

CONFERENCIA BERNARDO HOUSSAY: Temas de inmunidad y diabetes mellitus revisados a la luz de la ciencia básica y de las tecnologías actuales

CONFERENCIA BERNARDO HOUSSAY: Topics of immunity and diabetes mellitus reviewed in the light of basic science and current technologies technologies

RESUMEN

Los métodos convencionales para medir autoanticuerpos, denominados marcadores, en la diabetes mellitus (DM) con componente autoinmune (DM1 y LADA), han sido de tipo radiométrico o enzimático (ELISA). Los autoanticuerpos anti-insulina (IAA) fueron de los primeros en estudiarse. También se han detectado anticuerpos con la misma especificidad en los pacientes diabéticos tratados con insulina (IA) y en otras enfermedades poco comunes. En todos esos casos, los test mencionados se mostraron como muy sensibles, pero tenían la limitación de expresar resultados relativos debido a que no podían distinguir los dos parámetros constitutivos de las señales analíticas, como son las afinidades y las concentraciones. Los métodos denominados absolutos pueden discriminar esos parámetros y son los apropiados para estudiar en profundidad los casos en los cuales aparecen niveles muy altos de IAA o IA mediante los análisis preliminares convencionales.

Hemos seleccionado tres modelos de trabajo requeridos oportunamente a nuestro laboratorio del Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU, CONICET-UBA), por distintos grupos médicos o por la industria farmacéutica biotecnológica. El problema común de esos estudios especiales era superar las limitaciones de los métodos habituales para medir los anticuerpos específicos anti-insulina en alto nivel y pasar a un nivel de complejidad mayor que permitiera definir los niveles reales absolutos de esos anticuerpos. Los objetivos de los trabajos publicados en esas líneas fueron diversos, tales como brindar apoyo diagnóstico más preciso, o de reorientar la administración terapéutica en favor de análogos de insulinas. Para esto último también se revisaron los conceptos de inmunoreactividad cruzada y especificidad de modo de introducir el parámetro de selectividad (S), que permite la expresión cuantitativa más precisa de la interacción de los anticuerpos frente a un panel de antígenos con homologías estructurales. Finalmente se realizaron contribuciones al control de calidad exigibles por las autoridades regulatorias oficiales para las insulinas recombinantes producidas por la industria biotecnológica.

Para todos esos enfoques se presentaron las bases científicas teóricas y prácticas de la radiometría que permitieron históricamente la ponderación de los anticuerpos en base a sus parámetros absolutos y se incorporaron los principios de los biosensores actuales, basados en resonancia plasmónica de superficie, que incluye la determinación de los parámetros cinéticos.

Palabras clave: diabetes; inmunidad; anticuerpos; análisis.

Revista de la Sociedad Argentina de Diabetes 2025; Vol. 59 (97-109)

ABSTRACT

Conventional methods for measuring autoantibodies, called markers, in diabetes mellitus with an autoimmune component (type 1 diabetes and LADA), have been radiometric or enzymatic (ELISA). Anti-insulin autoantibodies (IAA) were among the first to be studied. Antibodies with the same specificity have also been detected in diabetic patients treated with insulin (AI) and in other rare diseases. In all these cases, the aforementioned tests were shown to be very sensitive, but they had the limitation of expressing relative results because they could not distinguish the two constituent parameters of the analytical signals, such as affinities and concentrations. The so-called absolute methods can discriminate these parameters and are appropriate to study in depth the cases in which very high levels of IAA or IA appear through conventional preliminary analyses.

We have selected three work models requested from our laboratory at the Institute of Humoral Immunity Studies (IDEHU, CONICET-UBA), from different medical groups or by the biotechnology pharmaceutical industry. The common problem of these special studies was to overcome the limitations of the usual methods for measuring high-level specific anti-insulin antibodies and move to a higher level of complexity that would allow defining the real absolute levels of these antibodies. The objectives of the works published in these lines were diverse, such as providing more precise diagnostic support, or reorienting therapeutic administration in favor of insulin analogues. For the latter, the concepts of cross-reactivity and specificity in immunology were also reviewed in order to introduce the selectivity parameter (S), which allows the most precise quantitative expression of the interaction of antibodies against a panel of antigens with structural homologies. Finally, contributions were made to quality control required by official regulatory authorities for recombinant insulins produced by the biotechnology industry.

For all these approaches, the theoretical and practical scientific bases of radiometry were presented, which historically allowed the weighting of antibodies based on their absolute parameters, and the principles of current biosensors were incorporated, based on surface plasmonic resonance, which includes the determination of the kinetic parameters.

Key words: diabetes; immunity; antibodies; analysis.

Revista de la Sociedad Argentina de Diabetes 2025; Vol. 59 (97-109)

Dr. Edgardo Poskus

Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral Prof. Ricardo Anibal Margni (IDEHU), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas-Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires (CONICET-UBA), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina



Contacto del autor: Edgardo Poskus
E-mail: poskusedgardo@gmail.com
Fecha de trabajo recibido: 16/12/2024
Fecha de trabajo aceptado: 22/12/2024

Conflictos de interés: el autor declara que no existe conflicto de interés.

INTRODUCCIÓN

Desde una institución científico-académica de doble dependencia CONICET-UBA, como es el Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU), tuvimos la oportunidad de actuar como laboratorio de investigación básica en Inmunología Molecular y como docentes en la carrera de Bioquímica, dentro de la Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA). La disponibilidad de planteles profesionales especializados, de instalaciones habilitadas para el empleo de radioisótopos y del equipamiento técnico apropiado, provenían de una larga trayectoria del IDEHU fundado por el Dr. Ricardo Aníbal Margni.

Las vinculaciones profesionales con el ámbito médico, especialmente consagrado a la medicina asistencial de la diabetes mellitus (DM), fueron surgiendo a raíz de los contactos docentes de posgrado y de las actividades interprofesionales asociadas a servicios de extensión del Laboratorio de Inmunoendocrinología (LIE), dentro del IDEHU. En la mayoría de los casos estudiados por requerimientos médicos, los análisis efectuados eran sobre marcadores serológicos de la DM autoinmune (DM tipo 1 o LADA). Entre ellos estaban los autoanticuerpos anti-insulina (IAA, semejantes a los anticuerpos inducidos por la insulino-terapia, IA) y otros que surgieron posteriormente, como los denominados IA-2A, GADA y ZnT8A. Los métodos aplicados inicialmente eran los radiométricos de referencia, o variantes tipo ELISA, reconocidos por consenso internacional. Los mismos eran sometidos a controles de calidad por agrupaciones de expertos internacionales *ad hoc*, que nuestro grupo integraba.

Recientemente el LIE desarrolló variantes analíticas originales para marcadores basadas en la citometría de flujo empleando microesferas sintéticas (FLOCMIA) con autoantígenos recombinantes adheridos a ellas¹. En otra publicación se destacó que se trataba de un desarrollo con potencialidad para la medición combinada de marcadores (multiplex), no solo para la DM, sino para otras enfermedades autoinmunes con riesgo asociado, como la enfermedad celíaca².

Todos los métodos hasta aquí mencionados tienen la limitación de ser relativos, es decir, no brindan información estrictamente cuantitativa y comparable. Por ello, para el desarrollo de esta

conferencia hemos privilegiado una temática enfocada exclusivamente en la determinación "absoluta" de anticuerpos anti-insulina. La estrategia teórica y experimental absoluta es más compleja que la aplicada en los inmunoanálisis rutinarios, por lo cual requiere una descripción especial. La misma está vinculada a las raíces científicas y académicas de la interacción entre antígenos y anticuerpos. Se seleccionaron tres modelos colaborativos interprofesionales que en su momento significaron desafíos provocativos aplicados a la DM y en particular a la insulina (modelos 1, 2 y 3). Los modelos tenían en común el estudio de las respuestas inmunes humorales anti-insulina de alto nivel.

