



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

UN METODO PARA DETECTAR ANTICUERPOS
ANTI-INSULINA.

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el título de:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
p r e s e n t a :
MA. VIRGINIA MOULIN RUIZ

México, D. F.

1978



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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
LAS _____
ABR 14-2-3091 798 299
FECHA _____
PREC _____
2 8 _____



JURADO ASIGNADO:

Presidente Q.F.B. MAGDALENA ACOSTA SEGURA.
Vocal Q.F.B. LEONOR MARTINEZ SOTO.
Secretario Q.F.B. DEA CORONADO PERDOMO.
1er. Suplente Q.F.B. ELDA PENICHE QUINTANA.
2do. Suplente Q.F.B. Ma. DOLORES LASTRA
AZPILICUETA.

Sitio donde se desarrolló el tema:

LABORATORIO DE ENDOCRINOLOGIA
HOSPITAL GENERAL CENTRO MEDICO LA RAZA.

Sustentante:

Ma. VIRGINIA MOULIN RUIZ.

Asesor del tema:

Q.F.B. DEA CORONADO PERDOMO.

Mi más sincero agradecimiento
y respeto a todas las personas
que hicieron posible la reali-
zación de este trabajo:

Al H. Jurado.

Q.F.B. MAGDALENA ACOSTA SEGURA.

Q.F.B. LEONOR MARTINEZ SOTO.

Q.F.B. DEA CORONADO PERDOMO

Q.F.B. ELDA PENICHE QUINTANA.

Q.F.B. Ma. DOLORES LASTRA

AZPILICUETA.

Mi sincero agradecimiento y respeto a la Srita. Q.F.B. Dea Coronado Perdomo por su cooperación y ayuda para la realización de este tema de tesis.

Mi más sincero agradecimiento al Servicio de Endocrinología del Centro Médico La Raza por las facilidades otorgadas en el desarrollo de este tema de tesis.

Con agradecimiento y respeto al Dr. Roberto Medina Santillán y a la Srta. Q.F.B. Haydée Fuentes Gallegos sin cuya cooperación y ayuda no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

Con agradecimiento y cariño
a mis padres:

Juan y Abigail.

Con cariño y respeto
a mis hermanos:

Guadalupe
Ma. Teresa
Magdalena
Juan.

Con agradecimiento y cariño
a mis tíos:

Pbro. Alfredo Ruíz Rodríguez.
y Esther Ruíz Rodríguez.

Con todo cariño a

Juan.

Con agradecimiento y respeto
a mis maestros, familiares y
amigos.

INDICE

| | Pág. |
|--|------|
| INTRODUCCION | 2 |
| GENERALIDADES: | |
| Insulina | 4 |
| Biosíntesis de insulina | 7 |
| Secreción de insulina | 9 |
| Transporte de insulina | 12 |
| Receptores insulínicos | 12 |
| Metabolismo | 13 |
| Fisiología | 13 |
| Presentaciones de la insulina comercial para uso terapéutico | 14 |
| Historia de la detección de anticuerpos anti-insulina. | 16 |
| Radioinmunoanálisis | 18 |
| Métodos de separación del complejo Ag-Ac de la hormona libre | 22 |
| MATERIAL Y METODOS: | |
| Muestras biológicas | 26 |
| Metodología | 26 |
| Aparatos y equipo | 27 |
| Reactivos | 29 |

| | Pág. |
|---|--------|
| Análisis Radiométrico | 30 |
| Cálculos | 31 |
| Capacidad de adsorción del carbón dextrán | 32 |
| RESULTADOS: | |
| Valores obtenidos con sustancias patrón para la determi nación del análisis radiométrico de anticuerpos anti-in sulina (tabla No. 1). | 37 |
| Valores obtenidos de sueros de pacientes sanos adultos- que no han sido tratados con insulina. (tabla No. 2)... .. | 38 |
| Valores obtenidos de sueros de pacientes diabéticos que requieren altas dosis de insulina. (tabla No. 3) | 39 |
| Cálculos estadísticos para comparación de los grupos es tudiados | 40 |
| DISCUSION | 43 |
| RESUMEN Y CONCLUSIONES | 46 |
| BIBLIOGRAFIA | 49 |

INTRODUCCION

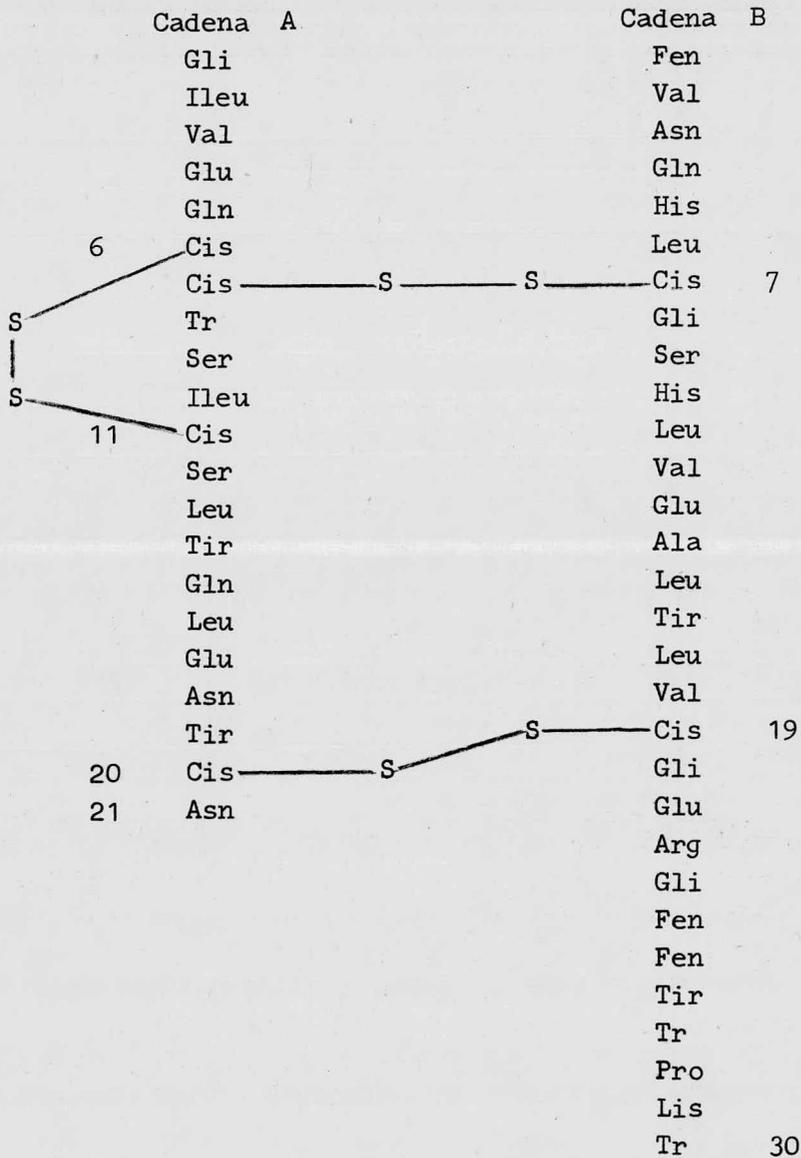
GENERALIDADES

INSULINA

En 1869 Langerhans (16) descubrió en el páncreas formaciones celulares en islote y en 1890 Von Mering y Minkowsky (16) demostraron su función endócrina al provocar la diabe--tes mellitus en un perro al cual extrajeron el páncreas. En 1921 Banting, Best y Macleod (16) prepararon un extracto pan--creático que al administrarlo por vía parenteral a perros --pancreatectomizados causaban la desaparición de los síntomas de diabetes, observándose un descenso en los niveles de glu--cosa sanguínea. Collip, trabajando con Banting logró la con--centración del principio activo, el cual fué llamado insuli--na. En 1926 Abel (16) purificó la insulina, partiendo de un extracto pancreático, la cristalizó como la primera hormona--de naturaleza proteica, cuyo peso molecular es de 5734 dal--tons. Su estructura primaria fué determinada por F. Sanger--y col. (12) en 1955 y su síntesis se realizó en 1966 en el -Laboratorio Nacional de Brookhaven, dirigida por P. G. Katsoyannis (12). La molécula está constituida por dos cadenas -polipeptídicas: la cadena A que posee 21 restos aminoácidos--y la cadena B, que consta de 30. Las dos cadenas se hallan--unidas entre sí por dos puentes disulfuro. En la cadena A -existe un puente disulfuro intracadena que enlaza los amino--ácidos en las posiciones 6 y 11. (fig. 1).

Aunque no se conoce con exactitud el sitio activo de la molécula de insulina, se sabe que sus puentes disulfuro -intactos son esenciales para su actividad biológica. La rup--tura de las uniones disulfuro con álcali o agentes reducto--res inactivan la hormona, la que puede ser reactivada por me--dio de agentes oxidantes suaves. El cambio del ácido aspár--tico 21 en la cadena A causa pérdida completa de la activi--dad. La pérdida del heptapéptido terminal de la cadena B --

Fig. 1.- Estructura de la Insulina Humana



así como la destrucción de las histidinas por fotooxidación--
causan inactivación.

Esta hormona ha sido purificada del páncreas de dife-
rentes especies y preservada en forma cristalina. Su crista-
lización requiere trazas de zinc, que es un constituyente --
normal de la insulina almacenada en el tejido pancreático. -
La estructura secundaria y terciaria de insulina bovina fué-
determinada por cristalografía de rayos X (Adams y col. - --
1969). Este estudio muestra que la cadena A de la molécula -
está más expuesta, incluyendo el enlace disulfuro 6-11 que -
posiblemente envuelve la actividad hormonal. La cadena B es-
tá en la porción interna de la molécula. Se ha descrito la-
insulina en forma de dímeros y probablemente polímeros uni--
dos entre sí por las interacciones características de la es-
trutura cuaternaria.

