

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Estudio de la actividad inhibidora del extracto semipurificado de larvas de gusano de seda (*Bombyx Mori*) producida sobre la enzima α -glucosidasa y su efecto en la concentración de la glucosa sanguínea en ratones BALB/C

PROYECTO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

Juan Pablo Cueva Tello

Sangolquí, Julio de 2007

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR

Juan Pablo Cueva Tello

COORDINADOR DE LA CARRERA

MSc. Mónica Jadán

SECRETARIO ACADÉMICO

Abg. Vinicio Zabala

Sangolquí, Julio de 2007

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por el Sr. Juan Pablo Cueva Tello como requerimiento parcial a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología.

Sangolquí, Julio de 2007

Dr. Ángel G. Guevara, PhD.

Ing. Patricio Castillo, PhD.

DEDICATORIA

A mi madre, por moldear con amor esta vasija.

A María José, por llenarla.

Juan Pablo Cueva Tello.

AGRADECIMIENTOS

A todos quienes hicieron posible la culminación de este proyecto:

A la Direzione Generale per la Cooperazione allo Sviluppo del Ministero degli Affari Esteri de Italia y el Instituto Italo Latinoamericano (IILA), entidades financieras de la presente investigación, especialmente a la Dra. Giovana Salice del IILA-Cooperativa Sociolario-Como-Italia.

Al Instituto Agropecuario Superior Andino de Santo Domingo de los Colorados, en particular al Ing. Crnl. Patricio Jaramillo y al Ing. Mayor René González por su apertura y disposición.

A la Ing. Sandra Soria, el Ing. César Cifuentes, el Ing. Oswaldo López y el Ing. Marcelo Patiño, quienes colaboraron como referentes y técnicos respectivamente de la Red Andina de la Seda.

Al Dr. Ángel Guevara y el Ing. Patricio Castillo, directores del proyecto, por su valiosa orientación científica y asesoría técnica.

A la Dra. Rosa Guerrero y a la Dra. Sonia Tello, por su gran apoyo y apertura en el desarrollo del proyecto.

A la Lic. María Belén Cabezas y a la Lic. Gloria Brito, así como a todos quienes conforman el personal de Laboratorios Axxis, por su ayuda desinteresada en la fase experimental de la investigación.

Al Centro de Biomedicina de la Universidad Central del Ecuador, en particular al Dr. Edmundo Estévez y al Dr. Oswaldo Rodríguez quienes dispusieron abiertamente sus instalaciones.

Juan Pablo Cueva Tello

TABLA DE CONTENIDO

CERTIFICACIÓN	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS	v
TABLA DE CONTENIDO	vi
LISTADO DE TABLAS	ix
LISTADO DE CUADROS.....	x
LISTADO DE FIGURAS.....	xii
LISTADO DE ANEXOS	xiv
NOMENCLATURA UTILIZADA.....	xv
RESUMEN.....	xvii
ABSTRACT	xviii
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1 Formulación del problema	1
1.2 Justificación del problema	2
1.3 Objetivos de la investigación	3
1.3.1 Objetivo general	3
1.3.2 Objetivos específicos.....	3
1.4 Marco teórico.....	3
1.4.1 enzimas.....	3
1.4.1.1 Generalidades de las enzimas	3
1.4.1.2 CINÉTICA de la reacción	5
1.4.1.3 Cinética enzimática.....	7
1.4.1.3.1 Cinética de equilibrio rápido.....	9
1.4.1.3.2 Cinética de estado estacionario.....	12
1.4.1.3.3 Representación de Lineweaver-Burk.....	13
1.4.1.3.4 Histéresis enzimática.....	15
1.4.1.4 Inhibición enzimática.....	15

1.4.1.4.1 Inhibición competitiva	16
1.4.1.4.2 Inhibición acompetitiva	22
1.4.1.4.3 Inhibición mixta	24
1.4.1.5 Significado de los parámetros cinéticos	27
1.4.1.6 Importancia de la inhibición enzimática en medicina	29
1.4.2 Diabetes mellitus	29
1.4.2.1 Generalidades.....	29
1.4.2.2 Clasificación de la diabetes mellitus.....	31
1.4.2.3 Etapas clínicas de la diabetes mellitus.....	35
1.4.2.4 Criterios diagnósticos para la diabetes mellitus	37
1.4.2.5 Tratamiento y prevención de la diabetes tipo 2.....	38
1.4.3 Aplicaciones terapéuticas del gusano de seda.....	43
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODO	47
2.1 Participantes.....	47
2.2 Zona de estudio.....	47
2.3 Período de tiempo de investigación.....	47
2.4 Diseño	47
2.5 Procedimientos.....	48
2.5.1 Preparación del extracto de gusano de seda	48
2.5.1.1 Obtención y selección de larvas de gusano de seda	48
2.5.1.2 Homogenización	49
2.5.1.3 Extracción etanólica	49
2.5.1.4 Filtrado y centrifugado.....	50
2.5.1.5 Concentración	51
2.5.1.6 Liofilización.....	51
2.5.1.7 Cálculo del porcentaje de humedad.....	52
2.5.1.8 Rendimiento en la preparación del extracto	53
2.5.2 Ensayo enzimático	53
2.5.2.1 Reactivos y soluciones.....	53
2.5.2.2 Descripción de los blancos	54
2.5.2.3 Descripción del ensayo enzimático	54
2.5.2.3.1 Transcurso de la reacción enzimática	56
2.5.2.3.2 Determinación del porcentaje de inhibición	56

2.5.2.3.3 Determinación de parámetros cinéticos.....	57
2.5.2.3.4 Mecanismo de Inhibición	58
2.5.3 Ensayo en ratones de laboratorio.....	58
2.5.3.1 Mantenimiento y aclimatación.....	58
2.5.3.2 Medición de la glucosa sanguínea en ayunas	59
2.5.3.3 Aplicación de los tratamientos.....	60
2.5.3.4 Medición de la glucosa sanguínea postprandial.....	62
2.6 Análisis de datos	62
CAPÍTULO 3: RESULTADOS	63
3.1 Características del extracto de larvas de gusano de seda	63
3.2 Porcentaje de humedad de las larvas de gusano de seda	64
3.3 Rendimientos.....	64
3.4 Curvas del transcurso de la reacción enzimática	64
3.5 Porcentaje de inhibición	69
3.6 Efecto de la concentración de maltosa y ELGS sobre la velocidad de reacción enzimática.....	70
3.7 Efecto del extracto de larvas de gusano de seda sobre la concentración de glucosa sanguínea en ratones.....	74
CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN	79
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES	84
CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES.....	87
CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA	88
ANEXOS.....	94

LISTADO DE TABLAS

Tabla 2.1	Concentraciones finales en los ensayos enzimáticos.....	56
Tabla 3.1	Porcentaje de inhibición y porcentaje de actividad en función de la concentración de ELGS.....	69
Tabla 3.2	Efecto de la concentración de maltosa y ELGS en la velocidad de reacción.....	70
Tabla 3.3	Velocidades promedio y error estándar.....	72
Tabla 3.4	Intervalo de confianza de los parámetros cinéticos.....	72
Tabla 3.5	Valores de glucosa sanguínea en ayunas y glucosa sanguínea postprandial en función de varios tratamientos orales.....	74
Tabla 3.6	Análisis de varianza de los tratamientos orales.....	75
Tabla 3.7	Prueba de Tukey-Kramer para los tratamientos orales (glucosa en ayunas).....	75
Tabla 3.8	Prueba de Tukey-Kramer para los tratamientos orales a los 30 minutos (glucosa 30' postprandial).....	76
Tabla 3.9	Prueba de Tukey-Kramer para los tratamientos orales a los 60 minutos (glucosa 60' postprandial).....	76
Tabla 3.10	Prueba de Tukey-Kramer para los tratamientos orales a los 90 minutos (glucosa 90' postprandial).....	76
Tabla 3.11	Prueba de Tukey-Kramer para los tratamientos orales a los 150 minutos (glucosa 150' postprandial).....	77
Tabla 3.12	Incremento de la concentración de glucosa sanguínea en función de los tratamientos orales	78

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1.1	Clasificación de las enzimas.....	5
Cuadro 1.2	Transcurso de la formación del complejo enzima-sustrato en función del tiempo e iniciación del estado estacionario.	12
Cuadro 1.3	Representación doble recíproca de Lineweaver-Burk.....	14
Cuadro 1.4	Representación de Lineweaver-Burk de la inhibición competitiva completa.....	18
Cuadro 1.5	Representación gráfica de v_o vs. $[I]$, a una concentración fija de sustrato.....	21
Cuadro 1.6	Representación de Lineweaver-Burk de la inhibición acompetitiva.....	23
Cuadro 1.7	Representación de Lineweaver-Burk de la inhibición mixta.....	26
Cuadro 1.8	Complicaciones crónicas de la diabetes mellitus.....	31
Cuadro 1.9	Clasificación etiológica de la diabetes mellitus.....	33
Cuadro 1.10	Características clínicas de los pacientes con diabetes mellitus de tipo 1 y de tipo 2.....	35
Cuadro 1.11	Etapas clínicas de la diabetes mellitus.....	37
Cuadro 1.12	Comparación de los criterios diagnósticos de la OMS (1999) y la ADA (2003) para la diabetes mellitus.....	38
Cuadro 1.13	Elementos esenciales de la atención integral de la diabetes mellitus tipo 2.....	39
Cuadro 1.14	Tratamientos orales reductores de la glucosa sanguínea para la diabetes tipo 2.....	40

Cuadro 1.15 Tratamiento de la glucemia en la diabetes mellitus de tipo 2.....	41
Cuadro 1.16 Recopilación de las investigaciones principales sobre prevención de diabetes mellitus	42
Cuadro 1.17 Estructura de la 1-deoxinojirimicina (DNJ).....	43
Cuadro 1.18 Estructura de los alcaloides aislados de materiales relacionados con la sericultura.....	44

LISTADO DE FIGURAS

Figura 2.1	Larvas de gusano de seda en el tercer día del quinto instar del período larvario.....	48
Figura 2.2	Homogenización de las larvas de gusano de seda en agua.....	49
Figura 2.3	Extracción etanólica del homogenizado de larvas de gusano de seda.....	50
Figura 2.4	Filtrado del extracto	50
Figura 2.5	Concentración del extracto en un rotavapor	51
Figura 2.6	Precongelado del extracto en ángulo inclinado	51
Figura 2.7	Liofilización de concentrado de larvas de gusano de seda.....	52
Figura 2.8	Mezcla e incubación de los componentes del ensayo enzimático a 37° C.....	55
Figura 2.9	Baño de agua hirviendo a 90° C	55
Figura 2.10	Diluciones de ELGS.....	57
Figura 2.11	Jaulas para el mantenimiento y aclimatación de ratones blancos.....	59
Figura 2.12	Toma de sangre venosa de la cola de un ratón.....	60
Figura 2.13	Marcas diferenciales en cabeza, lomo y cola en dentro de cada grupo de ratones.....	61
Figura 2.14	Aplicación de los tratamientos en ratones por vía oral.....	62
Figura 3.1	Extracto de larvas de gusano de seda procesado	63
Figura 3.2	Transcurso de la reacción enzimática con una concentración de	

	maltosa de 25 mM, sin ELGS.	65
Figura 3.3	Transcurso de la reacción enzimática con una concentración de maltosa de 500 mM, sin ELGS.	66
Figura 3.4	Transcurso de la reacción enzimática con una concentración de maltosa de 25 mM y 0.2 mg ELGS/ml	67
Figura 3.5	Transcurso de la reacción enzimática con una concentración de maltosa de 500 mM y 0.2 mg ELGS/ml	68
Figura 3.6	Hipérbola rectangular que se forma a partir del porcentaje de inhibición en función de la concentración de ELGS.....	69
Figura 3.7	Porcentaje de actividad de la α -glucosidasa en función de la concentración de ELGS.....	70
Figura 3.8	Representación de Michaelis-Menten con varias concentraciones de ELGS.	71
Figura 3.9	Representación de Lineweaver-Burk.....	73
Figura 3.10	Curvas de la concentración de glucosa sanguínea en ratones BALB/c en función de los tratamientos orales.	77

LISTADO DE ANEXOS

ANEXO A: Valores de absorbancia y concentraciones de glucosa formada en los diferentes ensayos enzimáticos.	94
ANEXO B: Estadística descriptiva de los valores de glucosa sanguínea en ayunas y glucosa sanguínea postprandial obtenidos en el ensayo con ratones.....	98

NOMENCLATURA UTILIZADA

[]:	Concentración
A1C:	Hemoglobina glicosilada
ADA:	Asociación Americana de la Diabetes (American Diabetes Association)
DKA:	Cetoacidosis diabética (Diabetic ketoacidosis)
DNJ:	1-deoxinojirimicina
E:	Enzima libre
EI:	Complejo enzima-inhibidor
ELGS:	Extracto de larvas de gusano de seda.
ES:	Complejo enzima-sustrato
E_T:	Enzima total
FDA:	U.S. Food and Drug Administration
GDM:	Diabetes mellitus gestacional (Gestational diabetes mellitus)
HHS:	Estado hiperosmolar hiperglucémico (Hyperglycemic hyperosmolar state)
I:	Inhibidor
IDDM:	Diabetes mellitus insulino dependiente (Insulin-dependent diabetes mellitus)
IFG:	Trastorno de la glucosa en ayunas (Impaired fasting glucose)
IGT:	Trastorno de la tolerancia a la glucosa (Impaired glucose tolerance)
IUBMB:	International Union of Biochemistry and Molecular Biology
k₁:	Constante de velocidad de la formación de ES a partir de E + S
k₋₁:	Constante de velocidad de la disociación de ES a E + S
k₂:	Constante de velocidad de la formación de producto
k₋₂:	Constante de velocidad de la formación de ES a partir de E + P
K_{cat}:	Constante catalítica o número de recambio
K_i:	Constante de disociación del complejo EI
K_m:	Constante de Michaelis-Menten
K_{map}:	K _m aparente
K_s:	Constante de disociación del complejo enzima-sustrato
K_{sap}:	K _s aparente

MRDM: Diabetes mellitus relacionada a la malnutrición (Malnutrition related diabetes mellitus)

NIDDM: Diabetes mellitus no insulino dependiente (Noninsulin-dependant diabetes mellitus)

OMS: Organización Mundial de la Salud

P: Producto de la reacción enzimática

RPM: Revoluciones por minuto

S: Sustrato libre

VIH: Virus de inmunodeficiencia humana

V_{max} : Velocidad máxima

V_{maxap} : Velocidad máxima aparente

RESUMEN

La hiperglucemia prolongada está relacionada estrechamente con el desarrollo de la diabetes mellitus tipo 2. Sin embargo, los inhibidores de las α -glucosidasas pueden ayudar a reducir las concentraciones elevadas de glucosa sanguínea. El gusano de seda (*Bombyx mori*) es un acumulador natural de uno de estos inhibidores: la 1-deoxinojirimicina (DNJ). El objetivo de la presente investigación fue determinar la capacidad inhibidora de un extracto de gusano de seda en un ensayo enzimático *in vitro*, así como su efecto en la glucosa postprandial en un modelo *in vivo*. Para esto, se preparó un extracto de larvas de gusano de seda (ELGS) con etanol al 50% y se probó su efecto sobre la actividad de la α -glucosidasa de levadura. Además, se analizó el efecto en la concentración de glucosa sanguínea en ratones después de un tratamiento oral con ELGS. Se obtuvieron 10.6 g de ELGS a partir de 1 kg de peso húmedo de larvas. El valor de K_m en un ensayo enzimático con maltosa fue 50.5 mM. Con el ELGS se observó una inhibición enzimática reversible, competitiva y completa con un valor de $K_i = 0.064$ mg/ml. Después de 30 minutos de la aplicación del tratamiento oral en ratones, se observó un porcentaje de reducción en el incremento de la glucosa postprandial de 75.9% para una dosis de 0.05 g/kg de acarbosa, 54.9% para una dosis de 0.08 g/kg de ELGS y 85.1% para una dosis de 0.4 g/kg de ELGS. El ELGS es un inhibidor de la enzima α -glucosidasa y tiene un efecto hipoglucemiante en ratones dependiente de la dosis.

ABSTRACT

Long-term hyperglycemia has a tight relationship with type II diabetes mellitus development. However, α -glucosidase inhibitors can help to decrease high blood glucose concentrations. Silkworm (*Bombyx mori*) is known as a natural store of one of these inhibitors: 1-deoxynojirimycin (DNJ). The goal of the present study was to determine the inhibitory effect of a silkworm extract in an *in vitro* enzymatic assay, as well as to test its effect on postprandial glucose values in an *in vivo* model. For this purpose, a silkworm larvae extract (ELGS) was prepared with 50% ethanol and was assayed with α -glucosidase enzyme from baker's yeast. Furthermore, the effect on the blood glucose concentration in white mice was examined after an oral treatment with ELGS. One kilogram of fresh larvae yielded 10.6 kg of ELGS. The K_m value for an enzymatic assay with maltose was 50.5 mM. When ELGS was added to the enzymatic assay, it showed a competitive reversible pure inhibition with a K_i value of 0.064 mg/ml. After 30 minutes of the oral treatment administration on white mice, the increment of postprandial glucose was diminished in a 75.9% with a dose of 0.05 g/kg of acarbose, 54.9% with a dose of 0.08 g/kg of ELGS and 85.1% with a dose of 0.4 g/kg of ELGS. Consequently, ELGS seems to be an effective α -glucosidase inhibitor and to reduce the hyperglycemia in a dose dependant manner on mice.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del problema

La diabetes mellitus de tipo 2 es un desorden sistémico crónico caracterizado por elevados niveles de glucosa en sangre (hiperglucemia) con grandes índices de morbilidad y mortalidad. El 40% de los pacientes desconoce de la enfermedad hasta fases avanzadas de la misma ya que la etapa pre-diabética no siempre presenta síntomas. Sin embargo, es posible tener control y prevenir la diabetes tipo 2 con cambios en el estilo de vida y/o un tratamiento farmacéutico adecuado (Kasper *et al.*, 2006).

Los pacientes en etapas de pre-diabetes tienen un alto riesgo de desarrollar diabetes mellitus de tipo 2 así como enfermedades cardiovasculares (Fuller *et al.*, 1980). La hiperglucemia es un factor que a la larga desencadena la resistencia a la insulina. En pacientes con alteración de la tolerancia a la glucosa (IGT), el riesgo de adquirir diabetes aumenta anualmente en un 3.6 a 8.7% (Edelstein *et al.*, 1997). De igual manera, los factores de riesgo lipídicos y no lipídicos para una enfermedad de las arterias coronarias están frecuentemente asociados a la etapa pre-diabética pese a que nunca se evidencie la diabetes mellitus en el individuo (Shobha *et al.*, 2004).

Se ha descrito un efecto hipoglucemiante del gusano de seda (*Bombyx mori*) probado en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (Jeon *et al.*, 2000; Ryu *et al.*, 2002). Por otro lado, se ha descrito en el gusano de seda la presencia de un alcaloide polihidroxilado llamado 1-deoxinojirimicina (DNJ), un potente inhibidor de las α -glucosidasas (Asano *et al.*, 2001), enzimas responsables de la degradación de los polisacáridos en el intestino humano (Murray *et al.*, 2001).

¿Se puede ensayar la inhibición de una α -glucosidasa a partir de un extracto de gusano de seda? ¿Es el gusano de seda un potencial agente hipoglucemiante para la prevención de la diabetes mellitus tipo 2?

1.2 Justificación del problema

En el futuro, la diabetes mellitus seguirá siendo una de las primeras causas de muerte y morbilidad en el mundo, en vista del constante aumento de su incidencia (Kasper *et al.*, 2006). En el año 2000 se registraron 171 millones de personas con diabetes en el mundo y se estima que esta cifra incrementará a 366 millones para el año 2030 (Wild *et al.*, 2004). En el año 2000 se atribuyó el 5.2% de muertes en el mundo a la diabetes mellitus. Sin embargo, cifras de hasta 8% de mortalidad corresponden a países como Estados Unidos, Canadá y otros en el medio oriente, mientras que en países subdesarrollados esta cifra desciende al 3%. El grupo humano más afectado por la diabetes corresponde a aquellos con edades entre 35 y 64 años, con un 6 a 27% de mortalidad por la diabetes. En general, la diabetes es la quinta causa de muerte en el mundo (Roglic *et al.*, 2005).

En el Ecuador, según datos del Ministerio de Salud Pública (2006), la diabetes mellitus se posiciona como la tercera causa principal de muerte en el país con una tasa de mortalidad de 4.9%, después de las enfermedades cerebrovasculares y las enfermedades hipertensivas.

El estudio del efecto inhibitor sobre la enzima α -glucosidasa y los efectos hipoglucemiantes del gusano de seda, sustentan la posibilidad de una nueva línea de producción en la prevención de la diabetes mellitus. El carácter naturista y nutritivo del gusano de seda, es una gran ventaja sobre los hipoglucemiantes comerciales de la actualidad.

Por otro lado, la sericultura en el Ecuador se ha desarrollado progresivamente desde el año 1996, fecha de introducción del gusano de seda. En la actualidad son 95 familias que se sustentan de la cadena productiva de la seda, entre artesanos y sericultores distribuidos en las provincias de Pichincha, Chimborazo, Bolívar, Azuay, Zamora y Pastaza (Soria, 2006). Todos ellos se benefician con el aumento en la producción del gusano de seda.

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo general

Investigar el efecto inhibitorio, in vitro, del extracto semipurificado de gusano de seda, obtenido a partir de un homogenizado de larvas de gusano de seda del tercer día del quinto instar, sobre la actividad de la enzima α -glucosidasa, así como el efecto supresor en la elevación de la glucosa sanguínea en ratones.

1.3.2 Objetivos específicos

- Describir un procedimiento para la preparación de un extracto de larvas de gusano de seda.
- Medir el porcentaje de inhibición sobre la actividad de la enzima α -glucosidasa por efecto del extracto de larvas de gusano de seda.
- Calcular los parámetros cinéticos V_{max} y K_m en la reacción enzimática de la enzima α -glucosidasa con maltosa, así como la constante de inhibición K_i en la reacción inhibida con extracto de larvas de gusano de seda
- Determinar el mecanismo de inhibición enzimática del extracto de larvas de gusano de seda sobre la α -glucosidasa.
- Medir los cambios de la concentración de glucosa sanguínea en ratones de laboratorio, por efecto de un tratamiento oral, con extracto de larvas de gusano de seda.

1.4 Marco teórico

1.4.1 Enzimas

1.4.1.1 Generalidades de las enzimas

Las enzimas son moléculas especializadas que catalizan las reacciones químicas en los sistemas biológicos. Son proteínas sintetizadas en las células, cuya acción catalítica difiere de la que ejercen las recientemente

descritas ribozimas o ARN catalítico (Chávez *et al.*, 1990; McKee *et al.*, 2003). La distribución de las enzimas en las células es diversa y según esta se definen las características biológicas celulares.

