



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

TÍTULO:

EVALUACIÓN DE LA EFICACIA PRECLÍNICA *IN - VITRO* / *IN - VIVO* EN
EL DESARROLLO DE UN PROTOTIPO DE INSULINA DE LIBERACIÓN
MODIFICADA PARA EL TRATAMIENTO DE DIABETES TIPO I EN
PERROS

TESIS:

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:

JUAN ISAAC CHÁVEZ CORONA

TUTORA PRINCIPAL

DINORAH VARGAS ESTRADA. FMVZ-UNAM.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

MARÍA JOSEFA BERNARD BERNARD. FQ-UNAM.

MARÍA ISABEL GRACIA MORA. FQ-UNAM.





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

DEDICATORIA

Esperando que sea un trabajo precedente para mejores avances en el tema correspondiente, y siendo un esfuerzo en conjunto de muchas personas en la obtención de resultados, quisiera resaltar que la consumación de este trabajo es debido, en especial, a la Dra. Sheila Peña por su acompañamiento en la realización de muchos de los procedimientos y de su apoyo incondicional para la escritura de esta tesis, así que para ella con todo mi aprecio y cariño, y especial dedicatoria.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) y al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IT202420, por el financiamiento para la ejecución del proyecto titulado: Evaluación de la seguridad no clínica *in vitro / in vivo* en el desarrollo de un prototipo de insulina de liberación modificada para el tratamiento de diabetes tipo I en perros, parte II.

A la responsable del proyecto: MVZ PhD Sara del Carmen Caballero Chacón, y corresponsable del proyecto: MVZ PhD Dinorah Vargas Estrada.

A la Unidad de Investigación Preclínica (UNIPREC), del conjunto E de la Facultad de Química, por permitir la realización experimental de la investigación *in vivo* en las instalaciones de la Unidad de Experimentación Animal (UNEXA).

A la Biol M en C María Isabel Gracia Mora y a la QFB PhD María Josefa Bernad Bernad por sus asesorías y todo su apoyo brindado en el proyecto.

Al QBP Ramiro González Romero por su asesoría en la fabricación de los formulados con liposomas.

A la QFB Jessica Contreras Guzmán principal responsable de la fabricación y caracterización de los formulados con liposomas.

Y en especial a la Dra. Sheila Irais Peña Corona por sus valiosas aportaciones con sus comentarios en la ejecución experimental y asesoría en el análisis estadístico de los resultados obtenidos, por su interés y compañía en las largas jornadas de trabajo en el bioterio.

A todos ellos, muchas gracias.

Resumen. La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad crónica metabólica que se caracteriza por una elevación anormal de la glucosa sanguínea. La afección surge de la alteración metabólica de los carbohidratos, las grasas y las proteínas causada por la alteración en la liberación de insulina, la acción de la insulina o ambas. Hoy en día la DM plantea un importante problema de salud pública. La DM y las complicaciones derivadas de la DM imponen una carga bastante importante para las personas, así como para el sistema sanitario de algunos países. En el área veterinaria, la DM es común en perros de mediana edad y geriátricos. Se estima un gasto de \$ 70 dólares por mes solo en insulina, y un valor de mercado (conservador) proyectado de ~ \$ 110 millones de dólares por año. Se elaboró una formulación de insulina de liberación modificada y se evaluó mediante pruebas preclínicas, la prueba de concepto o de eficacia y de toxicidad *in vivo*, en un modelo experimental de diabetes mellitus tipo I en ratas Wistar, con el fin de contar con el perfil de seguridad y eficacia del prototipo. Se probaron varios preparados de liposomas flexibles con adición de polímeros por diferentes métodos de manufactura; las características físicas y de estabilidad fueron determinadas para todos los preparados y los mejores preparados fueron evaluados *in vivo* en modelos experimentales de ratas Wistar de diabetes tipo 1 inducidos por medio de la administración de estreptozotocina a dosis de 45mg/kg por vía intraperitoneal, para determinar su liberación y efecto biológico. Se utilizaron 51 ratas Wistar sanas, machos, de 250-300 gramos de peso vivo; se distribuyeron de manera aleatoria en 9 grupos de seis animales cada uno, del grupo 1 al grupo 8, y el grupo 9 con 3 animales, a los cuales se les administró un formulado de liposomas con y sin insulina (numerados del 1 al 7), con diferentes características fisicoquímicas, tanto por vía oral (PO) como por vía subcutánea (SC). Se observó que los formulados 1 y 2 iniciaron su efecto farmacológico hipoglucemiante por vía SC aun antes que la insulina comercial de acción intermedia, persistiendo su efecto por más tiempo. Por vía oral no se observaron efectos hipoglucemiantes. En estudios previos se observaron resultados similares por estas vías, con el uso de liposomas, pero con distintos surfactantes; lo anterior permite el desarrollo de nuevos modelos de nanopartículas para la administración de insulina. La vía subcutánea resultó ser la vía de administración más eficiente de los formulados diseñados para disminuir glucemia en comparación con la vía oral. Los excipientes utilizados para la fabricación de liposomas no ejercieron algún efecto en los niveles de glucosa en sangre. Sobre los resultados obtenidos en la toxicidad, en los hallazgos *post mortem*, de las ratas del presente estudio, se observó degeneración de los órganos analizados (hígado y riñón),

tales como acumulación de gotitas de lípidos, infiltración de células inflamatorias, aumento de contenido fibroso, dilatación de los vasos porta, congestión de estos vasos y proliferación de células epiteliales de los conductos biliares.

Palabra clave: liposomas, insulina, diabetes, glucosa.

Abstract. Diabetes mellitus (DM) is a chronic metabolic disease characterized by an abnormal elevation of blood glucose. The condition arises from metabolic disturbance of carbohydrates, fats, and proteins caused by an imperfection in insulin release, insulin action, or both. Today, DM poses a significant public health problem. DM and the complications derived from DM impose a fairly considerable burden on individuals and the health system. DM is common in dogs, affecting middle-aged to senior dogs. Estimated spending of USD 70 per month on insulin alone and a projected (conservative) market value of ~ USD 110 million per year. Objective: Developed an insulin formulation of enhanced, modified release and evaluation through preclinical tests, proof of concept or efficacy and toxicity, in vivo, in an experimental model of diabetes mellitus in Wistar rats, to have the safety and efficacy profile of the prototype. Methodology: Several preparations of flexible liposomes with polymers were received by different manufacturing methods. For all the formulations, determined the physical and stability characteristics. The best formulations were evaluated in vivo in experimental models of Wistar rats of type 1 diabetes induced by the administration of streptozotocin at a dose of 45mg/kg intraperitoneally to determine its release and biological effect. Fifty-one healthy male Wistar rats of 250-300 grams live weight were used. The animals were randomly distributed into nine groups of six, each (from group 1 to group 8), and group 9 with three animals, to which a formulation of liposomes with and without insulin (numbered from 1 to 7) was administered, with different physicochemical characteristics, both orally and subcutaneously (SC). Results and Discussion: It was observed that formulations 1 and 2 started their hypoglycemic pharmacological effect by the SC route even before the intermediate-acting commercial insulin, persisting in its impact for a longer time. Oral hypoglycemic effects were not observed. Similar results have been observed in previous studies by these routes, with the use of liposomes but with different surfactants; This allows the development of new models of nanoparticles for the administration of insulin. Conclusion: The subcutaneous route turned out to be the most efficient route of administration of the formulations designed to reduce glucose concentration in blood compared to the oral way. In addition, the excipients used to manufacture liposomes did not affect blood glucose levels. Regarding the results obtained in toxicity, in the post-mortem findings of the rats in this study, degeneration of the analyzed organs (liver and kidney) was observed, such as accumulation of lipid droplets, infiltration of inflammatory cells, increase in content fibrous, dilatation of the portal vessels, congestion of these vessels and proliferation of epithelial cells of the bile ducts.

Keywords: liposomes, insulin, diabetes, glucose.

Contenido

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
3. DIABETES MELLITUS	7
3.1. Clasificación de la diabetes mellitus.	7
3.2. Insulina	8
3.3. Indicaciones para la terapia con insulina.	9
3.4. Clasificación de los tipos de insulina.	9
3.5. Especificaciones para el desarrollo de preparados de insulina para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2.	10
3.6. Funcionalidad de la insulina: Autofosforilación del receptor.	12
3.7. Insulina comercial.	13
Insulex R.....	13
5. ESTREPTOZOTOCINA	17
5.1. Mecanismo de acción de la estreptozotocina.	18
5.2. Respuesta glucémica y de insulina ante la administración de estreptozotocina (STZ)	20
5.3. Anormalidades en ratas diabéticas.	21
8. JUSTIFICACIÓN	23
9. HIPÓTESIS	25
10. OBJETIVO	25
10.1. Objetivos Específicos.	25
11. MATERIAL Y MÉTODOS	26
Pruebas preclínicas <i>in-vivo</i>.	26
Grupos de animales.	26
Tamaño de muestra.	27
Alimentación.	28
Obtención de muestra sanguínea para bioquímica	28
Metodología para la administración Intraperitoneal.	29
Prueba de tolerancia a la glucosa	30
Obtención de muestra sanguínea para glucosa.	31

Metodología para la administración subcutánea (SC) de formulados	32
Metodología para la administración oral forzada	32
14. RESULTADOS	34
Análisis estadístico	34
Prueba de tolerancia a la glucosa (PTG)	34
Grupos: 1, 2, 3, 4, 5	34
Grupos: 6, 7, 8 y 9	37
Administración de Formulados por vía Subcutánea (SC)	42
Administración de Formulados por vía Subcutánea (SC) sin administración de bolo de dextrosa por vía oral	46
Administración de Formulados por vía Subcutánea (SC) con administración de bolo de dextrosa por vía oral	48
Administración de Formulados por vía oral	49
Administración de Formulados por vía oral sin administración de bolo de dextrosa por vía oral	52
Administración de Formulados por vía oral con administración de bolo de dextrosa por vía oral	54
Bioquímica	56
Alanino Aminotransferasa (ALT)	56
Aspartato Aminotransferasa (AST)	58
Creatinina	58
Urea	59
Nitrógeno Ureico en sangre (BUN)	61
Registro de peso corporal	61
Anatomopatología	64
Grupo 1	64
Grupo 2	64
Grupo 3	65
Grupo 4	65
Grupo 5	65
Grupo 6	65
Grupo 7	66
Grupo 8	66

Evaluación histopatológica por individuo.	67
Diagnósticos morfológicos.	69
Fotomicrografías.	70
DISCUSIÓN	71
CONCLUSIÓN	87
PERSPECTIVAS	89
BIBLIOGRAFÍA	91
ANEXOS	97
1. CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA DE LA PRUEBA DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA (PTG) EN RATAS SANAS.	97
2. CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA DE LA PRUEBA A LA TOLERANCIA A LA GLUCOSA (PTG) DE RATAS CON DMT1.	99
3. CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA CON ADMINISTRACIÓN DE FORMULADOS POR VÍA SUBCUTÁNEA (SC).	101
4. CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA CON ADMINISTRACIÓN DE FORMULADOS POR VÍA ORAL FORZADA.	108
5. BIOQUÍMICA: AST, ALT, UREA, CREATININA, BUN.	115
6. Registro de peso corporal.	118

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Ventajas y desventajas de los liposomas.....	4
Cuadro 2. Parámetros biológicos básicos de ratas Wistar.....	13
Cuadro 3. Organización de los grupos y formulados administrados a animales.....	23
Cuadro 4. Formulados de los liposomas.....	27
Cuadro 5. Resumen de los tratamientos administrados.....	29
Cuadro 6. Concentración de glucosa en mg/dL de grupos 1, 2, 3, 4 y 5.....	31
Cuadro 7. Concentración de glucosa en mg/dL de grupos 6, 7, 8, y 9.....	34
Cuadro 8. Identificación de individuos analizados por histopatología.....	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Niveles trifásicos de glucosa e insulina en sangre después de la aplicación de Streptozotocina	19
Figura 2. Grupos de experimentación con sus correspondientes formulados.....	38
Figura 3. Imágenes representativas del daño histológico asociado a la Diabetes Mellitus inducida con Streptozotocina en ratas Wistar.....	64

1. INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad crónica metabólica que se caracteriza por una elevación anormal de la glucosa sanguínea (Muñoz, 2014). La afección surge de la alteración metabólica de los carbohidratos, las grasas y las proteínas causada por la deficiencia en la liberación de insulina, la acción de la insulina o ambas (Sen, 2016). Las principales categorías de diabetes son de tipo 1, tipo 2, y la DM gestacional. Tanto la DM tipo 1 como el tipo 2 son enfermedades multifactoriales en las que un trasfondo genético muy complejo interactúa con factores ambientales que contribuyen al desarrollo de la enfermedad (Chatzigeorgiou *et. al.*, 2009; FID, 2019)

Hoy en día la DM como enfermedad, plantea un importante problema de salud pública. La Federación Internacional de Diabetes (FID) ha estimado que, en 2017, 425 millones de personas (el 8,8% de todos los adultos) en todo el mundo de entre 20 y 79 años ahora tienen diabetes. Si esta tendencia ascendente continúa, que es el escenario más probable, entonces, para 2045, se estima que 693 millones de personas de 18 a 99 años, o 629 millones de personas de 20 a 79 años, vivan con DM (Vallianou *et. al.*, 2021). La DM se está convirtiendo en uno de los principales problemas de salud del mundo que afecta a personas de todas las edades, incluidos niños, jóvenes, adultos y mujeres embarazadas. La DM y las complicaciones derivadas de la DM imponen una carga bastante importante para las personas, así como para el sistema sanitario (Sen *et. al.*, 2016).

La DM tipo 1 es común en perros de mediana edad hasta geriátricos. Se estima que la prevalencia de DM dentro de la población de perros de compañía oscila entre el 0,2% y el 1,2%, y es incluso mayor en razas genéticamente predispuestas como Samoyedos, Terriers tibetanos, Cairn Terriers y otras. Además, sobre una base de datos de 2,5 millones de pacientes caninos, la prevalencia de DM en perros ha aumentado en un 79,7% desde 2006 (Banfield's State of Pet Health, Informe de 2016). Suponiendo una población general de 70 millones de perros en EE. UU. solo en 2012, se prevé un mínimo de 165 000 perros diabéticos solo en EE. UU. Una encuesta reciente a gran escala indicó además que 1/10 perros diabéticos están siendo eutanaziados en el momento del diagnóstico de la DM, y 1/10 podrían ser eutanaziados dentro de un año. Con un gasto estimado de \$ 70 dólares por mes solo en insulina, se estima un valor de mercado (conservador) proyectado de aproximadamente ~ \$ 110 millones de dólares por año (Moshref, *et. al.*, 2019).

Tratamiento con insulina. El tratamiento con insulina ha sido 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, y también de manera aguda, desencadenada por el aumento de la glicemia ocasionado por la ingesta de alimentos (Muñoz, 2014).

En el área humana la insulina es la línea de vida para los pacientes con DM tipo 1, de la misma forma para los pacientes con esta enfermedad en la Medicina Veterinaria. El uso inadecuado de la insulina puede ser peligroso. Dado que se espera que los pacientes se apliquen las inyecciones ellos mismos, la educación adecuada del paciente y la familia es imprescindible para un control óptimo de la diabetes (Sahasrabudhe *et al.*, 2017). La terapia con insulina se asocia con efectos adversos cutáneos importantes, que pueden afectar la cinética de absorción de la insulina y provocar variaciones glucémicas por encima y por debajo de los niveles objetivo de glucosa en sangre. Las complicaciones comunes de la inyección subcutánea de insulina incluyen: lipoatrofia, lipohipertrofia, reacciones alérgicas como eritema, prurito, endurecimiento, y reacciones cutáneas idiosincráticas (pigmentación, acantosis nigricans) (Richardson *et al.*, 2003).

Por lo tanto, los sistemas alternativos de administración de fármacos no invasivos, seguros, compatibles con el paciente y convenientes son esenciales para eliminar los problemas clínicos asociados con la inyección de insulina (Niu *et al.*, 2014). Los puntos fuertes y las limitaciones de varias vías de administración no invasivas, como la oral, bucal, nasal, pulmonar, peritoneal y transdérmica, se han investigado y revisado exhaustivamente (Wong *et al.*, 2016; Shah *et al.*, 2016; Wong *et al.*, 2018). La insulina se puede encapsular en sistemas de administración de fármacos en nanopartículas, micropartículas y liposomas. Los liposomas se definen como vesículas esféricas que consisten en una o más bicapas lipídicas. Estudios previos han indicado que los liposomas se pueden administrar a través de varias vías de administración, y en comparación con otros sistemas de administración de fármacos de tamaño submicrónico, los liposomas parecen ser sistemas potenciales de administración oral de fármacos debido a su biocompatibilidad, efecto protector contra la degradación enzimática, membranas bicapa estables y orientación específica de células blanco (Wong *et al.*, 2018).

En el presente trabajo de investigación, es continuación de la línea de investigación previa iniciada por la Dra. Arciniegas *et al.*, 2020. Previo a este estudio se desarrolló un prototipo de liberación modificada de insulina incluida en liposomas con diferentes composiciones de excipientes en su estructura, que permita simular la liberación fisiológica de insulina ante las variaciones de la concentración de glucosa en sangre en pacientes con

diabetes mellitus tipo 1. Además de su evaluación de eficacia y toxicidad pre clínica *in vivo* en modelos biológicos experimentales inducidos de diabetes mellitus tipo 1 (DMT1) en ratas Wistar.

El desarrollo de un vehículo novedoso que permita la administración de insulina con efectos normoglucemiantes en pacientes con DMT1 a largo plazo, disminuirá los efectos adversos de la aplicación constante de esta hormona por vía subcutánea, y por la vía de administración oral se establecerán las bases para una mejora en el desarrollo de formulaciones de liposomas para considerar esta vía como alternativa terapéutica en la administración de insulina.

Aunque se ha publicado la inocuidad de los excipientes utilizados en la formulación (Rowe et. al., 2009), se decidió conocer si existía algún efecto en la salud de los animales, se consideró la medición de analitos de importancia clínica tales como la alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), urea, nitrógeno uréico en sangre (BUN), y creatinina en los modelos experimentales de DMT1 inducida en ratas Wistar, con extracción de muestras sanguíneas previo a la administración de liposomas y al término de su periodo de experimentación.

Para conocer la eficacia de los liposomas con y sin insulina se obtuvieron muestras de sangre en diversos periodos de tiempo de los modelos experimentales en ratas Wistar con DMT1 para el monitoreo de la concentración de glucosa, y de esta forma descubrir la vida media y el tiempo de absorción de la insulina contenida en los liposomas y de los efectos de los excipientes en los niveles de glucosa en sangre.

Al término del tratamiento, se realizó la necropsia de los sujetos utilizados en el estudio, y se obtuvieron muestras para el análisis histopatológico de los riñones e hígado.

2. ANTECEDENTES

Los liposomas son pequeñas vesículas artificiales de forma esférica que pueden crearse a partir de colesterol y fosfolípidos naturales no tóxicos. Debido a su tamaño y carácter hidrofóbico e hidrofílico (además de biocompatibilidad), los liposomas son sistemas prometedores para la administración de fármacos. Las propiedades de los liposomas difieren considerablemente según la composición lipídica, la carga superficial, el tamaño y el método de preparación. Los liposomas pueden atrapar compuestos hidrofóbicos e hidrofílicos, evitar la descomposición de las combinaciones atrapadas y liberarlas en los objetivos designados (Cuadro1) (Akbarzadeh, 2013).

Cuadro 1. Ventajas y desventajas de los liposomas

Ventajas
Los liposomas aumentan la eficacia y el índice terapéutico del fármaco.
El liposoma aumenta la estabilidad a través de la encapsulación.
Los liposomas no son tóxicos, son flexibles, biocompatibles, completamente biodegradables y no inmunogénicos para administraciones sistémicas y no sistémicas.
Los liposomas reducen la toxicidad del agente encapsulado.
Los liposomas ayudan a reducir la exposición de los tejidos sensibles a fármacos tóxicos.
Flexibilidad para acoplarse con ligandos específicos del sitio para lograr una orientación activa

Clasificación de liposomas. El tamaño de los liposomas puede variar desde vesículas muy pequeñas (0,025 μm) hasta vesículas grandes (2,5 μm). Además, los liposomas pueden tener membranas de una o dos capas. El tamaño de la vesícula es un parámetro agudo para determinar la vida media en circulación de los liposomas, y tanto el tamaño como el número de bicapas afectan la cantidad de fármaco encapsulado en los liposomas. Según su tamaño y número de bicapas, los liposomas también se pueden

clasificar en una de dos categorías: 1. Vesículas multilamelares (MLV) y 2. Vesículas unilamelares (VU). En los liposomas multilamelares grandes (LMLV), las vesículas tienen una estructura de cebolla. Clásicamente, varias vesículas unilamelares se formarán en el interior de otras de menor tamaño, formando una estructura multilamelar de esferas concéntricas de fosfolípidos separadas por capas de agua. Las vesículas unilamelares también se pueden clasificar en dos categorías: 1. vesículas unilamelares grandes (LVU) y 2. vesículas unilamelares pequeñas (SUV). En los liposomas unilaminares, la vesícula tiene una única esfera bicapa de fosfolípidos que encierra la solución acuosa (Akbarzadeh, 2013).

Los liposomas convencionales y novedosos se han investigado ampliamente para la administración oral de péptidos en las últimas décadas. Los liposomas convencionales se preparan únicamente con fosfolípidos indispensables y colesterol, mientras que los liposomas novedosos están constituidos por fosfolípidos substituidos parcialmente y colesterol (Schlegel *et al.*, 2011).

Estos transportadores submicrónicos han atraído una atención sustancial para encapsular fármacos peptídicos y proteicos. Para optimizar el tamaño de las partículas y la eficiencia de atrapamiento de la insulina en el núcleo, se deben tomar en cuenta varios factores, que incluyen la proporción de fosfolípidos/colesterol, la proporción de fosfolípidos/fármaco, el pH del agente amortiguador durante la hidratación y la proporción de fase de la emulsión de agua en aceite. Una proporción adecuada de fosfolípidos/colesterol permite la formación de la fluidez de la membrana, permitiendo la encapsulación de grandes cantidades de moléculas de insulina y evitando la fuga de insulina del núcleo del liposoma (Wong *et al.*, 2018).

Categorías de liposomas que se han investigado para incluir a la insulina:

1. Liposomas convencionales: estructuras con bicapa simple/multi vesicular.
2. Liposomas con capa revestida:
 - Liposomas revestidos de polímeros naturales (ejemplos: quitosano, dextrano)
 - Liposomas revestidos de nanopartículas de sílice.
 - Liposomas revestidos con polietilenglicol.
 - Liposomas revestidos de mucina.
3. Liposomas con orientación específica de célula blanco:
 - Liposomas con biotina modificada.

- Liposomas con ácido fólico modificado.
 - Liposomas con lecitina modificada (ejemplos: aglutinina de germen de trigo, lectina de tomate, aglutinina europea ulex)
4. Bilosomas: liposomas que contienen sales biliares:
 - Deoxicolato de sodio.
 - Taurocolato de sodio.
 - Glicolato de sodio.
 5. Liposomas que contienen esteroides botánicos.
 6. Proliposomas: se convierten a liposomas una vez con el contacto con medios fisiológicos.
 7. Liposomas dobles: preparados con filtros con poros de diferentes tamaños.
 8. Liposomas a base de lípidos de membrana arqueobacteriana (Wong *et al.*, 2018)

En investigaciones previas, Arciniegas et al., 2019, se obtuvieron 14 formulaciones de liposomas con encapsulación de insulina, compuestos con diferentes surfactantes, tamaño de distribución, índice de polidispersión y potencial Z; los cuales obtuvieron un porcentaje de encapsulación mayor al 61%, con una concentración de insulina de 15UI/mL. Todos estos fueron evaluados *in-vivo* en ratas Wistar (con inducción de DM con estreptozotocina), por medio de su administración oral y subcutánea, y sus curvas de glucosa fueron obtenidas durante 480 minutos.

Todas las formulaciones por vía subcutánea obtuvieron una óptima reducción en los niveles de glucosa, sin embargo, la adición de BrijL23 produjo una mejor reducción durante los 420 minutos. Por la vía oral, la reducción de glucosa no alcanzó los niveles normales, pero la adición de Poloxámero 407 y BrijS10 mostraron la mejor reducción de los niveles de glucosa por esta vía. Concluyeron que la adición de surfactantes a la estructura lipídica puede modificar la liberación de insulina por diferentes rutas de administración, pero esto depende de las características del mismo surfactante, así como de la temperatura de la fase de transición de la bicapa lipídica (Arciniegas et al., 2020). Por lo anterior, en el presente trabajo se decidió continuar con el diseño de liposomas en diferentes concentraciones con el fin de mejorar el efecto de los prototipos de insulina de liberación modificada, en la reducción de la hiperglicemia en ratas diabetizadas experimentalmente.

3. DIABETES MELLITUS

La diabetes mellitus (DM) es un grupo de trastornos metabólicos de numerosas etiologías caracterizados por hiperglucemia e intolerancia a la glucosa. Sed, visión borrosa, poliuria y pérdida de peso son los síntomas generales de la DM. En la progresión diabética grave, las complicaciones como la cetoacidosis o un estado hiperosmolar no cetósico pueden provocar estupor, y la falta de un tratamiento eficaz puede aumentar el riesgo de coma y muerte (Sen et.al., 2016).

3.1. Clasificación de la diabetes mellitus.

Las principales categorías de diabetes son tipo 1, tipo 2, y la DM gestacional. Tanto la diabetes mellitus tipo 1 como el tipo 2 son enfermedades multifactoriales en las que un trasfondo genético muy complejo interactúa con factores ambientales que contribuyen al desarrollo de la enfermedad (Chatzigeorgiou *et al.*, 2009; FID, 2019).

La diabetes tipo 1 está causada por una reacción autoinmunitaria en la que el sistema inmunitario del organismo ataca a las células beta del páncreas que producen insulina. Como consecuencia, el cuerpo no produce insulina o la cantidad que produce no es suficiente (FID, 2019). La diabetes tipo 1 (comúnmente conocida como diabetes de inicio juvenil o insulino dependiente) representa aproximadamente el 10% de todos los casos de diabetes mellitus y se caracteriza por una destrucción autoinmune de las células beta pancreáticas por linfocitos efectores que conduce a la pérdida de producción de insulina y la hiperglucemia prospectiva. Al menos 20 genes del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) están implicados en la diabetes tipo 1, que se caracteriza por la presencia de autoanticuerpos contra proteínas como la insulina, la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) y la tirosina fosfatasa ICA512 (también conocida como IA-2) (Chatzigeorgiou *et al.*, 2009). En el área de la Medicina Veterinaria, la presentación de la enfermedad en los perros, suelen tener entre 4 y 14 años y la mayoría son diagnosticados entre los 7 y los 10 años. La diabetes ocurre en las hembras con el doble de frecuencia que en los machos (AVMA, 2022).

La diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) (comúnmente conocida como diabetes de inicio en la edad adulta) representa aproximadamente el 90% de todos los casos (Chatzigeorgiou *et al.*, 2009). La diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) también se conoce como diabetes mellitus no insulino dependiente (DMNID), que se caracteriza por la resistencia del tejido hacia la acción de la insulina o la disminución relativa de la secreción de insulina. La DM tipo 2 está

relacionada con la obesidad y suele aparecer más tarde en la vida (después de los 40 años en el humano). La DMT2 puede pasar desapercibida (asintomática) durante varios años, lo que puede dar lugar a diferentes complicaciones. Las personas que padecen DMT2 no dependen de la insulina de una fuente exógena. (Sen *et al.*, 2016).

La Diabetes mellitus gestacional (DMG), se refiere a las mujeres embarazadas previamente diagnosticadas con diabetes o que padecen hiperglucemia diagnosticada por primera vez durante el embarazo (FID, 2019). El desarrollo de resistencia a la insulina al final de la gestación es un proceso común en los humanos. La fisiopatología subyacente de la DMG se caracteriza por presentar la disminución de la sensibilidad a la insulina (respuesta normal de los tejidos a su acción, explicada por el factor de sensibilidad a la insulina) o por el aumento de la resistencia a la insulina (la respuesta biológica disminuida en los tejidos blancos, principalmente músculo, hígado y grasa a los efectos biológicos de esta hormona)(Morales *et al.*, 2007) que se define como la incapacidad de una concentración definida de insulina para efectuar una respuesta biológica predecible del metabolismo de los nutrientes a nivel del tejido diana (Poretsky, 2017).

3.2. Insulina.

Es secretada por las células beta de los islotes de Langerhans en el páncreas. Llega al hígado a través de la circulación portal y luego se extiende al resto del cuerpo y alcanza sus otros órganos diana, principalmente el músculo esquelético y tejido adiposo. La síntesis y secreción de insulina se estimulan predominantemente por el aumento en las concentraciones de glucosa en la sangre, pero el grado en el que las células beta responden a la glucosa es modificada por muchos otros factores, incluyendo nutrientes, hormonas y estimulación nerviosa. (Burge *et al.*, 1997; Porte, 2002; Borgoño *et al.*, 2012).

Los principales blancos de acción de la Insulina en el metabolismo de la glucosa se encuentran en:

- Hígado

- Estimula la utilización de glucosa promoviendo la glucogénesis.
- Estimula el depósito de glucógeno.
- Reduce o inhibe la producción hepática de glucosa (Glucogenólisis).
- Reduce o inhibe la formación de glucosa a partir de aminoácidos (Gluconeogénesis).

- Músculo Esquelético

- Mejora la disponibilidad, almacenaje y oxidación de la glucosa.
- Estimula la traslocación del transportador GLUT-4 del citoplasma a la membrana celular muscular.
- Estimula la síntesis de proteínas musculares.

- Adipocito

- Disminuye la lipólisis en el adipocito y con ello la disponibilidad de glicerol para la gluconeogénesis (Rodríguez, 2003).

3.3. Indicaciones para la terapia con insulina.

Los objetivos del tratamiento con insulina son los siguientes: normalizar la glucosa en ayunas, normalizar la glicemia posprandial y minimizar el riesgo de hipoglicemia (Rodríguez, 2003).

Se requiere insulina para tratar los siguientes grupos:

1. Diabetes tipo 1 (propensa a la cetosis): todos los pacientes desde el diagnóstico.
2. Diabetes tipo 2

- Con falla secundaria a los medicamentos antidiabéticos o pobre control glicémico.
- Durante una enfermedad intercurrente grave (puede ser temporal).
- Con complicaciones metabólicas agudas (p. ej., estados hiperosmolares)
- Con complicaciones diabéticas avanzadas, (por ejemplo, insuficiencia renal)
- Antes, durante y después de una cirugía o procedimientos mayores
- Durante el tratamiento con esteroides orales o parenterales (glucocorticoides)

3. Diabetes gestacional (después de fallar con la dieta o medicamentos orales antidiabéticos)

3.4. Clasificación de los tipos de insulina.

Los diferentes tipos de insulina usados en el tratamiento de la DMT1 se clasifican por la duración de su acción en tres grupos principales:

- De acción corta.
- De acción intermedia.
- Acción larga (Strachan, 2013)

La duración de la acción puede prolongarse mediante la adición a pH neutro de una proteína de pescado llamada protamina para formar insulina isófana (o NPH (protamina neutra Hagedorn)). La protamina se une a la insulina y reduce su solubilidad después de la inyección, lo que retrasa su absorción. Al agregar un exceso de iones zinc a la insulina, se produce la cristalización de la insulina en una suspensión, lo que también retrasará la liberación de insulina después de la inyección subcutánea. Esto forma la insulina de liberación lenta, que son suspensiones de cristales de insulina zinc, en general, estas insulinas "depot" modificadas son preparaciones turbias (Strachan, 2013).

3.5. Especificaciones para el desarrollo de preparados de insulina para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2.

Las preparaciones de insulina se diferencian principalmente por sus perfiles cinéticos/farmacodinámicos. Por lo general, se clasifican en preparaciones de acción rápida, corta, intermedia y prolongada, y se utilizan solas o como mezclas libres o preparaciones premezcladas de insulina de acción rápida / corta e insulina de acción intermedia / prolongada en diversas proporciones. Se utiliza la misma clasificación para los análogos de insulina, que se diferencian de las preparaciones de insulina humana por la sustitución de aminoácidos u otros cambios químicos, por ejemplo: adición de una cadena de ácidos grasos dentro de la molécula de insulina. (Owens, 2011; European Medicines Agency, 2018; Jacob *et. al.*, 2018; Donner *et. al.*, 2019; Jarosinski *et. al.*, 2021; Bolli *et. al.*, 2022).

