



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

Biocompatibilidad de matrices monolíticas de silicio  
obtenidas por el método Sol-Gel que contienen  
glibenclamida como principio activo

**T E S I S**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA**

P R E S E N T A

**Mayra Yadira Macario Pérez**

DIRECTOR DE TESIS

**Dra. Elizabeth Guadalupe Sánchez González**

ASESOR DE TESIS

**Dr. Vicente Jesús Hernández Abad**



CIUDAD DE MÉXICO

2017



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.

## *AGRADECIMIENTO*

*El desarrollo de esta tesis fue financiado con recursos del proyecto PAPIIT IT200815 “Diseño de matrices híbridas de liberación modificada preparadas mediante el proceso sol-gel, con actividad hipoglucemiante, aplicables en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2”, por lo que se agradece el apoyo de la Universidad Nacional Autónoma de México, a través de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico.*

## *AGRADECIMIENTO*

*Se agradece al Dr. Rubén Marroquín Segura y al Dr. José Luis Alfredo Mora Guevara por su atención, amabilidad y tiempo dedicado en los experimentos para el logro de este proyecto.*

## DEDICATORIA

*Agradezco a Dios por estar en todo momento de mi vida y darme la oportunidad de cumplir la primera de muchas metas.*

*A la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por abrirme las puertas para forjarme profesionalmente.*

*A mi familia por apoyarme y darme palabras de aliento cuando más lo necesitaba, por permanecer a mi lado en cada momento, por todo el amor y confianza que me han brindado.*

*A la Dra. Elizabeth, al Dr. Vicente y a la maestra Cynthia por darme la oportunidad de permanecer en su grupo de trabajo y confiar en mí. Son personas con grandes conocimientos y con una gran calidez humana, a las cuales admiro mucho.*

*Al Dr. Rubén Marroquín y al Dr. José Luis Mora por la paciencia y dedicación que me brindaron, por los días de trabajo tan agradables.*

*A mis sinodales por dedicar un poco de su tiempo en la revisión y aportación de este trabajo.*

*A las personas que sin ser parte de mi familia me brindaron de manera incondicional su apoyo y me motivaron a no rendirme nunca, a levantarme en cada caída y luchar por mis sueños.*

*A mis profesores y amigos que fueron parte esencial durante mi trayectoria académica.*

*Gracias a Dios y a la vida por dejarme conocer a cada uno de ellos.*

## TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	2
2.1. Proceso Sol-Gel.....	2
2.1.1. Aplicaciones.....	3
2.2. Biocompatibilidad y toxicidad de las matrices Sol-Gel .....	4
2.2.1. Biocompatibilidad de las matrices.....	4
2.2.2. Estudios de biocompatibilidad .....	5
2.3. Animales de experimentación en las pruebas de inocuidad y biocompatibilidad .....	6
2.4. Aspectos fisiológicos a considerar en estudios de biocompatibilidad .....	7
2.4.1. Función renal .....	7
2.4.1.1. Examen General de Orina .....	8
2.4.1.2. Creatinina .....	8
2.4.1.3. Urea.....	8
2.4.1.4. Nitrógeno Ureico en Sangre (BUN) .....	10
2.4.2. Función hepática.....	10
2.4.2.1. Transaminasas .....	11
2.4.2.2. Aspartato aminotransferasa (AST) .....	12
2.4.2.3. Alanino aminotransferasa (ALT) .....	12
2.4.2.4. Lactato Deshidrogenasa (LDH) .....	12
2.4.2.5. Proteínas séricas .....	13
2.4.2.5.1. Electroforesis en acetato de celulosa .....	13
2.4.2.6. Fisiología cardiaca.....	15
2.4.2.6.1. Enzimas en las células miocárdicas .....	16
2.4.2.6.2. Creatina Cinasa (CK) .....	16
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	17
4. OBJETIVOS .....	18
5. HIPÓTESIS .....	19
6. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	20
7. DIAGRAMA DE FLUJO .....	21

8. DESARROLLO EXPERIMENTAL .....	22
8.1. Reactivos y sustancias.....	22
8.2. Animales de experimentales .....	22
8.3. Material .....	22
8.4. Equipo e instrumentos .....	23
8.5. Metodología .....	23
9. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS .....	27
9.1. Peso relativo de órganos .....	27
9.2. Perfil renal.....	29
9.3. Perfil hepático .....	31
9.4. Enzimas cardíacas .....	32
9.5. Glucosa .....	32
10. CONCLUSIONES.....	34
11. REFERENCIAS.....	35
12. ANEXO.....	39
12.1. Proteinogramas obtenidos en el programa Image .....	39

## **1. INTRODUCCIÓN**

El proceso sol-gel es una ruta de síntesis muy versátil, que permite obtener materiales porosos de sílice para aplicaciones biomédicas. El conocimiento del proceso químico y sus alcances ha permitido el estudio de los mecanismos de reacción involucrados en el mismo, así como la producción y diseño de materiales para liberación controlada de fármacos y biomateriales.

La microencapsulación es una tecnología versátil para controlar la liberación de los fármacos. Diseñar tecnologías de liberación prolongada es cada vez más importante y necesario en el área farmacéutica, ya que estos sistemas pueden ser descritos como formulaciones dirigidas hacia áreas específicas del cuerpo que permiten una dosificación sostenida en la que el fármaco se entrega de manera controlada durante un cierto periodo de tiempo. En comparación con las formas tradicionales de administración, permiten mantener la concentración de fármaco apropiado en el tejido donde es necesario, así se aumenta la eficacia terapéutica y se reduce la posibilidad de toxicidad derivada del uso del fármaco administrado.

Cualquier material que sea diseñado con objeto de ejercer una función en contacto con el organismo vivo ha de ser biocompatible y no presentar ningún tipo de toxicidad, ya que estará en contacto con fluidos fisiológicos.

Por tal motivo se llevó a cabo un estudio de biocompatibilidad en las matrices monolíticas de silicio diseñadas por el método Sol-Gel las cuales contienen glibenclamida como principio activo. Se usaron ratones machos CD-1 de 32 g aproximadamente. Se realizarán pruebas bioquímicas para la función renal como urea, creatinina y nitrógeno ureico en sangre, para la función hepática se determinaron transaminasas y proteínas séricas y para la fisiología cardiaca se realizará la medición de Creatina Cinasa.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Proceso Sol-Gel

Las enfermedades degenerativas han impulsado la necesidad de tratamientos efectivos más exitosos y rentables, estimulando el desarrollo de métodos versátiles para producir matrices bioactivas e interfaces con funcionalidad mejorada<sup>1</sup>. En los últimos años, los biomateriales han adquirido cada vez mayor interés dentro de las ciencias biomédicas y las distintas disciplinas científicas.

El proceso sol-gel es una ruta de síntesis muy versátil, que permite obtener materiales porosos de sílice para aplicaciones biomédicas. Actualmente, las aplicaciones biomédicas de estos materiales abarcan un amplio rango de sistemas para la liberación de fármacos y genes, la ingeniería de tejidos, la terapia celular o los sistemas de diagnóstico, entre otros.

El método sol-gel se caracteriza por las bajas temperaturas a las que se sintetizan materiales inorgánicos e híbridos orgánico-inorgánicos, permitiendo la incorporación de especies orgánicas o incluso biológicas. Esta ruta permite obtener materiales de gran pureza y homogeneidad a escala molecular, así como controlar a escala nanométrica las superficies, interfases y porosidad de los materiales obtenidos<sup>2</sup>. Por otro lado, el control del método de procesado permite variar la morfología de los materiales sintetizados y así obtener partículas, películas, monolitos o fibras<sup>3</sup>.

Este proceso consiste básicamente en la formación de redes compuestas por elementos inorgánicos obtenidos a través de dos reacciones químicas simultáneas, que son la hidrólisis y condensación, éstas se inician a partir de una solución homogénea de alcóxido, disolvente, agua y un catalizador, este último puede o no, ser usado.

La primera etapa del proceso es la hidrólisis del alcóxido, y puede ser catalizada por medio de un ácido o una base, en esta etapa se obtienen soles, es decir una suspensión de aspecto similar a una disolución, que contiene partículas de tamaño

inferior a 100 nm y se forman grupos silanol (Si-OH), al tiempo en que se libera el alcohol correspondiente (ROH).

Los grupos silanol comienzan a polimerizar por medio de la condensación, así se van formando estructuras tridimensionales unidas por enlaces siloxano (Si-O-Si) al irse eliminando el agua y el alcohol. Posteriormente se forma un gel sólido, más o menos compacto y denso, lo cual dependerá de las condiciones de secado. Las estructuras tanto del sol como el gel, formadas en las primeras etapas, dependen fuertemente de las condiciones de la reacción inicial como son la temperatura, el tipo de catalizador y las velocidades relativas de hidrólisis y de la condensación.

La ventaja más importante en el proceso Sol-gel es que los precursores, como los alcóxidos son frecuentemente volátiles y fáciles de purificar, contienen alta porosidad en los materiales que pueden ser tanto amorfos como nanocristalinos y buen control para la modificación química del precursor<sup>4</sup>.

### **2.1.1. Aplicaciones**

El conocimiento del proceso químico y sus alcances ha permitido el estudio de los mecanismos de reacción involucrados en dicho proceso, así como la producción y diseño de materiales tales como: semiconductores, fotocatalizadores, películas delgadas y materiales de encapsulamiento para la liberación controlada de fármacos y biomateriales<sup>5</sup>.