Existen pequeñas diferencias de especie a especie en
los aminoácidos que componen la molécula de insulina. Smith,
1966, estudió la estructura primaria de varias especies ani-
males.

| Especie | Diferencias en la secuencia de aminoácidos con la insulina humana | | | |
|--|--|-----|-----|-------------------------|
| | Posición en la cadena A | | | Posición en la cadena B |
| | 8 | 9 | 10 | 30 |
| Cerdo, perro, esperma de ballena | Tre | Ser | Ile | Ala |
| Conejo | Tre | Ser | Ile | Ser |
| Ganado bovino | Ala | Ser | Val | Ala |
| cabra | Ala | Gli | Val | Ala |
| Oveja | Tre | Gli | Ile | Ala |
| Caballo | Ala | Ser | Tre | Ala |
| Ballena Sei | Ala | Ser | Tre | Ala |

La insulina juega un importante papel en el metabolismo general, estimulando al de carbohidratos, el almacenamiento de glucógeno, la síntesis de ácidos grasos y la captación de aminoácidos y proteínas. Es una hormona anabólica - que actúa sobre el tejido muscular, adiposo, cardiaco, esquelético y cristalino del ojo. (22).

BIOSINTESIS DE INSULINA.

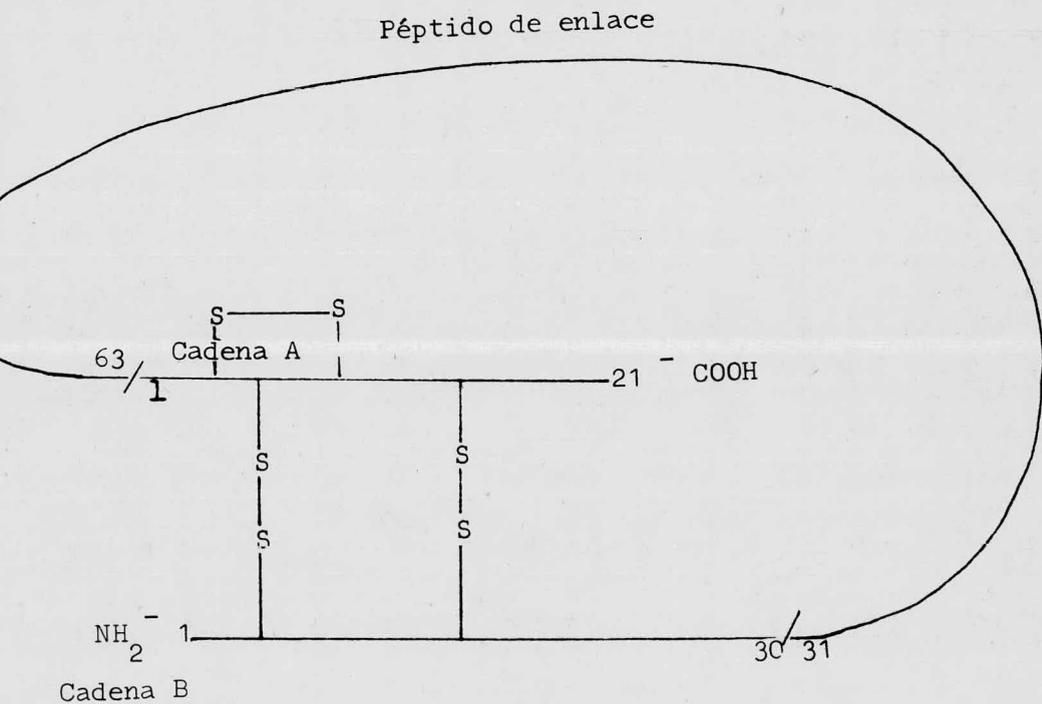
La insulina es sintetizada como una sola cadena en los polirribosomas de las células beta del páncreas, los puentes disulfuro se forman durante este proceso por reducción de la cadena abierta. La molécula resultante denominada proinsulina bajo la acción de enzimas hidrolasas se rompe entre los aminoácidos 30-31 y 63-1, liberándose un péptido llamado péptido C o péptido conectante, que contiene 33 aminoácidos.

La proinsulina ha sido aislada y purificada finalmente por filtración en gel a partir de extractos pancreáticos (Steiner y Cunningham, 1967), (11). La molécula de proinsulina es prácticamente inactiva, pero puede reaccionar en forma cruzada con los anticuerpos preparados contra la insulina. (fig. 2).

Además de la proinsulina de cadena simple, hay un compuesto intermediario de cadena doble, el cual se demostró "in vitro" en extractos de páncreas porcino. Este componente del plasma, de alto peso molecular, está caracterizado en términos de propiedades conocidas de proinsulina. Evidencias recientes indican que en pacientes con ínsulas de células tumorales, el componente circulante de alto peso molecu-

lar puede ser diferenciado de la proinsulina y del componente del plasma de alto peso molecular de sujetos normales. - Este componente circulante puede ser referido como un componente proinsulina semejante o con el término de "insulina -- grande". (1, 9).

Fig. 2.- PROINSULINA PORCINA

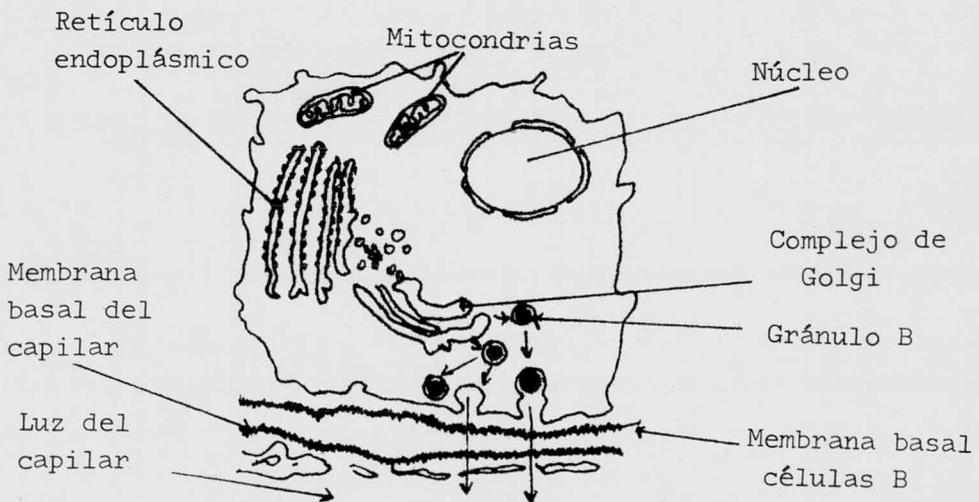


SECRECION DE INSULINA.

El hombre requiere aproximadamente 50 unidades de in su li na por día, que es sólo una quinta parte de la almacenada en los gránulos beta del páncreas. Puesto que hay una reserva para cinco días, es razonable suponer que los factores reguladores necesitan actuar primordialmente sólo sobre los me ca ni s m o s de liberación de la insulina almacenada y no ne ce s a r i a m e n t e sobre la in s u l i n o g e n e s i s i s. El proceso se c r e t o r e d e s p u e s de la estimulación por glucosa o tolbutamida ha sido -- captado por microscopía electrónica. (Lacy, 1964). (11).

Durante la secreción, los gránulos se mueven hacia la membrana plasmática de la célula, donde la membrana su pe r f i c i a l del gránulo se funde con la membrana celular. Las me m b r a n a s fundidas se rompen luego y el contenido granular se libera en el espacio pericapilar por exocitosis. Posteriormente la insulina debe cruzar las membranas basales de las células beta y de un capilar vecino, así como el endotelio fenestrado del capilar para llegar al torrente circulatorio. (8).

Fig. 3.- Secreción de Insulina



Las hormonas; gastrina, secretina, pancreozimina y el glucagon, provocan liberación de insulina. "In vivo" el glucagon puede actuar primariamente en el páncreas para aumentar el AMPcíclico, el cual a su vez facilita la producción de los intermediarios de los carbohidratos que estimulan la secreción de insulina (Malaidde y col., 1967). (11).

La secreción de insulina es estimulada por agentes que aumentan la acción beta adrenérgica y es inhibida por los que estimulan los sistemas alfa adrenérgicos. La epinefrina es un estimulador tanto beta como alfa adrenérgico. La estimulación alfa en los islotes es responsable de un efecto inhibitorio. Cuando la acción alfa adrenérgica es bloqueada con fentolamina, la acción estimulante beta persiste (Porte y col., 1966).

Independientemente de la concentración de glucosa sanguínea, en stress extremo, no solo provee glucosa a la circulación por glucogenólisis, sino preferentemente la reserva para que la utilice el encéfalo puesto que deprime la secreción de insulina. Al mismo tiempo provee de ácidos grasos movilizados del tejido adiposo para proporcionar el combustible principal al músculo en ejercicio.

La secreción de insulina está controlada por otras cationes (Grodsky y col., 1966). "In vitro", el calcio es un requisito absoluto para la secreción de insulina independientemente de la concentración de glucosa, el magnesio es inhibidor de la secreción de insulina. La secreción de insulina se incrementa siguiendo la estimulación del vago, la acetilcolina es un potente agente insulínico, transmisor colinérgico por interacción con la membrana plasmática de células responsables de incrementar la permeabilidad de cationes como son sodio y calcio. Un gran número de secretores de in

ulina requieren calcio extracelular y el movimiento de calcio dentro de las células beta estimula el mecanismo secretor. Cuando el movimiento de calcio dentro de las células es inhibido, la secreción de insulina también es inhibida. - (10).