Chávez *et al.* (1990) atribuyen a las enzimas una distinción frente a otros catalizadores comunes por las siguientes propiedades:

Eficiencia: Los incrementos de velocidad alcanzados son mucho mayores que otros catalizadores.

Especificidad: Uno o varios sustratos específicos pueden ser transformados por una enzima en una reacción. Esto se debe a la presencia de un sitio activo en la estructura molecular de la enzima en donde puede transformarse solo un sustrato específico.

Rendimiento: La especificidad mejora el rendimiento de la reacción por que no generan productos secundarios.

Regulación: La actividad enzimática puede ser regulada directamente por el uso de activadores o inhibidores, por un cambio conformacional reversible sobre la enzima o indirectamente por control genético.

Versatilidad: La gran variedad de enzimas disponibles en la naturaleza es capaz de catalizar un gran número de reacciones.

Las enzimas aumentan la velocidad de reacción por que son capaces de bajar la energía de activación requerida para que una reacción química ocurra. Las enzimas no alteran la termodinámica de la reacción; es decir, el punto de equilibrio en las reacciones catalizadas por enzimas es el mismo; solo se incrementa la velocidad para llegar a dicho equilibrio (McKee *et al.*, 2003; York, 2004). La actividad enzimática cambia en función de la temperatura, el pH y la concentración del sustrato, entre otros factores.

Las enzimas se agrupan en 6 clases diferentes, de acuerdo con la

clasificación de la IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology). El Cuadro 1.1 muestra la clasificación de las enzimas y varios ejemplos dentro de cada grupo.

Cuadro 1.1 Clasificación de las enzimas

1. Oxidorreductasas	2. Transferasas
Deshidrogenasas	Transaldolasa y transcetolasa
Oxidasas	Acil- metil- glucosil- y fosforiltransferasas
Reductasas	Quinasas
Peroxidasas	Fosfomutatas
Catalasa	
Oxigenasas	
Hidroxilasas	
3. Hidrolasas	4. Liasas
Esterasas	Descarboxilasas
Glucosidasas	Aldolasas
Peptidasas	Hidratasas
Fosfatasas	Deshidratasas
Tiolasas	Sintasas
Fosfolipasas	Liasas
Amidasas	
Desaminasas	
Ribonucleasas	
5. Isomerasas	6. Ligasas
Racemasas	Sintetasas
Epimerasas	Carboxilasas
Isomerasas	
Mutasas (no todas)	

Fuente: Tomado de York, 2004

La catálisis enzimática puede ocurrir con la participación exclusiva de la enzima y el sustrato, pero existen otros tipos de enzimas que necesitan de un cofactor (un ión metálico o una vitamina) para catalizar la transformación del sustrato. La enzima activa en unión con el cofactor se llama holoenzima, mientras que la enzima sin el cofactor se llama apoenzima (York, 2004).

1.4.1.2 Cinética de la reacción

La cinética de la reacción estudia la velocidad del cambio de los reactivos en productos (York, 2004). Una reacción puede ser caracterizada de acuerdo con el número de especies involucradas. De esta manera, a partir de la reacción más simple ($A \longrightarrow B$) se puede describir el mecanismo de una

reacción compleja (Voet *et al.*, 2006). Para expresar la velocidad de reacción de manera matemática se usa la siguiente ecuación:

$$v = \frac{-d[A]}{dt} = \frac{d[P]}{dt}$$

en donde A y P corresponden al reactivo y producto respectivamente. En esta ecuación se representa el cambio en la concentración de estos, con respecto al tiempo.

Desde un punto de vista más práctico, la ecuación de la velocidad puede presentarse como una relación entre las concentraciones de los reactivos o los productos con la velocidad inicial medida experimentalmente:

$$v = \frac{-d[A]}{dt} = k[A]^n$$

en donde k es la constante de velocidad y n el orden de la reacción.

Las reacciones químicas pueden clasificarse según el orden de la reacción.

Reacciones de orden cero: Son aquellas que no dependen de la concentración de ninguno de los reactivos sino más bien de la concentración del catalizador o de otro factor. También se observa este comportamiento cuando los sitios catalíticos de una enzima han sido saturados.

Reacciones de primer orden: La velocidad de reacción depende directamente de la concentración de una especie de reactivo. La unidad para la constante de velocidad k es s⁻¹. En el ejemplo A → B, la ecuación de velocidad es:

$$\frac{-d[A]}{dt} = k[A]$$

en donde $[A]$ es la concentración molar de la especie A. El signo negativo del término de velocidad significa que la especie A desaparece.

Reacciones de segundo orden: La velocidad de reacción depende directamente de la concentración de dos reactivos (cuando $A + B \longrightarrow C$) o a la segunda potencia de uno de ellos (cuando $2A \longrightarrow B$). La unidad para la constante de velocidad k es $M^{-1} s^{-1}$. Para el ejemplo $A + B \longrightarrow C$ la ecuación de velocidad es:

$$\frac{-d[A]}{dt} = k[A][B]$$

Para el ejemplo $2A \longrightarrow B$ la ecuación de velocidad es:

$$\frac{-d[A]}{dt} = k[A]^2$$

Reacciones de tercer orden: Son pocas en la naturaleza. La velocidad es proporcional a la concentración de tres reactivos.

En ciertas condiciones, una reacción de segundo orden puede comportarse como una reacción de primer orden. Si es que se tienen grandes concentraciones de A con respecto a B, la reacción parecería que depende de un solo reactivo. Estas reacciones se conocen como reacciones de pseudo primer orden (Lehninger, 1981).

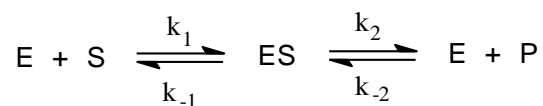
1.4.1.3 Cinética enzimática

La cinética enzimática es el estudio cuantitativo de la catálisis enzimática, en donde se describe la velocidad de la reacción, la afinidad de las enzimas por el sustrato, el efecto de los inhibidores enzimáticos y el mecanismo de reacción (McKee *et al.*, 2003). La importancia del estudio de la cinética enzimática radica en la elucidación de los mecanismos catalíticos de las enzimas (Voet *et al.*, 2006), así como la comprensión del metabolismo

celular y el diseño de mejores tratamientos en salud humana (McKee *et al.*, 2003).

Las enzimas catalizan una inmensa cantidad de reacciones en los sistemas vivos. Las reacciones enzimáticas pueden clasificarse en reacciones monosustrato o reacciones multisustrato. En ambos tipos de reacción pueden cuantificarse tanto la velocidad de reacción como su eficiencia.

Los principios de la cinética de las reacciones son aplicables en la cinética enzimática, con la diferencia de que las enzimas presentan una cinética de saturación. Una formulación general del mecanismo de reacción enzimática propuesta por Brown, en 1902, es la siguiente:



en donde:

E = Enzima libre

S = Sustrato libre

ES = Complejo enzima sustrato

P = Producto

k_1 = Constante de velocidad de la formación de ES a partir de E y S

k_{-1} = Constante de velocidad de la disociación de ES

k_2 = Constante de velocidad de la formación de producto

k_{-2} = Constante de velocidad de la formación de E y P

A bajas concentraciones de sustrato, la velocidad de la reacción enzimática depende solo de la concentración de sustrato, cuando la concentración de enzima se mantiene constante. Bajo estas circunstancias las reacciones enzimáticas siguen un comportamiento de primer orden (Chávez *et al.*, 1990). Conforme se añaden más moléculas de sustrato, los sitios activos de la enzima se saturan y se alcanza una velocidad máxima de reacción, lo que resulta en una reacción de orden cero. En este punto de saturación, la

concentración del complejo ES es equivalente a la cantidad de enzima total por lo que:

$$V_{\max} = k_2[E_T]$$

en donde:

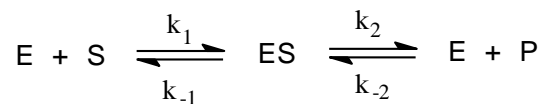
V_{\max} = Velocidad máxima

E_T = Enzima total

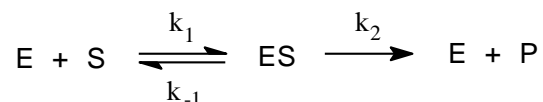
Esta cinética de saturación de las enzimas es la razón por la cual la representación de la velocidad de reacción, en función de la concentración de sustrato, es una hipérbola rectangular (York, 2004).

1.4.1.3.1 Cinética de equilibrio rápido

Leonor Michaelis y Maud Leonora Menten desarrollaron la teoría de la cinética de equilibrio rápido en 1913. Esta es válida para reacciones enzimáticas monosustrato, las mismas que se ajustan al mecanismo descrito anteriormente:



Si se considera el ensayo únicamente en el inicio de la reacción, la cantidad de producto P, que forma ES, es muy pequeña, por lo que se puede hacer la siguiente simplificación:



Michaelis y Menten asumieron que, en una reacción enzimática, se produce un equilibrio rápido entre la enzima, el sustrato y el complejo enzima-sustrato, donde este último se forma instantáneamente y se mantiene

constante, de manera que la disociación del complejo en enzima y producto quedaba muy lenta con respecto a la formación de ES y disociación de ES en enzima y sustrato. Dentro del transcurso inicial, con base en la teoría de la cinética de la reacción, a cualquier tiempo t se verifica que (Chávez *et al.*, 1990):

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S]$$

y

$$-\frac{d[ES]}{dt} = k_{-1}[ES].$$

En el equilibrio se cumple que:

$$\frac{d[ES]}{dt} = -\frac{d[ES]}{dt},$$

entonces:

$$k_1[E][S] = k_{-1}[ES]$$

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1}}{k_1} = K_s.$$

En vista que:

$$[E] = [E_T] - [ES],$$

entonces:

$$\frac{([E_T] - [ES])[S]}{[ES]} = K_s.$$

Al despejar el término $[ES]$:

$$[ES] = \frac{[E_T][S]}{[S] + K_s}$$

Dado que la velocidad de formación de los productos es:

$$v_o = k_2[ES],$$

entonces:

$$v_o = \frac{k_2[E_T][S]}{[S] + K_s}$$

y en condiciones de saturación:

$$V_{\max} = k_2[E_T],$$

lo que resulta en:

$$v_o = \frac{V_{\max}[S]}{[S] + K_s}$$

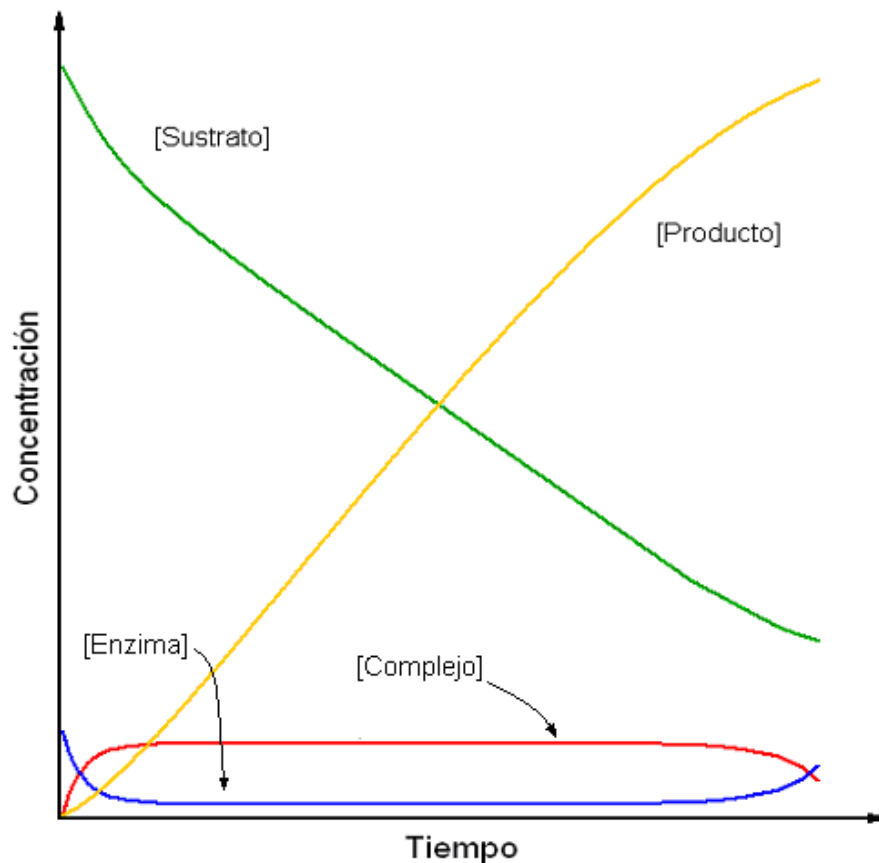
Cuando la concentración de sustrato inicial $[S_o]$ es mucho más grande que la concentración de enzima inicial $[E_o]$, la formación del complejo enzima sustrato $[ES]$ no altera, de manera significativa, la concentración inicial de sustrato. De esta manera, la ecuación de Michaelis-Menten queda en la siguiente forma:

$$v_o = \frac{V_{\max}[S_o]}{[S_o] + K_s}$$

1.4.1.3.2 Cinética de estado estacionario

En 1925, Briggs y Haldane introdujeron el concepto de estado estacionario Chávez *et al.*, 1990. Al igual que Michaelis y Menten, en el inicio de la reacción enzimática, consideraron que las concentraciones de la enzima y del complejo enzima-sustrato son muy pequeñas en comparación con la concentración de sustrato. A diferencia de la teoría del equilibrio rápido de Michaelis y Menten, consideraron que la velocidad de cambio de $[ES]$ puede ser despreciable en comparación con la velocidad de cambio de $[P]$ (a excepción de una fase pre-estacionaria en donde se forma el complejo ES). La concentración de ES se mantiene constante a medida que el complejo se forma y se disocia como lo muestra el Cuadro 1.2.

Cuadro 1.2 Transcurso de la formación del complejo enzima-sustrato en función del tiempo e iniciación del estado estacionario.



Fuente: Tomado de Lehninger, 1981

Entonces, se dedujo que:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S]$$

y

$$-\frac{d[ES]}{dt} = k_{-1}[ES] + k_2[ES]$$

en el estado estacionario:

$$k_1[E][S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES]$$

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = K_m.$$

con lo que la ecuación de Michaelis-Menten se expresa de la siguiente manera:

$$v_o = \frac{V_{\max} [S_o]}{[S_o] + K_m}$$

No se debe confundir K_m con K_s , a menos que el valor de k_{-2} sea muy pequeño, comparado con el de k_{-1} (Lehninger, 1981).

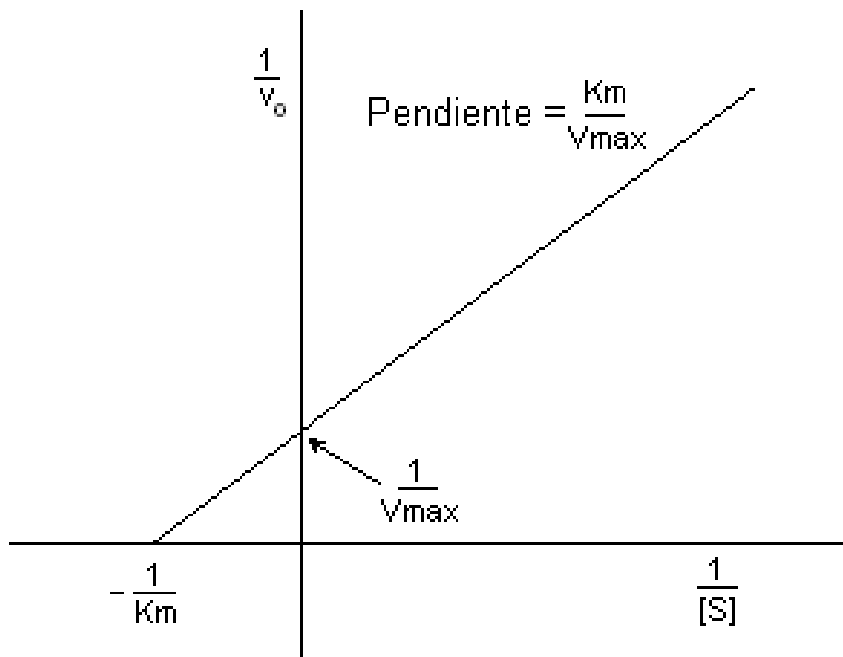
1.4.1.3.3 Representación de Lineweaver-Burk

Para el cálculo de los parámetros cinéticos de la reacción enzimática, la curva de Michaelis-Menten no es en su totalidad adecuada porque el parámetro V_{\max} es el límite para una concentración de sustrato infinita (Lehninger, 1981). Al transformar algebraicamente los valores de velocidad y concentración de sustrato (v_o y $[S]$) en sus recíprocos ($1/v_o$ y $1/[S]$), se tiene la ecuación deducida por Lineweaver-Burk:

$$\frac{1}{v_o} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

cuya representación se muestra en el Cuadro 1.3.

Cuadro 1.3 Representación doble recíproca de Lineweaver-Burk



Fuente: Tomado de Lehninger, 1981

Esta ecuación permite determinar los parámetros cinéticos K_m y V_{\max} con mejor precisión. No obstante, en la actualidad se analizan estos parámetros con computadores que usan métodos matemáticos y estadísticos sofisticados (Voet *et al.*, 2006). Cuando la representación de Lineweaver-Burk no resulta en una curva lineal, la ecuación de Michaelis-Menten no es aplicable para la reacción enzimática en las condiciones del estudio (Chávez *et al.*, 1990).

1.4.1.3.4 Histéresis enzimática

La histéresis enzimática se define como la alteración de una propiedad física o cinética de una enzima, por acción de un cambio rápido en la concentración de un ligando o sustancia aledaña (Frieden, 1970). Estas enzimas presentan un incremento o un retraso lento en la velocidad de reacción antes de llegar al estado estacionario (Frieden, 1979). Un gran número de enzimas presentan este comportamiento; muchas de éstas tienen una estrecha relación con los procesos de regulación en los organismos (Frieden, 1970). Este fenómeno puede durar pocos segundos o minutos y se piensa que los mecanismos responsables son diversos procesos de isomerización, polimerización y desplazamiento entre dos ligandos (Frieden, 1970).

Un caso de histéresis enzimática es el cambio conformacional en la estructura de la enzima sacarasa intestinal por acción de inhibidores competitivos como la acarbosa, nojirimicina y deoxinojirimicina. En presencia de estos inhibidores, la reacción alcanza el estado estacionario después de una fase de retraso entre 5 y 10 segundos (Hanozet *et al.*, 1980).

1.4.1.4 Inhibición enzimática

Se considera como inhibidor a la sustancia que disminuye la actividad de una enzima. Estas sustancias se encuentran fácilmente en el mercado en forma de fármacos, antibióticos, toxinas, conservantes de alimentos, entre otros (McKee *et al.*, 2003).

El estudio de la inhibición enzimática es de gran importancia para la comprensión de la catálisis enzimática y las rutas metabólicas así como la descripción de la arquitectura y las propiedades físicas, químicas y funcionales de las enzimas (McKee *et al.*, 2003).

Hay dos tipos de inhibidores. Los inhibidores irreversibles se caracterizan por que modifican covalentemente el sitio activo o algún

aminoácido estructural en la enzima de manera que se bloquea el acceso al sustrato. Este tipo de inhibición no puede ser analizada bajo la teoría de Michaelis y Menten. En cambio, los inhibidores reversibles interactúan con la enzima de manera reversible lo que disminuye la actividad enzimática.

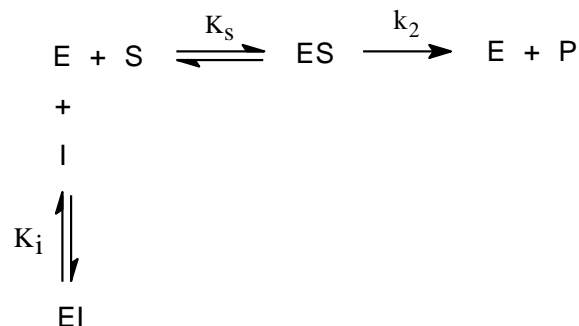
Muchos de los inhibidores reversibles se parecen en su estructura a los sustratos; pero, cuando se unen con la enzima no forman producto. Otros inhibidores no reaccionan directamente con el centro activo. Los tipos principales de inhibición reversible son: inhibición competitiva, inhibición acompetitiva e inhibición mixta (Voet *et al.*, 2006).

1.4.1.4.1 Inhibición competitiva

Un inhibidor competitivo es una sustancia que se combina con la enzima y excluye al sustrato de esta unión. Puede ser una molécula análoga o derivada del sustrato, un producto de la misma reacción u otro sustrato alternativo (Chávez *et al.*, 1990).

Una característica importante de la inhibición competitiva es que su efecto se puede reducir con el aumento de la concentración de sustrato (McKee *et al.*, 2003).

