UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

"Estudio farmacocinético de la insulina de rápida acción por vía intraarticular en caballos clínica y radiográficamente sanos"

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

Fernando García Lacy

Tutor principal:

Dra. Lilia Gutiérrez Olvera

Departamento de Fisiología y Farmacología, FMVZ-UNAM

Comité tutoral:

Dr. Héctor Salvador Sumano López

Departamento de Fisiología y Farmacología, FMVZ-UNAM

Dra. Lisa Ann Fortier

Programa de Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal

México, D.F. **Septiembre, 2014**

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

El presente trabajo fue realizado en las instalaciones del Departamento de Medicina, Cirugía y Zootecnia, en el Laboratorio de Investigación del Departamento de Fisiología y Farmacología y en el Laboratorio Clínico del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (FMVZ-UNAM).

Se contó con el apoyo del MVZ. Alejandro Rodríguez Monterde, MVZ. Mariano Hernández Gil, MVZ. Luis Enrique García Ortuño, MVZ. Lilia Gutiérrez Olvera, MVZ. Héctor Salvador Sumano López y Lisa A. Fortier, DVM.

Fue financiado por recursos propios.

Alumno becario de CONACyT, desde Agosto del 2011, hasta Julio del 2013, con número de registro 425082.

Dedicatoria

Obviamente este trabajo es para ti Mom, porque jamás podría haber llegado hasta donde estoy, hasta este logro más en mi vida de no ser por ti, no tengo palabras para agradecerte todo lo que nos has apoyado y enseñado, desde que era chiquito siempre me diste a mí la razón porque creías en mí, no en la gente que te decía que era una mala influencia o lo que sea. El chiste es que siempre te admiraré por como te sacrificaste por nosotros, primero para ser mamá y estar con nosotros todo el tiempo y luego para sacarnos adelante y fuera del hoyo en el que estábamos. Todo lo que logre en la vida será gracias a ti. ¡Yo siempre digo que eres la mejor Mom del planeta!

A Bubi también porque siempre cuento contigo para lo que sea, tanto para mi apariencia como para cosas personales y hasta profesionales. Siempre has cuidado de mí desde que éramos chiquitos y sé que no importa la edad que tengamos siempre lo seguirás haciendo. Siempre hemos estado juntos y aunque no vivamos ya juntos sé que siempre estaremos igual de unidos que siempre.

A todos los caballos que se vean de alguna forma beneficiados por este trabajo, todo lo que hago, toda mi vida gira en torno a ustedes, no sé qué efecto tienen en mí, pero gracias por todo lo que me han enseñado y sepan que estaré ahí siempre que pueda para ayudarlos.

Agradecimientos

A Mom por haberme ayudado tanto en la escritura de esta tesis, en la redacción, en la traducción, dudas, etc. Muchas gracias por todo tu apoyo en esto y en todos los aspectos de mi vida, ya lo dije y lo reitero, jamás habría llegado hasta aquí de no ser por ti. Te quiero y admiro muchísimo.

A Bubi por también haberme apoyado en esto y en todo, porque siempre me presumes y me apoyas. Gracias por confiar en mí y confiarme tus caballos (sé que eso no es fácil), pero sobre todo gracias por todo tu cariño de carnala.

A Abue por haberme apoyado en todo y estar orgullosa de mí y de todos mis logros por pequeños que éstos sean, muchas gracias por todos tus consejos, me encanta que puedo contarte lo que sea y siempre sabes qué decir (y no porque digas lo que quiero oír) para hacerme sentir bien, gracias por consentirnos tanto incluso a esta edad (ya soy viejo). Espero pronto poder ser alguien que cuide de ti como lo hace Jaime (me refiero a económicamente), quisiera volver a ese tiempo en el que estar en Teziu contigo y con Bubi era todo para mi. Te quiero mucho Abue, muchas gracias por todo tu amor.

A mi corazón de melón, mi elemento favorito, mi L-cita chula, no sé cómo podría agradecerte todo lo que hiciste por mi, tú sí que me ayudaste en este trabajo, desde que me ayudabas a muestrear, agarrando esos caballos locos que te daban alergia, hasta por prestarme tu compu para poder terminar de escribir esto. Gracias también por esas noches que me acompañaste a mover caballos, esas desveladas en las que me hacías un lunchecito para que comiera y por muchas otras cosas, eres una gran mujer y una gran parte muy importante en mi vida, este logro es para ti también, sé que este es el primero de muchos que compartiremos, porque me encanta pensar que nos falta mucho por vivir juntos, ¡¡TE ADORO!!

A toda toda mi familia en general, muchas gracias por apoyarme en todo, ¡los quiero mucho! En especial a Pili y Ra, Jaime y Orlando, Ana y Nena, pero súper especialmente a Gordis porque me ayudaste muchísimo con la estadística e incluso hasta con mis tutorales. Eres un buen puerquito.

A todos mis mejores amigos, mis hermanazos, dicen que los verdaderos amigos se cuentan sólo con los dedos de una mano, pero con ustedes necesito más dedos, porque me han enseñado que de verdad cuando tienes amigos así, no necesitas más. O sea Wiki, LFR, Ivis (aunque tu nombre sea IVÁN), Estopas, Pepis, Gordo (otra vez), Tony (¡socio!) y Chaque (mijoooooo), los quiero amigos.

Al Expert por confiar en mi y por “arriesgarse” a que me encargue de sus caballos, gracias de verdad por esa gran oportunidad que me diste hace más de dos años, te has convertido en un muy buen amigo, y yo opino que ya tenemos que irnos a dar otro roll a Europa a 265 km/h, jajaja.

Agradezco en especial al Magical and crazy bastard, porque me ayudaste muchísimo con lo de la formateada y acomodar fotos y eso. También a wiki porque desde el principio me ayudaste a medir la superficie articular, también aunque no se pudo bien, me ayudaste a arreglar lo del estúpido Office que chafeó.

A mi tutor, mentor, colega, asesor, consejero, etc., pero sobre todo gran amigo, el Dr. Rodríguez Monterde (el médico), muchas gracias por presionarme cuando me hacía wey, gracias por todos tus consejos, tanto personales como profesionales, gracias por ser un modelo a seguir y por enseñarme tantas cosas, siempre sé que puedo acudir a ti para lo que sea y que me vas a aconsejar adecuadamente. No podría pensar en nadie más para apoyarme en algún problema, muchísimas gracias por todo, y ni creas que ya acabamos, ¡falta el doctorado!

A todo el personal del DMCZE, por las facilidades otorgadas, pero en especial a Mariano Hernández Gil, porque siempre fuiste primero un amigo antes que cualquier cosa, gracias por todo tu apoyo.

Al personal del Laboratorio de Investigación de farma por ayudarme con la cromatografía, en especial a Lilia y al Dr. Sumano, por echarme la mano para terminar esto rápido.

También al personal del Laboratorio de diagnóstico en Patología, en especial al Dr. Luis Enrique García Ortuño y también súper especialmente a Chabela (¡morra!) por ayudarme tanto con el análisis del líquido sinovial, muchísimas gracias de verdad.

A la Dra. Lisa Fortier por su paciencia y porque todos sus consejos ayudaron para darle más peso a este trabajo.

A los hermosos y fabulosos corceles (Paris, Bruno, Tabaco, Boxito, Karola, Punk y Angustias) que fueron parte de este trabajo, aunque algunos ya no estén, agradezco muchísimo por lo que me enseñaron y por lo que me hicieron lograr, siempre serán muy especiales para mí.

Resumen

El caballo tiene aproximadamente 6 mil años de haberse domesticado; y ha sido utilizado por el hombre para diversas actividades deportivas, de las cuales se derivan las diferentes funciones zootécnicas que conocemos actualmente. Sin embargo, estas funciones convierten al caballo en un atleta expuesto a diversas cargas en tejidos blandos y óseos que pueden conllevar a patologías diversas, por lo cual, la medicina deportiva en equinos combina varios regímenes terapéuticos, es decir, combina diversos medicamentos para conservar su salud deportiva. La insulina se ha utilizado de manera empírica por vía intraarticular en caballos como adyuvante para el tratamiento de procesos osteoartríticos, sin que realmente se conozcan sus efectos tanto a nivel local (articular) como sistémico (glucosa sanguínea), su farmacocinética y por consiguiente su dosis terapéutica. Existe evidencia científica de que *in vitro,* a concentraciones menores a 50 ng/ml en cultivo celular, la insulina induce mitosis en condrocitos y producción de colágeno tipo II. En este estudio, se extrapoló la dosis con base en la superficie de cartílago articular desde la superficie del cultivo celular y se determinó si se presentan o no, signos de claudicación o inflamación posterior al tratamiento, cambios significativos en la composición del líquido sinovial o en el nivel de glucosa tanto sanguínea como sinovial, se midió la concentración de insulina por medio de cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) en líquido sinovial para evaluar su área bajo la curva, vida media de eliminación, tiempo de concentración máxima y el tiempo de residencia. Se utilizaron 6 caballos de raza criolla, a quienes se les realizaron estudios previos para descartar tanto resistencia a la insulina como estudios clínicos y radiográficos para cualquier patología que involucrara la articulación radio-carpal. Se utilizaron dosis de 10, 15 y 20 UI de insulina, obteniéndose que existen diferencias significativas en los niveles sanguíneos de glucosa después de la inyección de insulina para las 3 dosis utilizadas ($P<0.001$), no se encontró diferencia significativa en los niveles de proteína sinovial y conteo celular sinovial entre las articulaciones tratadas y control (SSF) ($P>0.05$), tampoco en las concentraciones de glucosa sinovial al ser comparadas las articulaciones tratadas y las control ($P>0.05$). La CLAR reveló que los parámetros farmacocinéticos ya citados dependen de la dosis utilizada, sin embargo, no se encontró diferencia significativa entre éstas ($P=0.9851$). La insulina utilizada en este estudio probó ser inocua para su uso intraarticular en caballos, sin embargo, dado que la mayor disminución de glucosa se dio a la hora de haberse inyectado la insulina, se recomienda monitorear al caballo durante poco más de una hora y utilizar una dosis no mayor a 20 UI totales para un caballo de aproximadamente 350-400 kg. Cabe destacar que aún no hay estudios de farmacocinética de este medicamento utilizado en articulaciones en medicina humana o en medicina veterinaria, por lo que este es el primer estudio *in vivo* que se realiza hasta la fecha.

Palabras clave: *Insulina, intraarticular, caballo, CLAR, dosis.*

Abstract

The horse has approximately 6,000 years of being domesticated, also it has been used by man kind for several athletic activities, from which we have the different equine sports today. However, this activities make the horse an athlete, which makes it more prone to excessive loads to the bones and soft tissues, and therefore injuries, and because of that, equine sports medicine has been developing several combinations of treatments for those conditions in order to maintain their health for sports. Insulin has been used empirically for intraarticular injection without really knowing both its local (joint) and systemic effects and therefore, its dose. There´s scientific evidence that insulin produces mitosis in equine chondrocites *in vitro* with concentrations lower than 50 ng/ml, also it enhances type II colagen production. In this study, we managed to adapt the dosage used in cell cultures to the actual joint, by measuring the articular surface from a specimen, also we determined if there were changes in sinovial fluid composition, blood and synovial glucose levels, insulin concentration in synovial fluid by high performance liquid chromatography (HPLC) to know its area under the curve, half life, time of maximum concentration and residence time. Previous clinical studies were performed which include insulin resistance and radiology evolving the radio-carpal joint to all 6 mixed breed horses that were used in this study; three different doses were used: 10, 15 and 20 IU of insulin, obtaining significant changes through time in blood glucose levels for the 3 doses (*P<0.0001*); no significant difference was found between synovial fluid protein and cell count in both treated and control (SSF) joints (*P>0.05*); also, no significant difference was found regarding synovial glucose levels between treated and control joints (*P>0.05*). HPLC revealed that the pharmacokinetic parameters are dose dependant, however, there was no significant difference when compared with the three different doses (*P=0.9851*). Insulin used in this study proved to be inocuous to the equine joint, however, since the lowest blood glucose level was seen one hour post injection, it is recommended to monitor the horses' signs for about one hour and use no more than 20 IU for a 350-400 kg horse. To this day, there are not studies of insulin used intraarticularly in human or veterinary medicine, thus this is the first *in vivo* study.

Key words: *Insulin, intraarticular, horse, HPLC, dose.*

Índice

	Página
1. Introducción.	1
1.1 Anatomía funcional de estructuras sinoviales.	2
1.2 Cápsula articular y sinovial.	3
1.3 Circulación sinovial.	5
1.4 Presión intra-articular (PIA).	7
1.5 Cartílago Articular.	9
1.6 Dolor articular.	13
1.7 Líquido sinovial.	14
2. Insulina.	16
2.1 Generalidades.	16
2.2 Diferencias moleculares entre insulina humana y de caballo.	16
2.3 Funciones generales.	17
2.4 Desórdenes relacionados a desbalances de insulina.	18
2.5 Uso farmacéutico.	18
2.6 Diferencias en estructura secundaria.	20
2.7 Vía metabólica de la insulina de caballo.	22
3. Justificación.	26
4. Objetivos.	27
5. Hipótesis.	27
6. Material y métodos.	28
6.1 Medición de la superficie articular de la articulación radio carpal.	30

6.2 Cronograma. 34

6.3 Técnica de artrocentesis. 36

6.4 Actividad física. 37

6.5 Procesamiento de las muestras. 37

6.6 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) para medición de insulina y datos farmacocinéticos. 39

7. Resultados. 40

7.1 Evaluaciones previas a la inyección de insulina. 40

7.2 Examen oral de glucosa. 40

7.3 Examen clínico. 42

7.4 Estudio radiográfico. 42

7.5 Radiografías. 43

7.6 Evaluación clínica posterior a la inyección. 49

7.7 Análisis físicoquímico. 49

7.8 Glucosa sanguínea. 57

7.9 Glucosa sinovial. 61

7.10 Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR). 63

8. Discusión. 70

8.1 Examen clínico previo. 70

8.2 Examen de aparato locomotor (clínico y radiográfico). 71

8.3 Examen clínico posterior al tratamiento. 71

8.4 Análisis fisicoquímico de líquido sinovial. 72

8.5 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) y análisis de datos farmacocinéticos. 75

9. Conclusiones. 77

10. Bibliografía. 79

11. Anexo I.

Gráficas Glucosa sanguínea por grupo por dosis utilizada. 85

12. Anexo II.

Gráficas de glucosa por dosis utilizada en los 6 caballos. 90

13. Anexo III.

Niveles de glucosa sinovial en los 3 grupos con dosis de 15 y 20 UI. 92

Listado de cuadros

Página

1. Cuadro 1.

Rotación del modelo cruzado de los 3 grupos en los 3 diferentes periodos. 47

2. Cuadro 2.

Comparativo de características físicas y sus y sus promedios en cada individuo. 51

3. Cuadro 3.

Resultados obtenidos en el examen oral de glucosa. 51

4. Cuadro 4.

Resultados de la evaluación clínica de las articulaciones control y tratamiento a las diferentes dosis. 59

5. Cuadro 5.

Comparativo de los caballos del grupo 1 inyectados con 15 UI del examen fisicoquímico de líquido sinovial en articulaciones tratadas y control. 61

6. Cuadro 6.

Comparativo de los caballos del grupo 1 inyectados con 20 UI del examen fisicoquímico de líquido sinovial en articulaciones tratadas y control. 62

7. Cuadro 7.

Comparativo de los caballos del grupo 2 inyectados con 15 UI del examen fisicoquímico de líquido sinovial en articulaciones tratadas y control. 63

8. Cuadro 8.

Comparativo de los caballos del grupo 2 inyectados con 20 UI del examen fisicoquímico de líquido sinovial en articulaciones tratadas y control. 64

9. Cuadro 9.

Comparativo de los caballos del grupo 3 inyectados con 15 UI del examen fisicoquímico de líquido sinovial en articulaciones tratadas y control. 65

10. Cuadro 10.

Comparativo de los caballos del grupo 3 inyectados con 20 UI del examen fisicoquímico de líquido sinovial en articulaciones tratadas y control. 66

11. Cuadro 11.

Promedio de concentraciones de insulina obtenidas con CLAR de los 6 caballos con dosis de 10 UI. 75

12. Cuadro 12.

Promedio de concentraciones de insulina obtenidas con CLAR de los 6 caballos con dosis de 15 UI. 75

13. Cuadro 13.

Promedio de concentraciones de insulina obtenidas con CLAR de los 6 caballos con dosis de 20 UI. 76

14. Cuadro 14.

Resultados de parámetros farmacocinéticos calculados para la insulina intraarticular con dosis de 15 UI. 79

15. Cuadro 15.

Resultados de parámetros farmacocinéticos calculados para la insulina intraarticular con dosis de 20 UI. 80

Listado de figuras y gráficas

		Página
1.	**Figura 1.** Microfotografía y esquema de composición de proteoglicano, compuesto de queratán sulfato y condroitín sulfato, unidos a una cadena de ácido hialurónico.	11
2.	**Figura 2 y 3.** Esquemas que muestran la presencia de péptido señal presente en la insulina humana y el número de aminoácidos que posee cada segmento de la proteína.	17
3.	**Figura 4 y 5.** Prueba de Kyte & Dolittle para Hidrofobicidad de la insulina de caballo.	19
4.	**Figura 6 y 7.** Prueba de Kyte & Dolittle para Hidrofobicidad de la insulina de humano.	20
5.	**Figura 8 y 9.** Estructura secundaria de la insulina de caballo y de humano en formato GOR.	21
6.	**Figura 10 y 11.** Formato SOPMA de estructura secundaria de molécula de insulina de caballo y de humano.	22
7.	**Figura 12.** Vía de señalización de la insulina de caballo.	24

8. Figura 13 y 14.

Estructura tridimensional de la insulina de caballo mostrando 3 alpha hélices y 4 hojas beta y vista completa de la insulina como proteína. 25

9. Figura 15.

Escala de “gato” o *Cresty neck.* 29

10. Figura 16-18.

Mapeo de la superficie articular en dos dimensiones de un espécimen de raza *Warmblood* de 500 kg. 30-31

11. Figura 19.

Línea de tiempo para medición de glucosa sanguínea posterior a la inyección de las 3 dosis utilizadas de insulina. 34

12. Figura 20.

Cronograma en horas de los muestreos por grupo posteriores a la inyección de insulina. 35

13. Gráfica 1.

Glucemia obtenida durante el examen oral de glucosa. 41

14. Figuras 21-26.

Estudio radiográfico de articulación del carpo de ambos miembros del caballo 1, tomas dorso-palmar (21-22), látero-medial (23-24) y látero-medial flexionada (25- 26). 43

15. Figuras 27-32.

Estudio radiográfico de articulación del carpo de ambos miembros del caballo 2, tomas dorso-palmar (27-28), látero-medial (29-30) y látero-medial flexionada (31-32). 44

16. Figuras 33-38.

Estudio radiográfico de articulación del carpo de ambos miembros del caballo 3, tomas dorso-palmar (33-34), látero-medial (35-36) y látero-medial flexionada (37-38). 45

17. Figuras 39-44.

Estudio radiográfico de articulación del carpo de ambos miembros del caballo 4, tomas dorso-palmar (39-40), látero-medial (41-42) y látero-medial flexionada (43-44). 46

18. Figuras 45-50.

Estudio radiográfico de articulación del carpo de ambos miembros del caballo 5, tomas dorso-palmar (45-46), látero-medial (47-48) y látero-medial flexionada (49-50). 47

19. Figuras 51-56.

Estudio radiográfico de articulación del carpo de ambos miembros del caballo 6, tomas dorso-palmar (51-52), látero-medial (53-54) y látero-medial flexionada (55-56). 48

20. Figura 20.

Microfotografía de una muestra de líquido sinovial obtenida del caballo #4 a dosis de 20 UI de insulina. 56

21. Gráfica 2.

Promedio de glucosa sanguínea de los 6 caballos inyectados con una dosis de 10 UI. 57

22. Gráfica 3.

Promedio de glucosa sanguínea de los 6 caballos inyectados con una dosis de 15 UI. 58

23. Gráfica 4.

Promedio de glucosa sanguínea de los 6 caballos inyectados con una dosis de 20 UI. 58

24. Gráfica 5.

Promedio de glucosa en líquido sinovial de los 6 caballos inyectados con una dosis de 15 UI de insulina a las 2 y 6 horas. 61

25. Gráfica 6.

Promedio de glucosa en líquido sinovial de los 6 caballos inyectados con una dosis de 20 UI de insulina a las 4 horas. 62

26. Figura 58.

Cromatograma obtenido donde se muestra el pico de absorbancia detectado de insulina a los 16 min de iniciada la prueba. 63

27. Figura 59.

Línea de tiempo en horas que marca los diferentes muestreos modificados para obtener las diferentes concentraciones de insulina en líquido sinovial. 64

28. Gráfica 7.

Promedio de las concentraciones de insulina en líquido sinovial obtenidas con CLAR, para los 6 caballos con las 3 dosis utilizadas (10, 15 y 20 UI). 66

29. Gráfica 8.

Curva de eliminación de la insulina de la articulación radio-carpal a dosis de 15 UI. 68

30. Gráfica 9.

Curva de eliminación de la insulina de la articulación radio-carpal a dosis de 20 UI. 69

1. Introducción

El caballo tiene aproximadamente 6 mil años de haber sido domesticado. Desde entonces ha sido utilizado por el hombre para diversas tareas, tales como trabajo en el campo, transporte y hasta actividades recreativas.[1]

Al ser un animal de presa, el caballo es un atleta natural, ya que combina fuerza y resistencia para escapar de sus depredadores, razón por la cual el hombre lo ha aprovechado y sometido a diversos deportes ecuestres. De ellos se derivan las diferentes funciones zootécnicas, tales como salto, adiestramiento, alta escuela, carreras, charrería, concurso completo, rodeo, etc.

Al convertirse en un medio de transporte y atleta para el hombre, en ocasiones el caballo es sometido a estrés o cargas diversas que sobrepasan su capacidad física; lo que ocasiona un excesivo uso y desgaste en articulaciones, tendones, ligamentos y bursas, provocando procesos inflamatorios. Dicha inflamación en bursas sinoviales o sinovias es denominada sinovitis. Los mediadores celulares y procesos bioquímicos asociados con la inflamación son los responsables de los signos clínicos de la misma, tales como calor, dolor y aumento de volumen, así como la subsecuente destrucción del tejido o pérdida de la función. Este proceso incrementa la cantidad de sangre que llega a estos órganos incrementando el filtrado plasmático en los mismos, lo que clínicamente se observa como distensión sinovial o efusión.[2]

Existen diversos medicamentos y tratamientos para las sinovitis, así como diferentes combinaciones. El objetivo de éstos es el de controlar los ya

mencionados mediadores químicos y procesos bioquímicos del proceso inflamatorio, aliviar el dolor, prevenir la destrucción de tejidos y restaurar la función para que el caballo regrese a su actividad física normal. [3,4]

Actualmente se utilizan numerosos medicamentos por vía intrasinovial, tales como antiinflamatorios esteroidales, glucosaminoglicanos polisulfatados, antibióticos, ácido hialurónico, DMSO (dimetil sulfóxido), parasimpáticolíticos como atropina, principalmente. Los antiinflamatorios esteroidales por vía intrasinovial ofrecen una pronta analgesia y una notable mejoría en el desempeño del caballo, por lo que se ha abusado de ellos. Estas prácticas sin periodos de descanso físico y fisioterapia, tomando en cuenta el tiempo de permanencia dentro de la articulación, dependiendo del fármaco, y que puede llegar a ser de hasta 21 días, puede ocasionar necrosis de cartílago articular, fibrosis y calcificaciones distróficas en tejidos blandos, principalmente en la membrana articular, ya que se reemplazan los sinoviocitos por tejido cicatrizal por lo que se pierde la función de secretar sustancias que constituyen el líquido sinovial limitando el funcionamiento adecuado de la articulación.[2]

1.1 Anatomía funcional de estructuras sinoviales

La articulación es un órgano que se compone por la cápsula articular, sinovia, cartílago articular y hueso subdcondral. Tiene su propio aporte local sanguíneo, inervación e intercambios de fluidos para mantener su buen funcionamiento. Sus dos funciones principales son las de dar movimiento y transferir cargas. [5, 6]

Las articulaciones se clasifican a menudo según su rango normal de movimiento:

- Sinartrosis.- Articulaciones sin movimiento (suturas del cráneo)
- Anfiartrosis.- Movimiento leve o limitado (interfalángica proximal o tarso metatarsiana)
- Diartrosis.- Con movimiento alto (metacarpo falángica, fémoro tibio patelar, coxo femoral, etc.)

Según su forma especializada de tejido conectivo, pueden ser: Sindesmosis, que son articulaciones inmóviles o con movimiento leve conectadas por membranas fibrosas; o sinoviales, que son las articulaciones en las que los huesos están separados por completo y están contenidas en un órgano especializado llamado articulación sinovial o cavidad articular.[6]

1.2 Cápsula articular y sinovial

La cápsula articular es la capa más externa y recubre cada una de las articulaciones sinoviales, en ella se encuentran vasos sanguíneos que se ramifican hasta la subsinovia y se acompañan de vasos linfáticos y nervios. Está constituida por tejido fibroso y está en íntimo contacto con la membrana sinovial o sinovia.[5] Ésta se encuentra diseñada para proveer una vía para el intercambio de fluidos, así como aporte sanguíneo y síntesis de ácido hialurónico.[2] Sus componentes son:

- Subsinovia, subíntima o lámina propia.- Compuesta por tejido fibroso o adiposo.
- Íntima o sinovia.- Se encuentra en contacto con el líquido sinovial y se compone de una capa luminal de 1-5 células de grosor y un plexo vascular.

Las vellosidades sinoviales se encuentran en esta capa, las cuales están altamente irrigadas, lo que le permite un mejor intercambio de macromoléculas. Se componen por una arteriola central y vénulas helicoidales que dependiendo de la presión intra-articular será su intercambio de oxígeno. Se dice que la punta de cada vellosidad es muy susceptible a sufrir isquemia. En ellas se sintetiza el ácido hialurónico por parte de los sinoviocitos.

