



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**TÍTULO DEL PROYECTO**

“CONCENTRACIÓN GLUCÉMICA EN RATAS Wistar diabéticas tipo I, inducidas  
experimentalmente, después del  
tratamiento con una formulación innovadora de insulina y liposomas”

**T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MEDICINA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

**PRESENTA:**

DANAE BELEMBALDERAS VAZQUEZ

TUTOR PRINCIPAL:

**SARA DEL CARMEN CABALLERO CHACÓN**

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA Y FARMACOLOGÍA FMZ. UNAM

Ciudad Universitaria CDMX 2020.



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.

## AGADECI MIENTOS

Ala Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por brindarme la oportunidad de formarme académicamente.

A mi asesora Sara del Carmen Caballero Chacón por la paciencia y apoyo que me brindó.

Ala Dra. Dinorah Vargas Estrada por su apoyo para la realización de este proyecto.

Ala Dra. Sheila Peña Corona por aportar conocimientos estadísticos en este ensayo.

Ala UNEXA por permitir el uso de sus instalaciones para la realización de este proyecto, así como todo el personal que colaboró.

Al proyecto PAPIITIT202317 por el apoyo económico a esta tesis.

## DEDICATORIA

Con mucho cariño y amor.

A Dios, por permitirme llegar hasta aquí, al darme salud y fuerza, por iluminar mi mente y poner en mi camino a las personas indicadas para lograr este sueño.

A mi madre por creer en mí, dándome todo su apoyo incondicional y recordarme todo el tiempo que no debo rendirme.

A Ricardo Valencia si nti ja más hubi era llegado hasta aquí y porque eres lo más importante en mi vida.

A mi asesora de tesis Dra. Sara del Carmen Caballero, por tanta paciencia y apoyo desde que la conocí.

A Diana Berítez porque si nti este sueño nunca se habría podido lograr, y por todo tu apoyo durante mi carrera.

A todas las personas que no mencioné, pero me brindaron su apoyo para la realización de este proyecto

## Índice

<b>1.0</b>	Introducción	5
<b>2.0</b>	Marcos teórico	8
<b>2.1</b>	Clasificación y etiología	8
<b>2.2</b>	Fisiopatología de la Diabetes mellitus	9
<b>2.3</b>	Diabetes mellitus no cetósica	10
<b>2.4</b>	Diabetes mellitus no tratada o cetoadiósica	10
<b>2.5</b>	Diagnóstico	12
<b>2.6</b>	Tratamiento con Insulina	13
<b>2.7</b>	Diabetes inducida por estreptozotocina	15
<b>2.8</b>	Lipomas	16
<b>3.0</b>	Justificación	17
<b>4.0</b>	Hipótesis	18
<b>5.0</b>	Objetivo	18
<b>5.1</b>	Objetivos específicos	18
<b>6.0</b>	Materiales y métodos	19
<b>6.1</b>	Animales, Ratas Wistar	19
<b>6.2</b>	Ingredientes de los formulados	20
<b>6.3</b>	Eutanasia de los animales	21
<b>7.0</b>	Resultados	21
<b>8.0</b>	Discusión	24
<b>9.0</b>	Conclusión	28
<b>10.0</b>	Bibliografía	29

## 1.0 Introducción

La diabetes mellitus (DM) en perros se considera una enfermedad crónica que está relacionada con altas concentraciones de glucosa en sangre, diversas son las causas por las que las células no pueden usar monosacáridos como fuentes de energía permitiendo su almacenamiento en el cuerpo, por lo que, si no se hace un diagnóstico oportuno o un control adecuado se pueden generar daños irreversibles en todos los tejidos y como consecuencia, esto conducirá a enfermedades secundarias que pueden causar un mayor deterioro del paciente e incluso poner en riesgo su vida.

La DM en perros por lo tanto es una enfermedad cuya prevención, diagnóstico y control se hace a través de la medición de los niveles de glucosa, ya que su concentración en el torrente sanguíneo es un factor que determina la cantidad de este carbohidrato en el líquido intersticial, así como el transporte de glucosa a las células y, por tanto, su uso como fuente de energía. Otro factor importante sobre el monitoreo de la glucosa está relacionado con la presencia de otras enfermedades, como el sobrepeso o la obesidad. Es importante destacar que el diagnóstico de estas enfermedades cada vez es mayor en medicina veterinaria de acuerdo a lo expuesto por González y (Bernal 2011, Du et. al. 2017); (Tropf et. al. 2017); (Glor et. al. 2016).

En los perros, el rango fisiológico de glucemia es de 75 - 120 mg/dL en estado de ayuno, pero puede elevarse a 180 - 200 mg/dL después de la ingesta de alimentos. Existen trastornos metabólicos en los que si se produce una hiperglucemia persistente con un rango que supere > 162 mg/dL se considera como diabetes mellitus (Davison, et. al. 2017).

En México no existe un reporte particular sobre la prevalencia de la diabetes carina, pero el número de pacientes diabéticos parece estar en aumento a nivel mundial (Davison et. al. 2008).

En general, la DMse puede causar debido a la deficiencia relativa o absoluta de la hormona insulina por parte de las células beta del páncreas, en los islotes de Langerhans, situación que ha llevado a que el principal tratamiento sea la administración exógena de esta hormona por vía inyectable. Sin embargo, un control exitoso de los niveles de glucosa sanguínea requiere de múltiples inyecciones diarias y algunos efectos adversos en los sitios de aplicación. Esta falta de flexibilidad del tratamiento y las molestias causadas por las múltiples aplicaciones generan estrés e incomodidad en los pacientes, lo que puede causar fallas por un tratamiento inadecuado. Con el fin de mejorar el tratamiento para pacientes con esta condición se han hecho intentos por desarrollar soluciones basadas en la ingeniería genética, aplicando dispositivos que contienen insulina recombinante y rutas alternativas de administración de la insulina con diferentes vidas medias. Se han evaluado múltiples vías de administración con diferentes resultados clínicos; sin embargo, la vía oral podría ser una vía atractiva sobre todo para el paciente dado que evitaría molestias por las inyecciones y divididos a la hora de administrarla (Arciniegas et. al. 2018).

El tratamiento con insulina es altamente específico y efectivo frente a esta enfermedad y lo que se busca es simular la secreción fisiológica de la insulina, la cual ocurre de manera continua, para mantener el nivel basal de glucemia, y ocurre también de manera aguda, desencadenada por el aumento de la glucemia postprandial. Resulta interesante pensar que, para favorecer la utilización de la insulina por vía oral, se han desarrollado nanopartículas con polímeros naturales y sintéticos, con el fin de encapsularla para protegerla de las condiciones

del tracto gastrointestinal y así mismo favorecer su absorción. Se han probado también formulaciones de insulina por vía oral basadas en nanopartículas lipídicas o en liposomas, ya que, además, éstas tienen varias ventajas sobre otros sistemas, debido a que presentan muy poca o ninguna toxicidad pues son sistemas biodegradables (Dave, et. al. 2013). Los liposomas se han utilizado como un medio para administrar la insulina y favorecer su distribución directamente al hígado a partir de un sitio de la inyección periférica y prolongar la acción de la insulina. Las rutas alternativas se han vuelto muy importantes en la investigación, y se han inducido las investigaciones sobre las diferentes vías como la oral, nasal, rectal, pulmonar, ocular o la transdérmica (Arciniegas et. al. 2018)

Una formulación oral exitosa protegería la insulina de ser degradada en el estómago y permitiría disponer a la hormona, intacta, y protegida para su absorción en el tracto gastrointestinal (Kanerek et. al. 2016). La formulación con insulina tendría que superar algunas barreras naturales para alcanzar la absorción intestinal, estas barreras incluyen: las condiciones del pH gastrointestinal, que varían desde el pH gástrico ácido en el estómago al intestinal ligeramente que es básico, el medio ambiente, las barreras enzimáticas luminal, epitelial intestinal y la mucosidad intestinal (Mahato, et. al. 2003).

Investigaciones previas han demostrado que el uso de liposomas protege a los fármacos de la degradación y mejoran su absorción a través de las membranas mucosas, la principal desventaja es el adaramiento rápido de los liposomas por el organismo (Mahato, et. al. 2003).

El uso de liposomas basados en la administración oral de insulina se ha investigado ampliamente en estudios con animales; se han reportado reducciones variables en la glucemia dependiendo de diferentes factores incluyendo la composición lipídica de estos, la presencia o la ausencia de surfactante, el tamaño, la carga superficial, el estado físico de la



bi capa de fosfídipidos empleados, así como los excipientes utilizados. En otros casos, se ha demostrado que la modificación de liposomas con diferentes polímeros y surfactantes protegen eficazmente a los liposomas. (Yun, et. al. 2012).

## **2.0 Marco Teórico**

### **2.1 Clasificación y Etiología**

Considerando la base fisiopatológica, la diabetes mellitus (DM) se clasifica en tipo I y tipo II

- La DM Tipo I: se caracteriza por la destrucción o pérdida progresiva de células  $\beta$ , obteniendo así ausencia repentina y completa de la insulina y puede tener una pérdida gradual a medida que las células  $\beta$  son destruidas. Es de origen autoinmune y de tipo hereditario
- La DM Tipo II: se caracteriza por una resistencia a la insulina y/o disfunción de las células  $\beta$ , en donde la insulina puede estar aumentada, disminuida o normal. Se relaciona con problemas metabólicos y obesidad o son secundarios a otras enfermedades endocrinas o a la administración de medicamentos (Ochoa, et. al. 2007).
- La DM en la dinámica de perros se clasifica en diabetes mellitus dependiente de insulina (DMI) o tipo I y diabetes mellitus no dependiente de insulina (DMND) o tipo II.
- DMI: es la más reconocida en casi todos los perros del 50 a 70%, se caracteriza por una deficiencia de insulina y la necesidad vital de terapia con insulina exógena.
- DMND es más frecuente en el gato que en el perro, la etiopatogenia es multifactorial asociada a obesidad en algunos casos.

La diabetes mellitus se presenta en perros entre los 4 y 14 años de edad, las hembras son más afectadas que los machos y las razas más frecuentemente afectadas son: Poodle, Schnauzer,

Sa moyedo, Rottweiler, Pastor Alemán y Golden Retriever, entre otras. Si bien, la mayoría de los carinos al momento de ser diagnosticados se sitúa entre los 4 y los 14 años, estudios epidemiológicos han demostrado que los perros que se ven más afectados son los menores de 5 años (Ochoa, et. al.2007)

## **2.2 Fisiopatología de la Diabetes.**

La etiología de la diabetes mellitus en el perro es principalmente autoinmune de índole hereditaria. Finalmente, el resultado es una pérdida irreversible de la función de las células  $\beta$  pancreáticas y por lo tanto la falta de la insulina y sus efectos en el cuerpo. Entre los otros factores desencadenantes, se han encontrado la predisposición genética, infecciones, medicamentos que produzcan resistencia a la insulina, la pancreatitis y la obesidad, en conjunto relacionados con un estado de insulinoresistencia.

## **2.3 Diabetes Mellitus no cetósica**

En pacientes con diabetes, la deficiencia de insulina disminuye la utilización de glucosa, aminoácidos y ácidos grasos por los tejidos. La glucosa obtenida en la dieta o a partir de la gluconeogénesis hepática se acumula en la circulación causando hipergucemia y cuando ésta se eleva, la capacidad de las células de los túbulos renales para reabsorber glucosa a partir del ultrafiltrado glomerular es superada y aparece la glucosuria. Esto ocurre cuando la glucosa en sangre excede en el perro 99 a 120 mg/dL. La glucosuria provoca diuresis osmótica lo que ocasiona poliuria y polidipsia compensatoria, la cual previene la deshidratación. La disminución de glucosa periférica promueve el desdoblamiento de las proteínas del músculo y la grasa para producir glucosa en el hígado por la vía gluconeogénica, promoviendo la

pérdida de peso. A pesar de la hiperglucemia el paciente presenta polifagia. Por lo que los cuatro signos de la DM son: poliuria, polidipsia, polifagia y pérdida de peso (Ochoa, et. al. 2007).

#### **2.4 Diabetes mellitus no tratada o cetoadicótica.**

La cetoadicosis diabética (CAD) es una complicación grave de la diabetes mellitus, ésta ocurre más a menudo en perros y gatos con diabetes no diagnosticada previamente, con menor frecuencia aparece en el perro o gato diabético tratado con insulina que recibe una dosis inadecuada de ésta. La CAD es muy compleja y puede ser complicada por las enfermedades dísticas concurrentes (pielonefritis, pancreatitis, piometra, hipertiroidismo, insuficiencia renal, insuficiencia cardíaca, asma, infecciones de vías urinarias, hipoadrenocortisolismo, etc.). Casi todos los pacientes con CAD tienen deficiencia relativa o absoluta de insulina; las concentraciones circulantes de las hormonas diabéticas están aumentadas en los pacientes con CAD; sin embargo, el efecto de estos trastornos hormonal es la acentuación de la deficiencia de insulina mediante el desarrollo de resistencia a la insulina, estimulación de la lipólisis que lleva a la cetogénesis y gluconeogénesis que empeora la hiperglucemia. Es frecuente que los perros o gatos con CAD tengan alguna enfermedad coexistente como: pancreatitis, infección, gastroenteritis o insuficiencia cardíaca congestiva. Estos problemas incrementan la secreción de hormonas diabéticas circulantes (epinefrina, glucagón, cortisol y hormona del crecimiento) que, además, son inductoras de la resistencia a la insulina. La deficiencia de insulina, y el incremento de hormonas contrarreguladoras, estimulan la cetogénesis. La síntesis de cuerpos cetónicos (ácido acetacético y  $\beta$ -hidroxi butírico) requieren de 2 alteraciones: aumento en la movilización de Ácidos Grasos Libres (AGL) a partir

de los depósitos de triglicéridos en tejido adiposo y desvío en el metabolismo hepático de la síntesis hacia la oxidación de grasas y cetogénesis ( Meyer, et. al. 2004).

La insulina es un inhibidor de la lipólisis y de la oxidación de AGL. La deficiencia de insulina incrementa la lipólisis aumentando la disponibilidad de AGL al hígado que promueve la cetogénesis. Si las cetonas se acumulan en el espacio extracelular superan el umbral del túbulo renal y son eliminadas por orina, contribuyendo a la diuresis osmótica, generada por la glucosuria y excreción de sodios.

La poliuria, polidipsia, pérdida de peso y polifagia, son los signos clínicos más relevantes, la poliuria y polidipsia se desarrollan hasta que se presenta la glucosuria; se puede llegar a presentar aliento cetónico, cataratas (favorecida por la hiperglucemia crónica), intolerancia al ejercicio, hepatomegalia y finalmente falla renal. En gatos se presenta debilidad de miembros posteriores debido a neuropatía periférica, a menudo se dejan de acicalar y pueden tener un pelo descuidado y seborrea seca; en caso de diabetes mellitus cetoadtóica se presenta depresión, letargia, deshidratación, anorexia, vómito y taquipnea. Estos pacientes si no se tratan con insulina entran en un estado que podría ser letal ( Meyer, et. al. 2004)

## 2.5 Diagnóstico

El diagnóstico se basa en la historia clínica, anamnesis y pruebas de laboratorio.