Medicamentos hipoglucemiantes útiles para el control de la diabetes como las sulfonilureas, tolbutamida, clopropropamida, fenformida, glicodiazina, glicoxepid, glibenclamida y la tolazamida, estimulan la secreción de insulina, no así, la aloxana y el diazóxido que inhiben su secreción. - (2,8).

Las drogas insulínótropicas incrementan el transporte intestinal de azúcar por lo que se ha clasificado al intestino como "insensible a la insulina" porque no afecta el transporte de glucosa a través del epitelio intestinal. (2).

TRANSPORTE DE INSULINA

La hormona está unida a las proteínas plasmáticas, - su corrimiento electroforético se caracteriza con las gamma-globulinas. Se une a la IgG en plasma de pacientes diabéticos tratados con insulina pero este fenómeno no se ha encontrado en sujetos normales. (17).

RECEPTORES INSULINICOS

Los receptores están localizados en la membrana plasmática de la célula y constituyen el sitio inicial de interacción entre la hormona y el tejido. El calcio y otros ca-

tiones divalentes estimulan la unión con insulina en la membrana de placenta humana, células grasas y membranas de hígado, no así en linfocitos cultivados. Las concentraciones altas de cloruro de sodio aumentan el enlace de insulina a células grasas y membranas de hígado, pero inhiben la unión a membrana de placenta humana. (19).

METABOLISMO

La glutatión-insulina transhidrogenasa (GIT) inactiva a la insulina por separación reductiva de los enlaces disulfuro en la cadena A y B. El glutatión reducido, actuando como una isoenzima para la transhidrogenasa, dona los átomos de hidrógeno para la reducción y es convertido en glutatión oxidado. Los péptidos de las cadenas A y B son degradados por proteólisis quedando los aminoácidos correspondientes. La GIT se localizó en la membrana ribosomal del hígado como un complejo protein- fosfolípido. La vida media de la insulina en la circulación es de 10 a 25 minutos en el hombre. (4,11, 23).

FISIOLOGIA

La insulina muestra todas las actividades adscritas a las hormonas, incluyendo el sitio de transporte en la membrana, la síntesis de ácido ribonucléico (ARN) en el sitio nuclear, la traducción en el ribosoma para la síntesis proteica y una influencia en los niveles tisulares de ácido monofosfórico (AMP) cíclico.

El efecto primario de esta proteína en el músculo y tejido adiposo es facilitar el transporte de glucosa, aminoácidos, ion potasio, nucleósidos y fosfato inorgánico. El consumo de glucosa por la célula es el paso limitante de la velocidad para todo el metabolismo subsecuente de la glucosa dentro de la célula. En el tejido adiposo la insulina eleva la síntesis de lípidos aportando acetil-coenzima-A y NADPH = requeridos para dicha síntesis, así como la producción de -- glicerol (glicerofosfato) para la síntesis de triglicéridos.

En el hígado no existe barrera para el transporte de glucosa, las concentraciones extracelulares e intracelulares son iguales, la insulina actúa directamente originando salida disminuída de glucosa, producción menor de urea, AMPcíclico disminuído y captación elevada de potasio y fosfato. Se sugiere que la insulina puede actuar sobre un locus genético en el núcleo que contiene la unidad genética funcional (genoma) para un grupo de enzimas específicas. Así, la insulina estimula la glucogénesis efectuando un incremento simultáneo en la síntesis de las enzimas glucocinasa, fructofosfocinasa y pirúvicocinasa. Al mismo tiempo, la insulina reprime a -- las enzimas que controlan a la gluconeogénesis; pirúvicocarboxilasa, fosfoenolpirúvico carboxilasa, fructosa-1,6-difosfatasa y glucosa-6-fosfatasa. (11).

PRESENTACIONES DE LA INSULINA COMERCIAL PARA USO TERAPEUTICO.

Protamina zinc insulina.- es una combinación de insulina con protamina que se absorbe más lentamente que la insulina ordinaria.

Globininsulina.- es otra combinación de insulina con una proteína (en este caso globina), tiene un efecto intermedio entre la insulina ordinaria y la insulina protamina.

Insulina ultralenta.- es una insulina de acción lenta preparada por cristalización controlada en presencia de - altas concentraciones de zinc en amortiguador de acetatos monosódicos a pH 7.2, para producir grandes cristales que son lentamente absorbidos.

Insulina lenta.- es una mezcla 7:3 de insulina ultralenta y ordinaria, que tiene una duración de efecto intermedio.

Características de los efectos hipoglucemiantes de - la insulina-zinc-cristalina y de varias insulinas modificadas.

| Tipo de insulina | Horas después de la administración | |
|---|------------------------------------|---------------------|
| | Acción máxima | Duración del efecto |
| Insulina-zinc-cristalina (IZC) | 2 a 4 | 5 a 8 |
| Globina-zinc-insulina | 6 a 10 | 18 a 24 |
| IPNH (insulina protamina neutra) Hagedorn | 8 a 12 | 29 a 30 |
| Insulina lenta | 10 a 16 | 24 a 28 |
| Protamina-zinc-insulina (PZI) | 16 a 24 | 24 a 36 o + |

Las preparaciones de insulina se estandarizan midiendo su efecto sobre la glicemia en conejos. Una unidad de in

sulina es la cantidad requerida para reducir la glucosa sanguínea, en un conejo normal de 2 Kg con 24 horas de ayuno, de 120 a 45 mg/100 ml.

El estándar Internacional contiene 24 unidades por miligramo de insulina recristalizada. La insulina comercial usualmente se vende en dos concentraciones; U-40 y U-80 refiriéndose los números a las unidades por mililitro. (11).

HISTORIA DE LA DETECCION DE ANTICUERPOS ANTI-INSULINA.

La existencia de anticuerpos anti-insulina circulantes por inyección de insulina heteróloga en pacientes diabéticos fué sugerida por estudios de Banting y col. en 1938 y después por Wasserman et al. y Lowell. En 1955 Moloney y -- col. demostraron los anticuerpos anti-insulina en animales, y en 1956 se confirmó su existencia en humanos por Berson y Yalow, y se estableció su importancia en el desarrollo de resistencia a la insulina. (21).

Hay dos tipos de anticuerpos producidos por insulina heteróloga: Un tipo de anticuerpo da origen a reacción alérgica dérmica y en electroforesis migra con las beta globulinas (Lowell 1942 y Cann 1953), y es capaz de producir urticaria, edema angioneurótico y algunos shocks anafilácticos, -- ocurre solo excepcionalmente en el hombre.

Otro tipo de anticuerpo demostrable por medición de insulina unida a I-131, es diferente: éste migra con las gamma globulinas y su enlace con insulina es reversible (Berson et al. 1956) Berson y Yalow 1957 y Kalant et al. 1958, Skom- y Talmage 1958.

Existe la hipótesis de que la diabetes avanzada provoca una enfermedad autoinmune debida al desarrollo de autoanticuerpos anti-insulina. La alta concentración de estos anticuerpos en sujetos diabéticos crónicos provocan la resistencia a la insulina por un mecanismo inmunitario, (Berson y Yalow 1957b, Burrows et al. 1957). Esta afirmación es respaldada por el efecto favorable de terapia corticoide en muchos casos de resistencia a la insulina (Collens y Bonwitsch, 1955) y por la disminución de anticuerpos anti-insulina que acompaña la desaparición de resistencia a la insulina (Morse 1961). (18).

Utilizando la técnica de ultracentrifugación y un suero humano anti-insulina capaz de distinguir entre insulina humana y bovina, se demostró que los anticuerpos circulantes de pacientes diabéticos no sólo se unen a la insulina exógena administrada sino también a la insulina endógena. Por tanto, estos anticuerpos reaccionan con una molécula propia por lo que se les consideró como autoanticuerpos, a pesar de su obvia inducción por insulina exógena. Este anticuerpo fué probado con insulina específica pero su especificidad de especie no pudo ser probada (Arquilla y Stovicky, 1956). Por tanto, existe un cruzamiento inmunitario con insulina de varias especies. Lowell (1942) asumió la especificidad de especie inmunológica de la insulina endógena de ciertas especies que desaparecen en el proceso de preparación y purificación. (13).

La producción de autoanticuerpos anti-insulina está considerada como un factor etiológico de diabetes mellitus en el hombre. No hay pruebas de que los anticuerpos anti-insulina sean producidos por personas que nunca recibieron insulina. (17).

El fenómeno inmune en diabetes mellitus se ha estudiado recientemente por pruebas "in vitro" de la función inmunológica de células blasto para detectar una población de linfocitos sensibilizada al antígeno. Federlin y col. (14) vieron que los linfocitos de diabéticos alérgicos a insulina son transformados en células blasto cuando son expuestos a antígeno purificado de insulina bovina. Otros investigadores, usando la prueba de migración de leucocitos sugieren un mecanismo auto-inmune presente en diabéticos demostrado por inhibición en la migración de leucocitos, diabéticos expuestos a derivados antigénicos ligados al ducto del páncreas -- porcino y a páncreas fetal de ternero.

