

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

“FALTA DE ESTANDARIZACION EN LAS MEDICIONES DE INSULINA EN EL
LABORATORIO CLINICO. MITO O REALIDAD.”

T E S I N A

QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE LA
ESPECIALIZACION EN BIOQUIMICA CLINICA

P R E S E N T A

Q.F.B. HECTOR IVAN FLORES HERNANDEZ

NO CUENTA: 504011612

DIRECTOR DE TESINA

DR. JOSE C. PEREZ JAUREGUI



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.

INDICE GENERAL

	PAG
<u>INTRODUCCION</u>	<u>3</u>
<u>GENERALIDADES</u>	<u>5</u>
BIOSÍNTESIS DE LA INSULINA	5
LA SECRECIÓN DE INSULINA	6
ACCIÓN DE LA INSULINA	9
LA INSULINA Y LA DIABETES	11
LA INSULINA Y EL SÍNDROME METABÓLICO	14
INDICACIONES CLÍNICAS DEL ENSAYO DE INSULINA	16
<u>ANTECEDENTES</u>	<u>20</u>
METODOLOGÍAS PARA LA DETERMINACIÓN DE INSULINA	24
INMUNOENSAYOS	24
ENSAYO INMUNOABSORBENTE LIGADO A ENZIMA (ELISA)	26
ENSAYO INMUNO-ELECTROQUIMIOLUMINIMÉTRICO (ICMA)	27
ENSAYO INMUNO-QUIMIOLUMINISCENTE.	28
ESTANDARIZACIÓN DE LOS ENSAYOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE- INSULINA EN SUERO.	29
<u>JUSTIFICACION</u>	<u>32</u>
<u>OBJETIVOS</u>	<u>33</u>

COMPARACIÓN ENTRE LABORATORIOS:	34
VARIABLES QUE PODRÍAN ESTAR OCACIONANDO LA FALTA DE- ESTANDARIZACIÓN	41
IMPRECISIÓN	42
RECUPERACIÓN	43
REACTIVIDAD CRUZADA	43
<u>CONCLUSIONES</u>	<u>44</u>
<u>REFERENCIAS</u>	<u>47</u>

ABREVIATURAS Y SIGLAS

<	Menor que.
μUI	Microunidades internacionales.
aa	Aminoácidos.
Ac	Anticuerpos.
ADA	Asociación Americana de Diabetes.
ADP	Adenosin difosfato.
ATP	Adenosin trifosfato.
C.V.	Coefficiente de Variación.
CAP	Colegio de Patólogos Americanos.
CDC	Centro de Control de Enfermedades de Estados Unidos.
D.E.	Desviación Estándar.
Da	Daltones.
DF	Distrito Federal.
dL	Decilitro.
DMNID	Diabetes mellitus no insulino – dependiente.
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
EAC	Enfermedad arterial coronaria.
EIA	Inmunoensayo enzimático.
ELISA	Inmunoensayo inmunoabsorbente ligado a enzima.
g	Gramos.
GLUT	Transportador de glucosa.
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión.
Hrs	Horas.
ICMA	Ensayo inmuno-electroquimioluminimétrico.
IRS	Sustrato del receptor de insulina.
K	Potasio.

mg	Miligramos.
mmol	milimol.
N – terminal	Amino-terminal.
NCEP-ATP III	Tercer reporte del panel de expertos del programa nacional de educación en colesterol.
nmol	nanomol.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
P	Fósforo.
pH	Concentración de iones hidrogeno.
PI3 cinasa	Fosfatidil inositol-3- cinasa.
PROM	Promedio.
RIA	Radioinmunoanálisis.

Falta de estandarización en las mediciones de insulina en el laboratorio clínico. Mito o realidad.

RESUMEN

De acuerdo a lo que se ha publicado en diferentes trabajos por diversos grupos de autores, aunque la medición de insulina en suero se ha venido realizando en los laboratorios de análisis clínicos e investigación desde hace ya más de 40 años, se ha establecido por acuerdo que no existe en la actualidad un método estandarizado disponible para medir dicha hormona, por lo que entre otras cosas, los resultados que se obtienen en diferentes laboratorios no pueden ser comparables entre sí además de que por lo mismo no ha sido posible establecer valores de referencia aceptados universalmente.

Originalmente la medición de insulina se describió utilizando la metodología del radioinmunoensayo, sin embargo, con los avances en la investigación en el desarrollo de nuevas metodologías e instrumentación, en la actualidad la hormona puede cuantificarse con instrumentos automatizados utilizando métodos inmunométricos que utilizan trazadores luminiscentes, todo lo cual los hace altamente reproducibles.

No obstante lo anterior y a pesar de las grandes ventajas de estos inmunoensayos utilizados hoy en día para las mediciones de proteínas, péptidos y moléculas pequeñas en concentraciones muy escasas, para el caso de la insulina, no se han logrado definir con certeza ni la exactitud ni la sensibilidad de los ensayos, de tal

forma que en los laboratorios clínicos continúan apareciendo sustancias en las muestras de pacientes que causan interferencias en las metodologías utilizadas.

En este trabajo se hace un análisis de los diferentes estudios publicados en los últimos años que hacen referencia a la falta de estandarización en la cuantificación de insulina en los laboratorios clínicos a nivel mundial y en nuestro país, así como de la problemática que representa la interpretación de estos.

INTRODUCCIÓN

A través de los años, la insulina ha entregado al mundo científico páginas fascinantes relativas a su descubrimiento, estructura, mecanismos de acción, cuantificación *in vitro* en el laboratorio, aplicación terapéutica y su participación en la fisiopatogenia de la diabetes mellitus. Sin embargo, los grupos de expertos que estudian la diabetes tanto en los Estados Unidos como a nivel internacional, han establecido que la cuantificación de insulina no es una prueba de utilidad clínica en los pacientes diabéticos. Lo que resulta incuestionable es que, independientemente de la utilidad de los resultados de la cuantificación de la concentración sérica de la insulina, ya sea para uso clínico o con propósitos de investigación, los laboratorios de análisis clínicos deben buscar garantizar a la comunidad médica y científica que los resultados de su cuantificación en suero son confiables y comparables entre sí.

Es por ello que la Asociación Americana de Diabetes (ADA) creó en 1996 un Grupo de Trabajo con la misión de intentar estandarizar el ensayo para la medición de insulina y más recientemente, en 2004, se convocó nuevamente a un grupo internacional de expertos a quienes se dio la tarea de evaluar la especificidad de diferentes ensayos comerciales,⁽¹⁾ de establecer guías y criterios de aceptabilidad de los ensayos, y de desarrollar un programa de estandarización, dando así continuidad a los trabajos iniciados algunos años antes.

En este trabajo hacemos un análisis de los diferentes estudios publicados en los últimos años que hacen referencia a las causas y problemática relacionada con la falta de estandarización en la cuantificación de insulina en los laboratorios clínicos

a nivel mundial y a las dificultades que esto genera en la interpretación de los resultados.

GENERALIDADES

BIOSÍNTESIS DE LA INSULINA

La insulina es producida por las células β de los islotes pancreáticos de Langerhans y consta de 51 aminoácidos (5,808 Da) contenidos en dos cadenas peptídicas: Una cadena A con 21 aminoácidos (aa) y una cadena B, con 30.

Su molécula precursora, la preproinsulina (11,500 Da), después de ser sintetizada entra al retículo endoplásmico en donde es escindida por enzimas microsomales para convertirse, casi inmediatamente después de su síntesis, en proinsulina. La proinsulina es transportada al aparato de Golgi donde es empaquetada en gránulos secretorios recubiertos de clatrina.

La proinsulina consiste en una cadena simple de 86 aa (9,600 Da) que contiene 3 puentes disulfuro e incluye las cadenas A y B de la insulina más un segmento conector de 35 aa (péptido-C).

Posteriormente los gránulos secretorios maduran perdiendo su cubierta de clatrina, y las moléculas de proinsulina son literalmente partidas, por acción de las *endoproteasas, proconvertasa 2 y 3, y de la carboxipeptidasa H*, primero en productos intermedios denominados *formas des* de proinsulina parcialmente procesada, y posteriormente en insulina y péptido-C (figura 1).

Una pequeña cantidad de proinsulina se escapa al rompimiento parcial o total, por lo que los gránulos secretorios maduros normales contienen insulina y péptido C en cantidades equimolares, así como entre 2% y 6% de proinsulina intacta y parcialmente fraccionada.

Lo anterior ocasiona que, cuando mediante exocitosis, la insulina es secretada al torrente sanguíneo, es acompañada siempre de una cantidad equimolar de péptido-C y de pequeñas cantidades de proinsulina(2-3).

LA SECRECIÓN DE INSULINA

La glucosa es el principal regulador para la secreción de insulina por las células β pancreáticas, aunque también ejercen su influencia los aminoácidos, las cetonas, y diversos nutrientes. De este modo, cuando los niveles de glucosa en el organismo alcanzan cifras >70 mg/dL (3.9 mmol/L) se produce el estímulo para que se sintetice la insulina iniciándose una serie de señales que estimulan la traducción y procesamiento de la proteína, además de inducirse su secreción, todo lo cual se lleva a cabo mediante una compleja serie de pasos regulatorios que inician con el transporte de glucosa al interior de la célula β de los islotes de Langerhans a través del *transportador de glucosa* GLUT2 (figura 2).