- Hemograma. Se presenta eritrocitosis relativa por hemoconcentración, debido a la deshidratación, en muy pocas ocasiones existe anemia ligera no regenerativa, que se asocia a inflamación crónica. El leucograma es de inflamación y puede haber neutrófilos tóxicos si existen complicaciones inflamatorias e infecciosas ( Meyer, et. al. 2004).
- Bioquímica sanguínea. Hiperglucemia hipercolesterolémica e hipertriglicéridemia por alteración en el metabolismo de lípidos, incremento de ALT por degeneración hepatocelular,

hiperbilirrubinemia e incremento de FA por colestasis, en casos de lipodosis hepática (gatos), hiperazotemia prerrenal por deshidratación, acidosis metabólica por ganancia de ácidos en caso de diabetes mellitus cetoadicótica.

- Urianálisis. La densidad urinaria  $>$  a 1.015, glucosuria, cetonuria en casos de diabetes mellitus cetoadicótica, generalmente se presenta infección de vías urinarias, por lo tanto, se observa proteinuria, leucosuria, hematuria y bacteriuria.

Para diferenciar la hiperglucemia que se presenta por estrés, de la hiperglucemia por diabetes mellitus, se pueden determinar fructosamina sérica y hemoglobina glucosilada, que son proteínas que se unen a la glucosa de manera irreversible. En caso de hiperglucemia crónica, aumenta la unión de la glucosa con estas proteínas, encontrándose elevadas en suero, mientras que, en la hiperglucemia por estrés, no hay aumento de estas proteínas glucosiladas.

- Fructosamina. Es un marcador de la concentración media de glucosa en sangre durante el periodo de vida de la proteína, que varía entre una y tres semanas, a mayor promedio de concentración de glucosa en sangre durante las 1 a 3 semanas precedentes, habrá mayor concentración de fructosamina en suero. Es importante considerar los diagnósticos diferenciales como: hiperadrenocortisismo, pirometra e insuficiencia renal (perros) e hipertiroidismo (gatos) y, por otra parte, se deben descartar otras causas de hiperglucemia: estrés, pancreatitis aguda, hiperadrenocortisismo, gestación y farmacoterapia (corticosteroides, progestágenos y soluciones parenterales con dextrosa). Asimismo, las complicaciones por diabetes mellitus se deben tener presentes: cataratas, hipoglucemia, pancreatitis crónica, infecciones recurrentes, pobre control glucémico, cetoadicosis e insuficiencia renal crónica (Thrall, et. al. 2012)

## 2.6 Tratamiento con insulina

La insulina comercial se encuentra en múltiples formas de presentación que difieren en cuanto a su concentración, duración, pureza y costo. Existen tres grupos generales de insulina para perros y gatos que son de acción rápida, intermedia y prolongada (Cuadro 1).

Dentro de los diferentes tratamientos que existen para tratar la diabetes se encuentran las insulinas comerciales que tienen diferentes denominaciones como: la de acción ultrarápida, regular, intermedia, de acción prolongada (Rodríguez, et. al. 2003).

Insulina	Inicio	Máximo	Duración
Ultrarápida	5 – 15 Minutos	30 – 75 Minutos	3 – 4 Horas
Regular	30 – 45 Minutos	2 – 3 Horas	4 – 6 Horas
Intermedia	2 – 4 Horas	8 – 10 Horas	10 – 14 Horas
Acción prolongada	1.5 Horas	No tiene pico	24 Horas

Cuadro 1: Características generales de las presentaciones farmacéuticas de la insulina

La insulina de acción rápida se presenta en forma de solución, que puede administrarse por cualquier vía, intravenosa (IV), intramuscular (IM) y subcutánea (SC); suele utilizarse en la regulación de la diabetes complicada, dado que se necesitan ajustes de acción rápida. Su acción se inicia dentro de un rango de una a cuatro horas, y su tiempo de vida media en el organismo es de ocho horas (Hardy, et al., 1998). Tiene la desventaja de que requiere varias aplicaciones al día y puede haber renuencia y divido del dueño para dar el tratamiento.

La actividad de la insulina de acción intermedia oscila en un promedio de nueve horas, y tiene un tiempo de vida media en el organismo de 24 horas; este producto se utiliza más, debido a que se requiere sólo una administración al día (Hardy, et. al. 1998). Finalmente, la insulina de acción prolongada, cuya su actividad permanece a las 12 horas post administración, y tiene

un tiempo de vida media en el organismo de entre 24 a 36 horas, cuando es administrada por vía subcutánea a una dosis diaria (Hardy, et. al. 1998). Sin embargo, el costo de estos últimos tratamientos es bastante alto por lo que muchos propietarios no aceptan este programa de tratamiento. La zona corporal donde se aplica la inyección debe de alternarse frecuentemente, para evitar la formación de hematomas y procesos inflamatorios, además de que producen lipodistrofia en el sitio de aplicación y debido a lo cual induce incomodidad y miedo al paciente, de ahí la renuencia del propietario a su administración.

## **2.7 Diabetes inducida por estreptozotocina**

La inducción a diabetes se ha logrado por medio de diversas técnicas experimentales. En 1889, Von Mering y Minkowski produjeron diabetes experimental en perros mediante la remoción quirúrgica del páncreas. Desde entonces, la pancreatectomía total se usa en muchas especies, con el propósito de crear modelos experimentales. En omnívoros y herbívoros como conejos, cerdos, monos, y peces sólo se presenta un estado diabético caracterizado por glucosuria moderada y cetonuria variable (Peppas, et. al. 2006).

El uso de agentes químicos para producir diabetes, permite realizar estudios detallados de los eventos bioquímicos y morfológicos que ocurren durante y después de la inducción de un estado diabético. Existen varias clases de agentes químicos. Los primeros son sustancias con citotoxicidad específica que destruyen las células  $\beta$  del páncreas y causan un estado de deficiencia primaria de insulina. El segundo grupo lo constituyen agentes que actúan sobre las células  $\beta$  pero no las destruyen. Una tercera clase incrementa los requerimientos endógenos de insulina, debilitan al páncreas y como consecuencia se produce la diabetes. Este último grupo incluye a las hormonas antagonistas de la insulina, anticuerpos anti-insulina

y algunos agentes quelantes, en particular del zinc. Los agentes más utilizados son la alloxana y la estreptozotocina. Estos compuestos en dosis diabétogénicas actúan específicamente sobre las células beta. La estreptozotocina es una sustancia relativamente selectiva para las células beta, en ciertas especies causa diabetes permanente. La fijación a la membrana, a semejanza con la alloxana, es el primer evento en el proceso patológico. Algunas evidencias indican que la toxicidad de la estreptozotocina está mediada por el reconocimiento específico de algunos receptores sobre la célula beta. Se cree que provoca un decremento en los niveles del dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD), ya que puede disminuir tanto su síntesis como incrementar su hidrólisis. La nicotinamida protege a los animales contra la diabetes tanto de estreptozotocina como de alloxana. (Kanarek et. al. 2015).

## **2.8 Liposomas**

Los liposomas se descubrieron en 1961 por Bangham quienes observaron que algunos lípidos forman estructuras membranosas cuando están en disolución acuosa. Estas estructuras vesiculares altamente organizadas están constituidas por bicapas lipídicas concéntricas que encierran un interior acuoso. Para su elaboración se utilizan fosfolípidos con o sin la incorporación de colesterol, tocoferol, sondas fluorescentes u otros materiales, introducidos en la bicapa lipídica con el fin de dotar a las vesículas de alguna propiedad particular como puede ser la carga superficial, reducir la permeabilidad de la membrana o incrementar la estabilidad de los lípidos en la bicapa. En los años 70, se inició el estudio sobre el potencial que presentan estos como sistemas de liberación de fármacos o de otras moléculas bioactivas. Los liposomas son capaces de incorporar a su estructura moléculas hidrofílicas, hidrofóbicas y también las de carácter anfipático. Además, algunas de sus propiedades físicas



como carga superficial, tamaño, permeabilidad y rigidez de la pared, o su capacidad de carga son fácilmente modulables debido a la amplia variedad de fosfolípidos que existen. Por último, si se utilizan lípidos funcionalizados, se pueden unir anticuerpos u otros ligandos a la superficie del liposoma, lo que les convierte en sistemas que pueden acceder con mayor facilidad a determinados tejidos, por ejemplo los tumores (Casado, et. al 2007); (Arumozhi, et. al. 2004); (Kiss, et. al.2013).

Estudios en investigación preclínica realizados por Arciniegas, et. al., 2018, indican que las insulinas inducidas en liposomas por vía subcutánea disminuyen los niveles de glucosa, siendo esta la vía más efectiva. Esto indica que esta vía favorece la liberación prolongada de sus preparados o fármacos innovadores: (L23 Brij (1) y LF3-P407(2).

### **3.0 Justificación**

Es necesario realizar más estudios para mejorar el tratamiento con insulina en perros diabéticos, ya que el tratamiento se ha limitado al uso de la ruta parenteral a través de la aplicación de inyecciones subcutáneas e intramusculares, pero tiene muchas limitaciones, que incluyen dolor, mal estar, lipodistrofia, hipersensibilidad periférica e hipoglucemia. En el presente estudio se estudian diferentes formulaciones de diseños farmacológicos de insulina integrada en liposomas, en un modelo experimental de diabetes tipo 1 en ratas wistar, para conocer sus efectos sobre la glucemia al ser administrados por diferentes vías (Subcutánea y oral), con la finalidad de producir un efecto más prolongado en la disposición de insulina en el organismo y la reducción de la glucemia. Antes de probar este diseño farmacológico en perros o diabéticos es necesario complementar las pruebas preclínicas en rata Wistar con

diabetes mellitus tipo 1 para verificar el efecto de los preparados: L23 Brij (1) y LF3-P407 (2), a largo plazo e in uso contrastarlo con la vía oral.

#### **4.0 Hipótesis.**

Los preparados de liposomas inducidos con insulina humana y diferentes excipientes L23 Brij (TxF1) y LF3-P407 (TxF2), reducirán las concentraciones de glucemia por más de 12 horas en ratas Wistar inducidas con diabetes tipo 1, comparado con la insulina comercial.

#### **5.0 Objetivo.**

El presente estudio busca probar que un preparado basado en insulina integrada con liposomas produzca un efecto más prolongado sobre la reducción de la glucemia en ratas diabetizadas.

##### **5.1 Objetivos específicos:**

- Formar grupos de experimentación, y determinar las concentraciones de glucemia basales mediante glucometría.
- Inducir DB con ETZ y determinar las concentraciones de glucemia a diferentes tiempos mediante glucometría.
- Tratar a los animales de los diferentes grupos con los fármacos que corresponda.
- Conocer de las concentraciones de glucemia mediante glucometría a diferentes horarios y hasta cubrir 48 horas.

## 6.0 Material y métodos

### 6.1 Animales (ratas Wistar)

Se usaron 25 ratas Wistar machos, adultos y físicamente sanas, con 8 semanas de edad.

Los animales fueron adquiridos en el bioterio del Instituto de Neurobiología ubicado en Juriquilla Querétaro, debido a que es un bioterio certificado.

Se alojaron en la Unidad de Experimentación en animales (UNEXA), ubicada en el circuito de la Investigación Científica S/N del conjunto E de la Facultad de Química. Las ratas se mantuvieron en la sala de experimentación B-516, en las siguientes condiciones:

Temperatura: 22 °C

Densidad de población: 2 ratas por caja

Alimentación: Pellet D ET 5001 y agua a libre acceso

Tipo de cama: Viruta de madera, esterilizada en autoclave.

Los animales fueron manejados conforme a las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio NOM 062- ZOO 1999. El protocolo se sometió para su aceptación al ICUAL.

Los animales se dividieron en 5 grupos de 5 ratas cada uno. Los grupos se conformaron de la siguiente manera: Cuadro 2

**Control** = No diabético, sin tratamiento

**Sin TX**= Inducido a diabetes con Estreptozotocina sin tratamiento

Los grupos TxF1, Tx2 y TXC fueron previamente diabéticos con Estreptozotocina y recibieron los siguientes tratamientos:

**TxF1** = tratamiento con L23 Brij

**TxF2**= tratamiento con LF3-P407

**TxC=** tratamiento con insulina Pilsa

## 6.2 Ingredientes de los Formulados:

Preparado	INSULINA RECOMBINANTE HUMANA	L- AFOFATI DILCOJINA DE SOYA	CLATO DE SODIO	P407	BRIJ L23
IC	3 ml				
Brij L23 (F1)	3 ml	188.9 mg	25.8 mg		8.588 mg
LF3- P407(F2)	3 ml	188.9 mg	25.8 mg	21.47 mg	

A todos los animales de todos los grupos a excepción del control, se les indujo la diabetes tipo 1, previa medición de las concentraciones basales de glucemia y posteriormente se aplicaron 50 mg/kg de estreptozotocina por vía intraperitoneal (IP). Después de 24 horas se midió la glucemia para verificar si estaban diabéticas, las concentraciones de glucemia se encontraban por arriba de los 250 mg/dL (Epidia, et. al. 2008).

Una vez diabéticas, se administraron los tratamientos de las diferentes fórmulas de insulina adicionadas en liposomas. A los Grupos **TxF1 y TxF2** se probaron dos dosis 8 U y 15 U de los fármacos y al **Grupo TXFC** se le administró la insulina comercial 8 U sin liposomas, al grupo Sin Tx se le indujo la diabetes y no recibió tratamiento y el grupo Sin TX no presentaba diabetes ni recibió tratamiento. Todos los tratamientos fueron administrados por vía subcutánea (SC) y únicamente se aplicó en una ocasión.

El procedimiento de medición de glucosa se realizó puncionando la punta de la cola de la rata y tomando una gota de sangre para aplicarla al tirador del glucómetro marca One touch. En todos los grupos a excepción del control, al que se le determinó la glucemia basal, se les midieron las concentraciones de glucemia cada hora durante las primeras 9 horas, y a las 24, 28, 32 y 48 horas.

Todas las ratas tuvieron alimento y agua a libre acceso durante el estudio.

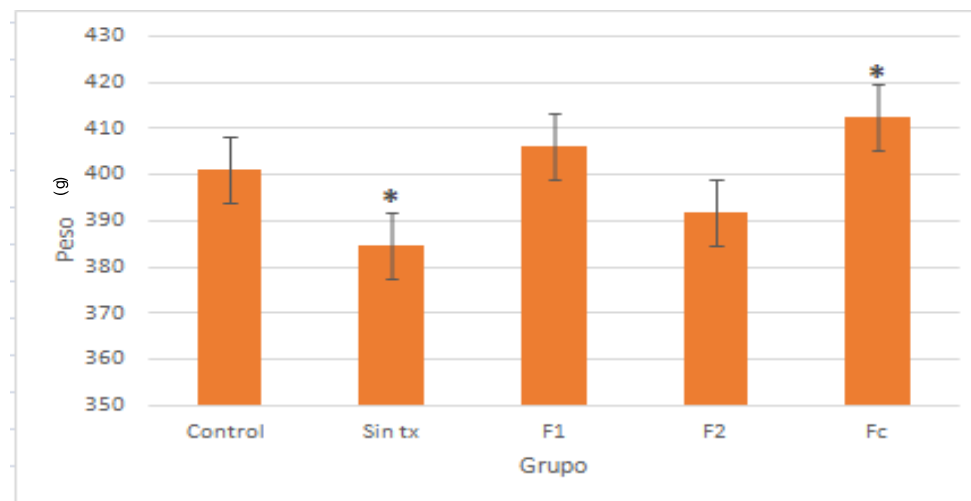
Después de un descanso de 4 días, para los **Grupos TxF1, TxF2 y TxC** se procedió de la misma manera en cuanto a las mediciones, pero con los tratamientos administrados por vía oral (PO).