Farmacocinética. Es necesario que también se realicen estudios de farmacocinética (FC) en todo tipo de pacientes a los que se destina el tratamiento. Se deben proporcionar datos farmacocinéticos completos, incluida la concentración máxima de insulina, el tiempo hasta la concentración máxima, el área bajo la curva insulina-tiempo y la vida media. Además de los estudios cinéticos en voluntarios sanos, se deben realizar estudios en pacientes diabéticos tipo 1 y tipo 2, adultos y niños (estratificados por edad), y en diversas situaciones asociadas a la variabilidad farmacocinética: dosis de insulina, lugar de inyección y grosor en la capa de grasa contribuye a la considerable variación de los parámetros

farmacocinéticos observados con la insulina. (European Medicines Agency, 2018; Donner et. al., 2019)

Farmacodinámica. Los datos farmacodinámicos en pacientes sensibles a la insulina con diabetes tipo 1 son de importancia primordial para la comparación de preparaciones de insulina, incluido su uso en mezclas. La técnica de pinzamiento de glucosa, propuesta por DeFronzo y colaboradores en 1979, la cual permite conocer tanto la sensibilidad tisular a la insulina (hepática y muscular) como la respuesta de la célula β a la glucosa; y esta técnica tiene dos variantes: el pinzamiento (“clamp”) hiperinsulinémico que permite cuantificar la utilización global de glucosa bajo un estímulo de hiperinsulinemia y el pinzamiento hiperglucémico, que permite medir la respuesta pancreática a la glucosa bajo condiciones de hiperglucemia, son los métodos preferidos para evaluar el perfil de acción del tiempo de las insulinas. (Martínez *et. al.*, 2011; European Medicines Agency, 2018; Donner *et. al.*, 2019). El clamp hiperinsulinémico (hiperinsulinémico-euglucémico) se basa en el concepto de que bajo concentraciones constantes de hiperinsulinemia, la cantidad de glucosa captada por los tejidos insulino-dependientes será proporcional a la tasa de infusión de glucosa exógena necesaria para mantener constante la concentración de glucosa circulante. La meta del clamp es aumentar la concentración de insulina en 100 μ U/ml sobre su valor basal y mantener constante la concentración de glucosa en sangre en aproximadamente 90 mg/dl mediante ajustes periódicos en una infusión de glucosa. En relación con el clamp hiperglucémico, éste nos permite medir la respuesta pancreática a la glucosa bajo condiciones de hiperglucemia. Su meta es aumentar la concentración plasmática de glucosa a 125 mg/dl sobre la concentración basal y mantenerla así durante un periodo aproximado de dos horas. En esta técnica el páncreas es sometido a un reto, lo que permite evaluar la secreción bifásica de la insulina in vivo, donde una alteración en la primera fase de la secreción de insulina será un reflejo de una patología de células β (Martínez *et. al.*, 2011).

Estudios terapéuticos confirmatorios. Los estudios serán generalmente controlados de forma activa utilizando una preparación de insulina como comparador con un perfil farmacológico similar al del agente analizado. En pacientes con diabetes tipo 1, el período de ejecución debe usarse para evaluar la variabilidad en los perfiles de glucosa en sangre y el número de episodios hipoglucémicos al inicio del estudio. Debe tener una duración suficiente para permitir la estabilización del control glucémico (European Medicines Agency, 2018).

Los estudios terapéuticos de confirmación deben evaluar la seguridad y eficacia de la preparación de insulina en la diabetes tipo 1 y tipo 2. Los pacientes deben ser tratados con el objetivo glucémico teniendo en cuenta los efectos adversos limitantes, en particular la hipoglucemia. La fase comparativa debería durar habitualmente 6 meses. Para los nuevos análogos de insulina, también deben estar disponibles datos de seguimiento que cubran un período de al menos 12 meses (Dornhorst et. al., 2007; European Medicines Agency, 2018).

3.6. Funcionalidad de la insulina: Autofosforilación del receptor.

La insulina es una hormona importante que participa en la regulación del metabolismo energético y de los lípidos a través de la activación de una cascada de señalización intracelular que involucra al receptor de insulina (INSR), las proteínas del sustrato del receptor de insulina (IRS), la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) y la proteína quinasa B (AKT).

La insulina activa el receptor de insulina tirosina quinasa (IR), que fosforila y recluta diferentes adaptadores de sustrato como la familia de proteínas IRS (insulin receptor substrate). El IRS fosforilado con tirosina muestra los sitios de unión para numerosos socios de señalización. Entre ellos, PI3K (tipo de enzima que transmite señales en las células y que ayuda a controlar el crecimiento celular.) Algunos tumores tienen concentraciones más altas de PI3K que lo normal. También se llama cinasa PI3 y fosfatidilinositol-3 cinasa) tiene un papel importante en la función de la insulina, principalmente a través de la activación de las cascadas Akt / PKB y PKCζ (Cell Signaling Technology, 2021).

La Akt activada induce la síntesis de glucógeno mediante la inhibición de GSK-3; síntesis de proteínas a través de mTOR y elementos posteriores; y supervivencia celular mediante la inhibición de varios agentes pro apoptóticos (Bad, factores de transcripción FoxO, GSK-3 y MST1). Akt fosforila e inhibe directamente los factores de transcripción FoxO, que también regulan el metabolismo y la autofagia. A la inversa, se sabe que AMPK regula directamente FoxO3 y activa la actividad transcripcional (Cell Signaling Technology, 2021).

La señalización de la insulina también tiene efectos mitogénicos y de crecimiento, que en su mayoría están mediados por la cascada de Akt, así como por la activación de la vía Ras / MAPK. La vía de señalización de la insulina inhibe la autofagia a través de la cinasa ULK1, que es inhibida por Akt y mTORC1 y activada por AMPK. La insulina estimula

la captación de glucosa en los músculos y los adipocitos mediante la translocación de las vesículas GLUT4 a la membrana plasmática. La translocación de GLUT4 implica la vía PI3K / Akt y la fosforilación de CAP mediada por IR, y la formación del complejo CAP: CBL: CRKII. Además, la señalización de la insulina inhibe la gluconeogénesis en el hígado, mediante la interrupción de la unión de CREB / CBP / mTORC2 (Cell Signaling Technology, 2021).

Entre otros efectos de la insulina, se sabe que regula varios aspectos del desarrollo y función del tejido adiposo ya que estimula el programa de diferenciación de las células adiposas. La insulina puede activar sus respuestas en el tejido adiposo a través de dos variantes de empalme de INSR: INSR-A, que se expresa predominantemente en células mesenquimales y menos diferenciadas y principalmente ligada a la proliferación celular, e INSR-B, que se expresa más en células terminalmente diferenciadas y acoplado a efectos metabólicos. Hallazgos recientes han revelado que diferentes distribuciones de INSR y una relación INSR A: INSR-B alterada pueden contribuir a anomalías metabólicas durante el inicio de la resistencia a la insulina y la progresión a diabetes tipo 2 (Cignarelli et. al., 2019).

El papel de la insulina en la regulación del desarrollo y la función del tejido adiposo es fundamental. La insulina estimula el transporte de glucosa y ácidos grasos y la síntesis de lípidos y suprime la lipólisis (Laviola et. al., 2006). Además, la insulina ejerce un papel fundamental en la modulación de las últimas etapas de la diferenciación de los adipocitos al inducir la expresión de PPAR γ , el gen maestro para la regulación de la adipogénesis (Cignarelli et. al., 2016). Además, varias moléculas con actividades paracrinas y endocrinas, como leptina, adiponectina, quemerina, omentina y vaspina, así como proteínas implicadas en la remodelación de la matriz extracelular, tienen una regulación insulino dependiente y existe una interacción compleja entre la red vascular y los adipocitos (Cignarelli et. al., 2019).

3.7. Insulina comercial.

Insulex R.

En el presente trabajo, se utilizará la insulex R, es una insulina de acción rápida, isofana, se caracteriza por ser idéntica a la insulina humana natural y por su grado de pureza. Minimiza las reacciones alérgicas a la insulina, lipodistrofia y resistencia a la insulina, y será para ser encapsularla en los liposomas que se diseñarán, es una insulina humana de acción rápida regular (origen ADN recombinante). Solución inyectable 100 U.I./mL. Expresada en *Pichia pastoris*. La acción se inicia a los 30 min, el efecto máx. se

presenta a las 1,5 a 3,5 h con una duración de acción aproximada de 7-8 h. Vía de administración: subcutánea, intramuscular o intravenosa (Vidal Vademecum Spain, 2020)

4. LA RATA COMO MODELO EXPERIMENTAL DE LA DIABETES MELLITUS

El uso de animales no humanos en la investigación biomédica ha aportado importantes contribuciones al progreso médico alcanzado en nuestros días. Los seres humanos han estado utilizando otras especies de animales vertebrados como modelos de su anatomía y fisiología desde los albores de la medicina (Nuno Henrique, 2013). La rata Noruega (*Rattus norvegicus*), conocida también como rata marrón, ha sido utilizada en investigación por más de un siglo y es, de hecho, la primera especie de mamífero domesticada fundamentalmente para propósitos científicos (Benavides, 2003). El uso de la rata como animal de laboratorio y modelo experimental de la diabetes se ha venido utilizando por sus características biológicas y de modificación en su tipo para el conocimiento de la patogenia y alternativas terapéuticas de la enfermedad, así mismo, los resultados obtenidos son extrapolables tanto en la medicina humana como en la medicina veterinaria; a continuación, se presentan los datos biológicos de la especie *R. norvegicus*.

La rata Wistar tiene un ciclo reproductor poliéstrico continuo de 4-5 días. Alcanza la pubertad a los 70-80 días de vida, con un peso de 200 a 250g, y mantiene una capacidad de concebir unos 18-20 meses. La duración de la gestación es de 21-22 días, con camadas de 7 crías por parto (González, 2011). En el cuadro 2 se muestran los parámetros biológicos de las ratas Wistar tomado de González, 2011.

Cuadro 2. Parámetros biológicos básicos de ratas Wistar:

Parámetro	Valor normal
Número de cromosomas	42
Vida útil (años)	2-4
Peso corporal al nacimiento (g)	4.5-6
Ingesta diaria de alimentos (g / 100g de peso corporal)	10
Ingesta diaria de agua (mL/ 100g de peso corporal)	10-15
Defecación (g/24h)	9-13
Producción de orina (mL/24h)	10-15
Peso de los órganos (en % de peso corporal)	
Suprarrenal (simple)	0.02
Sangre	5-7
Cerebro	1
Corazón	0.5
Riñón (único)	0.5
Hígado	3
Pulmón	1
Ovario (único)	0.05

Bazo	0.2
Testículo (sencillo)	0.5
Timo	0.07
Tiroides	0.005

En los modelos de diabetes, el desarrollo de la enfermedad en las ratas Wistar se asemeja tanto en humanos como en perros de maneras importantes, y de la posibilidad de administrar o modificar agentes externos (por ejemplo, toxinas, estrés, dieta y vacunación) para modificar la enfermedad; y para los estudios de fármacos, el tamaño de la rata permite extracciones de sangre en serie. (Iannaccone, 2009)

5. ESTREPTOZOTOCINA

La estreptozotocina (STZ) se aisló por primera vez del microorganismo *Streptomyces acromogenes*, mostrando actividad antibiótica de amplio espectro. Desde su descubrimiento en 1959, la STZ se ha utilizado ampliamente para la inducción de diabetes tipo 1 en animales de experimentación y en estudios preclínicos. Entre varios productos químicos disponibles utilizados para inducir la diabetes, STZ es el más preferido para modelar la diabetes humana en animales (Goyal, 2016).

Las alteraciones estructurales, funcionales y bioquímicas observadas en la diabetes inducida por STZ se asemejan a las que suelen aparecer con la diabetes en otras especies con en humanos y caninos. Por lo tanto, la diabetes inducida por STZ representa un modelo clínicamente relevante para estudiar la patogenia de la diabetes y las complicaciones asociadas en animales de experimentación. El género es un factor responsable de las variaciones en la inducción de diabetes entre machos y hembras, ya que los estrógenos interfieren con la acción de STZ, las hembras son menos susceptibles a la acción diabetogénica de STZ que los machos. Químicamente, la STZ es un compuesto de glucosamina nitrosoarea y se denomina en el sistema IUPAC como (2-desoxiD-glucosa derivado de N-metil-N-nitrosilurea) (Goyal, 2016).

La STZ es un compuesto hidrófilo que se presenta como un polvo cristalino de color amarillo pálido o blanquecino con un peso molecular de 265 g/mol y fórmula molecular C₈H₁₅N₃O₇. Tiene una vida media biológica corta de solo 5-15 min. La acumulación de STZ es preferentemente en las células beta pancreáticas a través del sistema transportador GLUT2 lo que da como resultado la citotoxicidad de las células beta. Principalmente se utilizó como agente alquilante en la quimioterapia de tumores metastásicos de los islotes pancreáticos. La actividad diabetogénica de STZ se hizo evidente por primera vez en 1963. Posteriormente se utilizó como opción para la diabetes experimental en animales (Goyal, 2016).

Estructuralmente se parece a la 2-desoxiD-glucosa, pero con un reemplazo en la posición C2 con un grupo N-metil-N con un grupo metilo unido en un extremo y una molécula de glucosa en el otro (Goyal, 2016).

La mortalidad por STZ es multifactorial y la principal causa puede ser la toxicidad en sistemas de órganos vitales como el riñón, el corazón y el sistema nervioso central. Existen informes sobre los síntomas inducidos por STZ tales como la enfermedad de Alzheimer

(Salkovic, 2013), dolor crónico (Courteix, 1993), genotoxicidad, muerte de neuronas retinianas, tumores renales y deformidades óseas en animales de laboratorio (Goyal, 2016).

5.1. Mecanismo de acción de la estreptozotocina.

La STZ contiene una molécula de glucosa unida a una fracción de metilnitrosourea altamente reactiva y se cree que ésta ejerce los efectos citotóxicos de la STZ, mientras que la fracción de glucosa dirige la sustancia química a las células β pancreáticas. La STZ tiene una vida media corta, debido al rápido metabolismo en el hígado y la eliminación por excreción renal. Una vez que la STZ se elimina del cuerpo, el deterioro funcional adicional del hígado o el riñón puede atribuirse a los efectos de la hiperglucemia diabética. Esta es la base para estudiar los mecanismos de las complicaciones diabéticas de STZ en estos órganos, así como en otros órganos como el cerebro, el corazón y los músculos (Akinlade, 2021; Barriga et al., 2022).

Al ser un análogo de la glucosa, la STZ ingresa a las células β a través del transportador GLUT2 y se acumula intracelularmente. La STZ dentro de las células forma un agente alquilante, diazometano (DAM), que provoca la metilación del ADN y provoca fragmentación del ADN, daño celular, eventual apoptosis y necrosis. y por lo tanto una acción diabetogénica. Aparte de la metilación del ADN, la STZ también induce diabetes a través de múltiples mecanismos, como el aumento de los niveles de NADPH, ya sea por autooxidación de glucosa o producción de diacilglicerol (DAG) y aumento de la generación de radicales libres de O_2 , activación de la vía de la proteína quinasa C, flujo de glucosa a través de la ruta metabólica de los polioles, acumulación de productos finales de glicación avanzada y secreción de citoquinas. Al involucrar todos estos mecanismos, debido a que la STZ daña selectivamente las células β , se le considera un compuesto único para modelar la diabetes en animales con una construcción aceptable y validez aparente (González, 2000; Lenzen, 2008; Giacco, 2019).

La STZ es más estable a un pH ácido de 4.5 y se degrada a un pH alcalino del citosol en las células β pancreáticas y produce un subproducto diazometano (DAM) que actúa como agente alquilante. La STZ conduce a una rápida degradación de las hebras de ADN a través de la interacción entre STZ y los residuos de citosina en el ADN (Goyal, 2016).

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) aumentan y provocan un desequilibrio entre los mecanismos de defensa prooxidantes y antioxidantes del cuerpo y da como resultado una condición llamada estrés oxidativo (Eleazu, 2013).

Las primeras etapas de la diabetes inducida por STZ en ratas se caracterizan por la generación de radicales libres que incluyen especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS). Estas especies reactivas como el radical superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo (OH) y el peroxinitrito (ONOO) inducen estrés oxidativo en animales diabéticos. La autooxidación de la glucosa, la vía de los polioles, la glicación de proteínas y la formación de productos de glicación avanzada son mecanismos que generan radicales libres, los cuales son responsables del estrés oxidativo en animales y humanos diabéticos. La administración de STZ a animales de experimentación muestra un aumento de malondialdehído y una disminución de los niveles de las enzimas antioxidantes catalasa, glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa. Por lo tanto, el aumento de la peroxidación de lípidos y la disminución de la actividad antioxidante significan vulnerabilidad de las células β al estrés oxidativo inducido por STZ. El ácido úrico se forma como consecuencia de la degradación del trifosfato de adenosina (ATP) por la xantina oxidasa (XOD) durante el metabolismo de STZ. Libera radicales superóxido e hidroxilo a partir de la dismutación del H_2O . Este aumento de la producción de ROS con privación de catalasa y glutatión peroxidasa estimula el proceso de destrucción de las células β (Goyal, 2016).

Las consecuencias auxiliares incluyen la formación de endoperóxidos, acumulación de tromboxano- B_2 y trombosis. El estrés oxidativo y la vía del NO están relacionados porque se modulan entre sí, provocando la destrucción de las células β después de la administración de STZ (Goyal, 2016).

El daño del ADN inducido por STZ desencadena el proceso llamado poli ADP-ribosilación. Conduce al agotamiento del dinucleótido de nicotinamida y adenina celular (NAD^+), la reducción del contenido de ATP y la sucesiva inhibición de la síntesis y secreción de insulina. La acción diabetogénica de STZ en animales se atribuye a la reducción de NAD^+ pancreático. La metilación y el daño del ADN inducidos por STZ conducen al inicio de los procesos de reparación del ADN, que implican la activación de la poli(ADP-ribosa) sintetasa (PARP) que agota el NAD^+ celular y el ATP. La activación del proceso de poliADPribosilación es más importante para la diabetogenicidad de STZ que el propio daño del ADN. Provoca la activación de las xantina oxidasas (XOD) y la formación de ácido úrico, radicales superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo; se manifiesta como aumento del estrés oxidativo y muerte celular (Goyal, 2016).

Los mecanismos de reparación del ADN sobre estimulados provocan la activación sostenida de PARP, agotando así las reservas de NAD^+ y ATP. La concentración

disminuida de ATP da como resultado la inhibición de la síntesis de insulina y la inducción de diabetes. Una disminución de NAD⁺ también conduce a la terminación de la función celular y la muerte de las células β (Wilson, 1990; Eleazu, 2013).

5.2. Respuesta glucémica y de insulina ante la administración de estreptozotocina (STZ)

Los animales tratados con STZ muestran una respuesta glucémica trifásica después de la destrucción de células β . Se caracteriza por una fase hiperglucémica inicial con disminución del nivel de insulina. La segunda fase hipoglucémica se debe a una liberación masiva de insulina de las células β rotas. La fase hiperglucémica constante y final implica un aumento de los niveles de glucosa en sangre hasta 350-400 mg/dl. La primera fase comienza con un aumento de la concentración de glucosa en sangre, 1 h después de la administración de la toxina, y una disminución de la insulina plasmática. Esta fase hiperglucémica, que suele durar de 2 a 4 h, está provocada por la inhibición de la secreción de insulina que conduce a la hipoinsulinemia. Durante esta fase las células β muestran las siguientes características morfológicas: vacuolización intracelular, dilatación del retículo endoplásmico rugoso, disminución del área de Golgi, reducción de los gránulos secretores y del contenido de insulina, e inflamación de las mitocondrias (Lenzen, 2008).

La segunda fase, nuevamente una fase hipoglucémica, generalmente ocurre de 4 a 8 h después de la inyección de la toxina y dura varias horas. Puede ser tan grave que provoque convulsiones e incluso puede ser mortal sin la administración de glucosa, en particular cuando las reservas de glucógeno hepático se agotan por inanición. Esta grave hipoglucemia transicional se produce por la inundación de la circulación con insulina como resultado de la ruptura de la membrana celular y de los gránulos secretores inducida por la toxina. Además de los cambios morfológicos observados en la primera fase, los núcleos de las células beta son picnóticos y no muestran tinción positiva para TUNEL; estos cambios son irreversibles. La tercera fase es la fase hiperglucémica diabética permanente. Desde el punto de vista morfológico, se observa desgranulación completa y pérdida de la integridad de las células beta en un plazo de 12 a 48 h. Las células no beta permanecen intactas, lo que demuestra el carácter selectivo de células beta de la acción tóxica. Los restos celulares que se originan de las células beta moribundas son eliminados por macrófagos scavengers no activados (Lenzen, 2008).

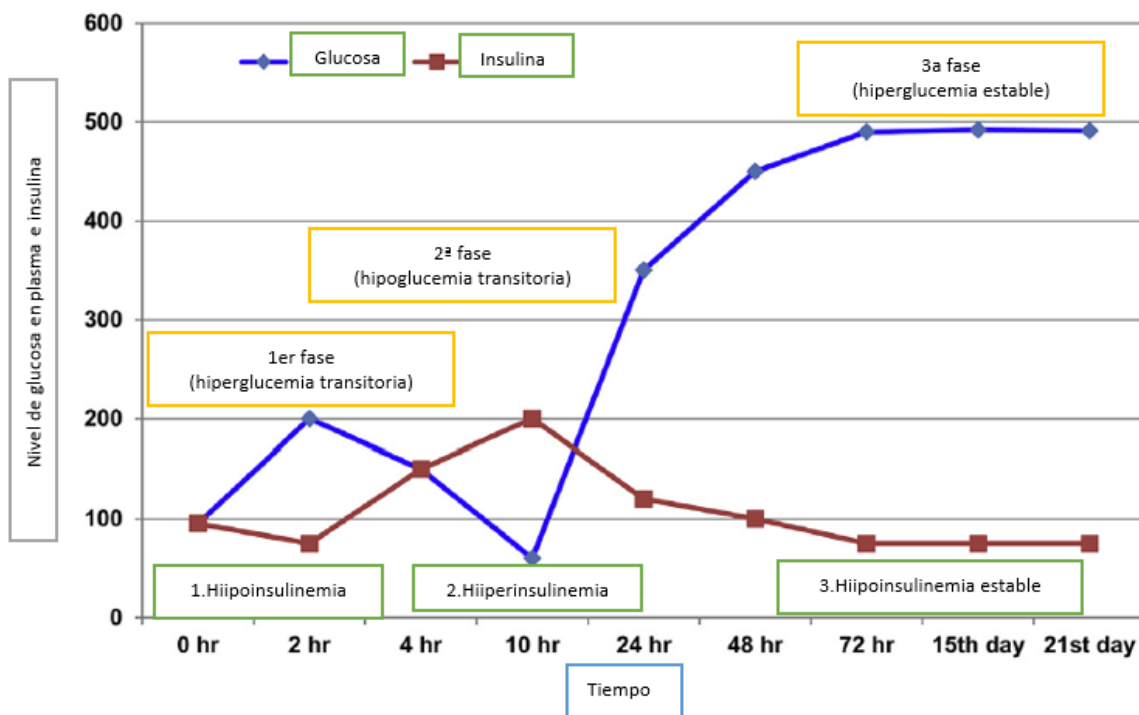


Figura 1. Niveles trifásicos de glucosa e insulina en sangre después de la inyección de STZ (Adaptado de Goyal, 2016).

5.3. Anormalidades en ratas diabéticas.

La rata se usa comúnmente como modelo animal para la diabetes tipo 1 inducida por STZ. La producción de un estado diabético en ratas depende de la dosis de STZ (Arison et al., 1967; Junod et al., 1969; Ganda et al., 1976). El procedimiento más utilizado es administrar una dosis de STZ (40 a 70 mg/kg) a ratas de 8 a 10 semanas de edad (Brondum et al., 2005).

La disfunción de las células β pancreáticas y los cambios en la glucosa sanguínea y la insulina en ratas diabéticas inducidas por STZ se acompañan de muchas otras anomalías. En ratas con diabetes se demostró un aumento de las concentraciones plasmáticas de la fosfatasa alcalina, la aspartato transaminasa y la alanina transaminasa y cambios en las concentraciones de otras enzimas relacionadas con el metabolismo de los carbohidratos. Además, se encontraron niveles elevados del factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interleucina 1b (IL-1b), IL-6, factor nuclear kB (NF-kB) unidad p65 y NO (óxido nítrico) comparadas con las ratas control. Estudios recientes también han demostrado un deterioro en el sistema de defensa antioxidante en ratas diabéticas inducidas por STZ. Los

niveles de peróxidos de lípidos, hidroperóxidos y carbonilos de proteínas son significativamente más altos en plasma, tejido pancreático y riñón de animales diabéticos. Simultáneamente, se encontró que las concentraciones plasmáticas de las enzimas superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión-S-transferasa estaban profundamente reducidas en eritrocitos, tejido pancreático, hígado y riñón de ratas con diabetes en comparación con animales sanos (Szkudelski, 2012).

8. JUSTIFICACIÓN

Durante la última década, ha sido evidente que la incidencia mundial de diabetes está aumentando drásticamente como resultado de la pandemia de diabetes. La DM se está convirtiendo en uno de los principales problemas de salud del mundo que afecta a personas de todas las edades, incluidos niños, jóvenes, adultos y mujeres embarazadas. La DM y sus complicaciones derivadas imponen un gasto financiero bastante importante para las personas, así como para el sistema sanitario.

En el ámbito de la medicina humana en 2019:

- Aproximadamente 463 millones de adultos (20-79 años) vivían con diabetes; se estima que para 2045 esto aumentará a 700 millones.
- La proporción de personas con diabetes tipo 2 está aumentando en la mayoría de los países.
- El 79% de los adultos con diabetes vivían en países de ingresos bajos y medios.
- 1 de cada 5 de las personas mayores de 65 años tiene diabetes.
- 1 de cada 2 (232 millones) de personas con diabetes no fueron diagnosticadas.
- La diabetes provocó 4,2 millones de muertes.
- La diabetes causó al menos USD 760 mil millones de dólares en gastos de salud en 2019, el 10% del gasto total en adultos.
- Más de 1,1 millones de niños y adolescentes viven con diabetes tipo 1.
- Más de 20 millones de nacidos vivos (1 de cada 6 nacidos vivos) se ven afectados por la diabetes durante el embarazo.
- 374 millones de personas tienen un mayor riesgo de desarrollar DMT2.

Por otro lado, en la medicina veterinaria, en una encuesta mundial reciente de 1192 veterinarios se encontró que una de cada 10 mascotas diabéticas muere por eutanasia al momento del diagnóstico, y otra de cada 10 lo hace a un año del diagnóstico aproximadamente. En esta encuesta, los factores citados como contribuyentes a la decisión de la eutanasia incluyeron los costos, los problemas para lograr un control glucémico adecuado, el bienestar de la mascota y el impacto en el estilo de vida del propietario (Niessen *et al.*, 2017).

En el presente estudio se probaron formulados de liposomas con diferentes concentraciones de excipientes conteniendo insulina en ratas Wistar diabetizadas con estreptozotocina por vía intraperitoneal para desarrollar la enfermedad de diabetes mellitus tipo 1, con el objetivo de poder controlar las variaciones de glucosa en sangre por periodos largos de tiempo, mucho mayores que el efecto causado por la insulina comercial de acción

corta. Así mismo, se propuso la vía de administración oral de la insulina. Por tanto, el desarrollo de nuevas tecnologías para controlar la concentración de glucosa en sangre en pacientes con DMT1 permitirá el mejoramiento de la calidad de vida de los pacientes en la administración de la insulina, así como del acceso para todos ellos en la adquisición de esta hormona disminuyendo los gastos asociados en su tratamiento.

Por lo anterior, es importante conocer la fisiopatología de la DM para poder desarrollar nuevas alternativas terapéuticas, aminorar el impacto negativo a la salud de las personas y los perros, y disminuir el desgaste económico que conlleva el tratamiento de la DM.

9. HIPÓTESIS

La administración de prototipos de insulina incluida en liposomas, en ratas diabetizadas experimentalmente, permitirá reducir los niveles de glucemia por un tiempo más prolongado, que el que se logra con la insulina comercial de acción rápida.

10. OBJETIVO

Evaluar el efecto hipoglucemiante a través de pruebas preclínicas de siete formulaciones de liposomas cargados con insulina en ratas Wistar diabetizadas con estreptozotocina por vía intraperitoneal, administrados por vía oral forzada y vía subcutánea, con el fin de contar con el perfil de seguridad y eficacia de las formulaciones prototipo.

10.1. Objetivos Específicos.

1. Determinar si existe un efecto terapéutico de los liposomas flexibles con y sin polímero al ser administrados por vía subcutánea y por vía oral forzada en ratas Wistar con diabetes mellitus experimental tipo 1.
2. Evaluar las alteraciones inducidas en hígado y riñón ocasionados por la enfermedad y conocer si hubo algún cambio después de la administración de los formulados con liposomas, por medio de la evaluación de los analitos: ALT, AST, Urea, Creatinina, BUN, en suero sanguíneo.
3. Evaluar los cambios patológicos desarrollados por la enfermedad y conocer si hubo algún cambio después del tratamiento con los formulados diseñados por medio del estudio histopatológico.

11. MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo de investigación está financiado por el PAPIIT con la clave IT202420.

Se utilizaron varios preparados de liposomas flexibles con adición de polímeros por diferentes métodos de manufactura; las características físicas y de estabilidad fueron determinadas para todos los preparados (resultados que no se muestran en este estudio, pero obtenidos en el trabajo realizado por Contreras *et. al.*, 2022. Desarrollo de un prototipo de insulina de liberación modificada para uso veterinario) y los mejores preparados fueron seleccionados y evaluados *in vivo* para determinar su liberación y efecto biológico.

Para la realización del estudio *in vivo*, fue previamente aprobado por el Comité para el cuidado y uso de los animales de laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Química de la UNAM en febrero del 2022 (OFICIO/FQ/CICUAL/467/22) de acuerdo con la normativa mexicana NOM-062-ZOO-1999.

Pruebas preclínicas *in-vivo*.

Grupos de animales.

Se usaron 51 ratas Wistar sanas, machos, de 250-300 gramos de peso vivo, obtenidos del Bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Los animales fueron alojados en una sala de UNEXA de la Facultad de Química de la UNAM. La sala en donde se alojaron cuenta con las siguientes condiciones ambientales: extracción e inyección de aire con al menos 18 recambios por hora, temperatura de 22 °C ± 2°C, humedad relativa entre 40-70% y ciclos de luz oscuridad de 12/12 horas. Los animales se distribuyeron de manera aleatoria en 9 grupos de seis animales cada uno del grupo 1 al grupo 8, y el grupo 9 con 3 animales, a los cuales se les administró un formulado (numerados del 1 al 7) con diferentes características fisicoquímicas (Cuadro 3).

Cuadro 3. Organización de los grupos y formulados administrados a animales.

Grupo	Formulado
1. Ratas sanas	Sin formulado
2. Ratas con diabetes mellitus tipo 1 (DMT1)	F1. Insulina: 0.714, Fosfatidil colina: 0.066, colato de sodio: 0.009, cuanto baste para 25mL.
3. Ratas con DMT1	F2. Insulina: 0.714, fosfatidil colina: 0.0639, colato de sodio: 0.0112, cuanto baste para 25mL

4. Ratas con DMT1	F3. Insulina: 0.714, fosfatidil colina: 0.0633, colato de sodio: 0.0087, brij s10: 0.0033, cuanto baste para 25mL.
5. Ratas con DMT1	F4. Insulina: 0.714, fosfatidil colina: 0.0633, colato de sodio: 0.0086, brij L23: 0.0033, cuanto baste para 25mL.
6. Ratas con DMT1	F5. Insulina: 0.714, fosfatidil colina: 0.0662, colato de sodio: 0.009, PEG500: 0.001, polaxámero 188: 0.0041, cuanto baste para 25mL.
7. Ratas con DMT1	F6. Fosfatidil colina: 0.0662, colato de sodio: 0.009, Brij s10: 0.0035, Brij L23: 0.0036, PEG500: 0.009, Polaxámero 188: 0.0042, cuanto baste para 25mL.
8. Ratas con DMT1	F7. Producto comercial Insulex R® de PISA.
9. Ratas con DMT1	Sin formulado.

Tamaño de muestra.

El tamaño de muestra se calculó con base en Charan J y Kantharia ND, 2013, para comparar dos grupos con variables discretas cuantitativas, con un error de tipo 1 del 5% (α) y al 80% de potencia (β).

Fórmula: $2 SD^2 (Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 / d^2$

Donde:

SD (Desviación estándar) = 62.86 obtenido de Arciniegas et al., 2020

$\alpha = 0.05$

$Z_{\alpha/2} = Z_{0.05/2} = Z_{0.025} = 1.96$

$Z_{\beta} = 0.842$ (de la tabla Z)

d = tamaño del efecto diferencia entre valores medios de Arciniegas et al., 2020 =

250mg/dL - 127mg/dL = 123

Tamaño de muestra = $2 (62.86)^2 (1.96 + 0.842)^2 / (123)^2 = 4.1$

Corrección de la muestra tomando en cuenta la mortalidad de las ratas.