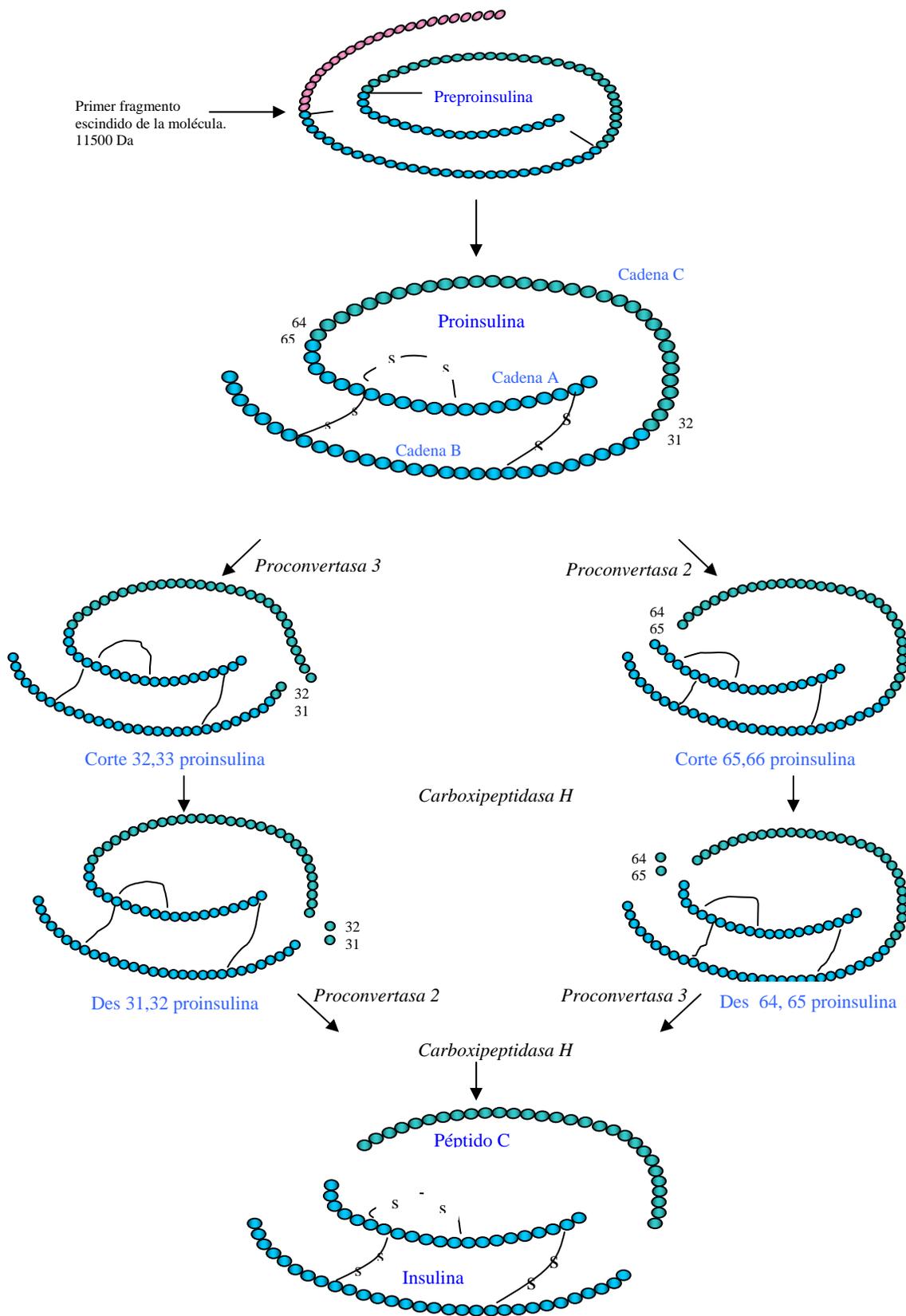


Figura 1. Modificado de D Chevenne et al. Procesamiento de la proinsulina a insulina y péptido C. Se indican también los cortes realizados por las endopeptidasas y los fragmentos resultantes de proinsulina parcialmente procesada.

Una vez dentro, la glucosa es fosforilada por la glucocinasa formando glucosa-6-fosfato, la cual a su vez genera mediante su metabolismo a través de la glucólisis, moléculas de ATP que inhiben la actividad del canal de K^+ sensible al ATP. Este canal es un complejo de 2 proteínas independientes, una de las cuales es el receptor de ciertos medicamentos antidiabéticos orales (sulfonilureas, meglitinidas); la otra subunidad es una proteína del canal de K^+ rectificador hacia el interior. La inhibición de éste canal de K^+ induce la despolarización de la membrana de la célula β , abriendo los canales de calcio dependientes del voltaje (lo que conduce a la entrada de calcio) y la estimulación de la secreción de insulina.

La secreción de insulina tiene un patrón pulsátil de liberación hormonal, con pequeñas secreciones de la hormona, y de péptido-C, que se producen aproximadamente cada 10 ó 15 minutos, superpuestas a oscilaciones ultradianas de mayor amplitud de entre 1 y 3 horas⁽⁴⁻⁶⁾.

Las comidas, u otros estímulos importantes de la secreción de insulina, inducen grandes descargas de secreción de insulina que suelen durar 2 ó 3 horas antes de volver al nivel basal.

Por ejemplo, en la diabetes tipo 2, intolerancia a la glucosa y en el insulinoma, estos patrones normales de secreción están alterados.

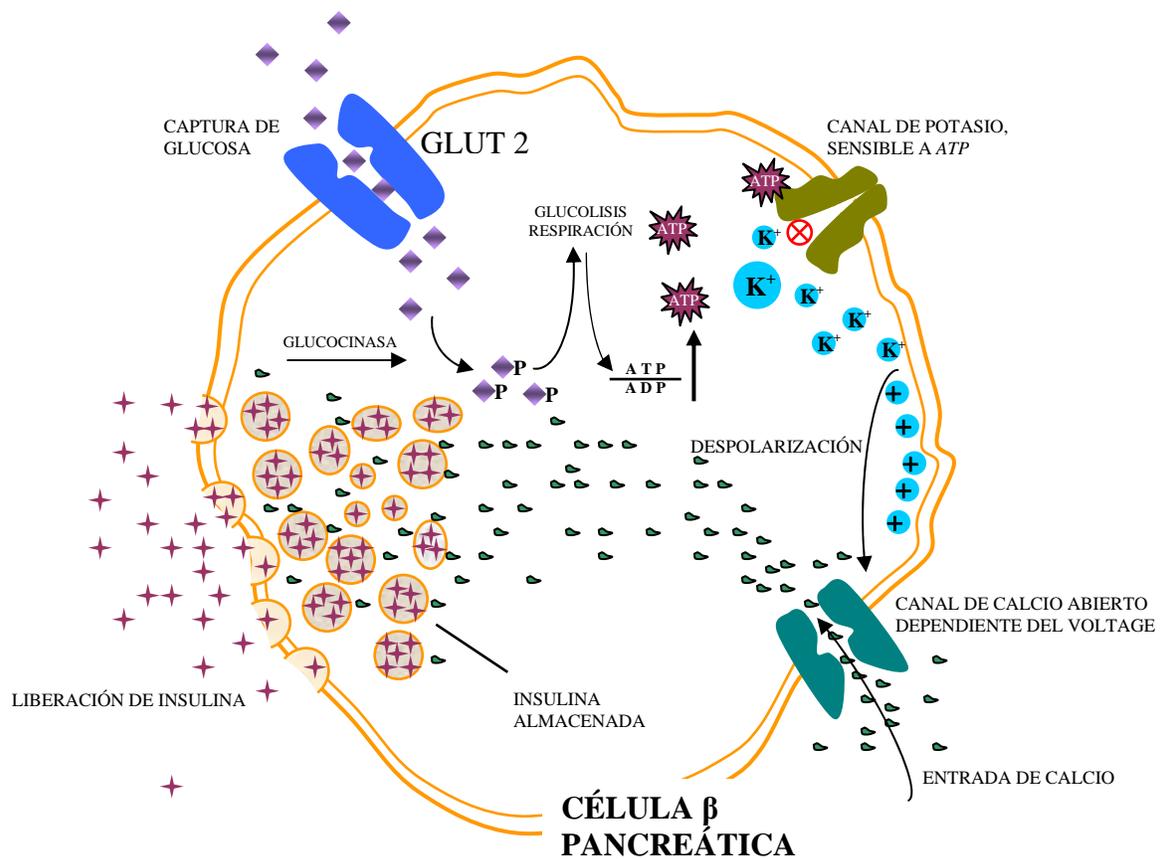


Figura 2. Modificado de www.betacell.org. Secreción de insulina. Esquema que ilustra el estímulo que desencadena la molécula de glucosa en la célula β pancreática. La glucosa es introducida a la célula por el transportador de glucosa GLUT 2; posteriormente es metabolizada dentro de la célula alterando la actividad de los canales iónicos, lo que conduce a la secreción de insulina.

ACCIÓN DE LA INSULINA

La insulina, una vez secretada a la vena porta, se elimina y degrada en un 50% en su primer pasaje por el hígado. La insulina que no es degradada penetra en la circulación venosa sistémica y se une a su receptor en los lugares de acción u órganos blanco. Dicho receptor de insulina de la célula, pertenece a la clase tirosina cinasa de receptores unidos a la membrana. Cuando la insulina se une a su receptor, estimula la actividad intrínseca de la tirosina cinasa, provocando la autofosforilación del receptor así como el reclutamiento de moléculas de señalización intracelular, como los sustratos de receptor de insulina (IRS; insulin

receptor substrates) 1 y 2 (figura 3). Estas moléculas de señalización, junto con otras, inician una compleja cascada de reacciones de fosforilación y desfosforilación que son causantes de los amplios efectos metabólicos y mitógenos de la insulina⁽⁷⁾.

Por ejemplo, (ver figura 3) la activación de la vía del fosfatidil-inositol-3'-cinasa (PI-3 cinasa) estimula la translocación de los transportadores de glucosa GLUT4 a la superficie celular, lo cual constituye un suceso crucial para la captación de glucosa por el músculo y el tejido adiposo. Mientras que por otro lado, la activación de las otras vías de señalización induce la síntesis de glucógeno, la síntesis de proteínas, la lipogénesis y la regulación de diversos genes en células que responden a la insulina.

La homeostasis de la glucosa refleja un equilibrio preciso entre la producción hepática de glucosa y la captación y utilización periférica de la misma. El regulador más importante de este equilibrio es la insulina y a ella se suman los efectos de otras vías, como las aferencias nerviosas, las señales metabólicas y las hormonas (como el glucagon), para generar el control integrado del aporte y la utilización de la glucosa⁽⁸⁾.

De este modo, en ayunas los bajos niveles de insulina promueven la gluconeogénesis y la glucogenólisis hepática para evitar la hipoglucemia. Los niveles bajos de insulina disminuyen también la síntesis de glucógeno y la captación de glucosa en los tejidos sensibles a la insulina, y promueven además la movilización de los precursores almacenados.

