

INSTITUTO DE ENDOCRINOLOGIA Y ENFERMEDADES METABOLICAS

## Determinación radioinmunológica de la insulinemia en diabéticos insulino dependientes

Por los Dres.:

ANTONIO CLARO<sup>11</sup> y ROBERTO GONZALEZ\*

Claro, A.: González, R. *Determinación radioinmunológica de la insulinemia en diabéticos, insulino dependientes*. Rev Cub Med 18: 5, 1979.

Se describe un método sencillo y rápido para la determinación de insulina plasmática en pacientes diabéticos insulino dependientes. Se estudiaron a 23 pacientes, y se demuestra que la fracción de insulina precipitable por etanol osciló entre 38%-90% en ayunas. La insulinemia total fue elevada en todos los pacientes investigados, y la libre, osciló entre 11,5-14,3  $\mu$ U insulina/mi. No se encontró relación entre la fracción unida y la dosis de insulina usada por los pacientes, y sí entre el tiempo de tratamiento y fracción de insulina unida a las globulinas.

La determinación radioinmunológica de la insulina ha abierto amplias perspectivas en el estudio de la insulino secreción en los sujetos sano y enfermo. De todos es conocido los múltiples trabajos que se realizan en el paciente diabético a este respecto, no obstante, en el diabético insulino dependiente la determinación radioinmunológica de esta hormona no se puede realizar por los medios habituales. Ya desde los trabajos de *Banting* en 1938, en que se sugirió que los pacientes diabéticos que recibían insulina heteróloga presentaban anticuerpos contra ella, hasta su demostración, primero en animales por *Moloney* (1955) y luego en el humano por *Berson y Yalow* (1956),<sup>1</sup> no se tenía conocimiento pleno del fenómeno de resistencia a la insulina.

Es la presencia de dichos anticuerpos, lo que imposibilita la determinación radioinmunológica de la insulina sin un método previo de extracción, por este motivo se han desarrollado numerosas formas de extracción de la hormona, tal como han sido la ultracentrifugación (*Grodsky*, 1960) la disociación del complejo antígeno anticuerpo en etanol ácido (*Berson y Yalow*)<sup>2</sup> y la separación por cromatografía;<sup>3i</sup> la disociación del complejo a pH bajo, seguido de cromatografía por tamiz molecular, métodos éstos, difíciles, que han resultado costosos y de difícil estandarización en el trabajo diario del laboratorio.<sup>3</sup> Actualmente *Heding* propone un modo sencillo y eficiente, en el que logra separar y medir la

---

<sup>11</sup> Bioquímico especialista del Instituto de Endocrinología y Enfermedades Metabólicas (IEEM).

concentración de insulina circulante en sangre, en pacientes insulino dependientes y, a su vez, tener una semicuantificación de los anticuerpos. \*<sup>5-7</sup>

En esta comunicación presentamos nuestros hallazgos utilizando esta técnica, que permite determinar la insulinemia con relativa facilidad, y brindar, además, la semicuantificación de los anticuerpos antinsulina circulante que presentan los pacientes estudiados. Ella está basada en la disociación del complejo por acidificación del medio y subsiguiente precipitación de las globulinas por etanol.

#### MATERIAL Y METODO

Se determinó la insulinemia en pacientes diabéticos insulino dependientes, cuyas edades oscilaban entre 13 y 73 años, y entre 2 y 23 años con tratamiento insulínico.

Se tomaron muestras de sangre venosa en ayunas y 3 horas después de un desayuno normal, las cuales se conservaron en tubos heparinizados. El plasma se separó por centrifugación a temperatura de 4°C.

#### Procesamiento

Para la insulina total se tomaron muestras por duplicado de 500 ml de plasma, a los que se añade 100  $\mu$ A de CIH 1 N, lo que fue incubado a 37°C durante 1 hora; después se neutraliza con Na OH/ 1N, 100  $\mu$ l y se precipitan las globulinas con 3 ml de etanol al 96%, el sobrenadante se lleva a sequedad al vacío.

Para la insulina libre, al mismo volumen de plasma se añade 2,5 ml de etanol al 96% y el sobrenadante se deseca también.

Los residuos así obtenidos se resuspenden en amortiguador fosfato 0,04 M pH 7,4 que contiene 6 g/l de ClNa y 6 g/l de albúmina bovina.

El radioinmunoensayo se realizó utilizando el método de doble anticuerpo [Hales y

Randle, 1963),<sup>8-10</sup> con separación de la hormona marcada libre por filtración.

El conteo se realizó en un contador de emisiones gamma.