### 6.3 Eutanasia de los animales

Al finalizar el estudio, los animales se les practicó la eutanasia, y posteriormente se pasaron a la cámara CO<sub>2</sub> por 5 minutos, ubicada en la UNEXA. Verificando que los animales no respiraran, no presentaran función cardíaca, ni los reflejos palpebral, interdigital y punta de la cola).

## 7.0 Resultados

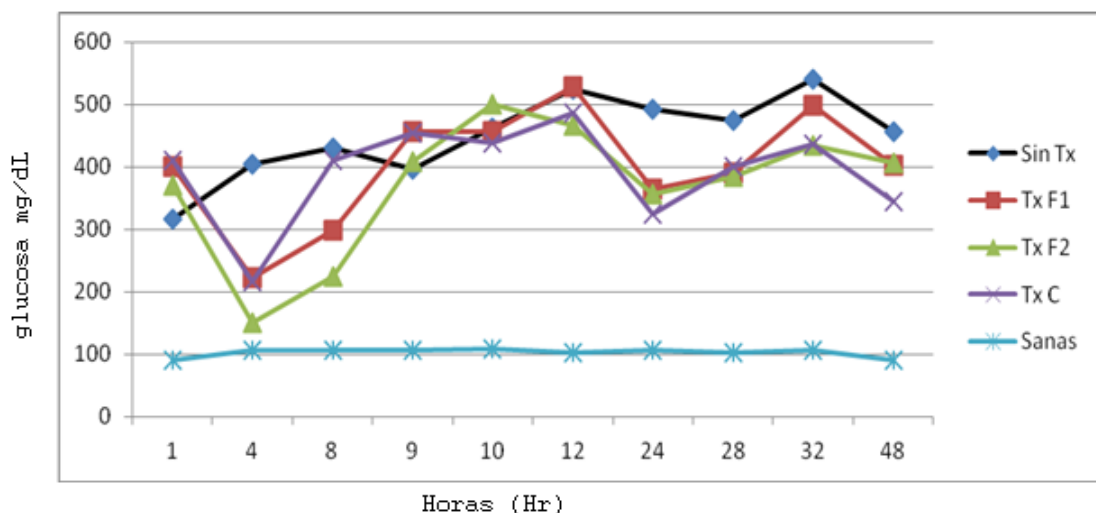
Se realizó el registro del peso corporal de cada uno de los animales en cada grupo durante todo el experimento y su cambio a través del tiempo, obteniendo una diferencia significativa entre el grupo Sin Tx y el grupo FC (\* p= 0.079) (Figura 1).



**Figura 1.** Gráfica de valores de peso medio de los animales en los diferentes grupos. Se observa mayor ganancia de peso en producto TxC con respecto al grupo sin tratamiento (Sin Tx) (\*= significativo).

A los animales de todos los grupos se les hicieron los registros basales de concentraciones de glucosa sanguínea obteniendo un valor promedio de 106.9 mg/dL ± 18.96 DS.

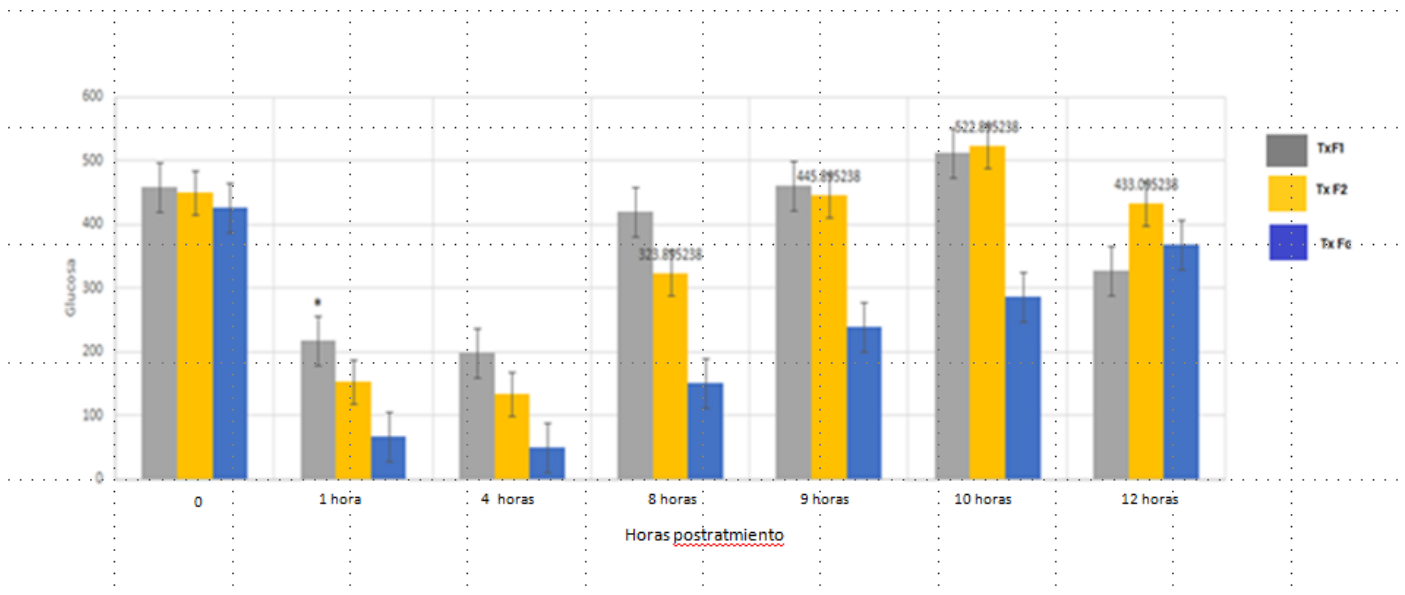
Los animales de los grupos: Sin Tx, Tx F1, Tx F2 y Tx FC fueron inducidos a diabetes mellitus tipo I mediante la aplicación de estreptozotocina (Sigma-Aldrich) en buffer de citratos por vía intraperitoneal (IP) a razón de 50 mg/Kg. De estos animales todos entraron en estado de diabetes tipo 1 (> 250 mg/dL) con excepción de 2 animales que se consideraron resistentes. A los animales que presentaron diabetes (glucosa mayor a 250 mg/dL) se les administraron los diferentes tratamientos (Tx F1, Tx F2 y Tx C) con una dosis de 8 U (Figura 2) y 15 U (Figura 3) por vía SC (subcutánea) y las concentraciones de glucosa se midieron a la hora 1, 4, 8, 10, 12, 24, 28, 32 y 48 horas. Donde se muestra que en los grupos con la dosis de 8U de Tx F1 y F2 la reducción de las concentraciones de glucosa a niveles normoglicémicos se mantiene hasta por 8 horas, 4 hora más que el tratamiento comercial (figura 2).



**Figura 2** Concentraciones de Glucosa en sangre de Ratas diabéticas con estreptozotocina, uno de los grupos sin tratamiento, 2 grupos tratados con Formulados innovadores de insulina denominado Tx F1 y Tx F2 y un grupo tratado con insulina comercial (Tx C), los tratamientos fueron administrados por vía SC en una sola dosis de 8 U y comparados con un grupo de ratas sanas.

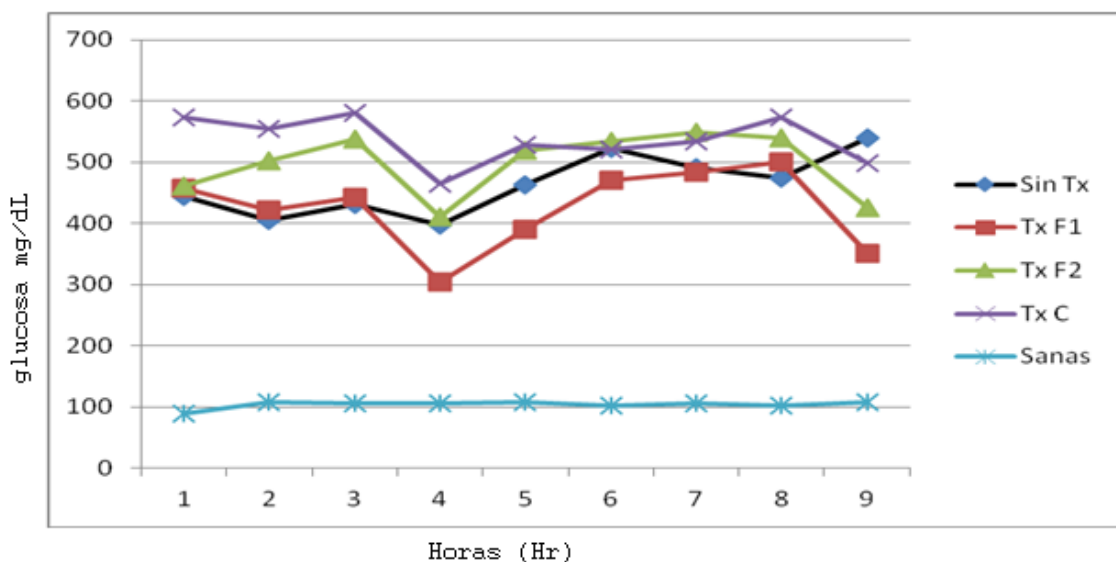
Con la dosis de 15 U Tx F1 y Tx F2 se muestra que los efectos normoglicémicos logrados por los tratamientos problema se alcanzaron dentro de las primeras 9 a 9:30 horas con un

incremento súbito de la glucemia a partir de las 10 horas, mientras que el TXC lo alcanzó inclusive un estado de hipoglucemia que perduró por 1 hora recuperando el estado normoglucémico 1 hora y media después, recuperando la glucemia paulatina mente hasta las 24 horas (Figura 3).



**Figura 3.** Concentraciones de Glucosa en sangre de Ratas diabéticas con estreptozotocina, uno de los grupos sin tratamiento, 2 grupos tratados con formulados innovadores de insulina denominado TxF1 y TxF2 y un grupo tratado con insulina comercial (TxC), los tratamientos fueron administrados por vía SC en una sola dosis de 15 U y comparados con un grupo de ratas sanas. Diferencias significativas  $p=0.001$  respecto al nivel de glucemia entre el grupo TxF1 y el TxC

El siguiente experimento consistió en que a los animales diabéticos (glucosa mayor a 250 mg/dL) se les administraron los diferentes tratamientos (TxF1, TxF2 y TXC) con sola dosis de 15 U por vía oral y las concentraciones de glucosa se midieron cada hora hasta las 9 horas postratamiento. En este caso ninguno de los tratamientos alcanzó concentraciones euglucémicas. Aunque todos los tratamientos mostraron una ligera reducción a la hora 4 postratamiento, el TxF1 mostró una tendencia a una reducción de la glucemia a las 4 y las 9 horas postratamiento (Figura 4).



**Figura 4** Concentraciones de glucosa en sangre de ratas diabéticas con estreptozotocina, uno de los grupos sin tratamiento, 2 grupos tratados con formulados innovadores de insulina denominado Tx F1 y Tx F2 y un grupo tratado con insulina comercial (Tx C), los tratamientos fueron administrados por vía oral en una sola dosis de 15 U y comparados con un grupo de ratas sanas.

## 8.0 Discusión

En el presente estudio se utilizó un modelo de Diabetes mellitus tipo 1 en rata wistar empleando estreptozotocina a dosis de 50 mg/kg por vía intraperitoneal (IP). Debido a que no presentaron hiperglucemia, algunas ratas fueron redosificadas en un intervalo de 24 hrs. De las 25 ratas solo 9 presentaron Diabetes Mellitus tipo 1 en las primeras 24 horas y las siguientes ratas requirieron de una segunda dosis de 50 mg/kg, de ellas, 2 nunca presentaron diabetes por lo que se consideraron resistentes de acuerdo con Damasceno, et al. 2005.

Se sabe que el efecto de la estreptozotocina depende de su dosis y la masa de células  $\beta$  afectadas. Por ejemplo, una dosis baja de estreptozotocina (igual o menor 50 mg/kg) afecta a las células  $\beta$  induciendo apoptosis solo en algunas células, por lo que causa una reducción



leve de la producción de insulina, adicionalmente la literatura informa que una pequeña dosis de estreptozotocina tiene la capacidad de prevenir la mitosis de los precursores de células  $\beta$  (Bequer, et. al. 2005). Al respecto, varios autores han reportado signos de regeneración en el páncreas siendo evidente a las dos semanas de evolución en ratas inoculadas en un ritmo diario, mientras que las inyectadas, hasta el quinto día mostraban alteraciones en el patrón histológico en el páncreas (Damasco, et. al. 2005). La capacidad de regeneración de las células  $\beta$  del páncreas en ratas *Wistar* disminuye rápidamente durante la primera semana después de la administración de estreptozotocina en dosis mayores a 50 mg/kg. Por lo tanto, dosis hasta por 100 mg/kg inducen Diabetes Mellitus tipo 1 prácticamente después de la primera dosis. En este ensayo se utilizaron de inicio 50 mg/kg, dado que en estudio previo se notó que un alto porcentaje de las ratas desarrollaba diabetes a las 24 horas y eso permite un ahorro en el uso de la estreptozotocina. Aun así, hay ratas que nunca llegan a presentar Diabetes Mellitus tipo 1 y se consideran resistentes (Bequer, et. al. 2005). Sin embargo, también puede ser que la vía de administración de estreptozotocina para la inducción de diabetes no haya sido la adecuada, ya que la vía IP en general es difícil de ejecutar de manera correcta, especialmente en pequeños roedores ya que no se puede asegurar que la dosis se esté administrando en la cavidad peritoneal o en el intestino, o la vejiga u otro órgano. Ocasionalmente se pueden dañar vasos sanguíneos produciendo hemorragias. Además, el uso repetido de esta técnica puede producir un serio estrés debido a la necesaria inmovilización. Es recomendable no inyectar más de una vez por día a un ritmo animal (Lewis et. al. 2016); (Daasen et. al. 2014).

