

Ensayo clínico controlado con insulinas porcine monocomponente y humana semisintética. Influencia en los niveles de anticuerpos

INSTITUTO NACIONAL DE ENDOCRINOLOGIA

Dr. Felipe Santana Pérez*, Dr. Oscar Mateo de Acosta Fernández**, Dr. Antonio Claro López*** y Dr. René Robaina****

Santana Perez, F. et al.: Ensayo clinico controlado con *insulinas* porcina *monocomponente* y *humana semisintética*. Influencia de *los* niveles de anticuerpos.

Se estudiaron 20 pacientes diabéticos insulino-dependientes, en edades comprendidas entre 16 y 39 años, que estaban recibiendo tratamiento con insulina porcina monocomponente y se distribuyeron al azar en 2 grupos de 10 pacientes cada uno: el grupo I utilizó insulina porcina monocomponente. Todos los pacientes fueron estudiados durante 1 año, y fue determinado el título de anticuerpos antiinsulina al inicio y a los 15 días, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 meses de iniciada la investigación.

INTRODUCCION

La introducción de la insulina en el tratamiento de la diabetes significó la eliminación virtual de la cetoacidosis diabética, la que en la mayoría de las veces terminaba con la muerte del paciente. Sin embargo, la presencia de impurezas pancreáticas y la heterogeneidad de especie de los distintos preparados insulínicos, estimuló la producción de anticuerpos. Precisamente la existencia de esos anticuerpos ha dado lugar a la aparición de complicaciones tales como la alergia a la insulina, la lipodistrofia, la resistencia insulínica, etcétera.¹

Fue Lewis,² en 1937, quien encontró evidencias suficientes de que en algunas condiciones experimentales la insulina se comporta como un antígeno; sin embargo, no fue hasta los años 60 en que pudieron establecerse las propiedades antigénicas de la insulina y el significado clínico de los anticuerpos. Fue entonces que con el objetivo de poder eliminar

.. Especialista de I Grado en Endocrinología.

... Doctor en Ciencias Médicas. Especialista de II Grado en Endocrinología. Profesor Titular de Medicina Interna. Instituto Superior de Ciencias Médicas. Universidad de La Habana. Director del Instituto Nacional de Endocrinología.

**** Candidato a Doctor en Ciencias Médicas. Especialista de II Grado en Bioquímica Clínica.

**** Especialista de II Grado en inmunología.

los inconvenientes producidos por esos contaminantes de los preparados de insulina y la antigenicidad de las diferentes especies, aparecieron las insulinas "altamente purificadas", obtenidas por medio de técnicas especiales de cromatografía, y posteriormente la insulina humana sintética,^{3,4} gracias al desarrollo de la Bioquímica y de la Ingeniería Genética.

En este trabajo nos proponemos evaluar la respuesta inmunológica de los pacientes tratados con insulina humana semisintética en 1 grupo de pacientes diabéticos evolucionados durante 1 año, quienes fueron comparados con un grupo control que mantuvo tratamiento con insulina porcina monocomponente.

MATERIAL Y METODO

Se estudiaron 20 pacientes diabéticos insulino-dependientes, en edades comprendidas entre 16 y 30 años, que estaban recibiendo tratamiento con insulina porcina monocomponente (MC) durante 1 año o más. Se distribuyeron al azar en 2 grupos de tratamiento de 10 pacientes cada uno: grupo I: diabéticos que mantuvieron su tratamiento usual con insulina porcina monocomponente; grupo II: diabéticos que pasaron a usar insulina humana monocomponente (HM).

La asignación por grupos se efectuó de acuerdo con una secuencia fortuita, para lo cual se utilizó la técnica de sobres numerados y cerrados, dentro de cada cual figuraba el grupo de tratamiento al que según el orden de admisión correspondió cada paciente. Todos los pacientes permanecieron en el estudio por un período de 12 meses.

Se les determinó el título de anticuerpos antiinsulina en periodos diferentes: al inicio y a los 15 días, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 meses de iniciada la investigación. Los anticuerpos antiinsulina se midieron por precipitación con polietilenglicol (PEG). Este método, descrito por *Nagakawa et al.*⁵ se basa en la cuantificación de los anticuerpos antiinsulina y mide la capacidad de unión del suero con la insulina marcada con I¹²⁵, utilizando el PEG para separar la hormona libre de la combinada.⁶ La cantidad de radiactividad se expresó como porcentaje de unión total de hormona marcada (recuento total). Se incluyó a cada análisis suero normal —de sujeto no inmunizado— como control, para sustraer la unión no específica.