La capa íntima puede cambiar de arquitectura dependiendo de las cargas biomecánicas que ésta reciba, por ejemplo, en las áreas de altas cargas, la sinovia es plana y se une a la fibrosa pero fuerte capa subíntima, como sucede en tendones que cruzan membranas sinoviales como lo hace el tendón extensor digital común sobre la articulación metacarpo falángica.[5]

El endotelio de los vasos sanguíneos en la capa íntima evita que partículas de alto peso molecular salgan de los capilares sinoviales. El transporte de glucosa dentro del líquido sinovial se realiza de forma más acelerada que el resto de las partículas, eso ocurre mediante difusión facilitada. Las moléculas lipofílicas como el oxígeno y el bióxido de carbono se difunden libremente a través de los sinoviocitos.[6, 7]

Los sinoviocitos o células íntimas, se encuentran en la capa íntima de la membrana sinovial, se dividen en fagocíticos mononucleares (sinoviocitos tipo A) y fibroblásticos (sinoviocitos tipo B). Éstos últimos, sintetizan varios componentes importantes del líquido sinovial, como el ácido hialurónico, componente

fundamental en la matriz extracelular de los sinoviocitos y la lubricina, glicoproteína encargada de la lubricación del cartílago articular.[2,5]

Normalmente los tipo A constituyen un tercio de la población normal de las células, sin embargo, cuando se tiene un proceso inflamatorio en la articulación, su relación cambia, pudiendo llegar a proliferar hasta un 50-70% del total de las células en la capa íntima, las cuales producen moléculas de adhesión vascular (VCAM-1), que son quimiotácticas para leucocitos. Las células tipo B también proliferan y el conjunto de estos procesos es lo que se observa clínicamente como sinovitis.[5]

1.3 Circulación sinovial

La membrana sinovial funciona como una barrera que mantiene la homeostasis articular proveyendo una forma de intercambio de nutrientes y subproductos metabólicos entre la sangre y los tejidos sinoviales, entre ellos el cartílago articular. La eficiencia en el recambio entre los capilares de la membrana sinovial y la cavidad articular depende de la densidad y profundidad de los capilares, así como del flujo sanguíneo.[5-7]

En la mayoría de las articulaciones diartrósicas, el aporte sanguíneo es muy rico y responde a estímulos como ejercicio o inflamación. Consta de ramas pequeñas de arterias epifisiarias que corren en la unión del periostio con la membrana sinovial formando un “círculo arterioso”. Existen también ramas más grandes que penetran el hueso, mientras que las chicas se mantienen en la periferia del cartílago formando la circulación pericondral. La circulación subcondral está dada por las

arterias epifisiarias que viajan en las epífisis paralelas a la superficie articular, pero que emiten ramas perpendiculares a ésta que llegan hasta la superficie del cartílago calcificado.[5]

Los factores que afectan el flujo sanguíneo sinovial son:

- Presión intra-articular (PIA)
- Temperatura local
- Movimiento de la articulación
- Tono vasomotor
- Reflejos y liberación local de mediadores vasoactivos

La densidad capilar es mayor en la sinovia (vellosidades) que en la cápsula articular fibrosa. En la sinovia se llevan a cabo recambios de moléculas pequeñas como la albúmina, así como producción de ácido hialurónico, razón por la cual, para mantener un líquido articular de buena calidad se requiere de una sinovia sana. El mayor activador de la circulación sinovial es el movimiento (ejercicio), lo cual ocurre cuando la articulación se mueve desde extensión máxima hasta flexión máxima, ocurre una acción como de bombeo que crea un incremento pulsátil en el flujo sanguíneo, esta es la razón por la cual encontramos un líquido articular más viscoso en articulaciones de caballos que están en entrenamiento que en las articulaciones de los que están en reposo, en estos últimos el líquido articular tiene muy pobre viscosidad. Sin embargo, se dice que articulaciones con enfermedad crónica degenerativa, se afectan más con el ejercicio, ya que al estar con un proceso crónico, disminuyen el flujo sanguíneo articular, lo que genera isquemia que a su vez genera fibrosis e hipertrofia sinovial. Artroscópicamente las

vellosidades sinoviales cuando han sufrido un proceso de hipoxia, se ven acortadas y más gruesas de lo normal, lo cual sugiere que las puntas de las vellosidades son más susceptibles a la isquemia, como ya había mencionado.[5, 8]

1.4 Presión intra-articular (PIA)

En las articulaciones diartrósicas sanas normalmente se mantiene una presión negativa y más baja que la presión atmosférica, que oscila entre -2 y hasta -12 mmHg. Para saber si una articulación está sana, debe haber ausencia de efusión y presencia de presión negativa, lo que se conoce como articulaciones secas (como se le llama en inglés "*tight joints*") o articulaciones "apretadas". Esto se obtiene gracias al movimiento, ya que promueve el flujo linfático desde el intersticio y con la flexión de la articulación se da absorción de fluido gracias al incremento en la PIA. Durante los exámenes del aparato locomotor, las pruebas de flexión se realizan precisamente para aumentar la PIA y así generar un estímulo nociceptivo que se verá en forma de claudicación aumentada. Por esta razón se concluye que el balance en el líquido articular se da gracias al intercambio de dos bombeos, que ocurren durante el movimiento, uno favorece el intercambio de fluido al intersticio y el otro promueve el flujo linfático. El flujo de fluido desde el espacio vascular hasta el intersticio y el espacio articular y de éstos hacia su drenaje a través de las vénulas y vasos linfáticos está gobernado por fuerzas de Starling; lo cual se refiere a que existe un balance entre la presión arterial y venosa y las fuerzas coloidosmóticas en la articulación.[2, 5]

En caballos con efusión articular sin claudicación, se han logrado medir PIA mayores a 30 mmHg, así como también se ha observado una disminución significativa en el flujo sanguíneo de la membrana sinovial. Con PIA mayores a 45 mmHg se ha observado una acidosis intra-articular. Se ha logrado inducir ruptura de la cápsula articular con presiones mayores a 80 mmHg en la articulación intercarpiana.

Se ha observado que en articulaciones con distensión lenta, es decir crónica, se observa un aumento gradual en la distensibilidad de la cápsula, a diferencia de las articulaciones con distensión aguda. Si la articulación es distendida con líquido sinovial, se observa un aumento en la distensibilidad de la cápsula, a diferencia de lo que se observa si es distendida con solución salina fisiológica, donde se observa una disminución en la distensibilidad de la cápsula articular, lo que sugiere una falla en la interfase de fluido que incrementa la tensión superficial y promueve el colapso de la articulación, confirmando la importancia de los componentes del líquido sinovial (hialuronato y lubricación).[5]

Durante el movimiento, el líquido sinovial se moviliza desde los compartimentos con la presión más alta hacia los compartimentos con presión más baja, produciendo una especie de reflujo del líquido sobre todo el cartílago articular.[5]

1.5 Cartílago Articular

En los mamíferos los tejidos esqueléticos se limitan a tres tipos diferentes: tejido conectivo de colágeno denso, cartílago y tejido óseo. El cartílago y el tejido óseo, se dice que son unas formas más especializadas de tejido conectivo. Los distintos tipos de cartílago presentes en el cuerpo, se adaptan a sus funciones.[11]

El cartílago se conforma de:

- Células (Condrocitos)
- Matriz extracelular (Proteoglicanos o también llamados mucopolisacáridos, hechos de monómero protéico y cadenas laterales de glucosaminoglicanos -GAG-, como el condroitín sulfato y el queratán sulfato; fibras de colágeno y agua).[6]

El cartílago es un tejido avascular y sin terminaciones nerviosas, algunos autores mencionan que en articulaciones puede haber algunas terminaciones, a diferencia de otros tejidos conectivos, pero en general se concluye que el cartílago carece de terminaciones nerviosas.[5] La nutrición de los condrocitos se da por difusión a través de la sustancia fundamental o matriz extracelular que es un gel coloidal rico en agua. El cartílago es el primer precursor del crecimiento óseo, por ejemplo en las placas de crecimiento, la mayor parte del esqueleto se forma primero sobre una base de moldes de cartílago para después reemplazarse por tejido óseo.[5] *(Figura 1)*

La función principal del cartílago articular es absorber y transferir cargas. Se compone por colágena (tipo II) que le provee fuerza tensil y por proteoglicanos que

le confieren fuerza compresiva. La nutrición del cartílago articular está dada por nutrientes y recambios en la microcirculación sinovial.[2]

Existen tres tipos de cartílago, el hialino que está presente en articulaciones, el elástico presente en epiglotis, en las paredes del conducto auditivo externo y en la trompa de Eustaquio y por último, el fibroso o fibrocartílago, que se dice que es una forma de transición entre el tejido conectivo denso y el cartílago hialino, ya que posee abundantes fibras de colágena tipo I.[11]

El cartílago hialino se forma a parir del mesénquima, pero a diferencia de otras células mesenquimatosas, no es originado del mesodermo, sino que tiene un origen ectodérmico en la cresta neural. Tiene una apariencia azulosa vidriosa, y además de encontrarse en las articulaciones, está presente en tráquea, laringe, esqueleto costal y bronquios. Una diferencia importante entre el cartílago hialino encontrado en otros tejidos que no sean articulaciones, es que en éstas no posee un pericondrio.[11]

En estado embrionario, más o menos en la quinta semana de vida se distinguen zonas en las cuales las células del mesénquima se hacen más redondas y forman cúmulos celulares densos, denominados núcleos cartilaginosos o centros de condrificación. Durante esta proliferación celular, los condroblastos comienzan a secretar la sustancia fundamental o matriz extracelular y el tropocolágeno, formando microfibrillas de colágeno que son precursores para el colágeno. A medida que la cantidad de matriz aumenta, se hace más firme y elástica y las

células se ubican en pequeños espacios llamados lagunas, donde se diferenciarán a condrocitos.[11]

El crecimiento del cartílago puede ser de dos formas: crecimiento intersticial y crecimiento aposicional. En el intersticial, se llevan a cabo mitosis de condrocitos, donde las células “hijas” o también llamados grupos isógenos, tienen la capacidad de producir matriz extracelular; se dice que este tipo de crecimiento se da sólo en el cartílago joven. Mientras que en el aposicional, el crecimiento se observa por la diferenciación de varias células mesenquimatosas alrededor del cartílago en formación a partir del pericondrio, donde debajo de éste, se dan todas las etapas de diferenciación, zona que se conoce como capa condrogénica. Este tipo de crecimiento es el que predomina durante la infancia y pubertad.[11]

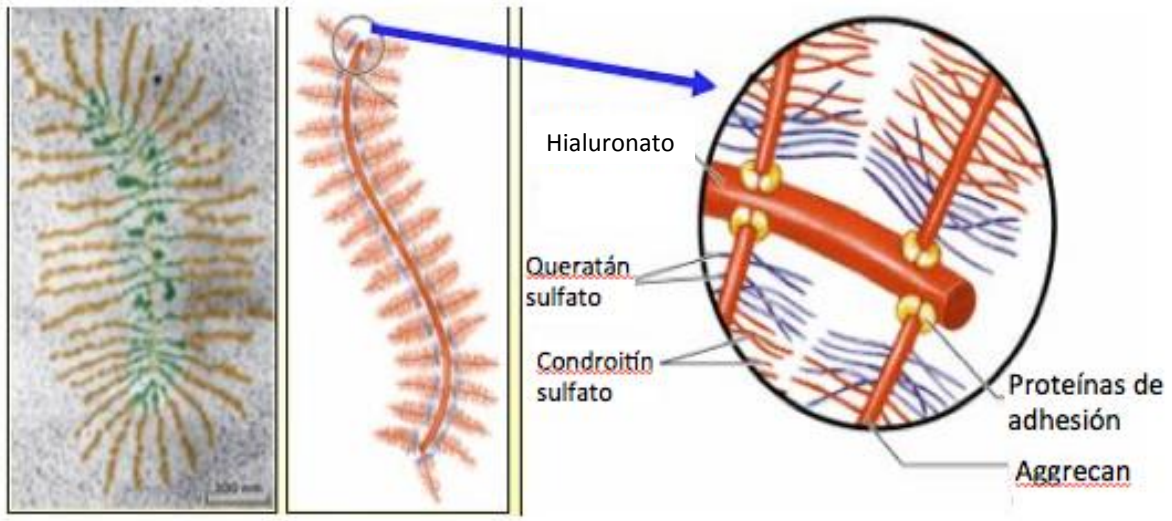


Figura 1.- Microfotografía y esquema de la composición de un proteoglicano, compuesto de queratán sulfato y condroitín sulfato, unidos a una cadena de ácido hialurónico.

Adaptado de:

http://www.google.com.mx/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&source=images&cd=&docid=ZRnxnpfgLAwuaM&tbnid=bXMD9yhv9uuxAM:&ved=0CAUQjRw&url=http%3A%2F%2Fwww.studyblue.com%2Fnotes%2Fnote%2Fn%2Fcarbohydrates%2Fdeck%2F1437385&ei=4DcGVOqrEcfloATu5ILwAw&bvm=bv.74115972,d.cGU&psig=AFQjCNE394GUPQSFbua6GmU15LItCz1rAA&ust=1409779763725655

Entre cada vellosidad de queratán y condroitín sulfato se atrapan moléculas de agua, mismas que cuando se ejerce presión al poner peso en la extremidad, salen de la matriz extracelular; gracias a esto, el cartílago tiene la capacidad de amortiguar y transferir cargas, ya que cuando el miembro se encuentra en flexión o sin peso, las moléculas de agua vuelven a ocupar su lugar en las vellosidades de los GAG.

La forma de condroitín-6-sulfato es la que está presente en el cartílago articular maduro, la forma de condroitín-4-sulfato es un constituyente importante del cartílago articular inmaduro, pero su nivel disminuye hasta casi no estar presente a medida que el cartílago madura.[6]

El cartílago maduro dañado, no se regenera, sino se repara, es decir, que se forma una cicatriz de cartílago fibroso o fibrocartílago (tejido conectivo fibroso), el cual es de mala calidad y no posee las funciones normales del cartílago sano, razón por la cual, todas las terapias celulares y de ingeniería de tejidos están orientadas a la regeneración del mismo.

La actividad condrogénica del pericondrio se limita al periodo de crecimiento activo antes de entrar a la edad adulta. La reparación del cartílago maduro se da también gracias al pericondrio, sin embargo ya no posee la misma capacidad de regeneración que en edad temprana.[11]

1.6 Dolor articular

En general el dolor articular se le atribuye a inflamación de la articulación. Existen fibras nerviosas mielinizadas y no mielinizadas, las mielinizadas son vías aferentes que transmiten estímulos nociceptivos rápidos, mientras que las no mielinizadas se ocupan del control vasomotor ya que son fibras del sistema nervioso simpático.[6, 10, 12, 13]

Al no haber fibras nerviosas en el cartílago articular, el dolor articular sucede gracias a las fibras aferentes presentes en la membrana sinovial o en el hueso subcondral. El dolor en la artritis es atribuido a fibras Aδ y fibras C, a neuropéptidos (sustancia P) y aminas vasoactivas (serotonina), que actúan como proinflamatorios de la sinovia. Otros neuropéptidos han sido encontrados mediante inmunohistoquímica en la sinovia de caballos como lo son la neurocinina A y neuropéptido Y.[2, 5]

El papel de la sustancia P en el dolor articular se observó mediante el efecto clínico de la adición de la capsaicina, que es un compuesto activo presente en los chiles, responsable de la sensación de picor. Esta sustancia induce una activación inicial de las fibras C, lo que resulta en liberación de sustancia P y por consiguiente dolor o molestia, sin embargo subsecuentemente desensibiliza las fibras C y las puede llegar a degenerar lo que sugiere un mecanismo de alivio de dolor con uso crónico en inflamación articular.[14]

Sin embargo el tratamiento más efectivo para aliviar el dolor es mediante la terapia con antiinflamatorios esteroidales (AIEs) usados por vía intraarticular y/o no

esteroidales (AINEs) usados por vía sistémica. Los AINEs inhiben la activación de prostaglandinsintetasas o ciclo-oxigenasas, para disminuir la formación de prostaglandinas a partir de ácido araquidónico, mientras que los AIEs inhiben la fosfolipasa A2, para formar ácido araquidónico, sustrato para la ciclooxigenasa y lipooxigenasa.[17]

La activación del sistema nervioso periférico, puede iniciar la inflamación aguda en la articulación que incluye vasodilatación, efusión y dolor.[18, 19]

1.7 Líquido sinovial

El líquido sinovial es un ultrafiltrado del plasma con la presencia de ácido hialurónico, gracias al cual está dada su viscosidad. Contiene proteínas, células mononucleares (leucocíticas y linfocíticas) que constituyen un 90% del total celular y el 10% restante se da por polimorfonucleares (neutrófilos).[2, 5] *(Cuadro 1)*

El ácido hialurónico o hialuronato de sodio es un glucosaminoglicano que se compone de ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina. Tiene una vida media dentro de la articulación de 12-20 horas, por lo que su producción debe ser continua. Éste le confiere la viscosidad característica al líquido sinovial; este efecto es proporcional a la longitud de su cadena, concentración de proteína, pH, composición iónica y temperatura.[5]

El hialuronato de alto peso molecular, es decir, mayor a 40 kDa, se ha observado que produce analgesia. Se realizó un estudio inyectando ácido hialurónico de 860 y 2300 kDa, en el que se obtuvo buena analgesia hasta por 72 horas posteriores a la inyección, sin relacionar este efecto con la unión del hialuronato con receptores

de bradicininas. Sin embargo, es degradado en procesos inflamatorios, razón por la cual, en estos procesos la viscosidad del líquido sinovial está disminuida.[15]

En el cartílago articular, existen proteínas que se unen al ácido hialurónico *(Hialuronan binding proteins)* o por sus siglas en inglés HBP´s, también se les conoce como hialadherinas, que son proteínas de unión que en conjunción con el hialuronato producen agregados grandes de proteoglicanos en el cartílago que le confieren la resistencia compresiva necesaria para soportar las cargas producidas por el ejercicio.[5]

2. Insulina

La insulina se ha utilizado de manera empírica por vía intraarticular en caballos como adyuvante para el tratamiento de procesos osteoartríticos, sin que realmente se conozcan sus efectos tanto a nivel local (articular) como sistémico (glucosa sanguínea), su farmacocinética y por consiguiente su dosis terapéutica.

2.1 Generalidades

Al no contar con insulina comercial indicada para caballos, se utilizó insulina de uso humano, por lo que a continuación se detallan las diferencias bioquímicas entre insulina humana y de caballo.

La insulina humana consta de una secuencia de 110 aminoácidos, mientras que la de caballo de 86 aminoácidos. Ambas tienen 2 tipos de cadenas: A y B. Éstas le confieren a la proteína dos homodímeros diferentes, la insulina de cadena B y la insulina de cadena A. Una cadena A y una B, están unidas entre sí por 2 puentes disulfuro.[24]

2.2 Diferencias moleculares entre insulina humana y de caballo

La insulina humana posee un péptido señal desde el aminoácido 1 al 24, un péptido (aminoácido 25-54) un propéptido (aminoácido 57-87) y otro péptido (aminoácido 90-110), mientras que la insulina de caballo no posee péptido señal, solo péptido (aminoácido 1-30), propéptido (aminoácido 33-63) y un péptido (aminoácido 66-86) *(Figuras 2 y 3).* En principio, sabemos que la insulina humana al tener un péptido señal ya tiene cierta parte hidrofóbica, la cual no está presente

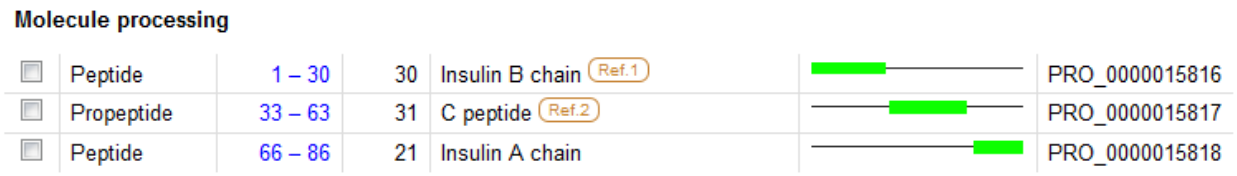
en la de caballo. La insulina humana tiene menos aminoácidos dentro del propéptido que la de caballo, lo cual indica que tiene menos segmentos removidos al ser activadas nuevamente.[24]

Humano:

Molecule processing

☐	Signal peptide	1 – 24	24	Ref.12	
☐	Peptide	25 – 54	30	Insulin B chain Ref.12	PRO_0000015819
☐	Propeptide	57 – 87	31	C peptide Ref.13 Ref.14	PRO_0000015820
☐	Peptide	90 – 110	21	Insulin A chain	PRO_0000015821

Caballo:



Molecule processing

☐	Peptide	1 – 30	30	Insulin B chain Ref.1	PRO_0000015816
☐	Propeptide	33 – 63	31	C peptide Ref.2	PRO_0000015817
☐	Peptide	66 – 86	21	Insulin A chain	PRO_0000015818

Figuras 2-3. Esquemas que muestran la presencia de péptido señal presente en la insulina humana y el número de aminoácidos que posee cada segmento de la proteína.

2.3 Funciones generales

Es producida en los islotes pancreáticos β, teniendo como función introducir moléculas de glucosa a las células, incrementando su permeabilidad a monosacáridos, aminoácidos y ácidos grasos. Acelera también la glucólisis, el ciclo de las pentosas y síntesis de glucógeno en el hígado.[24]

En estudios recientes se ha observado que induce mitosis *(in vitro)* en condrocitos de caballo. Por lo que posee también funciones de factor de crecimiento.[24]

2.4 Desórdenes relacionados a desbalances de insulina

En procesos de enfermedad se asocia a diabetes mellitus tipo 1 o insulinodependiente, la cual es una enfermedad multifactorial en la falla en la homeostasis de la glucosa y se caracteriza por susceptibilidad de los individuos a cetoacidosis en pacientes con diabetes en ausencia de terapia con insulina.[24]

Los signos clínicos en humanos son polidipsia, polifagia y poliuria que resultan de diuresis osmótica ocasionada por la hiperglicemia y sed como compensación. Todo esto a largo plazo resulta en afecciones en ojos, riñones, nervios y aparato circulatorio. Se han reportado varios tipos de enfermedades asociadas a desórdenes de insulina, como por ejemplo la diabetes mellitus neonatal permanente que se da en los primeros meses de vida, o la diabetes juvenil tipo 1, que se presenta antes de los 25 años de edad.[24]

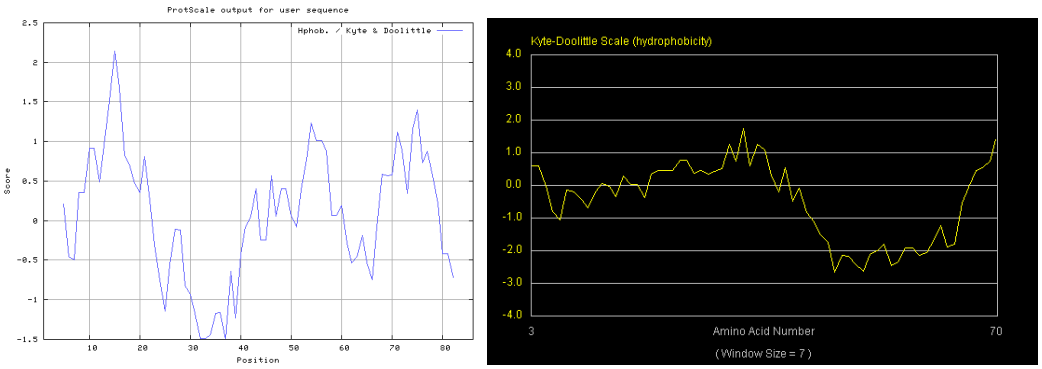
En caballos no es común encontrar diabetes como tal, sin embargo, existen alteraciones similares como es el síndrome metabólico equino o también conocido como resistencia a la insulina, que conlleva a problemas de metabolismo de carbohidratos, depósitos anormales de grasa y como consecuencia laminitis crónica.[24]

2.5 Uso farmacéutico

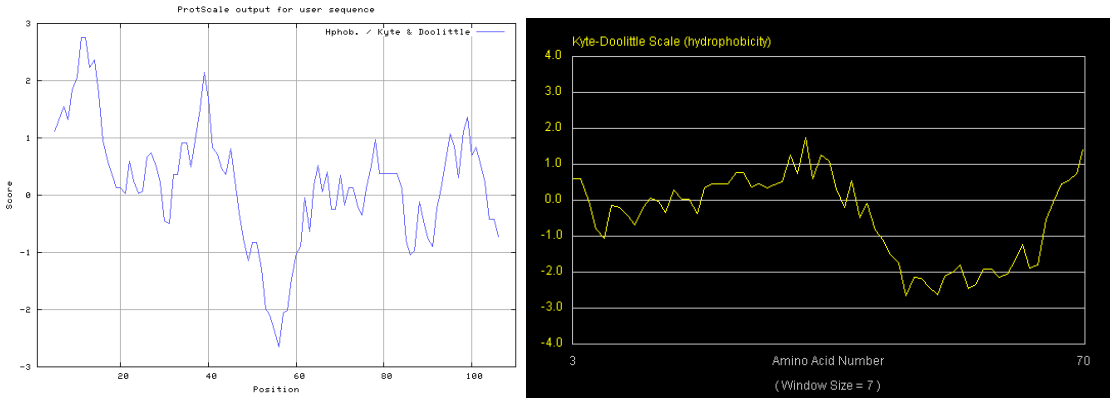
Los tipos de insulina disponibles en el mercado son la Humulina® o Humalog® y la Novolina®. Ambos son usados en el tratamiento de diabetes. En este estudio se

utilizó la insulina Humalog Lispro®, ya que es la de acción más rápida porque no posee sales de depósito.

Los valores de hidrofobicidad arrojados por la prueba de Kyte & Dolittle, de la insulina humana y la de caballo son diferentes, pero basados en el tamaño de ventana, tanto la insulina de humano como la de caballo tienen el mismo valor de tamaño de ventana. Esto indica que ambas proteínas tienen más regiones hidrofílicas expuestas en su superficie que podrían tener propiedades antigénicas *(Figuras 4-7)*. Por lo que podemos concluir que ambas son muy similares en cuanto a su polaridad.[25]



Figuras 4 y 5. Prueba de Kyte & Dolittle para Hidrofobicidad de la insulina de caballo.



Figuras 6 y 7. Prueba de Kyte & Dolittle para Hidrofobicidad de la insulina de humano.

2.6 Diferencias en estructura secundaria

Existen diferencias en ambas proteínas en cuanto a su estructura secundaria, la insulina de caballo no posee Alpha hélices, a diferencia de la de humano, que en su estructura posee un 30% de Alpha hélices. La de caballo posee un 51.16% de espirales aleatorias a diferencia de la de humano (44.55%) lo cual indica que la estructura de la insulina de caballo tiene un acomodo más aleatorio que la de humano, donde los monómeros están orientados de manera aleatoria mientras siguen unidos a sus unidades adyacentes, lo cual hace que su conformación no sea específica. En otras palabras, cuando existe ausencia de reacciones de estabilización en una estructura proteínica, el polímero puede tomar cualquier forma y pueden tener interacciones inespecíficas. Por último, la insulina de caballo tiene más cadenas extendidas (48.84%) a diferencia de la insulina humana (25.45%), lo cual indica que la insulina de caballo tiene más espacio y libertad de movimiento, por ejemplo para unión a otras proteínas, porque las hélices beta tienden a torcerse y formar giros, lo que las hace inestables.[26] *(Figuras 8 y 9)*

GOR4 :

Alpha helix	(Hh)	:	0 is	0.00%
3_{10} helix	(Gg)	:	0 is	0.00%
Pi helix	(Ii)	:	0 is	0.00%
Beta bridge	(Bb)	:	0 is	0.00%
Extended strand	(Ee)	:	42 is	48.84%
Beta turn	(Tt)	:	0 is	0.00%
Bend region	(Ss)	:	0 is	0.00%
Random coil	(Cc)	:	44 is	51.16%
Ambigous states	(?)	:	0 is	0.00%
Other states		:	0 is	0.00%

GOR4 :

Alpha helix	(Hh)	:	33 is	30.00%
3_{10} helix	(Gg)	:	0 is	0.00%
Pi helix	(Ii)	:	0 is	0.00%
Beta bridge	(Bb)	:	0 is	0.00%
Extended strand	(Ee)	:	28 is	25.45%
Beta turn	(Tt)	:	0 is	0.00%
Bend region	(Ss)	:	0 is	0.00%
Random coil	(Cc)	:	49 is	44.55%
Ambigous states	(?)	:	0 is	0.00%
Other states		:	0 is	0.00%

Figura 8 y 9. Estructura secundaria de la insulina de caballo *(izq.)* y de humano *(der.)* en formato GOR.