Recientemente se ha mostrado gran interés en la producción de materiales con tamaños nanométricos, los que abren una gran brecha en el área de la medicina con fines curativos de enfermedades tales como cáncer y diabetes. La nanomedicina tiene como una finalidad encapsular fármacos en nanodispositivos tales como enzimas, proteínas, entre otros e ir liberando dicho fármaco en forma controlada hasta llegar al órgano blanco de manera selectiva<sup>6</sup>.

La microencapsulación es una tecnología versátil para controlar la liberación de los fármacos. Diseñar tecnologías de liberación modificada es cada vez más importante y necesario en el área farmacéutica<sup>7</sup>, ya que estos sistemas de

liberación pueden ser diseñados como formulaciones dirigidas hacia áreas específicas del cuerpo que permiten una liberación sostenida en la que el fármaco se dosifica de manera controlada durante un cierto periodo de tiempo. De esta manera, en comparación con las terapias tradicionales de administración, permiten mantener la concentración de fármaco apropiado en el tejido donde es necesario, sin sobrepasar el umbral tóxico. Así se aumenta la eficacia terapéutica y se reduce la toxicidad del fármaco administrado<sup>8</sup>.

## **2.2. Biocompatibilidad y toxicidad de las matrices Sol-Gel**

### **2.2.1. Biocompatibilidad de las matrices**

La aplicación de los materiales porosos de sílice como sistemas de liberación de fármacos tanto orales como implantables implica el contacto con el medio fisiológico; mientras que en el primer caso se requiere no toxicidad, en el segundo caso estos materiales actúan como biomateriales, por lo que además han de ser biocompatibles.<sup>9</sup>

La biocompatibilidad es una condición que todo biomaterial debe de cumplir. Un buen punto de partida es estudiar la posible toxicidad derivada de su composición química. En lo que a la sílice se refiere, se sabe que la inhalación de sílice cristalina, en particular cuarzo, puede ocasionar graves enfermedades respiratorias. Sin embargo, la sílice amorfa obtenida por el método sol-gel se considera no tóxica, biocompatible y biodegradable.<sup>10</sup>

Es importante prestar atención a la evaluación de la inherente capacidad de degradación, la citotoxicidad y la biocompatibilidad de los materiales porosos de sílice, ya que la biodegradación de la sílice *in vivo* se produce principalmente por disolución en los fluidos biológicos. Esta sílice disuelta como ácido silícico se excreta en la orina, lo cual contribuye al interés en el empleo de las matrices síliceas en aplicaciones biomédicas<sup>11</sup>.

El método sol-gel se considera una ruta prometedora en el diseño de nuevos materiales con aplicaciones en biotecnología, aunque el salto al campo biomédico puede resultar complicado, debido a la falta de información en relación con la biocompatibilidad de los materiales sol-gel, lo que podría limitar sus aplicaciones *in vivo*. Cualquier material que sea diseñado con objeto de ejercer una función en contacto con el organismo vivo ha de ser biocompatible y no presentar ningún tipo de toxicidad, ya que estará en contacto con fluidos fisiológicos

En ello radica la necesidad de continuar investigando aspectos relacionados con la biodistribución, degradación y seguridad de la sílice en diferentes órganos y tejidos para el empleo de la sílice en biomedicina.<sup>10</sup>

### **2.2.2. Estudios de biocompatibilidad**

La inocuidad es la característica de una sustancia para poder usarse sin causar efectos tóxicos injustificables, es decir la inocuidad da la seguridad de uso<sup>12</sup>. Para obtener una garantía satisfactoria de seguridad de una sustancia química es necesario realizar una investigación que permita conocer el grado toxicidad de la misma.<sup>12,13</sup>

Los estudios de inocuidad tienen como objetivos, establecer los efectos tóxicos en diferentes especies de animales, anticipar posibles efectos tóxicos en el hombre y decidir si la sustancia es razonablemente segura para su experimentación clínica.  
14,15

En el caso de una sustancia desconocida, las investigaciones comienzan generalmente con ensayos de toxicidad aguda. La toxicidad aguda se lleva a cabo en una sola administración de una dosis única o de un pequeño número de dosis en un periodo corto, y estas pueden emplear diferentes vías de exposición como intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, oral y dérmica.

Tras el contacto con agentes físicos, sustancias químicas y medicamentos se puede llegar a generar alteraciones en el organismo haciendo presentes

fenómenos que pueden dar lugar a inflamación en órganos internos y un mal funcionamiento de estos.

Las pruebas básicas que se realizan en estudios de inocuidad son exámenes de sangre y orina, así como la evaluación de la funcionalidad de los órganos más importantes. Como evaluación post-mortem, se realiza un estudio detallado de los pesos absolutos y relativos de los órganos y glándulas más importantes<sup>10</sup>.

Este tipo de estudio proporciona una estimación de seguridad/riesgo vinculada a una exposición específica al producto químico en seres vivos.<sup>15</sup>

### **2.3. Animales de experimentación en las pruebas de inocuidad y biocompatibilidad**

Las especies de roedores son las que más se utilizan como parte de la evaluación de toxicidad crónica y aguda, biodisponibilidad y metabolismo en la evaluación de la seguridad de un medicamento<sup>16</sup>. Se ha probado su utilidad con base en su linaje genético definido, bajo costo, vida relativamente corta y mínimo espacio requerido para su alojamiento, son fáciles de manipular, baratos de mantener y con altos índices reproductivos, por lo que se han convertido en el modelo experimental más frecuentemente elegido en investigación para probar la seguridad de nuevos procedimientos y fármacos.<sup>17</sup>

Muchos efectos farmacodinámicos son análogos en el animal y en el hombre; por ello, los estudios en animales ofrecen una utilidad relativamente grande como medio de predicción de esos efectos. Son muchos los efectos tóxicos que pueden preverse a partir de observaciones en animales; ahora bien, en el estado actual del conocimiento hay algunos efectos tóxicos importantes que no se pueden prever, y esa es su principal limitación. No obstante, gracias al aumento constante de los conocimientos, va mejorando la utilidad de la experimentación animal y de otros estudios fundamentales como medio de predecir los efectos tóxicos en el hombre.

A pesar de las diferencias entre el hombre y el animal, a menudo se puede evaluar la inocuidad de un producto y predecir su eficacia potencial y su modo de acción a partir de los resultados de los estudios farmacodinámicos, farmacocinéticos y toxicológicos en los animales.<sup>18</sup>

## **2.4. Aspectos fisiológicos a considerar en estudios de biocompatibilidad**

### **2.4.1. Función renal**

Los riñones realizan varias funciones en el organismo: filtran la sangre y eliminan productos de desecho del metabolismo así como sustancias endógenas y exógenas, los productos de desecho incluyen urea (de los aminoácidos), ácido úrico (de los ácidos nucleicos), creatinina (de la creatina muscular), productos finales del metabolismo de la hemoglobina y metabolitos de las hormonas. Así los riñones regulan la concentración de hormonas dentro de los líquidos corporales, también representan un importante camino de eliminación de sustancias extrañas, como fármacos, pesticidas y otros compuestos químicos, mantienen el balance hidroelectrolítico, regulan el equilibrio ácido–base. Son importantes órganos endocrinos que producen y secretan renina, calcitriol y eritropoyetina.

La renina activa el sistema renina angiotensina-aldosterona, que ayuda a regular la presión sanguínea y el equilibrio Na-K. El calcitriol, en el metabolismo de la vitamina D3, es necesario para la absorción normal del calcio en el tracto gastrointestinal y para su depósito en el hueso.<sup>19</sup>

Los riñones están constituidos por unidades funcionales llamadas nefronas, las cuales están formadas por un glomérulo y un túbulo. El glomérulo es un conjunto de vasos sanguíneos a través del cual se filtran más de 150 litros de sangre al día. Este ultrafiltrado del plasma que contiene moléculas pequeñas como urea, creatinina, glucosa e iones pasa al espacio capsular y posteriormente a los túbulos.<sup>20, 21</sup>

### **2.4.1.1. Examen General de Orina**

La recolección de orina en animales de experimentación es un requerimiento básico dentro de los estudios bioquímicos, nutricionales, urológicos, metabólicos, toxicológicos, fisiológicos y de comportamiento general. El análisis de orina es uno de los que más información aporta y que se realiza con mayor normalidad.<sup>13</sup>

La orina recolectada es útil para evaluar la salud general y el estatus fisiológico de un animal, y ayuda a hacer un diagnóstico adecuado. Una pequeña cantidad de orina bastará para un análisis, que abarca la medición del pH urinario, niveles de proteínas, glucosa, bilirrubina, hemoglobina, cetona, urobilinógenos y nivel de creatinina<sup>22</sup>.

### **2.4.1.2. Creatinina**

La creatinina es formada en el tejido muscular como producto del metabolismo de la fosfocreatina, ésta llega a la sangre y es excretada exclusivamente por el riñón a través de la filtración glomerular, por lo que la determinación de la creatinina es la forma más práctica de estimar la función renal.

