



**FACULTAD DE FARMACIA.**

Grado en Farmacia.

**ESTRATEGIAS PARA LA FORMULACIÓN DE LA INSULINA POR VÍA ORAL**

Memoria de Trabajo Fin de Grado.

Sant Joan d'Alacant.

Junio 2023.

**Autor: Daniel Botella Vicente.**

Modalidad: Revisión bibliográfica.

Tutor/es: Marta González Álvarez y Alejandro Ruiz Picazo.

## RESUMEN

La diabetes es una enfermedad crónica que afecta a casi un 8,8% de la población mundial, un porcentaje que debido a los deficientes hábitos higiénico-dietéticos como el sedentarismo, ingesta de comida basura, etc. aumentará su prevalencia.

Se caracteriza por los valores altos de glucosa en los pacientes, como consecuencia de una escasa o inadecuada producción de insulina como la resistencia a su acción por parte del organismo.

La insulina es una hormona de naturaleza proteica que regula la captación de la glucosa a las células, por lo tanto, su acción es vital. Por esta razón, la administración de insulina exógena como fármaco constituye una de las principales terapias farmacológicas contra la diabetes junto a los fármacos hipoglucemiantes.

Sin embargo, la insulina presenta una naturaleza proteica, lo cual la hace susceptible a la degradación enzimática a nivel gástrico por parte de las enzimas proteolíticas pancreáticas. Además, es una molécula que presenta un gran tamaño molecular, lo que dificulta su absorción a nivel intestinal ya que las uniones intestinales son muy estrechas permitiendo solo el paso de moléculas pequeñas.

Estas dos características de la insulina impiden que se puede administrar oralmente obligando a que sea administrada por la vía subcutánea. Sin embargo, esta vía es menos aceptada y cómoda que la vía oral.

Por esta razón existen actualmente diversas estrategias viables para poder administrar esta molécula por vía oral pero que están todavía en fase preclínica. Entre ellas destacamos las formulaciones con la insulina encapsulada en nanocápsulas, nanovesículas o nanogeles, etc..., las nanoemulsiones o la administración conjunta de la proteína con inhibidores de las proteasas. En esta revisión se estudiará la viabilidad de las propuestas explorando la reducción de glucemia *in vivo*, la permeabilidad o la toxicidad de estas.

Palabras clave: **insulin, oral administration.**

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	2
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	4
1.1. ¿Qué es la diabetes mellitus y cuantos tipos hay? .....	4
1.2. ¿Qué es la insulina?.....	6
1.3. Mecanismo de acción de la insulina. ....	9
1.4. Historia de la insulina como fármaco .....	11
1.5. Tipos de insulina.....	12
1.6. ¿Por qué sería conveniente desarrollar formulaciones de insulina para ser administradas por vía oral?.....	14
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	18
2.1. Principal.....	18
2.2. Específicos.....	18
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	18
<b>4. RESULTADOS</b> .....	20
<b>5. DISCUSIÓN</b> .....	21
<b>6. CONCLUSIONES:</b> .....	40
<b>7. BIBLIOGRAFÍA:</b> .....	41

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. ¿Qué es la diabetes mellitus y cuantos tipos hay?

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad crónica que se caracteriza por un aumento de la concentración de glucosa en sangre debido a que el páncreas no sintetiza, o el organismo no utiliza, la insulina de forma adecuada.

Las concentraciones de glucosa en sangre normales están comprendidas en un rango que oscila entre los 70-110 g/dl. Cuando la concentración de glucosa en sangre supera los 110 g/dl, y se sitúa en algún valor entre los 110-130 g/dl, se considera que esa persona presenta un estado de prediabetes. Cuando la concentración de la glucosa en sangre supera los 130 g/dl, es cuando se considera que esa persona padece diabetes mellitus.

La diabetes mellitus es difícil de diagnosticar porque es una patología prácticamente asintomática en sus estadios iniciales. Esto supone que sea diagnosticada tarde, incluso después varios años. De hecho, se calcula que la mitad de las personas que padecen diabetes tipo II no estén diagnosticadas en este momento.

Esto provoca que hasta un 20% de los pacientes diabéticos presenten ya complicaciones en el momento del diagnóstico.

La diabetes en sus estadios más avanzados puede presentar serias complicaciones en la salud de los pacientes como:

- Ceguera
- Amputaciones de extremidades inferiores.
- Insuficiencia renal.
- Enfermedades cardiacas y accidentes cerebrovasculares.
- Problemas en los nervios.
- Afecciones en la piel.
- Enfermedad de las encías y otros problemas dentales.

Existen tres tipos de diabetes:

Diabetes tipo I: se caracteriza por ser una enfermedad autoinmune, es decir, el sistema inmune ataca por error a los islotes de Langerhans del páncreas, lugar donde se sitúan las células beta, que son las responsables de la síntesis de insulina. Afecta entre el 5 al 10% de los pacientes que sufren diabetes. Este tipo de diabetes se diagnostica sobre todo en niños, adolescentes y adultos jóvenes. Los pacientes que presentan este tipo de diabetes no pueden sobrevivir sin la insulina. Hoy en día, este tipo de diabetes no se puede prevenir.

Diabetes tipo II: ese tipo se caracteriza porque el organismo no puede utilizar la insulina adecuadamente y por tanto no puede mantener el nivel de azúcar óptimo en sangre. Es el tipo de diabetes más común, ya que afecta entre el 90-95% de los pacientes que padecen diabetes. Este tipo, al contrario que el tipo I, se suele diagnosticar en pacientes adultos y de mayor edad. Actualmente están apareciendo más casos en la población joven fruto de los inadecuados hábitos de vida como por ejemplo el sedentarismo e inadecuados hábitos alimenticios actuales.

La diabetes, especialmente el tipo II, presenta una elevada prevalencia, se estima que en todo el mundo hacia el año 2017 había 425 millones de personas de entre 20 y 79 años que padecían diabetes (un 8,8% de la población mundial en ese momento). Solo en España se estima que 6 millones de ciudadanos la padecen, es decir, un 13% de la población española es diabética, lo que le convierte en el quinto país de la Europa, con más prevalencia de esta enfermedad, solo superado por Alemania, Rusia, Turquía e Italia

Las previsiones indican, que, si no se implementan programas de prevención, la prevalencia de la diabetes mellitus podría incrementarse hasta los 629 millones de pacientes.

Además, la diabetes supone un alto coste sanitario. Según los últimos informes, un paciente diagnosticado y con un buen control de su diabetes supone per se 883 euros anuales de gasto al sistema, mientras que el que no está diagnosticado y controlado puede conllevar un coste de 2133 euros anuales.

Estos gastos se pueden incrementar más debido a las complicaciones asociadas a las diabetes

Por tanto, para evitar estos gastos sería necesario tomar, si es posible, medidas de prevención de la diabetes en la población.

Estas medidas de prevención no son útiles en el caso de la diabetes tipo I, ya que es una enfermedad autoinmune determinada por un componente genético, que predispone a desarrollar la enfermedad.

Sin embargo, el tipo II, puede prevenirse en buena parte debido a que factores de riesgo asociados con la aparición de la enfermedad están relacionados con hábitos de vida modificables, como pueden ser el exceso de peso, el sedentarismo o el consumo de tabaco. Por ello, si se consiguiese modificar los cambios en el estilo de vida se podría reducir significativamente el riesgo de desarrollar diabetes tipo II, y como consecuencia, reducir el impacto económico que supone esta enfermedad en el sistema sanitario. No obstante, otros factores como la edad, antecedentes familiares, o incluso sufrir síndrome de ovario poliquístico no pueden evitarse. <sup>1</sup>

## **1.2. ¿Qué es la insulina?**

La insulina es una hormona, es decir, una molécula sintetizada por una célula denominada endocrina que la libera al torrente sanguíneo y viaja a través del hasta otra célula, llamada diana, la cual tiene un receptor específico para dicha hormona. De esta forma, la hormona al unirse a su célula diana influye en la función celular de la misma. En el caso de la insulina, es producida por las células beta del páncreas y liberada al torrente sanguíneo para unirse al resto de células del organismo con el fin de que estas expresen una mayor concentración de transportadores de glucosa, cuya función es permitir que las células capturen la glucosa del torrente sanguíneo hacia el interior de estas.

La glucosa es un monosacárido con fórmula molecular  $C_6H_{12}O_6$ , que es contenido en los alimentos y las células la utilizan con el fin de obtener energía tras su oxidación. Por tanto, la insulina, cumple una función fisiológica fundamental, ya que, sin ella, las células del organismo no podrían asimilar la

glucosa y, por tanto, producir la energía que necesita para llevar a cabo sus funciones, produciendo como consecuencia su muerte.

. Respecto a sus características fisicoquímicas, la insulina es una molécula que presenta un elevado peso molecular (aproximadamente pesa 6000 daltons). Otra característica reseñable a esta hormona es su naturaleza proteica, ya que está formada por 51 aminoácidos que se distribuyen formando, tal y como se puede observar en la figura 1, una estructura tetraédrica, es decir, está formada por cuatro cadenas polipeptídicas. De ellos, 21 componen la denominada cadena alfa, que se corresponde con la cadena azul observada en la figura 1, y los otros 30 aminoácidos restantes forman la cadena beta (cadena verde en la figura 1), las cuales están unidas por dos puentes de disulfuro.

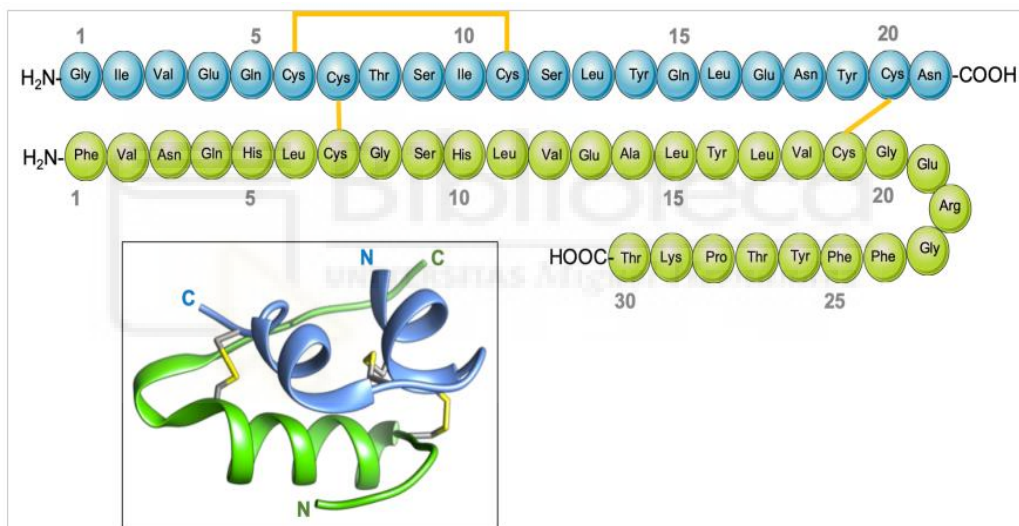


Figura 1: Estructura de la insulina. Tomada de *Elisa Armenteros Aragón et al.* <sup>1</sup>

La insulina se produce en el páncreas, un órgano que, como se puede ver en la figura 2, está situado en la parte trasera del abdomen, debajo del estómago, y se caracteriza por presentar una morfología estrecha y alargada. Está compuesto por dos tipos de glándulas, las cuales tienen funciones digestivas y hormonales, relacionados con el metabolismo de los hidratos de carbono ingeridos en la dieta.