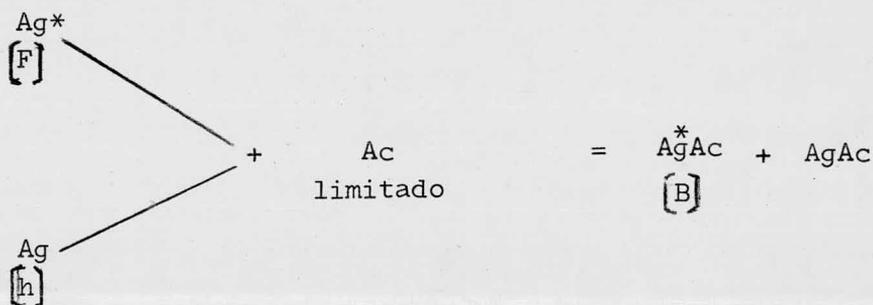
En el mecanismo inmune de células blasto en diabetes mellitus, la prueba de migración de leucocitos (LMT) tiene reportada hipersensibilidad celular en diabéticos contra antígeno no específico y un antígeno o derivado de la fracción microsomal de los islotes de Langerhans. No se encontró diferencia en los resultados de sujetos normales y diabéticos en la población de linfocitos B y T en sangre periférica. (15).

RADIOINMUNOANALISIS.

En 1960 Berson y Yalow (5) introducen el método de radioinmunoanálisis (RIA) para determinar los niveles de insulina en suero, basándose en las propiedades antigénicas de la insulina. Se ha extendido para el uso de hormonas peptídicas, hormonas esteroides y enzimas. Se puede realizar en suero o plasma.

Este método se basa en la reacción entre el antígeno

de la hormona marcada con I-125 y un anticuerpo específico - para la hormona, de los que resulta formación de un complejo antígeno-anticuerpo (Ag-Ac) radiactivo. Cuando se agrega antígeno (Ag) sin marcar (hormona), entra en competencia con - el antígeno marcado (Ag*), por la cantidad limitada de anti-cuerpos, formándose cierta cantidad de complejo antígeno-anti-cuerpo no radiactivo.



Donce Ag* = Hormona marcada con I-125 (antígeno)

Ag = Hormona no marcada (antígeno)

Ac = Anticuerpo específico para la hormona

$\boxed{\text{F}}$ = Concentración de la hormona marcada libre

$\boxed{\text{B}}$ = Concentración de la hormona marcada unida al Ac

$\boxed{\text{h}}$ = Concentración de la hormona no marcada.

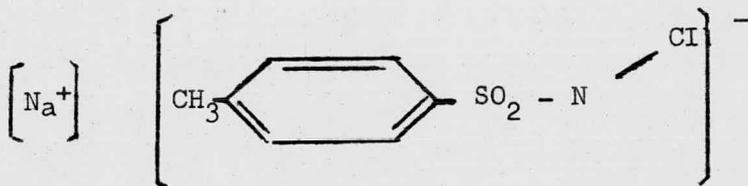
De acuerdo con el principio de acción de masas, la - razón entre antígeno radiactivo unido al anticuerpo $\boxed{\text{B}}$ y el antígeno libre $\boxed{\text{F}}$, esto es, $\boxed{\text{B}} : \boxed{\text{F}}$, disminuye progresiva- mente en proporción con la concentración creciente del Ag no radiactivo $\boxed{\text{h}}$. (22).

Las ventajas del RIA consisten en: Tiene una gran -- sensibilidad, debido al uso de radioisótopos y alta afinidad del anticuerpo. Posee gran especificidad, debido a la reac-- ción antígeno-anticuerpo. Se puede llevar a cabo la microde-- terminación de proteínas específicas en mezclas sin fraccio-- nar.

Los factores que intervienen en la prueba son: el an-- tígeno marcado, el anticuerpo y el complejo Ag-Ac.

Para la técnica de RIA se prefiere la yodación de la hormona protéica con I-125 que posee una vida media de 60 -- días prolongando el uso de la hormona marcada, no así el -- I-131 cuya vida media es de 8 días.

Para la yodación directa de proteínas se ha usado -- más el método de la cloramina-T, descrito por Greenwood y -- col. (27) en 1963. La cloramina-T es una sal del monocloruro de sodio derivado del p-tolueno sulfonamida y su fórmula-- es:



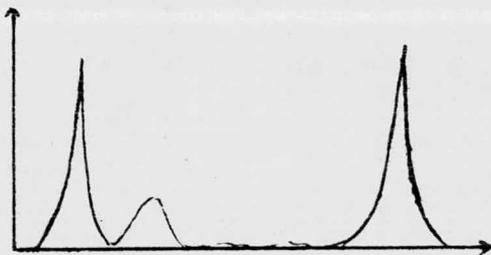
En solución acuosa, se produce ácido hipocloroso en-- pequeña cantidad que actúa como excelente oxidante. De don-- de el NaI-125 o NaI-131 es oxidado por la cloramina-T en pre-- sencia de la hormona en 15 a 60 segundos. La reacción se de-- tiene por adición de metabisulfito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$). Este proceso se realiza a pH 7.5, con volúmenes reducidos al míni-- mo, la incorporación de iodo radiactivo depende de la concen-- tración de proteínas. Después del procedimiento de oxida-- ción, la mezcla contiene proteína marcada, iodo radiactivo --

sin reaccionar, reactivos y protefnas que fueron dañadas durante la reacción de oxidación. Siendo necesaria la purificación inmediata de la protefna marcada ya sea por adsorción cromatográfica, filtración en gel, electroforesis en gel de almidón, resinas de intercambio iónico o diálisis.

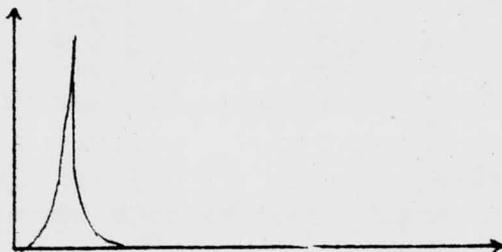
La calidad de la hormona marcada se verifica por cromatoelectroforesis, electroforesis en acetato de celulosa, cromatografía en gel de almidón o cromatografía en gel de poliacrilamida. Se hacen cortes de la placa donde se corrió la hormona y se mide la radiactividad de cada pieza en un contador gamma. (5, 24, 25).

Usualmente el pico del origen corresponde a la hormona marcada, el siguiente pico se considera como hormona dañada y el pico con mayor corrimiento corresponde al yoduro libre marcado. (fig. 4).

Antes de la purificación



Después de la purificación



El material marcado se guarda en amortiguador conteniendo albúmina de suero humano o bovino. La actividad específica se mide en $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ (microCuris / microgramos). (5).

METODOS DE SEPARACION DEL COMPLEJO Ag-Ac DE LA HORMONA LIBRE.

La sensibilidad y especificidad del RIA dependen del anticuerpo que se relaciona directamente con la afinidad del antígeno. La especificidad depende de la reacción entre el determinante antigénico con los sitios específicos del anticuerpo. Un antígeno es una sustancia que se combina con un anticuerpo específico. La parte de una molécula antigénica que combina con el sitio de unión de un anticuerpo se llama "determinante antigénico". En el caso de hormonas peptídicas, cada determinante consiste de una secuencia de aminoácidos. Cada antígeno puede tener uno o más determinantes antigénicos.

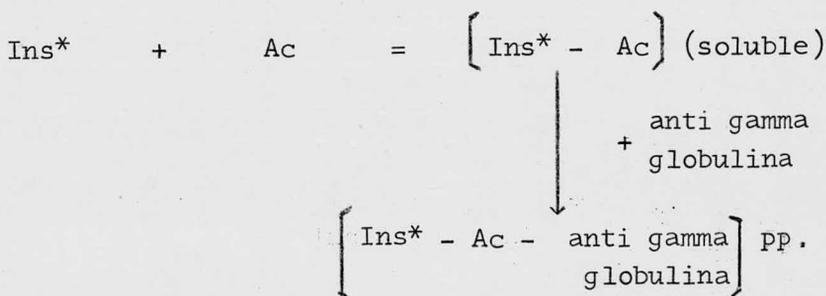
Hay varios métodos para separar el complejo Ag-Ac de la hormona libre:

1.- Método que separa simultáneamente la hormona unida al anticuerpo de la hormona libre: Cromatoelectroforesis, donde la hormona libre permanece en el origen y la hormona unida al anticuerpo migra con las gamma-globulinas.

2.- Método que remueve la hormona libre de la mezcla de incubación: Se basa en la adsorción de la hormona libre permaneciendo la hormona unida al anticuerpo sin adsorberse, se emplea carbón dextrán (DC), es el método más comunmente usado en RIA, fué propuesto por Herbert, Lau, Gotthieb y - -

Bleich (5) para la prueba de insulina. El carbón adsorbe a los polipéptidos y proteínas de peso molecular pequeño y excluye completamente el complejo Ag-Ac. Está caracterizado por su alta estabilidad, moderada capacidad de dispersión, alta afinidad por el Ag y especificidad adsorptiva. También se emplea la separación por talco y precipitado de sílica. Otro método emplea resinas de intercambio aniónico para la separación de la hormona unida de la libre.

3.- Método que remueve la hormona unida al anticuerpo de la mezcla de incubación: La técnica del doble anticuerpo fué desarrollada por Hales y Randle (5), donde demuestran que el anticuerpo anti-insulina puede ser precipitado por anti gamma-globulina de la especie de que proceden los anticuerpos. La técnica se basa en la inmunoprecipitación de la hormona marcada unida al anticuerpo (Ag*Ac) por el uso de un suero inmunoprecipitante o por anti gamma-globulina específica. Por ejemplo:



El segundo anticuerpo es agregado al medio de incubación precipitando el complejo Ag*Ac. La hormona libre permanece en solución y el precipitado se separa por centrifugación y es medida su radiactividad. Se ha visto que la arginina, leucina, epinefrina y heparina no alteran los niveles-

de insulina en este método.