Tamaño de muestra corregido = Tamaño de muestra / (1 - [% de deserción / 100])

En experiencia previa, se ha observado que por grupo hay mortalidad del 20-30% de ratas, en la literatura se menciona que después de la administración de estreptozotocina,

se tiene una mortalidad del 43.33% (Jiang et al 2014). Por lo tanto, la corrección del tamaño de muestra se tomará como el promedio entre el valor de mortalidad más alto reportado (43.33%) y el valor más bajo que hemos observado en estudios previos (20%).

El tamaño de muestra corregido queda de la siguiente manera:

Tamaño de muestra corregido = $4 / (1 - [43.33 / 100]) = 7.05 = 7$ sujetos por grupo

Tamaño de muestra corregido = $4 / (1 - [20 / 100]) = 5.1 = 5$ sujetos por grupo

Promedio 7.05 y 5.1 = 6.1

Alimentación.

A cada grupo de animales se les dieron 7 días de adaptación a las nuevas condiciones de alojamiento, fueron alimentados con Lab Diet 5001® durante este periodo de tiempo; posteriormente se realizó cambio de alimentación al nuevo tipo de alimento ABENE BDL-7300® de manera gradual hasta completar el 100% de ABENE BDL-7300® como ración única: 25% de ABENE BDL-7300® y 75% Lab Diet 5001® los primeros dos días, 50% de ABENE BDL-7300® y 50% el tercer y cuarto día, 75% ABENE BDL-7300® y 25% Lab Diet 5001® el quinto y sexto día, y 100% ABENE BDL-7300® el séptimo día.

Obtención de muestra sanguínea para bioquímica

Se obtuvieron muestras sanguíneas a 3 animales de los grupos 1 al grupo 8 por medio de capilar en el seno orbital, anestesiados con Sevoflurano 100%, previo a la administración de STZ y de la administración de los formulados, y al final de su periodo de monitoreo de concentración de glucosa con DMT1 y formulados administrados por vía subcutánea y vía oral forzada.

Lugar: Seno orbital.

Anestesia: Obligatoria, con Sevoflurano 100% (250mL en una botella de 250 mL)

Material: guantes desechables, capilares tratados con anticoagulante (EDTA, heparina). Esta técnica se realizó por personal cualificado debido al elevado riesgo de dañar estructuras adyacentes al globo ocular, lo que puede originar infecciones severas, ceguera etc.

Volumen de extracción: 600 µL (previo a la experimentación y al final del experimento)

Descripción de la técnica:

1. Se anestesió a la rata y comprobando que se ha alcanzó el plano quirúrgico, se sujetó a la rata estirando la piel del cuello hacia atrás asegurándose de no dificultar la respiración.
2. Se insertó el capilar en el ángulo externo del ojo a 45° (2 mm aprox) y se giró suavemente hasta que la sangre fluía por el mismo.

3. Se recogió la muestra y retiró el capilar.
4. Se oprimió ligeramente la zona de punción con una gasa o papel y se detuvo la hemorragia.
5. Se aplicó pomada oftálmica (Lubriform) al ojo.
6. Se comprobó la recuperación de la anestesia y se aportaron las medidas que se consideraron necesarias para ello (por ejemplo, aporte de calor)
7. Se observó a cada animal los días posteriores al sangrado para detectar la aparición de posibles complicaciones: protrusión de tejido adyacente al ojo, infecciones, hemorragias

Metodología para la administración Intraperitoneal.

Fármaco: Streptozocin (estreptozotocina), 50 mg/mL (Sigma-Aldrich), en una ocasión, a dosis de 45mg/Kg; se causó la muerte de las células β de los islotes pancreáticos, desarrollándose diabetes tipo 1.

Anestesia: No requerida.

Lugar de inoculación: intraperitoneal.

Material: guantes desechables, jeringa 1mL, aguja hipodérmica (27g), alcohol isopropílico, gasa.

1. Se llenó la jeringa con la cantidad del fármaco para administrar.

Dirección de inyección:

2. Se sujetó a la rata inclinando el cuerpo en un ángulo de 45 ° con la cabeza hacia abajo y se sostuvo de decúbito ventral.

Esto colocó los intestinos en posición craneal al lugar de la inyección.

3. Se preparó el área con un hisopo con alcohol.
4. Se insertó la aguja en el cuadrante inferior derecho del abdomen de la rata en un ángulo de 30°.
5. Se aspiró la jeringa para asegurar una colocación adecuada. Cualquier signo de sangre u otro líquido indicaba una colocación incorrecta; si se observaban, para prevenir la inducción de peritonitis, se retiraba la jeringa, se desechaba y se usaba una nueva jeringa, aguja y fármaco.
6. Se administró el fármaco con un movimiento constante y fluido.
7. 24 horas después de su administración se midió la concentración de glucosa, se consideró diabética con valores mayores a 200 mg/dL.

Prueba de tolerancia a la glucosa

Se realizó la prueba de tolerancia a la glucosa de la siguiente manera:

1. Al grupo 1 se realizó la prueba con monitoreo de concentración de glucosa a los 0, 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos, por medio de glucómetro Onetouch Ultramini® y tiras reactivas Onetouch Ultra® (glucosa oxidasa) con previo ayuno de 4 horas de sólidos y bolo de dextrosa a dosis de 2g/k vía oral forzada.
2. A los grupos 2 a 9 se realizó la prueba con diagnóstico de DMT1 con bolo de glucosa a dosis de 2g/k por vía oral forzada, con previo ayuno de 4 horas de sólidos con monitoreo de concentración de glucosa a los 0, 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos, por medio de glucómetro Onetouch Ultramini® y tiras reactivas Onetouch Ultra® (glucosa oxidasa).

Posterior a la administración de los formulados correspondientes (Cuadro 4) a cada uno de los grupos 2 al 8 por vía subcutánea, se realizó la prueba de tolerancia a la glucosa a los 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240, 360 y 480 minutos; posteriormente, por tres días consecutivos, con previo ayuno de 4 horas de sólidos, se realizó monitoreo de concentración de glucosa a los 0, 120 y 240 minutos a los grupos 2 y 3. Al resto de los grupos por dos días consecutivos, con previo ayuno de 4 horas de sólidos, a los 0, 60, 120 y 240 minutos con bolo de glucosa a dosis de 2g/k por vía oral forzada. El procedimiento anterior se repitió luego de la administración de los formulados por vía oral forzada.

Cuadro 4. Formulados de los liposomas

Grupo	PTG sanas	PTG con DMT1	PTG formulado vía SC	PTG formulado vía oral forzada
1	Sí, 0, 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos.	No	No	No
2	No	Sí, 0, 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos.	Sí, 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240 y 360 minutos. Con monitoreo de concentración de glucosa 3 días consecutivos pos-administración de formulado a los 0, 120 y 240 minutos.	Sí, 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240 y 360 minutos. Con monitoreo de concentración de glucosa 2 días consecutivos pos-administración de formulado a los 0, 120 y 240 minutos.
3	No	Sí, 0, 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos.	Sí, 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240 y 360 minutos. Con monitoreo de concentración de glucosa 3 días consecutivos pos-administración de formulado a los 0, 120 y 240 minutos.	Sí, 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240 y 360 minutos. Con monitoreo de concentración de glucosa 2 días consecutivos pos-administración de formulado a los 0, 120 y 240 minutos.
4	No	Sí, 0, 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos.	Sí, 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240, 360 y 480 minutos. Con monitoreo de concentración de glucosa 2 días consecutivos pos-	Sí, 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240, 360 y 480 minutos. Con monitoreo de concentración de glucosa 2 días consecutivos pos-administración de

			administración de formulado a los a los 0, 60, 120 y 240 minutos.	formulado a los a los 0, 60, 120 y 240 minutos.
5	No	Sí, 0, 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos.	Sí, 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240, 360 y 480 minutos. Con monitoreo de concentración de glucosa 2 días consecutivos pos-administración de formulado a los a los 0, 60, 120 y 240 minutos.	Sí, 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240, 360 y 480 minutos. Con monitoreo de concentración de glucosa 2 días consecutivos pos-administración de formulado a los a los 0, 60, 120 y 240 minutos.
6	No	Sí, 0, 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos.	Sí, 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240 y 360 minutos. Con monitoreo de concentración de glucosa 2 días consecutivos pos-administración de formulado a los a los 0, 60, 120 y 240 minutos.	Sí, 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240 y 360 minutos. Con monitoreo de concentración de glucosa 2 días consecutivos pos-administración de formulado a los a los 0, 60, 120 y 240 minutos.
7	No	Sí, 0, 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos.	Sí, 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240 y 360 minutos. Con monitoreo de concentración de glucosa 2 días consecutivos pos-administración de formulado a los a los 0, 60, 120 y 240 minutos.	Sí, 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240 y 360 minutos. Con monitoreo de concentración de glucosa 2 días consecutivos pos-administración de formulado a los a los 0, 60, 120 y 240 minutos.
8	No	Sí, 0, 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos.	Sí, 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240 y 360 minutos. Con monitoreo de concentración de glucosa 2 días consecutivos pos-administración de formulado a los a los 0, 60, 120 y 240 minutos.	Sí, 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240 y 360 minutos. Con monitoreo de concentración de glucosa 2 días consecutivos pos-administración de formulado a los a los 0, 60, 120 y 240 minutos.
9	No	Sí, 0, 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos.	Sí, 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240 y 360 minutos. Con monitoreo de concentración de glucosa 2 días consecutivos sin administración de formulado.	Sí, 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240 y 360 minutos. Con monitoreo de concentración de glucosa 2 días consecutivos sin administración de formulado.

PTG: prueba de tolerancia a la glucosa.

Obtención de muestra sanguínea para glucosa.

Lugar: punta de la cola, vena dorso caudal de la cola.

Material: guantes desechables, aguja hipodérmica (27g), alcohol isopropílico, torunda de algodón.

Procedimiento: Se inmovilizó a la rata Wistar y se limpió la punta de la cola con torunda con alcohol isopropílico. Usando la aguja hipodérmica se punciona la punta de la cola. La sangre se recoge presionando suavemente la cola. El flujo de sangre se detiene aplicando presión con una torunda de algodón limpia para lograr la hemostasia; con esta técnica es suficiente obtener una gota para la medición de glucosa por medio de las tiras de peroxidasa y el glucómetro; se recolectarán varias muestras, esto se hará quitando la costra o el coágulo de sangre de la punta de la cola.

Metodología para la administración subcutánea (SC) de formulados

Volumen máximo de aplicación :5-10mL en rata adulta, en una sola ocasión.

Materiales: guantes desechables, jeringa (1 mL), aguja hipodérmica (25g), alcohol isopropílico, torunda.

1. Se llenó la jeringa con la cantidad adecuada del fármaco (liposomas con insulina) que se administró.
2. Se preparó el área con una torunda con alcohol.
3. Se tensó la piel y se insertó la aguja en la base de la piel. La aguja alcanzó una profundidad de aproximadamente medio centímetro y se insertó con una inclinación de unos 30° con respecto a la superficie del animal.
4. Se aspiró la jeringa asegurando una colocación adecuada y para asegurarse de que no se alcanzó ningún vaso sanguíneo.
5. Ningún fluido aspirado, se procedió a la inyección de la muestra
6. Se administró el fármaco con un movimiento constante y fluido.
7. Se retiró la aguja y se presionó con una torunda ligeramente la zona de inyección

Metodología para la administración oral forzada

Materiales: guantes desechables, sonda (calibre 14, longitud 3 pulgadas, diámetro de la bola de 4mm, de forma curva), con previo ayuno de 4 horas, jeringas (1mL), fármaco (liposomas con insulina) o dextrosa.

Procedimiento:

1. Se midió la distancia desde la punta de la nariz hasta la última costilla. Esta es la longitud en que se insertó la aguja.
2. Se llenó la jeringa con la cantidad adecuada de fármaco a dosificar.
3. Se contuvo la rata de la siguiente manera: Con la mano no dominante, se agarró la base de la cola con el pulgar y el índice para evitar que la rata se escapara. Sin suspender a la rata por la cola o la parte superior del cuerpo durante un período de tiempo prolongado debido al estrés del animal. Se sacó a la rata de la jaula y se colocó en la superficie de la mesa de manejo. Con una presión firme pero suave, se agarró a la rata por el tórax con el pulgar y los dedos debajo de cada una de los miembros torácicos.
4. Se colocó la punta de la aguja en la parte posterior de la boca de la rata y se indujo la deglución, mientras se presionó suavemente el eje de la aguja contra el paladar para extender el cuello y se alineó la boca y el esófago.
5. Se deslizó la punta hacia abajo por la parte posterior de la boca, se movió hacia adelante con un movimiento fluido.

6. Se tomó el tiempo requerido ante cualquier resistencia que sintiera ya que indicaría una ubicación incorrecta. La aguja se deslizó fácilmente hacia el esófago. Una reacción violenta (tos, jadeo) generalmente sigue a la introducción accidental del tubo en la laringe o tráquea.

7. Una vez que se colocó la aguja correctamente, se administró el fluido.

Cuadro 5. Resumen de los tratamientos administrados.

VÍA DE ADMINISTRACIÓN	SUSTANCIA
Intraperitoneal	Estreptozotocina a dosis de 45mg/kg.
Oral forzada	Preparados de Liposomas con insulina (dosis de insulina en ratas de 0.5UI/100g de peso vivo), con los formulados a una dosis de 1.2mL/350g de peso vivo (en una sola ocasión) y dextrosa (dosis de 2g/kg) en una sola ocasión.
Subcutánea	Preparados de liposomas con insulina con la dosis del formulado de 0.6mL/350g de peso vivo en una sola ocasión.

14. RESULTADOS

Análisis estadístico.

El análisis estadístico descriptivo se realizó con el software IBM SPSS STATISTICS® Versión 21.

El análisis de varianza (ANDEVA) se realizó por medio de programa SAS PROC GLM (versión 9.3, SAS Inc., Cary, NC) y el método Tukey-Kramer post hoc test. El modelo incluye el tratamiento, rata, periodo y sus interacciones. Los resultados son expresados en medias de cuadrados mínimos.

Prueba de tolerancia a la glucosa (PTG).

Grupos: 1, 2, 3, 4, 5.

Grupo	Formulado
1. Ratas sanas	Sin formulado
2. Ratas con diabetes mellitus tipo 1 (DMT1)	F1. Insulina: 0.714, Fosfatidil colina: 0.066, colato de sodio: 0.009, cuanto baste para 25mL.
3. Ratas con DMT1	F2. Insulina: 0.714, fosfatidil colina: 0.0639, colato de sodio: 0.0112, cuanto baste para 25mL
4. Ratas con DMT1	F3. Insulina: 0.714, fosfatidil colina: 0.0633, colato de sodio: 0.0087, brij s10: 0.0033, cuanto baste para 25mL.
5. Ratas con DMT1	F4. Insulina: 0.714, fosfatidil colina: 0.0633, colato de sodio: 0.0086, brij L23: 0.0033, cuanto baste para 25mL.

- Prueba de tolerancia a la glucosa ratas sanas a los 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 minutos, con bolo de dextrosa a dosis de 2g/k.
- En el Anexo 1 se encuentran los valores obtenidos de las mediciones de las concentraciones de glucosa.

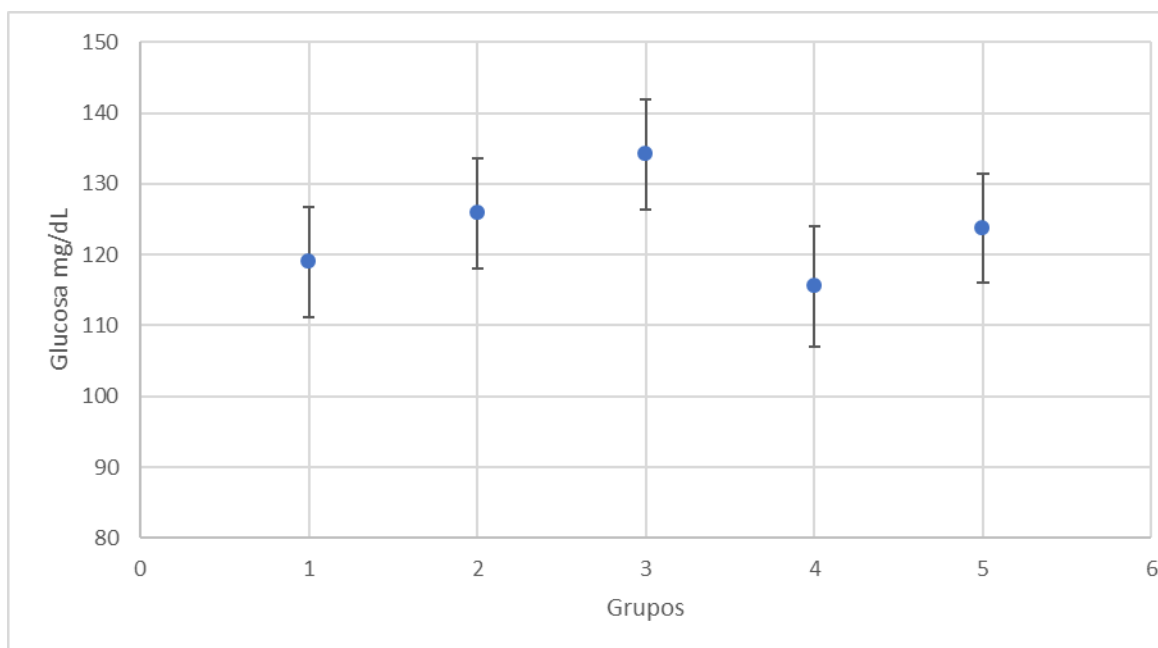
En los grupos de ratas correspondientes del 1 al 5 a los cuales se les realizó la prueba de tolerancia a la glucosa como sujetos sanos y con bolo de dextrosa por vía oral forzada a dosis de 2g/k tienen valores de glucosa homogéneos, siendo el de mayor variabilidad el grupo 2 con 29% y el de menor el grupo 1 y el grupo 4 con 18%. La media de los cinco grupos de la concentración de glucosa es 123.65mg/dL la cual varía ± 25.96 mg/dL en promedio (Cuadro 6).

Cuadro 6. Concentración media de glucosa en mg/dL en ratas sanas

Grupo	n	Media	Desviación estándar	Coefficiente de variación
1	42	118.95	21.833	0.18
2	42	125.88	36.983	0.29
3	42	134.14	26.160	0.19
4	35	115.57	20.906	0.18
5	42	123.74	23.943	0.19

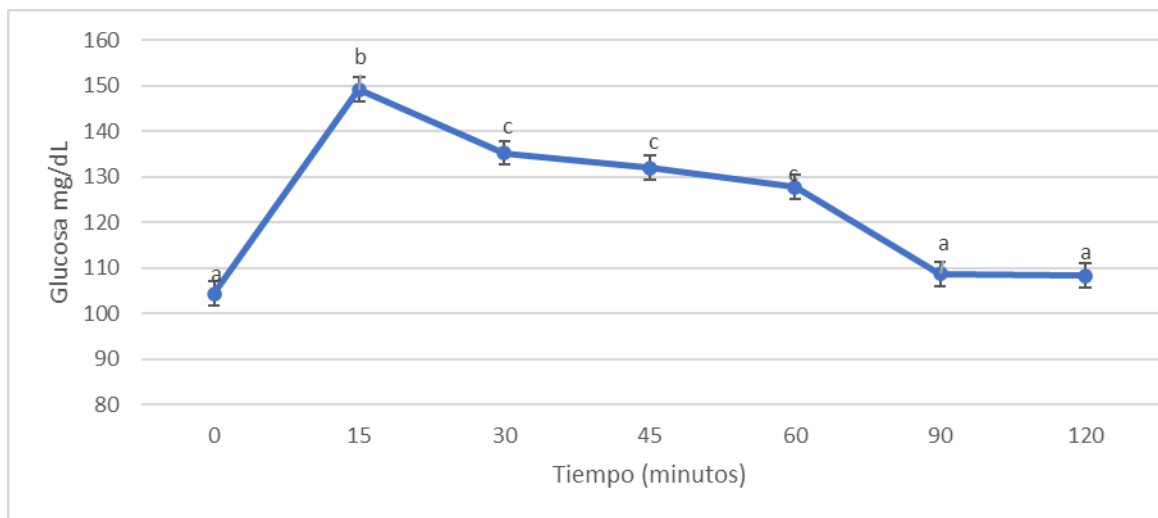
n= número de mediciones por grupo

Una vez hecho el análisis con SAS PROC GLM (versión 9.3, SAS Inc., Cary, NC) y el método Tukey-Kramer post hoc test, se obtuvo la gráfica con medias de cuadrados mínimos (Gráfica 1), en donde se observan las concentraciones de glucosa en sangre en la Prueba a la Tolerancia a la Glucosa en ratas sanas por grupos, y además no se encontraron diferencias estadísticas significativas $P < 0.05$.



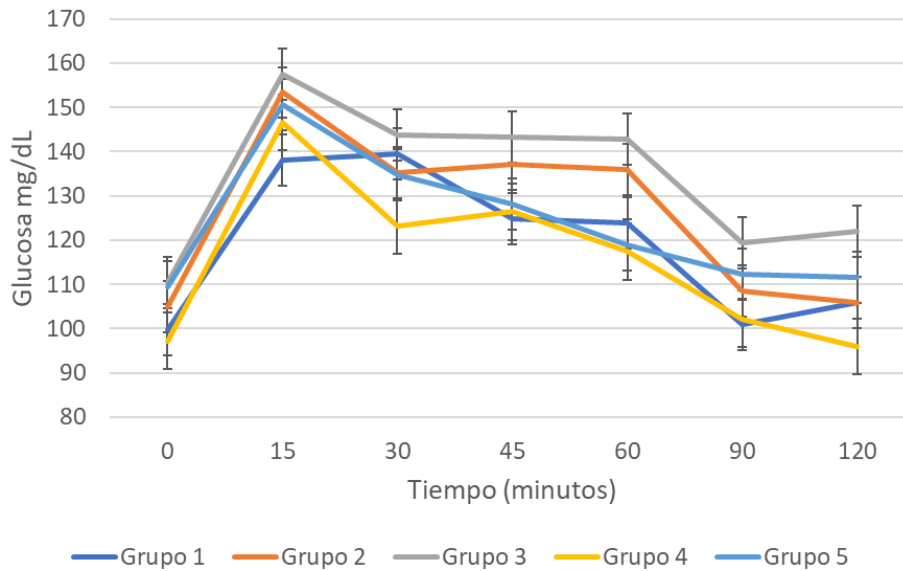
Gráfica 1. Concentración promedio de glucosa en sangre de ratas sanas dadas en medias de cuadrados mínimos y error estándar. Gráfica de dispersión que representa la concentración promedio de glucosa en sangre de ratas sanas luego de la administración de bolo de dextrosa a 2g/kg por vía oral forzada a intervalos de 0, 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos.

El estándar de la prueba realizada en las ratas era la medición de glucosa durante varios periodos de tiempo, considerando la concentración basal en el minuto 0, y luego del bolo de dextrosa por vía oral forzada a dosis de 2g/kg, realizando mediciones consecutivas a los 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos. De esta forma obteniendo un panorama general de las variaciones de glucosa que tuviera a lo largo de este periodo de tiempo en todos los grupos experimentales. Se hace notar un incremento a los 15 minutos post administración del bolo de dextrosa, con significancia estadística de $P < 0.05$ (Gráfica 2).



Gráfica 2. Gráfica de líneas que representa la concentración promedio de glucosa en sangre dadas en medias de cuadrados mínimos y error estándar, de ratas sanas luego de la administración de bolo de dextrosa a 2g/kg por vía oral forzada en el periodo de tiempo de 0, 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos. Literales distintas representan diferencias estadísticamente significativas $\alpha = 0.05$

Se obtuvieron además las concentraciones de glucosa en medias de cuadrados mínimos de cada uno de los grupos en el periodo comprendido desde el minuto 0 y hasta los 120 minutos. No se encontraron significancias estadísticas $P < 0.05$ (Gráfica 3).



Gráfica 3. Gráfica de líneas que representa la concentración promedio de glucosa en sangre dadas en medias de cuadrados mínimos y error estándar, de ratas sanas luego de la administración de bolo de dextrosa a 2g/k por vía oral forzada desde el minuto 0 hasta los 120 minutos.

Grupos: 6, 7, 8 y 9

Grupo	Formulado
6. Ratas con DMT1	F5. Insulina: 0.714, fosfatidil colina: 0.0662, colato de sodio: 0.009, PEG500: 0.001, polaxámero 188: 0.0041, cuanto baste para 25mL.
7. Ratas con DMT1	F6. Fosfatidil colina: 0.0662, colato de sodio: 0.009, Brij s10: 0.0035, Brij L23: 0.0036, PEG5000: 0.009, Polaxámero 188: 0.0042, cuanto baste para 25mL.
8. Ratas con DMT1	F7. Producto comercial Insulex R® de PISA.
9. Ratas con DMT1	Sin formulado.

DMT 1=Diabetes Mellitus tipo 1

- Prueba de tolerancia a la glucosa ratas diabéticas a los 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 y 360 minutos, con bolo de dextrosa oral forzada a dosis de 2g/kg.
- En el Anexo 2 se encuentran los valores obtenidos de las mediciones de las concentraciones de glucosa.

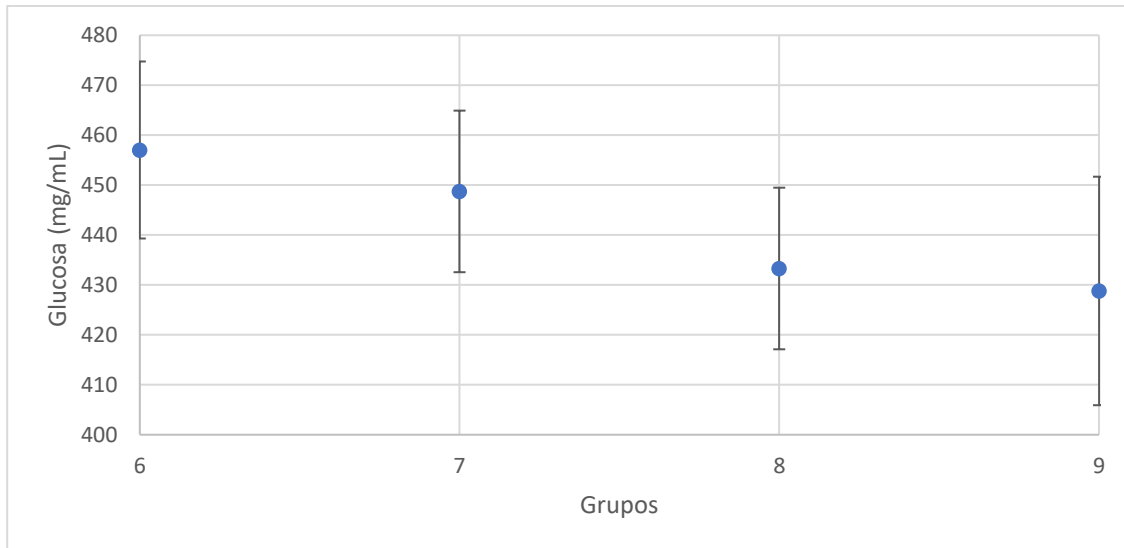
En los grupos de ratas correspondientes del 6 al 9 a los cuales se les realizó la prueba de tolerancia a la glucosa como sujetos con DMT1 y con bolo de dextrosa por vía oral forzada a dosis de 2g/k, se obtuvieron las concentraciones de glucosa en sangre desde el minuto 0 y hasta los 120 minutos, mostrando homogeneidad en sus valores. La media de los cinco grupos de la concentración de glucosa es 440.27mg/dL la cual varía ± 60.56 mg/dL en promedio (Cuadro 7).

Cuadro 7. Concentración media de glucosa en mg/dL en ratas diabetizadas

Grupo	n	Media	Desviación estándar	Coefficiente de variación
6	40	457.03	63.65	0.13
7	48	448.73	64.76	0.14
8	54	430.52	62.83	0.14
9	27	424.81	51	0.12

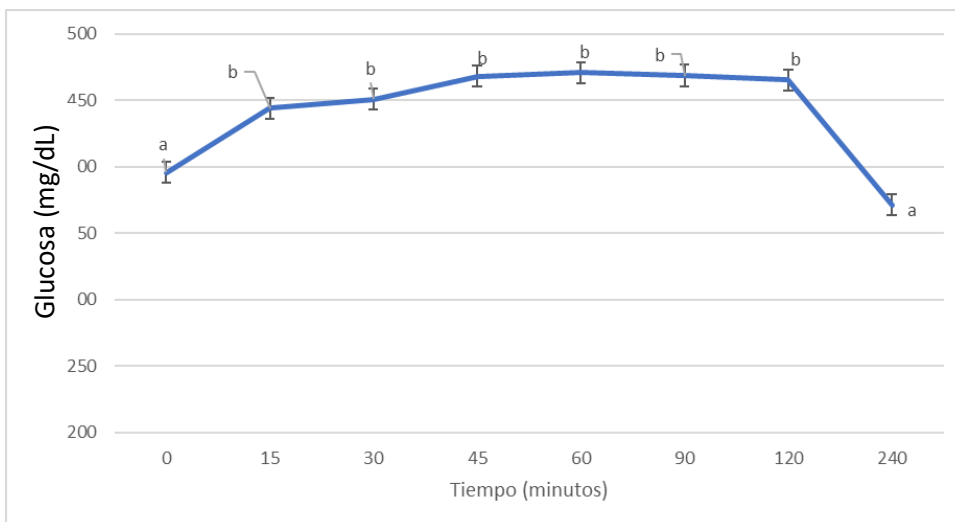
n= número de mediciones por grupo

De los valores obtenidos en medias de cuadrados mínimos por grupos en las concentraciones de glucosa en sangre, se realizan comparaciones, y no se encuentran diferencias estadísticamente significativas (Gráfica 4). De lo anterior, que en los animales enfermos por DMT1 las células β no son capaces de sintetizar insulina y poder regular los niveles altos de glucosa en sangre, característico de esta enfermedad.



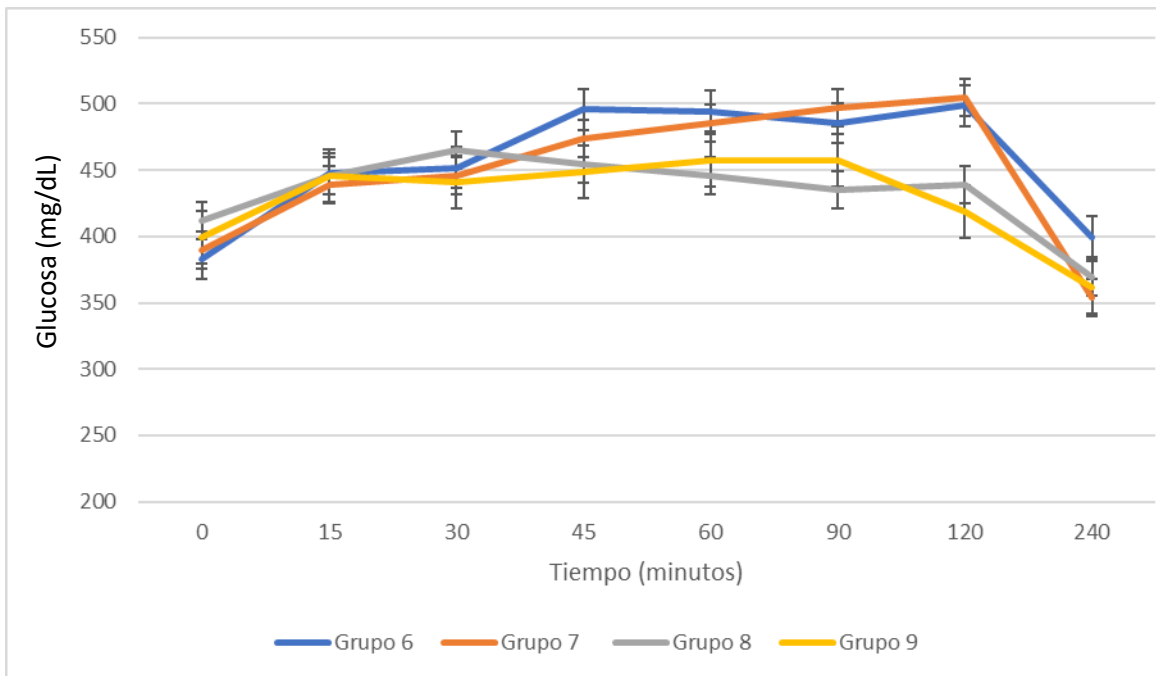
Gráfica 4. Gráfica de dispersión que representa la concentración promedio de glucosa en sangre de ratas con DMT1 dadas en medias de cuadrados mínimos y error estándar, luego de la administración de bolo de dextrosa a 2g/k por vía oral forzada a intervalos de 0, 15, 30, 45, 60, 90, 10 y 240 minutos, de la PTG de los grupos 6, 7, 8 y 9.

