



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN
INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO PARA LA
CUANTIFICACIÓN DE INSULINA HUMANA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**P R E S E N T A :
JOSÉ ANTONIO ALVARADO RÍOS**

**DIRECTOR DE TESIS:
DR. EULISES DÍAZ DÍAZ**

**ASESOR DE TESIS:
Q.F.B. TERESA BENÍTEZ ESCAMILLA**



MÉXICO, Ciudad de México, Marzo 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

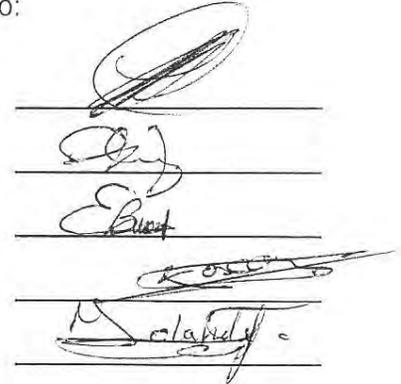
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES "ZARAGOZA"

DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN
ESCOLAR
PRESENTE.

Comunico a usted que el alumno ALVARADO RÍOS JOSÉ ANTONIO,
con número de cuenta 30407799-1 de la carrera de Q. F. B.,
se le ha fijado el día 07 del mes de Marzo de 2016 a las 09:00 hrs.,
para presentar examen profesional, que tendrá lugar en la sala de exámenes
profesionales Campus II de esta Facultad, con el siguiente jurado:

PRESIDENTE	DR. JOSÉ LUIS A. MORA GUEVARA
VOCAL*	DR. EULISES DÍAZ DÍAZ
SECRETARIO	Q.F.B. TERESA BENÍTEZ ESCAMILLA
SUPLENTE	Q.F.B. JOSÉ OSCAR GONZÁLEZ MORENO
SUPLENTE	MTRA. YOLANDA FLORES CABRERA



El título de la tesis que se presenta es: **Desarrollo y validación de un
inmunoensayo enzimático para la cuantificación de insulina humana**

Opción de titulación: **Tesis Experimental**

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
México, D.F. a, 09 de Febrero del 2016

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR DIRECCIÓN

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"



RECIBÍ:

OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES
Y DE GRADO

Vo.Bo.

DRA. RAQUEL RETANA UGALDE
JEFA DE LA CARRERA DE Q.F.B.



El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Hormonas Proteicas del Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (INCMNSZ), bajo la dirección del Dr. Eulises Díaz Díaz y la asesoría de la Q.F.B. Teresa Benítez Escamilla.

DEDICATORIA

A Dios que me ha dado una vida llena de bendiciones.

A mi mamá, María Félix:

Gracias por estar en todo momento y darme todo tu cariño y comprensión. Me enseñaste a ser feliz y afrontar los retos que se presentan en la vida. De ti aprendí el amor a la vida.

A mi papá, César Joel:

Gracias por brindarme tu cariño y comprensión. Me has enseñado a luchar por mis sueños y metas, viendo siempre el lado positivo de las cosas.

A mis hermanos, César Alberto y Sergio David:

Por ser mis compañeros de infancia, haberme enseñado a no dejarme vencer por las adversidades y a compartir lo que me da la vida.

A mis grandes amigos: Carlos Antonio, América, Alejandra, Omar, Dalia, Diego, Alejandro, Rebeca, Karla, Gabriela, Casandra, Marisela, Maribel, Fernanda, Dafne, Claudia, Mariana; que han estado conmigo en cualquier circunstancia y me han brindado su amistad sincera y apoyo, son parte de mi familia.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza de la Universidad Nacional Autónoma de México, por haberme dado una excelente formación académica.

Al Laboratorio de Hormonas Proteicas del Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, por permitirme la realización del presente trabajo en sus instalaciones.

Al Dr. Eulises Díaz Díaz, por su dirección en la elaboración de esta tesis. Gracias por todo el apoyo brindado, su tiempo, paciencia y sobre todo, su valiosa amistad.

A la Mtra. Teresa Benítez Escamilla, por su excelente asesoría y perseverancia durante la realización de esta tesis.

A todos los laboratorios y personal de los distintos departamentos e instituciones que colaboraron en la realización de la parte experimental de éste trabajo.

A los miembros del jurado que dedicaron su valioso tiempo en la revisión y corrección del presente trabajo.

CONTENIDO

Lista de abreviaturas.

I.	Introducción	1
II.	Marco teórico	4
a.	Diabetes Mellitus	4
i.	Generalidades	
ii.	Clasificación	
iii.	Incidencia en la población	
b.	Insulina	6
i.	Generalidades	
ii.	Síntesis y mecanismos de acción	
iii.	Resistencia a la insulina y síndrome metabólico	
iv.	Métodos de cuantificación	
c.	Inmunoensayo	14
i.	Generalidades	
ii.	ELISA	
iii.	RIA	
iv.	Validación	
v.	Normatividad	
III.	Planteamiento del problema	36
IV.	Objetivos	37
V.	Hipótesis	38
VI.	Diseño experimental	39
VII.	Resultados y discusión	59
VIII.	Conclusiones	83
IX.	Recomendaciones	84
X.	Referencias	85
XI.	Anexos	89

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grado Celsius	ICMA	Inmunoensayo quimioluminiscente automatizado
µg	Microgramos	IDF	Federación Internacional de Diabetes
µL	Microlitros	IGF-I	Factor de crecimiento similar a la insulina de tipo 1
5-AS	Ácido 5-aminosalicílico	IgG	Inmunoglobulina
Ab	Anticuerpo	IRS	Sustratos de receptor de insulina
ABTS	2,2'-Azino dietilbenzotiazolina ácido sulfónico	KDa	Kilodaltones
Ag	Antígeno	Log	Logaritmo
ALP	Fosfatasa alcalina	M	Molaridad
AMP	Adenosín monofosfato	mg	Miligramos
ARN	Ácido ribonucleico	mL	Mililitros
ATP	Adenosín trifosfato	mM	Milimolar
Bo	Unión específica máxima	mmHg	Milímetros de mercurio
BSA	Albumina de suero bovino	N	Normalidad
CHNC	Coma hiperosmolar no cetósico	ng	Nanogramos
cm	Centímetros	nm	Nanometros
CPM	Conteos por minuto	OMS	Organización Mundial de la Salud
CV	Coefficiente de variación	ONPG	o-nitrofenil β-d-galactopiranososa
dL	Decilitros	OPD	o-fenilendiamina
DM	Diabetes mellitus	PBQ	p-benzoquinona
DNA	Ácido desoxirribonucleico	PBS	Tampón fosfato salino
EDAC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida	pH	Potencial de hidrogeno
EIA	Enzimoinmunoanálisis	PIP-3	Fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima	p-NPP	p-nitrofenil fosfato
EMA	Entidad Mexicana de Acreditación	RER	Retículo endoplásmico rugoso
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición	RIA	Radioinmunoanálisis
FPIA	Inmunoensayo de polarización fluorescente	rpm	Revoluciones por minuto
GLUT-4	Transportador de glucosa tipo 4	SDS	Dodecilsulfato sódico
HDL	Lipoproteínas de alta densidad	TMB	Tetrametilbencidina
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia	UNE	Unión no específica
HRP	Peroxidasa de rábano picante		

I. INTRODUCCIÓN

La insulina es una hormona peptídica secretada por las células β de los islotes de Langerhans del páncreas endocrino; esta hormona mantiene los niveles normales de glucosa en la sangre al facilitar su captación por las células del organismo dependientes de insulina, contribuye a la regulación del metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas y promueve la división celular y el crecimiento mediados por sus efectos mitogénicos.

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”*, aplicación terapéutica y su participación en la fisiopatogénesis de la diabetes mellitus. El tratamiento de la diabetes se revolucionó en el año 1922, cuando se aplicó por primera vez insulina a un paciente diabético, algunos años después, en 1959, se desarrolló el radioinmunoanálisis ¹, 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 hormonas, creando las bases analíticas para la endocrinología moderna.

Hoy en día, gracias a estas y a otras contribuciones realizadas por innumerables científicos, algunas acreedoras de premios Nobel, tales como el otorgado en 1923 a Banting y McLeod por sus trabajos en donde observaban y explicaban los niveles de glucosa en sangre de perros a los cuales se les había inducido diabetes. 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 fisiopatogénesis de diversas enfermedades tales como diabetes, síndrome metabólico, insulinoma, arteriosclerosis de vasos coronarios y periféricos, hipertensión, dislipidemias, síndrome de ovarios poliquísticos, entre otras. Sin embargo y no obstante a lo anterior, probablemente aún quedan muchas dudas por esclarecer, por lo que seguramente, con el advenimiento y

desarrollo de la biología molecular, seguiremos siendo testigos del descubrimiento de nuevos mecanismos de interrelación entre la insulina, la fisiología y las enfermedades.

La concentración sérica de insulina predice el desarrollo de la diabetes mellitus tipo 2 y está relacionada con el riesgo de desarrollar diversas enfermedades degenerativas. Independientemente del uso que se le dé a 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 valores reportados sean confiables y comparables entre distintos laboratorios.

A pesar de que el radioinmunoanálisis para la cuantificación de insulina fue introducido hace más de 50 años, aún existen grandes retos y problemas analíticos por resolver en lo que se refiere a la medición de esta hormona y sus moléculas relacionadas, tales como la pro-insulina, el péptido C y los factores de crecimiento similares a la insulina tipo I y II. De hecho, los resultados que en la práctica diaria se obtienen en diferentes laboratorios clínicos, muchas veces no son comparables entre sí; por estas razones, tampoco se han podido establecer valores de referencia que sean universalmente aceptados. Cada laboratorio reporta valores de normalidad en función del método que emplea. Estas limitaciones metodológicas han conllevado a un concepto erróneo: *“el valor de referencia de insulina depende del método con que se mida...”*, siendo que en teoría, este valor sólo debe depender de las características de la población estudiada y no del método empleado, el cual debería ser 100% exacto y 100% preciso.

Por estas razones, el presente trabajo tuvo como objetivo desarrollar y validar un inmunoensayo que genere resultados confiables y comparables con los obtenidos por el método empleado actualmente en el laboratorio de Diabetes del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ). En el

futuro, la utilización del nuevo método desarrollado, generará una disminución en costos. Así mismo se podrá transferir la tecnología a otras instituciones que disponen de menos recursos y no pueden utilizar métodos de buena calidad por los elevados costos. Con esto, se podrá dar certeza de los resultados, garantizando una mejor calidad en la atención de los pacientes con trastornos metabólicos, los cuales tienen una tasa de incidencia y prevalencia muy elevada entre la población mexicana.

II. MARCO TEÓRICO

a. Diabetes mellitus

i. Generalidades

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad sistémica, crónico-degenerativa, de origen heterogéneo, con grados variables de predisposición hereditaria y con participación de diversos factores ambientales, que se caracteriza por hiperglucemia crónica debido a la ausencia y/o deficiencia en la producción, o en la acción de la insulina, lo que afecta al metabolismo intermedio de los hidratos de carbono, proteínas y grasas. ²

ii. Clasificación

- Diabetes gestacional: es la alteración en el metabolismo de los hidratos de carbono que se detecta por primera vez durante el embarazo, debido a una insuficiente adaptación a la insulinoresistencia que se produce en la gestante ². Este padecimiento es mayor en el tercer trimestre y parece ser una respuesta adaptativa, desviando la glucosa y los lípidos para el feto en conjunto con los efectos combinados del lactógeno placentario humano, la progesterona, estradiol y cortisol, que actúan como hormonas contra-reguladoras, garantizan un apropiado suministro de nutrientes necesarios para el crecimiento y desarrollo fetal. ³ A pesar de que el incremento de la resistencia a la insulina, es un fenómeno normal durante el embarazo, cuando es desproporcional, genera la diabetes mellitus gestacional, y también favorece el desarrollo de la hipertensión gestacional, otra condición patológica que se puede observar durante el embarazo. ⁴
- Diabetes tipo 1: se caracteriza por la destrucción de células β del páncreas, generando una deficiencia en la producción de insulina. Los pacientes pueden ser de cualquier edad, pero se presenta frecuentemente durante la adolescencia, la mayoría suelen ser delgados y presentar un comienzo abrupto

de signos y síntomas con insulinopenia antes de los 30 años de edad.

- Diabetes tipo 2: es el tipo de diabetes en la que se presenta resistencia a la insulina y en estadios avanzados se puede manifestar en forma concomitante una deficiencia en su producción, que puede ser relativa o absoluta. Los pacientes suelen ser mayores de 30 años y al realizarse el diagnóstico son frecuentemente obesos y presentan relativamente pocos síntomas clásicos.²

La DM es un padecimiento complejo que lleva implícito una serie de situaciones que comprometen el control metabólico de los pacientes, lo cual favorece el desarrollo de complicaciones, tanto agudas como crónicas. Dentro de las primeras, la hiperglucemia es un riesgo latente, otras son la cetoacidosis diabética y el coma hiperosmolar no cetósico (CHNC). Si bien, las agudas son más graves a corto plazo, la educación diabetológica y la mejora en la atención primaria de salud han rebajado considerablemente estas complicaciones. Las complicaciones crónicas se relacionan con los años de evolución de la enfermedad y el grado de control conseguido, tanto de la hiperglucemia en sí, como de los otros factores de riesgo vascular.⁵

Las complicaciones crónicas de la enfermedad se pueden clasificar en macrovasculares (entre las cuales se encuentran la cardiopatía isquémica, arteriopatía periférica y enfermedad renal isquémica), microvasculares clásicas (como la nefropatía, retinopatía y neuropatía).⁵

iii. Incidencia en la población

La epidemia de la DM es reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una amenaza mundial, se calcula que en el mundo existen más de 347 millones de personas con diabetes. El reto en términos de lo que representa para la sociedad es doble: por un lado, el importante monto de recursos que requieren los prestadores de servicios de salud para su atención, y por el otro el costo económico y emocional para las personas con diabetes y sus familias.⁶

De acuerdo a la información de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012 (ENSANUT) existe un total de 6.4 millones de adultos mexicanos con diabetes, es decir, 9.2% de los adultos en México han recibido ya un diagnóstico de diabetes. El total de personas adultas con diabetes podría ser incluso el doble, de acuerdo a la evidencia sobre el porcentaje de diabéticos que no conocen su condición. En México, la DM ocupa el primer lugar en número de defunciones por año, tanto en hombres como en mujeres las tasas de mortalidad muestran una tendencia ascendente en ambos sexos con más de 70 mil muertes y 400,000 casos nuevos anuales.⁷

b. Insulina

i. Generalidades

La insulina es una hormona peptídica secretada en el páncreas por las células β de los islotes de Langerhans y mantiene los niveles normales de glucosa en la sangre al facilitar la captación celular de glucosa, regula el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, y promueve la división y el crecimiento celular a través de sus efectos mitogénicos.⁸

En 1889 los trabajos experimentales con perros realizados por los científicos alemanes Oskar Minkowski y Josef von Mering, demostraron que la pancreatectomía total conducía al desarrollo de una forma severa de diabetes; y propusieron la hipótesis de que una sustancia secretada por el páncreas era la responsable del control glucémico. Investigadores como Minkowski, y George Ludwig Zuelzer en Alemania, así como E. L. Scott en los E.U.A., intentaron, con resultados inconsistentes, aislar y administrar el contenido de los islotes pancreáticos; no fue hasta 1909, que el investigador belga J. de Meyer, logró aislar un extracto pancreático con actividad biológica que lograba regular la glucemia, para el cual propuso el nombre de "insulina". Posteriormente a esta fecha, en 1916 similares resultados fueron obtenidos por el investigador británico Edward Albert Sharpey-Schafer.⁹

Finalmente, en 1921, una década más tarde, la insulina fue finalmente aislada, purificada, disponible y por tanto capaz de ser administrada de una forma terapéutica. En enero de 1922 comenzaron los primeros experimentos con seres humanos en un niño diabético de 14 años que había sido sometido a una pancreatectomía; lográndose revertir los síntomas clínicos y las alteraciones bioquímicas que presentaba como consecuencia del déficit endógeno de insulina. En mayo de ese mismo año, el componente activo había sido nombrado “insulina” (del latín “insula” que significa isla, haciendo alusión a su síntesis en los islotes pancreáticos), y los resultados de estos experimentos presentados ante la Asociación de Médicos de Estados Unidos. Fue entonces cuando, la compañía farmacéutica norteamericana, Eli Lilly, comenzó la producción de insulina porcina. Posteriores mejoras en el proceso de purificación, a través de precipitación isoeléctrica, permitió por primera vez la posibilidad de fabricar en cantidades industriales y favorecer su comercialización a principios de 1923. El Premio Nobel de fisiología o medicina de ese mismo año, fue otorgado a Frederick Grand Banting y John James Rickard McLeod por el descubrimiento de la insulina.⁹

En 1928 se dilucidó que la insulina era un polipéptido, pero no fue hasta el año 1952 cuando fue identificada su secuencia de aminoácidos y se completó la información de que su estructura estaba conformada por 51 aminoácidos. Organizados en un dipéptido conformado por una cadena A de 21 aminoácidos y una B de 30 aminoácidos, unidas por 3 puentes disulfuro: 1 intra-catenario entre la cisteína de las posiciones 6 y 11 de la cadena A; y dos inter-catenarios: uno entre las cisteínas de la posición 7 de la cadena A y la cisteína 7 de la cadena B; y otro entre las cisteínas de la posición 20 de la cadena A y la cisteína de la posición 19 de la cadena B (Figura 1A,1B). Esta conformación molecular madura, tiene un peso molecular de 5,802 Da y un punto isoeléctrico de 5.5.¹⁰

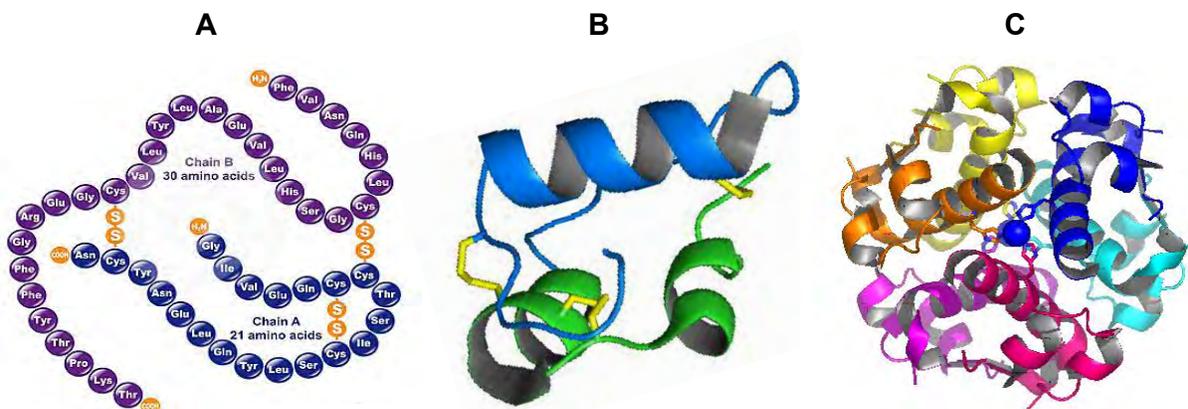


Figura 1. Esquema de la estructura de la molécula de Insulina: A) Representa la estructura primaria con su secuencia de aminoácidos y su estructura secundaria señalando sus puentes disulfuros intra- e inter-catenarios, que favorecen la asociación entre las cadenas A y B. B) Muestra una representación de la estructura terciaria: las regiones con configuraciones de alfa hélices y demás configuraciones tridimensionales, así como los puentes disulfuros en color amarillo. C) Muestra la representación de la forma en que la insulina se almacena en las vesículas del Aparato de Golgi en forma de hexámeros, coordinados por un átomo central de Zinc.

ii. Síntesis y mecanismos de acción

La insulina se codifica en el brazo corto del cromosoma 11¹¹ y es sintetizada en las células β de los islotes pancreáticos de Langerhans en forma de un precursor llamado proinsulina. Esta se sintetiza en los ribosomas del retículo endoplásmico rugoso (RER) a partir de ARNm como pre-proinsulina. La pre-proinsulina se forma por síntesis secuencial de una sola cadena de 100 aminoácidos que comprende: el péptido señal, de la cadena B, el péptido de conexión (péptido C) y finalmente la cadena A. La eliminación del péptido señal forma la proinsulina, que adquiere su característica de estructura tridimensional en el retículo endoplásmico rugoso (RER). Las vesículas secretoras transfieren la proinsulina desde el RER al aparato de Golgi donde la proinsulina se almacena de forma inmadura, y posteriormente, por acción enzimática de una proteasa específica, la proinsulina es convertida a insulina y péptido C. Posteriormente, el entorno acuoso rico en zinc y calcio de las vesículas de Golgi, favorece la formación de hexámeros insolubles de insulina al

unirse al zinc (Figura 1C). Cuando los gránulos maduros se secretan en la circulación por exocitosis, la insulina, y una relación equimolar de péptido C se liberan. La proinsulina y el zinc por lo general constituyen no más del 6% de la secreción de las células β de los islotes.¹⁰

La secreción de insulina de las células β de los islotes, hacia la vena porta hepática se caracteriza por ser pulsátil, esta refleja la suma de las ráfagas de secreción coordinadas de millones de células β de los islotes.¹² En respuesta a un estímulo, tal como la glucosa, la secreción de insulina es característicamente bifásica, con una fase inicial rápida de la secreción de insulina, seguido por una más lenta pero de liberación más sostenida de la hormona.¹³

La síntesis y secreción de insulina está regulada por secretagogos, tanto nutrientes como no nutrientes, por el contexto de los estímulos ambientales y la interacción de otras hormonas. Los secretagogos nutrientes tales como glucosa parecen desencadenar la secreción de insulina de la célula β mediante el aumento de ATP intracelular y el cierre de canales K^+ -ATP. La generación de AMP cíclico y otros productos intermedios de energía celular también favorecen la liberación de insulina. Los secretagogos no nutrientes pueden actuar a través de estímulos nerviosos, tales como las vías colinérgicas y adrenérgicas, o a través de hormonas peptídicas y aminoácidos catiónicos.¹⁴

El principal estímulo para la secreción de insulina es la glucosa, aunque otros macronutrientes, hormonas, y factores humorales pueden modificar esta respuesta. La insulina, junto con su principal hormona contra-reguladora el glucagón, regulan los niveles de glucosa en sangre, las células pancreáticas β secretan 0,25-1,5 unidades de insulina por hora durante el ayuno (o en estado basal), suficiente para permitir que la glucosa entre en las células dependientes de insulina, este nivel impide la hidrólisis no controlada de los triglicéridos y limita la gluconeogénesis, con lo cual se mantienen los niveles normales de glucosa en sangre. La secreción de insulina basal representa más del 50% del total de la

secreción de insulina de 24 horas, después de la secreción de insulina en el sistema venoso portal, el 60% es posteriormente eliminado por el hígado; así la concentración de insulina en la vena porta que llega al hígado es el triple que en la circulación periférica. En sujetos sanos las concentraciones de insulina venosa (o arterial) en ayunas son aproximadamente de 3-15 mU/L ($\mu\text{U}/\text{mL}$) o 18-90 pmol/L.¹⁵

La insulina es la hormona fundamental que regula el suministro de energía celular y el equilibrio de macronutrientes, además de dirigir los procesos anabólicos, es esencial para el transporte intracelular de glucosa en los tejidos dependientes de insulina como el músculo y el tejido adiposo, su secreción es regulada por la abundancia de energía exógena, suprime la descomposición de las grasas en el tejido adiposo y promueve su síntesis.¹⁶ En las células musculares, permite la entrada de glucosa para realizar sus funciones metabólicas y una porción de esta es almacenada en forma de glucógeno. La insulina por lo tanto, promueve la síntesis de glucógeno y lípidos en las células musculares y adipocíticas, mientras que inhibe la lipólisis y la gluconeogénesis a partir de aminoácidos musculares. En presencia de un suministro adecuado de aminoácidos, la insulina es anabólica en el músculo.¹⁷

Fisiológicamente, a nivel de todo el cuerpo, las acciones de la insulina se ven influidas por la acción de otras hormonas. La insulina, a pesar de ser la hormona dominante de conducir los procesos metabólicos en el estado de alimentación, actúa en concierto con la hormona del crecimiento, y el factor de crecimiento similar a la insulina de tipo 1 (IGF-1). La hormona de crecimiento se secreta en respuesta a la insulina, entre otros estímulos, previene la hipoglucemia inducida por la insulina; otras hormonas contra-reguladoras incluyen al glucagón el cual promueve la glucogenólisis, la gluconeogénesis y la cetogénesis; los glucocorticoides y las catecolaminas, estas hormonas impulsan los procesos metabólicos, en el estado de ayunas. La relación de las concentraciones de insulina y de glucagón, determina el grado de fosforilación o desfosforilación de las

correspondientes enzimas que regulan las señales intracelulares que median los efectos metabólicos de estas hormonas.¹⁷ Las catecolaminas promueven la lipólisis y la glucogenólisis; los glucocorticoides promueven el catabolismo muscular, la gluconeogénesis y la lipólisis. Un exceso de secreción de estas hormonas puede contribuir a la resistencia a la insulina en situaciones particulares, pero no es la causa fundamental de los estados de resistencia a la insulina, asociados a un estado energético muy positivo, típico del sobrepeso y la obesidad.

