



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA**

**INMUNODETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-INSULINA LIBRES EN SUERO  
Y UNIDOS A LA MOLÉCULA DE INSULINA EN PACIENTES INSULINO-  
DEPENDIENTES**

**LEIDY YOHANA DOMINGUEZ ROMERO**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
FACULTAD DE MEDICINA  
MAESTRIA EN BIOQUÍMICA  
BOGOTÁ D.C  
2014**



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA**

**INMUNODETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-INSULINA LIBRES EN SUERO  
Y UNIDOS A LA MOLÉCULA DE INSULINA EN PACIENTES INSULINO-  
DEPENDIENTES**

**Trabajo de tesis presentado para optar al Título de Magíster en  
Bioquímica**

**LEIDY YOHANA DOMINGUEZ ROMERO**

Directora:

Gabriela Delgado Murcia, DrSc Farmacéuticas

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
FACULTAD DE MEDICINA  
MAESTRIA EN BIOQUÍMICA  
BOGOTÁ D.C  
2014**

A mi mamá, que vivió este sueño como propio.

## Agradecimientos

Son muchas las personas que por su incondicional colaboración contribuyeron al desarrollo de este trabajo. En este espacio me permito nombrarlas con el objetivo de expresar mis más sinceros agradecimientos.

- A Dios por guiar mi camino, levantarme en momentos difíciles y permitirme culminar este sueño.
- A mi mamita porque gracias a su amor incondicional y su inmenso apoyo sume fuerzas para culminar tan anhelado objetivo.
- A los integrantes del Grupo de Investigación en Inmunotoxicología, de manera especial a su líder (y directora de este trabajo) la profesora Gabriela Delgado, por proponerme este tema, hacerme parte de su grupo y apoyarme en diversas circunstancias. También de forma muy especial a Jeysson Sánchez, Julián Pérez, Diana Granados, Erika Torres, Ángela Gómez y Magda Flórez, quienes con su amistad e incondicional apoyo, aportaron para la culminación de este trabajo.
- A la Dirección de Investigación (DIB) de la Universidad Nacional por el apoyo financiero y a Colciencias que a través del programa Jóvenes Investigadores 2012, permitió el apropiado desarrollo de esta tesis.
- A la Dra Luisa Bohórquez y el Dr Jorge Arturo Santa por su colaboración al contactar y valorar clínicamente los voluntarios diabéticos que participaron en este estudio y de manera muy especial a cada uno de ellos. También a la Dr Martha Nancy Calderón Ozuna por su apoyo incondicional.
- A la Universidad Nacional de Colombia por brindar un espacio propicio para mi desarrollo profesional, académico y personal. Dentro de esta al Departamento de Farmacia y a los grupos de Ingeniería de Tejidos y Farmacología de la medicina tradicional y popular y al Bioterio y su dirección por la colaboración que prestaron en momentos claves durante la fase experimental. Al Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia, especialmente al Dr Mauricio Reyes por la colaboración que me prestó durante parte de la fase experimental de este trabajo.
- A la Maestría en Bioquímica de la Facultad de Medicina y su comité asesor conformado por el Dr Carlos Arturo Guerrero, el Dr Orlando Acosta y el Dr Luis Gómez, por abrirme las puertas de esta maestría y brindarme la oportunidad de aprender.
- A la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC) de manera especial a su Director y fundador el Dr Manuel Elkin Patarroyo. También al Dr Manuel Alfonso Patarroyo y el Dr Jose Manuel Lozano y las Dras Yolanda Silva y Martha Forero por permitirme usar las instalaciones del instituto y guiar mi aprendizaje.

## Resumen

El uso de la terapia insulínica como tratamiento para la Diabetes, basado en la administración de Insulina Exógena (IE) de origen animal –con alta homología a la insulina humana, a nivel de la secuencia proteica, se asoció en sus inicios con la prevalencia de Anticuerpos Anti-Insulina (AAI) [1, 2], relacionados a su vez con alteraciones en la seguridad y eficacia de estas formulaciones [3-6]. Con la aparición de insulinas de origen recombinante –bajo la premisa de la identidad con la secuencia humana, aunque se redujo la presencia de AAI no se eliminó plenamente su generación [7-9]. Con el objetivo de evaluar el perfil inmunogénico de tres formulaciones comerciales de IE (Insulina Regular, NPH y Glargina), en este trabajo, se estandarizó la técnica de ELISA indirecta y de captura para la detección de AAI libres y Complejos Inmunes (CI), respectivamente. Con las técnicas ya estandarizadas, se logró su aplicación en la valoración de 29 sueros de voluntarios con terapia insulínica para luego correlacionar la presencia de AAI con parámetros bioquímicos como glicemia, insulinemia y porcentaje de Hemoglobina glicosilada (HbAc1). Con el desarrollo de este trabajo se logró evidenciar que: i) Cada formulación de insulina es reconocida de manera diferencial por los AAI sugiriendo una mayor potencial inmunogénico de NPH y menor de Glargina, ii) El perfil de isotipo IgG de los AAI en humanos es diferencial para cada formulación, siendo predominante el isotipo IgG3 para la insulina NPH, en voluntarios bajo tratamiento con Insulinas Regular-NPH, iii) La presencia de AAI no se asocia con alteraciones de los parámetros metabólicos analizados en este estudio, y iv) Los CI constituidos por AAI-IE no se detectaron en los sueros de los voluntarios diabéticos.

**Palabras Clave:** Anticuerpos anti-insulina, insulina exógena, Diabetes y ELISA.

## Abstract

The administration of Exogenous Insulin (EI) from animal source –based in the high homology with the human protein sequence, in the Insulin-therapy for Diabetes treatment, it was associated in its beginnings with the prevalence of Anti-Insulin antibodies (AAI) [1, 2], which was regarded to some changes in the safety and efficacy of these formulations [3-6]. The discovering of the human recombinant insulins –under the base of the identity with the human sequence, decreased the presence of IAA, however, these antibodies were not eliminated completely [7-9]. In order to evaluate the immunogenic profiles of three commercial EI formulations (Regular, NPH and Glargina Insulins), in this work, we standardized both ELISA assays, the indirect and the capture, for the detection of free IAA and Immune Complexes (IC), respectively. Using these standardized techniques, 29 sera samples from volunteers under insulin-therapy were evaluated, analyzing the presence of AIAs, subsequently the data was correlated with the biochemical parameters such as blood glucose, insulin and glycosylated hemoglobin percentage (HbAc1). With this study we have evidenced: i) Each formulation of insulin is recognized differentially by AAI, suggesting a higher immunogenic potential of NPH Insulin compared with Glargine Insulin –lower level of AAI, ii ) The IgG isotype profile of IAAs in humans, is differential towards each formulation, the IgG3 isotype is predominant for the NPH formulation in volunteers treated with Regular- NPH insulins, iii ) The presence of AAI is not associated with alterations in the metabolic parameters analyzed here, and iv) The IC constituted by AAI-EI were not detected in sera of diabetic volunteers.

**Key words:** anti-insulin antibodies, exogenous insulin, Diabetes and ELISA

## Producción académica

Los resultados de este trabajo se relacionan con la siguiente producción académica:

- ✓ Artículo titulado “Inmunogenicidad de productos biotecnológicos: producción diferencial de anticuerpos anti-insulina exógena en conejos Nueva Zelanda (como modelo experimental *in vivo*).” En preparación.
- ✓ “Rabbit anti-exogenous insulin antibody production and Characterization: tools for immunogenicity studies on biotechnologically derived products”, presentado en modalidad de Poster en la “2 Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas”, realizado en la ciudad de Rosario, República de Argentina, durante los días 22 y 23 de noviembre de 2012 (ver anexo).
- ✓ “Inmunodetección y caracterización de la reactividad de anticuerpos anti-insulina frente a tres formulaciones comerciales de insulina humana en individuos Diabéticos tipo 2” Presentado en la modalidad de poster en el “XIV Congreso Colombiano de Farmacología y Terapéutica”, realizado en la ciudad de Ibagué, Colombia, durante los días 15- 18 de agosto de 2013 (ver anexo).
- ✓ “Evaluación del perfil humoral (Isotipos IgG) de anticuerpos anti-insulina para tres formulaciones comerciales en diabéticos tipo 2” Presentado en la modalidad de póster en el “XIII Congreso Internacional del Colegio Nacional de Bacteriología”, realizado en la ciudad de Bogotá, Colombia, durante los días 1- 4 de noviembre de 2013 (ver anexo).

## Contenido

Resumen .....	V
Lista de Figuras .....	IX
Lista de tablas .....	XI
Lista de símbolos y abreviaturas .....	XII
Introducción .....	14
1. Objetivos.....	16
1.1. Objetivo general .....	16
1.2. Objetivo Específicos.....	16
2. Estado del arte.....	17
2.1. Diabetes.....	17
2.1.1. Fisiopatología de la Enfermedad .....	17
2.1.2. Criterios de diagnóstico y control de Diabetes Mellitus.....	18
2.1.3. Complicaciones de la diabetes.....	18
2.1.4. Situación Actual de la Enfermedad.....	19
2.1.5. Tratamiento de la Enfermedad.....	19
2.2. Insulina.....	19
2.2.1. Estructura de la insulina.....	19
2.2.2. La síntesis de la insulina.....	20
2.2.3. Regulación de la síntesis de insulina.....	20
2.2.4. La terapia con insulina .....	21
2.2.5. Tipos de insulina.....	21
2.2.6. Generalidades de la respuesta inmune a la insulina .....	26
2.2.7. Anticuerpos Anti-Insulina.....	26
2.3. Técnicas de inmunodetección de anticuerpos anti-insulina .....	28
2.3.1. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) .....	28
2.3.2. Radioinmunoensayo .....	30
2.4. Producción de suero policlonal.....	30
2.4.1. El conejo para la producción de anticuerpos.....	30
2.4.2. Inmunización .....	31
2.4.3. Dosis del antígeno.....	31
2.4.4. Adyuvante .....	31
3. Materiales y métodos.....	33
3.1. Reactivos biológicos.....	33
3.2. Inmunización de conejos .....	33
3.3. Extracción y almacenamiento de sueros.....	34
3.4. Depuración del anticuerpo anti-insulina exógena.....	35
3.6. Evaluación de los niveles séricos de glicemia, insulinemia y proteínas totales. ....	36
3.7. ELISA indirecta.....	36
3.8. ELISA de captura .....	37
3.9. Formación <i>in vitro</i> de complejos inmunes AAI-insulina.....	38
3.10. Electroforesis en condiciones denaturantes y no denaturantes.....	38
3.11. Western Blot para insulina, IgG de conejo y humana.....	39
3.12. Detección de isotipos IgG .....	40

3.13.	Análisis de datos .....	40
3.14.	Consideraciones éticas.....	41
4.	Resultados y discusión.....	42
4.1.	Producción y caracterización de suero anti-insulina exógena en conejo. ....	42
4.1.1.	Determinación del título de los sueros anti-insulina exógena. ....	44
4.1.2.	Reactividad cruzada del suero anti-insulina exógena.....	44
4.1.3.	Niveles de Glucosa, insulina y proteínas totales de conejos Nueva Zelanda. ....	46
4.2	Estandarización de la técnica de ELISA Indirecta.....	47
4.2.1.	Concentración óptima de insulina para adsorción a placa.....	48
4.2.2.	Porcentaje de leche descremada a emplear como solución de bloqueo.....	49
4.2.3.	Dilución del anticuerpo anti-IgG humana conjugado con peroxidasa. ....	49
4.2.4.	Evaluación de la Elisa indirecta para la detección de AAI.....	50
4.3.	Estandarización de la técnica de Elisa de captura. ....	51
4.3.1.	Depuración y titulación del anticuerpo de captura. ....	51
4.3.2.	Cuantificación de proteínas después del proceso de depuración.....	54
4.3.3.	Porcentaje de leche descremada a emplear como solución de bloqueo.....	55
4.3.4.	Dilución de la muestra y del anticuerpo anti-IgG humana. ....	56
4.3.5.	Formación <i>in vitro</i> de complejos inmunes AAI-IE.....	56
4.3.6.	Evaluación del ELISA de captura para la detección de CI. ....	58
4.4.	Detección y caracterización de AAI en voluntarios diabéticos.....	60
4.4.1.	Caracterización de los grupos experimentales. ....	60
4.4.2.	Inmunodetección y caracterización de la reactividad de AAI.....	61
4.5.	Detección del perfil de isotipos IgG de los AAI. ....	64
4.5.1.	Estandarización del ELISA para la evaluación del Isotipo IgG de los AAI.....	64
4.5.2.	Evaluación del perfil de isotipos IgG de AAI en voluntarios diabéticos.....	65
4.6.	Detección de Complejos (AAI-IE) en voluntarios diabéticos. ....	67
4.7.	Análisis de valores de Glicemia e insulinemia antes y después de la administración de insulina exógena. ....	68
5.	Conclusiones y perspectivas. ....	70
Anexo A: Presentación modalidad poster en la “2 Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas”.....		76
Anexo B: Premio a mejor trabajo en el área de biotecnología “2 Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas”.....		77
Anexo C: Presentación modalidad poster en el XIV Congreso Colombiano de Farmacología y Terapéutica. ....		78
Anexo D: Presentación modalidad poster en el XII Congreso Internacional de Bacteriología.....		79

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Estructura Primaria de la insulina.....	20
<b>Figura 2.</b> Estructura aminoacídica de tres análogos de insulina de acción rápida.....	25
<b>Figura. 3.</b> Estructura aminoacídica de dos análogos de insulina humana de acción prolongada.....	25
<b>Figura 4.</b> Inmunización y sangría de conejos Nueva Zelanda.....	33
<b>Figura 5.</b> Esquema del proceso de depuración del suero anti-IE derivado de conejo inmunizados.....	35
<b>Figura 6.</b> Producción de anticuerpos policlonales anti-insulina exógena en conejos Nueva Zelanda.....	42
<b>Figura 7.</b> Producción de anticuerpos policlonales anti-IHNT.....	42
<b>Figura 8.</b> Titulación de suero de conejo anti-insulina exógena.....	43
<b>Figura 9.</b> Evaluación del reconocimiento cruzado de los sueros Anti-IE de conejos....	45
<b>Figura 10.</b> Evaluación de los parámetros bioquímicos de conejos Nueva Zelanda inmunizados con Insulina exógena.....	46
<b>Figura 11.</b> Determinación de la concentración óptima de insulina a adsorber a placa en el ELISA indirecta.....	47
<b>Figura 12.</b> Determinación del porcentaje de leche descremada a usar en la solución de bloqueo del ELISA indirecto.....	48
<b>Figura 13.</b> Determinación de la dilución del anticuerpo anti-IgG humano a emplear en el ELISA indirecto.....	49
<b>Figura 14.</b> Evaluación del sistema de Elisa indirecto para la detección de AAI.....	50
<b>Figura 15.</b> Anticuerpos anti-IE después de la depuración con Ácido Caprílico y Sulfato de Amonio.....	51
<b>Figura 16.</b> Inmunoglobulina G (IgG) de conejo y humano después de la depuración con Ácido Caprílico y Sulfato de Amonio.....	52
<b>Figura 17.</b> Titulación de los sueros anti-insulina exógena de conejo después del proceso de depuración.....	53
<b>Figura 18.</b> Curva de calibración con Albumina Sérica Bovina.....	53

<b>Figura 19.</b> Determinación del porcentaje de leche a usar en la solución de bloqueo del ELISA de captura.....	54
<b>Figura 20</b> Determinación de la dilución de la muestra a evaluar y del anticuerpo anti-IgG humano a emplear en el ELISA de captura.....	55
<b>Figura 21.</b> Formación <i>in vitro</i> de complejos inmunes AAI-IE.....	57
<b>Figura 22.</b> Evaluación del ELISA de captura para la detección de complejos inmunes AAI-Insulina.....	58
<b>Figura 23.</b> Análisis de datos clínicos y bioquímicos de voluntarios diabéticos tratados con insulina.....	60
<b>Figura 24.</b> Inmunodetección de AAI y caracterización de su reactividad frente a tres formulaciones de IE humana.....	62
<b>Figura 25.</b> Evaluación de los anticuerpos anti-subclases IgG humana.....	63
<b>Figura 26.</b> Perfil de las subclases IgG de AAI de acuerdo al tratamiento insulínico actual y para tres las formulaciones de insulina monitoreadas.....	65
<b>Figura 27.</b> Glicemia e insulinemia antes y después de la administración de insulina exógena. ....	67
<b>Figura 28.</b> Inmunodetección de CI antes y después de la administración de insulina exógena.....	68

## Lista de tablas

<b>Tabla 1.</b> Comparación de la secuencia de aminoácidos entre la insulina humana, bovina y porcina.....	22
<b>Tabla 2.</b> Concentración de proteína (IgG) en los sueros anti-IE después del proceso de depuración con Ácido Caprílico y Sulfato de Amonio.....	54
<b>Tabla 3.</b> Controles evaluados en el sistema de detección de CI AAI-IE.....	58
<b>Tabla 4.</b> Características generales y parámetros metabólicos de voluntarios diabéticos según su tratamiento insulínico actual.....	59

## Lista de símbolos y abreviaturas

<b>AAI</b>	Anticuerpos Anti-Insulina
<b>AAI-IE</b>	Complejos inmunes formados por AAI e IE
<b>AC</b>	Ácido Caprílico
<b>ACF</b>	Adyuvante Completo de Freund
<b>AIF</b>	Adyuvante Incompleto de Freund
<b>ARN</b>	Ácido Ribonucleico
<b>ARNm</b>	Ácido Ribonucleico mensajero
<b>BCA</b>	Ácido Bicinconínico
<b>BSA</b>	Albumina Sérica Bovina
<b>CI</b>	Complejos inmunes
<b>CPA</b>	Células Presentadoras de Antígeno
<b>cpm</b>	Cuentas Por Minuto
<b>DE</b>	Desviaciones Estándar
<b>DMG</b>	Diabetes Mellitus Gestacional
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DO</b>	Densidades Ópticas
<b>DOvd</b>	DO voluntarios Diabéticos
<b>DOvnd</b>	DO Voluntarios no Diabéticos
<b>ELISA</b>	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
<b>FD</b>	Factor de Dilución
<b>HbAc1</b>	Hemoglobina glicosilada
<b>IE</b>	Insulina Exógena
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina
<b>IHNT</b>	Insulina Humana Recombinante No Terapéutica
<b>IMC</b>	Índice de Masa Corporal
<b>IR</b>	Índice de Reconocimiento
<b>kDa</b>	Kilodaltons
<b>MHC</b>	Complejo Mayor de Histocompatibilidad (siglas en inglés)
<b>NPH</b>	Insulina Neutra-Protamina-Hagedorn

<b>POS</b>	Plan Obligatorio de Salud
<b>PTGO</b>	Prueba de Tolerancia Oral a la Glucosa
<b>RE</b>	Retículo Endoplásmico
<b>SA</b>	Sulfato de Amonio
<b>SIDA</b>	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
<b>SRP</b>	Partícula de Reconocimiento Citosólico (siglas en inglés)
<b>TNF</b>	Factor de Necrosis Tumoral
<b>VIH</b>	Virus de la Inmunodeficiencia Humana

## Introducción

La diabetes es una enfermedad crónica de alto impacto epidemiológico, caracterizada por la alteración del metabolismo de los carbohidratos e hiperglicemia [10]. La Federación Internacional de la Diabetes (por sus siglas en inglés, IDF) reportó que en el mundo para el 2012 más de 371 millones de personas padecían diabetes y 4,8 millones murieron a causa de esta enfermedad [11]. Para ese mismo año, en Colombia más de 2 millones de personas la padecían y 14 mil murieron por esta misma causa [11]. El 5% de las muertes en el mundo están asociadas con diabetes y más del 80% de dichas muertes ocurren en países en vía de desarrollo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) calcula que las muertes por diabetes se duplicarán entre 2005 y 2030 [10].

La Asociación Americana de Diabetes (ADA), clasifica la Diabetes Mellitus (DM), en cuatro tipos: *i*) Diabetes Mellitus tipo 1, caracterizada por la destrucción, generalmente inmune, de las células  $\beta$  pancreáticas, deficiencia absoluta de insulina y necesidad de tratamiento con la proteína exógena, *ii*) Diabetes Mellitus tipo 2, caracterizada por insulino-resistencia y aumento en la producción de glucosa hepática, *iii*) Diabetes Gestacional (DMG), se presenta durante el embarazo y suele desaparecer al término de este, y por último *iv*) Otros tipos de diabetes, en donde se encuentran las diabetes derivadas de pancreatitis, endocrinopatías e inducidas por medicamentos [12]. En general el tratamiento para cada tipo de diabetes se basa principalmente en dieta saludable, ejercicio y el uso de hipoglicemiantes orales como primera opción terapéutica y seguida a la falla terapéutica de estos, el uso de Insulina Exógena (IE) [13].

La administración de insulina exógena en pacientes con DM, se ha visto asociada con la prevalencia de Anticuerpos Anti-Insulina (AAI) detectables en suero [1, 2]. Los AAI aparecen generalmente en el paciente diabético, como consecuencia del tratamiento con IE y al parecer pueden afectar la correcta respuesta hipoglicemiante [5, 6]. En algún momento se pensó que la aparición de eventos de inmunogenicidad como la generación de anticuerpos neutralizantes frente a IE, podía deberse al uso de insulinas provenientes de otras especies, que por esta condición generaba la posibilidad de ser reconocido como antígeno. Por lo tanto se esperaba que la producción de formulaciones con insulina similar en secuencia a la humana, redujera esta probabilidad, ya que dicha identidad proteínica, se relaciona con tolerancia inmunológica. Sin embargo no ha sido así y estudios han reportado la presencia de AAI en diabéticos que usan insulinas recombinantes humanas y análogos de la insulina [7-9, 14]. Por consiguiente la presencia de AAI en diabéticos tratados con insulinas humanas recombinantes se ha asociado a las características estructurales intrínsecas de la molécula (producto biológico o biotecnológico), la presencia de neo-epítopes (producto de la interacción entre proteína y auxiliares de formulación, o proteína y medio ambiente en circulación) y factores inmunogenéticos de los individuos en tratamiento, factores que favorecen respuestas particulares e indeseables y que afectan parámetros de seguridad/eficacia de la formulación [15, 16]. A la luz de lo anterior, no todas las formulaciones comerciales disponibles tendrían el mismo efecto (parte de la controversia a nivel de la intercambiabilidad de productos biotecnológicos), y por ende se debería considerar, que antes de reemplazar o sustituir una formulación por otra en este tipo de pacientes (no respondedores a insulina y/o

episodios de hipoglicemia), sería deseable hacer un tamizaje para detectar la presencia de anticuerpos neutralizantes y seleccionar la formulación menos reconocida por los AAI, reduciendo de este modo la probabilidad de efectos adversos asociados a estos (hiperglicemia o hipoglicemia).

El fundamento de esta propuesta se sustenta en la inmunogenicidad consecuente; que por su naturaleza proteínica tienen los productos derivados de DNA recombinante. Uno de los principales efectos asociados a la administración de productos biológicos-biotecnológicos como la IE, es la prevalencia de anticuerpos neutralizantes, lo que puede repercutir en la seguridad-eficacia del producto. Teniendo en cuenta lo anterior, la importancia de la detección de AAI en pacientes con terapia insulínica, podría significar el mejoramiento del control y tratamiento de los pacientes diabéticos con terapia insulínica, ya que determinando la presencia de anticuerpos dirigidos a insulinas comerciales, se podría encaminar mejor el tratamiento del paciente y favorecer la biodisponibilidad de la insulina. De esta manera, la estandarización de una técnica de inmunodetección (ELISA) constituiría una herramienta capaz de evidenciar la presencia de AAI y aportar conocimiento acerca del perfil inmunogénico de cada formulación evaluada.

## 1. Objetivos

### 1.1. Objetivo general

Desarrollar una técnica de inmunodetección para la evaluación de anticuerpos anti-insulina libres en suero y unidos a la molécula de insulina, en pacientes diabéticos tratados con tres tipos de insulina exógena, como una potencial herramienta predictiva relacionada con la respuesta terapéutica.

### 1.2. Objetivo Específicos

- I. Determinar las condiciones experimentales idóneas en la inmunodetección de anticuerpos anti-insulina para cada una de las insulinas exógenas utilizadas.
- II. Seleccionar con base en la historia clínica y paraclínica, los grupos experimentales y control de voluntarios a incluir en el estudio.
- III. Establecer el perfil de isotipo IgG específico para las diferentes insulinas exógenas monitoreadas.
- IV. Correlacionar los títulos y/o isotipo IgG detectados, con la respuesta terapéutica secundaria a la administración de insulina exógena (niveles de insulina y glucosa antes y después de la administración de insulina exógena).

## 2. Estado del arte

### 2.1. Diabetes

La Diabetes Mellitus (DM) es una enfermedad crónica en la que el organismo no produce suficiente cantidad de insulina o responde anormalmente a la insulina. Según la Asociación Americana de Diabetes (por sus siglas en inglés, ADA), se clasifica en cuatro tipos clínicos, DM tipo 1, DM tipo 2, otros tipos específicos de DM y Diabetes Mellitus Gestacional (DMG). El resultado final para los cuatro tipos de diabetes es el alto nivel de glucosa en sangre o hiperglicemia. La fisiopatología de la DM es muy compleja, ya que la enfermedad se caracteriza por diferentes etiologías, pero todos los tipos de diabetes comparten síntomas y complicaciones [10, 17].

#### 2.1.1. Fisiopatología de la Enfermedad

En una persona diabética, el metabolismo normal de la glucosa se encuentra alterado, como las células y tejidos del organismo no hacen uso de la glucosa circulante, aparece la hiperglicemia [10]. Durante un período de tiempo, el alto nivel de glucosa en la sangre puede favorecer la aparición de complicaciones graves, como trastornos oculares, enfermedades cardiovasculares, daño renal y problemas neurológicos [10].

En la DM tipo 1, el páncreas no puede sintetizar la cantidad suficiente de la insulina que necesita el organismo. La fisiopatología de esta diabetes, indica que es una enfermedad autoinmune, en la que el sistema inmune genera una respuesta que ataca las células  $\beta$  del páncreas. En consecuencia, el páncreas produce poca o ninguna cantidad de insulina. La DM tipo 1 se diagnostica más frecuentemente en niños y adultos jóvenes (alrededor de 20 años). Para este tipo de diabetes se maneja la dieta y el ejercicio, pero es indispensable el uso de Insulina Exógena (IE) como base en el tratamiento [12, 13, 17].

En la mayoría de los casos de la DM tipo 2, hay una producción disminuida de insulina y aumentada de glucosa hepática. Este tipo de diabetes se asocia a insulino-resistencia por parte de las células del organismo lo conduce a un aumento de la glucosa en sangre. Esta clase de DM comúnmente se diagnostica en adultos de mediana edad (más de 40 años). En este caso el tratamiento de elección involucra, manejo con dieta, ejercicio e hipoglicemiantes orales y en algunos casos el uso de IE [13, 17, 18].

Dentro de la clasificación de otros tipos específicos de diabetes, se encuentran el grupo de pacientes diabéticos con defectos genéticos relacionados con la función de las células  $\beta$  del páncreas y la acción de la insulina. Como ejemplo de esta clasificación se encuentran las enfermedades pancreáticas como la fibrosis quística y la diabetes inducida por productos químicos como en el caso del tratamiento del VIH / SIDA o después de un trasplante de órgano [12, 13, 17].

La DMG, se produce entre las mujeres embarazadas. Es causada por fluctuaciones del nivel hormonal durante el embarazo. Casi el 50% de la DMG serán DM tipo 2 [13, 17].

Los síntomas y signos de las diferentes formas de diabetes son similares. Dentro de los síntomas comunes se incluyen el aumento de sed (polidipsia), el aumento de orina (poliuria), el aumento del apetito (polifagia), la fatiga excesiva y la pérdida de peso inexplicable [10].

### **2.1.2. Criterios de diagnóstico y control de Diabetes Mellitus**

Durante años la manera más fácil y acertada de diagnosticar DM ha sido la medición de los niveles de glicemia. Un paciente se considera diabético según la ADA, cuando cumple cualquiera de los siguientes criterios: a) Padece síntomas de diabetes (poliuria, polidipsia, polifagia y baja de peso) y una glicemia igual o mayor a 200 mg/dL, realizada a cualquier hora del día; b) su glicemia basal en un ayuno de 8 horas es igual o mayor a 126 mg/dl; c) Su glicemia en la Prueba de Tolerancia Oral a la Glucosa (PTGO) es igual o mayor a 200 mg/dl, prueba estandarizada de la siguiente manera: tomando una muestra de glicemia basal y una muestra a las 2 horas después de administrarle al paciente un carga de 75 g de glucosa si pesa 45 o más Kg de peso [12, 17].