El esquema del mecanismo de la inhibición competitiva es:



en donde:

E = Enzima libre

- S = Sustrato libre
- P = Producto
- I = Inhibidor
- ES = Complejo enzima-sustrato
- EI = Complejo enzima-inhibidor
- Ks = k_{-1}/k_1 = Constante de disociación del complejo enzima-sustrato
- Ki = Constante de disociación del complejo EI (Constante de inhibición)
- k₂ = Constante de velocidad de la formación de producto

De acuerdo con la interpretación de la constante de Michaelis y Menten, se puede afirmar que el parámetro Ki corresponde a la constante de disociación del complejo enzima inhibidor, dado que:

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

por lo que Ki se puede comparar con Ks, la constante de disociación del complejo enzima-sustrato (Lehninger, 1981). La ecuación de Michaelis-Menten para una reacción enzimática con inhibición competitiva completa se deriva tomando en cuenta las consideraciones de la cinética de estado estacionario, que resulta en:

$$v_o = \frac{V_{\max} [S_o]}{[S_o] + \alpha K_m},$$

en donde α es un factor siempre mayor a 1 y equivalente a:

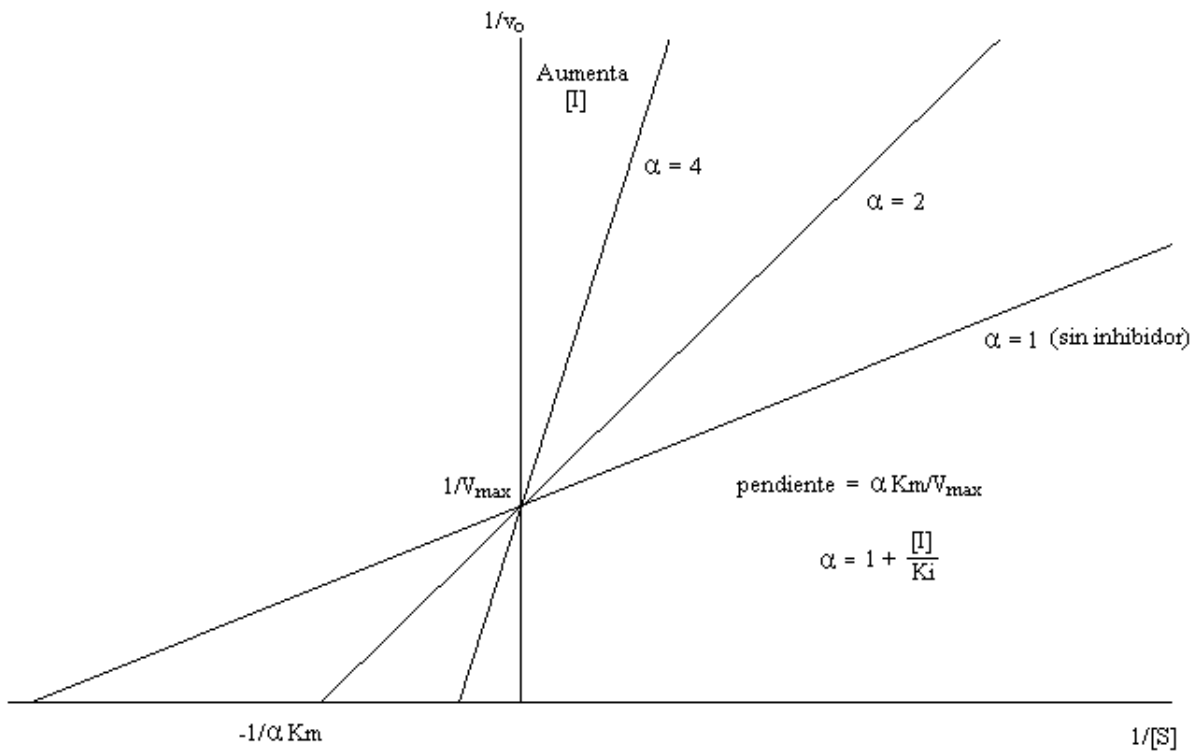
$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_i}$$

La ecuación de Michaelis y Menten, para la inhibición competitiva completa, representada por la linealización doble recíproca es:

$$\frac{1}{v_o} = \frac{K_m}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

El Cuadro 1.4 muestra la representación de Lineweaver-Burk de la inhibición competitiva completa en donde se observa una familia de curvas que intersecan en un punto común en el eje $1/v_o$ y en varios puntos en el eje $1/[S]$.

Cuadro 1.4 Representación de Lineweaver-Burk de la inhibición competitiva completa. La variación en las pendientes muestra el efecto del inhibidor sobre $\alpha K_m = K_{mapp}$



Fuente: Tomado de Voet *et al.*, 2006

En la inhibición competitiva completa, el parámetro V_{\max} se mantiene, ya que con el aumento de la concentración de sustrato se puede reducir el efecto del inhibidor. En cambio, el valor de K_m es más grande a medida que aumenta la concentración del inhibidor, ya que incluso una concentración pequeña de inhibidor se encuentra en la forma EI, que no presenta afinidad por el sustrato (Chávez *et al.*, 1990). A partir de los valores aparentes de K_m

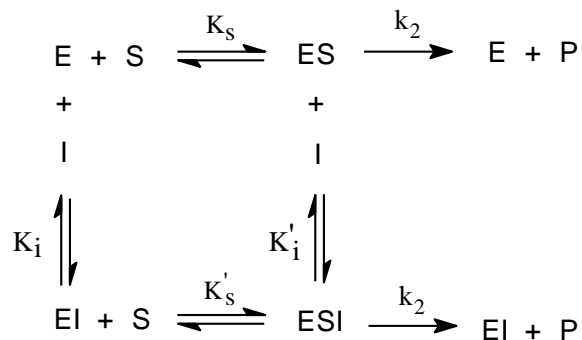
(K_{map}) se puede calcular la constante de inhibición K_i con la siguiente ecuación:

$$K_{map} = \alpha K_m$$

El análisis de los valores de K_i de los inhibidores competitivos completos, en relación con su estructura molecular, revela información importante de las propiedades del sitio activo de la enzima y la catálisis enzimática (Chávez *et al.*, 1990; Voet *et al.*, 2006).

La inhibición competitiva parcial es un caso especial en donde se forman los complejos ES, EI y ESI. En este caso, el sustrato y el inhibidor se unen con menor afinidad a los complejos EI y ES respectivamente y la velocidad de formación de producto es la misma a partir de los complejos ES o ESI.

El siguiente mecanismo corresponde a una inhibición competitiva parcial:



en donde:

ESI = Complejo enzima-sustrato-inhibidor

K'_i = Constante de disociación del complejo ESI

K'_s = Constante de disociación del complejo enzima-sustrato-inhibidor

La constante de disociación del complejo enzima-inhibidor se puede expresar como:

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

La constante de disociación del complejo enzima-sustrato-inhibidor se puede expresar como:

$$K'_i = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$

La ecuación de Michaelis-Menten para una reacción enzimática con inhibición competitiva parcial se deriva tomando en cuenta las consideraciones de la cinética de equilibrio rápido, que resulta en:

$$v_o = \frac{V_{\max} [S_o]}{[S_o] + \frac{\alpha}{\alpha'} K_m},$$

en donde α es un factor siempre mayor a 1 y equivalente a:

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_i}$$

y α' es un factor siempre mayor a 1 y equivalente a:

$$\alpha' = 1 + \frac{[I]}{K'_i}$$

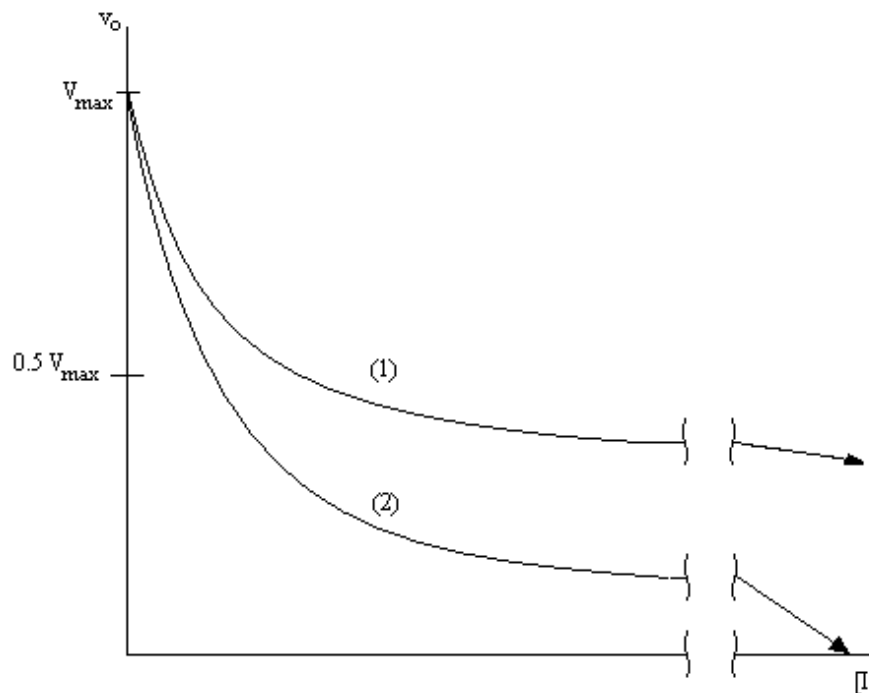
La ecuación de Michaelis y Menten, para la inhibición competitiva completa, representada por la linealización doble recíproca es:

$$\frac{1}{v_o} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}{\left(1 + \frac{[I]}{K'_i}\right)} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

Las rectas se intersecan en un punto común en el eje $1/v_o$, al igual que la inhibición competitiva completa, con la diferencia que la pendiente de las mismas se acerca a un límite finito conforme aumenta la concentración de inhibidor $[I]$. La recta límite interseca en el punto $-1/(\alpha'K_m)$ (Chávez *et al.*, 1990).

Para diferenciar la inhibición competitiva parcial de la inhibición competitiva completa, se analiza la velocidad de la reacción con una concentración constante de sustrato y a concentraciones altas de inhibidor. La inhibición competitiva parcial presenta una asíntota en la velocidad; es decir, no puede reducirse a cero, cuando la concentración de inhibidor tiende al infinito (Chávez *et al.*, 1990). El Cuadro 1.5 presenta una comparación entre los dos tipos de inhibición competitiva.

Cuadro 1.5 Representación gráfica de v_o vs. $[I]$, a una concentración fija de sustrato ($[S]=10K_s$). (1) Inhibición competitiva parcial, (2) Inhibición competitiva completa.

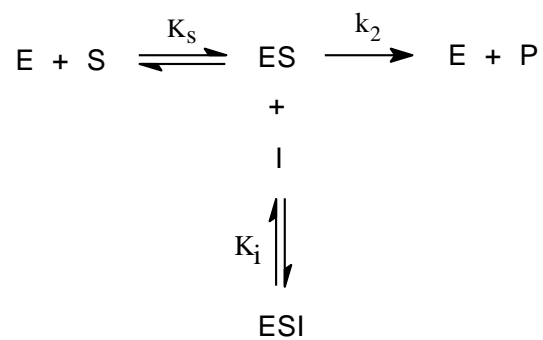


Fuente: Tomado de Chávez *et al.*, 1990

1.4.1.4.2 Inhibición acompetitiva

Un inhibidor acompetitivo es una sustancia que se combina con el complejo ES para formar un complejo ESI no productivo. Este tipo de inhibición se da con más frecuencia en reacciones enzimáticas bisustrato, antes que en reacciones monosustrato. El inhibidor no necesariamente se asemeja al sustrato, sino que distorsiona el sitio activo de la enzima (Voet *et al.*, 2006).

El mecanismo de la inhibición acompetitiva es:



La constante de inhibición acompetitiva se puede expresar como:

$$K_i = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$

La ecuación de Michaelis-Menten para una reacción enzimática con inhibición acompetitiva se deriva tomando en cuenta las consideraciones de la cinética del estado estacionario, que resulta en:

$$v_o = \frac{V_{\max} [S_o]}{\alpha [S_o] + K_m}$$

en donde α es un factor siempre mayor a 1 y equivalente a:

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_i}$$

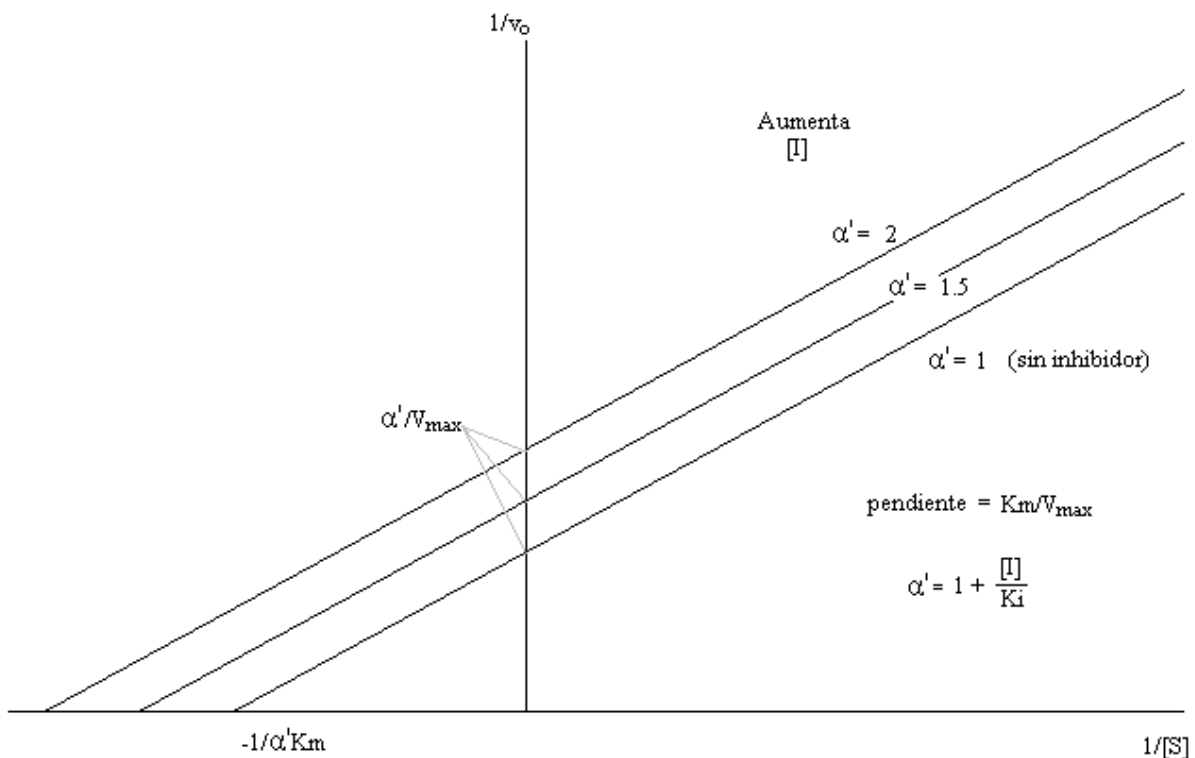
La ecuación de Michaelis y Menten para la inhibición acompetitiva representada por la linealización doble recíproca es:

$$\frac{1}{v_o} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}{V_{max}}$$

El Cuadro 1.6 muestra la representación de Lineweaver-Burk de la inhibición acompetitiva en donde se observa una familia de curvas paralelas de igual pendiente que intersecan en varios puntos en el eje $1/v_o$ y en el eje $1/[S]$.

Cuadro 1.6 Representación de Lineweaver-Burk de la inhibición acompetitiva.

Todas las curvas presentan una misma pendiente K_m/V_{max}



Fuente: Tomado de Voet *et al.*, 2006

A diferencia de la inhibición competitiva, el grado de la inhibición acompetitiva aumenta a medida que la concentración de sustrato es mayor (Chávez *et al.*, 1990; Lehninger, 1981). Además, si se aumenta la

concentración de sustrato, la velocidad de la reacción también se incrementa pero no hasta el grado de una reacción sin inhibidor (McKee *et al.*, 2003). También, el valor aparente de K_{map} disminuye debido a que la formación del complejo ESI ocupa una parte del complejo enzima-sustrato ES y por lo tanto la reacción $E + S \rightarrow ES$ se desplaza hacia la derecha (Chávez *et al.*, 1990).

Se puede calcular la constante de inhibición K_i a partir de:

$$K_{map} = \frac{K_m}{\alpha}$$

y

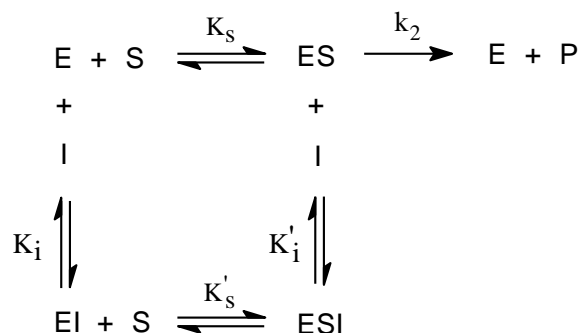
$$V_{maxap} = \frac{V_{max}}{\alpha}$$

1.4.1.4.3 Inhibición mixta

Un inhibidor de tipo mixto se puede unir tanto a la enzima libre como al complejo ES, lo que resulta en el complejo EI, que puede o no unirse al sustrato, y en el complejo ESI no productivo (Chávez *et al.*, 1990).

El inhibidor de tipo mixto no interactúa con el sitio activo de la enzima sino que cambia la estructura tridimensional de la misma, lo que resulta en la reducción de la afinidad de la enzima por el sustrato y la disminución de la catálisis enzimática (Voet *et al.*, 2006).

El siguiente mecanismo describe la inhibición mixta:



Las constantes de disociación para la unión del inhibidor son:

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

y

$$K'_i = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$

La ecuación de Michaelis-Menten para una reacción enzimática con inhibición de tipo mixto se deriva tomando en cuenta las consideraciones de la cinética de equilibrio rápido, que resulta en:

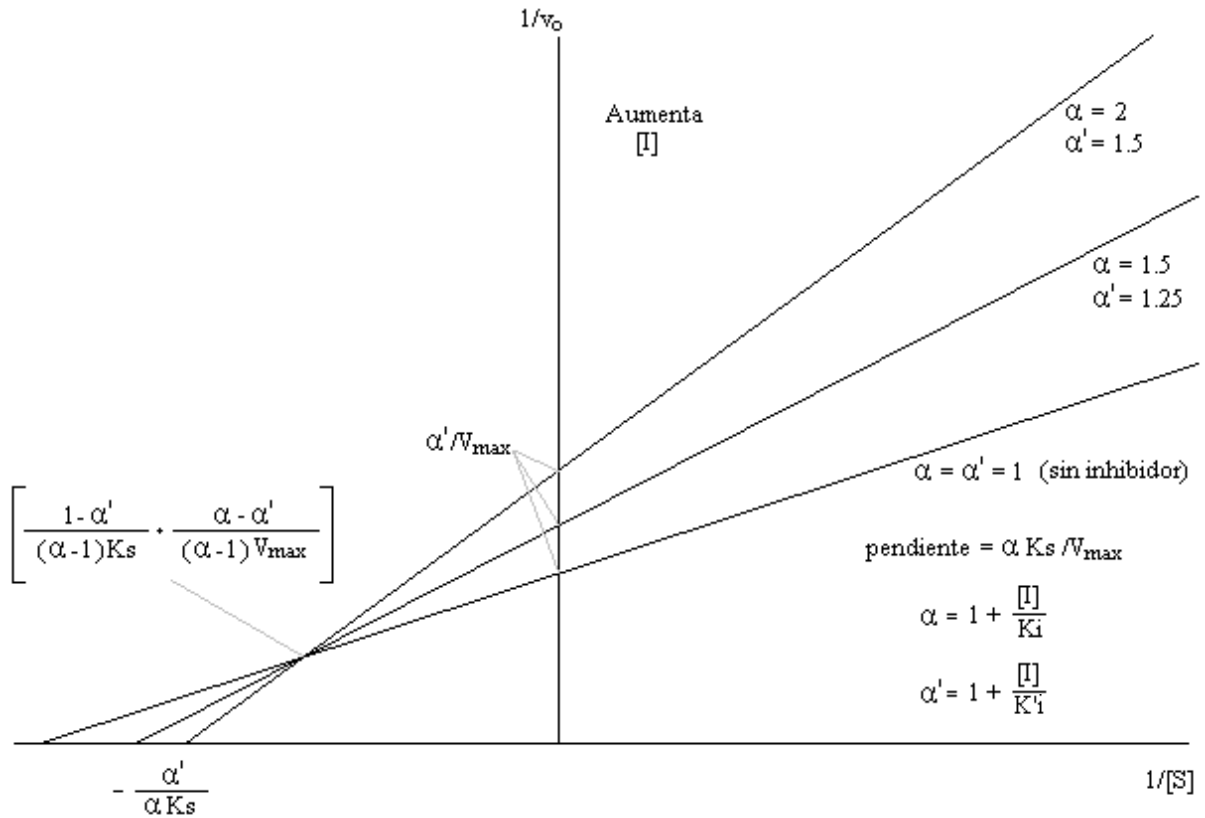
$$v_o = \frac{V_{\max} [S_o]}{\alpha'[S_o] + \alpha K_s}$$

La ecuación de Michaelis y Menten para la inhibición mixta representada por la linealización doble recíproca es:

$$\frac{1}{v_o} = \frac{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) K_s}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{\left(1 + \frac{[I]}{K'_i}\right)}{V_{\max}}$$

El Cuadro 1.7 muestra la representación de Lineweaver-Burk de la inhibición mixta en donde se observa una familia de curvas que intersecan en un punto común del plano y en varios puntos en el eje $1/v_o$ y en el eje $1/[S]$.

Cuadro 1.7 Representación de Lineweaver-Burk de la inhibición mixta. Nótese que las curvas intersecan a la izquierda del eje $1/v_o$ y sus coordenadas se indican entre los corchetes. Cuando $K_i = K'_i$ ($\alpha = \alpha'$), las curvas intersecan en un punto en el eje $1/[S]$, en $-1/K_s$.



Fuente: Adaptado de Voet *et al.*, 2006

El efecto inhibitorio no se anula al aumentar la concentración de sustrato (Lehninger, 1981). El valor aparente de K_s (K_{sapp}) puede incrementar, disminuir o permanecer inalterado. Este último caso se conoce como inhibición no competitiva pura y se da cuando la enzima y el complejo ES se unen con la misma afinidad con el inhibidor, por lo que:

$$K_i = K'_i$$

por lo tanto:

$$\alpha = \alpha'$$

Se pueden calcular las constantes de inhibición K_i y K'_i a partir de:

$$K_{sap} = \left(\frac{\alpha}{\alpha'} \right) K_s$$

y

$$V_{\max ap} = \frac{V_{\max}}{\alpha'}$$

1.4.1.5 Significado de los parámetros cinéticos

La definición operacional de la constante K_m es la concentración de sustrato a la que se alcanza la mitad de la velocidad máxima de reacción enzimática. Mientras más pequeño es el valor de K_m , mejor es la eficiencia catalítica a bajas concentraciones de sustrato (Voet *et al.*, 2006). Solo en el caso en que la constante de velocidad k_2 es mucho más pequeña que K_s , se puede considerar que $K_m = K_s$; es decir, que K_m es una medida real de la afinidad de la enzima por el sustrato (Chávez *et al.*, 1990). La constante K_m es independiente de la concentración de enzima y es función del pH y la temperatura. Cada enzima y sustrato interactúan con valores propios de K_m (Voet *et al.*, 2006).

Con base en la lógica de Michaelis y Menten, se afirma que el parámetro K_i corresponde a la constante de disociación del complejo enzima-inhibidor. De esta manera, se puede comparar K_i con la constante de disociación del complejo enzima-sustrato: K_s (Lehninger, 1981) y así, determinar cual de los ligandos (sustrato o inhibidor) tiene más afinidad por la enzima.

V_{\max} es la máxima eficiencia catalítica de una enzima con un sustrato determinado a un pH, temperatura y concentración de enzima constante (Chávez *et al.*, 1990; Voet *et al.*, 2006).