iii. Resistencia a la insulina y síndrome metabólico

En la mayoría de los casos se cree que la resistencia a la insulina se manifiesta a nivel celular a través de los defectos post-receptor en la señalización de la insulina. A pesar de los resultados prometedores en animales de experimentación con respecto a una serie de defectos de señalización de la insulina, su importancia para explicar la resistencia a la insulina en el humano aún no está clara. Los posibles mecanismos incluyen la baja regulación, las deficiencias o los polimorfismos genéticos del receptor de insulina con actividad tirocina cinasa, de las proteínas IRS o PIP-3 cinasa, o pueden implicar alteraciones de la función de GLUT-4.¹⁸

Los efectos sobre los tejidos y órganos de la insulina, su deficiencia y/o su resistencia periférica, varían de acuerdo con las funciones fisiológicas y su dependencia de la insulina para realizar los procesos metabólicos. Estos tejidos se definen como dependientes de la insulina, con base al transporte de glucosa intracelular, son principalmente el tejido adiposo y el músculo. Sin embargo, las acciones de la insulina son pleotrópicas y generalizadas, como lo son las manifestaciones de la resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia compensatoria asociada.¹⁹

El síndrome de resistencia a la insulina se caracterizan por: intolerancia a la glucosa, dislipidemia, disfunción endotelial, elevación de factores pro-coagulantes, cambios hemodinámicos, marcadores inflamatorios elevados, metabolismo

anormal de ácido úrico, aumento de la secreción ovárica de testosterona y trastornos del sueño relacionados con la respiración. Los síndromes clínicos asociados con la resistencia a la insulina incluyen a la diabetes mellitus tipo 2, enfermedades cardiovasculares, la hipertensión esencial, síndrome de ovario poliquístico, enfermedad del hígado graso no alcohólica, ciertas formas de cáncer y apnea del sueño.²⁰

La diabetes tipo 2 y el síndrome metabólico son los síndromes clínicos más comunes asociados con la resistencia a la insulina.¹⁷ También existen condiciones relativamente comunes, en las que la resistencia a la insulina es un fenómeno secundario, tales como la cirrosis hepática, insuficiencia renal, problemas en el embarazo, hipertiroidismo y síndrome de Cushing; así como la acromegalia y el feocromocitoma, que son menos comunes. En muchos de estos padecimientos, la resistencia a la insulina se debe a una mayor producción de hormonas contra-reguladoras.²¹

Sin embargo, hay también gran número de trastornos raros debido a sus características, en donde la resistencia a la insulina es una de las principales causas clínicas. Aunque individualmente son raras, estas condiciones pueden dar una idea de los mecanismos de resistencia a la insulina en otros entornos. Se caracterizan por alteraciones en los sistemas de órganos en donde la acción de la insulina juega un papel fundamental.²²

Las primeras observaciones de Jean Vague en la década de 1950 fueron redescubiertas alrededor de tres décadas después, cuando en 1988 se propuso que los individuos con intolerancia a la glucosa, triglicéridos elevados, HDL-colesterol bajo e hipertensión esencial, se encontraban en mucho mayor riesgo de desarrollar complicaciones cardiovasculares. La conexión subyacente con la resistencia a la insulina no se apreció en el momento y se conoció inicialmente como síndrome X, pero más adelante se denominó síndrome metabólico.²²

Actualmente el síndrome metabólico se define como la constelación de

anormalidades bioquímicas, fisiológicas y antropométricas, que ocurren simultáneamente y pueden dar oportunidad o estar ligadas a la resistencia a la insulina y por ende, incrementar el riesgo de desarrollar diabetes mellitus, enfermedad cardiovascular o ambas. Dentro de estas entidades se encuentran: obesidad abdominal, intolerancia a la glucosa o diabetes mellitus tipo 2, hipertensión arterial y dislipidemia (hipertrigliceridemia y/o HDL-colesterol bajo),²³ conforme a el siguiente cuadro:

Criterio	ATP III	IDF
Presión arterial (mmHg)	≥130/85	≥130/85
Triglicéridos (mg/dL)	>150	>150
Colesterol HDL (mg/dL) hombres	< 40	< 40
Colesterol HDL (mg/dL) mujeres	< 50	< 50
Circunferencia Abdominal (cm) hombres	>90	>90
Circunferencia Abdominal (cm) Mujeres	>80	>80
Glucosa plasmática de ayuno (mg/dL)	>110	>100

Cuadro 1. Criterios de síndrome metabólico. Se deben cumplir 3 de 5 criterios diagnósticos establecidos por Adult Treatment Panel III (ATPIII) e International Diabetes Federation (IDF). (López, 2007)

iv. Métodos de cuantificación

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 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 de dosis terapéuticas de insulinas. Los métodos cromatográficos, especialmente HPLC, son regularmente utilizados en el análisis de preparaciones farmacéuticas. La espectrofotometría de masas es un método con mucha complejidad tecnológica y

no está al alcance de la mayoría de los laboratorios. Por otro lado, la validación y el desarrollo de inmunoensayos, el método analítico más empleado en la rutina, desde la obtención de los reactivos hasta su implementación como método, es un proceso laborioso.²⁴

c. Inmunoensayo

i. Generalidades

Después de los primeros trabajos de Berson y Yalow, quienes en 1959 desarrollaron el primer inmunoensayo: radioinmunoanálisis o RIA, utilizando un trazador radioactivo, los inmunoensayos se han diversificado hasta nuestros días. Los hay manuales o automatizados y tienen gran cantidad de aplicaciones que van desde la detección y cuantificación de hormonas, la identificación de antígenos y anticuerpos en enfermedades infecciosas, de marcadores tumorales y 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 el reconocimiento específico del antígeno.
- 3.- El método para separar el complejo antígeno-anticuerpo unido, de los reactantes no unidos (si el ensayo usado es heterogéneo).
- 4.- El método de detección.

La eficacia de cualquier inmunoensayo depende de dos principales factores que son, la eficiencia de 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 pueden 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.

Actualmente se encuentran 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 ensayo 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 que dan señales quimioluminiscentes (ICMA), electroquimioluminiscentes y fluorescentes (FPIA).²⁴

ii. Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzima, ELISA

Los ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzima (ELISA, por sus siglas en Inglés) son un tipo de inmunoensayos enzimáticos (EIA) que se caracterizan por el hecho de que uno de los reactivos (antígeno o anticuerpo) es inmovilizado a un soporte sólido, lo que facilita la separación de la fracción libre de la unida, una vez que se han formado los complejos antígeno-anticuerpo. Éstos se distinguen de otros inmunoensayos como el RIA por el uso de una enzima acoplada ya sea al anticuerpo o al antígeno; al anticuerpo o antígeno acoplado a la enzima se le conoce como conjugado. Para poner de manifiesto la presencia de la enzima, esta se hace reaccionar con un sustrato incoloro para generar un producto coloreado.

^{25, 26}

Los ELISAs presentan grandes ventajas, que hacen que cada día se vayan imponiendo sobre métodos tales como aquellos basados en la utilización de

trazadores radiactivos o trazadores emisores de luz. Entre las ventajas que presenta se encuentran las siguientes: no requiere un equipamiento demasiado sofisticado y caro para su implementación en el laboratorio; los reactivos empleados tienen un vida media muy larga (en el caso del RIA, un trazador radiactivo marcado con yodo-125 tiene una vida media de 60 días, mientras que un conjugado enzimático utilizado en ELISA suele conservarse en buen estado durante años) y; no se corre el riesgo de contaminación producida por la manipulación de isótopos radiactivos.^{27, 28}

Clasificación y Diseño de los ELISAs

En la actualidad existen una gran variedad de diseños de ELISA que permiten la detección cualitativa o la medición cuantitativa de antígenos o anticuerpos. La configuración de un sistema de ELISA específico dependerá de los objetivos que se pretendan alcanzar; sin embargo, independientemente del diseño del ELISA, estos se pueden clasificar de forma general en dos tipos:

- A. De ampliación de actividad, multiplicativo, o no competitivos. En estos métodos la señal obtenida es proporcional a la concentración del analito que se está midiendo. Tal es el caso de los ELISA tipo sándwich.
- B. De modulación de actividad, de inhibición, o competitivos. En estos métodos la señal obtenida es inversamente proporcional a la concentración del analito que se quiere medir.^{27, 28}

Existen varios diseños del tipo competitivo, uno de ellos es aquel en el que se inmoviliza el antígeno y se utiliza un anticuerpo anti-antígeno marcado con enzima. En este caso se produce una competición entre el antígeno unido a la placa (fase sólida) y el antígeno libre en la fase líquida, por unirse al anticuerpo conjugado con la enzima. Como consecuencia de esta competición, la actividad

enzimática detectable disminuye a medida que se emplean concentraciones crecientes de antígeno libre, pues el anticuerpo conjugado es neutralizado por el antígeno de la fase líquida y se limita su unión a la fase sólida (Figura 2).²⁷

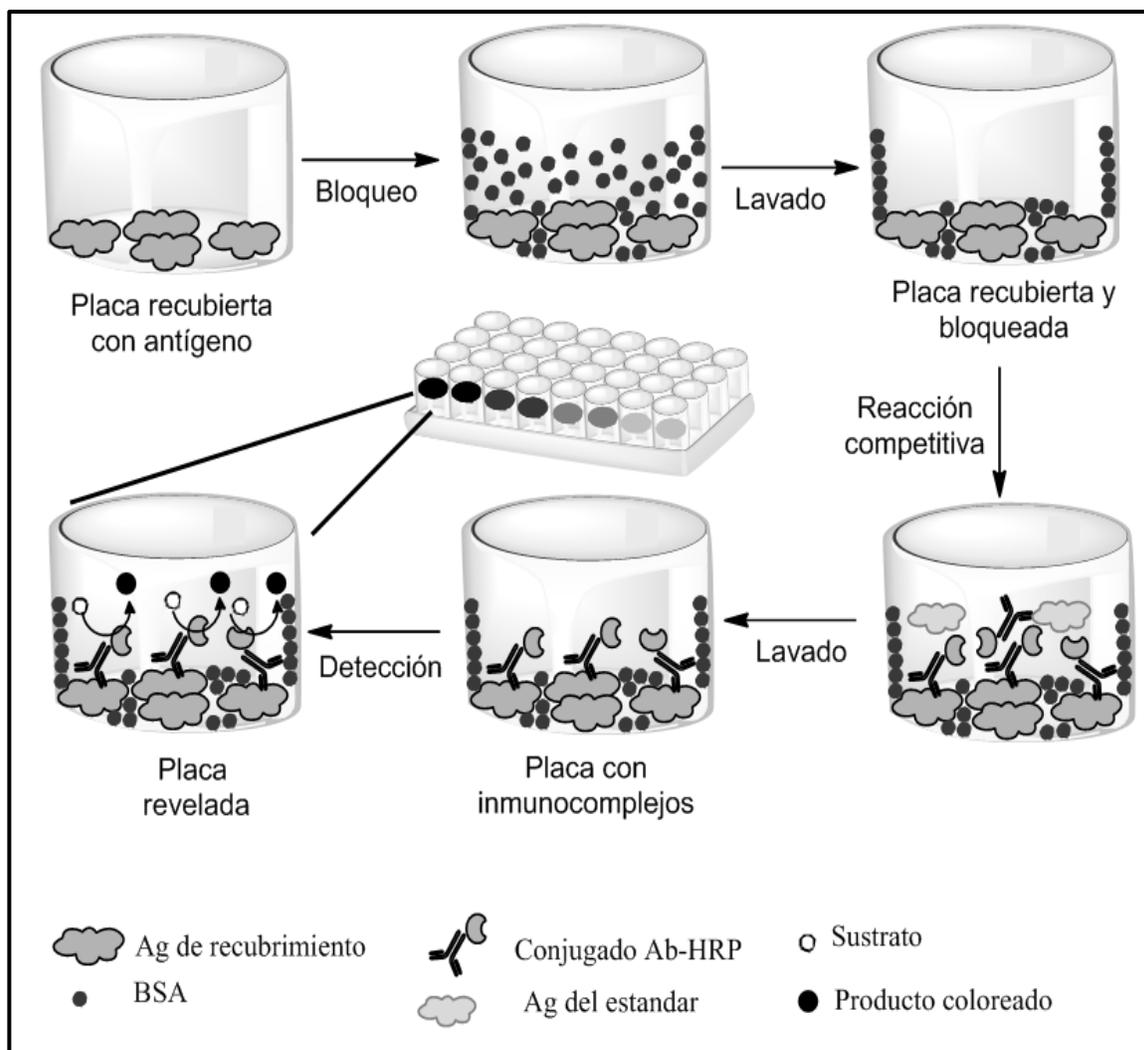


Figura 2. Diagrama esquemático del ELISA competitivo de captura de anticuerpo.

Componentes del ELISA

- I. Fase sólida. La fase sólida más ampliamente utilizada es la placa de ELISA de 96 pocillos manufacturada de Cloruro de Polivinilo (placas flexibles) o poliestireno (placas rígidas), que tienen un formato de 8 x 12 pocillos. Su

función en proveer un soporte en donde uno de los reactivos (antígeno o anticuerpo) pueda ser inmovilizado para facilitar la separación de las fracciones libre y unida, una vez que se han formado los complejos antígeno-anticuerpo. Estas fases sólidas deben reunir ciertas características, tales como poseer una alta capacidad de unión de los inmunoreactantes, ser capaces de inmovilizar diversos inmunoreactantes, producir una desorción mínima y desnaturalización despreciable de la molécula inmovilizada.

- II. Buffer de recubrimiento. Los más utilizados son el buffer carbonatos 50 mM, pH 9.6; Tris-HCl 20 mM, pH 8.5; y PBS, pH 7.2. Estos buffers proporcionan las condiciones de pH y fuerza iónica necesarias para que los antígenos o anticuerpos puedan ser unidos a la fase sólida por absorción pasiva.
- III. Buffer de lavado. Se emplea para separar la fracción libre de la unida, el buffer empleado típicamente es el PBS, pH 7.4, aunque también son empleados los buffer de fosfatos de baja molaridad (10 mM); independientemente del tipo de buffer, estos pueden llevar un detergente como el Tween-20 al 0.05%.
- IV. Buffer de bloqueo. Es un buffer de recubrimiento el cual lleva un agente bloqueante (es una molécula que no interacciona con los componentes del sistema); entre los más utilizados se encuentran la leche descremada, BSA, gelatina, casina, Tween-20, entre otros. Este buffer es empleado para prevenir cualquier unión no específica, de las proteínas en los sitios libres de la placa, con lo que se disminuye el background o fondo.^{27, 29}
- V. Conjugado. Este se obtiene por unión química de unos de los reactivos (antígeno o anticuerpo) con una enzima. Las enzimas empleadas comúnmente son la peroxidasa de rábano picante (HRP por sus siglas en inglés), la fosfatasa alcalina (ALP por sus siglas en inglés), la β -galactosidasa

y la ureasa. Existen numerosos métodos de conjugación química entre los que se encuentran la conjugación con *m*-NaIO₄ (meta-peryodato de sodio), con glutaraldehído, con PBQ (p-benzoquinona), entre otros; la elección del método a utilizar dependerá de las características del antígeno o anticuerpo a unir y de la enzima. Un buen conjugado enzimático se caracteriza por tener una composición definida y homogénea, se obtiene sin pérdida de la actividad enzimática, ni de la capacidad de reconocimiento antigénico, debido al proceso de conjugación, es altamente estable al almacenamiento por periodos prolongados, el método empleado para su obtención produce un alto rendimiento en conjugado y un bajo rendimiento en homopolímeros y, debe ser económico, rápido y fácil de preparar.^{27 - 29}

VI. Sustrato / Agente cromógeno / buffer de sustrato. El sustrato es un compuesto químico el cual reacciona específicamente con la enzima del conjugado; esta reacción produce una señal que se lee como una reacción de color (directamente como un cambio de color del sustrato o indirectamente por el efecto de la reacción sobre otro producto químico llamado agente cromógeno); para que la reacción tenga lugar es necesario controlar las condiciones de pH y fuerza iónica, lo cual se logra mediante el empleo de buffers. En el cuadro 2 se enlistan los sustratos, agentes cromógenos y buffer utilizados para las diferentes enzimas empleadas en los métodos de ELISA.²⁹

VII. Solución stop. Es una solución que se emplea para detener la reacción entre la enzima y el sustrato. En el cuadro 2 se enlistan las soluciones stop empleados para cada enzima.²⁹

Enzimas, cromógenos y condiciones de stop empleadas en los ELISAs.

Enzima	Sustrato	Cromógeno	Buffer de sustrato	Solución stop	Color		Lectura (nm)	
					Sin detener	Detenida la reacción	Sin detener	Detenida la reacción
HRP	H ₂ O ₂ (0.004%)	OPD	Fosfato / citrato, pH 5.0	1.25 M ácido sulfúrico	Verde / anaranjado	Anaranjado/ café	450	492
	H ₂ O ₂ (0.004%)	TMB	Acetatos 0.1 M, pH 5.6	SDS (1%)	azul	Amarillo	650	450
	H ₂ O ₂ (0.002%)	ABTS	Fosfato / citrato, pH 4.2	No stop	Verde	Verde	414	414
	H ₂ O ₂ (0.006%)	5-AS	Fosfatos, pH 6.8	No stop	Café	Café	450	450
	H ₂ O ₂ (0.02%)	Diaminobenzidina	Tris o PBS, pH 7.4	No stop	Café	Café		
ALP	p-NPP (2.5 mM)	p-NPP	Dietanolamina 10 mM y cloruro de magnesio 0.5 mM, pH 9.5	2 M carbonato de sodio	Amarillo/ verde	Amarillo/ verde	405	405
β-galactosidasa	ONPG (3 mM)	ONPG	Cloruro de magnesio y 2-mercaptoetanol en PBS, pH 7.5.	2 M carbonato de sodio	Amarillo	Amarillo	420	420
Ureasa	Urea	Bromocresol	pH 4.8	Mertiolate 1%	Purpura	Purpura	588	588

Cuadro 2. Enzimas, cromógenos y condiciones de stop empleadas en los ELISAs. p-NPP: p-nitrofenil fosfatos; ONPG: o-nitrofenil β-d-galactopiranosas; OPD: o-fenilendiamina; TMB: tetrametilbencidina; ABTS: 2,2'-Azino dietilbenzotiazolina ácido sulfónico; 5-AS: ácido 5-aminosalicílico; SDS: dodecilsulfato sódico. (Crowther, 2009)

Etapas del ELISA

Inmovilización de inmunoreactantes en la fase sólida

La inmovilización del inmunoreactante en la fase sólida puede ser no covalente o covalente. La primera se lleva a cabo por absorción pasiva, un proceso llamado comúnmente recubrimiento. La mayoría de las proteínas se absorben en las superficies plásticas, probablemente como resultado de interacciones hidrofóbicas entre estructuras no polares de la molécula y la matriz de plástico. Los factores más importantes que afectan en el proceso de absorción, son la temperatura, el tiempo, el pH, fuerza iónica y la concentración. De forma común, el proceso de recubrimiento se realiza incubando toda la noche a 4 °C o a 37 °C durante 1-3 horas.

Un rango de concentraciones de entre 1-10 µg/mL en un volumen de 50 o 100 µL de la molécula de recubrimiento, es suficiente para saturar los sitios disponibles en los pocillos de la placa. Para controlar el pH y la fuerza iónica, los inmunoreactantes se diluyen en buffers de recubrimiento.^{27, 29} La inmovilización covalente se realiza empleando métodos químicos, ejemplo de ello es el uso de glutaraldehído. Estos se emplean cuando las moléculas se unen con muy baja afinidad al plástico o tienen un alta desorción, tal es el caso de la unión de DNA, haptenos y oligopeptidos pequeños.^{28, 29} La concentración óptima del inmunoreactante para el recubrimiento, debe determinarse por titulación previa.²⁹

Lavado

Para ello se hace empleo de los buffers de lavado los cuales facilitan la eliminación del inmunoreactante de recubrimiento, no unido a la placa. Esta etapa de lavado y las posteriores, son críticas para separar el componente específicamente unido al inmunoreactante inmovilizado en la fase sólida, de componentes que puedan reaccionar de forma no específica.^{27, 29}

Bloqueo

Los buffers de bloqueo se emplean, debido a que después de la etapa de recubrimiento de la fase sólida persisten sitios de unión al plástico no ocupados, por lo que es necesario bloquear estos sitios con proteínas no relacionadas con el reconocimiento inmunológico. De otro modo, los inmunoreactantes que se emplearan en etapas posteriores podrán unirse inespecíficamente a estos sitios, produciendo resultados alterados.^{27, 29}

Formación de inmunocomplejos

Es esta etapa se incuba la muestra problema y/o los estándares en los pocillos de la placa, de modo que estos reaccionen con el inmunoreactante inmovilizado y con el conjugado adicionado. Se alcanzan los equilibrios químicos que producen la amplificación o modulación de la actividad enzimática del conjugado. La adición de la muestra problema (o estándares) y del conjugado se puede realizar simultáneamente o en pasos consecutivos con lavados intermedios, todo ello dependerá del diseño del ELISA. El tiempo y temperatura óptimos de incubación con cualquiera de los inmunoreactantes debe establecerse en forma empírica.^{27, 29}

En esta etapa existe el riesgo de que algunas moléculas del inmunoreactante (antígeno, anticuerpo o el conjugado enzimático) se unan en forma no específica a algún componente inmovilizado en la fase sólida, lo que produciría resultados alterados. Para evitar este efecto se diluye cada inmunoreactante en presencia de un gran exceso (0.1-1%) de una proteína no relacionada inmunológicamente, con objeto de que compita con el inmunoreactante por estos sitios de unión no específicos. Además y con el mismo fin, a estos buffers de ensayo suele agregárseles un detergente no iónico, siendo el más empleado el Tween-20 al 0.05%.

La dilución óptima del conjugado enzimático a ser empleada debe determinarse

por titulación previa.²⁷

Revelado

Después de un lavado para eliminar todas las moléculas no unidas a la fase sólida en forma de inmunocomplejos, se añade el sustrato enzimático en solución. Se deja reaccionar y se lee la absorbancia del color generado mediante espectrofotometría, utilizando un lector de placas.²⁹

Análisis de los resultados

La forma de conocer las concentraciones de la muestra problema en los ELISA, es a través de la interpolación de la respuesta producida de cada muestra problema, en el gráfico de dosis-respuesta generada por la curva estándar.

iii. Radioinmunoanálisis, RIA

El RIA es una técnica en la cual se utiliza una reacción en donde el analito en cantidades variables, compete con una cantidad constante y conocida del trazador (marca radioactiva del analito) para ocupar los sitios de unión de un anticuerpo específico. El radioinmunoanálisis requiere de cuatro elementos fundamentales y de cinco procesos básicos.^{30, 31}

Elementos del RIA

1. Ligando marcado radiactivamente o trazador. El ligando debe ser marcado radiactivamente de manera que no pierda su inmunoreactividad y debe poseer alta pureza. El isótopo radiactivo más frecuentemente utilizado como marca es el yodo-125 debido a su vida media de 60 días.^{30, 31} En el RIA, el trazador se encuentra en una cantidad baja y constante.
2. Anticuerpo específico o ligador. Es un anticuerpo obtenido tradicionalmente por la inmunización de animales (anticuerpos policlonales); recientemente

gracias a la introducción de las técnicas de hibridomas, son utilizados también anticuerpo monoclonales. Lo más importante de un anticuerpo es que sea específico para interactuar con el antígeno.^{30, 31} El anticuerpo en un RIA se encuentra en una cantidad constante y limitante.

