El objetivo del presente estudio es:

A) Adaptar una técnica que permita encontrar la proteína responsable de fijar a la insulina por medio de la separación de las proteínas - - plasmáticas, usando para este fin insulina marcada con ^{125}I y cuanteando la radioactividad de cada - banda en un contador de centelleo de radiaciones - gama. La técnica que mejor se presta para este fín es la electroforesis en gel de poliacrilamida, ya-que los geles son excelentes soportes (16).

B) Una vez demostrado que la proteína fijadora de insulina tenia una movilidad electroforética tipo gama, se procedió a identificar si esta era del tipo IgG o IgM (18) (19) para lo cual se uso - insulina marcada con ^{125}I y placas comerciales para identificación de inmunoglobulinas (Tri-Partigen).

G E N E R A L I D A D E S

A.- HISTORIA DE LA INSULINA.

En 1869 Langerhans describió los islotes - pancreáticos que llevan su nombre; pero su función siguió siendo un misterio durante muchas décadas.- El papel endocrino del páncreas se estableció en - 1889, cuando von Mering y Minkowski demostraron - que la pancreactectomía iba seguida de diabetes sacarina en los animales. La identificación de la - función endócrina del tejido de los islotes fué - obra de Schulze en 1900 y Ssobolew en 1902, que pudieron destruir el tejido normal de los acini, conservando los islotes y un metabolismo normal de - glucosa, mediante ligadura de los conductos pan- - creáticos. Finalmente, en 1921, Banting y Best lograron extraer insulina del páncreas. Ahora se sabe que la función endócrina del páncreas esta localizada en los islotes de Langerhans, que son células epiteliales dispersadas a través de todo el organo.

B.- SINTESIS DE LA INSULINA.

La insulina, es la hormona antidiabética - que se produce en el páncreas por las células beta de los islotes de Langerhans, es una proteína queesta formada por 51 aminoácidos, tiene un peso molecular mínimo de 6,000 y es estable en soluciones ácidas diluídas a pH de 2.5 a 3.5. La molécula deinsulina está compuesta de dos cadenas de polipéptidos, designadas A (21 aminoácidos) y B (30 aminoácidos) que están conectadas entre si por dos enlaces disulfuro que unen los aminoácidos cisteína, - como se muestra en la figura 1. (1). La cadena A - contiene además un enlace disulfuro entre dos de -

sus cisteinas lo que es importante porque la secuencia de aminoácidos dentro de la cadena es diferente, para las diferentes especies animales. La insulina de cerdo, de perro y la humana tienen una composición de aminoácidos similar en estas posiciones y diferente entre sí unicamente en el carboxilo terminal de la cadena B. La insulina de cerdo en forma similar a la bovina, tiene alanina en esta posición; la insulina humana tiene en cambio treonina.

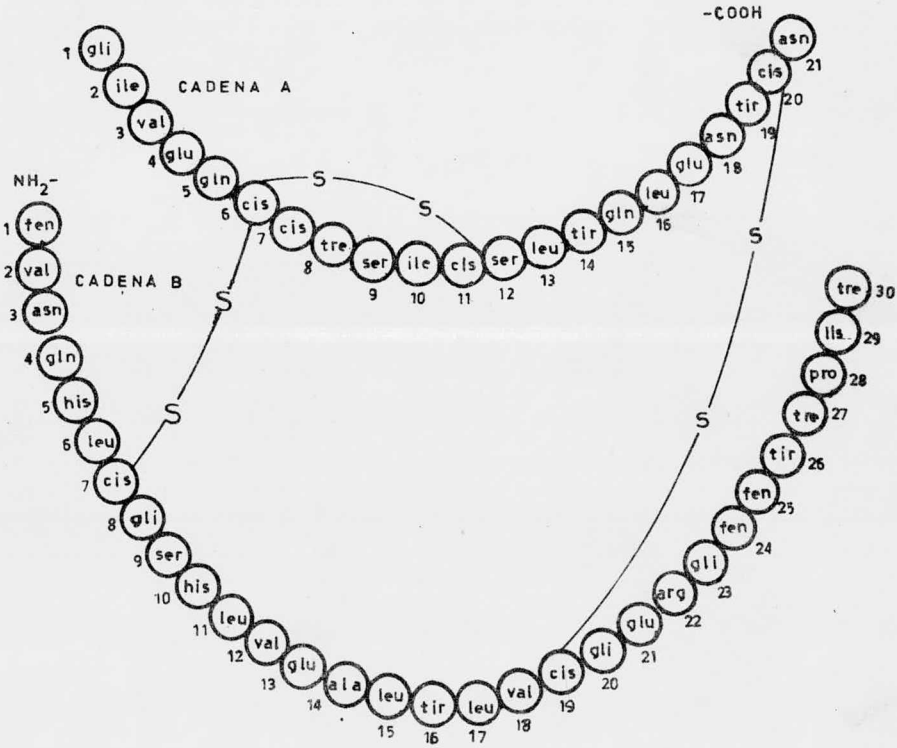


Figura 1. Estructura de la insulina humana.

La síntesis de la insulina biológicamente activa que- se puede medir en sangre es el resultado final de una serie - de pasos. En primer lugar se forma proinsulina, esta es una - cadena de polipeptidos larga con un peso molecular de alrededor de 9,000. Figura 2.

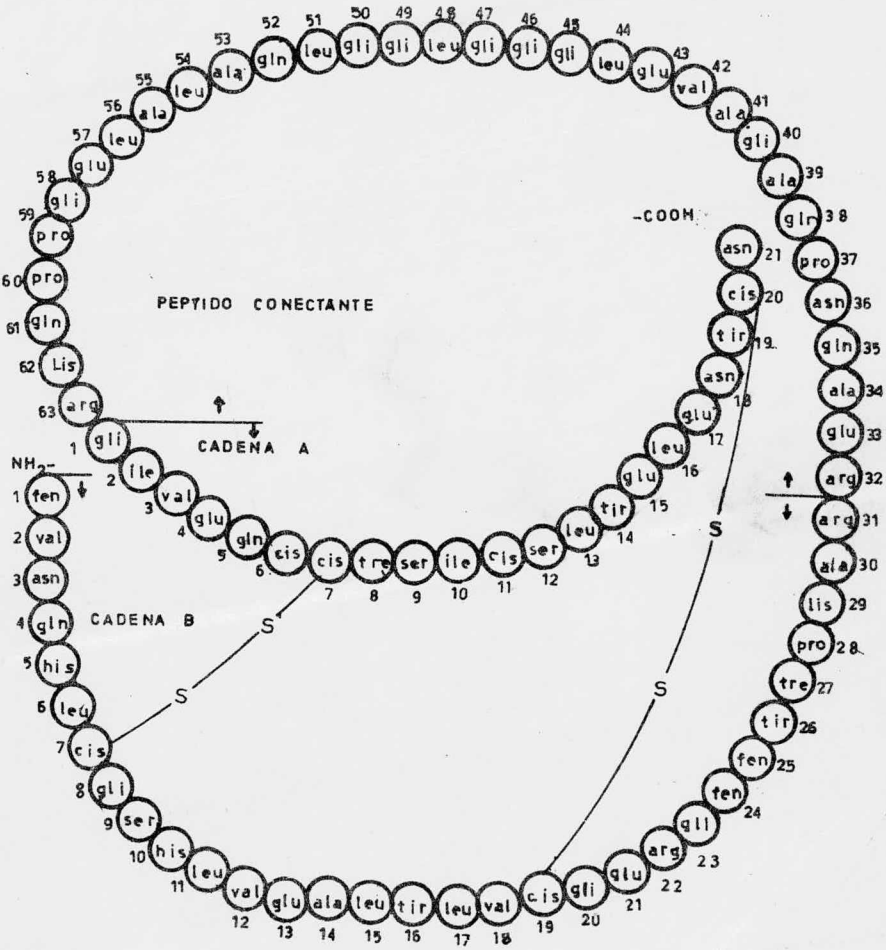


Figura 2. Estructura de la proinsulina porcina.

En segundo lugar hay un rompimiento de la - cadena de proinsulina que queda dividida en insulina y una cadena conocida con el nombre de péptido-conectante.

Cuando la biosíntesis de insulina se sigue-en una célula beta pancreática, se puede observar-que la proinsulina se localiza en el retículo endoplasmico. A partir de aquí la proinsulina se con--vierte en insulina en el aparato de Golgi, final--mente se almacena en los granulos. Estos gránulos-de la célula beta estan compuestos de cristales de zinc de insulina. Muchos estudios han mostrado una correlación entre el grado de granulación de la célula beta y el contenido de insulina del páncreas.

En 1953 se inicia la síntesis química de algunas hormonas peptídicas, dando lugar a que gru--pos de Alemania, Estados Unidos y China enfoquen - sus estudios a la síntisis en el laboratorio de - las dos cadenas peptídicas de la insulina. (24). - La introducción de una máquina programada automáticamente logra facilitar la síntesis y acortar el - tiempo, pudiendo sintetizar la cadena A (21 aminoácidos) en 8 días y la cadena B (30 aminoácidos) - en 11 días. Sin embargo la síntesis química total-de la insulina humana se desarrollo en los laboratorios Ciba-Geigy en Brasilia Suiza en 1974 por el Dr. Werner Rittel. (27)

C.- SECRECION DE LA INSULINA.

El proceso secretor para la insulina almacenada después de la estimulación por glucosa o tolbutamida ha sido captado por la microscopia elec--

trónica. Es semejante a la secreción de otras proteínas almacenadas como granulos, incluyendo aquellas que se encuentran en la pituitaria y células-acinares pancreáticas. Durante la secreción, los granulos se mueven hacia la membrana plasmática de la célula, donde la membrana superficial del granulo se fusiona con la membrana celular. Las membranas fusionadas se rompen luego y el contenido granular se libera en el espacio pericapilar. Este proceso se llama emeiocitosis. Lacy y col. en 1968, observaron microtúbulos a los cuales están adheridos algunos granulos y sugirieron que ellos facilitan o dirigen este movimiento granular. Los agentes que destruyen a estos microtúbulos (vencrestina, óxido de deuterio) inhiben la secreción de insulina. Los organelos microfilamentosos también han sido observados e implicados en el proceso de secreción.