La utilidad de la determinación de creatinina sérica es un indicador de la filtración glomerular, apoyándose en el hecho de que cualquier reducción en esta última representa una limitación en la excreción de creatinina, que continúa produciéndose en el tejido muscular, originando una acumulación en el torrente sanguíneo. Cuando existe daño renal, éste casi siempre se refleja en un aumento, tanto de urea como de creatinina.<sup>21</sup>

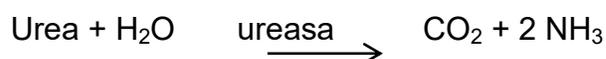
### **2.4.1.3. Urea**

La urea es el principal producto de desecho del metabolismo de las proteínas, representando la forma mayoritaria de eliminación de nitrógeno. Es un compuesto relativamente inocuo para el organismo comparado con el amonio y es muy soluble en agua. Esta gran solubilidad permite que se filtre totalmente a nivel del glomérulo renal y que se difunda homogéneamente por todo el organismo.

La urea se sintetiza mayoritariamente en el tejido hepático, por un mecanismo llamado ciclo de la urea en donde intervienen los aminoácidos ornitina y arginina. La urea se elimina por el riñón por un mecanismo pasivo de filtración a nivel glomerular.

Los métodos usados para la determinación de la urea pueden clasificarse en dos grandes grupos: métodos directos de *Fearon*, según la cual la urea se condensa con la diacetilmonoxima, para dar un compuesto coloreado; y métodos indirectos basados en la determinación del amonio liberado por acción de la ureasa sobre la urea.

La urea es hidrolizada por la ureasa, liberando anhídrido carbónico y amoniaco según la reacción:



La urea se cuantifica a partir del amonio liberado, que puede ser medido con varios reactivos.

La reacción de *Berthelot* es la más utilizada; en ella el amonio reacciona con el hipoclorito dando cloramina que en presencia del fenol y catalizado por el nitroprusiato produce un derivado indofenólico de color azul en medio alcalino, cuya intensidad es proporcional a la cantidad de urea.

Existe un método enzimático cinético de medición de la urea que utiliza las enzimas ureasa y glutamato deshidrogenasa. El amonio liberado es convertido en glutamato por acción de la glutamato deshidrogenasa, en presencia de NADH y  $\alpha$ -cetoglutarato, según la reacción.



La concentración de urea se determina midiendo la velocidad de desaparición del NADH a 340 o 365 nm<sup>23</sup>.

#### **2.4.1.4. Nitrógeno Ureico en Sangre (BUN)**

El BUN es una medida indirecta y general de la función renal y la tasa de filtración glomerular (si la función hepática es normal). También es una determinación de la función hepática. El BUN cuantifica la cantidad de nitrógeno ureico en sangre. La urea se forma en el hígado como producto final del metabolismo de las proteínas y la digestión. Durante la digestión se escinden las proteínas en aminoácidos. En el hígado, estos aminoácidos se catabolizan y forman amonio libre. Las moléculas de amonio se combinan para formar urea, que después se deposita en la sangre y se transporta a los riñones para su excreción. Por lo tanto, el BUN se relaciona de manera indirecta con la función metabólica del hígado y la función de excreción renal. Sirve como un índice de la función de estos órganos.

Los individuos con cifras elevadas de BUN se conocen como hiperazoémicos. Casi todas las enfermedades renales inducen una excreción inadecuada de urea, de tal modo que la concentración sérica rebasa el parámetro normal. La hiperazoemia prerrenal se refiere a la elevación del BUN como resultado de trastornos patológicos que alteran la acumulación de nitrógeno ureico, antes de que llegue al riñón. Ejemplo de hiperazoemia prerrenal incluyen deshidratación, insuficiencia cardíaca congestiva y catabolismo proteico excesivo<sup>22</sup>.

#### **2.4.2. Función hepática**

El hígado es el principal órgano en la regulación del metabolismo energético. Se sitúa entre la vena porta y la cava inferior, recibe tanto la mayor parte de los sustratos energéticos absorbidos por el intestino como una elevada concentración de las dos principales hormonas reguladoras del metabolismo a corto plazo, la insulina y el glucagón que produce el páncreas endocrino. Bajo la influencia de estas hormonas y en colaboración con otras, como glucocorticoides y catecolaminas, adapta su actividad a las necesidades energéticas del organismo, de modo que puede tanto ceder energía en forma de glucosa y otros sustratos (ácidos grasos, lipoproteínas, cuerpos cetónicos) como acumularla en forma de glucógeno y lípidos, todo ello en función del estado metabólico del organismo.

El hígado, además de tener funciones digestivas y excretoras que se relacionan con la formación de bilis, es un órgano fundamental en los procesos metabólicos, debido tanto a su posición estratégica como a sus funciones metabólicas. Además de regular la homeostasia calórica y el metabolismo proteico, el hígado desempeña una función importante en el metabolismo de hormonas, vitaminas y xenobióticos, en el almacenamiento de metales y vitaminas y en la respuesta inmunitaria<sup>24</sup>.

El hígado sintetiza casi todas las proteínas presentes en el plasma, especialmente la albúmina, que determina la presión oncótica del plasma, así como la mayoría de los importantes factores de coagulación. También es un lugar esencial para la eliminación del amoníaco generado por el catabolismo de las proteínas. Esto se logra convirtiendo el amoníaco en urea, que puede ser excretada posteriormente por los riñones.<sup>19</sup>

Este órgano se encarga de realizar muchas importantes funciones metabólicas que se interrelacionan y coordinan con las de otros órganos y tejidos, por ello la evaluación de sus funciones puede ser realizadas por medio de pruebas de laboratorio.<sup>21</sup>

#### **2.4.2.1. Transaminasas**

Son enzimas que transfieren un aminoácido a un cetoácido aceptor para dar lugar a aminoácidos distintos de los originales. En el hígado se han detectado no menos de 60 reacciones de transaminación, pero las únicas transaminasas con valor clínico son la aspartato-amonotransferasa o transaminasa glutámico-oxalacética (AST o GOT) y la alanino-amino-transferasa o transaminasa glutámico-pirúvica (ALT o GTP).

Estas enzimas no son específicas del hígado (aunque la GTP lo es más) y se encuentran también en el músculo, el corazón, el páncreas y el cerebro.<sup>25</sup>

### **2.4.2.2. Aspartato aminotransferasa (AST)**

Esta enzima se encuentra en concentraciones muy elevadas dentro de tejidos altamente metabólicos, como el músculo cardíaco, células hepáticas, células musculo esqueléticas y, en menor grado, riñones y páncreas. En presencia de enfermedad o lesión que afecte las células de estos tejidos, las células se lisan; la AST se libera, pasa a la sangre y se incrementan sus cifras séricas. El aumento de las concentraciones de AST se relaciona de forma directa con el número de células afectadas por la enfermedad o lesión.

El aumento depende del tiempo transcurrido desde que se produce la lesión hasta la toma de sangre. La AST se elimina del sistema en unos cuantos días. Las concentraciones de AST sérica se elevan 8 horas después de la lesión celular, con un punto máximo de las 24 a 36 horas después, y vuelven a la normalidad en 3 a 7 días. Si la lesión celular es de tipo crónico, las concentraciones se incrementan de manera persistente.<sup>22</sup>

### **2.4.2.3. Alanino aminotransferasa (ALT)**

Esta prueba se emplea para diagnosticar enfermedades hepatocelulares. La ALT se encuentra de manera predominante en el hígado y, en menores cantidades, en riñones, corazón y músculo esquelético. Las lesiones o enfermedades que afectan al parénquima hepático provocan la liberación de esta enzima hepatocelular a la sangre, lo cual eleva las concentraciones séricas de ALT. La mayor parte de los aumentos de ALT es consecuencia de disfunción hepática, por lo que esta enzima no sólo es sensible, sino muy específica de enfermedad hepatocelular.<sup>22</sup>

### **2.4.2.4. Lactato Deshidrogenasa (LDH)**

La lactato deshidrogenasa (LDH) cataliza la oxidación de lactato a piruvato; esta enzima se encuentra en el citoplasma de todas las células del organismo. Se han aislado cinco lisoenzimas de la LDH: la LDH<sub>1</sub> y LDH<sub>2</sub> predominan en el músculo cardíaco, el riñón y los eritrocitos; la LDH<sub>3</sub> se encuentra en cerebro y riñón y la LDH<sub>4</sub> y LDH<sub>5</sub> son las isoenzimas principales en el hígado y el músculo esquelético.

Esta enzima es menos sensible que las transaminasas para detectar daño hepático, es más útil para el infarto al miocardio y como indicador de hemodiálisis.<sup>21</sup>

#### **2.4.2.5. Proteínas séricas**

Las proteínas integran un grupo de macromoléculas bioquímicas mayores y participan en gran variedad de funciones del organismo, entre las que se encuentran la respuesta inmunológica, el transporte de varias moléculas, la catálisis enzimática, la distribución de líquidos, el mantenimiento de la presión oncótica del plasma y la participación en procesos de coagulación.

Con excepción de los componentes del complemento y las inmunoglobulinas, casi todas las proteínas del suero se producen en el hígado. En su mayoría son catabolizadas por macrófagos y las células del endotelio capilar y las proteínas pequeñas se pierden pasivamente en el glomérulo renal y la pared intestinal. Por ello, su determinación en el suero proporciona información importante sobre el funcionamiento y las alteraciones patológicas de varias actividades como las gastrointestinales, hepáticas, hematológicas, inmunológicas y renales.<sup>21</sup>

##### **2.4.2.5.1. Electroforesis en acetato de celulosa**

La electroforesis es una técnica de separación de moléculas por la carga eléctrica. Se basa en el movimiento de las moléculas cargadas en un campo eléctrico con respecto al pH del medio en el que se encuentre. Esta técnica se aplica en el campo de la Bioquímica a la separación y análisis de compuestos cargados, como aminoácidos, péptidos, proteínas y ácidos nucleicos.