Con respecto a la hipótesis planteada se observó que ninguno de los preparados problema o formulados innovadores, compuestos por insulina contenida en liposomas, redujo las

concentraciones de glucemia por más de 12 horas cuando fue administrada por vía SC, es decir se comportaron como la insulina comercial de acción intermedia (4-8 horas), cuyos efectos sobre la glucemia fueron variables dependiendo de la dosis utilizada. Así, se observó que, si se utilizaban 8 U de los productos problema, sus efectos más potentes sobre la glucemia se observaron de las 4 a 8 horas postratamiento. Las dosis de 15 U presentaron un efecto más potente, aunque con una inducción hacia un estado normoglicémico muy drástico y con duración máxima de 1:30 horas, así como una recuperación de hiperglucemia también drástica en el lapso de la siguiente hora. Comparada con el producto comercial a la doble dosis, éste produjo una hipoglucemia severa marcada con duración promedio de una hora y una recuperación paulatina de la hiperglucemia en un lapso de 10 a 24 horas postratamiento.

En lo que respecta a la administración de los tratamientos por vía oral, éstos no mostraron una reducción significativa en los niveles de glucosa. Eso sugiere que los formulados innovadores liposomas flexibles usados, no superaron todas las barreras GT, considerando que la insulina estaba protegida dentro de los portadores y adicionalmente protegida por un polímero, y de acuerdo a pruebas *in vitro* preliminares, soportaba los cambios de pH y la agresión enzimática, pero probablemente no fue suficiente para atravesar la capa mucosa. Es común que las partículas de los portadores de fármacos administrados por vía oral queden atrapadas dentro de la capa mucosa del intestino, independientemente de su tamaño. Estas partículas atrapadas en el moco tienen una capacidad muy limitada para la absorción sistémica y la administración de fármacos (Arciniegas, et. al. 2019).

Los desafíos para desarrollar una formulación de insulina oral están asociados superar las barreras que tendrían que cruzar. Además del pH la barrera principal es la absorción a través

de la membrana intestinal. En términos generales, la absorción de moléculas en el tracto gastrointestinal (GT) ocurre a través de la ruta paracelular o transcelular. Las moléculas con un alto peso molecular, como la insulina (6 KDa), no penetrarían a través de esta ruta. Este gran tamaño molecular, su carga y su hidrofilia impiden la absorción de insulina por difusión transcelular. Las uniones estrechas presentes entre las células impiden el transporte paracelular de drogas, con la excepción de las moléculas de drogas hidrofílicas que pesan menos de 200 Da (Mustata, et. al. 2006). Sin embargo, la evidencia morfológica y bioquímica para la absorción de insulina se demostró en la rata GT (Bendayan, et al 1994). Esto se logró mediante la infusión directa de insulina en varias partes del GT, seguido de visualización con marcadores de oro en inmunoensayo de insulina en sangre (Khan, et. al. 2003). Se descubrió que la insulina se adsorbe a la membrana plasmática apical y se internaliza por endocitosis (Bendayan, et. al. 1994). Por lo tanto, si los liposomas flexibles son lo suficientemente flexibles como para pasar a través de las membranas liposolubles por lo que deberían adaptar su forma para pasar incluso a través de uniones estrechas. (Cevc, et. al. 1998). Obstáculos adicionales son los cambios de pH y las enzimas en todo el GT. En el estómago hay proteasas aspárticas como la pepsina, en el intestino delgado, las proteasas pancreáticas que consisten en la serina endopeptidasa (tripsina,  $\alpha$ -quimotripsina, elastasa y exopeptidasas, carboxipeptidasas A y B) son responsables de la degradación de las proteínas (TenHoor, et. al. 1992).

Otra barrera que debe superar es la capa de moco presente en el intestino. El revestimiento de mucina presenta una barrera física en lugar de química. Se informa que la capa de mucina es más gruesa en el estómago y el colon, mientras que en el intestino delgado el grosor varía según el grado de actividad digestiva. La capa mucosa disminuye la velocidad de difusión de

Los fármacos para alcanzar la superficie de absorción de las células epiteliales, aunque el efecto es insignificante para los fármacos hidrofílicos de bajo peso molecular. (Lai, et. al. 2009). Para reducir el ataque enzimático y proteger los cambios de pH es necesario mantener la insulina dentro del portador; por esa razón, se seleccionaron los liposomas, porque tienen buenas propiedades para permear las membranas porque su estructura de bicapa es similar a la de la membrana celular, y se ha demostrado que la insulina cuando se encapsula dentro de los liposomas probablemente está protegida de la degradación proteolítica en el GIT. Además, la administración de liposomas no reforzó ningún efecto tóxico (Owens, et. al. 2003). Sin embargo, en este ensayo no se demostró que hubiera cambios en la glucemia con ninguno de los tratamientos por lo que se debe seguir investigando dentro de los diferentes tipos de formulados con liposomas incluyendo tal vez otro tipo de excipientes. Por ejemplo, es sabido que la adición del excipiente poloxámero 407 añadido a la formulación de liposomas parece reducir las concentraciones de glucosa de animales diabéticos hasta un 47% por vía oral (Fazel, et. al. 2018). Sin embargo, este tema sobrepasa los alcances del presente estudio.

## **9.0 Conclusión**

Los resultados de este estudio indican que los liposomas flexibles añadidos con tensioactivos mantienen la insulina protegida dentro de ella; sin embargo, es necesario hacer más pruebas con diferentes proporciones de los formulados innovadores basados en liposomas para lograr mejoras en la liberación *in vivo* de esta proteína cuando es administrada por diferentes rutas.

## 10.0 Bibliografía

- Arciniegas S. M. Evaluación pre-clínica y farmacocinética de una nueva formulación de insulina en un modelo de diabetes experimental en ratas wistar, para su uso final en perros con diabetes mellitus tipo I [Tesis doctorado] CDMX, Universidad Nacional Autónoma de México 2018.
- Davison LJA, Walding B, Herrtage ME, Catchpole B. Anti-insulin antibodies in diabetic dogs before and after treatment with different insulin preparations. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2008; 22(6):1317-25. doi: 10.1111/j.1939-1676.2008.0194.
- Dave, V.; Sharma, R; Sharma, S; Jain, P; Yadav, S. Experimental Models on Diabetes, A Comprehensive Review *Int J Adv PharmSci* 2013, 4, 01-08
- Peppas, N; Kavi mandan, N 2006. Nanoscale analysis of protein and peptide absorption: Insulin absorption using complexation and pH-sensitive hydrogels as delivery vehicles. *Eur. J. PharmSci.*, 2006, 29(3-4), 183-197.
- Kanerek, R B and Ho, L: Patterns of nutrient selection in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Physiol. Behav*, 2016, 32: 639-645.
- Mahato, R; Narang, A; Thomas, L, Miller, D. Emerging trends in oral delivery of peptide and protein drugs. *Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier. Syst.*, 2003, 20, 153-214.
- Yun, Y.; Cho, Y, Park, K. Nanoparticles for oral delivery: targeted nanoparticles with peptidic ligands for oral protein delivery. *Adv. Drug. Delivery. Rev* 2012, 65(6), 822-832.
- Ochoa, L N, & Bouda, J. (2007). *Patología clínica veterinaria*. UNAM Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
- Lozano V. Caracterización del felino pre-diabético de acuerdo a su condición corporal y su respuesta al cambio de dieta alta en proteína [Tesis maestría] CDMX, Universidad Nacional Autónoma de México, 2014.
- Feldman, E C, Nelson, R W, Reusch, C, & Scott-Moncrieff, J. C (2014). *Canine and Feline Endocrinology*-E-Book. Elsevier Health Sciences.
- Meyer, D J., Cdes, E H, & Rich, L J. (2004). *Veterinary laboratory medicine: interpretation and diagnosis*. Saunders.

- Thrall, M A, Weiser, G, Alison, R, & Campbell, T. (Eds.). (2012). Veterinary hematology and clinical chemistry. John Wiley & Sons.
- Cevc, G; Gebauer, D; Stieber, J.; Schatzlein, A; Bume G Ultraflexible vesicles, Transfersomes, have an extremely low pore penetration resistance and transport therapeutic amounts of insulin across the intact mammalian skin. *Biochim Biophys. Acta.* 1998, 1368, 201–215.
- Jadupati, M Suma, S.; Amit, N; Kalyan, S. Formulation, optimization and evaluation of transferosomal gel for transdermal insulin delivery. *Saudi. Pharm J.*, 2012, 20, 355–363.
- Fazel, M; Daihamed, M; Ousouia, M; Almasia, A Haeria, A Dadashzadeha, S. Preparation, In-Vitro Characterization and Pharmacokinetic Evaluation of Brij Decorated Doxorubicin Liposomes as a Potential Nanocarrier for Cancer Therapy. *Iran J Pharm Res.* 2018. 17 (Special Issue 2): 33-43.
- Sorica, T.; Sharma, C. Oral insulin delivery. 1 ed; Woodhead Publishing: United Kingdom 2014.
- Mezei, M Liposomes and the skin. In: Gregoridis G; Florence AT; Patel. H editors. Liposomes in drug delivery. Switzerland: Harwood Academic Publishers. 1993. 24-135.
- Cevc, G; Bume, G New highly efficient formulation of dclfenac for the topical, transdermal administration in ultradeformable drug carriers, Transfersomes. *Biochim Biophys. Acta.* 2001, 1514, 191-205.
- Cevc, G Transdermal Drug Delivery of Insulin with Ultradeformable Carriers. *Clin Pharmacokinetic.* 2003, 42(5), 461-474.
- Arciniegas, S M Bernad, M.J.; Lopez, R; Torres, R; Caballero, S.C; D. In-vitro and In-vivo Profiles and Characterization of Insulin Nanocarriers Based in Flexible Liposomes Designed for Oral Administration. *Lett. Drug. Des. Discov.*, 2019, 16 (1).
- Park, S.; Choi, S.; Davaa, E.; Park, J. Encapsulation enhancement and stabilization of insulin in cationic liposomes. *Int. J. Pharm* 2011, 415, 267–272.

- Szkudel ski, T. The Mechanis m of Alloxan and Streptozotocin Acti on i n B Cells of the Rat Pancreas. *Physiol. Res.* 2001, 50, 536-546.
- Trinder, P. Deter mination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen receptor. *Ann. Clin. Biochem.* 1969, 6, 24–37.
- Malvern Technical Notes [Online]. Malvern Instruments Limited. Available from [http://www.malvern.com/en/support/resource-center/technical-not es/TN101104/IntensityVolumeNumber.aspx](http://www.malvern.com/en/support/resource-center/technical-notes/TN101104/IntensityVolumeNumber.aspx). [Accessed 10 February 2019]
- Wi edt, T. Mie Theory, A review In, Hergert, W; Wi edt, T, eds. The Mie Theory. Basics and applications. Germany, Springer Series in Optical Science. 2012, 169, 53-79.
- Badran, M. Formulati on and i n vitro eval uati on of flufenamic acid loaded deformable liposome for improved skin delivery. *Digest J. Nanomat er. Bi ostruct.* 2014, 9, 83–91.
- Chen, M; Li u, X; Fahr, A. Skin penetrati on and depositi on of carboxyfluorescein and tetraporphin from different lipid vesicular systems: I n vitro study with finite and infinite dosage applicati on. *Int. J. Pharm.* 2011, 408, 223–234.
- Putri, D C; Dwastuti, R; Marchaban, M; Nugroho, A K. Opti mizati on of mi xi ng temperat ure and soni cati on durati on i n liposome preparati on. *J. Pharm. Sci. Commun.* 2017, 14, 79–85.
- Mustata, G; Dinu, S. Approaches to oral drug delivery for challengi ng molecule. *Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier. Syst.*, 2006, 23, 111-135.
- Bendayan, M; Ziv, E; G ingras, D; Ben-Sasson, R; Bar-On, H; Kidron, M. Bi ochemi cal and morpho- cytochemi cal evi dence for the i ntesti nal absorpti on of i nsul i n i n control and diabeti c rats. Comparison between the effectiveness of duodenal and colon mucosa. *Diabetologia* 1994, 37, 119-26.
- Khan, MA; Agarwal, V. Compositi on and method for preparati on of an oral dual controlled release formulati on of a protei n and i nhi bi tor. US Patent No. 20,030,220,254. 2003.
- TenHoor, C; Dressman, J. Oral absorpti on of pepti des and protei ns. *STP*

Pharmacol. Sci. 1992, 2, 301-312.

- Patel, H; Stevenson, R; Parsons, J.; Ryman, B Use of liposomes to aid intestinal absorption of entrapped insulin in normal and diabetic dogs. *Biochim Biophys. Acta.* 1982, 716, 188-193.
- Damasceno DC, Netto AQ, Lessi IL, Gallego FQ, Corvino SB, Dallaqua B, *et al.* Streptozotocin-induced diabetes models: Pathophysiological mechanisms and fetal outcomes. *BioMed Res Int.* 2014; 2014: 819065. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/819065>
- Letícia Bequer, Tahiry Gómez, José Luis Molina, Daniel Artilles, Rosa Bermúdez, Sonia Capés, Acción de la estreptozotocina en un modelo experimental de inducción neonatal de la diabetes. 2015. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.2686>.
- Arciniegas S, Saavedra S, Balderas D, Caballero S, Bernard M, Sánchez J, García M, Rico H, Vargas D. Comparison in the Glucose response of flexible liposomes loaded with insulin with addition of different surfactants in a experimental diabetes model. *Letters in Drug Design & Discovery Vet. Res.* 2019, (16):1570-1808.
- Casado M. Modelos animales en el estudio de la diabetes. *Av Diabetol.* 2007; 23: 432-8
- Arulmozhi DK, Veeranjanyulu A, Bodhankar SL. Neonatal streptozotocin-induced rat model of type 2 diabetes mellitus: A glance. *Indian J Pharmacol.* 2004; 36: 217-21.
- Kiss AC, Woodside B, Sinzato YK, Bernardi MM, Kempinas WG, Anselmo-Franci JA, *et al.* Neonatally induced mild diabetes: Influence on development, behavior and reproductive function of female Wistar rats. *Diabetol Metab Syndr.* 2013; 5: 2-10. <http://dx.doi.org/10.1186/17585996-5-61>



RESEARCH ARTICLE

## Comparison in the Glucose Response of Flexible Liposomes Loaded with Insulin with the Addition of Different Surfactants in an Experimental Diabetes Model

Sara Melisa Arciniegas<sup>1</sup>, Sergio Andres Saavedra<sup>1</sup>, Danaé Balderas<sup>1</sup>, Sara del Carmen Caballero<sup>1</sup>, María Josefa Bernad<sup>2</sup>, Julio Cesar Sánchez<sup>3</sup>, María Isabel Gracia<sup>4</sup>, Héctor Ariel Rico<sup>4</sup> and Dinorah Vargas<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Physiology and Pharmacology department, Veterinary Medicine School, Universidad Nacional Autónoma de México, México. Universidad 3000, Circuito Exterior S/N Delegación Coyoacán, C.P. 04510. Ciudad Universitaria. CD.MX. México; <sup>2</sup>Pharmaceutical Technology, Chemistry Faculty, Universidad Nacional Autónoma de México, México. Universidad 3000, Circuito Exterior S/N Delegación Coyoacán, C.P. 04510. Ciudad Universitaria. CD.MX. México; <sup>3</sup>Department of Chemical and Biological Inspection of the Veterinary Medicine School, Universidad Nacional Autónoma de México 04510, México; <sup>4</sup>Animal Experiment Unit, Chemistry Faculty, Universidad Nacional Autónoma de México, México Universidad 3000, Circuito Exterior S / N Delegación Coyoacán, C.P. 04510. Ciudad Universitaria. CD.MX. México

**Abstract: Background:** Insulin has been included in a variety of dosage forms; nevertheless, liposomes have shown protection to degradation and better absorption. The addition of surfactant to liposomes could give the ability to deform and pass through intact membranes, and could increase the stability and the release of the drug.