La constante catalítica k_{cat} , también conocida como número de recambio, se define como:

$$k_{\text{cat}} = \frac{V_{\text{max}}}{[E_T]}$$

La constante k_{cat} es numéricamente igual al número de moléculas de sustrato que se transforman en producto en una unidad de tiempo, en condiciones de saturación (McKee *et al.*, 2003). En la ecuación de Michaelis-Menten, $k_{\text{cat}} = k_2$, mientras que en reacciones multisustrato o intermediarios de reacción, k_{cat} es función de varias constantes de velocidad (Voet *et al.*, 2006). Al reordenar la ecuación anterior se tiene que:

$$V_{\text{max}} = k_{\text{cat}} [E_T]$$

y la ecuación de Michaelis y Menten puede escribirse como:

$$v_o = \frac{k_{\text{cat}} [E_T] [S]}{[S] + K_m}$$

Cuando la concentración de sustrato es menor que K_m , entonces la concentración de E_T es aproximadamente igual a la concentración de E , por lo que la ecuación de Michaelis-Menten se reduce a:

$$v_o = \left(\frac{k_{\text{cat}}}{K_m} \right) \cdot [E] [S]$$

en donde k_{cat}/K_m es una constante de segundo orden que constituye una medida de la eficacia catalítica. Establece el impacto combinado de la unión y la catálisis (McKee *et al.*, 2003). El límite de eficiencia catalítica no puede ser mayor a k_1 . Este límite se encuentra en el orden de 10^8 a $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Las enzimas que alcanzan este límite obedecen al mecanismo de Briggs-Haldane y se dice que han alcanzado una perfección catalítica (Chávez *et al.*, 1990; McKee *et al.*, 2003).

1.4.1.6 Importancia de la inhibición enzimática en medicina

La importancia de la inhibición enzimática para los seres vivos radica en la regulación de las vías metabólicas (McKee *et al.*, 2003). Una gran cantidad de fármacos y drogas son inhibidores de alguna enzima específica del organismo, por lo que la cinética enzimática y de inhibición son muy estudiadas en la industria farmacéutica (McKee *et al.*, 2003; York, 2004; Voet *et al.*, 2006).

Un ejemplo concreto de la inhibición enzimática en aplicaciones médicas es el uso de inhibidores específicos sobre la actividad de las proteasas involucradas en la replicación del VIH. El AZT (3'-azida-3'-deoxitimidina; Zidovudina) es un inhibidor de la transcriptasa reversa (Voet *et al.*, 2006).

1.4.2 Diabetes mellitus

1.4.2.1 Generalidades

No se puede definir a la diabetes mellitus como una entidad patológica aislada (Kumar *et al.*, 2005), sino más bien como un grupo de trastornos metabólicos de los hidratos de carbono, proteínas y grasas que en conjunto presentan un cuadro de hiperglucemia crónica (Kasper *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2005; World Health Organization, 1999). La hiperglucemia es consecuencia de la deficiencia o ausencia total de secreción de insulina en el páncreas, un defecto en la sensibilidad tisular a dicha hormona o ambas a la vez. Este desbalance metabólico caracterizado por un aumento de la glucemia, menor absorción celular de glucosa y mayor utilización de las grasas y proteínas, puede desencadenar en una serie de efectos secundarios y complicaciones en varios órganos del cuerpo, principalmente en los riñones, vasos sanguíneos, nervios y ojos (Guyton *et al.*, 2001).

Las causas de la diabetes mellitus obedecen a una compleja interacción entre factores tanto genéticos como ambientales y de estilo de vida

del individuo. La hiperglucemia puede producirse también por una falta de la secreción de insulina (Kasper *et al.*, 2006). Los diferentes grados de hiperglucemia en el paciente diabético se relacionan directamente con las alteraciones fisiológicas producidas por la enfermedad (Wyngaarden *et al.*, 1991). La hiperglucemia prolongada ocasiona una deshidratación intra y extracelular grave cuando la presión osmótica del líquido extracelular provoca la salida de agua de las células y sus compartimientos internos. Debido a las altas concentraciones de glucosa en la sangre del paciente, se filtra más glucosa por el túbulo renal de la que puede reabsorberse y sale despedida por la orina, estado que se conoce como glucosuria. Así mismo, hay una pérdida masiva de líquidos lo que proporciona al paciente diabético la condición de poliuria y en consecuencia, un aumento de la sed o estado de polidipsia (Guyton *et al.*, 2001). Goodman (1998) atribuye el estado de polifagia al hecho de que existe gran pérdida de glucosa por la orina. Otros síntomas son también observados con frecuencia como la pérdida de peso corporal y visión desenfocada (Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2003).

Las complicaciones agudas de la diabetes mellitus son la cetoacidosis diabética (diabetic ketoacidosis, DKA) y el estado hiperosmolar hiperglucémico (hyperglycemic hyperosmolar state, HHS) las que pueden conducir a un estado de estupor, coma diabético e incluso la muerte, si no se ha tratado a tiempo (World Health Organization, 1999).

Gran porcentaje de la morbilidad y la mortalidad por diabetes mellitus se debe a las complicaciones crónicas de la enfermedad. El riesgo de las complicaciones a largo plazo va en aumento con la duración de la hiperglucemia. Las complicaciones crónicas, por lo general se presentan en el transcurso del segundo decenio de la hiperglucemia, lo que expone al paciente a un período prolongado de hiperglucemia asintomática. Es por esta razón que muchas personas con diabetes mellitus de tipo 2 muestran las complicaciones en el momento del diagnóstico (Kasper *et al.*, 2006). Las complicaciones crónicas pueden clasificarse en vasculares y no vasculares, las que a su vez se dividen en otros grupos como se observa en el Cuadro 1.8.

Cuadro 1.8 Complicaciones crónicas de la diabetes mellitus

Microvasculares Enfermedades oculares: Retinopatía (no proliferativa y proliferativa) Edema de la mácula Neuropatías: Sensitivas y motoras (moneuropatías y polineuropatías) Vegetativas Neuropatías
Macrovasculares Arteriopatía coronaria Enfermedad vascular periférica Enfermedad vascular cerebral
Otras Del tubo digestivo (gastroparesia, diarrea) Genitourinarias (uropatías y disfunción sexual) Dermatológicas Infecciosas Cataratas Glaucoma

Fuente: Kasper *et al.*, 2006.

Las personas que sufren de diabetes mellitus tienen un alto riesgo de sufrir enfermedades vasculares periféricas, cardiovasculares y cerebrovasculares (World Health Organization, 1999).

1.4.2.2 Clasificación de la diabetes mellitus

Años atrás se clasificó a la diabetes mellitus de acuerdo al rango de edad del grupo humano afectado. De aquí se conocen los términos de diabetes mellitus juvenil y diabetes mellitus del adulto. No obstante, esta clasificación ha perdido su validez al comprobarse que de 5 a 10% de la diabetes juvenil se da en individuos adultos mayores de 30 años, así como existen niños y adolescentes con problemas de obesidad que pueden desarrollar la diabetes

mellitus del adulto (Kasper *et al.*, 2006).

En el año 1985 se aceptó ampliamente una clasificación propuesta por la OMS, la cual diferenciaba los tipos de diabetes mellitus de acuerdo al tratamiento administrado, es decir, de acuerdo a si se usaba insulina o no. Los términos obedecen a una clasificación etiológica y corresponden a las siglas en inglés de diabetes mellitus insulino dependiente (IDDM) y diabetes mellitus no insulino dependiente (NIDDM). Adicionalmente de estos dos grupos principales se dividió en un tercer grupo a la diabetes mellitus relacionada a la malnutrición (MRDM) y en un cuarto grupo a la diabetes gestacional (GDM) (World Health Organization, 1999). Sin embargo, esta clasificación traía confusiones porque existían casos en los que pacientes con NIDDM requerían de insulina tarde o temprano (Kasper *et al.*, 2006).

Finalmente, la OMS presenta los términos “diabetes mellitus tipo 1” y “diabetes mellitus tipo 2” para diferenciar a los pacientes con IDDM y con NIDDM respectivamente. Recomienda a su vez utilizar el criterio etiológico así como las etapas de la enfermedad para su clasificación (World Health Organization, 1999).

El Cuadro 1.9 presenta una clasificación detallada de la diabetes mellitus de acuerdo a las causas.

Cuadro 1.9 Clasificación etiológica de la diabetes mellitus

1. Diabetes tipo I (Deficiencia absoluta de insulina por destrucción de las células β)		A. Inmunomediada
		B. Idiopática
2. Diabetes tipo II		Predominantemente resistencia a la insulina con deficiencia relativa de insulina
		Predominantemente defecto secretorio con resistencia de insulina
3. Otros tipos específicos	A. Defectos genéticos de la función de las células β	Diabetes juvenil con inicio en la madurez (MODY)
		Mutaciones del ADN Mitocondrial
	B. Defectos genéticos en la acción de la insulina	Resistencia a la insulina tipo A
		Leprecaunismo
		Síndrome de Rabson-Mendenhall
	C. Defectos pancreáticos exócrinos	Diabetes lipoatrófica
		Pancreatitis
		Pancreatectomía
		Neoplasia
		Fibrosis quística
	D. Endocrinopatías	Hemocromatosis
		Pancreatopatía fibrocalculosa
		Acromegalia
		Síndrome de Cushing
		Glaucoma
		Hipertiroidismo
		Feocromocitoma
	Somatostatinoma	
	E. Fármacos	Aldosteronoma
		Glucocorticoides
		Hormona tiroidea
		Interferón α
		Inhibidores de proteasa
Agonistas β -adrenérgicos		
Tiazidas		
Ácido nicotínico		
F. Infecciones	Fenitoína	
	Citomegalovirus (CMV)	
	Rubeola congénita	
G. Síndromes genéticos asociados a diabetes	Virus Coxsackie B	
	Síndrome de Down	
	Síndrome de Klinefelter	
		Síndrome de Turner
4. Diabetes mellitus gestacional o gravídica		

Fuente: Adaptado de Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2003 y Kumar *et al.*, 2005.

Diabetes mellitus tipo 1: Representa aproximadamente el 10% de todos los casos de diabetes mellitus. A su vez se divide en diabetes mellitus tipo 1A (inmunomediada) y diabetes mellitus tipo 1B (idiopática). La primera es la más común dentro de este grupo y se caracteriza por la deficiencia total de insulina a causa de la destrucción de las células β del páncreas por un desorden autoinmunitario (Kumar *et al.*, 2005). No se conocen las causas de la diabetes mellitus tipo 1B pero se sabe que existe una disposición genética hereditaria a la degeneración de las células β que deja al paciente propenso a la cetosis (Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2003). La destrucción de las células β no sólo responde a un desorden autoinmunitario sino también a una posible infección viral (Guyton *et al.*, 2001). Por lo general, la diabetes mellitus tipo 1A aparece en la niñez, se manifiesta en la adolescencia y progresa con los años; no obstante puede ocurrir a cualquier edad, incluso en la vejez (Kumar *et al.*, 2005; Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2003). Se manifiesta bruscamente con tres características principales: hiperglucemia, uso de las grasas para producción de energía y reducción de las proteínas orgánicas (Guyton *et al.*, 2001).

Diabetes mellitus tipo 2: El 80 al 90% de los pacientes con diabetes corresponden al grupo de la diabetes mellitus tipo 2. Es una combinación de una deficiencia relativa de insulina con una resistencia periférica a la acción de la misma (Kumar *et al.*, 2005). La resistencia a la insulina se puede definir como una baja sensibilidad tisular a los efectos metabólicos de la insulina (Guyton *et al.*, 2001). Se presenta comúnmente en el adulto entre 40 a 60 años de edad. El desarrollo de la diabetes mellitus tipo 2 no sugiere una base autoinmune; los factores genéticos son mucho más importantes así como los hábitos dietéticos y el estilo de vida sedentario. Esta última afirmación se basa en que existe una relación muy estrecha entre la obesidad y la resistencia a la insulina (Kumar *et al.*, 2005). A diferencia de la diabetes tipo 1, la diabetes tipo 2 no presenta complicaciones de cetosis o es muy infrecuente. Se detectan concentraciones altas de insulina plasmática a causa de la hiperglucemia y la falta de utilización de los hidratos de carbono (Guyton *et al.*, 2001).

El Cuadro 1.10 resume las características clínicas que se manifiestan en los dos tipos principales de diabetes mellitus.

Cuadro 1.10 Características clínicas de los pacientes con diabetes mellitus de tipo 1 y de tipo 2

Dato	Tipo I	Tipo II
Edad de comienzo	Generalmente <20 años	Generalmente >40 años
Masa corporal	Reducida (atrofiada) o normal	Obesidad
Insulina plasmática	Reducida o ausente	Normal o elevada
Glucagón plasmático	Elevado, se puede suprimir	Elevado, resistente a la supresión
Glucosa plasmática	Aumento	Aumento
Sensibilidad a la insulina	Normal	Reducción
Anticuerpos anticélulas β	Presentes	Ausentes
Cetoacidosis	Frecuente	Rara; coma hiperosmolar no cetósico
Tratamiento	Insulina	Adelgazamiento, tiazolidionas, metformina, sulfonilureas, inhibidores de la α -glucosidasa, insulina

Fuente: Adaptado de Guyton *et al.*, 2001 y Kumar *et al.*, 2005

1.4.2.3 Etapas clínicas de la diabetes mellitus

Sin tomar en cuenta la etiología, se pueden identificar tres etapas en la diabetes mellitus (World Health Organization, 1999):

Demanda insulina para sobrevivir. Grupo al que corresponden principalmente los individuos con diabetes mellitus tipo 1.

Demanda insulina para control. Existe secreción endógena de insulina pero no la suficiente como para alcanzar niveles de glucemia normales. Algunos pacientes con diabetes de tipo 2 pueden alcanzar esta etapa.

No demanda insulina. A este grupo corresponden principalmente los individuos con diabetes mellitus de tipo 2.

Estudios sobre la historia natural de la diabetes mellitus afirman que previo al desarrollo de la misma hay una etapa prolongada de pre-diabetes (Ramlo-Halsted *et al.*, 1999). Esta etapa se caracteriza por ser un período de

homeostasis anormal de la glucosa llamado “Trastorno de la glucosa en ayunas” o IFG por sus siglas en inglés (Impaired fasting glucose) y también “Trastorno de la tolerancia a la glucosa” o IGT por sus siglas en inglés (Impaired glucose tolerance) (Kasper *et al.*, 2006).

Los pacientes en la fase de IFG o IGT tienen un alto riesgo de desarrollar diabetes mellitus de tipo 2 así como enfermedades cardiovasculares (Fuller *et al.*, 1980). En pacientes con IGT, el riesgo de adquirir diabetes aumenta anualmente en un 3.6 a 8.7% (Edelstein *et al.*, 1997). Así mismo, los factores de riesgo lipídicos y no lipídicos para una enfermedad de las arterias coronarias o más conocido como síndrome metabólico, están frecuentemente asociados a las etapas de IFG e IGT así jamás se evidencie la diabetes en el individuo (Shobha *et al.*, 2004).

En algunos tipos de diabetes, los valores de glucemia pueden disminuir por diversos factores. Por ejemplo, los individuos con diabetes de tipo 2 pueden volver a la categoría de IGT con la pérdida de peso; en la diabetes gravídica, la diabetes puede pasar a IGT o incluso a niveles normales de tolerancia a la glucosa después del parto (Kasper *et al.*, 2006).

El Cuadro 1.11 muestra las diferentes etapas de la diabetes mellitus en relación a la clasificación etiológica:

Cuadro 1.11 Etapas clínicas de la diabetes mellitus. Las flechas indican que en algunos tipos de diabetes las variaciones en la tolerancia a la glucosa pueden ser bidireccionales. Los valores de FPG y PG no son válidos para el diagnóstico de diabetes gravídica. La línea discontinua indica que algunos tipos de diabetes pueden no requerir insulina para la supervivencia.

Tipo de Diabetes	Tolerancia a la glucosa normal	Hiperglucemia			
		Glucosa en ayunas anómala o alteración de la tolerancia a la glucosa	Diabetes mellitus		
			No requiere insulina	Requiere insulina para su control	Requiere insulina para sobrevivir
Tipo 1					
Tipo 2					
Otros tipos específicos					
Diabetes gravídica					
Tiempo (años)					
FPG (mg/100 ml)	<110	110–125	≥126		
2-h PG (mg/100 ml)	<140	140–199	≥200		

FPG: Glucosa plasmática en ayunas

2-h PG: Glucosa plasmática a las 2 horas de una descarga de glucosa

Fuente: Adaptado de Kasper *et al.*, 2006.

1.4.2.4 Criterios diagnósticos para la diabetes mellitus

Desde el año 1965, el mundo entero ha aceptado ampliamente los criterios para el diagnóstico de la diabetes mellitus impuestos por la OMS. Sin embargo, la Asociación Americana de la Diabetes (American Diabetes Association, ADA) ha discrepado por primera vez con la OMS con respecto a los valores definidos para la IFG. A su vez, la OMS realizó un estudio que mantiene los últimos criterios publicados (World Health Organization, 2006). El Cuadro 1.12 compara ambos criterios diagnósticos.

Cuadro 1.12 Comparación de los criterios diagnósticos de la OMS (1999) y la ADA (2003) para la diabetes mellitus

		OMS 1999	ADA 2003
Diabetes	Glucosa en ayunas	≥7.0mmol/l (126mg/dl)	≥7.0mmol/l (126mg/dl)
	Glucosa 2 horas postprandial*	≥11.1mmol/l (200mg/dl)	≥11.1mmol/l (200mg/dl)
IGT	Glucosa en ayunas	<7.0mmol/l (126mg/dl) (si es medido)	No requerido
	Glucosa 2 horas postprandial*	≥7.8mmol/l (140mg/dl) y <11.1mmol/l (200mg/dl)	≥7.8mmol/l (140mg/dl) y <11.1mmol/l (200mg/dl)
IFG	Glucosa en ayunas	6.1 a 6.9mmol/l (110mg/dl a 125mg/dl)	5.6 a 6.9mmol/l (100mg/dl a 125mg/dl)
	Glucosa 2 horas postprandial*	<7.8mmol/l (140mg/dl) (si es medido)	<11.1mmol/l (200mg/dl) (Medición no recomendada)

* Glucosa plasmática venosa 2 horas postprandial (Con 75g de glucosa)

Fuente: Adaptado de World Health Organization, 2006

1.4.2.5 Tratamiento y prevención de la diabetes tipo 2

La meta principal de los tratamientos existentes para la diabetes mellitus tipo 2 es acercar los niveles de glucemia a un nivel normal lo más sea posible (Lerman, 1994). A diferencia de la prioridad farmacéutica en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 1, el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 consiste en un cambio del estilo de vida del paciente que debe asimilar nuevos hábitos dietéticos y de ejercicio físico. Si este régimen falla, se recurre al uso de hipoglucemiantes orales e incluso a la administración de insulina (Shobha *et al.*, 2004). La sensibilidad de la insulina puede mejorar con el ejercicio, la pérdida de peso y el tratamiento con hipoglucemiantes pero no puede ser restaurada a los niveles normales (Wing *et al.*, 1994). Se puede mejorar el tratamiento de la diabetes mellitus con un monitoreo de la hemoglobina glicosilada (A1C) la cual cuantifica proporcionalmente la concentración de glucosa en la sangre a través del tiempo (Larsen *et al.*, 1990). La atención integral de la diabetes mellitus tipo 2 consiste además de la

identificación y la solución de los trastornos asociados y sus complicaciones específicas (Kasper *et al.*, 2006) lo que se detalla en el Cuadro 1.13.

Cuadro 1.13 Elementos esenciales de la atención integral de la diabetes mellitus tipo 2



Fuente: Kasper *et al.*, 2006

La patogenia de la diabetes mellitus tipo 2 es de importancia terapéutica ya que se conocen agentes farmacológicos contra ciertos trastornos metabólicos ocasionados por la enfermedad. Kasper *et al.* (2006) propone el Cuadro 1.14 el cual presenta los agentes farmacéuticos utilizados y sus efectos así como una descripción breve de los diferentes grupos.

Cuadro 1.14 Tratamientos orales reductores de la glucosa sanguínea para la diabetes tipo 2

Agente farmacéutico	Mecanismo de acción	Ejemplos	Reducción esperada en la A1C, %	Ventajas específicas del agente	Desventajas específicas del agente
Secretagogos de la insulina	Aumento de insulina		1 a 2		
Sulfonilureas		Clorpropamida, tolazamida, tolbutamida, Glimepirida, Glipizida, Glibenclamida		Disminuye la glucemia en ayunas	Hipoglucemia, pérdida de peso, hiperinsulinemia
No sulfonilureas		Repaglinida, Nateglinida		Inicio rápido de la acción, descenso posprandial de la glucosa	Hipoglucemia
Biguanidas	Disminuye producción hepática de glucosa, pérdida de peso, aumento de utilización de glucosa, baja la resistencia a la insulina	Metformina	1 a 2	Pérdida de peso, mejoría de los valores de lípidos, no producen hipoglucemia	Acidosis láctica, diarrea, náuseas
Inhibidores de la alfa glucosidasa	Disminuye absorción de glucosa	Acarbosa, miglitol	0.5 a 1.0	No hay riesgo de hipoglucemia	Flatulencia, pruebas de la función hepática
Tiazolidinadionas	Disminuye resistencia a la insulina, aumenta utilización de glucosa	Rosiglitazona, pioglitazona	1 a 2	Bajan las necesidades de insulina y sulfonilureas, disminuyen los triglicéridos	Necesidad de vigilancia hepática frecuente por peligro de lesión idiosincrásica del hígado.
Tratamiento médico nutricional y actividad física	Disminuye resistencia a la insulina	Dieta baja en calorías y grasas, ejercicio	1 a 2	Otros beneficios para la salud	Obediencia difícil, pocos buenos resultados a largo plazo

A1C: Hemoglobina glicosilada

Fuente: Adaptado de Kasper *et al.*, 2006

Secretagogos de la insulina. Estimulan la secreción de insulina. Son más eficaces en diabéticos de tipo 2 que han iniciado la enfermedad en no más de 5 años ya que aún poseen una producción endógena de insulina y son propensos a la obesidad.

Biguanidas. Reducen la producción de glucosa en el hígado así como mejoran

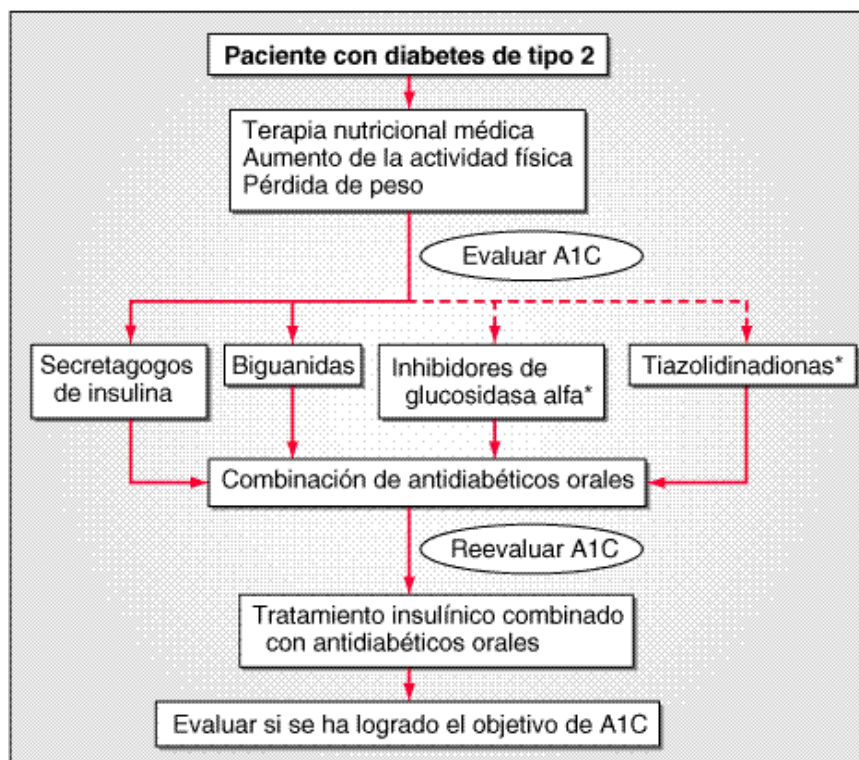
ligeramente la aceptación periférica de la misma.

