



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE QUÍMICA

VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD MITOGENICA DE  
INSULINAS EN UN ENSAYO IN VITRO EMPLEANDO CÉLULAS SAOS-2

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

VICTORIA MARÍA CHÁVEZ TORRES





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: JORGE ESTEBAN MIRANDA CALDERON

VOCAL: ROSA CAMACHO SANDOVAL

SECRETARIO: OCTAVIO CASTRO ESCAMILLA

1er. SUPLENTE: CARLOS ALBERTO ALVAREZ LIMON

2°. SUPLENTE: SONIA MAYRA PEREZ TAPIA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

UNIDAD DE DESARROLLO E INVESTIGACIÓN EN BIOPROCESOS (UDIBI), DE  
LA ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS (ENCB) DEL INSTITUTO  
POLITÉCNICO NACIONAL (IPN).

FINANCIAMIENTO:

EL PRESENTE TRABAJO RECIBIÓ FINANCIAMIENTO (PARCIAL O TOTAL) DEL  
PROYECTO DE INVESTIGACIÓN DE LA UDIBI CON CÓDIGO FTU/P2/18/002-  
PRO

ASESOR DEL TEMA:

DRA. ROSA CAMACHO SANDOVAL

SUPERVISOR TÉCNICO:

DRA. SONIA MAYRA PÉREZ TAPIA

SUSTENTANTE:

VICTORIA MARÍA CHÁVEZ TORRES

## ÍNDICE

Abreviaturas .....	5
RESUMEN.....	7
1. INTRODUCCIÓN.....	8
1.1. Insulina.....	8
1.1.1. Receptor de insulina y mecanismo de señalización .....	9
1.2. Actividad mitogénica .....	11
1.3. Diabetes mellitus .....	12
1.4. La insulina como medicamento biotecnológico y biosimilares .....	13
1.5. Ensayos de potencia.....	14
1.6. Validación de métodos .....	15
1.6.1. Parámetros de validación de un bioensayo .....	17
1.6.1.1. Linealidad.....	17
1.6.1.2. Precisión .....	17
1.6.1.2.1. Precisión intermedia.....	18
1.6.1.3. Exactitud .....	19
1.6.1.3.1. Porcentaje de recobros.....	19
1.6.1.4. Especificidad .....	19
1.6.1.5. Adecuabilidad del sistema .....	20
2. JUSTIFICACIÓN.....	20
3. HIPOTESIS .....	21
4. OBJETIVO.....	21
4.1. Objetivos particulares .....	21
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	21
5.1. Cultivo de la línea celular .....	23
5.1.1. Descongelación de las células Saos-2 .....	23
5.1.2. Expansión y mantenimiento de las células Saos-2.....	24
5.1.3. Preparación de la suspensión celular y distribución en la placa.....	24
5.2. Preparación de los tratamientos de insulina .....	25

5.3. Evaluación de la proliferación con MTS.....	26
6.2. Precisión.....	28
6.3. Exactitud.....	28
6.4. Especificidad .....	29
7. RESULTADOS .....	30
7.1. Estandarización de las condiciones del bioensayo .....	30
7.2. Evaluación del Ajuste al modelo de los cuatro parámetros .....	31
7.3. Evaluación de la Precisión .....	33
7.4. Evaluación de la Exactitud (Porcentaje de Recobros).....	37
7.5. Evaluación de la Especificidad .....	39
7.6. Evaluación de la Adecuabilidad del sistema .....	41
8. DISCUSIÓN .....	41
8.1. Evaluación del Ajuste al modelo de los cuatro parámetros .....	41
8.2. Evaluación de la Precisión .....	42
8.3. Evaluación de la Exactitud .....	43
8.4. Evaluación de la Especificidad .....	44
8.5. Evaluación de la Adecuabilidad del sistema .....	45
9. CONCLUSIONES .....	45
10. PERSPECTIVAS .....	46
11. REFERENCIAS.....	47
12. ANEXOS .....	49

## **Abreviaturas**

ADNr: ácido desoxirribonucleico recombinante

ATP: adenosín trifosfato

CV: coeficiente de variación

DM: Diabetes Mellitus

DMSO: dimetil sulfóxido

D.O.: densidad óptica

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EEIH: estándar europeo de insulina humana

EMA: Agencia Europea de Medicamentos

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos

GLUT4: transportador de glucosa

G6P: glucosa-6-fosfato

ICH: Conferencia Internacional sobre armonización de requisitos técnicos para el registro de productos farmacéuticos de uso humano

IGF-1R: receptor del factor de crecimiento insulínico Tipo I

IGF-1: factor de crecimiento insulínico Tipo I

IGF-2: factor de crecimiento insulínico Tipo II

IR: receptor de insulina

IR-A: isoforma A del receptor de insulina

IR-B: isoforma B del receptor de insulina

IRS: proteínas adaptadoras  
LogEC50: logaritmo de la concentración efectiva cincuenta  
MAPK: proteína cinasa activada por Ras-mitógeno  
mARN: ácido ribonucleico mensajero  
MTS: Sal de tetrazolio  
PBS: solución de buffer de fosfatos  
PDK1: proteína cinasa 1 dependiente de 3-fosfoinosítido  
PIP3: fosfatilinositol-3, 4, 5-trifosfato  
PI3K-AKT: fosfatidilinositol 3-cinasa  
PKB: proteína quinasa B  
R<sup>2</sup>: coeficiente de correlación  
SFB: suero fetal bovino  
USP: Farmacopea de los Estados Unidos

## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue establecer las condiciones experimentales ideales para realizar un ensayo de proliferación *in vitro* que permita evaluar la capacidad mitogénica de insulinas comerciales. Cuando la insulina se encuentra en altas concentraciones en sangre, además de unirse a su receptor específico el receptor de insulina (IR), puede unirse al receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1R) e inducir el proceso de mitogénesis. La unión a IGF-1R no es del todo deseable ya que puede favorecer el desarrollo problemas cancerígenos en los pacientes. En el presente trabajo se emplearon células Saos-2 las cuales expresan el IR y altas concentraciones del receptor IGF-1R para evaluar la actividad mitogénica inducida por insulinas comerciales. Se estandarizaron las condiciones experimentales del ensayo y posteriormente se realizó la validación del mismo, los atributos evaluados fueron el ajuste al modelo de cuatro parámetros, precisión, exactitud, especificidad y adecuabilidad del sistema. El bioensayo cumplió con los atributos establecidos además de la precisión intermedia al evaluar las presentaciones de insulina R, N y 70/30; generando evidencia documentada de que es adecuado para su uso intencionado.



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Insulina

La insulina es una proteína no glicosilada que está constituida por 51 aminoácidos, su monómero que es de forma circular (5.8 KDa) está formado por una cadena A de 21 aminoácidos y una cadena B de 30 aminoácidos, las cuales están unidas por dos puentes disulfuro (1, 2). Está codificada en el brazo corto del cromosoma 11 y es secretada por las células beta ( $\beta$ ) de los islotes del páncreas como pre-proinsulina el cual es precursor de la proinsulina.

La pre-proinsulina se sintetiza en los ribosomas del retículo endoplásmico rugoso y está formada por el péptido señal, la cadena B, un péptido conector y la cadena A. Cuando esta adquiere un cambio conformacional en su estructura tridimensional tras eliminar al péptido señal, se convierte en proinsulina. Posteriormente la proinsulina es transportada en vesículas secretoras hacia al aparato de Golgi. Durante este tráfico, las enzimas del medio convierten a la proinsulina en insulina tras eliminar al péptido conector; la insulina forma hexámeros que contienen zinc que son insolubles, precipitándose en cristales químicamente estables a pH 5.5. Cuando los gránulos son secretados hacia la circulación por exocitosis la insulina es liberada (3).

El aumento de la concentración de glucosa en circulación induce la activación de las células  $\beta$  pancreáticas promoviendo la liberación de insulina de los gránulos secretores. La entrada de glucosa en la célula  $\beta$  es detectada por la glucocinasa, que fosforila la glucosa y la convierte a glucosa-6-fosfato (G6P), generando adenosín trifosfato (ATP); molécula indispensable para la obtención de energía celular. El cierre de los canales dependientes de  $K^+$ -ATP da como resultado la despolarización de la membrana celular y la activación de los canales de calcio dependientes de voltaje, lo que conduce a un aumento de la concentración de calcio intracelular provocando la secreción de insulina (3).

La principal función de la insulina es regular el metabolismo, al promover el almacenamiento de energía y la activación de la síntesis de proteínas (4). También funciona como regulador negativo en su propia vía de señalización, ya que a medida que aumentan los niveles de insulina, disminuye la señalización de su receptor en las células beta. La falta de regulación negativa podría ser la responsable de la hiperinsulinemia observada en los pacientes con diabetes (5).

Además de sus efectos sobre la homeostasis de la glucosa, la insulina también promueve otros eventos celulares como: la regulación del transporte de iones, aminoácidos, síntesis de glucógeno, transcripción génica y además se sabe que puede estimular la proliferación celular (4, 6).

#### 1.1.1. Receptor de insulina y mecanismo de señalización

Las funciones biológicas de la insulina son mediadas por la activación del receptor de insulina (IR). El IR es una proteína transmembranal con actividad enzimática (tirosina cinasa), este receptor se activa principalmente por insulina pero también reconoce a moléculas análogas a insulina como los factores de crecimiento insulínicos Tipo I y II (IGF-1 e IGF-2, del inglés *insulin-like growth factor*) (Figura 1) (4, 7).

El IR se encuentra codificado en el brazo corto del cromosoma 19 y tiene aproximadamente 150 kilobases (kb) de longitud, contiene 22 exones y 21 intrones (6). Este receptor está conformado en un solo gen INSR, que después del splicing alternativo da como resultado la transcripción de dos isoformas: IR-A o IR-B. Los cambios post-traduccionales resultan en la formación de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , al unirse dos subunidades de cada una de ellas a través de puentes disulfuro forman el tetrámero del IR transmembranal, de aproximadamente 320 kDa. La subunidad alfa del IR contiene los dominios de unión a insulina, mientras que la subunidad beta posee los dominios tirosina cinasa, necesarios para señalizar intracelularmente en respuesta a insulina (4, 6) Los 12 aminoácidos derivados del exón 11 se incluyen en la isoforma del IR más larga (IR-B), y no en la isoforma IR-A. Se ha reportado que la isoforma IR-A tiene menor afinidad por la insulina que la isoforma IR-B,

además puede unirse y activarse por el factor de crecimiento IGF-2 en concentraciones del orden nanomolar (4). La expresión predominante de IR-A es importante para el crecimiento y desarrollo prenatal, mientras que la expresión IR-B es importante en la acción metabólica de la insulina en adultos (8).