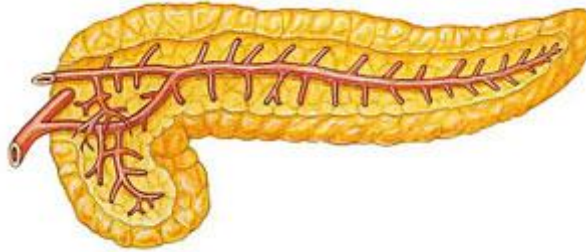


Figura 2: Morfología del páncreas. Tomada de *Antonio Martínez Noguera et al.* <sup>2</sup>

Las glándulas pancreáticas se clasifican en dos tipos:

- **Exocrinas:** Constituyen alrededor del 95 % de la masa celular del páncreas y son las responsables de las funciones digestivas del mismo, ya que estas glándulas tienen como función sintetizar las enzimas digestivas, que son vertidas al estómago mediante una compleja red de conductos que se van uniendo entre sí para confluir en el conducto pancreático principal que desemboca en la parte distal del estómago. Estas enzimas, cuando se vierten al estómago, son activadas por el ambiente ácido presente mismo, con el fin de que rompan las diferentes macromoléculas que componen los alimentos, en moléculas más pequeñas con el fin de favorecer su digestión.
- **Endocrinas:** Solo constituyen el 5% restante del páncreas y se encuentran agrupadas formando pequeñas agrupaciones alrededor de las glándulas exocrinas denominadas islotes de Langerhans. Estas glándulas son las responsables de la función hormonal del páncreas. Existen varios tipos de células endocrinas pancreáticas, las células alfa, responsables de la síntesis del glucagón, las células delta, que sintetizan la somatostatina, y en especial, se destacan las células beta, las cuales son las responsables de la síntesis de insulina. <sup>2</sup>



### **1.3. Mecanismo de acción de la insulina.**

Cuando se incrementan los niveles de glucosa en sangre tras la ingesta de alimentos, ésta penetra en las células beta del páncreas a través de los receptores GLUT2, esta es fosforilada por la enzima glucoquinasa IV, que da lugar como productos, a la glucosa-6-fosfato, y al piruvato, el cual penetrará en la mitocondria. Aquí se oxidará mediante el ciclo de Krebs, dando lugar a ATP, el cual tendrá como función cerrar los canales de potasio sensibles al ATP ubicados en la membrana plasmática de la célula beta. Esto provoca una despolarización de dicha membrana, que tiene como resultado la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje, ubicados también en la membrana.

La apertura de los canales de calcio provoca una entrada masiva de iones de calcio al interior de las células beta, lo cual produce la liberación de los gránulos que contienen la insulina que está siendo producida en el interior de las células beta.

Una vez en el torrente sanguíneo, la insulina se une a los receptores específicos para ella que están presentes en el resto de las células del organismo, en especial, las neuronas del tejido nervoso, las células musculares, y los adipocitos que son las células con más demanda de glucosa necesitan.

Estos receptores de insulina presentan una actividad tirosina quinasa, y estructuralmente, es una glicoproteína transmembranosa compleja, que tal y como puede verse figura 3, está constituida por dos cadenas llamadas alfa (cadenas coloreadas en azul claro en la figura 3) en el lado extracelular de la membrana plasmática, y dos cadenas denominadas beta (cadenas coloreadas en azul oscuro en la figura 3), que poseen un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular en cuyos extremos presentan residuos de tirosina.

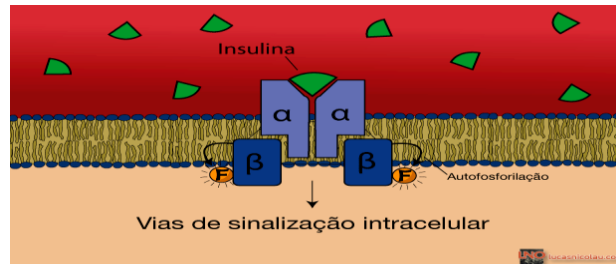


Figura 3: Estructura del receptor de insulina. Tomada de *Lucas Nicolau de Oliveira*.<sup>3</sup>

La insulina interactúa con su receptor, uniéndose a las cadenas alfa, lo cual provocará un cambio de conformación en la estructura de las cadenas beta que conllevará a la autofosforilación de los residuos de tirosina que se encuentran en el dominio intracelular de las mismas.

Estos residuos serán reconocidos por la proteína IRS, la cual se unirá a ellos, provocando la fosforilación de los residuos de tirosina que también presenta esta proteína.

A partir de aquí la vía puede tomar 3 caminos:

- + + + + Vía de la IP3K: En esta vía la proteína IRS fosforilada es reconocida por la enzima fosfatidilinositol 4-5 difosfato (PI3K), la cual fosforila al lípido de la membrana plasmática fosfatidilinositol 3-4-5 trifosfato, el cual al fosforilarse se convierte en PDK1. Este sirve de anclaje para la proteína PKB, que se unirá a PDK1 provocando que también se fosforile. Una vez se haya fosforilado, PKB se desprende de la membrana plasmática dirigiéndose al citoplasma, el cual provoca que esta active las enzimas fosfatasas, que como consecuencia desfosforilan a enzimas de vías hiperglucemiantes e hiperglucemiantes inactivándolas. Por otro lado, PKB fosforilada induce la expresión génica celular para la expresión de enzimas y proteínas, en este caso, es una señal para que la célula produzca más transportadores de glucosa GLUT-4, unas proteínas que se insertan en la membrana plasmática celular, y permiten la absorción de glucosa del torrente sanguíneo al interior celular.
- + + + + Vía de las MAP quinasas: En esta vía una proteína llamada GRB2 asociada a mSOS, reconoce al IRS fosforilado, lo cual provoca su activación, y como consecuencia fosforila a otra proteína llamada RAS, y

esta fosforila a otra proteína llamada RAF, que a su vez fosforila a la proteína MEK, y a su vez esta fosforila a la proteína MAP quinasa, culminando, la cual es capaz de translocarse al núcleo celular, y activar la expresión de transportadores GLUT-4.

- ✚ Vía de la fosfolipasa C gamma: en esta vía se une la proteína IRS fosforilada, la enzima fosfolipasa C, la cual cataliza la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato en los productos diacilglicerol e inositol trifosfato, también conocido como IP3. Este interactúa con los canales de calcio del retículo endoplásmico liso, lo cual provoca la liberación de calcio al citoplasma. Este aumento del calcio intracelular favorece la liberación en la membrana plasmática de las vesículas que contienen los transportadores GLUT-4 que se han sintetizado en el núcleo celular, permitiendo de esta forma que la célula capte la glucosa del torrente sanguíneo <sup>4</sup>.

#### **1.4. Historia de la insulina como fármaco**

Hasta principios del siglo XX, la diabetes era una enfermedad mortal sin cura posible. Todo cambió el 12 de diciembre de 1921, los médicos canadienses Banting y Best descubrieron la insulina y sus funciones. Al año siguiente, Leonard Thomson, un niño de 14 años que presentaba una diabetes severa, fue el primer paciente que se le administró una inyección de extracto pancreático vacuno.

Inicialmente tras su descubrimiento, la insulina provenía de purificaciones cada vez más finas de páncreas de animales. Sin embargo, poco a poco se fueron desarrollando nuevas fuentes y mejora de la calidad de la insulina.

A finales de los años 30, se combinó la insulina con la proteína protamina y el zinc, dando lugar a la primera insulina de tipo lento, que se comercializarían por primera vez de la década de los años 50.

En 1955, se produjo un importante hito en el desarrollo de la insulina, cuando bioquímico británico Frederick Sanger realizó la secuenciación completa de la insulina, lo cual sería fundamental para el desarrollo de la insulina sintética.

A mediados de la década de los 70, los laboratorios farmacéuticos empezaron a producir insulina de forma sintética en los laboratorios.

En la década de los ochenta y noventa surgieron los primeros análogos de acción rápida e inmediata modificados genéticamente, que tenían como objetivo último incrementar el potencial de absorción.

Paralelamente a estos avances, se fueron también desarrollando los métodos de administración de insulina, ya que, al inicio de su descubrimiento, solo estaba disponible en forma de jeringuillas las cuales presentaban un elevado riesgo de producir una crisis hipoglucémica que podía comprometer la vida de los pacientes.

Es por ello por lo que en 1963 surgieron las primeras bombas de insulina, y más tarde en 1970, se mejoraron dichas bombas incluyendo una infusión continua de insulina subcutánea. Mas tarde, también se conectó a un monitor de glucemia continuo. Y finalmente, en 1983, se comercializó por primera vez las plumas de insulina que conocemos hoy en día.

Sin embargo, la insulina es una sustancia proteica, hecho que provoca su degradación en el estómago por parte enzimas proteolíticas producidas en el páncreas. Este hecho provoca que la insulina pierda su conformación, y carezca de efecto.

Por otro lado, su elevado peso molecular dificulta mucho su absorción por las microvellosidades intestinales.

Estas características fisicoquímicas hacen prácticamente imposible la administración de la insulina enteralmente, obligando a administrarla por la vía subcutánea <sup>5</sup>.

### **1.5. Tipos de insulina.**

Las insulinas se clasifican teniendo en cuenta los valores de los siguientes parámetros:

- Inicio (cómo de rápida es su actuación).
- Pico (cuánto tarda en lograr el impacto máximo).

- Duración (cuánto dura el efecto antes de desaparecer).
- Concentración
- Vía de administración (si se administra de forma subcutánea o intravenosa)

En base a esto existen varios tipos de insulina, en las que se exponen sus principales características (resumidos en tabla 1):

*Insulina de acción rápida:* se caracteriza porque empieza a actuar aproximadamente 15 minutos de la inyección alcanzando su máxima eficacia en aproximadamente 1 hora y continúa funcionando durante 2 a 4 horas después de la inyección.