Los niveles reducidos de insulina, influyen también sobre la capacidad del glucagon de estimular la glucogenólisis y la gluconeogénesis por el hígado y la médula renal. Estos procesos son de importancia capital para asegurar un suministro adecuado de glucosa al cerebro.

En la fase posprandial, una gran carga de glucosa desencadena un ascenso de la insulina y una caída del glucagon, con lo que estos procesos se invierten. La parte principal de la glucosa posprandial es utilizada por el músculo esquelético. Otros tejidos, especialmente el cerebro, utilizan la glucosa por mecanismos independientes a la misma⁽⁹⁾.

LA INSULINA Y LA DIABETES

La respuesta del organismo a la glucosa en sangre requiere de la coordinación de toda una serie de mecanismos. Fallas o insuficiencia en cualquiera de los componentes involucrados en la regulación, secreción o captación de la insulina pueden ocasionar en forma secundaria un incremento en los niveles de glucosa en la sangre. Así mismo, cualquier daño en las células beta, que producen la insulina, incrementará los niveles de glucemia.

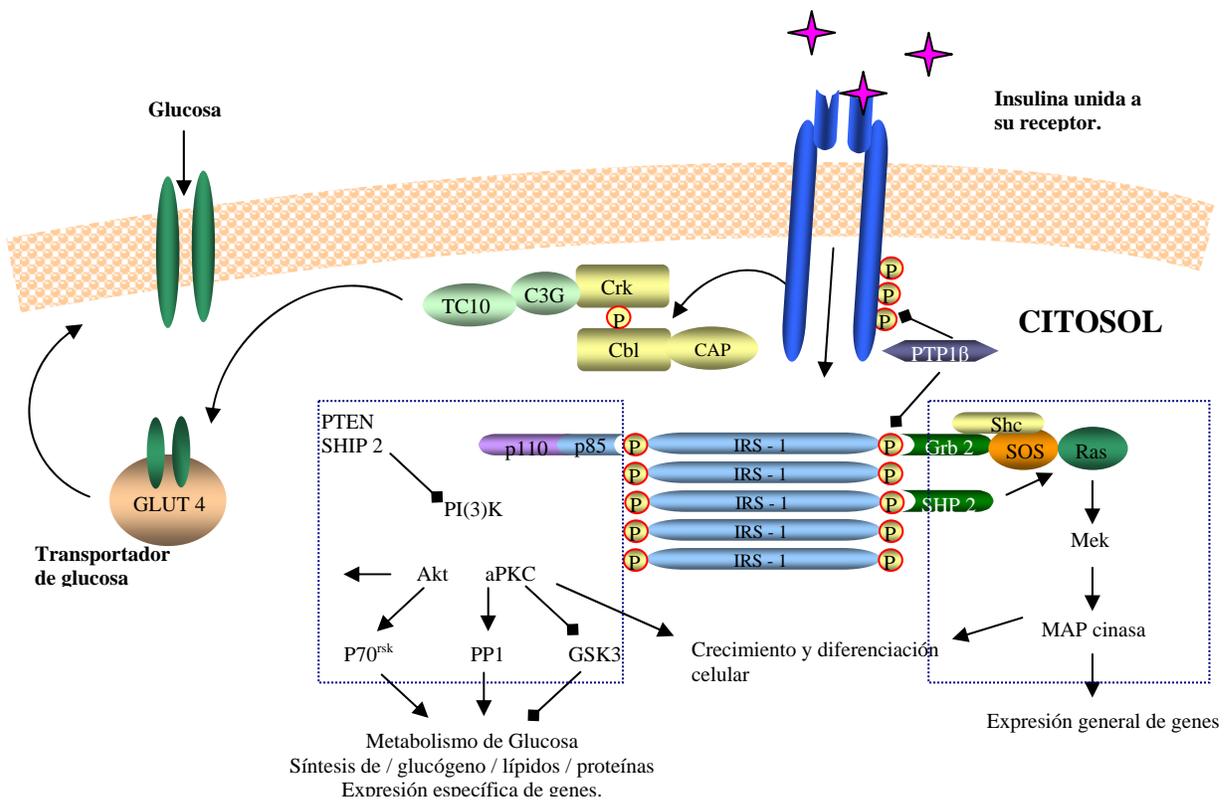


Figura 3. Modificado de Insight review articles. Transmisión de la señal en la acción de la insulina. El receptor de la insulina es una *tirosin cinasa* que experimenta autofosforilación y que a su vez, cataliza la fosforilación de proteínas celulares tales como; los miembros de la familia de las IRS, Shc y Cbl. En cuanto a la fosforilación de la tirosina, estas proteínas interactúan con moléculas de señalización a través de sus dominios SH2 resultando en una serie de diversas rutas de señalización, incluyendo la activación de PI(3)K PtdIns(3,4,5)P dependiente de proteínas cinasas, ras y la cascada de cinasas MAP, Cbl/CAP y la activación de TC10. Estas rutas actúan de una manera concertada para coordinar la regulación del tráfico de vesículas, síntesis de proteínas, activación e inactivación enzimática y expresión génica, lo cual resulta en la regulación del metabolismo de glucosa, lípidos y proteínas.

La diabetes mellitus, conocida comúnmente como diabetes, es una enfermedad metabólica que se caracteriza por niveles anormalmente altos de glucosa en la sangre. Mientras que las personas que no son diabéticos producen insulina para reducir los niveles elevados de glucemia (por ejemplo, después de ingerir alimentos) en el diabético dichos niveles permanecen altos. Esto puede deberse a

que no se está produciendo insulina, o no se está produciendo en cantidades suficientes capaces de reducir los niveles de glucemia, como es el caso de la diabetes tipo 1, o bien que se esté produciendo suficiente insulina pero que los órganos blanco no la utilicen, como sucede en la diabetes tipo 2. Aunque regularmente en este último tipo de diabetes, co-existen alteraciones en la secreción de insulina con grados variables de resistencia a la insulina.

La Asociación Americana de Diabetes (ADA) ha establecido en el último consenso y actualización del año 2003 a través de su *Comité de expertos en el diagnóstico y clasificación de la diabetes mellitus* ⁽¹⁰⁾ que los criterios diagnósticos para Diabetes son los siguientes:

1. Síntomas de diabetes, más concentración de glucosa casual ≥ 200 mg/dL. Casual significa, en cualquier momento del día, independientemente de la hora de ingesta del último alimento. Los síntomas clásicos de diabetes incluyen poliuria, polidipsia, y pérdida de peso inexplicable, o
2. Glucosa sérica en ayunas ≥ 126 mg/dL. Ayunas es definido como no ingesta calórica por lo menos de 8 horas, o
3. Glucosa a las 2 hrs. ≥ 200 mg/dL, durante una curva de tolerancia oral a la glucosa (CTOG). Esta prueba debe ser realizada de acuerdo a la OMS, usando una carga de glucosa de 75 g de glucosa anhidra disuelta en agua.

En ausencia de hiperglucemia clara o inequívoca con descompensación metabólica, estos criterios deben ser confirmados repitiendo la prueba en un día diferente.

LA INSULINA Y EL SÍNDROME METABÓLICO

El síndrome metabólico o síndrome de resistencia a la insulina fue descrito en 1988 por Reaven⁽¹¹⁾, quién originalmente lo llamó síndrome X. Este síndrome se caracteriza por la asociación entre alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos, obesidad, dislipidemias e hipertensión arterial y la presencia de resistencia a la insulina.

Aunque aún hoy en día no se conoce con certeza la causa del síndrome metabólico, es claro que la presencia de obesidad es uno de sus agentes causales y que la mayoría de los pacientes obesos cursan con hiperinsulinemia y menor sensibilidad a la acción de la insulina⁽¹²⁾.

Hablar del síndrome metabólico lleva a definiciones y resultados contradictorios ya que existen múltiples definiciones y criterios diagnósticos establecidos acerca del síndrome metabólico además de que no existen marcadores genéticos o pruebas diagnósticas específicas.

Por otro lado, diferentes grupos han publicado varias definiciones del síndrome de las cuales destacan la de la Organización Mundial de la Salud, el Grupo Nacional de Educación en Colesterol (NCEP-ATPIII)⁽¹³⁾, el Grupo Europeo de Estudio de la Resistencia a la Insulina, la Federación Internacional de Diabetes, y el de la Asociación Americana de Endocrinólogos Clínicos.

Aunque el síndrome metabólico se asocia a la presencia de resistencia a la insulina, es contradictorio si se requiere utilizar algún método diagnóstico de laboratorio para establecerla.

El mejor método para medir la sensibilidad tisular a la acción de la insulina es el “clamp” o pinza metabólica euglucémica⁽¹⁴⁾.

Brevemente, consiste en administrar insulina al paciente hasta alcanzar una concentración estable determinada (comúnmente 100 uUI/mL); Una vez que se alcanza dicha concentración, se aplica glucosa por vía intravenosa. El indicador del grado de resistencia a la acción de la insulina es la cantidad de glucosa que se necesita administrar para mantener la normoglucemia (80-90 mg/dL).

Como puede deducirse, este es un procedimiento costoso y laborioso que se utiliza en la actualidad sólo en investigación, resultando evidentemente poco práctica su utilización en el ejercicio de la clínica diaria.

Para sustituirlo se han descrito diferentes modelos matemáticos que utilizando las concentraciones de glucosa e insulina en ayunas y postprandiales, además de constantes aritméticas, sirven para estimar la sensibilidad a la insulina, y que correlacionan muy adecuadamente con la técnica del “clamp”.

La Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología establece⁽¹⁵⁾ que el solicitar determinaciones de insulina en la práctica clínica cotidiana tiene inconvenientes importantes por lo que además de ser un gasto innecesario para el paciente, su resultado es de poco o ningún valor, al no contar con la estandarización del ensayo de insulina y puntos de corte bien definidos para establecer el diagnóstico de resistencia a la insulina.

La posición de dicha Sociedad concluye que determinar los niveles de insulina, o fórmulas derivadas de esta, en la definición del síndrome metabólico, es poco confiable.