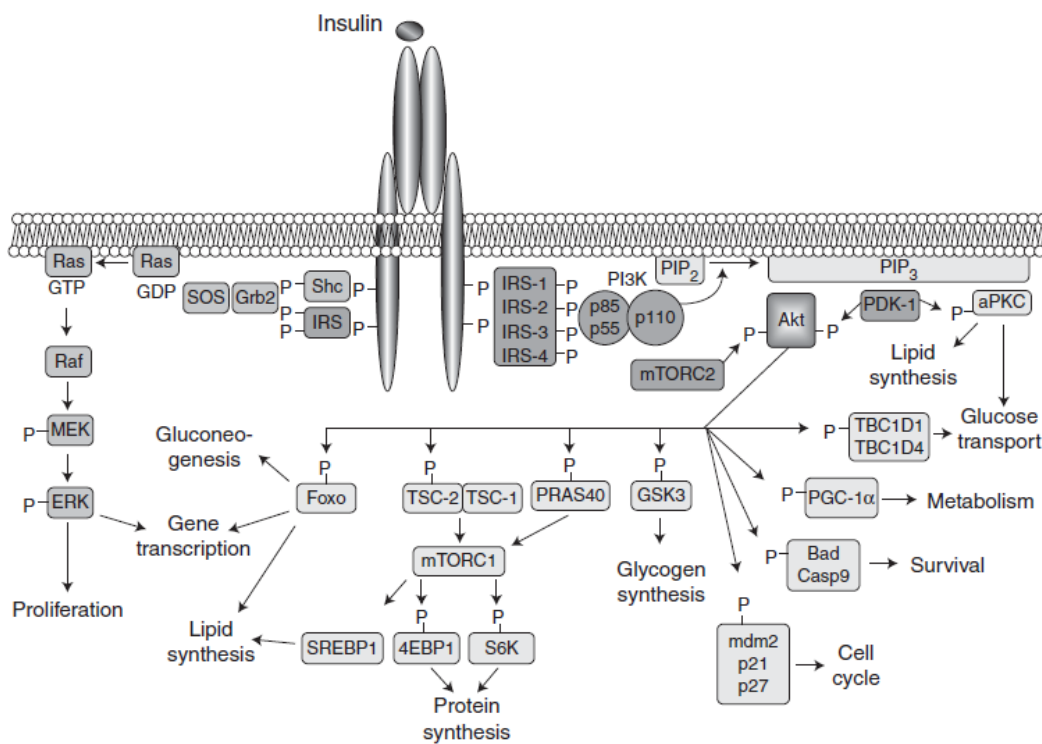
El IR juega un papel clave en la regulación de la homeostasis de la glucosa, se expresa en casi todos los tejidos de los mamíferos con mayor expresión en el tejido adiposo e hígado, los cuales son el principal blanco de la insulina (6). Puesto que el receptor de la insulina puede estimular la proliferación celular, bajo ciertas condiciones de hiperinsulinemia, puede resultar en trastornos patológicos como el cáncer y enfermedades cardiovasculares (4).

La vía de señalización de la insulina es compleja e involucra varios procesos metabólicos. En presencia de insulina, el IR fosforila proteínas que están vinculadas en la activación de dos principales vías de señalización: la fosfatidilinositol 3-cinasa/proteína cinasa B (**PI3K**)–**AKT/(PKB)**, que es responsable de la mayoría de las acciones metabólicas de la insulina y la proteína cinasa activada por Ras-mitógeno (**MAPK**), vía que regula la expresión de algunos genes y coopera con la ruta PI3K para controlar el crecimiento celular y la diferenciación (Figura 1) (7, 9).

Inicialmente la unión de la insulina a los dominios del IR promueve el reclutamiento de PI3K a la membrana plasmática. Posteriormente la PI3K es fosforilada y activada por las proteínas adaptadoras IRS (del inglés *Insulin receptor substrates*) que permite el aumento del fosfatilinositol-3, 4, 5-trifosfato (PIP3), que a su vez activa la proteína cinasa 1 dependiente de 3-fosfoinosítido (PDK1) y AKT. La vía PI3K / AKT se regula negativamente mediante la activación de PTEN que genera una defosforilación en PIP3. La vía AKT por su parte, activa la captación de glucosa, la translocación del transportador GLUT4 a la membrana plasmática y la síntesis de glucógeno (Figura 1) (4, 7). Por lo tanto, ambas isoformas del IR son componentes relevantes de la red que modula los efectos pleiotrópicos del sistema de insulina / IGF, que ejerce distintos efectos sobre el crecimiento celular, diferenciación, apoptosis y metabolismo (8).

## 1.2. Actividad mitogénica

Como ya se mencionó, el IR activado también estimula la ruta mitogénica que induce la proliferación celular mediante la activación de la cascada de señalización de **RAS/RAF/MEK/ERK** tras la fosforilación de proteínas Shc, y la formación del complejo Grb / Sos (Figura 1). Este complejo, a su vez, desencadena la activación de GTPasa Ras generando las isoformas RAF MEK1/2 (MAPKK) y ERK1/2 (MAPK); que son enzimas clave en la entrada y progresión del ciclo celular. Una vez que ERK1/2 está activado, fosforila proteínas citosólicas que pueden traslocarse al núcleo y regular la expresión génica y el crecimiento celular (4, 7).



**Figura 1. Vías de señalización del receptor de insulina.** Modificado de Boucher Jérémie.(7).La unión de la insulina a su receptor conduce al reclutamiento y la fosforilación de sustratos receptores como las proteínas IRS y Shc. La Shc activa la vía **Ras-MAPK**, mientras que las proteínas del IRS activan principalmente la vía **PI3K-AKT**, reclutando y activando a PI3K, lo que lleva a la generación de un segundo mensajero PIP3. PIP3 ligado a la membrana recluta y activa a PDK-1 que fosforila y activa a AKT. Esta última, se encarga de mediar la mayoría de los efectos metabólicos de la insulina, regulando el transporte de glucosa, la síntesis de lípidos, la gluconeogénesis y la síntesis de glucógeno; además desempeña un papel en el control del ciclo celular y la supervivencia. La vía **Ras-Raf-MAPK** controla la proliferación celular y la transcripción de genes.

Por otra parte, la insulina también puede unirse al receptor I del factor de crecimiento insulínico (IGF-1R). En condiciones de baja concentración de insulina, esta se une a su receptor, mientras que en altas concentraciones de insulina puede unirse a IGF-1R e iniciar la mitogénesis, que resulta en proliferación celular, lo cual podría desencadenar un problema como el cáncer (10). La vía de señalización entre el IR y el IGF-1R es compartida en cuanto a las moléculas involucradas, la función biológica está determinada por la concentración, afinidad y la interacción del ligando-receptor que participa.

Para evaluar la potencia mitogénica de los análogos de insulina, en estudios previos se han empleado líneas celulares de adenocarcinoma mamario como las MCF7 o de osteosarcoma humano como las Saos-2. Las células MCF7 y Saos-2 expresan el IR y sobre expresan el IGF-1R, se ha reportado una relación de la expresión IGF-1R/IR de 7:1 en las células MCF-7 y 10:1 en las células Saos-2 (11). El uso de estas líneas celulares como modelos para evaluar cambios en la proliferación celular tienen como ventaja la reproducibilidad de los resultados obtenidos así como una mayor cercanía a la respuesta mitogénica *in vivo* inducida por la insulina humana o sus análogos (12-14).

### 1.3. Diabetes mellitus

La Diabetes, es un grupo de enfermedades metabólicas, caracterizadas por hiperglucemia debida a anormalidades en la secreción y/o acción de la insulina. Existen dos tipos de Diabetes; la Diabetes Mellitus (DM) Tipo I y la DM Tipo II.

Las personas con diabetes tipo 1 representan el 5% de la población con diabetes en todo el mundo. La destrucción autoinmune de las células  $\beta$  pancreáticas da como resultado la pérdida de la producción de insulina, afectando el metabolismo de los carbohidratos y de los lípidos, dando lugar a la generación de metabolitos nocivos como los cuerpos cetónicos, entre otros (15).

Por el contrario, la diabetes tipo 2 es mucho más común y representa alrededor del 90 al 95% de la población con diabetes. La diabetes tipo 2 es causada por una combinación de pérdida y disfunción de las células beta junto con el IR en los tejidos

diana y generalmente se asocia con sobrepeso y obesidad. Se conoce que avanza de un estado caracterizado por resistencia a la insulina a resistencia sostenida junto con una reducción progresiva en la secreción de insulina (16).

La diabetes es un problema de salud mundial que va en aumento y que ha generado la necesidad de mejorar los medicamentos disponibles en el mercado, teniendo una clara oportunidad de contar con medicamentos biotecnológicos, estructuralmente más cercanos a la insulina. La insulina y sus análogos son utilizados principalmente para pacientes con Diabetes (17).

#### 1.4. La insulina como medicamento biotecnológico y biosimilares

El descubrimiento de la insulina en 1922 por Banting, Best, y Macleod marcó un gran avance en la medicina y la terapia en pacientes con diabetes tras descubrir que el extracto de páncreas redujo la hiperglucemia y la glucosuria en perros diabéticos. Posteriormente, la purificación de la insulina lograda en gran parte por el trabajo de J.B. Collip y en cooperación con Eli Lilly Company mejoraron el rendimiento y la estandarización del proceso.(18).

Más tarde en 1978, se presentó la primera insulina humana de ADN recombinante preparada por David Goeddel utilizando y combinando las cadenas de insulina A y B expresadas en *Escherichia coli*. A partir de entonces, las empresas Genentech y Lilly firmaron un acuerdo para comercializar la insulina humana obtenida a partir de ácido desoxirribonucleico recombinante (ADNr). Finalmente en 1982, se comercializó la primera insulina que utiliza tecnología de ADNr, **Humulin R (rápida)** y **N (NPH, de acción intermedia)** (19).

Actualmente, estos productos de insulina están disponibles y a medida que comienzan a llegar al final de su vida de patente, hay una clara oportunidad para la competencia. Por ello las industrias farmacéuticas desarrollan insulinas modificadas que tengan una mejor estabilidad y acción prolongada sobre el medicamento comercial. Además de esto, algunas compañías farmacéuticas apuestan a la creación de sus propias versiones de insulina como productos biosimilares (10). Los

productos biosimilares, son productos biotecnológicos altamente similares al producto innovador o de referencia en cuanto a su estructura y función, además no tiene diferencias clínicamente significativas.

Las insulinas biosimilares ingresaron al mercado como terapia para tratar la diabetes, obteniéndose a un costo significativamente menor, aumentando así la asequibilidad y el acceso a este tratamiento a la mayoría de los pacientes (20). La aprobación de los biosimilares se realiza a través de una vía regulatoria estricta que debe demostrar que cuenta con la calidad, seguridad y eficacia comparables al producto de referencia (21, 22).

En el mercado existen varias presentaciones de insulinas, entre las cuales se encuentran: la **insulina R de acción rápida**, la **insulina N de acción retardada** y la **insulina 70/30 de acción intermedia**, el efecto biológico de todas es el mismo la diferencia radica en el tiempo en el que realizan su efecto.

#### 1.5. Ensayos de potencia

Dado el crecimiento en el área de los productos biotecnológicos como la insulina, las instituciones gubernamentales solicitan a las industrias farmacéuticas que demuestren que sus productos (biocomparables) cuentan con características de potencia, seguridad y eficacia comparables a los productos de referencia. Para evaluar la biocomparabilidad de un producto biológico se deben proporcionar suficientes datos que demuestren que ambos son muy similares en cuanto a sus propiedades fisicoquímicas y funciones biológicas, a pesar de las diferencias menores en los componentes inactivos (excipientes).

Las pruebas de potencia pueden consistir en ensayos *in vitro*, *in vivo* o en ambos, que hayan sido diseñados específicamente para cada producto (23). Para los biosimilares de insulina, estos ensayos de potencia deben analizar diversos mecanismos relevantes para evaluar su función biológica, incluyen a las pruebas de unión a receptores e inducción de señalización y adicionalmente se deben investigar problemas potenciales como la inducción de mitogénesis. Los resultados de dichos

ensayos indicarán con mayor exactitud la respuesta biológica que se espera ver *in vivo* en los estudios de comparación clínica en humanos. Dos ejemplos de ensayos que se han diseñado para el desarrollo de biosimilares de insulina son ensayos competitivos de unión a receptor y ensayos de potencia mitogénica (10). Uno de los requisitos importantes al realizar estas pruebas, es validar las metodologías aplicadas a la caracterización de los medicamentos biotecnológicos de acuerdo a las guías nacionales e internacionales correspondientes.

