



**SUBDIRECCION DE INVESTIGACION  
Y ESTUDIOS DE POST GRADO**

**"PERFUSION DE GRANDES DOSIS DE INSULINA  
HACIA ARTERIA CENTRAL DE LA RETINA"**

**TESIS QUE EN OPCION AL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA**

**DRA. MARIA GUADALUPE H. ZAPIAIN MARROQUIN**

**MONTERREY, N. L., MAYO DE 1985.**

TM  
RE66  
.D5  
Z3  
c.1



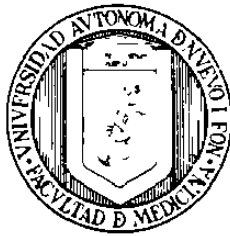
1080071420

DUPLICADO

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA

SUBDIRECCION DE INVESTIGACION Y ESTUDIOS DE POST GRADO



DONADO POR: Maria H  
Zapiain Marroquin  
FECHA Agosto 1985

"PERFUSION DE GRANDES DOSIS DE INSULINA HACIA ARTERIA  
CENTRAL DE LA RETINA"

tesis que en opción al grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

presenta

DRA. MARIA GUADALUPE HORTENCIA ZAPIAIN MARROQUIN

Monterrey, N.L., MAYO de 1985.

TAM  
RE 661  
-DSM  
23

①

TEMS MADSTRA

DEPARTAMENTO DE FISILOGIA

FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

Asesor:

DR. JOSE PISANTY O.

DEDICADO:

A MIS PADRES:

Por haberme dado las bases, para mi desarrollo personal y profesional.

A MI ESPOSO:

Por su amor y apoyo que me impulsan a la --  
superación constante.

A MIS HIJOS:

Quienes con su existencia dan sentido a mi -  
vida.

A MI MAESTRO:

Dr. José Pisanty, quién ha sabido con su -  
ejemplo despertar en mi la curiosidad inves-  
tigadora.

## MI AGRADECIMIENTO:

Al Dr. Roland Engerman de la Universidad de Madison Wisconsin, U.S.A. quién amablemente me instruyó en el manejo de la técnica de Kuwabara y Cogan.

A los maestros miembros del Jurado de esta tesis por sus indicaciones, críticas y sugerencias.

A todos los miembros del Departamento de Fisiología quienes con su armonía y dedicación al trabajo colaboran en el desarrollo profesional de sus estudiantes tanto de pre como de post-grado.

A las secretarias, Martha Elvia Galindo Lerma y Reyna Olga Rdz. de Nudding por su colaboración en el trabajo mecanográfico de esta tesis.



# I N D I C E

CAPITULO		PAGINA
I	INTRODUCCION.....	1
II	MATERIAL Y METODOS .....	5
III	RESULTADOS .....	10
IV	DISCUSION Y CONCLUSIONES .....	22
V	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	24

## CAPITULO I

### I N T R O D U C C I O N

La insulina es una hormona secretada por las células Beta de los islotes pancreáticos, descubierta y aislada - por Banting y Best en 1921, cristalizada por Abel en - 1926, y su constitución química aclarada por Sanger en 1956; tiene un peso molecular de 5,700 y está formada - por 2 cadenas de aminoácidos (A y B) unidas entre sí - por puentes disulfuro (6 y 7).

Desde que la insulina purificada se aisló, se inició - también su utilización para fines experimentales y clínicos; excepto por diferencias en la magnitud de la resupuesta, dependiendo de la sensibilidad de especie, la - insulina causa invariablemente un efecto hipoglucémico que no es mediado por ningún órgano ó tejido en partiucular.

La insulina cuando es administrada a los pacientes que padecen la enfermedad metabólica conocida como diabetes, corrige la mayor parte de los trastornos específicos, - por lo que ésta hormona se utiliza como medicamento paura los diabéticos.

La diabetes está asociada con anormalidades de los veuqueños vasos sanguíneos. Estas alteraciones pueden ser estudiadas en vida sobre retina, conjuntiva y lecho unugueal.

La microcirculación retiniana es fácilmente observable

y es donde se detectan primeramente las manifestaciones clínicas de la microangiopatía diabética.

La retina, al igual que el cerebro, probablemente no requiere de insulina para captar la glucosa (1)

La causa exacta de la Microangiopatía diabética no es conocida pero las células endoteliales parecen jugar un papel fundamental en su desarrollo, uno de los principales apoyadores de esta hipótesis es Siperstein considerado como el primer estudioso en este campo; Jhon W. Vester se refiere a las lesiones vasculares diabéticas en estos términos "Yo personalmente me inclino a sentir que la microangiopatía es en realidad la lesión primaria. Es también mi pensamiento que la delineación de los factores que producen anormalidades pueden revelarnos (en el caso de la diabetes) el camino para conocer la terapia efectiva". (14)

Se ha mencionado una gran cantidad de posibles etiologías y factores que favorecen o agravan la sintomatología de las lesiones retinianas, entre ellas el incremento del flujo sanguíneo que lesiona el endotelio, las variaciones del flujo que no pueden ser compensadas debido a que el problema metabólico causa que se formen fácilmente trombos en los pequeños vasos y la consecuente oclusión.

Engerman y Cols. (3) mencionan que los perros con diabe

tes mal controlada presentan retinopatía con más frecuencia que los que tienen un mejor control de la enfermedad; Leslie y Pyke basados en un estudio hecho en 95 pares de gemelos idénticos dan importancia a los factores genéticos (8), y más recientemente se habla de los niveles de prostaglandinas. Como posibles causas de retinopatía así como los tromboxanos (12). Se menciona que hay también relación con la severidad de la retinopatía y el tabaquismo (9).

Las manifestaciones de la retinopatía diabética son secundarias a la oclusión vascular, hemorragias, microaneurismas y depósitos algodonosos; en las áreas donde el capilar no perfunde, cuando hay grandes zonas sin perfusión, se forman nuevos vasos, típicos también de la retinopatía. (4)

La ceguera por retinopatía diabética es un problema público importante en la sociedad. En Estados Unidos, es responsable de un 10% de los nuevos ciegos de todas las edades y de un 20% de los que se encuentran en las edades de 45 a 74 años. (10)

El riesgo de ceguera causado por la diabetes depende de la edad del paciente al hacerse el diagnóstico y de la duración de la enfermedad. Caird 2) estima que para un diabético juvenil diagnosticado a los 20 años de edad el riesgo de ceguera es de 0.1% después de 10 años

y 3.5 después de 30 años. En el diabético adulto - diagnosticado a los 40 años, 3.8% después de 20 años y 7.1% después de 30, cuando la diabetes se diagnostica a los 60 años de edad el riesgo es de 1.8% después de 10 años y 5.05% después de 20 años.