Además la ADA define dos estados prediabéticos; a) Intolerancia a la Glucosa, con una glicemia igual o mayor de 140 y <200 mg/dL a las 2 horas en la PTOG y 2) Alteración de la Glicemia en ayunas siendo mayor o igual a 110 mg/dl y <126 mg/dl [12, 17].

Para la DMG, la ADA y la Asociación Americana de Obstetricia y Ginecología, establecieron que la glicemia 1 hora post carga de 50 g glucosa menor de 140 mg/dl es normal; pero si es igual o mayor a 140 mg/dl se debe hacer PTGO con 100 gramos de glucosa y muestras a las 0,1,2 y 3 h. Si dos valores son iguales o superiores a los siguientes: 105-190-165-145 mg/dL, se diagnostica DMG. La OMS tiene como criterio para el diagnóstico de DMG una glicemia basal mayor de 126 mg/dL y la glicemia pos-carga de 75gramos a la de las 2h mayor de 200mg/dL [12, 17].

### **2.1.3. Complicaciones de la diabetes**

Los niveles elevados de glucosa sanguínea, con el tiempo pueden afectar varios órganos, como ojos, riñones y nervios. Además de aumentar el riesgo de cardiopatía y accidente vascular cerebral, estudios han demostrado que el 50% de los pacientes diabéticos mueren de enfermedad cardiovascular. Otra consecuencia de altos niveles de glicemia, es la retinopatía diabética, una causa importante de ceguera, y la consecuencia del daño de los pequeños vasos sanguíneos de la retina que se va acumulando a lo largo del tiempo. Al cabo de 15 años con diabetes, aproximadamente un 2% de los pacientes quedan ciegos y un 10% sufren un deterioro grave de la visión en población americana [19]. Una consecuencia de diabetes muy común, es la neuropatía diabética, la cual se debe a lesión de los nervios que puede llegar a afectar a un 50% de los pacientes. También puede ocasionar problemas muy diversos, como hormigueo, dolor, entumecimiento o debilidad en los pies y las manos [19].

#### **2.1.4. Situación Actual de la Enfermedad**

La Federación Internacional de la Diabetes (por sus siglas en inglés, IDF) reportó que en el 2012 en el mundo más 371 millones de personas padecieron diabetes y 4.8 millones murieron a causa de esta enfermedad [11]. Para este mismo año, en Colombia más de 2.0 millones de personas padecían diabetes y más de 14 mil murieron por esta misma causa [11]. Además el 5% de las muertes en el mundo son debidas a la diabetes y más del 80% de dichas muertes, ocurren en países de ingresos bajos y medios. La Organización Mundial de la Salud (OMS) calcula que las muertes por diabetes se duplicarán entre 2005 y 2030 [10].

#### **2.1.5. Tratamiento de la Enfermedad**

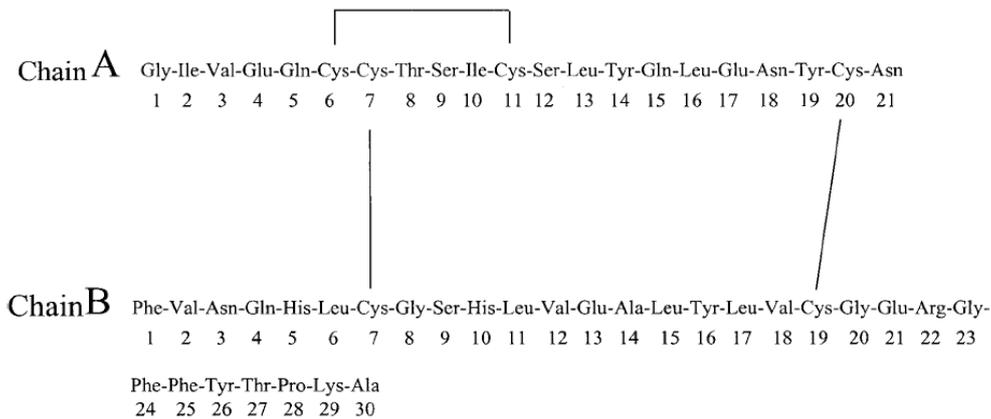
El objetivo principal del tratamiento a pacientes diabéticos está dirigido a salvarles la vida. Los objetivos secundarios a largo plazo son la prevención de complicaciones y la mejora de la calidad de vida del paciente. La administración de IE es la base de la terapia para los pacientes con DM tipo 1, mientras que para los pacientes con DM tipo 2, se usan hipoglicemiantes orales y/o insulina, siempre acompañados de cambios terapéuticos en el estilo de vida. La administración de IE es importante en el tratamiento de pacientes DM tipo 2 cuando los niveles de glicemia no se pueden controlar con hipoglicemiantes orales. Dentro de los hipoglicemiantes orales están las sulfonilureas, biguanidas,  $\alpha$ -glucosidasas, incretinas y tiazolidinedionas. La función principal de estos fármacos es corregir el trastorno metabólico, como la resistencia a la insulina y secreción inadecuada de insulina. Deben ser prescritos en combinación con una dieta y los cambios de estilo de vida [13].

### **2.2. Insulina**

La insulina es una hormona de 51 aminoácidos, secretada por las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans y conformada por dos cadenas (A y B) conectadas por enlaces disulfuro. Uno de sus principales funciones es la estimulación de la captación de glucosa de la circulación sistémica, así como la supresión de la gluconeogénesis hepática, con lo que cumple una función primordial en la homeostasis de la glucosa y la prevención de los trastornos metabólicos [20].

#### **2.2.1. Estructura de la insulina**

La insulina es una hormona de naturaleza proteínica con una masa molecular de 6000 daltons. Está formada por 2 cadenas polipeptídicas, la cadena A formada por 21 aminoácidos y la cadena B constituida por 30, estas cadenas están conectadas por 2 enlaces disulfuro intermoleculares entre el aminoácido 7 de cada una de las cadenas y el 20 de la cadena A con el 19 de la cadena B y un enlace intramolecular en la cadena A, entre los aminoácidos 6 y 11[20]. En la Figura 1 se muestra de manera esquemática la estructura de la insulina[21].



**Figura 1.** Estructura Primaria de la insulina[21].

### 2.2.2. La síntesis de la insulina.

La insulina es sintetizada por las células  $\beta$  del islote pancreático, como una preprohormona, procesada después de su traducción, para dar una molécula biológicamente activa. El precursor de la insulina es una cadena polipeptídica de más o menos 9000 daltons, llamada proinsulina [20].

El producto inmediato de la traducción del ARN mensajero (ARNm) de la proinsulina, es un péptido de 11,500 Daltons. Este precursor ha sido llamado preproinsulina; el cual consta de un péptido señal de 24 aminoácidos, seguido por la cadena B, un péptido conector (péptido C) que contiene cerca de 30 aminoácidos y finalmente la cadena A. La preproinsulina recién sintetizada y empacada dentro de gránulos secretores, es procesada durante su trayecto a través del Retículo Endoplásmico (RE) y el aparato de Golgi. El péptido señal actúa como una contraseña que dirige el transporte de la proteína naciente desde los ribosomas hasta el RE. Este proceso involucra la interacción con una Partícula de Reconocimiento Citosólico (por sus siglas en inglés; SRP), la cual causa una asociación del complejo proteína-ribosoma, con el receptor a SRP presente en el RE, durante esta transferencia, una peptidasa remueve el péptido señal, convirtiendo la preproinsulina en proinsulina. La proinsulina se mueve a través de la formación de vesículas, desde el RE hasta el Aparato de Golgi. La conversión de insulina y péptido C, tiene lugar en el complejo de Golgi por efecto de dos endopeptidasas y es co-secretado con la insulina [20].

### 2.2.3. Regulación de la síntesis de insulina.

La regulación de la secreción de insulina implica eventos no solamente a nivel génico, sino que intervienen también eventos de conductancia iónica, segundos mensajeros y de tipo metabólico. Los aspectos genéticos tienen que ver con la regulación de la expresión del gen, así como con el procesamiento del ARNm y su posterior traducción a proteína. Los eventos relacionados con la conductancia iónica tienen que ver de manera muy importante con la presencia de diferentes tipos de canales iónicos en la célula  $\beta$  y su función en la movilización de ciertos iones importantes en la secreción de insulina. Los segundos mensajeros y los productos del metabolismo de la glucosa participan de manera conjunta pues el metabolismo de estas moléculas lleva a la

producción de segundos mensajeros que participan en la cascada de eventos que llevan a la secreción de la insulina [20].

La biosíntesis y secreción de la insulina por las células  $\beta$  pancreáticas es regulada por una gran variedad de factores incluyendo a la glucosa, algunos aminoácidos, neurotransmisores y hormonas. Entre los diversos elementos capaces de estimular la secreción de insulina, la glucosa es fisiológicamente la más importante. Se sabe que el estímulo que promueve la liberación de insulina es el metabolismo de la glucosa u otros nutrientes secretados, lo que provoca la secuencia de eventos que acoplan al cierre de canales de  $K^+$  regulados por ATP con la liberación de insulina; proceso en el que los cambios en la concentración citoplásmica de  $Ca^{2+}$  en las células  $\beta$ , es esencial [20].

#### **2.2.4. La terapia con insulina**

Anteriormente se creía que la terapia con insulina era exclusiva en el tratamiento de DM tipo 1, pero actualmente se conoce que pacientes con DM tipo 2, cuando no se logran controlar con hipoglicemiantes orales, dieta y ejercicio, por deterioro de las células  $\beta$  y progresión de su enfermedad requieren terapia con insulina exógena [22].

Lo ideal en la terapia insulínica es que la IE imite el patrón natural de secreción de la insulina por un páncreas sano; sin embargo, este complejo patrón de secreción ejecutado por el páncreas es difícil de duplicar. Por lo tanto la terapia insulínica se debe combinar con una buena dieta y ejercicio[22].

#### **2.2.5. Tipos de insulina**

La insulina ha sido utilizada en el tratamiento de la diabetes desde hace más de noventa años (1922). Inicialmente, se utilizó insulina porcina y bovina por su homología con la insulina humana, pero actualmente se utilizan insulinas humanas biosintéticas obtenidas por tecnología ADN recombinante a partir de cultivos de bacterias y levaduras, cuya estructura molecular es homóloga a la insulina humana [23].

- **Insulinas de origen animal**

Las insulinas utilizadas hasta hace dos décadas eran purificadas de acinos pancreáticos de origen porcino y bovino[22] y generaban una respuesta inmune marcada al ser administradas[24]. Dicha respuesta se fundamentó en las diferencias entre sus estructuras primarias (Tabla 1) y en el ineficiente proceso de purificación, permitiendo que la insulina viniera acompañada de otras proteínas o moléculas que intensificaban su inmunogenicidad[24].

Insulina Bovina: esta molécula difiere de la insulina humana en tres aminoácidos que se ubican en las siguientes posiciones: Alanina por Treonina en la posición 8 de la cadena A, Valina por Isoleucina en la posición 10 de la cadena A, y Alanina por Treonina en el carboxilo terminal de la cadena B [23, 24].

Insulina Porcina: esta insulina difiere de la humana en un solo aminoácido ubicado en la posición 13 de la cadena B donde varía una Alanina por Treonina en el carboxi-terminal. [23, 24].

TABLE 2. Comparison of amino acid sequences in human and animal insulin

	A chain	B chain	No. of differences
Human	GIVEQCCTSI <del>C</del> SLYQLENYCN	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFF <del>F</del> YTPKT	3
Cow	GIVEQCCASVCSLYQLENYCN	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFF <del>F</del> YTPKA	
Pig	GIVEQCCTSI <del>C</del> SLYQLENYCN	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFF <del>F</del> YTPKA	1
Rabbit	GIVEQCCTSI <del>C</del> SLYQLENYCN	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFF <del>F</del> YTPKS	1

**Tabla 1.** Comparación de la secuencia de aminoácidos entre la insulina humana, bovina y porcina [24].

### Insulinas humanas

Actualmente se dispone en el mercado de una gran variedad de insulinas humanas, todas ellas tienen en común haber sido obtenidas por tecnología del ADN recombinante y presentar una concentración de 100 unidades/mL. Pero se diferencian en sus perfiles farmacocinéticos, sistemas de administración y precios. Las características farmacocinéticas de las insulinas son las que condicionan su uso en la práctica clínica, se definen mediante el inicio, la duración de acción y el pico máximo [22].

### Clasificación de las insulinas humanas según características farmacocinéticas

Según las características farmacocinéticas se pueden diferenciar 3 tipos de insulinas: de acción rápida, acción intermedia y acción prolongada. Los parámetros que definen la cinética de las insulinas son el inicio, el pico y la duración de acción. Es muy importante tenerlos en cuenta, a la hora de planificar un régimen de insulina. Los tiempos se consideran a partir del momento de inyección. El inicio de acción se refiere al comienzo del efecto de la insulina, el efecto o pico máximo, es el tiempo que tarda en alcanzar la máxima concentración o máximo efecto y la duración de acción es el periodo de tiempo en el que se mantiene el efecto de la insulina [21, 22].

#### ✓ Insulinas de acción rápida

Estas insulinas llegan a la sangre de 15 a 30 minutos después de la inyección. La insulina humana tiene un inicio de acción más lento que estas (Regular, Aspart y Lispro); por ello, la insulina Regular se debe administrar media hora antes de las comidas, a diferencia de Aspart y Lispro que se pueden administrar junto con la comida [23, 25]. Sus picos van de 30 a 90 minutos después de la inyección y su acción puede durar de 240 a 360 minutos. La insulina humana recombinante que hace parte de este grupo es la insulina Regular o Cristalina [23, 25].

**Insulina Regular o Cristalina.** Es una insulina de acción rápida (15-30 minutos) cuya secuencia de aminoácidos es idéntica a la insulina humana endógena y se administra acompañada de una insulina de acción prolongada [22].

✓ **Insulinas de acción intermedia**

Estas insulinas llegan a la sangre de 2 a 4 horas después de la inyección, su pico aparece de 4 a 14 horas más tarde y permanece en la sangre de 14 a 20 horas. Son modificadas con la finalidad de prolongar su absorción y por lo tanto, su tiempo de acción. Son de aspecto lechoso y se administran únicamente por vía subcutánea, nunca por vía intravenosa. La preparación más usada es la insulina isófano o NPH (Neutra-Protamina-Hagedorn) [21, 22].

**Insulina NPH.** Esta insulina viene formulada en un solución que contiene protamina, (proteína básica extraída de la esperma de los peces) y zinc en proporciones equiparables. Su uso como insulina basal tiene varias limitaciones; una de ellas es su perfil de acción, ya que mezcla elementos de insulina basal y prandial, obligando al paciente a cubrir el período de máxima acción con comidas a horarios fijos y creando problemas en el control glicémico nocturno; la otra limitación es debida a que es una inyección vespertina que tiene su máximo efecto en las primeras horas de la madrugada, siendo causa frecuente de hipoglucemia nocturna[21].

• **Análogos de insulina**

Son insulinas de alta homología con la humana. Sin embargo, son modificadas en su estructura aminoacídica para variar la farmacocinética. Pertenecen a este grupo las insulinas ultrarrápidas (Lispro, Aspart y Glulisina) y las insulinas de acción prolongada (Glargina y Detemir)[26].

✓ **Análogos de acción ultrarrápida**

Las principales ventajas que aportan los análogos ultrarrápidos de insulina respecto a otras es que su efecto hipoglucemiante es más precoz y por tanto coincide con el mayor pico glucémico provocado por la ingesta, de modo que controla más eficazmente la glucemia postprandial; además su duración de acción es menor, por lo que se reduce la incidencia de hipoglucemias postprandiales [23, 25].

**Insulina Lispro:** es un análogo de la insulina humana obtenida por ingeniería genética en la que los aminoácidos originales de la insulina en posiciones B28 y B29 de la cadena B han sido sustituidos por Lisina y Prolina, respectivamente. Este cambio permite una menor tendencia a la libre asociación de la molécula de insulina, y como resultado, una absorción más rápida, un aumento en los niveles séricos máximos y una menor duración en comparación con la insulina regular. Es importante destacar que la secuencia de aminoácidos reemplazados o cualquier aminoácido sustituido en la región B26 -30 de la molécula de insulina no afecta el dominio de unión a los receptores de insulina[27]. Por lo tanto, la afinidad a los receptores de insulina Lispro es similar al de la insulina regular[25]. La insulina Lispro es sintetizada por una cepa de

*Escherichia coli* no patógena, en la que se ha insertado el gen de la insulina Lispro. El efecto hipoglucemiante de la insulina Lispro se presenta con mayor rapidez y tiene una menor duración que el de la insulina regular, cuando ambas se inyectan por vía subcutánea. Esta diferencia se debe a la baja capacidad de agregación de la insulina Lispro en el tejido subcutáneo, lo que hace que retenga su configuración monomérica y se triplique la velocidad de absorción. Por este motivo, la insulina Lispro administrada inmediatamente antes de una comida es capaz de mantener la glucosa sanguínea por debajo de 180 mg/dL en las siguientes dos horas. Además, el uso de insulina lispro se ha asociado con una frecuencia menor de hipoglucemia postprandial comparada con la insulina regular [25].

**Insulina Aspart.** Es un homólogo de la insulina humana de acción rápida, se obtiene por ingeniería genética, utilizando una cepa de *Sacharomyces cerevisiae* en el que se ha insertado el gen de la insulina Aspart. Esta insulina sólo se diferencia de la humana en que el aminoácido Prolina en la posición 28 de la cadena B, ha sido sustituido por un Ácido Aspártico (Figura 2). Esta sustitución reduce la tendencia de la molécula de insulina humana para formar hexámeros, por lo que se puede absorber más rápidamente a partir del lugar de la inyección [21, 23, 26].

**Insulina Glulisina.** Es un análogo de la insulina humana al cual en la posición 3 de la cadena B se le ha sustituido la Asparagina por la Lisina y en la posición 29 la Lisina por el Ácido Glutámico (Figura 2). Esto disminuye su capacidad para formar agregados moleculares tras la administración subcutánea, por tanto, tiene un inicio más rápido de la acción hipoglucemiante que el de la insulina humana administrada exógenamente. A diferencia de la insulina regular humana y de otros análogos de acción rápida y gracias a su estructura molecular, la insulina Glulisina presenta una mayor capacidad de formación de dímeros estables en solución. Por este motivo la insulina Glulisina no requiere Zinc y presenta una rápida absorción ya que no es necesario el paso de disociación de hexámeros a monómeros [21, 23, 26].

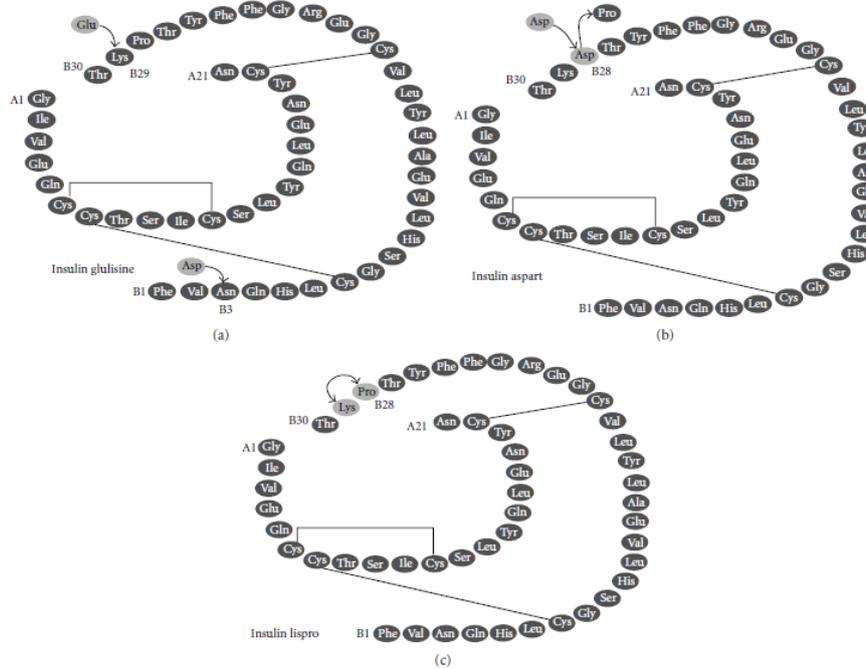
#### ✓ Análogos de acción prolongada

Pertencen a este grupo las insulinas Glargina y Detemir. Este tipo de insulinas tarda de 2 a 14 horas para llegar a sangre. No tiene pico o tienen un pico muy pequeño de 10 a 16 horas después de la inyección. Se queda en la sangre entre 20 y 24 horas [21, 23].

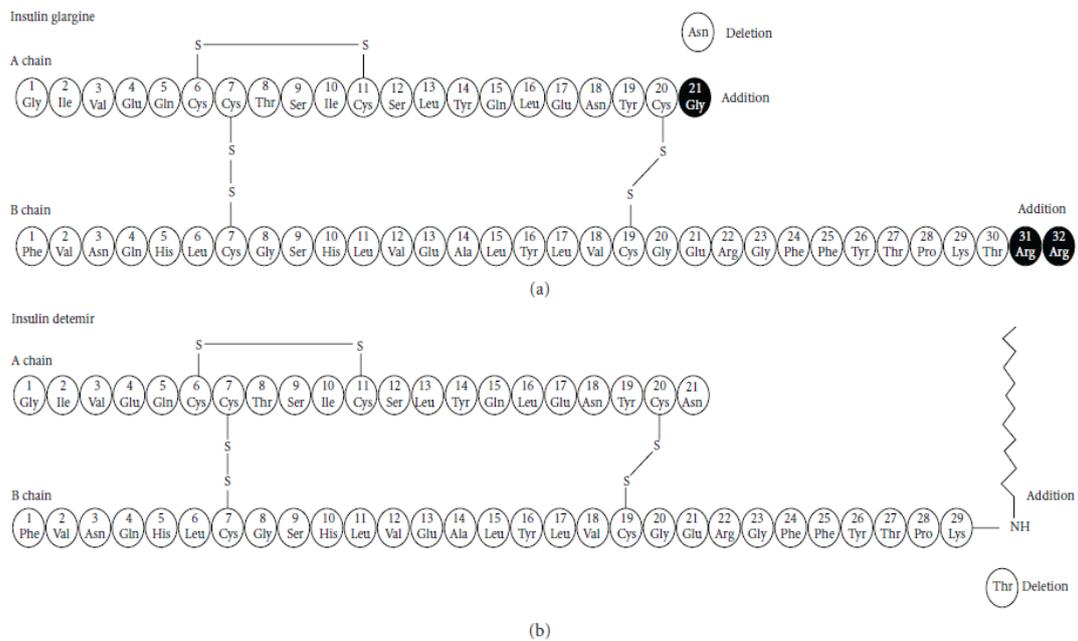
**La Insulina Glargina.** Es un análogo sintético de insulina que se obtiene cambiando el Ácido Aspártico de la posición 25 por Glicina y añadiendo dos Argininas en el extremo C-terminal de la cadena B (Figura 3). La insulina Glargina es soluble a pH 4, pero precipita a pH neutro del tejido subcutáneo, formando microcristales a partir de los cuales se libera la insulina lentamente y sin picos. Una ventaja adicional es que presenta una menor variabilidad en su absorción, con respecto a insulina NPH [21, 23].

**La Insulina Detemir.** Es un análogo soluble de insulina que se obtiene uniendo a la molécula de insulina ácido mirístico (Figura 3). Cuando se administra insulina Detemir, el complejo ácido mirístico-insulina, se une de forma reversible a la albúmina sérica y del tejido subcutáneo, con lo que su absorción se hace más lenta y se prolonga su

duración de acción. La insulina Detemir circula unida a la albúmina en más de un 98% y solo la parte no unida a la albúmina es capaz de unirse a los receptores de insulina. Tiene un inicio de acción de 1-2 horas, un perfil más plano que la NPH y una duración de acción de 16-20 horas [21, 23].



**Figura 2.** Estructura aminoacídica de tres análogos de insulina humana de acción rápida. A) Insulina Glulisina, b) insulina Aspart y c) Insulina Lispro [23].



**Figura 3.** Estructura aminoacídica de dos análogos de insulina humana de acción prolongada. a) Insulina Glargina e, b) Insulina Detemir [23].

## Respuesta inmune a la insulina exógena

Independientemente de la pureza y origen, las insulinas terapéuticas continúan siendo inmunogénicas en los seres humanos, por su naturaleza proteínica. Sin embargo, las respuestas inmunológicas severas son muy poco frecuentes y afectan una pequeña minoría de los pacientes. Dentro de los factores que pueden favorecer la susceptibilidad a las respuestas humorales a la insulina exógena incluyen factores genéticos, la edad, la presencia de insulina exógena en altas concentraciones en sangre, y el sitio de administración de insulina [24].

### 2.2.6. Generalidades de la respuesta inmune a la insulina

La generación de una respuesta inmune primaria por anticuerpos a proteínas extrañas, inicia con el reconocimiento del antígeno por las Células Presentadoras de Antígeno (CPA) tales como las células dendríticas[28]. Las células dendríticas se encuentran distribuidas en todo del organismo, incluyendo todos los sitios de administración de la insulina exógena. El antígeno se procesa en pequeños péptidos dentro de vesículas endosómicas. Estos péptidos se unen a moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) clase II y son transportados a la superficie de las CPA. El complejo MHC-péptido en la superficie de CPA se une a los linfocitos T por medio del receptor de células T que reconoce el péptido. Posteriormente se da la unión de B7 (Molécula co-estimuladora) a CD28 en las células T y se llevan a cabo la activación de células T y la producción de diversas citoquinas; lo que conduce a la proliferación y la diferenciación de las células B para la secreción de anticuerpos al plasma[24].

### 2.2.7. Anticuerpos Anti-Insulina

Estudios previos han logrado determinar dos tipos diferentes de anticuerpos anti-insulina; los autoanticuerpos y los anticuerpos anti-insulina que parecen estar dirigidos contra diferentes epítopes de la molécula de la insulina. Los autoanticuerpos insulínicos reconocer epítopes lineales especialmente sobre la cadena  $\beta$  de la insulina, mientras que los anticuerpos anti-insulina reconocen epítopes conformacionales[29]. Además, los autoanticuerpos son más especie-específicos que los anticuerpos anti-insulina[30].

- **Isotipos de Anticuerpos Anti-Insulina**

Los Anticuerpos Anti-Insulina (AAI) están representados en todas las clases de inmunoglobulinas y entre las subclases las IgG han sido reportadas principalmente la IgG1 seguido por la IgG3 y en menor concentración IgG2 e IgG4 [31-33]. Los AAI clase IgM han sido detectados durante el tratamiento temprano con insulina [34, 35]. Mientras la IgA ha sido asociada con reacciones alérgicas en los pacientes con diabetes. La mayoría de los informes sobre reacciones alérgicas implican IgE sola o en combinación con IgG [36, 37]. Sin embargo, la presencia de IgE no siempre ha estado correlacionada con pacientes que presentan reacciones alérgicas y pacientes con IgE no siempre han mostrado reacciones alérgicas [38]. Por otro lado los anticuerpos IgG

se han asociado con casos graves de resistencia a la insulina [39], además de que anticuerpos contra la insulina tanto subcutánea como inhalada en su mayoría son de esta clase [40].

- **Afinidad de los anticuerpos anti-insulina**

La afinidad de los anticuerpos anti-insulina ha sido evaluada por medio del ensayo de unión por radioligando y graficado los resultado por análisis de Scatchard [41, 42], encontrándose una amplia gama de afinidades, debido a que dichos anticuerpos reconocen diferentes epítopes en la molécula de insulina [30]. La determinación de la afinidad de los anticuerpos anti-insulina y su capacidad de unión por ensayo de radioligando, ha dado como resultado dos clases de anticuerpos, una de anticuerpos de alta afinidad y la otra de baja afinidad. Las constantes de afinidad para cada una de estas poblaciones es de  $1.9 \times 10^{-10}$  M para la población de anticuerpos de alta afinidad y para la población de anticuerpos de baja afinidad de  $1.6 \times 10^{-6}$  M [43].

- **Medición de anticuerpos anti-insulina**

Las dos técnicas más utilizadas para la cuantificación de anticuerpos anti-insulina, son el ensayo de unión por radioligando y la técnica de ELISA indirecta. En el ensayo de unión por radioligando, los complejos inmunes (anticuerpos anti-insulina unidos a la molécula de insulina) se precipitan por la adición de inmunoglobulina anti- IgG humana, más la proteína A / G sefarosa y polietilenglicol. Los sedimentos de complejos inmunes se separan por filtración o centrifugación, se lavan para eliminar la insulina radiomarcada no unida, y se miden en un contador de centelleo. El promedio de la unión inespecífica se cuantifica por Cuentas Por Minuto (cpm) y se resta del total unido para determinar la unión específica. Las cuentas por minuto, producto de la unión específica se convierten en nanogramos de anticuerpos anti-insulina, sobre la base de la actividad específica de la insulina marcada. Los datos se pueden expresar como capacidad de unión en nanogramos de insulina por mililitro de suero [24].

