

29  
15

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**



**EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA**

**ALBUMINA BOVINA Y DE RATA COMO UNA  
MATRIZ BIODEGRADABLE PARA LA LIBERACION  
LENTA DE INSULINA**

**TESIS MANCOMUNADA**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:**

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

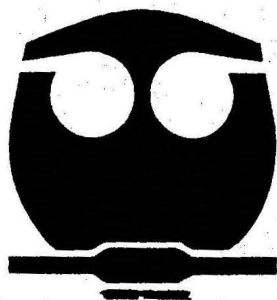
**P R E S E N T A N :**

**MARTHA MAGDALENA BOURGUETT ORTIZ**

**ROSA MARIA LOPEZ AYLLON**

**MEXICO, D. F.**

**1986**





Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **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 está 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.

# I N D I C E

CAPITULO	I	INTRODUCCION	9
CAPITULO	II	MATERIAL Y METODOS	
		Animales de experimentación	15
		Técnicas quirúrgicas	15
		Inducción de la diabetes	17
		Preparación de microesferas	18
		Purificación de albúmina	20
		Implante	22
		Electroforesis e inmuno-electroforesis de la albúmina de rata	22
		Toma de muestra	29
		Determinación de glucosa del suero	30
		Determinación de insulina del suero	31
		Determinación de anticuerpos anti-albúmina	34
CAPITULO	III	RESULTADOS	
		Inducción de la diabetes	38
		Preparación de microesferas	40
		Purificación de albúmina	43
		Efecto de la aloxana y el implante sobre el peso de las ratas	46

	Determinación de glucosa del suero	49
	Determinación de insulina del suero	54
	Determinación de anticuerpos anti-albúmina	60
CAPITULO	IV	DISCUSION Y CONCLUSIONES
	Discusión de resultados	62
	Conclusiones	67
	Adendum	69
	Bibliografía	90

CAPITULO I

INTRODUCCION

La diabetes mellitus es una enfermedad muy común dentro de nuestra población, según datos publicados en el boletín estadístico sobre defunciones en el IMSS durante 1981, la diabetes mellitus fué la primera causa de mortalidad en grupos mayores de 45 años y en 1980 representó el cuarto lugar entre los motivos de consulta a nivel medicina familiar y el quinto lugar a nivel de hospital de especialidad. La tendencia prospectiva para los próximos años hace preveer un aumento del 64 % en la mortalidad. Estas cifras hacen evidente la razón por la cual ésta enfermedad se incluye en los programas prioritarios del sector salud.

La diabetes mellitus del tipo I es el resultado de una falla en la producción de la insulina, (ver adendum) y el tratamiento para esos pacientes es la administración de la insulina por vía subcutánea, 2 ó 3 veces al día. Este tratamiento es frecuentemente rechazado por los pacientes, principalmente los jóvenes en quienes se inicia la aplicación antes de los 20 años, lo que ocasiona una discontinuidad en el tratamiento que conlleva a recaídas graves. Todos esos inconvenientes han servido como base para que algunos grupos de investigadores desarrollen diferentes técnicas para suministrar la insulina y otras hormonas, en forma continua y prolongada.

El tratamiento de las enfermedades endocrinas en donde se observa una deficiencia hormonal, representa un reto en medicina, ya que los métodos sustitutivos deben de suministrar la hormona de

forma tal que simulen las variaciones fisiológicas. Aunque Kor-  
renchevsky, Dennison, Schalit y Parkes, administraron con tal -  
propósito la hormona "testicular", disuelta en un aceite para -  
lograr una absorción lenta ( 1-5 ), sus resultados no fueron sa-  
tisfactorios; siendo Deanesly y Parkes en 1933 los primeros en  
mostrar que la liberación de las hormonas dependen del tipo de  
aceite empleado como vehículo ( 6 ). Así, al comparar los acei-  
tes de oliva, sesamo y castoria para la liberación de estróge-  
nos en la rata y el ratón, esos autores observan que con el  
aceite de castoria obtenían los mejores resultados. Posterior-  
mente estos mismos autores estudiaron los efectos de diversos  
preparados hormonales aplicados por diferentes vías, encontrado  
do que el implante subcutáneo de comprimidos daba los mejores -  
resultados. Esta técnica fué utilizada por varios investigado-  
res, aplicando hormonas esteroides en animales de diversas es-  
pecies ( 7-18 ) incluyendo el hombre ( 16 ). También se reali-  
zaron estudios para la liberación de insulina ( 8 ).

Años más tarde, se inicia una etapa diferente con los trabajos  
de Folkman y Long, en los que emplearon una cápsula de plástico,  
el silastic, la cual al ser colocada en el músculo cardíaco y  
bajo la piel de perros, permitió la difusión de triyodotironina  
( 20 ). Esta modalidad fué empleada en una gran variedad de --  
compuestos de bajo peso molecular ( 19-26 ).

En la década siguiente B.K. Davis buscando un material que per-

mitiera la difusión de proteínas y polisacáridos, sugiere el uso de poliacrilamida y polivinilpirrolidona (27-31). Este mismo autor produjo la matriz PSR que contenía polivinilpirrolidona y silastic, buscando mejorar los resultados (30).

Otros intentos se realizaron por el grupo de Langer y Folkman empleando hidroximetilmetacrilato, etilvinilacetato y alcohol polivinílico para la liberación de enzimas e insulina(32-33). Posteriormente Tze, Wong y Young en 1976 y Sun y cols en 1977 emplearon cultivos de islotes de Langerhans incluidos en capilares de un copolímero de cloruro de polivinilo y acrílico (Amicon) el cual permite la difusión de compuestos de peso molecular determinado ( 34, 35). En estos estudios donde se utilizaron matrices de polímeros, se formó una cápsula fibrosa alrededor del implante en las primeras 4 semanas de tratamiento que impedía la difusión del contenido de la matriz ( 66 ), y era necesario retirar las matrices del sitio del implante por medio de una intervención quirúrgica. Para evitar esta intervención, se pensó en desarrollar un material que fuera biodegradable, siendo Gresser uno de los iniciadores en la elaboración de este tipo de matrices biodegradables, utilizando un copolímero de ácido d-1-poliláctico y ácido glicólico ( 36 ). Más tarde Beck y cols utilizando solamente ácido poliláctico mejoran los resultados obtenidos por Gresser ( 37 ).

Posteriormente Lee y Sokolosky, en 1981 prueban la albúmina co



mo una matriz biodegradable para la liberación de progesterona con la ventaja de ser una proteína abundante en el suero de mamíferos(38).

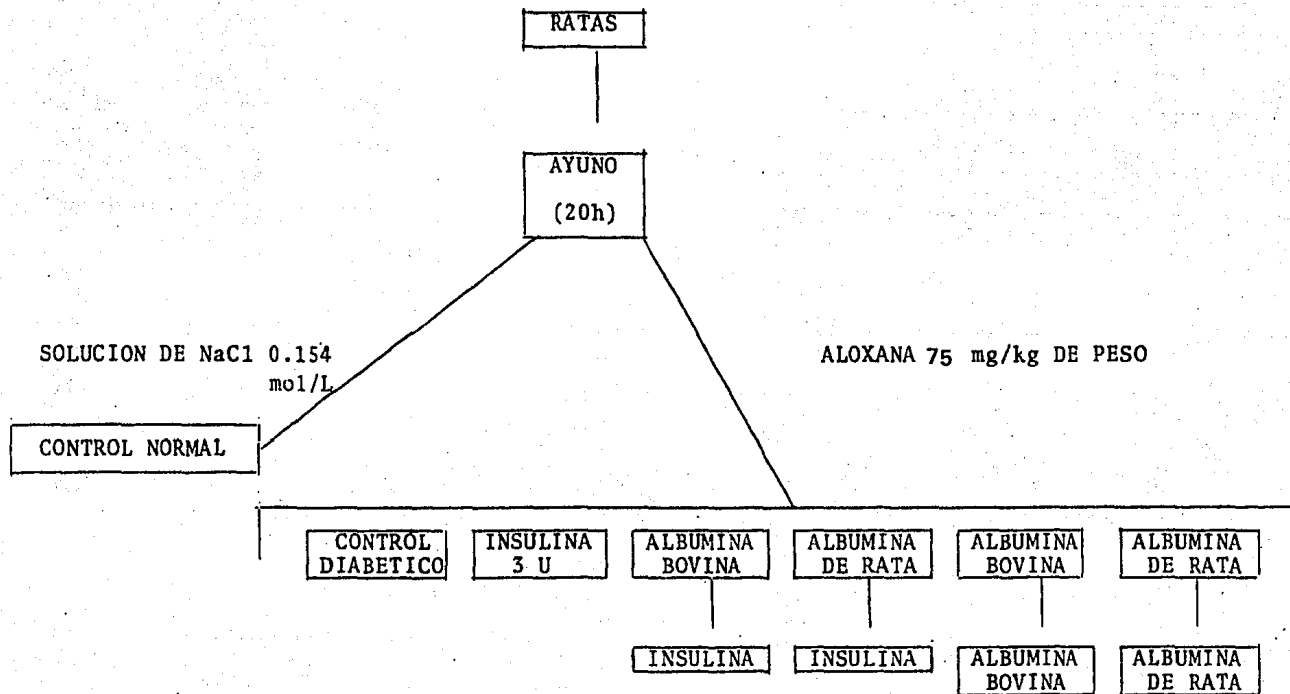
Los estudios que utilizan matrices biodegradables fueron empleados principalmente para la liberación de hormonas esteroides, y basándose en ellos, Goosen y Leung estudiaron en 1982 la capacidad de difusión de la insulina a través de una matriz de albúmina (39), obteniendo resultados positivos, es decir que la insulina difunde a través de la matriz de albúmina. Un año más tarde de estos mismos autores utilizaron este complejo como tratamiento para ratas diabéticas (40), y meses después estudiaron la difusión de la insulina a través de una matriz biodegradable de polilisinina (41).

El propósito de este estudio es desarrollar la tecnología para la elaboración de matrices biodegradables que permitan la liberación lenta de insulina, evaluar la pirogenicidad y esterilidad de la preparación. Estudiar el efecto que produce su implantación en ratas diabéticas sobre las concentraciones de glucosa e insulina en el suero. Medir la respuesta inmune de las ratas a los componentes de las matrices que serán preparadas.

Para lo cual se utilizarán 60 ratas adultas a las cuales se les inducirá diabetes experimental mediante la administración de aloxana ( 75 mg/kg de peso), después de un ayuno de 48 h (63,64).

Serán tratadas con insulina simple de acción rápida (3U/rata) por vía subcutánea, microesferas de albúmina bovina-insulina ( AB - I ), albúmina de rata-insulina (AR-I ), albúmina bovina ( AB-AB ), albúmina de rata ( AR-AR ). Y un grupo no recibirá tratamiento (C D ) que servirá como referencia para evaluar la efectividad del tratamiento.

DIAGRAMA DE FLUJO QUE SE SIGUIO  
PARA LA INDUCCION Y CONTROL DE  
LA DIABETES EN LA RATA



## CAPITULO II

### MATERIAL Y METODOS

## 1.- ANIMALES DE EXPERIMENTACION

Se emplearon ratas hembra, adultas de la cepa Sprague-Dowley con un peso entre 180 y 280 g, a las cuales se les proporcionó agua y alimento " ad libitum ".

## 2.- TECNICAS QUIRURGICAS

### 2.1. Laparotomía

Las ratas se anestesiaron con dehidrobenzoperidol (Janssen Pharmaceutical, 2 mg/kg de peso ) como pre-anestésico y con clorhidrato de ketamina (Cia Medicinal La Campana, 50 mg/kg de peso) como anestésico. Cuando se encontraron en el plano quirúrgico de la anestesia, se sujetaron por las cuatro extremidades en una tabla de manejo en posición de decúbito dorsal, después de lo cual se procedió a hacer una incisión longitudinal a través del tejido epitelial y subcutáneo y posteriormente siguiendo la línea media se procedió a cortar el tejido muscular.

Para disecar la arteria aorta abdominal se desplazaron los intestinos al lado izquierdo del animal y el tejido conectivo que cubre la arteria se seccionó quedando libre la arteria para su utilización.

Una vez disecada la arteria, se puncionó utilizando una jeringa de 10 ml con aguja del No. 20, obteniendo un promedio de 8 ml de sangre.

## 2.2. Implante

Bajo anestesia general dada por la administración del clorhidrato de ketamina y dehidrobenzoperidol en las dosis anteriormente descritas, se realizó una incisión, de aproximadamente un centímetro de largo en la región costal, previo rasurado y antisepsia de la zona. Con unas tijeras de Metzen-Baum se disecó el tejido subcutáneo y se procedió a implantar las microesferas, para lo cual se emplearon unas pinzas de Adson sin dientes. La incisión se suturó empleando Mercilene 000 y puntos separados simples. Para evitar una posible infección postoperatoria se utilizaron nitrofuranos en forma local.

## 3.- INDUCCION DE LA DIABETES

Las ratas permanecieron en ayuno de 20 h, después del cual se sometieron a anestesia general con éter y se les administró aloxana (Sigma Chem Co, 60 mg/kg de peso) disuelta en una solución de NaCl 0.154 mol/L por vía intravenosa (42-47). Después de la administración de la aloxana, se midió glucosa en orina con tiras reactivas (Gluketur, Boehring) y en el suero se determinó la concentración de glucosa e insulina 24 h antes y 48 h después de la administración de la aloxana.

#### 4.- PREPARACION DE LAS MICROESFERAS BIODEGRADABLES

##### 4.1. Técnica

La insulina de acción rápida ( Eli Lilly, 1864 U) se suspendió en 1.6 ml de amortiguador de fosfatos 1 mmol/L a pH 7.5 al cual se le adicionó 1 % de dodecil sulfato de sodio. En esta solución se disolvieron 320 mg de albúmina a 4 °C.

Para iniciar el enlace cruzado se adicionaron 0.4 ml de una solución acuosa de glutaraldehído (2.5% v/v) para obtener una concentración final de 0.5 %, la mezcla se agitó rápidamente y se adicionó por medio de una pipeta a 50 ml de una solución de aceite de maíz y éter de petróleo 60 - 90 °(1:4 v/v ).

La emulsión formada se mantuvo en agitación a temperatura ambiente por 15 min, después de este tiempo se de cantó la fase aceitosa y las microesferas formadas se lavaron 3 veces con éter de petróleo, finalmente se de jó evaporar el éter en una campana de extracción.

Para evaluar la concentración de insulina por mg de mi croesferas, se pesaron 100 mg de éstas y se colocaron en 100 ml de amortiguador de fosfatos 1 mmol/L pH 7.5, dejando difundir la insulina durante 7 días a 37°C con agitación continua.

#### 4.2. Tamaño

La homogeneidad y tamaño de las microesferas se evaluó mediante un microscopio electrónico de barrido

#### 4.3. Prueba de contaminación microbiana

Para excluir la posible contaminación microbiana de las microesferas, 50 mg de éstas se incubaron 12 h a 37°C, en un medio de enriquecimiento ( caldo cerebro corazón ), de éste medio se tomó una muestra con un asa bacteriológica inoculado por el método de estría cruzada, en los siguientes medios; gelosa sangre, EMB y Saboureaud.

#### 4.4. Prueba de pirogenicidad

La posible pirogenicidad producida por las microesferas, se evaluó utilizando 2 conejos, uno como control y el otro de prueba. A los dos conejos se les practicó una incisión subcutánea, bajo anestesia general con pentobarbital sodico (Janssen Pharmaceutical, 14mg/kg), y clorhidrato de ketamina (Cia Medicinal La Campana, 20mg/kg). El conejo en el que se realizó la implantación de las microesferas recibió 150 mg de éstas, en tanto que el control solo recibió solución salina. La temperatura fue determinada:

a) 24 h antes de la implantación de las microesferas.



- b) Unos minutos antes de ser anestesiados los animales.
- c) Cada hora durante la primeras 4 h post-implante.
- d) A las 12, 24, 48 y 72 h después del implante de las microesferas.

## 5.- PURIFICACION DE ALBUMINA DE RATA

### 5.1. Obtención del suero de rata

El suero de rata se obtuvo sangrando al blanco a los animales mediante una punción en la aorta abdominal, para lo cual se efectuó una laparotomía y se disecó dicha arteria.