Algunos ejemplos de este tipo de insulina son las inyecciones de insulina glulisina (Apidra ®), insulina lispro (Admelog ®, Humalog ®) e insulina aspart (Fiasp ®, NovoLog ®).

*Insulina de acción corta:* la insulina de este tipo comienza a actuar 30 minutos después de la inyección, alcanza su concentración máxima entre 2 y 3 horas después de la inyección, y persiste su efecto hasta aproximadamente 3 a 6 horas. Un ejemplo de este tipo es la insulina Human Regular ®.

*Insulina de acción intermedia:* Se caracteriza porque empieza a actuar a las 2 o 4 horas de su administración, alcanza el pico máximo alrededor de 4 a 12 horas después, y su efecto persiste aproximadamente 12-18 horas. Como ejemplo de este tipo se destaca el NPH ®.

*Insulina de acción prolongada:* se caracteriza porque frecuentemente se combina con la insulina de acción rápida o corta. Su efecto empieza varias horas después de la inyección y persiste hasta 24 horas después (casi un día completo). Algunas insulinas representativas de este tipo son la insulina Lantus ® o Levemir ®.

*Insulina de acción ultra prolongada:* este tipo se destaca que empieza a actuar a las 6 horas de la inyección, pero no alcanza ningún tipo o concentración

máxima y su efecto persiste aproximadamente 36 horas, y en algunos casos más. Ejemplos de este tipo se encuentran las insulinas Tresiba ® y Toujeo ®<sup>6</sup>

TIPOS DE INSULINA				
Según tiempos de acción				Ejemplos
	<b>Comienzo de la acción</b>	<b>Pico máximo de la acción</b>	<b>Duración del efecto</b>	
<b>Cortas</b>	30 minutos	2-3 horas	3-6 horas	Human Regular ®
<b>Intermedias</b>	2-4 horas	4h-12 horas	12-18 horas	NPH ®
<b>Rápidas</b>	15 minutos	1 hora	2-4 horas	Insulinas glulisina (Apidra ®), Insulinas lispro (Admelog®, Humalog®), insulinas aspart (Fiasp®, NovoLog®).
<b>Prolongadas</b>	Varias horas después	No alcanza pico	24 horas	Lantus ®, Levemir ®,
<b>Ultra prolongadas</b>	6 horas	No alcanza pico	36 horas o mas	Tresiba®, Toujeo ®,

Tabla 1: Tipos de insulina y sus principales propiedades. <sup>7</sup>

### **1.6. ¿Por qué sería conveniente desarrollar formulaciones de insulina para ser administradas por vía oral?**

La vía subcutánea es un tipo de administración parenteral de fármacos, es decir, hace referencia a la administración de estos por debajo de la piel o mucosas.

Existen 3 tipos de vías de administración parenteral:

- Vía intravenosa.
- Vía intramuscular.
- Vía subcutánea: Es la vía de elección para la administración de insulina.

La vía subcutánea que se caracteriza, tal y como se puede comprobar en la figura 4, por la administración de fármacos en tejido subcutáneo (debajo de la piel). Generalmente se administra en el espacio intersticial de los tejidos de la superficie externa de la parte superior del brazo, la superficie anterior del muslo y la porción inferior del abdomen.

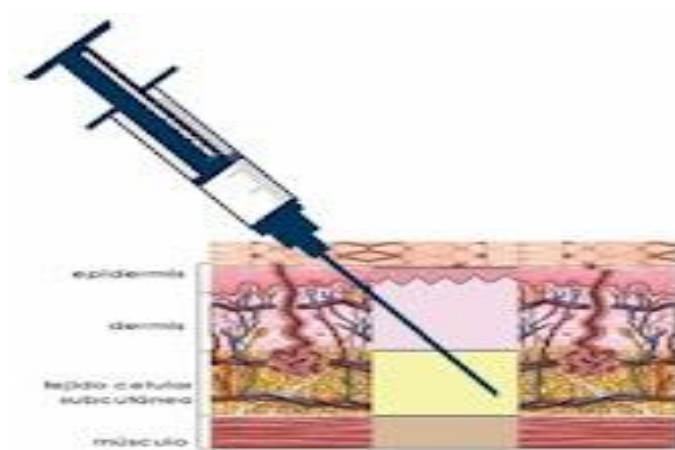


Figura 4: Visualización de la administración subcutánea. Tomada de *Lorena Plazas et al.* <sup>8</sup>

A través de la vía subcutánea se consigue una liberación más o menos sostenida, pues se trata de una región poco vascularizada, por tanto, poco irrigada, lo que hace que la absorción de los principios activos sea relativamente lenta.

No es una vía tan restrictiva como la intravenosa, por lo que se pueden inyectar suspensiones, implantes o soluciones.

Es utilizada para la inyección de pequeños volúmenes de principio activo (1-1,5 ml).

Estas vías parenterales presentan algunas ventajas como son por ejemplo la rapidez del efecto que es vital en casos de urgencia y que evitan el paso del principio activo por el tracto gastrointestinal, lo cual se consigue que, de esta forma, una sustancia como la insulina que se degrada en él se pueda absorber en el organismo.

Sin embargo, presentan una serie de problemas como:

- Necesidad de adiestrar al paciente en la administración de este.
- Mayor posibilidad de error: la absorción del fármaco al ser inyectado directamente al torrente sanguíneo presenta una biodisponibilidad del 100%, por tanto, si el paciente o personal sanitario ha administrado una dosis mayor a la que el paciente necesita, los efectos son irreversibles. En el caso de la insulina, muchos pacientes al administrarse por error una dosis mayor de insulina, han sufrido alguna hipoglucemia con consecuencias fatales algunas veces.
- Elevado coste económico
- Riesgo de infección en el sitio de administración.
- Es una vía invasiva, y, por tanto, es dolorosa, para el paciente.

Estos inconvenientes en el caso concreto de la insulina crean un impacto serio en la calidad de vida de los pacientes, ya que, se debe administrar varias veces al día.

Por un lado, el hecho de tener que pincharse varias veces provoca en los pacientes irritación y dolor en el lugar de inyección. Además, existen pacientes que presentan fobia a las agujas, lo cual, disminuye la adherencia en estos a la insulino terapia.

Las continuas inyecciones provocan irritación local y dolor en el lugar de inyección que sufren los pacientes. Además, existen algunos que presentan fobia a las agujas, lo cual, disminuye mucho la adherencia de este tipo de pacientes al tratamiento.

Además, al inyectarse varias veces, los pacientes diabéticos suelen presentar en su piel lipodistrofia, es decir, la formación de depósitos o bultos de grasa en el lugar de inyección. Esto, además de afectar estéticamente a dicho lugar, provoca también la ralentización de la acción de la insulina al suponer un impedimento para su absorción.

Por tanto, para evitar estos problemas estéticos y no interferir en la acción de la hormona, es necesario rotar la zona de inyección de esta. Para ello, es necesario inyectar la insulina en la zona adecuada, ya que de ello influye la



rapidez de la acción de esta. En la zona del abdomen es la zona donde se produce una mayor rapidez de la absorción de la insulina. En los brazos también se puede inyectar, aunque su absorción es más lenta. Se recomienda cambiar la zona de inyección en función de la hora o necesidad, dejar un espacio de entre 1 o 2 cm, y cambiar de lado cada semana para dar descanso a una zona en su totalidad.

Por otro lado, es necesario que los pacientes ajusten la dosis de insulina que necesitan en cada momento, ya que las plumas de insulina están cargadas con varios cartuchos que contienen diferentes dosis, permitiendo al paciente inyectarse diferentes dosis de insulina. Estas dosis dependerán del tipo de diabetes que presente el paciente, su peso, su nivel de actividad física, o la cantidad de carbohidratos que ha ingerido. Si estos los pacientes no se inyectan las dosis correctas de insulina que requieren, pueden sufrir crisis hipoglucémicas o hiperglucémicas que puede comprometer su estado de salud, e incluso provocarles la muerte.

Por tanto, la vía de administración subcutánea de la insulina presenta una serie de inconvenientes como son la necesidad de adiestramiento para su correcto uso, la necesidad de controlar correctamente las dosis para evitar la aparición de hipoglucemias que pueden ser letales, y sobre todo, el hecho de ser una vía dolorosa e irritante del lugar donde se administra, y que se tengan que administrar varias veces al día los pacientes, inyecciones de insulina, han generado la necesidad de que se busquen otras vías de administración de la insulina, sobre todo por vía oral. Esto es debido a que es la vía menos invasiva, barata, y de fácil administración por parte del paciente. Ello conllevaría una mejora en la adherencia de los pacientes diabéticos a la terapia con insulina.

Actualmente el desarrollo de nuevas formulaciones de insulina es un área de investigación en auge y es en lo que se tratara de ver y discutir en este TFG.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Principal.

El principal objetivo de este trabajo es explorar las estrategias para administrar la insulina por vía oral.

### 2.2. Específicos.

- ✚ Exponer los requisitos que debe tener una formulación de insulina para poder administrarse por vía oral
- ✚ Determinar el tipo de formulaciones y los materiales utilizados para que la administración oral de la insulina sea viable
- ✚ Comprobar la seguridad, tolerabilidad y aceptabilidad de estas nuevas formulaciones.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS.

Se ha realizado una revisión bibliográfica de diversos artículos científicos mediante una búsqueda sistemática sobre las estrategias para administrar por vía oral la insulina.

Se han utilizado las bases de datos Medline (vía PubMed) como una serie de páginas web online con el fin de explicar la justificación de este trabajo.

Para definir los descriptores que definan la búsqueda en la base de datos Medline, se consultó previamente la página de descriptores de la salud (Decs), en la cual se hallaron los descriptores "Administration, Oral" e "Insulin".

Con descriptores se desarrolló la ecuación ("Insulin"[Mesh]) AND "Administration, Oral"[Mesh], la cual se empleó en la base de datos Medline, mediante el buscador PubMed.

Para seleccionar los artículos más apropiados se aplicaron diferentes filtros en la base de datos siguiendo estos criterios:

Criterios de inclusión:

- Artículos que se ajustan a los objetivos de la búsqueda.
- Publicados en los últimos 5 años.

- Redactados en inglés.

Criterios de exclusión:

- No tener el acceso completo,
- Idioma diferente al inglés o castellano.
- Estudios no ajustados al objetivo de la búsqueda.

Una vez aplicados los criterios de inclusión y exclusión mencionados se recuperaron 124 artículos en Medline. Tras una revisión más exhaustiva de los mismos, en las que se examinó el resumen de dichos artículos, se seleccionaron sólo nueve artículos para realizar esta revisión, ya que el resto no contenía información relacionada con el tema de esta investigación, o simplemente eran artículos duplicados. La figura 5 muestra un esquema del proceso que se ha llevado a cabo.