MEDIDA DE RADIATIVIDAD.

Al final del proceso de separación, se mide la radiactividad de las muestras en la fracción unida al anticuerpo, en la que se encuentra el antígeno libre o en ambas, dependiendo del tipo de separación empleado. Se usa un contador gamma para medir I-125 y I-131. (7,20).

MATERIAL Y METODOS.

MUESTRAS BIOLÓGICAS

El material biológico utilizado en este estudio estuvo constituido por 100 sueros de pacientes del Servicio de Endocrinología del Centro Médico La Raza, cuyas edades fluctuaron de 18 a 77 años de edad, siendo 44 de sexo masculino y 56 de sexo femenino, divididos en dos grupos:

a) Grupo control no diabético: Integrado por 50 pacientes, 18 de sexo masculino y 32 de sexo femenino, que nunca recibieron insulina.

b) Grupo de personas adultas diabéticas: constituido por 26 pacientes de sexo masculino y 24 de sexo femenino que recibieron insulina por más de tres meses y que actualmente se les aplica de 100 a 170 Unidades de insulina diaria, con el objeto de ver si el método es o no sensible.

Las muestras de sangre fueron obtenidas en condiciones de reposo y ayuno, por punción venosa y sin anticoagulante. Se centrifugaron y se separaron los sueros, los que se conservaron en congelación hasta el momento de su uso.

En todas ellas se determinaron anticuerpos anti-insulina por análisis radiométrico.

METODOLOGIA.

ANÁLISIS RADIOMÉTRICO de R. S. Yalow (3,5), modificado. Es un procedimiento analítico cuantitativo. Se basa en la afinidad de una muestra desconocida (proteína fijadora de

insulina) por un agente radiactivo (insulina-I-125). La insulina marcada desplaza competitivamente a la insulina no -- marcada presente en el suero problema, disminuyendo la radiactividad en la fracción de insulina no combinada, resultando un compuesto radiactivo fácilmente separable de la -- sustancia radiactiva original (insulina-I-125) combinada e insulina-I-125 libre, por filtración, volatilización u otros procedimientos. En este caso se usó carbón dextrán (DC) que adsorbe polipéptidos de bajo peso molecular como la insulina, excluyendo el complejo antígeno-anticuerpo del carbón dextrán. Las fracciones se separan por centrifugación y se lee radiactividad en el sobrenadante.

Para establecer esta metodología se hizo una variante de él en el RIA para la detección de insulina en el cual se substituyó el anticuerpo por el suero del paciente que su puestamente contenía anticuerpos anti-insulina. (fig. 5).

APARATOS Y EQUIPO.

Agitador y barra magnética.

Centrífuga.

Espectrómetro de centelleo líquido.

Mezclador tipo vortex.

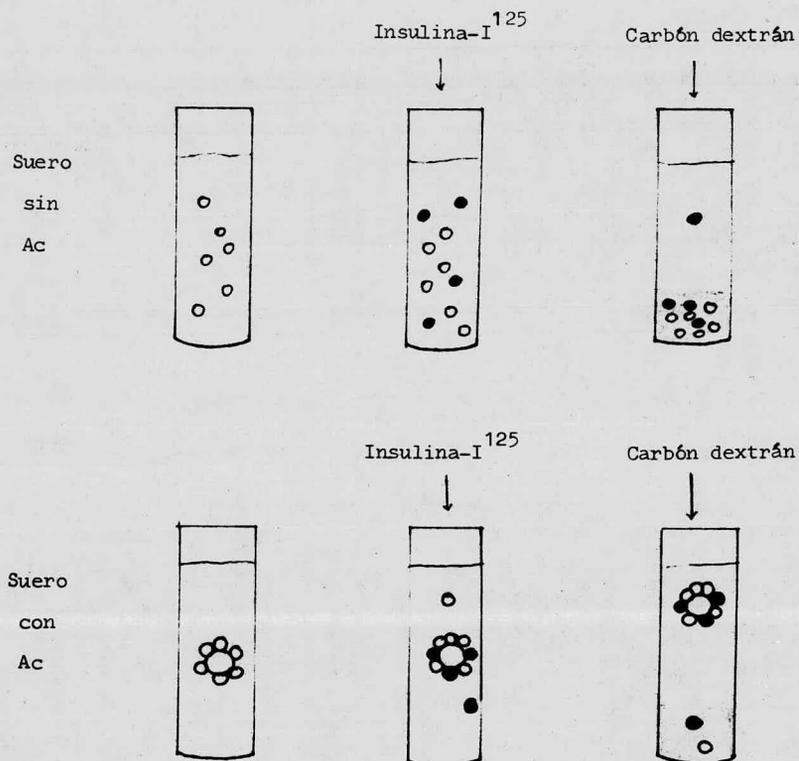
Reloj.

Micropipetas automáticas con puntas de plástico.

Tubos de plástico desechables de 12 x 75 mm.

Frascos de polietileno para el espectrómetro.

Equipo común de laboratorio.



(Fig. 5).- PRINCIPIO DEL ANALISIS RADIOMETRICO

- Anticuerpo (Ac)
- Insulina no marcada
- Insulina-I¹²⁵

REACTIVOS.

- 1.- Solución de albúmina bovina al 7.5%.
- 2.- Agua destilada.

Reactivos usados del Equipo de Insulina Marcada con I-125 liofilizada. CEA IRE SORIN (CIS), (ref. INSIK-3).- (3).

- 3.- Insulina marcada con I-125; La preparación liofilizada contiene albúmina bovina y conservadores. Actividad específica de 100 milicurie por miligramo.

Hidratar el contenido con 10 ml de agua destilada.

Conservado a la temperatura de 2 a 8 °C.

Nota.- El equipo CIS Insulina Radioinmunoanálisis contiene aproximadamente 2.5 μ C de I-125 trazador. Este material radiactivo es usado solo para pruebas "in vitro" de laboratorio.

- 4.- Anticuerpo anti-insulina: Preparado en cobayo. La preparación liofilizada contiene albúmina bovina y estabilizador.

Conservado a la temperatura de 2 a 8 °C.

Estabilidad: Liofilizado y bajo refrigeración, un año.

Reconstituirlo con 10 ml de agua destilada.

Siguiendo el procedimiento recomendado, el suero anti-insulina une del 30 al 50% de la dosis de insulina marcada.

- 5.- Amortiguador de fosfatos (mezcla seca): Cada paquete contiene fosfato de sodio, sal de sodio de EDTA, y albúmina bovina.

Conservado a la temperatura de 2 a 8 °C.

Disolver la mezcla de sal seca en 200 ml de agua destilada se obtiene una solución a pH 7.4 conteniendo 1% de solución de albúmina bovina (BSA).

- 6.- Carbón dextrán (DC): Cada frasco contiene 2.5 gr de mezcla (1:10). Al momento de su uso, suspender el contenido del frasco en 120 ml de solución amortiguadora. La suspensión puede ser usada durante 48 horas.

ANALISIS RADIOMETRICO.

Procedimiento.- etiquetar los tubos por duplicado, - pipetear cuidadosamente y realizar la prueba de acuerdo al - esquema siguiente:

MANEJO DE LOS DIFERENTES REACTIVOS EN EL METODO RIA MODIFICADO

| TUBOS | INSULINA I-125 ml | AMORTI GUADOR ml | SUERO PATRON O PRO- BLEMA ml | SUERO ANTI- INSU- LINA ml | ALBUMINA BOVINA ml | AMORTI GUADOR ml | CARBON DEXTRAN ml |
|---------------------------------|-----------------------------|----------------------------|--|---|------------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| T | 0.1 | | | | | | |
| A | 0.1 | 0.1 | | | 0.1 | | 1.0 |
| B | 0.1 | | | 0.1 | 0.1 | | 1.0 |
| SUERO PATRON | 0.1 | | 0.1 | | | 0.1 | 1.0 |
| PROBLA MA | 0.1 | | 0.1 | | | 0.1 | 1.0 |
| INCUBAR 2 horas entre 2 y 8 °C. | | | | | | | |

Nota:

T = Radiactividad total.

A = Testigo negativo.

B = Testigo positivo.

- Mezclar el contenido de todos los tubos durante 2 minutos, (excepto T).
- Incubar durante 10 minutos entre 2 y 8 °C.
- Centrifugar todos los tubos a 2500 - 3000 r.p.m. durante - 20 minutos.
- Decantar el sobrenadante en tubos desechables de polietileno.
- Medir la radiactividad de los tubos durante dos minutos, - incluyendo el tubo T.

CALCULOS

$$\text{Porcentaje de fijación de insulina al suero} = \frac{\left[\begin{array}{l} \text{muestra} \\ \text{(c.p.m.)} \end{array} \right] \left[\begin{array}{l} \text{adsorción inespecífica} \\ \text{(suero patrón)} \\ \text{(c.p.m.)} \end{array} \right]}{\text{radiactividad total (c.p.m.)}} \times 100$$

Nata: Consultar la tabla No. 1 (pág. 37).

Al resultado obtenido se le llama porcentaje de fijación de insulina al suero, que representa la capacidad del - anticuerpo para unir proteínas y se representa en porcentaje.

Observaciones.- el tiempo de incubación nos da el - equilibrio en la reacción.

La suspensión de carbón dextrán se coloca en baño de hielo a una temperatura entre 2 y 8 °C, con agitación conti-

na para mantener el medio homogéneo mientras se aplica a -- las muestras.