La sangre obtenida de ésta forma, se vació por las paredes en un tubo de ensaye, se dejó coagular y se separó el paquete celular por centrifugación a 2036 x g (3000 rpm ) durante 15 min.

### 5.2. Precipitación de globulinas con sulfato de amonio

Las globulinas se precipitaron mediante la adición, al suero, de una solución saturada de sulfato de amonio hasta obtener una concentración final de 33 % (50,51). La adición de ésta solución se hizo gota a gota y con agitación constante evitando hacer espuma. El pH de la solución se ajustó a 7.8 con NaOH 2 mol/L. Terminada la adición, la solución se continuó agitando durante

una hora y media, después de la cual se centrifugó a 2036 x g ( 3000 rpm ) durante 30 min.

El precipitado que contiene las globulinas se desechó y el sobrenadante se utilizó para los pasos siguientes.

### 5.3. Precipitación de albúmina con sulfato de amonio

Al sobrenadante obtenido del paso anterior se le adicionó solución saturada de sulfato de amonio hasta alcanzar una saturación de 64 %, ajustando constantemente el pH a 4.8 con HCl mol/L. De nuevo, la adición del sulfato de amonio se hizo gota a gota y con agitación constante. La agitación se continuó por 2 h y la solución se centrifugó a 2036 x g ( 3000 rpm ) durante 30 min. El sobrenadante se desechó y el precipitado se disolvió en una solución de NaCl 0.154 mol/L, hasta obtener el volúmen original del suero. Para eliminar el sulfato de amonio, la solución se dializó contra 6 L de agua destilada a pH 7, seguido de una diálisis con 2 l. de un amortiguador de tris-HCl 1 mmol/L de pH 7.4 (48 - 52 ).

### 5.4. Purificación de la albúmina por cromatografía en DEAE-Sephacel.

Una columna de 2 x 5 cm de DEAE-Sephacel (Sigma Chem Co.), se lavó con 50 ml del mismo amortiguador adicionado de

NaCl 1 mol/L. Nuevamente se adicionaron a la columna 50 ml de la solución amortiguada de tris-HCl 0.01 mol/L, pH 7.4. Una vez preparada la columna, se adicionaron 50 ml de la solución proteica y la columna se lavó con 50 ml de una solución de NaCl 0.154 mol/L, amortiguada con fosfatos 0.01 mol/L, pH 7.5 que permite eliminar las globulinas que aún permanecían en solución. Posteriormente, la columna se lavó con 50 ml de la solución tris-HCl 0.01 mol/L, pH 7.4 adicionada de NaCl 1 mol/L, con lo cual se logró eluir a la albúmina. Para reutilizar la columna se adicionaron nuevamente 50 ml del amortiguador de tris-HCl 0.01 mol/L, pH 7.4 ( 53 ).

#### 6.- IMPLANTE

Las microesferas se colocaron haciendo incisiones en la región costal de las ratas, previamente anestesiadas, implantando 75 mg en cada lado, haciendo 2 reimplantes a los 15 y 30 días ( 40 ), de los cuales se realizó un estudio histopatológico.

#### 7.- ELECTROFORESIS EN ACETATO DE CELULOSA

##### Reactivos:

A.- Amortiguador de barbital 0.06 mol/L, pH 8.4,  $\mu$  0.05

B.- Acido acético al 5 %

- C.- Etanol al 95 %
- D.- Acido acético-etanol ( 1:4 v/v )
- E.- Rojo de Ponceau S

### 7.1. Preparación de reactivos

#### A.- Amortiguador de barbital

ácido dietilbarbitúrico .....	2.76	g
dietilbarbirurato de sodio .....	15.4	g
agua desionizada cbp .....	1.5	l.

#### E.- Rojo de Ponceau S

rojo de Ponceau S .....	0.5	g
ácido tricloroacético .....	7.5	g
ácido sulfosalicílico .....	7.5	g
agua destilada .....	0.25	L

### 7.2. Técnica

La membrana de acetato de celulosa se humedeció en el amortiguador de barbital 0.06 mol/L, y con un papel filtro se eliminó el excedente de amortiguador. Después se colocó en la cámara de electroforesis, se aplicaron las muestras y se corrió durante 11 min a 25 Amp. La membrana se tiñó sumergiéndola durante 8 min en la solución de rojo de Ponceau S y se decoloró al colocarla en forma sucesiva en los siguientes reactivos, 1 min en

ácido acético al 5 %, 1 min en etanol al 95 % y 3 min en una mezcla de ácido acético-etanol (1:4 v/v). Para clarificar la membrana se colocó sobre una placa de vidrio, se eliminó el excedente de la mezcla ácido acético-etanol y se metió al horno a 100 °C durante 2 min ( 54 - 55 ).

## 8.- INMUNOELECTROFORESIS

### Reactivos

- A.- Amortiguador de barbital 0.05 mol/L, pH 7.4  $\mu$  0.05
- B.- Solución de agarosa al 1.5 %
- C.- Solución para teñir
- D.- Solución para decolorar
- E.- Anticuerpos contra proteínas del suero de la rata

### 8.1. Preparación de reactivos

#### A.- Amortiguador de barbital

diethylbarbiturato de sodio.....	15.87	g
ácido clorhídrico 0.1 mol/L .....	0.230	L
timerosal .....	2.0	g
agua destilada cbp .....	2.0	L
se ajusta el pH a 8.4		

**B.- Solución de agarosa**

agarosa .....	1.5	g
amortiguador de barbital .....	0.1	L

**C.- Solución para teñir**

azul brillante de coomassie R-250..	2.5	g
metanol .....	0.5	L
ácido acético .....	0.1	L
agua destilada.....	0.4	L

**D.- Solución para decolorar**

etanol.....	0.45	L
ácido acético .....	0.1	L
agua destilada .....	0.45	L

**E.- Obtención de los anticuerpos contra proteínas del suero de la rata.**

Los anticuerpos se prepararon inmunizando a un conejo con suero estéril de rata, siguiendo el esquema que se indica a continuación:

DIA	VIA DE ADMINISTRACION	DOSIS DE ANTIGENO
1º	Intramuscular	0.5 ml de suero de rata, 0.5 ml de adyuvante completo de Freund
8º	Intramuscular	1.0 ml de suero de rata, 1.0 ml de adyuvante completo de Freund
15º	Intravenosa	0.2 ml de suero de rata, diluido 1:10*
16º	Intravenosa	0.5 ml de suero de rata, diluido 1:10*
17º	Intravenosa	1.0 ml de suero de rata, diluido 1:10*
18º	Intravenosa	0.2 ml de suero de rata
19º	Intravenosa	0.5 ml de suero de rata
20º	Intravenosa	1.0 ml de suero de rata
28º	Intravenosa	1.0 ml de suero de rata

\* Se diluyó utilizando una solución de NaCl 0.164 mol/L.

El día 28º se realizó la sangría de prueba ( 3ml ) por vía intravenosa y el día 36º se realizó la sangría de cosecha ( 50 ml ) por punción cardíaca ( 57 ).

## 8.2. Técnica

- a) Preparación de la placa
- b) Aplicación de las muestras y electroforesis
- c) Adición del anticuerpo
- d) Tinción

a) Se utilizó una placa de vidrio de 8.2 x 9.5 cm, limpia y desengrasada. Se colocó sobre una superficie plana y nivelada, para poder verter sobre ella, rápidamente y con cuidado, 20 ml de la solución caliente de agarosa, la cual se dejó solidificar. Posteriormente, con la ayuda de una plantilla se procedió a hacer los canales y horadaciones pertinentes.

### b) Aplicación de las muestras y electroforesis.

En los pozos formados en el paso anterior se colocaron 0.1 ml de las muestras proteicas utilizando un capilar. En el primer pozo, se adiciono una gota de una solución 0.001 mol/L de azul de bromofenol que al ligarse con la albúmina se desplazó con ésta, obteniendo así una gufa de la migración de la protefna. Una vez preparada la placa se procedió a realizar la electroforesis.



Se colocó la placa en una cámara de electroforesis que previamente se llenó con amortiguador de barbital 0.04 mol/L, hasta aproximadamente 1 cm encima de los electrodos, y se establecieron los puentes entre la cámara y la placa, con la ayuda de unas tiras de papel filtro, con un extremo sumergido en la solución amortiguadora y otro extremo sobre una orilla de la placa. La cámara se cerró y los electrodos se conectaron de tal forma, que las muestras se desplacen del cátodo hacia el ánodo. Posteriormente se conectaron los electrodos a la fuente de poder, manteniéndola durante 1 h a 90 volts.

c) Adición del anticuerpo

Después de transcurrido este tiempo, con la ayuda de una aguja, se procedió a retirar la agarosa que formaban los canales e inmediatamente después se llenaron con el suero que contiene los anticuerpos contra las proteínas del suero de la rata.

Una vez llenados los canales, la placa se introdujo en una cámara húmeda durante 24 h. Al término de este tiempo se observaron las bandas de precipitación y para poder observarlas mejor se procedió a teñirlas.

#### d) Tinción

La placa se lavó varias veces con una solución de NaCl 0.154 mol/L para eliminar las proteínas que no reaccionaron . Posteriormente se lavó con agua destilada hasta eliminar las sales y se dejó deshidratar a temperatura ambiente durante 48 h.

Para su tinción, la placa se sumergió durante 15 min en la solución para teñir.

El excedente de colorante se eliminó sumergiendo la placa varias veces en la solución para decolorar ( 49 - 56 ).

#### 9.- TOMA DE MUESTRA

Las muestras de sangre para las determinaciones de insulina y glucosa en el suero de la rata, se obtuvieron bajo anestesia general con éter, del seno orbital, utilizando un catéter de plástico del No. K 79, el cual se introdujo en la comisura interna del ojo con un inclinación aproximada de 45 ° hasta llegar al seno orbital. La sangre se centrifugó a 2036 x g (3000 rpm) durante 10 min para eliminar el paquete celular. El suero obtenido de esta forma fue almacenado a -20°C hasta su utilización.

## 10.- DETERMINACION DE GLUCOSA

La determinación de glucosa en el suero de la rata se hizo empleando el método de la glucosa-oxidasa (Merkotest), (58).

### Reactivos:

Reactivo de color.

Amortiguador de fosfatos 0.1 mol/L y tris-0.1 mol/L ajustado a pH 8.

Glucosa-oxidasa 6KU/L, peroxidasa 38 KU/L.

4-aminoantipirina 0.25 mmol/L.

2,4-diclorofenol 0.3 mmol/L.

### 10.1. Preparación de la curva estándar

Sol. Patrón 400mg/100 ml	agua	Conc.final de glucosa(mg/ml)
1.00 ml	-	4
0.75 ml	0.25 ml	3
0.50 ml	0.50 ml	2
0.25 ml	0.75 ml	1

## 10.2. Técnica

	PROBLEMA	BLANCO
Suero o solución de glucosa	0.01 ml	-
Reactivo de color	2.00 ml	2.00 ml

Las soluciones se mezclaron y se dejaron reposar a temperatura ambiente, durante 40 min. Al finalizar este tiempo se determinó la extinción a 510 nm.

## 11.- DETERMINACION DE INSULINA ( RADIOINMUNOANALISIS )

### Reactivos:

- A.- Insulina estándar (CIS)
- B.- Insulina marcada con  $I^{125}$  (New England Nuclear)
- C.- Anticuerpo diluido al título adecuado
- D.- Suspensión de carbón-dextrana
- E.- Solución I
- F.- Solución II
- G.- Solución III

### 11.1. Preparación de reactivos:

- A.- El estándar de insulina humana (CIS) se disolvió en 5 ml de la solución I. Las diluciones para la

curva estándar se prepararon con el mismo diluyente.

B.-La insulina marcada con  $I^{125}$ . Se diluyó con la solución I hasta obtener  $3 \mu\text{U/ml}$ . La dilución se llevó a cabo tomando en cuenta los datos de actividad específica que envía el fabricante.

C.-Anticuerpo. Se realizó una dilución 1:14 000 utilizando la solución I.

D.-Suspensión de carbón-dextrana. Se suspendieron por separado 50 g de Norita en 1,900 ml de la solución III mantenida en hielo y 5 g de dextrana en 100 ml de la misma solución III.

La dextrana se adicionó lentamente a la suspensión de carbón manteniendo la agitación continua y la temperatura a  $4^\circ\text{C}$ . Una vez formada la mezcla, la suspensión se agitó constantemente manteniendo el recipiente en hielo.

E.-Solución I. Utilizada como diluyente de ensayo. Amortiguador de barbital sódico 0.1 mol/L pH 8.5 y albúmina bovina al 2.5 %.

F.-Solución II. Se disuelven 14.714 g de barbital sódico y 9.714 g de acetato de sodio en 500 ml de agua destilada.

G.-Solución III. A 100 ml de la solución II se le adicionaron 1.53 g de NaCl, 100 ml de HCl 0.1 mol/L y se aforó a, 2 L con agua desionizada.

11.2. Técnica:

En tubos de ensaye de plástico de 12 x 75 mm se colocaron los siguientes reactivos:

	Diluyente	Muestra	Insulina <sup>o</sup>	Anticuerpo	Insulina*
Unión - - inespecífica.	0.9	- -	- -	- - -	0.1
Unión específica, 100 %	0.8	- -	-	0.1	0.1
Curva estándar 5 a 200 $\mu$ U	0.7	- -	0.1	0.1	0.1
Sueros a) conocido b) problema	0.7	0.1	- -	0.1	0.1

0 = Insulina.

\* = Insulina marcada con I<sup>125</sup>.

Los tubos se cerraron con un tapón de presión y el contenido se mezcló en un agitador Vortex, posteriormente se incubaron a 4°C durante 4 días. Terminando este período se le adicionaron 3 ml de la suspensión fría de carbón-dextrana. Una vez agitados los tubos, estos se centrifugaron a 4 °C, durante 1 h a 2036 x g (3000 rpm). El sobrenadante se trasvasó a tubos de plástico de la misma medida cuyo contenido en radioactividad se determinó en un contador de radiaciones gamma (Autogamma Scintillation Spectrometer), (59-62).

## 12.- DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTIALBUMINA (OUCHTERLONY)

### Reactivos:

- A.- Agarosa
- B.- Albúmina bovina
- C.- Albúmina de rata
- D.- Amortiguador de Veronal

### 12.1. Preparación de reactivos:

- A.- Agarosa
  - agarosa ..... 0.15 g
  - agua destilada ..... 0.01 L

B.- Albúmina bovina

albúmina bovina ..... 20 g  
agua destilada ..... 0.1 L

C.- Albúmina de rata

albúmina de rata ..... 20 g  
agua destilada ..... 0.1 L

D.- Amortiguador de Veronal

diethylbarbiturate de sodio ..... 15.87 g  
ácido clorhídrico 0.1 mol/L ..... 0.230 L  
agua destilada ..... 2.0 L  
se ajusta el pH a 8.5

12.1. Técnica

Se utilizaron portaobjetos desengrasados, los cuales se colocaron sobre una superficie nivelada para verter sobre cada uno de ellos 3 ml de agarosa fundida y se dejó solidificar. Una vez solidificada, se procedió a hacer 5 horadaciones en forma de roseta, una central y 4 periféricas, con la ayuda de tubos capilares se llenaron los pozos con 0.04 ml de los reactivos según se indica a continuación; los pozos periféricos con sueros problema y el pozo central con el



antígeno correspondiente. Los portaobjetos se colocaron dentro de una cámara húmeda y se mantuvieron en ella durante 48 h a temperatura ambiente. Al término de ese tiempo se leyeron los resultados (57).

### 13.- ANALISIS ESTADISTICO

Las diferencias entre los grupos y entre el mismo grupo, se evaluaron mediante la prueba " t " de student.