La prevalencia de ceguera causada por la retinopatía - diabética fué ligeramente baja en la era pre-insulínica, ya que pocos diabéticos escaparon a los estragos - de la cetocacidosis e infección por largos períodos para desarrollar ó revelar retinopatía. (15)

Basados en estos antecedentes hemos querido diseñar un trabajo que nos permita abrir una línea de investigación sobre las probables causas que favorecen la aparición de la retinopatía en el paciente diabético y para ello hemos tomado en cuenta la idea popular de que al iniciar el tratamiento con insulina también se desencadena la retinopatía.

Nuestra hipótesis de trabajo sera por lo tanto:

" La dosis alta (40 U/Kg.) de insulina en sangre favorece la aparición de la retinopatía."

## CAPITULO II

### MATERIAL Y METODOS

En esta serie de experimentos se utilizaron 30 perros - de raza indefinida y de ambos sexos entre 10 y 20 Kg., los cuales se sometieron al siguiente tratamiento:

Se anestesiaron con pentobarbital sódico intraperitoneal; a razón de 33 mg. por Kg. de peso, se practicó ve nodisección femoral para pasar a través de vena femoral una solución de glucosa al 10% I.V. con un venopak y - aguja de 23 x 35, además se realiza una incisión lineal media a nivel de cuello para localizar y disecar la arteria carótida primitiva que es seguida hasta su bifurcación a nivel del ángulo del maxilar inferior, en este sitio se identifican las ramas interna y externa de la carótida y se coloca un hilo de referencia en la rama - externa; se procede a purgar un cateter de polietileno #10 para la perfusión de insulina que se encuentra en - 500 cc. de solución salina a una concentración de 40 U - de insulina por Kg. de peso (Insulina Lilly).

En 5 casos se perfundió solución de insulina inactivada por calor en ebullición a baño maría por 2 horas; para comprobar dicha inactivación se administró a perros nor males el equivalente en volumen a una unidad por Kg. de peso en cada uno de los casos, sin observar hipoglucemia. Y en otros 5 con solución salina al .9%, en cada - caso la solución será impulsada por una bomba de perfu-

si3n continua.

Inmediatamente antes de iniciar la perfusi3n se extrae uno de los globos oculares que servir3 como testigo. -- Una vez listo esto se procede a pasar la insulina; para lograrlo se coloca el cateter en car3tida primitiva y se dirige hacia la bifurcaci3n, inmediatamente antes de llegar a ella se hace tracci3n sobre el hilo de referencia de la rama externa con lo cual bloqueamos su luz y podemos dirigirnos hacia la rama interna, ya colocada - iniciamos la perfusi3n de insulina, as3 como la de glucosa a trav3s de vena femoral, ambas soluciones pasan - con una velocidad de 10 gotas por minuto; la perfusi3n se continuar3 por un peri3do no menor de 4 horas ni mayor de 6 tratando de mantener los niveles iniciales de glucemia, este control se realiza a trav3s de tiras de dextrostix le3das en un reflect3metro Eyetone.

Al concluir la perfusi3n se extrae de inmediato el otro globo ocular; ambos ojos se colocan en sendos recipientes debidamente marcados en soluci3n de formol al 10% - por un m3ximo de 24 horas, al cabo de las cuales se - - pr3ctica la revisi3n de la vasculatura retiniana mediante la t3cnica de Kuwabara y Cogan, (13) la cual consiste en la digesti3n del tejido retiniano con tripsina de la siguiente forma:

1.- Se abre el ojo coronariamente con una navaja y con

unas tijerillas rectas, con el globo ocular sumergido en agua en una caja de Petri y bajo el micorscopio estereoscópico.

2.- Se observa el fondo buscando hemorragias, pigmentaciones anormales ó depósitos.

3.- Se divide la retina en 4 secciones diferenciando - correctamente cada sección; Superior temporal, Superior nasal, Inferior temporal, Inferior nasal (para esto es importante conocer si el globo ocular es derecho ó izquierdo) y se procede a separar la retina de cada segmento con una pequeña espátula de metal y colocarlas en una capsula de metal cada una tomándola con un gotero.

4.- Cada una de las capsulas debe ser claramente marcada y se deja enjuagando en agua corriente durante toda la noche para eliminar los restos de formol.

EN LA MAÑANA SIGUIENTE:

1.- Se descongelan los tubos que contienen la solución de tripsina (que previamente fué preparada como se explicará más adelante) introduciendolos en agua tibia e invirtiendo cuidadosamente el tubo.

2.- Se prepara el baño de temperatura constante a 37°C

3.- En vasos de precipitado de 10 cc. se coloca solución de tripsina, a la concentración indicada en la técnica de tripsina, con una sección de retina en cada vaso se



ponen en baño de temperatura constante por aproximadamente 4 horas (para ojos de perros).

4.- Después de una hora u hora y media se procede a tratar de separar el vitreo de cada sección de retina, esto favorece la digestión de la retina.

5.- Una vez pasadas 4 horas se retira una de las piezas y se coloca bajo el microscopio en una caja de Petri - con H<sub>2</sub>O (utilizando un gotero de vidrio) para iniciar - la limpieza del tejido vascular, ésta se hará con un - par de varillas de vidrio que en su extremo tienen un - pelo (de camello) para retirar el tejido, una vez lim- - pios los vasos retinianos se procederá a montarlos en - un portaobjetos.

6.- Para montar la preparación se utiliza una placa de Petri especialmente diseñada, (fig.1) a la cual se le - pone agua, y el portaobjetos, se coloca la preparación sobre la parte central con el gotero de vidrio y se procede a drenar el H<sub>2</sub>O cuidando de que la fuerza del flujo no sea muy grande y succione el tejido, una vez montada se deja secar, bajo el microscopio con la lámpara encendida y cubierta con un vidrio de reloj.

7.- Ya seca la preparación se tiñe con PAS-HE se cubre y marca correctamente (se hace el mismo procedimiento - con cada una de las secciones retinianas).