Se obtuvieron las concentraciones de glucosa en sangre de todos los individuos de los grupos antes mencionados, desde el minuto 0 y hasta los 120 minutos, en donde se pudieron encontrar diferencias estadísticamente significativas entre los valores del minuto 0 y 120 respecto a los demás (Gráfica 5). Sobre los niveles de glucosa en sangre, se hace visible la diferencia entre el minuto 0 y el aumento de ésta a lo largo de los 240 minutos, y hasta llegar a su última medición, la disminución por la falta de consumo de alimento.



Gráfica 5. Gráfica de líneas que representa la concentración promedio de glucosa en sangre de ratas con DMT1 dadas en medias de cuadrados mínimos y error estándar, luego de la administración de bolo de dextrosa a 2g/kg por vía oral forzada a intervalos de 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 y 240 minutos. Literales distintas representan diferencias estadísticamente significativas $\alpha= 0.05$

De manera grupal, se analizaron los valores correspondientes, desde el minuto 0 y hasta los 120 minutos, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas (Gráfica 6). Todos los grupos con DMT1 se comportaron de manera similar respecto a las concentraciones de glucosa en sangre.



Gráfica 6. Gráfica de líneas que representa la concentración promedio de glucosa en sangre de ratas con DMT1 dadas en medias de cuadrados mínimos y error estándar, luego de la administración de bolo de dextrosa a 2g/kg por vía oral forzada desde el minuto 0 hasta los 240 minutos.

Administración de Formulados por vía Subcutánea (SC).

Los grupos experimentales fueron clasificados de la siguiente manera: Grupo 2 con DMT1- Formulado 1, Grupo 3 con DMT1- Formulado 2, Grupo 4 con DMT1- Formulado 3, Grupo 5 con DMT1- Formulado 4, Grupo 6 con DMT1- Formulado 5, Grupo 7 con DMT1- Formulado 6, Grupo 8 con DMT1- Formulado 7 y Grupo 9 con DMT1 sin administración de formulado (Figura 2).









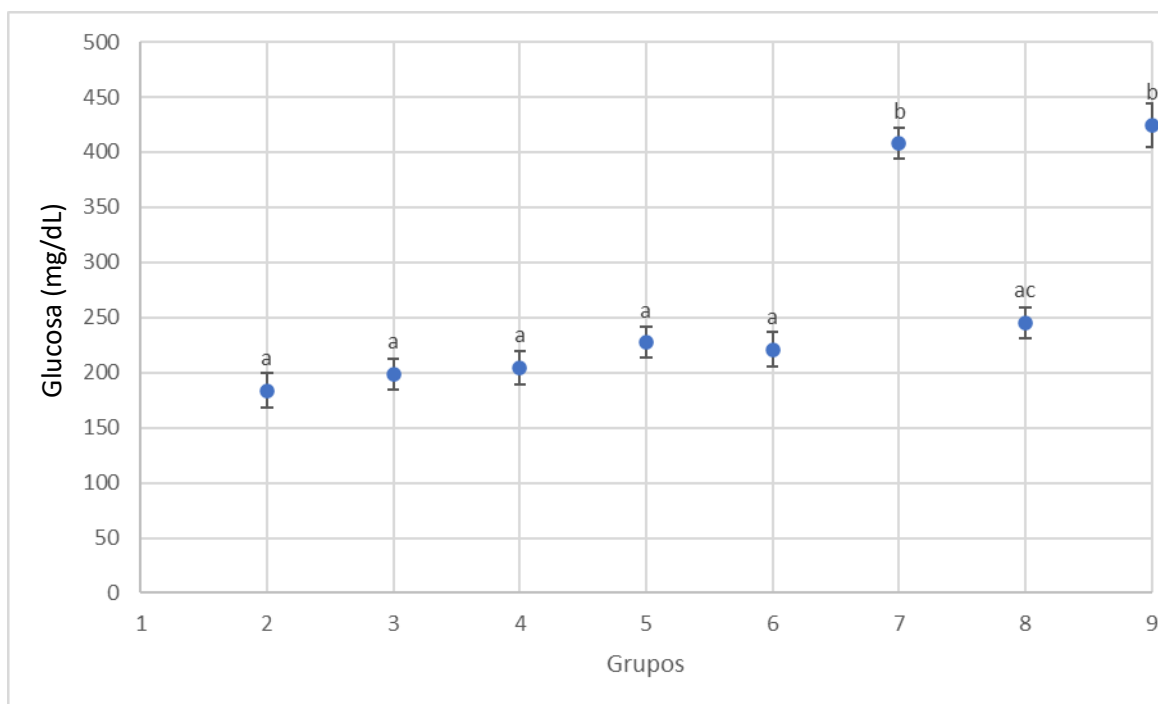
Grupo experimental	Formulados con sus características
2  n= 6	F1. Insulina: 0.714, Fosfatidil colina: 0.066, colato de sodio: 0.009, cuanto baste para 25mL.
3  n= 6	F2. Insulina: 0.714, fosfatidil colina: 0.0639, colato de sodio: 0.0112, cuanto baste para 25mL.
4  n= 6	F3. Insulina: 0.714, fosfatidil colina: 0.0633, colato de sodio: 0.0087, brij s10: 0.0033, cuanto baste para 25mL.
5  n= 6	F4. Insulina: 0.714, fosfatidil colina: 0.0633, colato de sodio: 0.0086, brij L23: 0.0033, cuanto baste para 25mL.
6  n= 5	F5. Insulina: 0.714, fosfatidil colina: 0.0662, colato de sodio: 0.009, PEG500: 0.001, polaxámero 188: 0.0041, cuanto baste para 25mL.
7  n= 6	F6. Fosfatidil colina: 0.0662, colato de sodio: 0.009, Brij s10: 0.0035, Brij L23: 0.0036, PEG5000: 0.009, Polaxámero 188: 0.0042, cuanto baste para 25mL.
8  n= 6	F7. Producto comercial Insulex R® de PISA.
9  n= 3	Sin formulado.

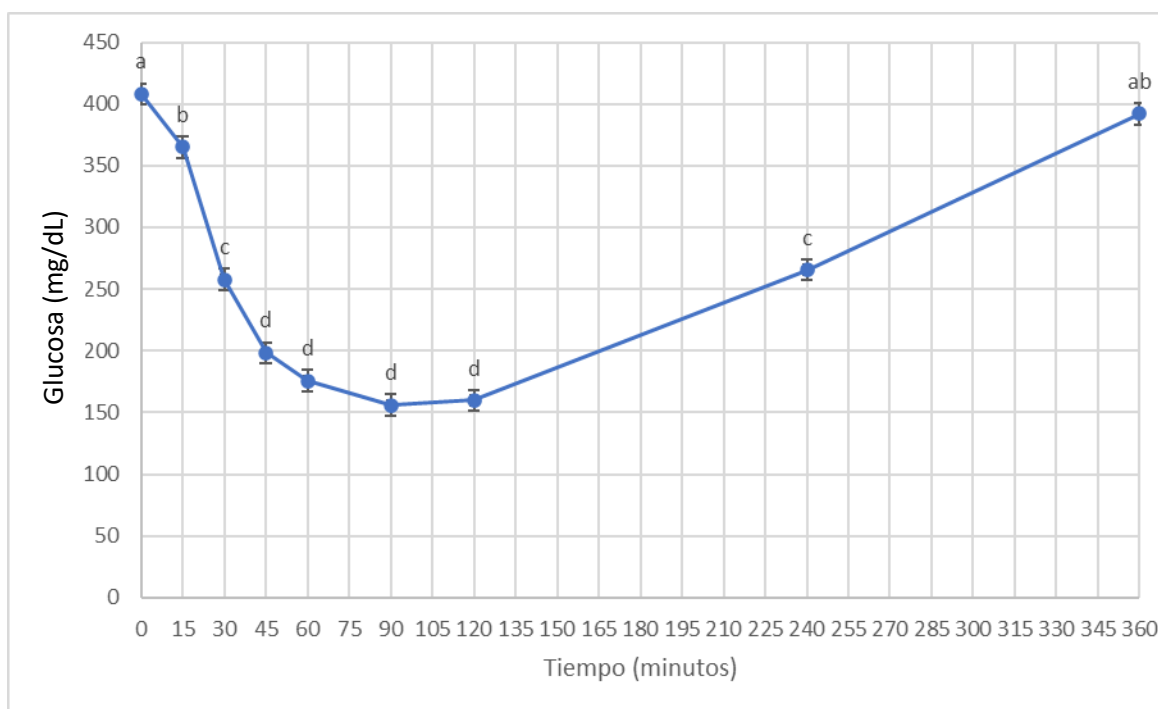
Figura 2. Grupos de experimentación con sus correspondientes formulados. 1. F1: formulado 1; F2: formulado 2; F3: formulado 3; F4: formulado 4; F5: formulado 5; F6: formulado 6; F7: formulado 7. n= número de ratas en cada grupo.

Se obtuvieron los valores de glucosa en sangre, en medias de cuadrados mínimos, de cada uno de los grupos con su respectivo formulado desde el minuto 0 y hasta los 360 minutos. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas, $P < 0.05$, de los grupos 7 y 9 respecto a los demás (Gráfica 7). El grupo 7 y 9 destacan por los valores de glucosa en sangre altos respecto a los demás grupos, ya que en estos no se administró insulina, en el grupo 7 los excipientes y en el grupo 9 ningún formulado.



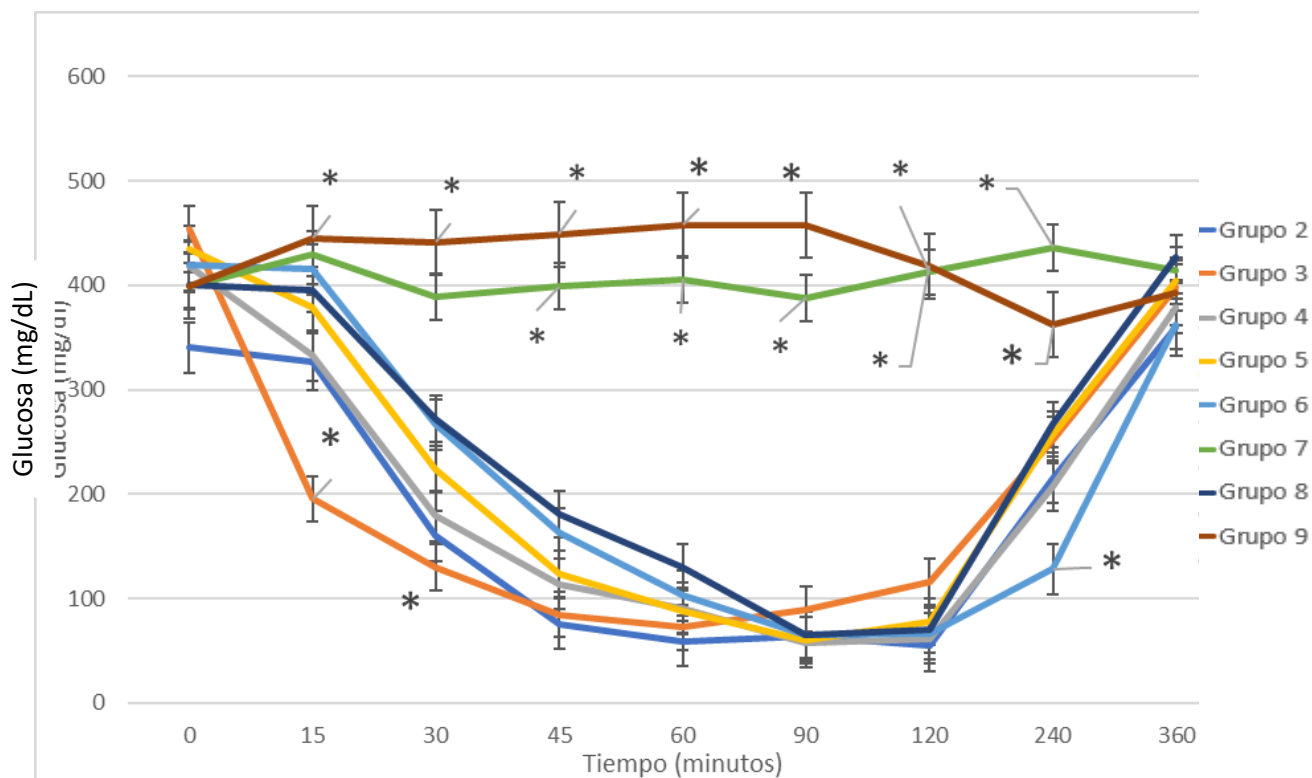
Gráfica 7. Gráfica de dispersión que representa la concentración promedio de glucosa en sangre de ratas con DMT1 dadas en medias de cuadrados mínimos y error estándar, luego de la administración de sus formulados correspondientes a dosis de 0.6mL/350g por vía subcutánea a intervalos de 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240, 360 minutos. Literales distintas representan diferencias estadísticamente significativas $P < 0.05$.

Los valores obtenidos de la concentración de glucosa en sangre, en el periodo de tiempo comprendido desde el minuto 0 y hasta los 360 minutos, luego de la administración de los formulados correspondientes a cada grupo experimental, mostraron diferencias estadísticamente significativas en el minuto 0, 30, 240 y 360 respecto a los demás, $P < 0.05$ (Gráfica 8). Lo anterior se explica por el tiempo de efecto que tiene la insulina empaquetada en los liposomas y dispersa en los formulados, notándose una disminución evidente de la glucosa de hasta 150mg/dL a los 90 minutos post administración de los formulados, regresando a la concentración basal de glucosa a los 360 minutos.



Gráfica 8. Gráfica de líneas que representa la concentración promedio de glucosa en sangre de todas las ratas con DMT1 dadas en medias de cuadrados mínimos y error estándar, luego de la administración de sus formulados correspondientes por vía SC a intervalos de 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240, 360 minutos. Literales distintas representan diferencias estadísticamente significativas $\alpha = 0.05$

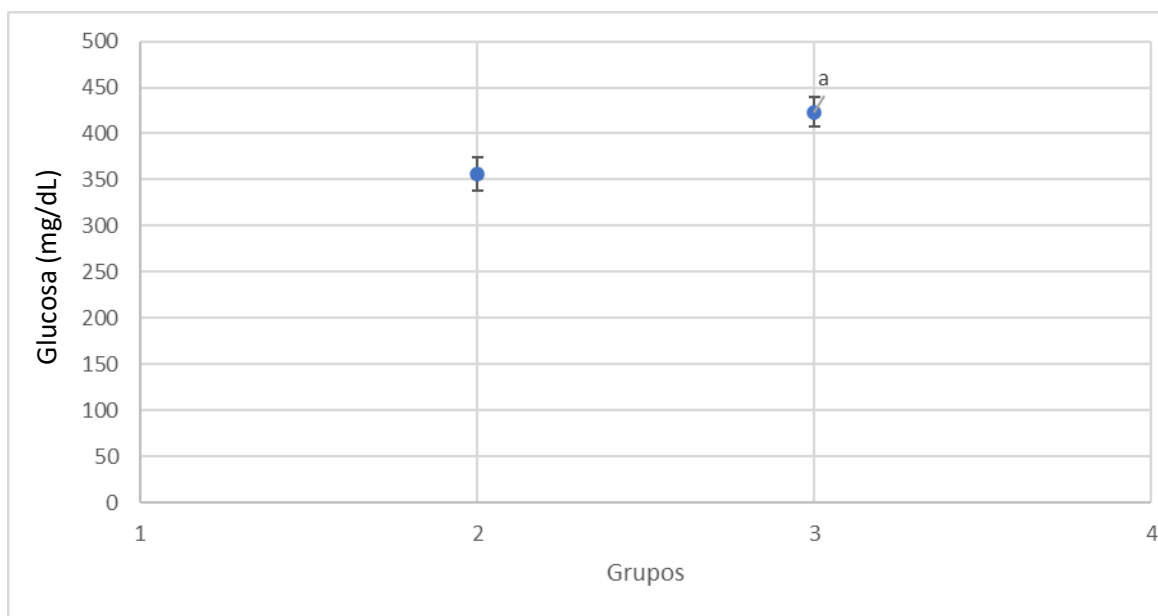
De los formulados, con su respectivo grupo experimental con DMT1, en el periodo de tiempo comprendido desde el minuto 0 y hasta los 360 minutos, mostraron diferencias estadísticamente significativas, con especial relevancia los valores de glucosa en sangre de los grupos 9 y 7, con todos los demás, ya que estos comparten la característica de no incluir insulina en los liposomas, en el caso del grupo 7, y el grupo 9 al cual no se le administró algún tipo de formulado ni de insulina. Lo que demuestra que los liposomas no tuvieron algún efecto hipoglucemiante en las ratas con DMT1 (Gráfica 9).



Gráfica 9. Gráfica de líneas que representa la concentración promedio de glucosa en sangre de ratas con DMT1 dadas en medias de cuadrados mínimos, luego de la administración de su formulado correspondiente por vía SC desde el minuto 0 hasta los 360 minutos. Los asteriscos representan diferencia estadísticamente significativa $\alpha=0.05$

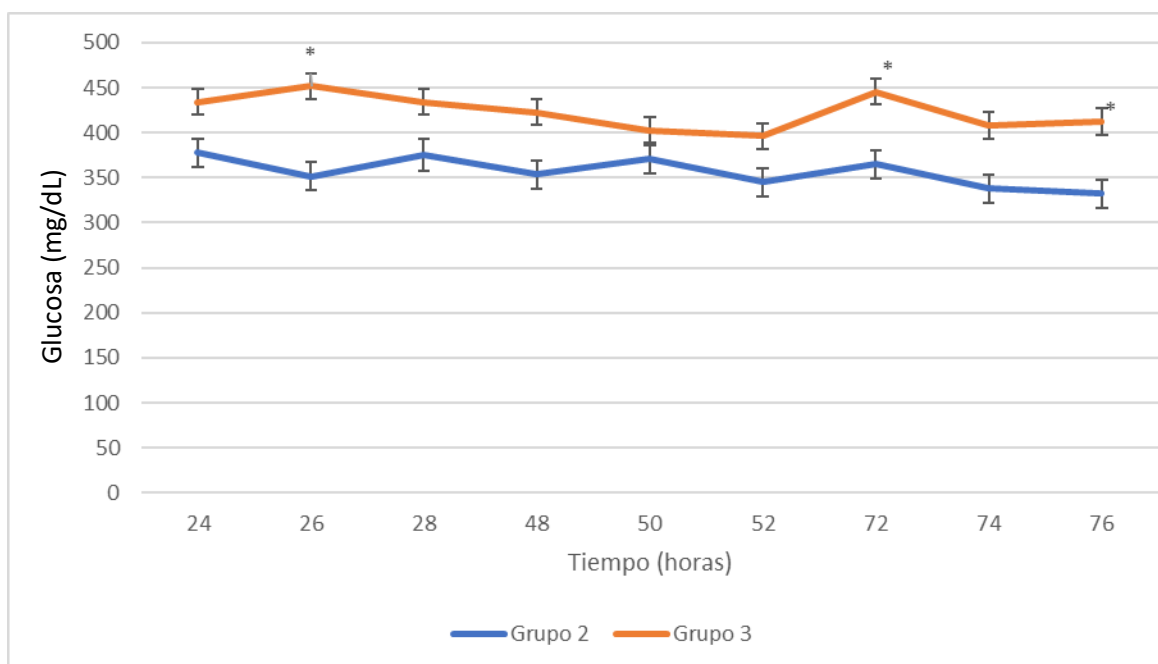
Administración de Formulados por vía Subcutánea (SC) sin administración de bolo de dextrosa por vía oral.

Haciendo una evaluación de los formulados por vía subcutánea, en los grupos 2 y 3 con DMT1, con 4 horas de ayuno de sólidos y monitoreo de concentración de glucosa en sangre desde las 24 y hasta las 76 horas pos-administración, sin administración de bolo de dextrosa por vía oral, se observó que el grupo 2 con el F1 tuvo mejores respuestas hipoglucemiantes en comparación con el grupo 3 con el F2, con diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) entre estos dos (Gráfica 10).



Gráfica 10. Gráfica de dispersión que representa la concentración promedio de glucosa en sangre de ratas con DMT1 dadas en medias de cuadrados mínimos y error estándar, luego de la administración de sus formulados correspondientes a dosis de 0.6mL/350g por vía subcutánea a intervalos de 24, 26, 28, 48, 50, 52, 72, 74, 76 horas, a los cuales no se les administró bolo de dextrosa por vía oral forzada. Literales distintas representan diferencias estadísticas significativas $\alpha = 0.05$

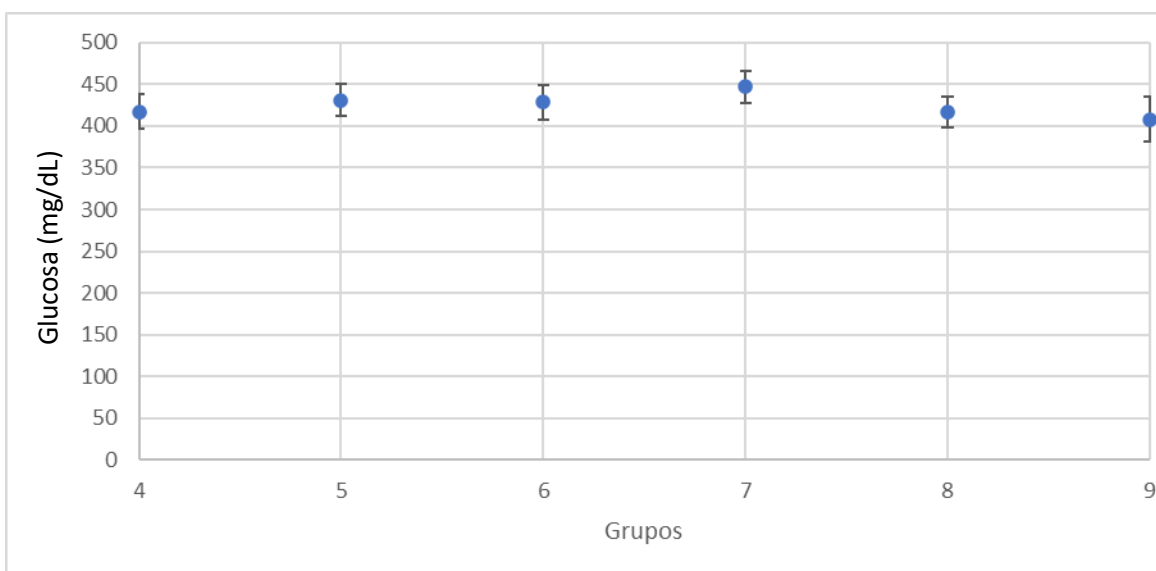
Se analizan los datos obtenidos de las concentraciones de glucosa en sangre de ambos grupos a lo largo del tiempo comprendido desde las 24 y hasta las 76 horas post administración de sus formulados correspondientes (F1 y F2) por vía subcutánea, y se observan diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) en el minuto 26 y minuto 72 entre estos dos grupos de manera independiente (Gráfica 11).



Gráfica 11. Gráfica de líneas que representa la concentración promedio de glucosa en sangre de ratas con DMT1 dadas en medias de cuadrados mínimos y error estándar, luego de la administración de su formulado correspondiente por vía SC desde 26, 28, 48, 50, 52, 72, 74, 76 horas, sin bolo de dextrosa. Los asteriscos representan diferencia estadísticamente significativa $\alpha = 0.05$

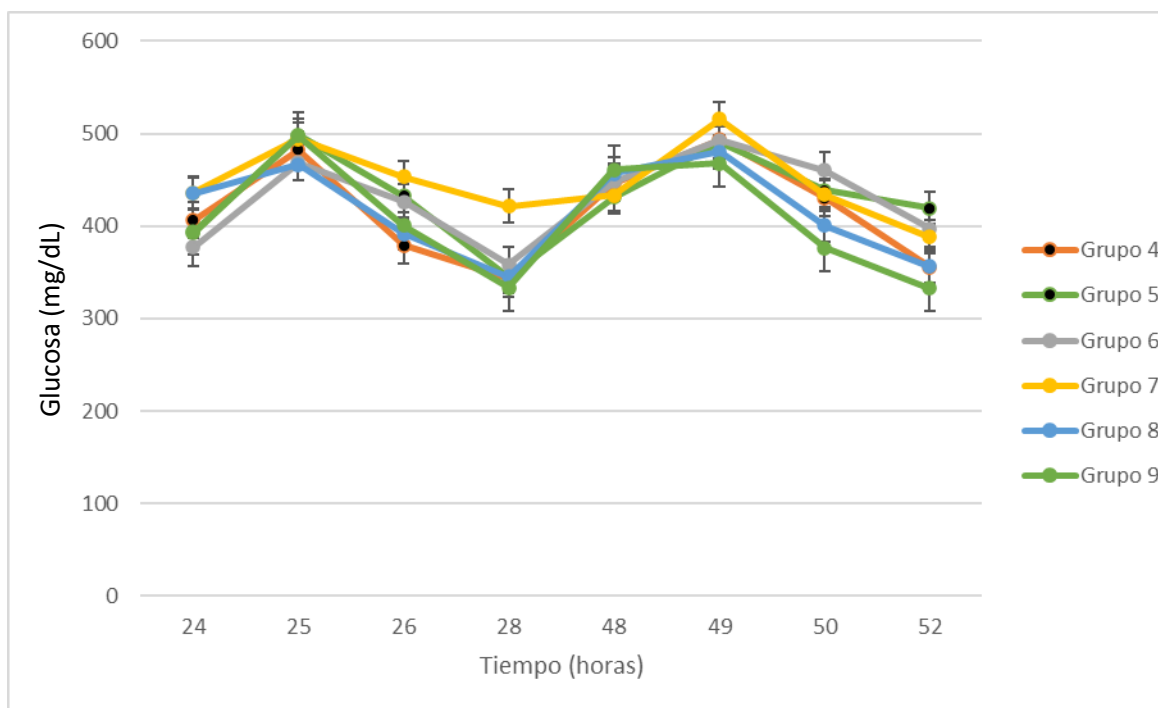
Administración de Formulados por vía Subcutánea (SC) con administración de bolo de dextrosa por vía oral.

Lo correspondiente a los grupos 4, 5, 6, 7, 8, y 9, a los cuales se les administró por vía subcutánea los F3, F4, F5, F6 y F7 respectivamente (a excepción del grupo 9 que sirvió como grupo control, alternativamente a las mediciones de glucosa en el tiempo de los demás grupos), se observó que los valores obtenidos desde las 24 y hasta 52 horas posadministración de los formulados por vía subcutánea con 4 horas de ayuno y bolo de dextrosa por vía oral forzada a dosis de 2g/kg, que no hubo variaciones estadísticamente significativas en las concentraciones de glucosa entre todos estos formulados, de esta forma haciendo ver que no son eficaces a largo plazo (Gráfica 12).



Gráfica 12. Gráfica de dispersión que representa la concentración promedio de glucosa en sangre de ratas con DMT1 dadas en medias de cuadrados mínimos y error estándar, luego de la administración de sus formulados correspondientes a dosis de 0.6mL/350g por vía subcutánea con administración de bolo de dextrosa por vía oral a dosis de 2g/kg por vía oral forzada a intervalos de 24, 25, 26, 28, 48, 49, 50, 52 horas.

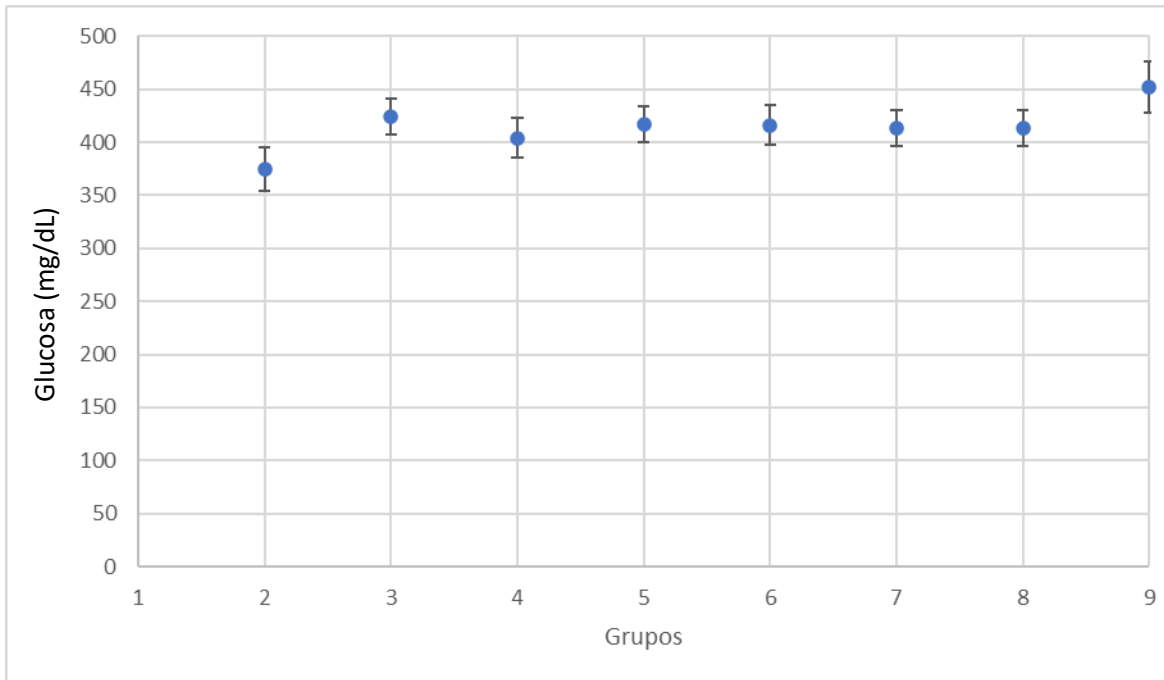
En el tiempo, de manera independiente de cada uno de los grupos evaluados, desde las 24 y hasta las 52 horas pos-administración de los formulados correspondientes a cada grupo, se observó una homogeneidad de las concentraciones de glucosa en sangre, sin apreciarse diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) (Gráfica 13).



Gráfica 13. Gráfica de líneas que representa la concentración promedio de glucosa en sangre de ratas con DMT1 dadas en medias de cuadrados mínimos y error estándar, luego de la administración de su formulado correspondiente por vía SC y bolo de dextrosa a dosis de 2g/kg por vía oral forzada, desde 24, 25, 26, 28, 48, 49, 50, 52 horas.

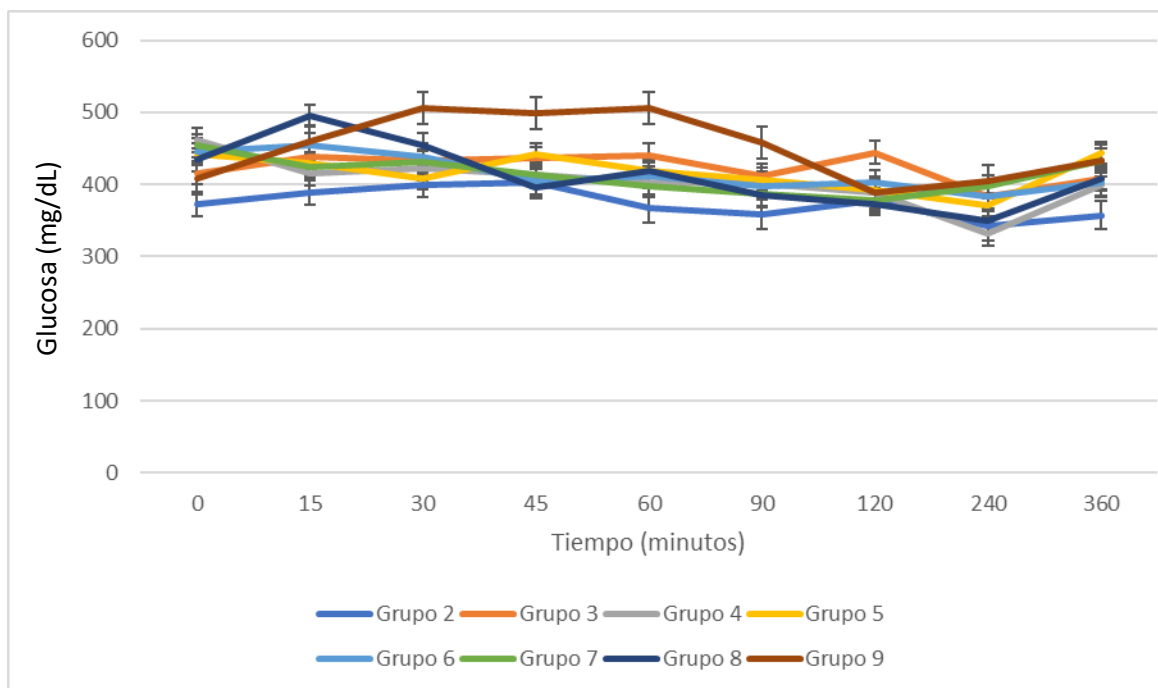
Administración de Formulados por vía oral.