CAPITULO III

RESULTADOS

### III.1. INDUCCION DE LA DIABETES

En los primeros intentos que realizamos para inducir la diabetes en las ratas, los animales se mantuvieron en ayuno durante 48 h previo a la administración intravenosa de una dosis de aloxana de 75 mg/kg de peso ( 63,64 ). Este tratamiento produjo una mortalidad muy alta del 82%. Al investigar las razones del efecto tan nocivo de la aloxana, encontramos que el alimento que se proporcionaba a los animales en el bioterio no contenía la calidad adecuada de proteínas y por lo tanto, los animales se encontraban desnutridos. Esto, aunado al ayuno y la toxicidad de la aloxana causó la muerte de las ratas. Por lo anterior, decidimos probar el tratamiento con diferentes dosis de aloxana y diferentes tiempos de ayuno, la tabla I resume parte de los datos obtenidos.

Como se puede observar, los resultados óptimos se obtienen utilizando una dosis de aloxana entre 55 y 60 mg/kg de peso después de mantener a los animales en ayuno durante 18 a 24 h. Por lo tanto se decidió tomar como condiciones de trabajo un ayuno de 20 h y una dosis de 60 mg/kg de peso.

TABLA I

EFFECTO DE LA DURACION DEL AYUNO Y LA DOSIS DE ALOXANA  
SOBRE LA INDUCCION DE LA DIABETES

DOSIS (mg/kg)	DURACION DEL AYUNO (h)	NO. DE * ANIMALES	ANIMALES ** DIABETICOS	% DE ANIMALES *** SOBREVIVIENTES
75	48	45	35	17.7
65	18	7	7	57.14
65	24	7	7	42.85
60	18	7	7	100
60	24	7	7	100
55	18	7	7	100
55	24	7	7	100
50	18	7	0	100
50	24	7	2	100

\* Número total de animales que recibieron el tratamiento con aloxana.

\*\* Número de animales que resultaron con síntomas de diabetes.

\*\*\* % del total de los animales tratados con aloxana, que sobrevivieron al tratamiento.

### III.2. PREPARACION DE LAS MICROESFERAS BIODEGRADABLES

#### 2.1. Técnica

Ya que Goosen y Leung no indican el tipo de éter de petróleo utilizado, tuvimos que realizar la síntesis tanto con el éter de petróleo 30 - 60 °C como con el de 60 - 90 °C. Con el primero se obtenían microesferas, pero al lavarlas estallaban inmediatamente, en cambio con el éter de petróleo 60 - 90 °C, los resultados fueron satisfactorios, conservándose las esferas intactas. La cantidad de insulina contenida por mg de microesferas fue de 0.13 U.

#### 2.2. Tamaño

Se observó con el microscopio electrónico de barrido que la preparación produjo predominantemente microesferas de 2  $\mu$ m de diámetro ( Figs. 1 y 2 ).

#### 2.3. Prueba de contaminación microbiana

La prueba para excluir la posible contaminación microbiana resultó negativa, ya que no se observó desarrollo de bacterias ni hongos.

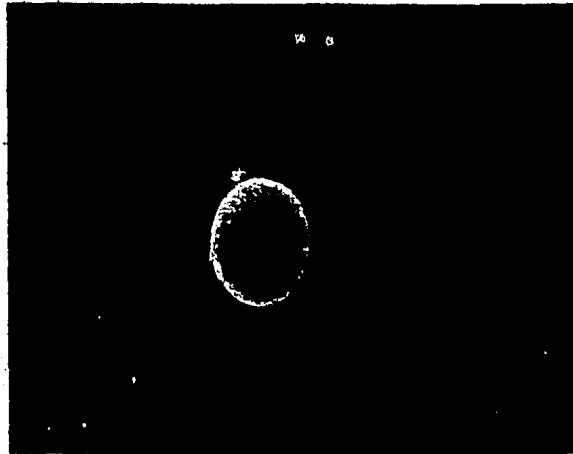


Fig. 1 microesfera a un aumento de 80 x

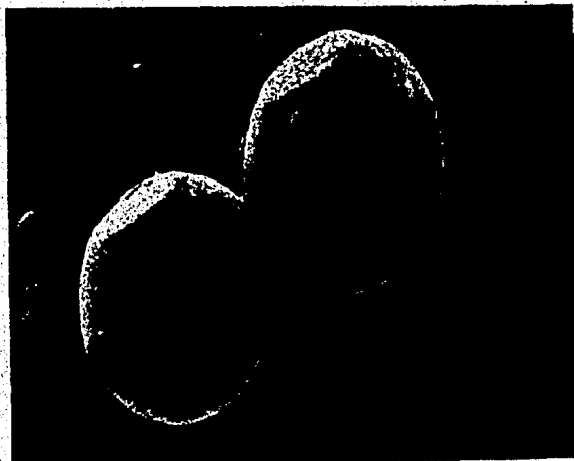


Fig. 2 microesferas a un aumento de 160 x

#### 2.4. Prueba de pirogenicidad

En la prueba de pirogenicidad ( Tabla II ), se obtuvo una diferencia en la temperatura de  $1.3^{\circ}\text{C}$ , y de acuerdo a la Farmacopea Nacional, cambios menores de  $1.8^{\circ}\text{C}$  no son significativos ( 65 ).

TABLA II  
CAMBIOS DE TEMPERATURA DURANTE LA PRUEBA DE  
PIROGENICIDAD

TIEMPO ( h )	CONTROL ( C )	PRUEBA ( P )	P. vs. C ( $\Delta$ )
- 24	$38.3^{\circ}\text{C}$	$39.3^{\circ}\text{C}$	$+1.0^{\circ}\text{C}$
0	$39.0^{\circ}\text{C}$	$38.8^{\circ}\text{C}$	$-0.2^{\circ}\text{C}$
1	$37.3^{\circ}\text{C}$	$37.7^{\circ}\text{C}$	$+0.4^{\circ}\text{C}$
2	$37.2^{\circ}\text{C}$	$37.1^{\circ}\text{C}$	$-0.1^{\circ}\text{C}$
3	$38.4^{\circ}\text{C}$	$38.9^{\circ}\text{C}$	$+0.5^{\circ}\text{C}$
4	$38.9^{\circ}\text{C}$	$39.5^{\circ}\text{C}$	$+0.6^{\circ}\text{C}$
12	$39.5^{\circ}\text{C}$	$40.1^{\circ}\text{C}$	$+0.6^{\circ}\text{C}$
24	$39.2^{\circ}\text{C}$	$38.4^{\circ}\text{C}$	$-0.8^{\circ}\text{C}$
48	$39.1^{\circ}\text{C}$	$39.8^{\circ}\text{C}$	$+0.7^{\circ}\text{C}$
72	$39.0^{\circ}\text{C}$	$39.5^{\circ}\text{C}$	$+0.5^{\circ}\text{C}$

### 111.3. PURIFICACION DE LA ALBUMINA DE RATA

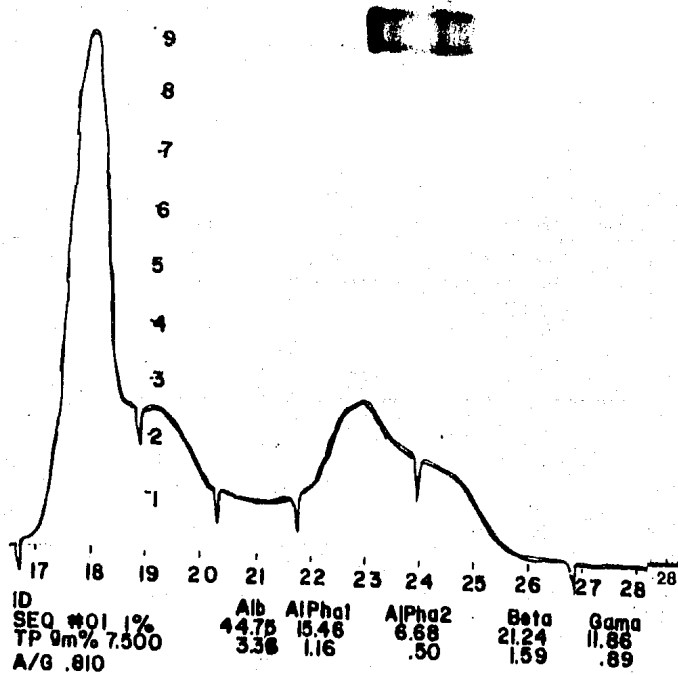
Dado que la albúmina obtenida siguiendo el método de Berlinguett mostraba una importante contaminación con otras proteínas ( Fig. 3 ), se decidió modificar la técnica con objeto de precipitar directamente del suero las globulinas, previamente a la precipitación de la albúmina. Siguiendo este método se logró eliminar la mayor cantidad de globulinas ( 75.5 % ). Para lograr una mayor pureza, la albúmina se aplicó a una columna de intercambio ionico ( DEAE-Sephacel ).

El análisis por electroforesis en acetato de celulosa comprobó la presencia de una banda que corresponde a la albúmina y una banda muy pequeña que corresponde a las alfa globulinas ( 5.7 % ). Una preparación comercial de albúmina bovina purificada, mostró las mismas características (Fig. 4 y 5 ). Se realizó también el estudio por inmunoelectroforesis, empleando anticuerpos de conejo contra las proteínas del suero de la rata, obtenidos en este estudio\*, observándose nuevamente dos bandas, la de mayor densidad correspondiente a la albúmina y una de menor densidad correspondiente a las alfa globulinas ( Fig. 6 ).

\* Los anticuerpos obtenidos en nuestro estudio, contra las proteínas del suero de la rata dieron un título de 1:128.

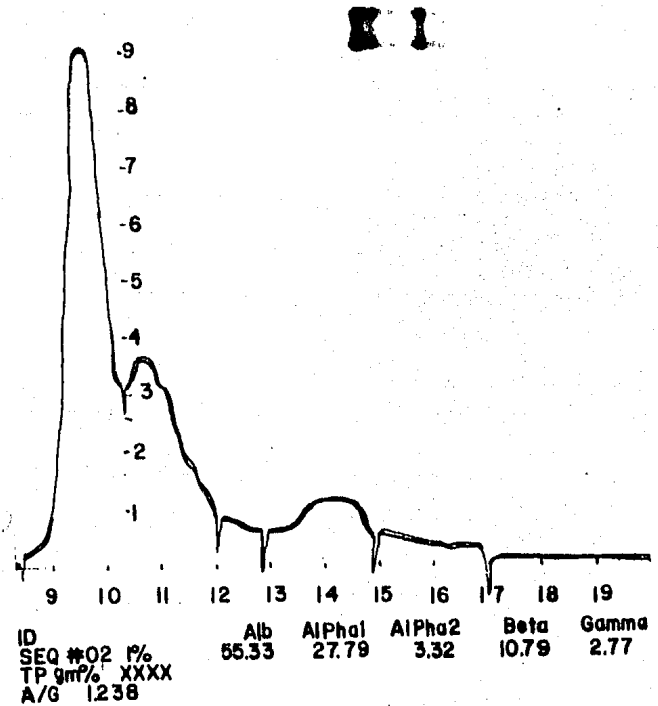


FIGURA 3

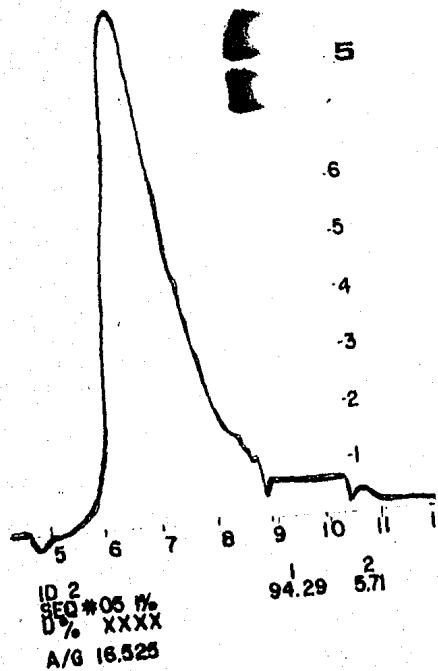


Suero normal de rata.

44



Albúmina purificada por el método de Berlinguett.



45

Fig. 4 Albúmina bovina comercial

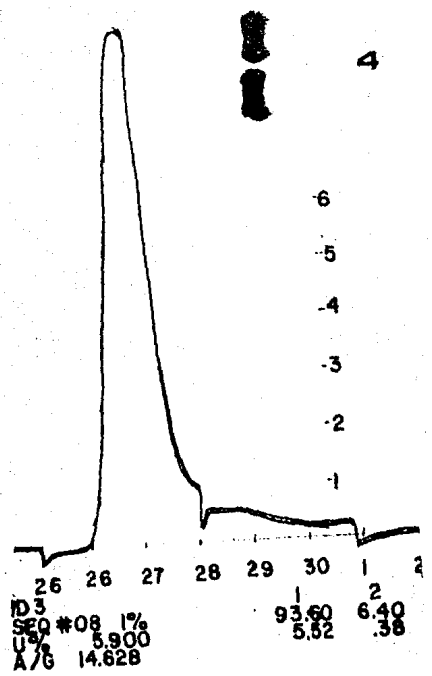


Fig. 5 Albúmina de rata

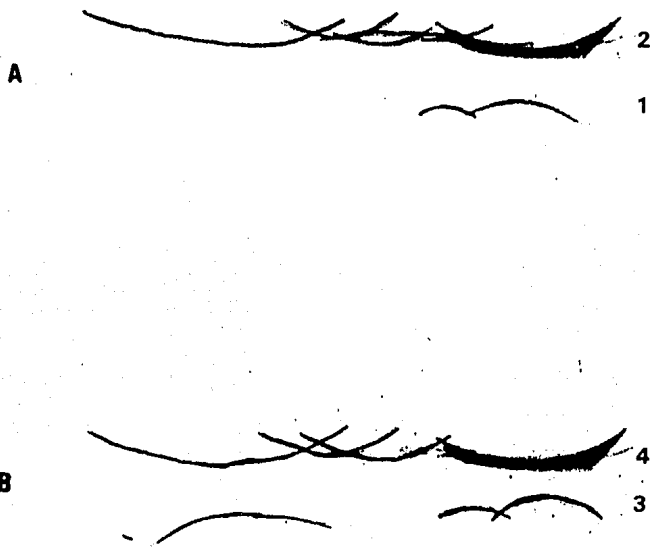


Fig. 6 A) Inmunoelectroforesis de la albúmina de rata (1) y del suero normal de rata (2).  
 B) Inmunoelectroforesis de la albúmina de rata antes de pasar por la columna de DEAE sephacel (3) y del suero normal de rata (4).

### III.4. ESTUDIO HISTOPATOLOGICO DE LA ZONA DE IMPLANTACION

El tejido disecado de las zonas donde se implantaron las microesferas, al estudiarse histopatológicamente, no mostró indicios de inflamación ni de fibrosis a los 15, 30, ni 45 días de la implantación.

### III.5. EFECTO DE LA ALOXANA Y DE LA IMPLANTACION DE LAS MICROESFERAS SOBRE EL PESO, GLUCOSA E INSULINA DEL SUERO EN LA RATA.