Las membranas de acetato de celulosa presentan, con relación al papel, las ventajas de ser químicamente más homogéneas y poder transparentarse, con lo que las sustancias que se separan pueden cuantificarse, una vez teñidas o reveladas, por densitometría de transparencia.

Las membranas de acetato de celulosa son muy elásticas cuando están húmedas, y frágiles y quebradizas cuando están secas. También requieren una cantidad de muestra mucho menor que el papel. Estas se utilizan mucho en los laboratorios clínicos por su fácil manipulación y la rapidez de sus desarrollos electroforéticos. La principal aplicación tiene como objeto la separación de las proteínas del suero, lo que se conoce como un proteinograma. Figura 1

La electroforesis en acetato de celulosa separa las proteínas del suero en cinco fracciones, que son la albúmina y las globulinas  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ <sup>26</sup>.

La albumina y la globulina representa la mayor parte de la proteína dentro del cuerpo, y se determinan juntas como proteína total. La albúmina es una proteína que se forma dentro del hígado, conforma casi 60% del total de la proteína, transporta componentes esenciales, como fármacos, hormonas y enzimas. Se sintetiza en el hígado y, por lo tanto, es una medida de la función hepática.

Un incremento en la fracción de la albúmina en el suero, o hiperalbuminemia, casi siempre se debe a una deshidratación en el paciente.<sup>32</sup>

Las globulinas representan todas las proteínas distintas de la albúmina, su papel es el mantenimiento de la presión osmótica es mucho menor que el de la albúmina. Las  $\alpha$ -globulinas corresponden sobre todo a la  $\alpha_1$ -antitripsina. Algunas transportan proteínas, como la globulina tiroidea y la globulina unida a cortisol, además de contribuir a su zona electroforética. Las  $\alpha_2$ -globulinas incluyen haptoglobinas séricas (que unen la hemoglobina durante la hemólisis), ceruloplasmina (que transportan al cobre), protrombina y colinesterasa (una enzima usada en el catabolismo de la acetilcolina). Las  $\beta$ -globulinas se encuentra la transferrina, las lipoproteínas de baja densidad, el complemento, la hemopexina y la microglobulina beta 2. Las  $\gamma$ -globulinas se encuentran la proteína C-reactiva y las inmunoglobulinas como IgG, IgA, IgM, IgD e IgE (anticuerpos).<sup>27</sup>

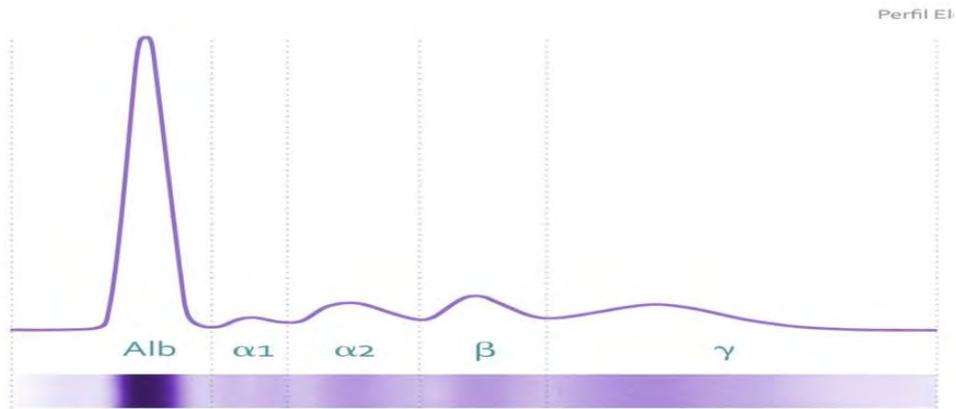


Figura 1. Proteinograma normal.

#### 2.4.2.6. Fisiología cardíaca

El corazón tiene cuatro cavidades: dos aurículas, que reciben sangre venosa, y dos ventrículos, que expulsan sangre hacia las arterias. El ventrículo derecho bombea sangre hacia los pulmones, donde se oxigena la sangre; el ventrículo izquierdo bombea sangre oxigenada hacia todo el cuerpo.<sup>28</sup>

El metabolismo altamente anaeróbico del corazón le permite usar como combustible muchos sustratos normalmente presentes en el plasma, y la absorción cardíaca de la mayoría de estos sustratos es proporcional a su concentración arterial una vez que ciertos niveles son excedidos. En términos generales, el corazón usa los ácidos grasos libres como su combustible predominante. También consume importantes cantidades de glucosa y lactato, así como cantidades más pequeñas de piruvato, cuerpos cetónicos y aminoácidos. La mayor parte de la energía para la función cardíaca se obtiene de la descomposición de metabolitos a través del ciclo del ácido cítrico y la fosforilación oxidativa. Estas vías enzimáticas se encuentran principalmente en las mitocondrias, representando aproximadamente un 35% del volumen total del músculo cardíaco.

#### **2.4.2.6.1. Enzimas en las células miocárdicas**

Varias enzimas encontradas en el tejido miocárdico son clínicamente importantes debido a que su liberación en el torrente sanguíneo puede estar relacionada con el daño y la muerte de las células miocárdicas.<sup>32</sup>

El infarto al miocardio se diagnostica mediante electrocardiografía (ECG) y pruebas específicas de la sangre. La creatina cinasa (CK) es una enzima normal de las células musculares, se libera en grandes cantidades cuando cualquier tejido muscular está dañado. La forma específica de CK para las células del músculo cardíaco es la creatina cinasa MB (CK-MB).<sup>29</sup> Los marcadores bioquímicos que se determinan son la creatina cinasa, la deshidrogenasa láctica y la transaminasa glutámico oxalacética.

#### **2.4.2.6.2. Creatina Cinasa (CK)**

Es una enzima localizada principalmente en el músculo cardíaco y esquelético, además del cerebro. Su función principal es catalizar la transferencia de fosfato de alta energía entre creatina y fosfocreatina, entre ADP y ATP. La medición de la creatina cinasa (CK) total tiene una especificidad relativamente baja, por encontrarse en otros tejidos, además del miocardio. La creatina cinasa tiene tres isoenzimas, generadas al ser dímeros de las cadenas M y B; así se forman la CK-MB, la CK-BB y la CK-MM, siendo la más específica del miocardio la CK-MB.<sup>21</sup>

La proteína codificada por este gen es una enzima citoplasmática en la homeostasis de la energía y es un marcador de suero importante para el infarto de miocardio.<sup>30</sup> Esta prueba se solicita para sustentar el diagnóstico de lesión del miocardio (infarto). La CK se encuentra de manera predominante en músculo cardíaco, músculo esquelético y cerebro. Los valores séricos de CK se elevan cuando estos músculos o células nerviosas se lesionan. Las concentraciones de CK pueden aumentar en 6 horas después del daño; si la alteración no es persistente, los valores son máximos 18 horas después de la lesión y regresan a la normalidad en 2 a 3 días.<sup>22</sup>

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Los materiales obtenidos por el método Sol-Gel pueden ser empleados en procesos de liberación modificada de fármacos para el tratamiento de enfermedades degenerativas.

Estos materiales son muy prometedores, solo que tienen como inconveniente el hecho de que aún no son ampliamente estudiados y por lo tanto no hay gran información que asegure que al entrar en contacto con un organismo no generen reacciones tóxicas o algún efecto indeseado. Por ello, antes de ser empleados en formulaciones, es necesario evaluar, mediante algunos parámetros bioquímicos, el grado de toxicidad que pueden llegar a generar y asegurar si estos materiales realmente son biocompatibles y, por lo tanto, inocuos para ser usados en la formulación de nuevos medicamentos. De inicio, el planteamiento debe fundamentarse en estudios en animales de experimentación para que, de ser el caso, se pueda proceder a otros modelos más próximos a su aplicación futura en la clínica.

## 4. OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

- ∞ Determinar la biocompatibilidad de las matrices monolíticas fabricadas por el método Sol-Gel mediante estudios de toxicidad en ratones.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ∞ Conocer los cambios físicos como: peso, irritabilidad y muerte que se generan en los grupos de ratones una vez administrada la matriz monolítica.
- ∞ Determinar si la administración de las matrices monolíticas afecta la función de los órganos (hígado, riñón y corazón) mediante el peso relativo de estos.
- ∞ Conocer si existen modificaciones bioquímicas en niveles de urea, creatinina, transaminasas, creatina cinasa, lactato deshidrogena y proteínas séricas en los animales tratados, derivadas de la alteración posible en sus órganos.

## **5. HIPÓTESIS**

Las matrices monolíticas diseñadas por el método Sol-gel serán biocompatibles con el organismo de los animales de experimentación, como se demuestra una vez que son administradas y evaluadas las funciones de los órganos vitales por medio de diferentes pruebas.