Por otro lado, la prueba de ELISA para la cuantificación de anticuerpos anti-insulina consiste en la adsorción de la insulina a la placa de ELISA con la adición posterior de los sueros a evaluar. Los anticuerpos específicos anti-insulina en el suero problema se unen a la insulina adsorbida a cada pozo de la placa, y el anticuerpo restante se elimina por lavado. Luego una inmunoglobulina anti-IgG humana marcada enzimáticamente (con peroxidasa o fosfatasa alcalina) se agrega y se une al anticuerpo anti-insulina. Posteriormente el sustrato para cada enzima se añade al pozo, y el producto coloreado que se forma se cuantifica por la medición de absorción de luz. La cantidad de producto coloreado aumenta con la cantidad de anticuerpo anti-insulina presente en la muestra problema. Los datos de las pruebas ELISA se expresan como los títulos de anticuerpo, correspondiente a la mínima concentración de anticuerpo capaz de reconocer una concentración establecida de antígeno o los títulos que producen el 50% del máximo de la señal[24].

- **Detección de complejos formados por anticuerpos anti-insulina e insulina.**

Los complejos inmunes se precipitan por la adición de inmunoglobulina anti-humana y la proteína A conjugada con sefarosa, polietilenglicol, o de otros factores precipitantes. Los sedimentos de complejos inmunes se separan por filtración o centrifugación y se lavan para eliminar la insulina no unida. También se puede utilizar la cromatografía de exclusión por tamaño [24].

Usando métodos de ultracentrifugación para analizar la naturaleza de los complejos inmunes (anticuerpos anti-insulina unidos a la molécula de insulina), se determinó que la insulina puede formar monómeros y dímeros unidos a la molécula de insulina. Los dímeros se componen de dos moléculas de IgG unidas a una o dos moléculas de insulina [44]. Dos epítopes diferentes de la insulina son reconocidos (molécula bivalente) y actúan formando un puente entre dos moléculas de IgG; pero sin formar grandes complejos inmunes. Se sabe que los complejos inmunes pequeños no activan el complemento y son eliminados fácilmente de circulación [45].

### **2.3. Técnicas de inmunodetección de anticuerpos anti-insulina**

Dos son las técnicas de inmunodetección comúnmente utilizadas para la detección de anticuerpos anti-insulina. La primera es la técnica de ELISA y la segunda el radioinmunoensayo. Para la determinación de la afinidad se usa el Radioinmunoensayo y para la cuantificación se usa la técnica de ELISA [46].

#### **2.3.1. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)**

La técnica de ELISA, consiste en la detección de un antígeno inmovilizado sobre la fase sólida, mediante anticuerpos marcados que directa o indirectamente producen una reacción cuyo producto, por ejemplo un colorante, puede ser medido por espectrometría [46].

- **Procedimiento para realizar un ELISA**

La primera fase de un ensayo de ELISA, es la unión del antígeno o del anticuerpo a los pozos de la placa. Esta unión se realiza con facilidad a placas de poliestireno químicamente tratadas, para que su contenido de oxígeno sea mayor y de esta manera generar una placa de ELISA capaz de formar un mayor número de interacciones débiles con los grupos hidrofílicos de ciertos aminoácidos de las proteínas. Las placas de poliestireno no tratadas contienen aproximadamente 0,5% átomos de oxígeno, mientras que el contenido de las placas tratadas contienen 2.5% de oxígeno[47].

En el caso del antígeno unido a la placa, puede ser detectado por un anticuerpo anti-antígeno marcado enzimáticamente (ELISA directo) o empleando un anticuerpo primario (ELISA indirecto) que va ser detectado con un Anticuerpo (Ac) secundario anti-inmunoglobulina G (IgG) marcado enzimáticamente y de la especie del Ac primario. Por último el inmunoensayo se revela, con la solución de sustrato

enzimático. Se deja reaccionar, posteriormente se detiene la reacción y se lee por densidad óptica mediante espectrofotometría [46, 48].

- **Clases de ELISA**

En la actualidad existen muchas variedades de la técnica de ELISA permitiendo modificar y mejorar la sensibilidad de la prueba. Dentro de las técnicas de ELISA más conocidas y usadas, se encuentran el ELISA directo, indirecto, de captura y el ELISA competitivo [48, 49].

**ELISA directo.** En esta clase de ELISA, el anticuerpo primario esta enzimáticamente marcado. Para el ELISA directo, se fijan los antígenos a un soporte solido insoluble y se incuban 1 hora a 37C o toda la noche a 4C, posteriormente se debe lavar para eliminar los antígenos fijados deficientemente o no fijados, se bloquean los sitios inespecíficos, con proteínas no relacionadas como albumina o leche descremada. Posteriormente, se adicionan los anticuerpos conjugados enzimáticamente. Se lava para eliminar los anticuerpos marcados que no hayan reaccionado. Por último, se adicionará un substrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima marcadora. Se debe detener la reacción enzimática a un tiempo estandarizado para evitar reacciones inespecíficas y ruido de fondo de la técnica, posteriormente se hace lectura colorimétrica del producto final coloreado, por densidad óptica mediante espectrofotometría [48, 49].

**ELISA Indirecto.** En el ELISA indirecto, se utilizan dos tipos de anticuerpos, el anticuerpo primario y el anticuerpo secundario que en este caso, estará marcado enzimáticamente para evidenciar la unión antígeno-anticuerpo. Se debe fijar al soporte sólido e insoluble los antígenos específicos para los anticuerpos objeto de estudio. Posteriormente, se lava para eliminar los antígenos fijados deficientemente o no fijados. Se bloquea con leche descremada o albumina. Luego, se adiciona el suero problema, de tal forma que sus anticuerpos reaccionarán específicamente con los antígenos fijados al soporte. Se lava para eliminar los anticuerpos que no hayan reaccionado y poder adicionar el anticuerpo secundario, se volverá a lavar para eliminar los anti-anticuerpos marcados que no hayan reaccionado. Por último se adiciona el substrato enzimático sobre el que sea capaz de actuar la enzima marcadora. Se puede detener o no la reacción y se hace la lectura colorimétrica del producto final coloreado [48, 49].

**ELISA de captura.** Este tipo de ELISA permite detectar complejos proteínicos , gracias a la utilización de un anticuerpo de captura, dirigido contra una de las proteínas involucradas en el complejo, además se utiliza un anticuerpo primario dirigido contra una proteína diferente a la reconocida por el anticuerpo de captura, de esta manera se pueden detectar interacciones o asociaciones de proteínas con la utilización de un anticuerpo secundario, marcado enzimáticamente, por último se adicionará el substrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima marcadora, se detiene la reacción y se hace la lectura colorimétrica [48, 49].

### 2.3.2. Radioinmunoensayo

El radioinmunoanálisis es una técnica de inmunodetección comúnmente usada en la detección de anticuerpos anti-insulina [50, 51]. Para determinar la cantidad de anticuerpo anti-insulina presente en la muestra se debe utilizar una concentración de insulina conocida. Además de la insulina sin marcar (antígeno frío), se debe añadir una cantidad constante y conocida de insulina radiomarcada (antígeno marcado). Los antígenos marcados se forman sustituyendo algunos de los átomos normales del antígeno por los correspondientes isótopos radiactivos ( $H^3$ =tritio,  $P^{32}$ ), o introduciendo radioisótopos extraños en la molécula (yodo= $I^{125}$  unido a un residuo de TYR). Los dos tipos de antígenos, frío y marcado, van a competir, en igualdad de condiciones, por unirse con el anticuerpo disponible. Las concentraciones del antígeno marcado y sin marcar se conocen, la única variable del sistema es la concentración del anticuerpo (muestra problema) [50, 51].

## 2.4. Producción de suero policlonal

El objetivo principal en la producción de anticuerpos es obtener sueros con títulos altos y de alta afinidad, de una manera compatible con el bienestar de los animales inoculados[52]. Como primer paso en la producción de suero policlonal, se debe tener en cuenta la elección de la especie animal que se utilizará para la inmunización, dentro de las especies más usadas se encuentra la gallina, la cabra, el cerdo, el ratón, el caballo y el conejo. Otro paso fundamental, es el diseño del esquema inmunización, el cual requiere decisiones respecto a los lugares anatómicos de la inoculación, la frecuencia de cada inyección, el tipo y la cantidad de adyuvante [53].

### 2.4.1. El conejo para la producción de anticuerpos

El conejo es la especie más utilizada para la producción de anticuerpos policlonales, debido a su cómodo tamaño y facilidad para manipular y sangrar. Se utilizan conejos de un peso entre 2.5-3.0 Kg, de 10-16 semanas de vida, cuando sus niveles séricos de IgG materna no son detectables y su sistema inmune está maduro. Se prefieren conejos hembras porque son más dóciles y fáciles de manipular. Otro punto a favor para escoger el conejo en la producción de anticuerpos, es su capacidad para producir un volumen suficiente de suero con un título alto y de gran afinidad [53]. En cuanto al número de animales requerido por antígeno para la producción de anticuerpos policlonales, el principio de uso de individuos en un modelo biológico con este fin debe basarse en el principio de las tres "R" –refinamiento, reducción y reemplazo- es decir el menor uso de individuos posible. Acorde con lo anterior la Florida State University en su "Polyclonal Antibody Production Protocol", sugiere el uso de 2 a 3 animales, ya que debido a la variabilidad de la respuesta de cada individuo frente al mismo antígeno, no se puede garantizar la producción de anticuerpos con el uso de uno, pero hace claridad en cuanto a que si con el primer animal inmunizado se logra la producción de anticuerpos y el volumen de suero extraído es suficiente no se requiere el uso de un segundo y tercer animal, favoreciendo de esta manera un uso racional de los animales de experimentación [54].

### 2.4.2. Inmunización

La inmunización requiere tener en cuenta el tamaño, estructura y estado del antígeno en el momento de ser presentado al sistema inmune, ya cualquiera de estas variables afectará la cantidad y calidad de los anticuerpos producidos. En cuanto al tamaño, polipéptidos menores a 10 kDa, requieren ser conjugados con una proteína de gran potencial inmunogénico para convertirse en un buen inmunógeno. Esto es importante, cuando el péptido de interés es corto, entre 15-20 [55]. En el caso de la insulina, cuya masa molecular es de aproximadamente de 6000 daltons, se requiere el uso de un adyuvante, que cumpla con la función transportadora y permita su presentación de manera progresiva y apropiada, logrando mantener la respuesta inmune humoral en la animal inmunizado. La eficiencia de este proceso varía con los factores del huésped, la ruta de administración, el adyuvante y la naturaleza intrínseca del antígeno [55].

- **Inyección subcutánea**

La inyección subcutánea es la forma más usada para la inmunización de animales en la producción de sueros policlonales, la inyección contiene el antígeno y el adyuvante, por lo que es rápidamente transportado de los conductos linfáticos a los nodos linfático [55].

### 2.4.3. Dosis del antígeno

Dos criterios son importantes para tener en cuenta en el momento de escoger la dosis apropiada del antígeno. Primero, la dosis usada debe ser mínima y así lograr una buena respuesta inmune que permita estimular la producción de anticuerpos. Para conejos, la dosis mínima que es capaz de inducir respuesta inmune se encuentra entre 10 µg y 100 µg [55]. El segundo criterio es la cantidad de sitios de aplicación y el volumen inoculado, el cual no debe exceder 1 mL [55].

En cuanto la cantidad de antígeno: a) Para la primera inmunización se requieren cantidades no muy bajas de antígeno (picogramos), ya que el uso cantidades mínimas no favorecen el desarrollo de la memoria inmunológica y por lo contrario induce tolerancia al antígeno, b) Las cantidades adecuadas para administración de los refuerzos deben favorecer la selección clonal de linfocitos B antígeno específicos (inducidos por la primera dosis), ya que si son cantidades muy bajas no lograrán favorecer dicha selección. Sin embargo, cantidades no muy altas de antígeno son necesarias para la inmunización de refuerzo ya que pueden ayudar a elevar la afinidad de los anticuerpos producidos [55].

### 2.4.4. Adyuvante

Los adyuvantes son compuestos que inyectados junto al antígeno mejoran la respuesta inmune humoral y mediada por células. Los pequeños polipéptidos (menores de 10 kDa) y antígenos no proteínicos, deben ser conjugados con una molécula

transportadora y más inmunogénica para convertirse en buenos inmunógenos, esta molécula es el adyuvante [55].

- **Adyuvante de Freund**

El Adyuvante de Freund es el más utilizado para la producción de anticuerpos, debido a que aumenta más eficientemente la exposición del antígeno al sistema inmune, prolongando la producción de sueros policlonales. Está compuesto por una emulsión de agua en aceite, preparada en aceites no metabolizables. Si el adyuvante contiene lípidos de *Mycobacterium tuberculosis* es llamado Adyuvante Completo de Freund y si por lo contrario no posee estos lípidos, se conoce como Adyuvante Incompleto de Freund [55].

**Adyuvante de Freund Completo:** El Adyuvante Completo de Freund (ACF) se utiliza frecuentemente para la primera inmunización del animal, ya que su composición; aceite mineral (agente tensioactivo) y partículas de micobacterias inactivadas (*M. tuberculosis* o *M. butyricum*), favorece la respuesta inmunológica al antígeno. La producción de anticuerpos es favorecida principalmente por el efecto depósito, que se basa en la encapsulación del antígeno dentro de la solución de aceite mineral (difícilmente metabolizable), lo que permite una liberación lenta y constante de este. Por otro lado, favorece la migración de células como macrófagos y dendríticas al sitio de la inmunización debido a la presencia de micobacterias inactivas. Estas características lo convierten en uno de los adyuvantes más eficaces [55].

Aunque ACF es un adyuvante muy eficaz para la producción de anticuerpos, su uso se asocia con el desarrollo de una respuesta inflamatoria exacerbada en el sitio de inyección, la cual puede ser dolorosa y grave, incluso puede resultar en la formación de granulomas, abscesos y/o necrosis del tejido. Los adyuvantes que contienen componentes de las micobacterias, sólo deben utilizarse para la primera inmunización y una sola vez por animal, debido a que en una segunda inmunización induciría una reacción de hipersensibilidad favoreciendo la liberación de histamina y otros mediadores de los basófilos y mastocitos [55].

**Adyuvante de Freund Incompleto:** El Adyuvante Incompleto de Freund (AIF) se compone del mismo aceite y agente tensioactivo del ACF, pero no contiene partículas inactivadas de micobacterias. Generalmente es utilizado para reforzar la inmunización en los animales que recibieron previamente una inyección de antígeno con ACF. Tiene propiedades adyuvantes que favorecen la inmunidad humoral sin inmunidad mediada por células, pero se considera generalmente que es menos potente que la ACF. AIF con menor frecuencia causa abscesos y formación de granulomas y son generalmente menos severas que las ocasionadas por el uso de la AIF [55].

Los antígenos administrados con AIF son capaces de estimular y mantener la respuesta inmune humoral inducida después de la primera inmunización, también permite mejorar la especificidad de los anticuerpos. Por otro lado al carecer de micobacterias, minimiza los efectos secundarios. Por esta razón, el AIF se utiliza para reforzar la inmunización [55].

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1. Reactivos biológicos

En la inmunización de los conejos y detección de Anticuerpos Anti-Insulina (AAI) se utilizaron tres Insulinas Exógenas (IE) terapéuticas; dos insulinas humanas de origen recombinante: NPH (Novo nordisk, Bagsvaerd, Dinamarca) y Regular (Novo nordisk, Bagsvaerd, Dinamarca), y un análogo de insulina: Glargina (Sanofi-Aventis, Frankfurt, Alemania). También se usó Insulina Humana Recombinante No Terapéutica (IHNT) como ingrediente farmacéutico activo sin formular (Sigma® San Luis EEUU). Las tres distintas formulaciones de IE terapéutica fueron seleccionadas como blanco de estudio, por estar incluidas en el Plan Obligatorio de Salud (POS) en Colombia [56] y representar cada una de las categorías de la clasificación según su farmacocinética [23]. Las inmunizaciones de los conejos se hicieron formulando cada IE con adyuvante completo e incompleto de Freund (Sigma® San Luis EEUU). Para la detección de Anticuerpos Anti-Insulina, se utilizó anti-IgG de conejo y humana acoplada a peroxidasa (Invitrogen® Camarillo EEUU) y para la evaluación de los isotipos IgG se utilizó anti-IgG 1,2,3 y 4 humana acoplada a peroxidasa (Invitrogen® Camarillo EEUU).

#### 3.2. Inmunización de conejos

Teniendo en cuenta que la única finalidad de la inmunización de los conejos Nueva Zelanda fue la producción de anticuerpos policlonales anti-IE para su uso como suero control positivo de la presencia de AAI y como anticuerpo de captura (ELISA sándwich) en la detección de complejos inmunes (AAI-IE) -y no como un modelo animal de la evaluación del perfil inmunogénico humoral de las insulinas monitoreadas, se requirió solo la inmunización de cuatro conejos hembras de raza Nueva Zelanda, entre 75-90 días de edad, cada una con una IE diferente (Regular, NPH, Glargina e IHNT). El esquema de inmunización contempló seis inmunizaciones: 1050 µg de cada insulina para la primera y 1750 µg para las cinco siguientes las cuales se aplicaron con un intervalo de quince días entre cada una. Para cada inmunización se realizaron dos inoculaciones, una subcutánea, en la región superior del cuello (Figura 4 A-B) y la otra, intramuscular en la región inguinal. La primera inmunización se realizó con 300 µL de adyuvante completo de Freund [57] y las siguientes con 500 µL de adyuvante incompleto [57].



**Figura 4.** Inmunización y sangría de conejos Nueva Zelanda. **A)** Inyección subcutánea de insulina y adyuvante de Freund, **B)** ubicación del inoculo después su aplicación y **C)** ubicación de la vena marginal de la oreja.

### 3.3. Obtención, extracción y almacenamiento de sueros control y sueros evaluados.

Teniendo en cuenta la recomendación otorgada por la FDA (del inglés, "Food and Drug Administration"), la cual plantea que, para la estandarización de un técnica de inmunodetección que permita valorar la respuesta inmune humoral frente a proteínas terapéuticas, se pueden utilizar anticuerpos policlonales generados en animales sometidos a esquemas de inmunización o sueros humanos que posean anticuerpos detectables para su uso como sueros control [58], en este estudio, se emplearon como controles positivos para AAI los sueros de los conejos inmunizados individualmente con cada insulina y el suero de un voluntario diabético tipo 1. Este último se seleccionó teniendo en cuenta que su historia clínica reportaba haber sido tratado con las tres insulinas monitoreadas y que en ensayos piloto su suero, tuvo reconocimientos altos (evidenciados en las densidades ópticas superiores al punto de corte para cada formulación) por las insulinas evaluadas.

En cuanto a los sueros obtenidos de los conejos inmunizados, con el ánimo de hacer seguimiento a la efectividad del esquema de inmunización y por ende establecer la cinética de producción de AAI, se colectaron 3-5 mL de muestra de sangre de la vena marginal de la oreja (Figura 4 C) antes de la primera inmunización (pre-inmune) y quincenalmente después de la tercera, cuarta, quinta y sexta inmunización. Al día 90, los conejos fueron exanguinados por la vena marginal de la oreja, previa sedación con paraformaldehído, con el objeto de obtener el suero hiperinmune anti-insulina.

Por otro lado, los voluntarios diabéticos con terapia insulínica se contactaron gracias a la colaboración de la Dra Luisa Fernanda Bohórquez (Médica Diabetóloga) y del Dr Jorge Arturo Santa (Grupo de promoción y prevención del Departamento de Sanidad de la Policía Nacional). Tres fueron los criterios de inclusión empleados: 1) Voluntarios con diagnóstico de diabetes tipo 2 según criterios de la asociación Americana de la Diabetes (ADA), 2) Voluntarios mayores de 18 años y 3) Voluntarios bajo tratamiento con las insulinas Regular-NPH, NPH o Glargina. El único criterio de exclusión utilizado fue el de padecer enfermedades del sistema endocrino e inmunológico descritas en su historia clínica. Los criterios de inclusión se establecieron con la única finalidad de seleccionar voluntarios diabéticos que permitieran evaluar la técnica de ELISA indirecta (detección de AAI) y ELISA de captura (detección de complejos AAI-IE) estandarizadas durante el desarrollo de este trabajo. El estudio en humanos se realizó en dos fases: *i*) una primera fase contempló la toma de dos muestras de sangre, la primera en ayunas para la evaluación de glicemia preprandial, hemoglobina glicosilada e inmunodetección de AAI libres y la siguiente dos horas después de la ingesta para la evaluación de glicemia postprandial y también la probable inmunodetección de AAI libres, y *ii*) la segunda fase contempló la toma de cuatro muestras de sangre, la primera se realizó 5 minutos antes de la administración de la insulina y las siguientes a los 30, 60 y 120 minutos después de la misma, con el objetivo de detectar los probables Complejos Inmunes (CI) formados por anticuerpos anti-insulina e insulina, y correlacionarlos con glicemia e insulinemia.

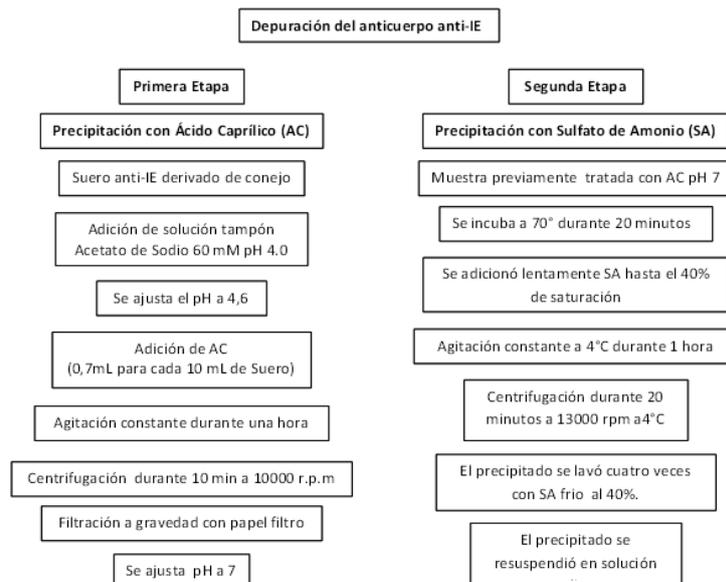
Como voluntarios controles negativo, se emplearon muestras de diez voluntarios cuya historia clínica no reportaba diabetes, inmunosupresión o endocrinopatías. Cada uno de los voluntarios (normoglicémicos e hiperglicémicos) tuvo conocimiento verbal y escrito del procedimiento de toma y destinación de sus muestras (contemplados en la normativa ética correspondiente).

Las muestras se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 min para posterior recuperación del suero, el cual se dispensó en tubos de 1.5 mL estériles (Eppendorf®) y fue almacenado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su empleo.

### 3.4. Depuración del anticuerpo anti-insulina exógena

Para su uso como anticuerpo de captura, a cada alícuota de suero policlonal anti-insulina exógena derivado de conejo se le adicionó solución tampón Acetato de Sodio 60 mM pH 4.0 al doble de su volumen y se le ajustó el pH a 4,6 con NaOH 1N. Para la precipitación, a cada 10 mL de suero se le adicionó lentamente 0,7 mL de Ácido Caprílico, siempre en agitación. Luego de la agitación durante una hora, se centrifugó durante 10 minutos a 10000 r.p.m y se filtró a gravedad con papel filtro (Whatman®), para posteriormente centrifugarse 20 minutos a 15000 r.p.m y ajustar el pH a 7.

Siguiendo con el proceso de depuración, para la precipitación con sulfato de amonio  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  se tomó la muestra tratada con Ácido Caprílico ( $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{O}_2$ ) pH 7, previamente incubada a  $-70$  durante 20 minutos y se le adicionó lentamente sulfato de amonio hasta llegar al 40% de saturación, se dejó en agitación a 4C en hielo durante 1 hora y a 4C sin agitación durante toda la noche. Posteriormente, se centrifugó 20 minutos a 13000 rpm a 4C, se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado cuatro veces con sulfato de amonio frío al 40%. El precipitado se resuspendió en solución salina estéril hasta disolver en el menor volumen posible.



**Figura 5.** Esquema del proceso de depuración del suero anti-IE derivado de conejo.

### 3.5. Cuantificación de proteínas (IgG) después de la depuración

En la determinación de la concentración de proteína presente en las muestras de suero anti-IE de conejos después del proceso de depuración de con Sulfato de Amonio y Ácido Caprilico, se usó el método del ácido bicinconínico (BCA) (Pierce, BCA™ Protein Assay Kit). Como curva estándar se emplearon diluciones seriadas de Albumina Sérica Bovina. Brevemente, 25 µL de cada muestra se incubó con 200 µL de solución de trabajo y se incubó a 37°C durante 30 minutos y se midió a 562 nm en un lector de placas Tecan GENios Microplate Reader (Tecan, Austria). Cada ensayo se realizó por duplicado.

### 3.6. Evaluación de los niveles séricos de glicemia, insulinemia y proteínas totales.

La valoración de parámetros bioquímicos en las muestras séricas de los conejos se realizó con el fin de monitorear el *status* de cada conejo durante el esquema de inmunización, como un control de calidad experimental. El análisis de los niveles séricos de glucosa y proteínas totales de las muestras de los conejos fue realizado en el Laboratorio Clínico Veterinario de la Universidad Nacional de Colombia. La determinación de glucosa de las muestras séricas humanas se realizó en el laboratorio de la Clínica Nuestra Señora del Rosario por medio del método enzimático Glucose GOD FS (DiaSys Diagnostic Systems®, Holzhheim Germany), mientras que los niveles séricos de insulina se evaluaron en el Laboratorio Clínico Médico Colcan utilizando la técnica de inmunoquimioluminiscencia (LIAISON®insulin, Saluggia, Italy). El porcentaje de Hemoglobina glicosilada (%HbA1C) se evaluó utilizando la prueba cuantitativa A1CNow<sup>+</sup> (Bayer HealthCare®, EEUU).

### 3.7. ELISA indirecta.

La inmunodetección de AAI se realizó incubando la microplaca de 96 pozos (Maxisorp® Nunc) con 50 µL de cada una de las formulaciones comerciales de IE en solución carbonato-bicarbonato 10 mM, pH 9,6 a 4°C por 16 horas; se lavó tres veces con solución fosfato salino (PBS) más Tween 20 al 5% (PBS-T). Como agente bloqueador se usó leche descremada al 5% y 7% para la detección de AAI en muestras séricas de conejos y humanos, respectivamente, y se incubó una hora a 37°C. Seguido a esto se realizaron tres lavados. Posteriormente, se incubó a 37 °C por una hora con 100 µL del suero a evaluar, finalizando con tres lavados adicionales. Luego se incubó con 100 µL de anticuerpo anti-IgG conjugado con Peroxidasa (Invitrogen®) a una dilución 1:5000 y 1/20000 en PBS-T a 37 °C por una hora, para sueros de conejos y humanos respectivamente, se lavó para retirar el exceso de reactivo y luego se adicionó el sustrato 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB)(Invitrogen®) en proporción 1:1 por pozo. La reacción se detuvo pasados 15 min, con 50 µL de HCl 1N. La microplaca fue leída a

450 nm en un lector de placas TRIAD Series Multimode Detector (DYNEX Technologies). Cada ensayo se realizó por duplicado.

Para la determinación de la concentración óptima de IE a usar en el ELISA, la microplaca se incubó con 8 concentraciones seriadas (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a 0,078  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de cada IE. La prueba para el análisis de la concentración óptima de IE a adherir en la placa, se realizó usando los sueros en los que previo ensayo sus reconocimientos fueron equiparables. Para el caso de las IE Regular y NPH se usó el suero pos-cuarta inmunización, mientras que para el caso de la IE Glargina el suero post sexta inmunización fue el empleado. En todos los casos los sueros fueron empleados a una dilución 1/1000 y 1/10 para conejos y humanos respectivamente.

Con el objetivo de evaluar la producción de AAI en los conejos, la microplaca de ELISA se incubó con la concentración óptima de recubrimiento para cada una de las insulinas así, 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para la evaluación en conejos y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , para el ensayo en humanos. Posteriormente, se evaluaron las muestras de suero pre-inmune, pos-tercera, pos-cuarta, pos-quinta y pos-sexta inmunización de cada conejo, en dilución 1/1000 y en el caso de las muestras séricas humanas se usó 1/10 como dilución.

En la titulación de los sueros anti-IE de conejos, los pozos de la microplaca se recubrieron con 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de cada IE. Se evaluaron diluciones seriadas de suero anti-IE de conejo partiendo de 1/500, hasta 1/32000. Por último, se determinó el reconocimiento cruzado de los sueros de los conejos inmunizados, usando 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de cada insulina por pozo e incubando con 100  $\mu\text{L}$  de los sueros previamente seleccionados en dilución 1 /1000.