En el formato SOPMA, se observan diferencias con el formato GOR, ya que aquí la insulina de caballo sí posee hélices alfa (33.72%), así como también que ambas proteínas poseen giros beta (11.63% para la de caballo y 11.82% para la de humano). Esto puede ser debido a que ambos predictores de secuencia secundaria fueron desarrollados en forma distinta y por las propiedades de ambas (presencia de espirales aleatorias), su estructura puede interpretarse de manera diferente. A mayor presencia de cadenas extendidas, se implicará mayormente en la formación de agregados de la proteína, lo cual se asocia a enfermedades, como por ejemplo la amiloidosis presente en el Alzheimer. Sin embargo, hay regiones que se describen como favorables, como las de mayor estabilidad las cuales están en *phi* = -120^{O} y *psi* = $+135^{o}$. Aquí se incluyen las hojas beta paralelas y antiparalelas.[27] Para observar cómo lucen los giros de la estructura se hizo un modelo tridimensional de la insulina de caballo. *(Figuras 10 y 11)*

Sequence length : 86

SOPMA :

Alpha helix	(Hh)	:	29 is	33.72%
3_{10} helix	(Gg)	:	0 is	0.00%
Pi helix	(Ii)	:	0 is	0.00%
Beta bridge	(Bb)	:	0 is	0.00%
Extended strand	(Ee)	:	15 is	17.44%
Beta turn	(Tt)	:	10 is	11.63%
Bend region	(Ss)	:	0 is	0.00%
Random coil	(Cc)	:	32 is	37.21%
Ambigous states	(?)	:	0 is	0.00%
Other states		:	0 is	0.00%

Sequence length : 110

SOPMA :

Alpha helix	(Hh)	:	43 is	39.09%
3_{10} helix	(Gg)	:	0 is	0.00%
Pi helix	(Ii)	:	0 is	0.00%
Beta bridge	(Bb)	:	0 is	0.00%
Extended strand	(Ee)	:	12 is	10.91%
Beta turn	(Tt)	:	13 is	11.82%
Bend region	(Ss)	:	0 is	0.00%
Random coil	(Cc)	:	42 is	38.18%
Ambigous states	(?)	:	0 is	0.00%
Other states		:	0 is	0.00%

Figuras 10 y 11. Formato SOPMA de estructura secundaria de molécula de insulina de caballo *(izq.)* y de humano *(der.).*

2.7 Vía metabólica de la insulina de caballo

Cuando la insulina se une a su receptor resulta en fosforilación de tirosina de los sustratos del receptor de insulina (IRS) por el receptor de insulina tirosin kinasa (INSR). Esto permite la asociación de los IRSs con la subunidad reguladora de la enzima fosfoinositida-3-kinasa (PI3K), la cual activa a la protein-kinasa 3-fosfoinositida-dependiente (PDK1) que activa a la serin-kinasa Akt, la que por su parte desactiva a la glucógeno-sintetasa 3 (GSK-3), que conlleva a la activación de la glucógeno sintetasa (GYS) y por consiguiente la síntesis de glucógeno. La activación del gen Akt también resulta en la translocación de vesículas de GLUT4, desde su “pool” intracelular hasta la membrana plasmática, donde permiten que la célula pueda introducir glucosa a través de la membrana. La proteína serin-knasa Akt también conlleva a la activación de síntesis de proteínas por los genes eIF4 y p70S6K mediada por otro gen llamado mTOR; así como también a un efecto de antilipólisis.[28]

La vía más importante para este estudio, es la de la Mitogen activated protein-kinase, (por sus siglas en inglés *MAP-Kinase* o en español MAP-kinasa o proteín kinasa mitogénica activada) ya que hay proteínas de señalización como el GRB2, que interactúa con los IRSs, que comienza la cascada de reacciones que conlleva a la activación de la MAP-kinasa y respuestas mitógenas en forma de transcripción de genes.[28] *(Figura 12)*

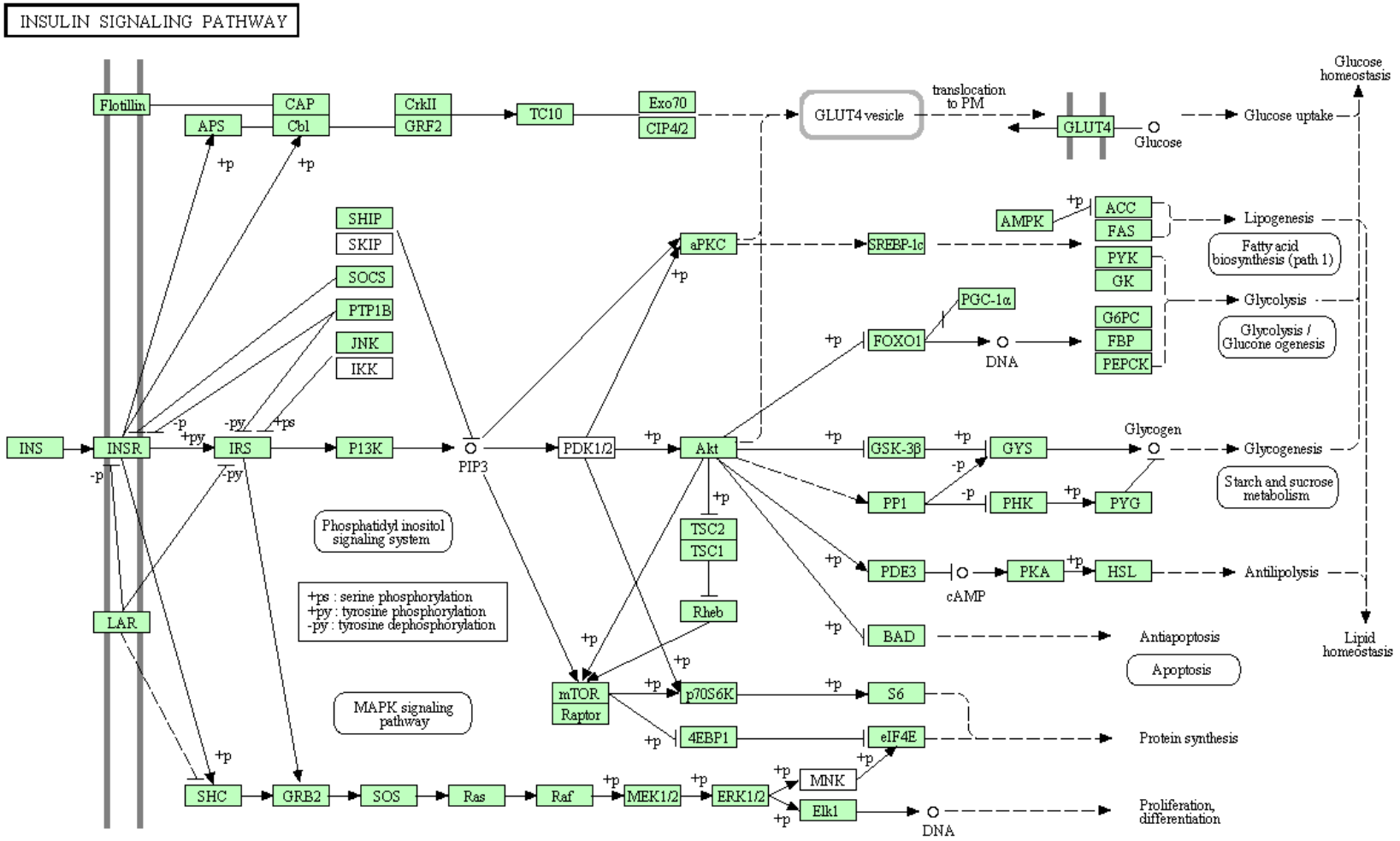
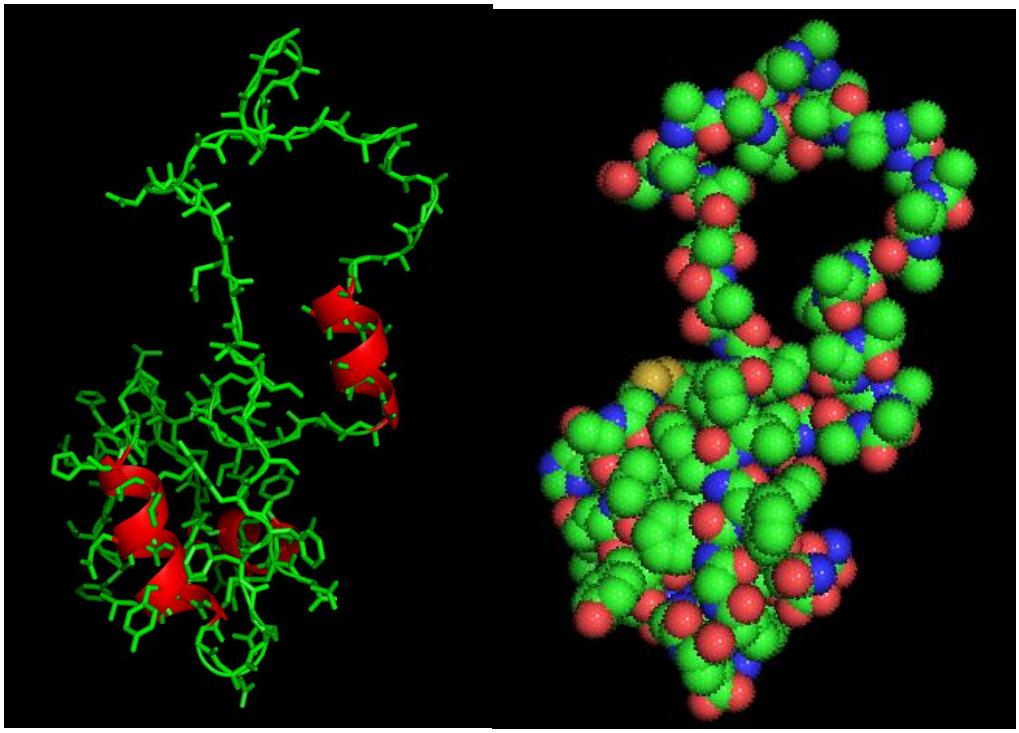


Figura 12.- *Vía de señalización de la insulina de caballo.*[30]

Estructuras tridimensionales de insulina de caballo



Figuras 13 y 14. *IZQ (7).- Estructura tridimensional de la insulina de caballo mostrando 3 alpha hélices (color Rojo) y 4 hojas beta (verde). DER (8).- Vista completa de la insulina como proteína.*[28, 29]

3. Justificación

Existe evidencia científica de que *in vitro,* a concentraciones menores a 50ng/ml en cultivo celular (monocapas de 75 cm^2), la insulina induce mitosis en condrocitos y producción de colágeno tipo II.[20]

En este estudio, se extrapoló la dosis con base en la superficie de cartílago articular desde la superficie del cultivo celular (75 cm^2) y se determinó si se presentan o no, cambios significativos en la composición del líquido sinovial o en el nivel de glucosa en sangre, que puedan representar algún peligro para el caballo y así evaluar su inocuidad. Aún no hay estudios de farmacocinética de este medicamento utilizado en articulaciones en medicina humana o en medicina veterinaria. El IGF1 y 2 tienen un mayor efecto mitótico y de producción de colágeno tipo II en condrocitos *in vivo.*[21]

Debido al alto costo y poca disponibilidad en México que tienen estos dos factores (IGF-1 y 2) en México, es necesario realizar este estudio, ya que funcionará como una ayuda más al tratamiento de lesiones osteocondrales en el caballo deportivo así como también representará una opción más de tratamiento a un bajo costo en comparación con estos factores de crecimiento, aunque se debe tener presente que la insulina posiblemente tendrá un menor efecto que dichos factores (IGF-1 y 2). Será útil para tratamiento de, por ejemplo, la discondroplasia y osteoartritis, afecciones comunes en caballos de alto rendimiento.

4. Objetivos

Evaluar si la insulina Humalog Lispro® es inocua para la articulación del caballo (ausencia de inflamación, efusión, claudicación, etc.), para poder asegurar que su uso en la clínica en caballos no representa un riesgo para los mismos.

Evaluar si las dosis utilizadas producen cambios en los niveles de glucosa sanguínea que conlleven a efectos adversos.

Determinar la farmacocinética de dosis crecientes (10, 15 y 20 UI) de insulina por vía intra-articular y establecer su dosis máxima por esta vía.

5. Hipótesis

H_0: La insulina utilizada a las dosis utilizadas no causará reacciones adversas tanto a la articulación como órgano independiente, como al caballo sistémicamente.

H_a: La insulina utilizada a las dosis utilizadas va a ocasionar efectos adversos tanto a nivel local (articulación) como a nivel sistémico.

6. Material y métodos

Se utilizaron 6 caballos, 5 de raza criolla y una yegua pura sangre, de los cuales, 3 fueron yeguas, dos machos castrados y un macho entero. Fueron divididos al azar en 3 grupos de 2 caballos cada uno, denominados como Grupo 1, Grupo 2 y Grupo 3.

Todos los caballos fueron sometidos a estudios clínicos (evaluación de aparato locomotor en estática y en dinámica) y radiográficos (tomas: Látero-medial, Dorso-palmar, Látero-medial flexionada) de la región del carpo con el fin de descartar cualquier patología o proceso degenerativo proveniente de la misma. (MinXray® HFX 90V. Aparato de alta frecuencia de rayos X, elaborado por MinXray Inc. Illinois, EUA).

Todos fueron alimentados con aproximadamente 9 kg de heno de avena, divididos en 3 raciones iguales al día, a las 6:00, 12:00 y 18:00 y agua *ad libitum*.

Todos los animales se mantuvieron en condiciones de estabulación.

Se evaluaron a todos los animales en busca de signos clínicos correspondientes a síndrome metabólico equino o resistencia a la insulina, tales como:

- Obesidad y depósitos regionales de grasa.
- Inflamación de prepucio o glándula mamaria.
- Condición corporal ≥7/9.
- Depósito de grasa alrededor del ligamento nucal “gato” *o Cresty neck* (escala ≥3/5). *(Fig. 15)*
- Ceños en la muralla del casco.

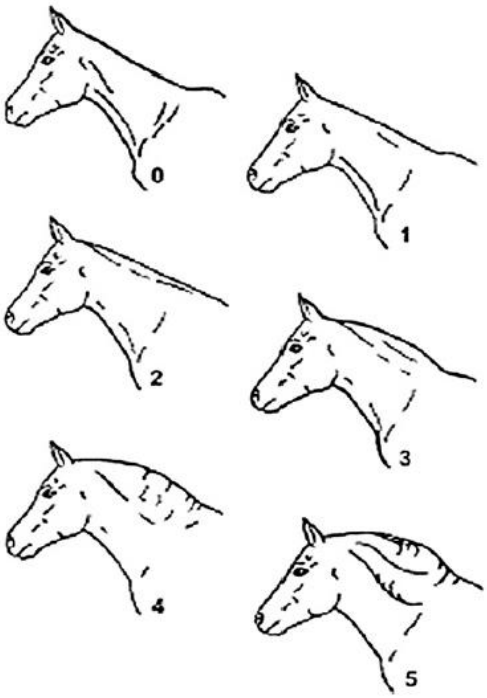


Figura 15. Escala de “gato” o *Cresty neck* descrita por Carter et al, 2009.[34]

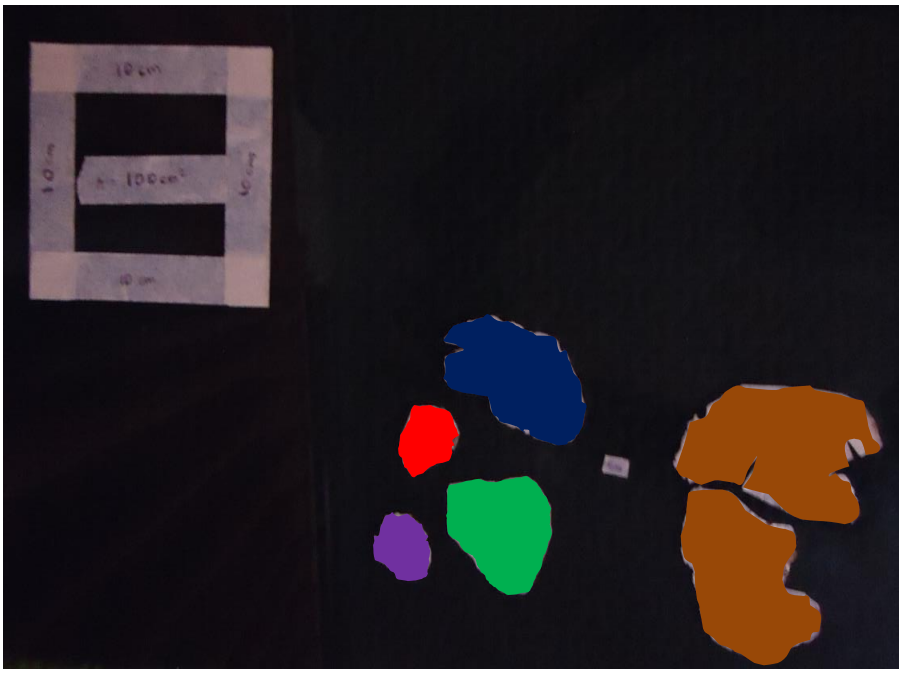
Como prueba rápida y de campo (no definitiva), se realizó una prueba de glucosa oral, con el fin de determinar si algún individuo era resistente a la insulina (Frank, 2011), bajo el siguiente protocolo:

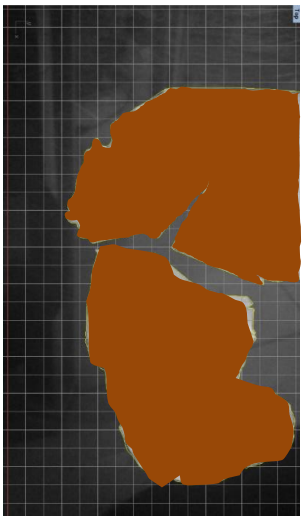
- Ayuno de 12 horas.
- Medición basal de glucosa sanguínea.
- Administración por vía oral (con jeringa de 60 ml) a razón de 15 ml/100 kg (150 mg/kg) de jarabe de maíz Karo® (Elaborado para. ACH Foods México, S. De R. L. De C. V.).
- Medición de glucosa a los 60, 75 y 90 minutos posteriores a la administración de la miel.

6.1 Medición de la superficie articular de la articulación radio carpal.

Con el fin de conocer cuántas UI de insulina se requerían para poder inducir mitosis en condrocitos de una articulación, se midió la superficie de cartílago articular de la articulación radiocarpal, ya que a partir del cultivo celular la superficie donde se observó mitosis fue en cultivos de 75 cm^2. Se utilizó un espécimen de un caballo de raza Warmblood de aproximadamente 500 kg. El procedimiento fue el siguiente:

- Enmascarillado de la superficie articular.
- Extracción del desarrollo de la superficie articular de cada hueso.
- Trazado con el programa Rhinoceros versión 4.0.
- Escalado.
- Uso de un comando para delimitar el área de cada uno de los desarrollos obtenidos.
- Suma del área de cada hueso para un total de 92.462 cm^2. *(Figuras 16-18)*





Figuras 16-18. Mapeo de la superficie articular en dos dimensiones de un espécimen de raza *Warmblood* de 500 kg. El recuadro en la esquina superior derecha (imagen 1) muestra una escala de 100 cm^2 de área de superficie.
Azul.- Hueso radial, area: 24.729 cm^2
Verde.- Hueso intermedio del carpo. Área: 16.839 cm^2
Rojo.- Hueso ulnar del carpo. Área: 6.478 cm^2
Morado.- Hueso accesorio del carpo. Área: 5.527 cm^2
Café.- Radio. Área: 45.887 cm^2
Área total: 92.642 cm^2

Para extrapolar la dosis se realizó una regla de 3 de la siguiente manera:

50 ng/ml $\longrightarrow$ 75 cm^2

X $\longrightarrow$ 92.462 cm^2

X=61.6 ng/ml

Partiendo del cultivo celular, se infiere que 61.6 ng de insulina por ml de líquido sinovial son necesarios para obtener mitosis en condrocitos. La cantidad de líquido sinovial en la articulación radiocarpal es de 11.67±3.28 ml.[22]

Tomando en cuenta que una UI de insulina equivale a 45.5 µg entonces:

45.5 µg $\longrightarrow$ 1 UI

61.6 µg⟶ X

X=1.35 UI de insulina serían necesarias para inducir mitosis en 92.462 cm^2 de superficie articular/µl.

Para una articulación de 11.67 ml, se requieren 0.00135 UI/ml, es decir que 0.0157545 UI de insulina son suficientes para inducir mitosis en la articulación radiocarpal de un caballo de 500 kg.

Este cálculo se refiere a que todo el cartílago articular (92.462 cm^2) presente en esa articulación requiere de mitosis; en una lesión de, por ejemplo 10 cm^2 se requerirían 0.000145 UI de insulina. En la práctica clínica, se han utilizado de manera empírica, dosis de 20 y 40 UI de insulina en articulaciones con osteoartritis sin reporte de efectos adversos, además, no se conoce si a esas dosis se está alcanzando un efecto benéfico o si es insuficiente para obtener un resultado determinado. En este estudio se utilizaron dosis de 10,15 y 20 UI de insulina, ya que los sujetos de estudio fueron de talla mediana.

Según estos cálculos a partir de cultivo celular, son dosis mucho mayores a lo que realmente se necesitaría, sin embargo el cultivo celular difiere del cartílago articular en su composición, también hay que tomar en cuenta cuánto del medicamento administrado realmente llegará a la lesión que se intenta tratar sin que éste sea metabolizado o expulsado de la articulación, por lo tanto se administraron dosis más elevadas de las que serían necesarias para inducir este efecto. Las dosis de 20 UI no sobrepasan la dosis intravenosa de insulina la cual se administra en infusión constante de 0.07 UI/kg/h, lo que significa que se

requieren 35 UI para un caballo de 500 kg en 24 horas. Con la finalidad de establecer el margen terapéutico se utilizaron dosis mayores a las necesarias.

Se eligió al azar a la articulación radiocarpal izquierda como tratamiento (insulina) y la radiocarpal derecha como control (Solución salina fisiológica o SSF 0.9%) del mismo caballo. Para las articulaciones control, el volumen utilizado de SSF, fue el mismo al equivalente usado en la articulación tratada, dependiendo de la dosis a utilizar y concentración/ml de insulina que presentó el producto. En este caso, se utilizó insulina Humalog Lispro ® (100UI/ml), de laboratorios Lilly® (Insulina recombinante elaborada por Eli Lilly and Company. Indianapolis, EUA).

Se midió glucosa sanguínea utilizando un glucómetro Accu-chek Performa® (elaborado por Laboratorios Roche, EUA) con una aguja calibre 25G, de la vena yugular, así como también glucosa en líquido sinovial utilizando el mismo glucómetro y tiras reactivas. Para los niveles sanguíneos se midió a una escala exponencial logarítmica empezando a los 10 y 30 minutos, posteriormente cada hora hasta las 8 horas y después cada 6 horas hasta las 74 horas después de la inyección *(Figura 19)*. Para el líquido sinovial se midió a las 2, 4 y 6 horas posteriores a la inyección. *(Figura 20)*

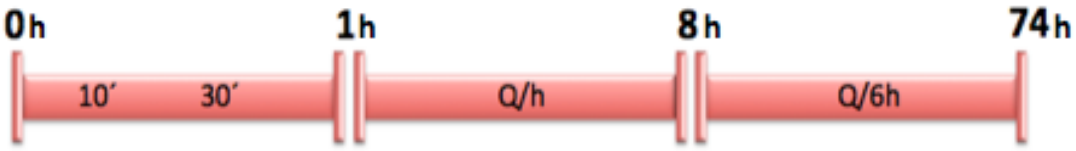


Figura 19. Línea de tiempo para medición de glucosa sanguínea posterior a la inyección de las 3 dosis utilizadas de insulina.

Se realizó un estudio citológico y físicoquímico, donde se evaluaron los siguientes parámetros: color, aspecto, celularidad, viscosidad, proteína, densidad y calidad del coágulo de mucina en el líquido articular antes de la inyección del medicamento tanto en la articulación en tratamiento como en la articulación control. Se midieron los mismos componentes a las 2, 4 y 6 horas posteriores a la inyección para las dosis de 15 UI y dependiendo del grupo que se tratara, ya que esto variaba gracias a la técnica de muestreo "*Naive pool sampling"* que permite evaluar los parámetros sin traumatizar la articulación por los muestreos repetidos y sacrificar significancia estadística, además de cuestiones de ética y bienestar animal.

También se midió la concentración de la insulina en el líquido sinovial utilizando cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) a los 30 minutos, 1, 2, 4, 6, 8 y 12 horas posteriores a la inyección. *(Figura 20)*

6.2 Cronograma

Los 6 caballos se dividieron de manera aleatoria en 3 grupos de 2 caballos cada uno y se denominaron Grupo 1, 2 y 3, para que los 6 caballos recibieran las 3 dosis diferentes. Así se obtuvo un modelo cruzado de 1 factor (insulina) y 3 niveles (las diferentes dosis utilizadas).

A las 2 semanas siguientes (periodo de *washout*), se repitió el proceso, pero el grupo 3 recibió 20 UI, el grupo 1 recibió 15 UI y el grupo 2 recibió 10 UI. Se dejaron descansar 2 semanas más y se recorrieron nuevamente los grupos para que el grupo 2 recibiera 20 UI, el grupo 3, 15 UI y el grupo 1, 10 UI. *(Figura 20, Cuadro1)*

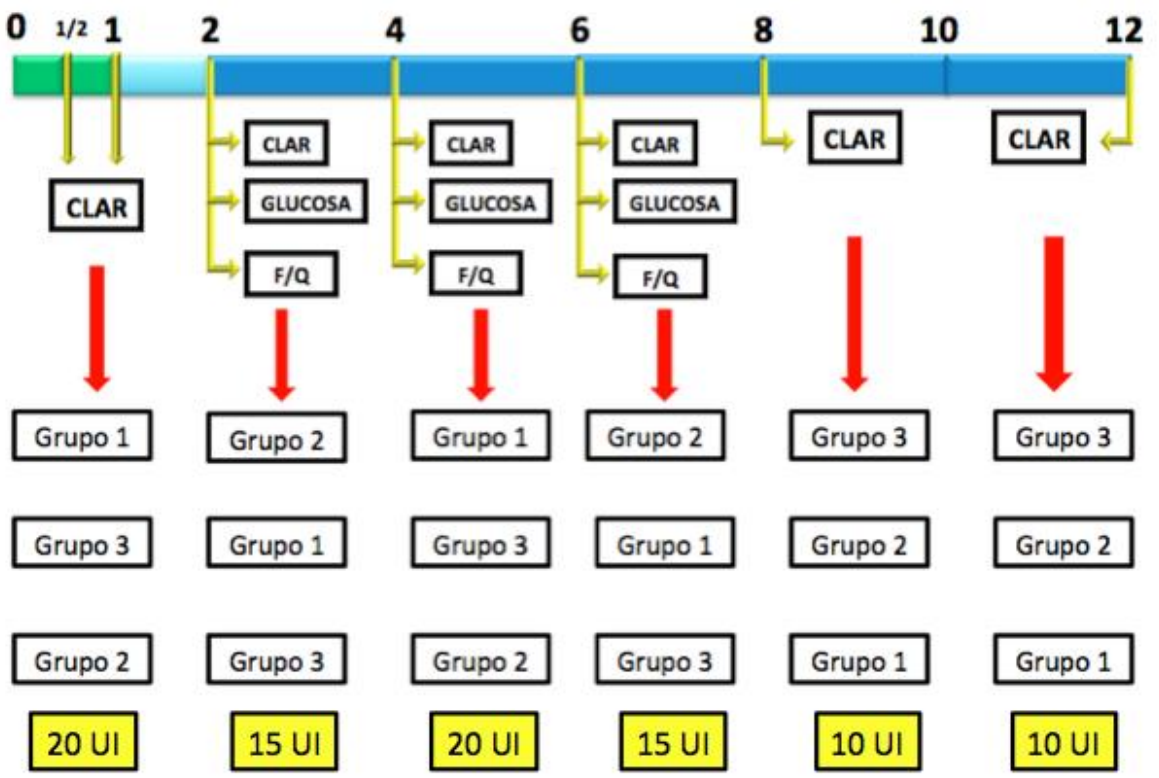


Figura 20. Cronograma en horas de los muestreos por grupo posteriores a la inyección de insulina. El recuadro amarillo indica la dosis que recibió cada grupo en los diferentes niveles.

CLAR. Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

F/Q. Examen Físicoquímico de líquido synovial

	Periodo de muestreo		
Grupos	**1**	**2**	**3**
1	20 UI	15 UI	10 UI
2	15 UI	10 UI	20 UI
3	10 UI	20 UI	15 UI

Cuadro 1. Se muestran la rotación del modelo cruzado, de los 3 grupos en los 3 diferentes periodos de la fase experimental en los cuales recibieron las 3 diferentes dosis de insulina (10, 15 y 20 UI).

6.3 Técnica de artrocentesis

Todas las punciones articulares fueron precedidas por la misma técnica antiséptica de la región, bajo el siguiente protocolo:

- Lavado con agua y jabón de todo el miembro, abarcando desde la mitad del antebrazo hasta el casco.
- Lavado quirúrgico de la región dorsal del carpo, utilizando iodopovidona espuma 3% y alcohol 96%.
- Con el miembro levantado en flexión y guantes estériles se realizó la artrocentesis con aguja de 1.5” calibre 21G, utilizando la aproximación dorsolateral de la articulación radiocarpal.[23]

Las muestras de líquido sinovial fueron colectadas en tubos de vacío sin anticoagulante, con su respectiva etiqueta indicando la dosis utilizada, el análisis a realizar (CLAR o F/Q) y el nombre del caballo correspondiente.

Todas las artrocentesis y muestreos sanguíneos se realizaron en las áreas de manejo en el Hospital para Équidos en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

6.4 Actividad física

Todos los caballos fueron caminados de mano por un mínimo de 10 minutos dos veces por día, durante toda la fase experimental del estudio.

6.5 Procesamiento de las muestras

Análisis físicoquímico de líquido sinovial

Las muestras de líquido sinovial fueron sometidas a un análisis físicoquímico y citológico en el laboratorio de Patología Clínica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM. Se colectaron en tubos de vacío sin EDTA, en cantidades variables, con una cantidad mínima de 1 ml.

El análisis subjetivo (color, aspecto, viscosidad y calidad de coágulo de mucina) se realizó de la siguiente manera:

Color

Inspección visual, tomando como normal el color amarillo paja.

Aspecto

Se evaluó la turbidez de la muestra, colocando el tubo ante un papel con letras, si era posible leer claramente a través de la muestra se consideró transparente, si se observaban las letras pero no con mucha claridad se consideró ligeramente turbio y si no era posible ver las letras a través de la muestra se consideró turbio.