Los resultados se calcularon de la manera siguiente:⁷

$$\% B = \frac{T - T_0}{T_m - T_0} \times 100$$

donde:

% B = porcentaje de unión de la insulina-I¹²⁵

T = recuento por conocer (paciente)

T₀ = recuento de la muestra control (suero normal)

T_m = recuento máximo (total de hormona marcada)

Los resultados se interpretaron como: *positivos*: porcentaje de unión mayor de 1%; *mejoría inmunológica*: la disminución del porcentaje de unión.

Se utilizaron preparaciones de insulina altamente purificada (monocomponente), porcina y humana en concentraciones de 80 UI/mL y 100 UI/mL respectivamente. Estos productos fueron suministrados por NOVO INDUSTRIAL A/S.

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el test de Student y análisis de correlación y regresión lineal. Se empleó un nivel de significación de $\alpha = 0,05$.

RESULTADOS

Como podemos observar en la tabla 1, ambos grupos no presentaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la distribución de la edad, sexo, tiempo previo de tratamiento insulínico y requerimientos diarios de insulina.

En el grupo I, el valor medio de anticuerpos antiinsulina inicial fue de $17,6 \pm 9,8 \%$, el cual se estabilizó en el transcurso de la investigación y concluyó a los 12 meses con cifras de $19,8 \pm 10,8 \%$. No hubo significación estadística en relación con el valor inicial (tabla 2).

Tabla 1. Distribución de los pacientes según grupos de estudio

Grupos de estudio	Edad (años)		Sexo M/F	Tratamiento insulínico previo (años)		Requerimiento de insulina (U/kg/día)	
	\bar{x}	DE		\bar{x}	DE	\bar{x}	DE
I	28,6	8,4	1/9	10,6	5,6	0,95	0,33
II	21,5	1,6	3/7	9,6	4,7	0,87	0,23
Valor de p	> 0,1		> 0,1	> 0,02		> 0,05	

Tabla 2. Anticuerpos antiinsulina expresados como porcentaje de unión a la insulina-1125

Grupos de estudio	Al inicio		12 meses		Valor de p
	\bar{x}	DE	\bar{x}	DE	
I	17,6	9,8	19,8	10,8	No significativo
II	16,0	1,6	16,7	14,5	No significativo

En la figura 1 podemos comprobar que este grupo en los últimos 4 meses presentó niveles ligeramente superiores al valor basal, pero sin significación estadística con éste, ni al compararlo con el grupo II.

En la figura 2 se puede observar el comportamiento individual de los pacientes con 3 momentos de la investigación (al inicio, 6 y 12 meses), en la cual se observa que el 60% de los pacientes a los 6 meses disminuyeron sus anticuerpos en relación con el valor inicial; pero luego a los 12 meses, se observan valores superiores en igual porcentaje de pacientes. El valor promedio del grupo a los 12 meses fue de 19,8 ± 10,8 %, cifra no significativa (tabla 2).

En el grupo II, el comportamiento de los anticuerpos antiinsulina presentó una estabilización de los valores promedios, medidos en cada momento de la investigación, aunque en niveles ligeramente más elevados que los correspondientes al grupo I, con la sola excepción de los valores del décimo y duodécimo mes (figura 1). No hubo en ninguna de estas cifras diferencias significativas en relación con el valor inicial.

En la tabla 2 se puede observar que de un valor promedio inicial de 16 ± 1,6 %, los anticuerpos antiinsulina se incrementan ligeramente a 16,7 ± 14,5 % al final del estudio, aunque no fue significativa esta diferencia ($p > 0,1$).

En la figura 3 observamos que a los 6 meses del cambio de insulina, en 5 pacientes se comprueba disminución de la capacidad de unión: el resto presentó incrementos muy ligeros, con la excepción de 1 paciente que presentó una elevación de más del 20 %. El valor medio del grupo fue de 16,7 ± 14,5 %, cifra no significativa con respecto al promedio inicial (tabla 2).