La historia comienza evocando brevemente la memorable contribución de cuatro Premios Nobel implicados en la temática de la insulina: Frederick B. Banting (1923), Bernardo A. Houssay (1947), Frederick Sanger (1958; 1980) y Rosalyn Yalow (1977). Esta última científica, Lic. en Física, junto con el Dr. Salomon Berson, desarrollaron el radioinmunoanálisis (RIA) a mediados de la década de 1950. Con ese método y su versión vinculada, el denominado "*radioligand binding assay*" (RBA), se pudo cumplir con el modelo prácticamente ideal de la interacción primaria, a dilución virtualmente infinita, y en el punto cercano al equilibrio. Con esas herramientas se encaró la medición de los autoanticuerpos anti-insulina (IAA) y de los anticuerpos anti-insulina inducidos por la insulino-terapia (IA). El rango de las señales analíticas variaba desde 0 (debajo de los valores inespecíficos de corte) hasta valores "muy altos," estimados en principio por el RBA (que es muy sensible, pero también arroja datos relativos). En el Modelo 1 se seleccionaron dos casos de pacientes con altos niveles de IA o IAA, y el objetivo central fue medirlos en unidades absolutas. Había que recurrir a las experiencias científicas y docentes clásicas acumuladas en el LIE y revisar la problemática también a la luz de otra metodología no radiométrica más moderna.

Modelo 1

En la Figura 1 se presentan los datos de los dos pacientes estudiados, según la información remitida por las respectivas profesionales médicas junto con las muestras de suero ingresadas al IDEHU/LIE.

Modelo 1

Sueros de dos pacientes especiales derivados al IDEHU

1) Hospital Garrahan (CABA). Dra. AG Krochik

- . Paciente varón de 12 años con DM1 (debut a los 18 meses). IMC: 19
- . Episodios alternantes de hipo e hiperglucemia (DM "lábil")
- . Hemoglobina glicosilada (HbA1c) 8,6%
- . Lipodistrofia en los sitios de inyección de insulina
- . Tratamiento con distintas insulinas, en altas dosis, incluyendo glargina y levemir
- . Anticuerpos anti-insulina a los 4 años: RBA B%= 48,2% (valor de corte: 3,28%)

(IAA)
IA



2) Hospital Privado de la Comunidad (Mar del Plata). Dra. MC Arriazu

- . Paciente mujer de 27 años con hipoglucemias desde los 10 años
- . Sin marcadores de DM1, sin alelos DQB1 de susceptibilidad, sin insulino terapia
- . Sin diagnóstico certero (¿posible síndrome autoinmune de insulina -IAS-, Hirata?)
- . Luego de episodios persistentes de hipoglucemia, la paciente fue tratada alternativamente con metilprednisolona, acarbosa, plasmaféresis o rituximab
- . Autoanticuerpo anti-insulina: RBA B%= 62,1% (valor de corte: 3,28%)

IAA



Figura 1: Características de los dos pacientes que se estudiaron comparativamente dentro del Modelo 1.

Como se mencionó anteriormente, los dos pacientes se incluyeron en el mismo estudio comparativo debido, en principio, a que ambos presentaban altos niveles de anticuerpos o autoanticuerpos anti-insulina (IA o IAA, respectivamente), asociados con episodios alternantes de hiperglucemia e hipoglucemia, aunque diferían sustancialmente en su diagnóstico presuntivo. El primero exhibía las características típicas de un individuo joven con DM1, bajo terapia insulínica, mientras que la segunda paciente no era diabética, nunca había sido tratada con insulina, y en principio reunía algunas características semejantes a las del síndrome de Hirata³.

El estudio preliminar de anticuerpos anti-insulina en los sueros de ambos pacientes se realizó por el método radiométrico de referencia RBA, el cual arrojó valores francamente altos respecto del control negativo. Para interpretar correctamente este tipo de resultados, expresados en unidades relativas de B%, debemos remitirnos brevemente a las determinaciones históricas de autoanticuerpos en DM y en especial los IAA.

El primer antecedente reconocido sobre la determinación de anticuerpos anti-islole (ICA) es el de Gian Franco Bottazzo en 1974⁴. La determinación se había efectuado entonces mediante microscopía basada en inmunofluorescencia indirecta sobre cortes pancreáticos. Recién en 1983

apareció la primera determinación radiométrica de autoanticuerpos anti-insulina, en pacientes que aún no habían sido tratados con insulina (IAA prodrómicos), basada en el método de unión de radioligando, denominado RBA⁵.

Para profundizar el conocimiento de los IAA/IA en ambos pacientes, y ante la demanda de los respectivos grupos médicos implicados, en nuestro laboratorio se elaboró un plan estratégico basado en la determinación de los parámetros de interacción primaria: afinidad y concentración de los anticuerpos específicos. Discutiremos someramente el significado de ambos términos y los antecedentes bibliográficos de ese tipo de determinaciones en términos de unidades absolutas, aplicados a la DM autoinmune.

La definición general de afinidad ha sido expresada como la fuerza de unión entre un anticuerpo y su sitio específico en el antígeno, denominado determinante antigénico o epítipo. Se suele representar por medio de la constante de asociación (K). Su valor se obtiene aproximadamente de la concentración de antígeno que, en diluciones suficientemente altas, la mitad está unida a los anticuerpos, mientras la otra mitad permanece libre.

Este concepto está necesariamente ligado a que los anticuerpos en sus regiones complementarias a los epítopos (denominadas "parátipo")

exhiben una inmensa variedad estructural que en cada caso los hace “encastrar” como una cerradura y su llave. El dilema durante muchos años sobre la mecánica genética que permitía expresar este ajuste en los paratopos de las inmunoglobulinas anticuerpos hacia sus respectivos epítomos, fue inicialmente aclarado por el investigador japonés Susumu Tonegawa, Premio Nobel de Medicina 1987. En resumen, a partir de unos centenares de genes en los linfocitos B que codifican para regiones variables de las cadenas pesadas y livianas de los anticuerpos, se produce por mecanismos recombinatorios aleatorios el ensamble potencial de una infinidad de paratopes posibles, dirigidos específicamente hacia un repertorio inmenso de antígenos. Finalmente, cada línea de linfocitos B a través de las respectivas células plasmáticas que evolucionan de ellos, secretan anticuerpos con una estructura específica para complementarse con un determinante antigénico, exhibiendo una afinidad definida. Este mecanismo ha sido comparado con la variabilidad que emana de un juego de naipes, del cual no siempre se espera obtener la mejor combinatoria de entrada por cuestiones probabilísticas. Luego veremos que, además de este barajado inicial (*shuffling*) existe otra oportunidad ulterior de mejorar “las cartas en mano”, o sea la estructura de los aminoácidos de las seis regiones CDR (regiones determinantes de la complementariedad), que contactan los epítomos en las cadenas pesadas y livianas de los paratopes.

Esta visión puramente mecánica de los encastramientos entre anticuerpos y sus antígenos es consistente con un enfoque termodinámico, ya que la fuerza de unión implica energías de interacción. La energía libre asociada a la unión de anticuerpos y antígenos está íntimamente vinculada con la afinidad, por lo cual desde la ciencia básica biofísica se aportó una imagen integrada: las energías libres de unión, el número de puntos de contacto entre paratopes y epítomos y los respectivos valores de afinidades conforman un modelo racionalizado. Por ejemplo, una interacción antígeno:anticuerpo que involucra unos 10 puntos de contacto corresponde a una energía libre asociada de aproximadamente 10.000 cal/mol, de la cual resulta una afinidad de 107 M⁻¹. Nótese que la afinidad en unidades de equilibrio de asociación se expresa como la inversa de la concentración, donde se une el 50% del antígeno específico.