#### **BUFFER TRIS PARA TRIPSINA:**

1.- En un vaso de precipitado de 250 ml. se colocan -

FIG. No. 1

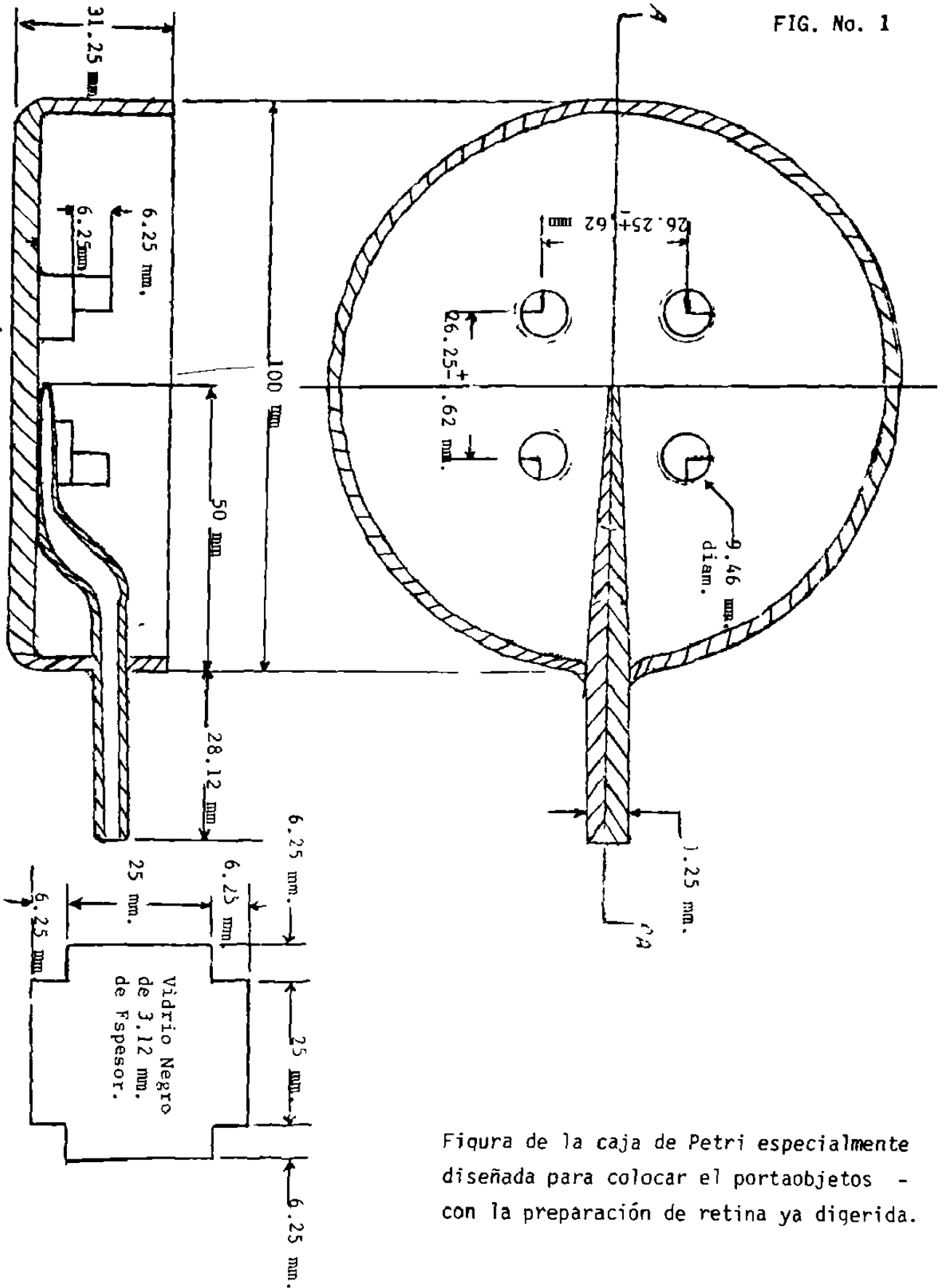


Figura de la caja de Petri especialmente diseñada para colocar el portaobjetos - con la preparación de retina ya digerida.

30.29 grs. de trishidroximetilaminometano.

2.- Se agrega 150 ml. de H<sub>2</sub>O destilada

3.- Se agrega 50 ml. de HCl al 2 N

4.- Se estandariza el pH a 7.00

5.- Agregue HCl al 2 N hasta que el pH sea de 7.84 esto es agregando aproximadamente 30 ml. más de HCl al 2 N.

Para la preparación de la tripsina se mezcla:

225 ml. de agua destilada

25 ml. de Buffer tris a pH de 7.84

2 grs. de fluoruro de sodio

En un agitador de agitación lenta se coloca un vaso de precipitado con el agua destilada, el tris y el fluoruro de sodio, se agrega la tripsina y se mezcla por 45 minutos; al cabo de este tiempo se coloca la solución en varios tubos de ensayo que serán llevados a congelar a una temperatura de -5°C para usarse posteriormente.