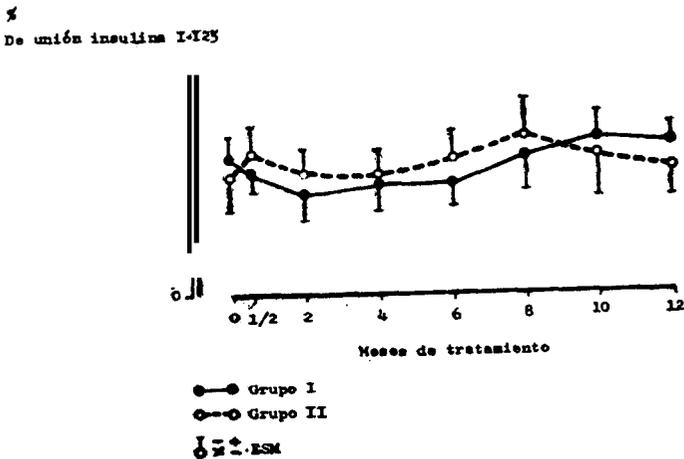


Figura 1. Valores medios del porcentaje de unión a los anticuerpos de la insulina marcada (%).

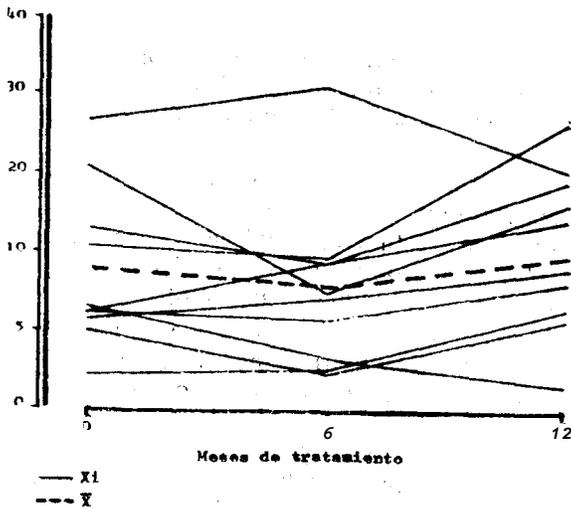
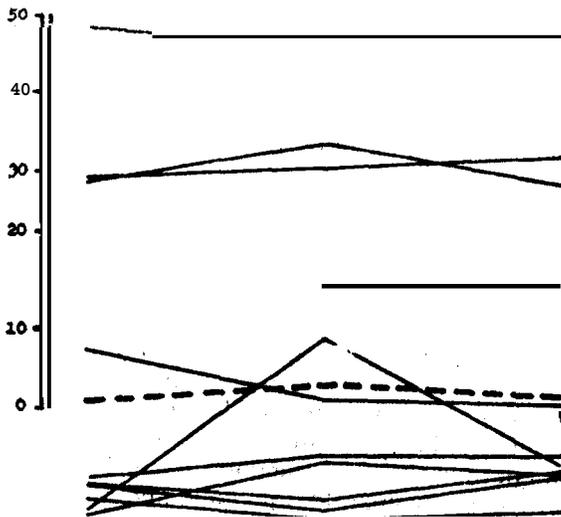


Figura 2. Porcentaje de unión insulina-1125 antes y a los 6 y 12 meses de tratamiento en el grupo I.



Cuando se compararon ambos grupos entre sí, no se encontraron diferencias significativas en ningún momento del estudio (figura 1). Sólo se encontró una correlación positiva estadísticamente significativa al inicio del estudio en el grupo I, entre los anticuerpos antiinsulina y los requerimientos diarios de insulina.

DISCUSIÓN

Es conocido que con el desarrollo de las insulinas "altamente purificadas" se ha producido disminución de los niveles de anticuerpos anti-insulina, y en muchos casos reducción de los requerimientos de insulina.^{3,8-10}

Por otro lado, cuando estas preparaciones se utilizan (especialmente aquéllas de origen porcino), las reacciones alérgicas, la lipodistrofia o la resistencia a la insulina de tipo inmunológica, son extremadamente infrecuentes. Sin embargo, la producción de anticuerpos, aunque menor, aun persiste con el uso de las insulinas "altamente purificadas".

En los últimos años se ha preparado y comercializado la insulina humana [semisintética y biosintética],⁴ cuyo fin principal ha sido poder disminuir o eliminar completamente la antigenicidad de la insulina exógena.