Pero ahí no acaba el tema, ya que faltaría explicar por qué los sueros a través del tiempo de su

estudio longitudinal pueden cambiar de valor, exhibiendo una “maduración” de la respuesta, asociada con un incremento de la afinidad.

Con el progreso del conocimiento en la biología celular y molecular ese fenómeno se fue interpretando mejor y el proceso por el cual se puede modificar la afinidad se lo denominó “hipermutación somática”. Otro investigador japonés, Tasuku Honjo, Premio Nobel 2018, contribuyó en buena medida a develar el mecanismo implicado al descubrir la enzima deaminasa de citidina (AID). Durante la transcripción que abre las dos cadenas a nivel de la región codificante para los anticuerpos, esa enzima cambia la estructura nucleotídica a nivel de una citosina y la reemplaza por uracilo. Finalmente, el corte que se produce en ese punto se repara con cierta aleatoriedad introduciendo un cambio en la secuencia con otra base. El resultado final es que así se produce otra oportunidad de incrementar la afinidad.

Llegados a este nivel en la descripción de la evolución de conocimientos en la inmunología y en particular del funcionamiento de la respuesta inmune humoral, podemos enfocarnos en la adecuada interpretación de trabajos señeros sobre la afinidad de anticuerpos anti-insulina en la DM, como el de Achenbach⁶. En ese estudio se vio que el rango de afinidades se extendía aproximadamente entre 105 y 10¹⁰ M⁻¹, o sea la diferencia exhibida por las afinidades más altas era 100.000 veces mayor respecto de las más bajas en esa población de individuos que cursaban la fase prodrómica de la enfermedad. Así se demostró que la determinación de un parámetro absoluto de la respuesta anti-insulina, como es la afinidad, amplía considerablemente el conocimiento de la calidad de la respuesta inmune humoral específica, más allá de lo que permitiría un análisis relativo estándar del tipo RBA o ELISA.

Sin embargo, como se mencionó anteriormente, la intensidad de las señales de los métodos relativos, independientemente de sus variantes basadas en interacción primaria o secundaria, dependen también de la concentración de los anticuerpos específicos (parámetro simbolizado aquí con la letra q). De este modo debemos recalcar que en los resultados analíticos participa con igual importancia este otro parámetro, definiendo el nivel de las respuestas humorales específicas.

Para expresar la concentración de los anticuerpos, especialmente en el suero de los pacientes bajo terapia insulínica, existen dos formas: la

convencional básica en términos de molaridad, y la más práctica en términos de la "capacidad de unión de insulina" o BC (*binding capacity*).

Estos análisis se mencionan raramente en la bibliografía sobre inmunidad y DM, probablemente debido a que están fuera de la práctica bioquímica corriente por los requerimientos especializados de su ejecución y por el procesamiento matemático complejo de los resultados. El mejor modelo bibliográfico sobre el tema tal vez sea el artículo de Davidson y DeBra⁷, titulado "*Immunologic insulin resistance*". En ese trabajo, y en el rescate editorial que hiciera de este el Dr. George Eisenbarth en su libro virtual "*Cellular, Molecular & Clinical Immunology*", se describe un valor medio de 30.000 microunidades de insulina unida a anticuerpos por mL de suero (o expresadas como 30 unidades de insulina por litro -30 UI/L), en asociación con insulinoresistencia inmunológica. Las bases matemáticas necesarias para sentar los conceptos de concentración o BC emanaron del desarrollo del RIA, por parte de Rosalyn Yalow, y del procesamiento de datos, según George Scatchard. El modelo monoclonal más sencillo, que permite calcular la concentración y la afinidad se complica un poco más en la práctica considerando el carácter oligoclonal de los sueros. Para resolver ese tema se debió recurrir al procesamiento de funciones no lineales basadas en el algoritmo de Newton-Gauss, el cual requiere la aplicación de modelos computados de simulación asimilables al modelo de dos anticuerpos, uno de alta afinidad y baja concentración, y otro de baja afinidad y alta concentración⁸. El operador que ejecuta este tipo de análisis y procesa los datos experimentales debe recibir un entrenamiento especial.

Un parámetro importante para definir la velocidad de disociación de los inmunocomplejos *in vitro* es el tiempo de semidisociación, o semivida, (T1/2). En el trabajo de Davidson y DeBra⁷, comentado anteriormente, se incluyeron datos obtenidos de experimentos cinéticos basados en curvas de disociación de insulina radiactiva y agregados a tiempo cero de un exceso de insulina fría. La representación gráfica del log de la insulina marcada decayendo en función del tiempo permitió calcular el valor de T1/2 para el componente más lento de la curva. En los pacientes con alta resistencia inmunológica a la insulina el valor promedio calculado fue de 614 minutos, con un rango de 14 a 1.300 minutos.

En otro trabajo realizado en Inglaterra por

Vaughan et al., publicado en 1983, se reclutaron pacientes en los que se producía el efecto inverso por parte de los anticuerpos anti-insulina: el efecto transportador de insulina o *carrier*⁹. Se pudo demostrar que en un paciente con altos niveles de inmunocomplejos de insulina se podía mantener la glucemia durante 12 horas, aun suspendiendo la administración de insulina.

Es importante observar que, en ese estudio de casi un centenar de pacientes, los valores máximos de los RBA rondaban el 40%. Los pacientes 1 y 2 del Modelo 1 estaban muy por encima de ese valor, aunque hay que enfatizar que las comparaciones de datos interlaboratorios no son estrictamente lícitas debido a que se trata de análisis que arrojan datos relativos dependientes de los respectivos protocolos de trabajo.

De la comparación de los trabajos en la literatura surge el efecto aparentemente paradójico respecto de los anticuerpos anti-insulina, causando en una u otra circunstancia la resistencia a la acción de la hormona, o el transporte de la misma. La alternancia de esos fenómenos ha sido denominada como "labilidad" por causas inmunológicas.

La conclusión es que altos niveles de anticuerpos específicos, como nuevos receptores de insulina circulantes, alteran la cinética de acción hormonal, pero pueden hacerlo de manera diferente. Una explicación sencilla y preliminar sería que en períodos preprandiales los complejos liberan parte de la insulina generando hipoglucemia y en períodos posprandiales secuestran parte de la insulina generando hiperglucemia. Sin embargo, el problema es más complejo. Se ha demostrado en pacientes tratados con insulina que los inmunocomplejos circulantes, al formarse a partir de un antígeno de bajo peso molecular, como es la insulina, comprende al menos dos tipos de estructuras¹⁰. Una de esas presenta una relación Ac:Ag 1:1 (o de masa total casi similar 1:2) y otra de relación 2:1. Pero esas estructuras no se relacionan de manera simple con los niveles de anticuerpos en el grupo de pacientes estudiados. Por ello se concluyó que otros factores influirían en la estructura de los inmunocomplejos, su tendencia a ser opsonizados o, inversamente, a actuar como transportadores de insulina bioactiva y finalmente determinar su permanencia en la circulación. Esos factores incluirían la oligoclonalidad de los anticuerpos, los epítomos involucrados (superpuestos o no interactuantes), las afinidades respectivas, la cinética de disociación de los inmunocomplejos y