## 6. DISEÑO EXPERIMENTAL

### Tipo de estudio: Experimental aleatorio controlado

- ∞ Actitud del investigador: Experimental
- ∞ Recolección de información: Prospectivo
- ∞ Secuencia temporal del estudio: Transversal
- ∞ Cantidad de poblaciones: Descriptivo

### Población de estudio:

- ∞ Matrices monolíticas Sol-gel

### Criterios de inclusión:

- ∞ Matrices sol-gel producidas en el Laboratorio de Investigación Farmacéutica, con un peso de 20mg y dureza de 1.26 kgF

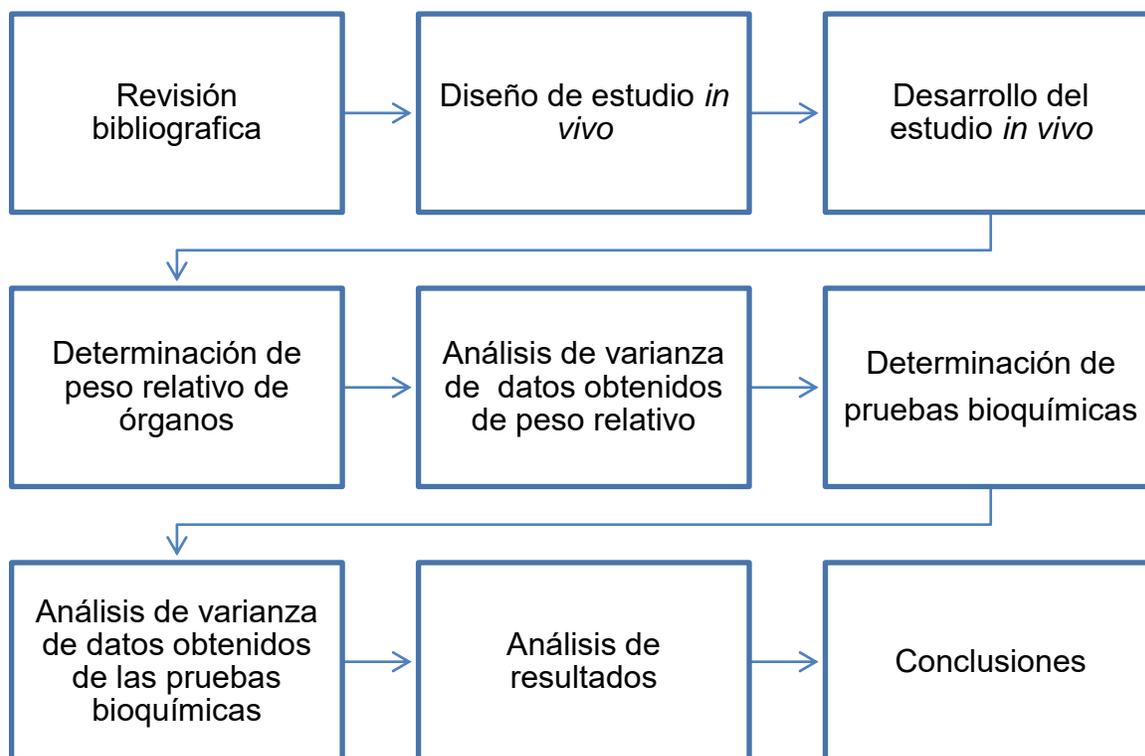
### Criterios de exclusión

- ∞ Matrices fuera de especificaciones

### Análisis estadístico

Los datos obtenidos se trataron mediante análisis de varianza (ANADEVA), comparando el efecto de cada tratamiento en la variable de respuesta correspondiente, con un intervalo de confianza del 95%, utilizando el paquete estadístico Statgraphics Centurion XVII.

## 7. DIAGRAMA DE FLUJO



## 8. DESARROLLO EXPERIMENTAL

### 8.1. Reactivos y sustancias

- ∞ Éter etílico (J.T. BAKER)
- ∞ Ácido acético glacial (J.T. BAKER)
- ∞ Alcohol-Yodo 1%
- ∞ Solución decolorante: solución acuosa al 40% de N-metil pirrolidona (GELMAN SCIENCE)
- ∞ Colorante de rojo de Ponceau (SIGMA) al 5% en solución acuosa de TCA al 7.5%
- ∞ Amortiguador de alta resolución (Electra HR)
- ∞ Cloruro de sodio 0.9% (PISA)
- ∞ Glucosa 50% (PISA)

### 8.2. Animales de experimentales

- ∞ Ratón CD-1 de 4 semanas
- ∞ Machos
- ∞ Peso promedio 32g.

### 8.3. Material

- ∞ Tiras ACCU-CHEK (Performa)
- ∞ Tiras de uroanálisis (ACON LABS)
- ∞ Portaobjetos (CORNING)
- ∞ Tubos eppendorf 2 mL (AXYGEN)
- ∞ Bisturí (HERGON)
- ∞ Vidrio de reloj
- ∞ Membranas de acetato de celulosa 57x145mm ( Sepraphore Gelman Instrument Company)
- ∞ Vidrio transparente 7x10 cm
- ∞ Papel filtro

## 8.4. Equipo e instrumentos

- ∞ Microbalanza (Mettler Toledo)
- ∞ Bascula analítica (ADAM)
- ∞ Centrifuga (Premiere)
- ∞ Medidor de glucemia ( ACCU-CHEK performa)
- ∞ Equipo de electroforesis Sepratek Electrophoresis Chamber (Gelman Science)
- ∞ Cámara de electroforesis ( Sepratek 8-applicator Gelman Sciences INC)
- ∞ Ilab 650.

## 8.5. Metodología

### Estudio *in vivo*

#### a) Grupo control

1. Se pesó y se registró el peso de los ratones
2. Se colocaron aproximadamente 20mg de matriz monolítica sin glibenclamida a cada ratón, bajo la piel en la región escapular.
3. Se alimentaron e hidrataron permitiendo una ingestión *ad libitum*, por 7 días.
4. Se tomaron muestras de sangre de la parte distal de la cola y con ayuda de un glucómetro se midieron los niveles de glucosa cada 24 horas por 7 días.
5. Se observó y registró la aparición de reacciones o cambios que se presentaron en el grupo (matriz monolítica)
6. Se anestesiaron los ratones en una cámara de éter.
7. Se tomó muestra de sangre mediante una incisión axilar.
8. Se sacrificaron los ratones en una cámara de éter.
9. Se determinó el peso relativo de corazón, hígado y riñón.

**b) Grupo tratado: matriz monolítica con glibenclamida**

1. Se pesó y registró el peso de los ratones.
2. Se colocó a cada ratón bajo la piel en la región escapular aproximadamente 20 mg de matriz monolítica con glibenclamida como principio activo.
3. Se alimentaron e hidrataron permitiendo una ingestión *ad libitum*, por 7 días.
4. Se tomaron muestras de sangre de la parte distal de la cola y con ayuda de un glucómetro, se midieron los niveles de glucosa cada 24 horas por 7 días.
5. Se observó y registró la aparición de reacciones o cambios que se presentaron en el grupo ante la presencia del cuerpo (matriz monolítica).
6. Se anestesiaron los ratones en una cámara de éter.
7. Se tomaron muestras de sangre mediante una incisión axilar.
8. Se sacrificaron los ratones en una cámara de éter.
9. Se determinó el peso relativo de corazón, hígado y riñón.

**c) Grupo tratado: matriz monolítica con glibenclamida y solución de glucosa al 50%**

1. Se pesó y registró el peso de los ratones
2. Se administró subcutáneamente glucosa al 50% (2g de glucosa/Kg) al inicio del ensayo y a los 60 minutos.
3. Se colocó a cada ratón bajo la piel en la región escapular aproximadamente 20 mg de matriz monolítica con glibenclamida como principio activo.
4. Se alimentaron e hidrataron permitiendo una ingestión *ad libitum*, por 7 días.
5. Se tomaron muestras de sangre de la parte distal de la cola y con ayuda de un glucómetro, se midió los niveles de glucosa cada 24 horas por 7 días.
6. Se observó y registró la aparición de reacciones o cambios que se presentaron en el grupo ante la presencia del cuerpo (matriz monolítica).

7. Se anestesiaron los ratones en una cámara de éter.
8. Se tomaron muestras de sangre mediante una incisión axilar.
9. Se sacrificaron los ratones en cámara de éter.
10. Se determinó el peso relativo de corazón, hígado y riñón.

#### **d) Examen General de Orina**

1. Se manipularon a los ratones de tal forma que quedaron inmobilizados
2. Se colocó una de sus patas sobre el portaobjetos, previamente rotulado con el número correspondiente al animal, para la recolección de la orina.
3. Se tomó una tira reactiva marca **ACON LABS** y se humedeció con la orina que se recolectó en el portaobjetos.
4. Se leyeron las tiras y se registraron los resultados obtenidos.

#### **e) Determinación de peso relativo de órganos Metodología Marroquín Segura et-al<sup>31</sup>**

1. Se anestesiaron los ratones en una cámara de éter hasta su muerte.
2. Se extrajeron y pesaron los órganos (corazón, hígado y riñón) en una balanza analítica
3. Se determinó el peso relativo de los órganos mediante la siguiente fórmula:

$$\text{peso relativo del órgano} = \frac{\text{peso del órgano (g)}}{\text{peso del animal (g)}} \times 100$$

4. Se realizaron pruebas bioquímicas como (urea, creatinina, transaminasa glutámico-oxalacética, transaminasa glutámico-pirúvica, proteínas séricas, lactato deshidrogenasa y creatina cinasa) según el órgano que resultó alterado.