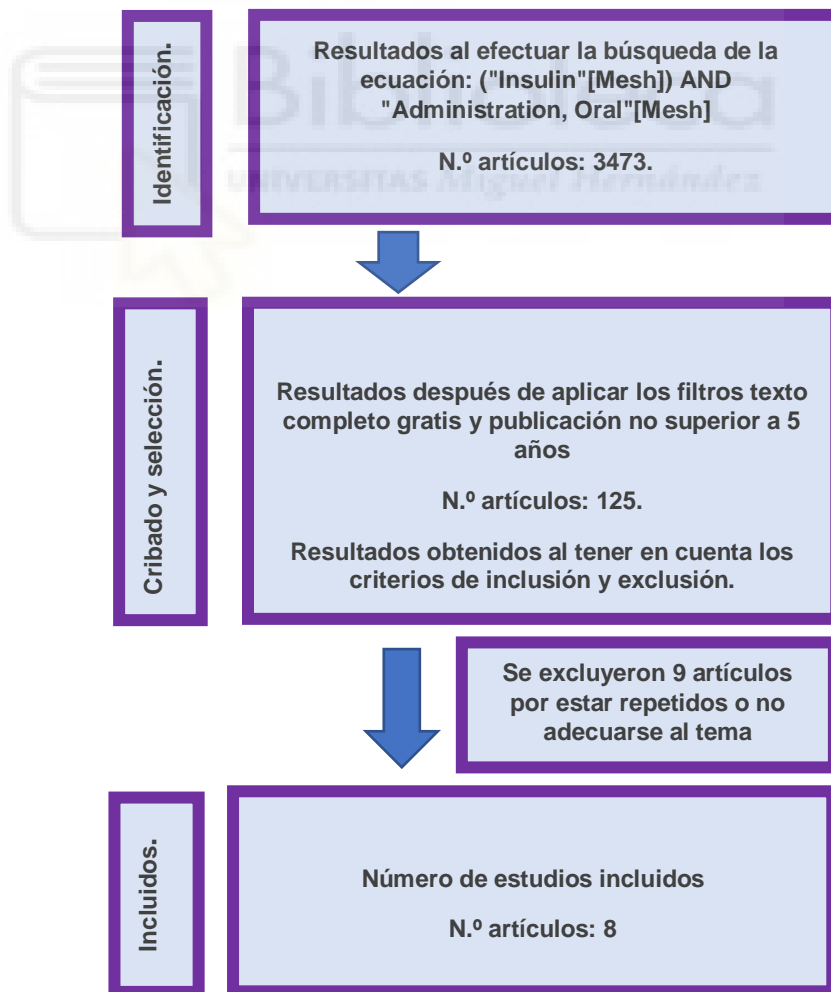


Figura 5: Diagrama de flujo para la identificación y selección de los artículos incluidos en esta revisión

#### 4. RESULTADOS

En la siguiente tabla (tabla 2), recoge los artículos seleccionados para este trabajo y los resultados más relevantes recogidos en cada uno de ellos.

Título	Autor	Revista	Año	País	Resultados
Mechanisms of deformable nanovesicles based on insulin-phospholipid complex for enhancing buccal delivery of insulin	You Xu et al. <sup>9</sup>	International journal of nanomedicine	2018	China	Mayor permeabilidad y reducción de la glucemia en utilizando nanovesículas deformables basadas en complejo de insulina-fosfolípido frente a las vesículas convencionales basadas en complejos insulina-fosfolípido.
Layered double hydroxide modified with deoxycholic and hyaluronic acids for efficient oral insulin absorption.	Xia Huang et al. <sup>10</sup>	International journal of nanomedicine	2021	China	Reducción de la glucemia en un 50% tras 8 horas de administración usando nanopartículas recubiertas de hidróxido modificado con ácido desoxicólico y hialurónico.
Oral administration of zein-based nanoparticles reduces glycemia and improves glucosa tolerance in rats.	Reboredo et al. <sup>11</sup>	International Journal of Pharmaceutics	2022	España	Reducción de la glucemia en un 25 % utilizando microesferas recubiertas de zeína recubiertas de polietilenglicol.
Enteric-coated insulin microparticles delivered by lipopeptides of iturin and surfactin	Xiaoying Xing et al <sup>12</sup> .	Drug delivery	2018	China	Reducción de los niveles de glucosa en aproximadamente un 40% usando microesferas recubiertas de surfactina e iturina con Acryl-Ezel.

pH-sensitive O-Carboxymetil chitosan/sodium alginate nanohydrogel for enhanced oral delivery of insulin	Haibing Zhang et al. <sup>13</sup>	International journal of biological macromolecules	2022	China	Aumento de la biodisponibilidad y reducción significativa de los niveles de glucemia de la insulina insertada dentro de un nano hidrogel de O-carboximetilquitosano y alginato de sodio.
self-assembly nanoparticles originating from small molecule natural product for insulin delivery through modulating tight junctions.	Xiaohujia et al. <sup>14</sup> .	Journal of nanobiotechnology.	2022	China	Reducción de la glucemia aproximadamente en un 70% gracias a la mayor penetración intestinal de nanopartículas de autoensamblaje que se sintetizan a partir de baicalina y cloruro de aluminio
Phospholipid complex based nanoemulsion system for oral insulin delivery: preparation, in vitro, and in vivo evaluations	Xiaong-Bin Xu et al <sup>15</sup> .	International journal of nanomedicine.	2019	China	Reducción de los niveles de glucemia en torno a un 44% de una nanoemulsion de insulina W/O.
Versatile oral insulin delivery nanosystems: from materials to nanostructures	Meng Jie Wang et al. <sup>16</sup>	Journal of nanobiotechnology.	2022	China	Resumen de las principales formulaciones orales para administrar insulina por vía oral, así como sus características.

Tabla 2: Tabla resumen con las características principales de los estudios incluidos para la revisión bibliográfica

## 5. DISCUSIÓN

La vía oral es la forma de administración preferida por los pacientes, ya que se considera la más segura, y generalmente, cómoda. Este hecho le ha convertido en se la vía más común de administración de fármacos, especialmente los que deben emplear de forma crónica como es el caso de la insulina.

Las formulaciones empleadas por vía oral comprenden comprimidos, capsulas, jarabes, soluciones, etc....

Estas formulaciones se ingieren por la boca y tras pasar por el estómago, se absorben en el duodeno principalmente por difusión pasiva, aunque también pueden absorberse por transporte activo y difusión facilitado. El grado de absorción de esta vía viene condicionado por la duración del vaciado gástrico y la duración del tránsito por el intestino delgado.

Por tanto, el paso del estómago y la absorción a nivel intestinal son las dos principales limitaciones que presenta la vía de administración oral de fármacos.

Por un lado, el estómago es un órgano en forma de saco cuya cavidad interior esta hueca. Dicha cavidad presenta un pH ácido generado por una serie de células denominadas parietales, las cuales secretan iones H<sup>+</sup> hacia esa cavidad interior.

Este ambiente ácido es producido para activar a las enzimas proteolíticas, las cuales son producidas en su forma inactiva en la parte exocrina del páncreas y vertidas en el estómago. Estas enzimas, tras el contacto con dicho ambiente ácido, sufren una conformación a su parte activa, y tienen la función de degradar las macromoléculas que componen los alimentos en moléculas más pequeñas para facilitar así su digestión.

La insulina al ser una proteína es degradada por dichas enzimas proteolíticas en concreto por  $\alpha$ - quimiotripsina, cuya función es degradar los enlaces peptídicos entre los aminoácidos que componen las proteínas.

Por otro lado, los fármacos administrados por esta vía deben ser capaces de absorberse por el intestino delgado. Esta absorción está limitada por dos factores principalmente. Por un lado, la pared intestinal está recubierta por una capa de moco denominada mucosa intestinal. Este moco es producido por las células caliciformes de la pared intestinal, y se compone principalmente de agua, y también está compuesto de pequeñas cantidades de glicoproteínas, proteínas, electrolitos y lípidos.

Por tanto, las sustancias eléctricamente neutras o positivas suelen ser absorbidas y retenidas en este moco.

Por otro lado, la pared del intestino está compuesto por una capa de células epiteliales que forman una barrera fisiológica que impide el paso de las sustancias del tracto gastrointestinal al torrente sanguíneo.

Estas células epiteliales están formadas por una serie de células:

- ❖ Enterocitos, las cuales son las responsables de la absorción de nutrientes.
- ❖ Células calciformes, las cuales, como se ha visto en el apartado anterior, son las responsables de la secreción de moco.
- ❖ Células microplegadas, también llamadas células M, las cuales tienen como función capturar los microorganismos y antígenos de la luz intestinal y presentarlo al sistema inmune de la mucosa.
- ❖ Células enteroendocrinas. Secretoras de secretina.
- ❖ Células Pan, secretoras de lisozimas.

Estas células epiteliales están estrechamente unidas formando unas pequeñas aperturas que solo permiten el paso de sustancias pequeñas de pequeño paso molecular. Esta condición limita la absorción de la insulina, ya que se trata de una molécula de elevado peso molecular.

Todas estas limitaciones mencionadas hacen imposible que la insulina se pueda administrar por vía oral por lo que se ha limitado su administración a la vía subcutánea, con las consecuentes inconvenientes que presenta.

Por tanto, para poder administrar esta hormona por vía oral se deben desarrollar estrategias que permitan:

- Protegerla del ambiente ácido del estómago y del ataque de las enzimas proteolíticas.
- Hacerla más permeable a la mucosa y barrera intestinal.
- Utilizar materiales que no sean tóxicos para el organismo.

Todas estas características serán el objetivo principal que discutir en esta revisión.

Entre las estrategias usadas actualmente para poder administrar oralmente la insulina se encuentran:

A. ENCAPSULACIÓN DE LA INSULINA.

Actualmente constituye la principal estrategia para realizar formulaciones de insulina por vía oral. Los sistemas de recubrimiento son materiales que crean una película alrededor de la molécula de la insulina, que la impermeabiliza del medio exterior que la rodea protegiéndola, lo cual, es muy útil para protegerla de la acción de la degradación enzimática.

Estas estructuras presentan una serie de características que las hace ideales para poder a través de ellos insulina:

- ✓ Su reducido tamaño.
- ✓ Su gran superficie específica.
- ✓ Su fuerte adhesión y focalización.
- ✓ Su fácil acceso a las células humanas.
- ✓ Liberación sostenida del fármaco.
- ✓ Superación de las barreras fisiológicas que impiden su absorción.