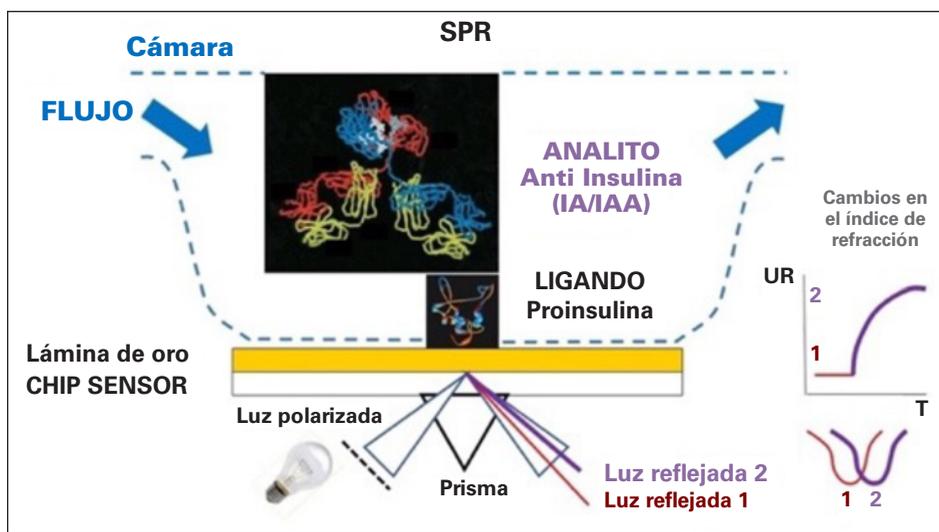
la degradación de la insulina libre por medio de la enzima degradadora de la insulina (EDI o *insulin-degrading enzyme*, IDE), una proteasa dependiente de zinc con una distribución ubicua en los tejidos del organismo.

No perdamos de vista que el problema que nos ocupaba era definir con mayor profundidad la naturaleza de las respuestas inmunes humorales de los pacientes del Modelo 1. Entonces, medir tanto las afinidades como las concentraciones de los anticuerpos anti-insulina hasta aquí ya se vislumbraba como indispensable. Pero, además de los parámetros de las interacciones, también era importante definir las cinéticas de disociación de los inmunocomplejos. Un nuevo recurso para resolver en forma versátil ese último punto provino de los biosensores, basados en el principio denominado resonancia plasmónica de superficie (*surface plasmon resonance*, SPR). Con ese tipo de instrumentos, en general de disponibilidad restringida a centros académicos y de investigación o a grandes laboratorios de desarrollo y control, se ha podido subir otro escalón en la caracterización fina de las moléculas receptoras (como los anticuerpos) y sus respectivos ligandos (como los antígenos). Cuando en el IDEHU estuvo disponible el biosensor Biacore T100, se pudo encarar desde el LIE la revisión analítica completa de los sueros del Modelo 1.

En la Figura 2 se muestra un esquema simpli-

ficado de las partes esenciales del instrumento, en el cual se destaca el *chip* sensor con el ligando adsorbido y la cámara donde fluye el analito. La luz polarizada se refleja con un desvío angular debido al cambio del índice de refracción por la unión del analito al ligando. El procesador asociado registra las unidades de resonancia plasmónica, un fenómeno electromagnético que se produce en la superficie del film de oro tras el efecto de excitación electrónica de la luz incidente. A medida que se incrementa la masa unida del analito, junto con el cambio angular de la luz reflejada, se computa la cinética de unión antígeno:anticuerpo en tiempo real para obtener la constante cinética de asociación (k_1). Luego en la fase siguiente, el pasaje de solvente sin analito, se obtiene la respectiva constante cinética de disociación (k_{-1}).

A diferencia de los procedimientos antes descritos, el cálculo de $T_{1/2}$ de disociación de los inmunocomplejos a partir de las determinaciones de SPR se inicia precisamente en el conocimiento de esta última constante cinética: k_{-1} . Dado que la cinética de disociación en este caso parte de un solo reactivo "A", se la define como "cinética de primer orden". La ley de velocidad de una reacción de primer orden se expresa por la ecuación diferencial: $-d[A]/dt = k_{-1}[A]$. De la solución integral, la semivida se calcula entonces de la expresión: $T_{1/2} = \ln(2) / k_{-1}$, o sencillamente como: $T_{1/2} = 0.693 / k_{-1}$.



SPR: *surface plasmon resonance*.

Figura 2: Componentes principales del biosensor.

En la Figura 3 se muestra el biosensor Biacore T100 (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) y en la pantalla de su procesador *online* se ve el gráfico en tiempo real de un experimento con anticuerpos anti-insulina/proinsulina uniéndose a la proinsulina fijada al *chip*.

Para la determinación de las afinidades, el *chip* sensor se preparó utilizando bajas concentraciones del antígeno (300 unidades de resonancia, UR). Luego de la etapa de asociación, el sistema se cambió a la segunda etapa con el pasaje de solvente, en la que se produjo la disociación de los inmunocomplejos adsorbidos; en ella se midió la cinética de liberación de los anticuerpos. Del cociente de las constantes cinéticas de asociación y de disociación se obtuvo la constante de afinidad utilizando el programa “*Biacore T100 Evaluation Software*” versión 2.0, provisto junto con el instrumento.

Los valores de concentración se obtuvieron de un experimento separado, utilizando un *chip* sensor especial (dextrano carboximetilado, CM5) y proinsulina fijada en alto nivel (1.500 UR) para la captura completa del ligando.

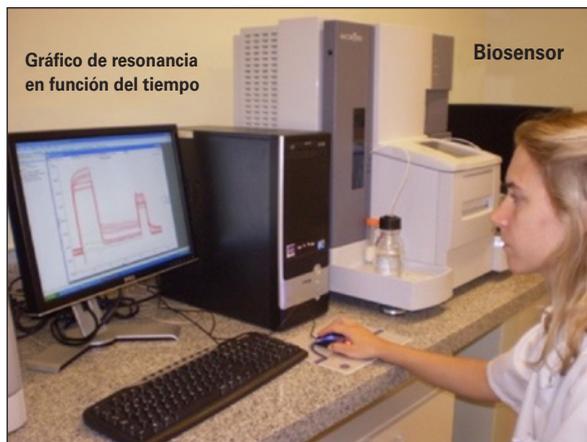


Figura 3: Biosensor Biacore T100.

Aunque en los experimentos de SPR para medir la afinidad, el antígeno está fijado a una superficie soporte en muy baja concentración y el anticuerpo fluye en una fase líquida, no se reúnen estrictamente los principios de la interacción primaria (dilución virtualmente infinita de los dos componentes en solución verdadera hasta alcanzar el equilibrio de las interacciones). Además, los programas de ajuste de datos a “un sitio” o “dos sitios” aplicado al procesamiento de datos del RIA⁸ ponderan los errores experimentales asociados a las señales cercanas a los inespecíficos. Por lo tanto, a los fines de no comprometer

prejuiciosamente cuál sería el mejor criterio para aceptar o descartar una eventual subpoblación de anticuerpos de muy baja afinidad, se decidió efectuar sobre los mismos sueros y en paralelo los correspondientes experimentos basados en RIAs de equilibrio.

En la Tabla 1 se muestran integradamente los resultados principales de las series experimentales realizadas con los sueros de los pacientes 1 y 2 del Modelo 1.

			
Paciente		1	2
RBA	Señal B%	48,2	61,2
RIA/Scatchard	BC (U/L)	76	195
SPR	K1 ($\times 10^5 M^{-1} s^{-1}$)	36,8	5,70
	k-1 (s^{-1})	0,36	0,17
	Q (nM)	250,55	352,25
	K(M^{-1})	$1,03 \times 10^7$	$3,37 \times 10^6$

Fuente: Trabucchi et al.¹¹.

Tabla 1: Resultados condensados de los análisis de RBA (señales relativas), RIA (concentraciones absolutas) y SPR (parámetros cinéticos), obtenidos de los sueros de pacientes 1 y 2.