Durante los últimos años, se ha podido demostrar que un gran número de compuestos mejora la liberación de insulina a partir del páncreas. Se debe enfatizar que el proceso de secreción de insulina comprende dos distintas fases, una de ellas ocurre inmediatamente después de la administración de un compuesto en particular, y la otra fase está en cierta forma retardada. Estas dos fases probablemente representan sitios anatómicos o metabolicamente diferentes a partir de los cuales la insulina se libera.

Diversos tipos de carbohidratos tales como hexosas; glucosa, manosa y fructuosa, y las pentosas ribosa y xilosa promueven la liberación de insulina. Aún existe la duda de si la glucosa tiene-

que ser metabolizada para liberar insulina, o bien la molécula de glucosa por si misma puede actuar - en un receptor específico, produciendo en esa forma su efecto estimulante. Experimentos en los cuales se emplean inhibidores glicolíticos (manoheptulosa) han demostrado que, si el metabolismo de la glucosa se interfiere, la liberación de insulina - se suprime.

El mecanismo preciso por el cual los aminoácidos promueven liberación de insulina no es bien conocido y podría no ser el mismo para todos los - aminoácidos esenciales; actualmente se sugiere que los aminoácidos más que participar en el metabolismo de la célula, actuan en un sitio específico de un receptor que promueve la secreción de la insulina. Se ha demostrado que algunos aminoácidos que-- no se metabolizan también son capaces de estimular la secreción de insulina.

Se ha demostrado que algunos ácidos grasos- de cadena corta, los cuerpos cetónicos y los tri-- glicéridos también son capaces de promover la liberación de insulina.

Varias hormonas polipeptídicas que incluyen el glucagon y el ACTH, también estimulan la secreción de insulina.

En la actualidad se cree que un aumento en- los niveles de AMP cíclico, representa un paso final común para la liberación de insulina, después- de la administración de hormonas polipeptídicas. - Las catecolaminas son capaces de regular la liberación de insulina dependiendo de si los efectos pre

dominan sobre los receptores alfa o beta adrenérgicos.

Finalmente las sulfonilureas que son empleadas en el tratamiento de la diabetes del adulto, estimulan la liberación de insulina del páncreas. Estas substancias pueden liberar insulina por aumento de los niveles de AMP cíclico. La generación de ATP mitocondrial parece ser necesaria para la liberación de insulina inducida por sulfonilureas.

D.- ESTADOS DIABETICOS.

Durante los últimos años se ha hecho aparente para los investigadores en el campo de la diabetes que la hiperglucemia o aún una moderada pero significante anormalidad de la curva de tolerancia a la glucosa es un evento tardío en el desarrollo del estado diabético.

El cambio genético en sí por supuesto es aún totalmente desconocido, pero es claro que un individuo diabético tiene uno o más genes alterados. Aún sin conocerse el material hereditario que el diabético recibe, se puede controlar el efecto que este material tiene en él, durante el período en el cual existe una anormalidad latente. Este período que va del momento de la concepción a el de la primera tolerancia anormal a la glucosa es llamado el período prediabético de diabetes. Prediabetes significa "antes de diabetes", y puede ser arbitrariamente definida como la condición de aquellas personas que eventualmente desarrollan diabetes, pero en los cuales ninguna anormalidad del metabolismo de los carbohidratos es demostrable en

una prueba de tolerancia a la glucosa (oral ointravenosa) aún después de la administración de esteroides. Esta resistencia dinámica a la diabetes, no siempre exitosa se caracteriza lo que ha sido llamado el período prediabético.

Obviamente este período de prediabetes precede el estado de diabetes "química" en el cual no hay síntomas del padecimiento, la glucemia en ayunas es normal, pero la tolerancia a la glucosa esta alterada (con o sin la adición de esteroides, embarazo, infección, estress, etc.). Este estado de diabetes química señala "el fin de la batalla para resistir el desarrollo de la diabetes" (26) y el momento más temprano en que se puede demostrar una tolerancia anormal para la glucosa.

El estado final es el de diabetes clínica franca o sintomática "aguda o crónica" en el cual, hay síntomas característicos del padecimiento y los valores de glucosa son anormalmente altos.

Estos tres estados, desde prediabetes hasta diabetes sintomática, no son necesariamente progresivos en dirección de avance, ya que en algunos individuos puede haber regresión de un período a otro (por ejemplo de diabetes química a prediabetes) y eso puede suceder sin cambios en el peso corporal o en ausencia de tratamiento.

Solo en muy pocas situaciones pueden estar uno seguro que el estado prediabético existe en presencia de una tolerancia normal para la glucosa. Algunas de estas causas son: (3) (4)

a) El gemelo idéntico no diabético de un - diabético.

b) Individuos con parientes cercanos diabéticos. De acuerdo a Steinberg (26), la probabili-- dad de que una persona tenga una tendencia genética a diabetes es de aproximadamente 100% cuando su padre y su madre son diabéticos; 50 a 80% cuando - el sujeto tiene un padre diabético y un abuelo por el lado del padre no diabético o con un padre diabéitco, un hermano diabético y un abuelo diabético del lado del padre que no es diabético; 30 a 40% - cuando los parientes diabéticos son dos abuelos - (no esposos entre sí) o cuando un padre y un primo hermano por el lado del padre no diabéticos tiene- este padecimiento.

c) Mujeres con historia obstétrica anormal.

1.- Con productos macrosómicos (más de 4K - de peso). No todas las madres que en el futuro van a ser diabéticas tienen hijos macrosómicos, aunque hayan tenido muchos hijos, Jackson, ha demostrado- que el 62% de las madres en etapaprediabética han- tenido cuando menos un niño con más de 4K de peso- en el momento de nacer.

2.- Mortalidad perinatal.

3.- Abortos repetidos.

4.- Toxemia.

5.- Algunas otras alteraciones obstétricas- asociadas a prediabetes han sido más discutidas tales como: infertilidad, hidroamnios, prematurez, - malformaciones congénitas y lactancia excesiva.

d) Individuos obesos.

Karam y col. encontraron una respuesta de - insulina a la glucosa elevada en sujetos obesos. - Resultados similares fueron reportados en hijos de ambos padres diabéticos por Camerini Dávalos y col. con una técnica diferente.

e) Sujetos con manifestaciones vasculares - de las que se observan en la diabetes. Estas pue-- den incluir retinopatía, enfermedad coronaria, y/o alteraciones neurológicas del tipo de la diabetes- tales como dolor en las extremidades e impotencia.

E.- TRATAMIENTO DE LA DIABETES.

La diabetes juvenil es tratada comúnmente - con insulina y regímenes dietéticos; no es todavía posible un tratamiento perfecto de mantenimiento.- En los diabéticos de iniciación en edad madura que solo tienen un grado moderado de la enfermedad se- pueden usar agentes hipoglucemiantes efectivos por via oral.

El descubrimiento de la insulina por Ban- - ting y Best en la Universidad de Toronto, se llevó a cabo en el verano de 1921. La primera inyección- de insulina a un paciente diabético se aplicó en - el Hospital General de Toronto, el 11 de enero de- 1922 a un joven de 14 años. La insulina fué crista lizada por Abel en la Universidad de John Hopkins- en 1926. La insulina protamina zinc se introdujo - en 1937, la insulina globina en 1939, la insulina- NPH en 1950, y la familia de las insulinas lentas- en 1954.

El tratamiento con insulina es imperativo - para la mayoría de los pacientes en los que la diabetes se inicia antes de los 20 años de edad. - - Usualmente es necesaria en aquellos pacientes en - que se inicia antes de los 40 años de edad y aún - frecuentemente se indica en aquéllos pacientes con inicio después de los 40 años. El tratamiento con-insulina es necesario a cualquier edad cuando la - diabetes es de tipo inestable.

Las insulinas que se usan clinicamente son; insulinas modificadas quimicamente como la insulina bovina sulfatada, la insulina porcina (intacta-o sin alanina, en la posición 30 de la cadena B) e insulina de salmón indicada en diabéticos resistentes debido a su reducida antigenicidad y reacción-cruzada con los anticuerpos circulantes.

Las preparaciones de insulina que se han hecho para que su acción y su absorción sea más prolongada presentan la desventaja de ser más inmunogenicas que la insulina cristalizada. La protamina zinc insulina, se absorbe más lentamente que la insulina simple y puede abatir a la glucemia por más de 24 horas, mientras que se requerirán 2 ó 3 in--yecciones de insulina simple para igualar este - - efecto. La globininsulina, es una combinación de - insulina y globina, su efecto dura de 12 a 15 ho--ras. La insulina ultralenta se prepara por una - - cristalización controlada en presencia de altas - concentraciones de zinc y acetato para producir - cristales grandes que son en consecuencia lentamente liberados a la circulación. La insulina lenta - es una combinación 7:3 de insulina ultralenta y - simple y tiene un efecto intermedio. La insulina -

comercial se ofrece ahora en tres concentraciones: 40 U, 80 U, 100 U, refiriendose las unidades a unidades por mililitro.

La unidad de insulina es la cantidad requerida para reducir la glucosa sanguínea, en un conejo normal de 2K con 24 horas de ayuno, de 120 a 45 mg/100ml. El estándar internacional contiene 24 - unidades/mg de insulina cristalizada. La mayoría - de las preparaciones comerciales de insulina cristalina tienen un promedio de 25 U/mg.

El uso de sulfonilureas fué introducido por Ryan y Schwartz para el tratamiento de hiperglucemia asociada a diabetes mellitus. Conn en 1936 reporta una dieta alta en proteínas y baja en carbohidratos para el tratamiento de hiperglucemia.

Es útil el uso de sulfonilureas en el tratamiento de los diabéticos de tipo de "inicio adulto" quienes aun conservan parte de la función pancreática, no en personas cuyo páncreas ya no produce insulina como los diabéticos juveniles. Las sulfonilureas efectivas por vía oral más extensamente empleadas son; la tolbutamida (Orinase), la clorpropamida (Diabinese) y la tolazamida (Tolinase),- siendo las dos últimas de acción prolongada, la - gliburida tiene igual acción a la tolbutamida, pero es 50 a 100 veces más potente que esta. Estu- - dios hechos por Anderson y Herman en un grupo de - pacientes diabéticos, mostró que la respuesta clínica a las sulfonilureas es similar a la reportada por Economov, Ryan y Schwartz, produciendo un alivio de la hiperglucemia. Los síntomas de la hiperglucemia fueron desapareciendo con la administra--

ción de sulfonilureas, pero cuando fué suspendido el tratamiento los síntomas vuelven. Al reanudar el tratamiento con sulfonilureas los síntomas desaparecen nuevamente. (6) El uso de biguanidas también es importante pues bloquea la gluconeogénesis con lo cual el nivel de glucosa sanguínea no se eleva.