El tiempo de aplicación de carbón dextrán no debe exceder de 4 a 5 minutos.

La fijación de radiactividad por el carbono es constante después de 90 minutos.

CAPACIDAD DE ADSORCION DEL CARBON DEXTRAN

Con objeto de conocer la cantidad necesaria de car--bón dextrán para adsorber la insulina libre presente en el -suero, se trabajó con insulina radiactiva con actividad espe--cífica de 100 milicuries por miligramo con lo que se preparó una solución conteniendo 0.125 micro curies por mililitro, -de la cual se tomó 0.1 mililitros para mezclarlo con 0.1 mi--lilitros de suero y 1.0 mililitros de suspensión de carbón -dextrán a diferentes concentraciones (ver esquema de adsor--ción del carbón dextrán, pág. 33).

Se incubó durante 10 minutos entre 2 y 8 °C y se cen--trifugó de 2500 a 3000 r.p.m. durante 20 minutos.

Se decantó el sobrenadante y se contó durante dos mi--nutos la radiactividad fijada a la suspensión de carbón dex--trán a diferentes concentraciones.

Se encontró que a partir de 0.01 gr de carbón dex--trán por mililitro, la fijación de insulina-I-125 se hace -- constante, por lo que se determinó usar 0.020 gr de carbón -dextrán por mililitro que está en una concentración adecuada. (Gráficas No. 1 y 2, págs. 34 y 35).

ADSORCION DEL CARBON DEXTRAN

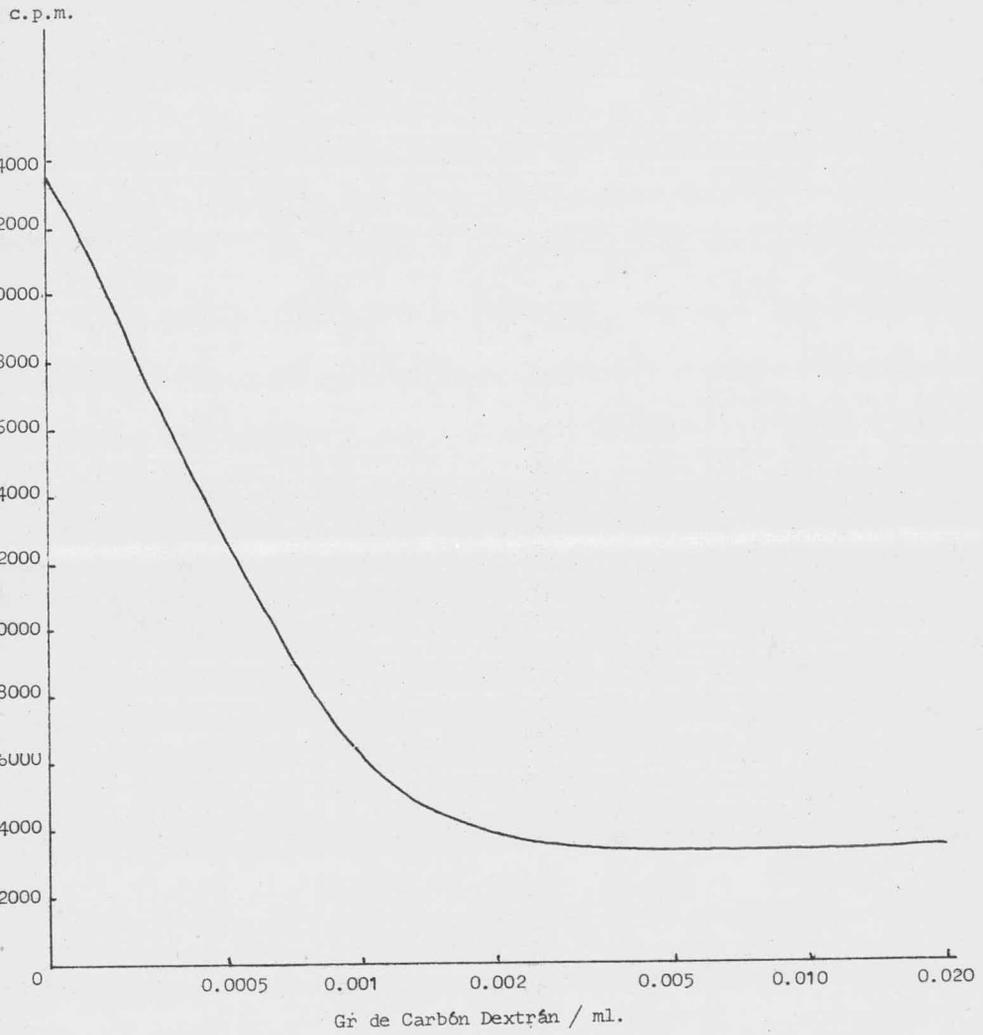
| INSULINA I-125 ml | SUERO ml | CARBON DEXTRAN | |
|----------------------|-------------|----------------|-----|
| | | Gr/ml | ml |
| 0.1 | 0.1 | 0.0005 | 1.0 |
| 0.1 | 0.1 | 0.001 | 1.0 |
| 0.1 | 0.1 | 0.002 | 1.0 |
| 0.1 | 0.1 | 0.005 | 1.0 |
| 0.1 | 0.1 | 0.01 | 1.0 |
| 0.1 | 0.1 | 0.015 | 1.0 |
| 0.1 | 0.1 | 0.020 | 1.0 |

-Incubar durante 10 minutos entre 2 y 8 °C.

-Centrifugar a 2500 - 3000 r.p.m. durante 20 minutos.

-Decantar sobrenadante y contar radiactividad en el sedimento y en el sobrenadante.

GRAFICA No. I
Capacidad de Adsorción del Carbón Dextrán
Sobrenadante.

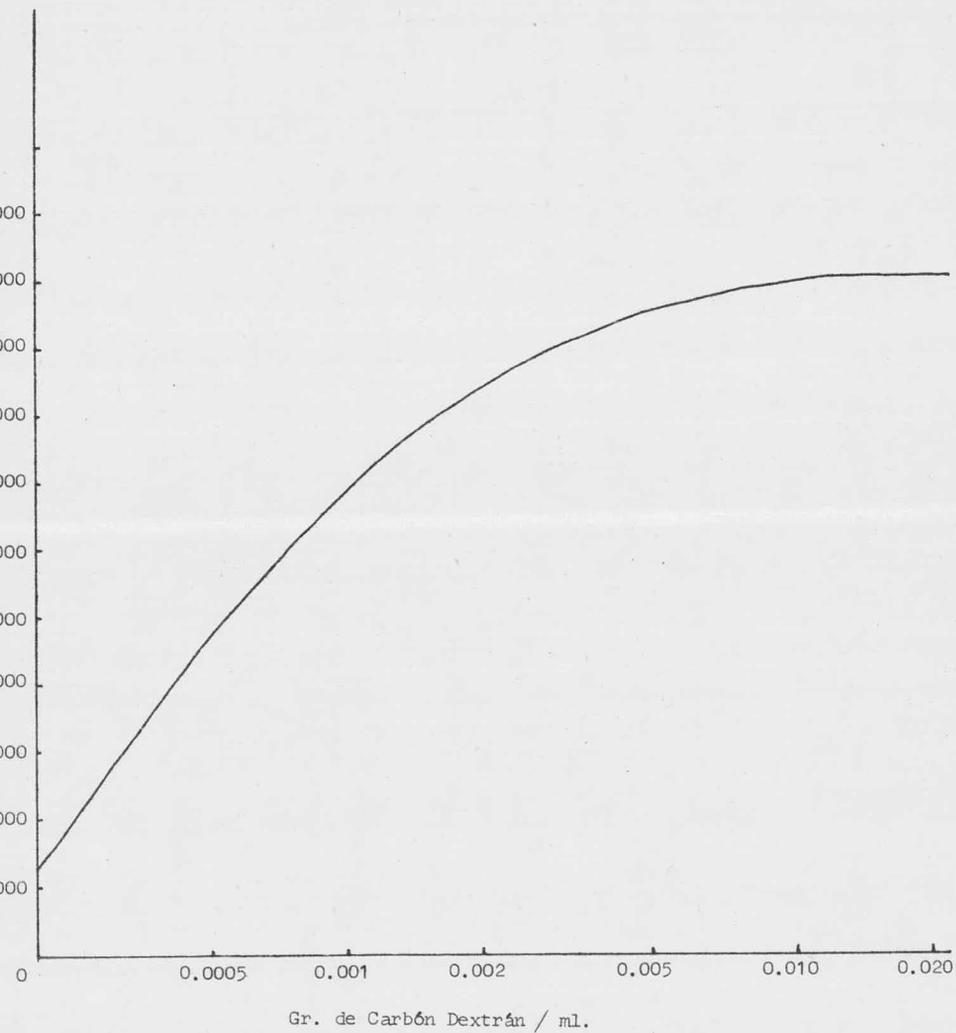


GRAFICA No. 2

Capacidad de Adsorción del Carbón Dextrán.

Sedimento.

c.p.m.