Hasta aquí, las principales conclusiones que pueden extraerse de estos resultados son las siguientes. Las afinidades de los anticuerpos anti-insulina en ambos pacientes resultaron relativamente medianas o bajas, en cambio las concentraciones resultaron muy elevadas (sobre todo en la paciente 2). Eso se demostró tanto por los análisis RIA/Scatchard (BC) como para los análisis con el biosensor (q). Los datos obtenidos se compararon con los respectivos parámetros obtenidos para pacientes IAA positivos con DM1 dentro del mismo estudio¹¹, como los obtenidos en otro trabajo previo de nuestro grupo utilizando SPR¹².

Los valores relativos tan altos para los ensayos de RBA en ambos casos se debían entonces, de manera predominante, a los respectivos niveles de concentraciones y no a los de afinidades. Cabe preguntarse entonces cuáles serían las causas de esas respuestas tan elevadas. En el caso del paciente 1, la explicación más probable se relaciona con el bajo o nulo nivel de autotolerancia hacia la insulina que suelen exhibir los pacientes con DM1 por razones genéticas. La región reguladora “*up stream*” del gen de la insulina que regula su expresión es reconocida como VNTR (*variable number of tandem repeats*) y sería la implicada dentro del contexto multigenético que condiciona la suscep-

tibilidad. Además, la administración necesaria de la terapia insulínica de reemplazo actuaría como un estimulador permanente de la respuesta humoral específica hacia la insulina. Esto ha sido demostrado también en los pacientes adultos, denominados LADA, según un trabajo liderado por Frechtel et al.¹³. En adición, otros autores demostraron que los mínimos o nulos niveles de expresión de la insulina en el timo por efecto de las variantes VNTR "small" jugarían un rol pivotal en la autotolerancia insulino-específica¹⁴. Esto explicaría el posible mecanismo sobre cómo el locus VNTR predispone o protege para la DM y, por extensión, a la intensidad de la respuesta hacia la insulina de administración externa.

Por otra parte, debido a que existían antecedentes bibliográficos sobre la asociación de las respuestas IAA en DM autoinmune con algunos isotipos y subisotipos de inmunoglobulinas¹⁵, también se efectuó este tipo de análisis para una caracterización más amplia de las respuestas humorales de ambos pacientes. En el mismo estudio se incluyeron análisis de isotipos y subisotipos mediante SPR.

La clase y subclase de anticuerpos anti-insulina del paciente 1 fue IgG1, típica de un paciente inicialmente con riesgo de DM1 y luego con franca expresión clínica de la enfermedad. En la paciente 2, la determinación de clase y subclase de IAA condujo a caracterizar un anticuerpo de subisotipo IgG3, compatible con una gammopatía monoclonal benigna¹⁶. La respuesta IAA de altísimo nivel estaría relacionada entonces con la condición excepcional generada por un plasmacitoma derivado de una línea específica de linfocitos B.

Por otro lado, la asignación inicial de la patología en la paciente 2 como probable síndrome autoinmune de insulina, tipo Hirata, fue perdiendo consistencia a lo largo del tiempo de observación. En la literatura especializada se esgrimían razones de etnia (el síndrome de Hirata es más frecuente en razas mongoloides); además, la inexistencia en la historia clínica de la paciente de eventuales terapias con drogas tipo tiores y finalmente la persistencia del cuadro clínico y de los resultados sostenidos en los análisis del laboratorio bioquímico tras la aplicación de una plasmaféresis.

En relación con los niveles extremadamente altos de IAA en esta paciente, surgieron importantes cautelas referidas a su condición de género y a eventuales embarazos. Existían antecedentes sobre los efectos nocivos de los anticuerpos anti-insulina maternos sobre el desarrollo fetal. Uno de

los estudios más representativos fue el de Menon et al.¹⁷. En ese estudio se demostró que el pasaje transplacentar de anticuerpos anti-insulina de isotipo IgG y de los respectivos inmunocomplejos con insulina podrían causar macrosomía fetal, con los conocidos riesgos asociados. La paciente 2 del Modelo 1, si bien presentaba IAA circulantes de afinidad relativamente baja ($3,37 \times 10^6$ M-1) y un T1/2 de solo 4 segundos, estos se hallaron, al menos en el momento del análisis con biosensor, en muy altas concentraciones (250,55 nM). Este nivel era muy elevado respecto del valor reportado para IA en el trabajo de Menon et al. (7,74 nM). A modo de referencia, es importante destacar que la prevalencia de macrosomía en el trabajo de Menon et al. era del 43% (12 entre los 28 casos estudiados). Sin embargo, hay que recalcar que la concentración de IAA por sí sola no determina inexorablemente la evolución a macrosomía fetal (16 casos en la relación anterior no se asociaron con esa condición), sino que los otros parámetros estáticos y cinéticos de la interacción que determinan la generación de los inmunocomplejos y la actividad degradativa coexistente de la IDE finalmente pueden resultar en una acción menos dramática a nivel fetal. De todos modos, los riesgos existentes ante un embarazo de la paciente en este caso estaban a la vista y fueron expuestos como tales. Aquí comentamos que más de una década después de la publicación del estudio de la paciente 2 en PLOS One y sin contar con datos sobre la posible persistencia de la respuesta inmune humoral absoluta en los IAA, la paciente tuvo felizmente una beba normal con un peso de 2,270 g (Apgar 9/10).

En resumen, los niveles absolutos elevados en la concentración de IA/IAA en ambos pacientes del Modelo 1 establecieron un criterio racional sobre el origen y el grado de descontrol glucémico. La cuantificación analítica precisa en ambos casos condujo a los grupos médicos involucrados a la necesidad de disminuir, dentro de lo posible, la magnitud de las respuestas inmunes humorales implicadas. En la Figura 1 se resumieron los intentos terapéuticos aplicados en cada caso. En particular, para el paciente 1, el cambio terapéutico empírico hacia un par de análogos de insulinas de acción lenta, en el intento de explorar una eventual disminución de la inmunogenicidad, no había arrojado resultados favorables, pero sirvió de antecedente para la estrategia general que se aplicaría más adelante en el Modelo 2.

Modelo 2

En la Figura 4 se resumen las características generales de una paciente con DM2, con elevados requerimientos de insulina asociados a altos niveles de anticuerpos anti-insulina e hiperglucemia. A los fines de orientar un cambio terapéutico en

favor de los análogos de insulina, con menor reactividad hacia sus anticuerpos circulantes, el caso provocó un nuevo desafío inmunoanalítico para el cual fue necesario aplicar un enfoque científico-técnico no convencional.

Modelo 2

Suero de una paciente derivada al IDEHU desde el Hospital JR Vidal, Corrientes (Dra. S Gorbán de Lapertosa)

Estudios de selectividad de anticuerpos.

Análisis especiales para la orientación del posible cambio del tipo de insulina

- . Mujer de 69 años con DM2, con 10 años de requerimiento de insulinas regular y lenta. HbA1c 11 %. Presentó episodios de hiperglucemia (500 mg/dL) con dosis de insulina NPH mayores a 3 IU/kg/día
- . Análisis preliminar de anticuerpos anti-insulina por RBA B%: 30,5 (valor de corte 3, 28%)
- . Análisis especial: RIA para test de inmunorreactividad cruzada/selectividad, aplicando los siguientes antígenos homólogos: insulina y varios análogos de insulina de acción lenta y rápida
- . Objetivo del estudio: orientar una nueva terapia hipoinmunogénica de reemplazo



Figura 4: Características de la paciente con alta respuesta IA, estudiada como modelo para orientar una nueva terapia insulínica hipoinmunogénica.