F.- FORMACION DE ANTICUERPOS ANTI-INSULINA.

Un inconveniente muy importante que provoca la inyección repetida de insulina es la producción de anticuerpos anti-insulina en algunos sujetos diabéticos, después de 2 ó 3 meses de tratamiento. En ocasiones se encuentran concentraciones elevadas del anticuerpo en personas que han mostrado clinicamente resistencia a la insulina y es cuando los requerimientos de esta hormona alcanzan 100 a 200 unidades o más al día.

El mecanismo de formación de anticuerpos no se conoce con certeza. Existen muchas hipótesis sobre la formación de anticuerpos, las principales se comprenden dentro de la:

a) Instructiva. Esta hipótesis postula que el antígeno debe estar presente para servir como molde directo en la síntesis de anticuerpos.

b) Selección clonal. Esta hipótesis propone que el huésped posee información para todos los posibles antígenos existentes y el papel del antígeno será unicamente encontrar el linfocito adecuado. Los antígenos en lugar de llevar información para la nueva síntesis de anticuerpos, simplemente

seleccionan, y estimulan enormemente la proliferación de células que producen globulinas específicas en forma natural. Tales líneas celulares persisten subsecuentemente en forma indefinida en el huésped y producen anticuerpos aún en ausencia del antígeno.

Una gran cantidad de información obtenida recientemente sugiere que el paso inicial en la producción de anticuerpos es la fagocitosis, cuando el antígeno es fagocitado por el macrofago este estimula a los linfocitos, tanto linfocitos T como linfocitos B, los linfocitos B sintetizan las globulinas específicas. Las inmunoglobulinas que más precozmente se producen en la respuesta primaria son IgM; las globulinas IgG aparecen posteriormente. Algunos linfocitos B a veces requieren de la cooperación de los linfocitos T para una producción eficaz de anticuerpos.

G.- DETECCION DE ANTICUERPOS ANTI-INSULINA.

La presencia de anticuerpos anti-insulina se ha puesto de manifiesto gracias a estudios y modificaciones de técnicas radioinmunológicas. Yallow y Berson en 1960 describen una técnica en la cual las muestras de los pacientes tratados con insulina exógena mostraron resistencia. Usando suero del paciente e insulina marcada con ^{131}I proponen una técnica de cromatografía ascendente en la cual la insulina unida al anticuerpo corre unida a la proteína que la fija, mientras que la no unida permanece en el punto de aplicación, haciendo cortes y pasandolos a un contador de radioactividad. El resultado que obtienen demuestra que hay anticuer-

pos que fijan la insulina. (7)

Grodsky en 1965, empleando técnicas inmunológicas diferenciales descubrió que los anticuerpos formados contra la insulina exógena eran capaces de combinarse con ella in vivo, así como también inactivar a la insulina formada endógenamente. Los anticuerpos inducidos en animales por la insulina endógena pueden producir lesiones en el páncreas, destrucción de las células de los islotes y ocasionalmente, diabetes grave. La insulina combinada con el anticuerpo no está disponible para las células y sólo se degrada lentamente: así mucha de la insulina, administrada o secretada, en realidad no actua.

La búsqueda de anticuerpos anti-insulina como responsables de la resistencia a la insulina ha sido investigada por Karam, Grodsky y Forsham en 1969, los cuales estudiaron la resistencia a la insulina en pacientes diabéticos que fueron tratados con insulina exógena. La detección de estos anticuerpos se llevó a cabo por técnicas de radioinmunoensayo utilizando insulina marcada con ^{125}I. (8)

Las técnicas de radioinmunoensayo estan basadas en la competencia que se efectúa entre un antígeno marcado y uno no marcado por unirse a los sitios activos del anticuerpo que se encuentra en cantidades limitadas. El radioinmunoanálisis consta de tres pasos fundamentales que son: a) competencia, b) separación entre los antígenos (unidos al anticuerpo y antígenos libres) y c) cuantificación de la radioactividad en una de las dos fracciones, generalmente se hace en la unidad al anti-

cuerpo.

La separación entre los antígenos puede realizarse por diferentes procedimientos: a) con inmunoadsorbentes, como el carbón activado, la amberlita, etc., b) por sistema de doble anticuerpo, que consiste en agregar al complejo antígeno-anticuerpo ya formado un antianticuerpo para que precipite. La cuantificación de la radioactividad se hará en un contador de centelleo de radiaciones gama, pues el isotopo usado para cuantear la insulina es ^{125}I.

El trazo de una curva estandar es indispensable para la cuantificación de un antígeno en una muestra problema, durante la competencia se mantienen constantes las concentraciones de antígeno marcado y anticuerpo, variando las concentraciones del antígeno no marcado (que funciona como estándar en la curva de calibración) en forma proporcional, la cantidad de material radioactivo unido al anticuerpo guardará una relación inversamente proporcional a la concentración de antígeno no marcado. De los datos obtenidos se traza la curva estándar, graficando en las ordenadas la relación porcentual del antígeno radioactivo unido al anticuerpo sobre la radioactividad total adicional (el estándar radioactivo y el anticuerpo estarán siempre en las mismas concentraciones) (9) (10). Existen equipos comerciales los cuales traen manuales para llevar a cabo la técnica completa, desde reconstruir los reactivos hasta la manera de reportar los resultados. (11) (12)

Se ha desarrollado una técnica de radioinmunoanálisis para detectar el péptido conectante - - (C-péptido) que resulta de la conversión enzimática de la proinsulina a insulina ya que es secretado en concentraciones equimoleculares a la circulación, por lo que también puede servir para evaluar los niveles de insulina cuando la técnica de la insulina no puede ser aplicada, pero en la cual la - presencia de anticuerpos anti-insulina circulantes y la terapia de insulina exógena interfieren con - el ensayo de insulina. (13)

H.- IDENTIFICACION DE LA PROTEINA FIJADORA DE INSULINA.

Para llevar a cabo la identificación de la-proteína fijadora de insulina se diseña una técnica en la cual se usa insulina marcada con ^{125}I, incubandola con las muestras de los pacientes. Para-la separación de las proteínas plasmáticas se usa-la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida, ya que estos geles son excelentes soportes - para las separaciones electroforéticas, pues son - transparentes, lo que permite la perfecta visualización de las bandas de las proteínas una vez teñidos, el ser practicamente inertes desde el punto - de vista químico y el ser flexibles y fuertes, lo-que permite la manipulación y conservación (14) - (15) (16) (17). Terminado el desarrollo electroforético se cuantea la radioactividad en un contador de centelleo de radiaciones gama.

Hein Christinsen (18), menciona un método - para determinar si los anticuerpos anti-insulina - residen en IgG, IgM o IgA. Por medio de una técni-

ca de doble anticuerpo para determinar la capaci-- dad de unión de IgG e IgM humana con la insulina,- se encontró que se une a las dos, pero preferentemente a la IgG. Para este estudio se usó insulina- marcada con ^{125}I. Estudios hechos por Sebriakova y Little (19), informan que los anticuerpos anti-insulina se encuentran en las inmunoglobulinas. Estudiando mujeres diabéticas embarazadas tratadas con insulina, hacen determinaciones del indice de anticuerpos en las madres y en el cordón umbilical, encontrando que los anticuerpos son del tipo IgG.

En el presente trabajo se lleva a cabo una- técnica de inmunodifusión radial para diferenciar- que tipo de inmunoglobulina es la responsable de - acarrear a los anticuerpos anti-insulina. Para este fin se utilizan placas preparadas comercialmente Tri-Partigen para IgG e IgM y suero de los pa-- cientes incubado con insulina marcada con ^{125}I, al terminar la inmunodifusión la radioactividad de - las placas se cuanteó en un contador de centelleo- de radiaciones gama.

MATERIAL Y METODOS.

MUESTRAS BIOLOGICAS.

Suero sanguíneo obtenido en ayunas de 33 pacientes diabéticos, 17 mujeres y 16 hombres cuyas edades oscilaron entre los 18 a 77 años de edad, que asistieron a consulta externa al Centro Médico La Raza y los cuales fueron tratados con insulina en dosis altas (más de 100 unidades diarias) durante más de 3 meses y en los cuales ya se había demostrado la presencia de anticuerpos anti-insulina (28). En ellos se realizó la electroforesis en gel de poliacrilamida para detectar la fracción proteica que acarrea a los anticuerpos y la inmunodifusión radial para caracterizar la inmunoglobulina que los transporta. (Los sueros fueron congelados hasta el momento de su utilización).

A.- ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA.

Fundamento.- La electroforesis de disco es un termino utilizado para designar un método de electroforesis empleando acrilamida (poliacrilamida) la cual se deja gelificar en un tubo para obtener un soporte cilíndrico en el cual las bandas separadas dan la apariencia de un montón de discos apilados (zonas de proteínas separadas). El método fué descrito por Davis y Ornstein en 1962, desde entonces el método ha recibido gran atención, debido a su gran poder de resolución, solo superable por el isoelectroenfoque. La separación de las proteínas plasmáticas se lleva a cabo por medio de corriente eléctrica, por lo regular la proteína migra de el cátodo (-) al ánodo (+), trabajando a pH alcalino superior a ocho. El método es capaz de resolver menos de 0.1 mg de suero (1 microlitro) en 15 a 25 bandas en un tiempo aproximado de 20 minutos. Este poder de resolución tan excepcional se debe aparentemente al "efecto tamizante" a nivel molecular (21).

a) Material de laboratorio.

1.- 12 tubos de 6 mm de diámetro interio y 10 mm de largo.

2.- 12 tapones para los tubos.

3.- 12 tapones horadados para la camara de electroforesis.

4.- Pipetas semiautomáticas de 5, 10 y 20 µl.

5.- Puntas para pipeta semiautomática.

6.- Pipetas pasteur.