Viscosidad

Se colocó una gota del líquido en un portaobjetos y con la ayuda de un palillo, se formaba una hebra; si ésta era de 2 cm o más se consideró como buena, si era menor de esa medida, se consideró como regular y si no presentaba formación de hebra se consideró como mala.

Calidad del coágulo de mucina

Se colocaron 5 ml de ácido acético al 20% en tubos de ensaye y se mezclaron con 2 gotas de micropipeta de líquido sinovial y se agitó la muestra, observando instantáneamente (2-5 segundos) la formación de coágulo. Si se formaba un coágulo instantáneo y compacto que no se deshacía al agitar el tubo se consideró como buena. Si éste coágulo se formaba pero no estaba tan compacto, y tendía a deshacerse o separarse al agitar la muestra se consideró como regular.

Celularidad

Se realizaron frotis con la técnica en *squash* de todas las muestras, para teñirse con *Diff-Quick.*

Las muestras también se montaron con pipetas de toma para glóbulos blancos en cámaras de Neubauer para observar la cantidad de células por ml de líquido sinovial. Se contaron las células presentes en los cuatro cuadrantes de las esquinas de la cámara y el resultado se dividió entre 20, para determinar la cantidad de células presentes ($x10^9$/L). Con la ayuda de los frotis teñidos se observó el tipo de células predominante (mononucleares o polimorfonucleares).

6.6 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) para medición de insulina y datos farmacocinéticos

Con el fin de obtener muestreos que pudieran introducirse en el programa Micromath PkAnalyst, se midió líquido sinovial de las articulaciones a la media hora, 1, 2, 3, 4 y 6 horas posteriores a la inyección de las diferentes dosis de insulina en las articulaciones tratamiento.

Se utilizó un cromatógrafo Jasco XLC® 3159AS para el análisis de las muestras. Se colectó como mínimo 1 ml de líquido sinovial en tubos de Eppendorf, los cuales se mantuvieron en congelación hasta el momento de su análisis. Las muestras fueron evaluadas mediante la técnica propuesta por Hafiz et al, 2013[37], en la cual se desproteiniza la muestra con acetonitrilo:propanol (1:1); la fase móvil consta de agua:acetonitrilo (1:1) y 1% de ácido trifluoroacético y una columna C18 (5µm 4.6 x 250 mm) utilizada para la separación con una recuperación del 98.5% y un coeficiente de variación del 5%. Los límites de detección y cuantificación fueron de 0.39 µg/mL y 0.13 µg/mL respectivamente, con tiempos de elución de 20 min.

Con los resultados arrojados por el programa PkAnalyst, se corrió una ji^2 utilizando tablas de contingencia para evaluar la existencia de diferencias significativas entre los distintos parámetros arrojados por el programa, como son: tiempo de vida media (K_{AE_half}), tiempo de concentración máxima (T_{Conc_Max}) y tiempo de residencia (*Residence_Time*), para las diferentes dosis.

7. Resultados

7.1 Evaluaciones previas a la inyección de insulina

Ninguno de los 6 individuos presentó signos clínicos correspondientes a síndrome metabólico equino o resistencia a la insulina. *(Cuadro 2)*

Grupo 1	Edad (años)	Sexo (H, M, MC)*	Peso (kg)	Altura a la cruz (m)	Condición corporal (Henneke DR, et al. 1983) [31]	Escala de grasa cuello (Carter RA, et al. 2009) [32]	Presencia de ceños en casco
Caballo 1	7	H	465	1.69	4/9	1/5	No
Caballo 2	5	MC	322.5	1.43	5/9	2/5	No
Grupo 2							
Caballo 3	5	MC	323	1.43	6/9	2/5	No
Caballo4	5.5	H	351.2	1.46	6/9	2/5	No
Grupo 3							
Caballo 5	5.5	M	388.5	1.53	5/9	2/5	No
Caballo 6	2.5	MC	316.5	1.45	5/9	2/5	No
Promedio	5.08	-	361.11	1.49	5.1/9	1.83/5	-

Cuadro 2. Comparativo de características físicas y sus promedios en cada individuo incluido en el estudio.

**H.- Hembra*
MC.- Macho castrado
M.- Macho entero

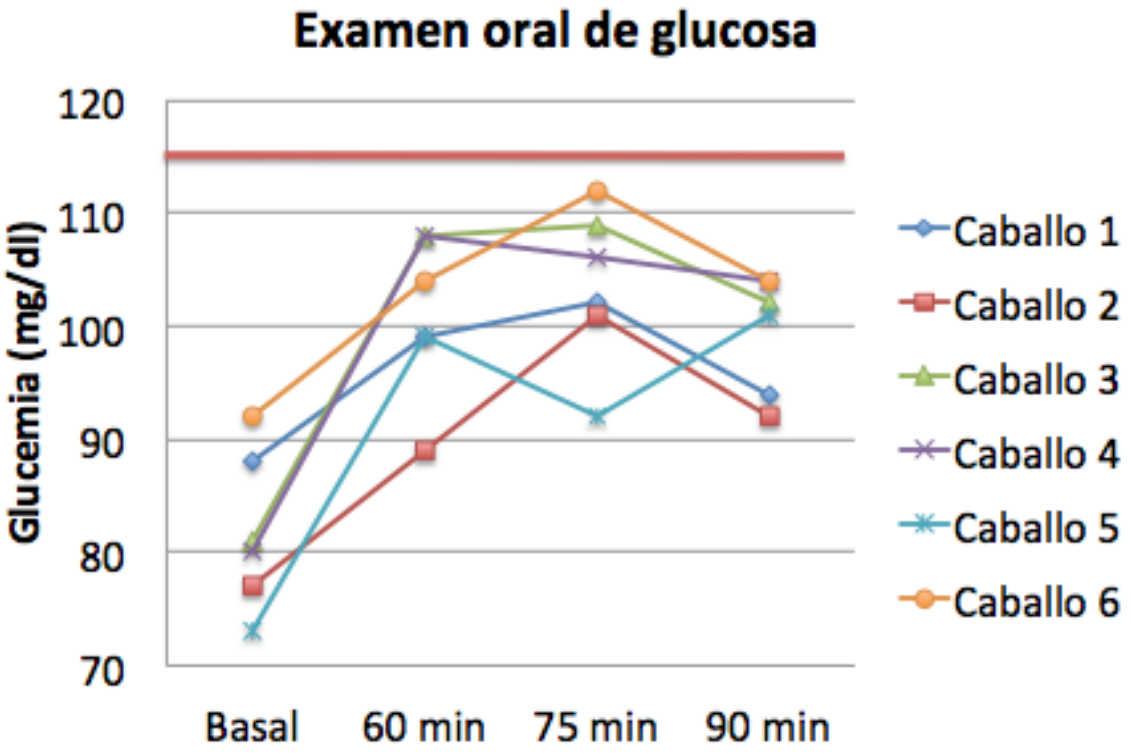
7.2 Examen oral de glucosa - *Oral Sugar Test*

Los 6 caballos fueron sometidos a un examen oral de glucosa. *(Cuadro 3, Gráfica 1)*

Tiempo de medición	Caballo 1	Caballo 2	Caballo 3	Caballo 4	Caballo 5	Caballo 6
Basal	88	77	81	80	73	92
60 min	99	89	108	108	99	104
75 min	102	101	109	106	92	112
90 min	94	92	102	104	101	104

Cuadro 3. Resultados obtenidos en el examen oral de azúcar *(Oral Sugar Test)* (Frank, 2011)[33].

- Unidades en mg/dl.



Gráfica 1. Glucemia obtenida durante el examen oral de glucosa. La línea roja denota el límite máximo permitido (115 mg/dl).

7.3 Examen clínico

Ningún caballo mostró signos de claudicación alguna durante la evaluación.

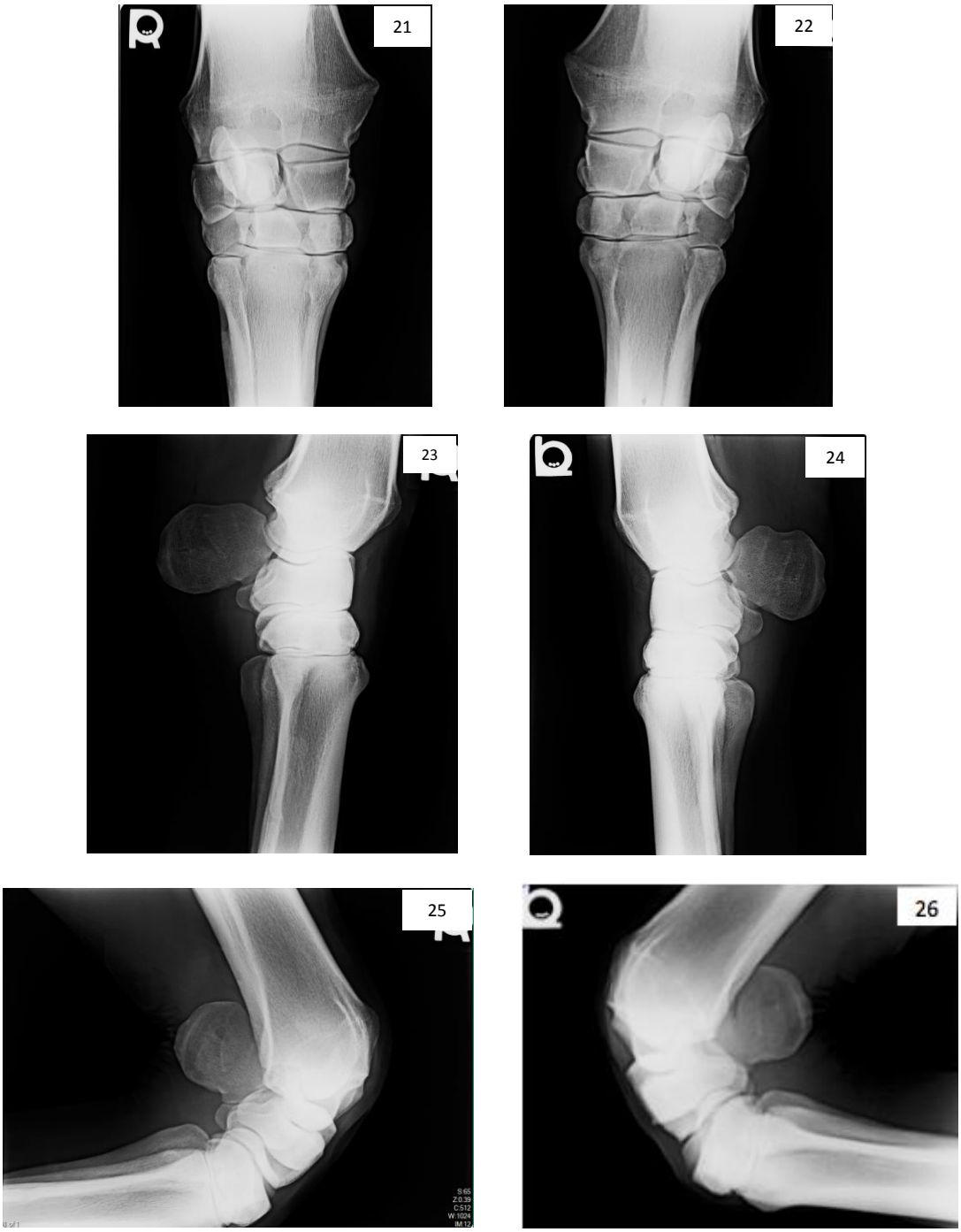
7.4 Estudio radiográfico

Ningún individuo presentó cambios radiográficos correspondientes a cualquier patología o proceso degenerativo en ninguna articulación radio-carpal (tratamiento y control). Ninguno mostró claudicación durante la evaluación clínica, ni tampoco cambios radiográficos que involucraran la articulación radio-carpal. *(Imágenes 21-36)*

7.5 Radiografías

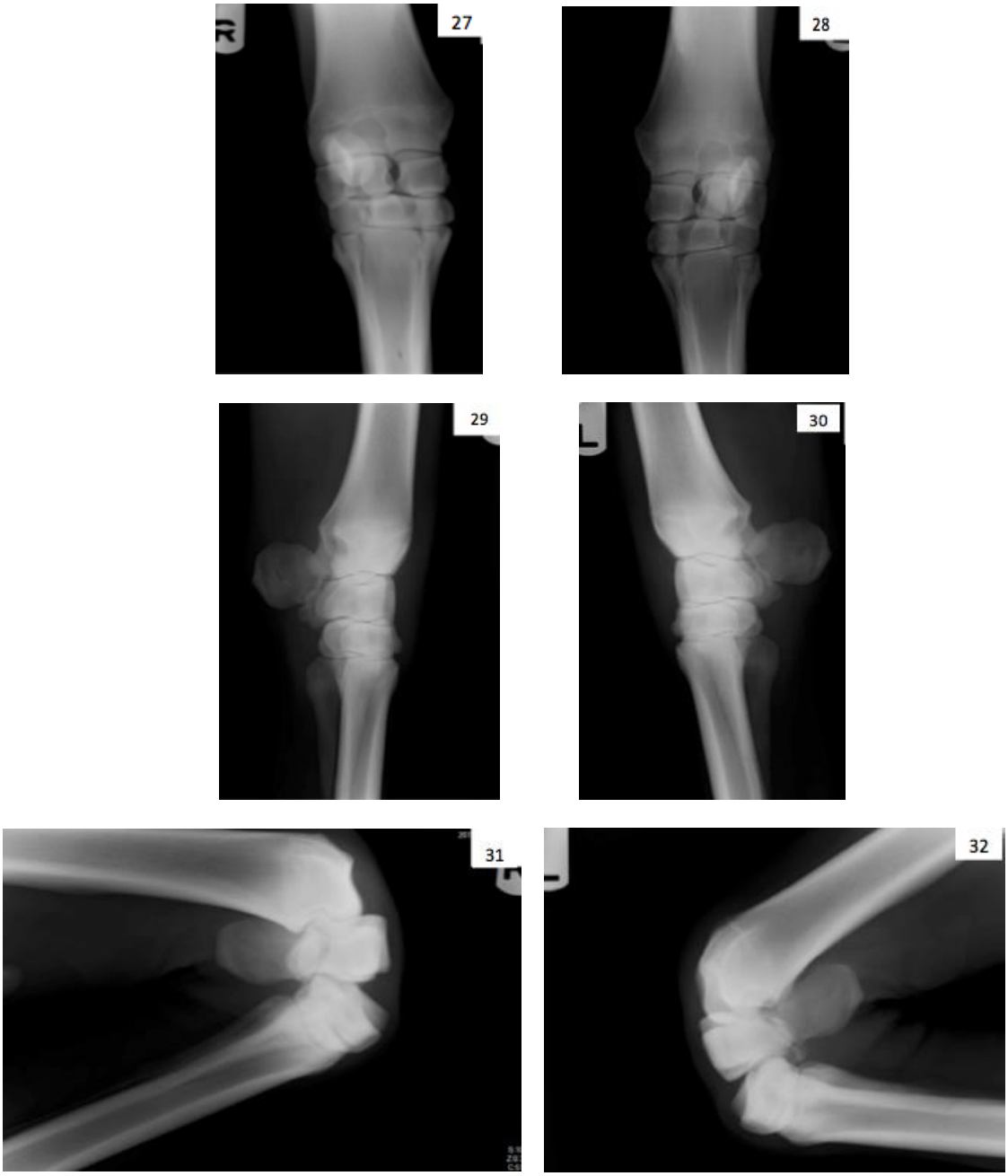
Grupo 1

Caballo 1:



Figuras 21-26. Estudio radiográfico de articulación del carpo de ambos miembros, tomas dorso-palmar (21-22), látero-medial (23-24) y látero-medial flexionada (25-26).

Caballo 2:



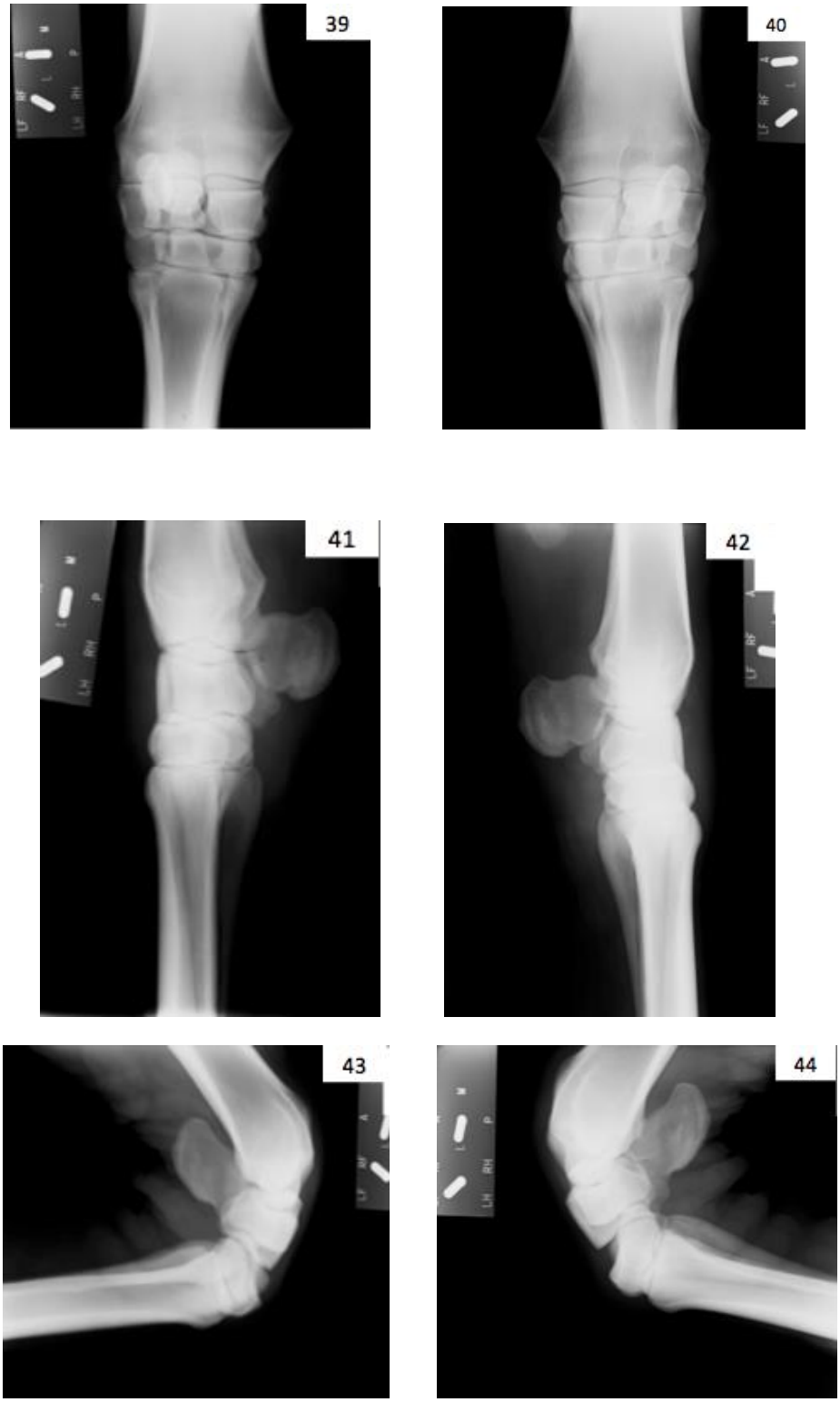
Figuras 27-32. Estudio radiográfico de articulación del carpo de ambos miembros, tomas dorso-palmar (27-28), látero-medial (29-30) y látero-medial flexionada (31-32).

Grupo 2

Caballo 3:

Figuras 33-38. Estudio radiográfico de articulación del carpo de ambos miembros, tomas dorso-palmar (33-34), látero-medial (35-36) y látero-medial flexionada (37-38).

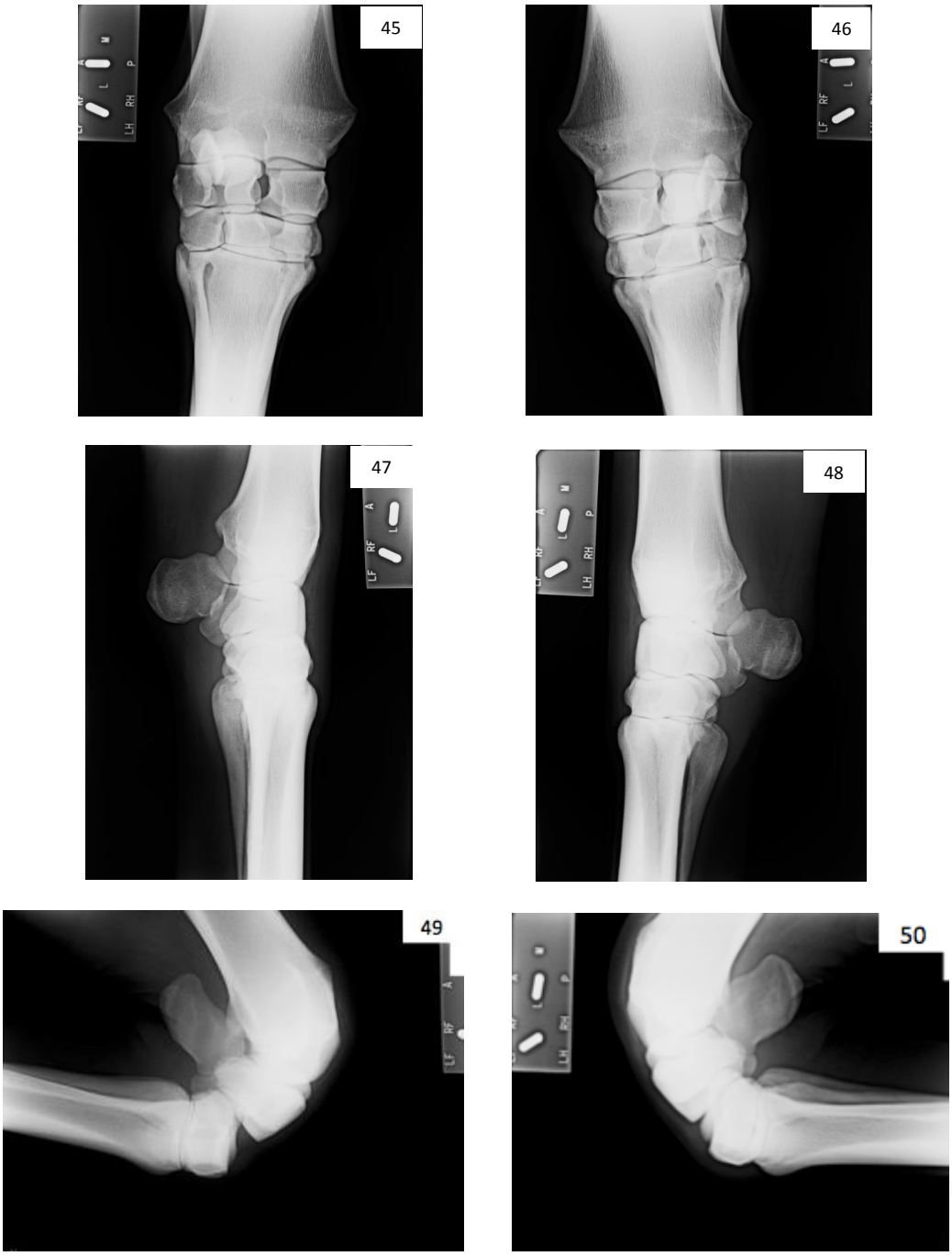
Caballo 4:



Figuras 39-44. Estudio radiográfico de articulación del carpo de ambos miembros, tomas dorso-palmar (39-40), látero-medial (41-42) y látero-medial flexionada (43-44).

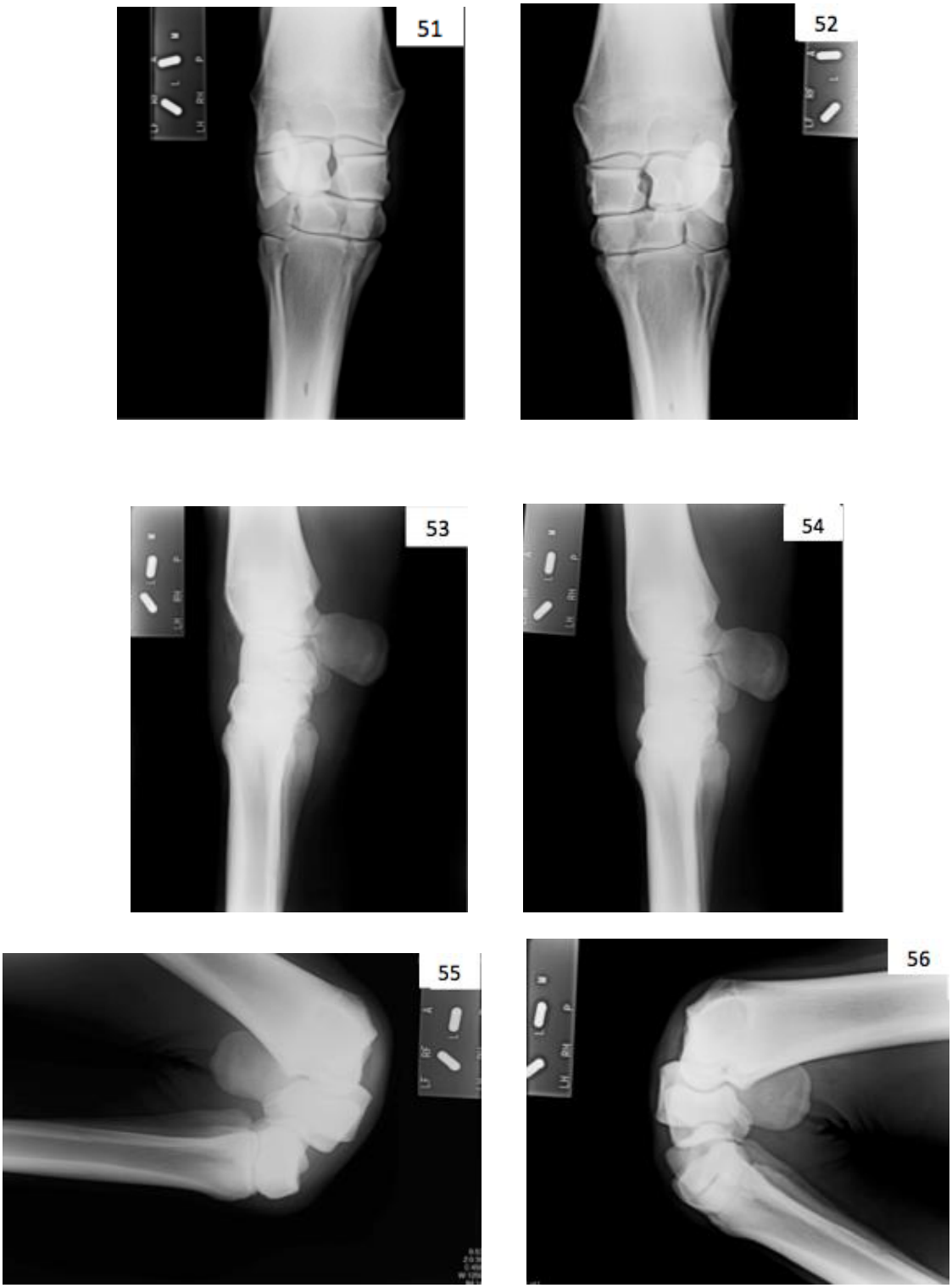
Grupo 3

Caballo 5:



Figuras 45-50. Estudio radiográfico de articulación del carpo de ambos miembros, tomas dorso-palmar (45-46), látero-medial (47-48) y látero-medial flexionada (49-50).

Caballo 6:



Figuras 51-56. Estudio radiográfico de articulación del carpo de ambos miembros, tomas dorso-palmar (51-52), látero-medial (53-54) y látero-medial flexionada (55-56).

7.6 Evaluación clínica posterior a la inyección

Se reevaluaron clínicamente a todos los individuos 24 horas después de cada inyección y ninguno presentó signología clínica de reacciones adversas incluyendo infección tanto en las articulaciones tratadas como en las control. Los perímetros de las articulaciones fueron medidas utilizando una cinta métrica graduada en centímetros, la cual se colocó justo por encima del hueso accesorio del carpo, para así medir sobre la articulación radio-carpal. *(Cuadro 4)*

Caballo	Claudicación	Dolor a la palpación	Calor a la palpación	Perímetro basal de la articulación (cm)* Tratamiento	Perímetro basal de la articulación (cm)* Control	Perímetro de la articulación (cm)* Tratamiento (24 h)	Perímetro de la articulación (cm)* Control (24h)
1	No	No	No	34.5	34.5	34.5	34.5
2	No	No	No	28	28	28	28
3	No	No	No	28.5	28.5	28.5	28.5
4	No	No	No	28.5	28.5	28.5	28.5
5	No	No	No	30	30	30	30
6	No	No	No	28	28	28	28

Cuadro 4. Resultados de la evaluación clínica de las articulaciones control y tratamiento a las diferentes dosis.
*Promedio de cada caballo en las 3 diferentes dosis.