Inhibidores de la α -glucosidasa. Reducen la hiperglucemia postprandial por inhibición de la enzima α -glucosidasa en la luz del intestino delgado, por lo que los polisacáridos no pueden convertirse a monosacáridos como la glucosa que se absorbe al torrente sanguíneo. Puede ser utilizado en pacientes con diabetes de tipo 1 para la disminución de la glucosa postprandial.

Tiazolidinadionas. Reducen la resistencia a la insulina. Uno de estos fármacos, la troglitazona, fue retirado por la FDA (U.S. Food and Drug Administration) al evidenciarse hepatotoxicidad.

El Cuadro 1.15 resume el algoritmo a seguir para el tratamiento de la glucemia en la diabetes mellitus tipo 2.

Cuadro 1.15 Tratamiento de la glucemia en la diabetes mellitus de tipo 2.



A1C: Hemoglobina glicosilada

* Se inicia el tratamiento con secretagogos de la insulina y biguanidas antes de aplicar estos fármacos.

Fuente: Tomado de Kasper *et al.*, 2006

Para la prevención de la diabetes mellitus tipo 2 se debe llevar un control adecuado de la glucemia del individuo. Así, si se detecta un estado de IGT en el paciente, se deben aplicar los tratamientos antes mencionados con criterio médico, dado que existe una reducción muy significativa del riesgo de adquirir diabetes (Buchanan *et al.*, 2002; Chiasson *et al.*, 2002; Knowler *et al.*, 2002; Pan *et al.*, 1997; Tuomilehto *et al.*, 2001). El Cuadro 1.16 resume los estudios que se han realizado sobre la prevención de la diabetes.

Cuadro 1.16 Recopilación de las investigaciones principales sobre prevención de diabetes mellitus

Estudio	Población	Media IMC (kg / m ²)	Tipo de intervención	Reducción del riesgo relativo %
Programa de Prevención de la Diabetes (Knowler <i>et al.</i> , 2002)	3234 pacientes con IGT	34	Modificación del estilo de vida.	58
			Metformina (Glucophage), 850 mg 2 veces al día.	31
Estudio de Prevención de Diabetes Terminal (Tuomilehto <i>et al.</i> , 2001)	522 pacientes con IGT	31	Modificación del estilo de vida.	58
Estudio Da Qing IGT y Diabetes (Pan <i>et al.</i> , 1997)	577 pacientes con IGT	25.8	Dieta	31
			Ejercicio	46
			Dieta y ejercicio.	42
Ensayo STOP-NIDDM (Chiasson <i>et al.</i> , 2002)	1429 pacientes con IGT	31	Acarbosa (Precose), 100 mg 3 veces al día.	24
Estudio TRIPOD (Buchanan <i>et al.</i> , 2002)	236 mujeres hispánicas con historial GDM	30	Troglitazona (Rezulin), 400 mg una vez al día *	55

IMC: Índice de masa corporal. IGT: Trastorno de la tolerancia a la glucosa (Impaired glucose tolerance). GDM: Diabetes mellitus gestacional. STOP-NIDDM: Estudio para la prevención de la diabetes mellitus no insulino dependiente (Study to Prevent Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus). TRIPOD: Troglitazona en la Prevención de la Diabetes (Troglitazone in the Prevention of Diabetes)

* La FDA retiró del mercado este medicamento por efectos secundarios de hepatotoxicidad

Fuente: Adaptado de Shobha *et al.*, 2004

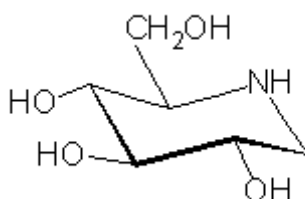
1.4.3 Aplicaciones terapéuticas del gusano de seda

Antes de llegar al intestino delgado, los almidones ingeridos por los humanos son degradados a maltosa y maltotriosa por la enzima amilasa presente en la saliva. Posteriormente son degradados a D-glucosa en el intestino delgado, por la acción de la α -glucosidasa, enzima específica para hidrolizar disacáridos y oligosacáridos con enlaces $\alpha(1 \rightarrow 4)$. Esto permite la absorción de la D-glucosa a la sangre (Murray *et al.*, 2001).

Actualmente se conoce que existe una clase de alcaloides diseminados en la naturaleza, capaces de inhibir las enzimas intestinales de los mamíferos (Watson *et al.*, 2001). Esta propiedad se debe a que su estructura es muy similar a los azúcares, sustratos de dichas enzimas (Asano, Kato y Watson, 2001).

El poder hipoglicemiante de los iminoazúcares fue descubierto por investigadores de Bayer en el año de 1976, diez años después de la síntesis de la nojirimicina en laboratorio, la cual fue la primer molécula con capacidad de mimetizar un azúcar (Martin, 2007). Sin embargo, la nojirimicina no era muy estable por lo que se almacenaba en su forma sintética reducida, la 1-deoxinojirimicina (DNJ) (Asano, Kato y Watson, 2001). Posteriormente, la DNJ fue descubierta en las raíces de la planta de morera (*Morus sp.*) y se le dio el nombre de moranolina (Yagi *et al.*, 1976). La estructura de la DNJ se observa en el Cuadro 1.17.

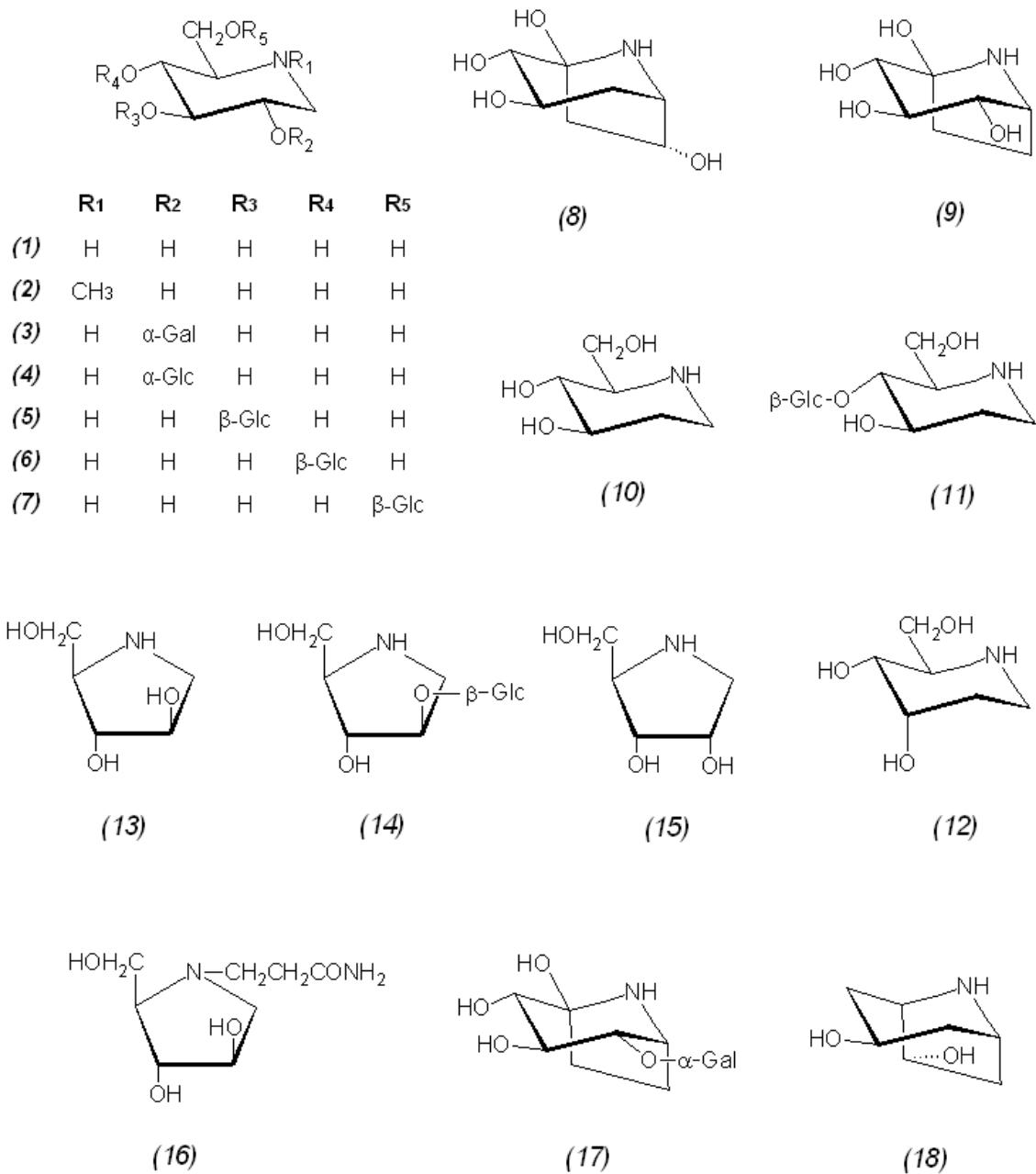
Cuadro 1.17 Estructura de la 1-deoxinojirimicina (DNJ)



Fuente: Adaptado de Asano *et al.*, 2001

En vista de que el gusano de seda (*Bombix mori*) se alimenta principalmente de las hojas de morera, se realizaron estudios sobre los alcaloides presentes en este insecto (Cuadro 1.18). El gusano de seda acumula 2.7 veces más DNJ que la morera (Asano *et al.*, 2001).

Cuadro 1.18 Estructura de los alcaloides aislados de materiales relacionados con la sericultura



Fuente: Tomado de Asano *et al.*, 2001

El efecto hipoglicemiante del gusano de seda como tratamiento oral, se debe a la 1-deoxinojirimicina (DNJ), alcaloide polihidroxiado que actúa como un inhibidor de la α -glucosidasa. El gusano de seda, procesado y pulverizado, puede ser utilizado en el control de la diabetes mellitus tipo 2, como alternativa ante productos sintéticos, por su efectividad comprobada (Ryu *et al.*, 2002).

Se ha determinado que el mayor efecto hipoglucemiante en pacientes humanos con diabetes mellitus de tipo 2, se obtiene con un tratamiento de pulverizado de larvas de gusano de seda del tercer día del quinto instar obtenido por secado en frío (Ryu *et al.*, 2002). El uso de suplementos dietéticos con altas concentraciones de 1-deoxinojirimicina y otros inhibidores de la α -glucosidasa son de gran interés, ante la posibilidad de prevenir la obesidad y la diabetes (Asano *et al.*, 2001).

A finales de los años 80, el mercado de la seda en Corea se vio amenazado por la producción regional de materiales sintéticos. Por este motivo, desde 1994, el investigador Kang Sun Ryu, en conjunto con su grupo de investigadores coreanos del Instituto Nacional de Sericultura y Entomología y de la Facultad de Farmacología de la Universidad de Kyung Hee, buscaron una alternativa para el aprovechamiento de los cultivos de gusano de seda con el propósito de salvar esta industria de la desaparición (Kim, 2002).

Desde entonces, el mercado de pulverizado de gusano de seda como agente hipoglucemiante se ha vuelto muy popular en los países asiáticos y cada vez existe mayor interés en los países occidentales.

En la actualidad, el Centro de Desarrollo Tecnológico de Sericultura de Colombia (CDTS) ha incursionado en la investigación de este recurso y comercializa un producto natural, nutritivo y terapéutico, para el control de la diabetes mellitus tipo 2, que se promociona con la marca "Nutriseda" (Cifuentes, 2005).

Otras aplicaciones potenciales de interés de la DNJ y sus derivados son los efectos antivirales *in vitro* sobre el VIH (Fischer *et al.*, 1996), y enfermedades como la hepatitis B (Fischer *et al.*, 1995) y la hepatitis C (Chapel *et al.*, 2006). Así mismo, se ha demostrado efectos anticancerígenos e inmunomodulatorios (Jacob, 1995).

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODO

2.1 Participantes

La presente investigación fue financiada por la Direzione Generale per la Cooperazione allo Sviluppo del Ministero degli Affari Esteri de Italia bajo el proyecto del Instituto Italo Latinoamericano (IILA) en convenio con la Escuela Superior Politécnica del Ejército (ESPE) y el Instituto Agropecuario Superior Andino de Santo Domingo de los Colorados (IASA II). La Red Andina de la Seda en Ecuador colaboró en el cultivo y la recolección de los gusanos de seda utilizados en este estudio. La fase experimental se desarrolló en los laboratorios de Biotecnología del Departamento de Ciencias de la Vida, Carrera de Ingeniería en Biotecnología, ESPE.

2.2 Zona de estudio

Lugar: Laboratorios de Biotecnología, Escuela Politécnica del Ejército, Campus Sangolquí, Ecuador.

Ciudad: Quito

Cantón: Rumiñahui

Provincia: Pichincha

2.3 Período de tiempo de investigación

Fecha de inicio: septiembre de 2006.

Fecha de terminación: julio de 2007.

2.4 Diseño

Para el estudio de la actividad inhibidora del extracto de larvas de gusano de seda sobre la enzima α -glucosidasa se escogió un diseño cuasiexperimental. Para el estudio del efecto del extracto sobre la glucosa sanguínea en ratones se usó un diseño experimental completamente al azar.

2.5 Procedimientos

2.5.1 Preparación del extracto de gusano de seda

2.5.1.1 Obtención y selección de larvas de gusano de seda

Las larvas de gusano de seda se obtuvieron de las instalaciones del Instituto Agropecuario Superior Andino de Santo Domingo de los Colorados (IASA II, Escuela Politécnica del Ejército). En condiciones de asepsia, se seleccionaron y pesaron 6 kilogramos de larvas de gusano de seda, correspondientes al período larvario del tercer día del quinto instar. Inmediatamente fueron congeladas y almacenadas a una temperatura de -20°C hasta su utilización. Las características físicas de las larvas se pueden apreciar en la Figura 2.1.

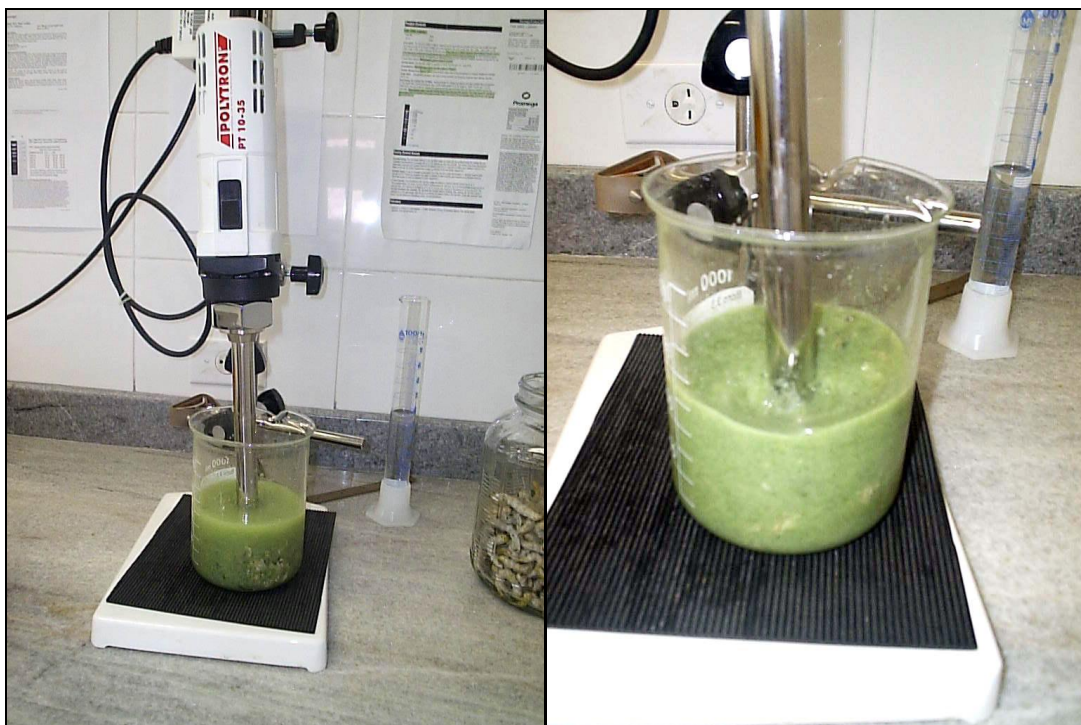
Figura 2.1 Larvas de gusano de seda en el tercer día del quinto instar del período larvario



2.5.1.2 Homogenización

Se lavaron 1700 gramos de larvas de gusano de seda con agua destilada a 4° C y se molieron en un mortero. El homogenizado se preparó a partir de las larvas de gusano de seda trituradas con agua destilada a 4° C, mediante un homogenizador Polytron, Kinematica Inc., modelo PT 10-35. El proceso de homogenización se muestra en la Figura 2.2.

Figura 2.2 Homogenización de las larvas de gusano de seda en agua



2.5.1.3 Extracción etanólica

Para la extracción de los alcaloides polihidroxilados se siguió el procedimiento de Naoki Asano (2001). El homogenizado en suspensión acuosa se mezcló con etanol anhidro hasta alcanzar una concentración 50% de etanol y 50% de agua, de manera que la mezcla final se constituyó de 100 gramos de peso seco de larvas de gusano de seda por cada litro de solución etanólica al 50%. Para completar la extracción de alcaloides, se dejó la mezcla en proceso de maceración por 72 horas, como lo muestra la Figura 2.3.

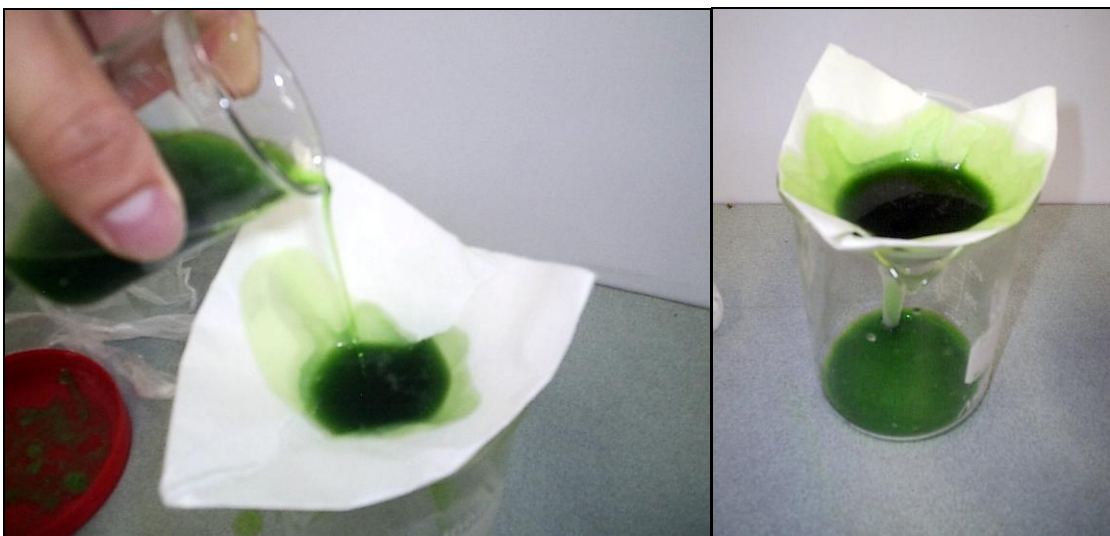
Figura 2.3 Extracción etanólica del homogenizado de larvas de gusano de seda



2.5.1.4 Filtrado y centrifugado

El extracto resultante se filtró con papel filtro de 70 gramos y se centrifugó con una fuerza G de 2000 g, durante 10 minutos en una centrífuga Hettich, modelo Universal 32 R. El sobrenadante se recogió en un balón de vidrio. El filtrado se muestra en la Figura 2.4.

Figura 2.4 Filtrado del extracto



2.5.1.5 Concentración

El extracto recogido se concentró con un rotavapor Heidolph Laborota 4001, a una temperatura de 50° C y una fuerza G de 4 g, hasta que el extracto adoptó una apariencia jabonosa, al reducir su volumen aproximadamente 50%. La Figura 2.5 muestra el extracto en proceso de concentración.

Figura 2.5 Concentración del extracto en un rotavapor



2.5.1.6 Liofilización

El concentrado se pre congeló a -20° C en ángulo inclinado en recipientes de vidrio de 50 ml como muestra la Figura 2.6.

Figura 2.6 Precongelado del extracto en ángulo inclinado



El extracto congelado se secó en frío, en un liofilizador Freeze Zone 4.5 litros, modelo 77510, Labconco Corporation, a -46°C y $145 \times 10^{-3}\text{ mbar}$, durante 48 horas. El proceso se ilustra en la Figura 2.7.

Figura 2.7 Liofilización de concentrado de larvas de gusano de seda



Los cristales formados se trituraron con una pinza dentro del mismo contenedor de vidrio y se mantuvieron dos horas adicionales en el equipo liofilizador.

2.5.1.7 Cálculo del porcentaje de humedad

Se pesaron 100 g de larvas de gusano de seda. Las larvas se secaron

en un crisol de porcelana a 50° C, por cinco días y se determinó el porcentaje de humedad de acuerdo al peso seco medido.

2.5.1.8 Rendimiento en la preparación del extracto

El rendimiento se calculó a partir del peso seco del extracto liofilizado con relación al peso húmedo de las larvas de gusano de seda. De igual manera, se calculó el rendimiento a partir del peso seco del extracto liofilizado con relación al volumen del extracto líquido concentrado. El porcentaje de DNJ en el pulverizado de gusano de seda se calculó con base en el equivalente de DNJ por peso seco de gusano de seda (1.88 g DNJ/ kg gusano de seda pulverizado) reportado por Asano *et al.* (2001).

2.5.2 Ensayo enzimático

2.5.2.1 Reactivos y soluciones

Enzima: α -glucosidasa de levadura (5.7 U/mg sólido, 10 U/mg proteína) (*Sigma*). Se preparó una solución (1.5 mg proteína/ml) la cual se dividió en alícuotas y se almacenó a -20° C.

Sustrato: Maltosa (Monohidrato) (*Himedia*). Se preparó una solución madre de maltosa (833.33 mM) con 0.1% de ácido benzoico.