**f) Electroforesis en acetato de celulosa para determinar proteínas séricas**

1. Se tomó y sumergió la membrana de acetato de celulosa en el amortiguador de alta resolución durante 10 minutos.
2. Se llenó la cámara de electroforesis con el amortiguador de corrimiento.
3. Se secaron las membranas con papel filtro y se colocaron sobre el soporte de la cámara.
4. Se tomó con un aplicador múltiple las muestras de suero y se colocaron sobre la membrana siguiendo las guías de la cámara.
5. Se conectó la cámara a la fuente y se aplicaron 200 V durante 20 minutos.
6. La membrana se tiñó con rojo de Ponceau en ácido tricloroacético (TCA) al 7.5% durante 10 minutos.
7. Se eliminó el exceso de colorante sumergiendo la membrana en una solución acuosa de ácido acético al 5%.
8. La membrana se escurrió y se colocó en solución clarificadora durante 5 minutos.
9. Se colocó la membrana sobre un vidrio y se secó con una secadora de aire hasta que la membrana sea transparente.
10. Las membranas se leyeron en el programa Image J.

**g) Determinación enzimática**

5. Estas determinaciones se realizaron de forma automática en el equipo "Ilab 650" por medio de espectrometría UV a una absorbancia de 340nm.

## 9. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 9.1. Peso relativo de órganos

Para obtener el peso relativo de hígado, riñón y corazón, se pesó cada ratón previo al sacrificio, e inmediatamente se pesó por separado cada órgano extraído, se empleó la fórmula para calcular el porcentaje de peso relativo de cada órgano. Se hizo el análisis de varianza con un nivel de confianza del 95% empleando como estadígrafo la F de Fisher, como se muestra en la tabla 1. De los resultados obtenidos no se encontró diferencia estadísticamente significativa en hígado, mientras que en riñón y corazón sí, con  $p= 0.0431$  y  $0.0020$  respectivamente, con una significancia del 5%.

Tabla 1. Resultados de los promedios obtenidos por grupo y análisis de varianza empleando como estadígrafo la F de Fisher.

Hígado		
Control	Monolito	Monolito y glucosa
n=6	n=6	n=6
$\bar{X}=6.561g$	$\bar{X}=6.5605g$	$\bar{X}=6.2050g$
F calculada= 0.75		Valor-P= 0.4894
*Riñón		
Control	Monolito	Monolito y glucosa
n=6	n=6	n=6
$\bar{X}=1.5931g$	$\bar{X}=1.3501g$	$\bar{X}=1.4610g$
F calculada= 3.90		Valor-P= 0.0431
*Corazón		
Control	Monolito	Monolito y glucosa
n=6	n=6	n=6
$\bar{X}=0.5527g$	$\bar{X}=0.4747g$	$\bar{X}=0.4374g$
F calculada= 9.72		Valor-P= 0.0020

\*indican diferencia estadística

Se realizó la prueba de Rangos Múltiples para riñón y corazón, la cual permite determinar cuáles medias son significativamente diferentes entre sí, los resultados obtenidos se representan en las tablas 2 y 3.

**Tabla 2. Prueba de Rangos Múltiples para peso relativo de riñón**

Grupo	Casos		Media
Monolito	6		1.35007
Monolito + glucosa	6		1.46102
Control	6		1.59318
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Control – Monolito	*	0.243117	0.185663
Control – Monolito + Glucosa		0.132167	0.185663
Monolito – Monolito + Glucosa		-0.11095	0.185663

\* indica una diferencia significativa.

\*\*Los monolitos contienen glibenclamida como principio activo

Los resultados obtenidos demuestran diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control y el grupo tratado con monolito, el cual contiene glibenclamida como principio activo, por lo anterior se podría suponer que el fármaco está causando una alteración fisiológica en dicho órgano y no necesariamente el monolito *per-se*.

**Tabla 3. Prueba de Rangos Múltiples para peso relativo de corazón**

Grupo	Casos		Media
Monolito + glucosa	6		0.437483
Monolito	6		0.474783
Control	6		0.552783
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Control - Monolito	*	0.078	0.0568704
Control – Monolito + Glucosa	*	0.1153	0.0568704
Monolito – Monolito + Glucosa		0.0373	0.0568704

\* indica una diferencia significativa.

\*\*Los monolitos contienen glibenclamida como principio activo

De acuerdo con la tabla 3, se encontraron diferencias significativas entre el grupo control vs el grupo tratado con monolito y el grupo control vs el grupo tratado con monolito más solución de glucosa al 50% (ver anexo), ambos grupos tratados con monolito contienen glibenclamida como principio activo. Por lo tanto, se puede mencionar que dicha alteración se debe a la glibenclamida. Esto probablemente refleje la expresión del receptor de sulfonilureas en las células del músculo liso

vascular y en los miocitos cardiacos, donde la activación de las sulfonilureas evita los efectos del reacondicionamiento isquémico. La glibenclamida interactúa con el receptor de sulfonilureas en estos sitios y puede relacionarse con aumento en el riesgo cardiovascular.<sup>33</sup>

Para determinar la alteración fisiológica en este órgano se realizó la determinación de la enzima cardiaca Creatina Cinasa, la cual indica una lesión al miocardio. Los resultados de esta prueba se muestran posteriormente.

## 9.2. Perfil renal

Se realizaron pruebas de laboratorio como urea, creatinina y BUN que permiten evaluar de forma rápida y fácilmente el funcionamiento renal. Los resultados de dichas pruebas se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Resultados obtenidos mediante un análisis de varianza para perfil renal

*Urea		
Control	Monolito	Monolito y glucosa
n=6	n=6	n=6
$\bar{X}=56.5\text{mg/dL}$	$\bar{X}=67.5\text{mg/dL}$	$\bar{X}=62.0\text{mg/dL}$
F calculada=4.17		Valor-P=0.00363
Creatinina		
Control	Monolito	Monolito y glucosa
n=6	n=6	n=6
$\bar{X}=0.383\text{mg/dL}$	$\bar{X}=0.367\text{mg/dL}$	$\bar{X}=0.3\text{mg/dL}$
F calculada=1.44		Valor-P= 0.2682
*BUN		
Control	Monolito	Monolito y glucosa
n=6	n=6	n=6
$\bar{X}=26.17\text{mg/dL}$	$\bar{X}=31.5\text{mg/dL}$	$\bar{X}=28.83\text{mg/dL}$
F calculada= 4.18		Valor-P= 0.0361

\*indica una diferencia significativa

Los valores obtenidos mediante un análisis de varianza indican que no se encuentra diferencia significativa en la prueba de Creatinina, mientras que para urea y BUN sí, con un valor de  $p=0.0363$  y  $p=0.0361$  respectivamente.

Para determinar cuáles medias fueron significativamente diferentes de entre sí, se realizó la prueba de rangos múltiples. Las tablas 5 y 6 muestran los resultados obtenidos para urea y BUN, en las cuales hay diferencia significativa en el grupo control vs grupo tratado con monolito para ambos parámetros.

**Tabla 5. Resultados obtenidos de la prueba de rangos múltiples para urea**

Grupo	Casos	Media	
Control	6	56.5	
Monolito + glucosa	6	62.0	
Monolito	6	67.5	
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Control – Monolito	*	-11.0	8.11944
Control – Monolito + Glucosa		-5.5	8.11944
Monolito – Monolito + Glucosa		5.5	8.11944

\* indica una diferencia significativa.

**Tabla 6. Resultados obtenidos de la prueba de rangos múltiples para BUN**

Grupo	Casos	Media	
Control	6	26.1667	
Monolito + Glucosa	6	28.8333	
Monolito	6	31.5	
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Control – Monolito	*	-5.33333	3.93235
Control – Monolito + Glucosa		-2.66667	3.93235
Monolito – Monolito + Glucosa		2.66667	3.93235

\* indica una diferencia significativa.

Puesto que la urea se sintetiza en el hígado, una elevación en sus niveles no representa específicamente daño en la función renal, de igual manera la elevación en el nitrógeno ureico sérico no implica necesariamente daño renal, puesto que la deshidratación puede llevar a concentraciones de nitrógeno ureico tan altas como 600 mg/L.<sup>32</sup> Cuando existe un daño renal, casi siempre se refleja en un aumento, tanto de urea como de creatinina, aunque el mejor indicador es la creatinina.<sup>21</sup>

### 9.3. Perfil hepático

Aunque no se encontró alteración alguna en el hígado, se realizó un perfil hepático debido a que este órgano es fundamental en los procesos metabólicos. El perfil hepático se determinó a partir del suero extraído de los tres grupos de ratones en el equipo ILab 650.

Tabla 7. Resultados obtenidos mediante un análisis de varianza para perfil hepático

Pruebas bioquímicas	Valor de F	Valor-P
TGO	0.57	0.5570
TGP	0.67	0.5278
LDH	0.07	0.9308
*Albúmina	8.66	0.0032
Alfa	1.24	0.3178
*Beta	8.99	0.0027
Gamma	0.04	0.9582

\*Albúmina, significancia estadística  $p=0.0032$

\*Beta, significancia estadística  $p=0.0027$

En los valores obtenidos para TGO, TGP y LDH no se encontraron diferencias significativas, las proteínas séricas se determinaron mediante electroforesis en acetato de celulosa, empleando el programa Image, para la lectura de estas (ver anexo 1), también se realizó un análisis de varianza en el cual se encontró diferencia estadísticamente significativa en albúmina con  $p=0.0032$  y beta con  $p=0.0027$ .