**Controles.** Para evaluar la especificidad de la unión antígeno-anticuerpo, se sensibilizaron pozos con Albúmina Sérica Bovina (BSA) y se incubaron con el suero control positivo. En la misma placa se evaluó la unión inespecífica del anti-IgG humano, en presencia de insulina, ausencia de suero positivo para AAI y revelando con anti-IgG humano.

### 3.8. ELISA de captura

Para la detección de Complejos Inmunes (CI) constituidos por AAI e IE, la microplaca de 96 pozos se incubó con 50  $\mu\text{L}$  de AAI depurados, contenidos en el suero de los conejos previamente inmunizados (anticuerpo de captura). Los anticuerpos de captura anti-Insulina Regular y anti-Glargina se diluyeron 1/1200 y el anti-NPH en 1/100 de solución carbonato-bicarbonato 0,05 mM, pH 9,6. La incubación se realizó durante 1 hora a 37°C antes, después una incubación a 4°C por 16 horas y para posteriormente lavar cuatro veces con solución fosfato salino (PBS) más Tween 20 al 5% (PBS-T). Como agente bloqueador se usó leche descremada al 5% en PBS-T, se incubó una hora a 37°C y se lavó. Los CI control (formados *in vitro*) y las muestras séricas a evaluar se incubaron una hora a 37 °C en una dilución de 1/100 en PBS y leche descremada al 3%, respectivamente y se lavaron. Posteriormente la placa se incubó con 50  $\mu\text{L}$  de anticuerpo anti-IgG conjugado con Peroxidasa (Invitrogen®) a una dilución 1:25000 en PBS-T a 37 °C por una hora, se lavó para retirar el exceso de reactivo y se adicionó 50

$\mu\text{L}$  de TMB (Invitrogen®) por pozo. La reacción se detuvo pasados 30 min, con 50  $\mu\text{L}$  de HCL 1N. La microplaca fue leída a 450 nm en un lector de placas Tecan GENios Microplate Reader (Tecan, Austria).

**Controles.** Para evaluar especificidad del ELISA, se realizaron cuatro ensayos: *i)* se evaluó el sistema inmunodetección en ausencia de anticuerpo de captura, sensibilizando la placa con BSA, *ii)* se evaluó el reconocimiento del anticuerpo secundario (anti-IgG humano) por el anticuerpo de captura, en ausencia de la muestra de suero, *iii)* se evaluó si el sistema de Inmunodetección reconocía tanto a la molécula de insulina, como a la del AAI de manera individual (Sin formar complejos) y *iv)* se evaluó el sistema de captura en ausencia de anti-IgG de humano.

### **3.9. Formación *in vitro* de complejos inmunes AAI-insulina.**

Con el fin de establecer un control positivo que permita comprobar que el sistema de captura estandarizado es capaz de detectar Complejos Inmunes (CI) constituidos por AAI e IE, se planteó la formación *in vitro* de estos. Para lo anterior, se incubó 150  $\mu\text{L}$  de IgG depurada del suero de un diabético positivo para AAI con 19,2  $\mu\text{L}$  de insulina (la formación de complejos fue independiente para cada insulina analizada). Los volúmenes de IgG e insulina incubados para la formación de CI, se establecieron partiendo de sus molaridades, de tal manera que por cada molécula de IgG, hubiese dos moléculas de insulina. La incubación se realizó durante 1 hora a 37°C, antes y después de la incubación a 4°C por 16 horas, en agitación constante. La confirmación de la formación *in vitro* de CI se realizó por medio de dos corridos electroforéticos de geles de poliacrilamida al 12,5 %, tanto en condiciones no denaturantes como denaturantes y reductoras, y sus respectivos Western blot, para la detección de insulina e IgG humana.

### **3.10. Electroforesis en condiciones denaturantes y no denaturantes**

En la evaluación del proceso de purificación de los anticuerpos anti-IE producidos en conejos y presentes en el suero de un voluntario diabético (suero control), se realizaron cuatro corridos electroforéticos en gel de poliacrilamida al 12,5 %. En cada pozo se sembraron 120  $\mu\text{g}$  de anticuerpo antes y después del proceso de purificación. Las muestras se corrieron en condiciones no denaturantes y denaturantes y reductoras (hervidas durante 5 minutos en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol) a 80 V durante aproximadamente 3 horas. Una réplica del gel corrido en condiciones no denaturantes y una del gel corrido en condiciones denaturantes y reductoras, se coloreó con una solución que tenía Azul de Coomasie R-250 disuelto en Metanol y Ácido Acético (Merck, Germany), durante 20 minutos y se destiño con metanol al 40%.

Para evidenciar la formación *in vitro* de complejos inmunes AAI-IE, se corrieron cuatro geles de poliacrilamida al 12,5% dos en condiciones no denaturantes y dos en condiciones denaturantes y reductoras. En cada pozo se colocaron 10  $\mu\text{L}$  de muestra y 3  $\mu\text{L}$  de buffer de carga. Una réplica de los geles no denaturantes y una de los geles

denaturantes y reductores fueron teñidos con Azul de Coomasie durante 20 minutos y desteñidos con metanol al 40 %.

Los corridos electroforéticos se llevaron a cabo en cámaras de electroforesis Mini-Protean (Bio-Rad, CA, USA). Las muestras corridas en condiciones no denaturantes se mezclaron con tampón de carga no denaturante (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, Glicerol, 0.5% (p/v), azul de bromofenol y agua destilada); las muestras corridas en condiciones denaturantes y reductoras, se mezclaron con tampón Laemli (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8 Glicerol, 10% (p/v) SDS, 0.5% (p/v) azul de bromofenol y  $\beta$ -mercaptoetanol) y se hirvieron durante cinco minutos.

### 3.11. Western Blot para insulina, IgG de conejo y humana.

Para confirmar la presencia de IgG de conejo y humana en los sueros después del proceso de depuración, las réplicas del gel de poliacrilamida al 12,5% corrido en condiciones no denaturantes y el del gel corrido en condiciones denaturantes y reductoras, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Trans-blot Transfer Medium, Pure Nitrocellulose Membrane, 0.45 mm; Bio-Rad) durante tres horas y media a 10 V, por medio del sistema de transferencia Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad, CA, USA). Luego de la transferencia las membranas se bloquearon con leche descremada al 5% en PBS-T, durante una hora a 37°C. Seguidamente, se realizaron cuatro lavados con PBS-T. Posteriormente, las membranas se incubaron a 37 °C por una hora con anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con Peroxidasa (Invitrogen® Camarillo EEUU) a una dilución 1/5000 en leche al 3% y PBS-T, se lavaron para retirar el exceso de anticuerpo y se revelaron con una solución de Carbazol y Peróxido de hidrogeno como sustrato. Una vez aparecidas las bandas, las membranas se lavaron, se fotografiaron y se incubaron durante una hora con anti-IgG humano conjugado con peroxidasa (Invitrogen® Camarillo EEUU) a una dilución de 1/10000 en leche al 3% y PBS-T, posteriormente se lavaron para retirar el exceso de anticuerpo y se revelaron con Carbazol y Peróxido de hidrogeno. Una vez aparecidas las bandas, las membranas se volvieron a lavar y fotografiar.

Teniendo como finalidad la confirmación de la presencia de CI formados *in vitro*, las réplicas del gel de poliacrilamida al 12,5%, corrido en condiciones no denaturantes y del gel corrido en condiciones denaturantes y reductoras, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Trans-blot Transfer Medium, Pure Nitrocellulose Membrane, 0.45 mm; Bio-Rad) durante tres horas y media a 10 V utilizando el sistema de transferencia Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad, CA, USA). Las membranas se bloquearon con leche descremada al 5% en PBS-T durante una hora a 37°C. Se lavaron cuatro veces con PBS-T. Posteriormente, se incubaron a 37 °C por una hora con la mezcla de los sueros anti-IE (anti-Insulina Regular, anti-NPH y anti-Glargina) producido en conejos a una dilución 1/100 en leche al 3% y PBS-T, se lavaron para retirar el exceso de anticuerpo y se incubaron durante una hora con anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (Invitrogen® Camarillo EEUU) en una dilución de 1/5000 en leche al 3% y PBS-T, se lavaron y se revelaron con Carbazol y Peróxido de hidrogeno como sustrato. Una vez aparecidas las bandas, las membranas se volvieron a lavar y se fotografiaron. Continuando con el proceso de confirmación, las

membranas se incubaron durante una hora con anti-IgG humano conjugado con peroxidasa (Invitrogen® Camarillo EEUU) a una dilución de 1/10000 en leche al 3% y PBS-T, posteriormente se lavaron para retirar el exceso de anticuerpo y se revelaron con carbazol y peróxido de hidrogeno. Una vez aparecidas las bandas, las membranas se volvieron a lavar y fotografiar.

### 3.12. Detección de isotipos IgG

Por medio de la técnica de ELISA indirecta se determinaron los isotipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanos específicos para cada insulina evaluada. Brevemente, la microplaca de 96 pozos (Maxisorp® Nunc) se incubó con 10µg/mL de cada una de las formulaciones comerciales de IE. Como agente bloqueador se usó leche descremada (Colanta®) al 5% incubada una hora a 37C. Posteriormente, se incubó a 37 °C por dos horas con 50 µL del suero a evaluar en dilución de 1/10. Luego se incubó con 50 µL de cada uno de los anticuerpo anti-IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 conjugados con Peroxidasa (Invitrogen®) a una dilución 1:500 en PBS-T a 37 C por dos horas. Se adicionó TMB (Invitrogen®) en proporción 1:1 por pozo. La reacción se detuvo pasados 30 min, con 25 µL de HCl 1N. La microplaca fue leída a 450 nm en un lector de placas TECAN Genios. Cada ensayo se realizó por duplicado en dos ocasiones distintas.

*Controles.* Con el fin de evaluar el reconocimiento de los anticuerpos anti-isotipo IgG usados en el ELISA, la placa se incubó con suero humano como fuente de todas las subclases. También se evaluó su especificidad, usando un anticuerpo monoclonal humano anti-TNF (Embrel®) cuya subclase es IgG1 y Albumina Sérica Bovina (BSA), como proteína no relacionada.

### 3.13. Análisis de datos

Las Densidades Ópticas (DO) obtenidas del control negativo de la técnica (Diluyente sólo, sin suero, expresado como un promedio del duplicado), fueron restadas de las DO obtenidas de las muestras séricas de pacientes diabéticos y normoglicémicos. Para determinar el valor de absorbancia a partir del cual se debe considerar sugestivo de presencia de anticuerpos anti-insulina (punto de corte), se usó el promedio de las DO obtenidas por los sueros de los voluntarios no diabéticos (controles negativos) frente a cada formulación, más dos Desviaciones Estándar (DE). Para compensar la variabilidad entre las placas, las Densidades Ópticas (DO) de los voluntarios Diabéticos tipo 2 con terapia insulínica, se normalizaron con el promedio de las DO de los voluntarios no diabéticos, calculado el Índice de Reconocimiento (IR), definido como el cociente de las DO obtenidas de cada suero evaluado (DOvd) sobre la media de las DO de los sueros de voluntarios no diabéticos (DOvnd). Donde valores superiores a 1 son sugestivos de la presencia de AAI y valores menores a 1 son sugestivos de la ausencia de AAI.

$$IR = \frac{DOvd}{DOvnd}$$

Los datos se analizaron usando el software estadístico *GraphPad*. En cuanto a los obtenidos de las muestras séricas derivadas de los conejos inmunizados (Cinética de producción, titulación y reactividad cruzada) se tuvo en cuenta que la población estaba representada por la cantidad de suero obtenido, y de esta forma la muestra la configuraba cada alícuota que se pudiera extraer de la misma lo cual favorecía que se cumplieran los supuestos que se establecen para el uso de una prueba paramétrica. La prueba Anova de una vía, se usó para las comparaciones entre grupos experimentales, seguido de la prueba de Bonferroni para los IRs. Los resultados se consideraran significativos si  $P < 0.05$ . Por otro lado, dado que los grupos experimentales conformados por los voluntarios humanos no cumplieron con los supuestos para aplicar una prueba no paramétrica se usó la prueba de Kruskal-Wallis, para las comparaciones entre grupos experimentales, seguido de un análisis de comparación múltiple para los IRs, los niveles de glicemia preprandial, glicemia postrandial y %HbA<sub>1</sub>C. Los resultados se consideraran significativos si  $P < 0.05$ .

### **3.14. Consideraciones éticas**

Según las categorías establecidas en el artículo 11 de la resolución 008430 de 1993, del Ministerio de Salud, este trabajo de investigación se clasificó como investigación de riesgo mínimo, ya que se emplearon datos obtenidos a través de procedimientos comunes como exámenes de laboratorio y tratamientos rutinarios como la extracción de sangre por punción venosa en adultos en buen estado de salud, con frecuencia máxima de dos veces a la semana y la administración de insulina como medicamento de uso común, con dosis y vías de administración medicamento establecidas. Adicionalmente, en conejos de laboratorio se indujo la formación de anticuerpos anti-insulina, siguiendo las pautas estrictas en el cuidado y manipulación del animal además del adecuado manejo del material de riesgo biológico.

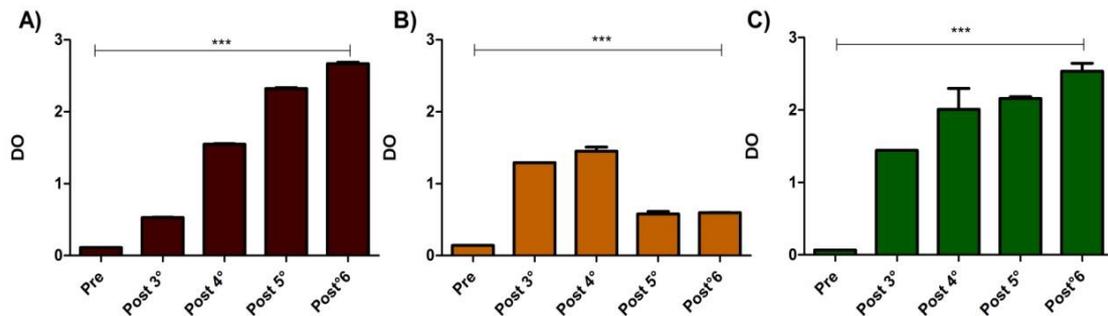
## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Producción y caracterización de suero anti-insulina exógena en conejo.

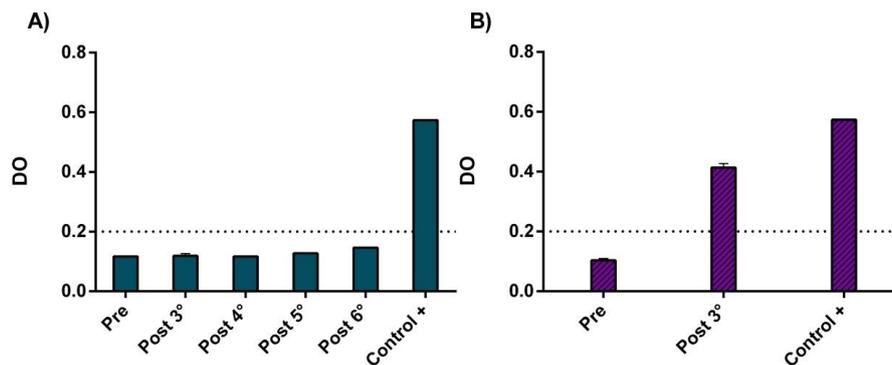
Con el objetivo de generar un suero policlonal anti-Insulina exógena para emplear como suero control en la estandarización del ELISA indirecto y como anticuerpo de captura en la ELISA Sándwich, se inmunizaron cuatro conejos cada uno con una formulación de insulina comercial distinta. Para establecer la efectividad del esquema de inmunización usado en los conejos, se evaluó por medio del ELISA indirecto, la presencia de AAI en las muestras de suero tomadas durante el esquema (preinmune, post-tercera, post-cuarta, post-quinta y post-sexta inmunización). Los datos obtenidos demostraron que la inmunización de los conejos Nueva Zelanda con las insulinas terapéuticas logró inducir la producción de AAI a partir de la tercera inmunización, lo cual se evidenció en la obtención de DO mayores al punto de corte determinado para cada formulación (0,112 para la Regular, 0,142 para la NPH y 0,071 para Glargina). Como se observa en la Figura 6, el reconocimiento de los sueros de los conejos por la IE, aumentó proporcionalmente con cada inmunización, para el caso de la formulación Regular (Figura 6 A) y Glargina (Figura 6 C), curiosamente para NPH (Figura 6B) no se observó el mismo comportamiento y las DO de los sueros pos-quinta y pos-sexta inmunización fueron más bajos, comparados con los mostrados en la pos-cuarta. Este resultado puede deberse a diversas razones, tales como la ganancia de tolerancia al antígeno (IE), un estado de inmunocompromiso del conejo inmunizado, en el cual se afectaría su capacidad de favorecer la producción de anticuerpos [59] o a la aparición de antidiotipia, en la donde la producción incrementada de AAI, genera anticuerpos contra su región variable, limitando la detección de aquellos específicos para NPH por estar posiblemente neutralizados [60]. Es importante recordar que la insulina NPH viene formulada en una solución que contiene protamina, una proteína de 49 aminoácidos con una masa molecular de 7kDa [61] y cuya inmunogenicidad es conocida. La presencia de esta molécula en solución con la insulina, quizá logre generar agregados de moléculas exponiendo probablemente nuevos epítopes y favoreciendo su inmunogenicidad. La formación de agregados de moléculas de insulinas exógena se ha reportado como un factor que favorece su inmunogenicidad [62].

Para evaluar la importancia de los excipientes de formulación en la inmunogenicidad de las insulinas terapéuticas estudiadas, se evaluaron los sueros de dos conejos inmunizados con IHNT (ingrediente farmacéutico activo). Los resultados evidenciaron que el esquema de inmunización utilizado en el primer conejo (100ug de insulina en la primera y 200ug en las 5 siguientes inmunizaciones) no logró favorecer el reconocimiento del suero por la molécula IHNT, sugiriendo la ausencia de anticuerpos anti-insulina (Figura 7 A). Debido a este bajo reconocimiento, se decidió modificar el esquema de inmunización, aumentando la cantidad de insulina inoculada al conejo, haciendo equiparable esta concentración a la empleada para cada IE comercial empleada (1050 µg de cada insulina para la primera y 1750 µg para las 2 siguientes) lo que favoreció la producción de anticuerpos anti-insulina detectables en la muestra

tomada post tercera inmunización (Figura 7 B). Es de resaltar que no se pudo seguir con el esquema de inmunización ya que el conejo no sobrevivió a la cuarta inmunización, los signos clínicos evidenciados sugieren un cuadro de hipoglicemia, caracterizado por baja temperatura, convulsiones (movimientos fuertes y repetitivos), incapacidad para sostenerse la cabeza y mantener su postura normal y mejoría a la administración de dextrosa intravenosa; signos compatibles con los reportados para humano [63]. Este evento se asoció con la administración de una dosis mayor de IHNT y posiblemente con las características de un ingrediente farmacéutico puro (libre de excipientes y sin modificaciones en su estructura) el cual quizá favorecería una acción metabólica más rápida, que permite la captación de glucosa y la disminución abrupta de los niveles de glucosa en sangre.



**Figura 6.** Producción de anticuerpos policlonales anti-insulina exógena en conejos Nueva Zelanda. **A)** Anti-Regular, **B)** Anti-Glargina y **C)** Anti-NPH. Cada barra representa la media de las DO en un punto tiempo del esquema de inmunización. Se presenta un ensayo representativo, realizado en tres ocasiones por duplicado y la desviación estándar para cada barra.

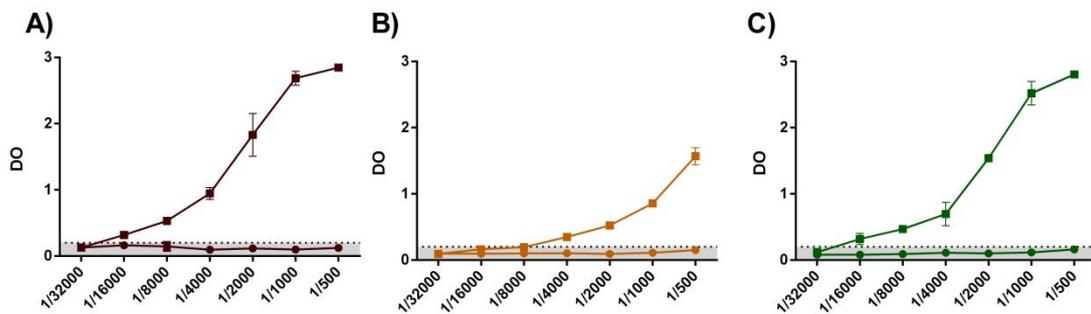


**Figura 7.** Producción de anticuerpos policlonales anti-IHNT. Reconocimiento de los sueros de los conejos inmunizados con IHNT **A)** Esquema de inmunización administrado al conejo #1 (100ug de insulina en la primera y 200 µg en las 5 siguientes) y **B)** Esquema de inmunización administrado al conejo #3 (1050 µg de insulina para la primera y 1750 µg para las 2 siguientes). Cada barra representa el reconocimiento del suero quince días post- inmunización. Se presenta un ensayo representativo, realizado en dos ocasiones por duplicado y la desviación estándar para cada barra. Como

control positivo se utilizó suero policlonal anti-insulina Regular, previamente caracterizado en dilución 1/1000.

#### 4.1.1. Determinación del título de los sueros anti-insulina exógena.

El título de un anticuerpo se considera la mayor dilución del suero capaz de reconocer su antígeno y se reporta como 1/en la dilución [64]. Entendiendo el concepto y la importancia de establecer el título de un suero, se evaluó el título de los sueros anti-IE derivados de conejo, usando siete diluciones seriadas, partiendo de 1/500, hasta 1/32000. Los resultados obtenidos para dichas diluciones se grafican en la Figura 8. Para determinar el título, se tuvo en cuenta el punto de corte de DO para cada insulina, como límite para considerar un reconocimiento positivo. La mayor dilución capaz de reconocer la IE unida a placa, fue de 1/8000 para anti-Regular y anti-Glargina (Figura 8 A y C) y de 1/4000 para anti-NPH (Figura 8 B). Los títulos obtenidos para cada suero Anti-IE (anti-Regular, anti-NPH y anti-Glargina) confirman el adecuado esquema de inmunización (Respuesta dosis-dependiente).



**Figura 8.** Titulación de suero de conejo anti-insulina exógena. **A)** Suero anti-Regular, **B)** Suero anti-NPH y **C)** Suero anti-Glargina. Las gráficas muestran la media de las DO contra las diluciones del suero y la línea de corte para cada suero evaluado. Se presenta un ensayo representativo, realizado en tres ocasiones por duplicado y la desviación estándar para cada punto.

#### 4.1.2. Reactividad cruzada del suero anti-insulina exógena.

Los ensayos de reactividad cruzada permiten establecer el grado en que diferentes antígenos, son reconocidos como similares por el sistema inmune, mientras que la reactividad cruzada es la reacción entre un anticuerpo y un antígeno que difiere de manera parcial del inmunógeno[65]. Entendiendo el alcance de estos ensayos y la importancia de la reactividad cruzada, se decidió evaluar el reconocimiento cruzado de los sueros obtenidos de conejo, por medio de la técnica ELISA indirecta, para este fin se usaron los sueros post-sexta inmunización en dilución de 1/1000 para el anti-NPH y de 1/4000 para anti-Regular y anti-Glargina (Diluciones equiparables en sus DO). Como se observa en la Figura 9, los resultados muestran un reconocimiento preferencial del suero para el antígeno (IE) con el que fue inmunizado cada conejo; sin embargo, se evidenció un reconocimiento cruzado, hacia las IE comerciales diferentes a las utilizadas en la respectiva inmunización. Se esperaba que dada la elevada homología entre las secuencias de cada IE comercial, el reconocimiento de los sueros fuera muy

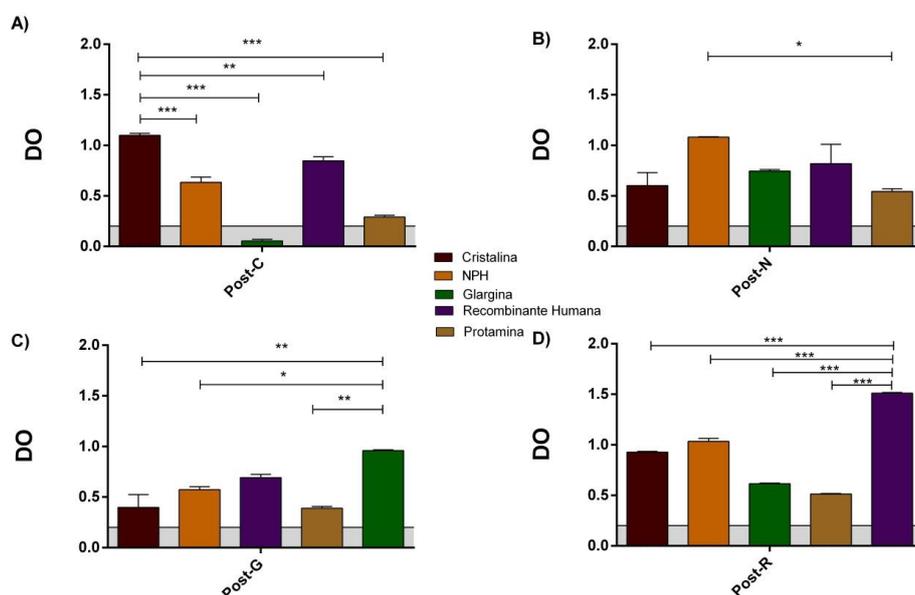
similar, sin embargo estos resultados demuestran lo sugerido en relación con que cada formulación puede generar perfiles variables de inmunogenicidad [66], por factores independientes de la proteína terapéutica; algunos asociados al producto [auxiliares de formulación, almacenamiento, entre otros] y otros restringidos a las características inmunógeno-fenotípicas del individuo a quien es administrada la proteína terapéutica[15]. La reactividad cruzada encontrada, así sea a menor concentración de AAI (dirigida a las formulaciones comerciales de IE distintas a la empleada en la respectiva inmunización), se puede asociar con la homología en sus secuencias aminoacídicas y la conservación de algunos epítopes [66].

El reconocimiento cruzado de los diferentes sueros por NPH [anti-Regular (1,045), anti-Glargina (0,418) y anti-IHNT (0,368)] y la reactividad cruzada del suero anti-NPH por las otras IE evaluadas [IHNT (1,147), Glargina (1,039) y Regular (0,644)] sugiere un alto potencial inmunogénico de NPH (Figura 9), posiblemente debido a la presencia de epítopes conformacionales constituidos por asociaciones entre la protamina y la insulina o la presencia de epítopes presentes únicamente en la protamina. De manera contraria, la baja reactividad cruzada evidenciada por el suero anti-Glargina respecto a las demás IE evaluadas [Regular (0,260), NPH (0,419) e IHNT (0,419)] sugiere una menor inmunogenicidad de la insulina Glargina (Figura 8 C), lo que podría relacionarse con un menor número de epítopes inmunogénicos en su estructura [67]. Este ensayo también evidenció, el reconocimiento cruzado del suero anti-Regular por la IHNT (0,847) lo que se explica con base en la homología de sus estructuras primarias (Figura 9 A).

Por otro lado, sorprende que el suero anti-IHNT reconoció en una menor medida a la insulina Regular (0,928), comparado con el reactividad que presentó frente a su propia molécula (1,510) (Figura 9 D); es llamativo este menor reconocimiento ya que basado en la homología de sus secuencias aminoacídicas, se esperaría un reconocimiento similar. Dicha reactividad puede estar asociada con la presencia de excipientes particulares en la formulación de la insulina Regular y que están ausentes en la IHNT, los cuales tienen como función proteger la conformación estructural de la insulina, disminuyendo de esta manera el reconocimiento por parte del suero Anti-IHNT de epítopes que si están presentes en la IHNT. También pudiera deberse a la formación diferencial de agregados, que ha sido reportada en este tipo de productos [68].

Por último es de resaltar que la protamina fue reconocida preferencialmente por el suero anti-NPH (0,544) y de manera cruzada por los demás sueros [anti-Regular (0,291), anti-Glargina (0,390) y anti-IHNT (0,515)]. Esta molécula es un péptido catiónico de 5 kDa, rico en Arginina y muy utilizado como ayudante de formulación de algunas insulinas, como la NPH. Es aislada del esperma de Salmon en donde cumple funciones similares a las de las histonas [69]. Los datos aquí obtenidos son compatibles con los asociados al potencial inmunogénico de la protamina, a nivel de su capacidad de favorecer la producción de inmunoglobulinas (Ig) del tipo G y E después de administración intravenosa de una dosis única[70]. Estudios retrospectivos han demostrado que estas reacciones son más comunes en los pacientes diabéticos que reciben inyecciones subcutáneas diarias de preparaciones de insulina con protamina [71].