Por vía oral forzada se administraron los formulados con liposomas correspondientes a cada uno de los grupos con DMT1, con previo ayuno de 4 horas de sólidos, y se obtuvieron las concentraciones de glucosa en sangre desde los 0 y hasta los 360 minutos. Los resultados obtenidos no tuvieron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$), pero de entre todos estos, el Formulado 1 tuvo mejores respuestas hipoglucemiantes de entre todos los formulados (Gráfica 14).



Gráfica 14. Gráfica de dispersión que representa la concentración promedio de glucosa en sangre de ratas con DMT1 dadas en medias de cuadrados mínimos y error estándar, luego de la administración de sus formulados correspondientes a dosis de 1.2mL/350g por vía oral forzada a intervalos de 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240, 360 minutos.

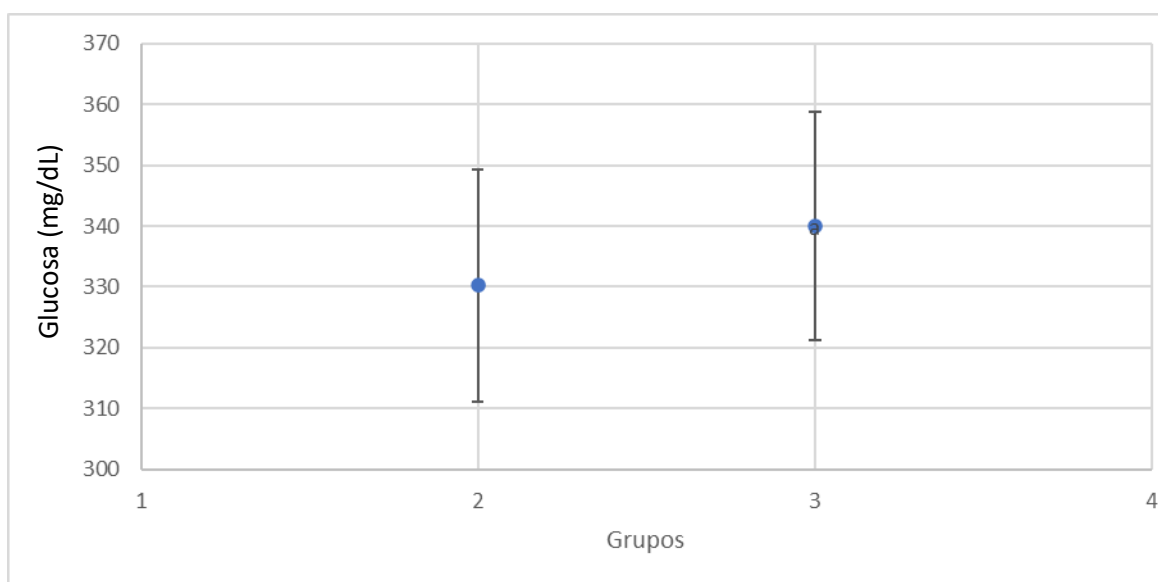
En cada uno de los grupos se obtuvieron los valores de glucosa en sangre correspondientes a cada uno de manera independiente, desde el minuto 0 y hasta los 360 minutos, y no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$), aun siendo el de mejor eficacia en disminuir las concentraciones de glucosa en sangre, en comparación con todos los demás grupos, el Formulado 1 del Grupo 2 (Gráfica 15).



Gráfica 15. Gráfica de líneas que representa la concentración promedio de glucosa en sangre de todas las ratas con DMT1 luego de la administración de su formulado correspondiente por vía oral forzada desde 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240, 360 minutos.

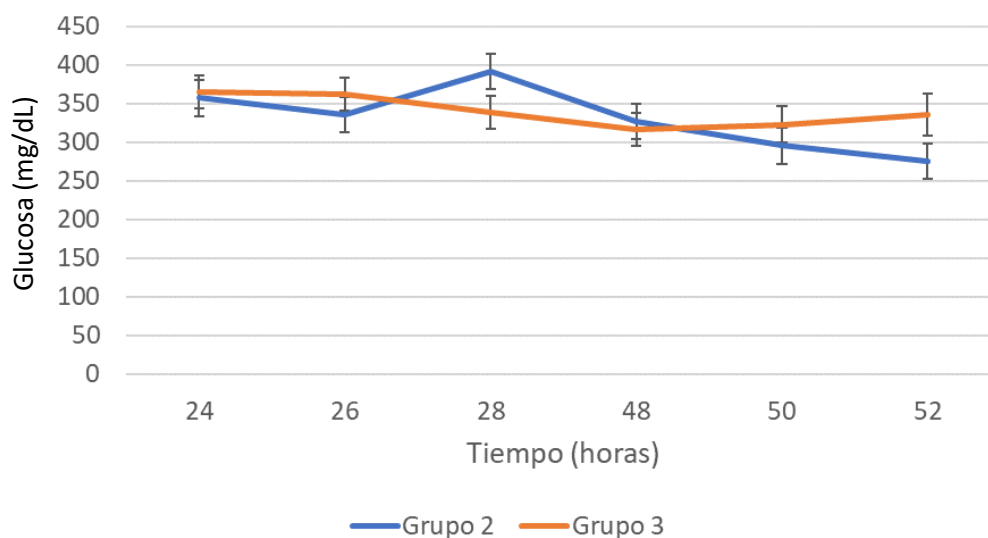
Administración de Formulados por vía oral sin administración de bolo de dextrosa por vía oral.

En los grupos 2 y 3 se tomaron las concentraciones de glucosa en sangre con 4 horas de ayuno de sólidos y sin administración de bolo de dextrosa por vía oral forzada a dosis de 2g/kg, desde las 24 y hasta las 52 horas pos-administración de formulados correspondientes a cada grupo. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre estos dos grupos (Gráfica 16).



Gráfica 16. Gráfica de dispersión que representa la concentración promedio de glucosa en sangre de ratas con DMT1 dadas en medias de cuadrados mínimos y error estándar, luego de la administración de sus formulados correspondientes a dosis de 1.2mL/350g por vía oral forzada a intervalos de 24, 26, 28, 48, 50, 52 horas. Sin bolo de dextrosa por vía oral.

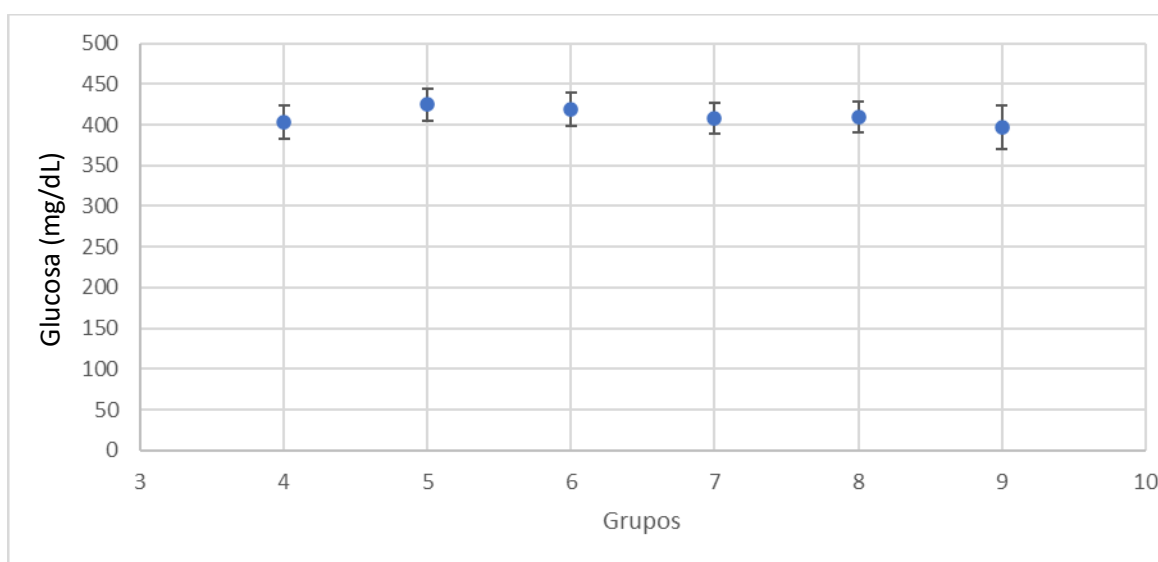
En cada uno de los grupos, 2 y 3, se obtuvieron los valores de glucosa en sangre correspondientes a cada uno de manera independiente, desde las 24 horas y hasta las 52 horas, y no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) (Gráfica 17). En ambos grupos, a pesar de ser diferentes excipientes de formulación en los liposomas, se comportaron de manera similar en los niveles de concentración de glucosa en sangre, en donde se observa la poca eficiencia por esta vía la eficacia hipoglucemiante de los liposomas.



Gráfica 17. Gráfica de líneas que representa la concentración promedio de glucosa en sangre de ratas con DMT1 dadas en medias de cuadrados mínimos y error estándar, luego de la administración de su formulado correspondiente por vía oral forzada a las 24, 26, 28, 48, 50, 52 horas. Sin bolo de dextrosa por vía oral.

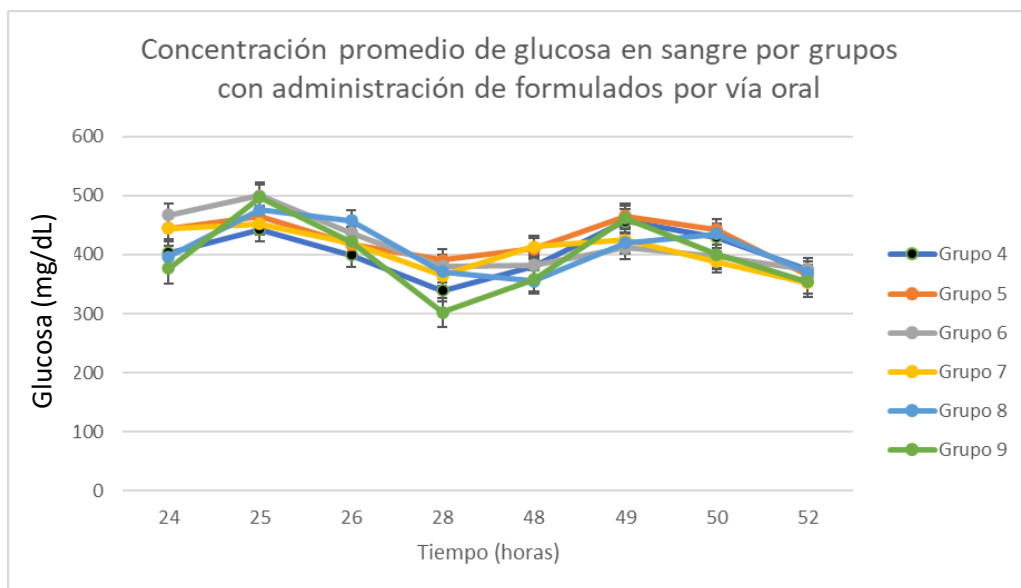
Administración de Formulados por vía oral con administración de bolo de dextrosa por vía oral.

En los grupos 4, 5, 6, 7, 8 y 9 se obtuvieron los valores de glucosa en sangre desde las 24 y hasta las 52 horas pos-administración de formulados correspondientes a cada uno de los grupos con administración de bolo de dextrosa por vía oral forzada a dosis de 2g/kg. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre todos estos grupos (Gráfica 18). Los formulados conteniendo liposomas con diferentes formulaciones de excipientes, no mostraron características sobresalientes para su efectividad en la disminución de glucosa en sangre por la vía oral.



Gráfica 18. Gráfica de dispersión que representa la concentración promedio de glucosa en sangre de todos los grupos de ratas con DMT1 luego de la administración de sus formulados correspondientes a dosis de 1.2mL/350g por vía oral forzada a intervalos de 24, 26, 28, 48, 50, 52 horas. Con bolo de dextrosa por vía oral forzada.

En cada uno de los grupos de manera independiente se obtuvieron los valores de glucosa en sangre en el tiempo comprendido desde las 24 y hasta las 52 horas, sin administración de bolo de dextrosa por vía oral forzada a dosis de 2g/kg y con previo ayuno de 4 horas de sólidos. De entre todas estas mediciones, no se observaron diferencias estadísticamente significativas (Gráfica 20).



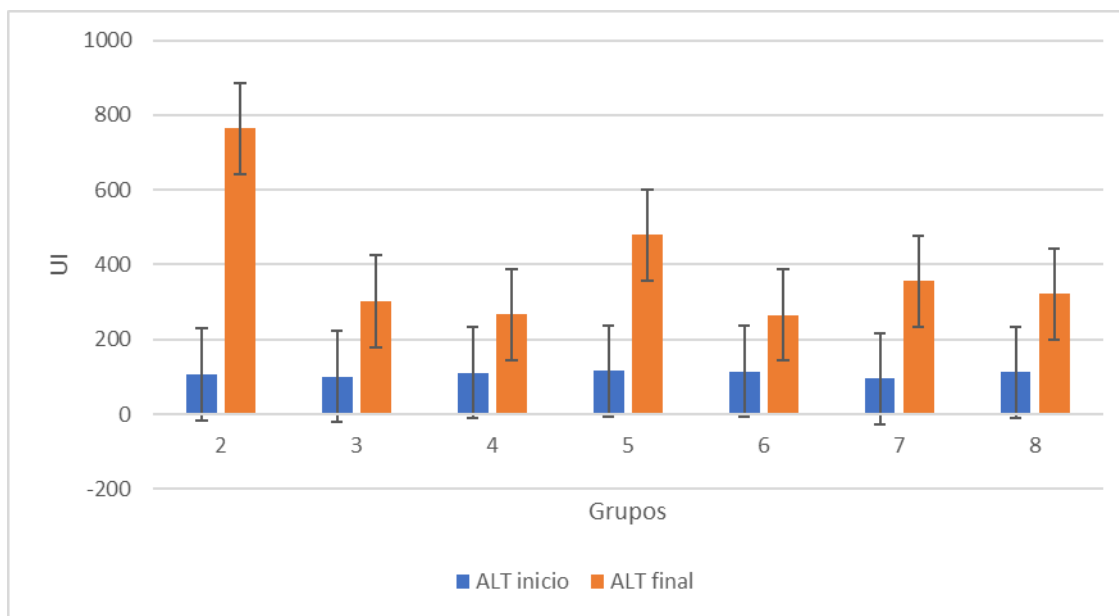
Gráfica 20. Gráfica de líneas que representa la concentración promedio de glucosa en sangre de ratas con DMT1 dadas en medias de cuadrados mínimos y error estándar, luego de la administración de su formulado correspondiente por vía oral forzada a las 24, 26, 28, 48, 50, 52 horas. Con bolo de dextrosa por vía oral.

Bioquímica.

Se obtuvieron muestras sanguíneas del plexo ocular al inicio (sin administración de STZ ni de formulados) y al final del periodo experimental (posterior a la diabetización con STZ y administración de los formulados correspondientes por grupo) de cada uno de los grupos, y se realizaron mediciones de ALT, AST, Urea, Creatinina, y nitrógeno ureico en sangre (BUN), con previo ayuno de 4 horas de sólidos. Las muestras de sangre se obtuvieron de 3 sujetos por grupo. En cada uno de los grupos se hicieron comparaciones de los niveles de cada uno de los analitos antes mencionados.

Alanino Aminotransferasa (ALT).

En el caso de ALT se observa un aumento a final del periodo experimental en todos los grupos. Sin embargo, dicho aumento, no fue estadísticamente significativo ($P < 0.05$) (Gráfica 21). Las alteraciones observadas antes y después de la administración de STZ y de los formulados, es resultado del progreso de la DM una vez inducida y sin llevar un tratamiento terapéutico para controlar los niveles de glucemia en sangre.



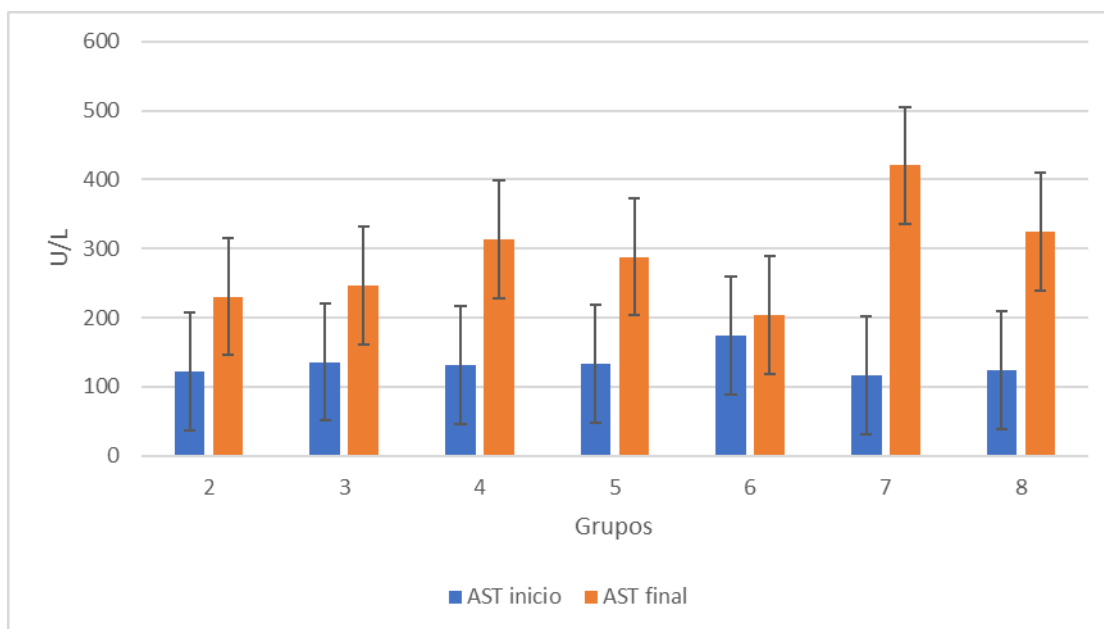
ALT: alanino aminotransferasa.

Gráfica 21. Medias mínimo cuadradas que representan el cambio de alanino aminotransferasa (ALT) después del periodo de seguimiento de 15 días, post administración de liposomas cargados con insulina en ratas Wistar. Se observa un incremento de las concentraciones de ALT en todos los grupos de ratas Wistar evaluadas.

Sin embargo, no hay diferencias estadísticamente significativas ($P>0.05$). Valores de referencia promedio de todos los grupos al inicio. 108.23 U/L.

Aspartato Aminotransferasa (AST)

En el caso de AST se observa un aumento en todos los grupos reflejándose el daño hepático asociado a la DM (Gráfica 22). Sin embargo, dicho aumento, no fue estadísticamente significativo ($P < 0.05$).

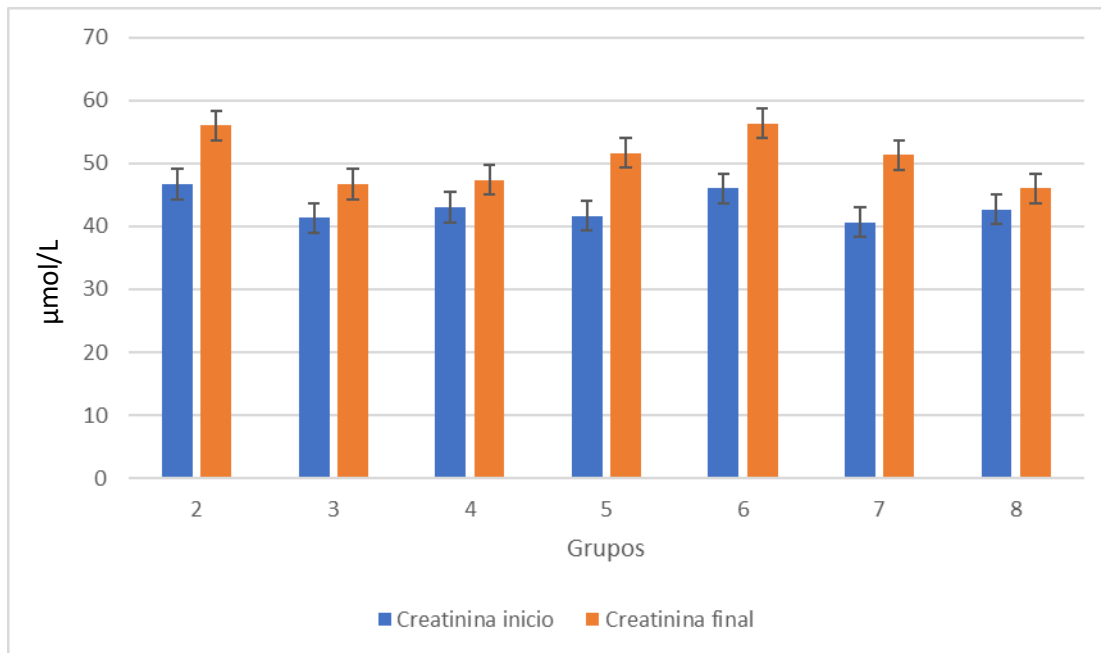


AST: Aspartato Aminotransferasa

Gráfica 22. Medias mínimo cuadradas que representan el cambio de Aspartato Aminotransferasa (AST) después del periodo de seguimiento de 15 días, post administración de liposomas cargados con insulina en ratas Wistar. Se observa un incremento de las concentraciones de AST en todos los grupos de ratas Wistar evaluadas. Sin embargo, no hay diferencias estadísticas $P > 0.05$. Valores de referencia promedio de todos los grupos al inicio. 133.85 U/L

Creatinina.

En el caso de Creatinina se observa un aumento muy leve si se comparan los datos al inicio y al final del periodo experimental (Gráfica 23). Sin embargo, para este analito no representan una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$). En conjunto con los analitos que visualizan la funcionalidad renal, es de consideración mencionar que el daño renal es evidente.

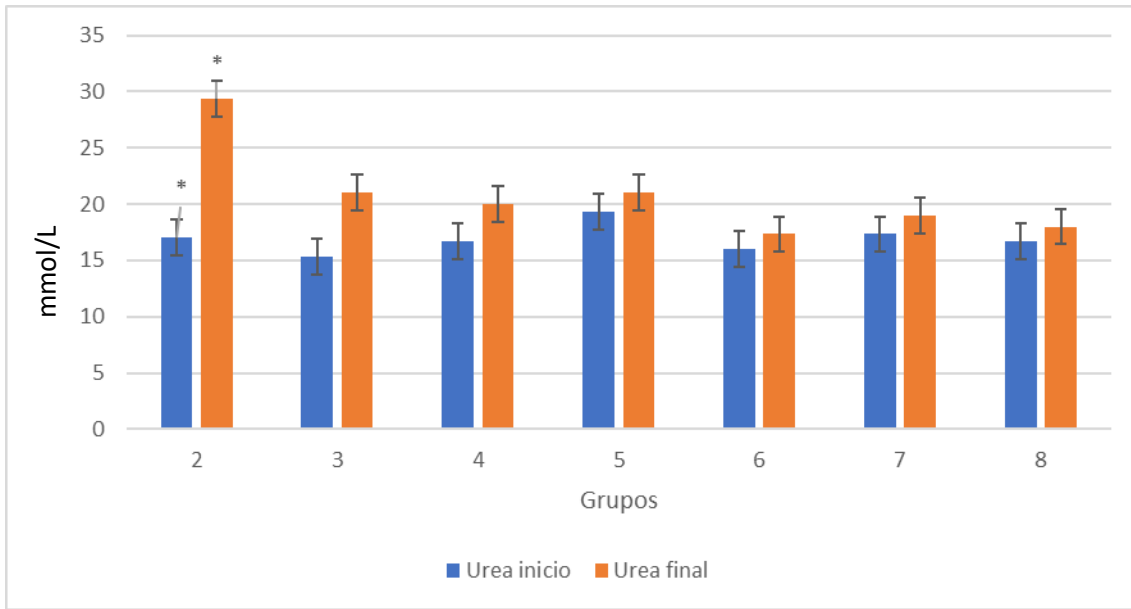


Grafica 23. Medias mínimo cuadradas que representan el cambio de creatinina después del periodo de seguimiento de 15 días, pos administración de liposomas cargados con insulina en ratas Wistar. No se observan diferencias estadísticamente significativas ($P > 0.05$). Valores de referencia promedio de todos los grupos al inicio: 43.12 mmol/L

Urea.

En el caso de la Urea, se observa un aumento en el grupo 2 con la administración del F1 (Insulina: 0.714, Fosfatidil colina: 0.066, colato de sodio: 0.009, cuanto baste para 25mL) reflejándose el daño renal asociado a la DM, con diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$); en los grupos restantes no se observaron diferencias al inicio y al final del periodo experimental de 15 días (Gráfica 24). Aunque no son diferencias estadísticamente significativas, las ligeras variaciones en los niveles de Urea representaría el daño renal causado por la DM.

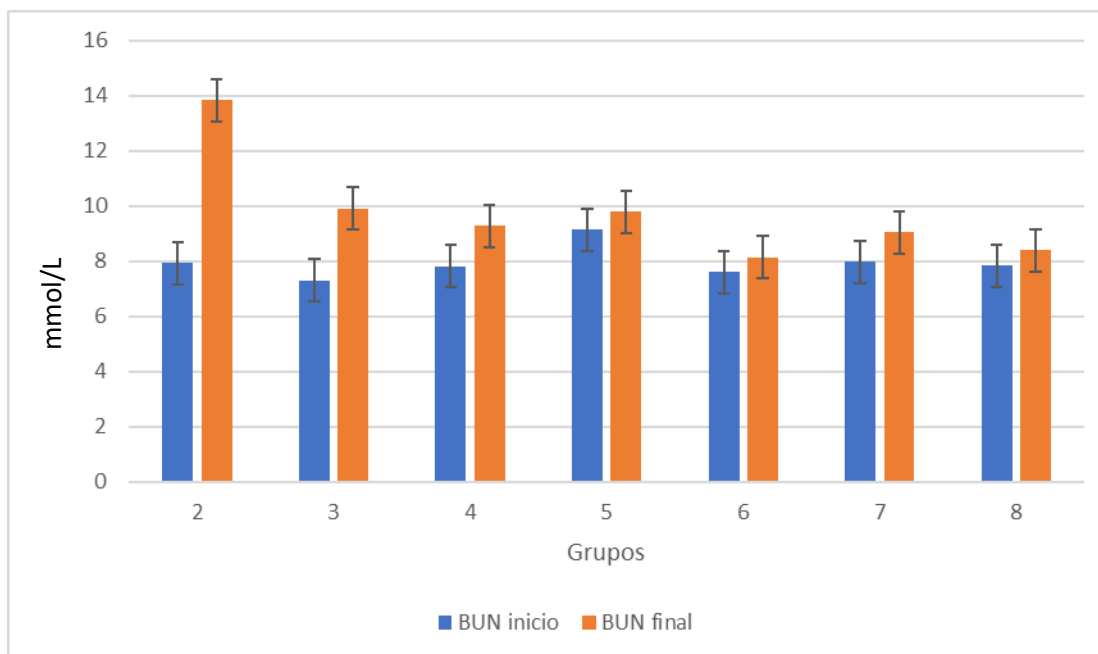
Con referencia a las alteraciones en conjunto de los analitos correspondientes a la funcionalidad renal, se hace mención que la DM causó daños a la salud de los sujetos bajo experimentación.



Gráfica 24. Medias mínimo cuadradas que representan el cambio de urea después del periodo de seguimiento de 15 días pos administración de liposomas cargados con insulina en ratas Wistar. Se observan diferencias estadísticamente significativas en el grupo 2 (17mmol/L al inicio y 29.33 mmol/L al final), en los otros grupos, no se observan diferencias estadísticamente significativas ($P>0.05$). Valores de referencia promedio de todos los grupos al inicio: 16.9 mmol/L.

Nitrógeno Ureico en sangre (BUN).

En el caso del BUN, no se observó un aumento de este analito en alguno de los grupos luego de 15 días de experimentación. No existen diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) (Gráfica 25). De igual forma, estas ligeras variaciones de BUN reflejan el daño renal asociado a la DM sin control terapéutico.

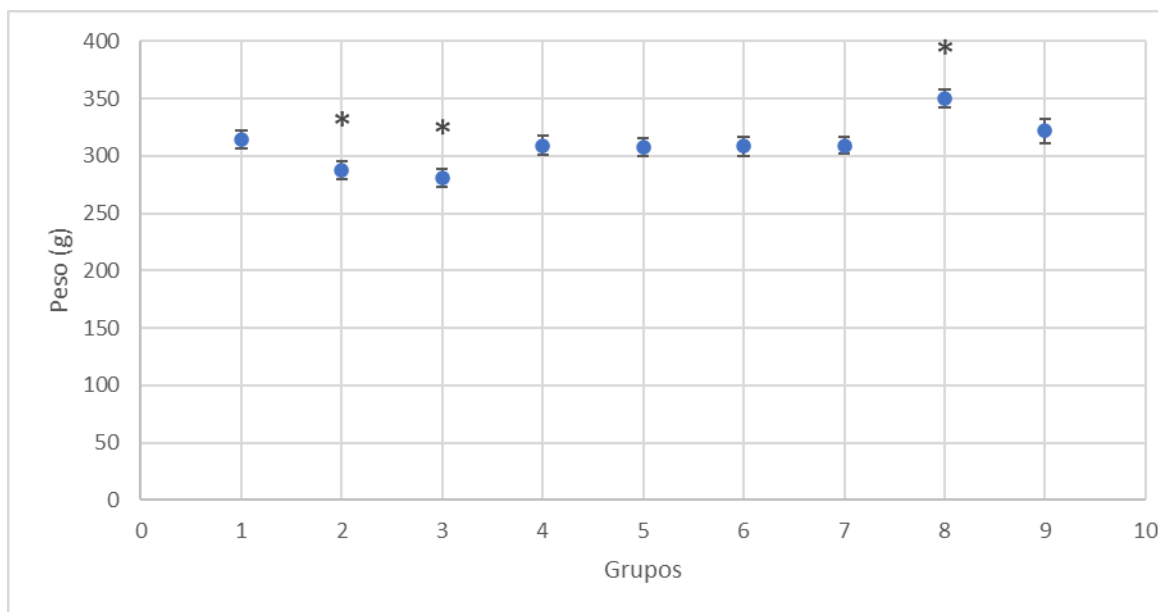


Gráfica 25. Medias mínimo cuadradas que representan el cambio de nitrógeno ureico en sangre después del periodo de seguimiento de 15 días pos administración de liposomas cargados con insulina en ratas Wistar. No se observan diferencias estadísticas ($P > 0.05$). Valores de referencia promedio de todos los grupos al inicio: 7.93 mmol/L.

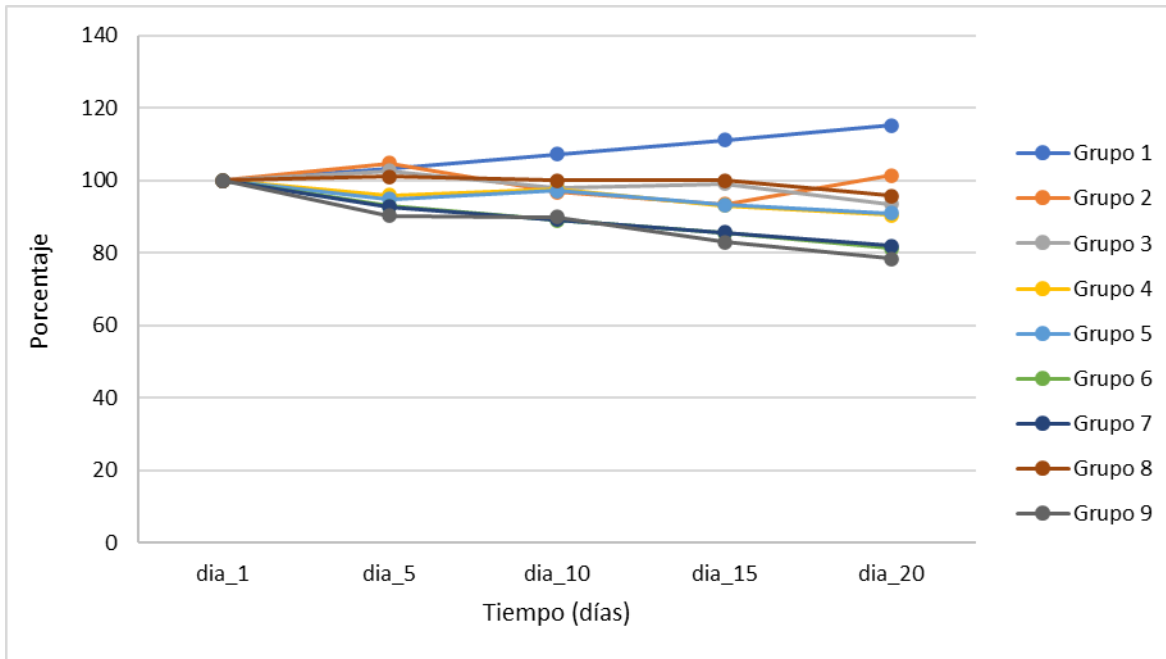
Registro de peso corporal.