El RIA es un tipo de análisis por saturación, es decir es un análisis donde se emplea una cantidad limitada del ligador en presencia del ligando específico en exceso; sin marca en concentraciones variables y marcado en una concentración constante, por lo tanto, si el anticuerpo específico está en tal cantidad que es saturado, la distribución de la fracción unida y lo que se queda libre del ligando marcado, depende de la relación de concentración inicial de los analitos marcados y no marcados.^{31 - 32}

Por regla general, la concentración o dilución de anticuerpo seleccionada para utilizarse en un RIA debe de ser aquella que permita la unión de entre 30 y 50 % del trazador.³¹

3. Estándares. Son cantidades conocidas del ligando o analito que se desea medir. Para evitar alteraciones en los resultados se requiere que el estándar sea de la misma especie de las muestras a evaluar, que esté en su forma biológicamente activa, y que se encuentre en una formulación que le brinde la máxima estabilidad.^{30, 31}
4. Muestra. La cual contendrá el analito no marcado que será medido y es análogo o idéntico al ligando empleado como estándar.^{30, 31}

Para estimar la concentración del analito, los inmunoensayos requieren de la comparación de los resultados obtenidos de las muestras desconocidas con los obtenidos de una serie de muestras estándares de concentraciones conocidas.^{30, 31, 32}

Procesos básicos del RIA

1) La reacción del RIA

El ligando marcado (trazador) y el no marcado compiten entre sí para unirse al anticuerpo hasta alcanzar el equilibrio de reacción, con la formación de los correspondientes complejos antígenos-anticuerpo. A partir de esta reacción puede determinarse la radioactividad presente en los complejos inmunes, y asociarlos con las concentraciones de los estándares empleados, lo que permite establecer una relación dosis respuesta. Pudiéndose estimar la dosis o concentración del analito presente en la muestra a evaluar, por comparación con el comportamiento obtenido por los estándares de concentración conocida. (Figura 3).^{30 - 32}

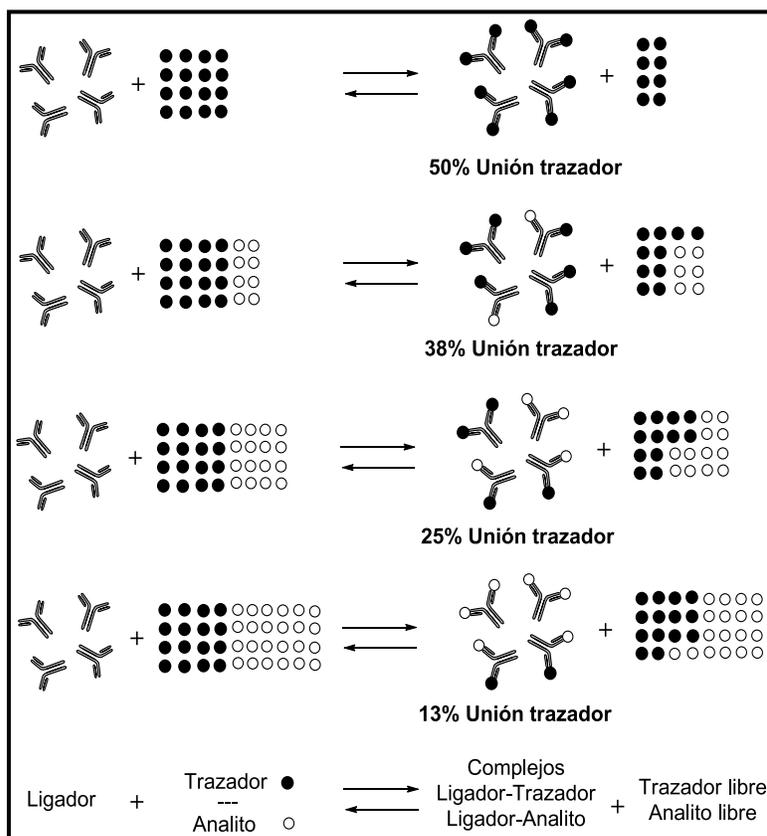


Figura 3. Análisis por enlace en el RIA. En el RIA la cantidad de radioactividad presente en la fracción unida es inversamente proporcional a la cantidad de antígeno no marcado, por lo que esta va disminuyendo desde 50% que es la unión máxima, en donde no está presente el antígeno no marcado, hasta un 13% cuando existe mayor cantidad de antígeno no marcado que de trazador, en esta figura. Nótese que las cantidades de anticuerpo y trazador son limitadas y constantes, no así la del antígeno sin marcar, estas van aumentando, por lo que la unión ligador-trazador disminuye.

Tiene una duración que va desde 2 hasta 24 horas, con una temperatura que varía entre 4 °C a 37 °C, dependiendo del anticuerpo utilizado y el método empleado. Tiene como finalidad que se establezca un estado de equilibrio entre el trazador y el ligando no marcado en su unión con el anticuerpo (Figura 4).^{30 - 32}

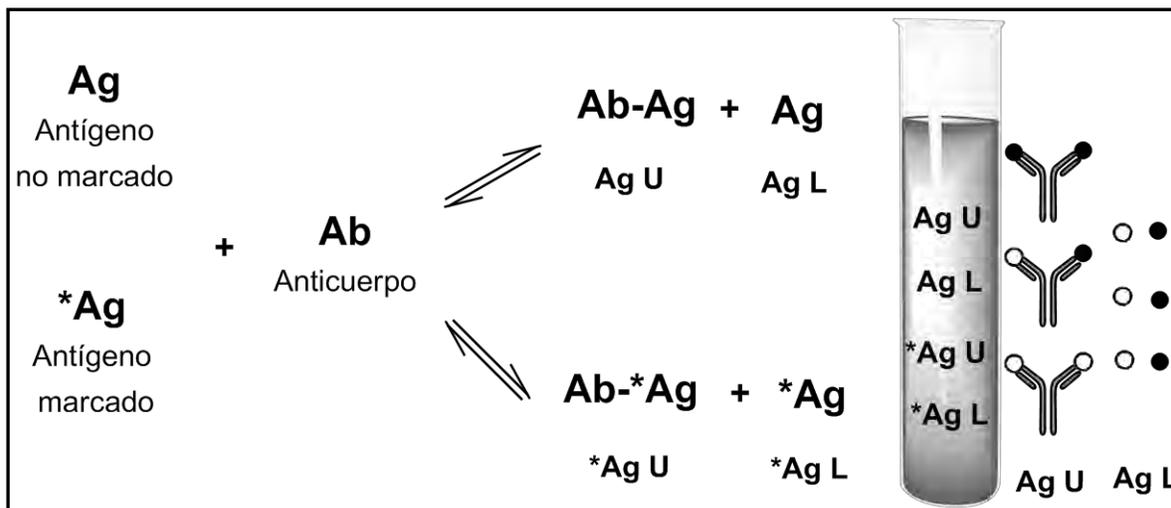


Figura 4. Reacción de equilibrio en el RIA. Mediante este esquema se demuestra la relación de las fracciones unidas al anticuerpo y libres de los antígenos (analitos) marcados y no marcados. Su distribución en los complejos inmunes, está en función de la relación de concentraciones del antígeno marcado y el no marcado.

3) Separación de las fracciones libre y unida

Existen muchos métodos para separar el ligando libre del unido al anticuerpo, entre los que se encuentran la migración diferencial, precipitación de los inmunocomplejos formados mediante la utilización de un segundo anticuerpo o por absorción del ligando libre utilizando carbón activado, o resinas, seguido de un proceso de centrifugación; o en fase sólida donde la formación de los inmunocomplejos ocurre unido a tubos o placas de polipropileno y la fracción libre solo se decanta.^{30 - 32}

4) Medición de la radioactividad

La radioactividad del trazador libre o del unido al anticuerpo, es medida en contadores gamma si se trata de sustancias que emiten rayos gamma como el yodo-125. Los contadores de centelleo líquido se utilizan cuando la sustancia emite partículas β como el tritio o el carbono-14.³⁰

El conteo de las radiaciones de los tubos procesados se expresa en conteos por minutos (CPM). Una vez que se le restan los CPM obtenidos de la unión no específica (UNE), y se divide entre los CPM totales del trazador empleado, se convierte a porcentaje de la radiactividad unida al anticuerpo (% Unión Específica) por medio de la fórmula:

$$\frac{CPM \text{ de la muestra} - CPM \text{ de la UNE}}{CPM \text{ totales}} \times 100 = \% \text{ de Unión Específica}$$

Donde, los CPM totales es la cantidad total de radiactividad del trazador presente al inicio de la reacción y los CPM de la muestra es la cantidad de radiactividad unida al anticuerpo después del método de separación, ya sea que se halla adicionado estándares o la muestra problema.^{30, 31}

Ejemplo. Cantidad total de CPM del trazador presente al inicio de la reacción: 21,480 CPM.

Después del método de separación (en ausencia de analito sin marcar, que compita con el trazador) la cantidad del trazador presente en:

Fracción unida: 7,567 CPM Fracción libre: 13,913 CPM UNE: 502 CPM

Calculo de la unión a estándar cero o unión específica máxima (B_0)

$$\%B_0 = ((7,567 - 502)/21,480) \times 100\% = 32,89\%$$

Por lo que, el porcentaje de unión es igual al 32.9%. El valor de 32.9% representa

la máxima unión del trazador al ligador específico en ausencia de analito y es llamado B_0 (Unión a estándar cero o unión específica máxima).

De la misma forma se calculan los porcentajes de unión del trazador al anticuerpo en presencia de estándares o muestras que contienen concentraciones del analito distintas de cero, el cual compete con el trazador por unirse al anticuerpo (%B).

En el siguiente ejemplo (cuadro 3), se dan las respuestas correspondientes a cada dosis cuando se cuantifica la fracción unida de un trazador radiactivo, representado como porcentaje de la radiactividad total.

CPM totales: 21,480 CPM

UNE: 502 CPM

Concentración Analito (unidades arbitrarias)	CPM	CPM - UNE	% de Unión
0	7,567	7,065	32.9
300	7,199	6,697	31.2
600	6,842	6,340	29.5
1,200	6,054	5,552	25.8
2,400	4,839	4,337	20.2
4,800	3,595	3,093	14.4
9,600	2,633	2,131	9.9
19,200	1,838	1,336	6.2
38,400	1,618	1,116	5.2

Cuadro 3. Ejemplo

5) Análisis de los datos

Al graficar el porcentaje de trazador unido contra las concentraciones de los estándares en una escala semilogarítmica se obtiene una curva sigmoide. La forma de conocer las concentraciones de las muestras problema es a través de la interpolación de la respuesta producida en la muestra en la curva dosis-respuesta obtenida de la curva estándar (Figura 5).³¹

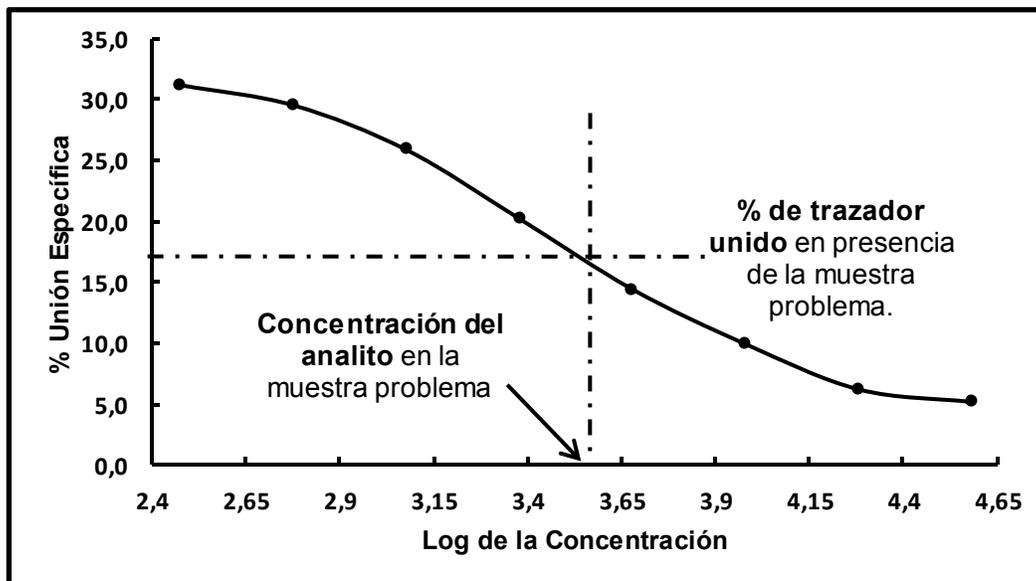


Figura 5. Estimación de la cantidad de analito presente en una muestra desconocida utilizando una curva estándar. La muestra desconocida es tratada bajo las mismas condiciones que los estándares, y el porcentaje de trazador unido es de aproximadamente 17.5%; esto corresponde a un valor de 3.52 (escala logarítmica) y un resultado final de 33.78 unidades arbitrarias de concentración.

En la mayoría de los casos se requieren realizar cálculos adicionales o transformaciones matemáticas con la finalidad de obtener una curva estándar, que al representarse en forma gráfica de una línea recta, que permita una mayor exactitud en la estimación de la concentración del analito presente en la muestra.

30, 31

Uno de los métodos más utilizados y uno de los más prácticos es la transformación Logit. Es un método que emplea la conversión de la dosis a logaritmos y la respuesta expresada como porcentaje en logaritmo de la relación de $((B/B_0)/(1-(B/B_0)))$.^{30, 31}

$$X = \text{Log de la dosis} \qquad Y = \text{Logit} = \text{Log} \left[\frac{\left(\frac{B-UNE}{B_0-UNE} \right)}{\left(1 - \frac{B-UNE}{B_0-UNE} \right)} \right]$$

Dónde:

B= CPM en cada una de las dosis y B₀= CPM de estándar cero.

En algunas situaciones la transformación de los datos de la curva estándar mediante el sistema Logit puede no resultar en una línea recta, por lo que es necesario utilizar otros modelos y representaciones matemáticos como el modelo logarítmico, el modelo de ley de acción de masas o el modelo logístico de 4 parámetros; muchos de los cuales están ya disponibles en programas computacionales o en el mismo software del equipo que realiza la lectura de radiactividad.³¹

iv. Validación de métodos analíticos

Un método analítico se define como la descripción de secuencias de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir, para llevar a cabo el análisis de un componente específico en una muestra, denominado analito. Como todo proceso de medición, éste debe de ser confiable para ser utilizado para el propósito definido.³³

La validación de métodos analíticos es el proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada; es decir cumple con su propósito. Según su objetivo los métodos analíticos se clasifican en cuatro categorías: 1) pruebas de identificación, 2) pruebas cuantitativas para impurezas, 3) pruebas de límites de impurezas y 4) pruebas de concentración o potencia.

Al llevar a cabo el proceso de validación, uno debe tener en cuenta que los parámetros de validación pertinentes, dependen de la finalidad específica de la medición; además de si la validación a realizarse será parcial o completa.^{33, 34}

En el cuadro 4 se resumen las 4 categorías de los métodos analíticos y los parámetros de validación a estudiar en cada uno de ellos.

Parámetros de desempeño a estudiar en la validación de los métodos analíticos.				
Clasificación del método.	Identificación	Prueba para impurezas		Concentración o Potencia
		Cuantitativa	Límite	
Parámetros				
Exactitud	-	+	-	+
Precisión				
▪ Repetibilidad	-	+	-	+
▪ Precisión intermedia	-	+(1)	-	+(1)
Especificidad ⁽²⁾	+	+	+	+
Linealidad	-	+	-	+
Límite de detección	-	-(3)	+	-
Límite de cuantificación	-	+	-	-
Rango	-	+	-	+

Cuadro 4. Parámetros de desempeño a estudiar en la validación de los métodos analíticos.(-) Significa que esta característica no se evalúa normalmente. + significa que esta característica normalmente se evalúa. (1) En los casos en que se ha realizado reproducibilidad, la precisión intermedia no es necesaria. (2) La falta de especificidad de un procedimiento analítico podría ser compensado por otros procedimientos analíticos de apoyo. (3) Puede ser necesaria en algunos casos.

A continuación se describen algunos de los parámetros que se estudian durante la validación de los inmunoensayos de acuerdo al Colegio Nacional de QFBs y a la ICH, y se menciona de manera breve la forma en que se evalúan.

Exactitud

La exactitud de un método analítico expresa el grado de concordancia entre el valor que se acepta, ya sea como un valor convencional verdadero o un valor de

referencia aceptado y el valor encontrado con el método.

Existen diversas formas para determinar la exactitud de un método.

- a. Empleando el método para analizar un analito de concentración conocida (por ejemplo una sustancia de referencia).³³
- b. Por comparación de los resultados obtenidos por el método analítico a validar con los de un segundo procedimiento bien caracterizado, al evaluar las mismas muestras.³³
- c. Por pruebas de recuperación, en donde se analiza una muestra antes y después de adicionar una cantidad conocida del analito, y el resultado se calcula y expresa matemáticamente en forma de porcentaje de recuperación $((\text{valor obtenido} / \text{valor esperado}) \times 100)$.^{33, 35} Un criterio de aceptación para esta prueba, en el caso de los inmunoensayos, es que el porcentaje de recuperación se encuentre entre 80 a 120%.³⁵
- d. Una forma muy empleada para evaluar la exactitud, en los métodos de inmunoensayos, es a través de ensayos de paralelismo o dilución, el cual es usado también para evaluar la linealidad. Para que los resultados de este método sean válidos es esencial que el analito en el estándar y en las muestras tengan un comportamiento similar; por esta razón las diluciones no deben afectar el resultado final. Con este ensayo se evalúa el efecto matriz. Para llevar a cabo esta evaluación se realiza al menos tres diluciones de diferentes muestras que cubren el rango analítico; los resultados obtenidos se corrigen por el factor de dilución y deben ser idénticos dentro del rango experimental, por lo que el coeficiente de variación no debe ser mayor al de la precisión del ensayo. También se puede evaluar los resultados a través del coeficiente de determinación (r^2) y correlación (r).³⁵

Especificidad

La especificidad es la capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no de otros componentes de la muestra, entre los cuales se pueden encontrar impurezas, productos de degradación, matriz, etc.³⁴

Para el caso de los bioensayos basados en unión a ligandos (como el ELISA y el RIA) se deben evaluar las interferencias causadas por sustancias fisiológicamente similares al analito (metabolitos, fármacos, compuestos endógenos, etc.) de forma individual y en combinación con el analito de interés. También se debe estudiar los efectos causados por la matriz y/o compuestos presentes dentro de esta, como lípidos, hemoglobina, anticoagulantes, etc. Mediante pruebas de paralelismo se puede evaluar la especificidad del método.^{35, 36}

Precisión

La precisión de un método analítico expresa el grado de dispersión entre una serie de mediciones obtenidas a partir del muestreo múltiple de la misma muestra homogénea.

La precisión puede ser considerada a tres niveles:

- *Repetibilidad*: expresa la precisión en las mismas condiciones de operación (mismo analista, mismos equipos, etc.) durante un intervalo corto de tiempo (mismo día). A la repetibilidad también se le denomina precisión intra-ensayo.
- *Precisión intermedia*: expresa las variaciones dentro de laboratorio; diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos, etc.
- *Reproducibilidad*: expresa la precisión entre laboratorios (estudios de colaboración, por lo general se aplica a la estandarización del método).³⁴

La precisión debe ser evaluada usando un mínimo de cinco determinaciones por concentración. Se recomienda un mínimo de tres concentraciones dentro del rango de concentraciones del método. La precisión es generalmente expresada a través de la varianza, desviación estándar o el coeficiente de variación (CV). Los inmunoensayos enzimáticos, por su propio carácter, son menos precisos que las técnicas químicas o físicas, por lo que el criterio de aceptación es menos riguroso. Para cada nivel ensayado se acepta un CV no mayor al 20%, salvo el límite inferior de cuantificación el cual no puede superar el 25% de CV; se consideran óptimos los CV menores al 5 o 10%.^{33, 35, 36}

Linealidad

La linealidad es la habilidad del método para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática definida, son proporcionales a la concentración del analito, dentro de un determinado rango de concentraciones.

En la evaluación de éste parámetro es recomendable utilizar una serie de cinco concentraciones del analito de interés. La linealidad del método puede evaluarse, analizando los resultados experimentales, por medio de un método estadístico apropiado, como es la línea de regresión obtenida por el método de mínimos cuadrados, que permiten llevar a cabo la estimación matemática del grado de linealidad del método analítico. El coeficiente de determinación (r^2) es utilizado como criterio de aceptación en la determinación de la linealidad del método; considerándose como óptimo, un $r^2 \geq 0.98$.³³

Límite de detección

El límite de detección es la dosis más baja distinta de cero del analito, que puede ser detectada por el método, pero no necesariamente cuantificada con un valor exacto.³³

Para el caso de los inmunoensayos una forma para calcular el límite de detección es a través de la medición de la respuesta de un número considerable de blancos (muestras que carecen del analito), típicamente 20 a 50. Entonces se calcula la media de la respuesta (señal de la dosis cero) y se le restan (si el método es de inhibición competitiva) o se le suma (si el método es multiplicativo no competitivo) dos veces el valor de la desviación estándar. Finalmente dicho valor obtenido se interpola en la curva estándar y cualquier concentración arriba (método competitivo) o abajo (método no competitivo) de este valor tiene un 95 por ciento de probabilidad de ser un resultado distinto de cero.^{25, 33, 35}

v. Normatividad

La Norma NMX-EC-17025-IMNC-2006 “Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración” establece lo siguiente en sus puntos:

5.4.5.1. La validación es la confirmación por examen y la provisión de evidencia objetiva de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico propuesto.

5.4.5.2. El laboratorio debe validar los métodos no normalizados, los métodos que diseña o desarrolla, los métodos normalizados empleados fuera del alcance previsto, así como las ampliaciones y modificaciones de los métodos normalizados, para confirmar que los métodos son aptos para el fin previsto.³⁷

Por otra parte la Entidad Mexicana de Acreditación (EMA) establece que para los métodos desarrollados se debe realizar la validación completa y presentar las evidencias correspondientes³⁸, estas pruebas son:

- Linealidad
- Precisión
- Veracidad
- Limite de detección
- Selectividad
- Sensibilidad analítica
- Intervalo de trabajo
- Especificidad analítica
- Incertidumbre

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A principio de la década de 1960 se desarrolló por primera vez la tecnología para la cuantificación de hormonas peptídicas en fluidos biológicos; creándose así las bases de la endocrinología moderna. El radioinmunoanálisis para la cuantificación de insulina fue introducido hace más de 50 años y aun así existen grandes retos y problemas analíticos por resolver en lo que se refiere a la medición de esta hormona y sus moléculas relacionadas. Actualmente los reportes clínicos muestran mucha ambigüedad en los valores de esta hormona cuando son medidos por estuches diferentes, por lo cual no se han podido establecer valores de referencia que sean universalmente aceptados.

En nuestro país no existe ninguna empresa o entidad pública o privada de docencia, investigación o comercialización que realice la producción de estos métodos analíticos, por lo que estos deben ser importados con el consiguiente incremento en los costos de operaciones, haciendo que la medición de insulina por una razón puramente económica no pueda ser realizada en la magnitud que debiera ser para poder estar en condiciones de garantizar la detección preventiva de pacientes en un estado prediabético y de esa forma poder intervenir adecuadamente para evitar la progresión de la enfermedad y los altos costos posteriores necesarios para el cuidado de las complicaciones crónicas que ocasiona, no solo para los pacientes sino también para la sociedad en general.

Es necesario crear nuevas posibilidades analíticas para garantizar el diagnóstico oportuno de pacientes que sufren de alteraciones metabólicas, por lo cual el presente trabajo tendrá como objetivo desarrollar y validar un inmunoensayo que genere resultados confiables y una disminución en costos. Así mismo, se podrá transferir la tecnología a otras instituciones para garantizar una mejor calidad en la atención de los pacientes con trastornos metabólicos, los cuales tienen una tasa de incidencia muy elevada entre la población mexicana y que se estima tenga una prevalencia ascendente para los próximos años.

IV. OBJETIVOS

Objetivo general:

Desarrollar y validar un inmunoensayo para la cuantificación de insulina humana.

Objetivos específicos:

Para el desarrollo de un ELISA:

- 1) Producir anticuerpos anti-insulina humana en cobayos.
- 2) Purificar los anticuerpos anti-insulina humana por cromatografía de inmunoafinidad.
- 3) Normalizar el proceso de recubrimiento de las placas de ELISA con los anticuerpos purificados.
- 4) Marcar la insulina con biotina.
- 5) Sintetizar y caracterizar un conjugado enzimático de Avidina acoplada a peroxidasa de rábano picante.
- 6) Normalizar un ELISA de competición en fase sólida ELISA en placas de 96 pozos.

Para el desarrollo de un RIA

- 7) Preparar el trazador radioactivo por marcaje con yodo-125 de la molécula de insulina humana.
- 8) Realizar la titulación del antisuero policlonal anti-insulina
- 9) Normalizar un radioinmunoanálisis de competición en fase líquida con precipitación por segundo anticuerpo.

Para ambos métodos:

- 10) Estandarizar el inmunoensayo a través de la evaluación de la precisión y la exactitud del método desarrollado.
- 11) Evaluar la estabilidad del estuche diagnóstico a 4 °C y 37 °C.
- 12) Evaluar el desempeño del método en condiciones reales de trabajo y comparar los resultados con los obtenidos al procesar las mismas muestras por el método comercial IMX de ABBOTT, empleado en el laboratorio de Diabetes del Departamento de Endocrinología del INCMNSZ.
- 13) Evaluar la reactividad cruzada con insulina de otras especies de animales de laboratorio y de interés pecuario.

V. HIPÓTESIS

Si es posible obtener los anticuerpos específicos anti-insulina, se podrá desarrollar un inmunoensayo para la cuantificación de insulina humana que sea confiable, demostrando así la utilidad del desarrollo metodológico, no solo por la calidad de los resultados, sino también, por el menor costo de operaciones.

VI. DISEÑO EXPERIMENTAL

Tipo de estudio:

El estudio que se realizara será observacional, prospectivo, longitudinal y comparativo; al analizar los resultados obtenidos de cuantificar los niveles de insulina, en muestras de pacientes diabéticos e individuos controles sanos (que abarcarán el rango de concentraciones de la curva estándar) con el inmunoensayo desarrollado y el comercial de referencia.

Población de estudio:

Muestras séricas de individuos controles y pacientes diabéticos ambulatorios, que acuden regularmente a la consulta de diabetes del INCMNSZ.

Criterios de inclusión y exclusión:

a) Sueros control de individuos sanos

Criterios de inclusión: Muestras de sueros obtenidas de sujetos sanos, en ayuno de 8 horas y con valores de glucemia menores de 100 mg/dL.