Es importante aclarar que se requieren estudios con unidades experimentales más grandes (mayor número de conejos por insulina administrada) para poder concluir sobre los posibles efectos de la respuesta inmune humoral de los conejos en relación con el tipo de formulación de insulina y su respuesta terapéutica. Lo anteriormente expuesto se desarrolla con la finalidad de analizar los resultados obtenidos.



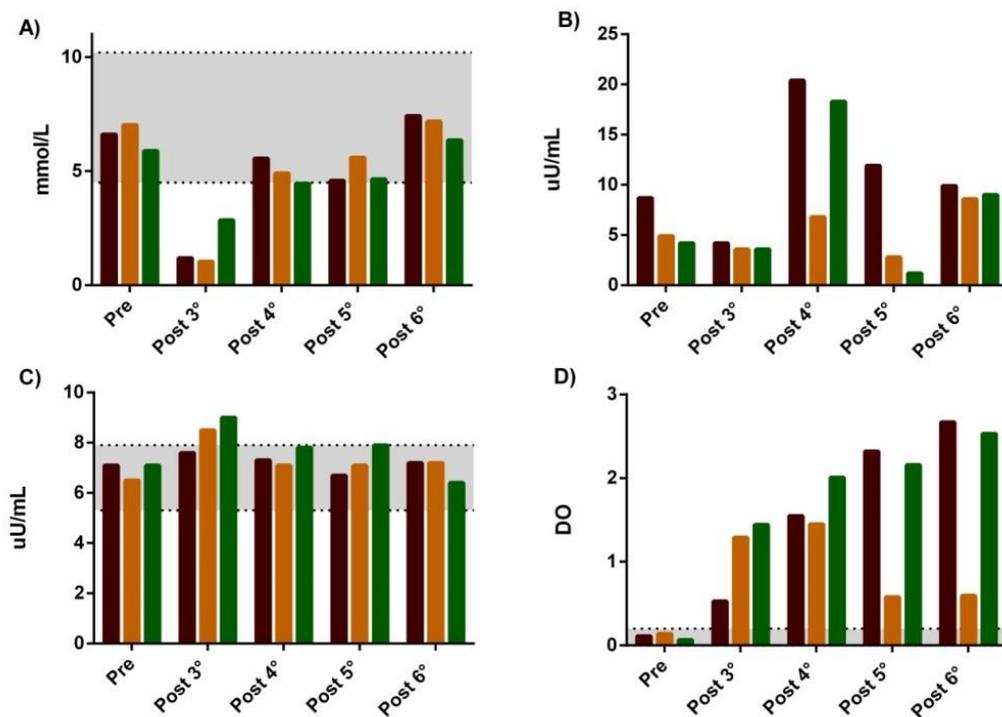
**Figura 9.** Evaluación del reconocimiento cruzado de los sueros Anti-IE de conejos. Reconocimiento de los sueros anti-IE post-sexta inmunización para cada formulación de insulina y protamina **A)** anti-Regular (1/4000) **B)** anti-NPH (1/1000), **C)** anti-Glargina (1/4000) y **D)** anti-IHNT (1/20). La gráfica muestra la media de las DO para cada molécula contra los sueros post-sexta inmunización de cada conejo. Se presenta un ensayo representativo, realizado en tres ocasiones por duplicado y la desviación estándar para cada barra.

#### 4.1.3. Niveles de Glucosa, insulina y proteínas totales de conejos Nueva Zelanda.

Con el objetivo de evaluar el *status* de cada conejo durante el esquema de inmunización, se valoraron parámetros bioquímicos relacionados con la administración de insulina (acción hipoglicemiante) y con la producción de AAI en las muestras tomadas durante el esquema de inmunización. A cada muestra se le analizaron los niveles de glucosa, insulina y proteínas totales (Figura 10). Los niveles de glucosa en suero, señalaron una disminución en la muestra tomada post-tercera inmunización para los tres conejos, lo que se asociaría con la aparición de AAI en las muestras de suero (Figura 10 A). Aunque el uso de un solo conejo por insulina administrada en el esquema de inmunización no permite concluir el posible efecto de los AAI sobre la acción hipoglicemiante de la insulina, en aras de discutir estos resultados -si se tiene en cuenta que los conejos empleados en el estudio eran normoglicémicos y que clínicamente no referían asociación con diabetes- la aplicación de IE, redujo los niveles de glicemia post-tercera inmunización. Sorprendentemente, los niveles de glucosa retornan a la normalidad en las muestras obtenidas a partir de la cuarta inmunización, lo que posiblemente se relaciona con el aumento en la producción de AAI y/o en un

aumento de la afinidad de éstos (Figura 10 D), permitiendo la neutralización de la insulina, la cual una vez acoplada al AAI, podría afectar su reconocimiento por el receptor de insulina, disminuyendo su actividad hipoglicemiante. Una forma de explicar estos resultados podría basarse en la posible actividad neutralizante de los AAI libres, los cuales podrían unirse no solo a las moléculas de IE, sino también a moléculas de insulina endógena.

Por otra parte, no se encontraron diferencias entre los niveles de proteínas totales evaluadas en cada punto del esquema de inmunización (Figura 10 C) respecto a los niveles basales obtenidos en cada individuo. Se sugiere valorar los niveles diferenciales de anticuerpos IgG, a fin de evidenciar si éstos se ven incrementados, o si se sostienen en rangos similares (de ser así, se pensaría en el incremento de la afinidad, en la medida que se aumente la exposición al inmunógeno).



**Figura 10.** Evaluación de los parámetros bioquímicos de conejos Nueva Zelanda inmunizados con Insulina exógena. Evaluación de **A)** Glicemia, **B)** Insulinemia, **C)** Proteínas totales y **D)** AAI. La gráfica muestra un único valor para cada parámetro evaluado.

#### 4.2. Estandarización de la técnica de ELISA Indirecta.

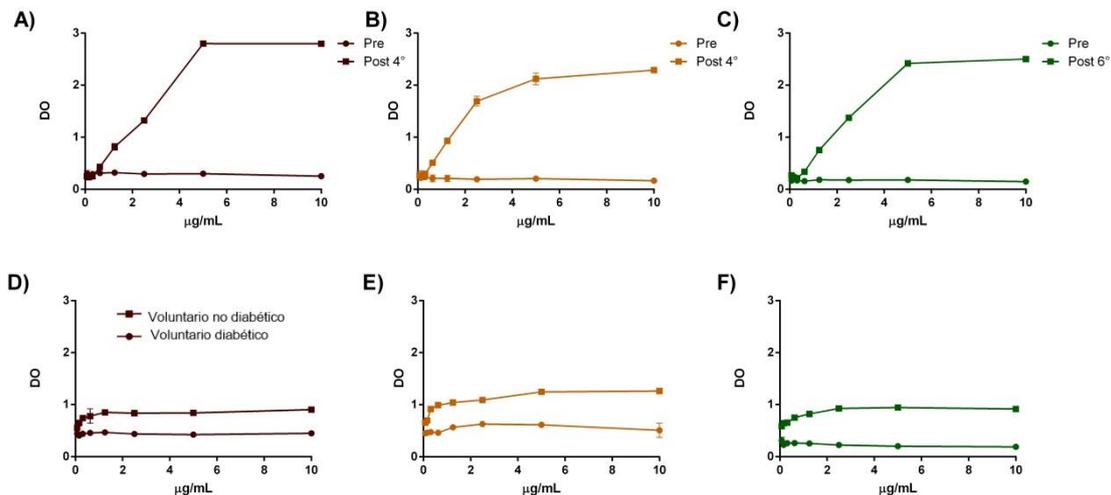
En la estandarización del ELISA indirecto para la detección de AAI, se utilizaron como control positivo (para la presencia de AAI) los sueros anti-IE derivados de conejo. Estos sueros permitieron evidenciar la adsorción de la de insulina a la placa y sugerir las posibles condiciones del ELISA para la detección de AAI en sueros humanos. Dadas las

diferencias entre la concentración de AAI en los sueros de los conejos inmunizados (producción de AAI como efecto deseado) y la concentración de AAI en sueros de diabéticos con tratamiento insulínico (Producción de AAI como efecto no deseado), se decidió estandarizar las condiciones óptimas de la inmunodetección (concentración de insulina, solución de bloqueo y dilución del conjugado) utilizando muestras séricas de voluntarios con terapia insulínica.

#### 4.2.1. Concentración óptima de insulina para adsorción a placa.

Buscando establecer la concentración óptima de insulina para sensibilizar cada pozo, se realizó una curva de saturación, utilizando seis diluciones seriadas de cada insulina (10 a 0.078  $\mu\text{g/mL}$ ). Las insulinas fueron detectadas utilizando el suero policlonal anti-IE derivado de conejo (Figura 11 A-C) y el suero de un voluntario con terapia insulínica (Figura 11 D-F), con el objetivo de establecer la concentración ideal de insulina en la detección de AAI en sueros humanos, ya que se esperaba tener una menor concentración de AAI en humanos tratados con insulina, respecto al suero de los conejos inmunizados.

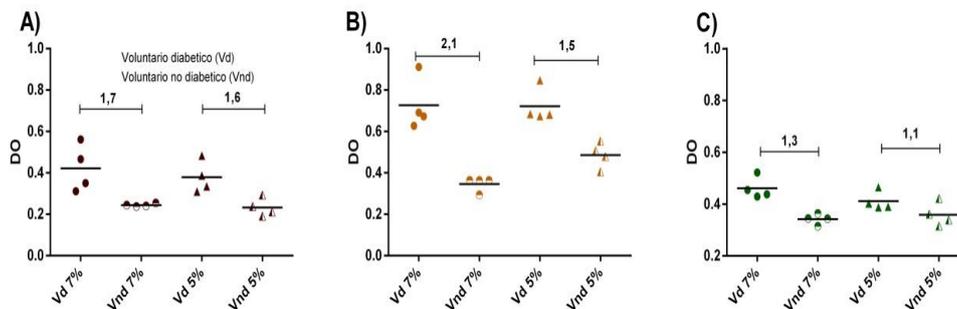
La concentración óptima de recubrimiento se define como la concentración a una temperatura, tiempo y amortiguador definido donde el suero estándar o el control positivo alcanzan el mayor reconocimiento del antígeno y se obtiene el menor reconocimiento por el suero control negativo y el blanco [72]. De acuerdo con lo anterior, se estableció el uso de 5  $\mu\text{g/mL}$  de cada formulación para la detección de AAI en muestras séricas derivadas de conejos y 10  $\mu\text{g/mL}$  para la detección de AAI en muestras séricas humanas (Figura 11).



**Figura 11.** Determinación de la concentración óptima de insulina a adsorber a placa en el ELISA indirecta. La concentración óptima de **A y D)** Regular, **B y E)** Gargina y **C y F)** NPH se determinó usando suero anti-IE de conejo y suero humano positivo para AAI, respectivamente. Las gráficas presentan la media de las DO contra las concentraciones de Insulina. Se muestra un ensayo representativo, realizado en dos ocasiones por duplicado y la desviación estándar para cada punto

#### 4.2.2. Porcentaje de leche descremada a emplear como solución de bloqueo.

Las soluciones de bloqueo en el ELISA, tienen como función principal unirse a los sitios de la placa donde no se adsorbió el antígeno (IE) favoreciendo de esta manera las uniones Antígeno-Anticuerpo específicas [73]. Entendiendo la importancia de este paso, se determinó el porcentaje de leche descremada a emplear como componente fundamental de la solución de bloqueo. Dicha valoración se realizó mediante la utilización de leche descremada al 5% y 7% en PBS-T. Los resultados evidenciaron que el porcentaje de leche descremada que permitía observar diferencias claras entre sueros de cuatro voluntarios diabéticos con tratamiento insulínico y los cuatro voluntarios normoglicémicos, según el cálculo del IR (cociente de las DO obtenidas de cada suero evaluado sobre la media de las DO de los sueros de voluntarios no diabéticos) fue de 7% para las tres formulaciones evaluadas (Figura 12 A-C). Lo anterior en razón a que los IRs obtenidos al usar leche descremada al 7% (Regular 1,7, NPH 2,1 y Glargina 1,3) fueron mayores a los obtenidos al usar leche descremada al 5% (Regular 1,6, NPH 1,5 y Glargina 1,1). Por lo tanto se estableció el uso de leche descremada al 7% en la solución de bloqueo.

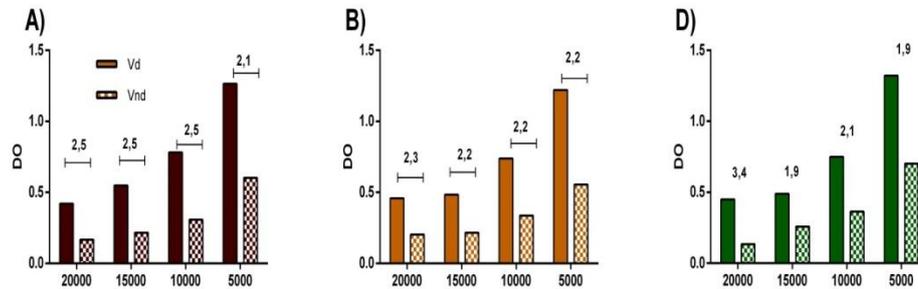


**Figura 12.** Determinación de la solución de bloqueo a emplear en el ELISA indirecto. Se estableció el porcentaje de leche descremada a usar en la inmunodetección de AAI para: **A)** Regular, **B)** NPH y **C)** Glargina. Las gráficas muestran la media de las Densidades Ópticas (DO) contra el porcentaje de leche descremada usada. Los ensayos fueron realizados por duplicado y muestran la media para cada grupo.

#### 4.2.3. Dilución del anticuerpo anti-IgG humana conjugado con peroxidasa.

Para determinar la dilución óptima de anticuerpo anti-IgG humana como herramienta fundamental en la inmunodetección de AAI por ELISA, se usó el suero de un voluntario no diabético y el suero de un voluntario con terapia insulínica y, se analizaron cuatro diluciones del conjugado (1/5000, 1/10000, 1/15000 y 1/20000). Según el cálculo del IR (cociente de las DO obtenidas de cada suero evaluado sobre la media de las DO de los sueros de voluntarios no diabéticos) se estableció a 1/20000, como la mayor dilución del conjugado capaz de evidenciar diferencias entre el voluntario con terapia insulínica y el voluntario normoglicémico para las tres formulaciones (Figura 13 A-C). En el caso de las insulinas Regular y Glargina se estableció a 1/20000, como la dilución óptima de

conjugado ya que los IRs obtenidos al usar esta dilución (Regular 2,3 y Glargina 3,4) fueron mayores a los obtenidos al usar las demás diluciones y en el caso de la insulina NPH en donde 1/20000, 1/15000 y 1/10000 tuvieron IRs de 2,5, se escogió a 1/20000 por ser la dilución más alta que tuvo un IR de 2,5.

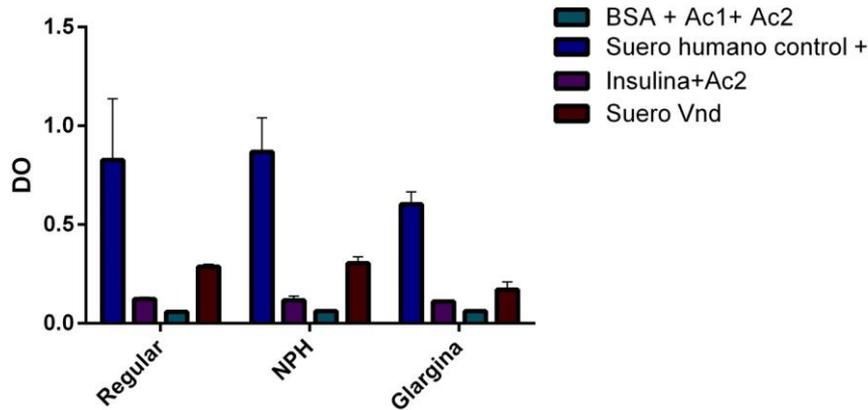


**Figura 13.** Determinación de la dilución del anticuerpo anti-IgG humano a emplear en el ELISA indirecto. Se estableció la dilución del anti-IgG humano a usar en la inmunodetección de AAI para: **A)** Regular, **B)** NPH y **C)** Glargina. Las gráficas muestran la media de las densidades ópticas (DO) contra la dilución del anti-IgG humano. Los ensayos fueron realizados por duplicado y muestran la media para cada grupo.

#### 4.2.4. Evaluación de la Elisa indirecta para la detección de AAI.

Con el fin de evaluar la especificidad de la ELISA indirecta para la detección de AAI libres, se plantearon cuatro controles: *i)* se evaluó el reconocimiento del anticuerpo primario (Suero control positivo para AAI) frente un proteína no relacionada, para esto se sensibilizaron pozos con Albúmina Sérica Bovina (BSA), se incubaron con el suero control positivo y se revelaron con anti-IgG humano (BSA+Ac1+Ac2), *ii)* se evaluó la unión inespecífica del anticuerpo secundario (Ac2), sensibilizando de manera individual los pozos con cada IE y revelando, en ausencia del control positivo (AC1) con anti-IgG humano (Insulina+Ac2), *iii)* se evaluó la reactividad de sueros procedentes de voluntarios no diabéticos (Vnd) y *iv)* la reactividad del suero de un voluntario positivo para AAI (control+), como se observa en la Figura 14.

Las Densidades Ópticas (DO) derivadas al evaluar estos controles, sugieren una alta especificidad de la unión antígeno-anticuerpo (IE-AAI) detectada por el de ELISA indirecto, ya que el sistema no mostró señales positivas (DO mayores a las obtenidas por el suero del Vnd) en ausencia de insulina (Ag) o de suero positivo (Ac1), pero sí cuando los pozos fueron sensibilizados con IE e incubados con el control positivo. Como se evidencia en la Figura 14 los resultados obtenidos fueron similares para los tres sistemas de detección (detección de Anticuerpos anti-Insulina Regular, anti-NPH y anti-Glargina).



**Figura 14.** Evaluación del sistema de ELISA indirecto para la detección de AAI. **A)** Sistema de detección de Anticuerpos anti-Insulina Regular, **B)** Sistema de detección de Anticuerpos anti-NPH y **C)** Sistema de detección de Anticuerpos anti-Glargina. Las gráficas muestran la media de las densidades ópticas (DO) contra los controles evaluados. Este ensayo es representativo de tres ensayos, realizado por duplicado y muestra la desviación estándar para cada barra.

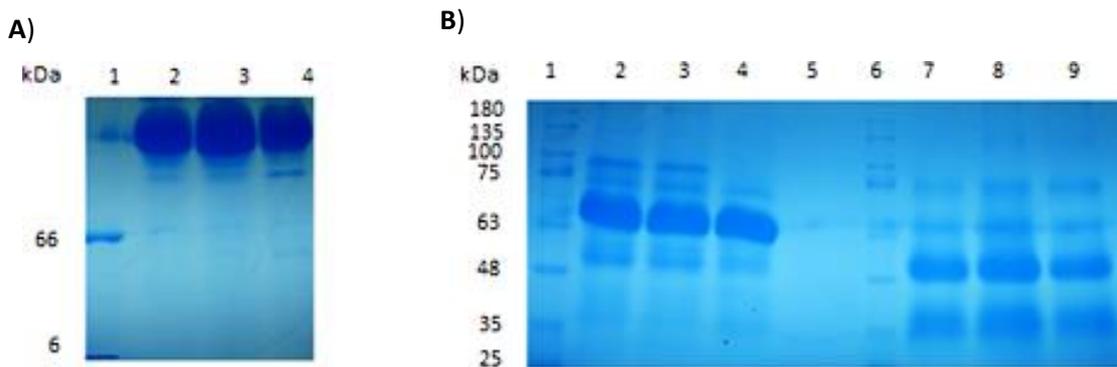
#### 4.3. Estandarización de la técnica de Elisa de captura.

En la estandarización del ELISA de captura para la detección de AAI unidos a la molécula de insulina (AAI-IE), se usaron como control positivo, complejos inmunes AAI-IE formados *in vitro*. Estos complejos permitieron confirmar las condiciones óptimas del ELISA de captura. Las variables evaluadas para la inmunodetección de complejos inmunes fueron la dilución del anticuerpo de captura (Anti-IE de conejo previamente depurado), la dilución de la muestra analizada y la del anticuerpo anti-IgG humano.

##### 4.3.1. Depuración y titulación del anticuerpo de captura.

Un paso clave en la estandarización del ELISA en Sándwich, es la obtención de un anticuerpo de captura con la mayor pureza posible, ya que la pureza y la calidad de este se han asociado con la especificidad de la prueba [74, 75]. Entendiendo la importancia del proceso de depuración del suero anti-IE para su uso como anticuerpo de captura, los sueros se trataron con ácido caprílico y sulfato de amonio. Para evaluar la efectividad del proceso de depuración, se corrieron dos geles de electroforesis, el primero en condiciones no denaturantes y el segundo en condiciones denaturantes y reductoras (SDS-Page) los dos al 12.5 % de poliacrilamida. En los dos geles se colocaron 120 µg de cada anticuerpo. En el corrido electroforético de condiciones no denaturantes, las muestras fueron colocadas en el siguiente orden: en el carril 1, el patrón de peso molecular (Albúmina y Protamina) y en los carriles 2 al 4, los sueros obtenidos después del proceso de depuración (Figura 15 A). Este corrido electroforético evidencia una banda a la altura de 150 kDa compatible con la masa molecular de la inmunoglobulina G (IgG) [76]. El proceso de depuración de los AAI también se evaluó por medio de un corrido electroforético en condiciones reductoras

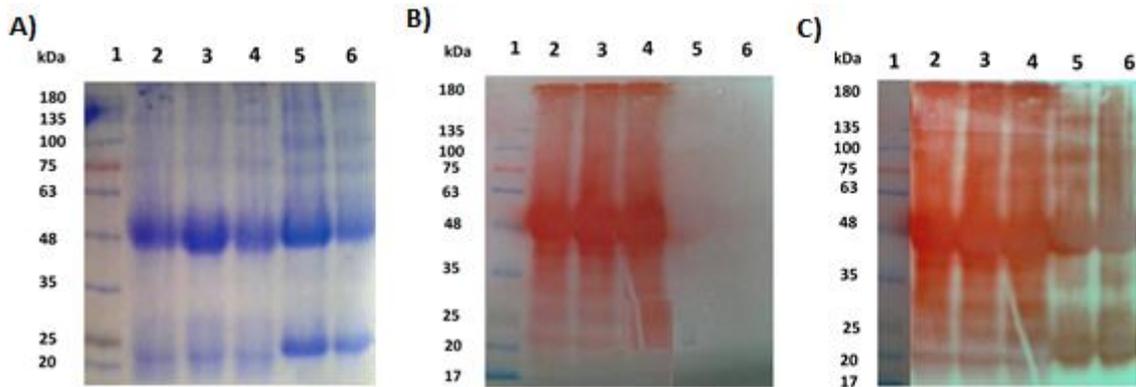
(Figura 15 B), en el cual se colocó en el carril 1, el patrón de peso molecular, del carril 2 al 4 los sueros antes del proceso de depuración, en el carril 5 el tampón de carga, en el carril 6 patrón de peso molecular y del carril 7 al 9, los sueros que contenían los AAI después del proceso de depuración. En este gel se observaron dos bandas, una a la altura de 55 kDa y otra a la altura de 25 kDa, datos compatibles con las masas moleculares de las cadenas pesadas y livianas de la IgG respectivamente (Figura 15 B) [76]. Aunque dichas bandas se encuentran acompañadas de dos bandas de mayor masa molecular, posiblemente Albúmina y/u otra proteína, lo evidenciado en los geles corridos tanto en condiciones no denaturantes como reductoras, sugiere con alta probabilidad, que se logró enriquecer la muestra con IgG.



**Figura 15.** Anticuerpos anti-IE después de la depuración con Ácido Caprílico y Sulfato de Amonio. **A)** Gel de electroforesis al 12.5% de poliacrilamida en condiciones no denaturantes, en el carril 1, patrón de peso molecular (Albumina 66 kDa y protamina 6 kDa), carril 2 anti- Regular depurado, carril 3 anti NPH depurado y carril 4 anti-Glargina depurado. **B)** Gel de electroforesis al 12.5% de poliacrilamida en condiciones reductoras, En el carril 1 patrón de peso molecular, carril 2 suero anti- Regular sin depurar, carril 3 suero anti-NPH sin depurar, carril 4 suero anti-Glargina sin depurar, carril 5 buffer de carga, carril 6 patrón de peso molecular, carril 7 anti-Regular depurado, carril 8 anti-NPH depurado y carril 9 anti-Glargina depurado.

Con la intención de confirmar que las bandas encontradas en los geles de electroforesis corridos tanto en condiciones no denaturantes como reductoras corresponden a IgG de conejo y humano, se corrieron nuevamente dos geles en condiciones reductoras, uno de los cuales se tiñó con Azul de Coomassie (Figura 16 A) y su replica, se transfirió a una membranda de nitrocelulosa para posterior detección con anticuerpos anti-IgG de conejo y humano. Brevemente, los geles se transfirieron durante tres horas y media a 10 V, posteriormente las membranas se bloquearon con leche al 5% en PBS-T, se revelaron en un primer momento con anti-IgG de conejo (Figura 16 B) y luego con anti-IgG de humano (Figura 16 C); como ambos anti-IgG estaban conjugados con peroxidasa, se usó como sustrato solución de Carbazol y Peróxido de hidrógeno. Los resultados obtenidos confirman la presencia de IgG de conejo (Figura 16 B) y humana (Figura 1 C) en las muestras, después del proceso de depuración, ya en que para ambas inmunodetecciones se observan dos bandas: la primera a la altura 55 kDa y la segunda a la altura de 25 kD. Estos datos resultan

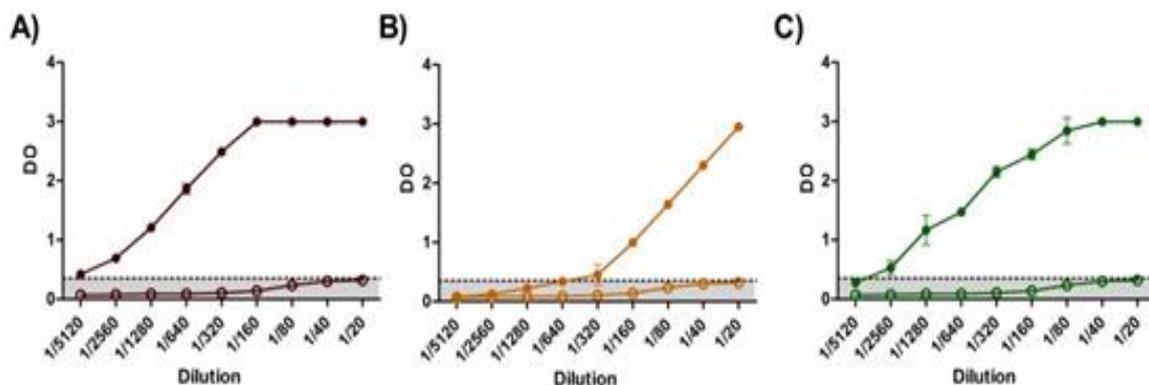
compatibles con las masas moleculares de las cadenas pesadas y livianas de la IgG respectivamente (Figura 16 B y C) [76].



**Figura 16.** Inmunoglobulina G (IgG) de conejo y humano después de la depuración con Ácido Caprílico y Sulfato de Amonio. **A)** Gel de electroforesis al 12.5% de poliacrilamida en condiciones reductoras, en el carril 1, patrón de masa molecular, carril 2 anti-Insulina Regular, carril 3 anti-NPH y carril 4 anti-Glargina, los tres derivados de conejo y en los carriles 5 y 6 IgG de de un voluntario diabético y un voluntario sano, respectivamente. **B)** Western Blot con anti-IgG de conejo y **C)** Western Blot contra IgG de humano.

Una vez depurados los sueros, se procedió a determinar sus títulos y las diluciones óptimas (dilución a la que las DO para los tres anticuerpos es equiparable) a usar en los ELISAS de captura. Para lo cual primero se evaluó el título de los AAI; la titulación se realizó usando 9 diluciones seriadas que iniciaron en 1/20 y terminaron en 1/5120. Los resultados obtenidos para dichas diluciones se grafican en la Figura 17. La dilución mayor capaz de reconocer la IE unida a placa, fue de 1/2560 para anti-Insulina Regular y anti-Glargina (Figura 17 A y C, respectivamente) y de 1/160 para anti-NPH (Figura 17 B). Los datos obtenidos sugieren que después del proceso de depuración los anticuerpos anti-IE siguen reconociendo el antígeno con el cual fueron inducidos, aunque en una menor medida. Teniendo en cuenta que la exposición de anticuerpos a pHs extremos y concentraciones altas de sal (las cuales son claves en el proceso de depuración) se han asociado con la pérdida de la solubilidad, estabilidad y reconocimiento de éstos por su antígeno [77]; los datos aquí obtenidos pueden deberse a este fenómeno .