**Introduction:** Due to the limitations of the current treatment of insulin in diabetic patients, investigation in alternatives routes has increased. The oral route is the most convenient because of the similarity with the natural secretion of this hormone. The aim was to evaluate the *in-vivo* effect of fourteen formulations of Insulin-loaded flexible liposomes with different surfactants by oral and subcutaneous routes.

**Methods:** Fourteen formulations of insulin were obtained with the addition of different surfactants. Size distribution, polydispersion index and Z potential were obtained for all formulations. *In-vivo* tests were performed in rats induced with experimental diabetes with streptozotocin, and glucose curves were obtained during 480 minutes.

**Results:** All formulations by the subcutaneous route caused an optimal reduction in glucose levels. However, the addition of Brij L23 produced a better reduction, lasting for 420 minutes. By the oral route, the reduction of glucose did not reach the normal levels, but the addition of Poloxamer 407 and Brij S10 showed the best reduction in the glucose levels by this route.

**Conclusion:** The addition of surfactants to the lipid structure can modify the release of the insulin by different routes of administration, but this behavior depends on the characteristics of the surfactant, such as the melting phase transition temperature of the lipid bilayer.

### ARTICLE HISTORY

Received: May 9, 2019  
Revised: August 19, 2019  
Accepted: September 30, 2019

DOI:  
10.2174/157019081908668191004102221

**Keywords:** Tensioactive, insulin, lipid vesicles, diabetes, nanocarrier, liposome.

### 1. INTRODUCTION

The findings for improvement in diabetic patients by insulin therapy are necessary as the treatment has been confined to the use of parenteral route for the application of subcutaneous and intramuscular injections; this route has been a

successful treatment but also has a lot of limitations, which include pain, discomfort, lipodystrophy and peripheral hyperinsulinemia. Alternative routes have great importance in the investigation, and researches include them in oral, buccal, nasal, rectal, pulmonary, ocular and transdermal routes. Nonetheless, the oral route is considered the most convenient because it has the most similar action to endogenous insulin [1].

A successful oral formulation protects insulin from being broken down in the stomach and release the hormone intact for absorption in the intestinal tract, avoiding toxic effects.

\*Address correspondence to this author at the Physiology and Pharmacology department, Veterinary Medicine School, Universidad Nacional Autónoma de México, México. Universidad 3000, Circuito Exterior S/N Delegación Coyoacán, C.P. 04510. Ciudad Universitaria. CD.MX. México; Tel.: 52 (55) 5622-59 80 ext. 110. E-mail: [dinorah.vstrada@gmail.com](mailto:dinorah.vstrada@gmail.com).

Insulin controls some natural barriers to achieve intestinal absorption, and these barriers include gastrointestinal pH conditions ranging from the acidic gastric environment in the stomach to the slightly basic intestinal environment, a luminal enzymatic barrier, intestinal epithelial barrier, mucus intestinal layer and efflux by glucoprotein P [2, 3].

Previous researches have included insulin in a wide variety of dosage forms; nevertheless, the use of liposomes has shown protection of drugs from degradation and improved absorption through the mucous membranes; the main disadvantage is the fast clearance of liposomes by the organism [4, 5]. The use of liposomes based systems for oral insulin delivery has been investigated extensively in animal studies; variable reductions in blood glucose have been reported depending on several factors including lipid composition, presence or absence of surfactant, size, surface charge, and the physical state of the phospholipid bilayer employed [6]. Previous studies have demonstrated that modification of liposomes with different polymers and surfactants could efficiently protect liposomes in the circulation [7]. In addition, other types of liposomes called ultra flexibles or transferosomes have shown the ability to deform passing through intact membranes and have displayed adequate therapeutic effects without causing alterations in the area of application [4, 5]. However, flexible liposomes have not been tested by any other route than the dermal.

The deformability of these types of lipid vesicles is because they adjust their shape according to the changing environmental conditions. This occurs easily, rapidly and reversibly. When a flexible liposome is exposed to non-uniform local stress, such that it enforces aggregate elongation or non-sphericity, individual aggregate components start to separate in different membrane regions [8]. The first step of flexible liposomes mediated drug transport across an intact membrane is the delivery of carrier associated active ingredient into the viable epidermal tissue, just below the skin barrier [9, 10]. Then, the delivery rate depends on the carrier composition and design, on the applied carrier dose, and on other application parameters. The release rate is also affected by drug characteristics. Small and soluble drugs or with low affinity for the carrier tend to dissociate from the carriers and diffuse rapidly into the bloodstream. In contrast, larger molecules or with high affinity for the carrier are distributed in the skin by interstitial fluid flow through the lymphatic system [8, 9, 11].

Considering their deformable characteristics and the effects found with insulin, it is considered that the flexible effect of these should be useful for any other biological membrane, so the main objective of this study was to evaluate different kinds of surfactants in the lipid structure of flexible liposomes, loaded with insulin, by oral route in diabetic animals, in order to reduce the degradation and also decrease the trauma in the application [4, 5, 11, 12].

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Materials

Human recombinant insulin (Pisa Agropecuaria, México), Soy L- $\alpha$ -phosphatidylcholine (Sigma Aldrich, México),

Sodium cholate (Sigma Aldrich, México), 18:0 PEG-2000-PE (Avanti Polar Lipids, Alabama, USA), Dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) (Cayman Chemical Co., México), Polaxamer 188 and 407 (Sigma Aldrich, México), BRIJ (Polyethylene glycol octadecyl ether) S20 and BRIJ L23 (Sigma Aldrich, México) and Sucrose > 99,5% (Sigma Aldrich, México) were acquired from the manufacturing companies.

### 2.2. Flexible Liposomes

The control group was a commercial non-liposomal human recombinant insulin (Pisa Agropecuaria, México), a second control was a traditional flexible liposome (FL-C) with a relatively good encapsulation percentage (>61%), [Soy L- $\alpha$ -phosphatidylcholine (PC), 88,2%, and sodium cholate (SC), 11,8%] and third control group was the same FL-C with PEG: 2000 addition with good encapsulation (>81%), [13]. Other groups were manufactured with equal PC and SC percentages, but with some different surfactants as a part of the lipid structure, all the details are summarized in Table 1. All formulations were prepared at 10 mM concentration and loaded with human recombinant insulin at 15 UI/mL.

### 2.3. Preparation Method

Flexible Liposomes (FLs) were manufactured by the Heating Method [14]. A hydrating solution (Sucrose 10%, [15]) in addition to insulin was mixed in a ball flask with phospholipids and PEG-2000 or/and elected surfactant, the air was replaced with a nitrogenous atmosphere for the reduction of lipid oxidation. The flasks were kept in a water bath at 60°C with constant agitation for 40 minutes. Then, the liposomes were placed at room temperature until reaching 25°C before packaging them into bottles [14].

### 2.4. Flexible Liposome Characterization

#### 2.4.1. Particle Size, Size Distribution and Z Potential

The particle size, size distribution, Polydispersity Index (PDI) and Zeta Potential (ZP) of the flexible liposomes were measured using a Dynamic Light Scattering (DLS) spectrophotometer (Zetasizer, Nano Sizer, MALVERN). The system was used in the automeasuring mode.

#### 2.4.2. In Vivo Study

##### 2.4.2.1. Animals

One hundred and thirty-two (132) healthy male rats of Wistar lineage were used, with weights between 380 - 450 grams. The experiment was approved by Subcommittee on Research, Care and Use of Experimental Animals (SICUAE) of Universidad Nacional Autónoma de México, according to Mexican law NOM-062-ZOO-1999. Animals were kept in the controlled-temperature room, were fed with Formulab Diet 5008 (LabDiet, St. Louis, MO) and free water access.

##### 2.4.2.2. Experimental Diabetes

Animals were induced to diabetes type 1 with one intraperitoneal injection of 55 mg/Kg of Streptozotocin (STZ, Sigma Aldrich, Mexico). Glucose values of all animals were evaluated 24 hours later to determine diabetes. Animals with glu-

Table 1. Proportions of phospholipids, polymers and surfactants used in the preparation of the flexible liposomes.

Formulation	Phospholipids		Polymer	Surfactants				
	PC	SC	PEG-2000	DMPC	P188	P407	Brij S10	Brij L23
FL C	88.2	11.8	-	-	-	-	-	-
FL + PEG	79.2	10.8	10	-	-	-	-	-
FL-C18/PEG	72.5	17.7	9.8	-	-	-	-	-
FL + PEG/DMPC1	72.6	9.9	9.2	8.3	-	-	-	-
FL + PEG/DMPC2	69.8	9.5	8.8	11.9	-	-	-	-
FL + PEG/DMPC2	67.1	9.2	8.5	15.2	-	-	-	-
FL/P188(1)	83.3	11.4	-	-	5.3	-	-	-
FL/P188(2)	79.2	10.8	-	-	10	-	-	-
FL/P407(1)	83.3	11.4	-	-	-	5.3	-	-
FL/P407(2)	79.2	10.8	-	-	-	10	-	-
FL/Brij S10(1)	84.2	11.5	-	-	-	-	4.3	-
FL/Brij S10(2)	80.8	11	-	-	-	-	8.2	-
FL/Brij L23(1)	84.2	11.5	-	-	-	-	-	4.3
FL/Brij L23(2)	80.8	11	-	-	-	-	-	8.2

cose values over 250 mg/dL were considered diabetics, and insulin treatment was conducted 24 hours after diabetes induction [16]. The blood glucose concentrations were obtained from coccygeal vein puncture by the use of glucometer (Accu-Chek<sup>®</sup> bG, Roche) and oxidase-peroxidase test strips [17].

#### 2.4.2.3. Study Design

Healthy animals were used as their own controls, before the diabetes induction. Glucose concentrations were obtained at 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135, 150, 165, 180, 240, 300, 360, 420 and 480 minutes. After that, all animals were induced to experimental diabetes, as explained previously. Twenty-four (24) hours later, animals with glucose values over 250 mg/dL were considered diabetics, and were used to obtain a glucose curve for STZ diabetic animals at the same time periods.

Then, animals were divided randomly into two big groups (sixty animals in each) to receive a single dose (0.5 UI/100 g) of insulin in two different routes (oral and subcutaneous). Each big group was subdivided into seventeen (15) small groups (4 animals in each), which received different treatments by the respective administration route (insulin alone or any of the fourteen formulations described above in Table 1) and another extra group was the diabetic control without treatment. After that two formulations that showed retarded action were tested for 48 hours. Blood glucose con-

centrations were obtained at 1, 4, 8, 9, 10, 12, 24, 28, 32, and 48 hours after administration. The study design is summarized in Fig. 1.

#### 2.5. Statistical Analysis

Data are reported as the mean  $\pm$  Standard Deviation (SD). Data normality was determined by the Shapiro-Wilks test, and the homogeneity of variances by the Levene test. Mean comparisons were made with the ANOVA test, and the differences between means by the Tukey test. All the results were obtained using statistical software (IBM SPSS statistics 20).

### 3. RESULTS

#### 3.1. Physical Characterization of the Lipid Particles

The particle size and size distribution data are summarized in Table 2. The values are expressed as intensity distributions, which describe how much light is scattered by the particles in the different size bins [17]. The results showed that all formulations with the exception of FL-C, FL+PEG/DMPC1, FL+PEG/DMPC2, and FL/P401 (1) present three different groups of sizes. The most predominant size group in each formulation was over 450 nm, however, this measurement was weighted according to the scattering intensity of each particle. As such, the intensity distribution can be somewhat misleading in a small amount of aggregation/

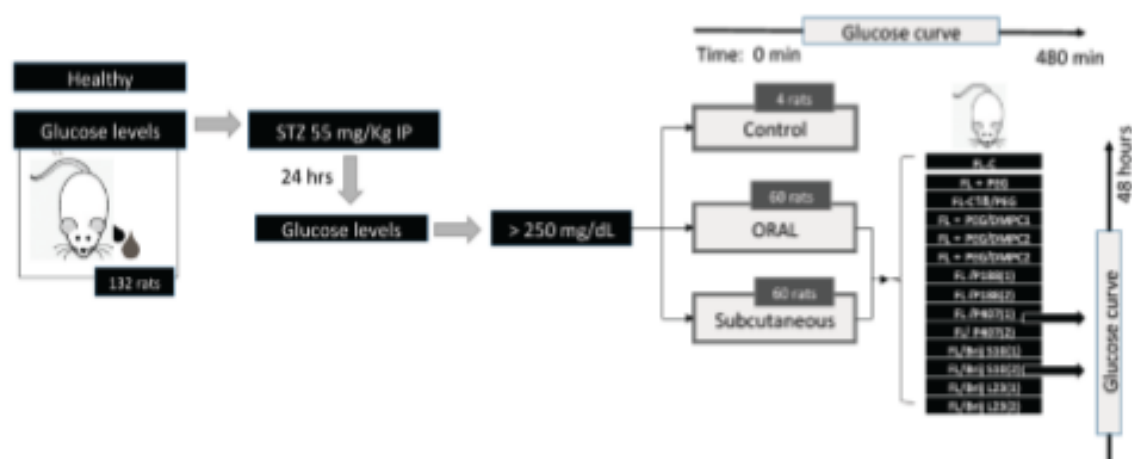


Fig. (1). Study design for *in-vivo* test. Animals were used as their own controls; basal glucose concentrations were obtained. Induction was made with Streptozotocin (STZ) Intraperitoneal (IP) injection. Twenty-four (24) hours later, animals with glucose values over 250 mg/dL were considered diabetic. Different insulin treatment was assigned to the animals and glucose curve was obtained after insulin administration. (A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

Table 2. Mean diameter size and distribution of particles of the flexible liposome preparations loaded with insulin reported as intensity measurements obtained by Zetasizer analysis.