En el periodo de tiempo experimental de todos los grupos, una vez adaptados al cambio de alimento y a las condiciones ambientales del nuevo bioterio, se comenzaron a registrar los pesos desde el día 1 al día 20, a intervalos de cada 5 días, desde antes de la diabetización y hasta el término de las mediciones de glucosa en sangre luego de la administración de los formulados por vía subcutánea y vía oral forzada. En los registros se observa el deterioro de los animales, en específico desde el grupo 2 y hasta el grupo 9, que fueron los animales a los cuales se les indujo la DM. Sobre las variaciones en los pesos, el grupo 1 tuvo regularidad en el mantenimiento de su condición corporal dado que no se indujo la DM en esos

animales; y en el caso del grupo 8, tuvo la posibilidad de mantenerse bajo observación una semana más en comparación con los demás previo a la diabetización con STZ, con lo cual pudieron compensar los efectos de la DM no controlada. Además, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) entre los grupos 2, 3 y 8 respecto a los demás (Gráfica 26 y 27).



Gráfica 26. Gráfica de dispersión que representa las variaciones de pesos promedios de todos los sujetos de todos los grupos desde el día 1 hasta el día 20 a intervalos de cada 5 días. Los asteriscos representan diferencias estadísticas significativas $\alpha=0.05$



Gráfica 27. Gráfica de líneas que muestra los cambios de peso por grupos respecto al día 1 de manejo y hasta el día 20.

Anatomopatología.

A continuación, se presentan los resultados del estudio postmortem de 24 ratas Wistar, machos, de acuerdo con el Procedimiento Normalizado de Operación para la realización de necropsias PNONE-UNAM-UNIPREC-01. Los individuos se identificaron de la siguiente manera:

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6	Grupo 7	Grupo 8
AP22-17	AP22-43	AP22-57	AP22-60	AP22-63	AP22-68	AP22-71	AP22-74
AP22-18	AP22-44	AP22-58	AP22-61	AP22-64	AP22-69	AP22-72	AP22-75
AP22-19	AP22-45	AP22-59	AP22-62	AP22-65	AP22-70	AP22-73	AP22-76

En la descripción macroscópica la rata identificada con el AP22-074 del grupo 8. presentó adherencias en la cavidad torácica entre los pulmones, el pericardio y la pared costal. El pericardio estaba marcadamente engrosado por abundante material amarillo fibrilar correspondiente a fibrina, que se extendía hacia la superficie pulmonar. Ambos pulmones tenían áreas multifocales rojo oscuro con consistencia firme.

En la descripción microscópica se revisaron secciones histológicas de hígado, riñón y en el caso de una rata pulmón y corazón.

Grupo 1.

Hígado: en los tres individuos se observan zonas con hepatocitos ligeramente aumentados de tamaño y pequeñas vacuolas lipídicas en el citoplasma (degeneración lipídica microvesicular).

Riñón: en los animales AP22-017 y AP22-019 se observa en los túbulos material basofílico amorfo correspondiente a mineralización (nefrocalcinosis).

Grupo 2.

Hígado: En los tres individuos de este grupo se observa la misma lesión que en el grupo 1.

Riñón: En los individuos AP22-043 y AP22-044 hay pequeños focos de células plasmáticas y linfocitos en el intersticio.

Grupo 3.

Hígado: En los tres individuos de este grupo se observa la misma lesión que en el grupo 1.

Riñón: Los tres animales presentan inflamación linfoplasmocítica en el intersticio, y en la rata AP22-059 se observa también nefrocalcinosis.

Grupo 4.

Hígado: En los tres individuos de este grupo se observa la misma lesión que en el grupo 1.

Riñón: En el animal AP22-060 se observa un foco de inflamación linfoplasmocítica en el intersticio, además de nefrocalcinosis.

Grupo 5.

Hígado: En los tres individuos de este grupo se observa la misma lesión que en el grupo 1.

Riñón: En la rata AP22-063 las células epiteliales de los túbulos renales contienen escasas vacuolas en el citoplasma (degeneración vacuolar). En la rata AP22-064 se aprecia degeneración vacuolar en el epitelio tubular, además de nefrocalcinosis. En el animal AP22-065 se observa degeneración vacuolar en el epitelio, nefrocalcinosis grave y focos de inflamación linfoplasmocítica intersticial.

Grupo 6.

Hígado: En los tres individuos de este grupo se observa la misma lesión que en el grupo 1.

Riñón: El animal con número AP22-068 presenta focos de inflamación linfoplasmocítica intersticial y nefrocalcinosis; la rata AP22-069 muestra degeneración vacuolar en el epitelio tubular y nefrocalcinosis, y en la rata AP22-70 se aprecia degeneración vacuolar en el epitelio tubular, así como focos de inflamación linfoplasmocítica intersticial.

Grupo 7.

Hígado: En los tres individuos de este grupo se observa la misma lesión que en el grupo 1; además, en el animal AP22-073 se aprecia un foco con algunos linfocitos y células plasmáticas alrededor de la triada porta (inflamación linfoplasmocítica periportal).

Riñón: en los tres animales se aprecia degeneración vacuolar en el epitelio tubular, además, la rata AP22-071 presenta nefrocalcinosis.

Grupo 8.

Hígado: en los tres individuos de este grupo se observa la misma lesión que en el grupo 1; además, en el animal AP22-075 se aprecia un foco de inflamación linfoplasmocítica periportal.

Riñón: en los tres animales se aprecia degeneración vacuolar en el epitelio tubular, además, las ratas AP22-075 y AP22-076 presentan focos de inflamación linfoplasmocítica intersticial y el animal AP22-076 también tiene nefrocalcinosis.

Pulmón: en la rata AP22-074 la pleura está engrosada por abundante fibrina y células inflamatorias representadas por neutrófilos y macrófagos que se extienden e infiltran el parénquima pulmonar.

Corazón: en la rata AP22-074 el pericardio se encuentra engrosado por abundante fibrina entremezclada con restos necróticos e inflamación piogranulomatosa que se extiende hasta el miocardio.

Evaluación histopatológica por individuo.

Cuadro 8 Identificación de individuos analizados por histopatología.

Individuo	Grupo	Riñón	Hígado
AP22-17	1	Nefrocalcinosis	Escasas vacuolas lipídicas
AP22-18	1	SCPA	Escasas vacuolas lipídicas
AP22-19	1	Nefrocalcinosis	Escasas vacuolas lipídicas
AP22-43	2	Inflamación linfoplasmocitaria intersticial	Escasas vacuolas lipídicas
AP22-44	2	Inflamación linfoplasmocitaria intersticial	Escasas vacuolas lipídicas
AP22-45	2	SCPA	Escasas vacuolas lipídicas
AP22-57	3	Inflamación linfoplasmocitaria intersticial	Escasas vacuolas lipídicas
AP22-58	3	Inflamación linfoplasmocitaria intersticial	Escasas vacuolas lipídicas
AP22-59	3	Inflamación linfoplasmocitaria intersticial/Nefrocalcinosis	Escasas vacuolas lipídicas
AP22-60	4	Focos de inflamación linfoplasmocítica intersticial/ Nefrocalcinosis	Escasas vacuolas lipídicas
AP22-61	4	SCPA	Escasas vacuolas lipídicas
AP22-62	4	SCPA	Escasas vacuolas lipídicas
AP22-63	5	Escasas vacuolas en epitelio tubular.	Escasas vacuolas lipídicas

AP22-64	5	Vacuolas en epitelio/Nefrocalcinosis.	Escasas vacuolas lipídicas
AP22-65	5	Focos de inflamación linfoplasmocítica intersticial/Nefrocalcinosis grave/epitelio tubular con vacuolas	Escasas vacuolas lipídicas
AP22-68	6	Foco de inflamación linfoplasmocítica intersticial/ Nefrocalcinosis	Escasas vacuolas lipídicas
AP22-69	6	Vacuolas en epitelio/Nefrocalcinosis	Escasas vacuolas lipídicas
AP22-70	6	Focos de inflamación linfoplasmocítica intersticial/ vacuolas en epitelio tubular	Escasas vacuolas lipídicas
AP22-71	7	Vacuolas en epitelio tubular/Nefrocalcinosis	Escasas vacuolas lipídicas
AP22-72	7	Vacuolas en epitelio tubular	Escasas vacuolas lipídicas
AP22-73	7	Vacuolas en epitelio tubular	Escasas vacuolas lipídicas/ inflamación periportal
AP22-74	8	Vacuolas en epitelio tubular	Escasas vacuolas lipídicas
AP22-75	8	Focos de inflamación intersticial/Vacuolas en epitelio tubular	Escasas vacuolas lipídicas/ inflamación periportal
AP22-76	8	Focos de inflamación intersticial/Vacuolas en epitelio tubular/Nefrocalcinosis	Escasas vacuolas lipídicas

SCPA: Sin cambios patológicos aparentes.

Diagnósticos morfológicos.

- Riñón: Nefrocalcionosis (Figuras 1 y 2).
Degeneración vacuolar leve multifocal/ Nefritis intersticial leve focal (Figuras 3 y 4).
- Hígado: Degeneración lipídica microvesicular leve multifocal (Figura 5).
- Pulmones: Pleuroneumonía fibrinosa y piogranulomatosa moderada.
- Corazón: Pericarditis y miocarditis fibrinosa y piogranulomatosa grave difusa.

Fotomicrografías.

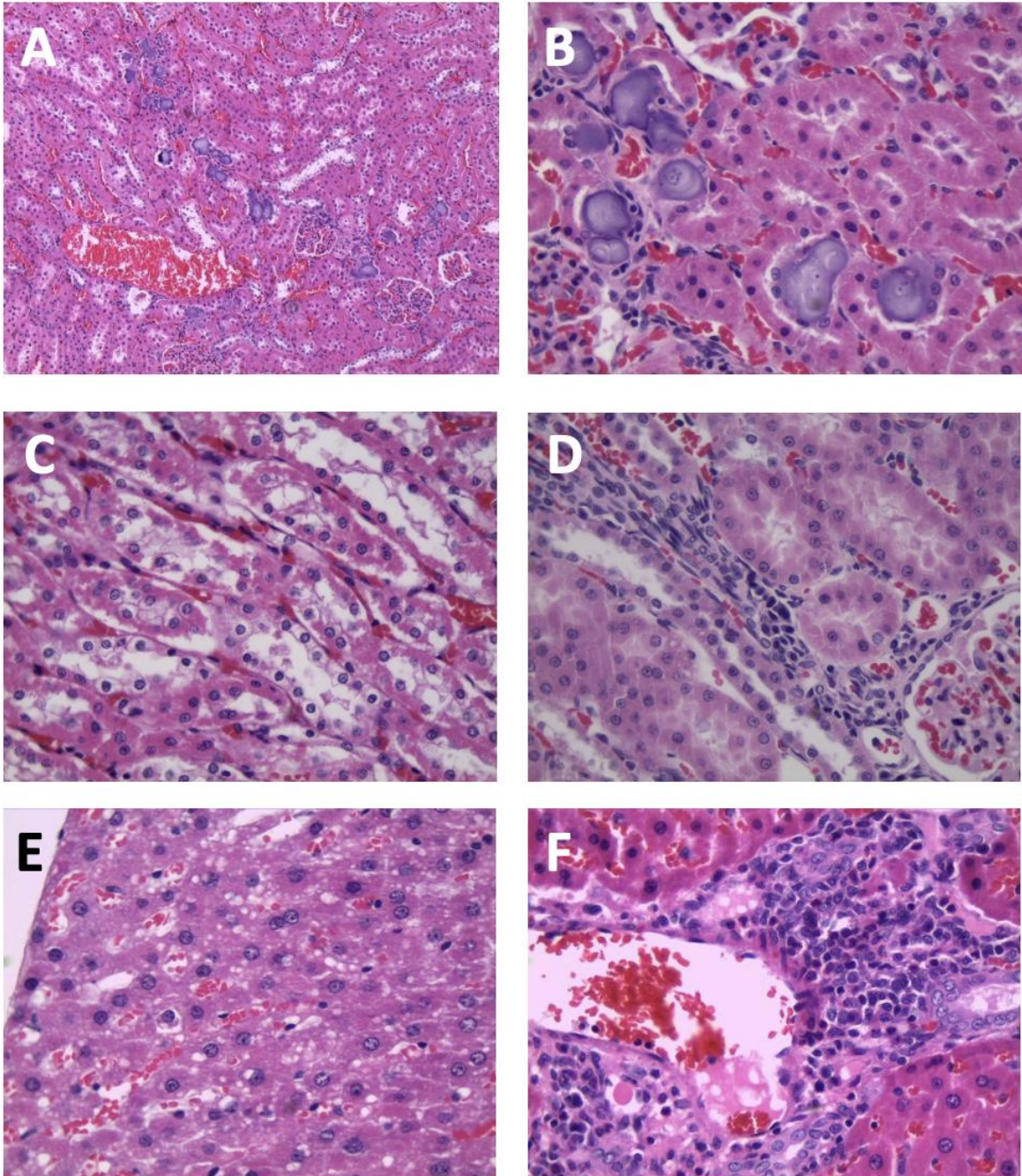


Figura 3. Imágenes representativas del daño histológico asociado a la Diabetes Mellitus inducida con Streptozotocina en ratas Wistar después de 15 días de seguimiento pos administración de liposomas cargadas con insulina. A y B) Se muestra deposición mineral en túbulos de riñón (nephrocalcinosis). C) Se observan vacuolas de agua en el citoplasma del epitelio tubular renal. D) Se aprecian linfocitos y células plasmáticas en el intersticio. E) Corte histológico de hígado vacuolas lipídicas en el citoplasma de los hepatocitos. F) se observan linfocitos y células plasmáticas alrededor de la triada porta.

DISCUSIÓN

La DMT1 es una enfermedad que se caracteriza por presentar una deficiencia absoluta en la secreción de insulina, un inicio relativamente rápido y la dependencia de insulina exógena en el momento del diagnóstico (Poretsky, 2017). Los pacientes con DMT1 dependen de la administración de insulina recombinante humana para mantener los niveles de glucosa en rangos fisiológicos y evitar complicaciones asociadas a la hiperglucemia descontrolada, por tanto, la experimentación en ciencia básica se ha realizado en modelos de DMT1 en ratas Wistar ha permitido el desarrollo de nuevas tecnologías terapéuticas en el control de esta enfermedad.

En este estudio, se diabetizaron ratas Wistar por medio de la administración de STZ por vía IP a dosis de 45mg/kg (Brondum *et al.*, 2005), y se logró que un 70% de los animales desarrollaran diabetes, y fue con una dosis menor a la administrada por Arciniegas *et al.*, 2020, por lo que fue posible reducir los efectos adversos propios de la estreptozotocina administrada por vía IP, que fue la misma dosis que administró Barriga *et al.*, 2022 por vía IV (con un porcentaje de diabetización del %85), la cual puede causar daño tisular y es dolorosa y puede causar angustia y estrés en los animales (NIH and ACUC; Beeton *et al.*, 2007). Posteriormente se realizaron mediciones de las concentraciones plasmáticas de glucosa para comprobar el diagnóstico de la enfermedad, considerándose como enfermas aquellas que presentaron valores superiores a 200mg/dL (Barriga, 2020). Asimismo, se evaluaron 7 tipos de formulados que contenían liposomas con diferentes proporciones de excipientes en la composición de su estructura encapsulando a la insulina. Previo a la administración de los formulados, se realizó la prueba de tolerancia a la glucosa a cada grupo como ratas sanas con ayuno de 4 horas de sólidos (Barriga, 2020; Bowe, 2014) y administración de bolo de dextrosa por vía oral forzada a dosis de 2 g/kg (Urzúa, 2011). Una vez comprobando el diagnóstico de la DMT1 en los sujetos experimentales, los formulados se administraron por vía subcutánea y por vía oral forzada en una sola ocasión, con el monitoreo de glucosa sanguínea a diferentes periodos de tiempo, tal como lo hizo Arciniegas *et al.*, (2020). Luego del primer monitoreo de glucosa de los animales de cada grupo, se realizó seguimiento de la misma por tres días consecutivos con

ayuno de 4 horas de sólidos y con bolo de dextrosa a dosis de 2g/kg por vía oral forzada a los 0, 60, 120 y 240 minutos. Al término de su periodo experimental de los grupos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, y 8 se realizó el estudio anatomopatológico a tres sujetos de cada grupo.

El uso de la rata como modelo experimental para el estudio de la DM tiene diversas aplicaciones, desde la comprensión de la fisiopatología de la enfermedad como para la aplicación de potenciales tratamientos terapéuticos por las alteraciones a la salud causadas por la diabetes (Jarrin, 2002). La terapéutica de la DM sigue siendo tema de interés para el desarrollo de nuevas tecnologías en la administración de insulina; en este trabajo realizado se propone la encapsulación de la insulina en liposomas como prototipo que permita la liberación prolongada de esta hormona ante las variaciones de glucosa que el paciente con DMT1 presenta a lo largo del día y así evitar la readministración de la misma. Otra de las propuestas que se consideraron en este trabajo es la ruta enteral de administración de insulina; dadas las características de los liposomas, y de los excipientes empleados para su manufactura, de los cuales, haciendo mención de sus características, el Polaxámero (Polaxamero 188) tiene la función de ser un acarreador de fármacos por sus propiedades emulsificantes, solubilizantes y agente dispersor, además de ser estable en soluciones ácidas y básicas, los polaxámeros han sido usados en variedad de formulaciones farmacéuticas tanto por vía oral, parenteral y tópica, siendo considerados como materiales no tóxicos y no irritantes; los polaxámeros no son metabolizados en el organismo; el Polietilenglicol (PEG 1500), dentro de su funcionalidad como plastificante, solvente, lubricante para tabletas y cápsulas, son ampliamente usados en gran variedad de formulaciones farmacéuticas incluyendo la parenteral, tópica, oftálmica, oral y rectal, además han sido usados en matrices poliméricas biodegradables en sistemas de liberación controlada; el Brij (Éteres alquílicos de polioxietileno) usado por sus propiedades como agente emulsionante; potenciador de la penetración y agente solubilizante; este éter alquílico de polioxietileno es químicamente estable en condiciones fuertemente ácidas o alcalinas, sin embargo, la presencia de electrolitos fuertes puede afectar adversamente la estabilidad física de las emulsiones que contienen polioxietileno

alquil éter; y aunque generalmente se consideran materiales esencialmente no tóxicos y no irritantes, algunos éteres alquílicos de polioxietileno, particularmente cuando se usan en concentraciones altas (>20%), parecen tener un potencial irritante mayor que otros; una de sus aplicaciones muy particulares es que se han desarrollado liposomas de polioxietileno alquil éter que encapsulan la insulina y estos se han investigado para la administración oral de fármacos; y en sus interacciones con otros excipientes se ha informado que una combinación de un agente mucolítico que posee un grupo tiol libre y un tensioactivo de polioxietileno alquil éter de polioxietileno y cadena de alquilo de longitud similar, que muestra una mejora eficaz en la absorción intestinal de compuestos hidrofílicos poco absorbidos (Rowe *et al.*, 2009), ya que los vuelve moléculas con amplio potencial para poder resistir las condiciones fisiológicas del tracto gastrointestinal y la posterior difusión de la insulina fuera del liposoma. Aunque no se obtuvieron buenos resultados por la vía oral, esto se debió a que, con los formulados administrados, no se lograron superar los desafíos que implica la administración de insulina por vía oral, tales como la pobre biodisponibilidad de la insulina y una baja velocidad de difusión a través de la capa mucosa (Kumar *et al.*, 2017), y la degradación enzimática en el tracto gastrointestinal una vez que la hormona logró difundir de su sistema de transporte diseñado (Kumar *et al.*, 2018). sigue siendo un amplio campo de investigación para el desarrollo de nuevas combinaciones de excipientes en liposomas que permitan la adhesión, resistan el ambiente fisiológico del tracto gastrointestinal y la posterior difusión de la insulina, como es el caso de los estudios publicados de Bashyal *et al.*, 2021, quienes desarrollaron y caracterizaron liposomas elásticos con surfactantes, como colato de sodio incorporado (SC-EL) y liposomas elásticos incorporados en glicodesoxicolato de sodio (SGDC-EL) y evaluaron su permeabilidad a través de los tejidos bucales porcinos, que posteriormente se evaluó mediante microscopía de barrido láser confocal (CLSM). Los SGDC-EL fueron los liposomas mejores ya que mejoraron significativamente la penetración de la insulina a través de tejidos bucales porcinos, 4,33 veces en el coeficiente de permeabilidad en comparación con la solución de insulina. Quedando demostrado que los ácidos biliares actúan como

detergente para solubilizar las grasas, siendo él mismo reabsorbido y logrando incrementar la permeabilidad de la insulina.

Modelo experimental.

Históricamente, los modelos animales han jugado un papel fundamental en la comprensión y caracterización de la fisiopatología de diversas enfermedades y la identificación de posibles objetivos para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos. Un modelo animal ideal debería: 1. permitir el estudio de fenómenos biológicos o comportamiento animal; 2. permitir la investigación de un proceso patológico espontáneo o inducido y, 3. reproducir, en uno o más aspectos, el fenómeno que ocurre en humanos (Camacho *et al.*, 2020). Los animales en este estudio debieron cumplir con los criterios de inclusión para ser considerados: Wistar, machos, ya que las hembras, en comparación con los machos, tienen características que les confieren una mayor resistencia a la alteración de los islotes pancreáticos, como un 40 % más de área de los islotes, un 22 % más de células β , un 50 % más de células α y una mayor capacidad de liberación de insulina cuando se estimulan, otro factor importante es el papel del estradiol en la protección de las células β contra diversas agresiones, entre las que se encuentra la exposición a STZ (Santos *et al.*, 2022); 250-300g de peso, sanos y de tipo convencional, y que no presentaran alteraciones en su salud que afectaran la concentración de glucosa en sangre, dado que era la principal variable a evaluar. A todos los sujetos una vez transportados a la nueva sala de mantenimiento del bioterio se les dio un periodo de adaptación de 15 días alimentándose con el mismo tipo de alimento del lugar de origen, sin realizar manejo que pudieran estresarlos; posterior a esos siete días se inició un cambio de alimentación gradual al nuevo alimento por otros siete días, por el tiempo que permanecieran bajo experimentación. Se observó que a pesar del tiempo de adaptación inicial de siete días, en el periodo del cambio de alimentación algunas ratas presentaron diarreas profusas, lo anterior asociado a una pobre adaptación por parte de la microbiota gastro intestinal de los individuos, ya que fueron casos en particular que presentaron este tipo de alteración, así como el descarte de dos sujetos de dos grupos distintos, ya que presentaron alteraciones

en su postura ladeando su cabeza, los cuales fueron devueltos al bioterio de origen, lo anterior asociado a inmunodepresión por estrés por el nuevo tipo de ambiente al que fueron expuestos. Una vez resuelto el problema de las diarreas, se determinó que los animales estaban listos para iniciar el proceso de experimentación.

El siguiente criterio de inclusión para considerar a un sujeto con DMT1, posterior a la administración de STZ por vía IP, fue haber obtenido niveles de glucosa mayores a 200 mg/dL a las 24 horas de su administración (Barriga, 2020), y un periodo de ayuno de 4 horas de sólidos previo a la medición de glucosa en sangre. En la mayoría de los grupos se obtuvo una inducción de la DM de entre el 70-80% 24 horas después, por lo cual, sin antes no haber alcanzado los valores mayores a 200 mg/dL no se iniciaba el proceso de administración de los formulados. Los sujetos que no alcanzaban los niveles de glucosa en sangre mayores a 200 mg/dL fue debido a sus características fisiológicas inherentes, ya que hubo algunos en donde se observó que a las 48 horas post administración de STZ lograron concentraciones mayores a los 200 mg/dL, además, hubo dos sujetos que requirieron de la readministración de STZ por vía IP a las 48 horas ya que no alcanzaban los valores establecidos para ser considerados como enfermos de DMT1. De esta forma se garantizaba que a todos los sujetos en experimentación a los cuales se les administrara los formulados presentaran la enfermedad y la dependencia de la insulina para disminuir la concentración de glucosa.

Desde una perspectiva clínica se pudo observar que las ratas con DMT1 padecieron las consecuencias de la enfermedad, todos los sujetos tuvieron disminución de su condición corporal, poliuria, polidipsia, polifagia y reducción de su actividad física en su resguardo primario y a la manipulación (Atkinson, 2014). Una vez diagnosticada la DMT1 es indispensable la administración de insulina exógena (Poretsky, 2017), pues la función de las células beta del páncreas están imposibilitadas para sintetizar insulina. La mayoría de los casos de diabetes tipo 1 representan un trastorno inmunitario, si no es que un desorden autoinmune, lo que significa que los pacientes a menudo muestran características de una contribución inmunológica a la patogénesis de la enfermedad (p. ej., autoanticuerpos o

asociaciones genéticas con genes que controlan las respuestas inmunitarias) y de tipo idiopática, cuya patogenia específica sigue sin estar clara (Atkinson, 2014). Aunque datos recientes sugieren que aunque la mayoría de los pacientes con diabetes tipo 1 tienen pocas células β , si es que tienen algunas, hay evidencia de regeneración de células β en bebés y niños muy pequeños (pero no en adolescentes o adultos) (Gregg *et al.*, 2012; Keenan *et al.*, 2010). Las ratas a las cuales se les indujo experimentalmente la DM1 tuvieron incapacidad de poder sintetizar insulina, ya que la STZ destruye a las células β del páncreas, así es que era poco probable que aun teniéndolas en resguardo por mucho más tiempo tuvieran la posibilidad de tener algún tipo de regeneración celular; aunque a pesar de lo anteriormente mencionado, hubo un caso de reversión de la DM, ya que un individuo una vez alcanzado los valores establecidos mayores a 200 mg/dL de glucosa en sangre, durante dos días después presentó valores de normoglucemia; por lo tanto, se excluyó del estudio. El fenómeno observado puede ser explicado debido a que la dosis establecida no tuvo mayor efecto en esta rata, o sea, sin destruir gran cantidad de células β las cuales posteriormente tuvieron la capacidad compensar las necesidades de insulina requeridas por el animal (Goyal *et al.*, 2016).

Liposomas.

Desde hace tiempo, se han explorado las diversas formas potenciales de administración de insulina por vía oral, basadas en métodos novedosos como liposomas, microesferas, nanopartículas, o incluso tiras para disolver en la boca, esto para superar las múltiples inyecciones por vía subcutánea y lograr un mayor bienestar al paciente, sobre todo en la DM dependiente de insulina (Kumar *et al.*, 2018). Los liposomas utilizados, compuestos en diferentes proporciones de fosfatidil colina, colato de sodio, Brij10, BrijL23, PEG1500 y Polaxámero188 tuvieron diversas respuestas respecto a su eficacia en la disminución de glucosa en sangre; los formulados que mejores respuestas hipoglucemiantes que se observaron fueron de los formulados 1 (F1: fosfatidil colina 0.066g, colato de sodio 0.009g, insulina de acción corta Insulex R® 0.714mL) y formulado 5 (F5: fosfatidil colina 0.0662g, colato de sodio 0.009g e insulina de acción corta Insulex R® 0.714mL, PEG1500 0.001g,

polaxámero188 0.0041g); la vía de administración que mejor respuesta tuvo ante el incremento de glucosa en sangre fue la vía subcutánea en comparación con la vía oral. Se observó que en el caso del formulado1 (F1) del grupo experimental 2, tuvo un promedio de concentración de glucosa en sangre de 183.88 mg/dL dado en medias de cuadrados mínimos, y el F5 de 227.62 mg/dL dado en medias de cuadrados mínimos, en el minuto 240 en el caso del F5 con una significancia estadística de $P < 0.05$ una concentración de 128.2 mg/dL, ambos por la vía subcutánea; para la vía oral forzada en el caso del F1 los valores promedio de glucosa en sangre fueron de 374.14 mg/dL dado en medias de cuadrados mínimos, y para el F5 de 415.95 mg/dL dado en medias de cuadrados mínimos. Las propiedades y la versatilidad de los liposomas están dadas por las características de los excipientes utilizados en su manufactura, así un liposoma compuesto por ácidos biliares y recubiertos por algún tipo de polímero mostrará mejor adaptabilidad y resistencia ante los procesos digestivos a los cuales queda expuesto en el ambiente gastro intestinal (Wong et al, 2018). En el caso de F1 , estos no tenían algún componente en su estructura que garantizara su estabilidad, integridad, biodisponibilidad y capacidad de retención que permitiera la difusión de la insulina, lo que posteriormente permitiría su absorción; esto disminuye las posibilidades de considerar en un futuro las formulaciones de los liposomas del F1 como prototipo de liberación modificada de insulina por la vía oral. En el caso del formulado F5 con PEG1500 y polaxámero188, polímeros que pudieron proteger a los liposomas del ambiente hostil del sistema gastro-intestinal dado por las características ácidas del medio, las proteasas y lipasas, tampoco tuvo una mayor eficiencia en la reducción de glucosa en sangre en comparación con los demás formulados, ya que no se encontró significancia estadística. Yazdi *et al.* (2020) formularon liposomas con PEG con un tamaño promedio de 150-210nm y una carga superficial negativa, conjugados con ácido fólico lo cual les dió una capacidad de captación celular mayor, y por tanto, una mayor captación de insulina, y que de acuerdo a los resultados obtenidos demostraron que los liposomas tenían más tiempo de residencia en el estómago y en el intestino. Así pues, una de las razones de la deficiencia de los liposomas para disminuir la concentración de glucosa en sangre

por vía oral con PEG en el presente estudio, fue que además del tamaño de partícula (F1 de 76.6nm, F2 107.2nm, F3 91.3nm, F4 117.5nm, F5 107.6nm, F6 155nm, 101.8nm), pudo haber sido necesario agregar un aditivo importante para la retención y aumento de captación de insulina, como la adición de ácido fólico, que mejorara su absorción a través de la capa epitelial intestinal posiblemente a través de transcitosis mejorando su biodisponibilidad. No se descarta la posibilidad que aunque dadas las características de los excipientes utilizados en este estudio y que se han mencionado con anterioridad, de que los animales requirieran de multidosas en el tiempo de experimentación por esta vía. Una alternativa para tolerar el ambiente ácido y el efecto enzimático es por medio de la adición de una capa ácido resistente y de ácido cítrico para inhibir las proteasas intestinales, así como de inhibidores enzimáticos, potenciadores de absorción, modificación química para la absorción mediada por receptores endógenos y de la adición de polímeros mucoadhesivos (Wong *et al.*, 2016). Yücel *et al.*, (2019) fabricaron liposomas cargados con células madre embrionarias junto con insulina, administrados intrapancreáticamente, demostrando los efectos sobre células diabéticas inducidas con STZ así como en ratones diabéticos, disminuyendo con éxito las concentraciones de glucosa; de esta forma demostrando la versatilidad de los liposomas para poder empaquetar diversidad de moléculas y sustancias y de la efectividad de la conjunción de aditivos para volverse más eficientes. Así pues, una alternativa en la adición de nuevos componentes en los formulados tipo, sería, además de los polímeros, sustancias que faciliten su sobrevivencia en el medio gastro intestinal para poder considerar la vía oral.

Considerando el uso de los liposomas con insulina en los perros con DMT1, aun queda pendiente la posibilidad de poder llevar a cabo su utilidad en esta especie objetivo. Al respecto, Patel *et al.*, (1982) realizaron ensayos administrando liposomas compuestos de fosfatidilcolina, diesteoilfosfatidilcolina o dipalmitoilfosfatidilcolina con colesterol y fosfato de dicetilo (en una proporción de 10:2:1 en peso) a una dosis de insulina de 40-80 U atrapada en los liposomas a perros sanos por vía intraduodenal, en donde observaron aumentos sustanciales de insulina inmunorreactiva en plasma después de 45-60 minutos, pero estos

aumentos no fueron reproducibles ni dependientes de la dosis y no se observó una disminución en la glucosa plasmática, posteriormente, probaron una dosis de 50-100 U de insulina en perros diabéticos, en donde también se observó aumento en los niveles de insulina inmunorreactiva en plasma después de 45-60 minutos, y nuevamente este aumento no tuvo relación con la dosis; sólo en los perros diabéticos hubo una ligera disminución de glucosa plasmática correspondiente con los niveles de insulina inmunorreactiva en plasma, concluyendo que la administración de insulina en liposomas puede permitir la absorción de insulina parcialmente degradada en la circulación pero no está influenciada por la dosis administrada. Es importante recalcar que el presentado estudio corresponde a una fase pre clínica en la utilización de liposomas para uso clínico en perros, queda aun por desarrollar una nueva formulación de liposomas que muestre resultados favorables por vía oral y que puedan ser aplicados en el ensayo clínico con perros.

Administración por vía subcutánea.