Por ello, se han desarrollado diversos nanosistemas para encapsular la insulina, como se puede comprobar en la figura 6. Entre ellos destacan las nanomicrocápsulas, nano microesferas, liposomas, nanopartículas sólidas lipídicas, micelas, nanogeles y híbridos orgánicos/inorgánicos.



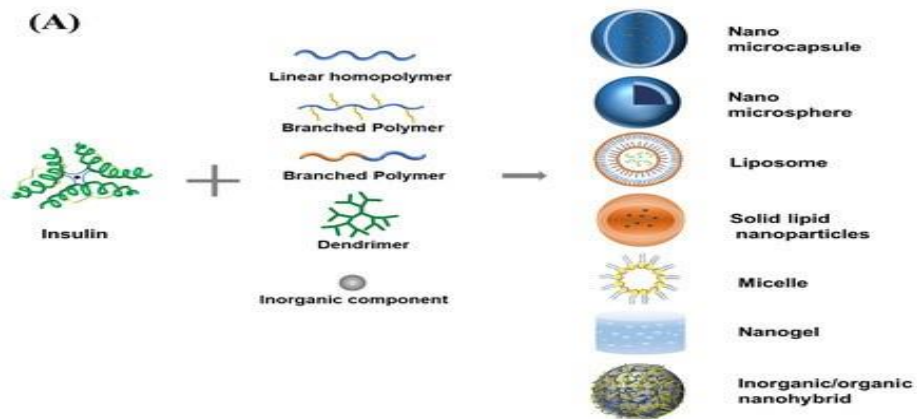


Figura 6: Principales nanosistemas para administrar insulina. Imagen tomada de Mengjie Wang et al <sup>16</sup>

A continuación, se verán con más detalle los principales nanosistemas que se han diseñado para encapsular la insulina

#### ✚ Liposomas o Nanovesículas:

Los liposomas, son vesículas que se caracterizan por presentar un núcleo acuoso donde se almacena el fármaco, en ese caso la insulina, rodeado de una bicapa de fosfolípidos que lo impermeabiliza del exterior, tal y como se muestra en la figura 7. El tamaño de estas estructuras oscila entre 25 nm y 2,5 µm. Por tanto, debido a su tamaño nanométrico nos referimos a ellas como nanovesículas.

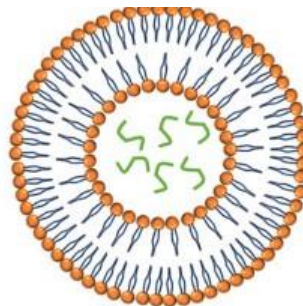


Figura 7: Morfología de un liposoma. Tomada de Mengjie Wang et al. <sup>16</sup>

Con el fin de comprobar sus características de permeación, toxicidad, efecto farmacológico *in vivo*, You Xu et al <sup>9</sup> prepararon nanovesículas de insulina que tenían la característica de ser deformables, con el fin también de comparar sus ventajas respecto a nanovesículas convencionales de insulina.

Estas nanovesículas deformables, a diferencia de las convencionales, no presentan una estructura rígida esférica, sino tal y como se observa en la figura 8, presentan una estructura más elipsoide debido a que son elásticas <sup>17</sup>. Esta conformación, como observamos nuevamente en la figura 8, facilita su paso a través de las estrechas uniones existentes en la barrera epitelial intestinal.

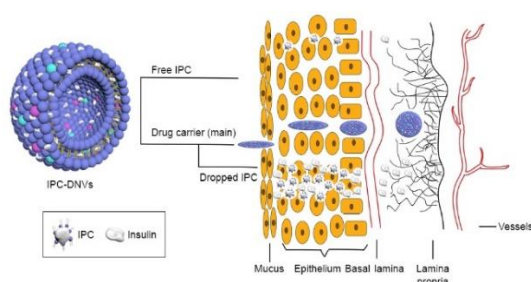


Figura 8: Visualización de la elasticidad de las nanovesículas deformables. Tomada de You Xu et al. <sup>9</sup>

Esta elasticidad se consigue añadiendo a la membrana unas sustancias llamadas “activadoras de membrana” como son por ejemplo el tween 80 y el span 20.

En este experimento You Xu et al <sup>9</sup>, prepararon nanovesículas disolviendo la insulina, lecitina (que es un fosfolípido de carácter anfipático), span 20 (para conferir propiedades elásticas), en cloruro de metano. Una vez añadidas todas las sustancias, las moléculas de lecitina encapsularon la insulina alrededor formando las nanovesículas. Posteriormente, el disolvente orgánico se eliminó mediante evaporación para liberar las nanovesículas.

Los estudios de permeación se realizaron *in vivo* utilizando conejos y consistieron en medir la cantidad de nanovesículas que eran capaces de atravesar la barrera intestinal con el fin de determinar la biodisponibilidad a nivel intestinal, ya que recordemos este era de los puntos limitantes a la administración de la insulina oralmente. Para ello se prepararon tres tipos de formulaciones, una que contenía insulina encapsulada por fosfolípidos dentro de nanovesículas deformables, una segunda formulación que contenía insulina dentro de nanovesículas deformables, pero no encapsulada con fosfolípidos, y una tercera que se trataba de nanovesículas convencionales sintetizadas a partir con fosfolípidos. Para comprobar la permeación intestinal, se determinó la

permeabilidad ( $P_{app}$ ) de cada una de estas tres formulaciones, mediante la siguiente ecuación (figura 9):

$$P_{app} = \frac{\left(\frac{dQ}{dt}\right)}{A \times \Delta C}$$

Figura 9: Ecuación de Papp. Tomada de You Xu et al. <sup>9</sup>

Los resultados mostraron que el grupo de conejos al que le fue administrado nano vesículas deformables a base de fosfolípidos mostró un valor de  $P_{app}$  del  $2,71 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ , el grupo que le fue suministrado nano vesículas deformables, pero no a base de fosfolípidos su  $P_{app}$  fue del  $2,15 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ . Por su parte, el grupo que recibió nano vesículas convencionales a base de fosfolípidos fue de tan solo del  $1,58 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ . Estos resultados demuestran que las nano vesículas deformables presentan una gran ventaja respecto a las nano vesículas convencionales, ya que su tamaño elipsoidal y deformable, permitirse ajustarse al tamaño más ajustado que presentan las estrechas uniones epiteliales del intestino. Además, las nano vesículas deformables deben ser sintetizadas a partir de fosfolípidos, ya que su estructura anfipática favorece la formación de las nano vesículas. Es por ello por lo que el grupo de las nano vesículas formadas a base de fosfolípidos presenta una permeabilidad más alta que el grupo de las nano vesículas formadas a base de otros lípidos.

Por otro lado, con el fin de comprobar que dichas nano vesículas tuvieran efectos hipoglucémicos *in vivo*, los conejos se asignaron al azar en 6 grupos de 3 individuos por grupo. A todos los grupos sin excepción, les fue administrada una solución de estreptozocina, una sustancia que destruye las células beta pancreáticas responsables de la producción de la insulina, con el fin de provocar en los conejos la patología diabética para recrear las condiciones reales de la enfermedad. El primero de ellos, fue el grupo control al que no se le administró la formulación, sino placebo (línea rosa de la figura 10) El segundo grupo se le administró insulina por vía subcutánea tal y como se administra actualmente, a una dosis de 1 UI/kg (línea negra de la figura 12). El tercer grupo se le administró nano vesículas deformables a base de fosfolípidos con una dosis de 1 UI/kg

(línea marrón en la figura 10). Por otro lado, el cuarto grupo se le administró nano vesículas deformables a base de fosfolípidos con una dosis de 10 UI/kg (línea verde). Y, por último, el quinto grupo se le administró nano vesículas deformables a base de lípidos, pero no fosfolípidos (línea roja), con una dosis de 10 UI/kg. Por último, el sexto grupo, le fue administrado nano vesículas convencionales a base de fosfolípidos con una dosis de 10 UI/kg, que se corresponde en la línea azul de la figura 10.

Una vez administrado a cada grupo su correspondiente formulación, se midieron los niveles en sangre de los conejos de los diferentes grupos con el fin de determinar su variación respecto al grupo control, el cual no presenta fluctuaciones tras no habersele administrado ninguna formulación.

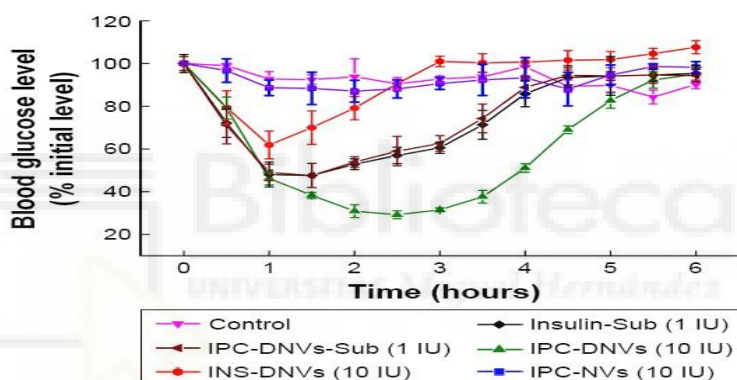


Figura 10: Variación de los niveles de glucosa de los diferentes grupos de nano vesículas. Tomada de You Xu et al. <sup>9</sup>

Como se puede observar en la figura 10, los grupos de conejos que les fue administrado la insulina encapsulada en nano vesículas deformables a base de fosfolípidos (líneas verde y marrón de la figura 12, presentaron una reducción de los niveles de la glucosa más acusada (aproximadamente un 60% de reducción del azúcar en sangre) que los grupos que se les administró insulina encapsulada por nano vesículas deformables a base de lípidos (línea roja), que tan solo mostraron una reducción del 30% y los que recibieron nano vesículas no deformables o convencionales. Esto demuestra, como se ha comentado anteriormente en los estudios de permeación, que las nano vesículas deformables gracias a sus características elásticas penetran en mayor cantidad que las nano vesículas no deformables. Por esta razón si observamos la línea

roja (grupo que recibió nano vesículas deformables, pero no a base de fosfolípidos) presenta una mayor caída de los niveles de glucosa que el grupo que recibió nano vesículas convencionales (línea azul).

Por otro lado, los dos grupos que les fueron administradas nano vesículas deformables a bases de fosfolípidos mostraron excelentes resultados hipoglucémicos. Por ejemplo, si observamos la línea marrón (conejos tratados con nano vesículas deformables con insulina a dosis de 1 UI/kg), se reduce en un 50% los valores de glucosa en sangre el mismo porcentaje que se reduce en los conejos tratados con inyecciones subcutáneas de 1UI/Kg. Esto se traduce que las nano vesículas deformables a base de fosfolípidos que contienen insulina a 1 UI/kg, presentan una caída de los niveles de glucosa casi iguales a los que producen las inyecciones subcutáneas a la misma dosis.