#### RESULTADOS

En el grupo de pacientes estudiados, encontramos que la fracción de insulina precipitable por etanol oscilaba entre el 38% y el 90% en ayunas (x 66, 2% S — 16,2%) con variaciones en lo que respecta a las cantidades absolutas de insulina circulante. En un grupo control de 10 personas no tratadas previamente no pudo encontrarse insulina unida a globulina.

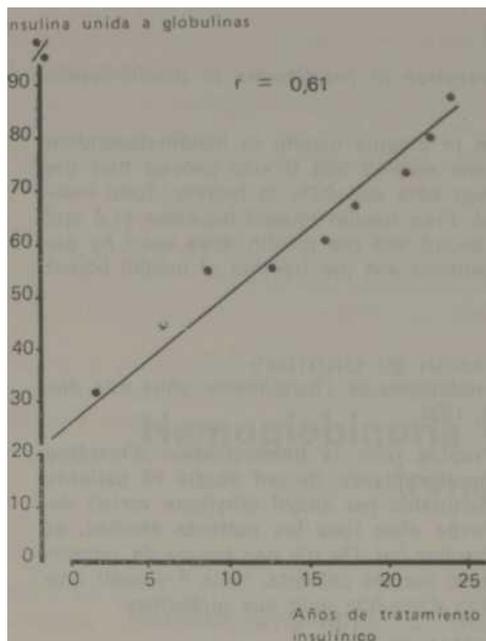
La insulinemia total en ayunas en todos los pacientes presentó valores elevados, pero los valores de insulina libre fueron como promedio de 11,5 y 14,3 microunidades para los pacientes que recibían menos de 40 y más de 40 unidades de insulina como dosis diaria.

La relación entre insulina libre e insulina unida en ambos grupos no presentaron diferencias significativas.

En aquellos pacientes que junto con el desayuno recibieron su dosis habitual de insulina se encontró un incremento proporcional, tanto en la insulina libre como en la unida, sin modificarse la relación entre ambas. En quienes no recibieron insulina los valores permanecieron casi invariables.

El gráfico ilustra la relación entre el porcentaje de insulina unida a globulinas y la duración del tratamiento insulínico en cada caso. Pudo encontrarse correlación positiva [test de correlación de rangos de Spearman) de 0,61 significativa para una P < 0,05.

La línea de regresión muestra un incremento de 1,5% de insulina unida a globulina por año de tratamiento. No pudo encontrarse relación entre la fracción de insulina unida y la dosis utilizada por el paciente, ni con la cantidad total de insulina utilizada en toda su vida.



Gráfico

Relación entre porcentaje de insulina unida a globulinas y años de tratamiento insulínico.  $r = 0,61$  para una  $p < 0,05$  (test de correlación de Spearman).

#### DISCUSION

El método descrito ha demostrado ser sencillo y rápido, así como que cumple los objetivos para el cual fue montado.

Dado el pequeño número de casos estudiados no es posible en este momento plantear conclusiones definitivas sobre el problema en cuestión, pero sí podemos señalar algunos hallazgos de interés que nos servirán de base para futuras investigaciones.

En primer lugar, cabe señalar que los valores encontrados para la insulinemia en ayunas en nuestros casos es muy superior a la encontrada en sujetos normales [Amaro, 1974],<sup>11</sup> y en diabéticos no insulino dependientes en este mismo laboratorio; por otro lado, los valores de insulina libre estaban por debajo de los límites encontrados para ambos grupos.

Teniendo en cuenta la posibilidad de producir diabetes experimental transitoria por inyección de antisuero antinsulina en animales de experimentación, es posible plantear que la insulina unida a anticuerpos tiene muy poca o ninguna actividad biológica; así se explica que estos pacientes presentaban cifras elevadas de glicemia en ayunas en presencia de grandes concentraciones de insulina total circulante.

Llama la atención en nuestra serie, que la administración de insulina a los pacientes incrementa la cantidad de insulina unida, lo que sugiere que los anticuerpos circulantes no estaban saturados aun en presencia de cantidades variables de insulina libre.

El hecho de que las proporciones entre ambas formas se mantengan constantes, indica una reacción de equilibrio, pero dado el gran número de factores que intervienen en dicho fenómeno nos resulta imposible en este momento hacer planteamientos sobre su mecanismo de acción. Constituye un tema interesante y útil de investigación el estudio de la dinámica de esta respuesta. En nuestros pacientes no observamos correlación entre la fracción de la insulina unida y la dosis habitual del paciente, contrariamente a lo planteado por Heding (1970)<sup>7</sup> en este sentido; en ambos casos la técnica fue similar.

No obstante, ello, los niveles de insulina libre encontrados fueron mayores en los pacientes que recibieron elevadas dosis.