INDICACIONES CLÍNICAS DEL ENSAYO DE INSULINA

Este tema resulta sin duda controversial. Como hemos mencionado anteriormente, la cuantificación de insulina en suero es utilizada principalmente para propósitos de investigación y sólo en contadas excepciones es conveniente y útil realizar el ensayo de insulina para fines clínicos y diagnósticos.

Aunque no es el objeto de este trabajo la revisión y discusión acerca de las indicaciones del ensayo de insulina para la toma de decisiones clínicas, revisaremos brevemente algunas de sus principales indicaciones.

Como ya revisamos anteriormente, de acuerdo con los criterios actuales para el diagnóstico de diabetes, es claro que la medición de la concentración de insulina en sangre no es un examen que esté indicado realizar para el diagnóstico de diabetes mellitus.

En el síndrome metabólico, aunque los métodos accesibles para el clínico en la práctica cotidiana del consultorio para evaluar la resistencia a la insulina pudieran incluir la determinación de la concentración de insulina sérica o la relación glucosa/insulina en ayunas y posterior a una carga oral estándar de glucosa, su confiabilidad es cuestionable por la gran variabilidad en los valores de insulina en sujetos sanos y con resistencia a la insulina, por la falta de estandarización del ensayo, y por la falta de puntos de corte bien definidos para separar valores normales de anormales.

Una de las indicaciones de utilidad clínica más aceptada es la cuantificación de la concentración de insulina en suero para establecer el diagnóstico y patogénesis de la hipoglucemia en ayunas.

Del mismo modo, el diagnóstico de un tumor de células del islote pancreático se basa en la persistencia de concentraciones de insulina plasmática inapropiadamente elevadas con concentraciones bajas de glucosa.

Recientemente se ha descrito además que resulta clínicamente útil conocer las concentraciones séricas de insulina en la evaluación y manejo de las pacientes con el síndrome de ovarios poliquísticos, en el que las mujeres que lo padecen manifiestan resistencia a la insulina por exceso de andrógenos así como por anomalías en el metabolismo de los carbohidratos. Es necesario en estos casos documentar, utilizando cuantificaciones de insulina en conjunto con mediciones de glucosa sérica la resistencia a la insulina.

También se ha publicado evidencia científica de que el incremento en las concentraciones de insulina y/o pro-insulina en individuos no diabéticos, predice el desarrollo de enfermedad arterial coronaria (EAC).

Aunque esta posibilidad pueda ser científicamente válida, su utilidad clínica sigue siendo cuestionable ya que, si bien la hiperinsulinemia permite estimar indirectamente la resistencia a la utilización de la glucosa (mediada por insulina) por sus órganos blanco, e identificar así a individuos en riesgo de tener o desarrollar el síndrome de resistencia a la insulina o síndrome metabólico, no es suficientemente claro aún que el incremento en el riesgo de EAC sea atribuible a la propia elevación de insulina en sangre por lo que, de alguna forma, pierde valor el conocer los niveles sanguíneos de insulina por sí mismos ⁽¹⁶⁻¹⁷⁾.

Por lo anterior, parece ser más útil cuantificar las consecuencias de la resistencia a la insulina y de la hiperinsulinemia, como la tensión arterial, el grado de

tolerancia a la glucosa, las concentraciones de triglicéridos y de colesterol de alta densidad, que los valores de la hormona por sí mismos.

Al fin y al cabo, las intervenciones clínicas están enfocadas a corregir estas últimas alteraciones, y no a intentar corregir las concentraciones de insulina o pro-insulina.

De cualquier forma e independientemente de la utilidad clínica o no de la cuantificación de la concentración de insulina sérica, si las metodologías actualmente disponibles no están estandarizadas, de poco servirá cuantificar la insulina sérica si no se dispone de un método estandarizado que permita su aplicación universal en los laboratorios de análisis clínicos, y que posibilite en consecuencia establecer los valores de referencia, separando claramente los valores normales de los anormales.

ANTECEDENTES

Aunque el primer ensayo de laboratorio clínico para la cuantificación de insulina fue descrito hace 50 años, resulta claro que por diferentes circunstancias, en los albores del siglo 21 no contamos aún con un método de laboratorio estandarizado que permita hacer comparables los resultados de las mediciones de insulina obtenidas de diferentes laboratorios, en los diferentes países del mundo. Basta recordar cuando en 1922 se revolucionó el tratamiento de la diabetes al ser aplicada por vez primera insulina a un paciente diabético, y luego cuando algunos años después, en 1959, se describió el radioinmunoanálisis, un método de laboratorio innovador para cuantificar la concentración de insulina en el humano, mismo que además sirvió de plataforma para la estructuración de metodologías basadas en inmunoensayos para la cuantificación de innumerables analitos en el laboratorio clínico ⁽¹⁸⁾.

Hoy en día, gracias a esas y a otras grandes y trascendentes contribuciones, que por cierto han representado para algunos científicos que se han entregado a su estudio un buen número de premios Nobel, hoy sabemos mucho acerca de la insulina y de su papel en los mecanismos de acción del metabolismo de carbohidratos y lípidos, así como de su asociación en la fisiopatogenia de diversas enfermedades tales como diabetes, síndrome metabólico, insulinoma, aterosclerosis de vasos coronarios y periféricos, hipertensión, dislipidemia, síndrome de ovarios poliquísticos, entre otras. ^(19, 20)

Aunque, como ya mencionamos con anterioridad, el ensayo para la cuantificación de insulina fue introducido hace casi 50 años, aún existen grandes retos y

problemas analíticos por resolver en lo que se refiere a la medición de la hormona y sus moléculas relacionadas, tales como la pro-insulina y el péptido C. De hecho, el consenso mundial es que no existe en la actualidad en los laboratorios de análisis clínicos un método estandarizado disponible para medirla por lo que, los resultados que en la práctica diaria se obtienen en diferentes laboratorios clínicos no son comparables entre sí, además de que por las mismas razones, tampoco se han podido establecer valores de referencia que sean universalmente aceptados.⁽²¹⁾

Por otro lado, gracias a los avances en la robótica, la informática, y en la investigación y uso de anticuerpos monoclonales, con el paso de los años se han venido desarrollando nuevas metodologías e instrumentación que permiten que en la actualidad la hormona pueda ser cuantificada en instrumentos automatizados, con métodos inmunométricos que utilizan marcadores quimioluminiscentes, todo lo cual en conjunto los hace altamente reproducibles.

Sin embargo y a pesar de las grandes ventajas de dichos inmunoensayos utilizados hoy en día para las mediciones de proteínas, péptidos y moléculas pequeñas en concentraciones muy escasas, no se han logrado definir con certeza ni la exactitud ni la sensibilidad de los ensayos para la insulina sérica y en los laboratorios clínicos continúan apareciendo sustancias en las muestras de pacientes, que causan interferencias en las metodologías utilizadas, posiblemente en parte relacionadas con variables no específicas; tales como cambios menores en la fuerza iónica concentración de iones hidrogeno (pH), o la osmolalidad en la mezcla de la reacción final y finalmente auto-anticuerpos^(22, 23). Por otro lado y

través de observaciones personales y a manera de ejemplo, los resultados del programa de Evaluación Externa de la Calidad del College of American Pathologists de los Estados Unidos⁽²⁴⁾, muestra los resultados promedios de una misma muestra enviada a 497 laboratorios y analizada en instrumentos de 10 diferentes marcas comerciales, pueden ir desde 26.4 hasta 138.41 $\mu\text{UI/mL}$, lo que refleja las enormes diferencias existentes entre los resultados que emiten los laboratorios de análisis clínicos.

Otro aspecto relevante y sumamente controversial sobre la insulina versa en torno a las indicaciones clínicas para su cuantificación. Se ha discutido en extenso con relación a ello y existen diferentes posturas, unas a favor y otras en contra de su utilidad en diversas entidades clínicas.

La cuantificación de insulina es utilizada en pacientes con hipoglucemia y en la investigación de la patogénesis y tratamiento de la diabetes mellitus, aunque en este último caso, sólo para propósitos de investigación; sin embargo, grandes estudios epidemiológicos⁽²⁵⁻²⁷⁾ han demostrado que las concentraciones séricas de insulina predicen el desarrollo de diabetes tipo 2 y que están asociadas con el riesgo de varias enfermedades degenerativas tales como aterosclerosis coronaria y de vasos sanguíneos periféricos, hipertensión y dislipidemia. De este modo, los grupos de expertos que estudian la diabetes tanto en los Estados Unidos como a nivel internacional, han establecido que la cuantificación de insulina no es una prueba de utilidad clínica en los pacientes diabéticos.

Todas estas sugerencias y muchas otras más que comentaremos más adelante, siguen siendo motivo de discusión. Lo que resulta incuestionable es que,

independientemente de la utilidad de los resultados de la cuantificación de la concentración sérica de la insulina, ya sea para uso clínico o con propósitos de investigación, los laboratorios de análisis clínicos deben buscar garantizar a la comunidad médica y científica que los resultados de su cuantificación en suero son confiables y comparables entre sí.

Es por ello que la Asociación Americana de Diabetes (ADA) creó en 1996 un Grupo de Trabajo con la misión de intentar estandarizar el ensayo para la medición de insulina. Más recientemente, en 2004, se convocó nuevamente a un grupo internacional de expertos⁽²⁸⁻²⁹⁾ a quienes se dio la tarea de evaluar la especificidad de diferentes ensayos comerciales, de establecer guías y criterios de aceptabilidad de los ensayos, y de desarrollar un programa de estandarización, dando así continuidad a los trabajos iniciados algunos años antes.

Es indudable que ha habido progresos importantes como son el advenimiento de los anticuerpos monoclonales, la informática y la robótica que han permitido automatizar los procesos analíticos y por ende hacerlos altamente reproducibles y precisos, por mencionar solo algunos.

Sin embargo, el hecho es que los resultados que se obtienen al cuantificar insulina sérica al utilizar las diferentes metodologías, reactivos, instrumentos y estándares, de las diferentes marcas y casas comerciales, no son comparables entre sí.

A continuación se describen brevemente las diversas metodologías con sus respectivos fundamentos.

METODOLOGÍAS PARA LA DETERMINACIÓN DE INSULINA

Los cuatro métodos básicos para la medición de insulina y sus precursores son los bioensayos, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), espectrofotometría de masas con dilución de isótopos estables, y los inmunoensayos. En la actualidad, estos últimos son los únicos utilizados en el laboratorio clínico de rutina.