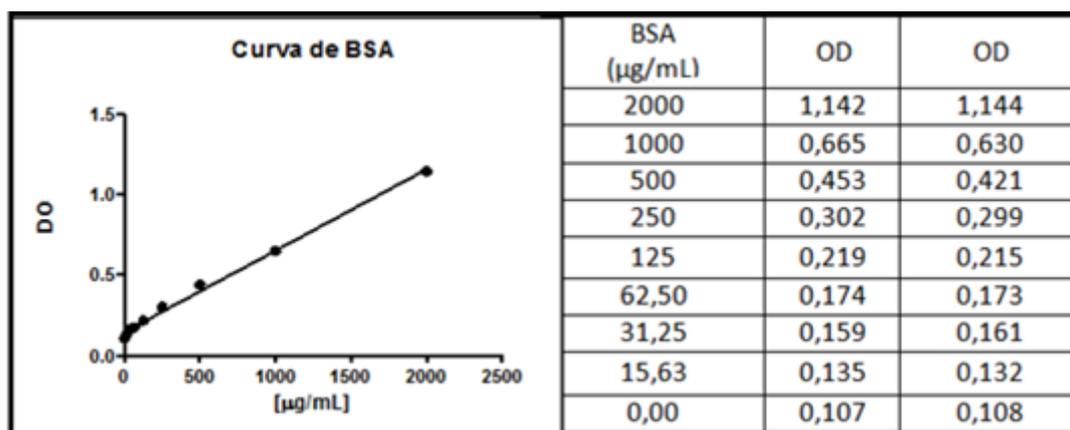
Las titulaciones de los AAI además de establecer el título para cada uno de éstos, también permitieron establecer la dilución óptima de anticuerpo AAI (dilución a la que las DO para los tres anticuerpos es equiparable) para su uso como anticuerpo de captura, las cuales fueron de en 1/1250 para anti-Insulina Regular y anti-Glargina, 1/100 para anti-NPH.



**Figura 17.** Titulación de los sueros anti-IE de conejo después del proceso de depuración. **A)** Suero anti-Insulina Regular, **B)** Suero anti-NPH y **C)** Suero anti-Glargina. Las gráficas muestran las medias de las densidades ópticas (DO) contra diluciones del suero. Este ensayo es representativo de tres ensayos realizados, corrido por duplicado y muestra la desviación estándar para cada punto.

#### 4.3.2. Cuantificación de proteínas después del proceso de depuración.

Para determinar la concentración de proteína (IgG) en el suero anti-IE después del proceso de depuración, se utilizó el método del Ácido Bicinconínico (BCA) (Pierce, BCA™ Protein Assay Kit), el cual se desarrolló incubando a 37 C durante 30 minutos 25  $\mu$ L de cada muestra (diluida con factor de 16) con 200  $\mu$ L de solución de trabajo para luego leer la reacción a 562 nm. Como curva estándar se utilizaron diluciones seriadas de BSA (Figura 18). Las Densidades Ópticas (DO) obtenidas se interpolaron con la curva de calibración y los datos obtenidos se multiplicaron por el Factor de Dilución (FD). La utilización de este método permitió establecer que la concentración de proteínas presente en el suero anti-Regular, anti-NPH y anti-Glargina después del proceso de depuración, fue de 20,892, 18,570 y 24439  $\mu$ g/mL respectivamente (Tabla 2).



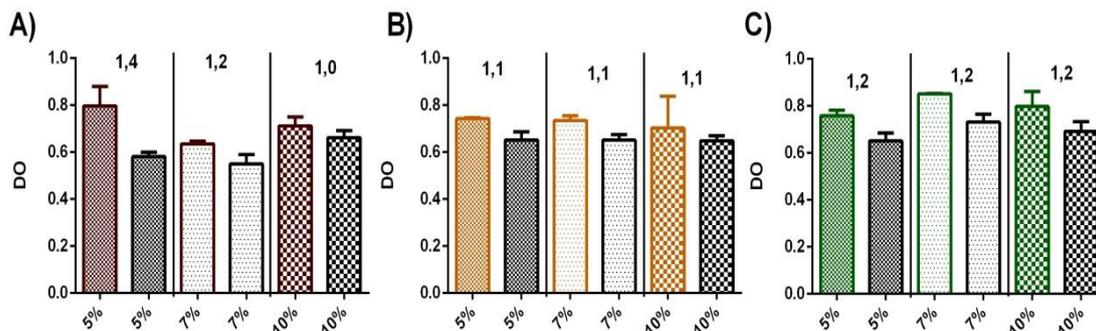
**Figura 18.** Curva de calibración con Albumina Sérica Bovina

Muestra evaluada	µg/ml	OD	Concentración
	Dilución (1/16)	Dilución (1/16)	µg/mL
Pos-sexta Regular purificada	1305	0,804	20892
Pos-sexta NPH purificada	1161	0,731	18570
Pos-sexta Glargina purificada	1527	0,916	24439

**Tabla. 2** Concentración de proteína (IgG) en los sueros anti-IE después del proceso de depuración con Ácido Caprílico y Sulfato de Amonio.

**4.3.3. Porcentaje de leche descremada a emplear como solución de bloqueo.**

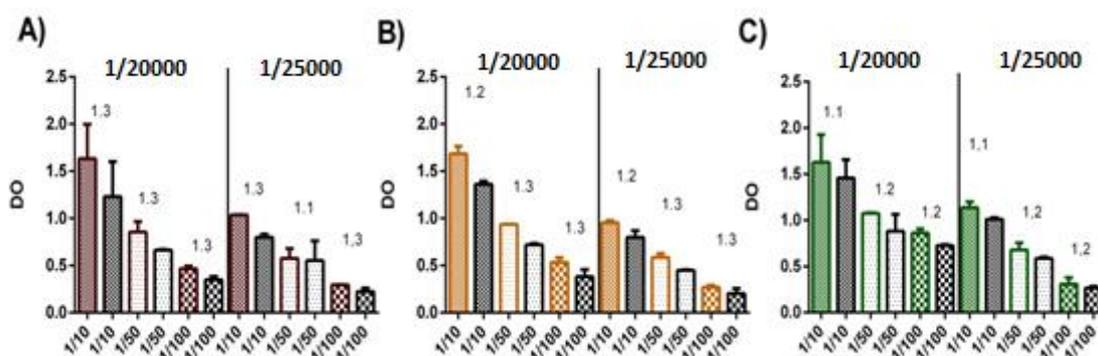
Se determinó el porcentaje de leche descremada a emplear como componente fundamental de la solución de bloqueo. Dicha valoración se realizó mediante la utilización de leche descremada al 5%, 7% y 10% en PBS-T. Los resultados no evidenciaron diferencias entre el uso de leche descremada al 5%, 7% y 10% según el cálculo del IR (cociente de las DO obtenidas de cada suero evaluado sobre la media de las DO de los sueros de voluntarios no diabéticos) encontrando IRs de 1,4, 1,2 y 1,0 al usar 5%,7% y 10% de leche descremada respectivamente para el sistema de detección de complejos AAI-Regular (Figura 19 A); y para los sistemas detección de complejos AAI-NPH (Figura 19 B) y AAI-Glargina (Figura 19 C) se encontró IRs de 1,1 y 1,2 para los tres porcentajes respectivamente. Por lo tanto se estableció el uso de leche descremada al 5% en la solución de bloqueo, por ser el porcentaje más bajo que sugiere diferencias entre el suero del voluntario diabético y el voluntario no diabético.



**Figura 19.** Determinación del porcentaje de leche a usar en la solución de bloqueo del ELISA de captura. Se estableció el porcentaje de leche descremada a usar en la Inmunodetección de CI constituidos por AAI unidos a: **A)** Insulina Regular, **B)** NPH y **C)** Glargina. Las gráficas muestran la media de las densidades ópticas (DO) contra el porcentaje de leche descremada usada. Las barras negras corresponde a las DO de obtenidas al usar suero de voluntarios no diabético. Los ensayos fueron realizados por duplicado en dos oportunidades y muestran la media para experimento.

#### 4.3.4. Dilución de la muestra y del anticuerpo anti-IgG humana.

Teniendo en cuenta que el uso de altos porcentajes de leche descremada no logró disminuir las absorbancias obtenidas en el ELISA de captura (altas absorbancias que pueden enmascarar el resultado) ni evidenciar diferencias claras entre el suero del voluntario diabético y el suero del voluntario no diabético, se procedió a determinar la dilución óptima de la muestra (Ac 1) y del conjugado (anti-IgG humano). Para lo anterior, se usaron tres diluciones tanto del suero del voluntario diabético con tratamiento insulínico como del voluntario no diabético (1/10, 1/50 y 1/100) y dos diluciones del conjugado: 1/20000 Y 1/25000. Según el cálculo del IR (cociente de las DO obtenidas de cada suero evaluado sobre la media de las DO de los sueros de voluntarios no diabéticos) se estableció a 1/100 como la dilución óptima de la muestra de suero para los tres sistemas de detección, debido a que a esta dilución las DO del suero del voluntario no diabético fueron menores a 0.200 (DO sugerida como límite inferior de la detección en ELISA) y el IR sugiere diferencias con el suero del voluntario diabético (Figura 20 A-C). Por esta misma razón, se estableció 1/25000, como la máxima dilución del conjugado para los tres sistemas de captura (Figura 20 A-C).



**Figura 20** Determinación de la dilución de la muestra a evaluar y del anticuerpo anti-IgG humano a emplear en el ELISA de captura. Se estableció la dilución del anti-IgG humano a usar en la inmunodetección de complejos AAI-IE para: **A)** AAI-Regular, **B)** AAI-NPH y **C)** AAI-Glargina. Las gráficas muestran la media de las DO contra la dilución del anti-IgG humano. Los ensayos fueron realizados por duplicado en dos ocasiones y muestran la media para cada grupo.

#### 4.3.5. Formación *in vitro* de complejos inmunes AAI-IE.

La formación *in vitro* de los Complejos Inmunes (CI), se fundamenta en la interacción Antígeno-Anticuerpo que en condiciones óptimas de incubación (tiempo, temperatura y solución amortiguadora) se genera por uniones débiles, entre las cuales se encuentran interacciones hidrofóbicas, fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno y fuerzas iónicas, que se encuentran presentes entre los aminoácidos que conforman cada proteína [78]. Teniendo en cuenta lo anterior se procedió a establecer un control positivo (AAI-IE) que permitiera comprobar que el sistema de captura estandarizado es capaz de detectar CI constituidos por Anticuerpos Anti Insulina (AAI) e Insulina Exógena (IE). Para lograr lo planteado, se incubó 150  $\mu$ L de IgG humana depurada del suero de un diabético positivo para AAI con 19,2  $\mu$ L de insulina (la

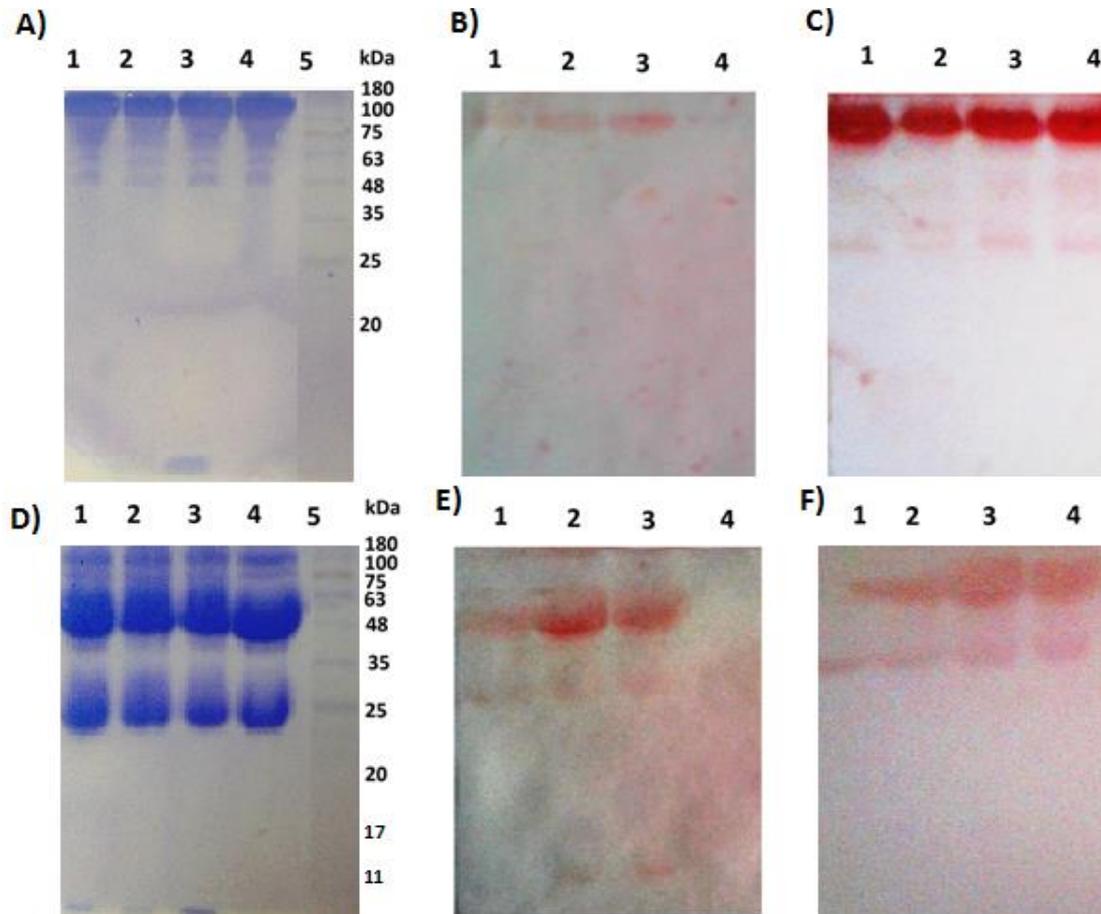
formación de complejos fue independiente para cada insulina analizada). La incubación se realizó durante 1 hora a 37°C, antes y después de la incubación a 4°C por 16 horas y en agitación constante.

Con la intención de evidenciar la presencia de CI después de la incubación de cada insulina con IgG depuradas, se corrieron cuatro geles de poliacrilamida al 12,5% dos en condiciones no denaturantes y dos en condiciones denaturantes y reductoras (Figura 16 A y D, respectivamente). Uno de los geles no denaturantes y uno de los geles denaturantes y reductores fueron teñidos con azul de Coomassie, evidenciando para el primer caso en los cuatro carriles (carril 1 AAI-Regular, carril 2 AAI-NPH, carril 3 AAI-Glargina y carril 4 AAI solo) una banda a la altura de 150 kDa compatible con la masa molecular de la inmunoglobulina G (IgG) [76]. Interesantemente en el carril 4 se evidencia una banda de 6 kDa aproximadamente compatible con la masa molecular de la insulina, que para este caso es Glargina (Figura 21 A). El hecho de que en el gel no reductor -donde se sembraron los complejos formados por AAI-Regular y AAI-NPH (carriles 1 y 2 respectivamente)- solo se evidencie una banda a la altura de 150 kDa, sugiere la posible formación de CI ya que de no formasen, se esperaría que corrieran la banda de IgG (banda de 150kDa) e insulina (Banda de 6kDa) por separado, como se evidencia en el carril 3 donde se colocó el complejo formado por AAI y Glargina (Figura 21 A). Aunque la presencia de la banda de insulina en este caso (AAI-Glargina), no descarta la formación de CI.

Al observar el gel corrido en condiciones denaturantes y reductoras, se presentan tres bandas en los carriles 1-3, las primeras a la altura de 55 y 25 kDa [76] y la última a la altura de 6 kDa aproximadamente, datos compatibles con las masas moleculares de las cadenas pesadas y livianas de la IgG y la insulina respectivamente (Figura 21 D). En el carril 4 de este gel, solo se observan las primeras bandas a la altura de 55 y 25 kDa, resultado que se esperaba ya que en este carril solo se colocó IgG. Los resultados obtenidos tanto en el gel en condiciones no denaturantes, como en el gel denaturante y reductor, sugieren la formación de CI con las insulina Regular y NPH, ya que en condiciones no denaturantes solo se observa la banda a la altura de 150 kDa, pero en condiciones denaturantes (temperatura de ebullición) y reductoras (presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol), se logran observar las tres bandas, compatibles con las masas moleculares de la insulina y las cadenas livianas y pesadas de las IgG.

Para confirmar los resultados obtenidos en los geles de electroforésis, los cuales sugieren la formación *in vitro* de CI, se transfirieron sus réplicas a membranas de nitrocelulosa y se revelaron en un primer momento con anticuerpos anti-IE producidos en conejo (Anti-Insulina Regular, anti-NPH y anti-Glargina), como se muestra en la Figura 21 B y D y en un segundo momento se revelaron con anti-IgG humano como se muestra en la Figura 21 C y F, observando la presencia de insulina a la altura de 150kDa en la membrana de condiciones no denaturantes (Figura 21 B) y a la altura de 55, 25 y 6 kDa, en la membrana de condiciones denaturantes y reductoras en los carriles 1-3 (Figura 21 E). Cuando se reveló con anti-IgG humano se intensifican las bandas observadas a la altura de 150 kDa en condiciones no denaturantes y a la altura de 55 y 25 kDa, en condiciones denaturantes y reductoras. Estos resultados confirman la

formación *in vitro* de CI AAI-IE (Para las tres insulinas monitoreadas) y sugieren su posible uso como control positivo para el ELISA de captura.



**Figura 21.** Formación *in vitro* de complejos inmunes AAI-IE. La evaluación de los complejos AAI-IE formados *in vitro* se realizó por medio de: **A)** Gel de electroforesis al 12.5% en condiciones no denaturantes, **B)** Western Blot para la inmunodetección de insulina en condiciones no denaturantes, **C)** Western Blot para la inmunodetección IgG en condiciones no denaturantes, **D)** Gel de electroforesis al 12.5% en condiciones denaturantes y reductoras, **E)** Western Blot para la inmunodetección de insulina en condiciones denaturantes y reductoras y **F)** Western Blot para la inmunodetección de IgG en condiciones denaturantes y reductoras. En el **carril 1** complejos formados *in vitro* por AAI e Insulina Regular, **carril 2** por AAI e Insulina NPH, **carril 3** AAI e Insulina Glargina y **carril 4** AAI y en el **carril 5** el patrón de masa molecular. Las fotografías corresponden a un ensayo representativo realizados en tres ocasiones.

#### 4.3.6. Evaluación del ELISA de captura para la detección de CI.

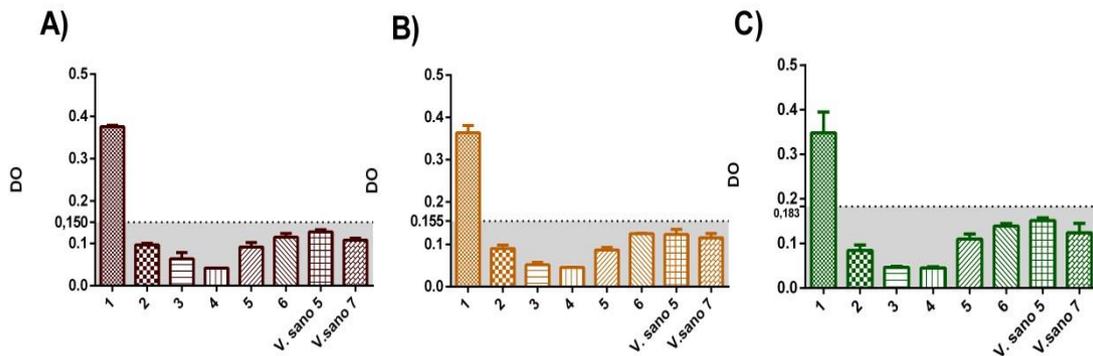
Con el fin de evaluar la especificidad del sistema de captura para la detección de CI constituidos por AAI e IE, se analizaron las Densidades Ópticas (DO) obtenidas al examinar por este sistema los CI formados *in vitro* con AAI depurados e insulina Regular (Figura 22 A), NPH (Figura 21 B) y Glargina (Figura 22 C). También se evaluaron las DO en presencia (Figura 22, control N 1) y ausencia (Figura 22, control N 2) de suero

positivo para AAI. En la misma placa se analizaron las señales emitidas por el sistema (DO) en ausencia de Anti-IgG (Figura 22, control N 3), anticuerpo de captura (Figura 22, control N 4) y sustrato (Figura 22, control N 5). Las DO obtenidas de los controles del 2-5, en los tres sistemas de captura fueron menores a 0,046, 0,049 y 0,050 para el sistema AAI-Regular, AAI-NPH y AAI-Glargina respectivamente. Lo anterior demuestra que el sistema de detección en ausencia de alguno de sus componentes (Anticuerpo de captura, anti-IgG, AAI, insulina y TMB) no detecta señales positivas, sugiriendo la confiabilidad de este. Por otro lado, se evaluaron las DO obtenidas al analizar por los tres sistemas de captura el suero de un voluntario sano, encontrando DO menores a 0.150, 0,155 y 0,183 para el sistema de inmunodetección de AAI-Regular, AAI-NPH y AAI-Glagina respectivamente. La tabla 3 muestra los controles evaluados en el ELISA de captura.

**Tabla 3.** Controles evaluados en el sistema de detección de CI AAI-IE.

Controles	Ac de captura	Bloqueo	Control + (AAI-IE)	Ac purificado	Insulina	Suero 1/100 diabético	Suero 1/100 Sano	Ac2 HRP 1/20000	TMB	HCL 1N
1	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+
2	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
3	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+
4	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+
5	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+
6	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+

El símbolo (+) significa la presencia del componente y (-) su ausencia.



**Figura 22.** Evaluación del ELISA de captura para la detección de CI AAI-Insulina. **A)** Sistema de detección de AAI-Regular, **B)** Sistema detección AAI-NPH y **C)** Sistema detección AAI-Glargina. Las gráficas muestran la media de las densidades ópticas (DO) contra los controles evaluados. Este ensayo es representativo, realizado por duplicado en tres ocasiones y muestra la desviación estándar para cada barra.

#### 4.4. Detección y caracterización de AAI en voluntarios diabéticos.

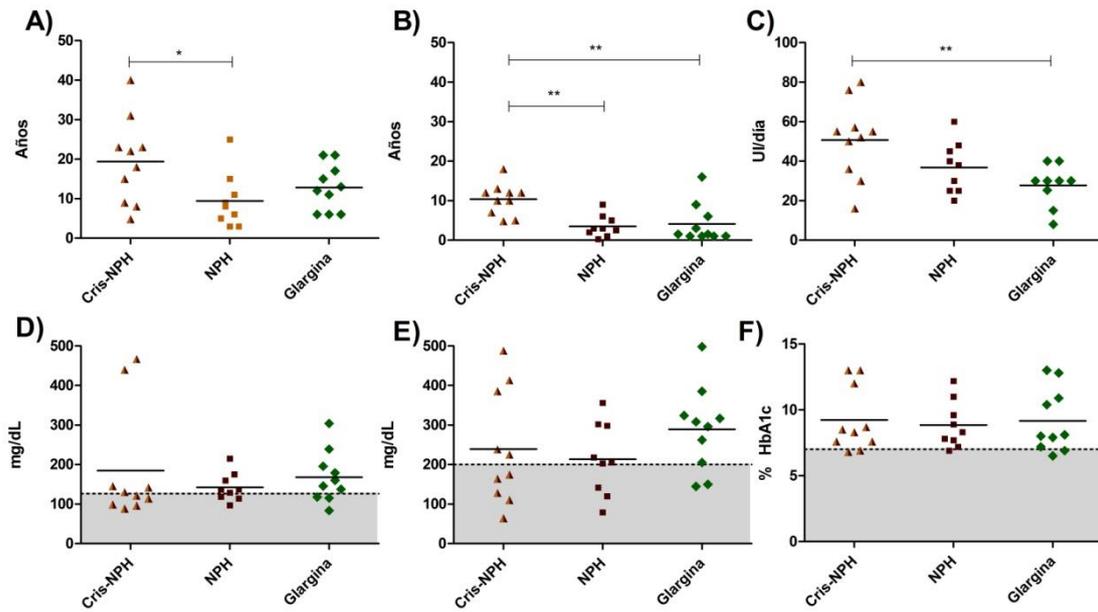
Teniendo estandarizada la técnica de ELISA indirecta para la detección de AAI y con el objetivo de evaluar su efectividad en la detección de AAI libres se procedió a evaluar 29 muestras séricas de voluntarios diabéticos tipo 2, tratados por más de tres meses con las insulinas evaluadas. Estos voluntarios diabéticos se clasificaron según su terapia insulínica actual, analizando además con estas muestras parámetros clínicos y bioquímicos que permitieron la caracterización de los grupos experimentales para la detección de AAI, la evaluación de su reactividad y la determinación su perfil de isotipos IgG.

##### 4.4.1. Caracterización de los grupos experimentales.

Con el ánimo de caracterizar clínicamente los grupos experimentales humanos formados para la detección de AAI, los 29 voluntarios se clasificaron en tres grupos, de acuerdo a su tratamiento insulínico actual: *i)* Regular-NPH, *ii)* NPH y *iii)* Glargina. Los datos obtenidos de sus historias clínicas y los parámetros bioquímicos de interés evaluados en sus muestras séricas fueron analizados. En primera instancia se analizó la edad, el sexo y el Índice de Masa Corporal (IMC), sin encontrar diferencias estadísticamente significativas para la edad y sexo, pero si para el IMC, siendo este mayor en el grupo tratado con Regular-NPH y menor en tratado con NPH (tabla 4). Al evaluar variables relacionadas con el diagnóstico y el tratamiento de la diabetes, tales como, el tiempo de diagnóstico, el tiempo de la terapia insulínica y la dosis diaria de insulina. Se encontró que el grupo tratado con Regular-NPH, se correlaciona con los valores más altos en las variables mencionadas (Figura 23 A-C). Al analizar parámetros bioquímicos tales como, el porcentaje de hemoglobina glicosilada (HbA1C%), la glicemia preprandial (Glicemia pre) y postprandial (Glicemia post), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (Figura 23 D-F). El porcentaje de hemoglobina glicosilada fue mayor a 8 en todos los grupos, lo que permite clasificar a los voluntarios como diabéticos no controlados.

**Tabla 4.** Características generales y parámetros metabólicos de voluntarios diabéticos según su tratamiento insulínico actual. Los datos representan la media  $\pm$  la Desviación Estándar (DE).

	Total n= 29	Tratamiento actual		
		Regular-NPH n= 10	NPH n=9	Glargina n=10
Edad (años)	54,6 (16,3)	58,0 (21,3)	49,4 (17,3)	55,7 (8,0)
Sexo M/F	17/12	6/4	5/4	6/4
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	28,3 (4,7)	25,8 (3,3)	31,5 (5,9)	28,0 (2,9)
Diagnóstico de Diabetes ( años)	14,0 (9,0)	19,4 (10,9)	9,4 (7,0)	12,8 (5,8)
Tiempo de terapia insulínica (años)	6,0 (4,6)	10,4 (4,0)	3,5 (2,7)	4,1 (5,0)
Dosis total de insulina (UI/d)	38,5 (17,2)	46,1 (24,0)	36,8 (13,0)	27,8 (9,9)
HbA1C (%)	9,1 (2,2)	9,2 (2,4)	8,8 (1,8)	9,2 (2,4)
Glicemia pre (mg/dL)	165,6 (92,9)	184,2 (143,2)	142,4 (35,9)	167,7 (65,2)
Glicemia Pos (mg/dL)	248,4 (116,9)	239,0 (142,7)	213 (91,8)	289,1 (107,2)



**Figura 23.** Análisis de datos clínicos y bioquímicos de voluntarios diabéticos tratados con insulina. **A)** Tiempo de diagnóstico, **B)** Tiempo con terapia insulínica, **C)** Unidades de insulina administradas al día, **D)** Glicemia preprandial **E)** Glicemia postprandial **F)** Porcentaje de Hemoglobina Glicosilada (% HbA1c). Las gráficas muestran la desviación estándar para cada grupo.