Criterios de exclusión: Muestras séricas obtenidas de sujetos que no se apeguen al tiempo de ayuno y/o cuyos valores de glucemia sean mayores a 100 mg/dL.

b) Sueros de pacientes diabéticos

Criterios de inclusión: Muestras de sueros obtenidas de sujetos diabéticos, en ayuno de 8 horas y con valores de glucemia mayores de 126 mg/dL.

Criterios de exclusión: Muestras séricas obtenidas de sujetos que no se apeguen al tiempo de ayuno.

Variables:

Independiente

- I. Tipo de suero a analizar.

- Suero de individuos sanos (grupo control).
- Suero de pacientes diabéticos (grupo problema).

II. Inmunoensayo a emplear para la cuantificación

- ELISA (desarrollado).
- ELISA (marca comercial).

Dependientes

- I. Densidad óptica de la muestra.

Materiales y Métodos

A. Para la normalización del ELISA.

- I. Preparación del antígeno Insulina.

Equipo

- Espectrofotómetro DU 650 (Beckman)

Material

- Celda de cuarzo.
- Membrana semipermeable de 3,5 kDa (Spectra/Por Molecularporous membrane tubing; Spectrum Laboratories Inc.).
- Matraz Erlenmeyer de 4 L.
- Tubos de ensayo 13 x 100 mm.

Reactivos

- PBS, pH 7,4.

Se utilizó insulina humana rápida recombinante producida por la compañía Eli Lilly de México. Se tomaron 6 ampolletas y se mezclaron, el volumen total fue dializado contra PBS pH 7.4 utilizando una membrana Spectra/Por de 3.5 kDa. Se hizo

cambio de diálisis cada 12 h durante 3 días para asegurar la eliminación completa del agente preservante (un derivado fenólico, que interfiere en la reacción de marcaje con el yodo-125). La insulina dializada se cuantificó espectrofotométricamente, para ello se prepararon 4 diluciones diferentes y se leyeron a una longitud de onda de $\lambda=280$ nm en tres días diferentes, y se estimó la concentración considerando el coeficiente de absorción molar de la insulina a 280 nm, considerando que una solución altamente purificada de insulina humana de 1 mg/mL tiene una absorbancia de 0.98 unidades.³⁹ Se estimaron las concentraciones de cada dilución, se multiplicó por las diluciones y se estableció la concentración promedio de las 12 mediciones totales.

La insulina humana fue empleada como inmunógeno para obtener anticuerpos de alta afinidad.⁴⁰

II. Producción del suero hiperinmune anti-insulina humana

Animales de experimentación

- 10 cobayos hembra jóvenes adultas de aproximadamente 550 g de peso.

Equipo

- Contador de radiaciones gamma (Cobra II Auto Gamma; Packard).

Material

- Material para RIA de Insulina (Anexo 1).

Reactivos

- Adyuvante completo de Freund (Sigma Aldrich).
- Adyuvante incompleto de Freund (Sigma Aldrich).
- Insulina purificada.
- Complete mini (Protease Inhibitor Cocktail Tables, Roche).

- Reactivos para RIA de Insulina (Anexo 1, variante A).

Esquema de inmunización

Los cobayos fueron inmunizados por vía subcutánea según un esquema de hiperinmunización prolongada durante 6 meses para obtener anticuerpos de alta afinidad.⁴⁰ Consistió en una inmunización inicial con 1 mL de Insulina humana disuelta en Adyuvante Completo de Freund (Sigma Aldrich) a una concentración de 200 µg/mL. Transcurridos 15 días, se les administró un segundo estímulo con 1 mL de Insulina humana disuelta en Adyuvante Incompleto de Freund (Sigma Aldrich) a la misma concentración.

Posteriormente, los animales fueron inmunizados una vez al mes, durante 5 meses, con 1 mL de Insulina humana en adyuvante incompleto de Freund a una concentración de 100 µg/mL. Finalmente, se decidió sangrar a los cobayos 6 meses posteriores a la primera inmunización. La sangre obtenida de cada animal fue centrifugada para separar el suero, y a éste se le adiciono por cada 10 mL, 1 tableta de inhibidores de proteasas (Complete mini; Roche) disuelta en 1.5 mL de PBS, pH 7.4. El suero hiperinmune así obtenido, se conservó en congelación a -20 °C y una alícuota de cada suero fue almacenada a 4 °C hasta el momento de ser evaluada la respuesta inmune de cada animal.

La respuesta inmune fue evaluada por la capacidad de los antisueros de unir una cantidad de 20 000 conteos por minuto (CPM) de insulina humana marcada con Yodo-125 (I^{125}), se realizaron 16 diluciones seriadas $\frac{1}{2}$ de cada uno de los 10 antisueros obtenidos en buffer PBS-BSA 1% pH 7,4.

III. Síntesis de la matriz cromatográfica de Affi-Gel 102 – Insulina.

Para la síntesis de la matriz de Affi-Gel 102 – insulina, se procedió según lo propuesto por el fabricante.⁴¹ Para ello se mezcló 45 mL de Insulina (con una concentración de 3.94 mg/mL) con 20 mL de Affi-Gel 102. Bajo agitación, se añadió 700 mg de reactivo acoplador EDAC, se ajustó el pH a 5.0 con HCl 1 N y

se dejó durante 12 horas en agitación circular a 4 °C para que la reacción se completara.

Se empacó una columna cromatográfica 1.5 x 10 cm (Glass Econo-Column, BIO RAD) con la matriz de Affi-Gel 102 – Insulina preparada y se lavó con 100 mL del buffer de fosfatos 20 mM, pH 7.1. Se cuantificó la cantidad de proteína en el eluato; a través de la estimación de la concentración por Lowry y su multiplicación por el volumen total del lavado. De esta forma se pudo determinar la cantidad de proteína acoplada a la matriz, como la diferencia entre la proteína adicionada y la recuperada en el lavado. Posteriormente, se equilibró la columna con 30 mL de buffer Tris 0.1 M, pH 7.4, para dejarla lista para el inicio del proceso de purificación.

IV. Purificación por cromatografía de inmunoafinidad de los anticuerpos policlonales anti-Insulina mediante la matriz de Affi-Gel 102 – Insulina.

Equipo

- Bomba peristáltica (Pump P-1; Pharmacia Biotech).
- Fraccionador (Waters).

Material

- Columna cromatográfica 1.5 x 10 cm (Glass Econo-Column BIO RAD).
- Tubos de ensayo 13 x 100 mm.
- Sistema desechable de esterilización por filtración con membrana de acetato de celulosa con poro de 0.22 µm (CORNING).
- Unidades de filtración por centrifugación con membrana de celulosa de 10 kDa (Amicon Ultra; Merck Millipore).
- Material para RIA de Insulina (Anexo 1).

Reactivos

- Suero hiperinmune anti-Insulina producido en cobayo.
- Affi-Gel 102 (BIO RAD).
- Insulina humana purificada.
- EDAC (hidrocloruro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodimida; Sigma Aldrich)
- Buffer de elución: buffer de fosfatos 20 mM, pH 7.1.
- Buffer de elución: buffer Tris 0.1M, pH 7.4.
- Buffer de elución: 1M de NaCl en buffer glicina 0.1M, pH 3.
- Buffer de elución: 1M de NaCl en buffer trietanolamina 0.1 M, pH 11.
- Buffer de PBS, pH 7.4.
- Reactivo de Bradford (BIO RAD).
- Reactivo para cuantificación de proteínas por Lowry (BIO RAD).
- Reactivos para RIA de Insulina (Anexo 1, variante A).

Se aplicó a la columna cromatográfica con matriz Affi-Gel 102 – Insulina, 25 mL del suero hiperinmune diluidos $\frac{1}{2}$ con 25 mL de buffer Tris 0.1 M, pH 7.4, a un flujo de 35 mL/h. Se recolectaron fracciones de 3.5 mL, primero se lavó la columna con 200 mL del buffer Tris 0.1 M, pH 7.4 conteniendo 0.1 M de NaCl. Posteriormente se pasó 200 mL de 1 M de NaCl en buffer glicina 0.1 M, pH 3. Después se pasó 200 mL de 1 M de NaCl en buffer trietanolamina 0.1 M, pH 11. Finalmente se lavó la columna con 120 mL de buffer Tris 0.1 M, pH 7.4, para restablecer las condiciones de pH y fuerza iónica iniciales. Con las fracciones colectadas se obtuvieron dos cromatogramas; el primero por el método de Bradford (medición de proteína), y el segundo a través de la medición de la capacidad de unión de los anticuerpos a la insulina humana marcada con yodo-125.

Las fracciones correspondientes a los picos 2 y 3 se mantuvieron separadas, y se concentraron los anticuerpos con el empleo de unidades de concentración por centrifugación con membrana de celulosa de 10 kDa (Amicon Ultra; Merck Millipore). Una vez concentrados, los anticuerpos fueron dializados

extensivamente contra buffer PBS, pH 7.4. Finalmente se les cuantificó la concentración de proteína mediante la técnica de Lowry y los anticuerpos fueron utilizados para el recubrimiento de placas.

V. Síntesis del conjugado Avidina – HRP

Material

- Membrana semipermeable de 10-12 kDa (Spectra/Por Molecularporous membrane tubing; Spectrum Laboratories Inc.).

Reactivos

- Peroxidasa de rábano picante (HRP tipo VI, $R_z \approx 3$; Sigma).
- Peryodato de sodio (Merck)
- Borohidruro de sodio (Merck)
- Avidina (Sigma)
- Buffer fosfato de sodio 10 mM, NaCl 0.15 M, pH 7.2
- Buffer acetato de sodio 1 mM, pH 4.
- Buffer carbonato de sodio 200 mM, pH 9.5.
- Buffer PBS pH 7.4.
- Glicerol (Fluka).

Se sintetizó el conjugado por el método del periodato de sodio.⁴² Para ello, se pesaron 5 mg de Avidina y 10 mg de peroxidasa de rábano picante (tipo VI, $R_z \approx 3$; Sigma).

Se resuspendió 10 mg de peroxidasa de rábano picante en 1,2 mL de agua bidestilada y se adicionó 0,3 mL de periodato de sodio 0,1 M (Merck) en fosfato de sodio 10 mM, NaCl 0.15 M, pH 7.2, preparado recientemente. Se incubó la solución a temperatura ambiente (TA) 20 min con agitación magnética, posteriormente se dializó contra tampón acetato de sodio (AnalaR) 1 mM pH 4 a 4

°C durante toda la noche. Se pesaron 5 mg de Avidina y se diluyeron en 500 µL de tampón carbonato de sodio (AnalaR) 200 mM pH 9.5. Posteriormente, se mezclaron ambas disoluciones y se incubaron a TA durante 2 h con agitación magnética. A continuación se adicionaron 100 µL de borohidruro de sodio (Merck) 4 mg/mL en agua bidestilada para estabilizar las bases de Schiff, y se incubaron a TA durante 2 h con agitación magnética. Se dializo la solución de conjugado contra PBS, pH 7.4 a 4 °C durante toda la noche. Finalmente, se mezcló la solución de conjugado con glicerol (Fluka) al 50% V/V y se conservó a -20 °C hasta su uso.

VI. Síntesis de Insulina-D-Biotina; purificación y evaluación de la identidad estructural de la Insulina-D-Biotina sintetizada

Equipo

- Agitador rotatorio (Glas-Col)
- Contador de radiaciones gamma (Cobra II Auto Gamma; Packard)
- Bomba peristáltica (Pump P-1; Pharmacia Biotech)
- Fraccionador (Waters)

Material

- Membrana semipermeable de 3.5 kDa (Spectra/Por Molecularporous membrane tubing; Spectrum Laboratories Inc.)
- Matraz Erlenmeyer de 4 L

Reactivos

- PBS 1X, pH 7.4
- PBS 10X, pH 7.4
- Insulina humana recombinante dializada (Eli Lilly de México)
- D-Biotina (Sigma)

Se tomaron 3 mL de insulina humana dializada (aproximadamente 12 mg) a los cuales se agregaron 315 mg de EDAC, se mezcló inmediatamente y se adicionaron 12 mg de D-Biotina disueltos en 15 mL de PBS 10X pH 7,4. Se incubó

durante 2 horas con agitación rotatoria a temperatura ambiente. Posteriormente el volumen resultante se dializo contra PBS 1X pH 7,4 durante toda la noche. Se centrifugo a 3000 rpm por 15 minutos para la eliminación de los macro-complejos insolubles formados, y una vez decantado, el volumen total fue purificado mediante una columna de exclusión molecular de Sephadex G-200 utilizando PBS 1X pH 7,4 como eluyente, a un flujo constante de 35 mL/h, las fracciones fueron evaluadas mediante RIA y se tomaron solo aquellas que mostraron un reconocimiento específico del anticuerpo anti-insulina.

VII. Diseño Metodológico.

La metodología elegida fue el ELISA de competición en fase sólida (placa de 96 pozos).

Desarrollo del ensayo de ELISA

Equipo

- Lavador de microplacas (Stat Fax 2600; Awareness Technology Inc.).
- Lector de microplacas (Stat Fax 2100; Awareness Technology Inc.).
- Incubadora (Thermo).

Material

- Placas de poliestireno de 96 pocillos, de alta capacidad de unión (Costar, Corning; 3590).
- Micropipetas de volúmenes variables.
- Micropipeta multicanal de 8 pozos.
- Puntas para micropipetas.

Reactivos

- Insulina humana purificada.
- Buffer de recubrimiento: PBS 0.5X, pH 7.4.

- Buffer de lavado; PBS-T: PBS 0.5 X, pH 7.4, Tween-20 al 0.05%.
- Buffer de bloqueo: PBS 1X, pH 7.4, Tween-20 al 0.05%, 0.3% de gelatina.
- Conjugado: conjugado Avidina-HRP diluido a una concentración de 3 µg/mL de buffer de bloqueo.
- Estándares de insulina: insulina disuelta en PBS-BSA 1%, conteniendo 25 mM de EDTA y 0.05% de timerosal, en las siguientes concentraciones: 0, 0,25, 0,74, 2,2, 6,6, 20 ng/mL
- Controles internos de calidad: insulina disuelta en PBS-BSA 1%, conteniendo 25 mM de EDTA y 0.05% de timerosal en las siguientes concentraciones: Control I; 1 ng/mL, Control II; 4ng/mL.
- Insulina-biotinilizada: 4 ng/mL.
- Sustrato (preparar al momento): 1 tableta de 5 mg (Sigma Aldrich) de OrthoPhenileneDiamine dihidrocloruro (OPD) disuelta en 11 mL de buffer fosfatos 0.02 M, pH 5.0, más 75 µL de una solución comercial de peróxido de hidrogeno. Utilizar una tableta por cada placa a montar.
- Solución stop: Ácido sulfúrico 2 N.

Recubrimiento y bloqueo de las placas de ELISA

Se recubrieron placas de poliestireno de alta capacidad de unión (Costar; Corning) con 100 µL por pocillo de anticuerpo anti-insulina a una concentración de 5 µg/mL en buffer de recubrimiento. Las placas se incubaron a desecación a 60 °C en una incubadora durante 6 horas. El anticuerpo de recubrimiento no absorbido se eliminó lavando las placas tres veces con 300 µL por pocillo con buffer de lavado. Se realizó el bloqueo con 300 µL de buffer de bloqueo por pocillo, incubándose las placas durante 2 h a 37 °C. Finalmente las placas se lavaron nuevamente tres veces con 300 µL por pocillo con buffer de lavado.

Normalización del procedimiento del inmunoensayo enzimático tipo ELISA

La curva estándar se estableció con 5 concentraciones de insulina seriadas al triple, desde 0,25 hasta 20 ng/mL, las cuales fueron preparadas a partir de la insulina purificada y caracterizada. También fueron preparados dos controles

internos con concentraciones de 1 y 4 ng/mL, respectivamente.

El desarrollo del ensayo se realizó como a continuación se describe:

A los tres primeros pocillos de cada placa se les adicionó 100 μ L del buffer de ensayo en pocillo A1 para establecer la unión no específica y en los pocillos B1 y C1, para establecer las uniones específicas máximas, o dosis cero. Se adicionó por duplicado, en cada placa, 100 μ L de cada estándar (pocillos D1 a E2) y 100 μ L de cada control (pocillos F2 a A3). A partir del pocillo B3 y hasta el H12, se les adicionó 100 μ L de cada muestra a analizar. Se dejó incubar durante 60 minutos (min) a temperatura ambiente (TA) para que la reacción antígeno-anticuerpo se llevara a cabo. Se lavaron las placas 3 veces y nuevamente se le añadió 100 μ L de buffer de ensayo al pocillo A1 (blanco); y al resto de los pocillos se les adiciono 100 μ L de la insulina biotinilada a una concentración de 4 ng/mL y se incubó 30 min a TA. Posteriormente, se lavaron las placas 3 veces y se añadieron 100 μ L del conjugado Avidina-HRP disuelto en el buffer de conjugado a una concentración de a 3 μ g/mL, se dejó incubar 30 minutos a temperatura ambiente, se lavaron las placas 3 veces y se revelaron añadiendo 100 μ L de sustrato por cada pocillo. Se dejó que la reacción procediera a temperatura ambiente durante 30 minutos y se detuvo con 20 μ L de ácido sulfúrico 2 N. Se midió la absorbancia en un lector de microplacas (StatFax 2100; Awareness Technology Inc.) a 492 nm, restándole la absorbancia a 630 nm (para contrarrestar las imperfecciones del plástico) y se interpretaron los resultados empleándose la transformación Logit/Log para obtener la línea de regresión a partir de las concentraciones de los estándares empleados.

B. Para la normalización del RIA.

I. Producción de antisueros anti-IgG de cobayo

Animales de experimentación

- 4 conejos machos de raza Nueva Zelanda de aproximadamente 3 kg de peso.

Material

- Geles de agarosa (Invitrogen™ life technologies, Carlsbad, California, USA).

Reactivos

- Adyuvante completo de Freund (Sigma Aldrich).
- Adyuvante incompleto de Freund (Sigma Aldrich).
- IgG de cobayo purificado.
- Complete mini (Protease Inhibitor Cocktail Tables, Roche).

Se purificaron las IgG del suero normal de cobayos vírgenes, por precipitación salina con sulfato de sodio, las que después de dializar fueron mezcladas con adyuvantes de Freund e inoculadas a 4 conejos adultos. El esquema de inmunización duró 7 meses, tiempo durante el cual se evaluó la respuesta inmune por inmunodifusión doble en geles de agarosa (Invitrogen™ life technologies, Carlsbad, California, USA).

II. Preparación del trazador radioactivo

La insulina humana, fue dializada durante 3 días para eliminar compuestos fenólicos empleados como preservos en la formulación, los cuales interfieren con la reacción de óxido-reducción que se produce durante la marcación de la hormona con yodo-125 (I^{125}) por el método de cloramina T.⁴³ Para la marcación se empleó aproximadamente 10 µg de insulina disuelta en 2.5 µL de PBS y se mezcló con 1 mCi de NaI^{125} (2 µL) (Amersham Pharmacia Biotech, London, UK), y 15 µL de cloramina T (5 mg/mL) (Sigma-Aldrich Corporation, St Louis, Missouri, USA) durante 1 minuto, posteriormente se añadió 50 µL de meta-bisulfito de sodio (15 mg/mL) (Sigma-Aldrich), para detener la reacción de marcaje. La insulina marcada fue purificada inicialmente por gel filtración en una matriz de Sephadex G-25 (Sigma-Aldrich) para separarla del I^{125} libre, recolectándose fracciones de 1 mL/tubo. Finalmente un mL del pico de insulina marcada fue repurificada en una

matriz de Sephadex G-100 (Sigma-Aldrich) para separar la insulina estructuralmente conservada de una pequeña fracción que sufrió algún grado de desnaturalización y por tanto formo complejos moleculares entre ellas. La insulina purificada fue conservada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta su utilización.

Calibración de los estándares de insulina humana para RIA.

La concentración de la solución de insulina empleada como estándar, fue determinada por su absorbancia a 280 nm, considerando que una solución altamente purificada de insulina humana de 1 mg/mL tiene una absorbancia de 0.98 unidades. Posteriormente se preparó una curva de calibración disolviendo la insulina dializada en el buffer de ensayo (PBS-BSA 1%, pH 7.4) en un rango de 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50,100, 200, 400 $\mu\text{UI/mL}$. Después de alicuotada la curva estándar, esta fue conservada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

Matrices empleadas.

El tampón de ensayo empleado fue el PBS-BSA 1%, EDTA 25 mM, pH 7.4, timerosal 0.02%. El tampón de precipitación fue PBS 0.5 X, BSA 0.25%, EDTA 12.5 mM, pH 7.4, PEG 4%, timerosal 0.01%.

III. Diseño Metodológico.

La metodología elegida fue el radioinmunoanálisis de competición en fase líquida, con precipitación por segundo anticuerpo.

Normalización del ensayo de RIA.

Se añadieron 100 μL del analito sin marcar en un rango amplio de concentraciones y se enfrentó con 100 μL del antisuero anti-insulina humana en la dilución de trabajo, más 100 μL de la insulina marcada con I^{125} (20 000 CPM), conteniendo 0.1% de suero normal de cobayo, se mezcló vigorosamente y se incubó toda la noche a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Al día siguiente se le adicionó 200 μL del tampón de precipitación conteniendo una dilución 1/21 del antisuero anti-IgG de cobayo. Se

mezcló bien y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 3000 rpm a 4 °C en una centrifuga Beckman modelo J-6B (Beckman Coulter™ Inc., Fullerton, California, USA). La fase líquida fue separada de los complejos precipitados por decantación, los tubos fueron escurridos y sus paredes internas secadas con un hisopo de papel sanitario absorbente. Finalmente los tubos fueron contados durante un minuto en un contador de radiación gamma Packard modelo Cobra II (Packard, Camberra, USA).

IV. Validación.

a. Estudio de la precisión del ensayo.

La precisión del ensayo fue evaluada a través del análisis de la repetibilidad y la reproducibilidad. Para ello se prepararon 3 muestras controles a partir de un pool de suero normal humano al que se le adicionaron 3 cantidades diferentes de insulina, con el fin de establecer controles bajo ($\approx 9.7 \mu\text{UI/mL}$), medio ($\approx 39 \mu\text{UI/mL}$) y alto ($\approx 162 \mu\text{UI/mL}$).

Precisión intra-ensayo: La precisión intra-ensayo o repetibilidad se realizó en un ensayo donde los 3 controles fueron evaluados por quintuplicado. Se estableció la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación (CV) intra-ensayo.

Precisión inter-ensayo: La precisión inter-ensayo o reproducibilidad se realizó en 7 ensayos realizados en días diferentes a lo largo de un mes. Se evaluaron los 3 controles por quintuplicado y se estableció la media, la desviación estándar y el CV en cada ensayo. Los valores promedio de cada uno de los 3 controles de los 7 ensayos, fueron promediados y calculado su coeficiente de variación inter-ensayo.

Precisión intra-departamental: La precisión intra-departamental se estableció al ser evaluado el sistema por 6 químicos del departamento.

Precisión inter-departamental: La precisión inter-departamental se estableció al ser evaluado el sistema por 6 departamentos de nuestra institución:

Departamento de Biología de la Reproducción, Departamento de Medicina Nuclear, Departamento de Nutriología Molecular, Departamento de Diabetes, Departamento de Nefrología y el Departamento de Infectología.

Precisión inter-institucional: La precisión inter-institucional se estableció al ser evaluado el sistema por 7 instituciones de salud pública, educación superior y/o investigación de la Ciudad de México: Escuela de Medicina de la UNAM, División de Ciencias de la Salud de la UAM de Iztapalapa, División de Neurociencias del Instituto de Psiquiatría, Laboratorio de RIA del Centro de Investigación Agropecuaria, Departamento de Medicina Nuclear del Hospital General Gea González, Departamento de Biología de la Reproducción del Seguro Social, completándose el estudio de validación externa del sistema analítico.

b. Estudio de la exactitud del ensayo.

Recuperación: Para la evaluación de la exactitud del sistema, se emplearon 8 muestras de concentración de insulina conocida, en un rango de 3.12 - 400 $\mu\text{U}/\text{mL}$, mismas que fueron evaluadas por nuestro sistema analítico y se contrastó la concentración encontrada con la concentración esperada para cada una de ellas, estableciéndose el porcentaje de recuperación para cada una de las muestras ensayadas.

Interferencia: Para evaluar las posibles interferencias con otras proteínas séricas, se realizó el estudio del efecto matriz. Para ello a un pool de suero normal humano se le adicionó una cantidad conocida de insulina, misma que fue añadida a un mismo volumen de tampón PBS-BSA 1%, EDTA 25 mM, pH 7.4. Se realizaron diluciones seriadas $\frac{1}{2}$ a ambas soluciones preparadas, utilizando el suero normal humano y el PBS-BSA 1%, EDTA 25 mM, pH 7.4 como diluyente en cada caso. Se evaluaron las concentraciones reportadas, multiplicando en cada caso por la dilución realizada y se estableció el porcentaje de recuperación considerando la concentración de las soluciones iniciales como el valor teórico y por tanto el 100%. Se compararon los porcentajes de recuperación entre las dos

soluciones y se evaluó la interferencia con otras proteínas séricas.

c. Estudio de estabilidad del estuche.