Para poder avanzar con la explicación de la estrategia aplicada en este modelo, primero debemos introducir el concepto de especificidad (y su antónimo, la inmunorreactividad cruzada, IRC), revisándolo a la luz del enfoque más preciso que se encuentra en la literatura del tema. En efecto, el trabajo señero de Berzofsky y Schechter¹⁸ ha permitido aclarar el tema de la IRC de manera formal y profunda, resolviendo algunas discrepancias históricas al respecto.

Los autores presentaron la problemática anunciando primero que la metodología de unión directa de interacción primaria, como es el RIA, era la ideal para estudiar las interacciones entre las inmunoglobulinas y los antígenos. Ello permitió distinguir al menos entre dos tipos de reactividad cruzada: la de tipo 1, típica de los anticuerpos monoclonales, y la de tipo 2, únicamente presente en sueros oligoclonales. Segundo, efectuaron un

análisis matemático detallado de las curvas de desplazamiento de los radioinmunoensayos para describir las bases moleculares de la IRC. Los conceptos de especificidad y reactividad cruzada, como dos términos opuestos, condujeron finalmente a la definición del término selectividad (S).

En la Figura 5 se resume gráficamente la definición de S a partir de las curvas de desplazamiento de un antígeno original y de dos análogos (moléculas similares, pero no idénticas a ese antígeno) que también reaccionan con el anticuerpo, pero de manera un tanto diferente. Ese modelo teórico anticipa el comportamiento inmunoquímico que pueden exhibir la insulina y sus análogos biosintéticos frente a un anticuerpo monoclonal (IRC de tipo 1). Si las curvas resultan no paralelas, o no alcanzan el eje de las abscisas, se presume que en el suero estudiado existe una heterogeneidad oligoclonal (IRC de tipo 2).

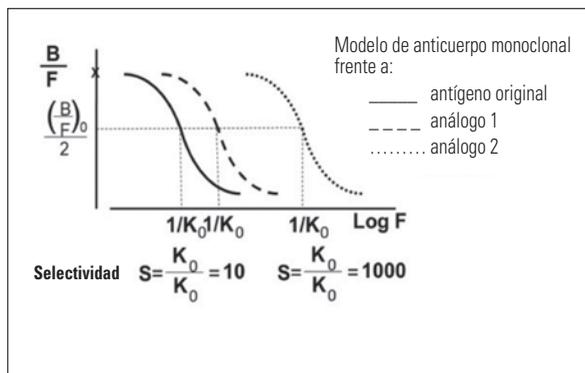


Figura 5: Curvas de desplazamiento y cálculo de la selectividad.

La principal diferencia en los gráficos aplicados por Berzofsky y Schechter con la representación de los gráficos clásicos de RIA, es que las magnitudes en el eje de las abscisas corresponden a valores del antígeno libre, expresados como concentraciones molares (F). Esos valores se calculan a partir de la fórmula: $F = [Ag] / 1 + B/F$, donde [Ag] corresponde a cada dosis molar del antígeno desplazante. Luego, por deducción matemática, en el punto medio respecto de las señales máximas del eje de ordenadas interpoladas en el eje de las abscisas se obtienen exactamente los valores de las inversas de K y no aproximadamente, como ocurre en los gráficos convencionales de B/F en función de las dosis directas de los antígenos.

En el trabajo de Berzofsky y Schechter¹⁸ se dan las justificaciones teóricas y las condiciones experimentales que se deben seguir para prescindir de la elaboración de RIAs homólogos (cada uno preparado con el mismo trazador derivado del antígeno análogo ensayado). De esta manera, el set completo de antígenos análogos que se desea estudiar se ensaya con un solo RIA homólogo múltiple, evitando el engoroso (y costoso) empleo de un panel completo de RIAs homólogos para cada muestra. En la Tabla 2 se extractan los valores de afinidad y selectividad obtenidos de las muestras de suero de la paciente estudiada, apropiadamente diluidas, y de un único trazador radiactivo, preparado a partir del antígeno original (la insulina humana recombinante regular, con que fue tratada la paciente inicialmente).

Insulina/análogo de insulina L=ligando C=competidor	K_0 (M^{-1})	$S=K_L/K_C$
R h-insulina (Humulin, Eli Lilly)	$7,90 \times 10^8$	
Determir (Ivemir, Novo Nordisk)	$8,10 \times 10^8$	0,98
Glargina (Lantus, Sanofi Aventis)	$2,10 \times 10^7$	37,62
Lispro (Humalog, Eli Lilly)	$1,96 \times 10^7$	40,61
Glusina (Apidra, Sanofi Aventis)	$1,00 \times 10^6$	790,00

Tabla 2: Afinidades y selectividades.

El trabajo se publicó en la revista periódica indexada MethodsX¹⁹, enfatizando que el objetivo de la investigación estaba centrado en la aplicación de una estrategia original aplicada a un caso modelo de DM con altos niveles de anticuerpos anti-insulina. La hipótesis planteada era que las afinidades exhibidas por los análogos frente al suero fueran diferentes y permitieran la orientación de una sustitución terapéutica alternativa, si alguna variante mostrara caída significativa en la selectividad. En la Tabla 2 se observa que, efectivamente, para el análogo glulisina el valor de S fue de 790, correspondiendo a la menor afinidad relativa respecto de la insulina regular aplicada originalmente a la paciente. El estudio no tenía en principio el carácter de investigación clínica longitudinal para otros parámetros bioquímicos completos, más allá del control glucémico a corto plazo y de la hemoglobina glicosilada A1c. Todos los registros clínicos posteriores de la paciente resultaron favorables, por lo cual no llegaron al laboratorio otras demandas inmunológicas consecutivas de ese caso.

Modelo 3

Los modelos anteriores estaban centrados en casos especiales enfocados como ejemplos representativos, aunque poco frecuentes, de anticuerpos anti-insulina de muy alto nivel asociados a complicaciones inmediatas y tardías. La pregunta que seguiría es: ¿pueden aparecer con alarmante prevalencia anticuerpos específicos durante las terapias con algunos productos biotecnológicos farmacéuticos, asociados con efectos indeseados? La respuesta es afirmativa, pero esto ha sido observado en raras ocasiones. Tal vez el ejemplo más resonante se produjo entre enero de 1998 y abril de 2004, período en el cual se informaron muchos casos de aplasia pura de células rojas asocia-

dos al tratamiento con la proteína eritropoyetina, o también denominada epoyetina (EPO). La EPO suele administrarse como terapia sustitutiva cuando ocurren patologías renales que conducen a un déficit marcado de esa hormona, con la aparición de anemias severas. Las formulaciones farmacéuticas implicadas entonces totalizaban 175 casos por Eporex, 11 casos por Neorecormon y 5 casos por Epogen. Cerca de la mitad de los casos ocurrió en Francia, Canadá, Reino Unido y España.

Durante las etapas iniciales de desarrollo y control de esos productos tal problema obviamente no había surgido y se obtuvieron las respectivas autorizaciones de las autoridades regulatorias. Bastante rápido se aceptó que la posible causa del problema era la inducción de anticuerpos específicos bloqueantes de la EPO, y al respecto aparecieron varios trabajos. Algunos de ellos se basaban en la determinación radiométrica, tipo RBA, de anticuerpos anti-EPO²⁰. En otros trabajos se estudiaron las posibles causas de la aparición del problema cuando ya estaba difundido el uso de esa proteína recombinante.