7.- Pipetas graduadas de 1, 5, y 10 ml.

8.- Matraces Erlenmeyer.

9.- Matraces aforados.

10.- Tubos de ensaye.

11.- Tubos de plástico desechables.

12.- Tapones desechables para los tubos.

13.- Jeringa de plástico con aguja.

14.- Bisturí.

b) Equipo.

1.- Cámara de electroforesis para tubos.

2.- Gradilla para tubos de electroforesis.

3.- Fuente de poder Gelman Instrument Company 0 - 150 m.a., 0 - 500 v. C.D.

4.- Contador de centelleo de radiaciones gama modelo 578 Pakard automático.

5.- Decolorador Spectra Biologicals. 110 - 125 V., 0.75 m.a.

6.- Agitador mecánico Vortex.

7.- Agitador para matraces.

c) Reactivos.

1.- Insulina marcada con ^{125}I.

2.- Acrilamida.

3.- Bisacrilamida.

4.- Persulfato de amonio.

5.- Tris (hidroximetil aminometano).

6.- Acido clorhídrico IN.

7.- Temed (tetrametiletilendiamina).

8.- Acido fosfórico IM.

9.- Glicina.

10.- Sacarosa.

11.- Acido acético 7%.

12.- Silicon.

d) Preparación de soluciones.

A.- Disolver 30g de acrilamida y 0.8g de bisacrilamida en agua destilada y desionizada. Aforar a 100 ml.

B.- Disolver 18.15g de Tris y 0.24 ml. de Temed en 24 ml. de ácido clorhídrico IN. Llevar a un volumen de 100 ml. con agua destilada y desionizada.

C.- Disolver 0.4g de persulfato de amonio en 100 ml. de agua destilada y desionizada.

D.- Disolver 5.16g de Tris y 3.48g de - glicina. Llevar a un aforo de 1000- ml. con agua destilada y desionizada. pH 9.64.

E.- Disolver 14.5g de Tris en 60 ml. de ácido clorhídrico IN. Llevar a 1000 ml. con agua destilada y desionizada. pH 8.84.

F.- Solución de ácido acético 7%.

G.- Solución de negro de amido 2%.

Procedimiento.

1.- Preparación de los geles de poliacrilamida.

1.1) Mezclar una parte de la solución A con una parte de la solución B y dos partes de la solución C.

1.2) La mezcla anterior debe prepararse y - usarse inmediatamente, ya que hay una rápida gelificación.

1.3) Colocar los tubos limpios y siliconizados en la gradilla especial, los cuales deberan de quedar nivelados verticalmente, de lo contrario habra un mal corrimiento de las proteínas, así mismo deberan encontrarse tapados en el extremo inferior.

1.4) Con la mezcla preparada anteriormente- llenar las tres cuartas partes del tubo y estratificar con agua destilada y desionizada. Dejar gelificar.

1.5) Una vez gelificados, quitarles los ta-

pones a los tubos y colocarlos en la cámara de - - electroforesis.

1.6) Colocar la solución D en la parte superior de la cámara y la solución E en la parte inferior de la cámara.

2.- Preparación y aplicación de la muestra.

2.1) Colocar en tubos de 13 X 100 5 microlitros de muestra y adicionar 5 microlitros de insulina marcada con ^{125}I. Incubar durante 22 - 24 - horas a 4°C.

2.2) Terminada la incubación añadir unos - cristales de azul de bromo fenol. Agitar.

2.3) Añadir varios cristales de sacarosa y- agitar.

2.4) Aplicar 5 microlitros de la muestra sobre la superficie del gel con la ayuda de la pipeta semiautomática.

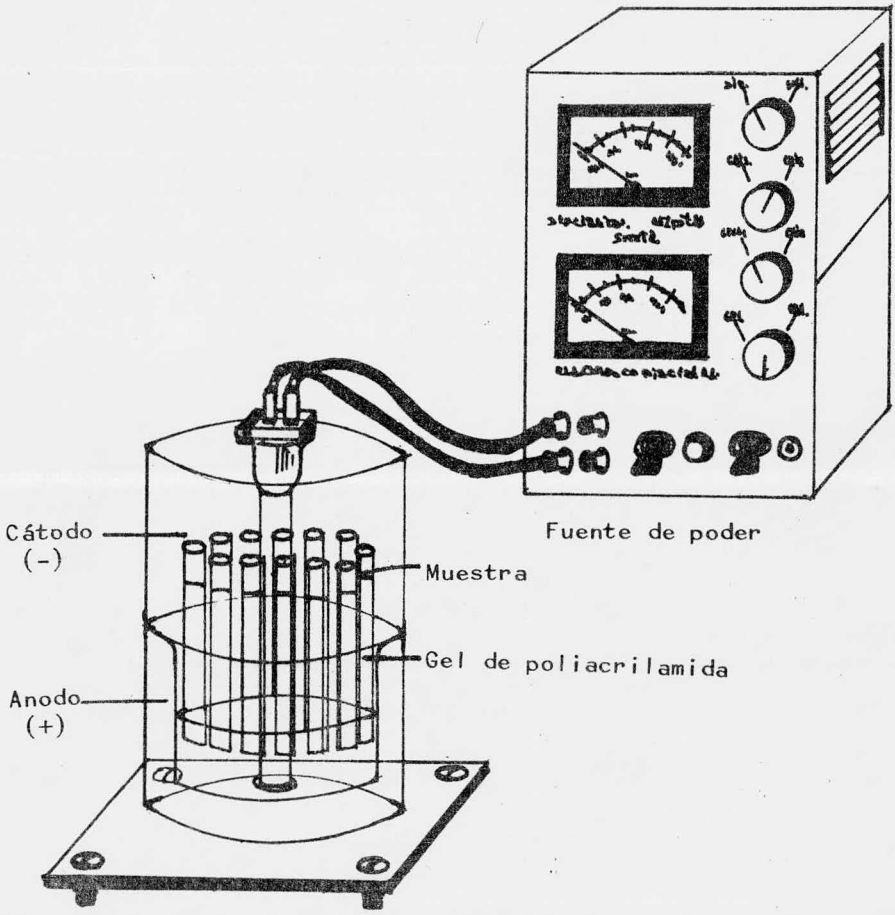
3.- Corrimiento electroforético.

3.1) Conectar la cámara a la fuente de po-- der, ajustar el amperaje (2.5 m.a. por cada gel).

3.2) La figura 3 muestra el montaje del aparato lista para llevar a cabo el corrimiento electroforético.

3.3) Dejar que se lleve a cabo el corrimiento electroforético hasta que el colorante trazador (azul de bromo feno) salga del gel.

Figura 3. Esquema del montaje del aparato para llevar a cabo el corrimiento electroforético.



4.- Análisis de los geles.

4.1) Al concluir la electroforesis, sacar los geles de los tubos con ayuda de una jeringa llena de agua a la cual se le coloca una aguja y esta se mete entre el gel y la pared del tubo, haciendolo girar para que se despegue.

4.2) Procesar los geles de manera diferente: revelar unos con colorante negro de amido al 2% y lavar el exceso con solución de ácido acético al 7%, cambiando periódicamente la solución. En otros se efectúan cortes, cada uno se coloca en un tubo de ensayo que se lleva al contador de radiaciones gama.

5.- Cuantificación de la radioactividad.

5.1) Colocar el gel no teñido paralelamente al gel revelado.

5.2) Hacer cortes de las bandas con ayuda de un bisturí.

5.3) Colocar cada banda (fragmento) en tubos de plástico desechables. Taparlos.

5.4) Llevar los tubos al contador de centelleo de radiaciones gama para cuantear la radioactividad de cada banda (fragmento).

B.- INMUNODIFUSION RADIAL.

Fundamento.- El anticuerpo se incorpora, en concentración uniforme, (a un gel de agar al 2ó - 3%), puesto en capa de espesor uniforme (1 ó 2 milímetros) sobre una placa de vidrio o de plástico-transparente. Se ponen cantidades exactamente medidas de antígeno en pozos (de 1 ó 2 milímetros de - diámetro) que se cortan en el agar gelificado, y - se espera la difusión. Se forma un anillo de precipitación en el agar alrededor del antígeno. La - - exactitud del método es del orden del 5%. Permite-reconocer cantidades de 0.3 microgramos de antígeno por mililitro (Mancini y col. 1963), o 5mg de - inmunoglobulina por 100 mililitros (Steihm y Fun--denberg, 1966). Las placas pueden emplearse tam- - bién para reacciones cualitativas de identidad.

a) Material de laboratorio.

1.- Pipetas semiautomáticas de 5 y 10 - ml.

2.- Puntas para pipeta semiautomática.

3.- Pipetas graduadas de 5 y 10 ml.

4.- Tubos de ensaye de 13 X 100.

5.- Tubos de plástico desechables.

6.- Tapones desechables para los tubos.

7.- Vaso de precipitado de 500 ml.

8.- Probeta graduada de 100 ml.

9.- Bisturí.

b) Equipo.

1.- Contador de centelleo de radiaciones gama modelo 578 Pakard automático.

2.- Decolorador Spectra Biologicals. 110 - 125 V., 0.75 m.a.

3.- Agitador y barra magnética.

4.- Agitador mecánico Vortex.

c) Reactivos.

1.- Insulina marcada con ^{125}I.

2.- Placas comerciales para inmunodifusión radial Tri-Partigen para IgG e IgM.

3.- Cloruro de sodio 0.85%.

Procedimiento.

1.- Preparación de la muestra.

a) Poner 5 microlitros de muestra (estándar o problema) en tubos debidamente etiquetados.

b) Ponerle a cada tubo 5 microlitros de insulina marcada con ^{125}I.

c) Mezclar e incubar durante 22 - 24 horas a 4°C.

2.- Composición de las placas.

Las placas usadas para este fín son comerciales y se trata de placas para inmunodifusió

Tri-Partigen, las cuales contienen una preparación de gel de agar en el cual se ha incorporado el suero anti-inmunoglobulina específico para las cadenas H. El antisuero se obtiene por inmunización de conejos, cabras, cerdos, caballos y otros animales. El agente conservador es la azida de sodio.