Se determinó la estabilidad del estuche de insulina cuando este es almacenado durante 2 meses a 4 °C y cuando es almacenado durante 1 mes a 37 °C. Para ello se evaluaron las concentraciones de los 3 controles por quintuplicado, mismas que estaban congelados a -20 °C hasta el momento de la evaluación y se verificó que sus valores promedio estuvieran en el rango establecido por los estudios de reproducibilidad.

También se evaluó la estabilidad a 4 °C de los estándares, 3 y 6 meses después de haber sido preparados, esto con el fin de verificar la eficacia de la formulación para mantener una adecuada homogeneidad y conservación de los estándares. La evaluación se realizó a través del cálculo del porcentaje de recuperación del valor esperado.

d. Estudio de asociación de las concentraciones de insulina en muestras de suero de pacientes, medidas por el método desarrollado y por el método comercial de referencia.

Para comparar el comportamiento de nuestro sistema analítico con el método comercial empleado en el Laboratorio de Diabetes del Departamento de Endocrinología del INCMNSZ, se emplearon 732 muestras de pacientes que acudían a dicho servicio. Los resultados obtenidos por ambos métodos se analizaron a través de un análisis de correlación lineal, para establecer el grado de asociación entre las concentraciones de insulinas cuantificadas por ambos métodos.

e. Evaluación comparativa de las concentraciones séricas de insulina medidas por el método de referencia y por el método desarrollado, en 8 estudios de tolerancia a la glucosa.

Para evaluar la eficacia del método desarrollado para detectar cambios en las

concentraciones circulantes de insulina con respecto al tiempo, se analizaron 8 pacientes a los que se les realizaron pruebas de tolerancia a la glucosa. Los resultados obtenidos se compararon con los obtenidos por el método de referencia antes mencionado.

f. Evaluación del efecto matriz en la determinación de insulina por el método de referencia.

Para evaluar las posibles interferencias con otras proteínas séricas, se realizó el estudio del efecto matriz. Para ello a un pool de suero normal humano se le adicionó una cantidad conocida de insulina, misma que fue añadida a un mismo volumen de tampón PBS-BSA 1%, EDTA 25 mM, pH 7.4. Se realizaron diluciones seriadas $\frac{1}{2}$ a ambas soluciones preparadas, utilizando el suero normal humano y el PBS-BSA 1%, EDTA 25 mM, pH 7.4 como diluyente en cada caso. Se evaluaron las concentraciones reportadas, multiplicando en cada caso por la dilución realizada y se estableció el porcentaje de recuperación considerando la concentración de las soluciones iniciales como el valor teórico y por tanto el 100%. Así se compararon los porcentajes de recuperación entre las dos matrices evaluadas.

g. Estudio de asociación de las concentraciones de insulina, medidas por el método desarrollado y por el método comercial de referencia, empleando la misma matriz en todo el rango de concentraciones evaluado.

Para comparar el comportamiento del sistema analítico desarrollado con el método comercial, se preparó un pool de sueros normales en ayuno de 10 individuos diferentes: 5 mujeres y 5 hombres. A un total de 270 mL de este pool de suero se le adicionó 5 mL de PBS 1X, EDTA 25 mM, pH 7.4, conteniendo un cóctel de inhibidores de proteasas (1 tableta del Complete Protease Inhibitor Cocktail por cada 50 mL del tampón, Roche Diagnostics Corporation, Indianápolis, USA) para garantizar la ausencia de proteólisis que pudiera alterar los estudios comparativos. A partir de este pool de suero, se prepararon 44 muestras a las cuales se les

adicionó cantidades variables de insulina para dar concentraciones finales de 2 - 250 $\mu\text{U}/\text{mL}$.

Las 44 muestras fueron evaluadas con el método desarrollado y por el método comercial empleado en el laboratorio de Diabetes de Departamento de Endocrinología del INCMNSZ. Los valores reportados por el método comercial fueron comparados con los valores obtenidos por nuestro método, estableciéndose la ecuación de correlación correspondiente.

h. Evaluación de la reactividad cruzada con insulina de otras especies de animales de laboratorio y de interés pecuario.

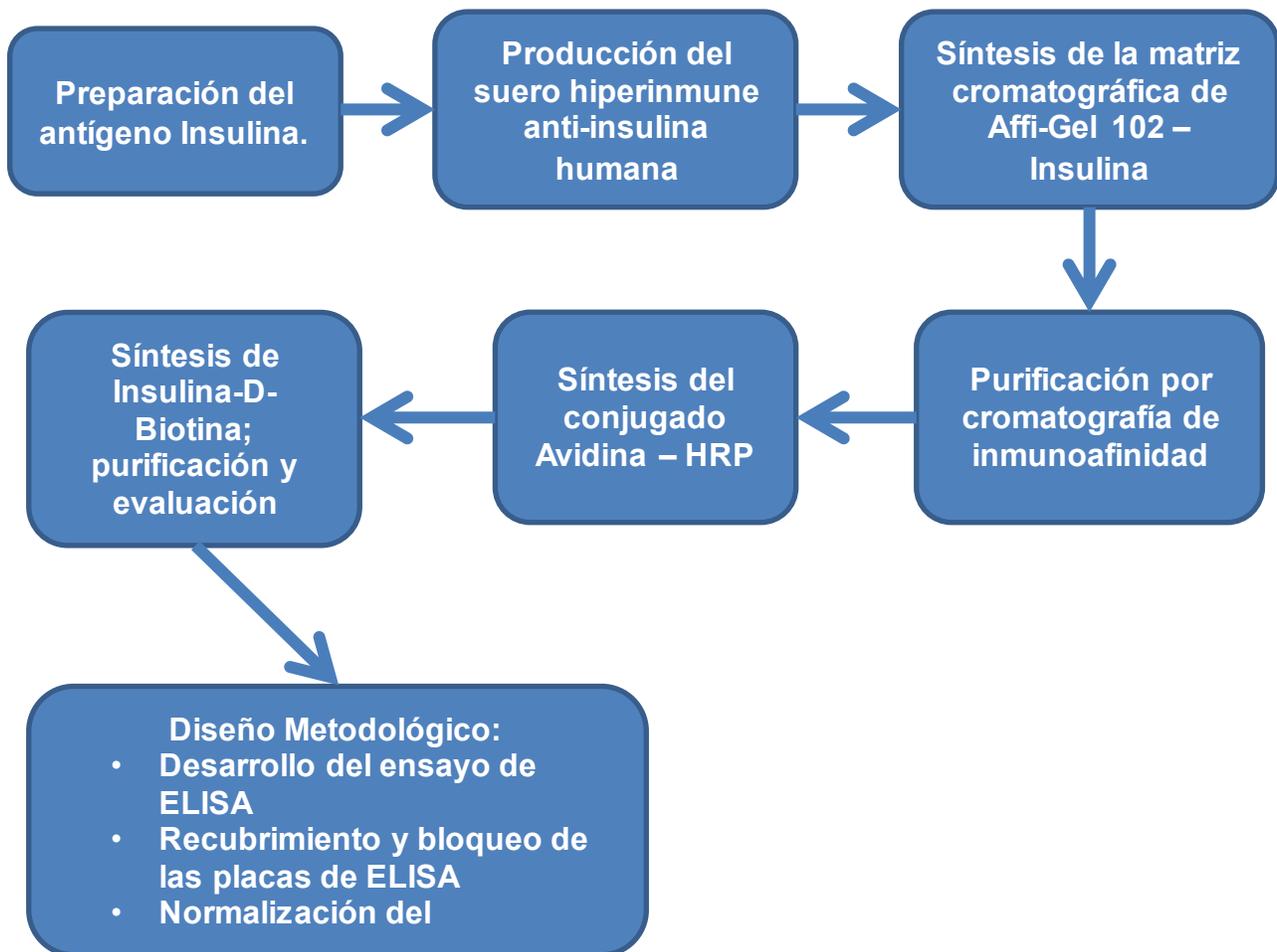
Dado que la estructura de la insulina es muy conservada entre mamíferos, se decidió verificar la posible utilidad que pudieran tener los anticuerpos anti-insulina humana producidos, para la determinación analítica de insulina de otras especies de animales de laboratorio y de interés pecuario.

Para ello se consiguieron con ayuda del personal que labora en el bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratoria “Ismael Cosío Villegas”, del Instituto Nacional de Psiquiatría “Dr. Ramón de la Fuente Muñiz” y del área de veterinaria del Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, muestras de suero de varias especies de animales: rata, ratón, hámster, conejo, cabra, borrego, puerco, vaca y mono, en estado postprandial; dos de machos y dos de hembras por especie. A todas las muestras de suero, se les realizaron diluciones seriadas $\frac{1}{2}$ y se midieron las concentraciones de insulina. Se estableció la pendiente de la ecuación de regresión obtenidas entre las diluciones de los sueros y las concentraciones encontradas para cada tipo de suero de especies distintas; las que fueron comparadas con la pendiente obtenida al analizar el comportamiento de las diluciones seriadas de muestras de suero postprandial humano y sus concentraciones de insulina. Este análisis de paralelismo, refleja el grado de reactividad cruzada; mientras más cercanas sean las pendientes, mayor

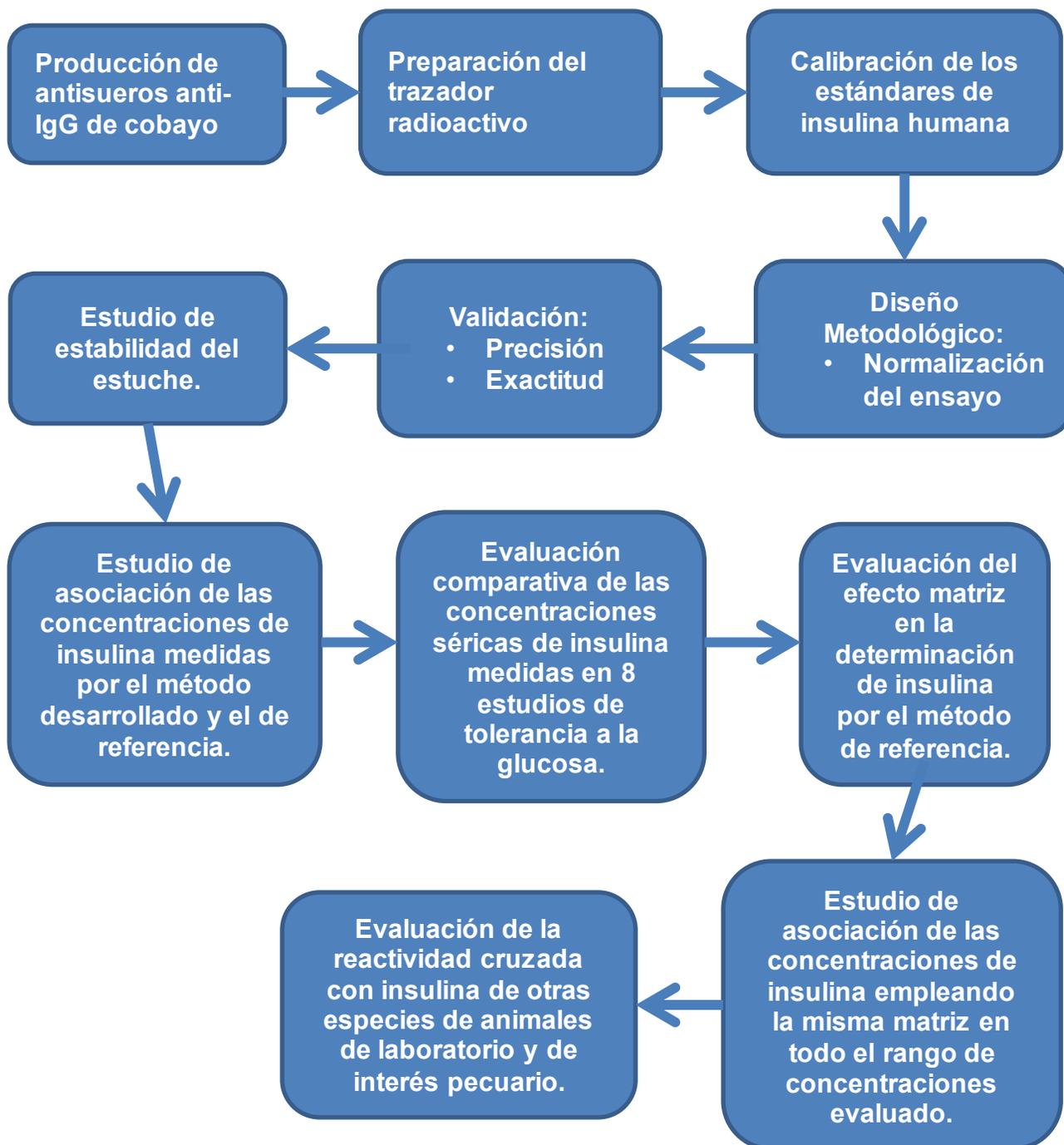
reconocimiento heterólogo existe y viceversa.

Diagrama de flujo

A. Para la normalización del ELISA.



B. Para la normalización del RIA.



VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Para la normalización del ELISA.

I. *Preparación del antígeno Insulina.*

Los resultados de la cuantificación de la insulina dializada se muestran en el cuadro 5, se puede ver que la concentración estimada por espectrometría fue de 3.94 mg/mL.

Dilución de insulina	Absorbancia $\lambda=280\text{nm}$			Promedio	Concentración mg/mL (Abs x k 1 mg/mL 280 nm x Dil)
	1er día	2º día	3er día		
38.56	0.1076	0.1114	0.1051	0.1080	4.08
19.28	0.2117	0.2163	0.2053	0.2111	3.99
9.64	0.3961	0.4107	0.4097	0.4055	3.83
4.84	0.8054	0.8142	0.8182	0.8126	3.85
				Promedio	3.94 mg/mL

Cuadro 5. Cuantificación de la insulina dializada empleada para producir los anticuerpos específicos y la normalización de los inmunoensayos.

Una vez dializada la insulina se obtuvo un volumen final de 70 mL, que al cuantificarlo tenía una concentración de 3.94 mg/mL; por lo que tuvimos una disponibilidad total de 275.8 mg totales de insulina altamente purificada y sin derivados fenólicos que pudieran interferir con las reacciones químicas a las que posteriormente se sometió la insulina.

II. *Producción del suero hiperinmune anti-insulina humana*

Como resultado del esquema de inmunización desarrollado y del manejo de los animales, 9 de los 10 animales produjeron antisueros específicos con títulos de trabajo (% de unión \approx 30%) en RIA de 1/25 600 (dilución 9) a 1/102 400 (dilución 11) (Fig. 6). Solamente un animal no generó una respuesta inmune apropiada; esto valida el éxito de los procedimientos seguidos.

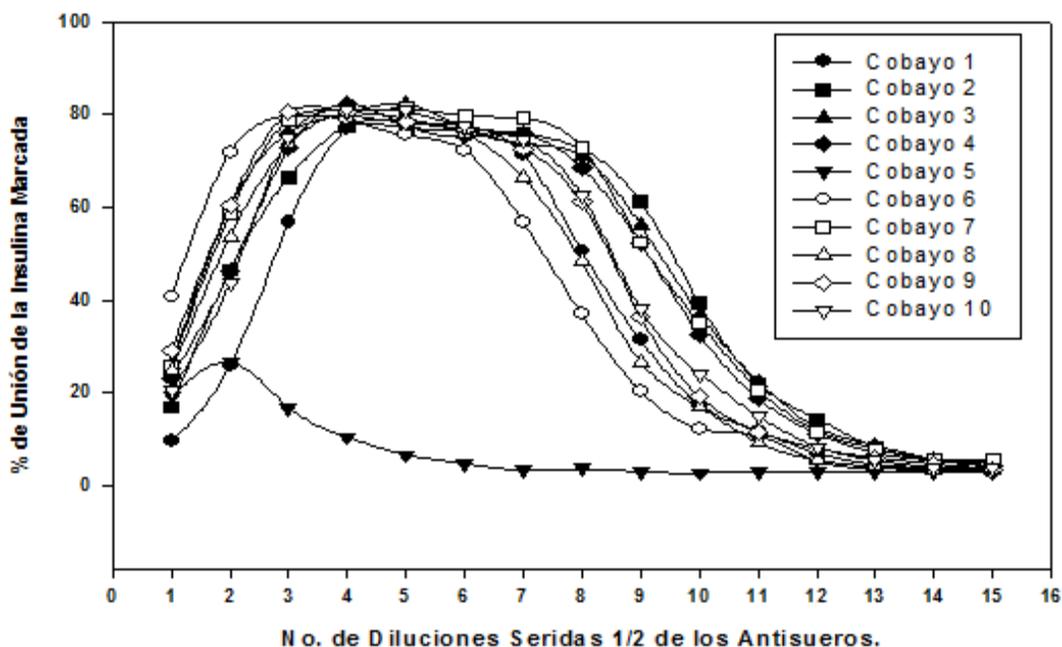


Figura 6. Titulación de los antisueros anti-insulina humana por radioinmunoanálisis. Al enfrentar las diferentes diluciones de los antisueros a 20 000 CPM de insulina- I^{125} . Se muestra los porcentajes de unión de las múltiples diluciones seriadas $1/2$, desde 1/100 (dilución 1) hasta 1/1 638 400 (dilución 15). La gráfica refleja el comportamiento característico del exceso de anticuerpos en la parte izquierda, la zona de equivalencia en la parte central y del exceso de antígeno en la parte derecha de la gráfica.

III. Síntesis de la matriz cromatográfica de Affi-Gel 102 – Insulina.

Los resultados obtenidos de la preparación de la matriz de afinidad, se muestran en el cuadro 6. Se puede observar que los 20 mL de la matriz preparada tenían una actividad específica de 5.24 mg/mL de gel.

Síntesis de la matriz de Affi-Gel 102 – insulina			
<i>Insulina</i>	<i>Affi-Gel 102</i>	<i>EDAC</i>	<i>Insulina sobrenadante</i>
184.5 mg	20 mL	700 mg	85.8 mg
Proteína unida a la matriz			104.8 mg
Actividad Específica			5.24 mg/mL de gel

Cuadro 6. Eficiencia del procedimiento de acoplamiento de insulina a la matriz de Affi-Gel 102.

El procedimiento empleado fue muy eficiente para lograr el acoplamiento de la insulina a la matriz de Affigel-102, el acoplamiento tuvo éxito debido al tratamiento de la insulina, la cual estaba altamente purificada. Se logró un reactivo de alta calidad que demostró ser de mucha utilidad ya que este paso es de vital importancia para poder obtener los anticuerpos específicos que se utilizaran en el desarrollo de los inmunoensayos.

IV. Purificación de los anticuerpos específicos anti-insulina por cromatografía de inmunoafinidad.

La figura 7, muestra el perfil cromatográfico de la purificación por inmunoafinidad de los anticuerpos anti-insulina producidos.

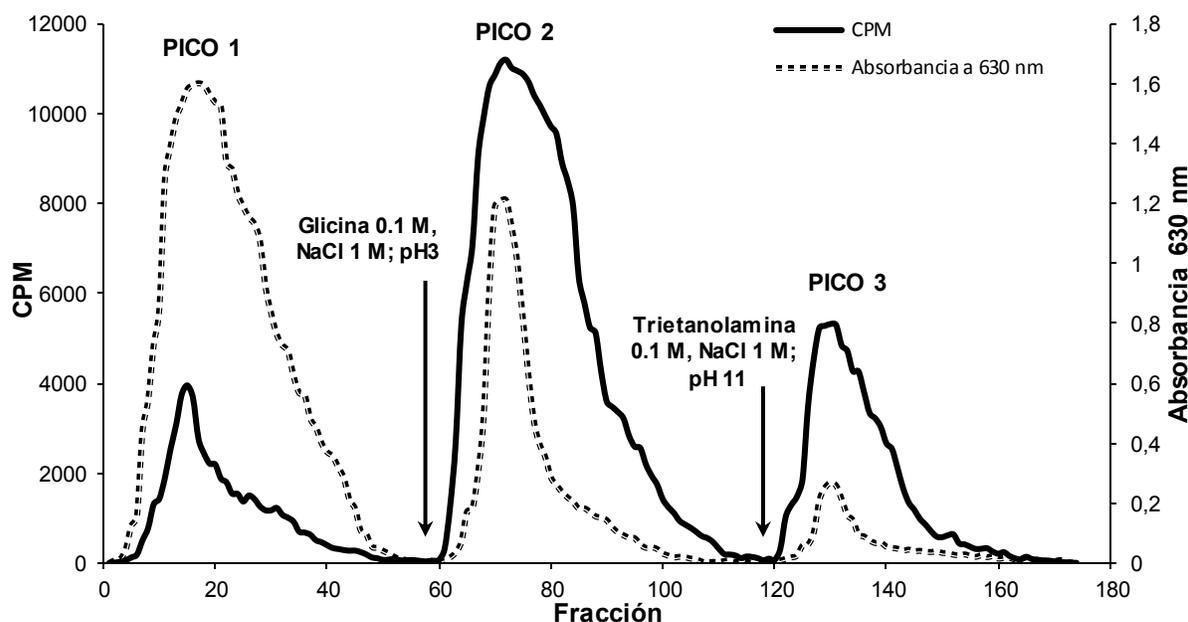


Figura 7. Purificación de los anticuerpos específicos anti-insulina por cromatografía de inmunoafinidad. El pico 1 es la proteína no unida que fue arrastrada por el buffer de aplicación Tris 0.1 M, pH 7.4 conteniendo 0.1 M de NaCl; el pico 2 corresponde a la elución de los anticuerpos anti-insulina cuyas interacciones con la matriz son sensibles al pH ácido; el pico 3 es la elución de los anticuerpos anti-insulina cuyas interacciones con la matriz son sensibles al pH básico.

El proceso de purificación fue monitoreado por lectura a 630 nm de una alícuota de 25 μ L de cada tubo, mezclado con 200 μ L del reactivo de Bradford, para

detectar la presencia de proteínas. La presencia de los anticuerpos específicos anti-insulina en cada pico fue detectado por su capacidad de unir a la insulina marcada con I^{125} , a través de un radioinmunoensayo. Como se puede observar en el cromatograma, durante el primer lavado (pico 1) con buffer Tris 0.1 M, pH 7.4 conteniendo 0.1 M de NaCl, se arrastran todas las proteínas no unidas a la matriz y aquellas unidas mediante interacciones débiles no específicas. Posteriormente se pasó buffer glicina 0.1 M pH 3, 1 M de NaCl, para eluir los anticuerpos cuyas interacciones con la matriz son sensibles al pH ácido (pico 2), después se pasó buffer trietanolamina 0.1 M, pH 11, 1 M de NaCl, para eluir los anticuerpos cuyas interacciones con la matriz son sensibles al pH básico (pico 3). Los anticuerpos anti-insulina que aún quedaban en la fracción no unida, fueron recuperados en un segundo proceso de purificación. Esto refleja los altos títulos de anticuerpos que se lograron obtener debidos al buen esquema de inmunización, tal y como lo muestra el cuadro 7, donde podemos ver que se logró obtener un total de 18.17 mg de anticuerpos anti-insulina altamente purificado a partir de 25 mL de antisuero hiperinmune; es decir una recuperación de 0.72 mg/mL de antisuero empleado. Esto sin contar que aún quedaba anticuerpos en la fracción no unida que por estar saturada la matriz no se pudieron unir.

Suero hiperinmune aplicado	Anticuerpos policlonales anti-insulina obtenidos
25 mL	Pico ácido: 12.81 mg
	Pico básico: 5.36 mg
	Total: 18.17 mg

Cuadro 7. Cantidades de anticuerpos policlonales anti-insulina purificados por cromatografía de inmunoafinidad.

V. Síntesis del conjugado Avidina – HRP

Se logró una preparación de un conjugado Avidina- HRP, que demostró funcionar adecuadamente en un rango de concentraciones de 3 μ g/mL.

VI. Síntesis de Insulina-D-Biotina; purificación y evaluación de su identidad estructural

Producto del procedimiento descrito en materiales y métodos, se logró el marcaje con D-Biotina de la insulina. Se puede observar en la figura 8, que una vez centrifugada y dializada la mezcla de reacción, se logra un producto homogéneamente marcado, que conserva su capacidad de ser reconocida por un anticuerpo específico anti-insulina. Esto garantiza que puede ser empleada en ensayos de competición con insulina nativa.