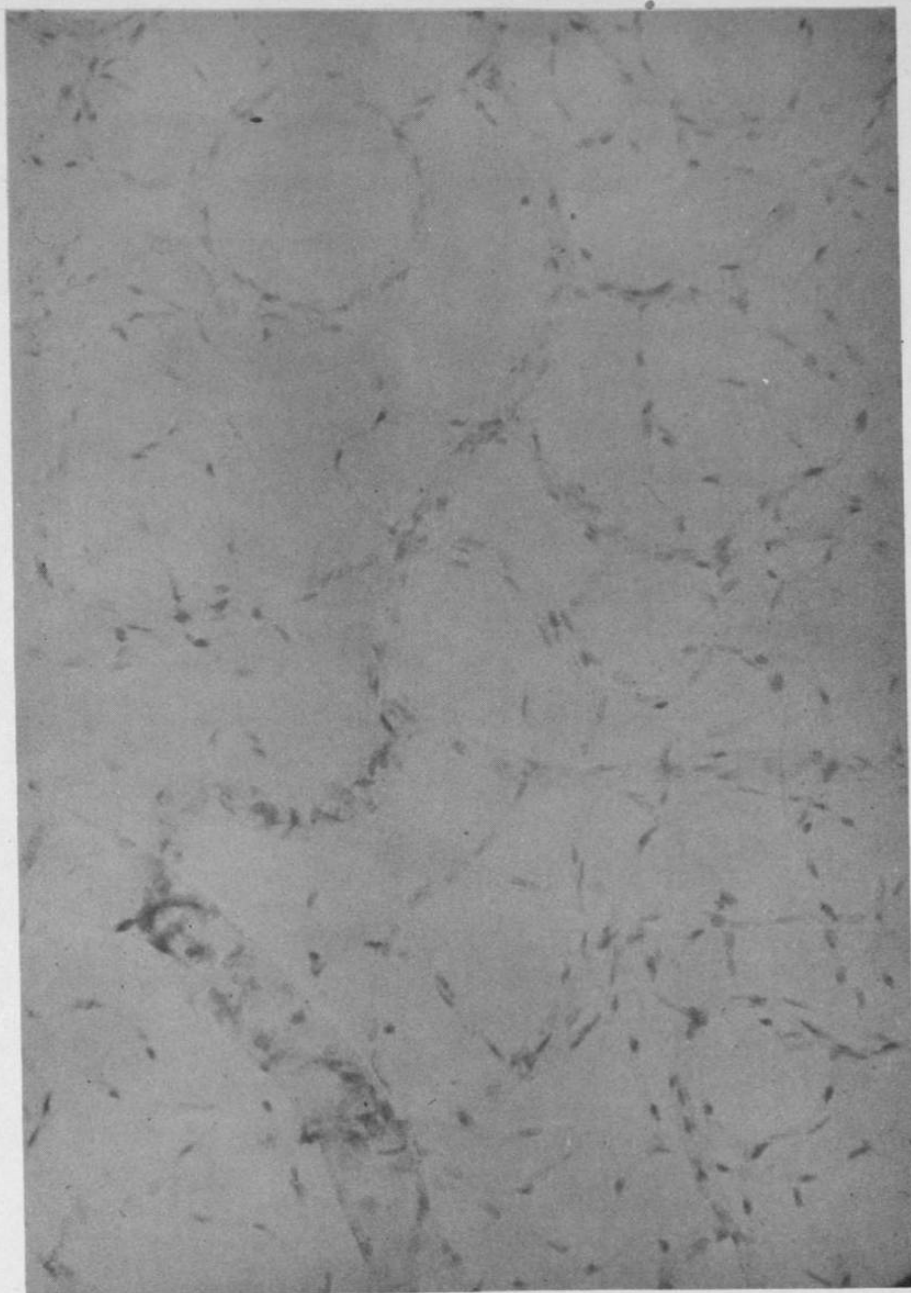
CAPITULO III  
R E S U L T A D O S

Se practicó un total de 30 experimentos, 20 de ellos para perfusión con insulina activa, 5 para perfusión con solución salina, y cinco para perfusión de insulina - - inactivada por calor (2 horas en ebullición a baño maría).

Todos los ojos testigos, así como los del lado perfundido con solución salina y con insulina inactivada por calor presentaron vasculatura retiniana normal; en todos los casos en que se perfundió con solución de insulina activa se observaron alteraciones en los vasos de la red retiniana, semejante a las patologías presentadas por los pacientes diabéticos, en algunos casos se observaron dilataciones vasculares, vasos arrosariados, lesiones aneurismáticas y aparentes vasos de nueva formación.

En las fotografías podemos observar las lesiones antes mencionadas.

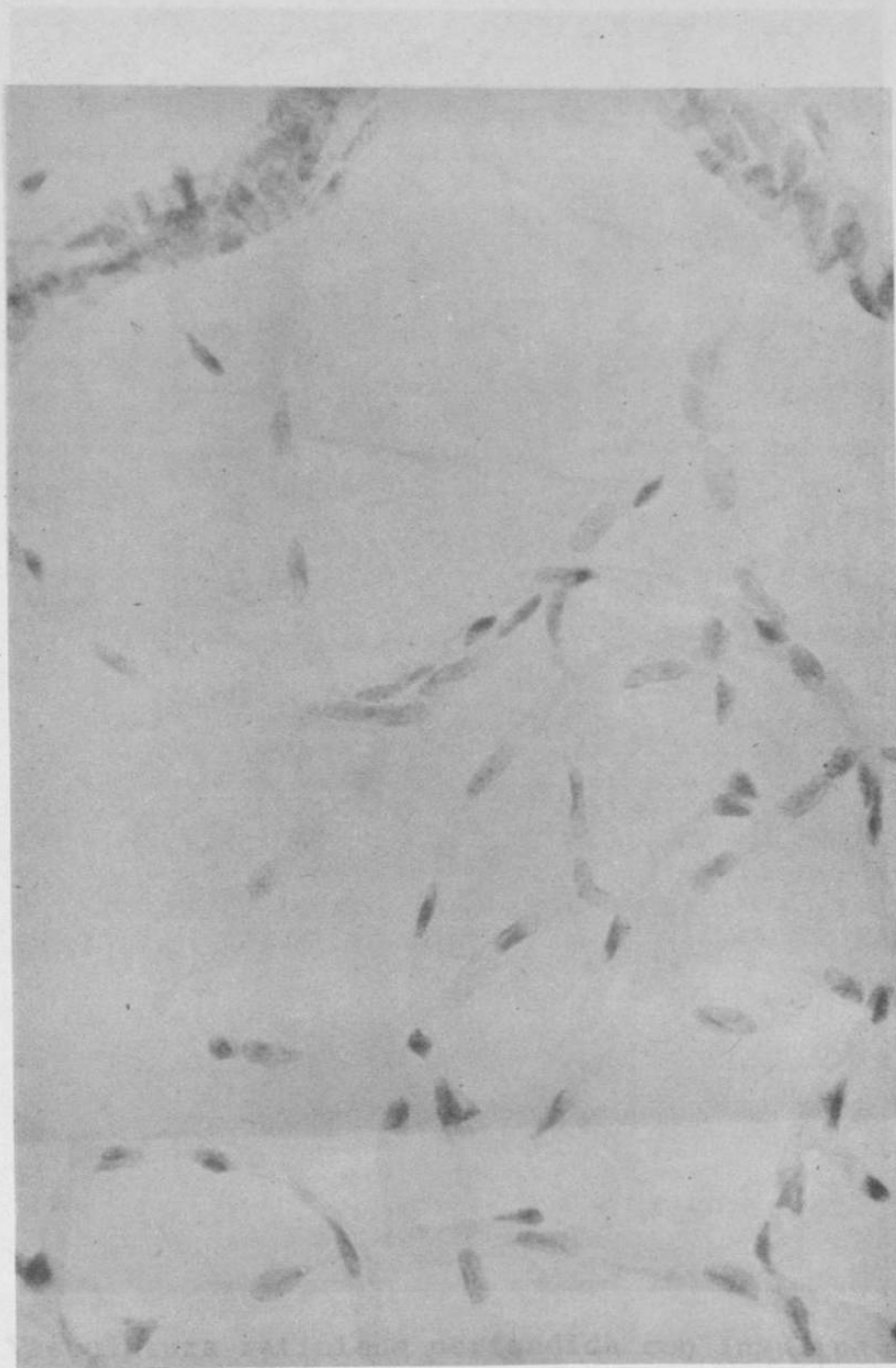
FOTOGRAFIA No. 1



Vasculatura retiniana normal del perro preparada con la técnica de Kuwabara y Cogan.