La glibenclamida se une principalmente a proteínas (90 a 99%), en especial a la albúmina<sup>33</sup>, esta es una proteína que se sintetiza en el hígado, conforma casi el 60% del total de la proteína, transporta componentes esenciales como fármacos, hormonas y enzimas, tiene una vida media de 19-21 días<sup>25</sup>, un incremento de la fracción de albúmina en suero casi siempre se debe a una deshidratación, lo que se correlaciona también con los valores nitrógeno uréico elevados encontrados.

## 9.4. Enzimas cardiacas

De acuerdo con los resultados obtenidos para peso relativo en corazón se encontró diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los grupos por lo tanto se llevó a cabo a cabo la determinación de la enzima cardiaca Creatina Cinasa (CK) la cual se emplea para conocer si hay alteración fisiológica en dicho órgano. Los resultados obtenidos demuestran que no hay diferencia significativa entre las medias de cada grupo, por lo tanto no se encuentra alteración fisiológica en el corazón, de acuerdo con la determinación de esta enzima.

Tabla 8. Resultados obtenidos mediante un análisis de varianza para Creatina Cinasa

Enzima	F calculada	Valor-P
Creatina Cinasa	1.82	0.1990

## 9.5. Glucosa

Las muestras de sangre se obtuvieron de la parte distal de la cola de cada ratón y con ayuda de un glucómetro se midieron los niveles de glucosa en sangre durante 7 días. Se realizó un análisis de varianza para determinar la interacción entre días y grupos por lo que se obtuvo que, los días presentan significancia estadística con un valor  $F = 64.67$  y  $p = 0.000$

La figura 2 representa el comportamiento de los niveles de glucosa por día, para el día 1,2 y 3 los niveles de glucosa se encuentran entre 130-140 mg/dL, para el día 4 los niveles son de 125 mg/dL y los días restantes hay una variación en el comportamiento 135- 155 mg/dL.

Esto se debe a que la glibenclamida es un hipoglucemiante y por lo tanto disminuye los niveles de glucosa en sangre, por lo que en los primeros días tendrá un mayor efecto debido a la concentración inicial.

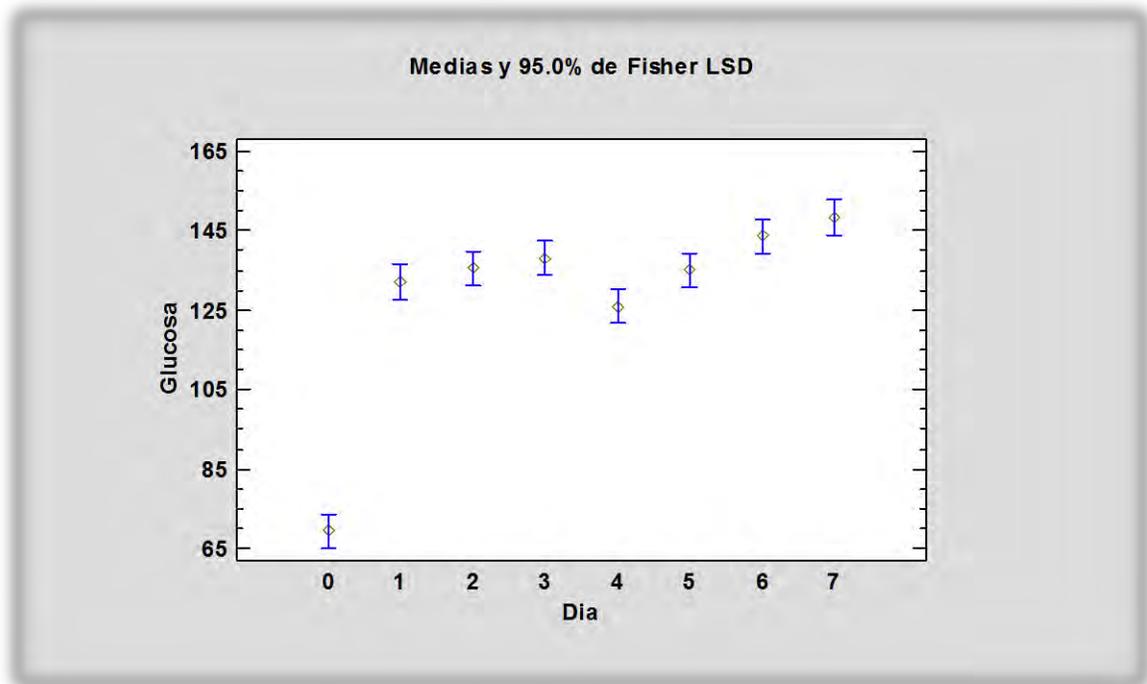


Figura 2. Resultados obtenidos de glucosa en sangre durante 7 días.

El estudio se realizó para conocer la biocompatibilidad de las matrices monolíticas las cuales contenían glibenclamida como principio activo. De acuerdo con los resultados obtenidos y analizados, los monolitos no causan alteración o daño en el organismo, ya que no se presentó muerte de los animales durante el estudio, las alteraciones encontradas en los órganos se debe al tratamiento con la glibenclamida posiblemente por la absorción, distribución y eliminación de dicho fármaco.

Esto resulta muy interesante ya que al no causar daño dicho monolito se puede emplear como alternativa en la innovación de nuevas formulaciones de liberación prolongada en tratamiento de enfermedades degenerativas como diabetes.

## **10. CONCLUSIONES**

- ∞ Los monolitos no causan alteración o daño alguno que comprometan al organismo de los animales empleados en el estudio.
- ∞ Los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas no representan alteración fisiológica en hígado, riñón y corazón.
- ∞ Los niveles de glucosa en sangre disminuyeron durante los primeros días del estudio.

## 11. REFERENCIAS

1. Gareth J, Rajendra K, Farzad F, Mustafa A, Cheol-Min H, Chinmaya M, Hae-Won K. Sol-gel based materials for biomedical applications. *Progress in Materials Science* 2016 January ;77: 1-79
2. Nieto A. Aplicaciones biomédicas de materiales mesoporosos de sílice y de carbón (Tesis Doctoral). Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2011.
3. Binker CJ, Scherer GW. Sol-Gel Science. The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing. San Diego, California: Academic Press; 1989.
4. Ramírez M, Huirache R, Espinosa G, Hernández G. Estado del arte del proceso sol-gel en México. *Espacio del divulgador* 2010 March; 1 7(2): 183-188
5. López T, Manjarrez J, Rembao D, Vinogradova E, Moreno A, González RD. An Implantable Sol-Gel Derived Titania-Silica Carrier for the Controlled Release of Anticonvulsant. *Materials Letters* 2006 Octubre; 60(23):2903-2908.
6. López T, Ortiz E, Alexander R, Basaldella E, Bokhimi X. Cortisol Controlled Release by Mesoporous Silica. *Nanomedicine* 2008; 5(2): 1-8
7. Böttcher H, Slowik P. Sol Gel Carrier Systems for Controlled Drug Delivery. *Journal of Sol-Gel Science Technology* 1998 January; 13: 277-281.
8. Langer R. New methods for drug delivery. *Science* 1990 September; 249:1527-1533.
9. Williams D. The Williams dictionary of biomaterials. University Press, Liverpool, 1999.

10. McLaughlin K, Chow W, Levy L. Amorphous silica: a review of health Effects from Inhalation Exposure with Particular Reference to Cancer. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 1997 April; 50(6): 553-566.
11. Reffitt DM, Jugdaohsingh R, Thompson R, Powell J. Silicic acid: its gastrointestinal uptake and urinary excretion in man and effects on aluminium excretion. *Journal of Inorganic Biochemistry* 1999; 76: 141-147.
12. NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2006, Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la Industria química farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos.
13. Vettorazzi G. Ensayos necesarios para la valoración toxicológica de las sustancias químicas. Ginebra, Suiza: Organización Mundial de la Salud, Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas.
14. Klaassen CD, Watkins JB. Casarett and Doull's. *Toxicology. The Basic Science of Poisons*. 6ª ed. United States of America: McGraw-Hill; 2011.
15. Patiño MN. *Farmacología Médica*. México: Panamericana; 2008.
16. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline Duration of Chronic Toxicity Testing IN Animals (rodent and non-rodent toxicity testing) S4, 1988.
17. Kurien T, Everds N, Scofield R. Recolección experimental de orina en animales. *Laboratory Animals* 2004; 38: 333-361.
18. Organización Mundial de la Salud. Pautas para la evaluación de los medicamentos destinados al hombre. Series de informes técnicos No. 563, Ginebra; 1975.
19. Bruce M. Bruce A. Berne y Levy *Fisiología*. 6ª ed. El sevier; 2010.