3.- Preparación de las placas.

a) Cortar el envoltorio de aluminio, sacar la caja de plástico, abrirla y dejar al aire durante 5 minutos para permitir la evaporación del agua de condensación que puede haberse acumulado.

b) Para determinar IgM se emplea suero sin diluir, sólo en el caso de determinar IgG, se debe diluir el suero a examinar y el suero estándar 1:10 con solución fisiológica.

c) Los pozos 1, 2 y 3 se llenan cada uno con 5 microlitros respecitvamente de inmunoglobulina de dilución estándar en el caso de la IgG, en el caso de la IgM no se diluye (estándar I, II y III), previamente incubados con insulina marcada con ^{125}I.

d) Los pozos 4 a 12 se llenan cada uno con 5 microlitros del suero a estudiar previamente tratado con insulina radioactiva.

e) Cerrar bien la placa y dejar a temperatura ambiente en medio humedo.

f) La evaluación puede ser hecha luego de un tiempo de difusión mínimo de 50 horas para IgG y de 80 horas para IgM.

g) Al finalizar el tiempo de difusión indi-

cado se miden los diámetros de los anillos de precipitación.

4.- Evaluación de las concentraciones de inmunoglobulinas.

a) La evaluación se realiza de la siguiente manera: Los diámetros al cuadrado de los anillos de precipitación obtenidos con las diluciones de los estándares I, II y III, se grafican a través de sus respectivas concentraciones sobre papel milimétrico. Se obtiene una línea recta que debe interceptar la ordenada entre 8.5 y 13.5 mm^2. Los valores para los sueros de los pacientes se determinan por referencia a esta curva por extrapolación.

5.- Medición de la radioactividad.

a) Colocar las placas en un vaso de precipitado de 500 ml. y adicionar 150 ml. de cloruro de sodio 0.85%, para lavar el exceso de radioactividad que no haya sido fijada en el gel. Colocar en el refrigerador toda la noche.

b) Al día siguiente tomar una alícuota de 1 ml. y depositarla en tubos de plástico desechables para cuantear la radioactividad desprendida, el resto del cloruro de sodio se desecha.

c) Agregar 200 ml. de cloruro de sodio 0.85% para hacer un segundo lavado, ahora a temperatura ambiente y con agitación durante tres horas y media. Terminado este tiempo tomar una alícuota de 1 ml. y contar la radioactividad desprendida de las placas, el resto de la solución se desecha.

d) Lavar nuevamente las placas con 200 ml.- de cloruro de sodio 0.85% con agitación y a temperatura ambiente durante dos horas y media. Tomar - una alícuota y medir la radioactividad. Como ya no se detecta radioactividad, se da por terminado el- lavado de las placas.

e) Sacar las placas del vaso de precipitado y con ayuda del bisturí cortar los anillos de precipitación. Colocar cada uno en los tubos de plástico desechables, taparlos y llevarlos al contador de centelleo de radiaciones gama.

R E S U L T A D O S

A.- ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA.

Terminado el desarrollo electroforético y revelados los geles, se pudo observar la separación de las proteínas plasmáticas en forma de bandas como se muestra en la fotografía (figura 4). En los geles no teñidos se llevo a cabo el corte de las bandas para obtener los fragmentos, los cuales fueron llevados al contador de centelleo de radiaciones gama para obtener la radioactividad de cada uno de ellos. Se logro obtener 8 fragmentos de cada gel, en los cuales la mayor cantidad de radioactividad se localizo en el fragmento 1 que pertenece a la banda de las gamaglobulinas y el fragmento 7 que es la banda de la albúmina. Para obtener la movilidad electroforética de la insulina libre, se aplico a un gel solo insulina marcada con ^{125}I (radioactividad total), y se encontro que terminado el corrimiento electroforético la mayor cantidad de radioactividad estuvo en el fragmento 6.- La radioactividad de cada fragmento fué reportada en microcuries.

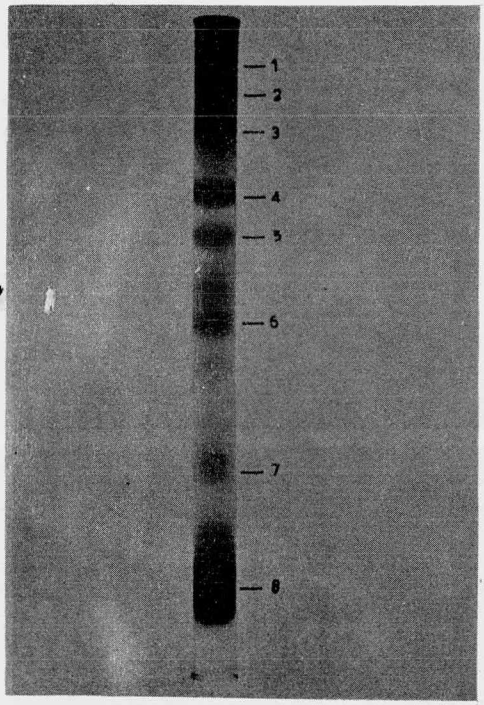


Figura 4. Fotografía de un gel de poliacrilamida mostrando la separación de las bandas de proteína al terminar el corrimiento electroforético.

Resultados obtenidos al fragmentar el gel y medir la radioactividad de cada fragmento.

Paciente No. 1	
Fragmento	Microcuries
1	→ 3324.3×10^{-6}
2	1299.1×10^{-6}
3	378.4×10^{-6}
4	304.5×10^{-6}
5	409.0×10^{-6}
6	466.6×10^{-6}
7	6630.6×10^{-6}
8	356.7×10^{-6}

Paciente No. 2	
Fragmento	Microcuries
1	→ 4526.1×10^{-6}
2	592.8×10^{-6}
3	315.3×10^{-6}
4	418.0×10^{-6}
5	1160.4×10^{-6}
6	1157.6×10^{-6}
7	10735.1×10^{-6}
8	405.4×10^{-6}

Paciente No. 3	
Fragmento	Microcuries
1	→ 5753.1×10^{-6}
2	418.0×10^{-6}
3	347.7×10^{-6}
4	239.6×10^{-6}
5	607.2×10^{-6}
6	791.0×10^{-6}
7	1632.4×10^{-6}
8	9055.8×10^{-6}

Paciente No. 4	
Fragmento	Microcuries
1	→ 1236.0×10^{-6}
2	181.9×10^{-6}
3	185.6×10^{-6}
4	171.2×10^{-6}
5	185.6×10^{-6}
6	223.4×10^{-6}
7	517.1×10^{-6}
8	129.7×10^{-6}

Paciente No. 5	
Fragmento	Microcuries
1	→ 1073.9×10^{-6}
2	91.9×10^{-6}
3	106.3×10^{-6}
4	111.7×10^{-6}
5	133.3×10^{-6}
6	118.9×10^{-6}
7	214.4×10^{-6}
8	117.1×10^{-6}

Paciente No. 6	
Fragmento	Microcuries
1	→ 2136.9×10^{-6}
2	502.7×10^{-6}
3	151.3×10^{-6}
4	140.5×10^{-6}
5	155.0×10^{-6}
6	178.4×10^{-6}
7	677.5×10^{-6}
8	156.7×10^{-6}

Paciente No. 7	
Fragmento	Microcuries
1	→ 1738.3×10^{-6}
2	378.4×10^{-6}
3	156.7×10^{-6}
4	122.5×10^{-6}
5	167.6×10^{-6}
6	286.5×10^{-6}
7	751.3×10^{-6}
8	164.0×10^{-6}

Paciente No. 8	
Fragmento	Microcuries
1	→ 2931.5×10^{-6}
2	904.5×10^{-6}
3	311.7×10^{-6}
4	205.4×10^{-6}
5	360.4×10^{-6}
6	924.3×10^{-6}
7	2173.0×10^{-6}
8	7691.9×10^{-6}

Paciente No. 9	
Fragmento	Microcuries
1	→ 6315.3×10^{-6}
2	1046.8×10^{-6}
3	333.3×10^{-6}
4	697.3×10^{-6}
5	506.3×10^{-6}
6	338.7×10^{-6}
7	1504.5×10^{-6}
8	1944.1×10^{-6}

Paciente No. 10	
Fragmento	Microcuries
1	→ 1481.1×10^{-6}
2	711.7×10^{-6}
3	218.0×10^{-6}
4	275.7×10^{-6}
5	183.8×10^{-6}
6	252.2×10^{-6}
7	700.1×10^{-6}
8	155.0×10^{-6}

Paciente No. 11	
Fragmento	Microcuries
1	→ 854.0×10^{-6}
2	109.9×10^{-6}
3	268.4×10^{-6}
4	218.0×10^{-6}
5	192.8×10^{-6}
6	870.3×10^{-6}
7	295.5×10^{-6}
8	82.9×10^{-6}

Paciente No. 12	
Fragmento	Microcuries
1	→ 1069.0×10^{-6}
2	237.8×10^{-6}
3	135.5×10^{-6}
4	108.1×10^{-6}
5	165.8×10^{-6}
6	135.1×10^{-6}
7	335.1×10^{-6}
8	113.5×10^{-6}

Paciente No. 13	
Fragmento	Microcuries
1	→ 962.2×10^{-6}
2	291.9×10^{-6}
3	174.7×10^{-6}
4	155.0×10^{-6}
5	198.2×10^{-6}
6	333.3×10^{-6}
7	1409.0×10^{-6}
8	169.4×10^{-6}

Paciente No. 14	
Fragmento	Microcuries
1	→ 1223.4×10^{-6}
2	225.2×10^{-6}
3	119.0×10^{-6}
4	108.1×10^{-6}
5	115.3×10^{-6}
6	153.1×10^{-6}
7	302.7×10^{-6}
8	120.7×10^{-6}

Paciente No. 15	
Fragmento	Microcuries
1	→ 5245.0×10^{-6}
2	1003.6×10^{-6}
3	410.8×10^{-6}
4	421.6×10^{-6}
5	580.1×10^{-6}
6	1418.0×10^{-6}
7	5093.7×10^{-6}
8	228.8×10^{-6}

Paciente No. 16	
Fragmento	Microcuries
1	→ 2119.0×10^{-6}
2	164.0×10^{-6}
3	144.1×10^{-6}
4	156.7×10^{-6}
5	172.9×10^{-6}
6	346.0×10^{-6}
7	553.1×10^{-6}
8	104.5×10^{-6}