Los bioensayos de insulina miden la actividad biológica de la insulina en animales, son relativamente imprecisos e insensibles, y son utilizados principalmente para establecer estándares internacionales así como para la estandarización comercial de insulinas terapéuticas. Los métodos cromatográficos, especialmente HPLC, son regularmente utilizados en el análisis de preparaciones farmacéuticas, la validación de inmunoensayos y el análisis de insulina de diferentes especies, aunque requieren de cantidades grandes de plasma y además son muy laboriosos⁽³⁰⁻³²⁾.

INMUNOENSAYOS

Después de los primeros trabajos de Berson y Yalow, quienes en 1959 desarrollaron el primer inmunoensayo, en este caso utilizando un trazador isotópico (RIA o radioinmunoensayo), los inmunoensayos han evolucionado dramáticamente hasta nuestros días. Los hay manuales o automatizados y tienen una gran cantidad de aplicaciones que van desde la detección y cuantificación de hormonas, la identificación de antígenos y anticuerpos en enfermedades infecciosas, marcadores tumorales, fármacos, entre otros.

Independientemente de la aplicación o de la tecnología subyacente utilizada, los inmunoensayos dependen de cuatro componentes básicos:

- 1) el antígeno a ser identificado;
- 2) el anticuerpo o antisuero usado para la detección;
- 3) el método para separar el complejo antígeno-anticuerpo unido, de los reactantes no unidos (si el ensayo usado es heterogéneo); y
- 4) el método de detección⁽³³⁾.

La eficacia de cualquier inmunoensayo depende de dos principales factores que son, la eficiencia en la formación del complejo antígeno-anticuerpo, y la capacidad para detectar dichos complejos.

Un requisito fundamental para los inmunoensayos es la disponibilidad de moléculas orgánicas que puedan unirse a dominios específicos presentes en el blanco u objetivo. Tradicionalmente los anticuerpos han cumplido con este papel ya que son relativamente fáciles de producir y pueden ser seleccionados para que posean las características de afinidad deseadas⁽³⁴⁻³⁶⁾.

Actualmente hay disponibles numerosos formatos de inmunoensayos con los que es posible detectar y medir prácticamente cualquier sustancia, incluyendo desde moléculas muy pequeñas (fármacos) o muy escasas, hasta antígenos celulares complejos. Los diferentes inmunoensayos pueden ser: radioinmunoensayo o RIA (que fue el primero de todos), inmunoensayo enzimático (EIA), que prácticamente ha desplazado al RIA, así como diversos derivados de ensayos tipo “sándwich” basados en métodos de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), los

cuales fueron desarrollados en los años 70's usando sustratos cromogénicos, y que en la actualidad utilizan sustratos y marcadores quimioluminiscentes (ICMA), electroquimioluminiscentes, y fluorescentes (FPIA).

ENSAYO INMUNOABSORBENTE LIGADO A ENZIMA (ELISA)

Desde los años 70's, los ELISA han sido el estándar contra el cual es medido el desempeño de los inmunoensayos. Son quizá los inmunoensayos mejor entendidos y más comúnmente utilizados⁽³⁷⁾.

Los ELISA's que detectan agentes biológicos son ensayos heterogéneos en donde el agente (virus) o el antígeno específico del agente, es capturado en una placa de plástico multipozos, o en un tubo de plástico, por un anticuerpo de "captura" que está previamente unido a la matriz sólida (ya sea la placa o el tubo). El antígeno unido es entonces detectado utilizando un anticuerpo "detector" secundario. El anticuerpo detector puede estar directamente marcado con una molécula generadora de una señal, o puede ser detectado con algún otro anticuerpo que esté marcado con una enzima. Estas enzimas catalizan una reacción química con un sustrato que resulta en un cambio colorimétrico. La intensidad de este color puede ser medida con un espectrofotómetro, el cual determina la densidad óptica de la reacción usando una luz a una longitud de onda específica. Muchos formatos de ELISA's requieren anticuerpos de dos diferentes especies de animales de tal forma que no tienen interacción directa al formar el "sándwich".

Existen muchas combinaciones de enzima-sustrato diferentes que son efectivas generando señales que pueden ser detectadas a través de lectores disponibles o bien a simple vista.

Las principales ventajas de los ELISA's son: 1) son comúnmente utilizados y entendidos por los laboratorios clínicos ; 2) pueden ser adaptados para procesarse en grandes volúmenes; 3) los anticuerpos utilizados no requieren de ningún tipo de tratamiento o purificación especial.⁽³⁸⁾

ENSAYO INMUNO-ELECTROQUIMIOLUMINIMÉTRICO (ICMA)

El ensayo inmuno-electroquimioluminimétrico es una metodología novedosa muy promisoriosa y semejante a los ELISA's, aunque en este caso el anticuerpo detector está marcado directamente con un trazador quimioluminiscente. El proceso electro-quimioluminiscente está basado en la formación de un intermediario químico en estado excitado que posteriormente regresa a su estado basal mediante la emisión de un fotón. Esta técnica de excitación es diferente de aquellas en las cuales el estado excitado es alcanzado por la absorción de un fotón. El trazador quimioluminiscente más frecuente y comúnmente utilizado es el Rutenio (Ru). Algunos ensayos incluyen partículas recubiertas con anticuerpos de captura que en presencia del agente biológico, forman los complejos inmunes antígeno-anticuerpo entre el agente y el anticuerpo detector marcado. Debido a su pequeño tamaño, el rutenio puede ser fácilmente conjugado a cualquier proteína ligando sin afectar la inmunoreactividad o solubilidad de la proteína. En un ensayo típico de detección de agentes, la muestra es agregada a una mezcla de

partículas paramagnéticas recubiertas con anticuerpos de captura y con anticuerpos detectores conjugados con rutenio. Después de un corto periodo de incubación el analizador vierte la muestra a un flujo celular, captura y lava las partículas magnéticas, y mide la señal electro-quimioluminiscente.

ENSAYO INMUNO-QUIMIOLUMINISCENTE.

La quimioluminiscencia es una reacción química en la cual uno de los productos de la reacción es luz. La enzima peroxidasa puede reaccionar con moléculas tales como el luminol para producir luz como parte del producto de la reacción. La reacción del luminol ocasiona una emisión de fotones en el rango de los 400 a 450 nm. La baja producción de fotones en esta reacción, ha limitado su sensibilidad y su aplicabilidad. Sin embargo al agregar moléculas potenciadoras, como la luciferina, 6-hidroxibenzotiazol, la reacción puede prolongarse por muchos minutos más, aumentando la emisión de fotones en miles de veces. La reacción puede ser medida por tubos foto multiplicadores muy sensibles.

Una desventaja del método es que la reacción es llevada a cabo en un sistema heterogéneo en el cual la peroxidasa está unida a una fase sólida. La peroxidasa y el luminol deben estar en un sistema libre de matrices biológicas comunes, tales como el suero, y por lo tanto es necesario un paso de separación.

Otros sistemas de trazadores generan reacciones quimioluminiscentes cuantitativas, utilizando ésteres de acridinio aromáticos y dioxetanos. Los ésteres de acridinio son oxidados por peróxido de hidrógeno para producir luz, mientras que los dioxetanos se convierten en derivados estables de ésteres de fosfato que,

cuando son hidrolizados, son degradados espontáneamente, generando luz como uno de los productos⁽³⁹⁾.

ESTANDARIZACIÓN DE LOS ENSAYOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE INSULINA EN SUERO.

En el inicio del desarrollo de los métodos para cuantificar insulina humana, una de las principales dificultades encontradas fue la ausencia de estándares de insulina pura. Únicamente había disponibilidad de estándares caseros que contenían mezclas de insulinas bovina y porcina, las cuales tienen diferencias inmunoquímicas con la insulina humana. Los laboratorios pioneros en la cuantificación de insulina utilizaban dichos estándares “caseros” con los cuales hacían sus propias calibraciones internas del ensayo, todo lo cual ocasionaba que los resultados de insulina cuantificados en los diferentes laboratorios, no pudieran ser comparables entre sí, ya que cada laboratorio utilizaba su propio estándar ⁽⁴⁰⁾.

Sin embargo, debido a que para entonces la aplicación del ensayo estaba limitada a laboratorios de investigación y se centraba en el estudio de la fisiopatología de la diabetes y trastornos relacionados, así como para el estudio de la regulación fisiológica de la secreción de insulina, no se percibía la necesidad de que los ensayos estuvieran estandarizados entre los diversos laboratorios.

Un poco después, algunos estudios de comparación entre laboratorios que utilizaban diferentes metodologías para la cuantificación de insulina, demostró que efectivamente, la variación entre los resultados era grande y muy evidente, lo cual podía deberse en parte, a la ausencia de un estándar común de contenido definido.

Reconociendo esta necesidad de estandarización del ensayo (y del estándar), la Organización Mundial de la Salud (OMS) suministró una preparación para cada especie de insulina purificada (bovina, porcina y humana) de tal forma que pudiera utilizarse en todo el mundo como un estándar externo. La posibilidad de contar con grandes cantidades de insulina humana pura, a través de la tecnología de DNA recombinante en los años subsecuentes, amplió la posibilidad de la estandarización⁴. En 1991 la potencia de los materiales de insulina pura nativa recombinante fue de 6.0 nmol/U.

Por esas fechas el ensayo de insulina en la práctica clínica se limitaba básicamente al diagnóstico de insulinoma, por lo que siendo muy poco utilizado en la práctica cotidiana se prestaba muy poco interés en lograr una estandarización seria y real del ensayo.

Del mismo modo, por esa misma época, aparecieron publicaciones de estudios epidemiológicos de gran escala en los que se demostró que las concentraciones séricas de insulina inmunoreactiva pueden predecir el desarrollo de diabetes mellitus no insulino dependiente (DMNID), y que existe la posibilidad de que los niveles de insulina inmunoreactiva pudieran ser utilizados en la evaluación clínica de pacientes para predecir su susceptibilidad a diabetes. Al mencionar en este trabajo el término inmunoreactivo nos referimos a inmunoensayos que pueden reconocer otras sustancias, además de la insulina, que comparten epítopes antigénicos con la insulina, tales como proinsulina, e intermediarios de la conversión de proinsulina a insulina.