#### 1.6. Validación de métodos

La validación de un método bioanalítico consiste en demostrar, mediante evidencia documentada y sustentada, que éste, es adecuado para su uso intencionado (24). Algunos de los parámetros que se deben cumplir para validar un ensayo son: ajuste de la curva dosis-respuesta, exactitud, precisión, especificidad, rango y adecuabilidad del sistema (23).

Cuando se realizan cambios a un método previamente validado, puede ser necesaria una validación adicional. Por ejemplo, los métodos de análisis publicados a menudo se modifican para satisfacer los requisitos del laboratorio que realiza el ensayo, y durante el curso de un programa típico de desarrollo de fármacos, un método bioanalítico definido a menudo sufre muchas modificaciones. Estos cambios deben validarse apegándose a las recomendaciones de las entidades regulatorias para garantizar un rendimiento adecuado del método analítico. Dependiendo de la modificación, se requieren diferentes tipos de validación para demostrar el rendimiento del método. A continuación se describen los tipos de validación de métodos bioanalíticos (23, 24).

##### Validación completa

La validación completa de los métodos bioanalíticos es importante; durante el desarrollo y la implementación de un nuevo método, para el análisis de una nueva entidad farmacológica o para revisiones de un método existente que agregue la cuantificación de metabolitos. En este nivel de validación se debe recabar



información suficiente para demostrar que dicho método es adecuado para su fin; entre los parámetros que se evalúan están: especificidad, linealidad, rango, exactitud y precisión.

#### Validación parcial

Las validaciones parciales evalúan modificaciones de métodos bioanalíticos ya validados que puede ir desde tan solo una determinación de exactitud y precisión intraensayo hasta una validación casi completa. Las modificaciones del método bioanalítico que se incluyen en esta categoría son, entre otros, los siguientes: transferencias de métodos bioanalíticos entre laboratorios o analistas, cambios en la metodología analítica (por ejemplo, cambio en los sistemas de detección), cambios en la matriz dentro de la especie (por ejemplo, plasma humano a orina humana), cambios en los procedimientos de procesamiento de muestras, cambio en el rango de concentración relevante, cambios en instrumentos y/o plataformas de software, etc.

#### Validación cruzada

La validación cruzada es una comparación de los parámetros de validación cuando se utilizan dos o más métodos bioanalíticos para generar datos dentro del mismo estudio o en diferentes estudios. Un ejemplo de validación cruzada sería una situación en la cual un método bioanalítico original validado sirve como referencia, y el método bioanalítico revisado es el comparador, las cuales deben hacerse en ambos sentidos. Cuando los análisis de muestras en un solo estudio se realizan en más de un sitio o más de un laboratorio, se debe realizar una validación cruzada con estándares de matriz enriquecida y muestras de sujetos en cada sitio o laboratorio para establecer la confiabilidad entre laboratorios. De acuerdo a la FDA todas las modificaciones a un método existente deben evaluarse para determinar el grado de validación recomendado (23).

### 1.6.1. Parámetros de validación de un bioensayo

La validación de bioensayos sigue un protocolo que describe los objetivos y el diseño del estudio de validación. Dicho protocolo se basa en las recomendaciones de las guías internacionales como la ICH Q2 (R1) y la USP. Dentro de los parámetros de validación se incluyen la exactitud relativa, especificidad, precisión intermedia y rango entre otros (24).

#### 1.6.1.1. Linealidad

La linealidad de un procedimiento analítico es su capacidad (dentro de un rango determinado de concentraciones) para obtener resultados de la prueba que son directamente proporcionales a la concentración (cantidad) de analito en la muestra (25).

El modelo de los cuatro parámetros (4PL) es una función matemática que comúnmente es utilizada para ajustar la relación concentración-respuesta de los datos obtenidos en bioensayos. Este modelo proporciona una representación precisa de la relación sigmoide entre la respuesta medida y el logaritmo de concentración observado para distintos tipos de bioensayos (26).

#### 1.6.1.2. Precisión

La precisión de un método analítico describe la cercanía de las medidas individuales de un analito cuando el procedimiento se aplica repetidamente a múltiples alícuotas de un solo material homogéneo y es expresada como el coeficiente de variación. La precisión debe medirse utilizando un mínimo de tres concentraciones en el rango de concentraciones de muestra de estudio esperadas. La precisión determinada en cada nivel de concentración no debe exceder el 25% del coeficiente de variación (CV) y para el límite inferior de cuantificación no debe exceder el 20% del CV (24). La precisión se subdivide en precisión dentro de la ejecución y entre ejecuciones; por un lado, la precisión dentro de la ejecución (precisión dentro del lote o la repetibilidad dentro de la ejecución) es una evaluación de la precisión durante una

única ejecución analítica. Por el contrario la precisión entre ejecuciones (precisión entre lotes o repetibilidad entre ejecuciones) es una evaluación de la precisión en el tiempo y puede involucrar a diferentes analistas, equipos, reactivos y laboratorios (23, 27).

La precisión puede considerarse en tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.

Repetibilidad: expresa la precisión en las mismas condiciones de operación en un corto intervalo de tiempo. La repetibilidad también se denomina precisión intraensayo.

Precisión intermedia: expresa variaciones dentro de los laboratorios: diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos, etc.

Reproducibilidad: expresa la precisión entre laboratorios (estudios de colaboración, generalmente aplicados a la estandarización de la metodología) (25).

#### 1.6.1.2.1. Precisión intermedia

La medida en que se debe establecer la precisión intermedia depende de las circunstancias en las cuales se pretende utilizar el procedimiento. El solicitante debe establecer los efectos de eventos aleatorios en la precisión del procedimiento analítico. Entre las variaciones típicas que se estudian incluyen días, analistas, equipos.

Debido a dichas influencias potenciales en el bioensayo, el diseño de la validación del bioensayo debe incluir la evaluación de estos factores. La precisión intermedia mide la variabilidad entre ejecuciones y la influencia de factores que varían con el tiempo después de que se implementa el bioensayo. Aunque los estudios de robustez, en los que se evalúa la capacidad del método para permanecer inalterado por variaciones normalmente se llevan a cabo durante el desarrollo del bioensayo, se pueden incluir factores clave dentro del ciclo como el tiempo de incubación y la temperatura (24, 25).

#### 1.6.1.3. Exactitud

La exactitud de un procedimiento analítico expresa la proximidad de acuerdo entre el valor que se acepta como verdadero, convencional aceptado y el valor encontrado, expresado en porcentaje. Esto a veces se denomina veracidad. La exactitud se determina mediante un análisis replicado de muestras que contienen cantidades conocidas del analito y debe medirse utilizando un mínimo de cinco determinaciones por concentración. Se recomienda un mínimo de tres concentraciones en el rango de muestra de estudio. El valor medio debe estar dentro del 15% del valor nominal, excepto en el límite inferior de cuantificación, donde no debe desviarse en más del 20%. La desviación de la media del valor nominal sirve como medida de la exactitud (23, 25).

##### 1.6.1.3.1. Porcentaje de recobros

El recobro de un analito en un ensayo es la respuesta del detector obtenida de una cantidad de analito agregado y extraído de la matriz biológica, en comparación con la respuesta del detector obtenida para la verdadera concentración del analito en una concentración conocida. El recobro se refiere a la eficiencia de extracción o recobro de un método analítico dentro de los límites de variabilidad. La recuperación del analito no necesita ser del 100%, pero el grado de recuperación de un analito y del estándar interno debe ser consistente, preciso y reproducible. Los experimentos de recuperación deben realizarse comparando los resultados analíticos de las muestras extraídas en tres concentraciones (baja, media y alta) con los resultados analíticos de los estándares ya establecidos a esas mismas concentraciones que representan una recuperación del 100% (23).

#### 1.6.1.4. Especificidad

La especificidad o selectividad es la capacidad de un método analítico para medir, diferenciar y cuantificar de manera inequívoca el analito en presencia de otros

componentes que se puede esperar estén presentes en la muestra. Se debe proporcionar evidencia de que la sustancia cuantificada es el analito deseado. Cada muestra definida como blanco debe analizarse para detectar interferencias, y debe asegurarse la selectividad en el límite inferior de cuantificación. Las sustancias potencialmente interferentes en una matriz biológica incluyen componentes de la matriz endógena; impurezas, metabolitos, productos de descomposición; entre otros (23, 27).

#### 1.6.1.5. Adecuabilidad del sistema

La adecuabilidad del sistema es una parte integral de los procedimientos analíticos. Son requerimientos basados en los resultados del ensayo de validación que se establecen como un sistema integral que puede y debe ser evaluado como tal y depende exclusivamente del método evaluado.

## 2. JUSTIFICACIÓN

La importancia de validar un método es contar con evidencia documentada de que dicho método garantiza la confiabilidad y consistencia de los resultados, cumpliendo con los requisitos que establecen las guías nacionales y/o internacionales. El laboratorio donde se realizó el presente trabajo es un laboratorio tercero autorizado para realizar ensayos de comparabilidad de biomoléculas, es por ello que debe contar con metodologías validadas que puedan emplearse para estudios de biocomparabilidad o de desarrollo. Existen pocos trabajos que demuestran un ensayo validado para evaluar la actividad mitogénica de insulinas comerciales, el cual es importante para demostrar su seguridad y prevenir problemas no deseables en las personas que los consuman. El presente trabajo se enfocó en estandarizar y validar un ensayo para evaluar la actividad mitogénica de las insulinas empleando

células Saos-2, y así contar con un ensayo confiable y consistente para su uso intencionado.

### **3. HIPOTESIS**

Dado que las células Saos-2 expresan el receptor IR e IGF1R, estas pueden emplearse para evaluar la actividad mitogénica de insulinas comerciales, mediante un bioensayo in vitro que cumpla con los parámetros de validación necesarios para demostrar que es adecuado para su uso intencionado.

### **4. OBJETIVO**

Demostrar mediante evidencia documentada que el método para evaluar la actividad mitogénica de insulinas comerciales empleando células Saos-2 es adecuado para su uso intencionado.

#### **4.1. Objetivos particulares**

- Establecer las condiciones experimentales para evaluar la actividad mitogénica en células Saos-2 estimuladas con el estándar de insulina.
- Evaluar que el bioensayo cumple con los criterios de validación: ajuste al modelo de cuatro parámetros de la curva dosis-respuesta, exactitud, precisión, especificidad y adecuabilidad del sistema, empleando insulinas comerciales.
- Realizar la validación del bioensayo con las diferentes presentaciones de insulina (R, N y 70/30).

### **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

En las tablas se enlistan los estándares europeos de insulina humana, los reactivos los materiales y los equipos utilizados.

**Tabla 1. Estándar de referencia europeo utilizado en la estandarización del método.**

<b>Nombre</b>	<b>Marca</b>
European Pharmacopoeia Reference Standard Insulin (Human) CRS	Council of Europe Lote:4.0 Id: 00QNZO

**Tabla 2. Reactivos utilizados en la estandarización y validación del método.**

<b>Nombre</b>	<b>Marca</b>
Medio McCoy's 5a	ATCC
MTS	Promega
Insulina Humana Recombinante de acción rápida	Humulin®R Lote: C722391A Cad: 01/2020
Insulina Humana de acción retardada	Humulin®N Lote: C660427G Cad: 08/2019
Insulina Humana de acción regular	Humulin®70/30 Lote: C733020C Cad: 02/2020
Suero Fetal Bovino	GIBCO
Tripsina	GIBCO
EDTA	GIBCO
Azul Tripano	Sigma
PBS	GIBCO
Agua elix	NA

ATCC: American type Culture Collection. Reactivos NA (No Aplica).