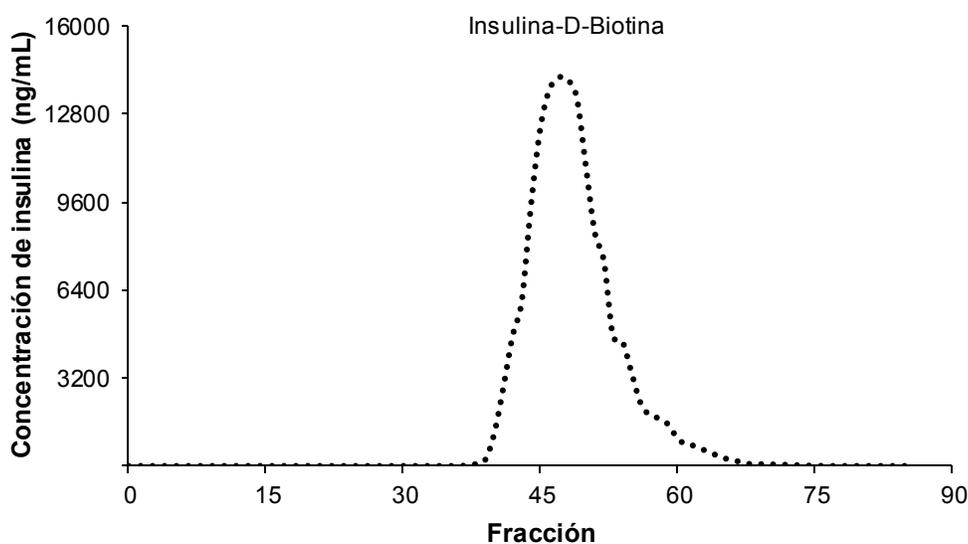


Figura 8. Purificación de la Insulina-D-Biotina en una columna de exclusión molecular de Sephadex G-200. La presencia de insulina en cada fracción fue monitoreada por RIA.

VII. Diseño Metodológico.

Normalización del procedimiento del inmunoensayo enzimático tipo ELISA

Con los reactivos primarios producidos, se intentó normalizar un ELISA de competición en fase sólida en placas de 96 pozos, según se describió en materiales y métodos. La curva de relación dosis-respuesta característica se muestra en la figura 9. Se puede observar que las absorbancias de los dos últimos puntos no difieren mucho, por lo que el último punto no se tomó en cuenta para la transformación matemática de linealización de la curva estándar.

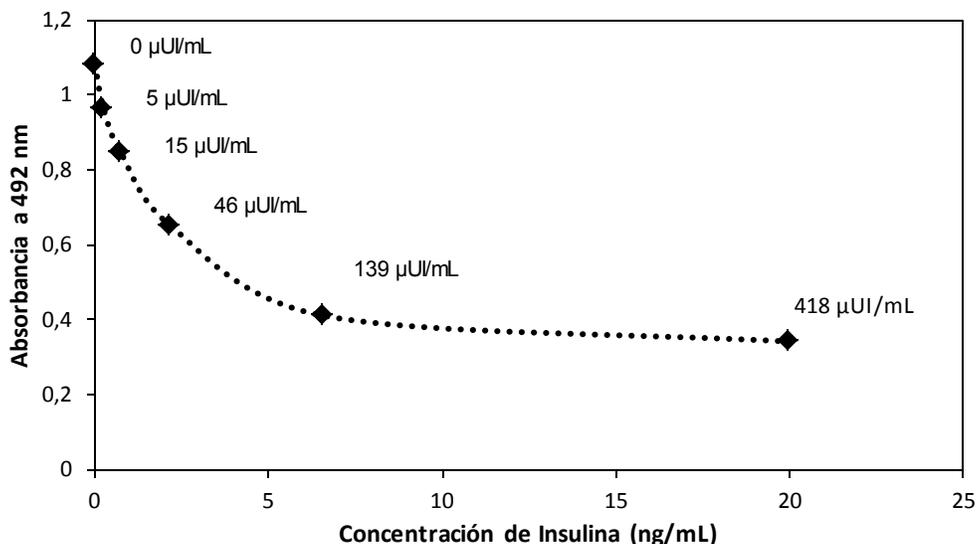


Figura 9. Relación dosis-respuesta de la curva estándar empleada en el ELISA de insulina.

Linealidad de la curva estándar

Los datos de la transformación matemática para linealizar el comportamiento de la curva estándar, utilizando la transformación logit/Log, se muestra en cuadro 8. Se puede observar que el último punto de la curva ensayada se encontraba fuera del rango lineal del ensayo, por lo que no fue utilizada para graficar la forma lineal de la curva dosis-respuesta.

Concentración del estándar (μUI/mL)	Absorbancia promedio (n=5)	Desviación estándar (n=5)	Coficiente de variación (n=5)	Logaritmo de la concentración del estándar	Logit Log [(B/B ₀) / (1-(B/B ₀))]
0	1.081	0.081	7.5		
5	0.962	0.114	11.9	0.699	2.093
15	0.847	0.103	12.2	1.176	1.286
46	0.649	0.067	10.3	1.663	0.407
139	0.410	0.044	10.7	2.143	-0.491
418	0.342	0.034	9.9	2.621	-0.517

Cuadro 8. Linealidad de la curva estándar de insulina. Se muestran los datos obtenidos al realizar el ensayo. Los datos representados en color rojo no se tomaron en cuenta para la representación Logit/Log, por salirse de la tendencia lineal.

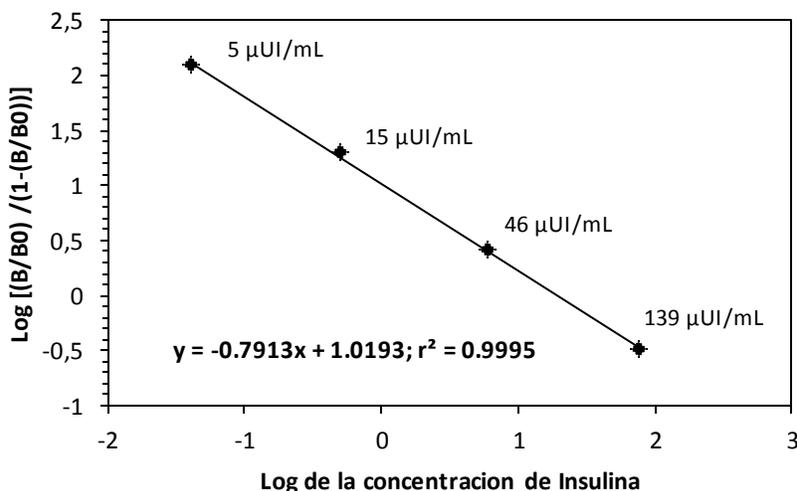


Figura 10. Transformación Logística de la relación dosis-respuesta de la curva estándar de Insulina.

A pesar de lograrse un adecuado coeficiente de correlación y una pendiente aceptable, para el ensayo de ELISA de insulina (figura 10), observamos que las condiciones antes descritas del ensayo no garantizan una buena reproducibilidad del mismo. Otros problemas metodológicos observados fue el hecho de que no había una adecuada diferencia en las absorbancias de la dosis cero y del último punto de la curva. Esto es debido a que con el afán de acelerar el proceso de equilibrio químico de la reacción, es decir acortar los tiempos de incubación, se emplearon concentraciones muy elevadas de insulina biotinilada, lo que favorece mucho su unión al anticuerpo unido a la placa. Este fenómeno contribuye de forma negativa ya que las diferencias en absorbancias entre las dosis empleadas se acortan mucho, lo que puede generar problemas de sensibilidad, exactitud y reproducibilidad de la medición. Por otro lado el rango dinámico obtenido bajo estas condiciones es relativamente estrecho lo que limita su capacidad de análisis. Todo ello da al traste con la robustez del ensayo y por tanto, no debe ser recomendado para su uso en la rutina, bajo las condiciones de normalización descritas en materiales y métodos. Se requieren cambiar las condiciones de la dosis de la insulina biotinilada y de los tiempos de incubación.

B. Para la normalización del RIA.

I. *Producción de antisueros anti-IgG de cobayo*

La figura 11, muestra la titulación por inmunodifusión doble en geles de agarosa. Se puede observar que el antisuero evaluado tiene título de trabajo mayor de 1/32, algo muy bueno para un antisuero evaluado por esta metodología, este antisuero es de alta calidad por lo que le da la utilidad para ser utilizado como un agente precipitante en el radioinmunoensayo.

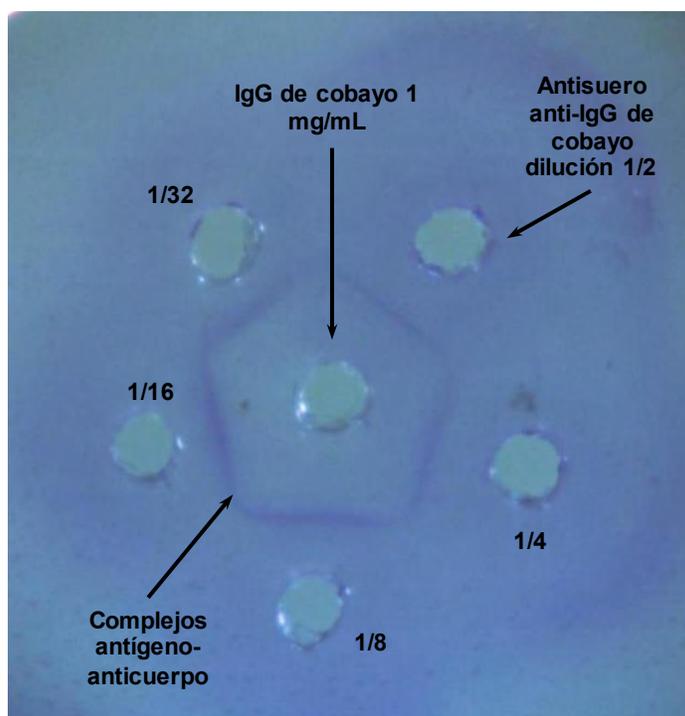


Figura 11. Titulación de los antisueros anti-IgG de cobayo por inmunodifusión doble en geles de agarosa. Al enfrenar las diferentes diluciones de los antisueros a una solución de 1 mg/mL de IgG de cobayo. Se observan las bandas de precipitación antígeno-anticuerpo teñidas con azul de Coomassie.

II. *Preparación del trazador radioactivo*

Se marcó insulina con I^{125} , obteniéndose una actividad específica $\approx 250 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ de proteína. La insulina radiactiva fue doblemente purificada lográndose separar del

exceso de I^{125} y una pequeña fracción de insulina que fue dañada por una marcación excesiva (Fig. 12), garantizando así la calidad de la proteína marcada para su utilización en el radioinmunoensayo.

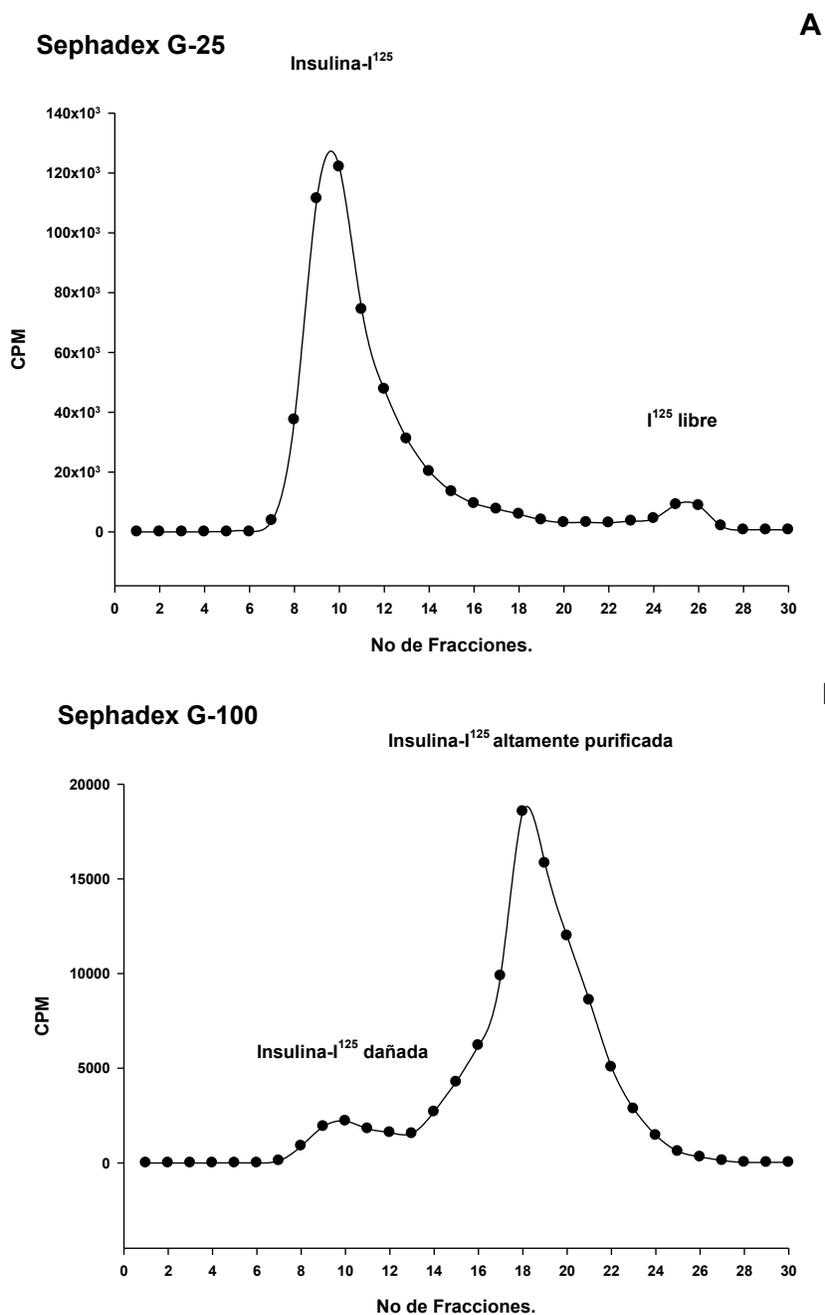


Figura 12. Proceso de purificación de insulina marcada con yodo-125. Purificación por gel filtración en Sephadex G-25 (A). Se observa la separación de la insulina marcada del I^{125} libre. Purificación en Sephadex G-100 (B). Se observa la separación de una pequeña cantidad de insulina dañada por marcación excesiva y la insulina apropiadamente marcada.

III. Diseño Metodológico.

Normalización del ensayo.

Se normalizó un ensayo con un rango dinámico desde 3.125 hasta 400 $\mu\text{UI/mL}$, con un límite de detección de 0.8 $\mu\text{UI/mL}$ (Fig.13A). Se observa el comportamiento sigmoide invertido característico de los ensayos de competición. La figura 13B muestra la transformación matemática logit/Log, que permite transformar la sigmoide invertida en una línea recta; permitiendo establecer una relación directa entre la dosis

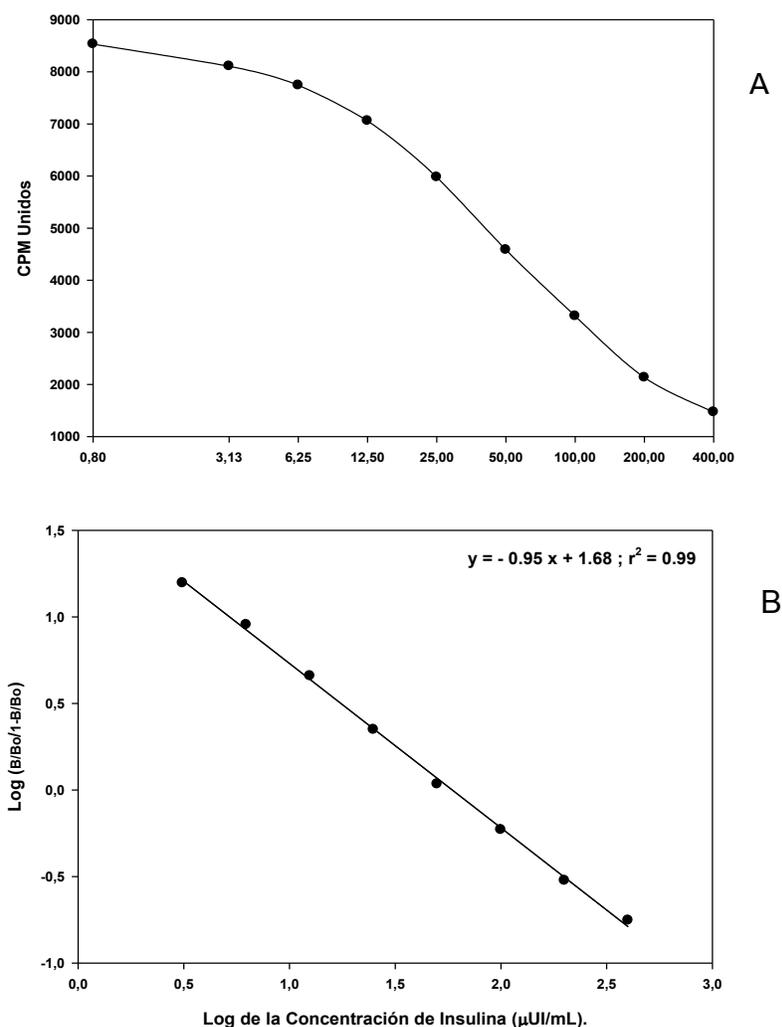


Figura 13. Se observa el comportamiento sigmoide que se obtiene al graficar la concentración de los estándares contra los conteos por minuto de la insulina marcada que forma parte de los inmuno-complejos (A). La transformación Logit/Log de la gráfica A, permite establecer una relación directa entre el logaritmo de la concentración de los estándares y el logaritmo de la relación de la insulina marcada unida entre la insulina marcada libre (B).

IV. Validación

a. Estudio de la precisión del ensayo.

Los resultados del estudio de precisión se muestran en el cuadro 9, donde se pueden observar los valores de repetibilidad, reproducibilidad, precisión intra- e inter- laboratorio, precisión inter-institucional y la precisión en condiciones ideales y reales.

	CCB	CCM	CCA
Repetibilidad (n = 5)	9.69 ± 0.84 (8.01 – 11.37)	38.59 ± 1.92 (34.75 – 42.43)	156.66 ± 6.08 (144.50 – 168.82)
Reproducibilidad (n = 7)	9.26 ± 2.18 (4.90 – 13.62)	38.97 ± 3.67 (31.63 – 46.31)	164.98 ± 7.54 (149.90 – 180.06)
Precisión Intra-Laboratorio (n = 6)	8.82 ± 2.37 (4.07 – 13.57)	38.73 ± 3.47 (31.79 – 45.67)	158.23 ± 11.72 (134.79 – 181.67)
Precisión Inter-Laboratorio (n = 6)	9.90 ± 1.80 (6.30 – 13.50)	39.29 ± 2.28 (34.73 – 43.85)	165.08 ± 5.87 (153.34 – 176.82)
Precisión Inter-Institucional (n = 7)	10.70 ± 2.93 (4.84 – 16.56)	39.20 ± 3.93 (31.34 – 47.06)	157.29 ± 24.30 (108.69 – 205.89)
Precisión en Condiciones Ideales (n = 7)	9.26 ± 2.18 (4.90 – 13.62)	38.97 ± 3.67 (31.63 – 46.31)	164.98 ± 7.54 (149.90 – 180.06)
Precisión en Condiciones Reales (n = 17)	9.87 ± 2.59 (4.69 – 15.05)	39.14 ± 3.35 (32.44 – 45.84)	160.45 ± 16.96 (126.53 – 177.41)
Precisión Total (n = 23)	9.70 ± 2.50 (4.70 – 14.70)	39.11 ± 3.44 (32.23 – 45.99)	161.99 ± 15.10 (131.79 – 177.09)

Cuadro 9. Estudio de la precisión del ensayo.

Repetibilidad: La precisión intra-ensayo, evaluada por los valores reportados de los 3 controles internos de calidad, demostró que el sistema cumple satisfactoriamente con este aspecto. Se encontró valores de $9.69 \pm 0.84 \mu\text{UI/mL}$ para el control bajo (CV = 8.67%), de $38.59 \pm 1.92 \mu\text{UI/mL}$ para el control medio (CV = 4.98%) y de $156.66 \pm 6.08 \mu\text{UI/mL}$ para el control alto (CV = 3.88%). El CV intra-ensayo promedio fue de 5.84% menor a 10% que es lo idóneo teóricamente aunque podría ser hasta un 20% y para valores cercanos al límite de cuantificación pueden ser de hasta 25%.

Reproducibilidad: La precisión inter-ensayo, evaluada por los valores reportados de los 3 controles internos de calidad, ensayados en siete días distintos a lo largo de un mes, demostró que el sistema analítico presenta una buena

reproducibilidad. Se encontraron valores de $9.26 \pm 2.18 \mu\text{UI/mL}$ para el control bajo (CV = 23.54%), de $38.97 \pm 3.67 \mu\text{UI/mL}$ para el control medio (CV = 9.42%) y de $164.98 \pm 7.54 \mu\text{UI/mL}$ para el control alto (CV = 4.57%). El CV inter-ensayo promedio fue de 12.51% menor a 20% que es lo teóricamente aceptado por lo cual el método cumple en este aspecto.

Variación intra-departamental: La precisión intra-departamental fue evaluada por los valores reportados de los 3 controles internos de calidad, en ensayos realizados por 6 químicos distintos de nuestro departamento. Se encontraron valores de $8.82 \pm 2.37 \mu\text{UI/mL}$ para el control bajo (CV = 26.87%); aunque este valor excede lo aceptado se tomó en cuenta debido a que el promedio de los CV no excedía el 20%; de $38.73 \pm 3.47 \mu\text{UI/mL}$ para el control medio (CV = 8.96%) y de $158.23 \pm 11.72 \mu\text{UI/mL}$ para el control alto (CV = 7.41%). El CV intra-departamental promedio fue de 14.41% menor a 20% que es lo teóricamente aceptado, así queda demostrado que el método cumple con una buena precisión intermedia.

Variación inter-departamental: La precisión inter-departamental fue evaluada por los valores reportados de los 3 controles internos de calidad, en ensayos realizados por 6 departamentos del INCMNSZ. Se obtuvieron valores de $9.90 \pm 1.80 \mu\text{UI/mL}$ para el control bajo (CV = 18.18%), de $39.29 \pm 2.28 \mu\text{UI/mL}$ para el control medio (CV = 5.80%) y de $165.08 \pm 5.87 \mu\text{UI/mL}$ para el control alto (CV = 3.56%). El CV inter-departamental promedio fue de 9.18% menor a 20% que es lo teóricamente aceptado.

Variación inter-institucional: La precisión inter-institucional fue evaluada por los valores reportados de los 3 controles internos de calidad, en ensayos realizados por 7 institutos de salud pública, educación superior y/o investigación de la Ciudad de México. Se encontraron valores de $10.70 \pm 2.93 \mu\text{UI/mL}$ para el control bajo (CV = 27.38%), de $39.20 \pm 3.93 \mu\text{UI/mL}$ para el control medio (CV = 10.02%) y de $157.29 \pm 24.30 \mu\text{UI/mL}$ para el control alto (CV = 15.45%). El CV inter-institucional promedio fue de 17.62% menor a 20% que es lo teóricamente aceptado.

Variación en condiciones reales: La precisión en condiciones reales fue evaluada por los valores reportados de los 3 controles internos de calidad, en ensayos realizados por 17 químicos de diferentes institutos de salud pública, educación superior y/o investigación de la Ciudad de México. Se obtuvieron valores de 9.87 ± 2.59 $\mu\text{UI/mL}$ para el control bajo (CV = 26.24%), de 39.14 ± 3.35 $\mu\text{UI/mL}$ para el control medio (CV = 8.56%) y de 160.45 ± 16.96 $\mu\text{UI/mL}$ para el control alto (CV = 10.57%). El CV en condiciones reales promedio fue de 15.12% menor a 20% que es lo teóricamente aceptado, estos resultados junto con los de variación inter-institucional demuestran que el método cuenta con reproducibilidad.

b. Estudio de la exactitud del ensayo.

Recuperación: El estudio de recuperación muestra que el sistema posee una adecuada exactitud a lo largo de todo el rango dinámico del ensayo. La recuperación promedio fue de 98.72% muy cercana al 100%, que es lo ideal y contenida entre el rango de 80-120% que es lo aceptado por definición para este tipo de métodos analíticos (Cuadro 10).

Concentración Esperada ($\mu\text{UI/mL}$)	Concentración Calculada ($\mu\text{UI/mL}$)	Recuperación (%)
3.13	2.90	92.80
6.25	6.87	109.92
12.50	12.93	103.44
25.00	21.96	87.84
50.00	44.34	88.68
100.00	95.90	95.90
200.00	203.00	101.50
400.00	438.80	109.70
Recuperación Promedio		98.72%

Cuadro 10. Muestra la relación entre las dosis esperadas y las medidas por el método analítico, expresadas en porcentajes de recuperación del valor esperado. Todos los valores de recuperación se encuentran en el rango de 80-120% que es lo teóricamente aceptado.

Estudio de posibles interferencias con otras proteínas séricas.

Estudio de interferencia de la matriz: Se encontró que no existe un efecto matriz

en el sistema. Se observó una recuperación promedio de aproximadamente 102% tanto en suero normal como en PBS-BSA 1%. Esto refleja la ausencia de interferencias de otras proteínas séricas en el reconocimiento específico de la insulina humana por los anticuerpos producidos (Cuadro 11).