Paciente No. 17	
Fragmento	Microcuries
1	→ 1830.6×10^{-6}
2	124.3×10^{-6}
3	117.1×10^{-6}
4	126.1×10^{-6}
5	129.7×10^{-6}
6	128.0×10^{-6}
7	632.4×10^{-6}
8	169.3×10^{-6}

Paciente No. 18	
Fragmento	Microcuries
1	→ 677.5×10^{-6}
2	908.0×10^{-6}
3	158.5×10^{-6}
4	129.7×10^{-6}
5	133.3×10^{-6}
6	144.1×10^{-6}
7	227.0×10^{-6}
8	176.5×10^{-6}

Paciente No. 19	
Fragmento	Microcuries
1	→ 2313.5×10^{-6}
2	416.2×10^{-6}
3	232.4×10^{-6}
4	163.9×10^{-6}
5	257.6×10^{-6}
6	446.8×10^{-6}
7	832.4×10^{-6}
8	9639.6×10^{-6}

Paciente No. 20	
Fragmento	Microcuries
1	→ 859.5×10^{-6}
2	128.0×10^{-6}
3	151.3×10^{-6}
4	160.4×10^{-6}
5	176.6×10^{-6}
6	144.4×10^{-6}
7	419.8×10^{-6}
8	151.3×10^{-6}

Paciente No. 21	
Fragmento	Microcuries
1	→ 996.4×10^{-6}
2	301.0×10^{-6}
3	369.4×10^{-6}
4	234.2×10^{-6}
5	263.1×10^{-6}
6	569.4×10^{-6}
7	7973.0×10^{-6}
8	286.5×10^{-6}

Paciente No. 22	
Fragmento	Microcuries
1	→ 1592.8×10^{-6}
2	135.1×10^{-6}
3	129.7×10^{-6}
4	131.5×10^{-6}
5	178.4×10^{-6}
6	174.7×10^{-6}
7	380.2×10^{-6}
8	117.1×10^{-6}

Paciente No. 23	
Fragmento	Microcuries
1	→ 1030.6×10^{-6}
2	183.8×10^{-6}
3	111.7×10^{-6}
4	109.9×10^{-6}
5	153.1×10^{-6}
6	194.6×10^{-6}
7	639.6×10^{-6}
8	133.3×10^{-6}

Paciente No. 24	
Fragmento	Microcuries
1	→ 1293.7×10^{-6}
2	218.0×10^{-6}
3	162.1×10^{-6}
4	131.5×10^{-6}
5	165.7×10^{-6}
6	190.0×10^{-6}
7	1425.2×10^{-6}
8	169.3×10^{-6}

Paciente No. 25	
Fragmento	Microcuries
1	1129.7×10^{-6}
2	1219.8×10^{-6}
3	427.0×10^{-6}
4	266.6×10^{-6}
5	382.0×10^{-6}
6	439.6×10^{-6}
7	6021.6×10^{-6}
8	1120.7×10^{-6}

Paciente No. 26	
Fragmento	Microcuries
1	1009.0×10^{-6}
2	407.2×10^{-6}
3	277.5×10^{-6}
4	169.4×10^{-6}
5	189.2×10^{-6}
6	277.5×10^{-6}
7	1194.6×10^{-6}
8	108.1×10^{-6}

Paciente No. 27	
Fragmento	Microcuries
1	363.9×10^{-6}
2	362.2×10^{-6}
3	174.7×10^{-6}
4	122.5×10^{-6}
5	140.5×10^{-6}
6	194.6×10^{-6}
7	416.2×10^{-6}
8	156.7×10^{-6}

Paciente No. 28	
Fragmento	Microcuries
1	61.3×10^{-6}
2	57.6×10^{-6}
3	109.9×10^{-6}
4	102.7×10^{-6}
5	59.5×10^{-6}
6	109.9×10^{-6}
7	55.8×10^{-6}
8	5.4×10^{-6}

Paciente No. 29	
Fragmento	Microcuries
1	764.0×10^{-6}
2	1922.5×10^{-6}
3	845.0×10^{-6}
4	245.0×10^{-6}
5	360.4×10^{-6}
6	749.5×10^{-6}
7	4834.2×10^{-6}
8	455.8×10^{-6}

Paciente No. 30	
Fragmento	Microcuries
1	214.4×10^{-6}
2	203.6×10^{-6}
3	117.1×10^{-6}
4	135.1×10^{-6}
5	122.5×10^{-6}
6	149.5×10^{-6}
7	441.4×10^{-6}
8	138.7×10^{-6}

Paciente No. 31	
Fragmento	Microcuries
1	726.1×10^{-6}
2	221.6×10^{-6}
3	160.4×10^{-6}
4	115.3×10^{-6}
5	144.1×10^{-6}
6	174.8×10^{-6}
7	250.4×10^{-6}
8	582.0×10^{-6}

Paciente No. 32	
Fragmento	Microcuries
1	387.4×10^{-6}
2	275.7×10^{-6}
3	122.5×10^{-6}
4	140.5×10^{-6}
5	164.0×10^{-6}
6	210.8×10^{-6}
7	569.4×10^{-6}
8	165.7×10^{-6}

Paciente No. 33	
Fragmento	Microcuries
1	448.6×10^{-6}
2	245.0×10^{-6}
3	146.0×10^{-6}
4	106.3×10^{-6}
5	128.0×10^{-6}
6	277.5×10^{-6}
7	1227.0×10^{-6}
8	108.1×10^{-6}

Radioactividad total	
Fragmento	Microcuries
1	147.7×10^{-6}
2	108.1×10^{-6}
3	147.7×10^{-6}
4	120.7×10^{-6}
5	155.0×10^{-6}
6	192.8×10^{-6}
7	115.3×10^{-6}
8	108.1×10^{-6}

Valores obtenidos del fragmento 1, que es el que corresponde a la banda de las gamaglobulinas. La radioactividad esta dada en microcuries.

Paciente	Microcuries	Paciente	Microcuries
1	3324.3×10^{-6}	17	1830.6×10^{-6}
2	4526.1×10^{-6}	18	677.5×10^{-6}
3	5753.1×10^{-6}	19	2313.5×10^{-6}
4	1236.0×10^{-6}	20	859.5×10^{-6}
5	1073.9×10^{-6}	21	996.4×10^{-6}
6	2136.9×10^{-6}	22	1592.8×10^{-6}
7	1738.3×10^{-6}	23	1030.6×10^{-6}
8	2931.5×10^{-6}	24	1293.7×10^{-6}
9	6315.3×10^{-6}	25	1129.7×10^{-6}
10	1481.1×10^{-6}	26	1009.0×10^{-6}
11	854.0×10^{-6}	27	363.9×10^{-6}
12	1609.0×10^{-6}	28	61.3×10^{-6}
13	962.2×10^{-6}	29	764.0×10^{-6}
14	1223.4×10^{-6}	30	214.4×10^{-6}
15	5245.0×10^{-6}	31	726.1×10^{-6}
16	2119.0×10^{-6}	32	387.4×10^{-6}

$\overline{X} = 2016.0 \times 10^{-6}$ y valores comprendidos entre 61.3×10^{-6} a 6315.3×10^{-6}, que representan la más baja y la más alta radioactividad.

B.- INMUNODIFUSION RADIAL.

1.- Placas de IgG.

1.1) Medición de la concentración de IgG.

Concluido el período de incubación para las placas, se procedio a medir los diámetros de los - anillos de precipitación de los estándares y graficar los valores en las ordenadas, las concentraciones de cada estándar se grafico en las abcisas, obteniendose la curva de calibración la cual al ex-- trapolar los valores de los diámetros de los ani-- llos de precipitación de los sueros problema se obtuvo la concentración de cada uno de ellos. Los resultados obtenidos muestran concentraciones elevadas en algunos pacientes, pero esto puede deberse- a otro tipo de padecimiento y no al de resistencia a la insulina, las otras concentraciones son normales.

Estándar	Diámetro mm^2	Concentración
I	23.00	49.0 mg/100ml
II	37.20	101.0 "
III	53.30	195.0 "
Paciente		
1	50.40	174.0 "
2	36.00	107.0 "
3	51.85	196.0 "
4	32.50	89.0 "
5	44.90	148.0 "