**Tabla 3. Materiales utilizados en la estandarización y validación del método**

<b>Nombre</b>	<b>Marca</b>
Placas de 96 pozos	Costar
Pipetas serológicas de 5, 10 y 25 mL	Costar
*Micropipetas 0.2-2.0 µL, 2.0-20 µL, 20-200 µL y 100-1000 µL	Eppendorf
Botellas de 75 cm <sup>2</sup>	Corning
Botellas de 25 cm <sup>2</sup>	Corning
Tubos de 50 mL	Corning
Tubos de 15 mL	Corning

Puntas para micropipeta de 10, 200 y 1000 $\mu$ L	Eppendorf
Microtubos de 1.5 mL	Axygen
Botellas de plástico de 150 mL	Costar
Canaletas individuales	Costar
Nombre	Marca
*Espectrofotómetro para microplacas	Biotek
*Espectrofotómetro para microplacas	Inolab
*Cabina de Bioseguridad	CHCBiolus
*Centrifuga	Thermo Scientific
*Incubadora de CO <sub>2</sub>	Sanyo

## 5.1. Cultivo de la línea celular

### 5.1.1. Descongelación de las células Saos-2

Se descongelaron las células Saos-2 provenientes de un banco de trabajo de acuerdo con el siguiente procedimiento:

1. Se colocó un criovial con las células congeladas en un baño María a 37°C por aproximadamente 3 minutos.
2. Se colocaron 6 mL de medio de cultivo McCoy's 5a suplementado con 15% de Suero Fetal Bovino (SFB) en un tubo cónico estéril de 15 mL. A partir de este punto todo el procedimiento se realizó en una cabina de flujo laminar para mantener condiciones de esterilidad.
3. Se transfirió todo el contenido del criovial al tubo con medio para diluir el DMSO.
4. Las células se centrifugaron a 1200 rpm por 5 minutos a 20°C.
5. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular con medio de cultivo.
6. Se determinó la viabilidad por el método de azul tripano como se indica a continuación:
  - En un microtubo de 0.6 mL se añadió 90  $\mu$ L de azul tripano al 0.4% y 10  $\mu$ L de la suspensión celular.
  - Se homogenizo con micropipeta y se colocaron 10  $\mu$ L de la suspensión en las dos posiciones de una cámara de Neubauer.



- Se colocó la cámara sobre el microscopio de luz y se contaron las células vivas y muertas para determinar la viabilidad
- 7. Las células se transfirieron a una botella de cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup> y se incubaron en condiciones de 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 5.1.2. Expansión y mantenimiento de las células Saos-2.

1. A partir de una botella de cultivo de células Saos-2, con una confluencia del 80%-90%, se retiró el medio de cultivo. Se lavó la monocapa celular con 5 mL de PBS 1X y posteriormente se retiró.
2. Se adicionaron 3 mL de Tripsina-EDTA 5 mM y se incubó a 37°C, 5%CO<sub>2</sub> por 5-10 minutos para despegar las células.
3. Se colectaron las células despegadas con medio de cultivo en un tubo de 15 mL y se centrifugaron a 1200 rpm por 5 minutos a 20°C.
4. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular con medio de cultivo, se tomó una alícuota y se realizó la cuenta celular y la determinación de viabilidad con azul tripano empleando una cámara de Neubauer.
5. Finalmente se adicionó medio McCoy's 5a suplementado con 15% de Suero Fetal Bovino (SFB) (medio de cultivo) en una botella de 75 cm<sup>2</sup> y se transfirieron las células. Se mantuvieron en incubación a 37°C 5 %CO<sub>2</sub>.

#### 5.1.3. Preparación de la suspensión celular y distribución en la placa

1. Se cosecharon las células como se indicó en el punto 5.1.2
2. Las células se ajustaron a una concentración de 100,000 células por mililitro con medio de ensayo (medio McCoy's 5a suplementado con 0.1% de SFB).
3. En una placa de 96 pozos, se colocaron 50 µL de la suspensión celular previamente ajustada y se mantuvo en incubación a 37°C y 5%CO<sub>2</sub> aproximadamente por una hora para permitir la adhesión de las células a la placa.

## 5.2. Preparación de los tratamientos de insulina

1. Se preparó una dilución del estándar europeo de insulina humana o insulinas comerciales (R, N o 70/30) para obtener una concentración de 12,000 nM, empleando medio de ensayo como diluyente; a partir de esta concentración se realizaron diluciones seriadas de acuerdo a la siguiente tabla. Las diluciones se prepararon por triplicado y de manera independiente. La concentración inicial del estándar de insulina fue 344,000 nM y de la insulina R, N y 70/30 fue 783,400 nM.

**Tabla 4. Preparación de las diluciones de Insulina Humana.**

<b>Concentración de la dilución</b>	<b>Volumen de dilución anterior</b>	<b>Volumen de medio McCoy's 5a al 0.1%SFB</b>
<i>6000 nM</i>	100 µL de 12,000 nM	100 µL de medio de cultivo
<i>3000 nM</i>	100 µL de 6000 nM	100 µL de medio de cultivo
<i>600 nM</i>	40 µL de 3000 nM	160 µL de medio de cultivo
<i>300 nM</i>	100 µL de 600 nM	100 µL de medio de cultivo
<i>60 nM</i>	40 µL de 300 nM	160 µL de medio de cultivo
<i>30 nM</i>	100 µL de 60 nM	100 µL de medio de cultivo
<i>6 nM</i>	40 µL de 30 nM	160 µL de medio de cultivo
<i>3 nM</i>	100 µL de 6 nM	100 µL de medio de cultivo
<i>0.6 nM</i>	40 µL de 3 nM	160 µL de medio de cultivo
<i>0.3 nM</i>	100 µL de 0.6 nM	100 µL de medio de cultivo
<i>0.06 nM</i>	40 µL de 0.3 nM	160 µL de medio de cultivo

2. Transcurrida la hora de incubación se corrobora al microscopio la adherencia de las células a la placa y se colocaron 50 µL de las diluciones a cada pozo correspondiente. La figura 2 muestra la distribución de las muestras en la placa., En las filas A – H y las columnas 1 y 12, se colocaron 100 mL de PBS 1X para evitar la pérdida de volumen en los pozos durante la incubación. Los tratamientos de insulina se colocaron de forma descendente de concentración de acuerdo a la figura 2. En los pozos de las

filas E, F y G, columna 3 y 4 se colocaron células sin estímulo, y en las columnas 5 y 6 se colocó medio de ensayo como muestras blanco.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
A															
B		6000 nM	3000 nM	600 nM	300 nM	60 nM	30 nM	6 nM	3 nM	0.6 nM	0.3 nM				
C		6000 nM	3000 nM	600 nM	300 nM	60 nM	30 nM	6 nM	3 nM	0.6 nM	0.3 nM				
D		6000 nM	3000 nM	600 nM	300 nM	60 nM	30 nM	6 nM	3 nM	0.6 nM	0.3 nM				
E		0.06 nM	Sin estímulo	Sin estímulo	Blanco	Blanco									
F		0.06 nM													
G		0.06 nM													
H															

**Figura 2. Distribución de los tratamientos de insulina humana recombinante en una placa de 96 pozos.**

3. La placa mantuvo en incubación a 37°C y 5%CO<sub>2</sub> durante 48 o 72 horas.

### 5.3. Evaluación de la proliferación con MTS

El MTS (sal de tetrazolio) se preparó de acuerdo a lo indicado por el fabricante y se prepararon alícuotas de 1 mL, las cuales se mantuvieron a -20°C.

1. Para revelar el ensayo se descongeló una alícuota de reactivo de MTS a temperatura ambiente y se añadieron 20 µL a cada pozo en la placa de 96 pozos y se dejó en incubación a 37°C y 5%CO<sub>2</sub>.
2. Se realizaron lecturas de la placa a una longitud de onda de 490 nm a las 2 y 3 horas de incubación, empleando un espectrofotómetro.

Establecidas las condiciones experimentales para ejecutar el método se llevó a cabo el ejercicio de validación considerando los siguientes parámetros: ajuste al modelo de los cuatro parámetros, exactitud, precisión, especificidad y adecuabilidad al sistema.

## 6. EJERCICIO DE VALIDACIÓN

Los parámetros de validación se establecieron de acuerdo a la guía ICH Q2 (R1) y al capítulo de validación de ensayos biológicos de la USP <1033>. Los criterios de aceptación para cada parámetro a evaluar se establecieron de acuerdo a las capacidades del método identificadas durante la etapa de la estandarización y de acuerdo a su uso intencionado, para establecer un bioensayo *in vitro* que permita evaluar la actividad mitogénica de las insulinas comerciales.

La Tabla 5 resume los parámetros de validación que se evaluaron.

**Tabla 5. Parámetros a evaluar en el ejercicio de validación.**

<b><i>Atributo de medición</i></b>	<b><i>Parámetro a evaluar</i></b>	<b><i>Criterio de aceptación</i></b>
<b><i>Ajuste al modelo matemático de los 4 parámetros</i></b>	Relación de asíntota superior y asíntota inferior	> 2.0
	Distribución de los puntos de la curva Dosis-Respuesta	Al menos 2 en cada asíntota Al menos 3 en la pendiente
	Coefficiente de correlación $r^2$	$r^2 > 0.80$
<b><i>Precisión</i></b>	% CV de la D.O. a 490 nm de los triplicados en cada nivel	$CV \leq 25\%$
<b><i>Precisión intermedia</i></b>	% CV del LogEC50 de los tres ensayos en dos equipos.	$CV \leq 10\%$
<b><i>Exactitud</i></b>	Porcentaje de Recobros	Máximo. 130% Mínimo. 70%
<b><i>Especificidad</i></b>	Insulina: Ajuste al modelo matemático de los cuatro parámetros. Excipientes: No se ajusta al modelo matemático de cuatro parámetros.	$r^2 > 0.80$
<b><i>Adecuabilidad</i></b>	Se deberá cumplir con los parámetros de ajuste al modelo matemático, precisión, exactitud y especificidad.	Relación de asíntotas > 2.0 $R^2 > 0.8$ $CV \leq 25\%$ Porcentaje de Recobro (70-130)%

### 6.1. Ajuste al modelo de cuatro parámetros

Una vez definidos los criterios de aceptación para la validación del método, se procedió a evaluar el ajuste al modelo de los cuatro parámetros de la respuesta inducida por las diferentes presentaciones de insulina en un intervalo de concentraciones de 6000 - 0.06 nM. Se construyó una gráfica del logaritmo de la concentración contra la D.O. a 490 nm para obtener una curva que se ajuste al modelo matemático.

### 6.2. Precisión

La precisión se estableció durante el ejercicio de estandarización como el coeficiente de variación de los triplicados en cada nivel de concentración, el cual debe ser menor al 25%. Para la precisión intermedia se evaluó el coeficiente de variación de los Logaritmos de la concentración efectiva 50 (LogEC50) de tres ensayos independientes, debe ser menor al 10%, las lecturas se realizaron en dos espectrofotómetros distintos.