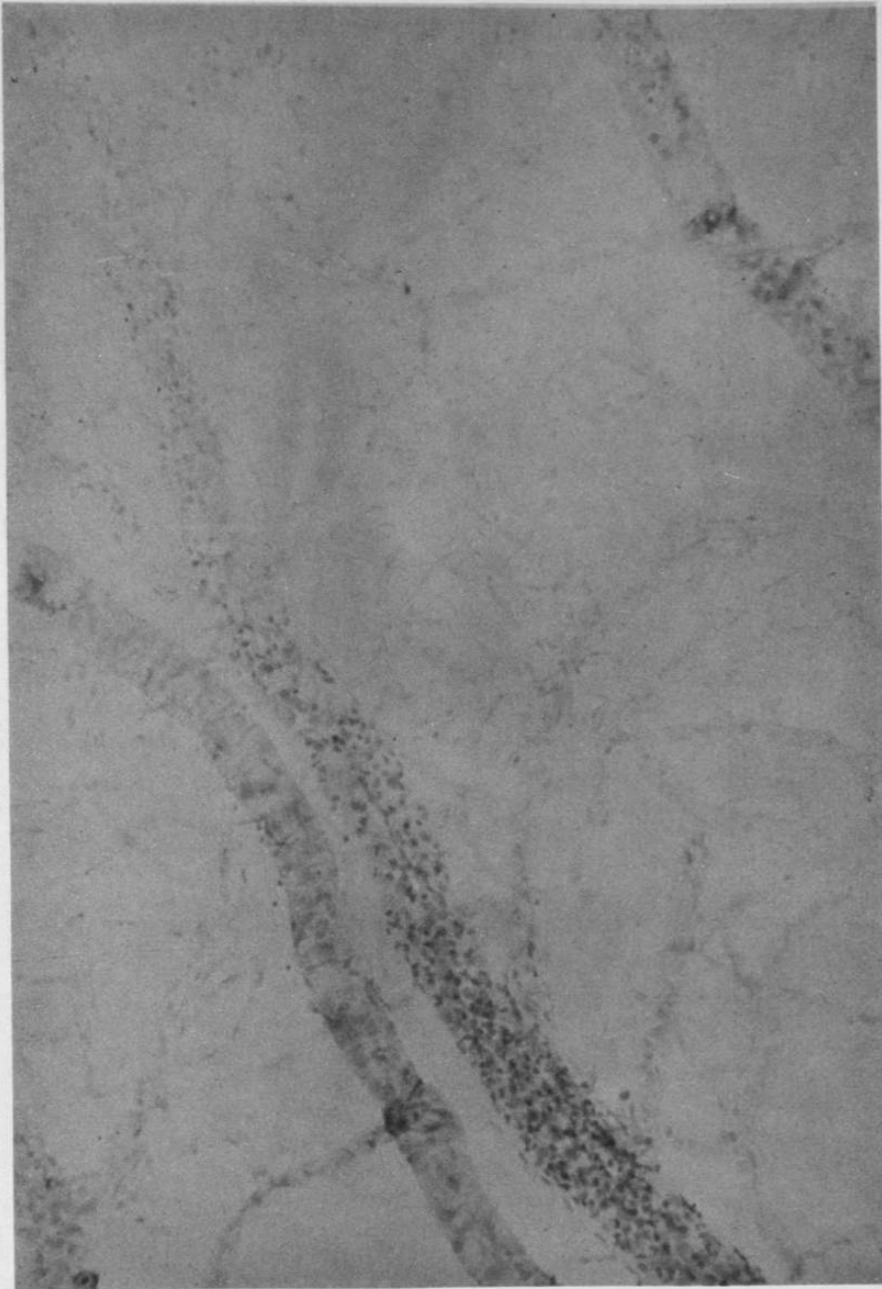
FOTOGRAFIA No. 1

FOTOGRAFIA No. 2



en donde vemos vasos de mayor tortuosidad.  
Vasculatura retiniana normal a mayor aumento.

FOTOGRAFIA No. 3



Vasculatura retiniana perfundida con insulina activa,  
en donde vemos vasos de mayor tortuosidad.

016419  
FOTOGRAFIA No. 4

**BIBLIOTECA**  
FAC. DE MED. U.A.N.L.



Vasos con estrechamientos y angulaciones importantes después de la perfusión con insulina activa.