Matriz: PBS-BSA 1%, EDTA 25 mM				Matriz: Suero Normal Humano			
Dilución	Insulina (μUI/mL)	Concentración X Dilución (μUI/mL)	Recuperación (%)	Dilución	Insulina (μUI/mL)	Concentración X Dilución (μUI/mL)	Recuperación (%)
1	57.30 ± 1.27	57.30	100.00	1	60.90 ± 1.84	60.90	100.00
1/2	29.05 ± 2.05	58.10	101.40	1/2	31.55 ± 3.32	63.10	103.61
1/4	15.65 ± 1.20	62.60	109.24	1/4	15.30 ± 0.28	61.20	100.49
1/8	6.35 ± 0.78	50.80	88.66	1/8	8.70 ± 1.27	69.60	114.28
1/16	4.25 ± 0.78	68.00	118.67	1/16	3.50 ± 0.85	56.00	91.95
1/32	1.70 ± 1.13	54.40	94.94	1/32	2.00 ± 1.27	64.00	105.09
Recuperación Promedio		58.53	102.15%	Recuperación Promedio		62.47	102.57%

Cuadro 11. Evaluación del efecto matriz, al comparar la recuperación de la concentración esperada de insulina en matriz de PBS-BSA y de suero normal humano.

Efecto de la toma de muestra.

Como se puede observar en el cuadro 12, el sistema analítico es capaz de medir a la insulina con la misma exactitud, independientemente del modo en que fue obtenida la muestra biológica. Lo mismo para muestras provenientes de mujeres que de hombres.

Muestra	Concentración de Insulina ($\mu\text{UI/mL}$)
Plasma en tubos con heparina	2.30 ± 1.46^a
Plasma en tubos con EDTA	2.30 ± 2.09^a
Suero en tubos de vidrio	3.07 ± 2.09^a
Suero en tubos de plástico	2.61 ± 2.07^a

Análisis de Varianza: $P = 0.759$; $n = 6$ hombres

Muestra	Concentración de Insulina ($\mu\text{UI/mL}$)
Plasma en tubos con heparina	4.18 ± 2.30^a
Plasma en tubos con EDTA	5.64 ± 2.48^a
Suero en tubos de vidrio	5.23 ± 2.51^a
Suero en tubos de plástico	4.39 ± 2.39^a

Análisis de Varianza: $P = 0.555$; $n = 6$ mujeres

Cuadro 12. Muestra los resultados de la evaluación de muestras de plasma con heparina, con EDTA, sueros colectados en tubos de vidrio y en tubos de plástico. El cuadro 11A muestra los resultados obtenidos en hombres y el cuadro 11B en mujeres.

Efecto de la hemoglobina.

El cuadro 13 muestra la ausencia de interferencias de concentraciones elevadas de hemoglobina. Por tanto podemos sugerir que la hemolisis, al menos hasta 150 mg/dL, no interfiere en la exactitud de la medición de insulina por este método.

Concentración de Hemoglobina (mg/dL)	Concentración Insulina Calculada ($\mu\text{UI/mL}$)	Concentración Insulina Esperada ($\mu\text{UI/mL}$)	Porcentaje de Recuperación
150.00	9.82 ± 0.42	10.66	92.12
75.00	10.45 ± 0.21	10.66	98.03
37.50	9.82 ± 0.42	10.66	92.12
18.75	10.66 ± 0.42	10.66	100.00
9.38	10.45 ± 0.42	10.66	98.03
4.69	10.66 ± 0.63	10.66	100.00
2.34	10.45 ± 0.84	10.66	98.03
1.17	11.50 ± 0.21	10.66	107.88
0.58	11.50 ± 1.67	10.66	107.88
0.29	10.66 ± 0.83	10.66	100.00
0.15	10.03 ± 1.25	10.66	94.09
Total			98.82%

Cuadro 13. Evaluación de las posibles interferencias de la hemoglobina en la exactitud de la medición de insulina por el método desarrollado.

Efecto de los lípidos

El cuadro 14, muestra los resultados del estudio de interferencia de los lípidos en la determinación analítica de insulina. Se puede observar que concentraciones de triglicéridos hasta 4192 mg/dL y de colesterol hasta 668 mg/dL, no interfieren en la exactitud de la determinación de insulina por el método de RIA desarrollado.

Concentración de Triglicéridos (mg/dL)	Concentración de Colesterol (mg/dL)	Concentración Insulina Calculada ($\mu\text{UI/mL}$)	Concentración Insulina Esperada ($\mu\text{UI/mL}$)	Porcentaje de Recuperación
4192	668	43.90 \pm 2.93	43.90	100.00
2172	430	34.28 \pm 3.34	34.49	99.39
1162	311	25.30 \pm 2.93	25.09	101.20
657	252	20.91 \pm 1.67	20.07	104.18
404	222	19.02 \pm 2.07	17.77	107.03
278	207	16.31 \pm 2.09	16.52	98.73
			Total	101.76 %

Cuadro 14. Evaluación de las posibles interferencias de los lípidos en la exactitud de la medición de insulina por el método desarrollado.

Efecto de la Bilirrubina

El cuadro 15, muestra que concentraciones de hasta 15 mg/dL de bilirrubinas no interfieren en la determinación analítica de la insulina.

Concentración de Bilirrubina (mg/dL)	Concentración Insulina Calculada ($\mu\text{UI/mL}$)	Concentración Insulina Esperada ($\mu\text{UI/mL}$)	Porcentaje de Recuperación	
15.00	15.06 \pm 0.84	15.34	98.17	
7.50	14.05 \pm 1.25	15.34	91.59	
3.75	14.84 \pm 1.06	15.34	96.74	
1.88	13.84 \pm 1.88	15.34	90.22	
0.94	13.99 \pm 4.70	15.34	91.20	
			Total	93.58 %

Cuadro 15. Evaluación de las posibles interferencias de las bilirrubinas en la exactitud de la medición de insulina por el método desarrollado.

c. *Estudios de estabilidad del estuche.*

Se evaluó la estabilidad de todo el estuche conservado a 4 °C durante dos meses y a 37 °C durante un mes.

Estudio de estabilidad del estuche almacenado a 4 °C: En el cuadro 16 se puede apreciar que el sistema es estable cuando se conserva a 4 °C durante dos meses, ya que los 3 controles de calidad dan valores dentro del rango definido por los estudios de precisión del sistema (reproducibilidad). Se toma en cuenta el rango de dos meses de estabilidad debido al tiempo de vida media del isótopo radioactivo con el que fue marcada la insulina, ya que al decrecer su radioactividad el método pierde sensibilidad.

Tiempo (semanas)	1	2	4	8
CCB (X ± DS)	10.22 ± 1.00	6.68 ± 0.48	10.10 ± 2.85	11.18 ± 1.31
CCM (X ± DS)	38.58 ± 3.13	34.80 ± 4.35	39.35 ± 2.33	43.28 ± 2.59
CCA (X ± DS)	169.12 ± 2.24	164.72 ± 6.41	154.28 ± 7.25	159.90 ± 22.34

Valores de Esperados (X+2DS):

CCB: (4.70 – 14.70)

CCM: (32.23 – 45.99)

CCA: (131.79 – 177.09)

Cuadro 16. Estabilidad del estuche de insulina a 4 °C. Se muestran los valores de los controles de calidad expresados como media ± desviación estándar a lo largo de dos meses de almacenamiento del estuche a 4 °C.

Estudio de estabilidad del estuche de insulina humana almacenado a 37 °C: Los estudios de estabilidad a 37 °C demostraron que el sistema es completamente estable hasta 3 días. Cuando se almacenó por una semana, se observa que el control alto tiende a salirse del rango establecido para la variabilidad en condiciones reales. Lo mismo sucede a los 15 días de almacenamiento a esta temperatura. A los 30 días, el sistema pierde completamente su estabilidad, ya que los 3 controles se salen del rango esperado (cuadro 17). La rápida pérdida de estabilidad es debida a que la temperatura a la cual se expuso el estuche hace que los componentes de éste tengan un grado de descomposición mucho mayor que si se encontraran en refrigeración, ya que son productos biológicos y se está utilizando un trazador radioactivo, lo que compromete más rápidamente el buen

funcionamiento del sistema.

Tiempo (días)	1	2	3	7	15	30
CCB (X ± DS)	6.24 ± 1.38	7.50 ± 3.80	8.35 ± 2.25	9.55 ± 1.38	8.22 ± 1.64	23.02 ± 5.52*
CCM (X ± DS)	35.70 ± 2.28	38.42 ± 1.20	41.30 ± 4.26	43.25 ± 5.47	43.85 ± 4.91	80.62 ± 19.11*
CCA (X ± DS)	169.12 ± 2.24	162.55 ± 15.79	176.25 ± 10.29	206.28 ± 9.71*	214.55 ± 10.45*	333.13 ± 53.85*

Valores de Esperados (X±2DS):

CCB: (4.70 – 14.70)

CCM: (32.23 – 45.99)

CCA: (131.79 – 177.09)

Cuadro 17. Estabilidad del estuche de insulina a 37°C. Se muestran los valores de los controles de calidad expresados como media ± desviación estándar a lo largo de un mes de almacenamiento del estuche a 37°C. Los valores marcados en negrillas y con asterisco (*) muestran los controles que se salen del rango esperado.

Estudio de Estabilidad de los Estándares de Insulina Humana

El cuadro 18 muestra el estudio de estabilidad de la curva estándar de insulina, se puede observar que mínimo hasta 6 meses los estándares son estables a 4 °C, y garantizan una adecuada exactitud de la medición de insulina, por lo que no se requiere de su congelación.

Concentración Esperada (μUI/mL)	3 meses		6 meses	
	Concentración Calculada (μUI/mL)	Porcentaje de Recuperación	Concentración Calculada (μUI/mL)	Porcentaje de Recuperación
3.13	2.86	91.52	3.66	117.12
6.25	6.58	105.28	6.36	101.76
12.50	10.31	82.48	11.78	94.24
25.00	22.30	89.20	25.75	102.92
50.00	53.60	107.20	50.29	100.58
100.00	84.60	84.60	100.89	100.89
200.00	191.00	95.50	212.72	106.36
400.00	361.00	90.25	424.58	106.14
	Total	93.25%	Total	103.75 %

Cuadro 18. Estudio de estabilidad de los estándares de insulina humana a 4° C.

d. Estudio de asociación de las concentraciones de insulina en muestras de suero de pacientes, medidas por el método desarrollado y por el método comercial de referencia.

La comparación de los valores reportados por el método comercial con los reportados por el sistema desarrollado se muestra en la figura 14, ésta mostró una alta asociación dada por el elevado coeficiente de determinación ($r^2 = 0.9201$). Así mismo, a partir de la pendiente obtenida de 1, se puede inferir que ambos métodos reportan concentraciones de insulina muy cercanas entre sí, es decir, son dos métodos equivalentes.

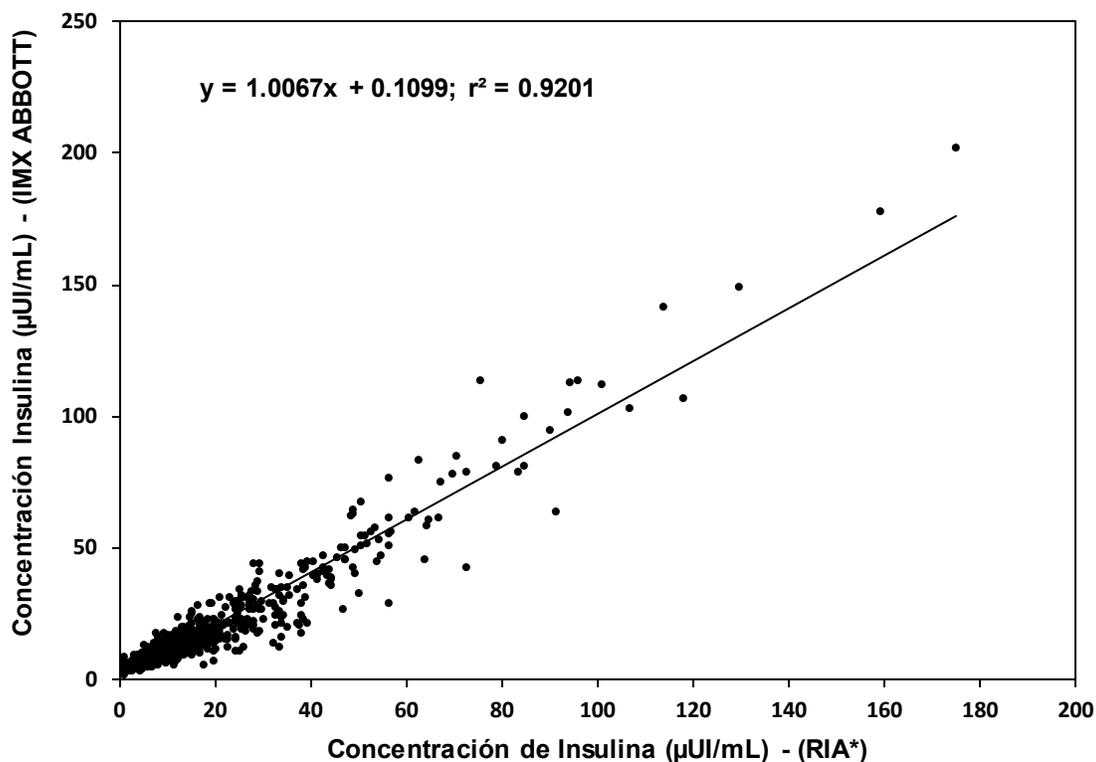


Figura 14. Correlación entre las concentraciones de insulina medidas por el método IMX de ABBOT y RIA INCMNSZ. Se muestran los resultados de la evaluación de 732 muestras de suero.

e. Evaluación comparativa de las concentraciones séricas de insulina medidas por el método de referencia y por el método desarrollado, en 8 estudios de tolerancia a la glucosa.

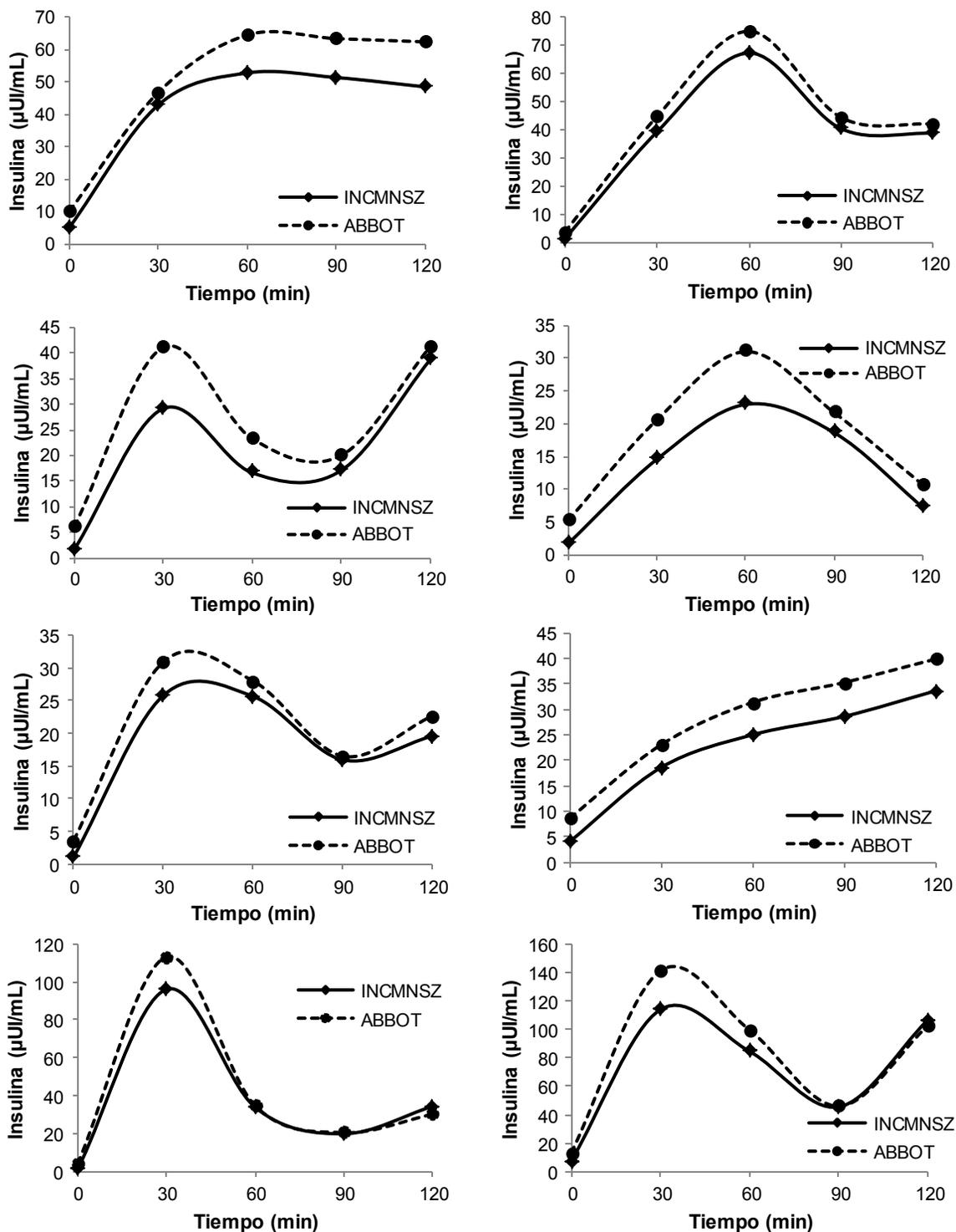


Figura 15. Comparación de las concentraciones de Insulina en curvas de tolerancia a la glucosa, medidas por el RIA desarrollado (INCMNSZ) y el metodo comercial IMX-ABBOTT.

La figura 15, muestra el comportamiento comparativo de la medición de insulina por el método de referencia empleado en el Laboratorio de Diabetes del Departamento de Endocrinología y por el método desarrollado. Se puede observar que consistentemente ambos métodos detectan los mismos cambios en las concentraciones de insulina en el tiempo. Pero en la mayoría de los casos el método de referencia tiende a reportar concentraciones relativamente mayores.

Esta tendencia a reportar concentraciones relativamente más elevadas pudiera ser un signo de que el método de referencia pueda tener algún grado de interferencia en la medición de insulina.

Para ello se realizó la evaluación del efecto matriz del método de referencia que se muestra en el cuadro 19.

f. Evaluación del efecto matriz en la determinación de insulina por el método de referencia.

El estudio del efecto matriz del método de referencia (cuadro 19) mostro inequívocamente, que este sufre algún grado de interferencia. La comparación entre las dos matrices empleadas, mostró que existen proteínas en el suero, que son capaces de interferir en la medición de insulina y hacen que la concentración medida tienda a sobre estimarse. Esto no ocurre cuando la única proteína añadida al sistema es la albúmina bovina.

Matriz: PBS-BSA 1%, EDTA 25 mM				Matriz: Suero Normal Humano			
Dilución	Insulina (μ UI/mL)	Concentración X Dilución (μ UI/mL)	Recuperación (%)	Dilución	Insulina (μ UI/mL)	Concentración X Dilución (μ UI/mL)	Recuperación (%)
1	280.70 \pm 18.67	280.70	100.00	1	285.80 \pm 20.08	285.80	100.00
1/2	135.85 \pm 10.11	271.70	96.79	1/2	148.90 \pm 12.73	297.80	104.20
1/4	67.65 \pm 0.21	270.60	96.40	1/4	80.45 \pm 6.29	321.80	112.60
1/8	33.85 \pm 1.06	270.80	96.47	1/8	51.55 \pm 3.61	412.40	144.30
1/16	18.20 \pm 1.27	291.20	103.70	1/16	30.15 \pm 3.32	482.40	168.79
1/32	8.90 \pm 0.42	284.80	101.46	1/32	21.90 \pm 3.39	700.80	245.21
Recuperación Promedio		278.30	99.12	Recuperación Promedio		416.83	145.85

Cuadro 19. Efecto de la matriz en el método comercial IMX-ABBOTT. Se puede observar que proteínas séricas interfieren en la cuantificación de insulina y tienden a sobrestimar el valor de la concentración real.

g. Estudio de asociación de las concentraciones de insulina, medidas por el método desarrollado y por el método comercial de referencia, empleando la misma matriz en todo el rango de concentraciones evaluado.

Con el objetivo de establecer de manera más fina las posibles interferencias de proteínas séricas en la medición de insulina del método de referencia, se prepararon 44 concentraciones diferentes de insulina, para lo cual se empleó como matriz un pool de sueros provenientes de 5 hombres y 5 mujeres con concentraciones muy bajas de insulina. Los resultados se muestran en la figura 16.

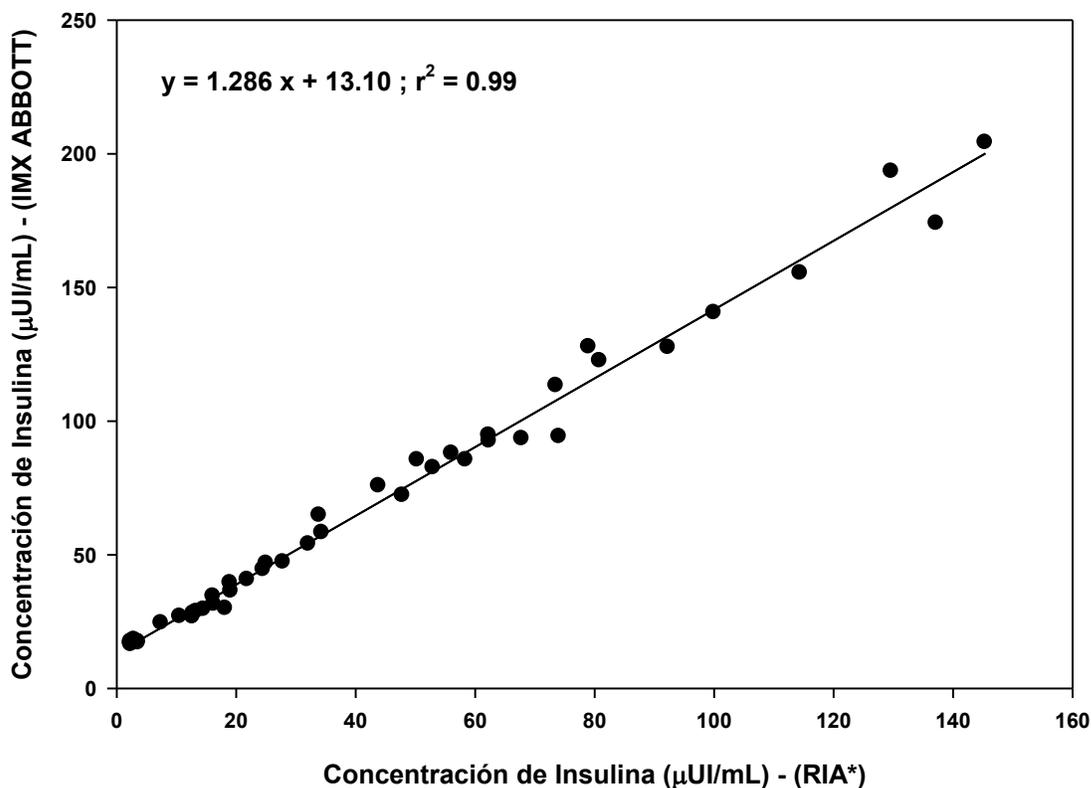


Figura 16. Evaluación comparativa de la exactitud en la medición de insulina por ambos métodos, considerando el mismo efecto matriz en todas las determinaciones.

Se puede observar de forma inequívoca, por el valor del intercepto (13.1, muy alto) de la ecuación de correlación, que el método comercial tiende a sobrestimar la medición de insulina, a tal punto que cuando el sistema desarrollado no detecta insulina en las muestras, el método de referencia detecta 13.1 $\mu\text{UI/mL}$. Así mismo, el valor de la pendiente de la ecuación de correlación sugiere que bajo estas condiciones experimentales, el método de referencia sobrestima la medición de insulina en cerca de un 29%. Este efecto se magnifica en este experimento, pues se empleó la misma matriz y por tanto la interferencia estaba presente en todas las muestras medidas, por lo que se demuestra que el método de referencia sufre de un efecto debido a la matriz.

h. Evaluación de la reactividad cruzada con insulina de otras especies de animales de laboratorio y de interés pecuario.

Los análisis de paralelismo arrojaron los resultados que se muestran en el cuadro 20, donde se puede observar que el RIA desarrollado, es capaz de medir de forma confiable las concentraciones de insulinas de varias especies de animales de laboratorio, que normalmente son empleadas en modelos experimentales de diabetes mellitus y síndrome metabólico en donde la medición de insulina resulta muy necesaria.

Especie de donde proviene la insulina	Porcentaje de reactividad
Humano	100%
Rata	≥ 95%
Ratón	≥ 98%
Hámster	≥ 98%
Conejo	≥ 98%
Cabra	≥ 98%
Borrego	≥ 98%
Puerco	≥ 98%
Vaca	≥ 98%
Mono	≥ 99%

Cuadro 20. Reactividad cruzada del RIA de insulina, utilizando los anticuerpos producidos, para la medición de insulina de otras especies de animales de laboratorio y de interés pecuario.

Así mismo, el método es útil para medir insulinas en animales de interés pecuario, pudiendo ser aplicado en estudios de aprovechamiento alimentario y de estimación del valor insulinogénico de diferentes tipos de dietas, que se quieran probar para el mejoramiento del ganado y lograr mayores rendimientos de carne y leche.