### 6.3. Exactitud

La evaluación de la exactitud del ensayo se realizó mediante el cálculo del recobro en tres niveles de concentración (baja, mediana y alta, 6000, 60 y 0.06 nM, respectivamente) de acuerdo a lo especificado por la FDA. Las células fueron estimuladas con una mezcla de las insulinas comerciales y estándar europeo en las siguientes proporciones: 80% de Insulina R, N o 70/30 y 20% de Estándar, 50%/50% y 20%/80% respectivamente, para las tres concentraciones establecidas y mediante triplicados independientes.

#### 6.4. Especificidad

Para evaluar la especificidad del método se probaron los excipientes de cada una de las tres presentaciones comerciales de insulina; los cuales se trataron igual que las muestras de insulina, es decir, se sometieron al mismo esquema de diluciones y se evaluó el ajuste al modelo de los cuatro parámetros en la respuesta inducida.

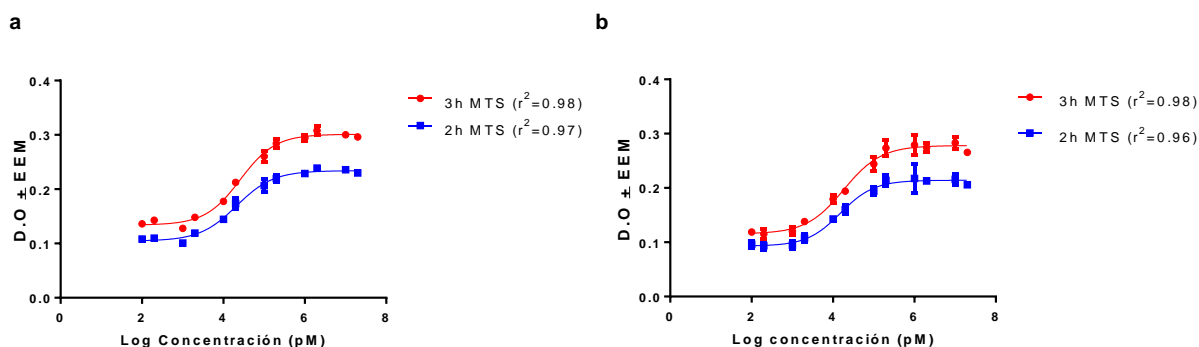
#### 6.5. Adecuabilidad del sistema

Para la adecuabilidad del sistema, se evaluó que el método cumpliera con los criterios previamente descritos: ajuste al modelo de los 4PL, precisión, exactitud y especificidad.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Estandarización de las condiciones del bioensayo

La primera parte del presente trabajo consistió en la estandarización de las condiciones experimentales del método para evaluar la actividad mitogénica de insulinas para el cual se emplearon células Saos-2 las cuales fueron tratadas con concentraciones crecientes del estándar europeo de insulina humana durante 48 y 72 horas. El efecto de la mitogénesis inducida por la insulina se evidenció por la adición de una sal de tetrazolio (reactivo de MTS) la cual es bio-reducida por las células vivas, generando un compuesto colorido que se detecta con ayuda de un espectrofotómetro, la absorbancia medida permite evaluar de forma indirecta las células viables presentes en el cultivo. La absorbancia se midió a las 2 y 3 horas después de la adición del MTS. De acuerdo a los resultados (Figura 3) se observa que en ambos tiempos de incubación (48 y 72 h) se obtienen curvas sigmoideas dosis-respuesta similares, por lo que se seleccionó el menor tiempo, 48 horas. Dado que no se obtuvieron diferencias en las respuestas obtenidas y un menor tiempo para la obtención de datos es mejor se estableció detectar la actividad mitogénica a las 2 horas con el reactivo de MTS. Figura 3.



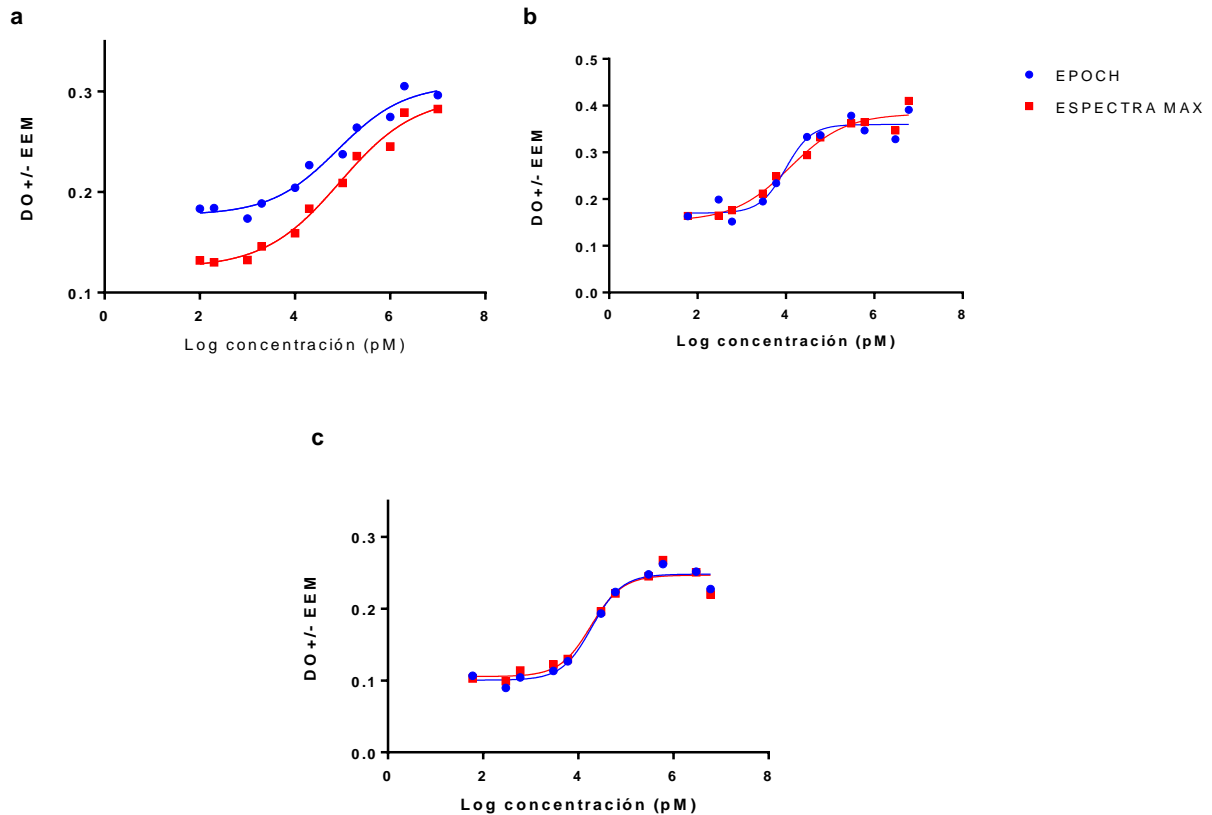
**Figura 3. Evaluación de la actividad mitogénica con Estándar Europeo de Insulina Humana,** Se sembraron y estimularon células Saos-2 con concentraciones crecientes del estándar de insulina humana, se incubaron por a) 48 horas y b) 72 horas para evaluar la actividad mitogénica. Se midió la absorbancia a 490 nm a las 2 y 3 h después de la adición de MTS. Los resultados obtenidos se sometieron a un análisis de regresión no lineal para determinar el ajuste a modelo de los cuatro parámetros.

Una vez establecidas las condiciones experimentales ideales para la ejecución del ensayo, se procedió a realizar la validación del método.

## 7.2. Evaluación del Ajuste al modelo de los cuatro parámetros

Para evaluar el ajuste al modelo de 4 parámetros (4PL) de la respuesta mitogénica inducida por las insulinas R, N y 70/30 se graficó el Log de la concentración de insulina contra la densidad óptica (D.O) obtenida a las 48 h post-tratamiento y dos horas con MTS, empleando el software GraphPad Prism 7. A la curva obtenida se le aplicó un análisis de regresión no lineal de 4PL, se obtuvo el valor de  $r^2$  y la distribución de los puntos en la curva de acuerdo a lo indicado en la Tabla 5. La Figura 4 muestra que la distribución de los puntos en la curva para las tres insulinas cumple con el criterio de la validación, las curvas de la respuesta mitogénica se ajustan al modelo 4PL, en la Tabla 6 se muestran los valores de  $r^2$ .





**Figura 4. Ajuste al modelo de los cuatro parámetros de la curva dosis-respuesta para evaluar la actividad mitogénica de insulinas en células Saos-2.** Se sembraron y trataron células Saos-2 con concentraciones crecientes de a) insulina R, b) insulina N y c) insulina 70/30, se incubó por 48 horas y se midió la respuesta 2 horas después de la adición del reactivo MTS. La lectura de absorbancia se evaluó a 490 nm en dos espectrofotómetros diferentes. Se realizó una regresión lineal utilizando el modelo de los cuatro parámetros, se muestra un ejemplo representativo de tres ensayos independientes.

**Tabla 6. Parámetros y Resultados obtenidos del ajuste al modelo de los cuatro parámetros para cada insulina.**

<b>Atributo de medición</b>	<b>Parámetro a evaluar</b>	<b>Resultados</b>			
		<b>Insulina R</b>	<b>Insulina N</b>	<b>Insulina 70/30</b>	
<b>Ajuste al modelo matemático de los 4 parámetros</b>	<b>Relación de asíntota superior e inferior</b>	2.5-3.3	2.81-3.90	2.06-3.32	Cumple
	<b>Coefficiente de correlación</b>	$r^2 = 0.81-0.98$	$r^2 = 0.86-0.95$	$r^2 = 0.81-0.96$	Cumple

### 7.3. Evaluación de la Precisión

Para evaluar la precisión de acuerdo a lo indicado en la Tabla 5, se determinó el coeficiente de variación de los valores de absorbancia en cada nivel de concentración de las diferentes insulinas, en tres ensayos independientes, se analizaron con el software GraphPad Prism 7.

Para evaluar la precisión intermedia se consideró el CV del LogEC50 obtenidos de ensayos independientes realizados en distintos días, las lecturas de absorbancia se hicieron en dos equipos.

En las Tablas 7, 8 y 9 se muestran los resultados obtenidos para la insulina R, N y 70/30 respectivamente. Se observa que el método cumple con el parámetro de precisión al ajustarse a los criterios establecidos.