Solución tampón: (Tampón fosfato + EDTA) (pH 7.20). Se mezclaron 17.42 g de K_2HPO_4 , 13.61 g de KH_2PO_4 y 0.1 g de EDTA en 80 ml de H_2O . Se ajustó el pH a 7.2 con NaOH y se aforó a 100 ml.

Inhibidor: Extracto de larvas de gusano de seda (ELGS). Se prepararon varias diluciones de acuerdo con las necesidades del ensayo enzimático.

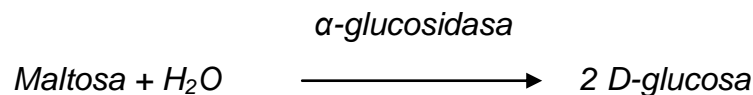
Kit para cuantificación de glucosa: Glucose (HK) Assay Kit, GAHK-20 (*Sigma*). Método enzimático de la hexoquinasa.

2.5.2.2 Descripción de los blancos

Para detectar una posible hidrólisis espontánea y la presencia de impurezas en la maltosa utilizada (glucosa \approx 1.5%), se cuantificó y se restó el valor detectado en un blanco de cada ensayo enzimático. Tanto los ensayos enzimáticos como sus blancos se sometieron a las mismas condiciones y tratamientos. Previo al experimento, la enzima de los blancos fue inactivada en un baño de agua hirviendo a 90° C por cinco minutos, dado que la mayoría de enzimas se inactivan a temperaturas comprendidas entre 55 y 60° C (Lehninger, 1981).

2.5.2.3 Descripción del ensayo enzimático

En la reacción:



se analizó el efecto del ELGS sobre la actividad de la enzima. Para esto, se prepararon soluciones madre de los reactantes y demás compuestos necesarios, de tal manera que al mezclar diferentes volúmenes de las soluciones en un volumen final, la concentración de cada compuesto resulte adecuada para el ensayo enzimático.

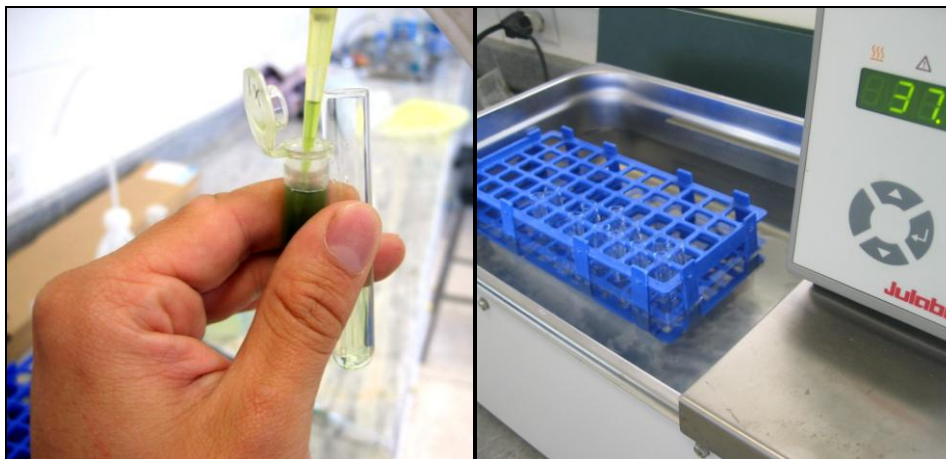
La reacción enzimática se llevó a cabo en un tubo de ensayo de vidrio, donde se mezclaron los siguientes componentes:

- 1.0 ml de solución tampón
- 1.8 ml de solución de maltosa (41.7, 47.5, 83.3, 166.7 ó 833.3 mM)
- 0.1 ml de agua ó 0.1 ml de solución de ELGS (0.6, 1.2, 3, 6, 12, 24, 60 ó 412.8 mg/ml)

La mezcla se incubó por cinco minutos, a 37° C en un baño maría. Se añadieron 0.1 ml de solución de enzima ó 0.1 ml de solución de enzima

inactivada para los blancos y se incubó a 37° C, por un período de tiempo determinado, como ilustra la Figura 2.8.

Figura 2.8 Mezcla e incubación de los componentes del ensayo enzimático a 37° C



Se controló estrictamente el tiempo de reacción con un cronómetro digital. La reacción enzimática se detuvo en un baño de agua a 90° C en el cual se sumergen los tubos de ensayo por cinco minutos como muestra la Figura 2.9.

Figura 2.9 Baño de agua a 90° C



Para la cuantificación de glucosa de los ensayos enzimáticos y los blancos se utilizó el kit Glucose (HK) Assay Kit, GAHK-20 (Sigma), basado en

el método de la hexoquinasa, el cual no presenta interferencias con la maltosa (Peterson, 1967) a diferencia del método de la glucosa-oxidasa (Janssen *et al.*, 1998). La absorbancia de las muestras se midió en cubetas de vidrio con ayuda de un espectrofotómetro Spectro Dual Split Beam UVS-2800, Labomed Inc. Para determinar la cantidad de glucosa producida se calculó la diferencia entre los valores de glucosa de cada ensayo enzimático y su blanco respectivo.

Las concentraciones finales de la mezcla de estos ensayos enzimáticos se muestran en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1 Concentraciones finales en los ensayos enzimáticos

Experimento	EDTA (mmol/l)	Tampón fosfato (mmol/l)	α -glucosidasa (mg/ml)	Maltosa (mmol/l)	ELGS (mg/ml)
Progreso de la reacción	1,00	66,67	0,05	25,00	0,00
				500,00	0,20
Porcentaje de inhibición	1,00	66,67	0,05	50,00	0,00
					0,02
					0,04
					0,10
					0,20
					0,40
					0,80
					2,00
Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de reacción	1,00	66,67	0,05	25,00	0,00
				28,50	0,10
				50,00	
				100,00	0,20
				500,00	

2.5.2.3.1 Transcurso de la reacción enzimática

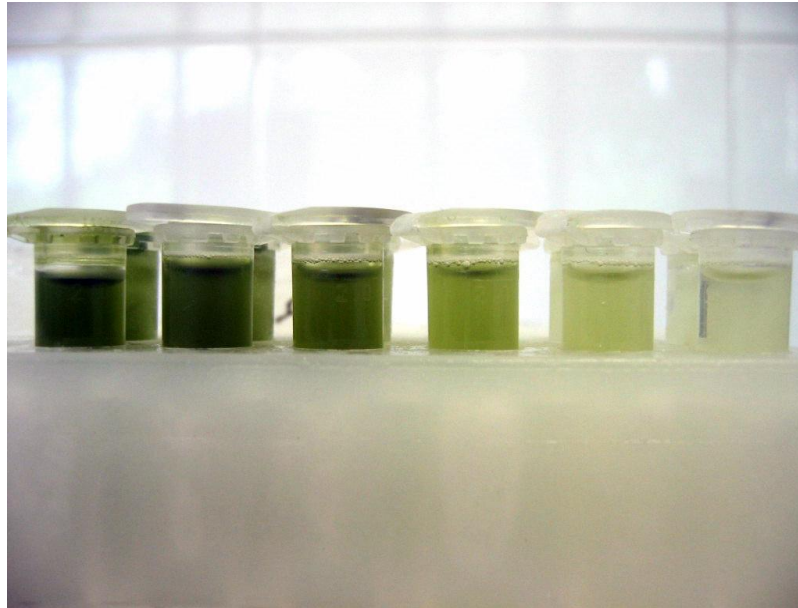
Se midió la glucosa producida por la enzima α -glucosidasa en 10, 20 y 30 minutos. Se experimentó con dos concentraciones de maltosa (25 mM y 500 mM) sin ELGS y luego con las mismas concentraciones de maltosa y 0.2 mg/ml de solución de ELGS.

2.5.2.3.2 Determinación del porcentaje de inhibición

Se midió la glucosa producida por la enzima α -glucosidasa en 20

minutos de incubación. La concentración de maltosa se mantuvo en 50 mM y se experimentó con varias concentraciones de ELGS en un rango de 0.02 a 14 mg/ml. Como se puede ver en la Figura 2.10, las diluciones de ELGS pertenecen a un amplio rango de valores de concentración.

Figura 2.10 Diluciones de ELGS



Para el cálculo del porcentaje de inhibición se utilizó la siguiente ecuación:

$$\%I = \frac{GF - GFE}{GF} \times 100$$

en donde:

GF: Glucosa formada en un ensayo enzimático sin ELGS

GFE: Glucosa formada en un ensayo enzimático con ELGS

2.5.2.3.3 Determinación de parámetros cinéticos

Este experimento se diseñó con base en la investigación de Murphy *et al.* (2003). Se midió el efecto de la concentración de maltosa sobre la actividad de la α -glucosidasa. Para esto se determinó la cantidad de glucosa producida

entre 10 y 20 minutos de reacción, para cinco concentraciones diferentes de maltosa en el rango de 0.5 Km y 10 Km, con una concentración de enzima constante. El valor preliminar de Km se calculó a partir de los resultados de la curva del transcurso de la reacción. Cada ensayo enzimático se hizo por duplicado.

Para la determinación de la constante de Michaelis y Menten (Km) y la velocidad máxima de reacción (V_{max}) se utilizó el método propuesto por Hans Lineweaver y Dean Burk (Lineweaver *et al.*, 1934).

Las unidades de Ki (mg/ml) se transformaron a mM de acuerdo con el equivalente de DNJ por peso seco de gusano de seda (1.88 g DNJ/ kg gusano de seda pulverizado) reportado por Asano *et al.* (2001).

La constante catalítica k_{cat} se calculó mediante la ecuación:

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{[E_T]}$$

2.5.2.3.4 Mecanismo de Inhibición

Se midió el efecto de 0.1 mg ELGS/ml y 0.2 mg ELGS/ml sobre la actividad de la α -glucosidasa, con varias concentraciones de maltosa. El mecanismo de inhibición se determinó mediante el análisis de los efectos del ELGS sobre la cinética enzimática.

2.5.3 Ensayo en ratones de laboratorio

2.5.3.1 Mantenimiento y aclimatación

Para este experimento se utilizaron 25 ratones BALB/c machos procedentes del bioterio de la Universidad Central del Ecuador, de dos meses de edad y 30 g de peso promedio. Los ratones se mantuvieron por dos semanas en jaulas especiales de plástico con techo de rejilla metálica, bajo un

régimen alimenticio balanceado y agua *ad libitum* a una temperatura de 20° C y períodos de luz y oscuridad de 12 horas. En la Figura 2.11 se aprecian los componentes de las jaulas y la disposición de los bebederos.

Figura 2.11 Jaulas para el mantenimiento y aclimatación de ratones BALB/c

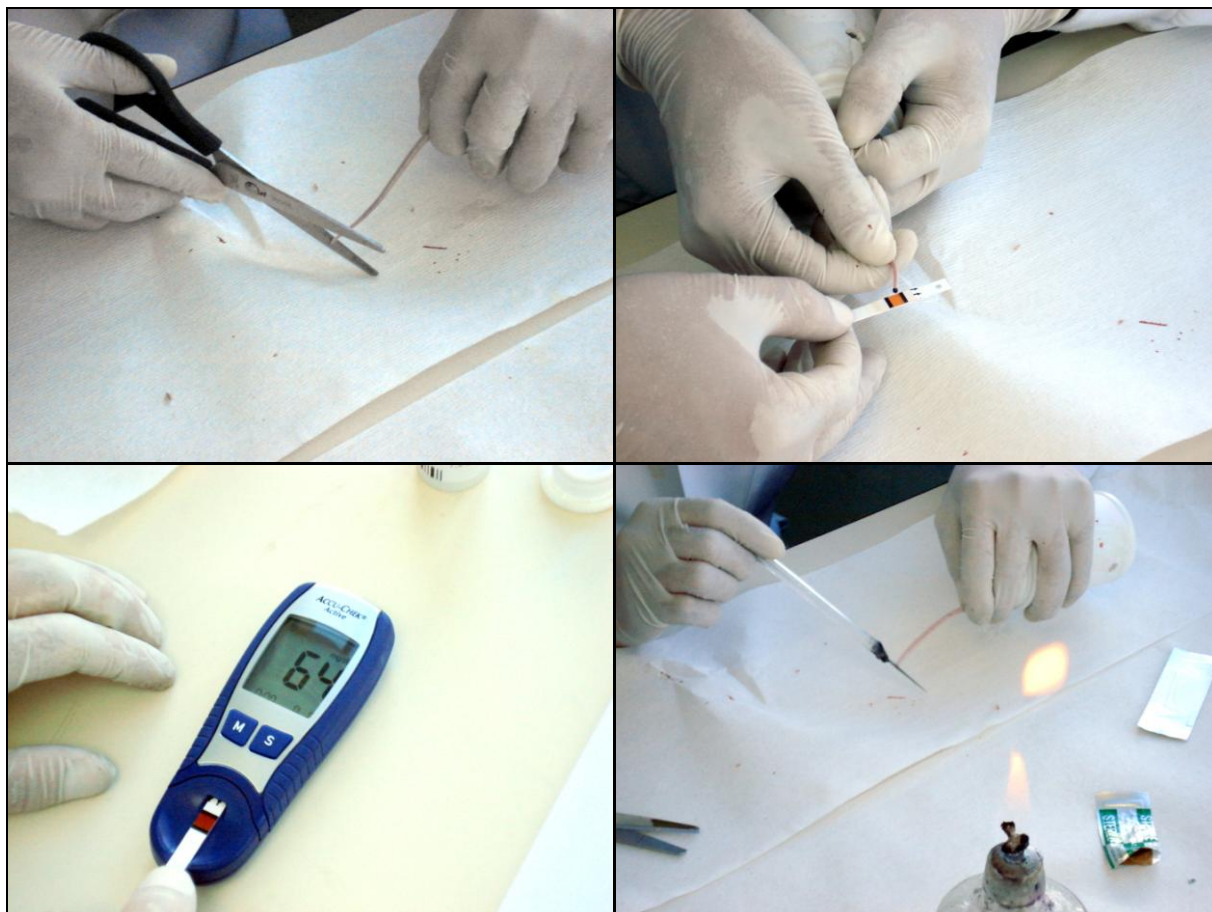


2.5.3.2 Medición de la glucosa sanguínea en ayunas

Se privó de alimento a los ratones 12 horas antes del experimento. Se tomó una muestra de sangre venosa de la cola de cada ratón según el procedimiento de Janet Hoff (2000). Para este fin, se adaptó un frasco plástico como dispositivo de alojamiento. Una vez inmovilizado el animal, se cortó una pequeña porción de la punta de la cola y se canalizó una gota de sangre sobre

una tirilla reactiva. La concentración de glucosa sanguínea en ayunas se midió con un glucómetro Accu-Check Active, Roche® Diagnostics. Finalmente, se cauterizó cuidadosamente la herida con una hoja de bisturí caliente. La Figura 2.12 ilustra el proceso para la toma de sangre venosa.

Figura 2.12 Toma de sangre venosa de la cola de un ratón



2.5.3.3 Aplicación de los tratamientos

Se dividieron los ratones en 5 grupos de 5 unidades experimentales cada uno y se marcaron diferencialmente con ácido pícrico como se muestra en la Figura 2.13.

Figura 2.13 Marcas diferenciales en cabeza, lomo y cola para dentro de cada grupo de ratones



Con una micropipeta, a cada grupo se le administró por vía oral 0.2 ml de uno de los siguientes tratamientos:

- Tratamiento 1: Agua
- Tratamiento 2: Solución maltosa (2 g maltosa/kg ratón)
- Tratamiento 3: Solución maltosa + Acarbosa (7.5 mg/ml)
- Tratamiento 4: Solución maltosa + ELGS (12 mg/ml)
- Tratamiento 5: Solución maltosa + ELGS (60 mg/ml)

La Figura 2.14 muestra la manipulación y la posición del ratón para la administración oral de los tratamientos.

Figura 2.14 Aplicación de los tratamientos en ratones por vía oral



2.5.3.4 Medición de la glucosa sanguínea postprandial

Se midió la concentración de glucosa sanguínea postprandial a los 30, 60, 90 y 150 minutos, después de la aplicación de los tratamientos, con el mismo procedimiento utilizado en la medición de glucosa sanguínea en ayunas. El porcentaje de reducción de la glucosa sanguínea se calculó con base en la relación entre el valor del incremento de glucosa postprandial con inhibición y el valor control del incremento de glucosa postprandial sin inhibición.

2.6 Análisis de datos

Los datos del ensayo enzimático y las curvas del transcurso de la reacción se ordenaron y representaron en la hoja electrónica de Microsoft® Office XP: Microsoft® Excel 2002 (Microsoft Corporation). Los ensayos enzimáticos, los parámetros cinéticos y las curvas se calcularon y representaron con el software Enzyme Kinetics Module® v1.3 de Sigmaplot® v10.0 (SYSTAT Software Inc.). La gráfica correspondiente al ensayo *in vivo* se representó con el software Sigmaplot® v10.0 (SYSTAT Software Inc.). Tanto el análisis de varianza como las pruebas de rango múltiple de Tukey se calcularon mediante el software SPSS® para Windows v14.0 (SPSS Inc.). Este último fue escogido por su superioridad frente a otros software disponibles con respecto al análisis de varianza (Mitchell, 2005).

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3.1 Características del extracto de larvas de gusano de seda

Terminado el proceso de liofilización del ELGS, se observó la formación de cristales de color verde oscuro que se trituraron con una pinza, hasta obtener un pulverizado como se presenta en la Figura 3.1.

Figura 3.1 Extracto de larvas de gusano de seda procesado



El extracto seco posee características higroscópicas y se disuelve fácilmente en agua.

3.2 Porcentaje de humedad de las larvas de gusano de seda

En 100 g de larvas de gusano de seda se determinó:

- Peso seco: 18.47 g
- Peso húmedo: 81.53 g
- Porcentaje de humedad: 81.53%

3.3 Rendimientos

- De 1 kg de peso húmedo de larvas de gusano de seda se obtienen 185 g de peso seco de larvas de gusano de seda.
- De 1 kg de peso húmedo de larvas de gusano de seda se obtienen 345.59 ml de extracto líquido concentrado.
- De 1 ml de extracto líquido concentrado se obtienen 30.64 mg de ELGS.
- De 1 kg de peso húmedo de larvas de gusano de seda se obtienen 10.6 g de ELGS. Rendimiento = 1.06%
- De 1 kg de peso seco de larvas de gusano de seda se obtienen 57.3 g de ELGS. Rendimiento = 5.73%

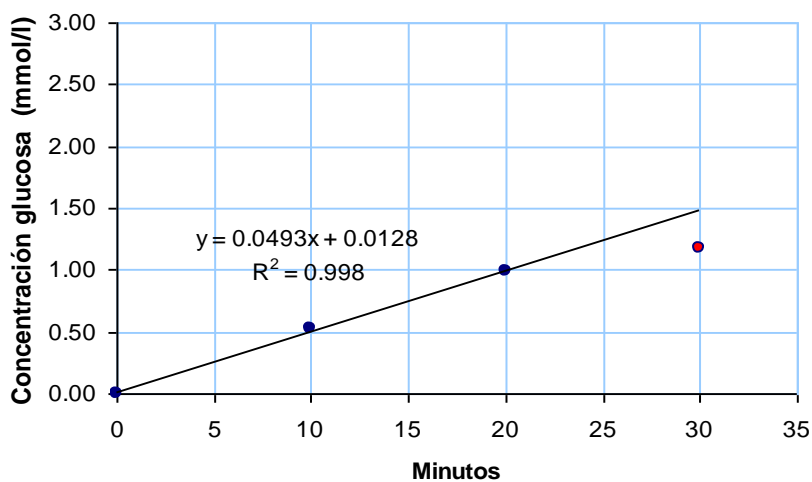
3.4 Curvas del transcurso de la reacción enzimática

En este experimento se investigaron los cambios en la velocidad de reacción a través del tiempo. Los resultados fueron de gran importancia ya que se hicieron varias consideraciones para los experimentos subsiguientes.

Antes de estudiar el efecto del ELGS sobre la actividad de la α -glucosidasa fue necesario ensayar primero con la enzima y el sustrato para determinar un período de tiempo en el cual la velocidad de reacción se mantuviera constante. Factores responsables del cambio de velocidad como el agotamiento de sustrato y una posible histéresis enzimática fueron detectados. En la Figura 3.2 se puede apreciar el efecto de una concentración baja de sustrato en el transcurso de la reacción.

Figura 3.2 Transcurso de la reacción enzimática con una concentración de maltosa de 25 mM, sin ELGS.

Tiempo (min)	Glucosa formada (mmol/l)
0	0.000
10	0.531
20	0.985
30	1.182



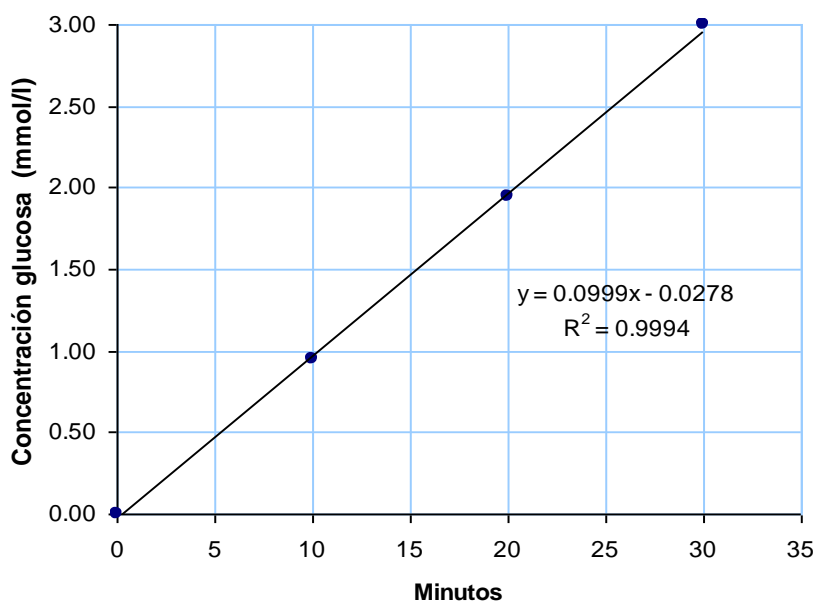
- Se ajusta a la línea de tendencia con $R^2 = 0.998$
- No se ajusta a la línea de tendencia

La velocidad de reacción se refleja en la pendiente de la curva. En el período entre 20 y 30 minutos, la velocidad decrece considerablemente por lo que un punto queda fuera del ajuste lineal. Todos los datos obtenidos a partir de la glucosa formada en 0, 10 y 20 minutos, se ajustan a la línea de tendencia con un R^2 de 0.998, lo que significa que la velocidad se mantiene constante en este período.

Cuando se aumentó la concentración de maltosa a 500 mM, no se evidenciaron cambios en la velocidad de reacción por agotamiento del sustrato. La Figura 3.3 presenta la curva del transcurso de la reacción con 500 mM de maltosa sin ELGS.