Formulation	Pk 1 Mean (d.nm)	Pk1 (%)	Pk 2 Mean (d.nm)	Pk2 (%)	Pk 3 Mean (d.nm)	Pk1 (%)
FL C	611.37 ± 13.46	85.60 ± 0.62	123.90 ± 12.52	14.40 ± 0.62	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
FL + PEG	911.90 ± 322.61	84.07 ± 13.90	114.43 ± 103.08	11.77 ± 11.46	3469.00 ± 3009.48	4.13 ± 5.01
FL-C18/PEG	462.3 ± 19.92	69 ± 3,9	107,7 ± 19,44	31 ± 3,9	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
FL + PEG/DMPC1	478.1 ± 28.1	75.1 ± 3.6	100.4 ± 4.9	24.9 ± 3.6	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
FL + PEG/DMPC2	583.6 ± 47.8	74.8 ± 4.9	115.1 ± 15.6	25.2 ± 4.9	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
FL + PEG/DMPC3	894.1 ± 525.9	59.9 ± 15.7	158.1 ± 56.6	31.4 ± 7.5	5336.0 ± 194.5	6.5 ± 5.1
FL/ P188(1)	875.8 ± 231.6	90.3 ± 3.7	1702.6 ± 2790.7	7.7 ± 0.5	1589.0 ± 2752.2	2.1 ± 3.6
FL/ P188(2)	979.0 ± 128.2	92.0 ± 3.9	1829.1 ± 2889.9	7.6 ± 4.0	1749.7 ± 3030.5	0.4 ± 0.7
FL/ P407(1)	897.7 ± 138.1	91.2 ± 7.8	1840.3 ± 2881.3	8.8 ± 7.8	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
FL /P407(2)	913.9 ± 92.2	70.8 ± 11.1	4304.7 ± 841.8	24.6 ± 15.0	94.7 ± 89.6	4.6 ± 4.2
FL/Brij S10(1)	1014.5 ± 121.4	75.2 ± 5.6	1766.8 ± 2794.2	14.7 ± 1.8	3605.7 ± 2986.8	10.0 ± 4.1
FL/Brij S10(2)	1006.5 ± 203.4	84.0 ± 9.9	158.5 ± 102.6	14.7 ± 9.9	1698.3 ± 2941.6	1.3 ± 2.3
FL/Brij L23(1)	742.0 ± 218.3	74.5 ± 15.6	1390.3 ± 2238.6	22.6 ± 17.6	3496.3 ± 3028.8	2.9 ± 3.0
FL/Brij L23(2)	669.2 ± 45.0	88.4 ± 2.6	3150.6 ± 2674.1	7.7 ± 2.6	1680.4 ± 2833.8	3.8 ± 3.5

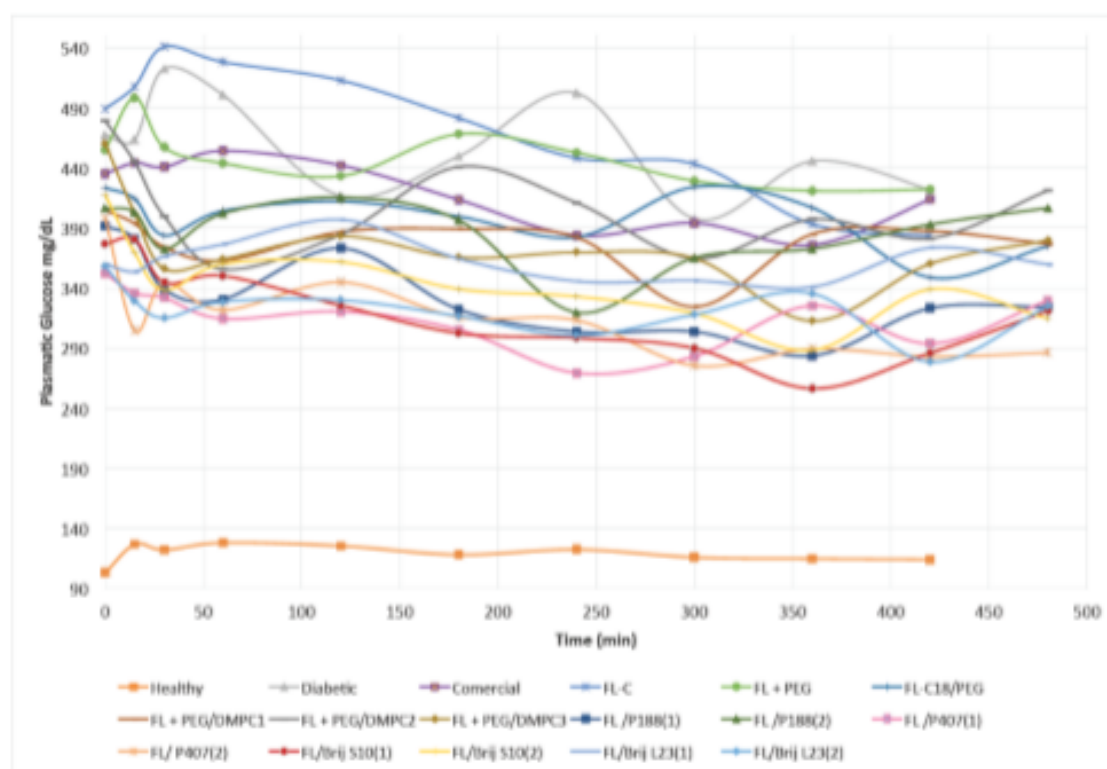


Fig. (2). Glucose curves (mean  $\pm$  SD) obtained by veinpuncture in rats with experimental diabetes induced with 55mg/Kg intraperitoneal dose of streptozotocin at different times after oral administration of all the formulations obtained and commercial insulin. (A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

agglomeration or the presence of a larger particle species can dominate the distribution. Nonetheless, this distribution can be used as a sensitive detector of the presence of large material in the sample [18]. All samples showed the presence of three main groups of particle sizes, with the exception of FL-C18/PEG, FL + PEG/DMPC1, FL + PEG/DMPC2 and FL/p407 (1), which showed two groups of particles. Even so, these data are comparative because the Zetasizer Nano uses the Mie theory by default to convert the intensity size distributions into volumes and numbers for all of the particle sizes [19].

The PDI was calculated from a simple two-parameter fit to the correlation data (cumulant analysis). These results are summarized in Table 3. PDI of 0.3 and below is considered to be acceptable and indicates a homogenous population of phospholipid vesicles [20, 21, 22]. The data shows that FL+P407(1) has the closest value to the homogeneity. PDI above 0.7 is considered as a highly polydisperse sample, all the samples with DMPC and low amount of Brij S10 (FL/Brij S10 (1)) are over this value. The rest of the formulations showed a mid-value of PDI, which indicates a heterogeneous distribution.

The ZP data are also summarized in Table 3. Adequate ZP is greater than 30 and lower than -30 mV, according to this, just the three formulations with DMPC, FL-C18/PEG,

FL+PEG and FL-C showed adequate ZP, but the last showed the higher ZP value.

### 3.2. In Vivo Study

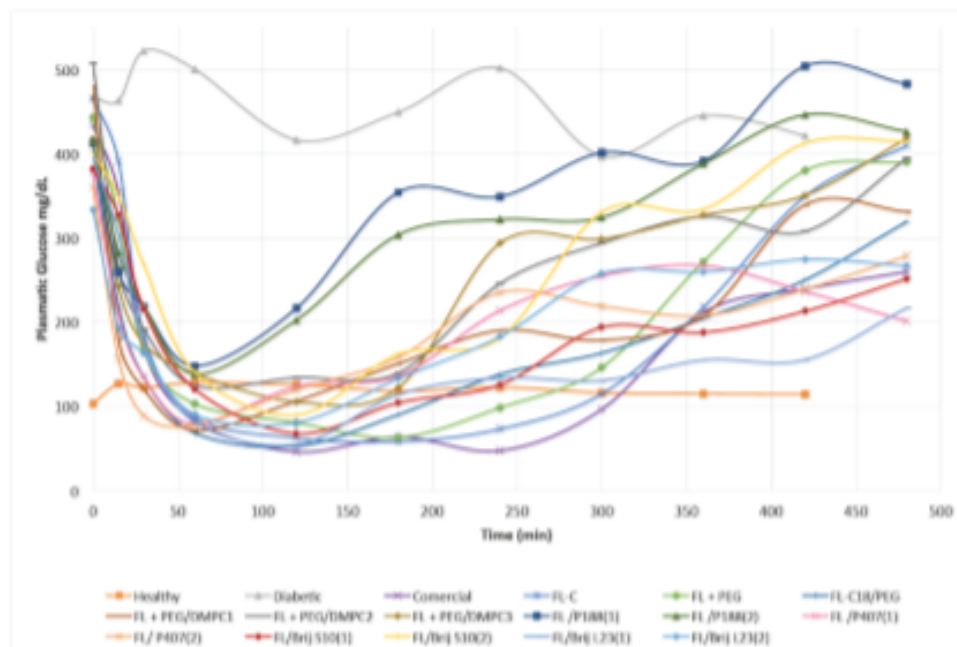
In vivo study showed that the basal glucose level in fasted animals was maintained under 127 mg/dL, while experimental diabetic animals without treatment showed glucose levels over 400 mg/dL.

All the different formulations were tested by oral and subcutaneous routes. The glucose concentration of healthy animals, diabetic animals and treated animals with insulin and the fourteen (14) different formulations by the oral route are shown in Fig. 2 and Supplementary Table 1. In the oral route statistically, all formulations did not show differences in glucose values at any time between them and with the commercial insulin ( $p > 0.05$ ), with the exception of FL-C that showed a difference 30 minutes after insulin administration. However, the administration of all formulations showed a reduction in the levels of insulin in different percentages in comparison with diabetic control, but none showed a reduction below desirable levels. During the first 30 minutes, a reduction tendency was noticed in all formulations, with the exception of FL-C. Both formulations with P407 showed the highest reduction in the levels of glucose, FL/ P407 (1) showed a reduction between 22,3% and 47% in comparison

**Table 3.** Polydispersity index [PDI] and Zeta potential [measured using a Zetasizer] were obtained for the flexible liposome preparations loaded with insulin.

Formulation	PDI	Zeta Potential
FL C	0.658 ± 0.0922 <sub>a</sub>	-70.20 ± 1.55
FL + PEG	0.493 ± 0.019 <sub>a</sub>	-53.9 ± 2.85
FL-C18/PEG	0.832 ± 0.086 <sub>a</sub>	-37.9 ± 1.95 <sub>ab</sub>
FL + PEG/DMPC1	0.721 ± 0.003 <sub>a</sub>	-42.9 ± 1.63 <sub>a</sub>
FL + PEG/DMPC2	0.701 ± 0.046 <sub>a</sub>	-36.2 ± 1.04 <sub>a</sub>
FL + PEG/DMPC3	0.76 ± 0.037 <sub>a</sub>	-41.4 ± 1.21 <sub>ab</sub>
FL/ P188(1)	0.525 ± 0.017 <sub>a</sub>	-21.7 ± 1.34 <sub>a</sub>
FL/ P188(2)	0.459 ± 0.045 <sub>a</sub>	-20.1 ± 1.27 <sub>a</sub>
FL/ P407(1)	0.355 ± 0.009 <sub>a</sub>	-28.6 ± 1.87 <sub>a</sub>
FL /P407(2)	0.548 ± 0.062 <sub>a</sub>	-21 ± 0.624 <sub>a</sub>
FL/Brij S10(1)	0.814 ± 0.187 <sub>a</sub>	-21.6 ± 0.503 <sub>a</sub>
FL/Brij S10(2)	0.518 ± 0.004 <sub>a</sub>	-20.7 ± 0.666 <sub>a</sub>
FL/Brij L23(1)	0.556 ± 0.101 <sub>a</sub>	-29.5 ± 1.57 <sub>a</sub>
FL/Brij L23(2)	0.471 ± 0.011 <sub>a</sub>	-13.8 ± 0.693

*ab*, Within a column, the values without a common superscript letter differ significantly ( $P < 0.05$ ).



**Fig. (3).** Glucose curves (mean ± SD) obtained by veinpuncture in rats with experimental diabetes induced with 55mg/Kg intraperitoneal dose of streptozotocin at different times after subcutaneous administration for all the formulations obtained and commercial insulin. (A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

with the diabetic control, and the maximum reduction occurred 240 minutes after insulin administration; meanwhile, FL/ P407(2) showed a reduction between 16,5% and 34,3% in comparison with the diabetic control, with the maximum reduction at 300 minutes. FL/Brij S10 (1) showed a slower reduction in comparison with the others, reaching the maximum effect at 360 minutes.

In the subcutaneous route, statistically, all formulations did not show differences in glucose values between them and with the commercial insulin at the basal point and 360 minutes after injection ( $p>0.05$ ). Statistically, a similar behavior to the commercial formulation was evidenced in all formulations in all points of time, with the exception of the 120, 180, 240 and 300 minutes where both formulations with P188 showed differences ( $p<0.05$ ). All formulations showed a reduction in the glucose levels to desirable values around 60 minutes after injection. Both formulations with P188 showed a quick reduction in the glucose levels just during the first 60 minutes and after that, the levels reached again to diabetic values. In the FL/Brij L23 (1), the glucose reduction lasted under 155 mg/dL during 420 minutes, and still showed glucose levels around 200 mg/dL in the 480 hours. All data are summarized in Fig. 3 and Supplementary Table 2.

According to the slow reduction in the glucose levels showed by FL/Brij L23 (1) and FL/ P407 (2), both were tested for 48 hours to determine the duration of this retarded effect. By subcutaneous route, the samples were tested with two different doses, a single dose of 0.5 UI/100 g and 1.5UI/100g. Data are summarized in Fig. 4 and Fig. 5, respectively. Statistically, both formulations administered subcutaneously at 0.5 UI/100g did not show differences between them and with the commercial insulin at any time ( $p>0.05$ ). However, FL/ P407 (2) did not show differences with the healthy animals during 4 and 8 hours after injection. With 1.5 UI/100g dose the FL/Brij L23 (1) and FL/ P407 (2) did not show differences in glucose levels during the respective times ( $p>0.05$ ), but were similar to the healthy animals after 8 and 9 hours after the injection ( $p<0.05$ ); while the commercial insulin showed similar levels of glucose to the healthy animals 8 hours after the injection lasting the effect until 24 hours ( $p>0.05$ ), in the rest point of times the effect of the commercial did not show differences with FL/Brij L23(1) and FL/ P407(2), ( $p>0.05$ ). Statistically, the behavior of the FL/Brij L23 (1) did not show any difference between doses in any time ( $p>0.05$ ), with the exception of 4 and 9 hours after injection; FL/ P407 (2) did not indicate any difference between doses in any time ( $p>0.05$ ), with exception of 4 and 9 hours after injection, meaning that the behavior of both formulations in spite of the dose was the same in all points of time, with the exception of 4 and 9 hours after injection.

The results obtained for the oral route with a dose of 1.5UI/100g showed that the behavior of the FL/ P407 (2) did not differ statistically from the commercial insulin in all the times ( $P>0.05$ ), with the exception of the 48<sup>th</sup> hour ( $p<0,05$ ). Moreover, FL/ P407 (2) was similar to FL/Brij L23 (1) just during the first 9 hours and between 24 and 32 hours ( $p>0,05$ ). However, none of them by the oral route showed similarities with the healthy animals ( $p<0,05$ ). Data is showed in Fig. 6.

#### 4. DISCUSSION

It was reported that insulin entrapped by liposomes reduces significantly the plasma glucose levels of diabetic animals by the oral administration [23], suggesting the possibility of liposomes as a tool of oral delivery of peptide drugs. However, the efficacy of liposomes as an oral dosage form has not been defined yet because of the complex behavior of liposomes in the Gastrointestinal Tract (GIT) [24, 25].