7.7 Análisis físicoquímico

Se observaron cambios en color, apariencia y celularidad, también en proteínas y número de células (las cuales fueron eritrocitos), al comparar muestras basales y a las diferentes horas de muestreo para las dosis que se utilizaron, tanto en las articulaciones tratadas con insulina como en las control (SSF). *(Cuadros 5-10, Figura 57)*

Grupo 1

Dosis: 15UI							
Caballo 1							
	Tratamiento			**Control**			**Valor de Referencia**
Parámetro	**Basal**	**2h**	**6h**	**Basal**	**2h**	**6h**	
Color	Amarillo paja	Amarillo paja	Amarillo paja	Amarillo paja	Rojizo	Rojizo	Amarillo paja
Apariencia	Transparente	Turbio +	Transparente	Transparente	Turbio +	Turbio++	Transparente
Proteína (g/L)	14	15	13	10	13	14	05- 25
Conteo celular ($x10^9$/L)	0.5	0.25	0.0	0.05	0.1	0.2	0.2-0.9
Viscosidad	Buena	Buena	Buena	Buena	Buena	Buena	Muy Buena-Buena
Calidad de coágulo de mucina	Buena	Buena	Buena	Buena	Buena	Buena	Muy Buena-Buena
Caballo 2							
Parámetro	**Basal**	**2h**	**6h**	**Basal**	**2h**	**6h**	
Color	Amarillo paja	Amarillo paja	Amarillo paja	Amarillo paja	Rojizo	Rojizo	Amarillo paja
Apariencia	Transparente	Turbio ++	Transparente	Transparente	Turbio +	Turbio ++	Transparente
Proteína (g/L)	10	12	15	9	9	10	05- 25
Conteo celular ($x10^9$/L)	0.25	0.15	0.2	0.05	0.1	1.0	0.2-0.9
Viscosidad	Buena	Buena	Buena	Buena	Buena	Buena	Muy Buena-Buena
Calidad de coágulo de mucina	Buena	Buena	Buena	Buena	Buena	Buena	Muy Buena-Buena

Cuadro 5. Se detalla un comparativo de los caballos del grupo 1 que fueron inyectados con 15 UI de insulina por vía intraarticular, demostrando los parámetros basales tanto de la articulación tratamiento como la articulación control en diferente tiempo después de la inyección (2 y 6h). Los recuadros amarillos indican alguna alteración en el parámetro.

Grupo 1

Dosis: 20UI					
Caballo 1					
	Tratamiento		**Control**		**Valor de Referencia**
Parámetro	**Basal**	**4h**	**Basal**	**4h**	
Color	Amarillo paja	Rojizo	Amarillo paja	Rojizo	Amarillo paja
Apariencia	Turbio +	Turbio ++	Transparente	Turbio ++	Transparente
Proteína (g/L)	18	18	15	17	05- 25
Conteo celular ($x10^9$/L)	0.15	0.3	0.1	0.15	0.2-0.9
Viscosidad	Buena	Buena	Buena	Buena	Muy buena-Buena
Calidad de coágulo de mucina	Buena	Buena	Buena	Buena	Muy Buena-buena
Caballo 2					
Parámetro	**Basal**	**4h**	**Basal**	**4h**	
Color	Rojizo	Rojizo	Amarillo paja	Rojizo	Amarillo paja
Apariencia	Turbio +	Turbio ++	Transparente	Turbio ++	Transparente
Proteína (g/L)	14	10	9	13	05- 25
Conteo celular ($x10^9$/L)	0.2	0.7	0.1	1.2	0.2-0.9
Viscosidad	Buena	Buena	Buena	Buena	Muy Buena-Buena
Calidad de coágulo de mucina	Buena	Buena	Buena	Buena	Muy Buena-buena

Cuadro 6. Comparativo de los caballos del grupo 1 que fueron inyectados con 20 UI de insulina por vía intraarticular, demostrando los parámetros basales tanto de la articulación tratamiento como la articulación control a las 4 horas posteriores a la inyección. Los recuadros amarillos indican alguna alteración en el parámetro.

Grupo 2

Dosis: 15UI							
Caballo 3							
	Tratamiento			**Control**			**Valor de Referencia**
Parámetro	**Basal**	**2h**	**6h**	**Basal**	**2h**	**6h**	
Color	Amarillo paja	Rojizo	Rojizo	Amarillo paja	Rojizo	Rojizo	Amarillo paja
Apariencia	Transparente	Turbio +++	Turbio+++	Transparente	Turbio ++	Turbio+++	Transparente
Proteína (g/L)	14	12	14	10	12	14	05- 25
Conteo celular ($x10^9$/L)	0.05	0.05	0.3	0.05	0.2	1.6	0.2-0.9
Viscosidad	Muy Buena	Muy Buena	Buena	Muy Buena	Muy Buena	Regular	Muy buena-Buena
Calidad de coágulo de mucina	Buena	Buena	Buena	Buena	Regular	Regular	Muy buena-Buena
Caballo 4							
Parámetro	**Basal**	**2h**	**6h**	**Basal**	**2h**	**6h**	
Color	Amarillo paja	Rojizo	Rojizo	Amarillo paja	Rojizo	Rojizo	Amarillo paja
Apariencia	Transparente	Transparente	Turbio +	Transparente	Turbio +	Turbio ++	Transparente
Proteína (g/L)	10	10	12	7	9	10	05- 25
Conteo celular ($x10^9$/L)	0.0	0.0	0.8	0.05	0.7	1.0	0.2-0.9
Viscosidad	Buena	Buena	Regular	Buena	Buena	Buena	Muy buena-Buena
Calidad de coágulo de mucina	Buena	Buena	Buena	Buena	Buena	Buena	Muy buena-Buena

Cuadro 7. Se detalla un comparativo de los caballos del grupo 2 que fueron inyectados con 15 UI de insulina por vía intraarticular, demostrando los parámetros basales tanto de la articulación tratamiento como la articulación control en diferente tiempo después de la inyección (2 y 6h). Los recuadros amarillos indican alguna alteración en el parámetro.

Grupo 2

Dosis: 20UI					
Caballo 3					
	Tratamiento		**Control**		**Valor de Referencia**
Parámetro	**Basal**	**4h**	**Basal**	**4h**	
Color	Amarillo paja	Rojizo	Amarillo paja	Amarillo paja	Amarillo paja
Apariencia	Transparente	Turbio +	Transparente	Transparente	Transparente
Proteína (g/L)	16	11	13	13	05- 25
Conteo celular ($x10^9$/L)	0.1	0.3	0.05	0.2	0.2-0.9
Viscosidad	Buena	Buena	Buena	Buena	Muy buena-Buena
Calidad de coágulo de mucina	Buena	Buena	Buena	Buena	Muy buena-Buena
Caballo 4					
Parámetro	**Basal**	**4h**	**Basal**	**4h**	
Color	Amarillo paja	Rojizo	Amarillo paja	Rojizo	Amarillo paja
Apariencia	Transparente	Turbio ++	Transparente	Turbio ++	Transparente
Proteína (g/L)	6	18	9	8	05- 25
Conteo celular ($x10^9$/L)	0.05	0.3	0.05	0.1	0.2-0.9
Viscosidad	Buena	Regular	Buena	Regular	Muy buena-Buena
Calidad de coágulo de mucina	Buena	Regular	Buena	Buena	Muy buena-Buena

Cuadro 8. Comparativo de los caballos del grupo 2 que fueron inyectados con 20 UI de insulina por vía intraarticular, demostrando los parámetros basales tanto de la articulación tratamiento como la articulación control a las 4 horas posteriores a la inyección. Los recuadros amarillos indican alguna alteración en el parámetro.

Grupo 3

Dosis: 15UI							
Caballo 5							
	Tratamiento			**Control**			**Valor de Referencia**
Parámetro	**Basal**	**2h**	**6h**	**Basal**	**2h**	**6h**	
Color	Amarillo paja	Rojizo	Rojizo	Amarillo paja	Rojizo	Rojizo	Amarillo paja
Apariencia	Transparente	Turbio ++	Turbio+++	Transparente	Turbio ++	Turbio+++	Transparente
Proteína (g/L)	10	18	14	8	12	14	05- 25
Conteo celular ($x10^9$/L)	0.05	0.2	3.8	0.05	0.2	1.6	0.2-0.9
Viscosidad	Buena	Buena	Regular	Buena	Regular	Regular	Muy buena-Buena
Calidad de coágulo de mucina	Buena	Buena	Regular	Buena	Regular	Regular	Muy buena-Buena
Caballo 6							
Parámetro	**Basal**	**2h**	**6h**	**Basal**	**2h**	**6h**	
Color	Amarillo paja	Rojizo	Rojizo	Amarillo paja	Rojizo	Rojizo	Amarillo paja
Apariencia	Transparente	Turbio +	Turbio ++	Transparente	Turbio +	Turbio ++	Transparente
Proteína (g/L)	8	7	6	7	16	6	05- 25
Conteo celular ($x10^9$/L)	0.1	0.1	0.2	0.05	0.6	0.2	0.2-0.9
Viscosidad	Buena	Buena	Buena	Buena	Regular	Buena	Muy buena-Buena
Calidad de coágulo de mucina	Buena	Buena	Buena	Buena	Buena	Buena	Muy buena-Buena

Cuadro 9. Comparativo de los caballos del grupo 3 que fueron inyectados con 15 UI de insulina por vía intraarticular, demostrando los parámetros basales tanto de la articulación tratamiento como la articulación control en diferente tiempo después de la inyección (2 y 6h). Los recuadros amarillos indican alguna alteración en el parámetro.

Grupo 3

Dosis: 20UI					
Caballo 5					
	Tratamiento		**Control**		**Valor de Referencia**
Parámetro	**Basal**	**4h**	**Basal**	**4h**	
Color	Amarillo paja	Rojizo	Amarillo paja	Rojizo	Amarillo paja
Apariencia	Transparente	Turbio ++	Transparente	Turbio +++	Transparente
Proteína (g/L)	8	6	10	8	05- 25
Conteo celular (x10^9/L)	0.05	0.2	0.05	0.1	0.2-0.9
Viscosidad	Buena	Buena	Buena	Buena	Muy buena-Buena
Calidad de coágulo de mucina	Buena	Buena	Buena	Buena	Muy buena-Buena
Caballo 6					
Parámetro	**Basal**	**4h**	**Basal**	**4h**	
Color	Amarillo paja	Rojizo	Amarillo paja	Rojo	Amarillo paja
Apariencia	Transparente	Turbio ++	Transparente	Turbio +++	Transparente
Proteína (g/L)	8	8	8	9	05- 25
Conteo celular (x10^9/L)	0.05	0.4	0.1	1.6	0.2-0.9
Viscosidad	Buena	Regular	Buena	Buena	Muy buena-Buena
Calidad de coágulo de mucina	Buena	Regular	Buena	Buena	Muy buena-Buena

Cuadro 10. Comparativo de los caballos del grupo 3 que fueron inyectados con 20 UI de insulina por vía intraarticular, demostrando los parámetros basales tanto de la articulación tratamiento como la articulación control a las 4 horas posteriores a la inyección. Los recuadros amarillos indican alguna alteración en el parámetro.

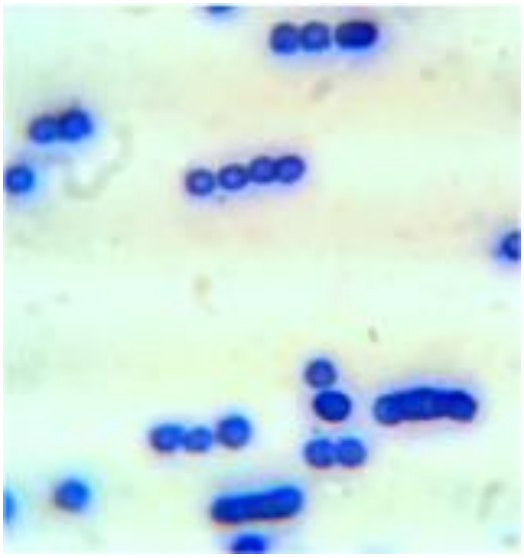


Figura 57. Microfotografía de una muestra de líquido sinovial obtenida del caballo #4 a dosis de 20 UI de insulina, usada como ejemplo, donde la muestra tuvo apariencia turbia con color rojizo. Se observan eritrocitos en arreglos estilo "Roulleau", lo cual es característico en el líquido sinovial gracias a la mucina presente. Tinción Diff-Quik (10x).

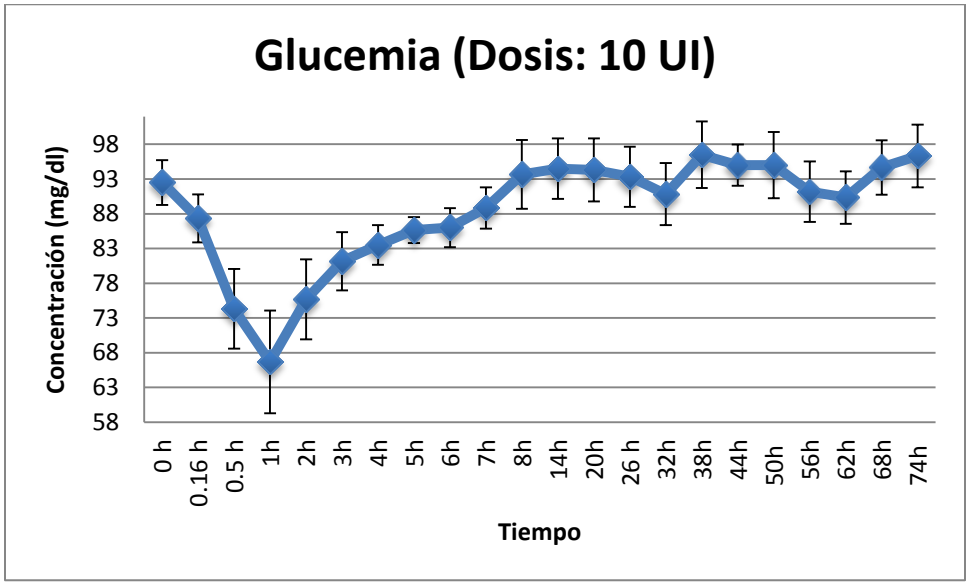
Análisis estadístico

Se compararon los niveles de proteína sinovial y conteo celular sinovial entre las articulaciones tratadas y las articulaciones control sin encontrar diferencias significativas tanto para la dosis de 15 UI (Proteína 2 horas ANOVA $F^{0.750}_{1}$= 0.069, *P= 0.798*, a las 6 horas F^{3}_{1}= 0.281, *P=0.607*; conteo celular basal ANOVA $F^{0.035}_{1}$=1.988, *P=0.189*, 2 horas $F^{0.110}_{1}$=2.811, *P=0.125*, 6 horas $F^{0.008}_{1}$=0.006, *P=0.940*), como para la de 20 UI (Proteína basal ANOVA F^{3}_{1}=0.187, *P=0.675*, 4 horas $F^{0.750}_{1}$= 0.039, *P=0.848;* conteo celular basal ANOVA $F^{0.002}_{1}$=0.789, *P=0.395*, 4 horas Friedman X^{2}_{1}=0.667, *P=0.414*). Sin embargo, para la dosis de 15 UI, los niveles de proteína basales de la articulación tratamiento, fueron

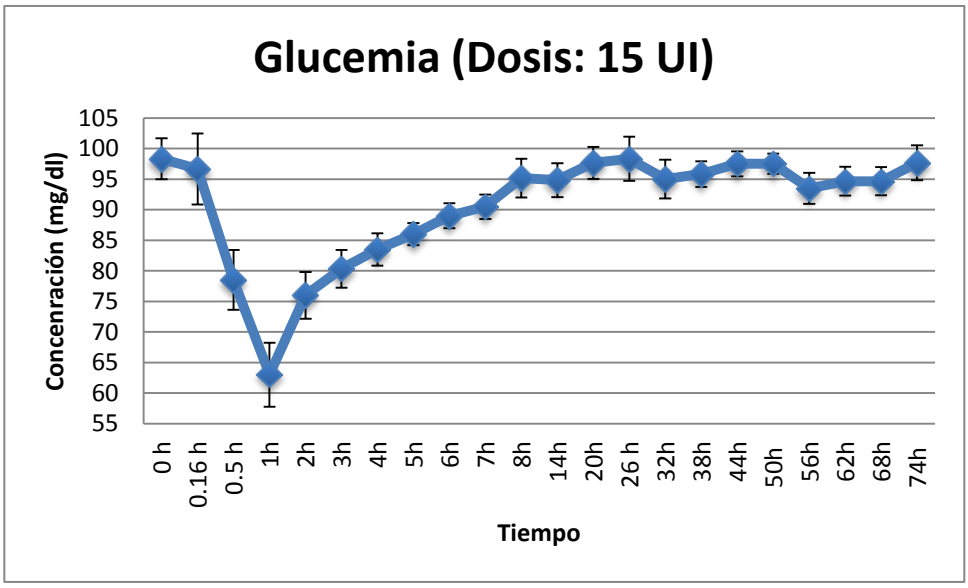
estadísticamente diferentes (Friedman X^2_1= 6, *P<0.05*) de los niveles de proteína sinovial basal en articulaciones control.

7.8 Glucosa sanguínea

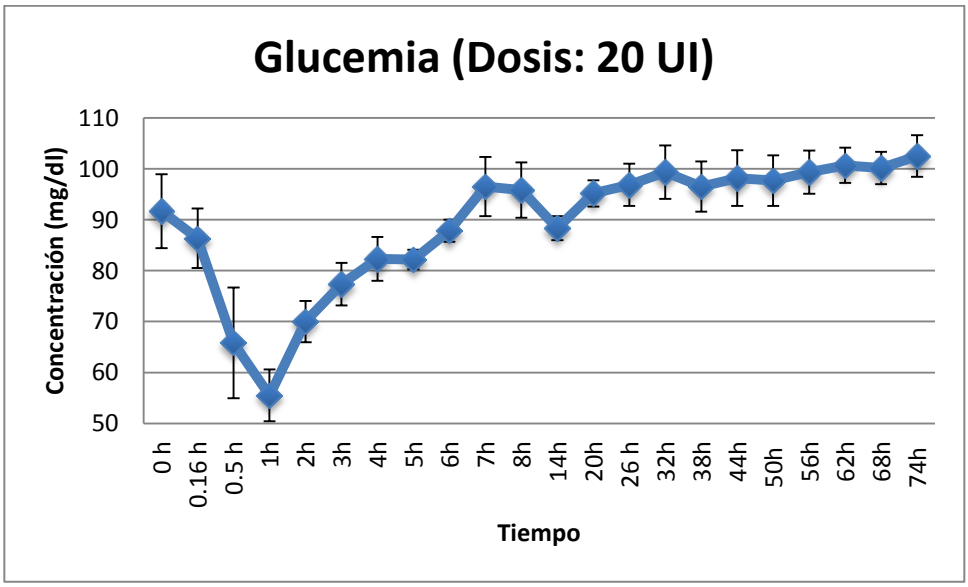
Todos los caballos inyectados con las diferentes dosis de insulina mostraron una baja importante de la glucemia a los 30 min y 1 hora posterior a la inyección intraarticular de la insulina. Al utilizar la dosis de 10 UI presentaron una disminución a los 30 min y una hora después de la inyección, sin embargo, no fue tan notoria como con las dosis de 15 UI y más aún con las dosis de 20 UI. *(Gráficas 2-4)*



Gráfica 2. Promedio de glucosa sanguínea de los 6 caballos inyectados con una dosis de 10 UI.



Gráfica 3. Promedio de glucosa sanguínea de los 6 caballos inyectados con una dosis de 15 UI.



Gráfica 4. Promedio de glucosa sanguínea de los 6 caballos inyectados con una dosis de 20 UI.

Análisis estadístico de los niveles de glucosa sanguínea

Mediante el uso del programa *SigmaPlot® 11.0*, se determinó la normalidad de los datos de la concentración de glucosa en sangre a través del tiempo mediante una prueba de Shapiro-Wilkinson; se encontró que la concentración de glucosa en los individuos en los diferentes muestreos, no tiene una distribución normal para la dosis de 10 y 20 UI de insulina; mientras que para las dosis de 15 UI sí se encontró una distribución normal.

Los muestreos obtenidos donde se utilizaron dosis de 10 y 20 UI de insulina (distribuciones no normales), mantuvieron una distribución no normal a pesar de ser transformados (log_{10} y raíz cuadrada). Por lo tanto, dado que se realizaron las tomas de glucosa en sangre en los mismos individuos en cada uno de los 22 diferentes muestreos, se realizó un análisis de varianza *(ANOVA)* de medidas repetidas para la distribución normal (15 UI) y un análisis de varianza (*ANOVA)* de Friedman (10 y 20 UI) para las distribuciones no normales. En los análisis, en los 22 periodos de tiempo, los individuos se consideraron como bloques y la glucosa en sangre como la variable (Zar 1999)[35]. En caso de existir diferencias significativas, se calculan los residuales estándares corregidos para evaluar en cuál celda observada difirió más de lo esperado (Quinn y Keough 2002)[36], mediante pruebas post hoc (Holm-Sidak, Tukey) para conocer qué muestreos difieren más entre ellos (Quinn y Keough 2002).[36]

Para determinar si existe una asociación entre la variación de la glucosa en sangre y la concentración (dosis) de la insulina utilizada, se utilizaron tablas de

contingencia de ji^2 (Zar 1999)[35]. En caso de existir diferencias significativas, se calcularon los residuales estándares corregidos para evaluar en cuál celda observada difirió más de lo esperado (Quinn y Keough 2002).[36]

Se encontraron diferencias significativas en los niveles de glucosa en sangre para los periodos de tomas de muestras, tanto para dosis de 10 UI de insulina (Friedman χ^2_{21}= 75.760, $P < 0.001$), de 15 UI (ANOVA F^{21}_2= 11.045, $P < 0.001$), y de 20 UI (Friedman χ^2_{21}= 75.904, $P < 0.001$).

La prueba post hoc (Holm-Sidak, Tukey) reveló que para todas las dosis de insulina utilizadas (10,15 y 20 UI), hay una diferencia significativa en el promedio de la concentración de glucosa sanguínea a la hora de haberse inyectado la insulina, al compararla con los demás muestreos sanguíneos.

No se encontró asociación entre la glucosa en sangre y las diferentes dosis de insulina utilizadas (10, 15 y 20 UI), tanto al comparar las concentraciones como bloque (10, 15 y 20UI ji^2_{100}=104, P= 0.372), como pareadas (10-15 UI ji^2_{34}=34.667, P = 0.436; 10-20 UI ji^2_{34}=41.333, P = 0.369; 15/20 UI ji^2_{34}=37.333, P= 0.318).

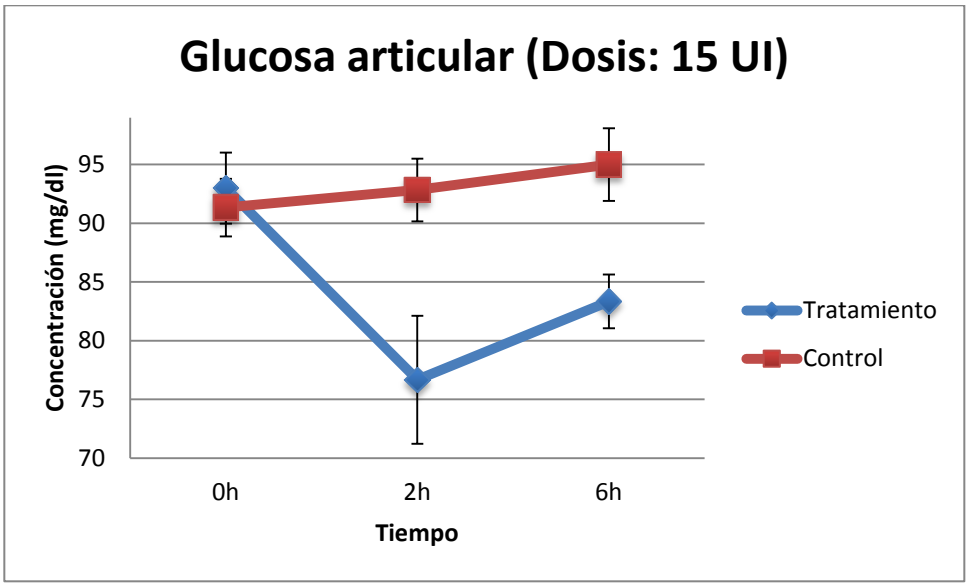
Los resultados de la respuesta individual (glucemia) de cada caballo en cada una de las 3 diferentes dosis se encuentran en el anexo I. Los resultados de los 6 caballos en las 3 dosis diferentes se encuentran en el anexo II.

7.9 Glucosa sinovial

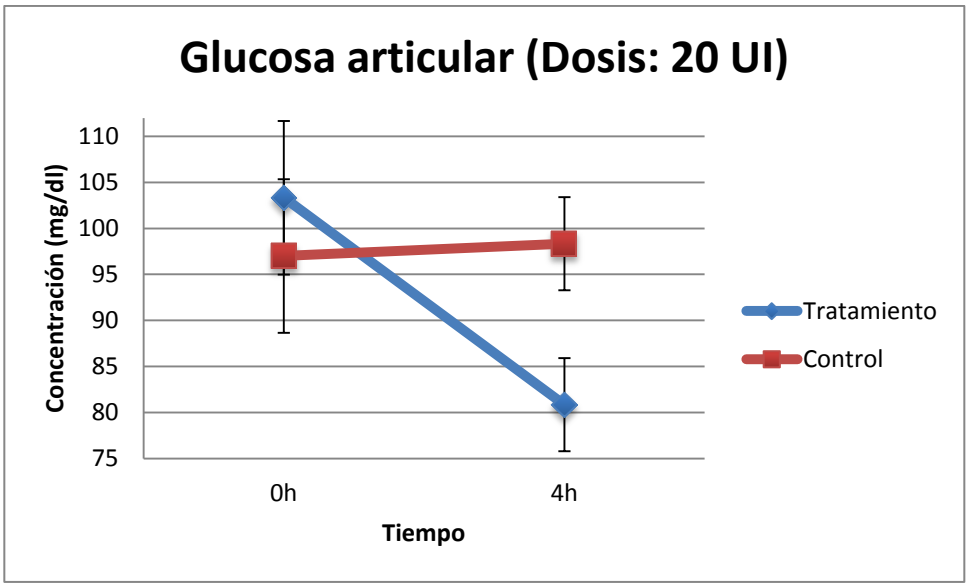
Los caballos con la dosis de 15UI también tuvieron disminución en la glucosa sinovial a las 2 y 6 horas. Se observa una notoria diferencia de las articulaciones tratadas y las control. *(Gráfica 5)*

Todos los caballos con la dosis de 20 UI presentaron una disminución en la glucosa a las 4 horas posteriores a la inyección. *(Gráfica 6)*

Sin embargo, la diferencia entre las articulaciones tratadas y las articulaciones control, no es estadísticamente significativa con ninguna de las dosis (15 y 20UI).



Gráfica 5. Promedio de glucosa en líquido sinovial de los 6 caballos inyectados con una dosis de 15 UI de insulina a las 2 y 6 horas.



Gráfica 6. Promedio de glucosa en líquido sinovial de los 6 caballos inyectados con una dosis de 20 UI de insulina a las 4 horas.

Análisis estadístico

Se compararon las concentraciones de glucosa en las articulaciones tratadas y en las control, sin encontrar diferencia estadísticamente significativa entre ellas, tanto para las dosis de 15 UI (ji^2_2=1.04, *P*= 0.5945) como para las de 20 UI (ji^2_1=1.41, *P*= 0.235).

Los resultados de la respuesta individual (glucosa individual) de cada caballo en cada una de las 3 diferentes dosis se encuentran en el anexo III.