Muchos casos se asociaron con el uso de jeringas lubricadas conteniendo Eporex, fabricada por Janssen-Ortho, o su empresa madre Johnson & Johnson. Al mismo tiempo esos laboratorios habían eliminado en esa época la preparación estabilizante proveniente de sueros debido a los riesgos denunciados por la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob y pasaron a un estabilizante sintético, con mayor tendencia a desnaturalizar la epoyetina y así estimular al sistema inmune. También se sospechó de su mayor inestabilidad al calor, a la agitación de las preparaciones y a la vía subcutánea de inyección.

Tal vez ese ejemplo, de amplia repercusión internacional y causante de gran preocupación por parte de las autoridades regulatorias, indujo la elaboración de un trabajo importante de "estandarización" y de "recomendaciones" publicado en 2004 por parte de la Oficina de Productos Biotecnológicos y Centro para la Evaluación e Investigación de Drogas de la *Food and Drug Administration* (FDA)¹⁵. Tal trabajo fue publicado en la revista *Journal of Immunological Methods* para su amplia difusión y no como un simple boletín oficial interno del organismo. Ese caso significó tal vez el mejor ejemplo del ingreso y difusión universal de la opinión de una entidad regulatoria líder en la era farmacéutica biotecnológica. A la

autoría principal de Anthony R. Mire-Sluis, enrolado en la FDA, le secundaron otros 12 coautores provenientes de compañías farmacéuticas de reconocido prestigio internacional y titulares de patentes de productos biotecnológicos.

Creemos importante transcribir textualmente las recomendaciones centrales incluidas en ese artículo denominado "*Recommendations for the design and optimization of immunoassays used in the detection of host antibodies against biotechnology products*".

"...Most biopharmaceutical therapeutics elicit some level of antibody response against the product. This antibody response can, in some cases, lead to potentially serious side effects and/or loss of efficacy. Therefore, the immunogenicity of therapeutic proteins is a concern for clinicians, manufacturers and regulatory agencies. In order to assess immunogenicity of these molecules, appropriate detection, quantitation and characterization of antibody responses are necessary"... "*Quasi-Quantitative and Qualitative assays are those for which an appropriate reference standard is not available*".

Como se aprecia, las mismas definiciones que habían sido establecidas mucho tiempo antes en el ámbito académico como pautas de la ciencia básica inmunológica y de los manuales de inmunanalítica, estaban siendo incorporadas al campo práctico regulatorio del control farmacéutico en la era biotecnológica.

En la Argentina la institución equivalente, la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT), ejerce las atribuciones regulatorias oficiales. Las bases funcionales y objetivos de la ANMAT en buena medida están armonizados con las instituciones oficiales líderes mundiales. Lo mismo ocurre con la Farmacopea Argentina (FA), o Codex Medicamentarius Argentino, otra división del Ministerio de Salud que se ocupa del control calidad de los medicamentos (en este caso la Farmacopea, también es de jurisdicción oficial, a diferencia de Estados Unidos, donde la Farmacopea es editada por una entidad privada).

La vinculación de profesionales de nuestro laboratorio, IDEHU/LIE, con la Comisión Permanente de la FA y la realización de servicios analíticos oficiales desde el CONICET y la UBA, para la industria farmacéutica biotecnológica local, nos dio apertura y experiencia en la temática aquí pre-

sentada. Un caso en particular de esos servicios, inscripto como un estudio de farmacovigilancia inmunológica poscomercialización, fue presentado ante la ANMAT con el título "Farmacovigilancia: seguimiento poscomercialización para el estudio de la inmunogenicidad de Densulin®. Protocolo DF-DS-S-01, Denver Farma, R. Argentina, Sept 2014, Autorización ANMAT Disposición 165/10, Exp N° 1-0047-0000-000545-09-1".

El ejemplo constituyó un control inmunoanalítico, dentro de una plataforma completa de trabajo multiprofesional, sobre una formulación farmacéutica y no con el foco en los pacientes reclutados para un estudio puntual, como en los Modelos 1 y 2.

Es importante destacar que el diseño experimental de este estudio de farmacovigilancia inmunológica presentado ante la ANMAT, a diferencia de las monografías farmacopeicas, donde los procedimientos de control de calidad están establecidos y detallados, se planeó según la estrategia general y el criterio técnico de los profesionales responsables. Las guías de referencia internacional sirvieron solo para la orientación general del estudio, aunque no para aportar un protocolo en particular. Según las recomendaciones de la Farmacopea Americana (desde la USP 24 en adelante, <1045> *Biotechnology-derived articles*), siempre existe la posibilidad que los productos derivados de la biotecnología puedan causar algunos efectos indeseados en los pacientes que los reciben debido a sensibilización inmunológica, como resultado de una o múltiples modificaciones moleculares. De ahí la conveniencia de que la insulina recombinante, como los otros productos biotecnológicos aplicados de manera terapéutica, deban ser sometidos a test de vigilancia. Por su parte, la *European Medicines Agency* (EMA) estableció, entre los estudios clínicos de seguridad para insulina recombinante humana, el estudio de inmunogenicidad y de reacciones locales.

Se comparó la inmunogenicidad de los productos designados como Densulin con otros productos equivalentes del mercado, a través de las determinaciones de anticuerpos séricos anti-insulina (IA) realizados en el IDEHU, CONICET-UBA (con la participación del Dr. Iácono y la Dra. Valdez). Las formulaciones de densulin estudiadas eran las regulares (R) e isófanas (N), conteniendo insulina humana recombinante de 100 UI/ml, inyectables. Los pacientes eran adultos insulino dependientes

o requirentes, con DM1 o DM2, clínicamente controlados por la División Diabetes del Hospital de Clínicas J. de San Martín, Facultad de Medicina, UBA (responsable, Dr. Puchulu) y con la participación del Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, localizado en el mismo hospital (responsable, Bioquímica Maselli). Para el diseño experimental y el tratamiento estadístico se contó con la participación de la Profesora Núñez, docente de la Cátedra de Matemática y Bioestadística de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.

Las metodologías inmunoanalíticas empleadas en este Modelo 3, como en los Modelos 1 y 2, fueron las de interacción primaria radiométricas. Como primera parte se aplicó el RBA, de mayor sensibilidad (con menor límite de detección, como método relativo, sin estándares de referencia), y como segunda parte se reservó la aplicación del RIA, como método absoluto, para medir eventuales respuestas medianas y altas de anticuerpos anti-insulina en unidades de BC. La correspondencia matemática de ambos test, RBA y RIA, solo era posible si se establecía un modelo monoclonal de anticuerpos de afinidad arbitrariamente definida (se seleccionó un valor de K igual a 107 M⁻¹).

Hasta donde nos consta, esta fue la primera vez que se aplicó para un estudio de farmacovigilancia poscomercialización de un producto biotecnológico, un formato secuencial de análisis relativo (*quasi-quantitative*), seguido de uno verdaderamente cuantitativo o absoluto, para establecer una escala validable universal.

En el presente estudio se ejecutó primero un test piloto de 24 muestras (Figura 6), en el cual se detectaron mediante RBA señales analíticas debidas a IA de muy bajo nivel para todas las muestras (B% < 14%). Ese valor tope, de acuerdo a la conversión estimativa antes explicada, podría corresponder a una BC muy baja (~ 1,4 U/L). Tal valor de nivel mínimo de concentración de IA, además era consistente con la ausencia de reacciones locales y otras manifestaciones clínicas adversas en el grupo estudiado (hipoglucemias, labilidad en el control de la diabetes, lipodistrofias, etc.). Recordemos que en el artículo de Davidson y DeBra⁵, los valores de BC para pacientes con altas respuestas de IA eran iguales o mayores a 30 U/L, lo mismo que se había mencionado para los pacientes del Modelo 1 (donde además por RBA los valores de B% eran muy superiores).