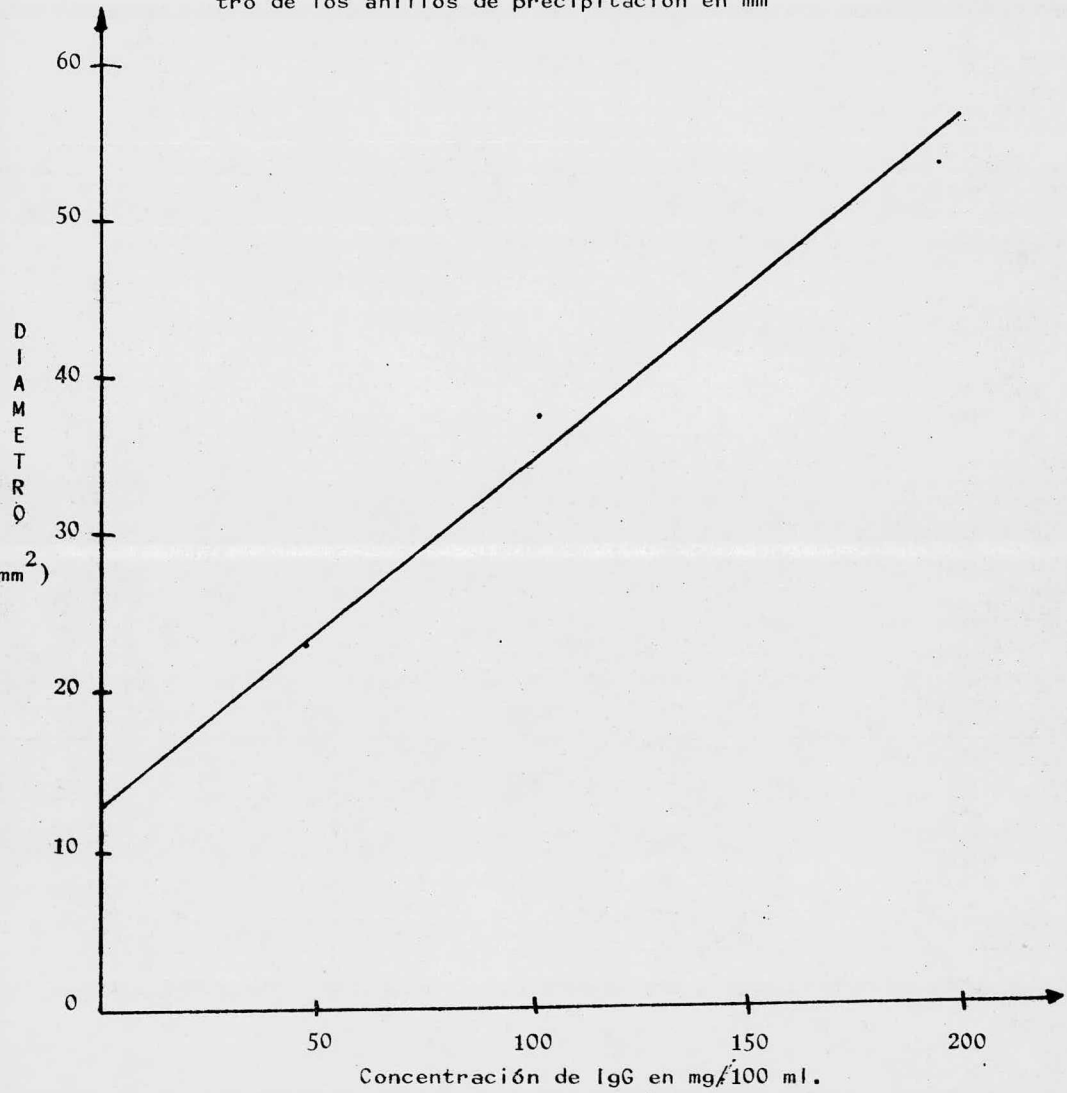
Paciente	Diámetro mm^2	Concentración
6	37.20	112.0 mg/100ml
7	33.65	96.0 "
8	30.25	90.0 "
9	42.25	136.0 "
10	31.25	85.0 "
11	44.90	148.0 "
12	42.25	136.0 "
13	33.65	96.0 "
14	62.40	+200.0 "
15	60.85	+200.0 "
16	49.00	172.0 "
17	82.80	+200.0 "
18	40.95	130.0 "
19	33.65	96.0 "
20	38.45	118.0 "
21	36.00	107.0 "

Valores de referencia: 60 a 150 mg/100ml

G R A F I C A 1.

CURVA ESTANDAR

Concentración de IgG en mg/100ml contra diáme-- tro de los anillos de precipitación en mm^2



1.2) Medición de la radioactividad.

a) Lavado de las placas.

Para eliminar el exceso de radioactividad que no fué fijada al gel, se llevaron a cabo una serie de lavados en los cuales se tomaron alícuotas de 1 ml. y se cuanteo la radioactividad presente en un contador de centelleo de radiaciones gama. Los resultados mostraron que en le primer lavado fué eliminada la radioactividad libre que no se fijo al gel, pues al tomar alícuotas del segundo y tercer lavado y cuantear la radioactividad esta ya no fué detectable, lo que indico que ya no existe radioactividad libre en la placa. La radioactividad fué mediada en microcuries.

Lavado	Microcuries
1	31351.3×10^{-6}
2	No detectable
3	No detectable

b) Medición de la radioactividad de las muestras.

Al llevar a cabo los cortes de los anillos de precipitación y cuantear la radioactividad, se observo que la mayoría de las muestras retuvo la radioactividad, lo que indico que la IgG acarrea a los anticuerpos anti-insulina, pues estos fijan la insulina marcada con ^{125}I y este complejo antígeno-anticuerpo al reaccionar con la antiglobulina fué fijado al gel, por esta razón es que existe radioactividad en las muestras de los pacientes. Los estándares que son sueros normales no mostraron ra

dioactividad, pues estos sueros no tienen anticuerpos anti-insulina.

Estándar	Microcuries
I	No detectable
II	No detectable
III	No detectable
Paciente	
1	592.8×10^{-6}
2	513.5×10^{-6}
3	1284.7×10^{-6}
4	947.7×10^{-6}
5	3690.1×10^{-6}
6	864.9×10^{-6}
7	1196.1×10^{-6}
8	2167.6×10^{-6}
9	481.1×10^{-6}
10	No detectable
11	No detectable
12	No detectable
13	185.2×10^{-6}
14	No detectable
15	1048.6×10^{-6}
16	2661.3×10^{-6}

Paciente	Microcuries
17	636.0×10^{-6}
18	No detectable
19	No detectable
20	No detectable
21	No detectable

$\bar{X} = 1182.6 \times 10^{-6}$, y valores comprendidos - entre 185.2×10^{-6} a 2661.3×10^{-6}, que represen-- tan la más baja y la más alta radioactividad.

2.- Placas de IgM.

2.1) Medición de la concentración de IgM.

El trazo de la curva estándar y la obten- - ción de las concentraciones de los sueros problema se obtuvo de la misma manera que para IgG. En es-- tos resultados también se observaron concentraciones altas de la inmunoglobulina, pero puede deberse a la misma razón que ya digimos para IgG, o sea que puede deberse a otro tipo de padecimiento y no a la presencia de anticuerpos anti-insulina.

Estándar	Diámetro mm^2	Concentración
I	21.15	62.0 mg/100ml
II	28.10	142.0 "
III	38.45	285.0 "
Paciente		
1	27.07	136.0 "
2	28.10	148.0 "
3	28.10	148.0 "
4	25.00	112.0 "
5	26.00	124.0 "
6	24.00	100.0 "
7	12.95	No demostrable
8	20.25	54.0 mg/100ml
9	22.10	75.0 "
10	34.84	232.0 "

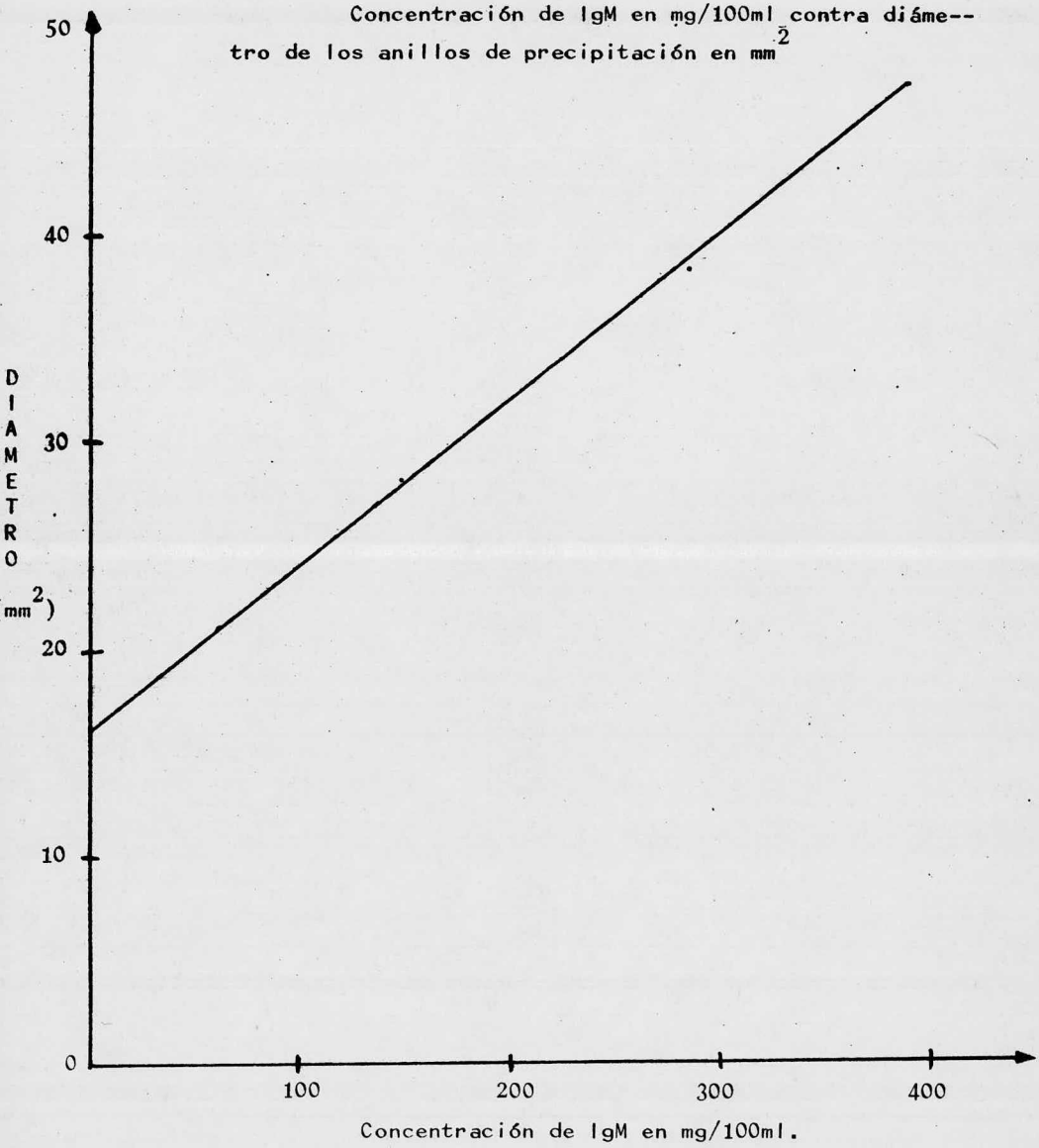
Paciente	Diámetro mm^2	Concentración
11	37.20	262.0 mg/100ml
12	31.35	118.0 "
13	32.50	202.0 "
14	16.00	No demostrable
15	18.50	32.0 mg/100ml
16	32.50	202.0 "
17	38.45	276.0 "
18	28.10	148.0 "
19	40.95	308.0 "
20	27.05	96.0 "
21	21.15	62.0 "

Valores de referencia: 50 - 193 mg/100ml.

G R A F I C A 2.

CURVA ESTANDAR

Concentración de IgM en mg/100ml contra diáme-- tro de los anillos de precipitación en mm^2



2.2) Medición de la radioactividad.

a) Lavado de las placas.