7.10 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR)

Con el cronograma inicial, no fue posible detectar insulina en líquido sinovial para las muestras tomadas a las 8 y 12 horas posteriores a la inyección para las dosis de 10 UI. Las muestras de los 6 caballos de 15 UI tomadas a las 2 y 6 horas y las muestras a dosis de 20 UI tomadas a los 30 min, 1h y 4h, mostraron un pico de detección a los 16 ± 0.5 min. *(Figura 58)*

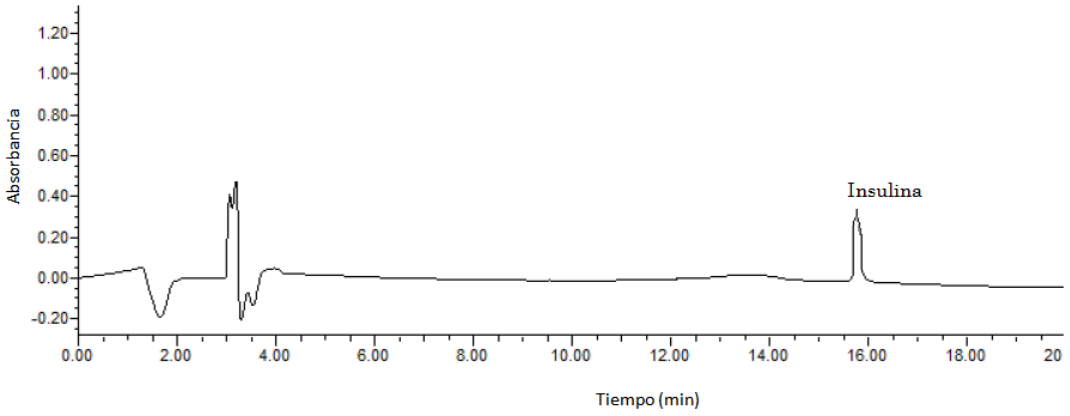


Figura 58.- Ejemplo de cromatograma obtenido donde se muestra el pico de absorbancia detectado de insulina a los 16 min de iniciada la prueba. Esto se observó en todas las muestras donde se detectó insulina en líquido sinovial.

Para poder establecer una curva de eliminación, fue necesario modificar los muestreos para CLAR de líquido sinovial, ya que no fue posible con los escasos muestreos para las diferentes dosis. *(Figura 59)*

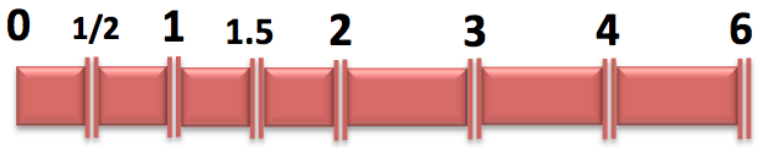


Figura 59. Línea de tiempo en horas que marca los diferentes muestreos modificados para obtener las diferentes concentraciones de insulina en líquido sinovial.

Se obtuvieron promedios de concentraciones de insulina en el líquido sinovial para las 3 dosis de insulina (10, 15 y 20 UI). *(Cuadros 11-13, Gráfica 7)*

Tiempo (horas)	Concentración (µg/ml)	Desviación estándar (SD)
0.5	1.25	0.34000
1	0.0	0.0
1.5	0.0	0.0
2	0.0	0.0
3	0.0	0.0
4	0.0	0.0
6	0.0	0.0

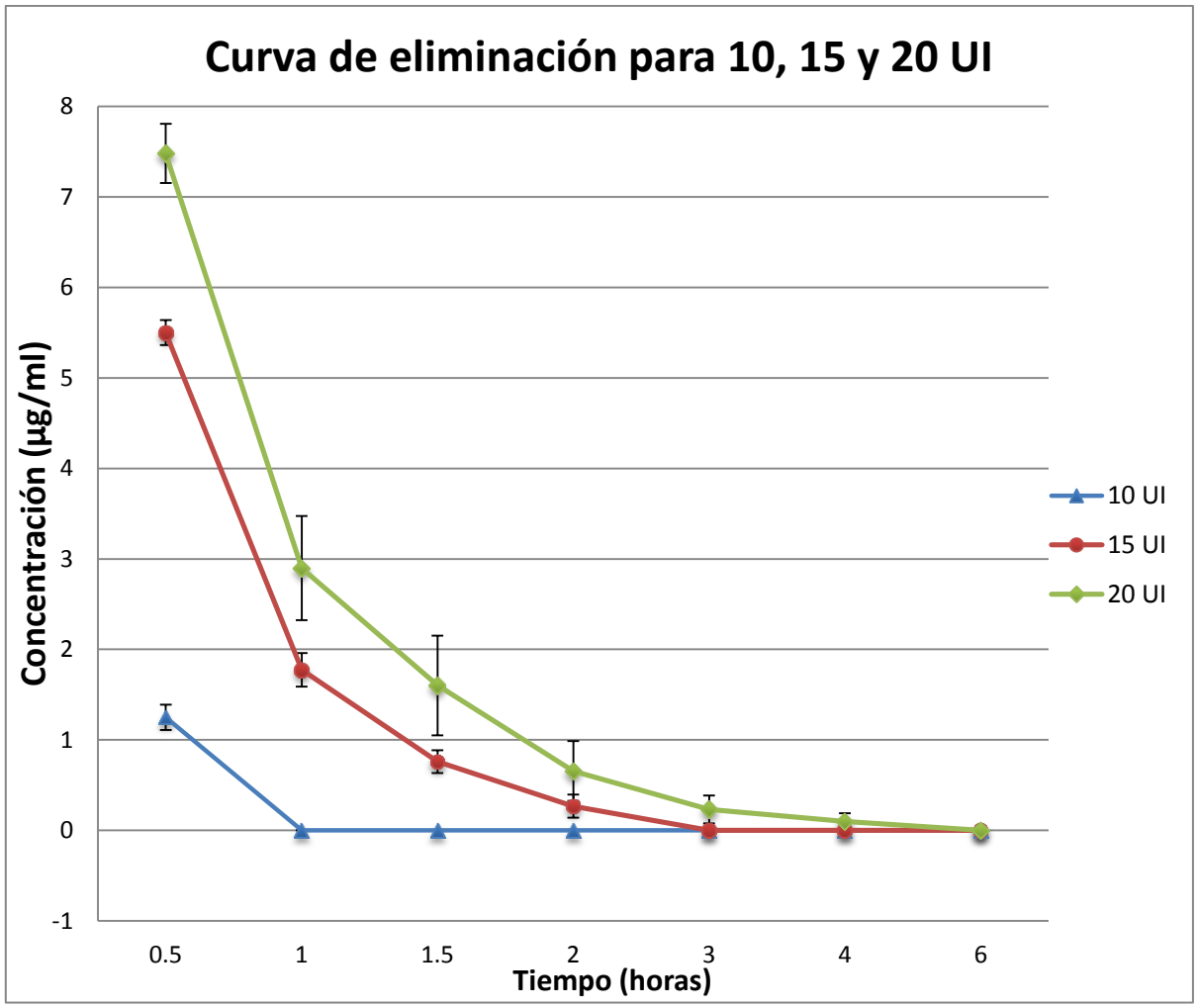
Cuadro 11. Promedio de las concentraciones obtenidas con CLAR de las articulaciones tratadas con insulina de los 6 caballos con dosis de 10 UI.

Tiempo (horas)	Concentración (µg/ml)	Desviación estándar (SD)
0.5	5.5	0.33912
1	1.774	0.45627
1.5	0.76	0.30854
2	0.268	0.3126
3	0.0	0.0
4	0.0	0.0
6	0.0	0.0

Cuadro 12. Promedio de las concentraciones obtenidas con CLAR de las articulaciones tratadas con insulina de los 6 caballos a dosis de 15 UI.

Tiempo (horas)	Concentración (µg/ml)	Desviación estándar (SD)
0.5	7.48	0.80436
1	2.898	1.40997
1.5	1.602	1.35086
2	0.656	0.80835
3	0.2325	0.37836
4	0.1	0.22361
6	0	0

Cuadro 13. Promedio de las concentraciones obtenidas con CLAR de las articulaciones tratadas con insulina de los 6 caballos a dosis de 20 UI.



Gráfica 7. Promedio de las concentraciones de insulina en líquido sinovial obtenidas con CLAR, para los 6 caballos con las 3 dosis utilizadas (10, 15 y 20 UI).

Análisis de datos farmacocinéticos

Los resultados obtenidos con CLAR, fueron analizados con el programa *MicroMath PkAnalyst*®, utilizando el modelo #5 de un compartimento con cinética de primer orden tanto de entrada como de salida.

Este modelo permite conocer las constantes de eliminación o absorción (que en este caso son iguales) y la relación volumen/dosis encontradas en las diferentes

mediciones de concentración en el compartimento en cierto tiempo. También reporta el área bajo la curva *(AUC)*, la vida media de eliminación o absorción (K_{AE_half}), el tiempo en el que se alcanzó la concentración máxima (T_{Conc_Max}) y el tiempo de residencia (*Residence_Time*). En los resultados obtenidos para la dosis de 15 UI, se observaron ligeros cambios en el tiempo de dichos parámetros, mismos que fueron menores a los observados en las dosis de 20 UI. *(Cuadros 14 y 15)*

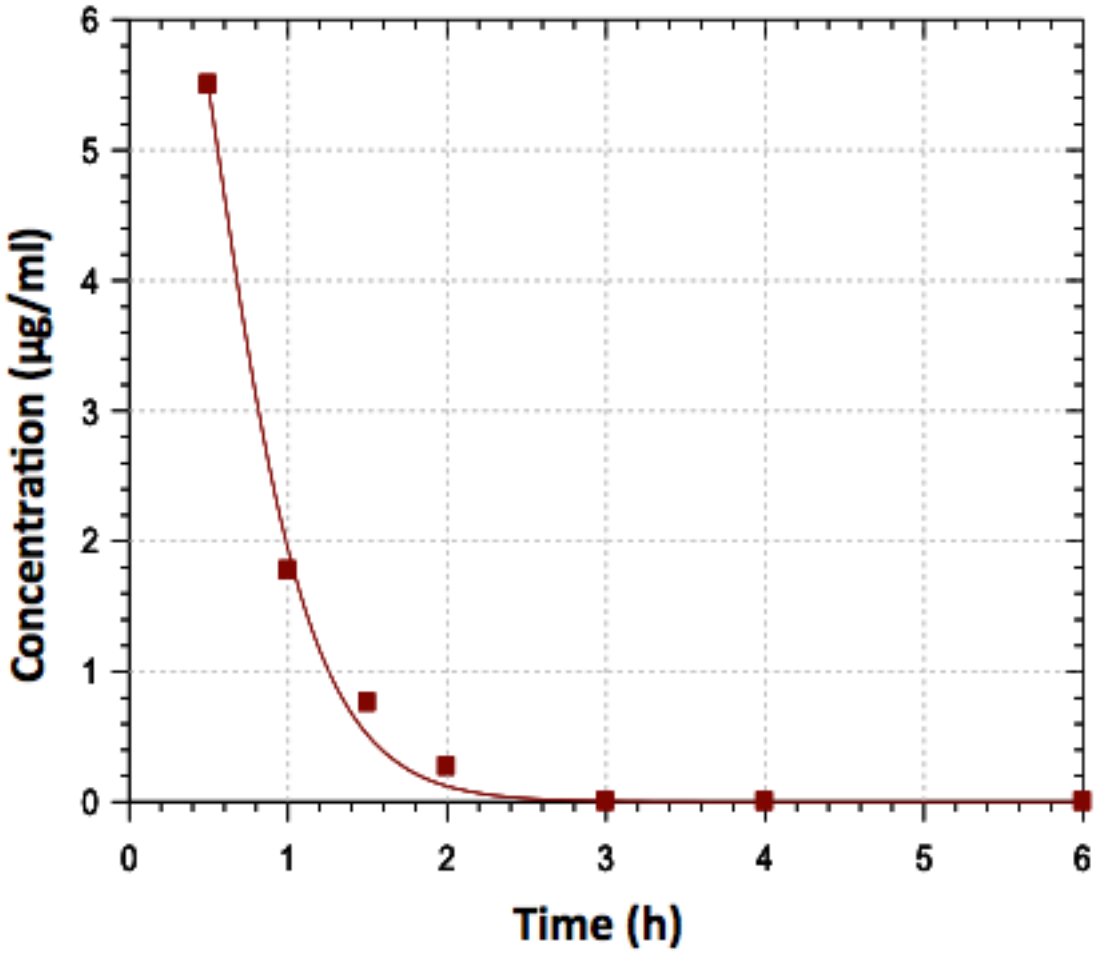
La variable independiente fue el tiempo y la dependiente la concentración. Los parámetros fueron volumen, dosis y la constante de eliminación K_{AE}. *(Gráficas 8 y 9).*

Prueba de ji^2 para las variables: *Vida media de eliminación, Tiempo de concentración máxima y Tiempo de residencia*

Se agruparon las 3 variables que se basan en el tiempo y se obtuvo ji^2_2= 0.03 *P*=0.9851. Este resultado indica que no existe una diferencia significativa entre las dosis de insulina de 15 UI y 20 UI para los parámetros vida media de eliminación, tiempo de concentración máxima y tiempo de residencia.

Parámetro calculado	Resultado	Tiempo en min
Vida media de eliminación (K_{AE_half})	0.199927931*	11.99
Tiempo de concentración máxima (T_{Conc_Max})	0.288435035*	17.30
Área bajo la curva (AUC)	5.15211030	NA**
Tiempo de residencia (*Residence_Time*)	0.576870070*	34.61

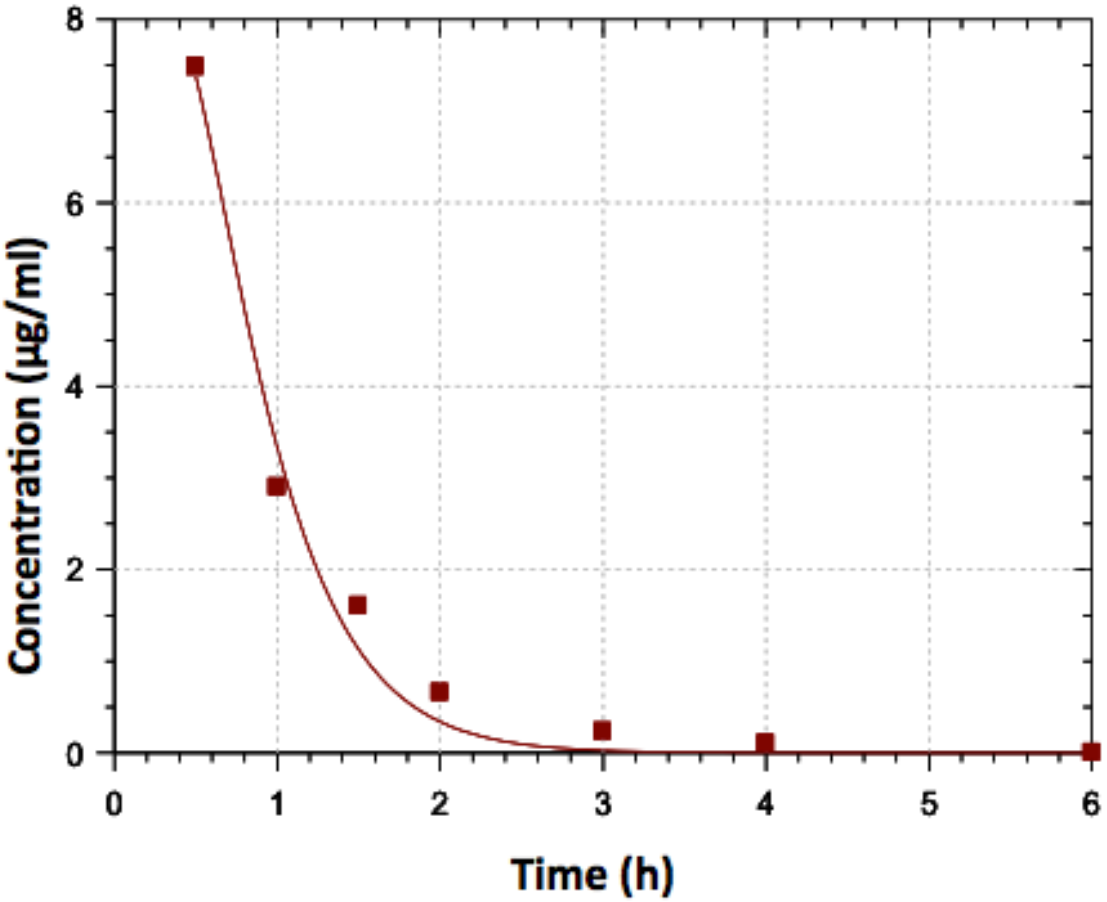
Cuadro 14. Resultados de parámetros farmacocinéticos calculados para la insulina intraarticular con dosis de 15 UI.
* *Tiempo en horas*
** *No aplica*



Gráfica 8. Curva de eliminación de la insulina de la articulación radio-carpal a dosis de 15 UI.

Parámetro calculado	Resultado	Tiempo en min
Vida media de eliminación (K_{AE_half})	0.232681513*	13.8
Tiempo de concentración máxima (T_{Conc_Max})	0.335688466*	19.8
Área bajo la curva (AUC)	7.37122310	NA**
Tiempo de residencia (*Residence_Time*)	0.671376931*	40.2

Cuadro 15. Resultados de parámetros farmacocinéticos calculados para la insulina intraarticular a dosis de 20 UI.
** Tiempo en horas*
*** No aplica*



Gráfica 9. Curva de eliminación de la insulina de la articulación radio-carpal a dosis de 20 UI.

8. Discusión

8.1 Examen clínico previo

Ninguno de los caballos del estudio presentó signos correspondientes a resistencia a la insulina o síndrome metabólico, tal y como se muestra en el cuadro de resultados. Todos tuvieron una condición corporal por debajo de la dispuesta como factor predisponente (8-9).[33]

Así mismo, ninguno presentó una escala de "gato" o *Cresty neck*, es decir, un acúmulo anormal de grasa alrededor del ligamento nucal del cuello, el cual es mayor o igual a 3 en la escala descrita por Carter et al, 2009.[34]. Este es otro factor predisponente para desarrollar síndrome metabólico equino.[33]

Sin embargo, para tener una base más objetiva para los criterios de inclusión de los individuos, fue necesario la realización del examen oral de glucosa, con el que no se mostró un incremento de la glucemia mayor a lo máximo reportado por Frank, 2011, el cual es 115 mg/dl.[33] Esto hizo elegibles para este estudio a todos los individuos.

Tanto el examen clínico en busca de signos clínicos correspondientes a síndrome metabólico equino o resistencia a la insulina, como el examen oral de glucosa, eran necesarios para descartar cualquier anomalía metabólica que pudiera alterar los niveles de insulina y por lo tanto, las mediciones de glucosa sanguínea y así tener resultados sin ser alterados por este tipo de variables, ya que, por ejemplo, si un caballo hubiera sido resistente a la insulina, los resultados de glucosa sanguínea hubieran sido alterados (elevados) con respecto a los demás caballos,

lo cual nos hubiera dado falsas lecturas, ya que en este estudio se pretendió incluir animales sanos.

8.2 Examen de aparato locomotor (clínico y radiográfico)

El examen de locomotor constó de inspección en estática (observación) y en dinámica (paso y trote en línea recta en piso duro y a la cuerda en piso blando), así como también de palpación en estática y en dinámica (flexión del carpo durante 1 minuto), con el que no se demostró evidencia clínica de claudicación alguna proveniente de la región del carpo en ninguno de los individuos.

El estudio radiográfico no reveló ningún cambio patológico en la articulación radio-carpal de ninguna de las dos articulaciones de cada uno de los 6 caballos.

8.3 Examen clínico posterior al tratamiento

Tal y como se muestra en el cuadro 3 en resultados, al reevaluar a todos los individuos a las 24 horas posteriores a la inyección, ninguno presentó signos clínicos de reacción adversa a la insulina o a la SSF 0.9% en ninguna de las articulaciones puncionadas. Los promedios en los perímetros de la articulación fueron iguales tanto en las articulaciones tratadas como en las articulaciones control con las 3 dosis en los 6 caballos. Hay que mencionar que esta medición se realizó con una cinta métrica dividida en centímetros, no se hizo con precisión milimétrica. Sin embargo, si hubiera habido algún tipo de reacción adversa al medicamento, aunque la medición no haya sido tan precisa, claramente hubiera aumentado el perímetro articular debido a la inflamación. Por lo tanto, parece ser que la insulina utilizada y la técnica aséptica realizada en este estudio fueron

adecuadas, ya que no se presentó evidencia clínica de reacción alguna, indicando que la insulina resulta ser inocua para la articulación.

8.4 Análisis físicoquímico de líquido sinovial

Como se muestra en los cuadros 4-9, en varias muestras tanto de articulaciones tratamiento (inyectadas con insulina) como en las control (inyectadas con SSF 0.9%), se obtuvo un líquido de apariencia turbia y color rojizo, lo que se atribuyó al efecto de la aguja (trauma) en la sinovia, ya que gracias a las tinciones, se observó que había presencia mayoritaria de células anucleadas, característica correspondiente a eritrocitos.[38]

Con el programa estadístico *SigmaPlot® 11.0*, se determinó la normalidad de los datos de los niveles de proteína y conteo celular en líquido sinovial tanto en articulaciones tratadas como control a través del tiempo mediante una prueba de Shapiro-Wilkinson; se compararon solamente los niveles de proteína sinovial y conteo celular sinovial entre las articulaciones tratadas y las articulaciones control, ya que son los parámetros que arrojaron datos objetivos (cuantitativos), además de que son los parámetros más importantes clínicamente, para detectar cambios en la composición de líquido sinovial (inflamatorios o infecciosos); sin encontrar diferencias significativas tanto para la dosis de 15 UI o las de 20 UI. El único cambio estadísticamente significativo fue para la dosis de 15 UI en los niveles basales de proteína entre las articulaciones tratadas y las control (Friedman X^2_1= 6, $P<0.05$), esto pudo deberse a variaciones en el manejo de las muestras en el

laboratorio, al ser cambios únicamente basales, no se les dio importancia debido a que la insulina aún no se inyectaba en la articulación.

La hemartrosis se asocia generalmente con trauma directo a la articulación, trastornos de coagulación o intoxicación por warfarina, pero en este caso, se asocia una punción directa, ya que no hubo infiltración de células inflamatorias, ni aumento en la proteína sinovial. [39]

Como los valores de proteína se mantuvieron en todo momento por debajo de los 25g/L, sin presencia de células inflamatorias polimorfonucleares ni de bacterias en la observación al microscopio (100x), se descartó la posibilidad de infección o reacción adversa a los materiales y técnica utilizados en este estudio, junto con la ausencia de la clásica signología de artritis séptica, como es: calor, inflamación e incapacidad para apoyar el miembro dentro de las primeras 24 horas. La incidencia de desarrollar artritis séptica en caballos adultos causada por una artrocentesis es bastante alta (34.1%). [40, 41]

Generalmente en caballos con artritis séptica, los valores del número de células puede llegar desde los 30 hasta los 90 ó $100x10^9$/L; y el valor de proteína presente en el líquido sinovial es mayor a 25 g/L, pero puede llegar hasta 60 g/L. [40,42]. Se han reportado también valores diferentes de proteína presente en el líquido sinovial, dependiendo de la condición patológica en la que se encuentre la articulación, la cual puede ser secundaria a trauma o infección, teniendo valores de 20-40 y de >40 g/L respectivamente.[43]

Ninguno de los muestreos presentó valores cercanos a los ya citados, por lo que en efecto, no se ocasionó infección o reacción adversa alguna con la inyección de insulina por esta vía.

El hecho de encontrar diferencias significativas en los niveles de glucosa en sangre para cualquiera de las 3 dosis utilizadas (10, 15 y 20 UI), indica que en efecto, la glucemia cambia a lo largo del tiempo al inyectar insulina en cualquiera de las 3 dosis por vía intraarticular.

Dentro de cada una de las 3 dosis utilizadas, se encontraron diferencias significativas a los 60 minutos posteriores a la inyección intraarticular de la insulina, lo cual indica que antes de los 60 minutos de haber inyectado la insulina, ya se está eliminando hacia el torrente sanguíneo y es el punto más bajo de glucemia, antes de estabilizarse nuevamente.

Sin embargo, el no encontrar asociación entre la glucemia y las diferentes dosis utilizadas de insulina (10, 15 y 20 UI), indica que se puede utilizar cualquiera de las 3 dosis sin alterar significativamente el nivel de glucemia, es decir, si se utiliza la dosis más baja o la dosis más alta, los cambios en los niveles de glucemia, no cambiarán significativamente.

En los muestreos en los que se midió glucosa en líquido sinovial (dosis de 15 y 20 UI), tampoco se encontró diferencia significativa al comparar las articulaciones tratadas con insulina como en las articulaciones control, en las que se utilizó SSF (0.9%). En futuros estudios, con poblaciones más grandes, es posible que se obtenga mayor variación en las mediciones de glucosa en líquido sinovial y se

encuentre diferencia estadísticamente significativa entre las articulaciones tratadas y las articulaciones control.

Clínicamente se observó que la insulina, en efecto, se une a receptores celulares presentes en la articulación, por lo que el nivel de glucosa sinovial baja, como se observó en los niveles tomados de la articulación tratada con insulina.

Es necesario realizar otro estudio en el que se muestre hasta qué punto los niveles de glucosa sinovial se normalizan, y entonces ver si existe diferencia estadísticamente significativa con respecto a la articulación control.

8.5 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) y análisis de datos farmacocinéticos

Inicialmente, como lo muestra la figura 50 del cronograma de muestreos sinoviales, el primer muestreo para CLAR fue a los 30 min, después 1 hora y después 4 horas para el grupo 1 (dosis 20 UI), para el grupo 2 fue 2 y 6 horas (dosis 15 UI) y para el grupo 3 fue 8 y 12 horas (dosis 10 UI). Sin embargo, al correr las muestras en CLAR y analizarlas con el programa pkAnalyst no fue posible establecer una curva de eliminación, así como también se observó que a las 8 horas ya no era posible detectar insulina en el líquido, por lo que fue necesario modificar los muestreos, quedando a los 30 min, 1 hora, 1.5, 2, 3, 4, y 6 horas, para las 3 dosis utilizadas, que fue cuando la CLAR emitió resultados.

La farmacocinética presenta linearidad en las dosis de 15 y 20 UI. Para la dosis de 10 UI no fue posible establecer una curva farmacocinética dado que la técnica analítica no fue lo suficientemente sensible para detectar esos valores a partir de 1

hora. Para las dosis de 15 y 20 UI de insulina, ambas curvas de eliminación parecen similares, sin embargo, hay pequeñas diferencias en cuanto a los parámetros farmacocinéticos utilizados.

Por ejemplo, con las dosis de 15 UI, el tiempo de residencia de la insulina, el tiempo de concentración máxima y el área bajo la curva, fueron ligeramente menores que los observados con las dosis de 20 UI. Sin embargo, para ambas concentraciones, el tiempo de concentración máxima dentro de la articulación fue entre 17 y 20 minutos, lo que es congruente con lo observado con los niveles de glucemia, donde se observó una disminución importante a los 30 minutos en todos los caballos con cualquier dosis. Al compararlos con todos los demás muestreos sanguíneos, fue significativamente diferente en el muestreo realizado en la primera hora posterior a la inyección.

A pesar de que aparentemente la dosis de insulina de 20 UI podría estar afectando desde 2 hasta 6 minutos de diferencia las variables arrojadas por el programa PkAnalyst a diferencia de los resultados obtendios para la dosis de 15 UI, nuestros datos no permiten establecer que esta diferencia sea significativa. Probablemente, con un mayor número de dosis de insulina y con las que se obtengan más concentraciones, es decir, donde se aumente la “n”, se podría obtener una mejor idea acerca del tiempo de acción de la insulina o sus repercusiones en la articulación en cuanto a datos farmacocinéticos se refiere.

Los cromatogramas fueron similares a los observados en el trabajo de Hafiz, et al, 2013, ya que se obtuvo un pico de insulina a los 16 ± 0.5 min; en este trabajo se observó el pico a los 15.8 min.[37]

9. Conclusiones

La insulina Humalog Lispro® utilizada en este estudio, resultó ser inocua para su uso por vía intraarticular en caballos (no se rechaza la H_0), ya que no hubo evidencia clínica y fisicoquímica en el líquido sinovial que sugiriera alguna reacción adversa o no favorable al medicamento, por lo que su uso en caballos por esta vía a estas dosis, no representará riesgo alguno para los mismos.