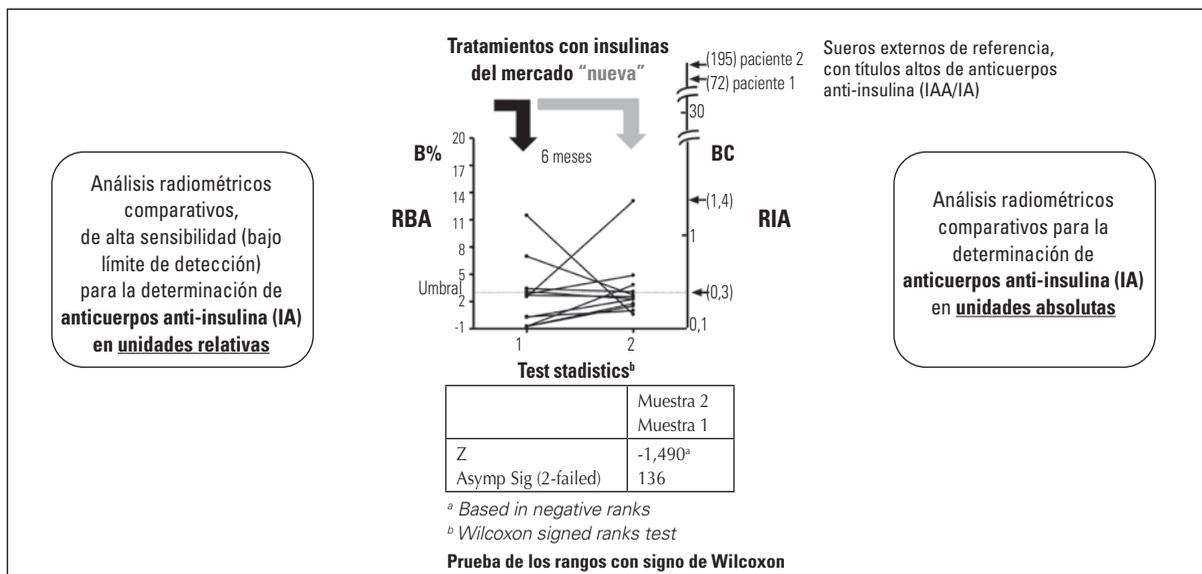


Figura 6: Esquema general del protocolo.

Es importante enfatizar que, en este tipo de estudio, la detección de anticuerpos por encima del nivel de corte, o inespecífico, se interpreta como positivo, pero no por ello significa una alarma respecto de una alta inmunogenicidad. Simplemente puede ser el reflejo de la estimulación marginal de la respuesta inmune humoral de algunos pacientes ante la inyección del fármaco biotecnológico, pero sin consecuencias clínicas.

BIBLIOGRAFÍA

- Sabljić AV, Bombicino SS, Marfía JI, Guerra LL, Penas-Steinhardt A, Faccinetti NI, Iacono RF, Poskus E, Trabucchi A, Valdez SN. Novel flow cytometric immunoassay for detection of proinsulin autoantibodies in diabetes mellitus employing a recombinant autoantigen expressed in *E. Coli*. *Front Immunol Section Autoimmune and Autoinflammatory Disorders* 2021;12:648021.
- Bombicino SS, Sabljić AV, Faccinetti NI, Guerra LL, Marfía JI, Masci I, Trabucchi A, Poskus E, Valdez SN. Inmunoensayo multiplex para el diagnóstico simultáneo de diabetes mellitus autoinmune y enfermedad celíaca. *Rev Soc Arg Diab* 2020;54:3-14.
- Hirata Y, Ishizu H, Ouchi N. Insulin autoimmunity in a case of spontaneous hypoglycemia *J Jpn Diab Soc* 1970;13:312-20.
- Bottazzo GF, Florin-Christensen A, Doniach D. Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet* 1974;1279-83.
- Palmer JP, Asplin CM, Clemons P, et al. Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. *Science* 1983;222:1337.
- Achenbach P, Koczwarra K, Knopff A, Naserke H, Ziegler AG, Bonifacio E. Mature high-affinity immune responses to (pro) insulin anticipate the autoimmune cascade that leads to type 1 diabetes. *J Clin Invest* 2004;114(4):589-97.
- Davidson J, De Bra D. Immunologic insulin resistance. *Diabetes* 1978;27:307-318.
- Feldman H, Rodbard D, Levine D. Mathematical theory of cross-reactive radioimmunoassay and ligand-binding systems of equilibrium. *Anal Biochem* 1972;45: 530-556.
- Vaughan NJ, Matthews A, Kurtz AB, Nabarro JD. The bioavailability of circulating antibody-bound insulin following insulin withdrawal in type 1 (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 1983;24(5):355-8.
- Brizzio AM, Nieto RR, Cedola N, Poskus E, Gagliardino JJ. Dimensiones moleculares de los complejos inmunes insulina-antiinsulina presentes en el suero de pacientes diabéticos / Molecular size of circulating immune insulinantiinsulin complex in diabetic patients. *Medicina (B.Aires)* 1988;48(2):113-9.
- Trabucchi A, Iacono RF, Guerra LL, Faccinetti NI, Krochik AG, Arriazu MC, Poskus E, Valdez SN. Characterization of insulin antibodies by surface plasmon resonance in two clinical cases. Brittle diabetes and insulin autoimmune syndrome. *PLoS One* 2013;8:1-7.
- Trabucchi A, Guerra LL, Faccinetti NI, Iacono RF, Poskus E, Valdez SN. Surface plasmon resonance reveals a different pattern of proinsulin autoantibodies concentration and affinity in diabetic patients. *PLoS One*. 2012;7(3):e33574.
- Cerrone GE, Caputo M, López AP, González C, Mazza C, Cédola N, Targovnik HM, Frechtel GD. Variable number of tandem repeats of the insulin gene determines susceptibility to latent autoimmune diabetes in adults. *Mol Diagn* 2004;8(1):43-9.
- Chentoufi AA, Polychronakos C. Insulin expression levels in the thymus modulate insulin-specific autoreactive T-cells tolerance: the mechanism by which the IDDM2 locus may predispose to diabetes. *Diabetes* 2002;51:1383-90.
- Hoppu S, Ronkainen MS, Kimpimaki T, Simell S, Korhonen S, et al. Insulin autoantibody isotypes during the prediabetic process in young children with increased genetic risk of type 1 diabetes. *Pediatr Res* 2004;55:236-42.
- Wasada T, Eguchi Y, Takayama S, Yao K, Hirata Y, et al. Insulin autoimmune syndrome associated with benign monoclonal gammopathy. Evidence for monoclonal insulin autoantibodies. *Diabetes Care* 1989;12:147-50.
- Menon RK, Cohen RM, Sperling MA, Cutfield WS, Mimouni F, Khoury JC. Transplacental passage of insulin in pregnant women with insulin-dependent diabetes mellitus. Its role in fetal macrosomia. *N Engl J Med* 1990;323:309-15.
- Berzofsky JA, Schechter AN. The concepts of cross reactivity and specificity in immunology. *Molecular Immunology* 1981;18(8):751-63.
- Cardoso LA, Pomares M, Avalos A, Lapertosa S, Frechtel G, Poskus E. Use of cross-reactivity immunoassay to orient insulin replacement in diabetic patients with high levels of insulin antibodies. *MethodsX* 2016;502-7.
- Casadevall N, Nataf J, Viron B, Kolta A, Kiladjian JJ, Martin-Dupont P, Michaud P, Papo T, Ugo V, Teyssandier I, Varet B, Mayeux P; Pure red-cell aplasia and antierythropoietin antibodies in patients treated with recombinant erythropoietin. *N Engl J Med* 2002;346(7):469-75.