Para eliminar la radioactividad no fijada al gel de las placas se realizo una serie de lavados, los resultados mostraron que al tomar alícuotas en el primero y segundo lavado y contar la radioactividad todavia estuvo presente esta, sin embargo en el tercer lavado ya no se detecto radioactividad al tomar la alícuota y contarla en el contador de centelleo de radiaciones gama, este resultado indica que la placa ya no tiene radioactividad libre. La radioactividad fué medida en microcuries.

Lavado	Microcuries
1	63454.5×10^{-6}
2	3423.4×10^{-6}
3	No detectable

b) Medición de la radioactividad de las muestras.

Eliminada la radioactividad no fijada al gel se siguio el mismo procedimiento que se usó para las placas de IgG, los resultados obtenidos para esta inmunoglobulina mostraron que no es la portadora de los anticuerpos anti-insulina, al no detectarse radioactividad después del conteo en el contador de centelleo de radiaciones gama.

Valores obtenidos de radioactivdad para la placa de IgM.

Estándar	Microcuries
I	No demostrable
II	" "
III	" "
Paciente	
1	" "
2	" "
3	" "
4	" "
5	" "
6	" "
7	" "
8	" "
9	" "
10	" "
11	" "
12	" "
13	" "
14	" "
15	" "
16	" "
17	" "
18	" "

Paciente	Microcuries
19	No demostrable
20	" "
21	" "

D I S C U S I O N

Según los resultados obtenidos al cuantear la radioactividad después de fragmentar el gel de poliacrilamida terminado el corrimiento electroforético, se pudo observar que la mayor cantidad de radioactividad se encuentra en el fragmento 1, que corresponde a las gamaglobulinas, coincidiendo este resultado con los reportes dados por Hein Christinsen (18) y los de Sebriakova y Little (19) de que los anticuerpos anti-insulina se encuentran en esta región en la cual encontramos un valor de radioactividad promedio de 2016.0 X 10^{-6} microcuries, otro de los fragmentos que presentó una radioactividad elevada fué el fragmento 7 que pertenece a la región de la albúmina, sin embargo esta radioactividad pudo deberse al corrimiento electroforético de la insulina marcada con ^{125}I, debido a que esta hormona presenta un punto isoeléctrico similar al de la albúmina (insulina P.I. 5.35, albúmina P.I. 4.7 - 4.9) y por lo tanto una migración electroforética similar. Algunos datos no coinciden con lo dicho anteriormente como son los casos 18, 25 y 29, en los que la mayor cantidad de radioactividad se encontró en el segundo fragmento que corresponde a la zona de las beta 2 globulinas, pero esto pudo deberse a varios factores como son: a) la difícil localización de las fracciones debido a que el gel no estuvo teñido, b) los cambios de voltaje que se presentan en el laboratorio los cuales son resentidos en la fuente de poder y consecuentemente en el corrimiento electroforético. Sin embargo los resultados obtenidos indican que es una gamaglobulina la proteína fijadora de la insulina.

En cuanto a la diferenciación de las inmunoglobulinas que transportan a los anticuerpos anti-insulina si éstas son del tipo IgG o IgM se llevó a cabo la técnica de inmunodifusión radial tratando las muestras con insulina marcada con ^{125}I, al terminar la inmunodifusión se hicieron una serie de lavados con cloruro de sodio 0.85% para eliminar la radioactividad no fijada al gel de la placa y que al cuantearla solo fuera la que se unió al gel.

Los resultados obtenidos de la inmunodifusión radial hacen pensar que los anticuerpos anti-insulina son transportados por la IgG, ya que es ésta inmunoglobulina en donde se encuentra radioactividad y dió un valor promedio de 1182.6×10^{-6} microcuries, sin embargo encontramos que en las muestras 10, 11, 12, 19, 20 y 21, no hubo fijación de la radioactividad aún cuando en la electroforesis en gel de poliacrilamida si fué detectable, lo que nos hace pensar que pudo deberse a una desnaturalización de la proteína. En cambio en la placa de IgM la hormona no se unió a esta inmunoglobulina ya que no se detectó radioactividad, por lo que se piensa que esta inmunoglobulina no es la transportadora de los anticuerpos anti-insulina.

CONCLUSION

De acuerdo a lo establecido en el trabajo - de encontrar la fracción proteica que transporta - los anticuerpos anti-insulina utilizando insulina- marcada con ^{125}I y por los resultados obtenidos, - podemos concluir que dicha proteína fijadora de insulina se encuentra en las gamaglobulinas y de éstas la que transporta realmente los anticuerpos anti-insulina es la IgG.

R E S U M E N

Se hizo una revisión breve de la historia de la insulina, su síntesis y secreción, así como de los estados diabéticos y el tratamiento de la diabetes, se menciona también brevemente la formación de anticuerpos anti-insulina y su detección. Es descrito con detalle el método de electroforesis en gel de poliacrilmida usado para la separación e identificación de la proteína acarreadora de los anticuerpos anti-insulina usando para este fin insulina marcada con ^{125}I como trazador, así como la técnica de inmunodifusión radial para caracterizar la inmunoglobulina transportadora de dichos anticuerpos utilizando el mismo trazador.

Se estudiaron 33 sueros de pacientes diabéticos, los cuales habian recibido más de 100 unidades diarias de insulina con título de anticuerpos de 19 a 76% de fijación, en ellos se realizó la electroforesis en gel de poliacrilamida, donde se obtuvieron resultados con un valor promedio de 2016.0 X 10^{-6} microcuries de radioactividad en la fracción correspondiente a las gamaglobulinas. Para la inmunodifusión radial se estudiaron 21 sueros de los 33 anteriores, ya que se escogieron los de fijación mayor de 40% en donde encontramos que la fijación de estos anticuerpos es en la IgG con un valor promedio de 1182.6 X 10^{-6} microcuries de radioactividad.

También se presentan los resultados totales obtenidos por las dos técnicas y una breve discusión sobre los resultados.

B I B L I O G R A F I A

1) Frederick Sanger.
Chemistry of insulin.
Science, 129, 1340 (1959).

2) Erol Cerasi and Suad Efendic.
Dose-response relation between plasma-insulin and blood glucose levels during oral glucose-loads in prediabetic and diabetic subjects.
The Lancet, 14, 794 (1973).

3) Juan A. Rull, W. Conn, John C. Floyd, Stefan-S. Fajans.
Levels of plasma insulin during cortisone glucose tolerance test in "nondiabetic" relati--ves of diabetic patients.
Diabetes, 19, 1 (1970).

4) Chiumello, Del Gercio, Carnelutti y Bidone.
Relationship between obesity, chemical diabetes and beta pancreatic funtion in children.
Diabetes, 18, 238 (1969).

5) Sorin Biomedica.
Insulin radioimmunoassay.
Kit CIS (1977).

6) James W. Anderson and Robert H. Herman.
Treatment of reactive hypoglycemia with sulfonylureas.
The American Journal of the Medical Sciences, 261, 16 (1971).

7) Rosalyn S. Yalow and Solomon A. Berson.
Plasma insulin concentrations in nondiabetic- and early diabetic subjects.
Diabetes, 9, 254 (1960).

8) John H. Karam, Gerold M. Grodsky and Peter H. Forsham.
Insulin-resistant diabetes with autoantibo- - dies induced by exogenous insulin.
Diabetes, 18, 445 (1969).

9) Malvano, Zucchelli, Quesada and Gandolfi.
Insulin radioimmunoassay: a comparison of - - three methods.
J. Nucelar Biology and Medicine, 18, 80 - - (1974).

10) William D. Gennaro and John D. Van Norman.
Quantitation of free, total and antibody-- - bound insulin in insulin-treated diabetics.
Clinical Chemistry, 21, 873 (1975).

11) Medical Diagnostic Products.
^{125}I radioimmunoassay Kit.
ICN Pharmaceuticals.

12) Amersham Corporation.
Radioimmunoassay of insulin in serum or plasma.
RIA Kit, Amersham Corporation.

13) RIA-mat C-peptide
Testkit for the radioimmunological determination of C-peptide (connecting peptide) in human serum.

14) Clarde, J. T.
Simplifeid "disc" (polyacrilamide gel) elec--trophoresis.
Ann N. Y. Acad. Sci. 121, 428 (1964).

15) Giovanna Ferro and Luzzi Ames.
Resolution of bacterial proteins by polyacrilamide gel electrophoresis on slabs.
The J. B. Chemistry, 249, 634 (1973).

16) S. T. Nerenberg.
Electroforesis, manual de practicas de laboratorio.
Edición 1968, Editorial JIMS, Barcelona.

17) Weber y Osborn.
Determinación del peso molecular promedio en-gel de dodecil-sulfato-poliacrilamida por - - electroforesis.
J. B. Chemistry, 244, 4406 (1969).

18) Hein Christinsen.
A new method for determination of insulin-binding immunoglobulins en insulin-treated diabetic patients.
Horm. Metab. Res. 2, 187 (1970)

19) Sebriakova and Little.
A method for the determination of plasma insulin antibodies and its application in normal- and diabetic subjects.
Diabetes, 22, 30 (1973).

20) Harol A. Harper.
Manual de Química Fisiológica.
5a. Ed. 1976. Editorial El Manual Moderno.

21) Lynch, Mellor, Raphael, Spare and Inwood.
Métodos de Laboratorio.
2a. Ed. 1972. Editorial Interamericana.

22) Norbert W. Tietz.
Química Clínica Moderna.
4a. Ed. 1972. Editorial Interamericana.

23) Arthur C. Guyton.
Tratado de Fisiología Médica.
4a. Ed. 1971. Editorial Interamericana.

24) Albert L. Lehninger.
Biochemistry.
4a. Ed. 1974. Ediciones Omega.

25) Eric E. Conn and P.K. Stumpf.
Bioquímica Fundamental.
2a. Ed. 1974. Editorial Limusa.

26) II Curso panamericano para graduados.
Diabetes Mellitus en Medicina General.
México, D.F., 27 al 30 de Noviembre 1972.

27) Chemical and Engineering News.
Abril 28, 1 (1975).

29) Tesis.
Un método para detectar anticuerpos anti-insulina.
México, 1978.

TESIS "CLASICAS"

PASEO DE LAS FACULTADES 32-D
FRACC. COPILCO UNIVERSIDAD
CIUDAD UNIVERSITARIA 20, D. F.