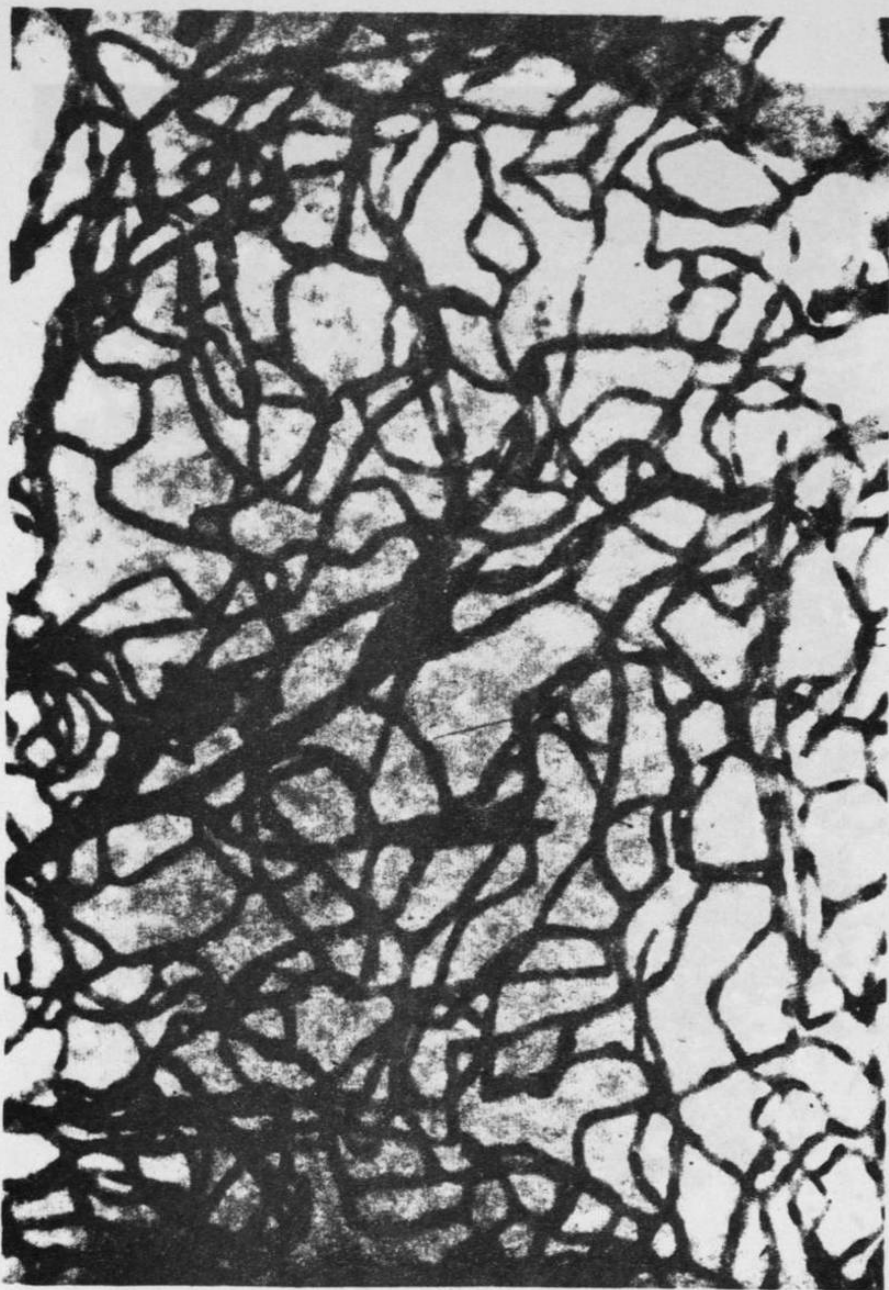
016410

FOTOGRAFIA No. 5

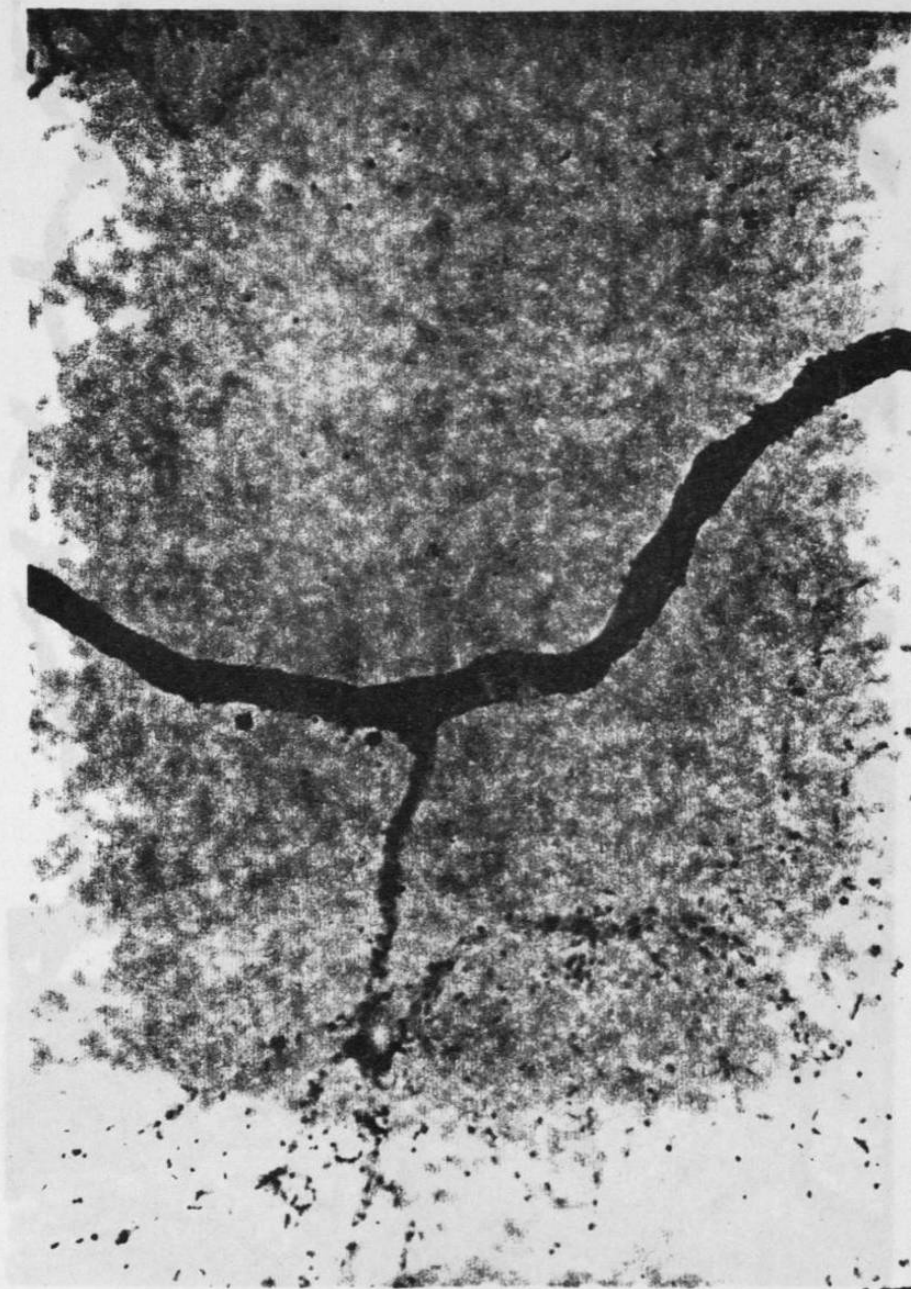


Misma lesión de la figura anterior a mayor  
aumento.