#### 5.1. Peso

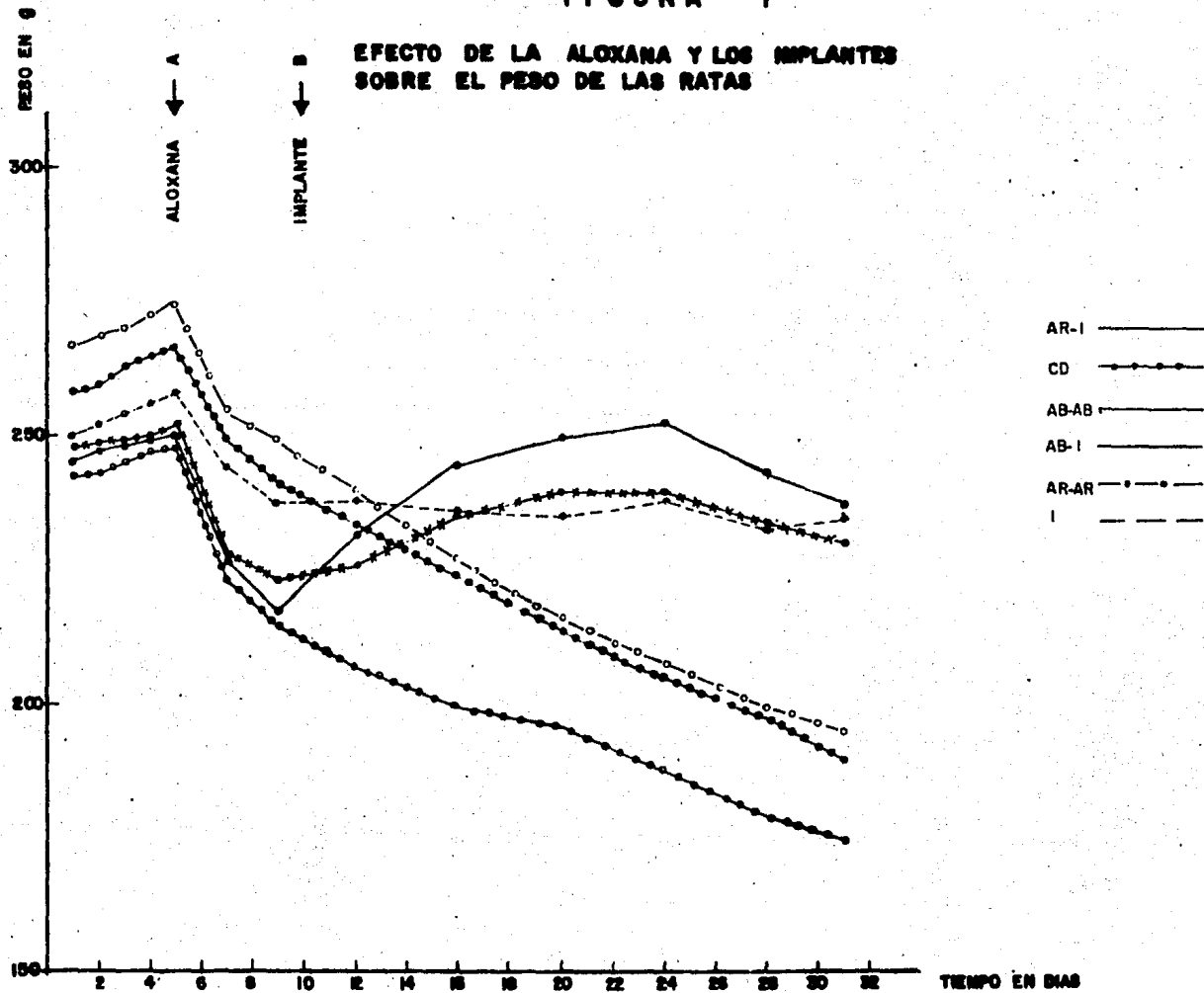
Al séptimo día, después de administrar la aloxana a las ratas, se observó una pérdida de peso, significativa ( P - 0.001 ), la cual se corrigió cuando se les administró insulina ( I ) ( P - 0.001 ), las microesferas de albúmina bovina-insulina ( AB-I ) ( P - 0.001 ), microesferas de albúmina de rata-insulina ( AR-I ) ( P - 0.001 ). A partir del vigésimo cuarto día los grupos a los que se les administraron microesferas con insulina comenzaron a perder peso nuevamente, mientras que las ratas tratadas con microesferas de albúmina bovina ( AB-AB ), albúmina de rata ( AR-AR ) y el control diabetico ( C D ), siguieron bajando de peso ( P - 0.001 ) como se puede observar en la tabla III y en la figura 7.

TABLA III

EFFECTO DE LA ADMINISTRACION DE LA ALOXANA Y LA IMPLANTACION DE  
 MICROESFERAS CON DIFERENTE COMPOSICION SOBRE EL  
 PESO DE LAS RATAS EN GRAMOS

DIAS	C.D.	AB-I	AR-I	I	AB-AB	AR-AR
1	258.0	248.7	245.2	250.0	242.7	267.0
2	259.9	249.1	247.1	252.5	243.0	268.9
3	263.0	249.8	248.5	254.7	245.0	270.3
4	265.0	250.2	249.0	256.2	247.0	272.5
5	266.9	252.0	250.0	258.7	248.3	275.0
5	AYUNO Y ALOXANA					
7	249.4	228.3	226.6	244.2	223.5	254.9
9	241.5	223.8	217.5	237.8	215.3	249.5
10	I M P L A N T E					
12	234.5	226.0	232.0	238.5	207.8	240.3
16	224.9	235.0	245.0	236.4	200.0	227.0
20	214.8	240.5	250.3	236.5	196.5	216.5
24	205.8	240.0	253.0	238.9	188.3	208.5
28	198.3	234.5	243.0	233.3	180.0	200.5
31	190.0	230.0	238.0	235.0.	175.0	195.0

FIGURA 7



## 5.2. Glucosa en el suero de la rata

Como se puede observar en la tabla IV y figura 8, al quinto día después de la administración de la aloxana, los niveles de glucosa en el suero se incrementaron en relación a la concentración basal ( P - 0.001 ), a más de 29.3 mmol/L. Al administrar el tratamiento, los valores disminuyeron en las ratas tratadas con AB-I, AR-I e I ( P - 0.001 ), mientras que en las ratas tratadas con AB-AB, AR-AR. Los niveles de glucosa siguieron aumentando en relación a la concentración basal ( P - 0.01 ) al igual que en el control diabético ( P - 0.001 ).

Las diferencias entre los grupos que recibieron insulina fueron significativas para AB-I vs. AR-I el vigésimo quinto día ( P - 0.001 ) y para (BI-I vs. I el mismo día y el trigésimo primer día ( P - 0.001 ), para AR-I vs. I hubo diferencias significativas hasta el trigésimo primer días ( P - 0.001 ).

La figura 9 y la tabla V, muestra el efecto sobre los niveles de glucosa en el suero de las ratas al reimplantar las microesferas de AB-I y AR-I a los 15 y 30 días, observando que dichos niveles se mantuvieron dentro de las concentraciones normales.

TABLA IV

EFEECTO DE LA ALOXANA Y DEL IMPLANTE SOBRE LOS NIVELES DE GLUCOSA SERICA\* EN LA RATA

TRATAMIENTO	n	D I A S									
		0**	5	10***	13	16	19	22	25	28	31
AB-I	6	5.89 ±0.26	29.39 ± 0.59	29.52 ± 0.43	5.76 ±0.10	6.12 ±0.05	6.81 ±0.04	7.98 ±0.15	19.17 ± 0.11	28.55 ± 0.46	30.8 ± 0.27
AR-I	6	6.07 ±0.10	32.64 ± 0.42	32.97 ± 0.89	5.36 ±0.04	5.58 ±0.07	5.70 ±0.6	5.79 ±0.06	6.39 ± 0.10	11.70 ± 0.23	24.23 ± 0.16
I	6	6.03 ±0.14	29.46 ± 0.45	30.69 ± 0.39	5.91 ±0.05	6.16 ±0.10	6.33 ±0.09	6.17 ±0.06	6.55 ± 0.10	6.38 ± 0.07	6.25 ± 0.52
AB-AB	6	7.18 ±0.17	32.76 ± 0.71	33.03 ± 0.93	36.33 ±0.53	38.36 ±0.40	39.01 ±0.22	39.17 ±0.21	39.67 ± 0.33	39.80 ± 0.29	39.89 ± 0.5
AR-AR	6	6.35 ±0.13	29.47 ± 0.70	30.31 ± 0.50	32.05 ±0.51	34.65 ±0.53	35.95 ±0.45	37.46 ±0.38	38.11 ± 0.34	39.01 ± 0.11	39.17 ± 0.35
C D	6	6.30 ±0.08	31.55 ± 1.14	32.15 ± 0.46	34.37 ±0.58	35.30 ±0.53	36.10 ±0.44	36.87 ±0.38	37.98 ± 0.49	39.70 ± 0.61	39.69 ± 0.57

\* Los valores de glucosa estan reportados en mmol/l, en donde 5.5 mmol/l = 100 mg/dl.

\*\* Representa el valor de glucosa en el suero obtenido un minuto antes de recibir la inyección de aloxana.

\*\*\* Día del implante.



FIGURA 8

EFEECTO DE LA ALOXANA Y LOS INPLANTES  
SOBRE LOS NIVELES DE GLUCOSA SERICA

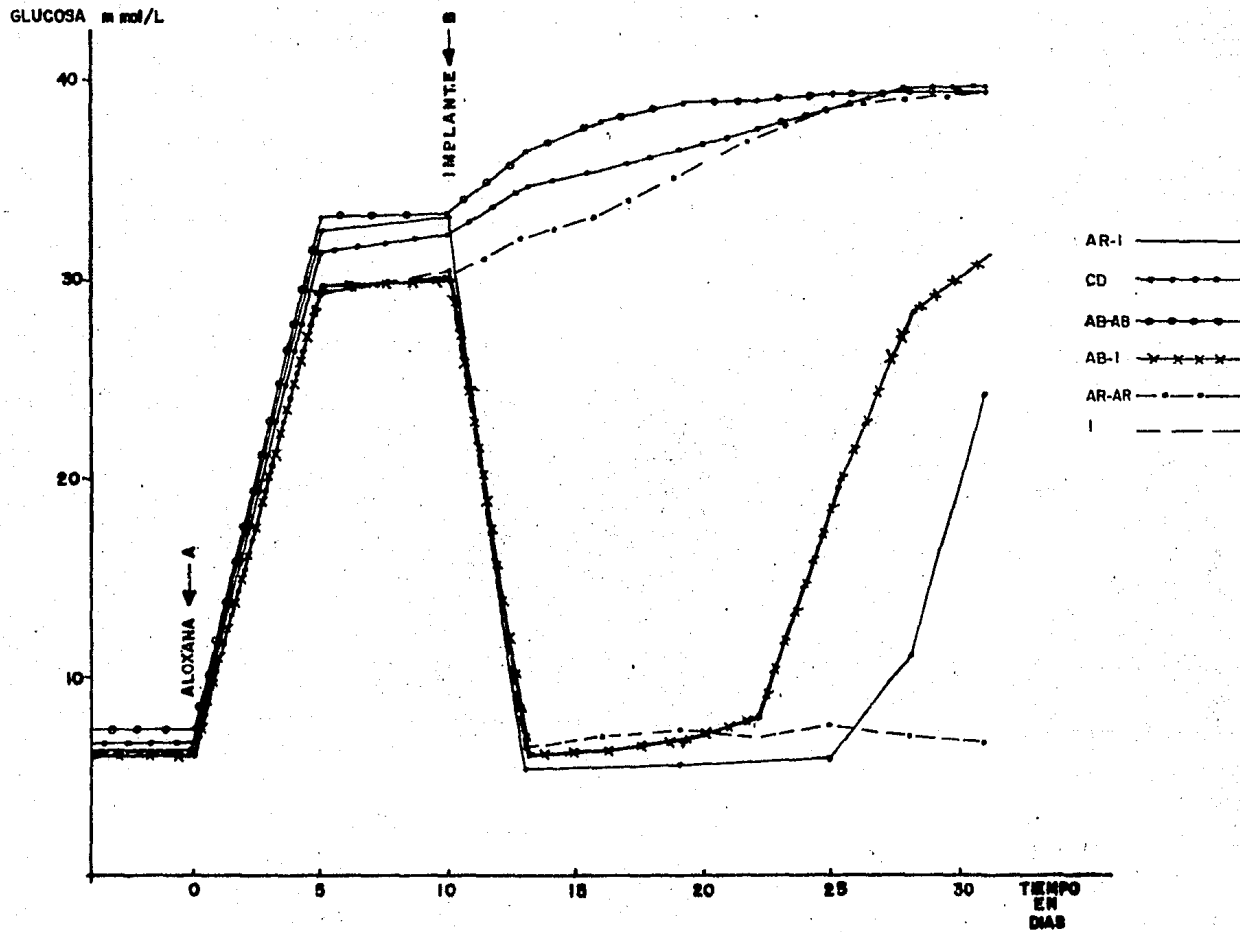


TABLA V

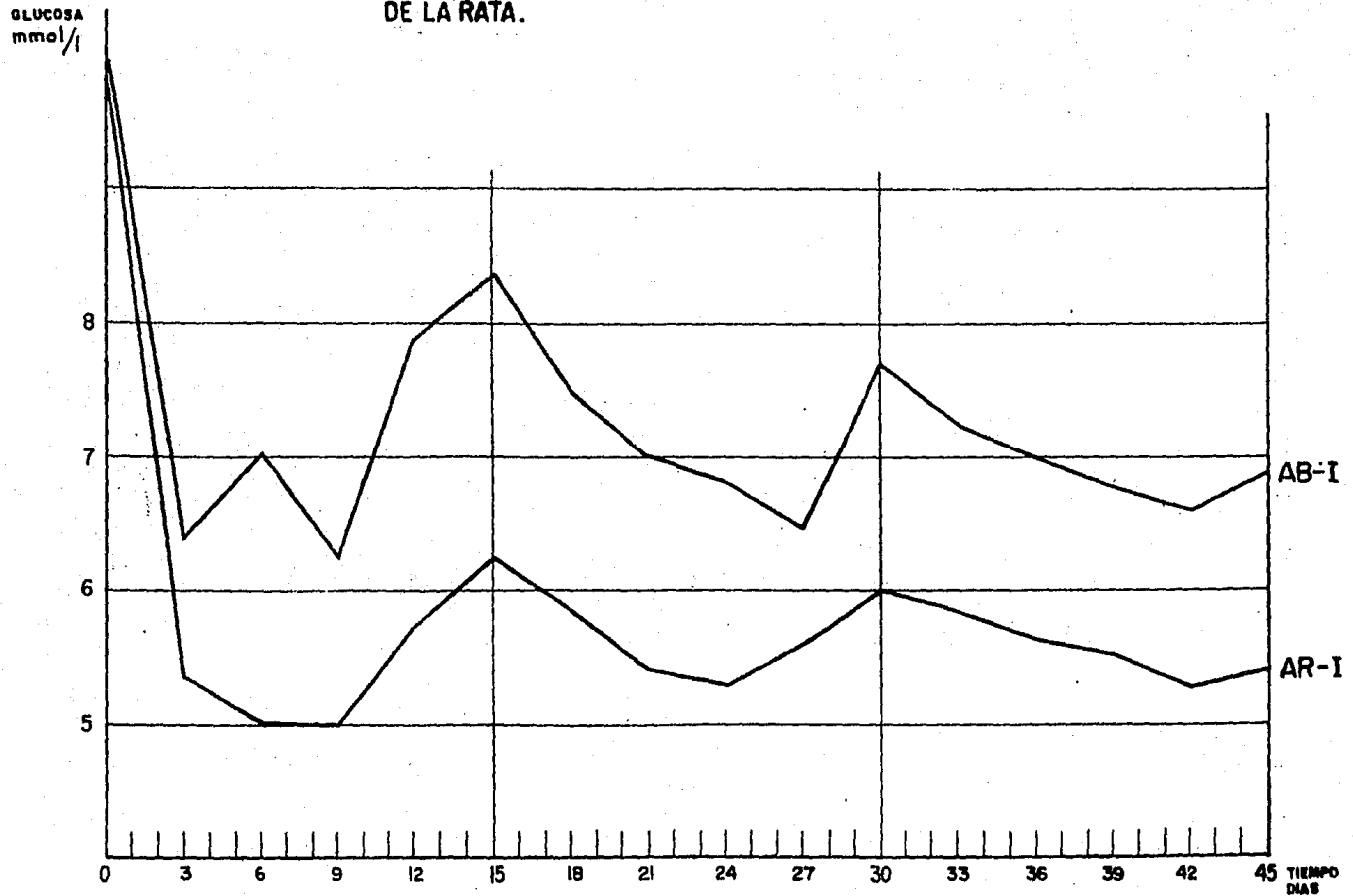
EFFECTO DE LOS IMPLANTES MULTIPLES DE MICROESFERAS DE  
 AB-I Y AR-I SOBRE LAS CONCENTRACIONES DE GLUCOSA ( mmol/L )

IMPLANTE	MICROESFERAS	DIA POSTIMPLANTE				
		3	6	9	12	15
1 <sup>º</sup>	AB-I	6.32	7.09	6.21	7.90	8.30
	AR-I	5.33	5.06	5.00	5.70	6.20
2 <sup>º</sup>	AB-I	7.40	7.00	6.80	6.40	7.60
	AR-I	5.80	5.40	5.30	5.60	6.00
3 <sup>º</sup>	AB-I	7.20	7.00	6.80	6.50	6.90
	AR-I	5.90	5.70	5.60	5.40	5.50

- Para evaluar los valores normales de glucosa en el suero de la  
 rata, se tomó muestra de sangre a 100 ratas obteniendo el si-  
 guiente resultado: 6.2 - 7.28 mmol/L de glucosa.