The challenges of developing an oral insulin formulation are associated with the barriers that would have to cross. The major barrier is the absorption through the gastrointestinal membrane. In general terms, the absorption of molecules in GIT occurs through the paracellular or transcellular route. Molecules with a high molecular weight, such as insulin (6 KDa), would not penetrate through this route. This large molecular size, its charge and its hydrophilicity impede insulin absorption by transcellular diffusion. The tight junctions present among the cells prevent paracellular transport of drugs, with the exception of hydrophilic drug molecules weighing less than 200 Da [26]. However, morphochemical and biochemical evidence for insulin absorption was demonstrated in the rat GIT [27]. This was achieved by direct infusion of insulin into various parts of the GIT, followed by visualization with gold markers and immunoassay of insulin in blood [28]. It was found that insulin is adsorbed in the apical plasma membrane and internalized by endocytosis [27].

Whereby, flexible liposomes are sufficiently flexible to pass through the pores considerably even smaller than themselves; this deform capacity is the reason to select them to probe by this route, because flexible liposomes should be adapting their form to pass across tight junctions [4, 11].

Additional obstacles are the pH changes and the enzymes throughout the GIT. In the stomach aspartic proteases are present called pepsins, whereas in the small intestine, pancreatic proteases consisting of the serine endopeptidase (trypsin,  $\alpha$ -chymotrypsin, elastase and exopeptidases, carboxypeptidases A and B) are responsible for the degradation of proteins [29]. To reduce the enzymatic attack and to protect pH changes, it is necessary to keep the insulin inside a carrier; for that reason, liposomes were selected, they have good permeation properties because their bilayer structure is similar to the cell membrane, and it has been demonstrated that encapsulated insulin within liposomes is probably protected from proteolytic degradation in the GIT [22, 30, 31], additionally the administration of liposomes does not report any toxic effect.

Another barrier is the mucus layer present in the gut. The mucin lining presents a physical barrier rather than a chemical one. It is reported that the mucin layer is thickest in the stomach and colon, whereas in the small intestine the thickness varies depending on the extent of digestive activity. The mucus layer decreases the diffusion rate of drugs to reach the absorptive surface of epithelial cells [32], although the effect is insignificant for low- molecular weight hydrophilic drugs [6].

However, liposomes also have some limitations, firstly, they generally show a short circulation half-life after administration due to uptake of liposomes in the Reticuloendothelial

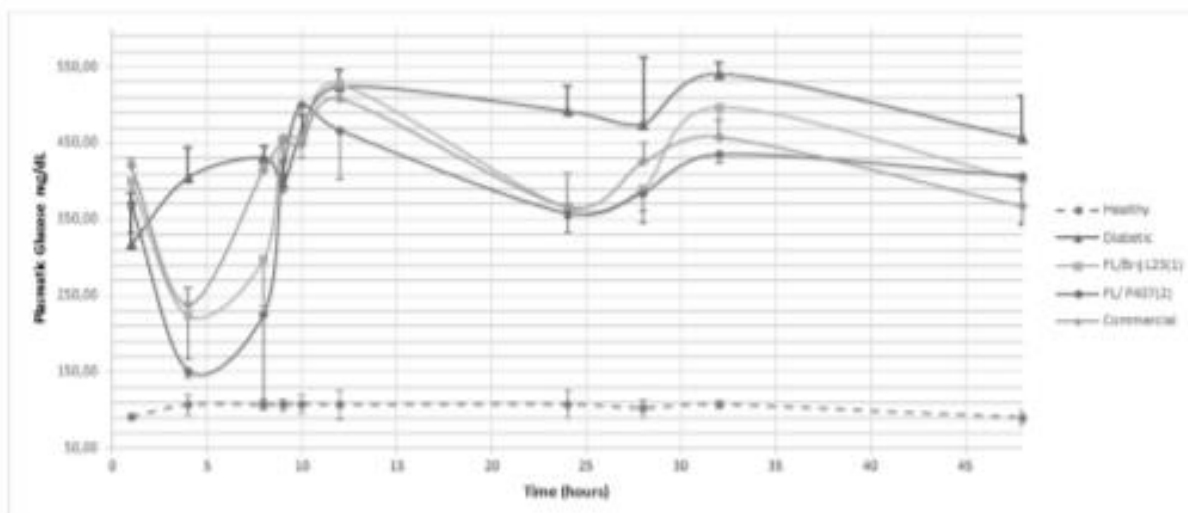


Fig. (4). Glucose curves (mean  $\pm$  SD) obtained by veinpuncture in rats with experimental diabetes induced with 55mg/Kg intraperitoneal dose of streptozotocin at different times by subcutaneous route for all the formulations obtained and commercial insulin. (A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

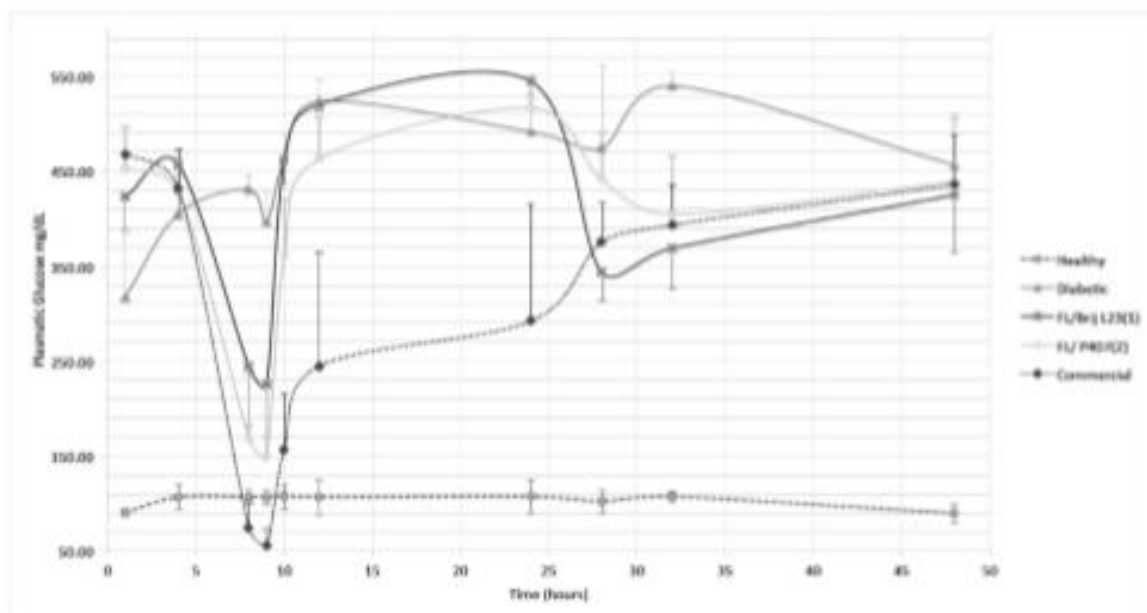


Fig. (5). Glucose curves (mean  $\pm$  SD) obtained by veinpuncture in rats with experimental diabetes induced with 55mg/Kg intraperitoneal dose of streptozotocin at different times by subcutaneous route for all the formulations obtained and commercial insulin. (A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).



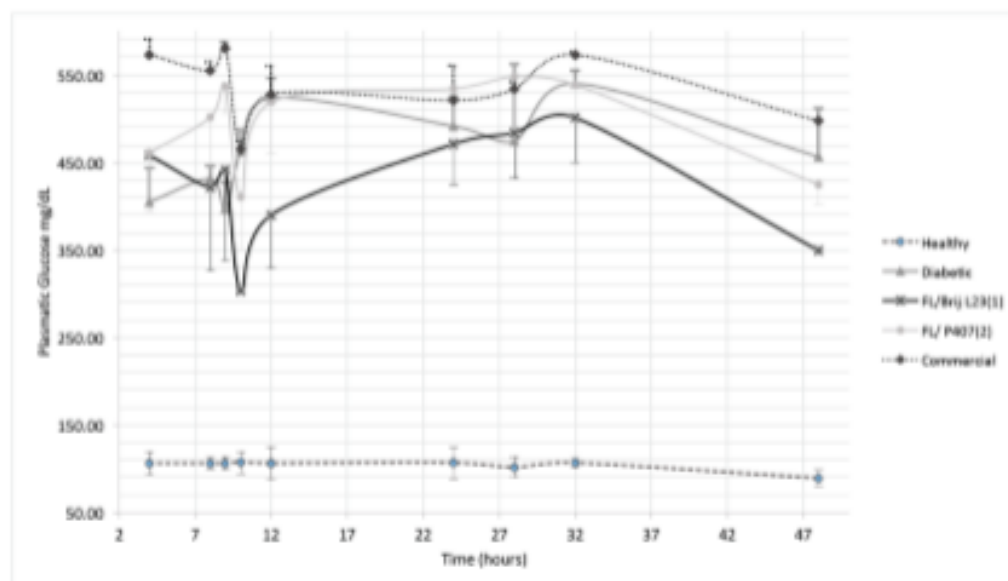


Fig. (5). Glucose curves (mean  $\pm$  SD) obtained by veinpuncture in rats with experimental diabetes induced with 55mg/Kg intraperitoneal dose of streptozotocin at different times by subcutaneous route for all the formulations obtained and commercial insulin. (A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

System (RES); secondly, they are prone to adhere to each other and fuse to form larger vesicles in suspension, which may result in inclusion leakage. Therefore, stability is a general problem to lipid vesicles [33, 34]. Many attempts, such as the surface modification of liposomes, have been investigated to improve their properties. Generally, the surface-modified material of liposomes includes proteins, polysaccharides, glycolipids and PEG. PEG is a water-soluble, non-toxic, nonantigenic, biocompatible polymer that has been approved by the FDA for human intravenous, oral, and dermal applications. PEG polymer forms an outer shell on the liposomes with beneficial effects. Water-soluble polyethylene glycol forms protective polymer coating, which is commonly used in liposomes to create a steric barrier and was found to improve the circulation time of liposomes by decreasing the uptake in the RES [35], but also potentially affects vesicle stability.

The characterization of the formulations allows to obtain important information related to the behavior of drug [35, 36]. The polydispersity describes the degree of "non-uniformity" of a distribution. All the samples exhibited polydispersity, but FL+P407 (1) showed homogeneity. This could affect the stability of the system in terms of particle agglutination [7, 36]. The ZP is an indicator of the dispersion stability, its magnitude indicates the degree of electrostatic repulsion between adjacent particles in a dispersion [35, 36]. When ZP results greater than 30 and lower than -30 mV, the repulsion between particles is greater, and the system becomes more stable. Only the three formulations with DMPC, FL-C18/PEG, FL+PEG and FL-C showed adequate ZP.

All the formulations administered by the oral route did not show a significant reduction in glucose levels; however,

the addition of poloxamer 407 seems to reduce the levels of diabetic animals to 47%. It suggests that flexible liposomes did not overcome all the GIT barriers, considering that insulin was protected inside carriers and additionally protected by modified polymer, it supports pH changes and enzymatic aggression, but probably it did not enough to cross through the mucus layer; it is common that particles of drug carriers administered orally become entrapped within the mucosal layer of the intestine irrespective of their size [6]. These mucus-entrapped particles then have very limited ability for systemic absorption and drug delivery.

All the formulations administered subcutaneously showed a reduction in the glucose levels to normal values. However, all formulations reached higher values of glucose before insulin was administered alone, with the exception of the FL/Brij L23 (1) and FL/Brij S10 (1), which still showed some therapeutic effects during 480 minutes of post-injection. The fact that glucose levels decrease with subcutaneous injection of nanocarriers indicated that formulations can release their content. However, regardless of the excellent encapsulation efficacy of these flexible liposomes, the release of insulin was limited *in vivo* by the oral route. It suggests that another possibility is that the nanocarrier did not permit that the protein crosses its membrane, because the transition temperature of lipids used in the fabrication not reaches an adequate thermal environment inside the body to release its content. For that reason, it is necessary to modify this transition temperature. The polymorphic transitions of the lipid particle matrix produce a barrier to physicochemical characterization and successful formulation development [37].

The results in the size are suggesting that the structure and amount of surfactants have a significant effect in con-

trolling the sizes of the liposomes. The Brij S10 has a carbon chain in C18, and Brij L23 has a carbon chain in C12, Brij compounds have saturated chain with a high melting temperature, which renders the lipid membrane stiffer and less permeable to the cargos. In addition, the different hydrophilic head groups can lead to different degrees of hydration and different affinity between the lipid membrane and the hydrophilic cargos, which could also contribute to the entrapment efficiency. [6, 38, 39]. Brij is formed with PEGylated acyl chains, so it can replace the functions of PEG-2000, thereby reducing opsonization and improving its pharmacokinetics [6, 39, 40].

DMPC is a zwitterionic lipid, thus there will be less electrostatic repulsion among lipid head groups, which results in the formation of more organized liposomes [41].

The poloxamer is a stabilizing agent which is able to prevent aggregation and to promote the formation of stable nanodispersions. It is noteworthy that Poloxamer-407 and Poloxamer 188 are a non-ionic triblock copolymer composed by a central hydrophobic poly(propylene oxide) chain (PPO) capped by two hydrophilic chains of poly

(ethylene oxide) (PEO), which functions as emulsifier and stabilizer [42].

The reduction of the ZP in comparison with FL-C was significantly altered with the addition of Brij or Polaxamer, it could be caused by a shift in the shear plane. In the case of the poloxamer produced by its PEO chains, whereas PEGylation did not show high reduction [43, 44]

The temperature of transition ( $T_m$ ) is an extremely important physical characteristic of liposomes. Indeed, the phase transition and fluidity of phospholipid membranes determine such properties as packing, permeability, fusion, aggregation, protein binding, all of which can markedly affect the stability of liposomes, and their behavior in biological systems [45].

The inclusion of surfactants to modulate thermosensitivity is an interesting concept and has the potential to be applied to other systems as well [40]. Encapsulated hydrophilic drugs are released from thermosensitive liposomes at the melting phase transition Temperature ( $T_m$ ) of the lipid bilayer. At  $T_m$ , the structure of the lipid bilayer changes as a transfer from a solid gel phase ( $L\beta$ ) to a liquid-crystalline phase ( $L\alpha$ ) occurs. The membrane is more permeable to water and hydrophilic drugs in the liquid-crystalline phase than when in the gel phase. The permeability of hydrophilic drugs is highest at temperatures around the  $T_m$  because of the co-existence of membrane areas in both phases forming grain boundaries [39].

The manufacturing method was the heating method, this is a model technique for the fast and simple production of lipid vesicles. Most of the phospholipid molecules employed as liposomal constituents have transition temperatures below 60°C; thus, in preparations lacking cholesterol, the temperature utilized in this method is adequate to form particles capable of encapsulating a drug [14, 46]. The exposure of the insulin to 60°C for this manufacturing process does not cause significant changes in the biological action and does not generate any danger to health of the animals, according pre-

vious data that showed that the biological effect of heated insulin reached the same glucose reduction as an insulin kept in refrigeration conditions [47].

## CONCLUSION

In conclusion, oral delivery is the most appropriate route for obtaining similar physiological behavior of the insulin; nonetheless, the challenges for developing oral insulin dosage forms are significant, considering that the absorption of insulin is the major obstacle. Nevertheless, the results of this study indicate the flexible liposomes added with surfactants maintaining insulin protected inside them; however, considering these results, it is necessary to make more tests with different proportions of the best surfactants here to achieve improvement in the *in vivo* release of this protein in different routes to subcutaneous. Further studies are now under investigation to clarify these points.