#### 4.4.2. Inmunodetección y caracterización de la reactividad de AAI.

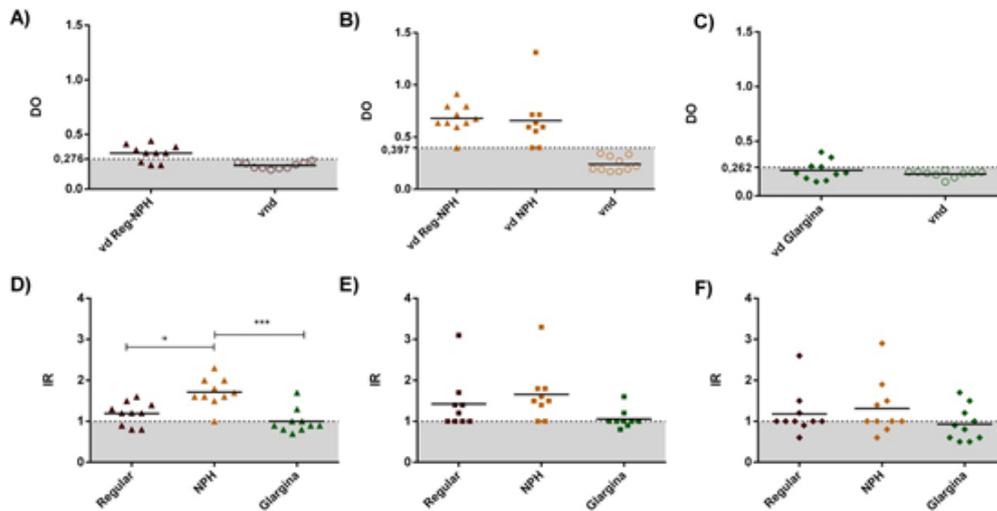
Con el fin de evaluar la técnica de ELISA indirecta previamente estandarizada, se procedió a detectar los AAI y caracterizar su reactividad frente a tres formulaciones comerciales de insulina humana, a cada muestra sérica se le evaluó la presencia AAI por medio del ELISA indirecto previamente estandarizado. Brevemente, la microplaca de ELISA se sensibilizó con 10 µg/mL de cada insulina, los sueros a evaluar se incubaron a 37°C durante 1 hora en dilución de 1/10, los AAI se detectaron con anti-IgG humano marcado con peroxidasa en dilución de 1/20000. Para establecer a partir de que Densidad Óptica (DO) se consideraba un reconocimiento positivo de AAI, a cada formulación se le estableció un punto de corte, el cual corresponde al promedio de las DO obtenidas de 10 sueros de voluntarios no diabéticos, más la suma de dos Desviaciones Estándar (DS). De acuerdo con lo anterior el punto de corte para los sueros reactivos para Regular, NPH y Glargina fue de 0,270, 0,346 y 0,256, respectivamente (Figura 24 A-C). Los resultados obtenidos establecieron que de los 29 voluntarios diabéticos con terapia insulínica analizados, 20 sueros reconocieron mínimo una de las insulinas monitoreadas sugiriendo la presencia de AAI (68,9%). Este dato contrasta con los obtenidos en grupos experimentales más grandes de voluntarios diabéticos tipo 1 tratados con insulinas humanas recombinantes, donde se reportan prevalencias entre el 14 y 44 % para AAI [79, 80]. Estas diferencias encontradas, podrían ser atribuidas a características propias de la técnica. Para el caso de los datos reportados previamente en la literatura, se utilizó como técnica de

inmunodetección el radioinmunoensayo, técnica que reporta títulos de AAI más bajos que el ELISA [81, 82] o podría relacionarse con las diferencias en la etiología de la DM tipo 1 y la DM tipo 2, teniendo en cuenta que los reportados hasta el momento en la literatura fueron evaluados en diabéticos tipo 1 y el grupo experimental de este estudio fue conformado por diabéticos tipo 2.

Continuando con la descripción de los resultados, se encontró que 7 sueros (70%) del grupo tratado con la mezcla Regular-NPH, reconocieron a la insulina Regular y 9 (90%) a la insulina NPH (Figura 17 A y B respectivamente), evidenciando un reconocimiento preferencial por la insulina NPH. Por otro lado en el grupo tratado con NPH, 7 sueros (77,7%) reconocieron esta misma formulación (Figura 24 B) y en el grupo tratado con Glargina 4 sueros (40%) reconocieron a la insulina Glargina (Figura 24 C). Los datos aquí encontrados evidencian un reconocimiento elevado de los sueros de los voluntarios tratados con NPH (ya sea en mezcla con Regular o sola) y un reconocimiento muy bajo por parte de los sueros de los voluntarios tratados con Glargina por su respectiva insulina terapéutica. Lo anterior, podría sugerir un mayor potencial inmunogénico de la insulina NPH y menor de la insulina Glargina. Los resultados obtenidos, si bien no determinan la inmunogenicidad de cada insulina, sugieren su posible perfil inmunogénico. En el caso de la insulina NPH, la presencia de moléculas de protamina (un péptido catiónico de 5000 daltons, rico en Arginina) en su formulación, podría ser una de las variables que favorecen su perfil inmunogénico; la protamina ha sido previamente reportada y relacionada con la producción de inmunoglobulinas (Ig) del tipo G y E después de administración intravenosa de una dosis única [70]. En cuanto al bajo reconocimiento de los AAI por la Glargina, se podría decir que modificaciones en la secuencia aminoacídica de la insulina como la adición de dos Argininas en las posiciones 31 y 32 de la cadena B y el remplazo de Ácido Aspártico por una Glicina en la posición 21 de la cadena A, disminuyen su potencial inmunogénico, ya sea de manera directa eliminando epítopes inmunogénicos o de manera indirecta modificando su farmacocinética. Los datos aquí obtenidos se correlacionan con reportes previos acerca de la baja inmunogenicidad de la formulación con Glargina, con la cual los pacientes tratados por más de un año no reflejan un aumento en la producción de AAI [83], pero contrastan con un estudio reciente donde el 62,5 % de los voluntarios diabéticos del grupo experimental en tratamiento con Glargina fueron positivos para AAI [14].

Para caracterizar la reactividad de los AAI frente a las tres insulinas analizadas y correlacionarla con la terapia insulínica actual, las DO de cada voluntario diabético se normalizaron con el promedio de las DO de los voluntarios no diabéticos, calculado el Índice de Reconocimiento (IR). Los resultados obtenidos muestran que los individuos tratados con la combinación Regular-NPH exhibe un reconocimiento mayor y altamente significativo por la insulina NPH (Figura 24 D). Interesantemente esto no sucede en el grupo tratado con NPH y aunque se observa el reconocimiento preferencial por la insulina NPH, los datos obtenidos no son estadísticamente significativos (Figura 24 E). Las diferencias en el reconocimiento de NPH por parte de estos dos grupos, podrían deberse a varias situaciones: a) la formación de nuevos epítopes en la mezcla Regular-NPH que potencializan la inmunogenicidad de NPH, b) al tiempo prolongado de la terapia insulínica del grupo tratado con Regular-NPH, ya que

a mayor exposición al antígeno (IE) mayor probabilidad de aumentar la afinidad y por ende la especificidad de los AAI y c) a la mayor dosis de Insulina manejada en este grupo, situación que condiciona la respuesta inmune a la insulina.



**Figura 24.** Inmunodetección de AAI y caracterización de su reactividad frente a tres formulaciones de IE humana. Se inmunodetectaron AAI en sueros de voluntarios diabéticos con terapia insulínica contra la insulina **A)** Regular, **B)** NPH y **C)** Glargina. La reactividad de los AAI frente a las tres formulaciones evaluadas se graficó usando el IR calculado para los voluntarios tratados con **D)** Regular-NPH, **E)** NPH y **F)** Glargina. Las gráficas de la **A-C** muestran la media de las DO para cada grupo experimental y el punto de corte para cada insulina evaluada. Las gráficas de la **D-F** muestran la media de los IRs para cada grupo experimental y para cada insulina evaluada. Los ensayos fueron realizados por duplicado en tres ocasiones y muestran la desviación estándar para cada punto.

Analizando los IRs obtenidos para cada formulación, se observó el reconocimiento cruzado de los sueros del grupo tratado con la insulina NPH por la insulina Regular y Glargina [(55% (5 sueros) y 22,2% (2 sueros) respectivamente)], como se muestra en la Figura 24 E. Lo que puede relacionarse con la presencia de epítopes comunes entre las formulaciones, teniendo en cuenta que la insulina NPH está formulada en una solución de protamina, la posibilidad de la presencia de epítopes conformacionales constituidos por asociaciones entre la protamina y la insulina o la presencia de epítopes lineales presentes únicamente en la protamina, aumentan la probabilidad de encontrar más epítopes en común con las insulinas Glargina y Regular.

Aunque el grupo tratado con Glargina presentó IRs más bajos que los obtenidos en los demás grupos experimentales, se evidenció un leve reconocimiento por NPH y Regular, y muy bajo por Glargina (Figura 24 F), lo cual se correlaciona con reportes previos acerca de la baja inmunogenicidad de la Glargina en donde pacientes tratados por más de un año, no reflejan un aumento en la producción de AAI [83]. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, es importante recordar que la producción de AAI depende no sólo de las propiedades intrínsecas de la insulina y su formulación, sino de las características inmunogenéticas de los individuos en terapia.

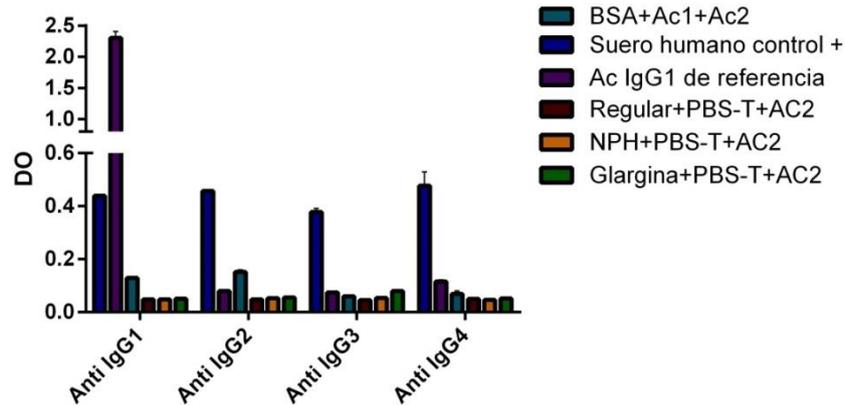
Cabe agregar que para poder asociar la presencia de AAI con un posible efecto hipoglicemiante o asociar la respuesta inmune humoral diferencial para cada insulina a las propiedades de cada formulación, se requieren estudios con unidades experimentales más grandes (mayor número de voluntarios por tratamiento insulínico representativos de la población de diabéticos tipo 2, y conformadas con el uso de criterios de selección que permitan su homogeneidad. Lo anterior, se plantea con la finalidad de confirmar los resultados obtenidos.

#### **4.5. Detección del perfil de isotipos IgG de los AAI.**

El tipo de antígeno, la ruta de administración, el tiempo de la inmunización y factores genéticos del individuo, dirigen la producción del isotipo IgG. Por tanto conocer el perfil de la subclase IgG inducida por cada una de las insulinas evaluadas, permite caracterizar la respuesta inmune humoral de manera individual y sugerir la posible importancia clínica y biológica de los AAI para cada insulina monitoreada. Para este propósito se estandarizó la técnica de ELISA indirecta, se evaluó la especificidad de los anticuerpos anti-isotipo IgG y se detectó el isotipo IgG de los AAI en los 29 sueros de los voluntarios diabéticos tipo 2 frente a las tres formulaciones analizadas.

##### **4.5.1. Estandarización del ELISA para la evaluación del Isotipo IgG de los AAI.**

Para establecer el perfil de isotipos IgG de los AAI para las tres formulaciones evaluadas, se estandarizó la técnica de ELISA indirecta, sensibilizando la microplaca con 10 µg/ml de insulina, incubando el suero a evaluar en dilución de 1/10 y el conjugado en 1/500. Antes de analizar la muestras séricas objeto de este estudio y con el fin de evaluar el reconocimiento de los anticuerpos anti-isotipo IgG usados en el ELISA, la placa se sensibilizó con suero humano como fuente de todas las subclases IgG (Figura 25), lo que permitió evidenciar la reactividad de cada anti-isotipo IgG por el suero control (Figura 18, barra azul oscuro). También se evaluó la especificidad de los anticuerpos anti-isotipo IgG, usando un anticuerpo monoclonal humano anti-TNF (Embrel<sup>®</sup>) cuya subclase es IgG1 – como anticuerpo de referencia- y la Albumina Sérica Bovina (BSA), lo cual permitió evidenciar la marcada especificidad de los conjugados usados para evaluar las subclases IgG de AAI (Figura 18 barra morada y azul clara respectivamente).



**Figura 25.** Evaluación de la reactividad de los anticuerpos anti-subclases IgG humana. Las barras representan la reactividad de cada anticuerpo anti-isotipo IgG (IgG1-4) graficada como la media de las densidades ópticas (DO). La barra azul clara representa la reactividad frente a Albumina Sérica Bovina (BSA), la barra azul oscura la reactividad frente a suero humano, la barra morada la reactividad frente a IgG1 de referencia, las barras rojas, amarillas y verdes la reactividad frente a la insulina Regular, NPH y Glargina en ausencia de AAI, respectivamente. Los ensayos fueron realizados por duplicado en dos ocasiones y muestran la desviación estándar para cada punto.

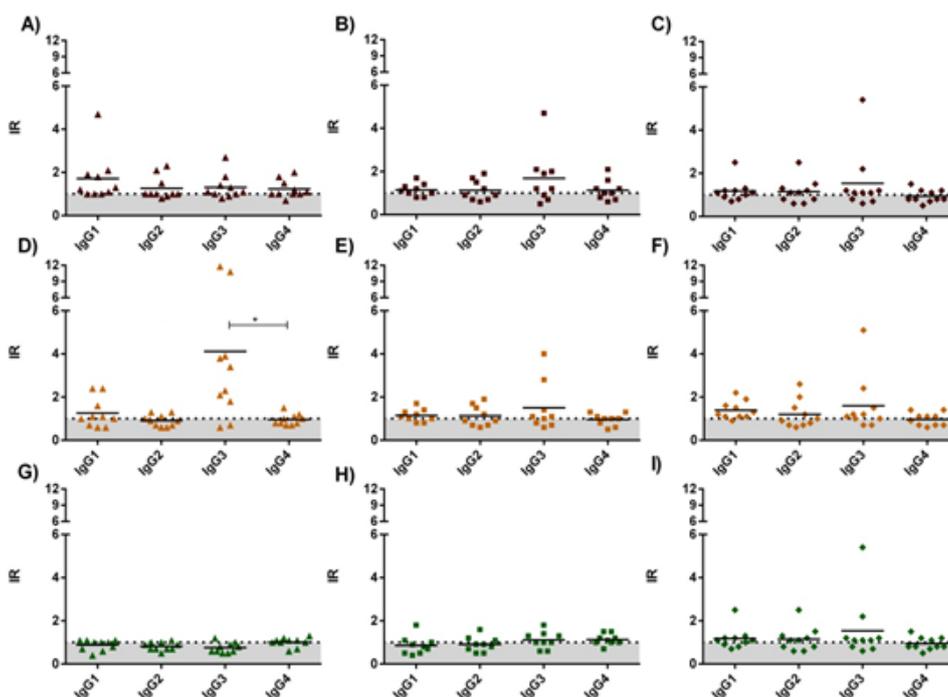
#### 4.5.2. Evaluación del perfil de isotipos IgG de AAI en voluntarios diabéticos.

La importancia de conocer el perfil de isotipo IgG de los AAI para cada una de las formulaciones evaluadas, radica en que además de que permite caracterizar la respuesta inmune humoral para cada formulación, también permite sugerir la posible importancia clínica de estos. Teniendo en cuenta lo anterior y como parte de la caracterización de los AAI, se evaluó el perfil de isotipo IgG para cada insulina por medio del ELISA indirecta. El ensayo se realizó incubando la microplaca con 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  insulina, evaluando las muestras en dilución de 1/10 y detectando con los anticuerpos anti-subclase IgG en dilución de 1/500. El análisis de los resultados obtenidos se realizó calculando los IRs de las subclases IgG para cada insulina (Regular, NPH y Glargina). Para analizar el efecto del tratamiento insulínico sobre el perfil de isotipos IgG, los datos obtenidos se graficaron según la terapia insulínica actual (Figura 26), lo que permitió observar que los AAI presentes en los sueros del grupo tratado con la mezcla Regular-NPH, son predominantemente de la subclase IgG3 (Figura 26 D). Aunque este resultado coincide con reportes previos en donde la subclase IgG3 se ha detectado en AAI [33, 84, 85], es importante mencionar que esta subclase no se ha documentado como predominante, dado que la literatura describe a la subclase IgG1 como predominante, seguida por IgG3 e IgG4 y en menor concentración IgG2 [33, 84, 85]. Las diferencias entre el perfil de isotipo IgG aquí encontrado y los encontrados en reportes previos, podría relacionarse con las diferencias en la etiología de la DM tipo 1 y la DM tipo 2, teniendo en cuenta que el perfil IgG reportado anteriormente, se evaluó en diabéticos tipo 1 y en este estudio se evaluó en diabéticos tipo 2.

Es interesante que el único grupo experimental donde se observó prevalencia de la subclase IgG3 fue el grupo tratado con la mezcla Regular-NPH, cuando analizamos su

reactogenicidad frente a NPH. Lo anterior, podría estar relacionado con la posible formación de neoepítopes en la mezcla Regular-NPH y/o con características propias de este grupo experimental. Dentro de las propiedades de la subclase IgG3 se describe su producción por estímulo de antígenos proteínicos[34], su alta eficiencia en la activación del complemento C1 [86] y su capacidad de unión a los receptores FcγRI presentes en los monocitos. En cuanto a la importancia clínica de niveles altos de IgG3, se ha reportado como el isotipo predominante para los anticuerpos anti-Rhesus junto a IgG1 en la enfermedad hemolítica del recién nacido y se ha asociado a mayor severidad de la enfermedad, dada su capacidad de activar eficientemente el complemento [87]. Teniendo en cuenta lo descrito anteriormente la presencia de AAI con isotipo IgG3 podría potenciar la respuesta inmune frente a la insulina NPH en individuos tratados con la mezcla Regular-NPH.

Es de resaltar que aunque el grupo experimental aquí evaluado está conformado por pocos individuos, sin embargo la prevalencia del isotipo IgG3 en los AAI de los sueros del grupo tratado con la mezcla Regular-NPH es interesante debido a las características bilógicas de este isotipo, por lo cual sugerimos debería evaluarse en un grupo experimental con mayor número de individuos que permita confirmar la prevalencia de éste en la población tratada con Regular y NPH.



**Figura 26.** Perfil de las subclases IgG de AAI de acuerdo al tratamiento insulínico actual y para tres las formulaciones de insulina monitoreadas. A-C) Regular, D-F) NPH y G-I) Glargina. Según su tratamiento insulínico actual A, D y G tratados con Regular-NPH, B, E y H tratados con NPH y C, F e I tratados con Glargina. Cada punto representa el IR de una muestra contra la subclase IgG analizada. Los ensayos fueron realizados por duplicado en dos diferentes experimentos y muestran la desviación estándar para cada isotipo.

#### 4.6. Detección de Complejos (AAI-IE) en voluntarios diabéticos.

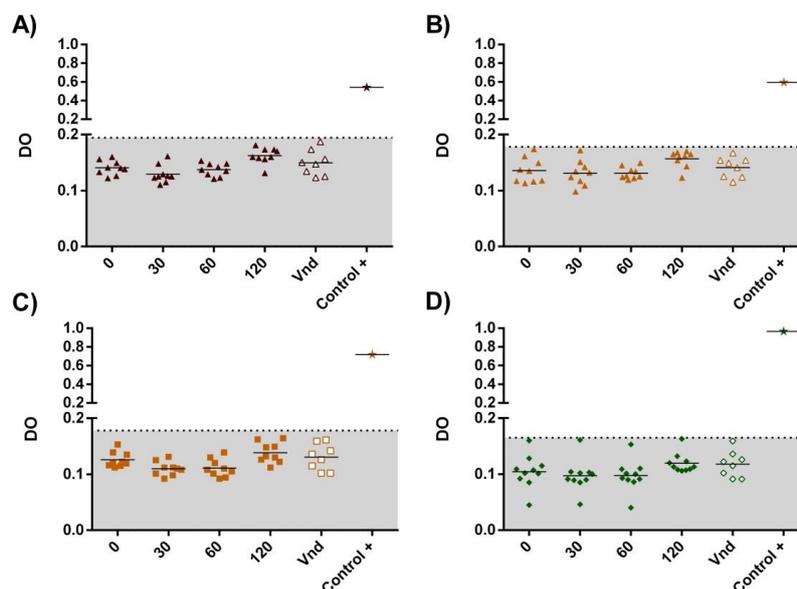
La circulación de ACs (AAI) y su correspondiente Ag (IE) favorecen la formación de CI, los cuales pueden mantenerse en circulación durante largos periodos de tiempo y acumularse en vasos sanguíneos pequeños permitiendo la aparición de microangiopatías y complicaciones secundarias en la Diabetes [88]. Entendiendo la importancia de la circulación de CI constituidos por AAI-IE y habiendo previamente estandarizado y evaluado el sistema de la detección de dichos CI (ELISA de captura), se procedió a evaluar las muestras séricas tomadas en cuatro puntos tiempo: 1) en ayuno y antes de ser administrado el tratamiento insulínico (0 min), 2) media hora después de ser administrada la insulina y de haber desayunado (30 min), 3) una hora después de administrada la insulina (60 min) y 4) dos horas después de administrada la IE (120 min). A cada muestra sérica se le evaluó la presencia de CI por medio del ELISA de captura. Brevemente, la microplaca se incubó con 50µL de AAIs depurados del suero de los conejos inmunizados (anticuerpo de captura). Los anticuerpos de captura anti-Insulina Regular y anti-Glargina se diluyeron 1/1200 y el anti-NPH en 1/100 de solución. Como agente bloqueador se usó leche descremada al 5% en PBS-T, los CI control (formados *in vitro*) y las muestras séricas a evaluar, se incubaron en una dilución de 1/100 y los CI se detectaron con anti-IgG humano marcado con peroxidasa en dilución de 1/25000. Para establecer a partir de qué Densidad Óptica (DO) se consideraba un reconocimiento positivo de CI, a cada sistema se le estableció un punto de corte, el cual corresponde al promedio de las DO obtenidas de 10 sueros de voluntarios no diabéticos, más la suma de dos Desviaciones Estándar (DS). De acuerdo con lo anterior, el punto de corte para el sistema de detección de CI formados por AAI e Insulina Regular, NPH y Glargina fue de 0,194 (Figura 27 A), 0,178 (Figura 27 B y C) y 0,165 (Figura 27 D), respectivamente.

Los resultados obtenidos establecieron que en ninguna de las muestras séricas de los voluntarios diabéticos con terapia insulínica, se detectaron CI constituidos por AAI-IE. Estos datos son compatibles con estudios previos donde los niveles de CI (AAI-IE) en sueros de pacientes con terapia insulínica, no son diferentes a los observados en los sueros de pacientes diabéticos sin terapia insulínica o de voluntarios no diabéticos, concluyendo que la administración de IE juega poco o ningún papel en la formación de CI en pacientes diabéticos [68]. Sin embargo, estos reportes contrastan con los reportados en un estudio de 237 sujetos diabéticos tratados con insulina por más de un año, donde la presencia de CI se correlacionó con los niveles de AAI pero no con microangiopatías [89]. Es importante resaltar, que los datos aquí reportados son novedosos ya que evalúan la presencia de CI constituidos por AAI-IE de manera individual para cada insulina monitoreada, gracias al uso de anticuerpos de captura específicos para cada formulación (anti-Insulina Regular, anti-NPH y anti-Glargina); además se debe tener en cuenta que la formación de CI con insulinas humanas recombinantes y análogos de la insulina, hasta el momento no ha sido lo suficientemente estudiada.

La ausencia de CI constituidos por AAI e IE sugerida por los resultados obtenidos en el ELISA de captura, puede deberse a una inexistente o pobre formación de estos en condiciones naturales o la alta efectividad de un proceso natural de depuración.

#### 4.7. Análisis de valores de Glicemia e insulinemia antes y después de la administración de insulina exógena.

Con el fin de correlacionar la presencia de CI constituidos por AAI-IE, con los niveles de glicemia e insulinemia antes y después de la administración de insulina, a cada voluntario diabético se le tomó una muestra de sangre en cuatro puntos tiempo: 1) en ayuno y antes de ser administrado el tratamiento insulínico, 2) media hora después de ser administrada la insulina y de haber desayunado, 3) una hora después de administrada la insulina y 4) dos horas después de administrada la IE.

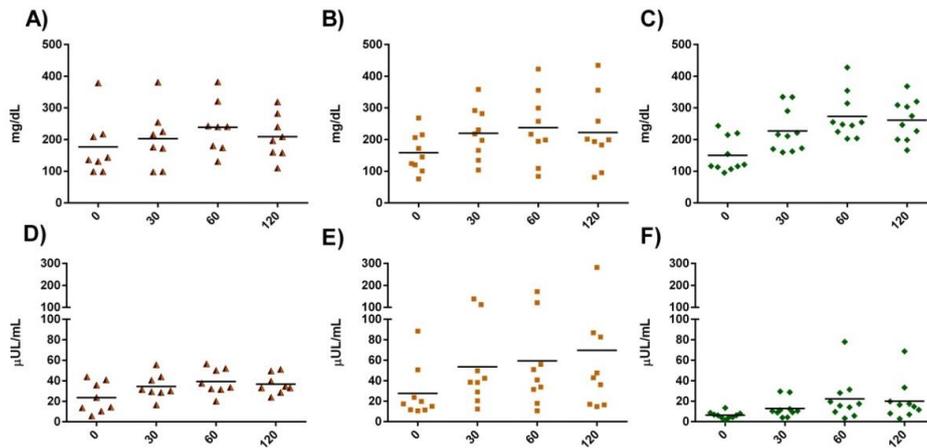


**Figura 27** Inmunodetección de CI antes y después de la administración de la IE. **A)** Grupo en terapia con Insulina Regular-NPH evaluado por el sistema de detección de CI constituidos por AAI-Regular, **B)** Grupo en terapia con Insulina Regular-NPH evaluado por el sistema de detección de CI constituidos por AAI-NPH, **C)** Grupo en terapia con Insulina NPH evaluado por el sistema de detección de CI constituido por AAI-NPH y **D)** Grupo en terapia con Insulina Glargina evaluado por el sistema de detección de CI constituidos por AAI-Glargina. Las gráficas muestran la media de las DO contra el tiempo al cual se tomó la muestra de los voluntarios diabéticos, el grupo de voluntario no diabéticos y el control positivo (CI formados *in vitro*) y la línea de corte para cada sistema de detección. Se presenta un ensayo representativo de dos ensayos realizados, corrido por duplicado, así como la desviación estándar para cada grupo.

Los niveles de glicemia cuantificados en las cuatro muestras de glicemia para el grupo tratado con las insulinas Regular- NPH, muestran un aumento de los niveles de glucosa a la media hora de administrado el desayuno y declina a las dos horas (Figura 28 A). Estos datos se correlacionan con el aumento de los niveles de insulina pasada la media hora y que se sostiene hasta las dos horas (Figura 28 D) Estos datos son compatibles con la farmacocinética descrita para la Insulina Regular (Acción rápida) y la Insulina NPH (Acción intermedia) [90].

La curva de glucosa del grupo en terapia con Insulina NPH muestra la mayor concentración a la hora, que declina brevemente terminando las dos horas (Figura 28 B). Estos resultados se correlacionan con el inicio de la acción de la Insulina NPH (Insulina de acción intermedia). La curva de insulina para la mayoría del grupo tiene un perfil similar, cuyo valor máximo inicia a la primera hora y se mantiene hasta las dos horas (Figura 28E). Los datos encontrados se correlacionan con la farmacocinética de la insulina NPH cuyo inicio de acción es a la hora y su pico se encuentra entre las 4 y 10 horas [90].

Los niveles de glucosa más altos en la curva, para el grupo tratado con Glargina se detectaron aproximadamente a la hora e inician la declinación llegando a las dos horas (Figura 28 C), datos que se correlacionan con los niveles de insulina, que pasada la hora se mantienen constantes en la mayoría de los individuos que conforman este grupo (Figura 28 F). Aunque no se tienen datos después de las dos horas, el perfil de la gráfica corresponde con la farmacocinética de la insulina Glargina, una insulina de acción prolongada cuyo inicio de acción es a la hora y media, la cual no presenta picos o modificaciones súbitas[21].



**Figura 28.** Glicemia e insulinemia antes y después de la administración de IE. Se cuantificaron los niveles de Glicemia e Insulinemia en las muestras séricas tomadas en cuatro puntos tiempo: 1) en ayuno y antes de ser administrado el tratamiento insulínico (0), 2) media hora después de ser administrada la insulina y de haber desayunado (30), 3) una hora después de administrada la insulina (60), y 4) dos horas después de administrada la insulina (120) para. **A y D)** Grupo tratado con las insulinas Regular-NPH, **B y E)** Grupo tratado con la insulina NPH y **C y F)** Grupo tratado con la insulina Glargina, respectivamente. Las gráficas muestran la desviación estándar para cada grupo.

En general, las glicemias e insulinemias obtenidas a los cuatro puntos tiempo en los tres grupos experimentales, son compatibles con la ingesta (desayuno) y con la farmacocinética de las IE administradas, y teniendo en cuenta la ausencia de CI en las muestras séricas tomadas en estos mismos puntos tiempo, no se logró correlacionar su presencia con alteraciones en la actividad hipoglicemiante de la IE administrada.