FIGURA 9

EFFECTO DE LOS IMPLANTES MULTIPLES DE  
MICROESFERAS DE AB-I Y AR-I SOBRE LA  
CONCENTRACION DE GLUCOSA EN EL SUERO  
DE LA RATA.



### 5.3. Insulina en el suero de la rata

Como se observa en la tabla VI, las concentraciones de insulina en el suero de las ratas control fluctúan entre 17 y 21  $\mu\text{U/ml}$  ( día cero ) no habiendo diferencias significativas entre los diferentes grupos.

El décimo día después de administrar la aloxana se observa una disminución en la concentración de insulina (  $P = 0.001$  ) entre 3 y 3.9  $\mu\text{U/ml}$  en todos los grupos.

Al administrar el tratamiento con las microesferas, las concentraciones de insulina aumentaron (  $P = 0.02 - 0.01$  ), en las ratas tratadas con AB-I, AR-I e I hasta concentraciones entre 15 y 19  $\mu\text{U/ml}$ , mientras que en las ratas tratadas con AB-AB y AR-AR, las concentraciones de insulina se mantuvieron bajas al igual que el control diabético ( C D ).

La duración del efecto de las microesferas de AB-I y AR-I decae al vigésimo cuarto día, observando que el grupo tratado con microesferas de AR-I mantiene concentraciones de insulina un poco más altas (  $P = 0.001$  ), que el grupo tratado con microesferas de AB-I.

TABLA VI

EFFECTO DE LA ALOXANA Y DEL IMPLANTE SOBRE LOS NIVELES DE INSULINA SERICA\* EN LA RATA

TRATAMIENTO	n	D I A S					
		0**	10***	16	19	25	31
AB-I	6	18.66 * 3.13	3.21 *0.93	15.85 * 2.38	17.06 * 2.20	11.05 * 1.58	2.64 *0.74
AR-I	6	18.95 * 1.86	2.96 *0.34	16.74 * 1.58	20.19 * 1.58	13.94 * 1.11	2.80 *0.69
I	6	19.50 * 1.45	3.17 *1.05	19.31 * 2.25	20.11 * 2.68	20.27 * 2.00	20.89 *2.74
AB-AB	6	18.40 * 2.74	3.42 *0.77	2.14 * 0.61	2.20 * 0.88	2.12 * 0.30	1.81 *0.82
AR-AR	6	17.45 * 3.71	3.66 *1.27	2.51 * 0.49	2.48 * 0.71	2.11 * 0.70	2.25 *0.48
C D	6	21.05 * 2.62	3.40 *0.82	2.50 * 0.55	2.42 * 0.63	2.66 * 0.48	2.45 *0.56

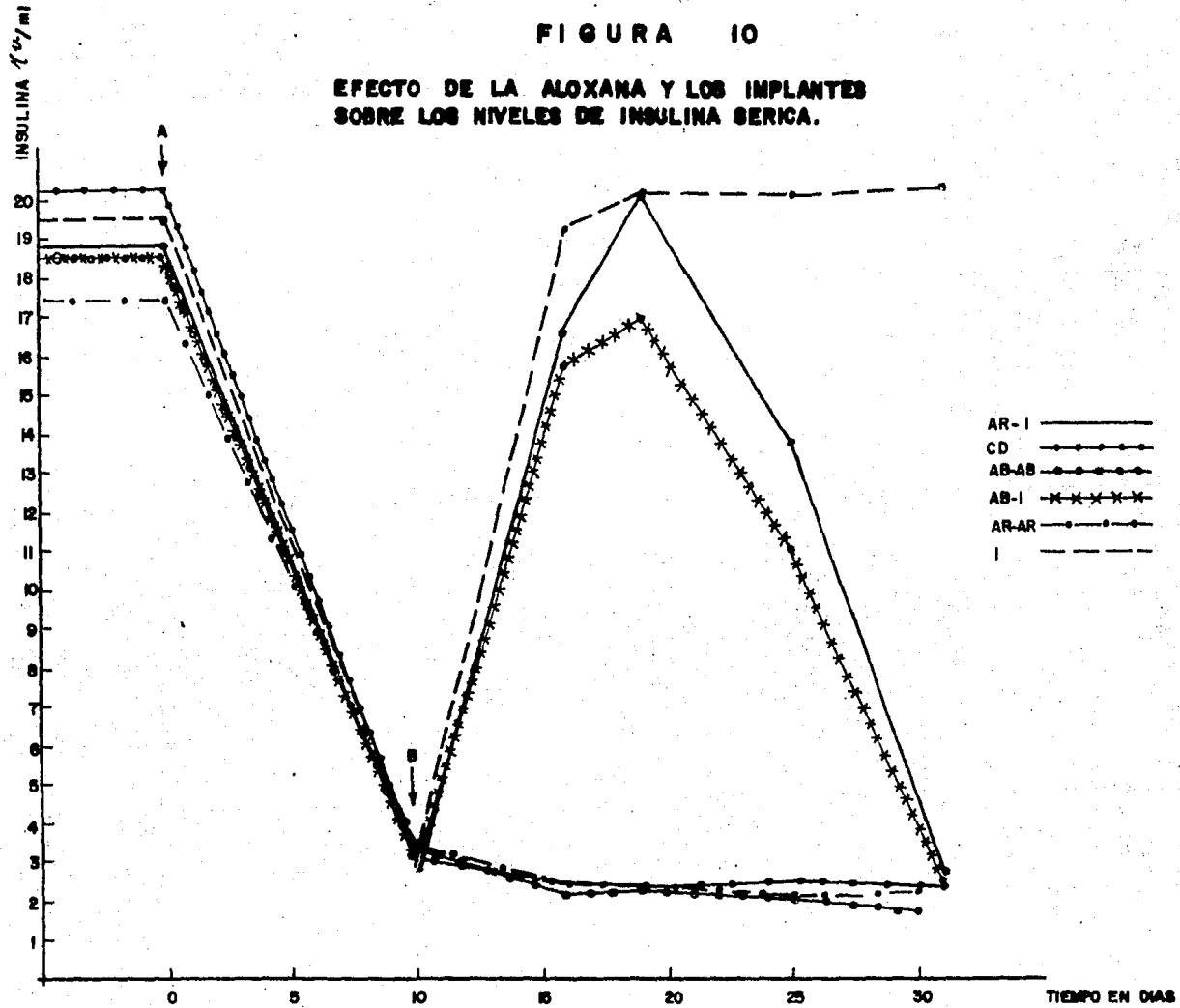
\* Los valores de insulina estan reportados  $\mu\text{U/ml}$ .

\*\* Representa el valor de insulina en el suero obtenido un minuto antes de recibir la inyección de aloxana.

\*\*\* Día del implante.

FIGURA 10

EFFECTO DE LA ALOXANA Y LOS IMPLANTES  
SOBRE LOS NIVELES DE INSULINA SERICA.



La figura 11 muestra las gráficas comparativas del efecto de los diferentes tratamiento sobre las concentraciones de glucosa e insulina en el suero de las ratas. Se observa que las concentraciones de insulina y glucosa se invierten, cuando se administró la aloxana, es decir que las concentraciones de glucosa aumentan bruscamente y la concentraciones de insulina disminuyen de la misma forma, para después mantenerse constantes. Situación que mejora notablemente al administrar la insulina en sus diferentes variantes ya descritas, al décimo día.

En la figura 12 se muestra la gráfica comparativa de los resultados obtenidos con los grupos que recibieron unicamente albúmina o que no recibieron ningún tratamiento. Se muestra que las concentraciones de glucosa e insulina del suero, son directamente proporcionales al daño celular producido al administrar la aloxana por vía intravenosa, existiendo una relación directa entre el incremento en las concentraciones de glucosa y la disminución en las concentraciones de insulina, principalmente a partir del quinto día, que corresponde a la administración de la aloxana.

GRAFICA COMPARATIVA DE LOS NIVELES DE INSULINA Y GLUCOSA SERICA EN LAS RATAS TRATADAS CON INSULINA.

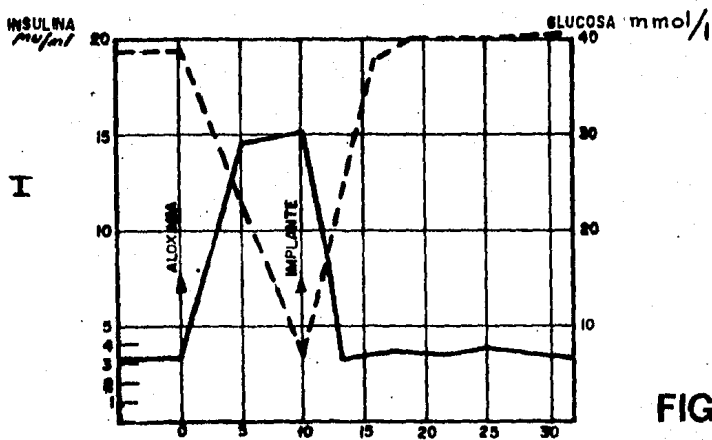
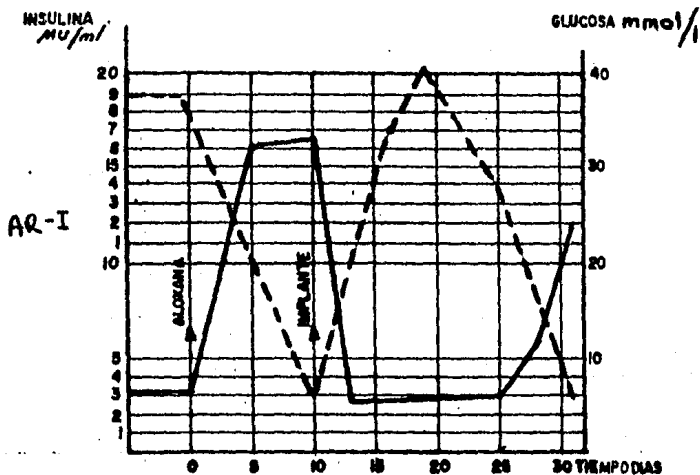
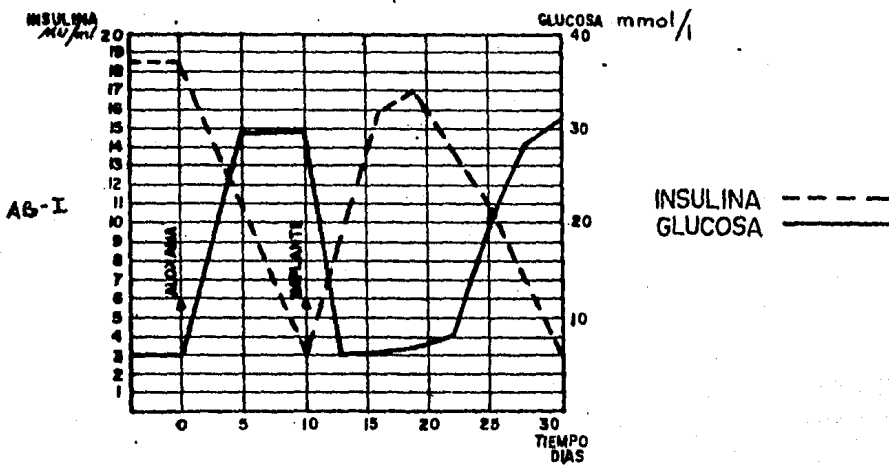


FIGURA 11



GRAFICA COMPARATIVA DE LOS NIVELES DE INSULINA Y GLUCOSA SERICA EN LAS RATAS SIN TRATAMIENTO.

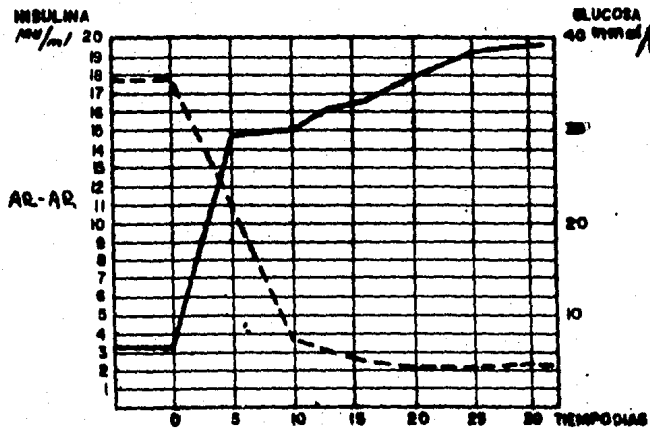
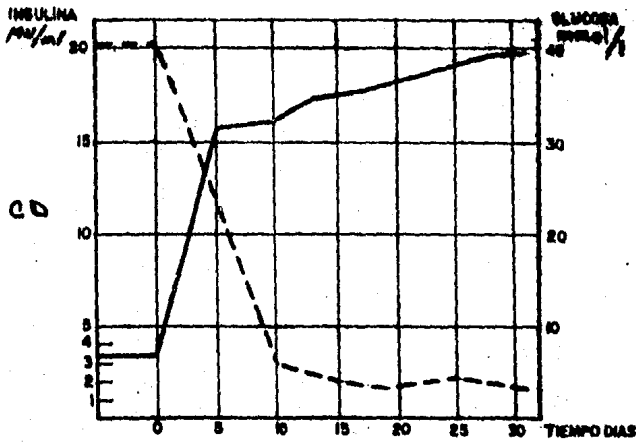
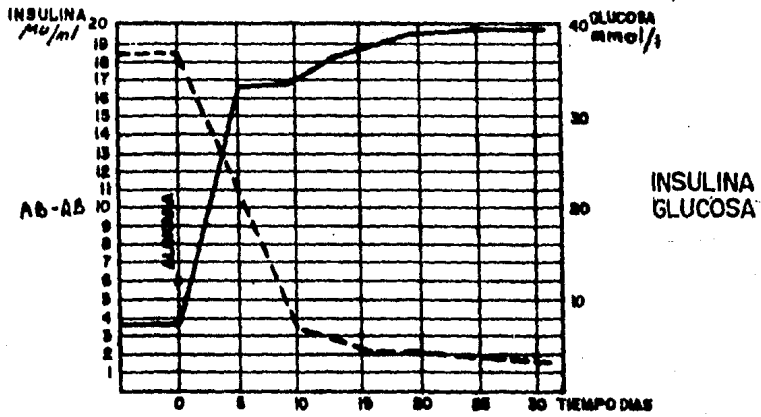


FIGURA 12

### III.6 DETERMINACION DE LOS ANTICUERPOS ANTIALBUMINA

No se presentó reacción evidente de anticuerpos antialbúmina durante los 45 días que duro el tratamiento.

## CAPITULO VI

### DISCUSION Y CONCLUSIONES

#### IV.I. DISCUSION

##### Efecto de la aloxana

Para la inducción de la diabetes, cuando se utilizó una dosis de 75 mg/kg de peso y un ayuno de 48 h como se indica en la literatura ( 64). el 75 % de los animales murieron. Por lo anterior se realizó un estudio de DL-50 para determinar la dosis y la longitud del ayuno. Experimentalmente se encontró en nuestro caso que la dosis óptima debía ser 60 mg/kg de peso y el ayuno de 20 h ( tabla I ). Haciendo resaltar que es necesario tomar en consideración la variabilidad de la respuesta fisiológica para poder inducir diabetes experimental, conservando una sobrevida razonable de los animales.

El contenido de insulina por mg de microesferas fue menor que el encontrado por Goosen y Leung, esto es debido probablemente a pérdida de insulina durante el proceso o a una incorporación insuficiente a las matrices utilizadas. La primer opción parece ser la más viable, puesto que la concentración de insulina en el éter y en la mezcla aceite de maíz- éter de petróleo, utilizados para lavar las microesferas, no excedió de 0.03 U en total.