VIII. Conclusiones

- ❖ Se logró la producción y caracterización de los reactivos primarios y secundarios para la normalización de un ELISA y un RIA para la cuantificación de insulina.

- ❖ Las condiciones evaluadas para el ELISA no fueron adecuadas para garantizar una medición confiable de insulina. Por tal motivo, se realizó la normalización y validación de un radioinmunoanálisis, que mostró ser muy robusto e incluso tener características analíticas más confiables que el método comercial con el que se comparó.

- ❖ El RIA desarrollado, puede ser empleado en el diagnóstico clínico de complicaciones metabólicas que involucren alteraciones en las concentraciones circulantes de insulina.

- ❖ Se demostró que el método desarrollado, puede tener una gran utilidad para la realización de estudios metabólicos en animales de laboratorio y de interés pecuario.

IX. Recomendaciones

Es recomendable seguir trabajando en la normalización óptima del ELISA de insulina. Para ello se debe disminuir la concentración de insulina biotinilada hasta concentraciones realmente de trazador, cercanas al punto más bajo de la curva y aumentar los tiempos de incubación para alcanzar un equilibrio químico que permita un verdadero estado de competición entre la insulina nativa y la marcada con biotina. Lo que contribuirá a mejorar todos los parámetros analíticos del método, entre ellos: el límite de detección, el rango dinámico, la sensibilidad, la precisión y exactitud, que le darán mayor robustez y confiabilidad al ELISA, para poder ser empleado como método de rutina en la medición de insulina humana.

X. Referencias

1. Rosalyn S. Yalow, Solomon A. Berson. Assay of plasma insulin in human Subjects by Immunological Methods. *Nature* 1959; Vol 184: p 1648-9.
2. Secretaria de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2010, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus. *Diario Oficial*, segunda sección. México D. F., Martes 23 de noviembre de 2010.
3. Butte NF. Carbohydrate and lipid metabolism in pregnancy: normal compared with gestational diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr.* 2000; Vol 71 (Supl.1): 1256–61.
4. Seely EW, Solomon CG. Insulin resistance and its potential role in pregnancy-induced hypertension. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; Vol 88: 2393–8.
5. Piniés José Antonio. Complicaciones agudas y crónicas, un riesgo que debe ser evitado. *Economía de la salud. Monográfico*, Vol 7 Num.2. España, 2002: 64-7.
6. Organización Mundial de la Salud (OMS). Diabetes: el costo de la diabetes. Hoja de hechos no. 236. Septiembre de 2012.
7. Secretaria de Salud. Instituto Nacional de Salud Pública. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición: Resultados Nacionales 2012 (ENSANUT). 1ª ed. México. 2012.
8. Wilcox Gisela. Insulin and Insulin Resistance. *Clin Biochem Rev.* 2005; Vol 26: 19-37.
9. Bliss M. The history of insulin *Diabetes Care.* 1993; Vol 16 (Supl. 3): 4–7.
10. Dodson G, Steiner D. The role of assembly in insulin's biosynthesis. *Curr Opin Struct Biol.* 1998; Vol 8: 189–94.
11. Schroder D, Zuhlke H. Genetechnology, characterization of insulin gene and the relationship to diabetes research. *Endokrinologie.* 1982; Vol 79: 197–209.
12. Porksen N, Hollingdal M, Juhl C, Butler P, Veldhuis JD, Schmitz O. Pulsatile insulin secretion: detection, regulation, and role in diabetes. *Diabetes.* 2002; Vol 51 (Supl. 1): 245–54.

13. Bratanova-Tochkova TK, Cheng H, Daniel S, et al. Triggering and augmentation mechanisms, granule pools, and biphasic insulin secretion. *Diabetes*. 2002; Vol 51 (Supl. 1): 83–90.
14. Malaisse WJ. Insulin biosynthesis and secretion in vitro. En: Alberti KGMM, Zimmet P, Defronzo RA & Keen H (Hon) editors. *International Textbook of Diabetes Mellitus*, 2^a ed, John Wiley & Sons, New York; 1997: 315–36.
15. Kahn SE, McCulloch DK, Porte D. Insulin secretion in the normal and diabetic human. En: Alberti KGMM, Zimmet P, Defronzo RA, editors & Keen H, (hon) editor. *International Textbook of Diabetes Mellitus*. 2^a ed. John Wiley & Sons, New York; 1997: 337–54.
16. Burks DJ, White MF. IRS proteins and beta-cell function. *Diabetes*. 2001; Vol 50 (Supl. 1): 140–5.
17. Karam JH. Pancreatic Hormones and Diabetes Mellitus. En: Greenspan FS, Strewler GJ, editors. *Basic and Clinical Endocrinology*. Appleton & Lange, Stamford CT USA; 1997: 601–2.
18. Wheatcroft SB, Williams IL, Shah AM, Kearney MT. Pathophysiological implications of insulin resistance on vascular endothelial function. *Diabet Med*. 2003; Vol 20: 255–68.
19. Reaven G. The metabolic syndrome or the insulin resistance syndrome? Different names, different concepts, and different goals. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2004; Vol 33: 283–303.
20. U.S. Department of Health, and Human Services. *Insulin Resistance and Prediabetes*. National Diabetes Information Clearinghouse. National Institutes of Health (NIH). NIH Publication No. 09–4893. 2008.
21. Withers DJ, White M. Perspective: The insulin signaling system—a common link in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Endocrinology*. 2000; Vol 141: 1917–21.
22. Hunter SJ, Garvey WT. Insulin action and insulin resistance: diseases involving defects in insulin receptors, signal transduction, and the glucose transport effector system. *Am J Med*. 1998; Vol 105: 331–45.

23. López Mariela E., Sosa Mirna A., Labrousse Nelson P. Ma., Síndrome Metabólico. Revista de Posgrado de la VIª Cátedra de Medicina. 2007; N° 174: 12-5.
24. Lawrence A. Kaplan. Clinical Chemistry: Theory, Analysis, Correlation. 4ª edición. Mosby, 2003.
25. Law B. Immunoassay a practical guide. UK: Taylor and Francis; 2005.
26. Kindt T, Goldsby R, y Osborne B. Inmunología de Kuby. 6ta ed. USA: McGraw-Hill Interamericana; 2007. p. 154-158.
27. Margni R. Inmunología e inmunoquímica. 5ta ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 1996. p. 799 -813.
28. Tijssen P. Practice and theory of enzyme immunoassays. Amsterdam: ELSEVIER; 1985.
29. Crowther J. The ELISA guidebook. 2nd ed. Humana Press; 2009.
30. Hernández C, Cure C y Hernández J. Fundamentos prácticos de la dosificación hormonal. Salud Uninorte 1988; Vol. 4-5 No. 3: 151-170.
31. Chard T. An introduction to radioimmunoassay and related techniques. 5th ed. Amsterdam: ELSEVIER; 1995.
32. Zambrano F, Díaz V. El radioinmunoanálisis y su control de calidad. México: Centro Nuclear de México "Nabor Carillo"; 1996.
33. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C. Guía de Validación de Métodos analíticos. México: El Instituto, 2002.
34. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for human Use. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). ICH, 2005.
35. Ochoa R. Técnicas inmunoenzimáticas para ensayos clínicos de vacunas y estudios inmunoepidemiológicos. La Habana: Finlay ediciones, 2012.
36. Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation. FDA, CDER, CVM, 2001.
37. NMX-EC-17025-IMNC-2006 "Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración".

38. Entidad Mexicana de Acreditación. Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico. Fecha de emisión 2008-04-15.
39. Pace CN, Vajdos F, Fee L, Grimsley G, Gray T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Science* 4:2411-23, 1995.
40. Immunizations. In *ANTIBODIES a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York, USA. 53-135, 1980.
41. BIORAD. Immobilization Procedure for Affi-Gel® 102. Catalog Number 153-2401. Bio-Rad Laboratories, 2000 Alfred Nobel Dr., Hercules, CA 94547.
42. Labeling antibodies. Periodate coupling. *Antibodies a Laboratory Manual*. Stockholm: Cold Spring Harbor Laboratory; 1988: 348.
43. Hunter WM, Greenwood FC. Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature* 194:495-96, 1962.

XI. Anexos

Procedimiento normalizado de operación para la cuantificación de insulina por radioinmunoanálisis

I. Utilidad.

Este inmunoensayo ha sido desarrollado para la cuantificación de Insulina en Múltiples Especies de Animales. Es un sistema homólogo para la insulina humana y heterólogo para el resto de las insulinas de las especies evaluadas. La reactividad cruzada con estas es de más de 95%.

El ensayo es capaz de detectar a la insulina en muestras de suero, plasma y medios de cultivos celulares.

II. Principio del Método.

Es un radioinmunoanálisis en fase líquida con precipitación por segundo anticuerpo en presencia de polientilenglicol.

Su principio se basa en la competencia que se establece entre una hormona sin marca (analito) y una hormona marcada con I125 (marcador radioactivo) por unirse a un anticuerpo específico que se encuentra en una concentración limitante con respecto a la concentración total de hormona en el tubo. En consecuencia, mientras mayor sea la concentración del analito, mayor será la posibilidad de unirse al anticuerpo con respecto al trazador radioactivo y viceversa.

Los microcomplejos inmunes formados, son entonces precipitables al adicionar un reactivo de precipitación que contiene un anticuerpo secundario específico contra el anticuerpo primario. Una vez formados estos macrocomplejos inmunes, son precipitados por medio de un proceso de centrifugación.

Los complejos inmunes precipitados son leídos en un contador de radiaciones gamma y la radioactividad medida, es graficada contra la concentración del analito en cada tubo de la curva estándar; estableciéndose una curva dosis-respuesta que permite estimar la concentración del analito en una muestra biológica.

III. Reactivos Suministrados.

*Se suministran reactivos suficientes para 112 tubos.

Todos los reactivos son suministrados listo para usarse, y tienen estabilidad evaluada por más de un año a 4oC, excepto la marca que solo tiene una vida útil de dos meses.

Todos los reactivos deben ser conservados de 2-8oC, no se requiere congelación de ningún reactivo, incluyendo los estándares o controles internos de calidad.

A. Buffer de Ensayo (Estándar 1).

-PBS pH: 7.4 conteniendo 25 mM de EDTA, 0.02% timerosal, 1% BSA fracción V.

-Cantidad: 6mL.

B. Anticuerpo Primario.

- Antisuero anti-insulina humana (producido en cobayo) diluido 1/ 40 000 en buffer de ensayo.
- Contiene colorante artificial azul 0.1%.
- Cantidad: 13 mL.

C. Insulina Humana Marcada con I^{125} .

- Insulina humana marcada con I^{125} purificada en Sephadex G-50 y repurificada en Sephadex G-100.
- La insulina- I^{125} está disuelta en buffer de ensayo conteniendo 1% de suero normal de cobayo.
- La marca es ajustada el primer día alrededor de 12 000 CPM y es útil mientras su conteo total sea $\geq 6 000$ CPM (dos meses después).
- Actividad Especifica: 120-140 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$.
- Recién yodada, la marca tiene una actividad total $< 1.5 \mu\text{Ci}$ ($< 56 \text{ kBq}$).
- Contiene colorante artificial rojo 0.1%.
- Cantidad: 13 mL.

D. Estándares de Insulina.

- Insulina recombinante altamente purificada disuelta en buffer de ensayo en las siguientes concentraciones: 6.53, 13.07, 26.13, 52.26, 104.53, 209.06 $\mu\text{UI}/\text{mL}$ (0.31, 0.62, 1.25, 2.5, 5, 10 ng/mL).
- Contiene colorante artificial amarillo 0.1% .
- Cantidad: 1 mL de cada estándar.

E. Controles Internos de Calidad.

- Insulina recombinante altamente purificada disuelta en buffer de ensayo en las siguientes concentraciones:
 - . I: 20.91 $\mu\text{UI}/\text{mL}$ (1 ng/mL).
 - . II: 83.62 $\mu\text{UI}/\text{mL}$ (4 ng/mL).
- Contiene colorante artificial café.
- Cantidad: 1 mL de cada control.

F. Reactivo de Precipitación.

- Antisuero anti-IgG de cobayo diluido 1/10 en PBS pH 7.4, conteniendo 4% de polietilenglicol, 0.025% de Triton X-100, 12.5 mM EDTA, 0.25% BSA y 0.01% de timerosal.
- Contiene colorante artificial verde 0.1%.
- Cantidad: 13 mL/frasco (2 frascos).

IV. Precauciones para el Manejo del Material Radioactivo.

- El material radioactivo solo puede ser recibido, transportado y manipulado por Personal Ocupacionalmente Expuesto (POE).
- Los laboratorios que quieran utilizar este producto deberán contar con licencia de operaciones vigente para el manejo de material radioactivo y deberán

cumplir con las especificaciones y normas establecidas por la Comisión de Energía Nuclear y Salvaguardias de México.

-En caso de accidente, se deberán tomar medidas de emergencia y notificar de inmediato al responsable de seguridad radiológica del laboratorio.

V. Materiales Requeridos pero no Suministrados.

- Tubos de borosilicato de 12X75 mm.
- Pipetas de 100 y 200 μ L.
- Puntas amarillas.
- Agitador tipo Vortex.
- Centrifuga refrigerada de ángulo libre con velocidad de 3000 RPM.
- Papel absorbente.
- Refrigerador.
- Contador de radiaciones gamma.

VI. Recolecta y Almacenamiento de las Muestras.

El ensayo es capaz de medir insulina en suero, plasma con EDTA, plasma con heparina, y medios de cultivos celulares.

Si las muestras no están hemolizadas, pueden ser almacenadas entre 2-8°C hasta 1 días antes de ser procesadas. Si el procesamiento demora más de 1 días, se recomienda que se congelen las muestras a -20°C.

La hemólisis y la lipemia, no son factores limitante en este método para la cuantificación confiable de insulina.

VII. Procedimiento de Ensayo.

Para garantizar los mejores resultados, se debe pipetear con precisión y seguir cuidadosamente el protocolo de trabajo. **Un factor de gran importancia es la agitación correcta de los tubos para garantizar un mezclado óptimo de los reactivos.*

El sistema analítico ha sido estandarizado para utilizar 100 μ L de muestra. Las muestras con concentraciones mayores de 209 μ UI/mL (10 ng/mL) deben diluirse con buffer de ensayo y ser nuevamente evaluadas.

Los mejores resultados se obtienen cuando son utilizados tubos de borosilicato. El uso de tubos de plástico puede ser admisible, pero puede introducir imprecisiones por la menor adherencia del precipitado a este tipo de materiales. Si el cliente decide utilizar tubos plásticos, se recomienda aspirar el sobrenadante en lugar de decantarlo.

A. Protocolo.

1^{er} Día:

1. Pipetear 200 μ L de buffer de ensayo a los tubos de las uniones no específicas (UNE) (3-4). Pipetear 100 μ L de buffer de ensayo a los tubos de las uniones específicas máximas (Bo) (5-6).

2. Pipetear 100 μ L de los estándares por duplicado (tubos 7-18) y de los controles internos de calidad (19-24).
3. Pipetear 100 μ L de cada muestra por duplicado (tubos 25-112).
4. Pipetear 100 μ L de anticuerpo anti-insulina a todos los tubos excepto a los tubos totales (T) (1-2) y a los tubos UNE (3-4).
5. Pipetear 100 μ L del marcador radioactivo a todos los tubos (1-112).
6. Agitar bien todos los tubos excepto los totales (1-2) en un vortex.
7. Incubar 18 horas (toda la noche) a 4°C.

2^{do} Día:

8. Agitar manualmente el reactivo de precipitación.
9. Pipetear 200 μ L del reactivo de precipitación a todos los tubos excepto los totales (1-2).
10. Agitar bien todos los tubos excepto los totales (1-2) en un vortex.
11. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
12. Centrifugar todos los tubos excepto los totales (1-2) durante 30 minutos a 4°C y 3000 RPM.
13. Decantar el sobrenadante, dejar volteados los tubos sobre papel absorbente durante 5 minutos.
14. Secar los tubos hasta la mitad con cotonetes o hisopos de papel absorbente.
15. Contar todos los tubos durante 1 minuto en un contador de radiaciones gamma.

VIII. Cálculos.

A. Cálculo Automático.

El cálculo de las concentraciones puede realizarse automáticamente por la mayoría de los contadores de radiaciones gamma. Puede hacerse también utilizando los datos del contador y paquetes estadísticos disponibles comercialmente. Se recomienda utilizar la transformación de 4 parámetros logísticos.

B. Cálculo Manual.

- 1) Calcular el promedio de los CPM de los tubos totales (1-2), de los tubos UNE (3-4), de los tubos Bo (5-6) y todos los duplicados de las muestras ensayadas.
- 2) Restar el promedio de los CPM de los tubos UNE a los promedios de todos los tubos excepto los totales. *La diferencia es lo que se emplea en el resto de los cálculos.
- 3) Calcular el porcentaje de unión específica máxima (%Bo) del marcador radioactivo (CPM Bo/CPM T)X 100. Este porcentaje debe estar entre 20-40%.
- 4) Calcular el porcentaje de unión del marcador radioactivo en el resto de los tubos estándares, controles y muestras (%B) (CPM estándares, controles, muestras/CPM T)X 100.
- 5) Calcular el porcentaje de unión del marcador radioactivo en cada tubo estándar, control o muestra con respecto a la unión específica máxima (%B/Bo).
%B/Bo = (% unión del marcador radioactivo en los tubos estándares, controles y muestras/% de unión específica máxima)X 100. Con este cálculo el % de

unión específica máxima se normaliza a 100%.

6) Graficar el %B/Bo para cada estándar en el eje-Y y la concentración conocida de los estándares en el eje-X utilizando un papel doble logarítmico.

7) Construya la curva de referencia uniendo los puntos creando la trayectoria más suave.

8) Determine la concentración de insulina en las muestras problemas y los controles por interpolación en la curva de referencia.

C. Transformaciones de Unidades.

$(\text{ng/mL} \times 150) / 7.175 = \mu\text{UI/mL}$.

IX. Interpretación de los Resultados.

A. Criterios de Aceptación.

1. Los resultados pueden ser considerados confiables cuando los tres controles internos de calidad caen dentro del rango esperado.

2. Si dos controles caen en el rango esperado, y el que no cae, no se aleja más de un 30% del valor esperado, los resultados pueden ser considerados confiables.

3. Si el coeficiente de variación entre duplicados es mayor de 10%, la muestra en cuestión debe ser evaluada nuevamente.

4. Los valores no detectables deben reportarse como menor que el límite de detección del ensayo.

5. El límite de linealidad del ensayo es 209 $\mu\text{UI/mL}$ (10 ng/mL); las muestras con concentraciones mayores, deben ser diluidas con buffer de ensayo y re-evaluadas.

X. Características del Ensayo.

A. Sensibilidad.

La menor concentración de insulina que puede ser detectada por el ensayo es 1 $\mu\text{UI/mL}$ (0.05 ng/mL).

B. Precisión.

1) Precisión intra-ensayo.

La precisión intra-ensayo se estimó al evaluar 4 réplicas de cada uno de los 2 controles internos de calidad: I y II en un mismo ensayo.

2) Precisión inter-ensayo.

La precisión inter-ensayo se estimó al evaluar por duplicado cada uno de los 2 controles internos de calidad en 4 ensayos diferentes.

Muestra Control	Concentración: $\mu\text{UI/mL}$ (ng/mL)	CV (%) intra-ensayo	CV (%) inter-ensayo
I	20.91 (1)	6.25	6.04
II	83.62 (4)	6.45	5.85

C. Exactitud.

1) Recuperación.

La exactitud del ensayo se evaluó bajo el criterio de recuperación del analito. Para ello se ensayaron una serie de muestras de concentraciones conocidas; y se comparó el valor esperado con el reportado por el ensayo.

Concentración Esperada ($\mu\text{UI/mL}$)	Concentración Calculada ($\mu\text{UI/mL}$)	Recuperación (%)
3.13	2.90	92.80
6.25	6.87	109.92
12.50	12.93	103.44
25.00	21.96	87.84
50.00	44.34	88.68
100.00	95.90	95.90
200.00	203.00	101.50
400.00	438.80	109.70
Recuperación Promedio		98.72%

2) Interferencias.

2A. Interferencias con Proteínas Séricas.

Se evaluó las posibles interferencias de las proteínas séricas en la cuantificación confiable de insulina por este método. Se preparó una serie de muestras al adicionar una concentración única de insulina a una matriz de PBS-BSA y otra de suero normal humano (SNH), se realizaron diluciones seriada $\frac{1}{2}$ con PBS-BSA y con SNH según el caso y se verificaron los porcentajes de recuperación en ambas matrices. Los porcentajes promedios de recuperación fueron de 102.6% para la matriz de PBS-BSA y de 102.2% para la matriz de SNH.

El sistema no tiene interferencias con otras proteínas séricas, es altamente específico para la insulina.

2B. Interferencia con Hemoglobina.

Concentraciones de hemoglobina hasta 150 mg/dL, no provocaron interferencias en la determinación de insulina.

2C. Interferencia con Lípidos.

Concentraciones de triglicéridos hasta 4192 mg/dL y de colesterol hasta 668 mg/dL, no provocaron interferencias en la determinación de insulina.

2D. Interferencia con Bilirrubina.

Concentraciones de bilirrubinas hasta 15 mg/dL, no provocaron interferencias en la determinación de insulina.

D. Reactividad Cruzada con otras Especies.

Dado que la secuencia de insulina humana, de un total de 51 aminoácidos, solo se diferencia de entre 1-5 aminoácidos con las de otras especies de animales de laboratorio o de interés pecuario; se evaluó la reactividad cruzada con algunas de ellas. Los porcentajes de reactividad cruzada encontrados se muestran a continuación:

Especie de donde proviene la insulina	Porcentaje de reactividad
Humano	100%
Rata	≥ 95%
Ratón	≥ 98%
Hámster	≥ 98%
Conejo	≥ 98%
Cabra	≥ 98%
Borrego	≥ 98%
Puerco	≥ 98%
Vaca	≥ 98%
Mono	≥ 99%

XI. Valores Esperados.

Para muestras de humanos los valores esperados en una población normal deben ser considerados menores de 15.6 $\mu\text{UI/mL}$ (0.75 ng/mL). Estos valores son los esperados según los estudios de Clamps realizados por Matthews, D.R. et al.

Matthews, D.R., Hosker, J.P., Rudenski, A.S., Naylor, B.A., Treacher, D.F., and Turner, R.C., Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. Diabetología, 1985. 28(7): p. 412-9.

Ensayos previos mostraron que cerca del 40% de los individuos sanos tenían valores de insulina menores al límite de detección del ensayo: 1 $\mu\text{UI/mL}$ (0.05 ng/mL).

Para el resto de las especies, los valores normales deben ser establecidos por cada usuario, pues este variará en función de la raza, condiciones sanitarias, de alimentación y del nivel de estrés de los animales.

En otras especies de animales monogástricos como el perro y el puerco, los valores basales pueden ser muy bajos por lo que igual que el humano, un porcentaje elevado de los individuos normales tienen valores de insulina en ayuno no detectables; lo cual está en concordancia con su fisiología.

XII. Autores.

Eulises Díaz Díaz, Alvarado Ríos José Antonio. Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán".

Variante A. RIA de insulina para la determinación del título de antisuero.

Esta variante es empleada para realizar el seguimiento de la respuesta inmune en animales inmunizados contra insulina y para el seguimiento de los procesos de purificación de los anticuerpos anti-insulina. Debido a que aquí lo que interesa es analizar la actividad de los anticuerpos presentes en los sueros inmunes y no la presencia de insulina, las diluciones de los sueros inmunes a analizar se montan como si fueran uniones máximas y no es necesaria la comparación con una curva estándar. Solo se estiman las uniones específicas máximas (B_0).

Reactivos

- No se requiere del anticuerpo primario, ni estándares, ni controles internos de calidad.
- El buffer de ensayo y la marca se preparan igual que para la cuantificación de insulina.

Material requerido

- El mismo que para la cuantificación de insulina.

1er Día

1. Pipetear 200 μ L de buffer de ensayo a los tubos de las uniones no específicas (UNE) (3-4).
2. Pipetear 100 μ L de buffer de ensayo a los tubos de las muestras (5-n).
3. Pipetear 100 μ L de cada muestra (diluciones seriadas del suero hiperinmune) (5-n).
4. Pipetear 100 μ L del marcador radiactivo a todos los tubos (1-n).
5. Agitar bien todos los tubos en un vortex.
6. Incubar de 18 horas (toda la noche) a 4 °C.

2do Día

7. Agitar manualmente el reactivo de precipitación.
8. Pipetear 200 μ L del reactivo de precipitación a todos los tubos.
9. Agitar bien todos los tubos en un vortex.
10. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
11. Centrifugar todos los tubos durante 30 minutos a 4°C y 3000 RPM.
12. Decantar el sobrenadante, dejar volteados los tubos sobre papel absorbente durante 5 minutos.
13. Secar los tubos hasta la mitad con cotonetes o hisopos de papel absorbente.
14. Contar todos los tubos durante 1 minuto en un contador de radiaciones gamma.

Calculo de resultados

Calcular el % UE como ya se mencionó anteriormente.

Autores.

Eulises Díaz Díaz, Alvarado Ríos José Antonio. Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”.