**Tabla 7. Coeficientes de variación de la respuesta mitogénica de insulina R, en cada nivel de concentración de tres ensayos independientes y en dos espectrofotómetros diferentes.**

	<b>Ensayo 1</b>		<b>Ensayo 2</b>		<b>Ensayo 3</b>	
	EPOCH	ESPECTRA MAX	EPOCH	ESPECTRA MAX	EPOCH	ESPECTRA MAX
<b>Log Con. pM</b>	%CV	%CV	%CV	%CV	%CV	%CV
<b>7.00</b>	17.3	7.3	6.9	7.1	2.4	5.3
<b>6.30</b>	21.1	5.0	6.5	7.5	5.1	8.1
<b>6.00</b>	23.2	6.8	2.8	8.6	2.0	6.7
<b>5.30</b>	20.6	14.5	4.9	13.4	3.6	7.2
<b>5.00</b>	20.6	13.0	11.8	12.0	1.2	8.2
<b>4.30</b>	13.7	18.2	13.4	6.1	3.6	7.0
<b>4.00</b>	15.9	9.7	5.2	4.4	5.1	3.8
<b>3.30</b>	9.0	0.9	9.4	4.5	3.0	7.6
<b>3.00</b>	15.7	14.3	6.5	5.8	2.3	1.6
<b>2.30</b>	9.6	6.0	7.6	2.4	1.4	2.7
<b>2.00</b>	22.3	14.3	4.4	3.1	6.9	4.6

<b>Precisión Intermedia</b>		
<b>Equipo:</b>	EPOCH	ESPECTRA MAX
<b>Ajuste:</b>	Log EC50	Log EC50
<b>Ensayo 1</b>	4.84	5.10
<b>Ensayo 2</b>	4.58	4.63
<b>Ensayo 3</b>	4.89	4.94
<b>Promedio</b>	4.77	4.89
<b>Desviación</b>	0.17	0.24
<b>%CV</b>	3.5	4.9

**Tabla 8. Coeficientes de variación de tres ensayos independientes para la insulina N a cada nivel de concentración y en dos espectrofotómetros diferentes.**

	<b>Ensayo 1</b>		<b>Ensayo 2</b>		<b>Ensayo 3</b>	
	EPOCH	ESPECTRA MAX	EPOCH	ESPECTRA MAX	EPOCH	ESPECTRA MAX
<b>Log Con. pM</b>	%CV	%CV	%CV	%CV	%CV	%CV
<b>7.00</b>	12.3	7.1	2.4	3.2	2.1	5.4
<b>6.30</b>	11.1	2.0	15.8	1.3	8.9	5.6
<b>6.00</b>	7.1	1.9	16.2	10.6	14.6	2.8
<b>5.30</b>	1.5	0.6	5.3	9.6	11.5	12.7
<b>5.00</b>	4.4	1.4	19.6	3.7	10.1	15.0
<b>4.30</b>	10.3	2.1	5.8	8.8	19.7	13.2
<b>4.00</b>	10.9	7.2	7.3	9.2	13.2	10.1
<b>3.30</b>	14.9	7.6	4.0	7.0	2.0	8.2
<b>3.00</b>	10.2	9.37	2.5	6.1	2.3	0.9
<b>2.30</b>	3.4	0.72	9.0	6.5	7.6	2.1
<b>2.00</b>	2.2	10.4	8.6	6.6	9.6	13.2

<b>Precisión Intermedia</b>		
<b>Equipo:</b>	EPOCH	ESPECTRA MAX
<b>Ajuste:</b>	Log EC50	Log EC50
<b>Ensayo 1</b>	4.21	4.44
<b>Ensayo 2</b>	4.06	4.04
<b>Ensayo 3</b>	3.99	4.09
<b>Promedio</b>	4.08	4.19
<b>Desviación</b>	0.25	0.21
<b>%CV</b>	2.7	5.0

**Tabla 9. Coeficientes de variación de tres ensayos independientes para la insulina 70/30 a cada nivel de concentración y en dos espectrofotómetros diferentes.**

	<b>Ensayo 1</b>		<b>Ensayo 2</b>		<b>Ensayo 3</b>	
	EPOCH	ESPECTRA MAX	EPOCH	ESPECTRA MAX	EPOCH	ESPECTRA MAX
<b>Log Con. pM</b>	%CV	%CV	%CV	%CV	%CV	%CV
<b>7.00</b>	6.7	4.3	6.0	2.9	2.8	3.6
<b>6.30</b>	3.2	3.4	20.6	7.1	6.8	8.5
<b>6.00</b>	8.0	9.7	12.4	10.0	4.5	3.8
<b>5.30</b>	1.5	7.2	7.7	3.4	1.3	0.3
<b>5.00</b>	4.9	5.8	18.6	7.6	3.9	4.3
<b>4.30</b>	7.2	4.0	18.2	5.9	3.0	3.3
<b>4.00</b>	7.9	10.0	18.3	10.3	0.8	1.3
<b>3.30</b>	7.9	15.3	13.6	8.3	3.6	7.5
<b>3.00</b>	6.3	8.6	17.2	7.4	3.6	4.7
<b>2.30</b>	1.7	1.0	9.0	1.1	2.0	3.2
<b>2.00</b>	10.8	7.4	6.2	15.0	5.5	6.6

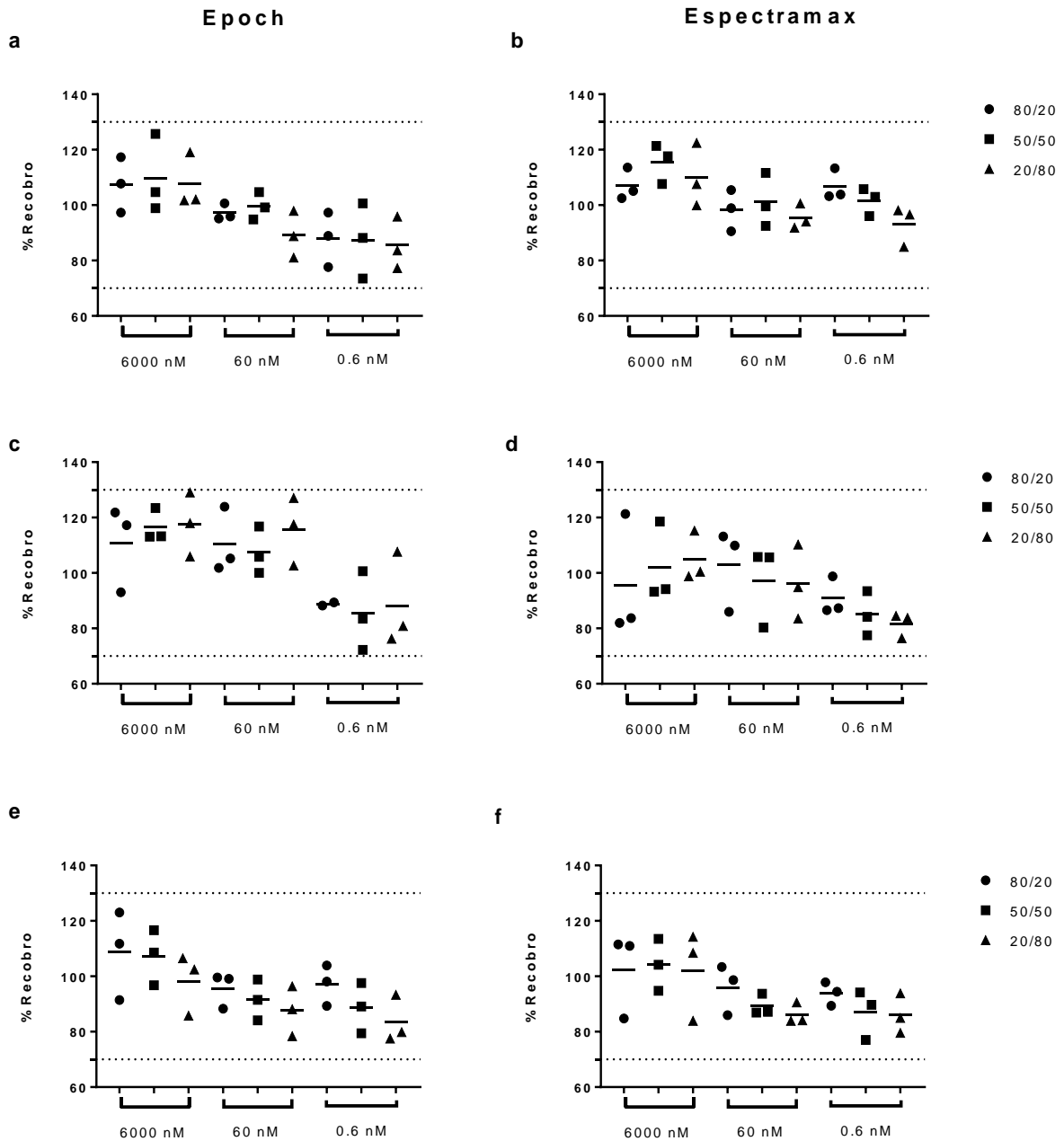
<b>Precisión Intermedia</b>		
<b>Equipo:</b>	EPOCH	ESPECTRA MAX
<b>Ajuste:</b>	Log EC50	Log EC50
<b>Ensayo 1</b>	4.28	4.27
<b>Ensayo 2</b>	4.11	4.23
<b>Ensayo 3</b>	4.34	4.27
<b>Promedio</b>	4.24	4.26
<b>Desviación</b>	0.12	0.24
<b>%CV</b>	2.8	5.6

#### 7.4. Evaluación de la Exactitud (Porcentaje de Recobros)

Para evaluar la exactitud se calculó el porcentaje de recobro de la respuesta de la mezcla del Estándar de Insulina Humano Europeo e Insulina R, N o 70/30 (dependiendo del caso). Los recobros se realizaron a tres concentraciones y puntos clave de la curva sigmoidea: 6000, 60 y 0.06 nM en porcentajes definidos de 80%/20%, 50%/50% y 20%/80% de Insulina en sus tres diferentes tipos y Estándar respectivamente.

Los datos generados se analizaron en el software GraphPad Prism 7 y se definió como límite máximo una respuesta de 130% y como límite mínimo una de 70%.

En la Figura 5 se muestran los resultados obtenidos para cada presentación de insulina en los dos espectrofotómetros empleados. Los resultados cumplen con los criterios establecidos en la Tabla 5, ya que la respuesta no sobre pasa ni es menor de los límites establecidos.



**Figura 5. Porcentaje de Recobro para evaluar la exactitud del método de la actividad mitogénica inducida por insulina.** Se grafica el porcentaje del cálculo de recobro para evaluar el método de actividad mitogénica inducido por a) y b) insulina R, c) y d) insulina N, e) y f) insulina 70/30; las lecturas de absorbancia se realizaron en el equipo Epoch y Espectramax respectivamente. Los círculos corresponden a 80% insulina (R, N o 70/30) y 20% Estándar Europeo de Insulina Humana (EEIH), los cuadrados a 50% insulina (R, N o 70/30) y 50% EEIH y los triángulos a 20% insulina (R, N o 70/30) y 80% EEIH para tres concentraciones de la curva. Cada punto corresponde al promedio de tres determinaciones independientes.