### Purificación de albúmina de rata

La referencia encontrada específica para la albúmina de rata fue la de Berlinguett ( 52 ), en la cual se adicionó sulfato de amonio hasta alcanzar una concentración final del 64 %. Como se puede observar en los resultados, al utilizar este procedimiento, la albúmina obtenida tenía una pureza de 55.3 %.

Debido a ésto, se decidió modificar la técnica como se explicó en los resultados, logrando con ello una albúmina con un grado de pureza de 94.3 %.

### Implantación de las matrices biodegradables

Se ha informado previamente ( 18, 66 ), que durante el primer mes del tratamiento se forma una cápsula fibrosa alrededor del implante, la cual impide la difusión del contenido de la matriz. En el presente estudio, no se encontró la formación de dicha cápsula durante los 60 días de observación máxima, al menos macroscópicamente.

### El peso

Es un parámetro indicativo del descontrol metabólico de la diabetes. Como se puede observar en los resultados obtenidos durante los primeros 5 días, los animales aumentan de peso esto puede atribuirse a que al empezar el experimento

se colocó un menor número de animales por jaula, por lo que tuvieron un mayor acceso al alimento y al agua. Al administrar la aloxana se presentó un descenso brusco del peso debido a la poliuria no compensada por la polidipsia, ni por la polifagia.

A partir del implante, se observa una estabilización del peso para los grupos AR-I, AB-I e I no así para AB-AB, AR-AR y CD, que se mantuvieron en descenso, situación pre vista.

Fue indudable que las curvas de peso son mejores y existen diferencias significativas en los grupos tratados con microesferas AB-I y AR-I, que las de los tratados con dosis únicas de insulina. Más aún, los animales tratados con microesferas de albúmina homóloga ganaron peso en mayor proporción que los que recibieron microesferas de albúmina heteróloga.

#### Glucosa del suero

Después de la administración de aloxana, se obtuvo un incremento significativo en las concentraciones de glucosa en el suero. Estas disminuyeron al administrar la insulina en cualquiera de las formas descritas, manteniéndose elevadas cuando se utilizaron preparaciones sin insulina.

Al estudiar el efecto de los implantes múltiples sobre las concentraciones de glucosa del suero, se observó que ésta se mantiene en los límites de referencia con una variación no significativa, cuando se administran los implantes cada 15 días, por lo menos durante 45 días.

Concordando con lo ocurrido en la variación del peso, los animales que recibieron microesferas de albúmina homóloga, tuvieron concentraciones de glucosa menores que los de los animales tratados con preparaciones a base de albúmina heteróloga, a partir del décimo segundo día. Es probable que este fenómeno sea debido a que la degradación enzimática de la albúmina bovina sea más rápida que la degradación enzimática de la albúmina homóloga o a que la reacción inmunológica que debe despertar la albúmina heteróloga modifica la velocidad de absorción de la insulina.

#### **Insulina del suero**

Sufrió una disminución brusca después de la administración de la aloxana, permaneciendo constante a lo largo del estudio indicando que la aloxana suprimió la función de las células beta. Situación que mejoró al administrar la insulina en sus diversas formas descritas anteriormente, mientras que los grupos que no recibieron tratamiento al igual que el grupo control diabético, mostraron concentraciones

indetectables de ésta hormona, al tiempo que se deterioraban físicamente y finalmente murieron.

El estudio comparativo del efecto de los diferentes tratamientos sobre las concentraciones de glucosa e insulina del suero, pueden ser comparados con los de otros autores, ( 40 ). El punto más significativo es la utilización de un sistema biodegradable de liberación lenta, que pueda sustituir el tratamiento tradicional. Mediante éste método se logro evitar la inyección diaria de insulina durante 15 días en la rata, los animales presentaron una notable recuperación física y las concentraciones de glucosa e insulina del suero tuvieron pocas variaciones.

Las ventajas de utilizar una matriz homóloga, son:

- Que es capaz de mantener un control sobre la glucemia más prolongado.
- Disminuye la posibilidad de que se presente una reacción inmunológica deleterea contra la matriz.

Sin embargo al utilizar la matriz de albúmina heteróloga no se demostró la presencia de anticuerpos. Por lo tanto se deberá tener en consideración la sensibilidad de la técnica utilizada y el tamaño del inóculo.



#### IV.2. CONCLUSIONES

Al implantar las microesferas de AB-I y AR-I, se presenta una respuesta muy semejante a la obtenida al administrar insulina diariamente por vía subcutánea, por lo tanto este tratamiento es efectivo para controlar la hiperglicemia en ratas diabéticas. Observándose una mayor duración y continuidad del efecto al utilizar una matriz de albúmina homóloga.

La concentración prevalente de la insulina del suero en las ratas tratadas con insulina ligada a matrices de albúmina, es similar a la de las ratas intactas. Lo anterior sugiere que la preparación es eficaz para mantener un control metabólico adecuado de la diabetes.

Durante el tiempo de observación las matrices de albúmina homóloga y heteróloga, no estimularon la producción de anticuerpos específicos en concentraciones detectables por el método empleado.

**A D E N D U M**

## I HISTORIA

El desarrollo de nuestros conocimientos acerca de la diabetes constituye una muestra del progreso científico que ha conducido repetidas veces a notables adelantos médicos. Lo primero fue la descripción clínica de la enfermedad dada por Celso en el año 10 dC. Areteo la describió en forma apropiada y le da el nombre de diabetes en el año 20 dC. La primera demostración de la naturaleza química se atribuye a Súsruta, quien en el siglo V describió " la orina meliflua ", dato confirmado después - por Thomas Willis y Dobson, quienes demostraron en 1679 la presencia de azúcar en la orina. Cowley hace la descripción de alteraciones pancreáticas en los diabéticos en 1788 y Bouchardat empieza a tratar la diabetes con regímenes diversos en 1850. Langerhans en 1869 descubre los islotes pancreáticos y Bernard en 1870 descubre la función glucogénica del hígado en conejos y la hiperglucemia en diabéticos. Años después se describe la acetonemia diabética. Un paso muy importante fue la demostración fisiológica realizada por Von Mering y Minkowsky en 1889, de que la extirpación del páncreas va seguida, en los perros, del desarrollo de un proceso muy semejante a la diabetes humana, con hiperglucemia, glucosuria y acetonuria, y que cuando se les suministra glucosa, hay eliminación por la orina de toda la glucosa que consumen.

Naunyn en 1895, menciona la naturaleza hereditaria de la diabetes, y describe sus diferencias en la diabetes juvenil y la tardía. Después de esto, los estudios realizados en el hombre por Opie en 1900, demostraron cierta correlación entre la degeneración del tejido endócrino del páncreas y la presencia de la diabetes. Los experimentos de Sobolew reforzaron estos estudios, ya que demostraron que la degeneración del tejido exócrino del páncreas no daba lugar a diabetes, De Meyer en 1909, da el nombre de "insulina", a una posible hormona de los islotes, siendo Banting y Best en 1921 los que descubren la insulina en perros y ésto pareció establecer la prueba de que la diabetes sacarina se produce por lesión intrínseca del páncreas. Sin embargo los estudios posteriores hicieron pensar que la enfermedad podía ser más compleja de lo que se creía en los primeros momentos que siguieron al descubrimiento de la insulina, y que la lesión intrínseca del páncreas podría no ser la causa primordial del proceso, tales dudas surgidas de la observación clínica de diversos trastornos endócrinos, recibieron un apoyo impresionante por los experimentos iniciales de Houssay. Este investigador observó que la diabetes grave ocasionada por pancreatectomía en el perro, mejoraba mucho si después se extirpaba la hipófisis. Long y Luckens en 1936, demostraron que se obtenía igual mejoría

si en vez de extirpar la hipófisis se extraían las glándulas suprarrenales en los gatos pancratectomizados.

Pareció por lo tanto que la insulina era esencial sólo para el dominio de la hiperglucemia, glucosuria y acetouria, cuando las glándulas suprarrenales o la hipófisis se hallaban presentes. Young en 1937, estudia la producción de diabetes permanente por inyección de extractos de hipófisis en el perro. Años más tarde Sanger en 1955, establece la estructura de la insulina y Steiner y Chance en 1967, descubren la proinsulina estableciendo su fórmula, siendo Hodking en 1969, quien descubre la estructura tridimensional de la insulina ( 47, 69 ).

## II. DEFINICION

La diabetes es una enfermedad crónica degenerativa, caracterizada por hiperglucemia y glucosuria, debido a una ausencia absoluta o relativa de insulina endógena circulante, lo que ocasiona un metabolismo anormal de los carbohidratos, de las proteínas y de los lípidos.

Los factores que afectan el desarrollo de la enfermedad son: genéticos y probablemente ambientales, y los factores que favorecen la aparición de la diabetes son: la autoinmunidad y la probable acción de un virus ( 67,71,72 ).

### III

### CLASIFICACION

El término diabetes mellitus más que una sola enfermedad describe a un grupo de enfermedades en las que el común denominador es la hiperglucemia, siendo en la mayoría de los casos de causa desconocida, de manera que la clasificación actual de diabetes mellitus se fundamenta en criterios epidemiológicos y fisiopatológicos más que etiológicos, por lo que es posible que surjan modificaciones a medida que se conozca mejor la etiopatogenia de la enfermedad, reconociendo actualmente tres clases clínicas que son:

- 1.- Diabetes mellitus.
- 2.- Intolerancia a los carbohidratos.
- 3.- Diabetes gestacional.

#### 1.- Diabetes mellitus.

Independientemente de su causa el término diabetes mellitus se aplica a los sujetos que tienen hiperglucemia de ayuno o una respuesta anormal a la prueba de tolerancia a la glucosa y se divide en tres subclases:

TIPO I.- Diabetes mellitus<sup>o</sup> dependiente de insulina para su tratamiento.

Se presenta generalmente en personas menores de 20 años, delgados, con tendencia a

desarrollar cetoacidosis diabética, que requieren de aplicación de insulina para su control. Este grupo se clasificaba anteriormente como diabetes juvenil, sin embargo la dependencia de insulina puede presentarse a cualquier edad por lo que se decidió evitar la edad del inicio como criterio diagnóstico. Por definición sólo se incluyen los sujetos que dependen permanentemente de insulina para controlar la hiperglucemia.

TIPO II.- Diabetes mellitus no dependiente de la insulina.

Se presenta en adultos mayores de 40 años, es de inicio insidioso y sólo eventualmente conduce al desarrollo de cetoacidosis diabética. La hiperglucemia se controla con dieta e hipoglucemiantes bucales, es frecuente que haya obesidad. Por definición no necesita insulina exógena para corregir la hiperglucemia, éstos pacientes tienen insulina circulante que puede estar en niveles supranormales.

OTROS TIPOS.- Diabetes mellitus secundaria o asociada a otros síndromes clínicos.

En esta subclase se incluyen los pacientes en quienes la hiperglucemia es secundaria a otras enfermedades como pueden ser la acromegalia, la enfermedad de Cushing, el feocromocitoma, el glucagonoma y la pancreatitis crónica. También influye la hiperglucemia como un efecto secundario de fármacos como pueden ser los antihipertensivos, las tiazidas y los glucocorticoides. La hiperglucemia asociada a otros padecimientos como la acantosis nigricans y las hiperlipidemias, pueden considerarse como secundarias.

## 2.- Intolerancia a los carbohidratos.

Este grupo lo conforman los pacientes que tienen una respuesta a la curva de tolerancia a la glucosa diferente a la " normal ", pero no de la magnitud necesaria para establecer un diagnóstico de diabetes mellitus. Se les ha clasificado como pacientes con intolerancia a los carbohidratos, antes se les clasificaba como prediabéticos pero só



lo el 25 % desarrollan diabetes mellitus por lo que se abandonó esta terminología.

### 3.- Diabetes gestacional.

Este término se refiere a la hiperglucemia que se descubre durante el embarazo y ocurre en el 2 % de todas las embarazadas, generalmente en el segundo y tercer trimestre, siendo de importancia descubrir este tipo de diabetes dada la elevada mortalidad fetal ( 70 ).

## IV DIAGNOSTICO

### Diabetes mellitus

El diagnóstico de la diabetes mellitus se establece en base a los siguientes criterios:

1.- El cuadro clínico, que comprende a todas las manifestaciones clínicas de la hiperglucemia como son la poliuria, la polidipsia, la polifagia y la pérdida de peso ( 70 ).

2.- La glucemia de ayuno que se juzga a partir de las cifras de referencia que son  $\leq 6.4$  mmol/L ( 115 mg/dl ), en hombres y mujeres no embarazadas,  $\leq 7.2$

mmol/L ( 130 mg/dl ), en niños y  $\leq$  5.8 mmol/L ( 105 mg/dl ), en mujeres embarazadas ( 70 ).

- 3.- La prueba de tolerancia a la glucosa que al igual que la glicemia de ayuno se juzga a partir de las cifras de referencia, para lo cual se emplea una dosis de 75 g de glucosa por vía oral y se mide la glucemia a diferentes tiempos, siendo las concentraciones de referencia de los 0 a los 60 min menores de los 11.1 mmol/L ( 200 mg/dl ), y a los 120 min menor de 7.8 mmol/L ( 140 mg/dl ).
- en los niños la dosis de glucosa se calcula a razón de 1.75 g por kg de peso ideal con una dosis máxima de 75 g ( 70 ).

De acuerdo a lo anterior el diagnóstico de diabetes se debe restringir a las siguientes condiciones:

- 1.- Pacientes con manifestaciones clínicas de hiperglucemia y con una glucemia de ayuno  $\leq$  a 11.1 mmol/L ( 200 mg/dl ).

- 2.- Pacientes con dos determinaciones de glucemia en ayuno  $\leq 7.8$  mmol/L ( 140 mg/dl ), en diferentes ocasiones.
- 3.- Pacientes con una respuesta a la prueba de tolerancia a la glucosa en la que se encuentran al menos dos determinaciones de glucosa  $\leq 11.1$  mmol/l. ( 200 mg/dl ), una mayor a los 120 min y otra en cualquier tiempo entre los 0 y 120 min ( 70 ).

#### INTOLERANCIA A LOS CARBOHIDRATOS

Los criterios para el diagnóstico de intolerancia a los carbohidratos son los siguiente:

- a) Glucemia en ayuno menor de 7.8 mmol/L ( 140 mg/dl ), pero mayor a 6.4 mmol/L ( 115 mg/dl ).
- b) La respuesta a la prueba de tolerancia a la glucosa debe mostrar una glucemia entre 7.8 y 11.1 mmol/L ( 140 y 200 mg/dl ), a los 120 min y una cifra mayor de 11.1 mmol/L ( 200 mg/dl ), entre los 0 y 120 min.

- c) En niños la glucemia de ayuno es mayor de 7.8 mmol/L ( 140 mg/dl ) y en la prueba de tolerancia a la glucosa las cifras están entre 7.8 y 11.1 mmol/L ( 140 y 200 mg/dl ), a los 120 min ( 70, 72 ).

#### DIABETES GESTACIONAL

Si la glucemia de ayuno es anormal se hace una prueba de tolerancia a la glucosa utilizando 50 g de glucosa siendo la respuesta normal a los 0 min  $\leq$  5.8 mmol/L ( 105 mg/dl ), y a los 60 min 8.25 mmol/L ( 150 mg/dl ), en el caso que se encuentre anormal es necesario efectuar una prueba de tolerancia a la glucosa utilizando 100 g de glucosa, siendo las concentraciones esperadas a los 0 min 5.8 mmol/L ( 105 mg/dl ), a los 50 min 10.6 mmol/L ( 190 mg/dl ), a los 120 min 9.2 mmol/L ( 165 mg/dl ), y a los 180 min 8.1 mmol/L ( 145 mg/dl ). Si dos concentraciones igualan o superan a cualquiera de las concentraciones anteriores se establece el diagnóstico de diabetes gestacional ( 70, 72 ).