FOTOGRAFIA No. 6



En el centro del campo se puede ver una zona  
hemorrágica. Lesión arteriolar.



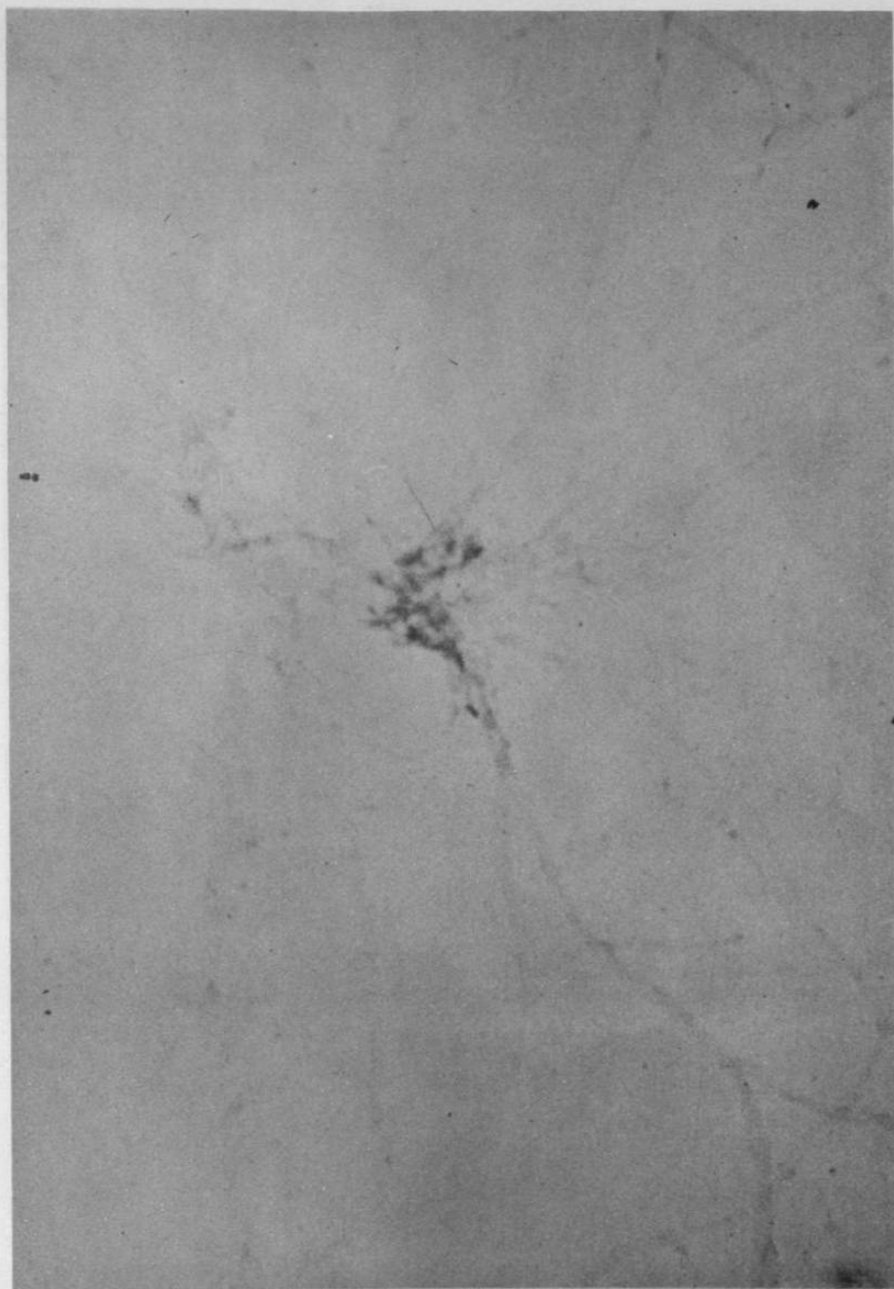
Lesión arrosariada.



Dilataciones aneurismáticas, así como oclusión de algunos de los capilares.