Tales conclusiones sin embargo, aunque prometedoras, son completamente dependientes de las características de los ensayos de laboratorio. De tal forma que, un ensayo para insulina que tenga reactividad cruzada con proinsulina y sus productos de degradación, puede llevar a diferentes conclusiones que otro que sea específico para insulina.

Para resolver este problema, en 1996 la Asociación Americana de Diabetes designó un grupo de trabajo para explorar la factibilidad de estandarizar el ensayo de insulina.

JUSTIFICACIÓN

De acuerdo con lo publicado por diversos grupos de autores, la falta de estandarización del ensayo de insulina es un hecho aceptado y reconocido en todo el mundo. No obstante haber sido desarrollado por primera vez hace más de 40 años, y aún con todos los avances tecnológicos y científicos, es evidente que hoy en nuestros días los laboratorios de análisis clínicos no disponemos de un ensayo de insulina estandarizado que permita que los resultados obtenidos de diferentes laboratorios sean comparables entre sí. La falta de estandarización ha ocasionado además que no se hayan podido establecer valores de referencia universalmente aceptados.

Aún cuando las indicaciones para la cuantificación en sangre de la hormona insulina resultan controversiales, es un hecho que en algunas situaciones clínicas su aplicación puede ser de utilidad. Para ello se requiere sin embargo, de contar con un ensayo confiable y reproducible.

En el presente trabajo hacemos una revisión bibliográfica sobre los diferentes esfuerzos que se han hecho por la comunidad científica internacional para identificar las causas y factores asociados con la falta de estandarización y las propuestas que han hecho para conseguirla, de tal forma que los laboratorios de análisis clínicos podamos poner a disposición de médicos y pacientes, un ensayo de insulina confiable y listo para ser aprovechado al máximo tanto en el ámbito de la investigación, como en el de la práctica clínica rutinaria.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Realizar una revisión de la literatura con respecto a la falta de estandarización del ensayo de insulina.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- a) Revisar resultados del programa de evaluación externa de la calidad del College of American Pathologists (CAP) para identificar diferencias en los resultados entre los diferentes métodos e instrumentos.
- b) Hacer una revisión acerca de las características de desempeño analítico de diversos instrumentos, y de la variabilidad de sus valores de referencias en equipos y reactivos disponibles en México para el ensayo de insulina.
- c) Identificar las diferentes variables que pueden estar ocasionando la falta de estandarización.

COMPARACIÓN ENTRE LABORATORIOS:

Para determinar las diferencias existentes entre las diferentes metodologías e instrumentaciones del ensayo de insulina, en forma práctica y económica utilizamos los resultados del programa de evaluación externa de la calidad del Colegio de Patólogos Americanos correspondiente al ciclo Y-A del año 2005.

La muestra número 1 fue analizada por 497 diferentes laboratorios participantes que utilizaron 10 instrumentos y métodos diferentes. El valor de la concentración de insulina más bajo correspondió a 153 laboratorios que utilizaron el equipo y reactivo de la marca DPC Immulite 2000, con un valor promedio de insulina de 26.4 uUI/mL, desviación estándar (DE) de 5.05 y coeficiente de variación porcentual (CV%) de 19.2%. En cambio, la concentración promedio más alta correspondió a 10 laboratorios, que utilizaron el equipo y reactivos AxSYM, de Abbott Laboratorios, con un promedio de 138.4, DE de 8.56 y CV% de 6.2%.

La concentración promedio de insulina, para la misma muestra ensayada el total de laboratorios participantes (497 laboratorios) fue de 70.24 uUI/mL.

Cabemencionar que, el valor más bajo de insulina reportado por un laboratorio fue de 15.6, mientras que el más alto, de 197.6 uUI/mL.

En la muestra número 2 la situación es muy similar, con grandes discrepancias entre las concentraciones promedio reportadas por los diferentes laboratorios.

Esta tabla muestra la falta de comparabilidad entre los resultados emitidos por los laboratorios dependiendo del instrumento y metodología que utilicen.

El desempeño analítico de cada ensayo es también poco homogéneo ya que mientras en algunos casos la variabilidad entre los laboratorios que utilizan el mismo equipo es del 2.9%, en otros de 7.2%, y en otros llega a ser hasta de 22.5%.

Surveys 2005 (Y-A), Ligands (Special)

Tabla 1. Resultados del CAP en la determinación de insulina

INSULINA	NO. LABS	PROM	D.E.	C.V.	MEDIANA	VALOR MÁS BAJO	VALOR MÁS ALTO
MUESTRA 1							
ABBOTT AXSYM	10	138.41	8.56	6.2	138.5	124	149.7
BAYER ADVIA Centaur	71	121.37	7.69	6.3	121.6	100.8	136.4
Beckman Access/2	69	86.08	6.2	7.2	87.4	69.6	97.6
DPC Coat - a – Count	6	-	-	-	75.2	66.1	83.9
DPC IMMULITE 1000	73	29.09	6.53	22.5	28.7	15.6	44.1
DPC IMMULITE 2000	153	26.4	5.08	19.2	25.1	19	42.6
Linco Research	7	-	-	-	134.6	102.7	197.6
Roche Elecsys/E170	12	107.22	3.07	2.9	108	100.3	111
Roche Elecsys 1010/2070	45	106.29	5.91	5.6	107.2	89.9	120.1
Tosoh AIA – Pack	15	112.79	4.73	4.2	110.9	107.6	122.8
All Instruments	497	70.24	42.07	59.9	81	15.6	197.6
MUESTRA 2							
ABBOTT AXSYM	10	55.15	4.77	8.7	55.3	49.1	65.4
BAYER ADVIA Centaur	71	44.03	3.02	6.9	43.8	37	50.7
Beckman Access/2	69	36.21	2.35	6.5	36.1	30.7	41.5
DPC Coat - a – Count	6	-	-	-	26.4	23.8	29.1
DPC IMMULITE 1000	74	12.59	2.6	20.6	12.2	7.7	18.4
DPC IMMULITE 2000	153	11.21	2.41	21.5	10.8	7.2	19.8
Linco Research	7	-	-	-	50.1	41.4	59.6
Roche Elecsys/E170	13	41.85	1.6	3.8	42.1	38.6	44.2
Roche Elecsys 1010/2070	44	42.11	2.29	5.4	42	36.5	48.6
Tosoh AIA – Pack	15	45.91	1.91	4.2	45.1	43.4	49.9
All Instruments	497	27.9	15.7	56.3	34	7.2	65.4

En la tabla 2 podemos observar los resultados de la revisión que hemos realizado mediante diferentes vías tales como consulta telefónica, páginas web, catálogos públicos, etc. de diferentes laboratorios tanto de nuestro país como de los Estados Unidos, en la que hemos querido destacar la variabilidad entre los valores de

referencia para el ensayo de insulina que cada uno de los 8 diferentes laboratorios incluidos reporta.

En este caso por ejemplo, si un paciente acudiera al laboratorio número 3 a realizarse el estudio de insulina en ayuno y le fuera reportado un resultado de 29 uUI/mL, dicho resultado debería interpretarse como normal, o “dentro de los valores de referencia”. En cambio, ese mismo resultado sería considerado como “anormal” o “fuera de los valores de referencia” en 6 de los 8 laboratorios incluidos en la tabla.

De los 8 laboratorios incluidos, el límite normal superior más alto es de 30 uUI/mL, mientras que el más bajo es de 17 uUI/mL.

Otro dato llamativo es que ninguno de los laboratorios incluidos utiliza ya la metodología de RIA. Todos los laboratorios utilizan inmunoensayos con metodologías automatizadas y trazadores luminiscentes.

Es importante también señalar que en el 2007 se realiza una comparación de un RIA con MEIA E IQMA en el cual concluyen que no hay comparabilidad en los resultados cuando son comparados entre laboratorios ⁽⁴¹⁾.

Características de desempeño de ensayos comerciales para insulina:

Tabla 2. Comparación entre diferentes laboratorios en la determinación de insulina.

LABORATORIO	ANALIZADOR	METODOLOGÍA	VALOR REFER.	UNIDADES	MUESTRA	INTERFERENCIAS
LAB 1 HOSP PRIVADO MÉXICO DF	IMMULITE 1000	INMUNOENSAYO QUIMIOLUMINISCENTE ICMA*	6 – 27	µUI/MI	SUERO	HEMÓLISIS
LAB 2 HOSP PRIVADO MÉXICO DF	ACCESS BECKMAN	INMUNOENSAYO QUIMIOLUMINISCENTE	1.9 – 23	µUI/mL	SUERO Y PLASMA	¿?
LAB 3 HOSP PRIVADO MÉXICO DF	ACCESS BECKMAN	INMUNOENSAYO QUIMIOLUMINISCENTE*	3 – 30	UI/mL	SUERO	HEMOLISIS
LAB 4 HOSP PÚBLICO MÉXICO DF	DXI BECKMAN	INMUNOENSAYO QUIMIOLUMINISCENTE	1.9 – 23	µUI/mL	SUERO Y PLASMA	HEMOLISIS
LAB 5 HOSP PÚBLICO MÉXICO DF	AXSYM ABBOTT	MEIA**	1.2 - 30	µUI/mL	SUERO	HEMÓLISIS
LAB 6 HOSP PÚBLICO MÉXICO DF	ELECSYS ROCHE	INMUNOENSAYO ELECTROQUIMIOLUMINISCENTE	3 – 17	µUI/mL	SUERO Y PLASMA	HEMOLISIS
LAB 7 ESTADOS UNIDOS	¿?	CEIA***	3 – 28	mU/L	SUERO Y PLASMA	¿?
LAB 8 ESTADOS UNIDOS	¿?	INMUNOENSAYO	< 17	µUI/mL	SUERO Y PLASMA	HEMÓLISIS Y LIPÉMIA

* ICMA: Immunochemiluminometric assay

** MEIA: Microparticle Enzyme Immunoassay

*** CEIA Capillary Electrophoresis Immunoassay

Finalmente, realizamos una revisión y análisis de 5 diferentes metodologías, instrumentos y marcas comerciales disponibles en México, cuyos resultados son presentados en la tabla 3, misma que incluye la metodología, anticuerpo o anticuerpos utilizados, tipo de calibrador, sustratos que utilizan, así como las interferencias que cada uno de ellos declaran en sus insertos.