RESULTADOS

TABLA No. 1

VALORES OBTENIDOS CON SUSTANCIAS PATRON
 PARA LA DETERMINACION DEL ANALISIS
 RADIOMETRICO DE ANTICUERPOS ANTI-INSULINA.

| TUBO | DESCRIPCION | RADIATIVIDAD (c.p.m.) | VALORES ESTANDAR % |
|------------------------|---|--------------------------|-----------------------|
| T | Radiactividad Total | 20792 | 100 |
| A | Testigo negativo | 2686 | 12.9 |
| B | Testigo positivo | 13393 | 64.4 |
| SUERO PA- - TRON | Adsorción Inespecí- fica de Insulina- - I-125 en la proteí- na serica. | 3122 | 15.0 |

TABLA No. 2

VALORES OBTENIDOS DE SUEROS DE PACIENTES SANOS ADULTOS
QUE NO HAN SIDO TRATADOS CON INSULINA.

| No. | PACIENTE | SEXO | RADIOACTIVIDAD (c.p.m.) | PORCENTAJE DE FIJACION DE INSULINA AL SUERO. |
|-----|----------|------|----------------------------|---|
| 1 | L.J.M. | F | 3298 | 0.84 |
| 2 | E.B. | F | 3264 | 0.89 |
| 3 | C.G. | F | 3172 | 0.24 |
| 4 | J.L.S. | M | 3224 | 0.57 |
| 5 | M.A.R. | M | 3006 | -0.55 |
| 6 | I.M. | F | 2349 | -1.30 |
| 7 | M.M. | M | 2895 | -1.0 |
| 8 | H.F.C. | F | 2609 | -2.40 |
| 9 | I.C. | F | 3015 | -0.55 |
| 10 | M.G. | M | 3009 | -0.54 |
| 11 | D.C. | F | 3113 | -0.04 |
| 12 | M.M.M. | F | 3164 | 0.21 |
| 13 | N.R.G. | F | 3293 | 0.82 |
| 14 | H.P.M.J. | F | 3139 | 0.08 |
| 15 | CH.L. | M | 3067 | -0.26 |
| 16 | H.M.C. | M | 3217 | 0.13 |
| 17 | R.G.J. | F | 3219 | 0.44 |
| 18 | N.V.A. | F | 3238 | 0.55 |
| 19 | O.B.F. | M | 3198 | 0.36 |
| 20 | E.P.H. | M | 3119 | -0.01 |
| 21 | G.L.P. | F | 3393 | 1.30 |
| 22 | C.P.M.M. | F | 3262 | 0.67 |
| 23 | C.M.E. | M | 3117 | -0.02 |
| 24 | A.C. | M | 3111 | -0.05 |
| 25 | L.Q.F. | F | 3230 | 0.51 |
| 26 | I.P.L. | F | 3142 | 0.09 |
| 27 | S.A.A. | F | 3263 | 0.67 |
| 28 | M.C.P.P. | F | 3224 | 0.97 |
| 29 | L.R.C. | F | 3113 | -0.04 |
| 30 | L.P.G. | F | 3142 | 0.09 |
| 31 | C.P.M.M. | F | 3014 | -0.51 |
| 32 | N.G.F. | F | 3181 | 0.28 |
| 33 | M.V.H. | F | 3117 | -0.02 |
| 34 | M.R.L. | M | 3274 | 0.73 |
| 35 | M.C.A. | F | 3078 | -0.21 |
| 36 | M.M.T. | F | 3174 | 0.25 |
| 37 | M.G.G.A. | M | 3113 | -0.04 |
| 38 | E.G.M. | F | 3140 | 0.08 |
| 39 | L.F.R.S. | M | 3062 | -0.28 |
| 40 | S.M.R.C. | F | 2731 | -1.80 |
| 41 | V.S.A. | M | 3329 | 0.99 |
| 42 | M.F.B. | F | 3098 | -0.11 |
| 43 | H.M.R.M. | F | 3716 | 2.85 |
| 44 | E.R.G. | F | 3195 | 0.35 |
| 45 | J.A.J.C. | M | 3214 | 0.44 |
| 46 | M.O.R. | M | 3592 | 2.26 |
| 47 | D.S.A. | M | 3714 | 2.84 |
| 48 | P.A.A. | F | 3161 | 0.18 |
| 49 | T.J.M. | F | 2899 | -1.07 |
| 50 | C.C.E. | M | 3727 | 2.90 |

$$\bar{X} = 0.25$$

VALORES DE REFERENCIA ESTABLECIDOS: de 0.0 a 2.29%

TABLA No. 3

VALORES OBTENIDOS DE SUEROS DE PACIENTES DIABETICOS QUE
REQUIEREN ALTAS DOSIS DE INSULINA.

| No. | PACIENTE | SEXO | RADIATIVIDAD (c.p.m.) | PORCENTAJE DE FIJACION DE INSULINA AL SUERO. |
|-----|----------|------|--------------------------|---|
| 1 | L.L.S. | M | 15502 | 59.5 |
| 2 | L.C.N. | F | 16142 | 62.6 |
| 3 | B.H.M. | M | 14143 | 53.0 |
| 4 | R.M.F. | F | 18916 | 75.9 |
| 5 | L.L.S. | M | 19762 | 80.0 |
| 6 | L.C.N. | F | 12490 | 45.0 |
| 7 | S.G.F. | M | 10344 | 34.7 |
| 8 | A.G. | M | 16907 | 66.2 |
| 9 | D.L. | M | 15093 | 57.5 |
| 10 | R.G. | F | 12010 | 42.7 |
| 11 | L.D. | F | 9149 | 28.9 |
| 12 | A.P.F. | F | 14727 | 55.8 |
| 13 | J.M.V. | M | 15908 | 61.4 |
| 14 | A.F.I. | F | 10453 | 35.2 |
| 15 | R.R.M. | F | 14734 | 55.8 |
| 16 | M.V.S. | M | 14028 | 52.3 |
| 17 | R.R.A. | F | 14699 | 55.6 |
| 18 | A.F.I. | F | 10453 | 35.2 |
| 19 | H.A.J. | M | 11879 | 43.1 |
| 20 | G.S.P. | F | 8646 | 26.5 |
| 21 | R.A. | F | 16106 | 62.4 |
| 22 | L.H.F. | M | 10551 | 35.7 |
| 23 | B.M.C. | F | 7080 | 19.0 |
| 24 | P.C.M. | F | 9629 | 31.2 |
| 25 | G.G.M.A. | F | 16850 | 66.0 |
| 26 | A.F.I. | F | 16519 | 65.1 |
| 27 | R.H.A. | F | 15257 | 58.3 |
| 28 | P.C.D. | F | 16660 | 65.1 |
| 29 | R.C.F. | M | 10505 | 35.5 |
| 30 | O.M.A. | F | 10961 | 37.7 |
| 31 | B.R.I. | F | 12905 | 47.0 |
| 32 | O.G.C. | F | 7193 | 19.5 |
| 33 | S.P.L. | M | 7260 | 19.9 |
| 34 | L.B.J. | M | 14288 | 53.7 |
| 35 | D.E.R. | M | 16870 | 66.1 |
| 36 | M.A. | F | 5597 | 12.0 |
| 37 | S.P.L. | M | 9780 | 32.0 |
| 38 | Z.A.B. | M | 9639 | 31.3 |
| 39 | S.P.L. | M | 8200 | 24.4 |
| 40 | N.G.A. | M | 8600 | 26.3 |
| 41 | C.R.C. | F | 12720 | 46.1 |
| 42 | P.P.R. | M | 9700 | 31.6 |
| 43 | N.G.A. | M | 7824 | 22.6 |
| 44 | C.R.C. | F | 12720 | 46.1 |
| 45 | P.P.R. | M | 10500 | 35.4 |
| 46 | L.G.G.C. | M | 8500 | 25.8 |
| 47 | Z.E.V. | M | 8998 | 28.2 |
| 48 | S.G.J.C. | M | 9673 | 31.5 |
| 49 | S.P.L. | M | 7238 | 19.7 |
| 50 | S.P.L. | M | 9780 | 32.0 |

$$\bar{X} = 43.08 \quad S = 17 \quad 2S = 34$$

$$\bar{X} \pm 2S = 43.08 \pm 34 = \underline{9.08 \text{ a } 77.08\%}$$

CALCULOS ESTADISTICOS
PARA COMPARACION DE LOS GRUPOS ESTUDIADOS

GRUPO DE SUEROS NORMALES (TABLA No. 2, pág. 38).

$$\bar{X}_1 = \frac{\sum X_1}{n_1} = \frac{12.78}{50} = 0.25$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum (X_1 - \bar{X}_1)^2}{n_1 - 1}} = \sqrt{\frac{51.05}{49}} = 1.02$$

$$S = 1.02$$

$$2S = 2.04$$

$$\bar{X}_1 \pm 2S = \underline{-1.79 \text{ a } 2.29\%}$$

GRUPO DE SUEROS DE PACIENTES DIABETICOS (TABLA No. 3, pág. 39).

$$\bar{X}_2 = \frac{\sum X_2}{n_2} = \frac{2154.2}{50} = 43.08$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum (X_2 - \bar{X}_2)^2}{n_2 - 1}} = \sqrt{\frac{14149.6}{49}} = 17$$

$$S = 17$$

$$2S = 34$$

$$\bar{X}_2 \pm 2S = \text{de } \underline{9.08 \text{ a } 77.08\%}$$

LIMITE DE CONFIABILIDAD:

$$\hat{s} = \sqrt{\frac{\sum (x_2 - \bar{x}_2)^2 + (x_1 - \bar{x}_1)^2}{n_1 + n_2 - 2}} = \sqrt{\frac{(14149.6) + (51.05)}{98}}$$

$$\hat{s} = 12.04$$

$$t = \frac{\bar{x}_2 - \bar{x}_1}{\hat{s}} \sqrt{\frac{n_2 \times n_1}{n_2 + n_1}}$$

$$t_{98} = \frac{43.08 - 0.25}{12.04} \times \sqrt{\frac{50 \times 50}{50 + 50}}$$

$$t_{98} = 17.5$$

0.1 < P > 0.05, existe Diferencia Significativa.