En nuestros pacientes, tanto en el grupo que recibió tratamiento con insulina porcina monocomponente (MC), como en el que se transfirió a la insulina humana semisintética (HM), no se comprobaron variaciones significativas en los niveles de anticuerpos antiinsulina durante todo el período de estudio. Estos resultados coinciden con la mayoría de los trabajos que se han publicado, comparando ambos tipos de insulina.¹¹⁻¹⁶

Peacock et al.¹⁷ estudiaron comparativamente la inmunogenicidad de preparados de insulina monocomponente, bovina, porcina y humana, en un grupo de 24 pacientes insulino-dependientes. Los niveles de anticuerpos no descendieron durante el tratamiento con insulina bovina purificada, pero con el cambio a insulina MC, hubo un descenso significativo y no se modificaron al pasar para la insulina HM.

Sin embargo, otros autores^{18,19} han informado la caída de los títulos de los anticuerpos antiinsulina durante el uso de la HM en relación con la MC.

De forma similar a lo planteado con la insulina porcina monocomponente, la insulina humana no se comporta igual en los diabéticos vírgenes de tratamiento, que en aquéllos que vienen tratándose durante años con insulinas convencionales e incluso con las insulinas altamente purificadas de origen animal.²⁰ En el primer caso, lo más habitual es que no se produzcan anticuerpos, y en el segundo caso, la insulina humana exógena se encuentra con un aparato inmunológico ya sensibilizado por el tratamiento prolongado y mantenido con las insulinas anteriores.

Algunos autores²¹ le dan importancia a la configuración especial que presentan las insulinas, como un factor más en la antigenicidad insulínica, y si recordamos que la insulina humana semisintética se logra por conversión de la porcina al remplazar por métodos enzimáticos la alanina en posición B-30 por treonina, puede esperarse entonces que la molécula de insulina obtenida posea la misma estructura primaria que la hormona producida por el hombre. Pero en nuestra opinión, difícilmente se lograría la configuración espacial propia de cada molécula en las diferentes especies.

Los pacientes del grupo I mostraron en relación con los del grupo II una mayor variabilidad en el comportamiento de los niveles de anticuerpos.

Esto **no** resulta extraño, teniendo en consideración lo ya señalado en numerosos trabajos^{8, 22-24} en relación con la antigenicidad de la insulina porcina monocomponente y la respuesta inmunológica tan heterogénea de cada individuo. En cambio, los pacientes que **se** trataron con insulina humana, de forma individual, presentaron un comportamiento más uniforme y con una tendencia a mantener los niveles basales.

Otro tema muy debatido en la literatura médica, ha sido la relación de los niveles de anticuerpos antiinsulina y otras variables, como son los requerimientos diarios de insulina, el grado de control metabólico y la presencia de complicaciones, entre otras.

En nuestro estudio **solo** se encontró relación entre los niveles de anticuerpos de insulina en el grupo **I**, antes de iniciar el estudio donde pacientes con altos títulos de anticuerpos tenían requerimientos **insulinícos** elevados, lo que se demostró por la **correlación** positiva y estadísticamente significativa. En el grupo tratado con insulina humana no encontramos **correlación** con los requerimientos en ningún momento del estudio.

SUMMARY

Santana Perez, F. et al.: A clinical *trial* controlled with single *component* swine insulin and semisynthetic human insulin. *Influence* of antibody titers.

Twenty insulin-dependent diabetic patients aged **16-39 years**, who were treated with single component swine insulin, are studied. These **patients** were randomly allocated to two groups, each with ten patients. Group I received single component swine insulin. All patients were studied for **1 year** and **antiinsulin** antibody titers were determined at the beginning of and **15 days**, and **2, 4, 6, 8, 10, and 12 months** after the investigation was started.

RESUME

Santana Pérez, F. et al.: *Essai clinique contrôlé avec l'emploi d'insulines* porcine *monocomposante* et humaine *semi-synthétique*. Influence des *taux d'anticorps*.

Les auteurs ont étudié **20 patients diabétiques insulino-dépendants**, âgés entre **16 et 39 ans**, qui étaient sous traitement par insuline porcine **monocomposante**. Ils ont été distribués au hasard en **2 groupes** comprenant **10 sujets** chacun; chez le groupe I ils ont utilisé de l'insuline porcine monocomposante. **Tous les malades ont été étudiés** pendant une année. Le **titre d'anticorps antiinsuline** a été déterminé au début de la recherche, le **15^e jour** et le **2^e, le 4^e, le 6^e, le 8^e, le 10^e et le 12^e mois**.