Los formulados con mejor eficiencia en la reducción de glucosa en sangre a los 360 minutos administrados por vía subcutánea corresponden al formulado 1 del grupo experimental 2 (F1), y al formulado 5 del grupo experimental 6 (F5); estos conteniendo liposomas con las siguientes características: F1: fosfatidil colina 0.066g, colato de sodio 0.009g, insulina de acción rápida regular (InsulexR®) 0.714mL; F5: fosfatidil colina 0.0662g, colato de sodio 0.009g e insulina de acción corta (InsulexR®) 0.714mL, PEG1500 0.001g, polaxámero188 0.0041g. Sobre las propiedades de los excipientes antes mencionados, el colato de sodio es una sal biliar, biosurfactante, que solubiliza y emulsiona el colesterol y los lípidos; utilizado en los sistemas de administración de medicamentos por lo antes mencionado, aunque su capacidad de solubilización es limitada porque las soluciones diluidas de sales biliares presentan pequeñas micelas con bajo número de agregación debido al impedimento estérico del gran esqueleto esteroidal (Yangxiu *et. al.*, 2016); la fosfatidil colina es un fosfolípido, con propiedades anfipáticas (teniendo afinidad tanto por medios acuosos y polares), con una cola hidrofóbica y una cabeza polar hidrofílica; la primera y más importante ventaja de los sistemas vesiculares basados en fosfolípidos es la compatibilidad de los fosfolípidos con la membrana interna

celular, lo que le da la característica particular de que exista más posibilidades de absorción y sea distribuido en los órganos y tejidos (Verma *et al.*, 2010). La administración subcutánea es la vía más práctica y convencional para la aplicación de insulina de acuerdo con las necesidades de los pacientes con DM, pero también representa riesgo de infecciones locales, hipoglucemia, necrosis de la piel, daño nervioso, lipodistrofia y dolor (Wong *et al.*, 2016). En el presente estudio, los sujetos experimentales no se observaron reacciones adversas durante el periodo de experimentación de siete días post administración por esta vía, permitiendo la aplicación segura sin efectos secundarios en la zona de inyección; a excepción del grupo 8 a los cuales se les administró la insulina comercial InsulexR® de acción corta que llegaron a tener hipoglucemia de hasta 33mg/dL y por lo cual se les ofreció alimento a libre acceso para evitar complicaciones debidas a la disminución severa de glucosa. Al ser administrada una única dosis de formulados por esta vía en el tiempo de experimentación se considera que no representa el constante número de aplicaciones que un paciente puede realizar a lo largo del tiempo que requiera de esta hormona y de la susceptibilidad que adquiere por la misma enfermedad. Stevenson *et al.*, (1982), realizó un ensayo por vía subcutánea en perros diabéticos administrando liposomas fabricados a base de fosfatidil colina y colesterol con dicetilfosfato conteniendo insulina, obteniendo resultados favorecedores en la disminución de glucosa, con una media de disminución de 295.46 mg/dL hasta 52.25 mg/dL a una dosis de 0.75 U/kg, y aun sin regresar a la concentración basal de glucosa después de 24 horas. Cabe responder la pregunta sobre las características de los liposomas fabricados en el presente estudio, siendo nuevas combinaciones de excipientes sí son compatibles para actuar eficazmente ante los niveles altos de glucosa en sangre.

Los niveles de glucosa en sangre con los F1 y F5 por vía subcutánea en su respectivo grupo experimental fueron en promedio 183.88mg/dL dado en medias de cuadrados mínimos, y 227.62 mg/dL dado medias de cuadrados mínimos, respectivamente hasta los 360 minutos, y de 356.67 mg/dL dado en medias de cuadrados mínimos para el F1 desde las 24 y hasta las 76 horas post administración de los formulados, y de 428.5 mg/dL dado en medias de cuadrados mínimos para

el F5, desde las 24 hasta las 56 horas. Arciniegas *et al.*, (2020), alcanzaron concentraciones de hasta 155 mg/dL con liposomas conteniendo Brij L23 hasta por 420 minutos, y aún mostró niveles de glucosa alrededor de 200 mg/dL después de 480 horas. Existe un rango muy amplio entre estos valores de glucosa, y está dado por el porcentaje de encapsulación registrado por Arciniegas *et al.*, ya que menciona haber obtenido un porcentaje mayor al 81%, lo que resulta en una mejor capacidad de acarreamiento (45% en promedio de todos los formulados conteniendo insulina) y de cantidad de difusión de la insulina. Considerando los niveles normales de glucosa en sangre en ratas de 114-143 mg/dL (Campbell, 2012), en el presente estudio ninguno de los dos formulados (F1 y F5) fueron eficaces para llevar a la normoglucemia a los animales en el periodo comprendido de su administración por vía subcutánea.

Administración oral.

Bajo el contexto de la consideración de otras vías, la administración de insulina por vía oral tendría varias ventajas sobre las otras vías de administración parenteral. Por ejemplo, se evitaría el dolor local, la incomodidad, la irritación, las lesiones por pinchazos y el riesgo de infección de la piel por *Staphylococcus aureus* asociada con las inyecciones están ausentes (Finucane, 2003) o de otro patógeno oportunista como *S. pseudointermedius* que ha sido aislado de portadores sanos y perros con problemas de piel y que en recientes trabajos se ha comprobado de problemas de zoonosis, constituyendo un riesgo para la salud humana (Ríos *et. al.*, 2015; Peña *et. al.*, 2022). Ya que la vía oral es considerada una vía poco invasiva para la administración de fármacos, la vuelve ideal para aquellos pacientes en los que la inyección por vía subcutánea les cause estrés psicológico y físico; en el caso de los perros permitiría la administración sin dolor y de los malestares y complicaciones que conlleva la administración de insulina de manera convencional. La administración oral de insulina también mejora los niveles portales del fármaco y reduce la hiperinsulinemia periférica, que se asocia con neuropatía y retinopatía en las otras vías de administración (Khafagy, 2007). En cuanto a lo observado en los formulados administrados por la vía oral forzada, no hubo respuesta eficaz para

disminuir la concentración de glucosa en sangre, siendo el F1 y F3 los que tuvieron mejores resultados ante los elevados niveles de glucosa, en promedio se obtuvieron valores de 374.14 mg/dL dado en medias de cuadrados mínimos para el F1 y para el F3 de 404.08 mg/dL a los 360 minutos; para el periodo de tiempo desde las 24 y hasta las 52 horas de 330.23 mg/dL para el F1 y de 403.05 mg/dL para el F3. Arciniegas *et al.*, (2020) obtuvieron valores por esta vía más eficientes con liposomas conteniendo Brij S10 de hasta 250 mg/dL alrededor de los 360 minutos. Con la referencia del porcentaje de encapsulación que obtuvo, el cual fue mayor al 81% y la adición de un polímero en la estructura de los liposomas, explica la eficiencia en la disminución de los niveles de glucosa en comparación con los obtenidos con los mejores formulados, ya que en estos no se agregó polímero alguno. Considerando los niveles normales de glucosa en sangre en ratas de 114-143 mg/dL (Campbell, 2012), en el presente estudio ninguno de los dos formulados (F1 y F3) llevaron a la normogluemia en los animales en el periodo comprendido del monitoreo de glucosa luego de su administración oral.

Retomando las propiedades de los excipientes utilizados en la fabricación de los liposomas, se esperaría que la eficiencia de estos para la administración de la insulina por la vía oral hubiera tenido mejores resultados en la disminución de glucosa en sangre de los animales con diabetes mellitus tipo 1, por lo que se considera que probablemente se requirieran de aditivos que mejoren su tiempo de estadía en el intestino delgado permitiendo su absorción y posterior liberación de insulina.

Los liposomas conteniendo insulina siguen siendo vehículos con gran potencial para ser considerados administrados por vía oral en el tratamiento de la DM, pero a pesar de sus propiedades de inclusión de diversidad de sustancias y de su facilidad de absorción, tienen que enfrentarse ante las condiciones del medio gastrointestinal, como el pH y enzimas digestivas. Zhang *et al.*, (2013) desarrollaron liposomas con biotina, “liposomas biotinilados”, como nuevos vehículos para mejorar la administración oral de insulina; la biotinilación la lograron mediante la incorporación de fosfolípidos conjugados con biotina en las membranas de los

liposomas, observaron un efecto hipoglucemiante significativo y una absorción mejorada después de tratar ratas diabéticas con liposomas biotinilados con una biodisponibilidad relativa de 12,09 % y 8,23 %, según la medición del efecto farmacológico y el nivel de insulina en sangre, respectivamente; esta biodisponibilidad lograda fue aproximadamente el doble que la de los liposomas convencionales. De lo anterior es de importancia mencionar que los liposomas requieren de excipientes que redirijan su absorción y por tanto aumenten la biodisponibilidad de la insulina.

Mutlu *et al.*, (2020) desarrollaron liposomas mediante la técnica de gelificación iónica utilizando succinato de D- α -tocoferilo polietilenglicol 1000 (en nuestro caso utilizamos polietilenglicol 5000), desoxicolato de sodio por separado y en combinación para aprovechar los liposomas y las nanopartículas y varios mecanismos de mejora de la absorción, los cuales se administraron por vía oral forzada a ratas diabéticas inducidas con STZ, a una dosis de insulina de 100 UI/kg; los resultados obtenidos de todas las formulaciones aplicadas fueron favorables con decrementos considerables de la glucosa sanguínea, comparados con el grupo control y el grupo de insulina oral. Los liposomas utilizados en el presente estudio se utilizaron a menores dosis de insulina en ratas, de 5UI/kg, así como lo realizaron Arciniegas *et al.*(2020), lo que explicaría su baja eficiencia para poder disminuir los niveles de glucosa en las ratas con DM. En el trabajo realizado de Arciniegas *et al.*(2020), todas las formulaciones administradas por vía oral no mostraron una reducción significativa en los niveles de glucosa; sin embargo, la adición de poloxámero 407 parece reducir los niveles de animales diabéticos al 47%.

Bioquímica.

Una característica distintiva clave entre la diabetes tipo 1 y tipo 2 es la presencia de autoanticuerpos contra los autoantígenos de las células β . Más del 90 % de las personas con diagnóstico reciente de diabetes tipo 1 tienen uno o más de los siguientes autoanticuerpos al inicio de la enfermedad: reactivos a la insulina (IAA), ácido glutámico descarboxilasa (GADA), autoantígeno 2 asociado al

insulinoma (IA2A) y transportador de zinc 8 (ZnT8A) (Ziegler *et al.*, 2010). En el caso de la diabetización inducida por la administración de STZ por vía IP, la evaluación de estos analitos hubiera sido innecesario, ya que fue la misma toxina que desencadenó la dependencia de la insulina al destruir las células β del páncreas. Por lo anterior era de interés conocer el potencial daño a la salud que pudieran ocasionar los liposomas, y del daño a órganos clave implicados en el metabolismo de sustancias activas, como el riñón e hígado, midiendo los niveles de AST, ALT, Urea, Creatinina y BUN. Los valores obtenidos al inicio de la experimentación en cada grupo, previo a la inducción de la DM, sirvieron como su propio control, de esta forma reflejando el daño que luego de la administración de los liposomas pudieron haber ocasionado en los sujetos experimentales, así evaluando la seguridad de estos compuestos.

En 2009, Zafar *et al.*, observaron niveles elevados de aspartato aminotransferasa (AST) de 13.7 ± 2.26 IU/L, alanina aminotransferasa (ALT) 21.2 ± 2.15 IU/L en ratas diabéticas inducidas con STZ a dosis de 45 mg/kg por vía IP, la glucosa plasmática sérica también se elevó significativamente (Zafar *et al.*, 2009). Yakhchalian *et al.* (2018), obtuvo valores de AST de 137.167 ± 19.22 IU/L, de ALT de 120.66 ± 11.54 IU/L, en ratas Wistar macho diabetizadas con STZ por vía IP a dosis de 60 mg/k (Yakhchalian *et al.*, 2018). Barriga (2020) obtuvo los siguientes valores promedio con administración de STZ a dosis de 45 mg/kg por vía endovenosa AST: 208.90 U/L, ALT 162.94 U/L, Creatinina 48.85 μ mmol/L, Urea 9.558 mmol/L, BUN 20.714 mmol/L. Los valores obtenidos promedio por todos los grupos experimentales en este estudio al término de la experimentación fueron los siguientes: BUN 9.76 mmol/L, Creatinina 50.76 μ mmol/L, ALT 394 U/L, AST 289.88 U/L, Urea 20.80 mmol/L.

Haciendo una comparación de los valores obtenidos en el estudio con los valores normales de referencia en la especie *R. norvegicus*, es evidente que a excepción de la creatinina, los demás valores sobresalen del rango establecido aunque sin muchas diferencias estadísticamente significativas en varios casos. Los valores mencionados como referencias de los analitos, fueron los promedios de los

sujetos de cada grupo al inicio del periodo experimental, valores particulares de estos animales, no comparables con lo establecido en varias referencias bibliográficas, ya que tuvieron condiciones de alojamiento y de crianza diferentes a cualquier otro bioterio reproductor con cepas de ratas Wistar. De las alteraciones comentadas, estas debidas a los efectos a la salud que provoca una DM1 sin control terapéutico, ya que en ratas con diabetes se ha demostrado un aumento de las actividades de la fosfatasa alcalina, la aspartato transaminasa y la alanina transaminasa y cambios en las actividades de diferentes enzimas del metabolismo de los carbohidratos. (Szkudelski, 2012). La diabetes tiene efectos nocivos significativos en muchos órganos, incluido el hígado. Las complicaciones hepáticas incluyen el desarrollo de enfermedad del hígado graso no alcohólico, esteatohepatitis no alcohólica, carcinoma hepatocelular e insuficiencia hepática (Poretsky, 2017). De los trabajos antes mencionados en los cuales se indujo DM por administración de STZ, se observan aumentos de las enzimas hepáticas, las cuales se encuentran en el citosol de los hepatocitos como es el caso de la ALT, y también en la mitocondria y citosol de los hepatocitos, como es el caso de la AST; entonces, alterada la integridad de las células hepáticas, los niveles de estas enzimas aumentan en el suero sanguíneo, a consecuencia de la DM.

La diabetes es la causa más común de enfermedad renal terminal en el mundo. La nefropatía diabética se debe a mecanismos celulares y subcelulares e implica la inducción de vías de señalización en el riñón que perpetúan la destrucción de los glomérulos, la vasculatura intrarrenal y el intersticio (Harbord, 2017). La urea, creatinina y nitrógeno ureico en sangre, son analitos clave que demuestran el funcionamiento renal; de la misma forma que con las enzimas hepáticas, se ve reflejado el deterioro renal ocasionado por la DM. Los hallazgos bioquímicos del presente estudio, son resultado del daño ocasionado por la DM inducida por la STZ, no podría considerarse que los formulados con liposomas tuvieran algún efecto degenerativo en hígado o riñón, ya que los excipientes utilizados no tienen efectos de toxicidad en el metabolismo renal y/o hepático, dadas sus características de biocompatibilidad en la formulación de sistemas de administración de fármacos (Rowe et. al., 2009). Respecto a la comparación de las observaciones obtenidas de

cada grupo experimental al inicio y al final, se refleja el daño hepático y renal dentro del periodo comprendido desde el diagnóstico de la DM y hasta el momento de la eutanasia, que fue cuando se obtuvo la segunda muestra de sangre por el plexo ocular. El tratamiento de la diabetes mellitus tipo 1 requiere de la administración de insulina exógena para regular los niveles de glucosa en sangre, es por esto que los daños observados también reflejan la intermitencia en la administración de insulina para controlar la enfermedad en los animales de experimentación.

Anatomopatología.

Zafar et al., (2009) encontraron que en el análisis histopatológico del hígado en ratas diabéticas mostró alteraciones, tales como acumulación de gotitas de lípidos, infiltración de células inflamatorias, aumento de contenido fibroso, dilatación de los vasos porta, congestión de estos vasos y proliferación de células epiteliales de los conductos biliares. En los hallazgos *post mortem*, de las ratas del presente estudio, se observó degeneración de los órganos analizados (hígado y riñón), y por hallazgos macroscópicos sobresalientes en una rata, en esta misma los pulmones, pericardio y corazón. Respecto a los hallazgos en el estudio histopatológico de hígado y riñón, están asociados a las complicaciones por DM (Poretsky, 2017; Demir et. al., 2021).

Una de las ratas presentó alteraciones en pericardio, pulmones y corazón, debido a una pericarditis y pleuronemonía, probablemente provocada por algún microorganismo bacteriano, siendo un estado particular de este animal, no se descarta la posibilidad de que haya desarrollado estas alteraciones por un estado de inmunodepresión, sin relación alguna a la DM o a la administración de STZ (Lenzen et. al., 2008)

CONCLUSIÓN

La administración de formulados de liposomas con insulina encapsulada mostró resultados aceptables por la vía subcutánea en comparación con la vía oral forzada, al reducir los niveles de concentración de glucosa en sangre en los modelos experimentales de DMT1 de ratas Wistar inducidos con STZ por vía IP.

El prototipo con mejores resultados por la vía subcutánea hasta los 360 minutos y desde las 24 y hasta las 76 horas es el F1 en comparación con el producto comercial InsulexR®; el F5 destaca por esta vía ya que se observaron niveles estadísticamente significativos inferiores de glucosa en el minuto 240, en comparación con todos los formulados evaluados por vía subcutánea. El F1 destaca de todos los demás formulados porque disminuye la concentración de glucosa con mucha más eficiencia a tiempos cortos y su efecto hipoglucemiante se conserva por debajo del efecto del producto comercial InsulexR®.

Los liposomas utilizados no fueron eficaces para la administración de insulina por la vía oral, ya que se obtuvieron medidas de glucosa superiores a los 300 mg/dL. Por lo anterior, se deben reconsiderar nuevas combinaciones de excipientes en la manufactura de liposomas propuestos para administrar por esta vía. Haciendo mención de los mejores resultados por esta vía, destacan los F1 y F3, pero con reservas para mejorar su capacidad de resistencia en el medio gastrointestinal.

Los liposomas no tuvieron algún efecto de toxicidad en los animales administrados; en la zona de administración por vía subcutánea no se observaron reacciones adversas, ni a la insulina ni a los formulados. Por la vía oral tampoco se presentaron reacciones adversas o daños a la salud asociada a los liposomas. La semiología clínica presentada en los modelos animales corresponde a una DM no controlada.

El F1 es el formulado con mejores respuestas ante los valores hiperglucémicos en ratas diabetizadas con STZ por vía IP, sin alcanzar el rango normal de glucosa de una rata sana.

Respecto al análisis de los analitos considerados en el suero sanguíneo, no hubo significancia estadística, a excepción del F1 del grupo 2 en los niveles de Urea al inicio y al final del experimento.

En los hallazgos histopatológicos, se aprecian alteraciones estructurales de hígado y riñón, sin probable interferencia con la acción de los formulados administrados.

PERSPECTIVAS

El desafío ante la problemática mundial de la DM es el desarrollo de nuevas tecnologías terapéuticas para la administración de insulina, por lo cual queda un largo camino por recorrer respecto al diseño y aplicación de novedosos sistemas de transporte para esta hormona; haciendo énfasis en que la vía oral es la que más investigación requiere, y que conviene más sobre cualquier otra vía de administración; así pues, las nanopartículas y liposomas involucrados en el transporte de fármacos con potencial aplicación clínica siguen siendo tema de interés en el desarrollo de nuevos prototipos de liberación modificada de insulina para el tratamiento de la diabetes.

Análisis *in vitro*.

Los análisis *in-vitro* para la seguridad de los análogos de insulina (ensayo de proliferación, de actividad metabólica y de autofosforilación), quedan como procedimientos por considerarse para este nuevo prototipo de liberación modificada, dado que no es una molécula novedosa de insulina, es importante realizarse, ya que los bioensayos en cultivos celulares proporcionarán evidencia de los efectos biológicos de la molécula de insulina contenida en liposomas, demostrando su eficacia y seguridad pre clínica de los prototipos.

Aplicaciones terapéuticas en perros.

Este trabajo experimental corresponde a la fase preclínica del desarrollo del prototipo de liberación modificada de insulina, siendo el perro la especie objetivo, aún falta por realizar nuevos trabajos con moléculas novedosas, tanto por nueva inclusión de excipientes, como de sustancias que aumenten la sobrevivencia de los liposomas, así como de la capacidad de aumentar el porcentaje de encapsulación de la insulina; una vez obteniendo resultados que demuestren la eficacia y seguridad en los ensayos preclínicos, podría considerarse la evaluación clínica en el perro.

Los liposomas utilizados por la vía oral no fueron eficaces para disminuir los niveles de glucosa en sangre en ratas con DM, y por lo cual se propone la reformulación de los excipientes utilizados en la fabricación de estas moléculas, así como de la adición de sustancias que mejoren las propiedades de adhesión, resistencia y permitan la difusión de la insulina en el sistema gastrointestinal. Por la vía subcutánea, se obtuvieron resultados favorables en solo una aplicación, aun sin llegar a niveles basales de glucosa, pero que en una readministración subsecuente probablemente se hubieran podido alcanzar los valores deseados, de acuerdo con las necesidades de insulina de cada animal enfermo. Aun con haber desarrollado un prototipo de liberación modificada de insulina, este mismo requiere de más pruebas preclínicas para ser considerado en el futuro para un ensayo clínico en perros.

BIBLIOGRAFÍA

- Akbarzadeh A. (2013). Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters*. 2013, 8:102
- Akinlade OM, Owoyele BV, Soladoye AO. (2021). Streptozotocin-induced type 1 and 2 diabetes in rodents: a model for studying diabetic cardiac autonomic neuropathy. *Afri Health Sci*. 2021;21(2). 719-727.
- AVMA (American Veterinary Medical Association) Diabetes in Pets. <https://www.avma.org/resources/pet-owners/petcare/diabetes-pets#:~:text=Diabetes%20in%20dogs%20and%20cats,as%20often%20as%20mal,e%20dogs>.
- Arciniegas S. M. (2018). 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 que para optar por el grado de Doctora en ciencias de la producción y salud animal. FMVZ-UNAM. Ciudad Universitaria, CDMX Agosto de 2018.
- Arciniegas S. M. (2019). Process for Physicochemical Improvement of Ultraflexible Liposomes Loaded with Insulin. *Indian J Pharm Sci* 2019;81(1):110-116.
- Arciniegas S. M. (2019). In Vitro and In Vivo Profiles and Characterization of Insulin Nanocarriers Based in Flexible Liposomes Designed for Oral Administration. *Letters in Drug Design & Discovery*, 2019, 16, 948-960.
- Arciniegas Sara Melisa. (2020). Comparison in the Glucose Response of Flexible Liposomes Loaded with Insulin with the Addition of Different Surfactants in an Experimental Diabetes Model. *Letters in Drug Design & Discovery*, 17, 795-806.
- Atkinson MA, E. G. (2014). Type 1 diabetes. *Lancet*, 2014 Jan 4;383(9911):69-82.
- Bashyal S. *et al.* (2021). Development, Characterization, and Ex Vivo Assessment of Elastic Liposomes for Enhancing the Buccal Delivery of Insulin. *Pharmaceutics* 13, 565. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13040565>
- Benavides, F. J., 2003. CAPÍTULO III Sistemática de los roedores utilizados. En: MANUAL DE GENÉTICA DE ROEDORES DE LABORATORIO Principios básicos y aplicaciones. S.I.: Universidad de Alcalá de Henare-Sociedad española para las ciencias del animal de laboratorio (SECAL)., pp. 95-97.
- Bolli G. *et. al.* (2022). Insulin: evolution of insulin formulations and their application in clinical practice over 100 years. *Acta Diabetol* 59, 1129–1144.
- Borgoño CA, Z. B. (2012). Insulins: past, present, and future. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 41(1):1-24.
- Bowe James E. (2014). METABOLIC PHENOTYPING GUIDELINES: Assessing glucose homeostasis in rodent models. *Journal of Endocrinology*, Volume 222: Issue 3 G13–G25.

- Burge Mark R. (1997). Insulins. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* Volume 26, Issue 3, 575-598.
- Camacho Mendes Tatiane. (2020). Induction of diabetes in Wistar rats: is the streptozotocin model feasible at any age? *Brazilian Journal of Development*, v. 6, n.6,p.40153-40164.
- Campbell, T. W. (2012). *Chemical Chemistry of Mammals: Laboratory Animals and Miscellaneous Species*. En M. A. Thrall, *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry* Second edition (págs. 571-581). John Wiley & Sons Inc.
- Cell Signaling Technology. (2021). *Cell Signaling Technology*. Obtenido de <https://www.cellsignal.com/pathways/insulin-receptor-signaling-pathway>
- Chatzigeorgiou A, H. A. (2009). The use of animal models in the study of diabetes mellitus. *In Vivo*, Mar-Apr;23(2):245-58.
- Cignarelli A, G. V. (2019). Insulin and Insulin Receptors in Adipose Tissue Development. *Int J Mol Sci*, 20(3):759.
- Cignarelli, A., Perrini, S., Nigro, P., Ficarella, R., Barbaro, M., Peschechera, A., . . . al., e. (2016). Long-acting insulin analog detemir displays reduced effects on adipocyte differentiation of human subcutaneous and visceral adipose stem cells. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, 26, 333–344.
- Courteix C. (1993). Streptozocin-induced diabetic rats: behavioural evidence for a 92odelo f chronic pain, *Pain* 53 (1993).
- Demir S, Nawroth PP, Herzig S, Ekim Üstünel B. (2021).Emerging Targets in Type 2 Diabetes and Diabetic Complications. *Adv Sci (Weinh)*.Sep;8(18)
- Donner T. *et. al.* (2019). Insulin – Pharmacology, Therapeutic Regimens, and Principles of Intensive Insulin Therapy. [Updated 2019 Feb 23]. In: Feingold KR, Anawalt B,
- Dornhorst A. (2007). Safety and efficacy of insulin detemir in clinical practice: 14-week follow-up data from type 1 and type 2 diabetes patients in the PREDICTIVE European cohort. *Int J Clin Pract*. Mar;61(3):523-8. doi: 10.1111/j.1742-1241.2007.01316.x. PMID: 17313628.
- Eleazu C. O. (2013). Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans, *J. Diabetes Metab. Disord*. 12 (2013).
- European Medicines Agency (2018). Guideline on clinical investigation of medicinal products in the treatment or prevention of diabetes mellitus. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP).
- Federación Internacional de Diabetes (2019). *ATLAS DE LA DIABETES DE LA FID 9ª EDICIÓN*. Federación Internacional de Diabetes.
- Finucane K.(2003). Insulin injection abscesses caused by *Mycobacterium chelonae*. *Diabetes Care*, 26:2483-1484.

- Giacco F. (2010). Oxidative stress and diabetic complications, *Circ. Res.*107 (2010).
- Gonzalez E. (2000). Pancreatic nitric oxide and oxygen free radicals in the early stages of streptozotocin-induced diabetes mellitus in the rat, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 33 (2000)
- Gonzalez Ramos P. (2011). La rata Wistar como modelo animal experimental, para el adiestramiento laparoscópico de residentes con entrenadores pélvicos. *PROGRESOS DE OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA*, 54(6), pp. 325-329.
- Goyal Sameer N.(2016). Challenges and issues with streptozotocin-induced diabetes. A clinically relevant animal model to understand the diabetes pathogenesis and evaluate therapeutics. *Chemico-Biological Interactions* 244.
- Gregg BE, M. P. (2012). Formation of a human beta-cell population within pancreatic islets is set early in life. *J Clin Endocrinol Metab.*, 97:3197–206.
- Harbord, N. B. (2017). Diabetic Nephropathy. En L. Poretsky, *Principles of Diabetes Mellitus Third Edition*. New York, NY, USA.
- Iannaccone, P. (2009). Rats!. *Disease Models & Mechanisms*, 2(5-6), pp. 206-2010.
- Jacob S. (2018). An Overview on the Insulin Preparations and Devices. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*. Vol 52. Issue 4. Oct-Dec.
- Jarosinski M. *et. al.* (2021). Structural principles of insulin formulation and analog design: A century of innovation. *Molecular Metabolism*. 52 , 101325.
- Jarrin M. *et al.* (2002). Streptozotocin Induced Diabetes in Wistar Rat: Is it a Good Model of Diabetic Retinopathy? . *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 43(13):1334.
- Keenan HA, S. J. (2010). Residual insulin production and pancreatic β -cell turnover after 50 years of diabetes: Joslin Medalist Study. *Diabetes*, 59:2846–53.
- Khafagy ES. (2007). Current challenges in non-invasive insulin delivery systems: a comparative review. *Adv. Drug. Deliv. Rev* 2007; 59: 1521–1546., 59: 1521–1546.
- Laviola L., Perrini S., Cignarelli A. & Giorgino, F. (2006). Insulin signalling in human adipose tissue. *Arch. Physiol. Biochem.*, 112, 82–88.
- Lenzen S. (2008). The mechanisms of alloxan-and streptozotocin-induced diabetes, *Diabetologia* 51.
- Martínez A., Maldonado J., López M. (2011). Métodos diagnósticos de la resistencia a la insulina en la población pediátrica. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* vol.68 no.5 México sep./oct.
- Michael ST, Ganesh RN, Viswanathan P. (2012). Effect of long acting insulin supplementation on diabetic nephropathy in Wistar rats. *Indian J Exp Biol.* Dec;50(12):867-874.
- Mora Eric *et. al.* (2007). Consideraciones clínicas sobre la importancia de la sensibilidad a la insulina, su resistencia y la intolerancia a la glucosa. *VOL. XV N° 2 - Año 2007*.

- Moshref M. (2019). Concise Review: Canine Diabetes Mellitus as a Translational Model for Innovative Regenerative Medicine Approaches. *Stem Cells Transl Med*, May;8(5):450-455.
- Muñoz M. (2014). Degludec, una nueva insulina basal de acción ultra-lenta para el tratamiento de la diabetes tipo 1 y 2: avances en investigación clínica. *UGC Endocrinología y Nutrición*, Hospital Universitario San Cecilio, Granada, España, 153-159.
- Mutlu N. *et al.* (2020). In vitro and in vivo evaluations on nanoparticle and phospholipid hybrid nanoparticles with absorption enhancers for oral insulin delivery. *Pharmaceutical Development and Technology*, DOI: 10.1080/10837450.2020.1849282
- Niessen SJM, Hazuchova K, Powney SL, et al. (2017). The big pet diabetes survey: perceived frequency and triggers for euthanasia. *Vet Sci*.
- Niu M. *et al.* (2014). Enhanced oral absorption of insulin-loaded liposomes containing bile salts: a mechanistic study. *Int J Pharm*, 2;460(1-2):119-30.
- Nuno Henrique F. (2013). *Animal Experiments in Biomedical Research: A Historical*. *Animals*, 3(1), pp. 238-273.
- Patel H. *et al.* (1982). Use of liposomes to aid intestinal absorption of entrapped insulin in normal and diabetic dogs. *Biochimica et Biophysica Acta*, 716, 188-193.
- Peña S. *et al.* (2022). Measurement of the physicochemical, performance, and consumer-information characteristics of commercial nonmedicated shampoo for dogs. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 25 (2) 213-221.
- Poretzky L. (2017). En L. Poretzky, *Principles of Diabetes Mellitus Third Edition* (pág. 1055). New York, NY, USA: Springer International Publishing AG.
- Poretzky L. (2017). *Principles of Diabetes Mellitus third edition*. New York, USA: Springer International Publishing AG.
- Porte D., Sherwin R. S., Baron A., Ellenberg M. & Rifkin H. (2002). *Ellenberg & Rifkin's Diabetes Mellitus: Theory and Practice*. 6th ed. New York: Mc Graw-Hill.
- Richardson T. & Kerr D. (2003). Skin-related complications of insulin therapy: epidemiology and emerging management strategies. *Am J Clin Dermatol*, 4(10):661-7.
- Ríos *et al.* (2015). Antibiotic multi-resistant *Staphylococcus* and its importance in veterinary medicine. *Clin Vet Peq Anim*; 35 (3): 149-161
- Rodríguez G. (2003). Insulinoterapia. *Revista Medica Herediana*, 14(3), pp. 140-144.
- Sahasrabudhe RA. (2017). Insulin Injection Site Adverse Effect in a Type 1 Diabetes Patient: An Unusual Presentation. *J Clin Diagn Res*, Aug;11(8):OD10-OD11.
- Santos R. *et al.* (2022). Female Wistar rats present particular glucose flux when submitted to classic protocols of experimental diabetes. *Biomedical Journal*. ISSN 2319-4170 In Press. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2022.05.004>.