20. Venado EA, Moreno LJ, Rodríguez AM, López CM. Insuficiencia Renal Crónica. México DF: Universidad Nacional Autónoma de México, Unidad de Proyectos Especiales; 2009.
21. Ruiz G. Ruiz A. Fundamentos de la interpretación clínica de los exámenes de laboratorio. 2ª ed. México: Médica Panamericana; 2010.
22. Pagana K, Pagana T. Laboratorio clínico Indicaciones e interpretación de resultados. México: Manual Moderno; 2014.
23. Fernández J. Fisiología Humana. 4ª ed. Mc Graw-Hill; 2010.
24. García M, Zurita M. Transaminasas: Valoración y significación clínica. Asociación Española de Pediatría, Protocolos diagnósticos-terapéuticos de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica SEGHNPAEP.
25. Balcells A. La clínica y el laboratorio. 20ª ed. España: El Sevier; 2006.
26. Marroquín R, Mora JL, Cabrera Y, Flores M, Hernández J, Palestino F. Manual de prácticas de laboratorio de microbiología e inmunología para el área de la salud. Universidad Nacional Autónoma de México, FES-Z; 2009.
27. Túnez F. Proteínas. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Córdoba. Disponible en: <http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/28proteinas.pdf>
28. Fox S. Fisiología humana. 13ª ed. China: McGraw-Hill; 2014.
29. Janson B. El cuerpo humano. Salud y enfermedad. 11ª ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health; 2010.
30. Perryman M, Kerner S, Bohlmeyer T, Roberts R. Insolation and Sequence Analysis of a full-length cDNA for Human M Creatine kinase. Biochemical and Biophysical 1986; 140 (3): 981-989.

31. Marroquín-Segura R, Calvillo-Esparza R, Mora-Guevara JL, Tovalín-Ahumada JH, Aguilar-Contreras A, Hernández-Abad VJ. Increase acetylcholine esterase activity produced by the administration of an aqueous extract of the seed kernel of *Thevetia peruviana* and its role on a cute and subchronic intoxication in mice. *Pharmacognosy Magazine* 2014; 10(37): 171-175.
32. Velázquez S. Manual de prácticas bioquímica Clínica. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México; 2009. Disponible en: [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/MANUALBIOQUIMICACLINICA\\_10817.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/MANUALBIOQUIMICACLINICA_10817.pdf)
33. Laurence L. Goodman and Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 12<sup>a</sup> ed. México: Mc Graw-Hill; 2012.

## 12. ANEXO

### 12.1. Proteinogramas obtenidos en el programa Image J

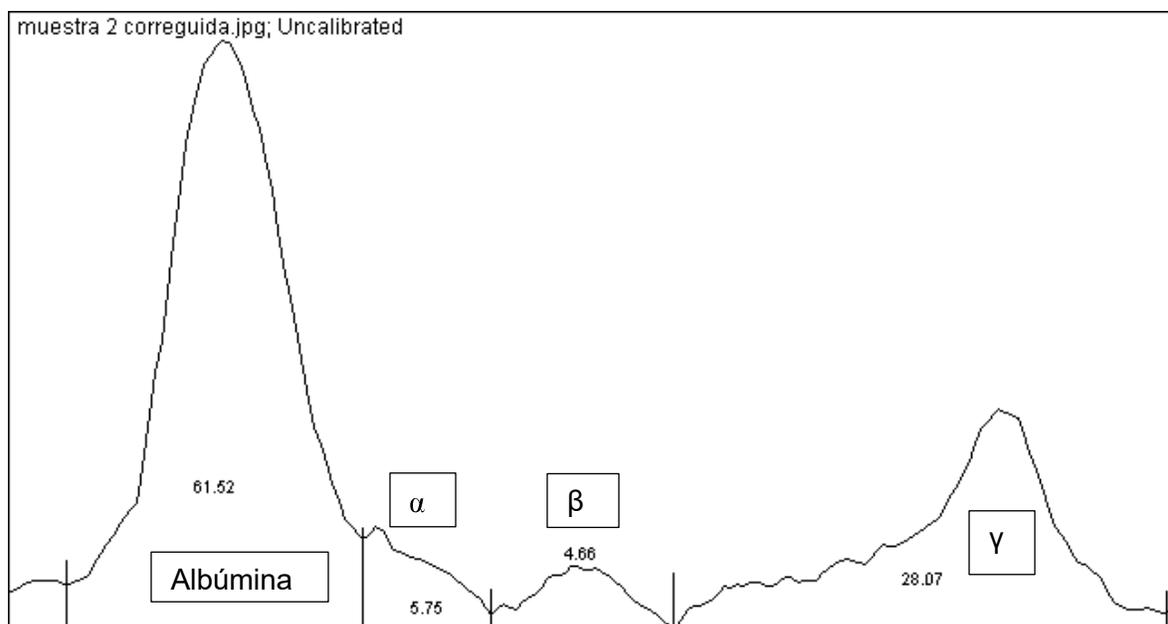


Figura 1. Proteinograma grupo control

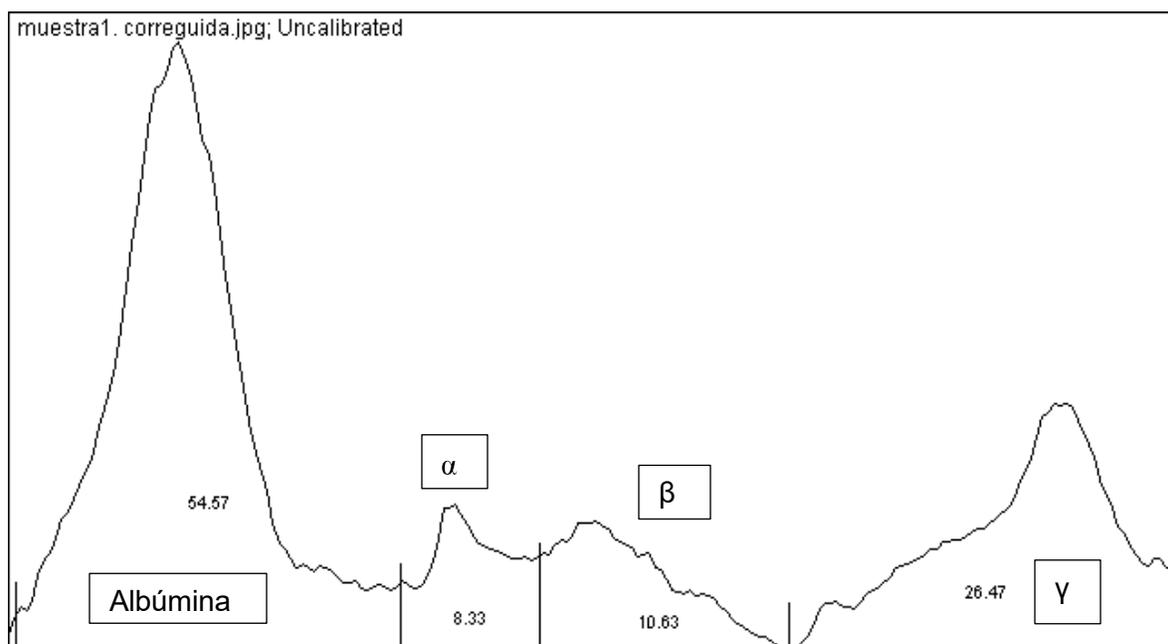


Figura 2. Proteinograma grupo tratado monolito-glibenclamide

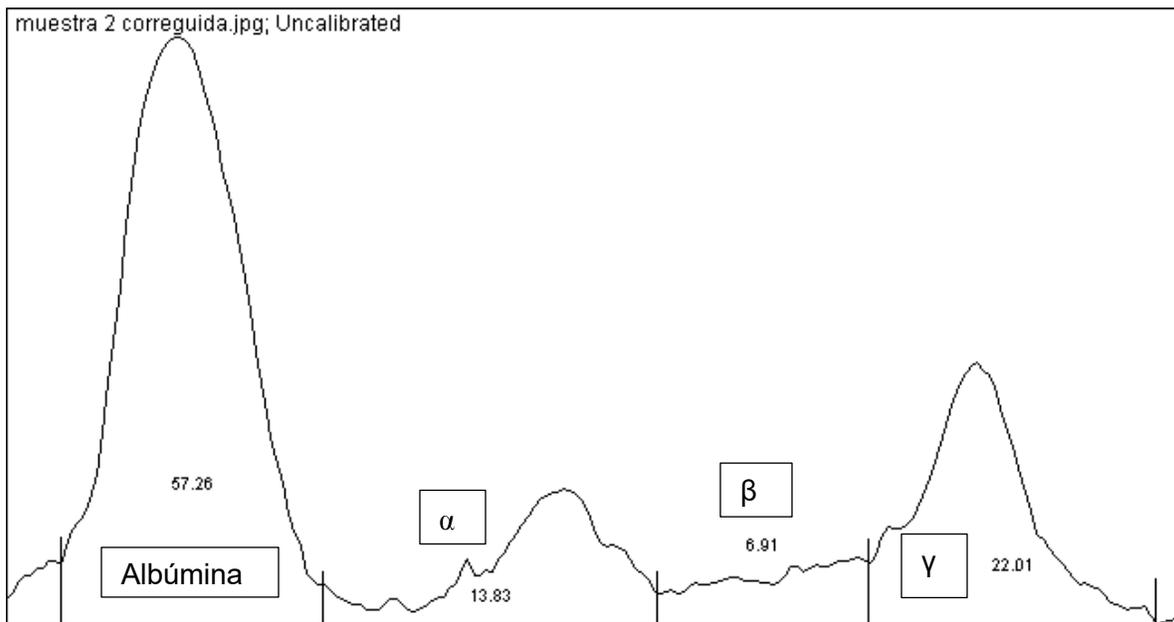


Figura 3. Proteinograma grupo tratado monolito-glibenclamida mas solución de glucosa 50%