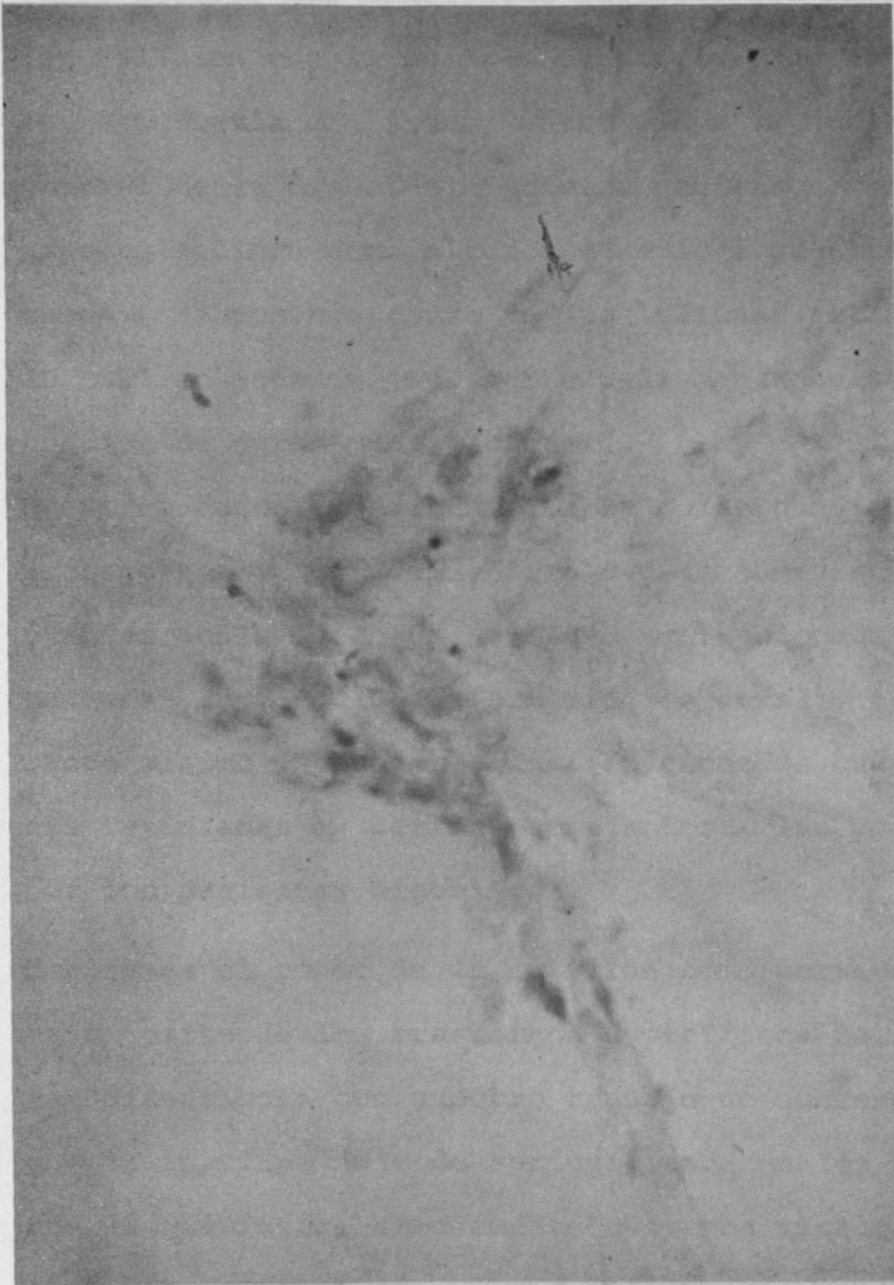


Franca lesión aneurismática.



Vasos de aparente nueva formación.

FOTOGRAFIA No. 11 LESIONES



Misma lesión de la figura anterior a mayor aumento.

## CAPITULO IV

### DISCUSION Y CONCLUSIONES

Otros autores han mencionado factores que pudieran tener relación con la posible etiología y agravamiento de la retinopatía diabética, entre ellos se habla de pobre control de la diabetes, factores genéticos, tabaquismo, prostaglandinas como algunos ejemplos; nuestro trabajo busca otra posible causa de las lesiones retinianas por lo cual no podemos comparar o relacionar nuestros datos con los de otras publicaciones.

Nuestros datos experimentales bajo las condiciones del trabajo realizado, demuestran que la administración de grandes dosis de insulina (40 U/Kg.) colocada directamente en la circulación arterial cerebral y por un período mínimo de cuatro horas, es capaz de causar lesiones retinianas en perros, semejantes a las presentadas por los pacientes diabéticos.

Conocemos el poder de la insulina como corrector de la mayor parte de los trastornos específicos de los pacientes diabéticos; con nuestro trabajo no queremos sugerir que la insulina deje de ser utilizada en los pacientes que la requieran, simplemente queremos recalcar que en nuestros animales de experimentación una dosis alta de insulina causó lesiones importantes muy semejantes a las de los pacientes; si nos gustaría llamar la atención ha



cia la posibilidad de que existan efectos secundarios -  
que a dosis farmacológicas puedan pasar desapercibidas  
y que probablemente el efecto acumulativo cause daño.

Por lo tanto consideramos que nuestro trabajo puede -  
originar otros estudios importantes en este campo.

## CAPITULO V

### B I B L I O G R A F I A

- 1.- Michael, Brownlee, M.D. Abnormal Physiological Processes in the retina. Handbook of Diabetes Mellitus. Vol.4 Biochemical Pathology. Edith. Garland - St. P.M.Press New York & London. Part 1, p.p.3-21 - 1981.
- 2.- F.I. Caird, A Pirie, T.G. Ramsell. The epidemiology of diabetic Blindness, Diabetes and the Eye. - Blackwell Scientific Publications. 1era. Ed. Cap.1 p.p. 1-7, 1969
- 3.- Ronald Engerman, Ph.D., J.M.B.B. Bloodworth, Jr. M.D. and Susan Nelson B.S. Relationship of Microvascular Disease in Diabetes to Metabolic Control. Diabetes Vol.26, No.8 p.p. 760-769, 1977.
- 4.- William F. Ganong. Funciones endócrinas del pán- - creas y regulación del metabolismo de los glúcidos. Fisiología Médica, Edit. El Manual Moderno, S.A. 8a Ed. p.p. 270-274, 1982.
- 5.- Arthur C. Guyton. Insulina, Glucagon y Diabetes Sa- carina. Tratado de Fisiología Médica, Edt. Nueva -- Editorial Interamericana. 6a. Ed. Cap.78, p.p. 1132- 1138, 1984.
- 6.- Bernardo A. Houssay., Metabolismo de los Hidratos - de Carbono. Fisiología Humana. Edit. "El Ateneo". 4a. Ed. Cap. 44, p.p. 511-518, 1969.

016410

- 7.- Albert L. Lehninger. Aspectos Bioquímicos de la -  
acción hormonal. Bioquímicas, Edit. Omega, S.A. -  
2a. Ed. Cap.29, p.p. 828-831. 1978.
- 8.- R.D.G. Lesle and D.A. Pyke. Diabetic Retinopathy  
in identical Twins Diabetes Vol.31, No.1, p.p.19-21  
1982.
- 9.- Margaret,E., Paetkau M.D. T.A.S. Boyd,M.B., Bruce  
Winship, and Michael Grace, Ph.D..Cigarrete Smoking  
and Diabetic Retinopathy. Edmonton, Alberta-Canada.  
Diabetes, January, Vol.26, No.1, p.p. 46, 1977.
- 10.- Paul F.Palmberg, M.D. Ph.D., St.Louis. Diabetic -  
Retinopathy. Diabetes. Vol. 26, No.7, p.p.703, 1977.
- 11.- Samuel Soskin M.D. and Rachmiel Levine, M.D. Car-  
bohydrate Metabolism. Cap.XV. Pancreas (Insulin).  
2a. Ed. Edit. The University of Chicago Press,p.p.  
167=176, 1946.
- 12.- M.B. Waitzman, Ph.D., A.M. Colley, Ph.D. and K. -  
Nardelli Olkowska, M.D. Metabolic Approaches to -  
studies on Daibetic Microangiopathy. Diabetes.May.  
Vol.26, No.5, p.p.510-515, 1977
- 13.- Kuwabara M. and Cogan D.G. Arch.Ophthalmological  
Vol.64, p.p. 904, 1960.
- 14.- John W. Vester, M.D. Clinical Cardiology and Diabete  
tes. Vol.1, part 1, p.44, 1981
- 15.- Berkow, J.W., ShugarmanR.G., Maumenee, E.E. and Patz  
A.: J. Med. Am. Assn. 193, 860, 1965.

**BIB**      **IECA**  
A .      ED U A N L