#### V PANCREAS

El páncreas se compone de dos tipos celulares bien definidos: las células de los acinis que producen las enzimas digestivas y las segregan hacia el duodeno y los islotes de Langerhans que segregan diversas hormonas en la corriente sanguínea. Se calcula que en el páncreas puede haber

entre 1 y 2 millones de islotes de aproximadamente 200  $\mu\text{m}$  de diámetro y cuya masa en conjunto, representa un 2 % de la masa total del órgano ( 47, 68, 71, 72 y 75 ).

En cada islote podemos distinguir al menos 4 tipos de células diferentes:

- 1.- Las células alfa, que representan el 20 % de la población celular del islote, las cuales segregan el glucagón.
- 2.- Las células beta, que forman el 75 % de las células del islote, que segregan la insulina.
- 3.- Las células delta, que segregan la somatostatina, que inhibe la secreción tanto de insulina como de glucagón.
- 4.- Las células PP, que segregan la hormona polipeptídica pancreática cuya función todavía no está muy clara.

## VI SINTESIS Y ESTRUCTURA DE LA INSULINA

La insulina se sintetiza y almacena en las células beta de los islotes pancreáticos. Su síntesis se inicia a par

tir del ADN, que se encuentra en el núcleo celular, y que envía su código genético a través del ARNm a los ribosomas. En éstos se forma una cadena larga de 86 aminoácidos, de peso molecular aproximado de 9 000 daltons que se llama proinsulina, la cual tiene muy poca actividad insulínica. Por acción enzimática, probablemente la tripsina, la cadena peptídica de proinsulina da origen a dos cadenas, una de 6 000 daltons ( insulina ) y otra de 3 000 daltons (peptido C ).

El proceso de conversión se realiza en el aparato de Golgi, en donde la insulina queda almacenada en forma de gránulos. Los sacos o vesículas que contienen los gránulos emigran hacia la membrana celular por los microtubulos y al llegar a ésta, mediante un fenómeno llamado emiocitosis son liberados. Estos gránulos viajan por el espacio extracelular y llegan a los capilares para entrar a la circulación general.

La insulina es una hormona de tipo proteico con un peso molecular de 6 000 daltons formada por 51 aminoácidos ordenados en dos cadenas denominadas cadena A constituida por 21 aminoácidos, y cadena B formada por 30 aminoácidos unidas por puentes disulfuro. La insulina puede existir como monómero, como dímero o como hexámero formado por tres de

tales dímeros, Dos moléculas de zinc se coordinan en el hexámero, que probablemente sea la forma almacenada en el gránulo de la célula beta. Se cree que la forma biológicamente activa de la hormona es el monómero ( 68,72, 73, 74, 76 )

## VII ACCION DE LA INSULINA SOBRE EL METABOLISMO

La insulina tiene diversas acciones que modifican la función de la mayoría de los tejidos orgánicos. Su actividad depende de la cantidad de la hormona, del tipo de tejido y la cantidad de nutrientes circulantes. Los tejidos y nutrientes que más relación tienen con la insulina son: el hígado, el músculo y el tejido adiposo, así como los carbohidratos, lípidos y proteínas. La acción general de la insulina sobre los carbohidratos en el tejido muscular es aumentar la captación celular de glucosa, el transporte a través de la membrana, la fosforilación y la incorporación de la glucosa a glucógeno por la actividad de la glucógeno sintetasa. En el hígado acelera la síntesis de glucógeno por acción de la glucógeno sintetasa suprime la gluconeogénesis. En el tejido adiposo aumenta la captación celular de glucosa e incorpora la captación celular de glucosa e incorpora la glucosa a ácidos grasos y triglicéridos, favoreciendo la lipogénesis. Sobre los lípidos, en el tejido adiposo favorece

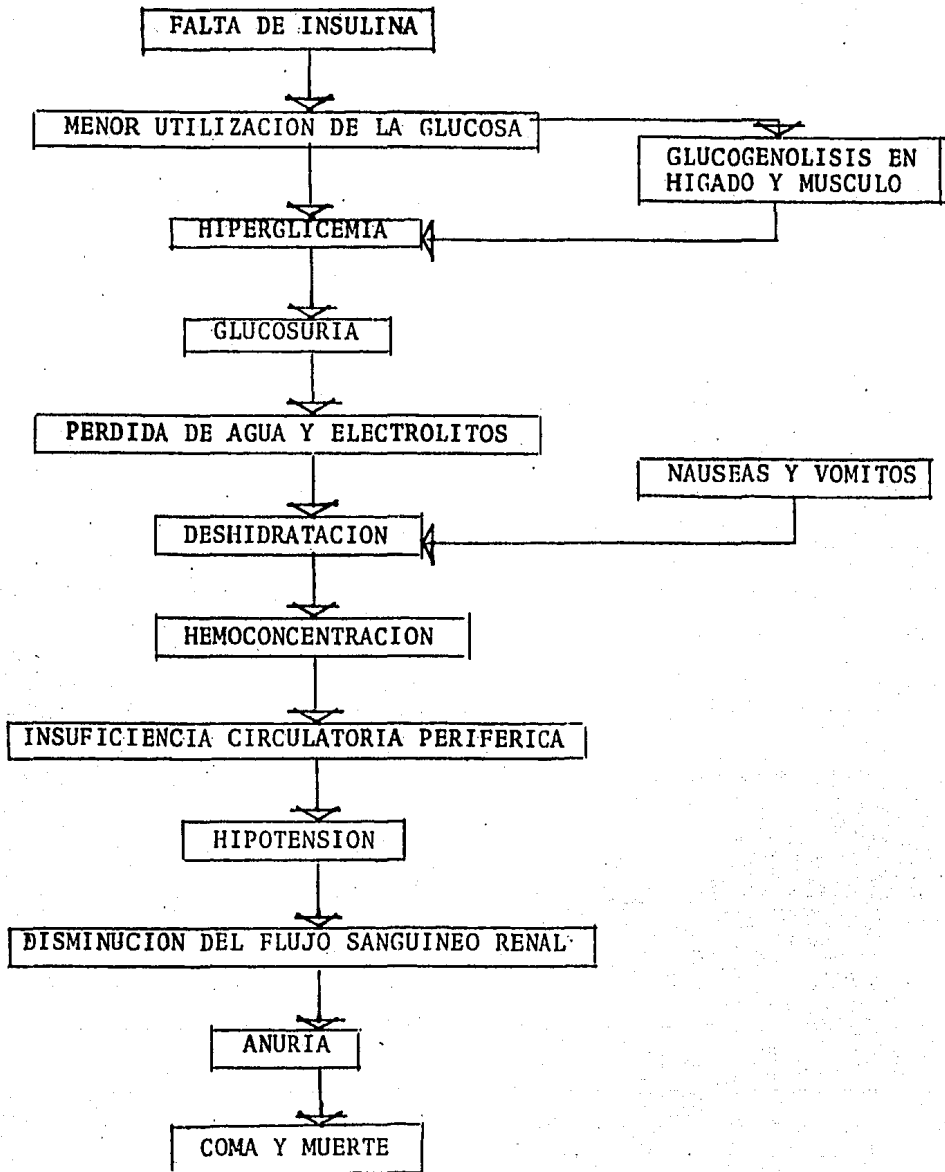
la síntesis y conversión de glucosa a triglicéridos, aumenta la captación de acetato y ácidos grasos por lo que inhibe la liberación de los mismos, suprime el catabolismo de los lípidos, proteínas y carbohidratos, regula la producción de cuerpos cetónicos. Sobre las proteínas en el hígado y en el tejido adiposo aumenta la captación de aminoácidos, el transporte a través de la membrana celular y la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos ( 76, 77, 78, 80, 81, 82 ).

Otro efecto de la insulina es estimular la formación de ATP, ADN yARN<sub>m</sub> ( 79, 81 ).

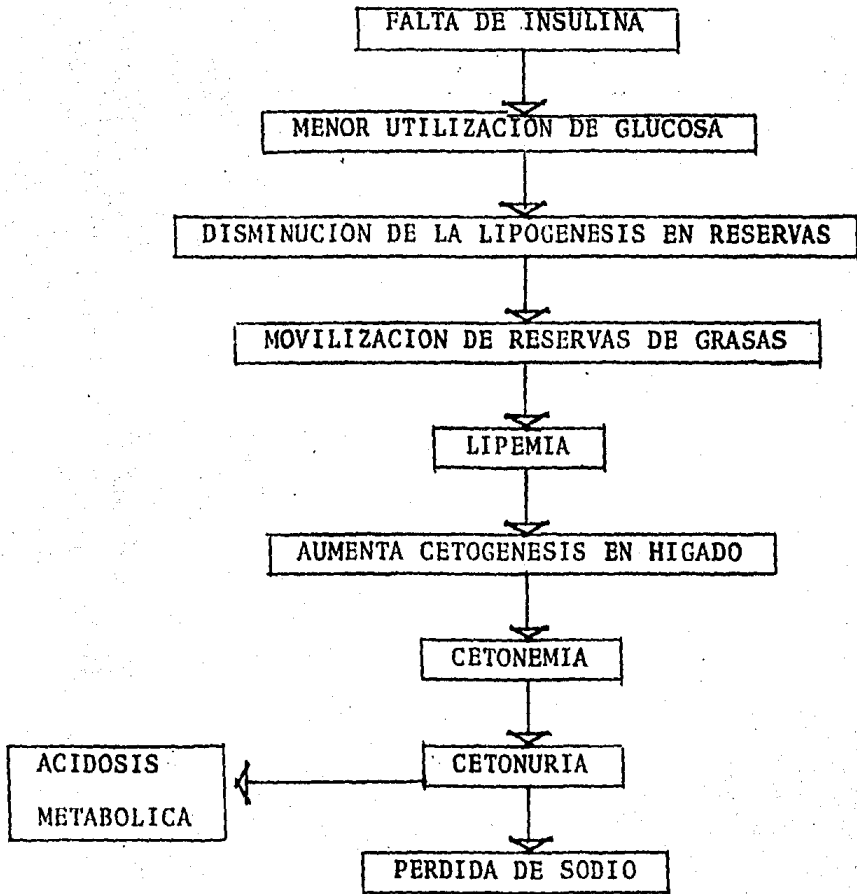
Cuando la insulina llega a faltar ( 68 ), ya sea por hipofunción de las células beta, por acción de alguna hormona antagonista, por bloqueo de los receptores celulares o por acción de anticuerpos específicos, entonces se va alterar todo el metabolismo intermediario como se puede observar en los siguientes cuadros:



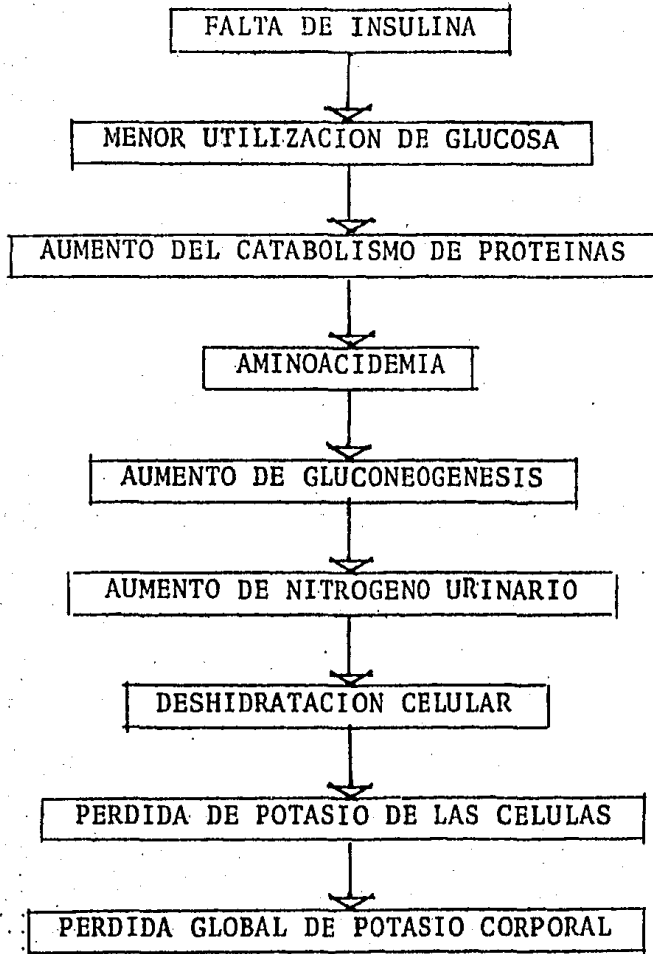
## METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS



## METABOLISMO DE GRASAS



## METABOLISMO DE PROTEINAS



## VIII

### MECANISMO DE ACCION DE LA INSULINA

El mecanismo de acción de la insulina, se ha explicado mediante su unión a un receptor específico, de carácter proteico, que se encuentra en la membrana celular y que modifica la permeabilidad y transporte de compuestos específicos. Este receptor es una glucoproteína asimétrica de peso molecular de 300 000 daltons, que se ha encontrado en la membrana celular de adipocitos, leucocitos, eritrocitos, fibroblastos y hepatocitos (76, 77 ).

Cuando la insulina se une a sus receptores en la membrana celular desencadena una cascada de eventos, que son los siguientes: se inhibe la adenilato ciclasa, estimulando la actividad de la fosfodiesterasa que produce un descenso en los niveles de 3' - 5' adenosina monofosfato ( AMPc ), éste disminuye la actividad de la proteína cinasa, produciendo ésta a su vez cambios en otras enzimas, como por ejemplo: inhibe a las fosforilasas y entonces se activa la glucógeno sintetasa, cuyo efecto es favorecer la síntesis de glucógeno, por lo que se inhibe la gluconeogénesis. Además, al disminuir la actividad de la proteína cinasa, disminuye también la actividad de algunas lipasas y por lo tanto disminuye la lipólisis y la cetogénesis, favoreciendo la lipogénesis. Otros eventos desencadenados por la unión -

de la insulina a su receptor son: estimular la síntesis de protefnas por un aumento en la captación de aminoácidos y permitir la entrada de iones potasio, aminoácidos y glucosa al interior de la célula. ( 76, 77, 82 ).

## IX

### TRATAMIENTO FARMACOLOGICO DE LA DIABETES

El tratamiento farmacológico cuenta con dos alternativas que son: los hipoglucemiantes orales y la insulina. De la población total de diabéticos, solamente una minoría ( 15 % ), requieren de insulina para su tratamiento. En éste grupo se incluyen: los diabéticos del tipo I, diabéticos del tipo II durante periodos de estres, cuando presentan alergias a las sulfonilureas y las diabéticas embarazadas ( 72, 73 ).

Las preparaciones de insulina que más se utilizan son la insulina de acción intermedia NPH y la insulina de acción rápida, siendo las insulinas disponibles en el país las siguientes:

TIPO	ASPECTO	ACCION.	DURACION DEL EFECTO ( h )	EFECTO MAXIMO (h)	AMORTIGUADOR	PROTEINA TIPO
Simple	Claro	Rápida	5 - 7	4	No tiene	No tiene
NPH	Turbio	Intermedia	24 - 28	14	Fosfato	Protamina
Protamina Zinc	Turbio	Prolongada	36	19	Fosfato	Protamina
Lenta	Turbio	Intermedia	24 - 28	14	Acetato	No tiene

La complicación más común del uso de insulina es la hipoglucemia que puede ser ocasionada por una sobredosis debida a la falta de alimento, exceso de ejercicio y errores en la técnica de aplicación, también puede presentarse el fenómeno de Somogyi, que consiste en que los pacientes no se controlan a pesar de recibir dosis progresivas de insulina, aumentando de peso y presentando glucemias variables, existen algunos pacientes que al recibir tratamiento con insulina presentan alergias y resistencia a la misma, causado por la presencia de anticuerpos anti-insulina o por anomalías en los receptores. ( 72, 73 ).

En los diabéticos del tipo II, generalmente se controlan con dieta y ejercicio, pero cuando no se consigue controlar de esta manera, se pueden utilizar los hipoglucemiantes orales, que sólo son adyuvantes y no sustituyen la dieta ni el ejercicio. Los agentes hipoglu-

cemiantes disponibles son las sulfonilureas y las biguanidas ( 72, 73, 83, 84 ).

La acción de las sulfonilureas es la de estimular a las células beta, cuando la degranulación de las mismas baja la captación de insulina endógena, aumenta la lipogénesis, el número de receptores y disminuye la producción hepática de glucosa.