Se utilizaron tres dosis, una dosis alta (20 UI), una dosis media (15 UI) y una dosis baja (10 UI) sin que se alteraran significativamente los niveles de glucosa tanto a nivel sinovial como a nivel sanguíneo, es decir, en este estudio, estos niveles no están asociados a la dosis utilizada. Esto indica que la glucosa sanguínea y sinovial tuvieron la misma disminución sin importar la dosis utilizada. Sin embargo, dado que el tiempo de residencia, tiempo de vida media y el tiempo de concentración máxima fue mayor en la dosis de 20 UI, se sugiere utilizar esta dosis como única o máxima por caballo, para lograr que permanezca el mayor tiempo posible en la articulación. Dado que la mayor disminución de glucemia con las 3 dosis ocurrió a la hora de haberse inyectado la insulina por vía intaarticular, se sugiere que al utilizar la insulina por esta vía, se observe clínicamente al caballo durante poco más de una hora, previendo que requiera atención médica para restablecer los niveles sanguíneos de glucosa.

La permanencia de la insulina en la articulación es muy corta y en este estudio es directamente proporcional o dependiente de la dosis utilizada, es decir, a mayor dosis utilizada, mayor sera la permanencia en la articulación. Con este estudio se concluye que la dosis máxima a utilizar en caballos es de 20 UI. Sin embargo, se necesitan más estudios para evaluar el efecto bioquímico en los condrocitos ya que la última medición de glucosa sinovial aún se encontraba por debajo de lo observado en la articulación control, lo que indica que aunque no hubo diferencia estadísticamente significativa.

Este estudio es descriptivo, por lo que sirve como base para futuros estudios que involucren el uso de insulina por vía intraarticular en caballos, ya que es el primer estudio *in vivo*, hasta la fecha que demuestra su seguridad.

10. Bibliografía

1.http://caballospastoreo.galeon.com/productos806041.htmlhttp://caballospastoreo.galeon.com/productos806041.html

2. López NG. Identificación y efecto del sulfato de atropina inyectado en la articulación radio carpal en caballos biomecánicamente y radiográficamente sanos. Tesis de maestría en Ciencias de la Producción y la Salud Animal. FMVZ, UNAM. 2006.

3. Celeste C, Ionescu M, Poole RA. Repeated intra-articular injections of triamcinolone acetonide alter cartilage matrix metabolism measured by biomarkers in sinovial fluid. *J Ortho Res* 2005;23(3):602-610.

4. Frederick JPM, Neal LB. Sympathoadrenal contribution to nicotinic and muscarinic modulation of bradycinin-induced plasma extravasation in the knee joint of a rat. *J Pharm and Exp Ther* 1992;26:889-895.

5. Bertone AL. Joint Physiology: responses to exercise and training. En Hinchcliff KW, et al. Equine Sports Medicine and Surgery. Saunders, London; 2005. Pp 152-160.

6. McIlwratith CW. Enfermedades de las articulaciones, los tendones, los ligamentos y las estructuras relacionadas. En Stashak, TS. Adams: Claudicación en el Caballo. 5a Ed. Intermédica Editorial. Argentina; 2004. Pp 469-684.

7. Ghadially FN. Structure and function of articular cartilage. Clin Rheum Dis 1981; 7:3-27.

8. Hasselbacher P. Structure of the synovial membrane. Clin Rheum Dis 1981; 7:57-69.

9. Saari H, Konttinen YT, Tulamo RM, et al. Concentration and degree of polymerization of hialuronate in equine sinovial fluid. Am J Vet Res 1989;50:2060-63.

10. Pasquini C, Spurgeon P, Pasquini S. Anatomy of the Domestic Animals. Systemic and regional approach. 9th Ed. SUDZ, EUA; 1995.

11. Geneser, F. Tejido esquelético. En Geneser F. Histología. 3a Ed. Interamericana, Argentina, 2000. Pp 263-297.

12. Mcdougall J. Elenko R, Bray R. Cholinergic vasoregulation in normal and adjuvant monoarthritic rat knee joints. J Ana Nerv Sys 1998;72:55-60.

13. Schumacher J. Aspiration and injection therapies for joints. Arthitis and Rheum 2003;49:413-420.

14. Colapert FC, Donnerer J, Lembeck, F. Effects of capsaicin on inflammation and on the substance P content of nervous tissues in rats with adjuvant arthritis. Life Sci 1983;32:1827.

15. Gotoh S, Onaya J-I, Abe M, et al. Effects of the molecular weight of hyaluronic acid and its action mechanisms on experimental joint pain in rats. Ann Rheum Dis 1993;52:817-822.

16. Rood & Riddle Equine Hospital Formulary of medications in use and Laboratory Manual.

17. Lizárraga MI, Sumano LH. Antiinflamatorios no esteroidales. En Sumano LH, Lizárraga MI. Farmacología y toxicología aplicada en equinos. 2ª Ed. Intervet, México, 2001. Pp 151-186.

18. Muir WW II, Woolf CJ. Mechanisms of pain and their therapeutic implications. J Am Vet Med Assoc 2001;219:1346-1356.

19. Basbaum AI, Levine JD. The contribution of the nervous system to inflammation and inflammatory disease. Can J Physiol Pharmacol 1991;69:647.

20. Henson FMD, Davenport C, Butler L, et al. Effects of insulin and insulin-like growth factors I and II on the growth of equine fetal and neonatal chondrocytes. *Equine Vet J* 1997;29(6):441-447.

21. Davenport C, Boston R, Richardson DW. Effects of insulin-like growth factor-II on the mitogenic and metabolic activities of equine articular cartilage with and without interleukin 1-β. *Am J Vet Res* 2004;65(2):238-244.

22. Smith JS, Ratzlaff MH, Grant BD, Frank FL. The synovial fluid volume of the radiocarpal, intercarpal and tibiotarsal joints of a horse. Synovial Fluid volume. *J Eq Med Surg* 1979;3:479-483.

23. Schumacher J, Schumacher J, Moyer W. Equine joint injection and regional anesthesia. Academic Veterinary Solutions. USA, 2011.

24. National Center of Biotechnology Information.

25. http://www.vivo.colostate.edu/molkit/hydropathy/index.htmlhttp://www.vivo.colostate.edu/molkit/hydropathy/index.html

26. Sistema GOR, desarrollado por Garnier et al, 1996.

27. Sistema SOPMA, desarrollado por Geourjon y Delage, 1995.

28. http://geno3d-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/d3_geno3d2.plhttp://geno3d-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/d3_geno3d2.pl

29. PyMol Molecular Graphics System.

30.http://www.kegg.jp/keggbin/search_pathway_text?map=ecb&keyword=insulin&mode=1&viewImage=true

31. Henneke DR, Potter GD, Kreider JL, et al. Relationship between condition score, physical measurements and body fat percentage in mares. Equine Vet J 1983;15(4):371–2.

32. Carter RA, Geor RJ, Burton SW, et al. Apparent adiposity assessed by standardised scoring systems and morphometric measurements in horses and ponies. Vet J 2009;179:204.

33. Frank N. Equine metabolic syndrome. Vet Clin Equine 2011;27:73–92.

34. Carter RA, Geor RJ, Burton SW, et al. Apparent adiposity assessed by standardised scoring systems and morphometric measurements in horses and ponies. Vet J 2009;179:204.

35. Zar HJ. Biostatistical Analysis. 4ª Ed 1999. Prentice Hall. New Jersey, USA.

36. Quinn GP & Keough MJ. Experimental design and data analysis for biologists. 2002. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

37. Hafiz Mohd, MJ, et al. A simple and sensitive method for the determination of insulin in rat plasma and its application in pharmacokinetic study. Inter J Pharmacy and pharmaceutical Sci. 2013;(5)2:133-137.

38. Fernandes PJ. Synovial fluid analysis. En Cowel RL, Tyler RD, Meinkoth JH, DeNicola DB. Diagnostic cytology and hematology of the dog and cat. 3rd Ed. Mosby Elsevier, Canadá; 2008. Pp 193-209.

39. Meyer DJ, Harvey JW. Evaluation of fluids: Effusions, synovial fluid, cerebrospinal fluid. En Veterinary laboratory medicine interpretation and diagnosis. 3rd Ed. Saunders, EUA;2004. Pp 245-250.

40. Bertone AL, Cohen JM. Infectious arthritis and fungal infectious arthitis. En Ross MW, Dyson SJ. Diagnosis and management of lameness in the horse. 2nd Ed. Saunders. EUA;2011. Pp. 677-687.

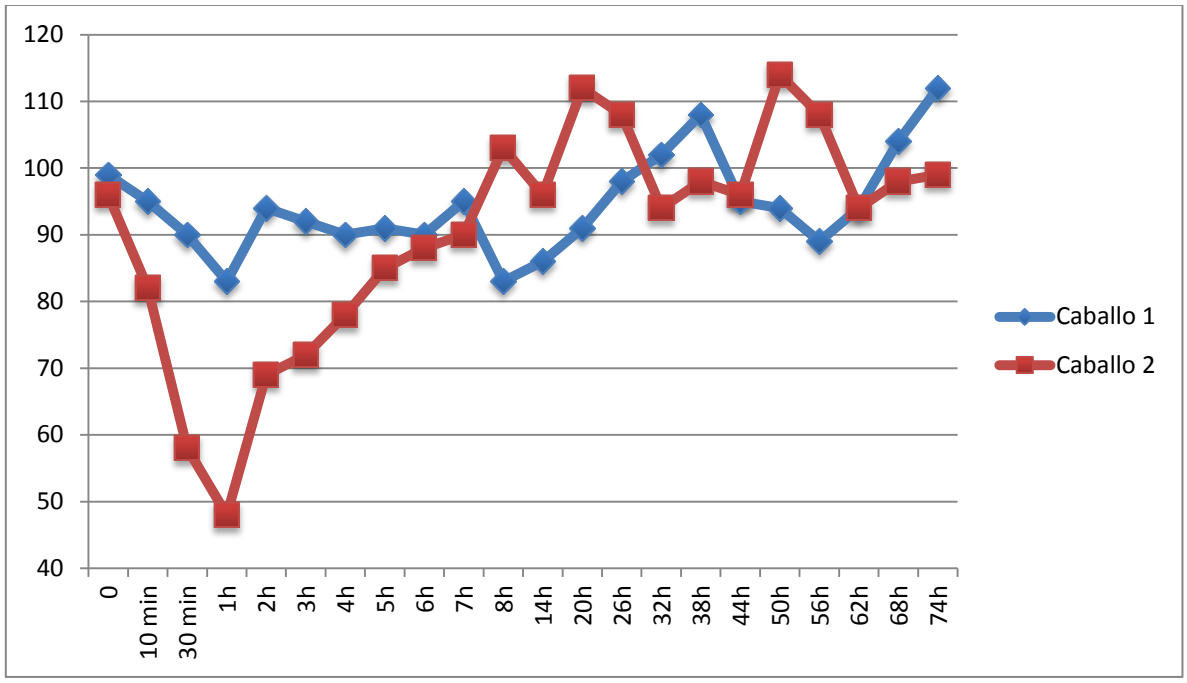
41. Olds AM, Stewart AA, Freeman DE, Schaeffer DJ. Evaluation of the rate of development of septic arthritis after elective arthroscopy in horses: 7 cases (1994-1954). J Am Vet Med Assoc 2006;229:1949.

42. Tulamo RM, Bramlage LR, Gabel AA. Sequential clinical and synovial fluid changes associated with acute infectious arthritis in the horse. Eq Vet J 1989;(5)2:325-331.

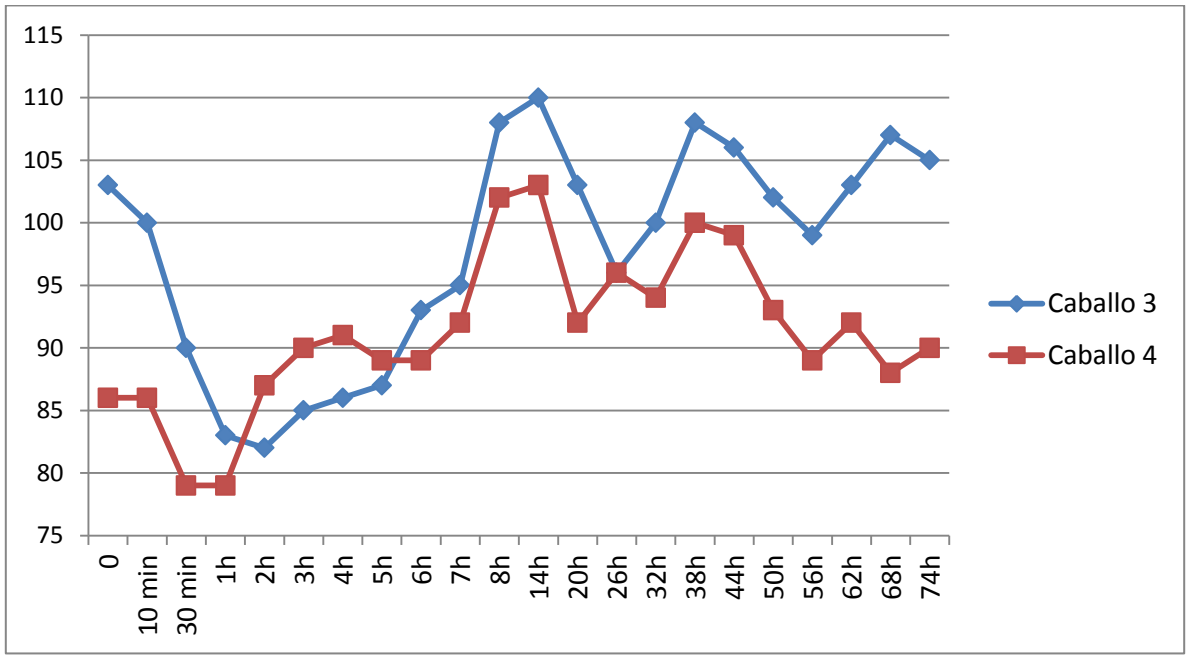
43. Taylor FG, Hillyer MH. Enfermedades musculoesqueléticas. En Taylor FG, Hillyer MH. Técnicas diagnósticas en medicina equina. Acribia, España;1997. Pp 245-284.

Anexo I

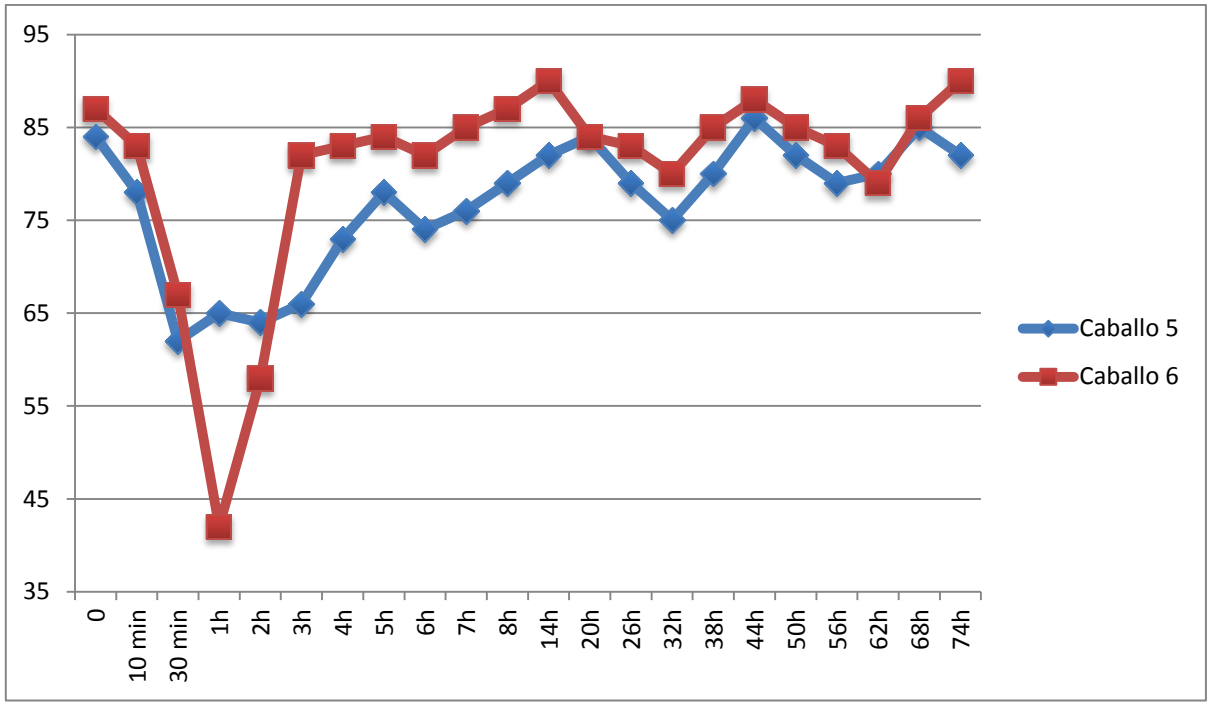
Gráficas Glucosa sanguínea por grupo por dosis utilizada



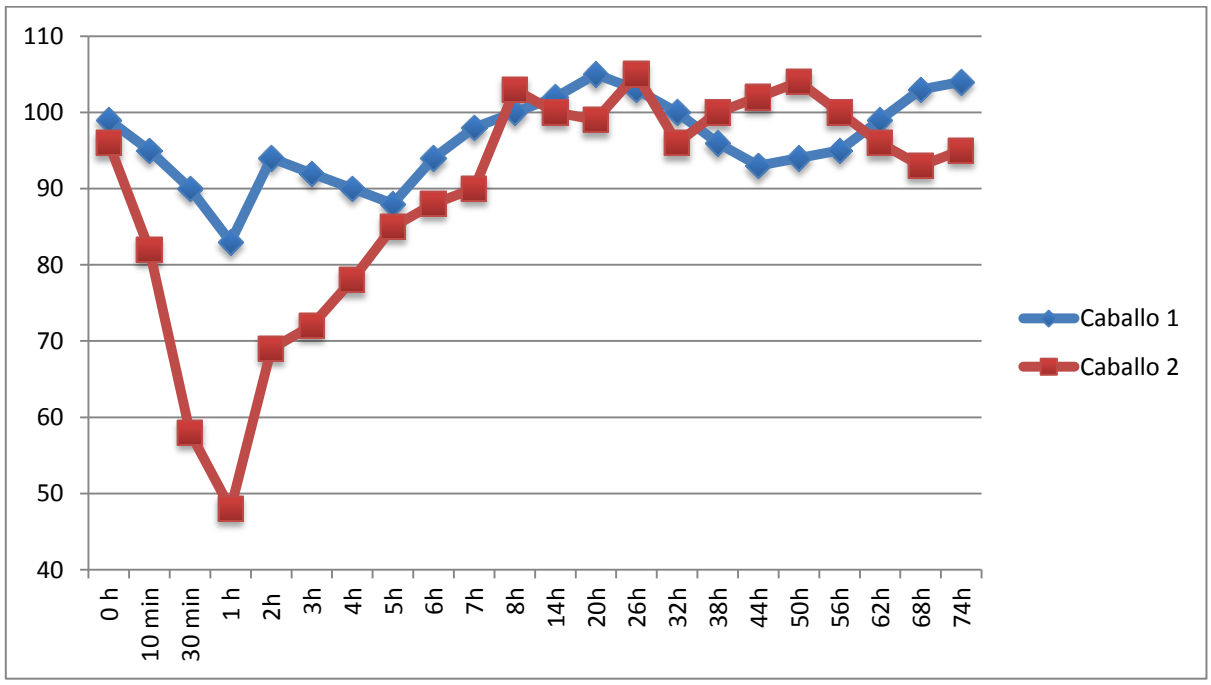
Gráfica 10. Niveles séricos de glucosa *(mg/dl)* en Grupo 1, con dosis de 10 UI



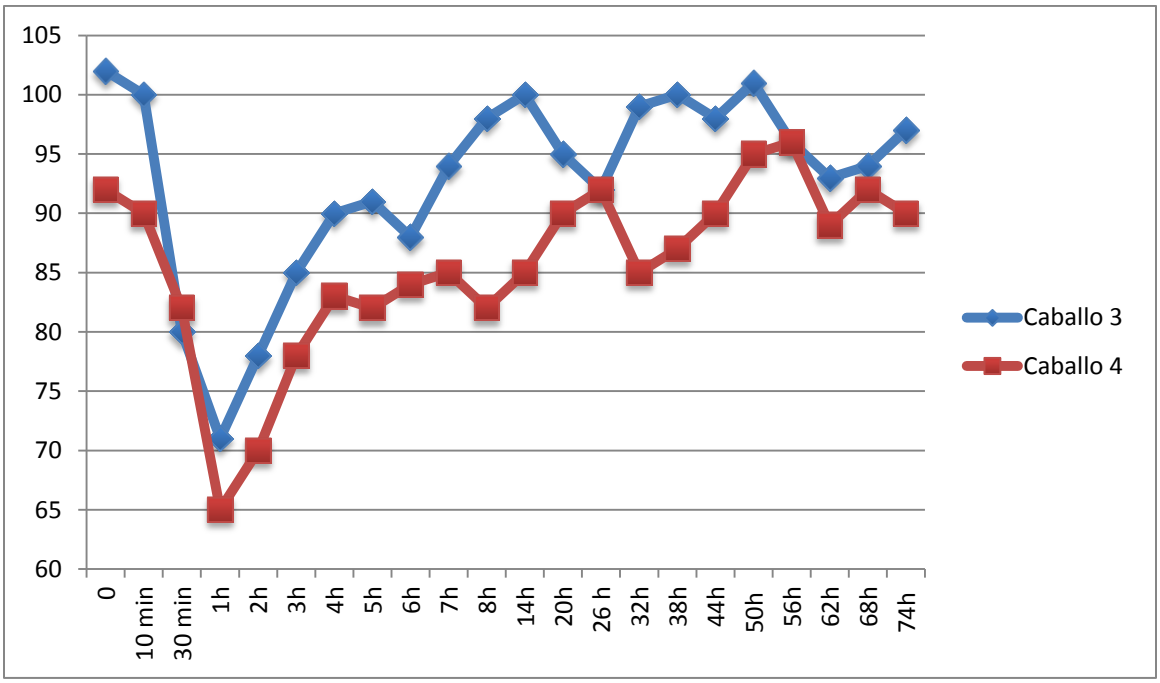
Gráfica 11. Niveles de glucosa sanguínea *(mg/dl)* de Grupo 2, con dosis de 10 UI



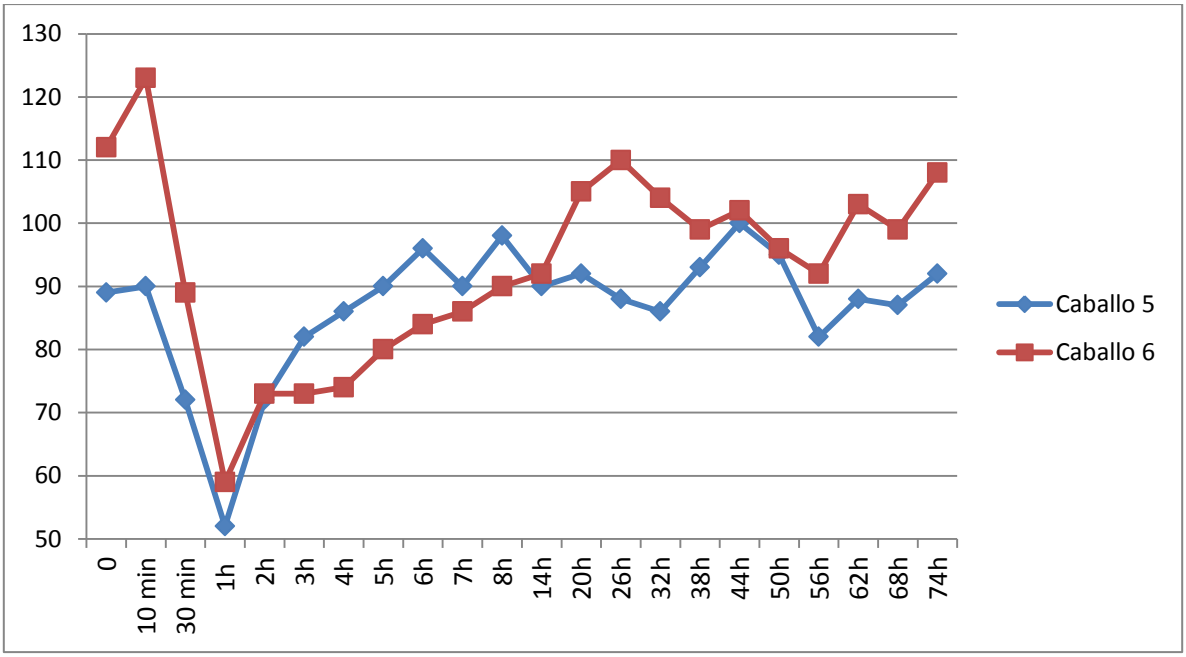
Gráfica 12. Glucosa sanguínea *(mg/dl)* de grupo 3 con dosis de 10 UI.



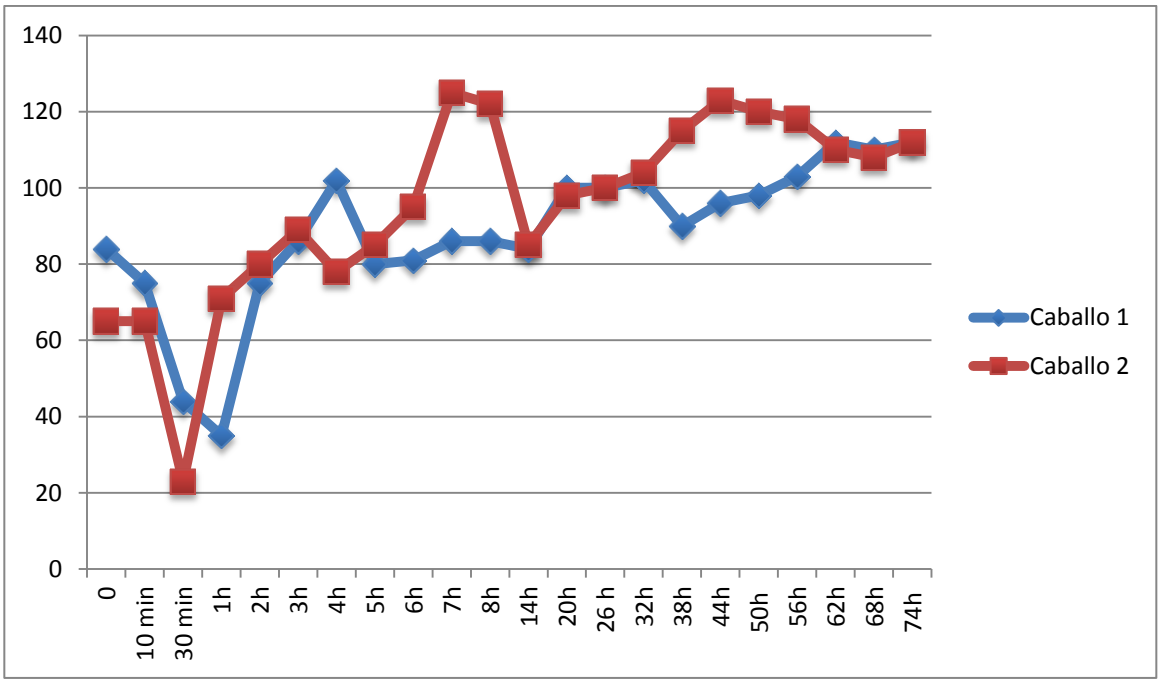
Gráfica 13. Glucosa sanguínea *(mg/dl)* de grupo 1 con dosis de 15 UI.



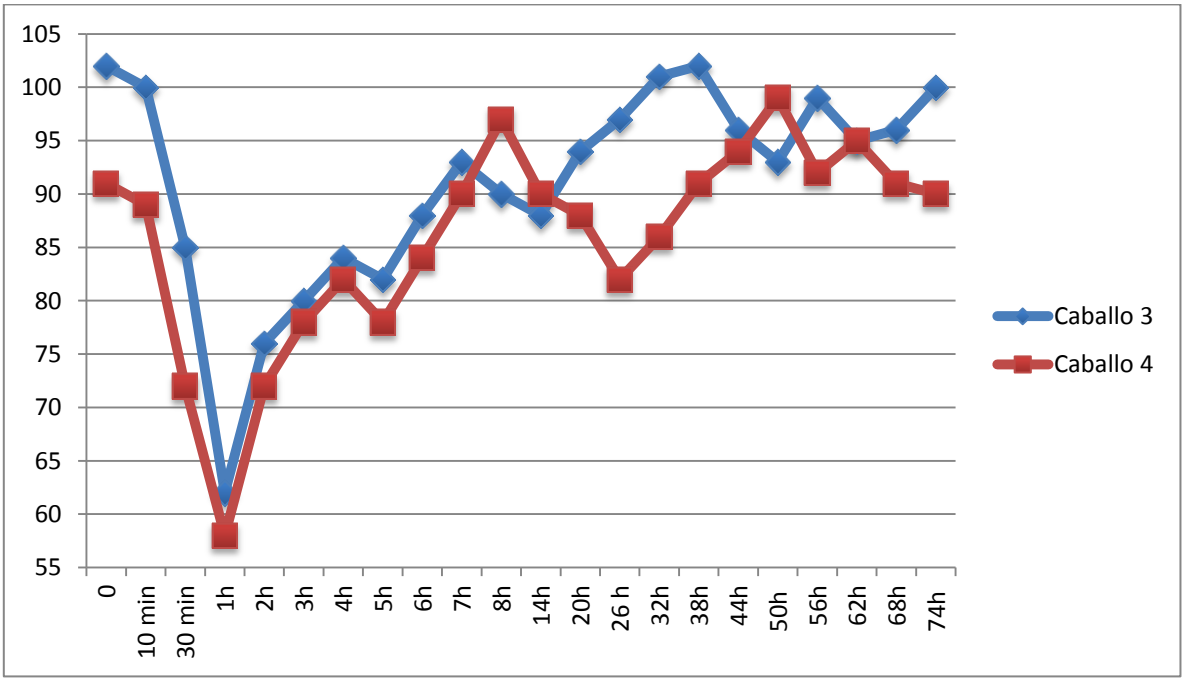
Gráfica 14. Glucosa sanguínea *(mg/dl)* de grupo 2 a dosis de 15 UI.