Figura 3.3 Transcurso de la reacción enzimática con una concentración de maltosa de 500 mM, sin ELGS.

Tiempo (min)	Glucosa formada (mmol/l)
0	0.000
10	0.944
20	1.943
30	2.997



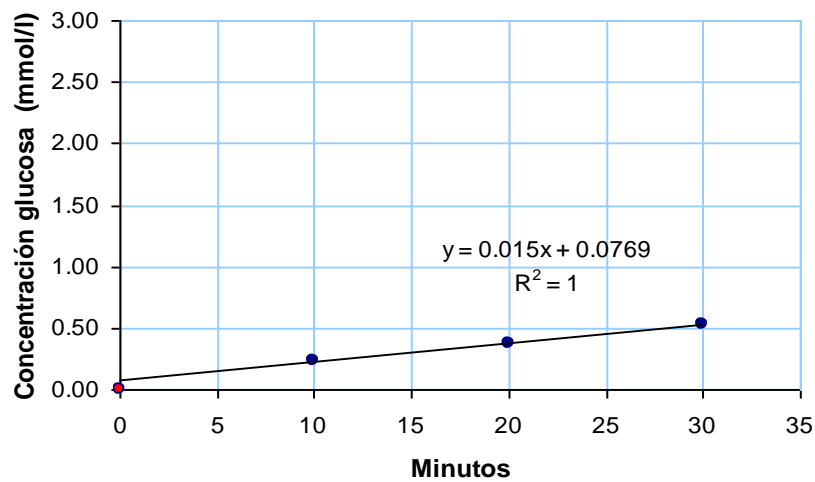
● Se ajusta a la línea de tendencia con $R^2 = 0.9994$

Los ensayos enzimáticos con concentraciones de maltosa de 25 mM y 500 mM en presencia de 0.2 mg ELGS/ml revelaron una fase de retraso inicial antes de observar una velocidad de reacción constante. La Figura 3.4 presenta

los resultados obtenidos con una concentración de maltosa de 25 mM y 0.2 mg ELGS/ml.

Figura 3.4 Transcurso de la reacción enzimática con una concentración de maltosa de 25 mM y 0.2 mg ELGS/ml

Tiempo (min)	Glucosa formada (mmol/l)
0	0.000
10	0.226
20	0.377
30	0.525

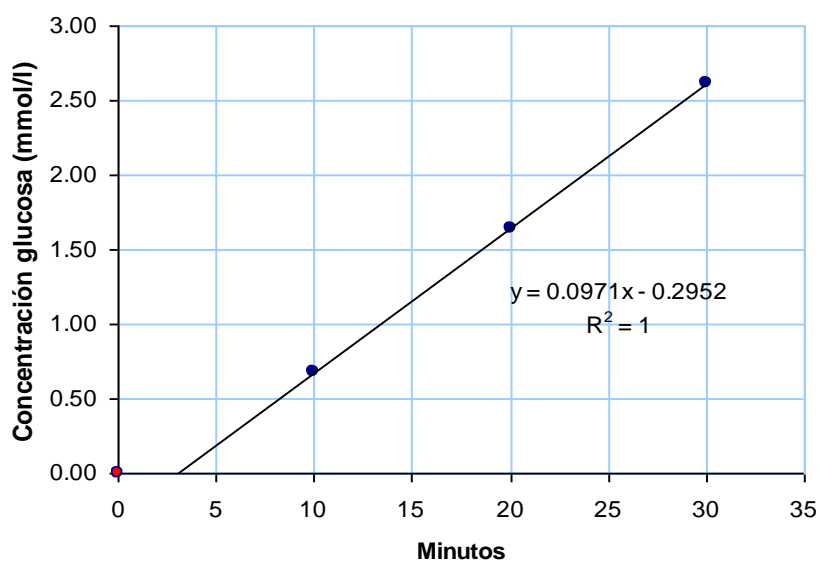


- Se ajusta a la línea de tendencia con $R^2 = 1$
- No se ajusta a la línea de tendencia

En un ensayo enzimático con mayor concentración de maltosa (500 mM) y la misma cantidad de ELGS (0.2 mg ELGS/ml) se observó un efecto similar al inicio de la reacción como se muestra en la Figura 3.5.

Figura 3.5 Transcurso de la reacción enzimática con una concentración de maltosa de 500 mM y 0.2 mg ELGS/ml

Tiempo (min)	Glucosa formada (mmol/l)
0	0.000
10	0.677
20	1.643
30	2.618



- Se ajusta a la línea de tendencia con $R^2 = 1$
- No se ajusta a la línea de tendencia

3.5 Porcentaje de inhibición

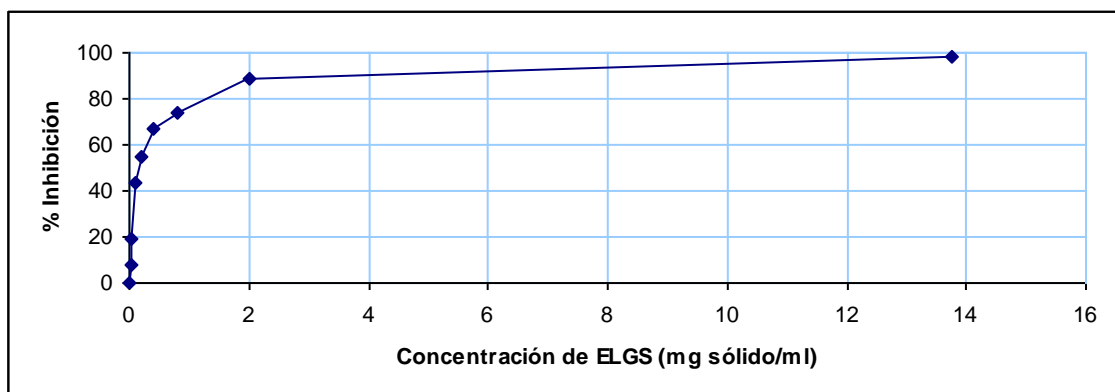
La actividad de la α -glucosidasa disminuyó conforme se aumentó la concentración de ELGS. La Tabla 3.1 muestra los porcentajes obtenidos.

Tabla 3.1 Porcentaje de inhibición y porcentaje de actividad en función de la concentración de ELGS.

mg ELGS/ml	% Inhibición	% Actividad
0.00	0.00	100.00
0.02	8.03	91.97
0.04	18.87	81.13
0.10	43.36	56.64
0.20	54.39	45.61
0.40	66.75	33.25
0.80	74.21	25.79
2.00	88.89	11.11
13.76	98.15	1.85

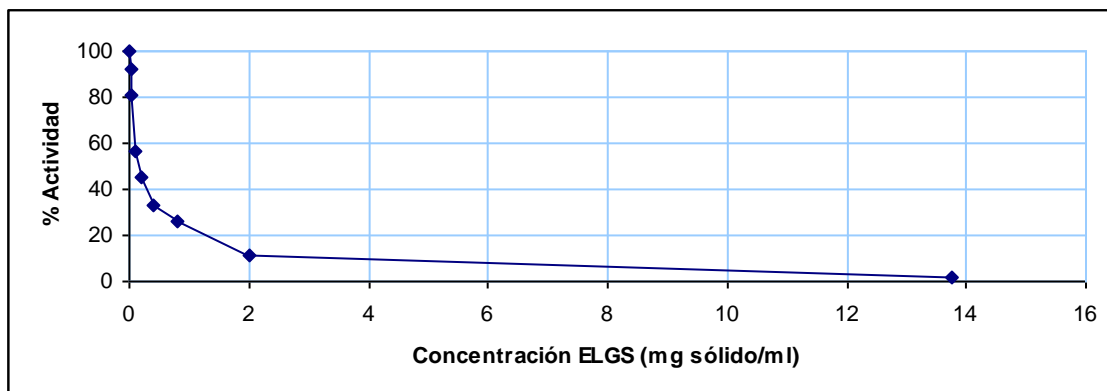
La curva que se genera a partir de los datos observados tiende a ser una hipérbola rectangular. Con altas concentraciones de ELGS se alcanza una inhibición aproximada del 100%, como muestra la figura Figura 3.6.

Figura 3.6 Hipérbola rectangular que se forma a partir del porcentaje de inhibición en función de la concentración de ELGS



La Figura 3.7 presenta la disminución del porcentaje de actividad de la α -glucosidasa la cual depende de la concentración de ELGS.

Figura 3.7 Porcentaje de actividad de la α -glucosidasa en función de la concentración de ELGS



3.6 Efecto de la concentración de maltosa y ELGS sobre la velocidad de reacción enzimática

Las absorbancias y concentraciones de glucosa formada entre 10 y 20 minutos de reacción enzimática se muestran en el Anexo A. La Tabla 3.2 resume los valores de velocidad obtenidos en el experimento.

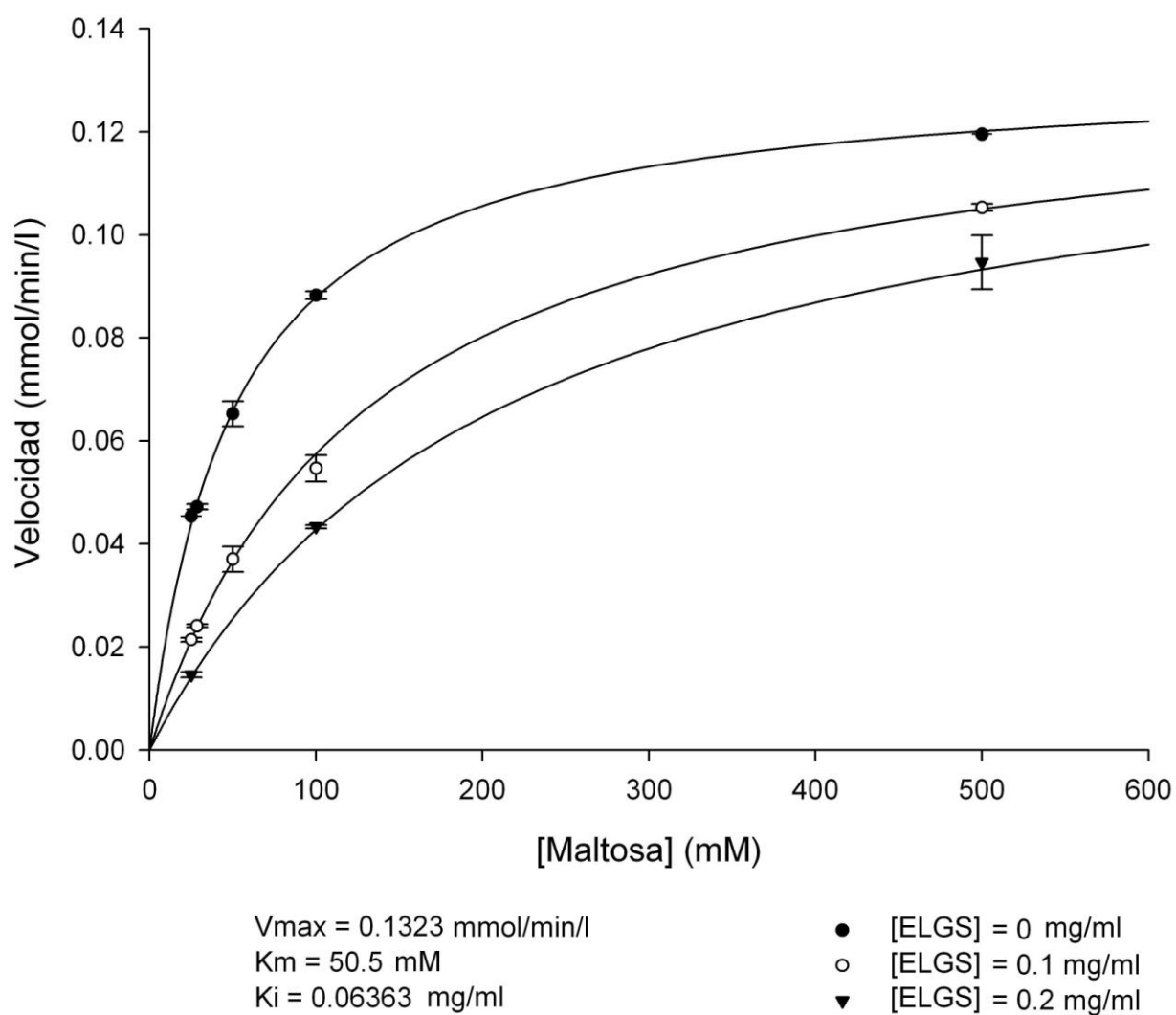
Tabla 3.2 Efecto de la concentración de maltosa y ELGS en la velocidad de reacción. Los valores de velocidad (mmol glucosa formada/min/l) se midieron por duplicado.

Sustrato mM	ELGS = 0 mg/ml		ELGS = 0.1 mg/ml		ELGS = 0.2 mg/ml	
	V ₁	V ₂	V ₁	V ₂	V ₁	V ₂
25.0	0.0454	0.0454	0.0218	0.0210	0.0151	0.0141
28.5	0.0477	0.0467	0.0244	0.0238	d.n.m.	d.n.m.
50.0	0.0628	0.0677	0.0395	0.0346	d.n.m.	d.n.m.
100.0	0.0875	0.0890	0.0521	0.0572	0.0437	0.0430
500.0	0.1195	0.1195	0.1060	0.1046	0.0999	0.0894

d.n.m. = Dato no medido

La representación de Michaelis-Menten y los parámetros cinéticos calculados con Enzyme Kinetics v1.3 de Sigmaplot (SYSTAT Inc.) se muestran en la Figura 3.8.

Figura 3.8 Representación de Michaelis-Menten con varias concentraciones de ELGS.



Ajuste de las curvas: $R^2 = 0.995$

Las velocidades promedio se presentan en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3 Velocidades promedio y error estándar

[Maltosa] (mM)	[ELGS] (mg/ml)	Velocidad promedio (mmol/min/l)	±Std.Err
25.00	0.00	0.0454	0.00
28.50	0.00	0.0472	5.00×10^{-4}
50.00	0.00	0.0653	2.45×10^{-3}
100.00	0.00	0.0883	7.50×10^{-4}
500.00	0.00	0.1195	0.00
25.00	0.10	0.0214	4.00×10^{-4}
28.50	0.10	0.0241	3.00×10^{-4}
50.00	0.10	0.0371	2.45×10^{-3}
100.00	0.10	0.0547	2.55×10^{-3}
500.00	0.10	0.1053	7.00×10^{-4}
25.00	0.20	0.0146	5.00×10^{-4}
100.00	0.20	0.0434	3.50×10^{-4}
500.00	0.20	0.0947	5.25×10^{-3}

La Tabla 3.4 muestra el intervalo de confianza que corresponde a los valores de los parámetros cinéticos calculados.

Tabla 3.4 Intervalo de confianza de los parámetros cinéticos.

Parámetro	Valor	±Error Estd.	95% Intervalo Confianza
V_{max}	0.1323	1.682×10^{-3}	a 0.1358
Km	50.4794	1.9709	a 54.5565
Ki	6.363×10^{-2}	3.388×10^{-3}	a 7.064×10^{-2}

El valor de Ki transformado de acuerdo con el equivalente teórico de DNJ por peso seco de gusano de seda es 2.2×10^{-2} mM.

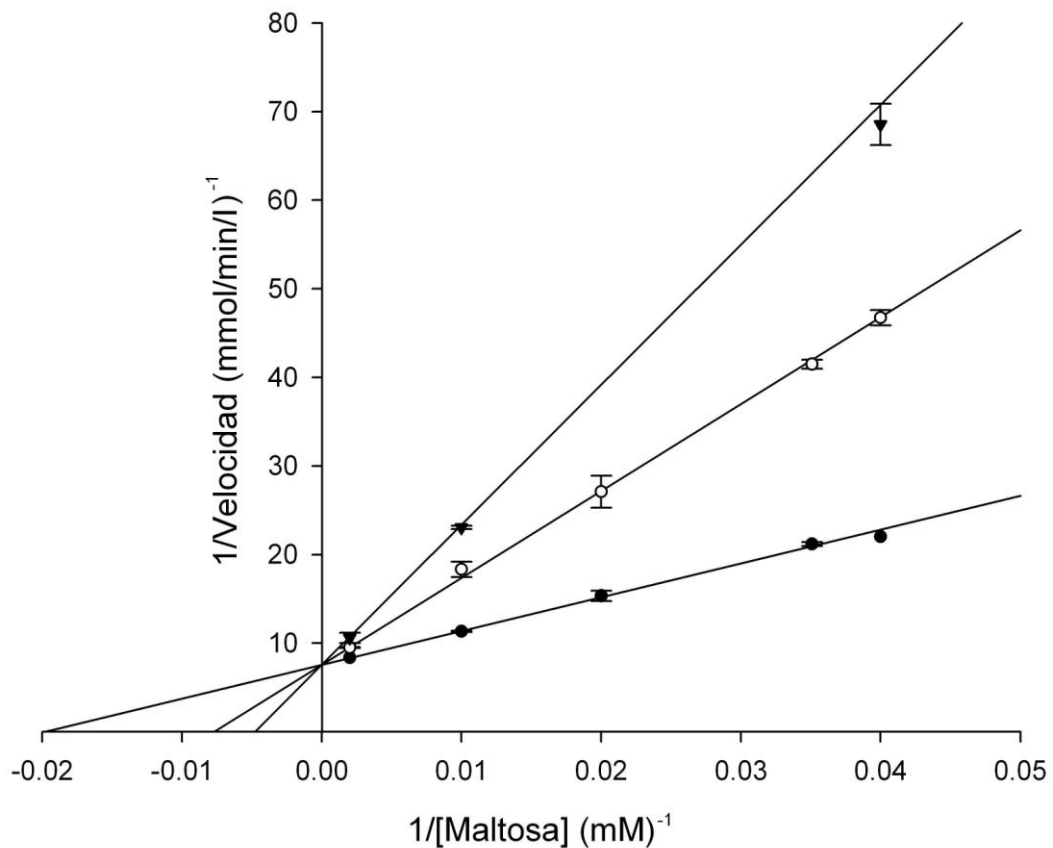
Los valores para el número de recambio k_{cat} y la constante de eficiencia catalítica k_{cat}/K_m son:

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{[E_0]} = \frac{0.1323 \text{ mM/min}}{0.0007299 \text{ mM}} = 3.025 \text{ s}^{-1}$$

$$\frac{k_{cat}}{K_m} = \frac{3.025 \text{ s}^{-1}}{50.5 \text{ mM}} = 59.9 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$$

La representación de Lineweaver-Burk de la velocidad de reacción en función de la concentración de sustrato y ELGS se representa en la Figura 3.9.

Figura 3.9 Representación de Lineweaver-Burk



$V_{max} = 0.1323 \text{ mmol/min/l}$

$K_m = 50.5 \text{ mM}$

$K_i = 0.06363 \text{ mg/ml}$

● [ELGS] = 0 mg/ml

○ [ELGS] = 0.1 mg/ml

▼ [ELGS] = 0.2 mg/ml

Ajuste de las curvas: $R^2 = 0.995$

3.7 Efecto del extracto de larvas de gusano de seda sobre la concentración de glucosa sanguínea en ratones

Los valores de concentración de glucosa sanguínea en ratones en función de la administración de los tratamientos orales se muestran en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5 Valores de glucosa sanguínea en ayunas y glucosa sanguínea postprandial en función de varios tratamientos orales

Tratamiento	#	TIEMPO (minutos)				
		0	30	60	90	150
Agua	1	61	75	67	70	63
	2	80	78	80	84	78
	3	61	74	67	73	60
	4	86	89	85	87	78
	5	66	88	80	80	78
Maltosa (2g/kg)	1	69	184	150	138	85
	2	74	171	158	137	104
	3	56	197	163	129	92
	4	65	185	143	132	100
	5	54	178	149	133	88
Maltosa + Acarbosa (0.05 g/kg)	1	58	96	110	111	95
	2	64	105	119	114	95
	3	66	86	101	101	80
	4	69	97	107	100	106
	5	55	72	106	120	92
Maltosa + ELGS (0.08 g/kg)	1	51	112	123	117	84
	2	60	d.n.m.	d.n.m.	d.n.m.	d.n.m.
	3	63	114	130	126	77
	4	63	129	162	138	96
	5	53	92	129	130	105
Maltosa + ELGS (0.4 g/kg)	1	56	72	123	136	89
	2	55	85	d.n.m.	d.n.m.	107
	3	63	82	134	137	106
	4	50	65	111	135	87
	5	56	65	147	130	85

d.n.m. = Dato no medido

La estadística descriptiva de estos valores se muestra en el Anexo B.

El análisis de varianza basado en un diseño completamente al azar

para cada tratamiento, con un nivel de significación del 1%, se presenta en la Tabla 3.6.