Además, el grupo de conejos al que se le administró nano vesículas deformables a base de fosfolípidos que contenían una dosis de insulina de 10 UI/kg (línea verde en la figura 12), presentó una caída de los niveles de glucosa ligeramente superior (hasta un 60% de reducción de los niveles de glucemia) a los observados al grupo que le fue administrado insulina por vía subcutánea. Esto sugiere que a mayor dosis en las nano vesículas mayor efecto hipoglucémico.

En resumen, de este estudio podemos deducir, que la insulina encapsulada por nano vesículas deformables a base de fosfolípidos es una opción prometedora y realista, ya que ha demostrado tener similar efecto hipoglucémico que las inyecciones subcutáneas que se han usan actualmente.

#### *Nanocápsulas/Nanoesferas:*

Las nanocápsulas son partículas de forma esférica de dimensiones nanométricas que contienen en su interior fármacos. Se preparan mediante materiales naturales o sintéticos conocidos como portadores. Constan de un núcleo interno que puede ser de naturaleza acuosa u oleosa, dependiendo de la naturaleza del fármaco (en este caso al ser la insulina una molécula hidrófila es

acuoso), y una capa a su alrededor que lo recubre e impermeabiliza del exterior, protegiéndolo.

Encontramos varios ejemplos de estas estructuras, como por ejemplo Xia Huang et al <sup>10</sup> que desarrollaron unas nanocápsulas en las que la insulina se encapsuló en una cubierta compuesta de ácido desoxicólico y ácido hialurónico. El ácido desoxicólico es un ácido biliar que se usa para constituir nanopartículas mientras que el ácido hialurónico interacciona con las capas de moco intestinales permitiendo a las nanopartículas adherirse mejor al epitelio intestinal facilitando la absorción <sup>18</sup>.

Xia Huang et al <sup>10</sup>, realizaron diversos estudios donde se comprobó la citotoxicidad, la permeabilidad y reducción de niveles de glucosa *in vivo*, en ratones a los que se le provocó la diabetes mediante la administración de estreptozotocina, una sustancia que destruye las células beta pancreáticas responsables de la síntesis de insulina.

La toxicidad se midió sobre células caco-2 utilizando el ensayo de MTT y se determinó utilizando este método las proporciones adecuadas de cada componente para que la formulación fuera segura.

Los ensayos de permeabilidad indicaron que permeabilidad intestinal mejora con la encapsulación de la insulina mediante estas nanopartículas de ácido desoxicólico/hialurónico (figura 11).

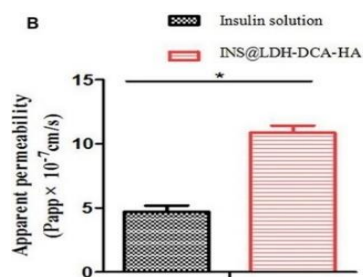


Figura 11: Permeabilidad de las nanopartículas de ácido desoxicólico/hialurónico y la solución de insulina. Tomada de Xia Huang et al.<sup>10</sup>

Respecto a los efectos hipoglucemiantes *in vivo*, Xia Huang et al<sup>10</sup>, utilizaron ratones diabéticos que dividieron en grupos en función de la formulación que se les administró, tal y como se muestra en la figura 12.

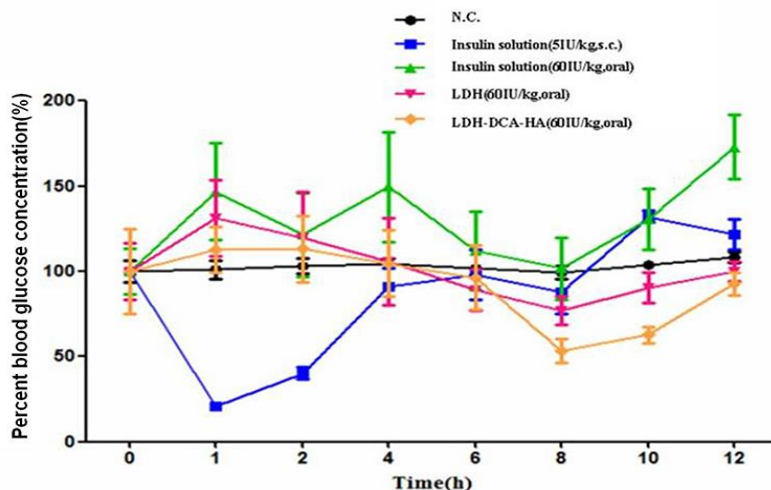


Figura 12: Efecto hipoglucémico de las nanopartículas de ácido desoxicólico y ácido hialurónico. Tomada de Xia Xuang et al<sup>10</sup>

Tal y como se observa en la figura 12, se comparó principalmente como se reducía el nivel de glucemia en los ratones que recibieron las nanopartículas de ácido desoxicólico y hialurónico con una cantidad de insulina a una dosis de 60 UI/kg (línea naranja en la figura 12) frente al grupo que recibió insulina por vía subcutánea a dosis de 51 UI/Kg (línea azul en la figura 12).

Como se puede observar el grupo que recibió insulina por vía subcutánea, presentó la mayor reducción de glucemia respecto a los otros grupos. A las dos horas se reducía su nivel de glucosa en más del 50%. Respecto al grupo que recibió la insulina encapsulada por las nanopartículas de insulina por vía oral encapsulada en las nanopartículas de ácido desoxicólico y ácido hialurónico, no apareció su efecto hipoglucémico hasta las 7 aproximadamente después de su administración. Y también hay que destacar que solo consiguió alcanzar una reducción de los niveles de glucemia alrededor del 50% a las 8 horas de administración. Esto muestra que estas nanopartículas presentan un tiempo de acción más lento que el de las inyecciones subcutáneas. Habría que realizar más

pruebas de los estudios si con mayor dosis, puede mejorar más su efecto hipoglucémico respecto a las inyecciones subcutáneas.

Por su parte Reboredo et al <sup>11</sup>, prepararon unas nanoesferas compuestas por zeína. La zeína es una proteína soluble en alcohol que tiene la particularidad de estimular en las células L del intestino delgado, la síntesis del péptido similar a glucagón tipo 1, más conocido por sus siglas GLP-1 <sup>19</sup>. Esta molécula forma parte de una familia llamada incretinas, que entre sus funciones fisiológicas destaca la estimulación de la insulina en el páncreas. En otras palabras, esto quiere decir que la zeína *per se* podría producir efectos hipoglucemiantes.

Para ello Reboredo et al <sup>11</sup>, estudiaron en ratas diabéticas, a las que se le administró nanoesferas a base de zeína solamente, que son las que en la figura 13, la línea que se corresponde como NP, y a otro grupo a los que se les administró nanoesferas de zeína que contenían insulina en su interior (línea negra en la figura 15 que aparece denominada como NP-PEG).

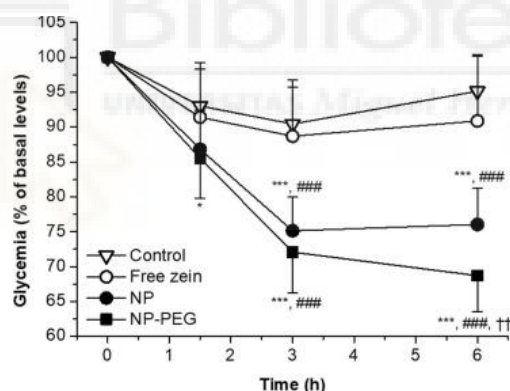


Figura 13: Efectos hipoglucémicos de las nanoesferas de zeína. Tomada de Cristian Reboredo et al <sup>11</sup>.

Como se puede observar en la figura 13, ambos grupos experimentaron similares caídas de los niveles de glucosa en sangre alrededor de las 3 horas de administración (aproximadamente decayeron un 25%), con lo cual esto demuestra que la zeína encapsulada, *per se* reduce la glucosa. Sin embargo, es destacable que el grupo que se le administró zeína libre, es decir sin encapsular (línea que en la figura aparece como free zein), no produjo una reducción de los niveles de glucosa. Esto parece deberse a que la zeína al estar encapsulada aumenta su superficie de absorción e interacciona más con las células



epiteliales. Sin embargo, se deberían hacer más estudios para verificar la toxicidad y estabilidad de las nanoesferas de insulina.

También formularon nanoesferas Xiaoying Xing et al <sup>12</sup>, los cuales sintetizaron unas nanoesferas con una cubierta entérica y administrada junto a dos lipopéptidos en distintas proporciones [surfactina: iturina]. En este estudio los lipopéptidos ITU y SFN se han utilizado en coadministración con la insulina encapsulada por vía oral ya que son potenciadores de la absorción <sup>20</sup>. Para comprobar los efectos hipoglucemiantes en presencia de iturina y surfactina se realizó un estudio *in vivo* con las proporciones de lipopéptidos que resultaron más prometedoras en los estudios de liberación *in vitro*.

Para ello se tomaron 3 grupos de ratones diabéticos, y se determinó la reducción del porcentaje del nivel de glucemia tras administrarle la formulación correspondiente a cada uno de ellos. Al primer grupo, se le administró insulina recubierta con la capa entérica y surfactina e iturina, en proporción [1:1]. Al segundo grupo, se le administró la misma formulación, pero con los lipopéptidos en proporciones surfactina: iturina 0:1. Al tercer grupo, se le administró insulina por vía subcutánea como control.

Tal y como se muestra, en la figura 14, los efectos hipoglucémicos del grupo al que se le administró la insulina recubierta en presencia de surfactina: iturina en proporción 1:1 (línea morada en la figura 14) demostró tener un mayor efecto hipoglucemiante que el que grupo al que le administró la insulina recubierta solo en presencia de iturina (línea azul). El grupo al que le fue administrada insulina por vía subcutánea se representa mediante la línea subcutánea en la figura 14.