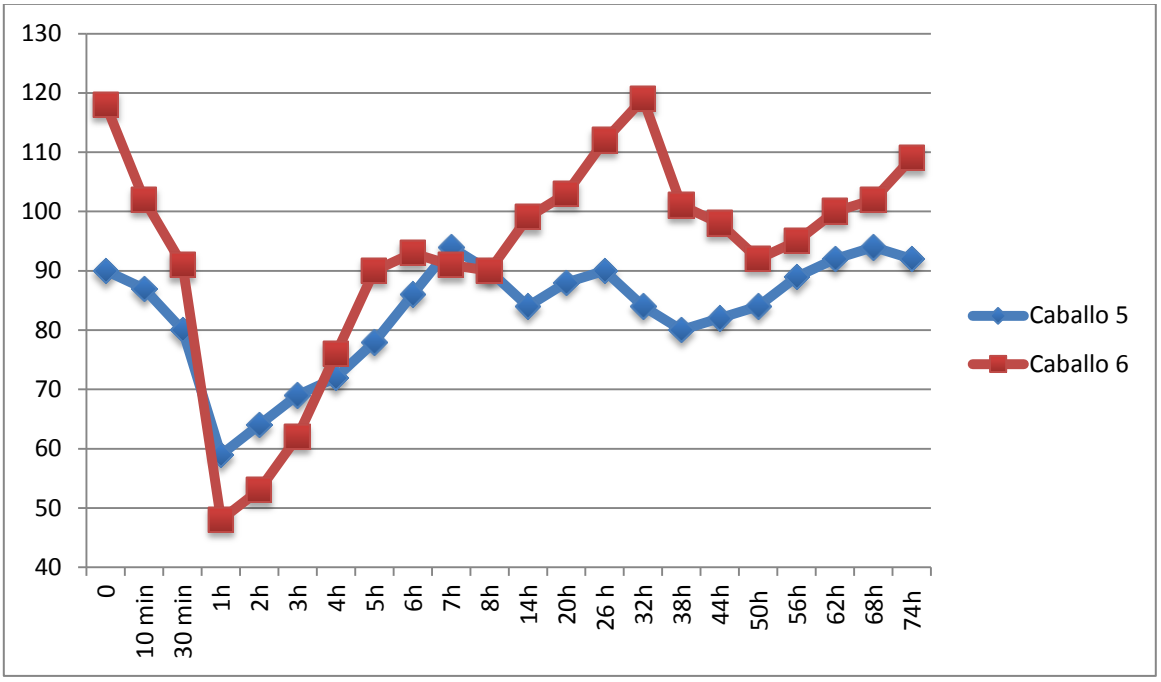
Gráfica 15. Glucosa sanguínea *(mg/dl)* de Grupo 3, a dosis de 15 UI.



Gráfica 16. Glucosa sanguínea *(mg/dl)* Grupo 1, con dosis de 20 UI.



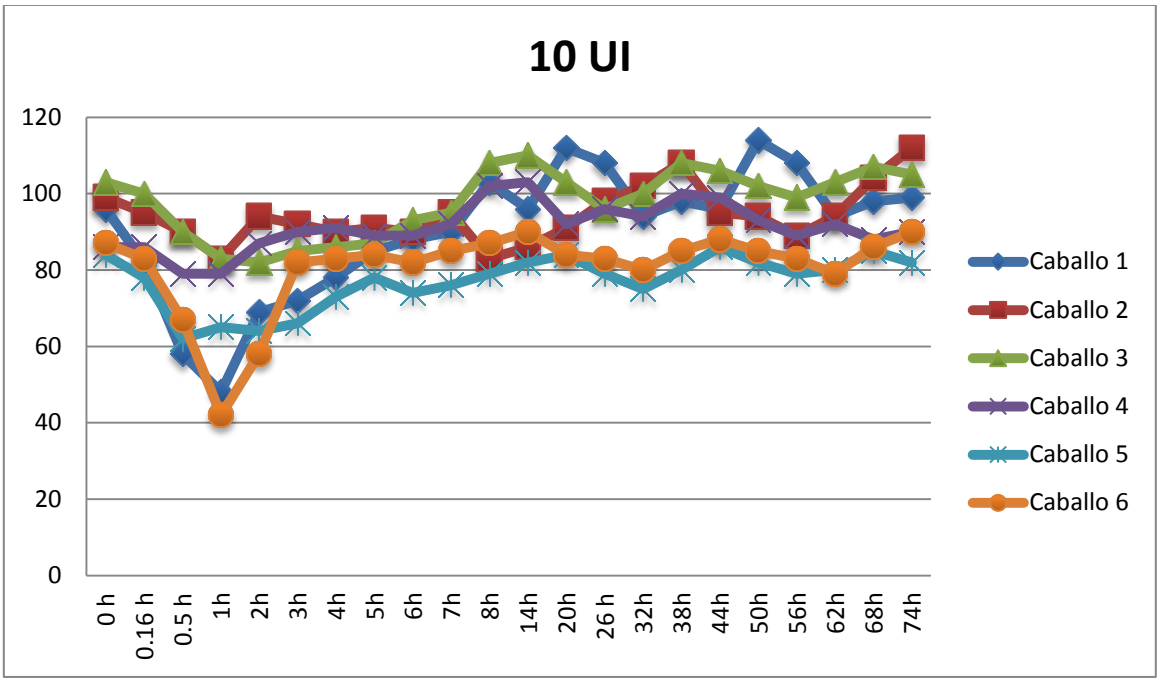
Gráfica 17. Glucosa sanguínea *(mg/dl)* Grupo 2, con dosis de 20 UI.



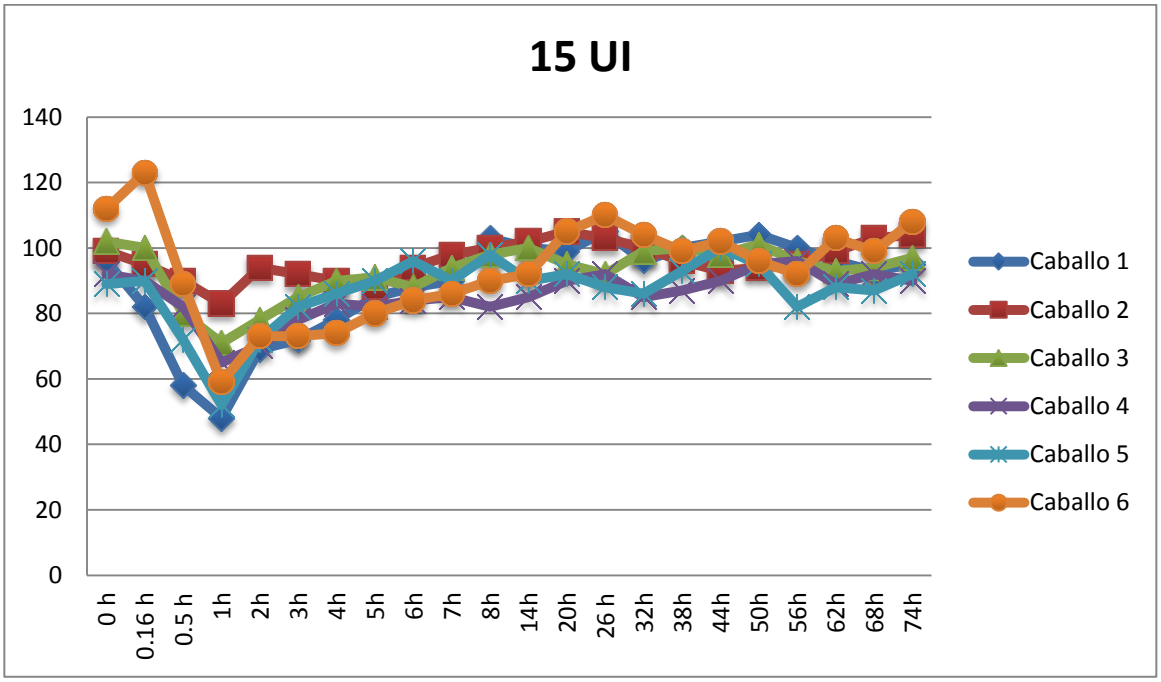
Gráfica 18. Glucosa sanguínea *(mg/dl)* Grupo 3, con dosis de 20 UI.

Anexo II

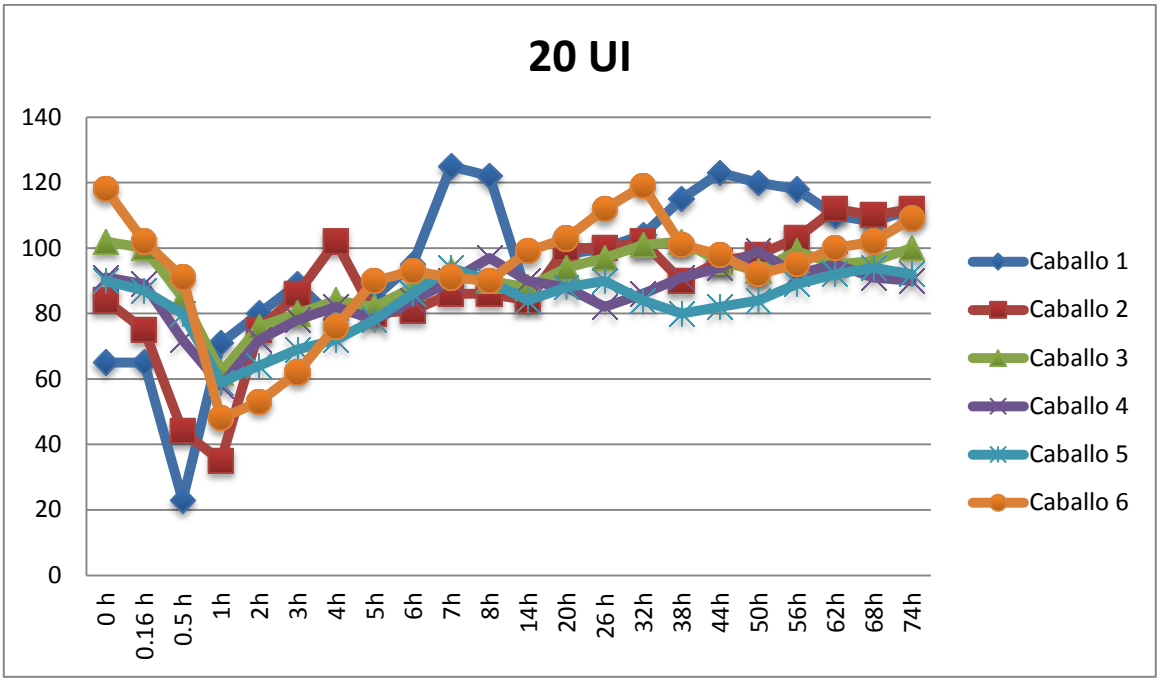
Gráficas de glucosa por dosis utilizada en los 6 caballos



Gráfica 19. Glucosa sanguínea *(mg/ml)* de los 6 caballos inyectados con 10 UI de insulina.



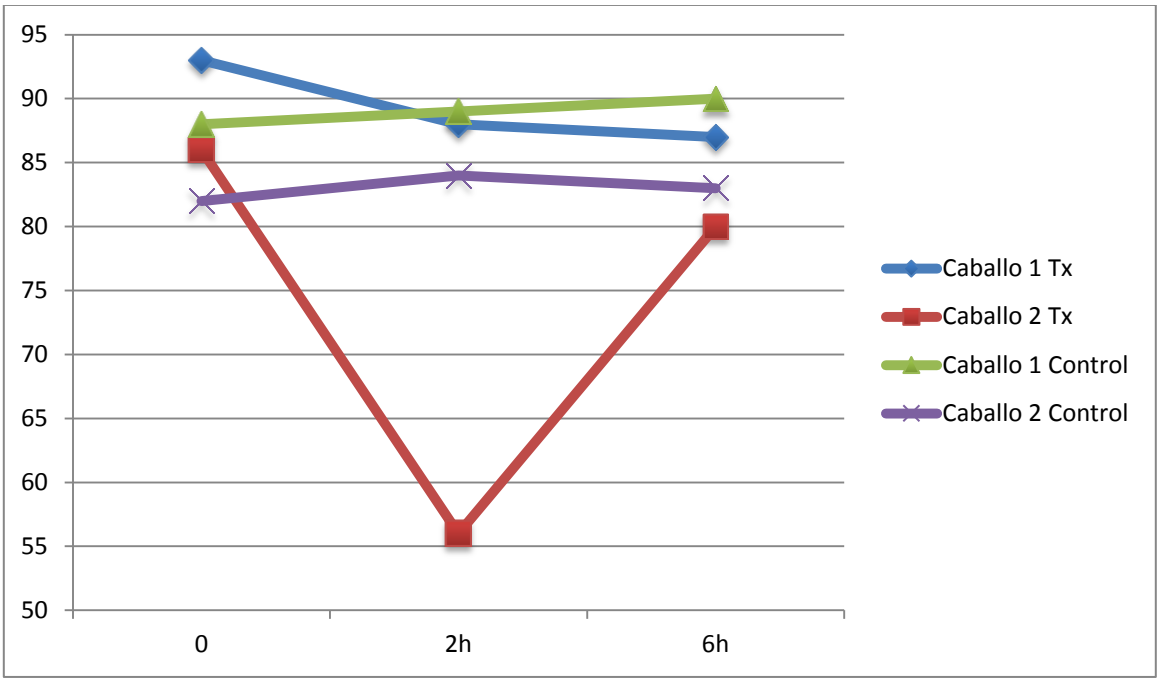
Gráfica 20. Glucosa sanguínea *(mg/ml)* de los 6 caballos inyectados con 15 UI de insulina.



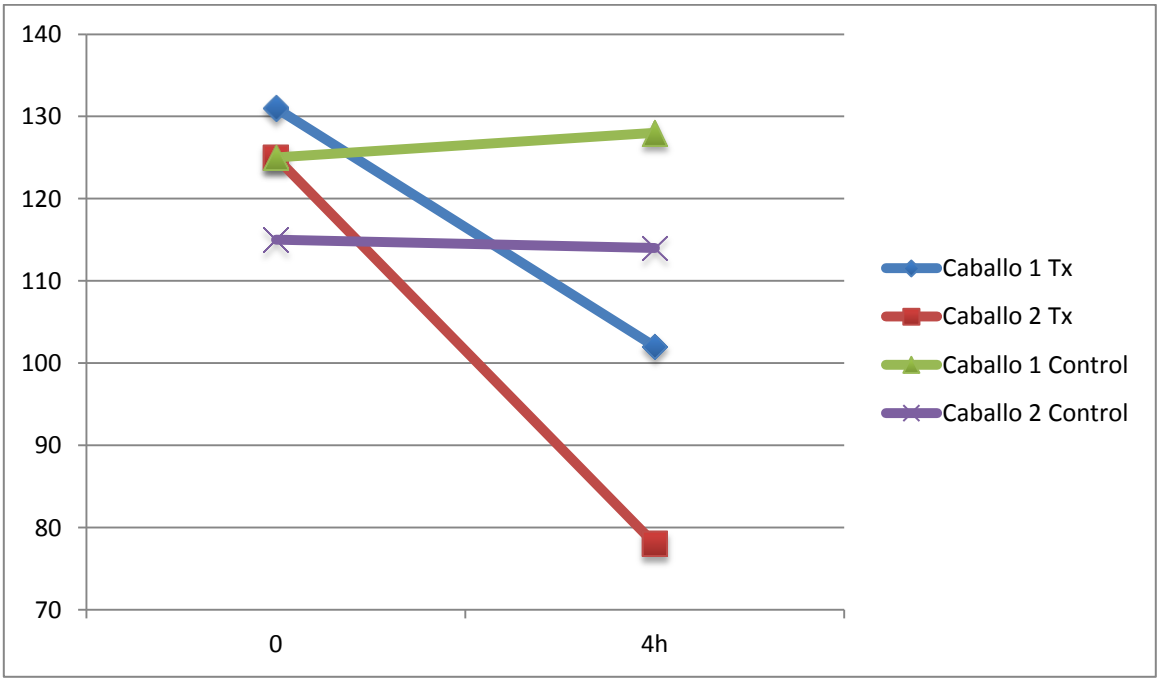
Gráfica 21. Glucosa sanguínea *(mg/ml)* de los 6 caballos inyectados con 20 UI de insulina.

Anexo III

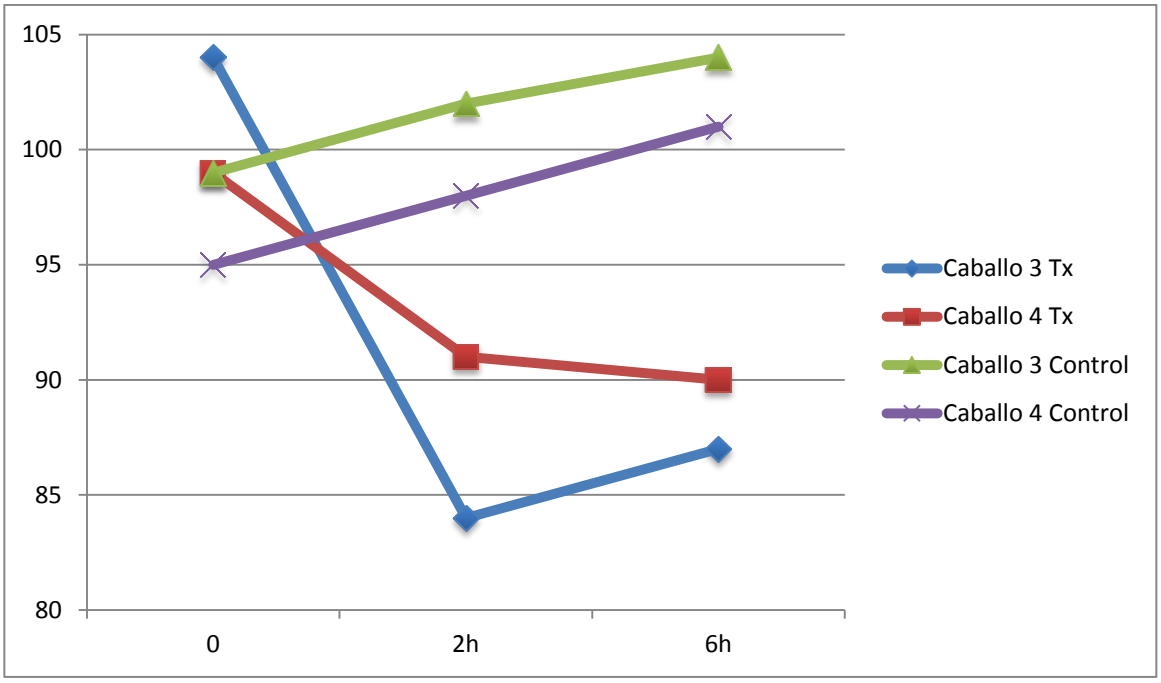
Niveles de glucosa sinovial en los 3 grupos con dosis de 15 y 20 UI.



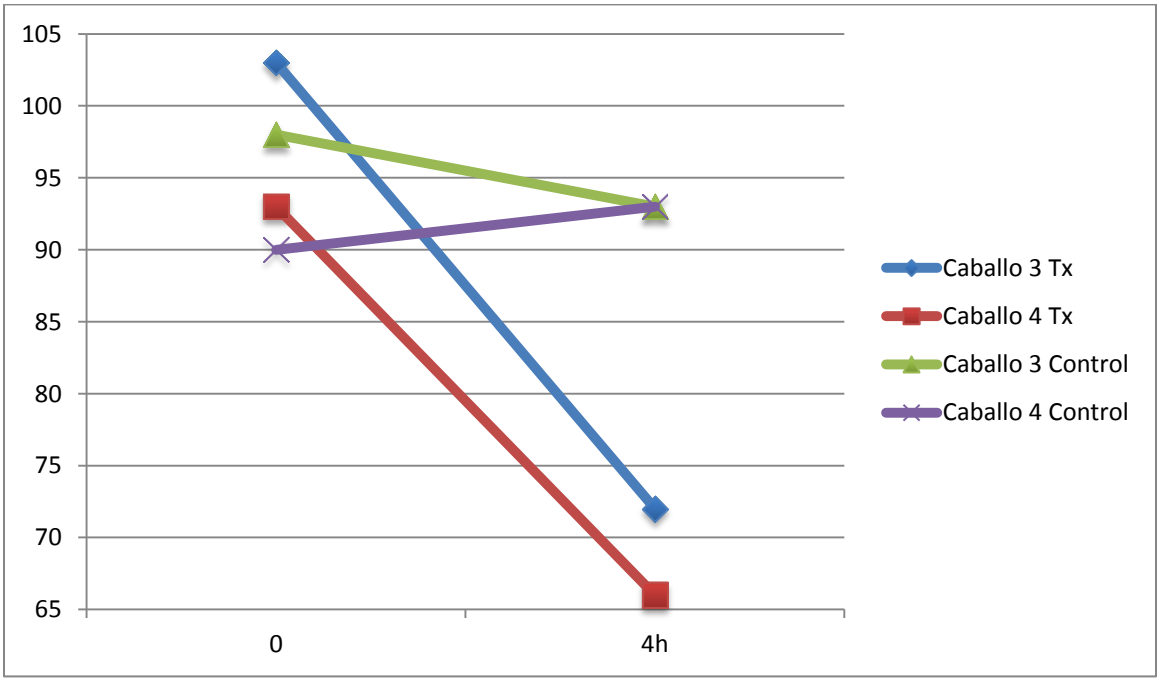
Gráfica 22. Niveles de glucosa sinovial *(mg/dl)* de Grupo 1, con dosis de 15 UI.



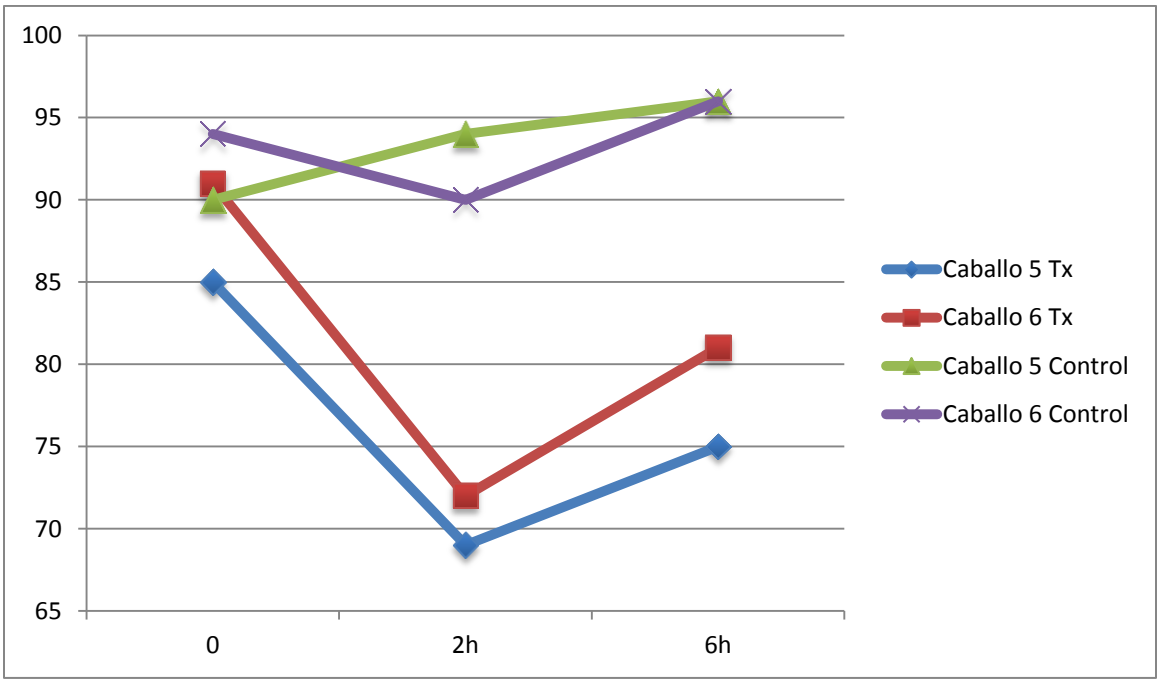
Gráfica 23. Glucosa en líquido sinovial *(mg/dl)* del Grupo 1, con dosis de 20 UI.



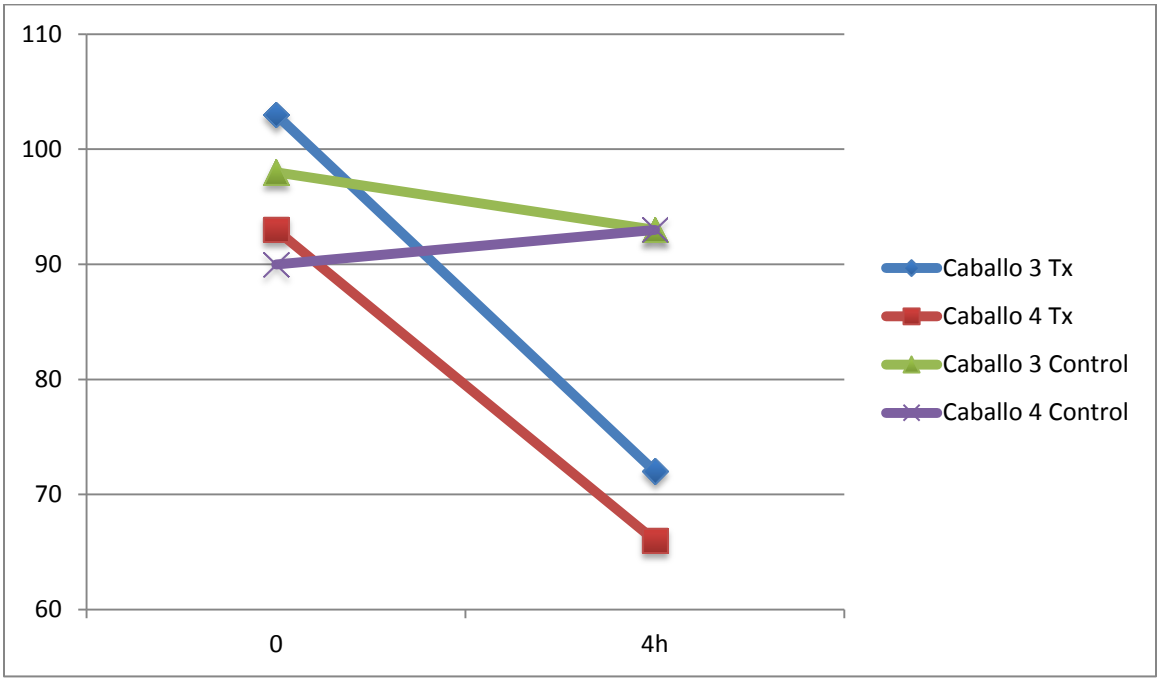
Gráfica 24. Niveles de glucosa sinovial *(mg/dl)* de Grupo 2, con dosis de 15 UI.



Gráfica 25. Niveles de glucosa sinovial *(mg/dl)* de Grupo 2, con dosis de 20 UI.



Gráfica 26. Glucosa sinovial *(mg/dl)* de articulación tratamiento y control de grupo 3 con dosis de 15 UI.



Gráfica 27. Glucosa sinovial *(mg/dl)* de articulación tratamiento y control del grupo 3 con dosis de 20 UI.