Todos estos ensayos son procesados en instrumentos completamente automatizados, en los que pueden realizarse un gran número de pruebas por hora, por lo cual no consumen mucho tiempo, ni horas hombre. Es decir, ya no representan la laboriosidad que presentaban con el RIA. Los ensayos utilizan

anticuerpos monoclonales y están basados en el procedimiento del inmunoensayo.

Otro hallazgo es que los diferentes reactivos e instrumentos utilizan calibradores diferentes entre sí. En todos ellos, se declara interferencia con los anticuerpos heterófilos y con los anticuerpos anti-insulina de pacientes tratados con insulina exógena.

Todo lo anterior nos permite inferir que en México contamos con amplia disponibilidad de reactivos comerciales aprobados, que utilizan instrumentación automatizada con tecnología de punta que representan el estado del arte a nivel mundial, amplia utilización de anticuerpos monoclonales, y trazadores luminiscentes.

Tabla 3 Características del ensayo en diferentes analizadores.

ANALIZADOR	TÉCNICA O TIPO DE ENSAYO	TIPO DE ANTICUERPO	CALIBRADOR	MARCA	INTERFERENCIAS
ACCESS BECKMAN	INMUNOENZIMÁTICO SIMULTANEO	2 Ac MONOCLONALES DE RATÓN	(IRP) 66/304 OMS	FOSFATASA ALCALINA LUMI-PHOS 530	Ac HETEROFILOS. Ac ANTI INSULINA
IMMULITE DPC	QUIMIOLUMINISCENCIA DIRECTA	1 Ac MONOCLONALES MURINOS Y 2 AC POLICLONALES DE OVEJA.		FOSFATASA ALCALINA	Ac HETEROFILOS. Ac ANTI INSULINA
AXSYM ABBOTT	INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO DE MICROPARTÍCULAS (MEIA)	2 Ac MONOCLONALES DE RATÓN	2D01-20 PRINCIP 2D01-01 REF OMS	FOSFATASA ALCALINA METILUMBELIFERIL FOSFATO	Ac HETEROFILOS. AC. ANTI-INSULINA
ELECSYS ROCHE	ELECTROQUIMIO- LUMINISCENCIA	¿?	¿?	¿?	¿?
ADVIA Centauro BAYER	QUIMIOLUMINISCENCIA DIRECTA	2 Ac MONOCLONALES DE RATÓN	(IRP) 66/304 OMS	ESTER DE ACRIDINIO	Ac HETEROFILOS. Ac ANTI INSULINA

Idealmente, un ensayo de insulina debe ser sensible, específico y aplicable a un gran número de muestras. Debe estar además estandarizado para que pueda ser

utilizado en grandes estudios clínicos y pueda además ser considerado por las guías clínicas.

De los 4 diferentes métodos con los que es posible cuantificar la hormona de insulina en sangre, como son los bioensayos, la cromatografía líquida de alta resolución, la espectrofotometría de masas con dilución de isótopos estables, y los inmunoensayos, únicamente estos últimos pueden ser aplicables a un gran número de muestras.

Los primeros inmunoensayos que se utilizaron para cuantificar insulina fueron los radioinmunoensayos (RIA), que utilizaban anticuerpos policlonales y que detectaban tanto insulina como proinsulina, ya sea intacta o bien sus intermediarios ^{31,32} des pro-insulina, lo cual hacía imposible evaluar correctamente la secreción de insulina, sobre todo en aquellas condiciones en las cuales las concentraciones de proinsulina circulante están incrementadas, como es el caso de la diabetes tipo 2, la intolerancia a la glucosa y la resistencia a la insulina.

Afortunadamente, la aparición de los anticuerpos monoclonales ha resuelto en gran parte dicho problema. En los inicios de los 80's, el desarrollo de los anticuerpos monoclonales llevó a la introducción de ensayos inmuno-métricos (IMA), que fueron reconocidos y aceptados como más precisos, más sensibles (con un límite de detección más bajo), y más específicos (selectivos), que los RIA.

Incluso se alcanzó una mayor especificidad, utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos contra el epítotope localizado en la región N-terminal de la cadena A de insulina. Este epítotope es ocultado por el péptido-C en la proinsulina y en la

molécula de proinsulina 31,32 des⁽²⁸⁾, lo cual asegura que no interfiera con ninguno de esos intermediarios.

Posteriormente, empezaron a comercializarse un gran número de ensayos automatizados que incluían marcadores enzimáticos o luminiscentes, con lo cual mejoró aún más la reproducibilidad y practicabilidad intra-laboratorios.

Los 3 principales obstáculos que persisten en la actualidad para la medición de insulina son:

- 1) Hemólisis
- 2) Anticuerpos anti-insulina circulantes
- 3) La reactividad (o falta de reactividad) de análogos de la insulina circulantes, de acción rápida o prolongada.

Las muestras hemolizadas contienen una enzima degradadora de insulina por lo que no deben ser analizadas, a menos de que sean conservadas a 4°C y analizadas en las primeras 2 a 3 hrs de su obtención, o bien, que se haya añadido un inhibidor de insulinasa en el tubo de recolección, para prevenir la degradación de la insulina.

Los anticuerpos anti-insulina interfieren con los inmunoensayos. En todos los kits de reactivos comerciales, los fabricantes declaran que los anticuerpos circulantes anti-insulina de los pacientes, formados en respuesta al tratamiento con insulina exógena (ya sea bovina, porcina o humana), causan interferencias con el ensayo.

VARIABLES QUE PODRÍAN ESTAR OCACIONANDO LA FALTA DE ESTANDARIZACIÓN:

En el año de 1996 la Asociación Americana de Diabetes (ADA) creó un Grupo de Trabajo para la Estandarización del Ensayo de Insulina⁽²¹⁾ el cual encontró que muestras idénticas de suero o plasma medidas en diferentes laboratorios, producían resultados ampliamente diferentes o dispares, y que por ende eran completamente inaceptables para comparaciones en la población.

El Grupo de Trabajo intentó entonces encontrar las potenciales explicaciones de dichas diferencias y realizó para ello varios experimentos, como lo fue utilizar el mismo estándar de referencia (único) en los diferentes laboratorios participantes, lo cual mejoró muy poco la comparabilidad entre los resultados.

El Grupo de Trabajo analizó además las características de varios ensayos de insulina, como linealidad, recuperación, exactitud, y reactividad cruzada con proinsulina y sus intermediarios de conversión primarios, y aunque dichas características variaron entre los diferentes métodos y laboratorios, tampoco esto logró explicar claramente las diferencias entre las mediciones realizadas entre un ensayo y otro.

Sorpresivamente, incluso el uso del mismo ensayo (mismo kit de reactivos) en diferentes laboratorios, no siempre produjo resultados comparables.

En conclusión, el Grupo de Trabajo no logró estandarizar el ensayo, y tampoco pudo identificar las potenciales causas de la falta de estandarización y de comparabilidad entre los resultados.

Diez años después, en abril de 2007, ha sido publicado un nuevo reporte del Grupo de Trabajo de la ADA⁽¹⁾, en el que se estudian las características de desempeño de 12 diferentes métodos de insulina comercialmente disponibles, de 9 fabricantes.

Los objetivos principales de este nuevo Grupo de Trabajo, integrado ahora por la ADA, el Instituto Nacional de Diabetes y Enfermedades Renales y Digestivas, y el Centro de Control de Enfermedades (CDC) de los Estados Unidos, fueron evaluar el desempeño analítico de diferentes ensayos, establecer guías de aceptabilidad de los ensayos, y desarrollar un programa de estandarización para alcanzar o lograr valores uniformes y exactos de los ensayos de insulina.

Los resultados que obtuvieron fueron los siguientes:

IMPRECISIÓN:

El coeficiente de variación intra-ensayo de los métodos evaluados varió de 3.7% a 39.0%. Siete de 10 de estos kits comerciales tuvieron coeficientes de variación o imprecisión igual o menor de 10.6%. Por otro lado, el coeficiente de variación entre-ensayos varió de 12% hasta 66%. Estos experimentos se llevaron a cabo utilizando para cada reactivo comercial su propio material de calibración. Como un intento por armonizar los resultados se realizaron pruebas también utilizando un material único de calibración para todos los kits comerciales, lo cual no logró mejorar los resultados de imprecisión intra ni inter-ensayos.

RECUPERACIÓN:

Siete de 10 de los ensayos probados tuvieron un porcentaje de recuperación de insulina dentro del 15.5% de la concentración esperada.

REACTIVIDAD CRUZADA:

En 9 de 10 métodos hubo una reactividad cruzada < 2% con proinsulina humana intacta, y 8 de los 10 métodos, tuvieron una reactividad cruzada < 3% a pro-insulina des (32,33). En 9 de los 10 reactivos, la reactividad cruzada a pro-insulina des (64,65) excedió el 40%.

En conclusión, el grupo de trabajo ha encontrado que varios de los ensayos comerciales estudiados, pero no todos, miden insulina con aceptable imprecisión y reactividad cruzada. Al igual que el Grupo de trabajo que les precedió, los hallazgos de la Fuerza de Tarea para la estandarización de insulina sugieren que la fuente de las discrepancias en los resultados entre los diferentes métodos comerciales es probablemente multifactorial y no puede ser explicado por una característica analítica de desempeño en particular ⁽²⁸⁾.

CONCLUSIONES

Los cambios en el estilo de vida, caracterizados por una dieta pobre en fibras y rica en grasas y carbohidratos, aunados a sedentarismo y falta de actividad física, han traído consigo el incremento en la prevalencia de sobrepeso y obesidad, y en la morbilidad y mortalidad secundaria a enfermedades crónico-degenerativas tales como diabetes, cáncer, enfermedad cardiovascular, síndrome metabólico, entre otras.

De hecho, actualmente la diabetes representa la primera causa de muerte en nuestro país, y el panorama no se ve alentador que diversos estudios y proyecciones indican que tanto en adultos como en niños, está aumentando dramáticamente la frecuencia de sobrepeso y obesidad, lo cual es un factor de riesgo importante para el desarrollo de la diabetes, dislipidemia, síndrome metabólico, y resistencia a la insulina.