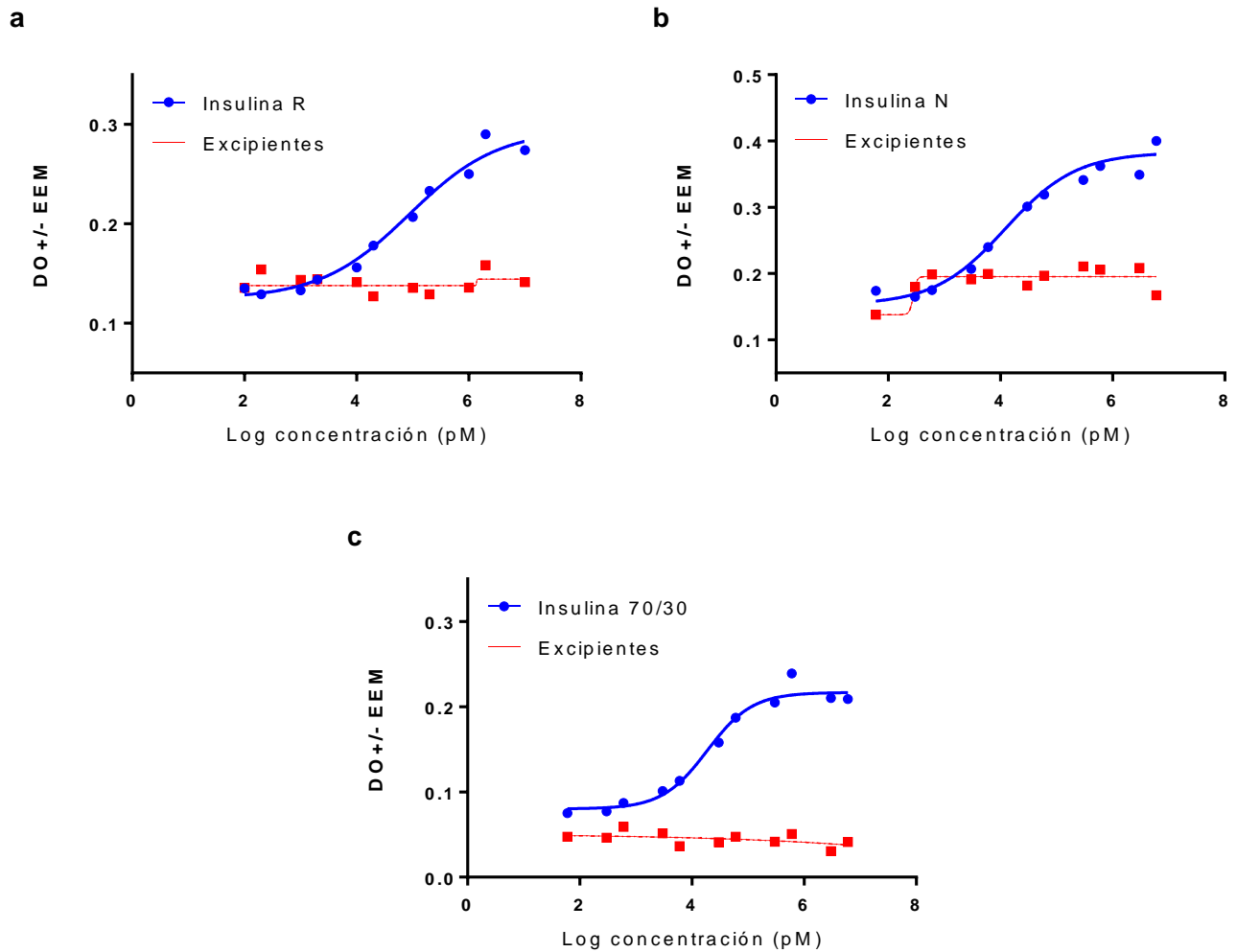
## 7.5. Evaluación de la Especificidad

La especificidad del método para evaluar la actividad mitogénica inducida por insulinas se llevó a cabo mediante el tratamiento de las células Saos-2 con el vehículo que tiene cada tipo de insulina. En el caso de la insulina R el vehículo en solución está constituido de glicerina, metacresol y zinc. En cambio el vehículo en suspensión de la insulina N y 70/30 está constituido de: sulfato de protamina, glicerina, fosfato de sodio di básico, metacresol, fenol y zinc. La diferencia entre estas dos últimas insulinas es que la insulina 70/30 posee 70 unidades de insulina R y 30 unidades de insulina N.

Los datos, de igual manera se analizaron mediante el software GraphPad Prism 7, se realizó el ajuste matemático de 4PL de la respuesta obtenida para cada insulina y excipiente.

En la Tabla 5 se muestran los criterios de aceptación para evaluar la especificidad del método. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 6, se observa una curva dosis-respuesta para las diferentes presentaciones de insulina que se ajusta al modelo 4PL y una línea constante para los excipientes que no cumple con el ajuste al modelo 4PL, ver Tabla 10.





**Figura 6. Evaluación de la especificidad del método para evaluar la actividad mitogénica de insulina en células Saos-2.** Se sembraron y trataron células Saos-2 con a) insulina R, b) insulina N y c) insulina 70/30 y con sus respectivos excipientes. Se midió la respuesta a las 48 horas post-tratamiento con 2 horas de reactivo de MTS. La lectura de absorbancia se evaluó a 490 nm. La curva dosis-respuesta se analizó con una regresión no lineal utilizando el modelo 4PL. Cada punto corresponde al promedio de triplicados independientes en cada nivel de concentración.

**Tabla 10. Recopilación de los coeficientes de correlación del ajuste al modelo 4PL para cada tipo de insulina.**

<b>Especificidad</b>		
<b>Equipo:</b>	EPOCH	ESPECTRA MAX
<b>Ajuste:</b>	$r^2$	$r^2$
<b>Insulina R</b>	0.95	0.95
<b>Excipientes</b>	No aplica	No aplica
<b>Insulina N</b>	0.86	0.91
<b>Excipientes</b>	No aplica	No aplica
<b>Insulina 70/30</b>	0.97	0.97
<b>Excipientes</b>	No aplica	No aplica

## 7.6. Evaluación de la Adecuabilidad del sistema

La adecuabilidad del sistema se evaluó al cumplir con los criterios de ajuste al modelo de los 4PL, precisión, exactitud y especificidad, los cuales se describieron en los puntos 7.1 - 7.4. Los resultados obtenidos se agrupan en las Tablas 11, 12 y 13 de la sección de anexos.

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1. Evaluación del Ajuste al modelo de los cuatro parámetros

La respuesta de la actividad biológica en función de la concentración de un analito o sustancia en algunos bioensayos se caracteriza por la obtención de una curva con forma sigmoidea. El modelo de regresión no lineal 4PL se usa comúnmente para analizar este tipo de curvas que no se ajustan a modelos lineales.

En la Figura 4 se observó que la actividad mitogénica inducida por las tres presentaciones de insulina (R, N y 70/30) generaron una curva dosis-respuesta de forma sigmoidea, que al realizar el análisis estadístico se ajustó al modelo de 4PL. La respuesta para las tres insulinas cumplió con una relación entre asíntota superior e inferior mayor a 2, evidenciando de esta forma que el método es capaz de

diferenciar entre una respuesta máxima y una mínima, así también con la distribución de puntos al menos dos en cada asíntota y tres en la pendiente. Estos resultados satisfacen un buen ajuste al modelo 4PL el cual se representa por el coeficiente de regresión. El coeficiente de regresión, indica cómo se correlacionan estadísticamente las variables estudiadas; un valor cercano a uno representa un resultado ideal, pues describe la cercanía de los valores a un modelo hipotéticamente teórico. De esta forma se satisface la evaluación del ajuste al modelo de 4PL del método al cumplir con lo establecido previamente por las entidades regulatorias (10).

Es importante resaltar, que a pesar de que existen diferencias en los excipientes de las insulinas R, N y 70/30, el rango de concentración evaluado fue adecuado para obtener una curva dosis-respuesta de la capacidad mitogénica inducido por estas; ya que no se observó variación en la respuesta debida a los excipientes. Esto da como ventaja que la presente metodología pueda emplearse de forma general para evaluar la capacidad mitogénica de cualquier presentación de insulina comercial.

## 8.2. Evaluación de la Precisión

La precisión o repetibilidad de un método indica la cercanía de las medidas individuales de un analito en múltiples alícuotas, en cambio la precisión intermedia indica variaciones del método dentro de un mismo laboratorio, realizándose en diferentes días, por diferentes analistas o inclusive por el uso de equipos distintos, ambas pueden expresarse como el coeficiente de variación. En el presente trabajo se evaluó la precisión del método mediante la determinación del coeficiente de variación (%CV) de la D.O. en los triplicados independientes de cada nivel de concentración de insulinas y la precisión intermedia como el %CV del LogEC50 de tres ensayos independientes corridos en distintos días. En las Tablas 7, 8 y 9 se observó que los %CV de todas las concentraciones se encuentran por debajo del criterio de aceptación en los tres ensayos que se realizaron para las diferentes presentaciones de insulina, asegurando la repetibilidad del ensayo en los dos espectrofotómetros empleados. Así mismo al analizar el %CV del Log EC50 de los

tres ensayos que se realizaron, estos eran inferiores al límite establecido de 10%, afirmando poca variación debido a la ejecución del bioensayo en diferentes días.

Para evaluar si había diferencia en la respuesta obtenida, las lecturas de D.O se realizaron en dos espectrofotómetros que se encuentran en el laboratorio (Epoch y Spectramax). De forma general las lecturas de D.O. obtenidas en los dos equipos fueron similares, la única diferencia fue que en el equipo Spectramax se obtuvieron menores valores en los %CV en cada concentración, lo que indica menor variabilidad en los resultados. Estos resultados sugieren que al seguir la metodología bajo condiciones experimentales estandarizadas podría reproducirse en cualquier laboratorio que cuente con alguno de estos equipos.

De esta manera, se evidencia que el método es consistente porque se generan resultados similares entre ensayos corridos en diferentes días, en dos equipos (27).

### 8.3. Evaluación de la Exactitud

La exactitud se refiere a la proximidad que existe entre el valor verdadero obtenido y el valor de referencia dado según la USP y la FDA (23, 24). Para determinar la exactitud de un método; en este deben de existir concentraciones conocidas de analito, en este caso de las tres presentaciones de insulinas y concentraciones conocidas de un estándar para obtener un valor de referencia.

En el método para evaluar la actividad mitogénica inducida por insulinas comerciales se evaluó la especificidad mediante el cálculo de porcentajes de recobros considerando como el valor de referencia la respuesta inducida por el estándar de insulina. Para ello se determinó el porcentaje de recobro en tres concentraciones y puntos clave de la curva sigmoide: 6000, 60 y 0.06 nM en porcentajes definidos de 80%/20%, 50%/50% y 20%/80% de insulina en sus tres diferentes presentaciones y estándar respectivamente, definiendo como límite máximo una respuesta de 130% y como límite mínimo de 70%.

En la Figura 5 se observa que la respuesta máxima obtenida en cada ensayo no fue superior al 130% ni menor al 70% para los tres ensayos independientes de cada insulina evaluada, la mayor variabilidad se observa en la concentración de 0.06 nM, lo cual puede deberse a la sensibilidad del método de detección.

También se observa que existe diferencia en la variabilidad de los porcentajes de recobro obtenidos con la insulina N respecto a los obtenidos con las insulinas R y 70/30. Esto se puede explicar considerando que la formulación de la insulina N consiste en una suspensión que tiene como excipiente una proteína para retardar el tiempo de absorción de la insulina. A diferencia de esta, la insulina 70/30 al poseer únicamente 30 unidades de N pero 70 de R, tiene una menor variabilidad lo que sugiere que los excipientes en las concentraciones probadas permiten obtener mediciones del analito de interés con una variabilidad que se encuentra dentro de rangos permitidos, lo cual indica la robustez del sistema.

#### 8.4. Evaluación de la Especificidad

De acuerdo a lo indicado por la FDA y la EMA (23, 27), la especificidad es la capacidad de un método para cuantificar de manera inequívoca el analito en presencia de otros componentes de la muestra. En este trabajo se determinó la especificidad del método para evaluar la actividad mitogénica inducida por las insulinas comerciales en las células Saos-2, al compararla respuesta del tratamiento en las diferentes presentaciones de insulina contra la respuesta de los excipientes correspondientes, conservando el mismo esquema de diluciones.

En la Figura 6 se evidencia que la respuesta obtenida con los excipientes es constante, con poca variabilidad y está por debajo de la curva dosis-respuesta de la actividad mitogénica inducida por insulina, además no se ajusta al modelo de análisis 4PL. Lo anterior se cumplió para los tres excipientes, a pesar de que la composición de estos es diferente, indicando que el método es selectivo y específico para detectar la respuesta inducida por insulina.