DISCUSSION

Se propone un método cuantitativo para detectar anticuerpos anti-insulina en pacientes diabéticos con consumo alto de insulina, en los que se supone que hay producción de estos anticuerpos debido a la poca respuesta de la terapia con esta hormona.

El método de R. S. Yalow (3,5), modificado y adaptado por nosotros en el Servicio de Endocrinología del Centro Médico La Raza, está basado en la unión de la insulina radiactiva a los posibles anticuerpos del paciente, incubando 0.1 ml de suero y 0.1 ml de insulina marcada, en un segundo paso la insulina libre (que no se ha unido a anticuerpos) es adsorbida con una suspensión de carbón dextrán y centrifugada, para contar en el sobrenadante la radiactividad unida a los anticuerpos, el porcentaje de la radiactividad encontrado será proporcional a la cantidad de anticuerpos del paciente.

Con objeto de establecer un blanco para descontar la insulina marcada con I-125 unida de manera inespecífica a las proteínas sericas se preparó una solución de albúmina bovina al 7.5% de la que se tomó 0.1 ml para incubarlo con 0.1 ml de insulina-I-125 bajo las condiciones establecidas en Material y Métodos. Esta radiactividad unida a proteína fue muy reproducible en todos los ensayos variando dentro de lapsos muy estrechos (2686 a 3122 c.p.m.).

Se estudiaron cincuenta sueros de individuos aparentemente sanos (no diabéticos) que nunca habían recibido insulina, obteniendo un resultado promedio de fijación inespecífica de insulina radiactiva a proteínas de un 15%, ligeramente superior a nuestro testigo negativo de 12.9%.

La gran reproducibilidad de fijación de insulina- -- I-125 al suero en las personas no tratadas y lo similar de -- las cifras con sueros de testigos negativos nos conduce a -- considerar que ~~el~~ blanco más adecuado para nuestro estudio - es una mezcla de sueros de personas no tratadas con insulina, para considerar esta fijación de radiactividad como un cero- -- por ciento, ya que esta representa únicamente la insulina li- -- gada a proteínas séricas y al tubo de ensayo de manera ines- -- pecífica, así utilizando la radiactividad de estos indivi- -- duos como cero y el 100% de radiactividad de la insulina mar- -- cada para nuestros cálculos, se encontró un porcentaje de fi- -- jación de insulina al suero de 0 a 2.29%, los cuales queda-- -- ron como valores de referencia.

Para nuestro estudio se consideró arbitrariamente un alto consumidor de insulina al individuo que para su trata-- -- miento requiere una dosis diaria superior a 100 Unidades. En estos pacientes altos consumidores de insilina se encontró, -- como se esperaba, resultados superiores a los sueros testi-- -- gos, los resultados fueron entre 12 y 80 por ciento de fija-- -- ción. La diferencia entre grupos es altamente significativa ya que se obtuvo $P < 0.1 > 0.05$.

El hecho de que el mínimo porcentaje encontrado en - estos pacientes resulta ser seis veces mayor que las perso- -- nas normales, hace que el procedimiento sea adecuado para su empleo en la práctica clínica en donde harán estudios poste- -- riores para correlacionar los porcentajes de fijación de in- -- sulina con respecto a las dosis recibidas por el enfermo.

Otra ventaja del método radica en que requiere poca- -- muestra y la facilidad para hacer varios estudios en poco -- tiempo de trabajo, aproximadamente 30 muestras en cuatro ho- -- ras.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

En el estudio presentado se anotan generalidades sobre la estructura, biosíntesis y secreción, transporte y receptores de la insulina, así como su metabolismo y su fisiología. Historia sobre la detección de anticuerpos anti-insulina y Radio Inmuno Análisis.

Se realizó un método rápido, sensible y altamente reproducible para estudiar la presencia de anticuerpos o alguna otra molécula protéica capaz de fijar insulina de manera específica, lo que ocasiona que el paciente requiera dosis altas para su tratamiento. El principio del método consiste en la incubación de 0.1 ml de suero problema con 0.1 ml de una solución de insulina radiactiva de 100 mC/mg de actividad específica, al terminar esta incubación se procede a separar la insulina-I-125 no unida a proteína por adsorción -- con una suspensión de carbón dextrán.

A continuación el sobrenadante, en donde se encontrará la insulina-I-125 unida a proteínas se lleva a un contador de pozo para cuantificar la radiactividad.

Este estudio se hizo en 50 sueros de individuos aparentemente sanos con los que se obtuvieron valores de referencia entre 0 y 2.29%, y 50 sueros de individuos tratados con altas dosis de insulina con el fin de establecer o ver la sensibilidad del método en estudio, en estos pacientes se observó un porcentaje de fijación de insulina al suero entre el 12 y el 80%.

CONCLUSIONES

Por los resultados obtenidos se demuestra que se trata de un método rápido, sensible y de alta reproducibilidad, con gran aplicación clínica en el estudio de pacientes diabéticos que consumen altas dosis de insulina, ya que las diferencias de fijación en estos pacientes son por lo menos seis veces inferiores de los que no han recibido insulina.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Arquilla, E., Raymond J. and Thomas M., (1976) Structural studies of insulin and insulin derivatives using various immunologic indicators and antibody populations. - *Diabetes* 25: 397.
- 2.- Botros, M., Selim R., Ghoneim Kh., Ghareeb A. and Wahban N., (1974) Insulinotrophic drugs, effect on intestinal absorption of sugar., *Diabetes* 23:112.
- 3.- CEA IRE SORIN (CIS), (1977) Instructions for use of insulin radioimmunoassay KIT (I-125)., INSIK-3 Francia.
- 4.- Chandler, M. and Partab T., (1974) Insulin degradation. IX. On the presence of glutathione-insulin transhydrogenase in human leukocytes., *Diabetes* 23:232.
- 5.- Chase, G. D., Joseph L. Rabionowitz., (1967) Principles of Radioisotope Methodology., Burgess Publishing Company. 3a. Ed., Minneapolis. 325,424.
- 6.- Efendic, S., (1974) Quantitative study on the potential effect of arginine on glucose-induced insulin response in healthy, prediabetic and diabetic subjects., *Diabetes* 23:261.
- 7.- Feldman, J. M. and Kenneth E., (1973) Effects of amino acids, epinephrine and heparin upon the radioimmunoassay of insulin in plasma., *Diabetes* 22:9.
- 8.- Ganong, W., (1974) Manual de Fisiología Médica., El Manual Moderno, S. A. 4a. Ed. México. 280.
- 9.- Gorden, P., Barry S. and Jesse R., (1971) Proinsulin-li-

ke component of circulating insulin in the basal state- and in patients and hamsters with islet cell tumors., J. Clin. Invest. 50:2113.

- 10.- Griffey, M., Howard H. and John E., (1974) Extracellu-- lar calciun and acetylcholine-stimulated insulin secretion. Diabetes 23:494.
- 11.- Harper, H., (1971) Review of Physiological Chemistry, - Lange Medical Publications, 3a. Ed. Madrid. 426.
- 12.- Holum J., (1971) Principios de Fisicoquímica, Química - Orgánica y Bioquímica., Limusa-Willey, S. A., 1a. Ed., - México. 528.
- 13.- Karam, J., Gerold M. and Peter H., (1969) Insulin-resis_ tant diabetes with autoantibodies induced by exogenous- insulin. Successful treatment by insulin Withdrawal.,- Diabetes 18:445.
- 14.- MacCuish, A., Jennifer J., C. J. Campbell., L. Duncan - and W. Irvine., (1974) Cell-mediated immunity to human- pancreas in diabetes mellitus., Diabetes 23:693.
- 15 - MacCuish, A., S. Urbaniak., C. J. Campbell., L. Duncan- and W. Irvine., (1974) Phytohemagglutinin transforma- - tion and circulating lymphocyte subpopulations in insu- lin-dependent diabetic patients., Diabetes 23:708.
- 16.- Marenzi, A., (1957) Hormonas., El ateneo, S. A., 1a. Ed. Buenos Aires, Rio de Janeiro, Lima. 285.
- 17.- Ohneda, A., Kiyoshi M., Munehiko S., Shoichi Y. and - - Toshio S., Diabetes 23:41.

- 18.- Pav, J., (1963) Insulin antibodies., Lancet 2:221.
- 19.- Posner, B., (1974) Insulin receptors in human and animal placental tissue., Diabetes 23:209.
- 20.- Schneider, B., Eugene S. and Rosalyn S., (1976) Some considerations in the preparation of radioiodoinsulin for radioimmunoassay and receptor assay., Diabetes 25:--260.
- 21.- Seabriakova, M., (1973) A method for the determination of plasma insulin antibodies and its application in normal and diabetic subjects., Diabetes 22:30.
- 22.- Tietz, N., (1970) Química Clínica Moderna., Edit. Interamericana, 1a. Ed. México. 587.
- 23.- Varandani, P., Yellow S., Mary A. N. and Lois A., (1974) Insulina degradation. VI. Feedback control by insulin of liber glutathione-insulin transhydrogenase in rat., Diabetes 23:117.
- 24.- Velasco, C., Werner O. and Rafael A., (1973) Critical variables in the radioimmunological technique for measuring immunoreactive insulin with use of immunosorbents., Clin. Chem. 19:201.
- 25.- Velasco, C., Harold S. and Rafael A., (1974) Radioimmuno-assay of insulin, with use of an immunosorbent., - Clin. Chem 20:700.
- 26.- Weir, D. M., (1973) Handbook of Experimental Immunology., Blackwell Scientific Publications., 2nd. Ed., Oxford. 17.1.