Está claramente establecido en las guías actuales más recientes y aceptadas sobre diabetes, que para efectos de diagnóstico y seguimiento de dicha enfermedad, la medición de insulina sérica no es una prueba recomendada. Lo anterior debido a que se ha demostrado que la cuantificación de la hormona insulina en los laboratorios clínicos no está estandarizada, de tal forma que los resultados de su medición originan concentraciones muy diferentes entre los diferentes laboratorios.

Por lo mismo, no existe un consenso acerca de los valores de referencia universalmente aceptados.

No obstante lo anterior, recientemente ha sido sugerido que la cuantificación de la insulina puede ser útil como predictor de enfermedad arterial coronaria, y para la evaluación de la misma. Sin embargo, tales afirmaciones pierden su utilidad y certeza, si no se ha logrado la estandarización del ensayo de insulina.

La Asociación Americana de Diabetes ha realizado intentos para alcanzar tal estandarización y ha creado Grupos de Trabajo dedicados al estudio de las variables que causan dicha falta de estandarización.

Dichas Fuerzas de Tarea han confirmado que existen diferencias notables entre los resultados obtenidos entre diferentes laboratorios. Además han publicado sus resultados y aunque se han identificado algunas variables que pueden explicar la falta de estandarización entre los ensayos de insulina, no se ha logrado encontrar la solución que permita alcanzar tal estandarización

En conclusión, los Grupos de Trabajo de la Asociación Americana de Diabetes reconocen que existe falta de estandarización entre los diferentes ensayos de insulina, que ocasiona que los resultados de las concentraciones de insulina de mismas muestras sean diferentes entre sí, al ser cuantificadas en diferentes laboratorios.

La ADA ha recomendado trabajar en los siguientes aspectos:

- Obtener una nueva preparación definida en términos de masa.
- Validar dicha preparación en ensayos con suero y diluyentes nativos.
- Desarrollar un método de referencia para alcanzar la trazabilidad de resultados por un periodo largo de tiempo.

Finalmente consideramos que la mejor forma de utilizar esta determinación de insulina con las metodologías actualmente disponibles es como muchos clínicos especialistas del área lo realizan que es complementándola con determinaciones de glucosa en una curva de tolerancia oral a la glucosa por ejemplo, o en su caso, esperar a que los científicos nos proporcionen una metodología novedosa y confiable para estas determinaciones con la certeza de un resultado sensible reproducible y económico en los laboratorios de análisis clínicos.

Los esfuerzos por alcanzar la estandarización continúan, y probablemente en los años venideros podamos ser testigos de la estandarización del ensayo de insulina.

REFERENCIAS

1. **Marcovina S, Bowsher RR, Miller WG, et al.** Standardization of Insulin Immunoassays: Report of the American Diabetes Association Workgroup. *Clinical Chemistry*, 2007; 53: 711 – 716.
2. **Orci L.** The insulin factory: a tour of the plant surrounding and a visit to the assembly line. *Diabetologia* 1985; 28: 528-546.
3. **Chevenne D, Trivin F, Porquet D.** Insulin assays and reference values, *Diabetes & metabolism* 1999; 25: 459 – 476.
4. **Lang DA, Matthews DE Burnett M. et al.** Pulsatile, synchronous basal insulin and glucagon secretion in man. *Diabetes* 1982; 31: pp22-26.
5. **Nicolau GY, Haus E, Lakatua DJ, et al.** Circadian and circannual variations in plasma immunoreactive insulin and C-peptide concentrations in elderly subjects. *Endocrinologie* 1983; 21: 243-255.
6. **Cheng A, Dubé N, Gu F, Tremblay ML.** Coordinated action of protein tyrosine phosphatases in insulin signal transduction, *European Journal of Biochemistry* 2002; 269: 1050-1059.
7. **Lowe WL.** Genetics of Diabetes, in Principles of Molecular Medicine, JL Jameson (ed). Totowa, NJ, *Humana*, 1998: 433-442.
8. **Virkamäki A, Ueki K, Kahn RC.** Protein-Protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanism of insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, 1999; 103: 931-943.

9. **Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL.** Principios de Medicina Interna Harrison 17^a Edición.
10. **Kahn R.** The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of diabetes mellitus. Follow up Report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 2003; Volume 26, Number 11.
11. **Reaven GM.** Insulin resistance and its consequences; non-insulin dependent diabetes mellitus and coronary heart disease. *Diabetes mellitus: a fundamental clinical text*. Philadelphia: Lipincott-Reaven. 1996: 509-519.
12. **Vazquez CCh, Salinas SO, Gomez RA, et al.** Niveles de insulina y factores de riesgo cardiovascular en mexicanos hipertensos *versus* normotensos. *Revista de Endocrinología y Nutrición*, 2003; 11: 7-14.
13. Expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP). Expert panel on detection, evaluation and treatment of high cholesterol. *JAMA*, 2001; 285: 2486-2497.
14. **Del prato S.** Measurement of insulin resistance in vivo *Drugs* 1999; 58: 3-6, discussion 75-82.
15. **Lerman IG, Aguilar-CS, Gómez-Pérez FJ, et. al.** El síndrome metabólico. Posición de la Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología, sobre la definición, fisiopatología y diagnóstico. Características del Síndrome

- Metabólico en México. *Revista de Endocrinología y Nutrición* 2004; 12 (3): 109-122.
16. **Risérus U., Ärnlov J., Berglund L.** Long-Term Predictors of Insulin Resistance: Role of Lifestyle and Metabolic Factors in Middle-Aged Men. *Diabetes Care*, 2007, 30 (11): 2928-2933.
 17. **Sacks DB, Bruns DE, Goldstein DE, Maclaren NK, et al.** Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Clinical Chemistry* 2002; 48, No. 11 :436-472.
 18. **Yalow RS, Berson SA.** Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature*, 1959; 184: 1648-1649.
 19. **Grundy SM.** Hypertriglyceridemia, insulin resistance, and the metabolic syndrome. *American Journal Cardiology*, 1999; 83: 25F-29F.
 20. **Steven M. Haffner, MD.** Do increased Proinsulin Concentrations Explain the Excess Risk of Coronary Heart Disease in Diabetic and Prediabetic Subjects? *Circulation*, 2002; 105: 2008-2009.
 21. **Robbins DC. Andersen L. et al.** Report of the American Diabetes Association's Task Force on Standardization of the Insulin Assay. *Diabetes*, 1996; 45: 242-256.
 22. **Kaplan IR, Levinson SS.** When is a heterophile antibody not a heterophile antibody? When it is an antibody against a specific immunogen. *Clinical Chemistry*, 1999; 45: 616-8.

23. **Vladutiu AO, Sulewski JM, Pudlack KA, Stull CG.** Heterophilic antibodies interfering with radioimmunoassay a false positive pregnancy test. *JAMA*, 1992; 248: 2489-90.
24. **College of American Pathologists (CAP).** Participant summary Y-A Ligands (Special), *Surveys*, 2005.
25. **Marks V.** Recognition and differential diagnosis of spontaneous hypoglycaemia. *Clinical Endocrinology (Oxf)*, 1992; 37: 309-316.
26. **Haffner SM, Stern MP, Mitchell BD, Valdez RA, et al.** Incidence of type II diabetes in Mexican Americans predicted by fasting insulin and glucose levels, obesity and body fat distribution. *Diabetes*, 1990; 39: 283-288.
27. **Haffner SM, Mykkänen L, Stern MP , Valdez RA, et al.** Relationship of proinsulin and insulin to cardiovascular risk factors in non-diabetic subjects. *Diabetes*, 1993; 42: 1297-1302.
28. **Marcovina S, Bowsher RR, Miller WG, et al.** Standardization of Insulin Immunoassays: Report of the American Diabetes Association Workgroup. *Clinical Chemistry*, 2007; 53: 711 – 716.
29. **Sapin R.** Insulin immunoassays: Fast approaching 50 years of existence and still calling for standardization. *Clinical Chemistry* 2007; 53: No. 5.
30. **Trethewey J.** Bio-assays for the analysis of insulin. *Journal Pharm. Biomed. Anal* 1989; 7: 189-197.

31. **Clark PMS, Hales CN.** How to measure plasma insulin. *Diabetes/Metabolism Reviews* 1994; 10: 79-90.
32. **Smith DJ, Venable RM, Collins J.** Separation and quantitation of insulins and related substances in bulk insulin crystals and in injectables by reversed-phase high- performance liquid chromatography and the effect of temperature on the separation. *Journal chromatogr Sci* 1985; 23: 81-88.
33. **Andreotti PE, Ludwig GV, Peruski AH.** Immunoassay of infectious agents. *BioTechniques* October 2003; 35: 850-859.
34. **O' Sullivan C.K.** Aptasensors – the future of biosensing? *Analytical Bioanalytical. Chemistry* 2002; 372: 44-48.
35. **Iqbal, S.S., M.W. Mayo, J.G. Bruno, B.V, et al.** A review of molecular recognition technologies for detection of biological threat agents. *Biosensors Bioelectronics*, 2000; 15: 549-578.
36. **Jayasena, S.D.** Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clinical Chemistry* 1999; 45: 1628-1650.
37. **Engvall E, Perlmann P.** Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 1971; 8: 871-4.
38. **Rudolf M. L.** Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme – Linked Immunosorbent Assay (ELISA), *Clinical Chemistry* 2005; 51: 12.
39. **Kaplan LA.** Clinical Chemistry: Theory, Analysis, Correlation, 4th ed. Mosby, 2003.

40. **Marks V.** False – Positive Immunoassay Results: A Multicenter Survey of Erroneous Immunoassay Results from Assays of 74 Analytes in 10 Donors from 66 Laboratories in seven Countries. *Clinical Chemistry* 2002; 48: 11, 2008-2016.
41. **Pimentel, M.** Análisis comparativo de métodos inmunológicos para la determinación de insulina en suero. TESINA UNAM, 2007.

PÁGINAS WEB CONSULTADAS:

www.nobelprize.org

www.questdiagnostics.com

www.specialtylabs.com

www.ncbi.nlm.nih.gov

medigraphic.com

www.clinchem.org