Este atributo no se encuentra reportado en la literatura para las metodologías que evalúan actividad mitogénica de insulina(10), he aquí un punto relevante del presente trabajo.

#### 8.5. Evaluación de la Adecuabilidad del sistema

La adecuabilidad del sistema se evaluó al determinar la capacidad del método para obtener una curva dosis-respuesta sigmoidea, que cumple con los parámetros de ajuste a 4PL, precisión, exactitud y especificidad descritos en los puntos anteriores, lo cual nos indica que nuestro ensayo puede emplearse para su uso intencionado.

### **9. CONCLUSIONES**

Se realizó la validación del método para evaluar la actividad mitogénica de insulinas comerciales empleando las células Saos-2, generando con ello información documentada de que el bioensayo cumple con los criterios de ajuste al modelo 4PL, precisión, exactitud, especificidad y adecuabilidad del sistema, por lo cual puede emplearse para su uso intencionado.

## **10. PERSPECTIVAS**

La evaluación de la capacidad mitogénica de insulina junto con otras funciones biológicas como son la unión a su receptor (IR) y su fosforilación, forman parte de la caracterización de las insulinas en los estudios de biocomparabilidad. Estos se requieren con la finalidad de garantizar la calidad, eficacia y seguridad de los productos biosimilares. Dado que el presente bioensayo se encuentra validado bajo la aplicación de la regulación internacional, podrá emplearse en estudios posteriores de biocomparabilidad para garantizar que las insulinas biosimilares tengan una respuesta comparable al medicamento de referencia en cuanto a su actividad mitogénica.

## 11. REFERENCIAS

1. De Meyts P. 2004. Insulin and its receptor: structure, function and evolution. *Bioessays* 26: 1351-62
2. Weiss M, Steiner DF, Philipson LH. 2000. Insulin Biosynthesis, Secretion, Structure, and Structure-Activity Relationships. In *Endotext*, ed. LJ De Groot, G Chrousos, K Dungan, KR Feingold, A Grossman, JM Hershman, C Koch, M Korbonits, R McLachlan, M New, J Purnell, R Rebar, F Singer, A Vinik. South Dartmouth (MA)
3. Gisela W. 2005. Insulin and Insulin Resistance. *Clin Biochem* 26
4. Vigneri R, Goldfine ID, Frittitta L. 2016. Insulin, insulin receptors, and cancer. *J Endocrinol Invest* 39: 1365-76
5. Haeusler RA, McGraw TE, Accili D. 2018. Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19: 31-44
6. Cheatham B, Kahn CR. 1995. Insulin Action and the Insulin Signaling Network. *Endocr Rev* 16: 117-42
7. Boucher J, Kleinridders A, Kahn CR. 2014. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6
8. Belfiore A, Malaguarnera R, Vella V, Lawrence MC, Sciacca L, Frasca F, Morrione A, Vigneri R. 2017. Insulin Receptor Isoforms in Physiology and Disease: An Updated View. *Endocr Rev* 38: 379-431
9. Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. 2006. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 85-96
10. Rabia Hidi NF, Catherine Diot, Alain Renoux. 2017. Testing the Quality, Safety, and Efficacy of Insulin Biosimilars *Analytical and Bioanalytical Testing*: 10
11. Liefvendahl E, Arnqvist HJ. 2008. Mitogenic effect of the insulin analogue glargine in malignant cells in comparison with insulin and IGF-I. *Horm Metab Res* 40: 369-74
12. Baricevic I, Jones DR, Roberts DL, Lutzen A, Lundby A, Worm J, Hansen BF, Renehan AG. 2015. A framework for the in vitro evaluation of cancer-relevant molecular characteristics and mitogenic potency of insulin analogues. *Carcinogenesis* 36: 1040-50
13. Lundby A, Bolvig P, Hegelund AC, Hansen BF, Worm J, Lutzen A, Billestrup N, Bonnesen C, Oleksiewicz MB. 2015. Surface-expressed insulin receptors as well as IGF-I receptors both contribute to the mitogenic effects of human insulin and its analogues. *J Appl Toxicol* 35: 842-50
14. Hernandez Mijares A, Sola Izquierdo E, Garcia Malpartida K, Verge D. 2010. [Safety of insulin analogues: what to evaluate, how to do it, and how to interpret the results]. *Endocrinol Nutr* 57: 376-80
15. Yaribeygi H, Farrokhi FR, Butler AE, Sahebkar A. 2018. Insulin resistance: Review of the underlying molecular mechanisms. *J Cell Physiol*
16. American Diabetes A. 2014. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 37 Suppl 1: S81-90



17. Giovannucci E, Harlan DM, Archer MC, Bergenstal RM, Gapstur SM, Habel LA, Pollak M, Regensteiner JG, Yee D. 2010. Diabetes and cancer: a consensus report. *Diabetes Care* 33: 1674-85
18. Rosenfeld L. 2002. Insulin: discovery and controversy. *Clin Chem* 48: 2270-88
19. Quianzon CC, Cheikh I. 2012. History of insulin. *J Community Hosp Intern Med Perspect* 2
20. Franze S, Cilurzo F, Minghetti P. 2015. Insulin biosimilars: the impact on rapid-acting analogue-based therapy. *BioDrugs* 29: 113-21
21. Polimeni G, Trifiro G, Ingrasciotta Y, Caputi AP. 2015. The advent of biosimilars for the treatment of diabetes: current status and future directions. *Acta Diabetol* 52: 423-31
22. Heinemann L, Khatami H, McKinnon R, Home P. 2015. An Overview of Current Regulatory Requirements for Approval of Biosimilar Insulins. *Diabetes Technol Ther* 17: 510-26
23. FDA . 2000. Guidance for Industry –Analytical Procedures and Method Validation, Chemistry, Manufacturing, and Controls Documentation. 10
24. USP. Biological Assay Validation.
25. Guideline IHT. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). 17
26. Gottschalk PG, Dunn JR. 2005. The five-parameter logistic: a characterization and comparison with the four-parameter logistic. *Anal Biochem* 343: 54-65
27. EMA. 2011. Guideline Bioanalytical method validation.

## 12. ANEXOS

Tabla 14. Dictamen de la validación de Insulina R.

<b>Atributo de medición</b>	<b>Parámetro a evaluar</b>	<b>Criterio de aceptación</b>	<b>Resultados</b>	
<b>Ajuste al modelo matemático de los 4 parámetros</b>	Relación de asíntota superior y asíntota inferior	> 2.0	2.5-3.3	Cumple
	Distribución de los puntos de la curva Dosis-Respuesta	Al menos 2 en cada asíntota Al menos 3 en la pendiente	Al menos 2 en cada Asíntota y 3 en la pendiente	Cumple
	Coefficiente de correlación $r^2$	$r^2 > 0.80$	0.81-0.96	Cumple
<b>Precisión</b> <b>Precisión intermedia</b>	% CV de la D.O. a 490 nm de los triplicados en cada nivel	$CV \leq 25\%$	(0.9-23.2)%	Cumple
	% CV del LogEC50 de los tres ensayos en dos equipos.	$CV \leq 10\%$	(4.5-5.1)%	
<b>Exactitud</b>	Porcentaje de Recobros	Máximo. 130% Mínimo. 70%	Máximo 125% Mínimo 80%	Cumple
<b>Especificidad</b>	Insulina: Ajuste al modelo matemático de los cuatro parámetros. Excipientes: No se ajusta al modelo matemático de cuatro parámetros.	$R^2 > 0.80$	Media de Insulina R $R^2 = 0.95$ Excipientes: No se ajusta.	Cumple
<b>Adecuabilidad</b>	Se deberá cumplir con los parámetros de ajuste al modelo matemático, precisión, exactitud y especificidad.	Relación de asíntotas > 2.0 $R^2 > 0.8$ $CV \leq 25\%$ Porcentaje de Recobro (70-130)%	Monitoreo durante la validación	Cumple

**Tabla 15. Dictamen de la validación de Insulina N.**

<b>Atributo de medición</b>	<b>Parámetro a evaluar</b>	<b>Criterio de aceptación</b>	<b>Resultados</b>	
<b>Ajuste al modelo matemático de los 4 parámetros</b>	Relación de asíntota superior y asíntota inferior	> 2.0	2.81-3.90	Cumple
	Distribución de los puntos de la curva Dosis-Respuesta	Al menos 2 en cada asíntota Al menos 3 en la pendiente	Al menos 2 en cada Asíntota y 3 en la pendiente	Cumple
	Coefficiente de correlación $r^2$	$r^2 > 0.80$	0.86-0.95	Cumple
<b>Precisión</b> <b>Precisión intermedia</b>	% CV de la D.O. a 490 nm de los triplicados en cada nivel	$CV \leq 25\%$	(0.9-23.9)%	Cumple
	% CV del LogEC50 de los tres ensayos en dos equipos.	$CV \leq 10\%$	(3.9-4.2)%	
<b>Exactitud</b>	Porcentaje de Recobros	Máximo. 130% Mínimo. 70%	Máximo 129% Mínimo 70%	Cumple
<b>Especificidad</b>	Insulina: Ajuste al modelo matemático de los cuatro parámetros. Excipientes: No se ajusta al modelo matemático de cuatro parámetros.	$R^2 > 0.80$	Media de Insulina N $R^2 = 0.88$ Excipientes: No se ajusta.	Cumple
<b>Adecuabilidad</b>	Se deberá cumplir con los parámetros de ajuste al modelo matemático, precisión, exactitud y especificidad.	Relación de asíntotas > 2.0 $R^2 > 0.8$ $CV \leq 25\%$ Porcentaje de Recobro (70-130)%	Monitoreo durante la validación	Cumple

Tabla 16. Dictamen de la validación de Insulina 70/30.

<b>Atributo de medición</b>	<b>Parámetro a evaluar</b>	<b>Criterio de aceptación</b>	<b>Resultados</b>	
<b>Ajuste al modelo matemático de los 4 parámetros</b>	Relación de asíntota superior y asíntota inferior	> 2.0	2.06-3.32	Cumple
	Distribución de los puntos de la curva Dosis-Respuesta	Al menos 2 en cada asíntota Al menos 3 en la pendiente	Al menos 2 en cada Asíntota y 3 en la pendiente	Cumple
	Coefficiente de correlación $r^2$	$r^2 > 0.80$	0.81-0.96	Cumple
<b>Precisión</b> <b>Precisión intermedia</b>	% CV de la D.O. a 490 nm de los triplicados en cada nivel	$CV \leq 25\%$	(0.3-20.7)%	Cumple
	% CV del LogEC50 de los tres ensayos en dos equipos.	$CV \leq 10\%$	(4.1-4.3)%	
<b>Exactitud</b>	Porcentaje de Recobros	Máximo. 130% Mínimo. 70%	Máximo 126% Mínimo 70%	Cumple
<b>Especificidad</b>	Insulina: Ajuste al modelo matemático de los cuatro parámetros. Excipientes: No se ajusta al modelo matemático de cuatro parámetros.	$R^2 > 0.80$	Media de Insulina 70/30 $R^2 = 0.97$ Excipientes: No se ajusta.	Cumple
<b>Adecuabilidad</b>	Se deberá cumplir con los parámetros de ajuste al modelo matemático, precisión, exactitud y especificidad.	Relación de asíntotas > 2.0 $R^2 > 0.8$ $CV \leq 25\%$ Porcentaje de Recobro (70-130)%	Monitoreo durante la validación	Cumple