Como se puede observar, se demostró que la coadministración de lipopéptidos es una estrategia válida y que presenta una mayor eficacia cuando se han administrado los dos lipopéptidos estudiados en la misma proporción. En ese caso, se ha podido observar que los valores de glucosa han descendido hasta un 50% y se han mantenido en el tiempo. Este estudio abre un nuevo campo de posibilidades para la administración de insulina y otras proteínas por vía oral

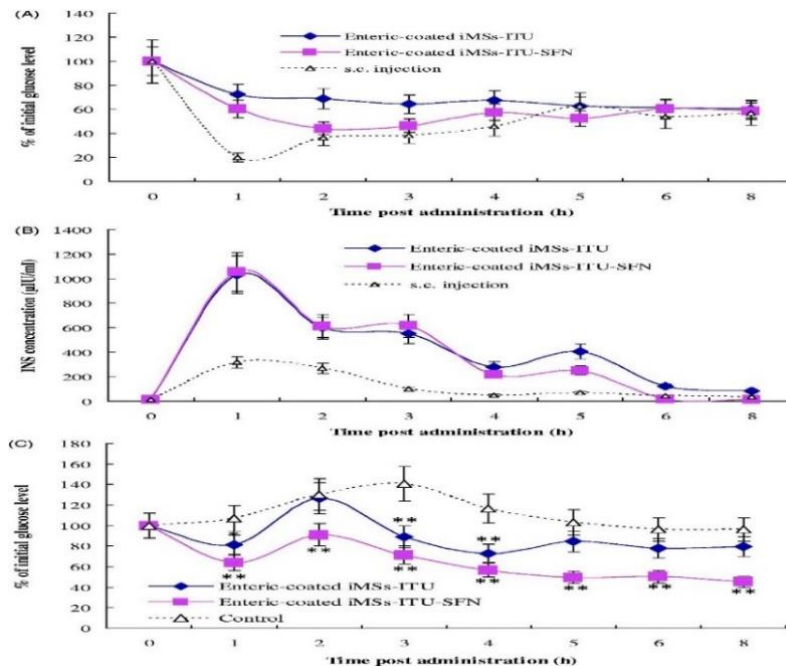


Figura 14: Efectos hipoglucemiantes de los grupos de insulina. Tomada de Xiaoying Xing et al <sup>12</sup>.

#### ✚ Nanogeles:

Los nanogeles, son nanopartículas que forman una red tridimensional, obtenidas mediante reticulación física o química de uno o más monómeros hidrófilos, pero no se pueden disolver en agua. Estos hidrogeles son altamente hidrófilos y biocompatibles, por lo que eluden la acción del sistema inmunitario y mantienen la circulación a largo plazo.

Sin embargo, presentan una desventaja fundamental como es su escasa estabilidad, lo que dificulta que el mantenimiento de la efectividad del fármaco a largo plazo.

Como ejemplo, Haibin Zhang et al <sup>13</sup> prepararon un nanohidrogel mediante el uso de O-carboximetilquitosano y alginato de sodio. El O-carboximetilquitosano es un derivado del quitosano, un polímero compuesto por D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina que carece de toxicidad y ha demostrado que tiene una alta capacidad de adherirse a la mucosa intestinal, lo que favorece su absorción intestinal <sup>21</sup>. Sin embargo, para poder reticularlo, Haibin Zhang et al <sup>13</sup> utilizaron el alginato de sodio, formando la estructura típica del hidrogel, ya que forma con el O-carboximetilquitosano enlaces de hidrógeno.

Estos enlaces de hidrógeno son más fuertes en el ambiente ácido, por esa razón, la estructura del nano gel está más compacta y rígida protegiendo la insulina. Sin embargo, a pH básico, como es el intestinal, estos puentes de hidrogeno son más débiles y la estructura no es tan compacta y rígida, y permite la liberación de la insulina. Por tanto, gracias al pH, se permite una liberación controlada de la insulina en el lugar adecuado como es la mucosa intestinal <sup>22</sup>.

Los ensayos *in vivo* mostraron que el nanohidrogel podía mantener niveles bajos de glucosa en sangre durante tiempo prolongado por lo que suponen una excelente plataforma sobre la que optimizar el sistema.

 **Nanohíbridos orgánicos/inorgánicos:**

Los nanohíbridos son estructuras esféricas similares a las nanoesferas o microcápsulas, sin embargo, en este caso se caracterizan por la presencia en su estructura de compuestos inorgánicos, como el tricloruro de aluminio, usado, por ejemplo, por Xiaohuija et al <sup>14</sup>, que desarrollaron unas nanopartículas esféricas que se originan a partir de baicalina y tricloruro de aluminio, tal y como se muestra en la figura 15.

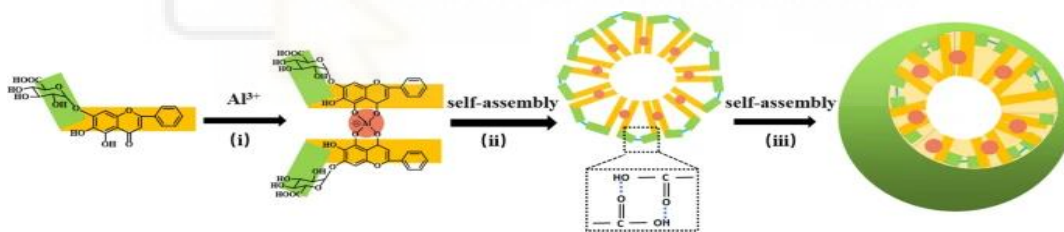


Figura 15: Autoensamblaje de las nano microcápsulas a partir de baicalina y tricloruro de aluminio. Tomada de Xiaohuija et al<sup>14</sup>

La baicalina es un flavonoide producido por la bacteria *Scutellaria Baicalensis*, que tiene como característica principal su naturaleza anfipática, es decir, tiene una parte hidrófoba (que se corresponde con la zona coloreada de verde en la figura, y una parte hidrófila, que se corresponde con la parte coloreada en amarillo oscuro en dicha figura). La parte hidrófila forma enlaces de coordinación e hidrogeno con el tricloruro de aluminio que permiten la constitución de la nanopartícula, donde la insulina queda encapsulada en su interior.

Por tanto, debido al éxito de la síntesis de nanopartículas de baicalina y tricloruro de aluminio, Xiaohuija et al <sup>14</sup> realizaron diversos ensayos donde se midió la permeabilidad de las nanopartículas en el epitelio intestinal con el fin de comprobar la biodisponibilidad, la liberación de la insulina de la nanopartícula, así como sus efectos hipoglucemiantes *in vivo*.

Estudios anteriores al experimento de Xiaohuija et al <sup>14</sup>, sugirieron que la baicalina provoca que, mediante un mecanismo génico no todavía esclarecido, que se inhiba la expresión génica de las proteínas que forman las estrechas uniones paracelulares del epitelio intestinal, como por ejemplo la claudina-1, las proteínas de andamiaje llamadas ZO, etc... Es decir, gracias a que la baicalina inhibe la síntesis de las proteínas que forman parte de las uniones paracelulares de las uniones epiteliales del intestino, permite que estas uniones puedan ser más permeables, y por tanto sería un gran para superar este obstáculo que supone una de las principales limitaciones a la administración oral de insulina <sup>23</sup>.

En estudios *in vitro* se utilizaron células caco-2, una línea de células modificadas genéticamente con el fin de servir modelo de la barrera intestinal. Para ello, tal y como se observa en la figura 16, se hizo pasar a través de dichas células caco 2, una solución de baicalina y nanopartículas de baicalina ensambladas con tricloruro de aluminio, observando a través de fluorescencia el nivel de síntesis de proteínas.

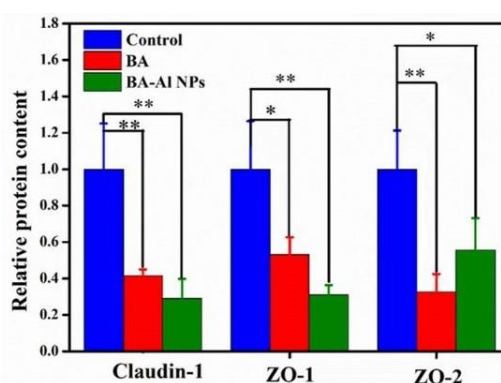


Figura 16: Inhibición de las proteínas oclusivas epiteliales por parte de la baicalina. Tomada de Xiaohuija et al <sup>14</sup>

Como se puede observar en la figura, las columnas rojas y verdes, corresponden a los niveles de proteínas expresadas tras la exposición a la sustancia de baicalina sola (líneas rojas), y a las nanopartículas de baicalina y

tricloruro de aluminio (líneas verdes). Como observamos, tras administrar la baicalina sola, en los tres casos, la columna roja decae demostrando que reducen el nivel de proteínas expresadas, sin embargo, si observamos las líneas verdes (nanopartículas de baicalina y tricloruro de aluminio) alcanzan un nivel todavía más bajo que las líneas rojas. Esto demuestra que efectivamente, la baicalina presenta un efecto inhibitor sobre la síntesis de estas proteínas oclusivas, y que es más efectivo cuando forma las nanopartículas.

Respecto a la liberación de la insulina de las nanopartículas de baicalina y tricloruro de aluminio, se observó, que los niveles de insulina libre a pH básico (alcanzan un valor del 80%, mientras que al valor de la insulina libre a pH ácido apenas alcanza un valor del 10%. Esto se puede deber a que en el ambiente ácido los puentes de hidrógeno entre la baicalina y el tricloruro de aluminio son más fuertes dando más consistencia a la nanopartícula formada.

Respecto a los efectos hipoglucemiantes de las nanopartículas de baicalina y tricloruro de aluminio, que los valores de glucemia tardaban unas 5h en disminuir, pero los valores bajos de mantenían en el tiempo mucho más que con la insulina subcutánea

#### B. SISTEMAS DE NANOEMULSION BASADO EN COMPLEJOS DE FOSFOLIPIDOS:

Las nanoemulsiones son un tipo de emulsiones cuyo tamaño de gotícula oscila entre 50-200 nm. Debido a que algunos fármacos, como el paeonol, han mejorado su biodisponibilidad al ser formulados como nanoemulsiones, Hu XB<sup>15</sup> evaluaron la administración de insulina oralmente por esta técnica utilizando nanoemulsiones A/O y O/A en las que la insulina se cargó siempre en la fase oleosa para protegerla de la degradación enzimática del tracto gastrointestinal.

Sin embargo, no se puede encapsular la insulina directamente en la fase oleosa o hidrófoba debido a su naturaleza hidrofílica, por lo tanto, es necesario encapsularla dentro de un complejo de fosfolípidos, ya que presentan una parte hidrofílica que interactúa con la insulina, y una parte hidrófoba que interactúa con el líquido oleoso.

Con el fin de evaluar su eficacia, Hu XB et al <sup>15</sup> sometieron ambas nanoemulsiones a estudios previos a su administración *in vivo*, para comprobar la estabilidad y permanencia de la insulina en dichas nanoemulsiones. Dichas pruebas consistieron en comprobar la resistencia de ambos sistemas a la degradación de las enzimas digestivas, determinar la permeabilidad intestinal, así como la citotoxicidad de ambas nanoemulsiones.