## LIST OF ABBREVIATIONS

CL	=	Sodium cholate
DLS	=	Dynamic Light Scattering
DMPC	=	Dimyristoylphosphatidylcholine
DSC	=	Differential scanning calorimetric
FL	=	Flexible liposomes
P188	=	Poloxamer 188
P407	=	Poloxamer 407
PC	=	Phosphatidylcholine
PDI	=	Polydispersity index
PEG-2000	=	Poly(ethylene glycol)
RES	=	Reticuloendothelial system
SC	=	Sodium Cholate
STZ	=	Streptozotocin
$T_m$	=	Temperature of Transition
ZP	=	Zeta potential

## CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

## AVAILABILITY OF DATA AND MATERIALS

Not applicable.

## FUNDING

We acknowledge the financial support from PAPIIT (Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica) N° IT202317.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors report no conflicts of interest in this work. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge to the Unit of verification of faculty of Veterinary Medicine and Zootechy of Universidad Nacional Autonoma de Mexico and the Animal Experimentation Unit of the Faculty of Chemistry for lending us the facilities to maintain the animals in optimal conditions during the study especially to Marisol Rivera Huerta who is responsible for Animal Experimentation and Francisco Sánchez Bartz who is responsible for the Laboratory of Cell Culture and Immunohistochemistry.

## CONTRIBUTIONS

Sara Melisa Arciniegas Ruiz: Doctorate student, design of research protocol. Validation and standardization process of all techniques used.

Sergio Andres SAAVEDRA. Preparation of pharmaceutical preparations and the physical and chemical characterization.

Danaé BALDERAS. Thesis work to obtain a degree in veterinary medicine, collaborated in the design of the protocol and in the experimental work with the animals.

Sara Del Carmen Caballero Chacón: Advisor and supervisor of research protocol.

María Josefa Bernad Bernad: Advisor of Drug design and physical and chemical characterization.

Julio Cesar SÁNCHEZ. Collaborated in the experimental work with the animals.

María Isabel GRACIA. Adviser of the protocols of diabetization of laboratory animals and Collaborated in the design of the research.

Héctor Ariel RICO. Advisor of the handling and treatment of animals and collaborated in the design of the research

Dimorah Vargas Estrada: Main supervisor of the project and force work of the research.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Table 1: Glucose levels (average  $\pm$  standard deviation) of all the formulations administered by oral route.

Supplementary Table 2: Glucose levels (mg/dL) average  $\pm$  standard deviation of all the formulations administered by subcutaneous route.

## REFERENCES

- [1] Peppas, N.A.; Kadiraman, N.J. Nanoscale analysis of protein and peptide absorption: insulin absorption using complexation and pH-sensitive hydrogels as delivery vehicles. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2006, 29(3-4), 183-197. [http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2006.04.014] [PMID: 16777391]
- [2] Mahato, R.I.; Narang, A.S.; Thoma, L.; Miller, D.D. Emerging trends in oral delivery of peptide and protein drugs. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 2003, 20(2-3), 153-214. [http://dx.doi.org/10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.v20.i23.30] [PMID: 14584523]
- [3] Yun, Y.; Cho, Y.W.; Park, K. Nanoparticles for oral delivery: targeted nanoparticles with peptidic ligands for oral protein delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2013, 65(6), 822-832. [http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.10.007] [PMID: 23123292]
- [4] Cevo, G.; Gebauer, D.; Stieber, J.; Schttalein, A.; Blume, G. Ultraflexible vesicles, Transfersomes, have an extremely low pore penetration resistance and transport therapeutic amounts of insulin across the intact mammalian skin. *Biochim. Biophys. Acta*, 1998, 1568(2), 201-215. [http://dx.doi.org/10.1016/S0005-2736(97)00177-6] [PMID: 9459598]
- [5] Malakar, J.; Sen, S.O.; Nayak, A.K.; Sen, K.K. Formulation, optimization and evaluation of transfersosomal gel for transdermal insulin delivery. *Saudi Pharm. J.*, 2012, 20(4), 355-363. [http://dx.doi.org/10.1016/j.sjps.2012.02.001] [PMID: 23960810]
- [6] Fazel, M.; Dezhamede, M.; Osoolia, M.; Almasia, A.; Haezia, A.; Dadashzadeh, S. Preparation, In-Vitro Characterization and Pharmacokinetic Evaluation of Beji Decorated Doxorubicin Liposomes as a Potential Nanocarrier for Cancer Therapy. *Dan. J. Pharm. Res.*, 2018, 17(Special Issue 2), 33-43.
- [7] Sonia, T.; Sharma, C. *Oral insulin delivery*, 1st ed; Woodhead Publishing: United Kingdom, 2014.
- [8] Cevo, G.; Schttalein, A.; Richardson, H. Ultra-deformable lipid vesicles can penetrate the skin and other semi-permeable barriers unfragmented. Evidence from double label CLSM experiments and direct size measurements. *Biochim. Biophys. Acta*, 2002, 1564(1), 21-30. [http://dx.doi.org/10.1016/S0005-2736(02)00401-7] [PMID: 12100992]
- [9] Mezei, M. Liposomes and the skin. *Liposomes in drug delivery*; Gregoriadis, G.; Florence, A.T.; Patel, H., Eds.; Harwood Academic Publishers: Switzerland, 1993, pp. 24-135.
- [10] Cevo, G.; Blume, G. New, highly efficient formulation of diclofenac for the topical, transdermal administration in ultra-deformable drug carriers, Transfersomes. *Biochim. Biophys. Acta*, 2001, 1514(2), 191-205. [http://dx.doi.org/10.1016/S0005-2736(01)00369-8] [PMID: 11557020]
- [11] Cevo, G. Transdermal drug delivery of insulin with ultra-deformable carriers. *Clin. Pharmacokinet.*, 2003, 42(5), 461-474. [http://dx.doi.org/10.2165/00003088-200342050-00004] [PMID: 12739984]
- [12] Rajan, R.; Jose, S.; Mukund, V.P.; Vasudevan, D.T. Transfersomes - A vesicular transdermal delivery system for enhanced drug permeation. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.*, 2011, 2(3), 138-143. [http://dx.doi.org/10.4103/2231-4040.85324] [PMID: 22171309]
- [13] Arciniegas, S. M. Bernad, M.J.; Lopez, R.; Torres, R.; Caballero, S.C.; Vargas, D. In-vitro and in-vivo Profiles and Characterization of Insulin Nanocarriers Based in Flexible Liposomes Designed for Oral Administration. *Lett. Drug Des. Discov.*, 2019, 16(1)
- [14] Mozafari, M.R. Liposomes: an overview of manufacturing techniques. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 2005, 10(4), 711-719. [PMID: 16341279]
- [15] Park, S.J.; Choi, S.G.; Devas, E.; Park, J.S. Encapsulation enhancement and stabilization of insulin in cationic liposomes. *Int. J. Pharm.*, 2011, 413(1-2), 267-272. [http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.05.061] [PMID: 21645598]
- [16] Sakradelski, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol. Res.*, 2001, 50(6), 537-546. [PMID: 11829314]
- [17] Trinder, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen receptor. *Ann. Clin. Biochem.*, 1969, 6, 24-37. [http://dx.doi.org/10.1177/000456326900600108]
- [18] Malvern. Technical Notes [Online]. Malvern Instruments Limited. <http://www.malvern.com/en/support/resource-center/technical-notes/TN101104IntensityVolumeNumber.aspx>
- [19] Wriedt, T. *Mie Theory, A review*. In: Hergert, W.; Wriedt, T., eds. *The Mie Theory. Basics and applications*. Germany, Springer Series in Optical Sciences, 2012, 169, pp. 53-79.
- [20] Badran, M. Formulation and in vitro evaluation of flufenamic acid loaded deformable liposome for improved skin delivery. *Dig. J. Nanomater. Biostruct.*, 2014, 9, 83-91.

- [21] Chen, M.; Liu, X.; Fahr, A. Skin penetration and deposition of carboxyfluorescein and tamoxifen from different lipid vesicular systems: In vitro study with finite and infinite dosage application. *Int. J. Pharm.*, 2011, 408(1-2), 225-234. [http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.02.006] [PMID: 21316430]
- [22] Putri, D.C.; Dwiastuti, R.; Marchaban, M.; Nugroho, A.K. Optimization of mixing temperature and sonication duration in liposome preparation. *J. Pharm. Sci. Commun.*, 2017, 14, 79-85. [http://dx.doi.org/10.24071/jpsc.142728]
- [23] Patel, H.M.; Ryman, B.E. Oral administration of insulin by encapsulation within liposomes. *FEBS Lett.*, 1976, 62(1), 60-63. [http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(76)80016-6] [PMID: 129340]
- [24] Spangler, R.S. Insulin administration via liposomes. *Diabetes Care*, 1990, 13(9), 911-922. [http://dx.doi.org/10.2337/diacare.13.9.911] [PMID: 2226109]
- [25] Choudhari, K.B.; Labhasetwar, V.; Dorla, A.K. Liposomes as a carrier for oral administration of insulin: effect of formulation factors. *J. Microencapsul.*, 1994, 11(3), 319-325. [http://dx.doi.org/10.3109/02652049409040461] [PMID: 8064555]
- [26] Mústata, G.; Dinh, S.M. Approaches to oral drug delivery for challenging molecules. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 2006, 23(2), 111-135. [http://dx.doi.org/10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.v23.i2.20] [PMID: 16952274]
- [27] Bendayan, M.; Ziv, E.; Gingras, D.; Ben-Sasson, R.; Bar-On, H.; Kidron, M. Biochemical and morpho-cytochemical evidence for the intestinal absorption of insulin in control and diabetic rats. Comparison between the effectiveness of duodenal and colon mucosa. *Diabetologia*, 1994, 37(2), 119-126. [http://dx.doi.org/10.1007/s001250050081] [PMID: 8163044]
- [28] Khan, M.A.; Agarwal, V. Composition and method for preparation of an oral dual controlled release formulation of a protein and inhibitor. *US Patent*, 2003, 20, 220-254.
- [29] TanHoor, C.; Dressman, J. Oral absorption of peptides and proteins. *STP Pharma. Sci.*, 1992, 2, 301-312.
- [30] Patel, H.M.; Stevenson, R.W.; Parsons, J.A.; Ryman, B.E. Use of liposomes to aid intestinal absorption of entrapped insulin in normal and diabetic dogs. *Biochim. Biophys. Acta*, 1982, 718(2), 183-193. [http://dx.doi.org/10.1016/0304-4165(82)90267-7] [PMID: 7046805]
- [31] Owens, D.R.; Zimman, B.; Bolli, G. Alternative routes of insulin delivery. *Diabet Med.*, 2003, 20(11), 886-898. [http://dx.doi.org/10.1046/j.1464-5491.2003.01076.x] [PMID: 14632713]
- [32] Lai, S.K.; Wang, Y.Y.; Hanes, J. Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2009, 61(2), 158-171. [http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2008.11.002] [PMID: 19133304]
- [33] Değim, İ.T.; Gümüşel, B.; Değim, Z.; Oşcalıkay, T.; Tay, A.; Gönar, S. Oral administration of liposomal insulin. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2006, 8(9-10), 2943-2949. [http://dx.doi.org/10.1166/jnn.2006.416] [PMID: 17048502]
- [34] Sipai Altaf Bhai, M.; Vandana, D.; Mamatha, Y.; Prasanth, V. Liposomes: An overview. *J. Pharm. Sci. Innov.*, 2012, 1(1), 13-21.
- [35] Vijayakumar, M.; Kovuru, R.; Vuddanda, P.; Singh, K.S.; Singh, S. Trans resveratrol loaded DSPE PEG 2000 coated liposomes: An evidence for prolonged systemic circulation and passive brain targeting. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, 2016, 33, 125-135. [http://dx.doi.org/10.1016/j.jddst.2016.02.009]
- [36] www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/wp-content/uploads/2011/02/DLS\_Terms\_defined\_Malvern.pdf
- [37] Martins, S.; Sarmiento, B.; Ferreira, D.C.; Souto, E.B. Lipid-based colloidal carriers for peptide and protein delivery—liposomes versus lipid nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine*, 2007, 2(4), 595-607. [PMID: 18203427]
- [38] Zhang, P.; Huang, Y.; Makhov, A.M.; Gao, X.; Zhang, P.; Li, S. Characterization of spherulites as a lipidic carrier for low and high molecular weight agents. *Pharm. Res.*, 2013, 30(6), 1525-1535. [http://dx.doi.org/10.1007/s11095-013-0990-y] [PMID: 23579481]
- [39] Knaidl, B.; Pallar, M.; Winter, G.; Lindner, L.H.; Hossann, M. Thermosensitive liposomal drug delivery systems: state of the art review. *Int. J. Nanomedicine*, 2014, 9, 4387-4398. [PMID: 25258529]
- [40] Tagami, T.; Ernsting, M.J.; Li, S.D. Optimization of a novel and improved thermosensitive liposome formulated with DPPC and a Brij surfactant using a robust in vitro system. *J. Control. Release*, 2011, 154(3), 290-297. [http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.05.020] [PMID: 21640149]
- [41] Thakur, R.; Das, A.; Chakraborty, A. The fate of anticancer drug, ellipticine in DPPC and DMPC liposomes upon interaction with HSA: a photophysical approach. *J. Photochem. Photobiol. B*, 2014, 130(5), 122-131. [http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.10.016] [PMID: 24322006]
- [42] Tian, J.L.; Ke, X.; Chen, Z.; Wang, C.J.; Zhang, Y.; Zhong, T.C. Melittin liposomes surface modified with poloxamer 188: in vitro characterization and in vivo evaluation. *Pharmazie*, 2011, 66(5), 362-367. [PMID: 21699070]
- [43] Grohmann, F.; Csémpesz, F.; Szogyi, M. Stabilization of small unilamellar DMPC-liposomes by uncharged polymers. *Colloid Polym. Sci.*, 1998, 276, 66-71. [http://dx.doi.org/10.1007/s003960050210]
- [44] Zhang, W.; Wang, G.; See, E.; Shaw, J.P.; Baguley, B.C.; Liu, J.; Amirapu, S.; Wu, Z. Post-insertion of poloxamer 188 strengthened liposomal membrane and reduced drug irritancy and in vivo precipitation, superior to PEGylation. *J. Control. Release*, 2015, 203, 161-169. [http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.02.026] [PMID: 25701612]
- [45] Lasic, D.D. *Liposomes from physics to applications*, 1st ed; Elsevier Science BV: Amsterdam, 1993.
- [46] Mozafari, M.R.; Reed, C.J.; Rostrom, C. Cytotoxicity evaluation of anionic nanoliposomes and nanolipoplexes prepared by the heating method without employing volatile solvents and detergents. *Pharmazie*, 2007, 62(3), 205-209. [PMID: 17416197]
- [47] Arciniegas, S.M.; Bernad, M.J.; Caballero, S.; Vargas, D. Glucose Response in Animals Induced with experimental Diabetes Type 1 after Treatment with Human Insulin Exposed to High Temperatures. *Tranzylv. Rev.*, 2017, XXV(23), 6191-6196.