BIBLIOGRAFIA

1. Goldner, M. G.; *H. T. Ricketts*: Insulin allergy. *J Clin Endocrinol Metab* **2**: 595, 1942.
2. Lewis, J. H.: The antigenic properties of insulin. *J Am Med Assoc* **108**: 1336, 1937.
3. Schlichtkrull, J. et al.: Clinical aspects of insulin antigenicity. *Diabetes* **21** (Suppl. 2): 649-656, 1972.
4. Santana, F.: Insulina humana. Métodos de obtención. Revisión bibliográfica. *Rev Cubana Med* (en prensa).
5. Nakagawa, S. et al.: A simple method for the determination of serum free insulin levels in insulin-treated patients. *Diabetes* **22**: 590-600, 1973.
6. Debuquois, B.; G. D. Aurbach: Use of polyethylene glycol to separate free and antibody-bound peptide hormones in radioimmunoassays. *J Clin Endocrinol Metab* **33**: 732-738, 1971.

7. **Hansen, B.:** Immunogenicity of insulin as a function of species and other factors. In: *Insulin, Growth Hormone and Recombinant DNA Technology*. New York, (Ed.] John L. Gueriguan Raven Press, 1981.
8. **Bruni, B. et al.:** Clinical trial with monocomponent lente. Preliminary report. *Diabetologia* 9: 492-498, 1973.
9. **Deckert, T. et al.:** The clinical significance of highly purified pig-insulin preparations. *Diabetologia* 10: 703-708, 1974.
10. **Mirouze, J. et al.:** Diabete sucré son traitement par les insulines purifiées monocomposees. *Nouv Presse Med* 2: 1981-1985, 1973.
11. **Drury, R. et al.:** A controlled study of prolonged treatment with semisynthetic human insulin. *Ir J Mcd Sci* 152: 430, 1983.
12. **Fireman, P. et al.:** Development of IgE antibodies to human (Recombinant DNA), porcine, and bovine insulins in diabetic subjects. *Diabetes Care* 5 (Suppl. 21): 119-125, 1982.
13. **Lyngsoe, J.; S. Vestermark:** The efficacy and safety of human insulin (NOVO) in insulin-dependent diabetic patients. *Diabetes Care* 6 (Suppl. 1): 53-55, 1983.
14. **Mann, N. P. et al.:** Human insulin and porcine insulin in the treatment of diabetic children: comparison of metabolic control and insulin antibody production. *Br Med J* 287: 1580-1583, 1983.
15. **Scherthaner, G. et al.:** Analysis of insulin antibodies following human and pork MC insulin therapy in HLA-DR typed juvenile diabetics. A prospective study (Abstract). *Diabetologia* 21: 324, 1981.
16. **Velcovsky, H. G.; K. F. Federlin:** Insulin specific IgG and IgE antibody response in type diabetic subject exclusively treated with human insulin (recombinant DNA). *Diabetes Care* 5 (Suppl. 2): 126-128, 1982.
17. **Peacock, I. et al.:** Effects of new insulins on insulin and C-peptide antibodies, insulin dose and diabetes control. *Lancet* I: 149-152, 1983.
18. **Clerk, A. J. L. et al.:** Biosynthetic human insulin in the treatment of diabetes. A double-blind crossover trial in established diabetic patients. *Lancet* 11 (8294): 354-357, 1982.
19. **Javicoli, M. et al.:** Biological and immunogenic activity of human monocomponent insulin: two year follow-up. *Diabetologia* 25: 166 (Abstract), 1983.
20. **Blandford, R. L. et al.:** Generalized allergic reaction with synthetic human insulin. *Lancet* II: 1468, 1982.
21. **Levin, S.:** Insulin conformations. *Biochem J* 114: 83, 1969.
22. **Czyzyk, A. et al.:** Serum levels of insulin-binding antibodies in diabetic patients treated with monocomponent insulin. *Diabetologia* 10: 233-236, 1974.
23. **Rodríguez-Miñón, J. L.:** Insulinas monocomponentes. *Rev Clin Esp* 148: 579-582, 1978.
24. **Yue, D. K.; J. R. Turtle:** Antigenicity of "monocomponent" pork insulin in diabetic subjects. *Diabetes* 24: 625-632, 1975.

Calle Zapata y D, Vedado, Ciudad de La Habana 4, Cuba.