En primer lugar, se evaluó la resistencia de las formulaciones al ataque enzimático. Para ello se dispersaron las nanoemulsiones en disoluciones de pepsina o tripsina (ambas son enzimas proteolíticas) a 37°C durante 8 horas y se recogieron muestras a los tiempos prefijados. Los resultados mostraron, que la insulina libre efectivamente sufre una degradación enzimática, pero si se administra protegida por nanoemulsiones, se reduce notoriamente su degradación. Como dato a señalar en ambas incubaciones, la nano emulsión W/O, mostraron un mayor porcentaje de insulina remante que las nanoemulsiones O/W en las dos incubaciones. Esto se puede atribuir que las nanoemulsiones W/O presentan un mayor efecto protector debido a que impermeabilizan el paso de las enzimas proteolíticas al ser estas hidrófilas.

Los estudios de toxicidad mostraron que más del 90% de las células Caco-2 eran viables, lo cual evidenció que las nanoemulsiones no presentan efectos tóxicos.

Por último, se realizó un estudio *in vitro* de permeabilidad utilizando monocapas de células Caco-2. Tal y como puede verse, en la figura 17, el valor de permeabilidad en la insulina por vía oral es inferior al valor de permeabilidad de las dos nanoemulsiones, entre las cuales no hay diferencia significativa de dicho valor.

Formulation	$P_{app} \times 10^{-6}$ cm/s	R
Insulin (control)	12.1±0.3	—
IPC	15.3±0.5*	1.26
W/O IPC-NE	17.9±0.2* <sup>##</sup>	1.48
O/W IPC-NE	18.1±0.3* <sup>##</sup>	1.50

Figura 17: Tabla de valores de permeabilidad de la insulina de las diferentes formulaciones. Tomada de Hu XB et al.<sup>15</sup>

Tras estas pruebas, se procedió a realizar ensayos *in vivo*, donde se procedió a administrar oralmente las dos nanoemulsiones en ratas diabéticas para observar el efecto hipoglucemiante que presentaban. Los resultados indicaron que ambas nanoemulsiones presentan un efecto hipoglucemiante, sin embargo, la nano emulsión W/O presenta una reducción de glucosa mayor que la O/W. Esto se puede explicar a que las enzimas proteolíticas actúan en medio acuoso, lo cual, al encontrarse la insulina encapsulada dentro de un medio oleoso, impediría que dichas enzimas pudieran penetrar hasta ella. Por otro lado, también el medio lipófilo facilitaría la permeabilidad de la insulina a través de la barrera intestinal.

Por tanto, esta estrategia constituye una opción real para hacer posible el uso de la insulina por vía oral.

### C. INHIBORES ENZIMÁTICOS.

Los inhibidores enzimáticos se usan para antagonizar la acción de las enzimas proteolíticas y evitar que degraden la insulina. Mengjie Wang et al <sup>16</sup> indican que el fármaco llamado ORMD-0801, desarrollado por la compañía farmacéutica Oramed, incluía como potenciadores de la permeación, un inhibidor de tripsina de la soja y un agente quelante del calcio. Sin embargo, en la actualidad dicho fármaco se encuentra en la fase III, y la biodisponibilidad es del 5-8%. Hay que destacar también que la seguridad y eficacia de fármaco son desconocidas. A pesar de ellos, parece una estrategia con posibilidades para mejorar la biodisponibilidad de la insulina en combinación con otras estrategias.

Sin embargo, pese a todas estas prometedoras investigaciones, todavía quedan muchos **obstáculos** que superar para que estas estrategias puedan ser una realidad, como es, por ejemplo, que se desconoce mucho de los perfiles de seguridad de los materiales de recubrimiento. Otros obstáculos para superar son el control exacto de la dosis, y la viabilidad del proceso de preparación, ya que actualmente es muy complejo preparar todos estos nanosistemas de recubrimiento. Por ejemplo, a nivel industrial, no sería rentable la fabricación de insulina oral a gran escala.

Por tanto, para resumir estas estrategias son muy prometedoras, pero para que lleguen a comercializarse es necesario más estudios de investigación referidos a la dosis a administrar, las medidas de conservación etc.

## **6. CONCLUSIONES:**

- Las formulaciones de insulina para la vía oral deben proteger a la proteína de la degradación enzimática y promover la permeabilidad intestinal de la misma sin producir toxicidad
- Las estrategias más prometedoras son la encapsulación de la insulina en nanovesículas deformables, nanocápsulas o nanohidrogeles y la incorporación de la proteína a la fase oleosa de nanoemulsiones utilizando materiales adecuados para la vía oral como fosfolípidos, lipopéptidos, etc. Recientemente se está apostando por la coadministración de insulina con inhibidores enzimáticos
- Estas formulaciones han resultado ser biocompatibles y no tóxicas. La principal limitación es la estabilidad en algunos casos como los nanohidrogeles y el precio del producto final.
- Se requiere realizar muchísimos más estudios para que todas estas estrategias sean una realidad, ya que es necesario explorar si estos niveles de citotoxicidad aceptables en animales son extrapolables a humanos, si la respuesta terapéutica sería igual, y, sobre todo, se necesita determinar las dosis efectivas en estas nuevas formulaciones. También se debe determinar la estabilidad, la rentabilidad industrial y las interacciones de estas formulaciones con los fármacos hipoglucemiantes.



## 7. BIBLIOGRAFÍA:

1. Dpto. Bioquímica y Biología Molecular [Internet]. [cited 2023 May 9]. Available from: <http://proteinasestructurafuncion.usal.es/moleculas/Insulina/index.html>
2. Páncreas: ultrasonidos para un mejor diagnóstico - UABDivulga Barcelona Investigación e Innovación [Internet]. [cited 2023 May 9]. Available from: <https://www.uab.cat/web/detalle-noticia/pancreas-ultrasonidos-para-un-mejor-diagnostico-1345680342040.html?articleId=1194422380374>
3. Resistência Insulínica | Lucas Nicolau. [Internet]. [cited 2023 May 9]. Available from: <https://lucasnicolau.com/?v=publicacoes&id=10>
4. Makki F.; Froguel P.; Wolowczuk I. Tejido adiposo en la inflamación relacionada con la obesidad y la resistencia a la insulina: células, citocinas y quimiocinas. 2013.
5. Allen N GA. Current Diabetes Technology: Striving for the Artificial Pancreas. Diagnostics. 2019;
6. Tipos de insulina :: Diabetes Education Online [Internet]. [cited 2023 May 9]. Available from: <https://dte.ucsf.edu/es/tipos-de-diabetes/diabetes-tipo-2/tratamiento-de-la-diabetes-tipo-2/medicamentos-y-terapias-2/prescripcion-de-insulina-para-diabetes-tipo-2/tipos-de-insulina/>
7. Tipos de insulina [Internet]. [cited 2023 May 9]. Available from: <https://www.redgdps.org/consenso-insulinizacion-dm2-redgdps/tipos-de-insulina>
8. Administración de Medicación Vía Subcutánea [Internet]. [cited 2023 May 9]. Available from: <http://tecnicasenfermeriausc.blogspot.com/2017/12/administracion-de-medicacion-via.html>
9. Xu Y, Zhang X, Zhang Y, Ye J, Wang HL, Xia X, et al. Mechanisms of deformable nanovesicles based on insulin-phospholipid complex for enhancing buccal delivery of insulin. *Int J Nanomedicine*. 2018;13.
10. Huang X, Han S, Chen Z, Zhao L, Wang C, Guo Q, et al. Layered double hydroxide modified with deoxycholic and hyaluronic acids for efficient oral insulin absorption. *Int J Nanomedicine*. 2021;16:7861–73.
11. Reboredo C, González-Navarro CJ, Martínez-López AL, Irache JM. Oral administration of zein-based nanoparticles reduces glycemia and improves glucose tolerance in rats. *Int J Pharm*. 2022 Nov 25;628.
12. Xing X, Zhao X, Ding J, Liu D, Qi G. Enteric-coated insulin microparticles delivered by lipopeptides of iturin and surfactin. *Drug Deliv*. 2018;25(1):23–34.
13. Zhang H, Gu Z, Li W, Guo L, Wang L, Guo L, et al. pH-sensitive O-carboxymethyl chitosan/sodium alginate nanohydrogel for enhanced oral delivery of insulin. *Int J Biol Macromol*. 2022 Dec 31;223:433–45.

14. Jia X, Yuan Z, Yang Y, Huang X, Han N, Liu X, et al. Multi-functional self-assembly nanoparticles originating from small molecule natural product for oral insulin delivery through modulating tight junctions. *J Nanobiotechnology*. 2022 Dec 1;20(1).
15. Hu X Bin, Tang TT, Li YJ, Wu JY, Wang JM, Liu XY, et al. Phospholipid complex based nanoemulsion system for oral insulin delivery: Preparation, in vitro, and in vivo evaluations. *Int J Nanomedicine*. 2019;14:3055–67.
16. Wang M, Wang C, Ren S, Pan J, Wang Y, Shen Y, et al. Versatile Oral Insulin Delivery Nanosystems: From Materials to Nanostructures. *Int J Mol Sci*. 2022 Mar 1;23(6).
17. Cevc G, Blume G. Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force. *BBA - Biomembranes*. 1992;1104(1).
18. Han L, Zhao Y, Yin L, Li R, Liang Y, Huang H, et al. Insulin-Loaded pH-Sensitive Hyaluronic Acid Nanoparticles Enhance Transcellular Delivery. *AAPS PharmSciTech*. 2012 Sep 30;13(3):836–45.
19. Mochida T, Hira T, Hara H. The corn protein, zein hydrolysate, administered into the ileum attenuates hyperglycemia via its dual action on glucagon-like peptide-1 secretion and dipeptidyl peptidase-IV activity in rats. *Endocrinology*. 2010 Jul;151(7):3095–104.
20. Zhao H SDJC et al. Actividad biológica de los lipopéptidos de Bacillus. *Appl Microbiol Biotechnol* 101. 2017;5951–60.
21. Liu M, Zhang J, Zhu X, Shan W, Li L, Zhong J, et al. Efficient mucus permeation and tight junction opening by dissociable “mucus-inert” agent coated trimethyl chitosan nanoparticles for oral insulin delivery. *Journal of Controlled Release*. 2016 Jan 28;222:67–77.
22. Hu Q, Luo Y. Recent advances of polysaccharide-based nanoparticles for oral insulin delivery. *Int J Biol Macromol*. 2018 Dec 1;120:775–82.
23. Hisada M, Hiranuma M, Nakashima M, Goda N, Tenno T, Hiroaki H. High dose of baicalin or baicalein can reduce tight junction integrity by partly targeting the first PDZ domain of zonula occludens-1 (ZO-1). 2020.