- Schlegel A. (2011). Anionic polymers for decreased toxicity and enhanced in vivo delivery of siRNA complexed with cationic liposomes. *J Control Release*, 152(3):393-401.
- Sen S. (2016). Diabetes Mellitus: General Considerations. Springer, ed. *Diabetes Mellitus in 21st Century*. eBook: Springer Nature, pp. 13-22.
- Sen S. C. (2016). Diabetes Mellitus: General Consideration. En R. C. Saikat Sen, *Diabetes Mellitus in 21st Century* (págs. 13-21). Singapore: Springer.
- Shah RB. (2016). Insulin delivery methods: Past, present and future. *Int J Pharm Investig*, 6(1):1-9.
- Stevenson R. et al. (1982). Prolonged Hypoglycemic Effect in Diabetic Dogs Due to Subcutaneous Administration of Insulin in Liposomes. *Diabetes*, Vol. 31, June.
- Strachan M. W. (2013). Chapter 2 Insulins and Regimens in Current Use. En *Insulin Therapy A Pocket Guide* (págs. 9-15). London: London:Springer.
- Szkudelski T. (2012). Streptozotocin–nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model. *Experimental Biology and Medicine* 2012; 237: 481–490.
- Vallianou NG. (2021). Diabetes mellitus in the era of climate change. *Diabetes & Metabolism*, Jul;47(4):101205.
- Verma Anju, Verma Megha, Singh Anchal. (2020). Chapter 14 – Animal tissue culture principles and applications. Editor(s): Ashish S. Verma, Anchal Singh. *Animal Biotechnology (Second Edition)*, Academic Press, 2020, Pages 269-293.
- Verma P. et. al. (2010). Phosphatidylcholine: a revolution in drug delivery technology. *IJPSR*. Vol. 1, Issue 2.
- Vidal Vademecum Spain. (agosto de 2020). Vidal Vademecum Spain . Obtenido de https://www.vademecum.es/equivalencia-lista-insulex+r+solucion+inyectable+100+u.i.%2Fml-mexico-a10ab01-1141270-mx_1
- Wilson G. (1990). Streptozotocin Interactions With Pancreatic b cells and the Induction of Insulin-dependent Diabetes, the Role of Viruses and the Immune System in Diabetes Mellitus, Springer, 1990.
- Wong CY. (2018). Recent advancements in oral administration of insulin-loaded liposomal drug delivery systems for diabetes mellitus. *Int J Pharm*, 549(1-2):201-217.
- Wong CY. (2016). Oral delivery of insulin for treatment of diabetes: status quo, challenges and opportunities. *J Pharm Pharmacol*, 68(9):1093-108.
- Wong C., Martinez J. & Dass C. (2016). Oral delivery of insulin for treatment of diabetes: Status quo, challenges. *J. Pharm. Pharmacol.*, 68, 1093–1108.
- Yakhchalian Nima et al., (2018). Hematological and Serum Biochemical Analysis of Streptozotocin-Induced Insulin Dependent Diabetes Mellitus in Male Adult Wistar Rats . *bioRxiv*.

- Yazdi JR, Tafaghodi M, Sadri K, Mashreghi M, Nikpoor AR, Nikoofal-Sahlabadi S, Chamani J, Vakili R, Moosavian SA, Jaafari MR. (2020). Folate targeted PEGylated liposomes for the oral delivery of insulin: In vitro and in vivo studies, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (2020)
- Yücel Çigdem *et al.* (2019). Novel Approach to the Treatment of Diabetes: Embryonic Stem Cell and Insulin-Loaded Liposomes and Nanocochleates. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* Vol. 19, 3706–3719.
- Zhang X. *et al.* (2013). Biotinylated liposomes as potential carriers for the oral delivery of insulin. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. Article in press.
- Ziegler AG. (2010). Prediction and pathogenesis in type 1 diabetes. *Immunity*, 32:468-78.

ANEXOS

1. CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA DE LA PRUEBA DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA (PTG) EN RATAS SANAS.

Valores correspondientes, dados en medias de cuadrados mínimos, de las concentraciones de glucosa en sangre de la prueba de tolerancia a la glucosa (PTG) por grupos.

Grupos	Cuadrados medios de concentración de glucosa (mg/dL)	Error estándar
1	118.952381	7.769506
2	125.880952	7.769506
3	134.142857	7.769506
4	115.571429	8.511067
5	123.738095	7.769506

Valores correspondientes, dados en medias de cuadrados mínimos, de las concentraciones de glucosa en sangre en el periodo de tiempo comprendido desde el minuto 0, hasta los 120 minutos de la prueba de tolerancia a la glucosa (PTG) de todos los grupos en general.

Minuto	Cuadrados medios de concentración de glucosa (mg/dL)	Error estándar
0	104.373333	2.641802
15	149.22	2.641802
30	135.273333	2.641802
45	131.946667	2.641802
60	127.813333	2.641802
90	108.673333	2.641802
120	108.3	2.641802

Valores correspondientes, dados en medias de cuadrados mínimos, de las concentraciones de glucosa en sangre en el periodo de tiempo comprendido desde el minuto 0, hasta los 120 minutos de la prueba de tolerancia a la glucosa (PTG) por cada uno de los grupos.

Grupo	Minuto	Cuadrados medios de concentración de glucosa (mg/dL)	Error estándar
1	0	99.666667	5.792535
1	15	138	5.792535
1	30	139.5	5.792535
1	45	124.833333	5.792535
1	60	123.833333	5.792535
1	90	101	5.792535
1	120	105.833333	5.792535
2	0	105	5.792535
2	15	153.333333	5.792535
2	30	135.166667	5.792535
2	45	137.166667	5.792535
2	60	136	5.792535
2	90	108.5	5.792535
2	120	106	5.792535
3	0	110.5	5.792535
3	15	157.5	5.792535
3	30	143.666667	5.792535
3	45	143.166667	5.792535
3	60	142.833333	5.792535
3	90	119.333333	5.792535
3	120	122	5.792535
4	0	97.2	6.345404
4	15	146.6	6.345404
4	30	123.2	6.345404
4	45	126.4	6.345404
4	60	117.4	6.345404
4	90	102.2	6.345404
4	120	96	6.345404
5	0	109.5	5.792535
5	15	150.666667	5.792535
5	30	134.833333	5.792535
5	45	128.166667	5.792535
5	60	119	5.792535
5	90	112.333333	5.792535
5	120	111.666667	5.792535

2. CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA DE LA PRUEBA A LA TOLERANCIA A LA GLUCOSA (PTG) DE RATAS CON DMT1.

Valores correspondientes, dados en medias de cuadrados mínimos, de las concentraciones de glucosa en sangre de la PTG por grupos con DMT1.

Grupo	Cuadrados medios de la concentración de glucosa (mg/dL)
6	457.025
7	448.729167
8	433.291667
9	428.791667

Valores correspondientes, dados en medias de cuadrados mínimos, de las concentraciones de glucosa en sangre de la prueba de tolerancia a la glucosa (PTG) por grupos con diabetes mellitus tipo 1 (DMT1) desde el minuto 0 y hasta los 120 minutos.

Minuto	Cuadrados medios de la concentración de glucosa (mg/dL)	Error estándar
0	395.875	7.998152
15	444.183333	7.998152
30	450.991667	7.998152
45	468.233333	7.998152
60	470.933333	7.998152
90	468.766667	7.998152
120	465.408333	7.998152
240	371.283333	7.998152

Valores correspondientes, dados en medias de cuadrados mínimos, de las concentraciones de glucosa en sangre de la prueba de tolerancia a la glucosa (PTG) por grupos con diabetes mellitus tipo 1 (DMT1) desde el minuto 0 y hasta los 120 minutos por grupo.

Grupo	Minuto	Cuadrados medios de la concentración de glucosa (mg/dL)	Error estándar
6	0	383	15.368751
6	15	447.4	15.368751
6	30	451.8	15.368751
6	45	495.6	15.368751
6	60	494.4	15.368751
6	90	485.4	15.368751
6	120	498.8	15.368751
6	240	399.8	15.368751
7	0	389.333333	14.029686
7	15	438.666667	14.029686
7	30	446	14.029686
7	45	473.833333	14.029686
7	60	485.5	14.029686
7	90	497.333333	14.029686
7	120	505	14.029686
7	240	354.166667	14.029686
8	0	411.833333	14.029686
8	15	445.333333	14.029686
8	30	464.833333	14.029686
8	45	454.833333	14.029686
8	60	446.166667	14.029686
8	90	435	14.029686
8	120	439.166667	14.029686
8	240	369.166667	14.029686
9	0	399.333333	19.840972
9	15	445.333333	19.840972
9	30	441.333333	19.840972
9	45	448.666667	19.840972
9	60	457.666667	19.840972
9	90	457.333333	19.840972
9	120	418.666667	19.840972
9	240	362	19.840972

3. CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA CON ADMINISTRACIÓN DE FORMULADOS POR VÍA SUBCUTÁNEA (SC).

Valores correspondientes, dados en medias de cuadrados mínimos, de las concentraciones de glucosa en sangre con administración de formulados por vía subcutánea en grupos con diabetes mellitus tipo 1 (DMT1), desde el minuto 0 y hasta los 360 minutos.

Grupos	Cuadrados medios de la concentración de glucosa (mg/dL)	Error estándar
2	183.880135	15.783564
3	199	13.990635
4	204.377778	15.325972
5	227.62963	13.990635
6	221.022222	15.325972
7	408.092593	13.990635
8	245.185185	13.990635
9	424.814815	19.785745

Valores correspondientes, dados en medias de cuadrados mínimos, de las concentraciones de glucosa en sangre con administración de formulados por vía subcutánea en grupos con diabetes mellitus tipo 1 (DMT1), desde el minuto 0 y hasta los 360 minutos de todos los grupos considerados.

Minuto	Cuadrados medios de la concentración de glucosa (mg/dL)	Error estándar
0	408.1375	8.53894
15	365.025183	8.687886
30	257.720833	8.53894
45	198.383333	8.53894
60	175.7	8.53894
90	155.908333	8.53894

120	159.766667	8.53894
240	265.5875	8.53894
360	392.023302	8.687886

Valores correspondientes, dados en medias de cuadrados mínimos, de las concentraciones de glucosa en sangre con administración de formulados por vía subcutánea en grupos con diabetes mellitus tipo 1 (DMT1), desde el minuto 0 y hasta los 360 minutos de todos los grupos considerados de manera independiente.

	Minutos	Cuadrados medios de la concentración de glucosa (mg/dL)	Error estándar
2	0	340.4	24.151768
2	15	327.0348	27.340878
2	30	160	24.151768
2	45	75.4	24.151768
2	60	59.2	24.151768
2	90	63.4	24.151768
2	120	54.8	24.151768
2	240	215.2	24.151768
2	360	359.486413	27.340878
3	0	454	22.047447
3	15	195.333333	22.047447
3	30	130.166667	22.047447
3	45	84.666667	22.047447
3	60	72.166667	22.047447
3	90	89.833333	22.047447
3	120	115.833333	22.047447
3	240	251.5	22.047447
3	360	397.5	22.047447
4	0	418	24.151768
4	15	332.8	24.151768
4	30	178.8	24.151768
4	45	113.6	24.151768
4	60	90.8	24.151768
4	90	57.6	24.151768

4	120	61.6	24.151768
4	240	207.8	24.151768
4	360	378.4	24.151768
5	0	435	22.047447
5	15	378.5	22.047447
5	30	224	22.047447
5	45	123.333333	22.047447
5	60	88	22.047447
5	90	60.333333	22.047447
5	120	77.833333	22.047447
5	240	257.333333	22.047447
5	360	404.333333	22.047447
6	0	419.2	24.151768
6	15	415.2	24.151768
6	30	266.8	24.151768
6	45	162.4	24.151768
6	60	102.6	24.151768
6	90	65.6	24.151768
6	120	66.4	24.151768
6	240	128.2	24.151768
6	360	362.8	24.151768
7	0	399.333333	22.047447
7	15	430.166667	22.047447
7	30	388.5	22.047447
7	45	398.666667	22.047447
7	60	405.5	22.047447
7	90	387.833333	22.047447
7	120	412.5	22.047447
7	240	436.166667	22.047447
7	360	414.166667	22.047447
8	0	399.833333	22.047447
8	15	395.833333	22.047447
8	30	272.166667	22.047447
8	45	180.333333	22.047447
8	60	129.666667	22.047447
8	90	65.333333	22.047447
8	120	70.5	22.047447
8	240	266.5	22.047447
8	360	426.5	22.047447
9	0	399.333333	31.179799
9	15	445.333333	31.179799

9	30	441.333333	31.179799
9	45	448.666667	31.179799
9	60	457.666667	31.179799
9	90	457.333333	31.179799
9	120	418.666667	31.179799
9	240	362	31.179799
9	360	393	31.179799

Valores correspondientes, dados en medias de cuadrados mínimos, de las concentraciones de glucosa en sangre con administración de formulados por vía subcutánea en los grupos 2 y 3 con diabetes mellitus tipo 1 (DMT1), desde las 24 y hasta las 76 horas post administración de formulados F1 y F2 respectivamente, sin bolo de dextrosa por vía oral a dosis de 2g/kg.

Grupo	Cuadrados medios de la concentración de glucosa (mg/dL)	Error estándar
2	356.678472	17.893952
3	423.092593	16.085467

Valores correspondientes, dados en medias de cuadrados mínimos, por tiempo de medición de las concentraciones de glucosa en sangre con administración de formulados por vía subcutánea en los grupos 2 y 3 con diabetes mellitus tipo 1 (DMT1), desde las 24 y hasta las 76 horas post administración de formulados, sin bolo de dextrosa por vía oral a dosis de 2g/kg.

Hora	Cuadrados medios de la concentración de glucosa (mg/dL)	Error estándar
24	405.983333	10.607544
26	401.816667	10.607544
28	404.853125	11.392172
48	388.033333	10.607544
50	386.8	10.607544
52	370.866667	10.607544
72	405.266667	10.607544

74	372.983333	10.607544
76	372.366667	10.607544

Valores correspondientes, dados en medias de cuadrados mínimos, por tiempo de medición de las concentraciones de glucosa en sangre con administración de formulados por vía subcutánea en los grupos 2 y 3 con diabetes mellitus tipo 1 (DMT1) de manera independiente, desde las 24 y hasta las 76 horas post administración de formulados, sin bolo de dextrosa por vía oral a dosis de 2g/kg.

Grupo	Hora	Cuadrados medios de la concentración de glucosa (mg/dL)	Error estándar
2	24	377.8	15.668381
2	26	351.8	15.668381
2	28	375.70625	17.735403
2	48	353.4	15.668381
2	50	370.6	15.668381
2	52	345.4	15.668381
2	72	365.2	15.668381
2	74	337.8	15.668381
2	76	332.4	15.668381
3	24	434.166667	14.30321
3	26	451.833333	14.30321
3	28	434	14.30321
3	48	422.666667	14.30321
3	50	403	14.30321
3	52	396.333333	14.30321
3	72	445.333333	14.30321
3	74	408.166667	14.30321
3	76	412.333333	14.30321

Valores correspondientes, dados en medias de cuadrados mínimos, de las concentraciones de glucosa en sangre pos administración de formulados F3, F4, F5, F6 y F7 respectivamente por vía subcutánea en los grupos 4, 5, 6, 7, 8 y 9 con DMT1, desde las 24 y hasta las 52 horas (grupo 9 sin formulado), con bolo de dextrosa por vía oral forzada a dosis de 2g/kg.

Grupo	Cuadrados medios de la concentración de glucosa (mg/dL)	Error estándar
4	417.1	20.843426
5	431.020833	19.027357
6	428.5	20.843426
7	447	19.027357
8	416.520833	19.027357
9	407.916667	26.908747

Valores correspondientes, dados en medias de cuadrados mínimos, de las concentraciones de glucosa en sangre pos administración de formulados F3, F4, F5, F6 y F7 respectivamente por vía subcutánea en los grupos 4, 5, 6, 7, 8 y 9 con DMT1 (grupo 9 sin formulado), por periodo de tiempo (desde las 24 y hasta las 52 horas), con bolo de dextrosa por vía oral forzada a dosis de 2g/kg.

Hora	Cuadrados medios de la concentración de glucosa (mg/dL)	Error estándar
24	406.716667	8.09165
25	484.677778	8.09165
26	413.938889	8.09165
28	357.905556	8.09165
48	446.027778	8.09165
49	490.027778	8.09165
50	423.261111	8.09165
52	374.855556	8.09165

Valores correspondientes, dados en medias de cuadrados mínimos, de las concentraciones de glucosa en sangre pos administración de formulados F3, F4, F5, F6 y F7 respectivamente por vía subcutánea en los grupos 4, 5, 6, 7, 8 y 9 con diabetes mellitus tipo 1 (DMT1) (grupo 9 sin formulado), por periodo de tiempo de manera independiente (desde las 24 y hasta las 52 horas), con bolo de dextrosa por vía oral forzada a dosis de 2g/kg.

Grupo	Hora	Cuadrados medios de la concentración de glucosa (mg/dL)	Error estándar
4	24	406	19.550735
4	25	482.6	19.550735
4	26	379.4	19.550735
4	28	343.2	19.550735
4	48	446.2	19.550735
4	49	493.2	19.550735
4	50	430.4	19.550735
4	52	355.8	19.550735
5	24	392.5	17.847298
5	25	498	17.847298
5	26	432.666667	17.847298
5	28	345.333333	17.847298
5	48	431.166667	17.847298
5	49	490.5	17.847298
5	50	438.5	17.847298
5	52	419.5	17.847298
6	24	376.8	19.550735
6	25	468.8	19.550735
6	26	426.4	19.550735
6	28	358.4	19.550735
6	48	447.8	19.550735
6	49	492.8	19.550735
6	50	460	19.550735
6	52	397	19.550735
7	24	436	17.847298
7	25	494.333333	17.847298
7	26	453	17.847298
7	28	421.666667	17.847298
7	48	433.5	17.847298
7	49	515.666667	17.847298
7	50	433.666667	17.847298
7	52	388.166667	17.847298
8	24	435	17.847298
8	25	466.666667	17.847298
8	26	391.833333	17.847298
8	28	345.166667	17.847298
8	48	456.5	17.847298

8	49	480.333333	17.847298
8	50	400.666667	17.847298
8	52	356	17.847298
9	24	394	25.239891
9	25	497.666667	25.239891
9	26	400.333333	25.239891
9	28	333.666667	25.239891
9	48	461	25.239891
9	49	467.666667	25.239891
9	50	376.333333	25.239891
9	52	332.666667	25.239891

4. CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA CON ADMINISTRACIÓN DE FORMULADOS POR VÍA ORAL FORZADA.

Valores de glucosa en sangre de los grupos con diabetes mellitus tipo 1 (DMT1) luego de la administración de los formulados correspondientes a cada uno de los grupos, con 4 horas de ayuno de sólidos, por vía oral forzada.

Grupo	Cuadrados medios de la concentración de glucosa (mg/dL)	Error estándar
2	374.147764	20.428864
3	423.592593	16.883065
4	404.088889	18.494471
5	417.296296	16.883065
6	415.955556	18.494471
7	412.888889	16.883065
8	412.777778	16.883065
9	451.703704	23.876259

Minuto	Cuadrados medios de la concentración de glucosa (mg/dL)	Error estándar
0	429.35	6.097155
15	438.3125	6.097155
30	436.85	6.097155
45	426.05797	6.21069

60	420.50172	6.21069
90	400.903803	6.21069
120	393.4	6.097155
240	370.353803	6.21069
360	410.778105	6.204069

Valores de glucosa en sangre de los grupos con diabetes mellitus tipo 1 (DMT1) luego de la administración de los formulados correspondientes a cada uno de los grupos, con 4 horas de ayuno de sólidos, por vía oral forzada por periodo de tiempo desde el minuto 0 hasta los 360 minutos.

Valores de glucosa en sangre de los grupos con diabetes mellitus tipo 1 (DMT1) luego de la administración de los formulados correspondientes a cada uno de los grupos de manera independiente, con 4 horas de ayuno de sólidos, por vía oral forzada por periodo de tiempo desde el minuto 0 hasta los 360 minutos.

Grupo	Minuto	Cuadrados medios de la concentración de glucosa (mg/dL)	Error estándar
2	0	372.6	17.24536
2	15	389	17.24536
2	30	399.6	17.24536
2	45	403.463758	19.668085
2	60	367.213758	19.668085
2	90	358.463758	19.668085
2	120	377.6	17.24536
2	240	342.463758	19.668085
2	360	356.924843	19.533892
3	0	415.833333	15.742787
3	15	437.833333	15.742787
3	30	433.166667	15.742787
3	45	436.5	15.742787
3	60	440.833333	15.742787
3	90	412.166667	15.742787
3	120	444.166667	15.742787
3	240	382.833333	15.742787
3	360	409	15.742787
4	0	461.8	17.24536
4	15	415.8	17.24536
4	30	422	17.24536
4	45	413	17.24536

4	60	402.2	17.24536
4	90	401.4	17.24536
4	120	389.2	17.24536
4	240	332	17.24536
4	360	399.4	17.24536
5	0	442	15.742787
5	15	429.166667	15.742787
5	30	409	15.742787
5	45	442.166667	15.742787
5	60	418.166667	15.742787
5	90	406.833333	15.742787
5	120	392.666667	15.742787
5	240	371.833333	15.742787
5	360	443.833333	15.742787
6	0	446.4	17.24536
6	15	454.2	17.24536
6	30	439.2	17.24536
6	45	404	17.24536
6	60	412.6	17.24536
6	90	398.2	17.24536
6	120	403.4	17.24536
6	240	383.2	17.24536
6	360	402.4	17.24536
7	0	454.166667	15.742787
7	15	424.666667	15.742787
7	30	430.5	15.742787
7	45	413.166667	15.742787
7	60	398.333333	15.742787
7	90	386.666667	15.742787
7	120	378	15.742787
7	240	397	15.742787
7	360	433.5	15.742787
8	0	434.333333	15.742787
8	15	495.5	15.742787
8	30	455	15.742787
8	45	396.5	15.742787
8	60	419.333333	15.742787
8	90	384.833333	15.742787
8	120	373.166667	15.742787
8	240	348.833333	15.742787
8	360	407.5	15.742787
9	0	407.666667	22.263663

9	15	460.333333	22.263663
9	30	506.333333	22.263663
9	45	499.666667	22.263663
9	60	505.333333	22.263663
9	90	458.666667	22.263663
9	120	389	22.263663
9	240	404.666667	22.263663
9	360	433.666667	22.263663

Valores correspondientes a las concentraciones de glucosa en sangre de los grupos 2 y 3 con administración de formulados 1 y 2 respectivamente, sin administración de bolo de dextrosa por vía oral forzada a dosis de 2g/kg, con previo ayuno de 4 horas de sólidos, desde las 24 y hasta las 52 horas.

Grupo	Cuadrados medios de la concentración de glucosa (mg/dL)	Error estándar
2	330.233333	19.133829
3	340.018333	18.812229

Valores correspondientes a las concentraciones de glucosa en sangre de los grupos 2 y 3 con administración de formulados 1 y 2 respectivamente, sin administración de bolo de dextrosa por vía oral forzada a dosis de 2g/kg, con previo ayuno de 4 horas de sólidos, desde las 24 y hasta las 52 horas de manera general.

Hora	Cuadrados medios de la concentración de glucosa (mg/dL)	Error estándar
24	361.083333	15.521392
26	348.833333	15.521392
28	365.05	15.521392
48	321.633333	15.521392
50	308.875	16.379565
52	305.28	17.541732

Valores correspondientes a las concentraciones de glucosa en sangre de los grupos 2 y 3 con administración de formulados 1 y 2 respectivamente, sin administración de bolo de dextrosa por vía oral forzada a dosis de 2g/kg, con previo ayuno de 4 horas de sólidos, desde las 24 y hasta las 52 horas de manera independiente.

Grupo	Hora	Cuadrados medios de la concentración de glucosa (mg/dL)	Error estándar
2	24	357	22.926615
2	26	336	22.926615
2	28	391.6	22.926615
2	48	326.6	22.926615
2	50	295.2	22.926615
2	52	275	22.926615
3	24	365.166667	20.92904
3	26	361.666667	20.92904
3	28	338.5	20.92904
3	48	316.666667	20.92904
3	50	322.55	23.399378
3	52	335.56	26.555975

Valores correspondientes a las concentraciones de glucosa en sangre de los grupos 4, 5, 6, 7, 8 y 9 (grupo 9 sin formulado) con su respectiva administración de formulados (F3, F4, F5, F6, F7), con administración de bolo de dextrosa por vía oral forzada a dosis de 2g/kg, con previo ayuno de 4 horas de sólidos, desde las 24 y hasta las 52 horas.

Grupo	Cuadrados medios de la concentración de glucosa (mg/dL)	Error estándar
4	403.05	20.798327
5	424.583333	19.255509
6	418.675	20.798327
7	407.354167	18.986188
8	410.145833	18.986188
9	396.375	26.850524

Valores correspondientes a las concentraciones de glucosa en sangre de los grupos 4, 5, 6, 7, 8 y 9 (grupo 9 sin formulado) con su respectiva administración de formulados (F3, F4, F5, F6, F7), con administración de bolo de dextrosa por vía oral forzada a dosis de 2g/kg, con previo ayuno de 4 horas de sólidos, por periodo de tiempo de manera general, desde las 24 y hasta las 52 horas.

Hora	Cuadrados medios de la concentración de glucosa (mg/dL)	Error estándar
24	421.977778	8.031998
25	471.727778	8.031998
26	425.333333	8.031998
28	358.055556	8.155101
48	383.15	8.031998
49	439.8	8.031998
50	415.394444	8.031998
52	364.805556	8.031998

Valores correspondientes a las concentraciones de glucosa en sangre de los grupos 4, 5, 6, 7, 8 y 9 (grupo 9 sin formulado) con su respectiva administración de formulados (F3, F4, F5, F6, F7), con administración de bolo de dextrosa por vía oral forzada a dosis de 2g/kg, con previo ayuno de 4 horas de sólidos, por periodo de tiempo de manera independiente, desde las 24 y hasta las 52 horas.

Grupo	Hora	Cuadrados medios de la concentración de glucosa (mg/dL)	Error estándar
4	24	402.8	19.406607
4	25	442.4	19.406607
4	26	399	19.406607
4	28	339.2	19.406607
4	48	380	19.406607
4	49	456.6	19.406607
4	50	429.8	19.406607
4	52	374.6	19.406607
5	24	444	17.715728
5	25	464	17.715728
5	26	417.5	17.715728
5	28	390.333333	19.636279
5	48	409.5	17.715728
5	49	464.833333	17.715728

5	50	442.333333	17.715728
5	52	364.166667	17.715728
6	24	467.4	19.406607
6	25	499.8	19.406607
6	26	437	19.406607
6	28	380.8	19.406607
6	48	382.4	19.406607
6	49	411.2	19.406607
6	50	396.4	19.406607
6	52	374.4	19.406607
7	24	444.333333	17.715728
7	25	451.833333	17.715728
7	26	419.666667	17.715728
7	28	364.833333	17.715728
7	48	413.333333	17.715728
7	49	424.666667	17.715728
7	50	388	17.715728
7	52	352.166667	17.715728
8	24	396.666667	17.715728
8	25	475.666667	17.715728
8	26	457.166667	17.715728
8	28	371.166667	17.715728
8	48	355.333333	17.715728
8	49	420.166667	17.715728
8	50	435.166667	17.715728
8	52	369.833333	17.715728
9	24	376.666667	25.053822
9	25	496.666667	25.053822
9	26	421.666667	25.053822
9	28	302	25.053822
9	48	358.333333	25.053822
9	49	461.333333	25.053822
9	50	400.666667	25.053822
9	52	353.666667	25.053822

5. BIOQUÍMICA: AST, ALT, UREA, CREATININA, BUN.

Valores correspondientes a los valores de nitrógeno ureico en sangre (BUN) de los grupos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, y 8 al inicio y al término del periodo experimental, con previo ayuno de 4 horas de sólidos. Datos en medias de cuadrados mínimos.

Inicio

Grupo	BUN mmol/L	Error estándar
2	7.9333333	0.7680629
3	7.3	0.7680629
4	7.8	0.7680629
5	9.1333333	0.7680629
6	7.6	0.7680629
7	7.9666667	0.7680629
8	7.8333333	0.7680629

Final.

Grupo	BUN mmol/L	Error estándar
2	13.8333333	0.7680629
3	9.9	0.7680629
4	9.2666667	0.7680629
5	9.8	0.7680629
6	8.1333333	0.7680629
7	9.0333333	0.7680629
8	8.4	0.7680629

Valores correspondientes a los valores de Creatinina de los grupos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, y 8 al inicio y al término del periodo experimental, con previo ayuno de 4 horas de sólidos. Datos en medias de cuadrados mínimos.

Inicio.

Grupo	Creatinina μ mmol/L	Error estándar
2	46.6666667	2.3754699
3	41.3333333	2.3754699
4	43	2.3754699
5	41.6666667	2.3754699
6	46	2.3754699
7	40.6666667	2.3754699
8	42.6666667	2.3754699

Fin.

Grupo	Creatinina $\mu\text{mol/L}$	Error estándar
2	56	2.3754699
3	46.6666667	2.3754699
4	47.3333333	2.3754699
5	51.6666667	2.3754699
6	56.3333333	2.3754699
7	51.3333333	2.3754699
8	46	2.3754699

Valores correspondientes a los valores de alanina aminotransferasa (ALT) de los grupos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, y 8 al inicio y al término del periodo experimental, con previo ayuno de 4 horas de sólidos. Datos en medias de cuadrados mínimos.

Inicio.

Grupo	ALT U/L	Error estándar
2	106.666667	122.022539
3	101.333333	122.022539
4	111.666667	122.022539
5	116.333333	122.022539
6	114	122.022539
7	95.666667	122.022539
8	112	122.022539

Fin.

Grupo	ALT U/L	Error estándar
2	765	122.022539
3	302	122.022539
4	266.666667	122.022539
5	480.333333	122.022539
6	266	122.022539
7	355.666667	122.022539
8	322.333333	122.022539

Valores correspondientes a los valores de aspartato aminotransferasa (AST) de los grupos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, y 8 al inicio y al término del periodo experimental, con previo ayuno de 4 horas de sólidos. Datos en medias de cuadrados mínimos.

Inicio.

Grupo	AST U/L	Error estándar
2	122.333333	85.116354
3	136	85.116354
4	132	85.116354
5	133.333333	85.116354
6	173.666667	85.116354
7	116	85.116354
8	123.666667	85.116354

Fin.

TRT	AST U/L	Error estándar
2	230.666667	85.116354
3	246	85.116354
4	313.333333	85.116354
5	288.333333	85.116354
6	204.333333	85.116354
7	420.333333	85.116354
8	324.666667	85.116354

Valores correspondientes a los valores de Urea de los grupos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, y 8 al inicio y al término del periodo experimental, con previo ayuno de 4 horas de sólidos. Datos en medias de cuadrados mínimos.

Inicio.

Grupo	Urea mmol/L	Error estándar
2	17	1.5836466
3	15.3333333	1.5836466
4	16.6666667	1.5836466
5	19.3333333	1.5836466
6	16	1.5836466
7	17.3333333	1.5836466
8	16.6666667	1.5836466

Fin.

Grupo	Urea mmol/L	Error estándar
2	29.3333333	1.5836466
3	21	1.5836466
4	20	1.5836466
5	21	1.5836466
6	17.3333333	1.5836466
7	19	1.5836466
8	18	1.5836466

6. Registro de peso corporal

Registro de los pesos desde el día 1 al día 20, a intervalos de cada 5 días, desde antes de la diabetización y hasta el término de las mediciones de glucosa en sangre luego de la administración de los formulados por vía subcutánea y vía oral forzada. Datos en medias de cuadrados mínimos.

Gupo	Días	Peso (g)	Error estándar
1	1	292.666667	6.336646
1	5	302.4845	6.336646
1	10	314.049	6.336646
1	15	325.6135	6.336646
1	20	337.178	6.336646
2	1	289.666667	6.336646
2	5	303.833333	6.336646
2	10	280.666667	6.336646

2	15	270.666667	6.336646
2	20	293.599925	6.336646
3	1	284.5	6.336646
3	5	292.288167	6.336646
3	10	278.833333	6.336646
3	15	282	6.336646
3	20	265.912667	6.336646
4	1	323.8	6.941448
4	5	310.6	6.941448
4	10	316.4	6.941448
4	15	301.2687	6.941448
4	20	292.8876	6.941448
5	1	322.666667	6.336646
5	5	306.333333	6.336646
5	10	313.5	6.336646
5	15	300.773583	6.336646
5	20	293.655333	6.336646
6	1	343.6	6.941448
6	5	319.4	6.941448
6	10	305.8	6.941448
6	15	293.6315	6.941448
6	20	279.378	6.941448
7	1	343.833333	6.336646
7	5	319	6.336646
7	10	306.666667	6.336646
7	15	294.7385	6.336646
7	20	281.799667	6.336646
8	1	352.5	6.336646
8	5	356.530917	6.336646
8	10	352.8835	6.336646
8	15	352.333333	6.336646
8	20	337.5	6.336646
9	1	364.2	8.961371
9	5	329	8.961371
9	10	327.333333	8.961371
9	15	302.636167	8.961371
9	20	285.639333	8.961371