## 5. Conclusiones y perspectivas.

- I. Los sueros anti-IE producidos en conejo permitieron la estandarización de la técnica de ELISA indirecta para la detección de AAI libres y su uso como anticuerpo de captura en la estandarización del ELISA Sándwich.
- II. Se lograron estandarizar las condiciones óptimas del ELISA indirecto y el ELISA de captura para la detección de AAI libres y unidos a la molécula insulina, respectivamente.
- III. La estandarización del ELISA indirecto para la detección de AAI contra las tres formulaciones de IE humana evaluadas en este estudio, permitió su utilización en el estudio de sueros humanos, proponiendo esta técnica como una herramienta sencilla y útil en la valoración de la inmunogenicidad (perfil humoral) de formulaciones de IE y otras proteínas terapéuticas.
- IV. Se establecieron diferencias en el perfil inmunogénico humoral (IgG) inducido por las tres IE evaluadas, tanto en los sueros de los conejos inmunizados, como en los provenientes de voluntarios diabéticos tipo 2 con terapia insulínica. Dichas diferencias están representadas en el mayor reconocimiento por parte de los sueros hacia la insulina NPH y menor hacia la Glargina. Datos que requieren confirmar con el uso de unidades experimentales más representativas.
- V. El potencial inmunogénico de cada formulación debe ser valorado en diferentes poblaciones de pacientes a fin de conocer los alcances y limitaciones de cada insulina; si se tiene en cuenta que reacciones adversas como las inmunotóxicas, dependen no sólo de las propiedades del biomedicamento, sino de las características inmunogenéticas de los individuos tratados.
- VI. Se logró establecer el perfil de isotipos IgG para tres IE por medio de la técnica ELISA indirecta, encontrando prevalencia de la subclase IgG3 en el grupo en tratamiento con las insulinas Regular-NPH al reaccionar con NPH. Los datos obtenidos son interesantes debido a las características biológicas de este isotipo, por lo que sugerimos debería evaluarse en un grupo experimental más amplio que permita confirmar la prevalencia de éste anticuerpo en la población con terapia insulínica.
- VII. La estandarización del ELISA de captura para la detección de CI constituidos por AAI-IE y su evaluación con CI control (aquí estandarizados), permitió evidenciar la ausencia de estos en las muestras séricas de 29 voluntarios diabéticos. Lo anterior permite sugerir (*i*) la pobre o inexistente formación de estos en condiciones naturales, (*ii*) la baja sensibilidad del método de detección, (*iii*) o la efectividad de un proceso natural de depuración de los complejos si llegaren a formarse.

## 6. Bibliografía

1. Berson, S.A., et al., *Insulin-I131 metabolism in human subjects: demonstration of insulin binding globulin in the circulation of insulin treated subjects*. Journal of Clinical Investigation, 1956. **35**(2): p. 170.
2. Reeves, W. and U. Kelly, *Insulin antibodies induced by bovine insulin therapy*. Clinical and experimental immunology, 1982. **50**(1): p. 163.
3. Francis, A., I. Hanning, and K. Alberti, *The influence of insulin antibody levels on the plasma profiles and action of subcutaneously injected human and bovine short acting insulins*. Diabetologia, 1985. **28**(6): p. 330-334.
4. Van Haeften, T.W., et al., *Effect of insulin antibodies and their kinetic characteristics on plasma free insulin dynamics in patients with diabetes mellitus*. Metabolism, 1986. **35**(7): p. 649-656.
5. Segal, T., et al., *Severe insulin resistance secondary to insulin antibodies: successful treatment with the immunosuppressant MMF*. Pediatr Diabetes, 2008. **9**(3 Pt 1): p. 250-4.
6. Koyama, R., et al., *Hypoglycemia and hyperglycemia due to insulin antibodies against therapeutic human insulin: treatment with double filtration plasmapheresis and prednisolone*. Am J Med Sci, 2005. **329**(5): p. 259-64.
7. Chen, J.-W., et al., *Impact of insulin antibodies on insulin aspart pharmacokinetics and pharmacodynamics after 12-week treatment with multiple daily injections of biphasic insulin aspart 30 in patients with type 1 diabetes*. European journal of endocrinology, 2005. **153**(6): p. 907-913.
8. Yanai, H., H. Adachi, and H. Hamasaki, *Diabetic Ketosis Caused by the Insulin Analog Aspart-Induced Anti-Insulin Antibody: Successful Treatment With the Newest Insulin Analog Glulisine*. Diabetes Care, 2011. **34**(6): p. e108-e108.
9. Asai, M., et al., *Insulin lispro reduces insulin antibodies in a patient with type 2 diabetes with immunological insulin resistance*. Diabetes research and clinical practice, 2003. **61**(2): p. 89-92.
10. World Health Organization, *Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia: Report of a WHO/IDF 2006*: Geneva.
11. International Diabetes Federation. *Diabetes Atlas Update 2012*. 2012 [cited 2013 19/01/13]; 2012:[Available from: <http://www.idf.org/diabetesatlas/5e/Update2012>].
12. American Diabetes Association, *Standards of medical care in diabetes--2012*. Diabetes Care, 2012. **33** Suppl 1: p. S11-61.
13. Bastaki, A., *Diabetes mellitus and its treatment*. International Journal of Diabetes and Metabolism, 2005. **13**(3): p. 111.
14. Shimatsu, N.H.a.A. *Treatment with insulin glargine causes anti-insulin antibody production more frequently than other insulin analogs in patients with diabetes mellitus 2013*.
15. Schellekens, H., *Factors influencing the immunogenicity of therapeutic proteins*. Nephrology Dialysis Transplantation, 2005. **20**(suppl 6): p. vi3-vi9.
16. Schellekens, H., *Immunogenicity of therapeutic proteins: clinical implications and future prospects*. Clinical therapeutics, 2002. **24**(11): p. 1720-1740.
17. Association, A.D., *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. Diabetes Care, 2013. **36**(Suppl 1): p. S67-S74.
18. Association, A.D., *Consensus Development Conference on Insulin Resistance: 5-6 November 1997*. Diabetes Care, 1998. **21**(2): p. 310-314.
19. Hoogwerf, B.J. and B.H. Brouhard, *Glycemic control and complications of diabetes mellitus: practical implications of the Diabetes Control and Complications Trial (DCCT)*. Cleve Clin J Med, 1994. **61**(1): p. 34-7; quiz 80-2.

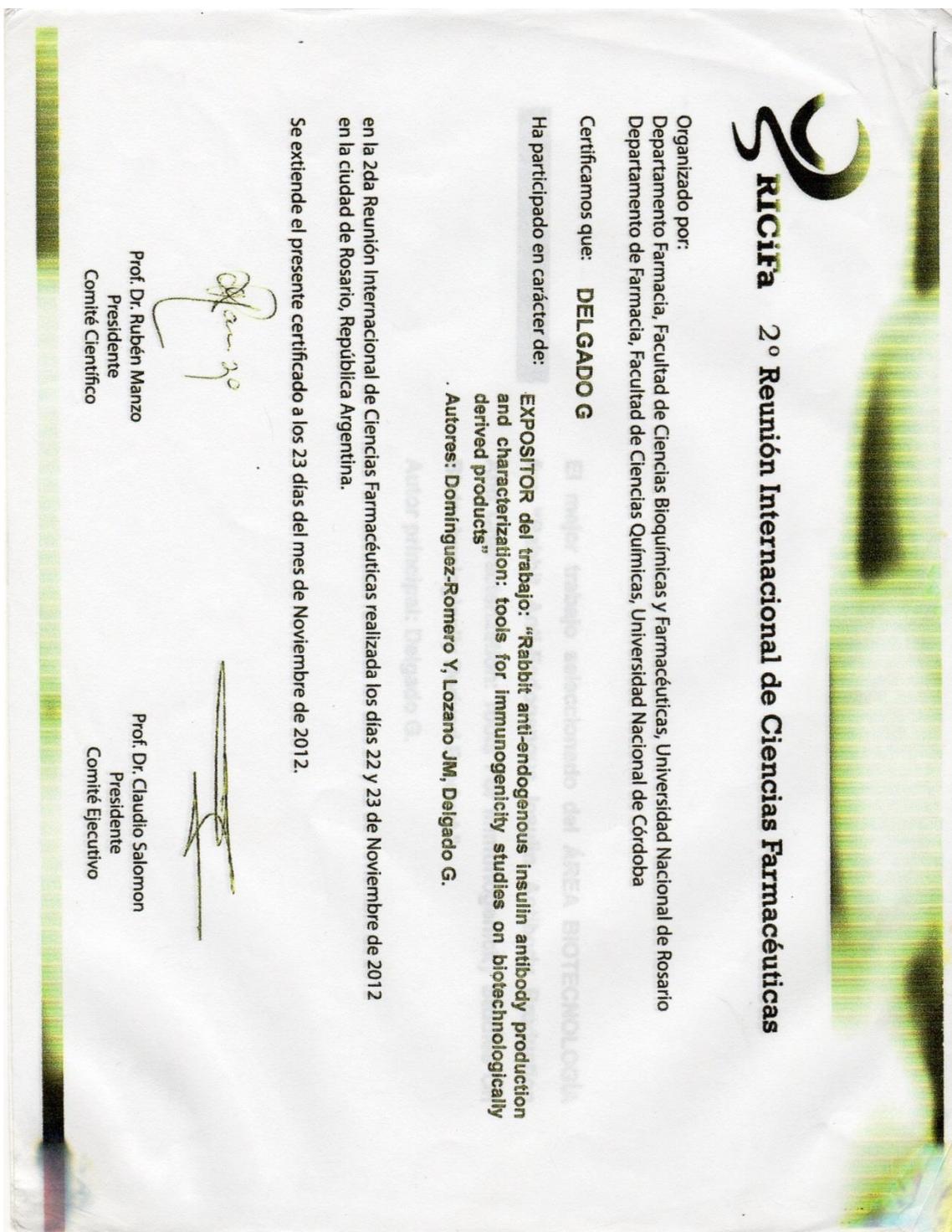
20. Pittman IV, I., L.H. Philipson, and D.F. Steiner, *Insulin biosynthesis, secretion, structure, and structure-activity relationships*. Journal [serial on the Internet], 2004.
21. Vajo, Z., J. Fawcett, and W.C. Duckworth, *Recombinant DNA technology in the treatment of diabetes: insulin analogs*. Endocrine reviews, 2001. **22**(5): p. 706-717.
22. Sheeja, v.R., M Harikrishna Joseph, Jibinc, *Insulin therapy in diabetes management*. Insulin, 2010. **2**(2): p. 018.
23. Valla, V., *Therapeutics of diabetes mellitus: focus on insulin analogues and insulin pumps*. Exp Diabetes Res, 2010. **2010**: p. 178372.
24. Fineberg, S.E., et al., *Immunological responses to exogenous insulin*. Endocrine reviews, 2007. **28**(6): p. 625-652.
25. Howey, D.C., et al., *[Lys (B28), Pro (B29)]-human insulin: a rapidly absorbed analogue of human insulin*. Diabetes, 1994. **43**(3): p. 396-402.
26. Hirsch, I.B., *Insulin analogues*. New England Journal of Medicine, 2005. **352**(2): p. 174-183.
27. Slieker, L., et al., *Modifications in the B10 and B26–30 regions of the B chain of human insulin alter affinity for the human IGF-I receptor more than for the insulin receptor*. Diabetologia, 1997. **40**(2): p. S54-S61.
28. Guermonprez, P., et al., *Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells*. Annual review of immunology, 2002. **20**(1): p. 621-667.
29. Nell, L.J., C. Hulbert, and J. Thomas, *Human insulin autoantibody fine specificity and H and L chain use*. The Journal of Immunology, 1989. **142**(9): p. 3063-3069.
30. Thomas, J.W., V. Virta, and L. Nell, *Heterogeneity and specificity of human anti-insulin antibodies determined by isoelectric focusing*. The Journal of Immunology, 1985. **134**(2): p. 1048-1052.
31. Andersen, O.O., *Clinical significance of anti-insulin-antibodies*. Acta Endocrinol Suppl (Copenh), 1976. **205**: p. 231-40.
32. Devlin, J.G., *Evidence for the existence of an IgM immunoglobulin to insulin*. Ir J Med Sci, 1966. **6**:507-510.
33. Koch, M., et al., *Semi-quantitative assessment of anti-insulin total IgG and IgG subclasses in insulin-immunized patients using a highly sensitive immunochemical micromethod*. Diabetologia, 1986. **29**(10): p. 720-6.
34. Devey, M., *Clinical Aspects of IgG Subclasses and Therapeutic Implications*. Immunology, 1988. **65**(2): p. 327.
35. Reisman, R., Wiche, K., Arbesman, C, *Immunotherapy with antigen E*. J Allergy 1969. **44**:82-95.
36. Lowell, F.C., *Immunologic Studies in Insulin Resistance I. Report of a Case Exhibiting Variations in Resistance and Allergy to Insulin*. J Clin Invest, 1944. **23**(2): p. 225-31.
37. Patterson R, R.M., Grammer LC *Insulin allergy: reevaluation after two decades*. Ann Allergy 1990. **64**:459-462.
38. DeShazo, R.D., et al., *Evaluation of patients with local reactions to insulin with skin tests and in vitro techniques*. Diabetes Care, 1987. **10**(3): p. 330-6.
39. Grammer, L.C., et al., *Specificity of immunoglobulin E and immunoglobulin G against human (recombinant DNA) insulin in human insulin allergy and resistance*. J Lab Clin Med, 1987. **109**(2): p. 141-6.
40. Fineberg, S.E., et al., *Antibody response to inhaled insulin in patients with type 1 or type 2 diabetes. An analysis of initial phase II and III inhaled insulin (Exubera) trials and a two-year extension trial*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(6): p. 3287-94.
41. Albert, S.G. and D.A. Popp, *Hypoglycemia due to Serum-Complexed Insulin in a Patient with Diabetes Mellitus*. Diabetes Care, 1984. **7**(3): p. 285-290.
42. Eguchi, Y., et al., *Longitudinal changes of serum insulin concentration and insulin antibody features in persistent insulin autoimmune syndrome (Hirata's disease)*. Autoimmunity, 1994. **19**(4): p. 279-84.

43. Baxter, R., D. Yue, and J. Turtle, *Equilibrium binding studies of insulin antibodies in diabetic subjects*. Clin Chem, 1976. **22**(7): p. 1089-1094.
44. Petersen, K.G., et al., *Insulin and anti-insulin antibody interaction. Evidence for the formation of 7 S and 10 S structures*. Diabetes, 1985. **34**(8): p. 799-802.
45. Schifferli, J.A. and R.P. Taylor, *Physiological and pathological aspects of circulating immune complexes*. Kidney Int, 1989. **35**(4): p. 993-1003.
46. Lequin, R.M., *Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*. Clin Chem, 2005. **51**(12): p. 2415-2418.
47. Bio-one, G., *Forum Technical Notes and Applications for Laboratory, in Microplates for Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA)*. 2008.
48. Avrameas, S., T.r.s. Ternynck, and J.D. Editor-in-Chief: Peter, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*, in *Encyclopedia of Immunology (Second Edition)*. 1998, Elsevier: Oxford. p. 816-819.
49. Voller, A., A. Bartlett, and D.E. Bidwell, *Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques*. J Clin Pathol, 1978. **31**(6): p. 507-20.
50. Goldman, J., et al., *Equilibrium binding assay and kinetic characterization of insulin antibodies*. Diabetes, 1978. **27**(6): p. 653-660.
51. Brooks-Worrell, B.M., D. Nielson, and J.P. Palmer, *Insulin autoantibodies and insulin antibodies have similar binding characteristics*. Proceedings of the Association of American Physicians, 1999. **111**(1): p. 92-96.
52. UIC *Guidelines-Polyclonal Antibodies production*. Office of Animal Care and Institutional Biosafety, 2000. **3.1**.
53. FSU, *Policlonal Antibody production rabbits*. Florida State University, 2007. **April, 2007**.
54. University, F.S. *Polyclonal Antibody Production Protocol - Rabbits*. 2007.
55. Leenaars, P., et al., *The production of polyclonal antibodies in laboratory animals*. Atlas Nottingham, 1999. **27**: p. 79-102.
56. Social, M.d.S.y.P., *Actualización de Plan Obligatorio de Salud*. 2011.
57. Martin R. Acosta, K.H.R., Suzanne S. Teuber, and Shridhar K. Sathe, *Production and Characterization of Rabbit Polyclonal Antibodies to Almond (Prunus dulcis L.) Major Storage Protein*. Journal Agriculture Food Chemistry, 1999.
58. Administration, F.a.D., *Guidance for Industry Assay Development for Immunogenicity Testing of Therapeutic Proteins* <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/UCM192750.pdf>, 2009.
59. Zouali, M., *Immunological Tolerance: Mechanisms*, in *Encyclopedia of Life Sciences*. 2001: <http://www.els.net> [doi: 10.1002/9780470015902.a0000950.pub2].
60. Cazenave, P., *Idiotypic-anti-idiotypic regulation of antibody synthesis in rabbits*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1977. **74**(11): p. 5122-5125.
61. Biegeleisen, K., *The probable structure of the protamine-DNA complex*. J Theor Biol, 2006. **241**(3): p. 533-40.
62. Robbins, D.C., et al., *Antibodies to covalent aggregates of insulin in blood of insulin-using diabetic patients*. Diabetes, 1987. **36**(7): p. 838-41.
63. McCall, A.L., *Insulin Therapy and Hypoglycemia*. Endocrinology and Metabolism Clinics of North America, 2012. **41**(1): p. 57-87.
64. AABB, *Technical Manual*, in *AABB Technical Manual*. 2005. p. 761-763.
65. Frank, S.A., *Immunology and evolution of infectious disease*, in *Chapter 4, Specificity and Cross-Reactivity*. 2002, Princeton University Press: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2396/>.
66. Craig, L., et al., *The role of structure in antibody cross-reactivity between peptides and folded proteins*. Journal of Molecular Biology, 1998. **281**(1): p. 183-201.
67. De Groot, A.S. and W. Martin, *Reducing risk, improving outcomes: Bioengineering less immunogenic protein therapeutics*. Clinical Immunology, 2009. **131**(2): p. 189-201.

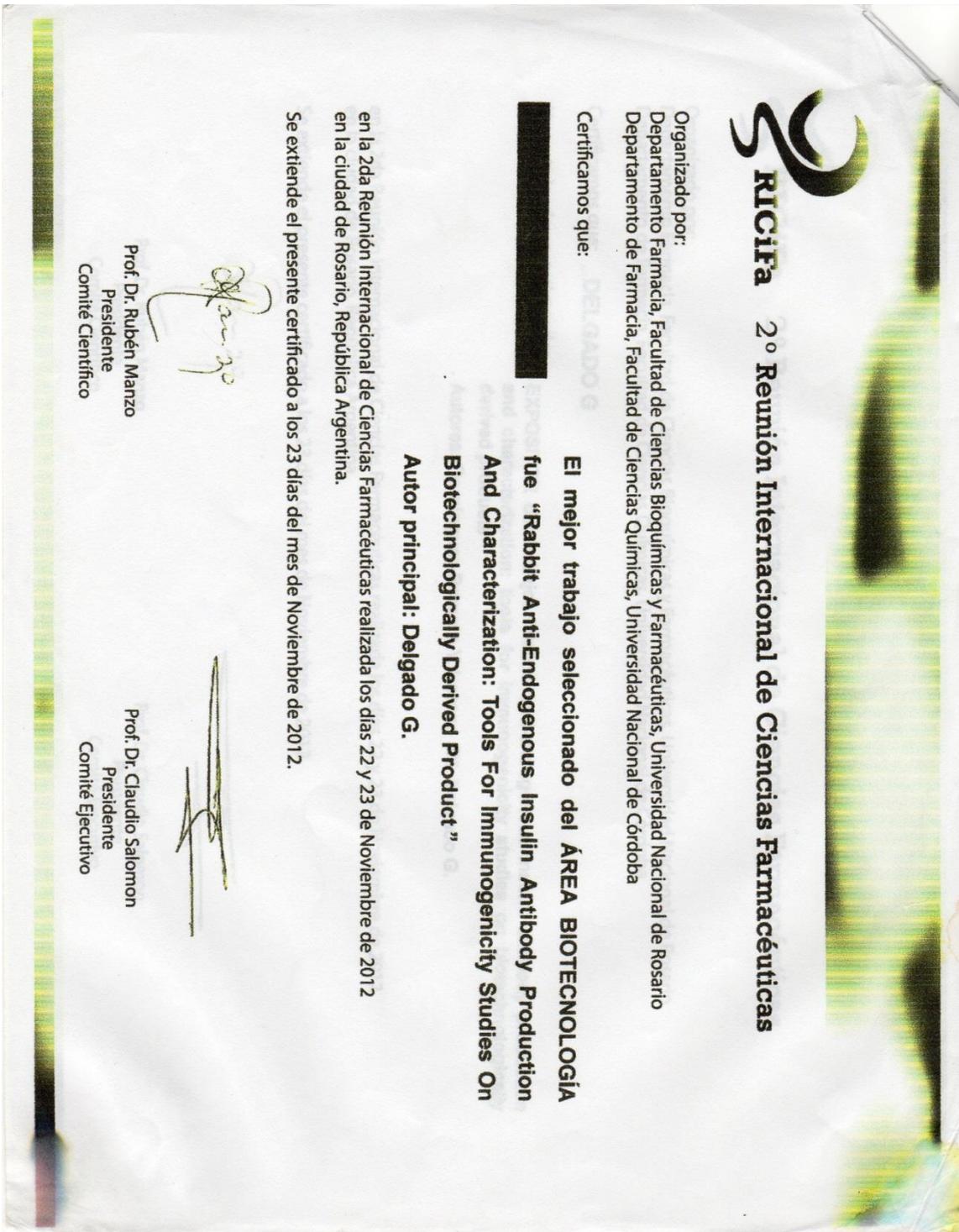
68. Campbell, L.V., et al., *Does insulin administration contribute to immune complex formation in diabetes?* Clinical and experimental immunology, 1984. **58**(2): p. 255.
69. Gill, T.A., D.S. Singer, and J.W. Thompson, *Purification and analysis of protamine*. Process Biochemistry, 2006. **41**(8): p. 1875-1882.
70. Nyhan, D.P., et al., *Single doses of intravenous protamine result in the formation of protamine-specific IgE and IgG antibodies*. Journal of allergy and clinical immunology, 1996. **97**(4): p. 991-997.
71. Weiss, M.E., et al., *Association of Protamine IgE and IgG Antibodies with Life-Threatening Reactions to Intravenous Protamine*. New England Journal of Medicine, 1989. **320**(14): p. 886-892.
72. Rolando Ochoa, J.C. Martinez, and X. Ferriol, *Guia para la estandarización de tecnicas inmunoenzimaticas en ensayos de vacunas*. VacciMonitor, 2000. **9**. (3).
73. Gibbs, J. and M. Kennebunk, *Effective blocking procedures*. ELISA Technical Bulletin. Kennebunk, ME: Corning Incorporated Life Sciences, 2001.
74. Lim, D.J.a.Y.P., *Analytical and Preparative Methods for Purification of Antibodies*. Food technol. biotechnol, 2001. **39**(3): p. 215–226.
75. Biosciences, A., *Antibody Purification*, E. AC, Editor. 2002.
76. Huber, R., *Spatial structure of immunoglobulin molecules*. Klinische Wochenschrift, 1980. **58**(22): p. 1217-1231.
77. Wolf D, K., *Purification of antibodies by the use of biochemical and immunochemical techniques* D.K. Division of Radiooncology, 69120 Editor. 2008: Heidelberg, Germany
78. van Oss, C.J., *Nature of specific ligand-receptor bonds, in particular the antigen-antibody bond*. J Immunoassay, 2000. **21**(2-3): p. 109-42.
79. Scherthaner, G., et al., *Immunogenicity of human insulin (Novo) or pork monocomponent insulin in HLA-DR-typed insulin-dependent diabetic individuals*. Diabetes Care, 1983. **6**: p. 43.
80. Heding, L., et al., *Immunogenicity of monocomponent human and porcine insulin in newly diagnosed type 1 (insulin-dependent) diabetic children*. Diabetologia, 1984. **27**(1): p. 96-98.
81. Dib, S.A., et al., *Detection of insulin antibodies by radioassay and ELISA: interrelation and correlation with metabolic control in type I diabetes*. Braz J Med Biol Res, 1994. **27**(5): p. 1167-80.
82. Sodoyez-Goffaux, F., et al., *Advantages and pitfalls of radioimmune and enzyme linked immunosorbent assays of insulin antibodies*. Diabetologia, 1988. **31**(9): p. 694-702.
83. Pieber, T.R., I. Eugène-Jolchine, and E. Derobert, *Efficacy and safety of HOE 901 versus NPH insulin in patients with type 1 diabetes. The European Study Group of HOE 901 in type 1 diabetes*. Diabetes Care, 2000. **23**(2): p. 157-162.
84. OO, A., *Clinical significance of anti-insulin-antibodies*. Acta Endocrinol, 1976. **205(Suppl):231–240**.
85. Soto-Aguilar, M.C., et al., *Total IgG and IgG subclass specific antibody responses to insulin in diabetic patients*. Ann Allergy, 1991. **67**(5): p. 499-503.
86. Jefferis, R. and D.S. Kumararatne, *Selective IgG subclass deficiency: quantification and clinical relevance*. Clin Exp Immunol, 1990. **81**(3): p. 357-67.
87. Urbaniak, S.J. and M.A. Greiss, *ADCC (K-cell) lysis of human erythrocytes sensitized with rhesus alloantibodies. III. Comparison of IgG anti-D agglutinating and lytic (ADCC) activity and the role of IgG subclasses*. Br J Haematol, 1980. **46**(3): p. 447-53.
88. Irvine, W.J., et al., *Immune complexes and diabetic microangiopathy*. J Clin Lab Immunol, 1978. **1**(3): p. 187-91.
89. Di Mario, U., et al., *The correlation between insulin antibodies and circulating immune complexes in diabetics with and without microangiopathy*. Clinical and Experimental Immunology, 1983. **52**(3): p. 575.

90. Eyzaguirre, F. and E. Codner, *[Insulin analogues: searching for a physiological replacement]*. Rev Med Chil, 2006. **134**(2): p. 239-50.

## Anexo A: Presentación modalidad poster en la “2 Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas”.



## Anexo B: Premio a mejor trabajo en el área de biotecnología "2 Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas".



## Anexo C: Presentación modalidad poster en el XIV Congreso Colombiano de Farmacología y Terapéutica.

**La Asociación Colombiana de Farmacología  
y la Universidad del Tolima**

**CERTIFICAN QUE**  
**Leidy Yohana Domínguez Romero, Luisa Fernanda  
Bohórquez Villamizar, Jorge Arturo Santa y Lucy Gabriela  
Delgado Murcia**

Asistió al XIV Congreso Colombiano de Farmacología y Terapéutica, realizado  
en la ciudad de Ibagué, del 15 al 18 de Agosto de 2013  
en calidad de

**Ponente en modalidad de póster**

**ACF**  
Asociación Colombiana  
de Farmacología

**Guillermo Gómez Moya**  
Presidente ACF

**Ángel Céspedes Rubio**  
Presidente Congreso

**Esperanza Muñoz Tello**  
Secretaria ACF

**Universidad  
del Tolima**

## Anexo D: Presentación modalidad poster en el “XIII Congreso Internacional del Colegio Nacional de Bacteriología”.



### EL COLEGIO NACIONAL DE BACTERIOLOGÍA CNB-COLOMBIA

#### CERTIFICA QUE

**Yohana Domínguez Romero CC 1032400673**

Participó en la modalidad de **Autor de Poster**. Titulado  
**"EVALUACIÓN DEL PERFIL HUMORAL (ISOTIPOS IgG) DE  
 ANTICUERPOS ANTI-INSULINA PARA TRES FORMULACIONES  
 COMERCIALES EN DIABÉTICOS TIPO 2"**

En el 13er CONGRESO INTERNACIONAL DEL COLEGIO NACIONAL DE BACTERIOLOGÍA CNB-COLOMBIA, realizado en el Hotel Crowne Plaza Tequendama de la ciudad de Bogotá durante los días 1, 2, 3 y 4 de noviembre de 2013.

Bogotá, 4 de noviembre de 2013

Cordialmente,

*Stella P de Bolívar*

**STELLA PÁEZ DE BOLÍVAR**  
 Presidenta Congreso CNB-COLOMBIA

**ALBERTO NUÑEZ MOLINARES**  
 Presidente 13er Congreso CNB - Colombia

*Carmen Cecilia Almonacid V.*

**CARMEN CECILIA ALMONACID V.**  
 Coordinadora Póster  
 13er Congreso CNB - Colombia