El mecanismo de acción de las biguanidas difiere del de las sulfonilureas por su modo de lograr la hipoglucemia ya que no actúa estimulando la secreción de insulina, por lo que no produce fácilmente hipoglucemia en individuos normales. Las biguanidas en dosis relativamente elevadas van a aumentar la utilización de glucosa incrementando la glucólisis anaerobia, disminuyen la gluconeogénesis e inhiben la absorción intestinal de glucosa y probablemente de algunas otras sustancias como la vitamina B<sub>12</sub> ( 72, 73, 83, 84 ).

Los hipoglucemiantes orales pueden producir como efectos colaterales leucopenia, trombocitopenia, anemia hemolítica, erupciones, púrpura, prurito, náusea, vómito, colestasis hepática, efecto antitiroideo, edema e hiponatremia.

## B I B L I O G R A F I A

- 1.- Korenchevsky, V., Dennison, M. and Schalit, R.: The response of castrated male rats to the injection of testicular hormone. *Biochem. J.* 1932; 26: 1306 - 1314.
- 2.- Korenchevsky, V., Dennison, M. and Kohn-Speyer, A.: The effect of testicular hormone on normal sexually mature rats a method of biological assay. *Biochem. J.* 1933; 27: 1506-1512.
- 3.- Parkes, A.J. Increasing the effectiveness of testosterone. *Lancet* 1936; 23 ( II ): 674 - 676.
- 4.- Korenchevsky, V., Dennison, M. and Edrige, M.: The prolonged treatment of castrated and ovariectomized rats with testosterone propionate. *Biochem. J.* 1937; 31: 475 - 485.
- 5.- Parkes, A.S.: Relative duration of action of various esters of oestrone, oestradiol and oestriol. *Biochem. J.* 1937; 31: 579 - 585.
- 6.- Deanesly, R., Parkes, A.S.: Note on the subcutaneous absorption of oils by rats and mice with special reference to the assay of oestrin. *J. Physiol.* 1933; 78: 155 - 160.
- 7.- Deanesly, and Parkes, A.S.: Factor influencing the effectiveness of administered hormones. *Proc. Royal Soc. B.* 1938; 124: 279 - 298.



- 8.- Parkes, A.S. and Young, F.F.; The influence of the subcutaneous implantation of tablets of solid insulin on the blood sugar level of the rabbit. *Endocrinol.* 1939; 1: 108 - 117.
- 9.- Mark, J. and Biskind, G.R.: The effect of long term stimulation of male and female rats with estrone, estradiol benzoate and testosterone propionate administered in pellet form. *Endocrinol.* 1941; 28: 465 - 477.
- 10.- Emmens, C.W.: Rate of absorption of androgens and estrogens in free and esterified form subcutaneously implanted tablets. *Endocrinol.* 1941; 28: 633 - 642.
- 11.- Shimkin, M.B. and White, J.: Absorption rate of hormone cholesterol pellet. *Endocrinol.* 1941; 29: 1020 - 1025.
- 12.- Biskind, G.R. and Meyer, M.A.: The comparative androgenic potency of testosterone, methyl testosterone and testosterone propionate administered in pellet form. *Endocrinol.* 1941; 29: 217 - 221.
- 13.- Forbes, T.R.: Factor of age in the rate of absorption of, and in mammary stimulation by, testosterone monopropionate pellets in rats. *Endocrinol.* 1942; 30: 765 - 766.
- 14.- Forbes, T.R.: Further observations on the relative absorption rates of pellets of various crystalline compounds implanted subcutaneously in rats. *Endocrinol.* 1942; 30: 761 - 764.

- 15.- Deanesly, R. and Parkes, A.S.; Deposition of protein material in implanted pellets of steroid hormones, Lancet. - 1943; I: 500 - 502.
- 16.- Bishop, P.M.F. and Folley, S.J.: Implantation of testosterone in cast pellets. Lancet, 1944; I: 434.
- 17.- Shimkin, M.B., Lorenz, E., Wyman, R. and Norton, S.G.: Absorption of subcutaneously implanted hormone pellets. Endocrinol. 1944; 35: 283 - 295.
- 18.- Folley, S.J.: Studies on the absorption of subcutaneously implanted tablets of hexoestrol. Proc. Roy. Soc. Ser B. 1945; 132: 142 - 163.
- 19.- Folkman, J. and Edmunds, L.H.: Endocrine pacemaker for complete heart block. Circ. Res. 1942; 10: 632 - 641.
- 20.- Folkman, J. and Long, D.M. Jr.: Drug pacemakers in the Treatment of heart block. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1964; 3: 857 - 868.
- 21.- Folkman, J. and Long, D.M.: The use of silicone rubber as a carrier for prolonged drug therapy. J. Surg. Res. 1964; 4: 139 - 142.
- 22.- Bass, P. Purdon, R.A. and Wiley, J. N.: Prolonged administration of atropine or histamine in a silicone-rubber implant. Nature 1965; 208: 591 - 592.
- 23.- Folkman, J., Long, D.M. Jr. and Rossenbaum, R.: Silicone rubber: A new diffusion property useful for general anesthesia. Science 1966; 154: 148 - 149.

- 24.- Dziuk, P.J. and Cook, B.: Passage of steroids through silicone rubber. *Endocrinol.* 1966; 78: 208 - 211.
- 25.- Folkman, J. and Mark, V.H.: Diffusion of anesthetics and other drugs through silicone rubber: Therapeutic implications. *Trans. N.Y. Acad. Sci.* 1968; 30: 1187 - 1195.
- 26.- Tatum, H.J., Coutinho, E.M., Filho, S.A.: Acceptability of long-term contraceptive steroids administration in humans by subcutaneous silastic capsules. *Amer. J. Obst. Gynecol.* 1969; 105: 1139 - 1143.
- 27.- Davis, B.K. and Chang, M.C.: Control of hamsters fertility with prostaglandin, F<sub>2</sub> alfa implants. *Acta Endocrinol.* 1972; 70: 97 - 103.
- 28.- Davis, B.K., Noske, I. and Chang, M.C.: Reproductive performance of hamsters with polyacrylamide implants containing ethinylestradiol. *Acta Endocrinol.* 1971; 70: 385 - 395.
- 29.- Davis, B.K.: Control of diabetes with polyacrylamide implants containing insulin. *Experientia* 1972; 28: 348.
- 30.- Davis, B.K.: Suppression of fertility in female hamster with polyvinylpyrrolidone-silicone rubber ( P S R ) implants containing prostaglandin F<sub>2</sub> alfa. *Prostaglandins* - 1974; 7: 393 - 399.
- 31.- Davis, B.K.: Diffusion in polymer gel implants. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 1974; 71: 3120 - 3123.

- 32.- Langer, R. and Folkman, J.: Polymers for the sustained released of proteins and other macromolecules. Nature 1976; 263: 797 - 799.
- 33.- Creque, H.M., Langer, R. and Folkman, J.: One month of sustained release of insulin from a polymer implants. Diabetes 1980; 29: 37 - 39.
- 34.- Tze, W.S., Wong, F.C., Chen, L.M. and O'Young, S.: Implantable artificial endocrine pancreas unit used to restore normoglycaemia in the diabetic rat. Nature 1976; 264: 466 - 467.
- 35.- Sun, A.M., Parisius, W. Healy, G.M., Vacek, I. and Macmorine, H.G.: The use, in diabetic rats and monkeys, of artificial capillary units containing cultured islets of Langerhans ( artificial endocrine pancreas ) Diabetes 1977; 26: 1136 - 1139.
- 36.- Gresser, Wise, Beck and Howes.: Long term controlled delivery of levonorgestrol in rats. Using small biodegradable cylinders. Contraception 1978; 17: 253 - 257.
- 37.- Beck, L.R., Cowsar, D.R., Lewis, D.H., Cosgrove, R.S., Riddle, C.T., Lowry, S.L. and Epperly, T.: A new long-acting injectable microcapsule system for the administration of progesterone. Fertil. Steril. 1979; 31: 545 - 551.
- 38.- Lee, T.K., Sokolosky, T.D. and Royer, G.P.: Serum albumin bead: an injectable, biodegradable system for the sustained release of drugs. Science 1981; 213: 233 - 235.

- 39.- Goosen, M.F.A., Leung, Y.F., Chous, S. and Sun, A.M.: Insulin-albumin microbeads: An implantable, biodegradable system. *Biomat - Med. Dev. Art. Org.* 1982; 10: 205 - 218.
- 40.- Goosen, M.F.A., Leung, Y.F., O'Shea, G.M., Chous, S. and Sun, A.M.: Long-acting insulin. Slow release of insulin from a biodegradable matrix: Implanted in diabetic rats. *Diabetes* 1983; 32: 478 - 481.
- 41.- Leung, Y.F., O'Shea, G.M., Goosen, M.F.A. and Sun, A.M.: Microencapsulation of crystalline insulin or islets of Langerhans: An insulin diffusion study. *Artificial Organs.* 1983; 712: 208 - 212.
- 42.- Dunn, J. S. and Mc Letchie, N.G.B.: Experimental alloxan diabetes in the rat. *Lancet* 1943; 25: 384 - 387.
- 43.- Dunn, J. S., Mc Letchie, N.G.B. and Sheenan, H.L.: Necrosis of islets of Langerhans produced experimentally. *Lancet* 1943; 17: 484 - 487.
- 44.- Hughes, H., Ware, N.L. and Young, F.G.: Diabetogenic action of alloxan. *Lancet* 1944; 29: 148 - 149.
- 45.- Lazarow, A., et al.: The production and course of alloxan diabetes in rat. *J. Lab. Clin. Med.* 1946; 31: 1004 - 1015.
- 46.- Lukens, F.D.: Alloxan Diabetes. *Physiol. Rev.* 1948; 28: 304 - 330.
- 47.- Volk, B.W. and Wellman, K.F.: The diabetic pancreas. N.Y., Edit. Plenum Press, 1977; pp. 425 - 445.

- 48.- Steyn - Parve, E.P. and Vanden Hout, A.J.: On the variability of the salting out curves of proteins of normal human plasma and serum. *Biochim.Biophys.Acta.* 1953; 10: 320-325.
- 49.- Garvey, Cremer, Sussdorf.: *Methods in immunology.* Massachusetts, W.A., Ed. Benjamin Inc. 1977; pp 283 - 285.
- 50.- Sober, H. Jr., Carrol, W.P., Peterson, E.A. and Putnam, F.: *The proteins composition, estructure and function Vol. III.* N.Y., Ed. Academic Press, 1965; pp 2 - 91, 154 - 254.
- 51.- Young, E.G.: *Comprehensive Biochemistry VII.* N.Y., American Elsevier Publishing. Co. Inc. 1963; pp 17-18.
- 52.- Berlinguett, D. and Loijelle, J.M.: Antigenic property and electrophoretic behaviour of the serum albumin of rats bearing the Walker tumor. *Canad. J. Biochem.* 1959; 37: 1401 - 1404.
- 53.- Rawn, D., *Biochemistry* N.Y., Ed. Harper and Row Publishers, 1983; pp 179 - 181.
- 54.- Tipton, G.: *Helena electrophoresis manual,* 1975, pp 1 - 21.
- 55.- Rose, N.R. and Friedman, H.: *Manual of clinical immunology.* Washington. D.F. Ed. American Society for microbiology 1980; pp. 124 - 127.
- 56.- Grabar, P. and Burtin, P.: *Immuno-electrophoretic analysis, applications to human biological fluids.* N.Y. Ed. Elsevier Publishing Company, 1964; pp 3 - 58.

- 57.- Acosta, M.: Manual de prácticas de Inmunología general. Fac. de Química, UNAM, 1983.
- 58.- Werner, W. Ray, H.G.: Über die Eigenschaften eines neuen chromogens für die blutzucker bestimmung nach der GOD/POD Method. Z. Anal Chem. 1970; 23: 224 - 228.
- 59.- Herbert, V., Lau, Kam - Seng, Gottlieb, Ch. W.: Coated char coal immunoassay of insulin. J. Clin. Endocrinol. 1965; 25: 1375 - 1384.
- 60.- Schlichtkrull, J., Brange, J.: Clinical aspects of insulin antigenicity. Diabetes 1972; 21 suppl 2: 649 - 656.
- 61.- Rost, M. A., and Ronald, E.: Immunogenicity of insulin. Diabetes 1972; 21 suppl 2: 657 - 660.
- 62.- Chase, G.D.: Some concepts of RIA theory data reduction and quality control. Ligand quart. 1979; 2: 25- 33.
- 63.- Shipley, E.G. and Rannefeld, A.N.: Glucose tolerance in rats following repeated small doses of alloxan. Endocrinol. 1945; 37: 313 - 321.
- 64.- Steiner, D.F., Randa, V. and Williams, R.H.: Severe ketoacidosis in the alloxan diabetic rat. Endocrinol. 1961; 68: 809 - 817.
- 65.- Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos. 4ª Ed., 1974; S.S.A. pp. 199 - 200.

- 66.- Anderson, J.M., Niven, H.: The role of the fibrous capsule in the function of implanted drug-polymer sustained release systems. J. Biol. Mat. Res. 1981; 15: 889 - 902.
- 67.- Pérez Pasten E., Barrón Uribe N., Villalpando Hernández S. Manual del Diabético Juvenil, México 1979.
- 68.- Tepperman, J. Fisiología Metabólica y Endocrina. México, D.F. Interamericana. 1975, pp. 172 - 202.
- 69.- Cecil R. and Loeb R. F. Tratado de Medicina Interna. I, México, D.F., Interamericana. 1962, pp. 579 - 580.
- 70.- National diabetes data group. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose tolerance. Diabetes 1979; 38: 1039 - 1057.
- 71.- Notkins, A.L. Causas de la Diabetes. Investigación y Ciencia 1980; Enero: 16 - 28.
- 72.- Kozak, Clinical Diabetes Mellitus. México, D.F., W.B. Saunders Co. 1982, pp. 146 - 154.
- 73.- Goodman y Guillman. Bases Farmacológicas de la Terapéutica. México, D.F. 1975. pp. 1221 - 1225.
- 74.- Guyton. Tratado de Fisiología Médica. México, D.F. 1976. Interamericana pp. 826 - 830.
- 75.- Harper and Rodwell. Manual de Química Fisiológica. México, D.F. 1980. Manual Moderno pp. 376 - 380.



- 76.- Lawrence, A. F.: The endocrine function of the pancreas. *Ann. Rev. Physiol.* 1969; 31: 353 - 382.
- 77.- Pitkiss, S.J. and Park, C.R.: Mechanism of action of insulin. *Ann. Rev. Pharmacol.* 1974; 14: 367 - 388.
- 78.- Cuatrecasas. Insulin receptor of liver and fat cell membranes. *Fed. Proc.* 1973; 32: 1838 - 1846.
- 79.- Morgan, H.E. and Jefferson, L.S.: Regulation of protein synthesis in heart muscle. II Effect of aminoacid levels and insulin on ribosomal aggregation. *J. Biol. Chem.* 1971; 246: 2163 - 2170.
- 80.- Friedmann, B., Goodman, E.H., Weinhouse, S.: Effects of insulin and fatty acids on gluconeogenesis in the rat. *J. Biol. Chem.* 1967; 242: 3620 - 3627.
- 81.- Jefferson, J.S., Exton, J.H. and Butcher, R.W.: Role of adenosine 3', 5' - monophosphate in the effects of insulin and anti-insulin serum on liver metabolism. *J. Biol. Chem.* 1968; 243: 1031 - 1038.
- 82.- Desbuquois, B. and Cuatrecasas, P.: Insulin receptors. *Ann. Rev. Med.* 1973; 24: 233 - 240.
- 83.- Brown, J.D., Steele, A.A. and Stone, D.B.: The effect of Tolbutamide on lipolysis and cyclic AMP concentration in white fat cells. *Endocrinology* 1972; 90: 47 - 51.
- 84.- Brooker, G. and Fichman, M.: Chlorpropamide and tolbutamide inhibition of adenosine 3' 5' cyclic monophosphate phosphodiesterase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1971; 42: 824 - 828.