Resulta interesante el hallazgo de un incremento de la fracción, unida en relación con el tiempo de tratamiento, ya que se ha planteado que los niveles de anticuerpos antinsulina se desarrollan en los primeros 5 meses de tratamiento para alcanzar niveles estacionarios; es posible que un estudio longitudinal a largo plazo en pacientes recién diagnosticados pudiera verificar nuestros hallazgos.

#### Agradecimiento

Agradecemos la valiosa ayuda técnica de la compañera Celeste Arranz Calzado.

Claro, A.; González, R. *Radioimmunologic determination of insulinemia in insulin-dependent diabetics*. Rev Cub Med 18: 5, 1979.

An easy and rapid method for the determination of plasma insulin in insulin-dependent diabetics is described. Twenty three patients were studied and it was proved that the ethanol-precipitable insulin fraction ranged between 38% and 90% in fasting. Total insulinemia was increased in all patients investigated. Free insulin ranged between 11,5 and 14,3  $\mu$ U/ml. A relationship between the fraction bound and the insulin dose used by patients was not found but between the time of treatment and the fraction of insulin bound to globulins.

#### RÉSUMÉ

Claro, A.; González, R. *Détermination radio-immunologique de l'insulinémie chez des diabétiques insulinodépendants*. Rev Cub Med 18: 5, 1979.

Les auteurs décrivent une méthode simple et rapide pour la détermination d'insuline plasmatique chez des patients diabétiques insulinodépendants. Ils ont étudié 23 patients et ils ont démontré que la fraction d'insuline précipitable par alcool éthylique variait de 38% à 90% à jeun. L'insulinémie totale était élevée chez tous les patients étudiés, et l'insulinémie libre a varié entre 11,5 et 14,3  $\mu$ U insuline/ml. On n'a pas trouvé de rapport entre la fraction unie et la dose d'insuline employée par les patients, mais il y avait une relation entre le temps de traitement et la fraction d'insuline unie aux globulines.

#### PE3KWE

Kjiapo, A.; roH3ane3, P. PaxHtoiiMMYHOJTorinecKoe onpeflejieHue - HHcyjIHHeMULO y COJIBHHX JIHaóeTOM OHCyJIOHOT:3aB0C0MHM, Rev Cub Med 18: 5, 1979.

OiuiCHBaeTCfl npocToñ h OucTpuñ MeToa jyin onpejjeieHZfl HHcyjizHa y naimeHTOB, CTpanarautfix caxapHHM jmaóeTOM o 3aBHcnMta ot HHcyjiz- Ha. EmiH o<5cjie,ij;obHH 23 nauaeHTa o noKasmaeTCH, \*ito 3paKmitf OH cy^HHa, BujjeieHHoro aTanojioM, Kojieóajiact Me\*fly 38^-90% o tojio- íara^tXo Oóman HHcyjiHHeMHH óana bhcokoH y bcbx odcjieflOBaHHHX na mieHTOB o cboóoOTan Kojieóa^acB Meawy 11,5-14,3 mm mcyjim/wio- He óhjio oóHapyxeHo cbh30 Meamy o^hom \$paKUoo o £o3oM oHcyjioHa- npoHoMaBmeñCH naiyéHTaMn, oflHaKo CBH3B ómia oóHapyKeHa Mesuty - nepoó^oM jie^eH0H o \$paKimeft OHcyji0Ha, CBH33HHoro c Tjioójli^aitui

#### BIBLIOGRAFIA

1. *Berson, S. A.; R. S. Yalow*. Insulin iodine metabolism in human subjects, demonstration of insulin binding globulin in the circulation of insulin treated subjects. J Clin Invest 35: 170, 1956.
2. *Grodsky, G. M.; P. H. Forsham*. An immunochemical-assay of total extractable insulin in man. J Clin Invest 39: 1070-1079, 1960.
3. *Berson, S. A.; R. S. Yalow*. The present status of insulin autogenist in plasma. Diabetes 13: 247-259, 1964.
4. *Yalow, R. S.; A. Berson*. Immunoassay of endogenous Man. J Clin Invest 39: 1157- 1175, 1960.
6. *Heding, L. G.* Determination of total serum insulin in insulin treated diabetic patients. Diabetologia 8: 260-266, 1972.
7. *Heding, L. G.* Determination of free and antibody bound insulin in insulin treated diabetic patients. Horm Metab Res 1: 145- 146, 1969.
8. *Hales, C. N.; P. J. Randle*. Immunoassay of insulin with insulin antibody precipitate. Lancet I, 200-204, 1963.
9. *Brunfeldt, K.; J. R. Jorgensen*. Some factors of significance in the double antibody immunoassay of insulin. Acta Endocrinol 54: 347- 361, 1967.
10. *Amaro, S.; A. Claro*. Insulinemia en el Obeso. 1ra. Jornada de Medicina Interna. Habana, 1974.