Tabla 3.6 Análisis de varianza de los tratamientos orales

Tiempo	Fuente de Variación	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrado Medio	F	Sig.
0 minutos	Entre grupos	660.16	4	165.04	2.83	0.052
	Dentro del grupo	1167.20	20	58.36		
	Total	1827.36	24			
30 minutos	Entre grupos	40596.68	4	10149.17	82.72	0.000
	Dentro del grupo	2331.15	19	122.69		
	Total	42927.83	23			
60 minutos	Entre grupos	14973.53	4	3743.38	29.66	0.000
	Dentro del grupo	2271.95	18	126.22		
	Total	17245.48	22			
90 minutos	Entre grupos	10651.50	4	2662.88	58.87	0.000
	Dentro del grupo	814.15	18	45.23		
	Total	11465.65	22			
150 minutos	Entre grupos	1945.50	4	486.38	4.96	0.007
	Dentro del grupo	1863.00	19	98.05		
	Total	3808.50	23			

Los resultados para la prueba de Tukey-Kramer (significación del 1%) en cada intervalo de tiempo señala las diferencias estadísticas significativas entre cada tratamiento como muestran las tablas a continuación

Tabla 3.7 Prueba de Tukey-Kramer para los tratamientos orales (glucosa en ayunas)

0 minutos	
Tratamiento	Subgrupo para alfa = .01
	a
M+ELGS(60mg/ml)	56.00
M+ELGS(12mg/ml)	58.00
M+Acarbosa	62.40
Maltosa	63.60
Agua	70.80

Sig. 0.043

Tabla 3.8 Prueba de Tukey-Kramer para los tratamientos orales a los 30 minutos (glucosa 30' postprandial)

30 minutos			
Tratamiento	Subgrupo para alfa = .01		
	a	b	c
M+ELGS(60mg/ml)	73.80		
Agua	75.80		
M+Acarbosa	91.20	91.20	
M+ELGS(12mg/ml)		111.75	
Maltosa			183.00
<i>Sig.</i>	0.152	0.067	1.000

Tabla 3.9 Prueba de Tukey-Kramer para los tratamientos orales a los 60 minutos (glucosa 60' postprandial)

60 minutos			
Tratamiento	Subgrupo para alfa = .01		
	a	b	c
Agua	80.80		
M+Acarbosa	108.60	108.60	
M+ELGS(60mg/ml)		128.75	128.75
M+ELGS(12mg/ml)		136.00	136.00
Maltosa			152.60
<i>Sig.</i>	0.012	0.013	0.035

Tabla 3.10 Prueba de Tukey-Kramer para los tratamientos orales a los 90 minutos (glucosa 90' postprandial)

90 minutos			
Tratamiento	Subgrupo para alfa = .01		
	a	b	c
Agua	78.80		
M+Acarbosa		109.20	
M+ELGS(12mg/ml)			127.75
Maltosa			133.80
M+ELGS(60mg/ml)			134.50
<i>Sig.</i>	1.000	1.000	0.568

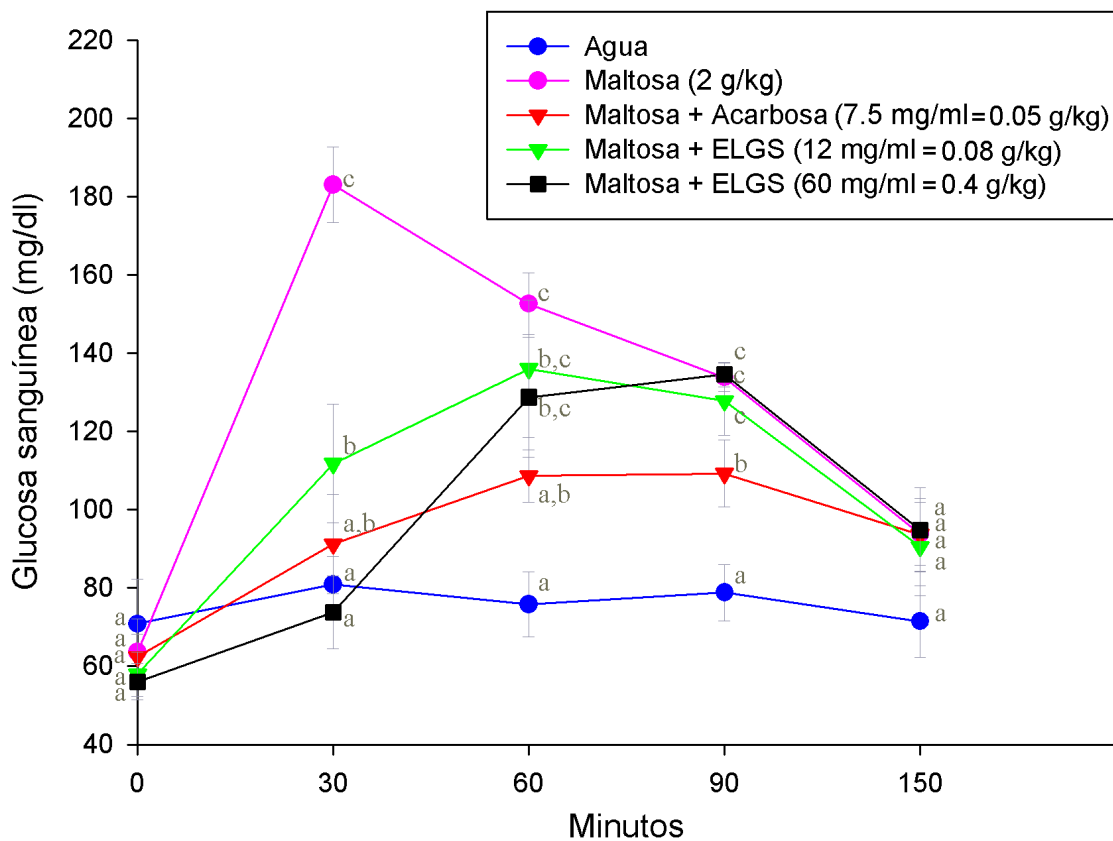
Tabla 3.11 Prueba de Tukey-Kramer para los tratamientos orales a los 150 minutos (glucosa 150' postprandial)

150 minutos	
Tratamiento	Subgrupo para alfa = .01
	a
Agua	71.40
M+ELGS(12mg/ml)	90.50
M+Acarbosa	93.60
Maltosa	93.80
M+ELGS(60mg/ml)	94.80

Sig. 0.013

La Figura 3.10 resume los valores de glucosa en ayunas y glucosa postprandial en función del tiempo y de los tratamientos orales. Las letras indican las diferencias estadísticas significativas según la prueba de Tukey-Kramer

Figura 3.10 Curvas de la concentración de glucosa sanguínea en ratones BALB/c en función de los tratamientos orales.



El incremento de la concentración sanguínea por cada tratamiento se muestra en la Tabla 3.12.

Tabla 3.12 Incremento de la concentración de glucosa sanguínea en función de los tratamientos orales

Tratamiento	Incremento en la concentración de glucosa sanguínea (mg/dl)			
	30 minutos	60 minutos	90 minutos	150 minutos
Agua	10.0	9.2	8.0	0.6
Maltosa (2g/kg)	119.4	89.0	70.2	30.2
Maltosa + Acarbosa (0.05 g/kg)	28.8	46.2	46.8	31.2
Maltosa + ELGS (0.08 g/kg)	53.8	78.0	69.8	32.5
Maltosa + ELGS (0.4 g/kg)	17.8	72.8	78.5	38.8

A los 30 minutos, la glucosa sanguínea postprandial para el tratamiento con acarbosa se reduce en un 75.9% con respecto al control positivo. De la misma manera, el ELGS (0.08 g/kg) y el ELGS (0.4 g/kg) reducen la glucosa postprandial en 54.9% y 85.1%, respectivamente.

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

El rendimiento de ELGS, a partir de peso seco de larvas de gusano de seda (5.73%), es menor al rendimiento del extracto liofilizado, a partir de peso seco de hojas de morera reportado por Miyahara *et al.*, (2004): 19.5%. Sin embargo, la cantidad de ELGS obtenida a partir de 1700 g de larvas de gusano de seda, fue suficiente para el objetivo de esta investigación.

Una vez obtenido el extracto, se establecieron las concentraciones finales del ensayo enzimático con base en las especificaciones del boletín técnico de la enzima α -glucosidasa de levadura (Sigma). De la misma manera, para disminuir el error en el análisis de la cinética enzimática, fue preciso tomar en cuenta las consideraciones de Murphy *et al.* (2003), en el diseño del experimento. También fue imprescindible el estudio del transcurso de la reacción enzimática para determinar el intervalo de tiempo en el cual se podía asegurar una velocidad de reacción constante para una determinada concentración de sustrato. De hecho, se observó que al utilizar bajas concentraciones de maltosa, la velocidad de reacción disminuye en un punto determinado por efecto del agotamiento de sustrato como lo ilustra la Figura 3.2. Era necesario excluir esta situación para un buen uso de la ecuación de Michaelis-Menten.

Por otra parte, se observó una fase de retraso inicial en reacciones enzimáticas inhibidas, como se muestra en la Figura 3.3 y en la Figura 3.4. Este retraso inicial en la reacción enzimática, en presencia de ELGS, sugiere una interacción de los componentes inhibidores del ELGS con el sitio activo de la enzima. Este fenómeno, conocido como histéresis enzimática, ha sido reportado en la investigación de Hanozet *et al.* (1981), quien analizó el efecto de la DNJ sobre la enzima sacarasa, y concluye una importante característica en el mecanismo de inhibición: se produce una isomerización, un cambio conformacional o un acoplamiento inducido en la disociación entre el inhibidor y la enzima. A partir de esta afirmación, se puede pensar para el ELGS, un mecanismo de inhibición similar sobre la enzima α -glucosidasa.

Estas observaciones sirvieron como punto de partida para el cálculo de los parámetros cinéticos. Para evitar las variaciones indeseables de la velocidad, se midió la cantidad de glucosa producida entre 10 y 20 minutos de reacción y con el cálculo de las velocidades iniciales a varias concentraciones de sustrato se obtuvo un valor de K_m de 50.5 mM. La investigación de Oku *et al.* (2006), en donde se experimentó con un extracto obtenido a partir de hojas secas de morera (*Morus alba*) y glucosidasas del intestino delgado de humanos y ratas, reportó un valor de K_m de 4.3 mM y un valor de K_i de 2.5×10^{-4} mM. Estos valores son respectivamente diez y cien veces más bajos que los valores de K_m y K_i calculados en esta investigación, lo que significa que estas enzimas tuvieron mayor afinidad por la maltosa, así como por el inhibidor. Sin embargo, estas comparaciones no tienen mayor repercusión en el estudio de la actividad inhibidora del ELGS y sus mecanismos de inhibición.

Estos resultados sugieren que la fuente de origen de la enzima influye significativamente en la afinidad de la enzima tanto por el sustrato como por el inhibidor. Lo mencionado puede ser un hecho beneficioso en el sentido que la inhibición puede ser mayor sobre las glucosidasas del tracto digestivo humano que sobre las glucosidasas producidas por microorganismos.

Con respecto a la eficiencia catalítica, la reacción enzimática es lenta ya que el valor de la relación k_{cat}/K_m ($59.9 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$) es bajo en comparación con las reacciones enzimáticas rápidas que presentan una relación k_{cat}/K_m en el orden de 10^8 (Chávez *et al.*, 1990). Las reacciones rápidas siguen el mecanismo propuesto por Briggs-Haldane, donde K_m es mayor a K_s , mientras que en las reacciones lentas, se cumple el mecanismo propuesto por Michaelis y Menten, donde la constante de velocidad k_2 es muy pequeña en comparación a k_{-1} (Voet *et al.*, 2006). En consecuencia, el valor de K_m es un valor aproximado de K_s . De aquí se deduce que la reacción enzimática estudiada sigue el mecanismo de Michaelis y Menten y el valor de K_m calculado refleja efectivamente la afinidad de la α -glucosidasa por la maltosa.

La baja eficiencia catalítica de la α -glucosidasa se debe al valor de su número de recambio, $K_{cat} = 3.025 \text{ s}^{-1}$. Comparado con otras enzimas, este valor es pequeño. Breitmeier *et al.* (1997) estableció una constante catalítica $k_{cat} = 60 \text{ s}^{-1}$ para la glucoamilasa-maltasa, mientras que Albert Lehninger (1981) presenta un valor de k_{cat} en el orden de 10^4 para la β -amilasa y en el orden de 10^6 , para una enzima muy eficiente, la anhidrasa carbónica C.

Con respecto a la inhibición enzimática, en la representación de Lineweaver-Burk de la velocidad de reacción en función de la concentración de sustrato y ELGS, se puede ver claramente un mecanismo de inhibición competitiva. Este resultado era esperado ya que, según la literatura, los inhibidores con estructuras análogas al sustrato pueden competir por el sitio activo de la enzima (Voet *et al.*, 2006). Este mecanismo de inhibición también se observó en las investigaciones de Breitmeier *et al.* (1987), Hanozett *et al.* (1981) y Oku *et al.* (2006), quienes utilizan DNJ como inhibidores de las α -glucosidasas.

Otra característica del mecanismo de inhibición se puede determinar mediante el gráfico v_o vs. $[I]$ (Chávez *et al.*, 1990). En el análisis de la Figura 3.6 se observaron porcentajes cercanos al 100%, cuando se utilizaron concentraciones altas de ELGS. Esto significa que en la reacción enzimática no se forma un complejo enzima-sustrato-inhibidor (ESI) productivo; es decir, la enzima α -glucosidasa ligada a las moléculas inhibitoras del ELGS no puede reaccionar con la maltosa para producir glucosa y en consecuencia, la inhibición es completa.

Aparte del mecanismo de inhibición, fue importante determinar el grado de disociación de la enzima con los inhibidores del ELGS. Las unidades del valor de K_i calculado (mg/ml) no son comparables con las unidades de K_m (mM) para determinar cuál de los ligandos es más afín a la enzima. Para esto fue necesario expresar la concentración de DNJ presente en el ELGS y transformar estas unidades en términos de molaridad. En vista de que no se realizó una purificación cromatográfica del ELGS, se utilizó el equivalente de DNJ para un extracto similar determinado experimentalmente en la

investigación de Asano *et al.* (2001). De esta forma se pudo comparar K_m y K_i , constantes que, en este estudio, reflejan la afinidad de la enzima por el sustrato y el inhibidor, respectivamente, como se estableció anteriormente. Se determinó que la afinidad de la enzima α -glucosidasa por los inhibidores del ELGS es aproximadamente 2300 veces más grande que la afinidad por la maltosa.

Los hallazgos de la experimentación *in vitro*, descritos en los párrafos anteriores, no son concluyentes por sí solos en lo que corresponde a la eficacia del ELGS como hipoglicemiante efectivo. Por lo tanto, fue necesario implementar un ensayo basado en un sistema biológico con ratones, dado el alto grado de similitud entre su genoma y el genoma humano (Mural *et al.*, 2002). El estudio *in vivo* controlado fue un simulacro de la ingesta oral de dietas con carbohidratos y el ELGS. En el análisis estadístico de los datos, se observaron diferencias significativas en la glucosa postprandial a los 30, 60 y 90 minutos después de la aplicación de los tratamientos. La prueba de rango múltiple de Tukey-Kramer fue esencial para reconocer cómo los tratamientos se agrupan según sus diferencias estadísticas. La diferencia más notoria se registró a los 30 minutos de la aplicación de los tratamientos, en donde se observó un pico elevado de glucosa postprandial para el grupo control sin ELGS, mientras que los grupos con ELGS y acarbosa, mantuvieron los niveles de glucosa en niveles bajos. El porcentaje de reducción en el incremento de la glucosa postprandial aumenta de acuerdo a la dosis de ELGS. Además, es posible alcanzar el porcentaje de reducción de la acarbosa con concentraciones de 1.6 a 8 veces más concentradas de ELGS. Dado el grado poco purificado del ELGS, se puede decir que es un potente hipoglucemiante oral con propiedades hipoglucemiantes similares a inhibidores de la α -glucosidasa que se encuentran en el mercado, como la acarbosa. Estos resultados se compararon con otras investigaciones de parámetros experimentales similares. El porcentaje de reducción de la glucosa postprandial a los 30 minutos con ELGS en dosis de 0.4 g/kg supera los resultados obtenidos con extractos de *Morus alba* (Miyahara *et al.*, 2004), *Geranium dielsiaum* (Karato *et al.*, 2006), *Rhus chinensis* (Shim *et al.*, 2003), y materiales derivados del árbol de pino (Kim *et al.*, 2005). No obstante, los extractos de la

familia *Sophora* estudiados por Shi *et al.* (1998) presentan un porcentaje de reducción más alto.

Según Watson *et al.* (2001), el número, posición y configuración de los grupos hidroxilo en los alcaloides polihidroxiados determinan la especificidad y potencia de los mismos. Por lo tanto, este estudio es una base para la investigación de nuevos agentes terapéuticos, en vista que las enzimas glucosidasas están involucradas en varias rutas del metabolismo. Las aplicaciones de mayor potencial son los hipoglucemiantes orales, los inhibidores de metástasis, los inhibidores de la replicación viral, y los agentes para la prevención de la obesidad. Por ahora, se puede incursionar en la producción de un nuevo hipoglucemiante natural en el mercado ecuatoriano. Los productores de gusano de seda en nuestro país tienen en sus manos una alternativa novedosa de gran potencial. Nuevas investigaciones tendrán que optimizar el efecto del ELGS y buscar otras aplicaciones del mismo.

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

- En el ensayo enzimático desarrollado con una concentración de enzima α -glucosidasa de 0.05 mg proteína/ml y 25 mM de maltosa, la velocidad de reacción decreció a partir de los 20 minutos de incubación por un posible agotamiento de sustrato.
- En la reacción enzimática con α -glucosidasa, la velocidad de reacción aumenta a mayor concentración de maltosa. Con concentraciones altas de maltosa, la velocidad de reacción se acerca al límite de velocidad, V_{\max} .
- En el ensayo enzimático desarrollado con una concentración de enzima α -glucosidasa de 0.05 mg proteína/ml, en condiciones controladas de temperatura de 37° C y pH 7.2, el límite de la velocidad es $V_{\max} = 0.1323$ mmol glucosa/min/l.
- El valor de la constante de Michaelis-Menten K_m para la enzima α -glucosidasa de levadura sobre maltosa es 50.5 mM, que en esta investigación, es una medida relativamente mediana de la afinidad de la enzima por el sustrato, dado que la eficiencia catalítica es baja y la constante de velocidad k_2 es más pequeña que la constante de velocidad k_{-1} (cinética de equilibrio rápido).
- La reacción enzimática de la α -glucosidasa con maltosa se produjo con un valor de $k_{\text{cat}} = 3.025 \text{ s}^{-1}$ y un valor de eficiencia catalítica $k_{\text{cat}}/K_m = 59.9 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$, por lo que se considera una reacción lenta.
- En las reacciones enzimáticas de la α -glucosidasa, se produjo el fenómeno conocido como histéresis enzimática, cuando se utilizó el ELGS como inhibidor. La interacción de los componentes del ELGS con la enzima α -glucosidasa provocaría el retraso inicial en el avance de la reacción, antes de alcanzar una velocidad constante.

- La inhibición de la actividad enzimática de la α -glucosidasa en ensayos *in vitro* dependió directamente de la concentración de ELGS, ya que el porcentaje de inhibición aumentó conforme se incrementaba la concentración de ELGS.
- El mecanismo de inhibición de la actividad de la α -glucosidasa por efecto del ELGS es competitivo, es decir que los inhibidores presentes en el extracto compiten con la maltosa por el sitio activo de la enzima. Esta exclusión mutua se confirma ya que el parámetro V_{max} es el mismo para cualquier concentración de ELGS, en donde el aumento de la concentración de sustrato puede revertir el efecto de un inhibidor competitivo.
- La inhibición competitiva de la actividad de la enzima α -glucosidasa es completa. En la reacción inhibida no se formaría un complejo enzima-sustrato-inhibidor (ESI) productivo por lo que la inhibición alcanza porcentajes cercanos al 100%, con concentraciones altas de ELGS.
- La afinidad de la enzima α -glucosidasa por los inhibidores del ELGS es mayor que la afinidad por el sustrato maltosa, dado que $K_i = 2.2 \times 10^{-2}$ mM y $K_m = 50.5$ mM.
- El ELGS, administrado por vía oral, baja la concentración de glucosa postprandial en ratones de manera significativa. Después de 30 minutos de la ingesta de 2.0 g/kg de maltosa y 0.08 g/kg de ELGS, el incremento en la concentración de glucosa sanguínea se redujo en un 54.9%. De la misma manera, después de 30 minutos de la ingesta de 2.0 g/kg de maltosa y 0.4 g/kg de ELGS, el incremento en la concentración de glucosa sanguínea se redujo en un 85.1%.
- El porcentaje de reducción en el incremento de la glucosa postprandial en ratones es función de la dosis de ELGS y por lo tanto se podría tener

un efecto inhibidor similar a un hipoglucemiante comercial como la acarbosa con dosis de ELGS entre 1.6 y 8 veces más concentradas que la dosis de acarbosa.

- El procedimiento para la preparación del (ELGS) propuesto en este estudio es válido y efectivo, dado que el ELGS obtenido es un inhibidor de la enzima α -glucosidasa y tiene un efecto positivo en la reducción de la hiperglucemia en ratones.

CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

- En esta investigación se tomaron en cuenta dos puntos del transcurso de la reacción para cuantificar la cantidad de glucosa producida. Sin embargo, para reducir la cantidad de ensayos enzimáticos en un estudio de actividad o de cinética, se podría recurrir a una técnica de medición de un solo punto.
- Se podría investigar si el retraso inicial observado en la reacción enzimática en presencia de ELGS se puede reducir o anular si se incubaba primero la enzima con el ELGS antes de añadir el sustrato, como lo describe Hanozet *et al.*, 1980).
- Para realizar una transformación más precisa de las unidades de Ki de mg/ml a mM, se sugiere cuantificar la DNJ presente en el ELGS mediante una purificación por un método cromatográfico, como el utilizado por Asano *et al.*, 2001).
- En vista de que la fuente de la enzima α -glucosidasa influye en la afinidad de los inhibidores presentes en el ELGS, se podría investigar si la inhibición del ELGS es mayor con enzimas del intestino humano.
- Una vez comprobada la efectividad del ELGS como hipoglicemiante efectivo, se tendría que realizar un estudio económico para determinar si es factible su lanzamiento al mercado como tal o procesado de diferente manera. El procesado más óptimo, y los efectos de dicho proceso sobre la actividad inhibidora del producto deberán ser tomados en cuenta.
- Un estudio previo del mercado tendría que analizar las posibilidades de oferta y demanda, así como las estrategias de publicidad dirigidas a los diversos grupos humanos.

CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Asano N., Kato A. y Watson A. (2001) Therapeutic Applications of Sugar-Mimicking Glycosidase Inhibitors. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*; 1: 145-154.
- ² Asano N., Yamashita T., Yasuda K., Ikeda K., Kizu H., Kameda Y., Kato A., Nash R., Lee H.S. y Ryu K.S. (2001) Polyhydroxilated Alkaloids Isolated from Mulberry Trees (*Morus alba L.*) and Silkworm (*Bombyx mori L.*). *J. Agric. Food Chem*; 49: 4208-4213.
- ³ Breitmeier D., Günther S. y Heymann H. (1997). Acarbose and 1-deoxynojirimicin inhibit maltose and maltooligosaccharide hydrolysis of human small intestinal glucoamylase-maltase in two different substrate-induced modes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*; 346(1): 7-14.
- ⁴ Buchanan T.A., Xiang A.H., Peters R.K., Kjos S.L., Marroquin A., Goico J. (2002). Preservation of pancreatic beta-cell function and prevention of type 2 diabetes by pharmacological treatment of insulin resistance in high-risk hispanic women. *Diabetes*; 51: 2796-803.
- ⁵ Chávez M.A., Díaz J., Pérez U., Delfín J. (1990) Temas de Enzimología (Tomo I). La Habana.
- ⁶ Chapel C., Garcia C., Roingeard P., Zitzmann N., Dubuisson J., Dwek R.A., Trépo C., Zoulim F. y Durantel D. (2006). Antiviral effect of alpha-glucosidase inhibitors on viral morphogenesis and binding properties of hepatitis C virus-like particles. *J. Gen. Virol.*; 87(4): 861-71.
- ⁷ Chiasson J.L., Josse R.G., Gomis R., Hanefeld M., Karasik A., Laakso M. (2002). Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: the STOP-NIDDM randomized trial. *Lancet*; 359: 2072-7.
- ⁸ Cifuentes, C. (2005). Gusano de Seda y Diabetes. Documento no publicado. Pereira. Colombia.
- ⁹ Edelstein S.L., Knowler W.C., Bain R.P., Andres R., Barrett-Connor E.L., Dowse G.K., *et al.* (1997). Predictors of progression from impaired glucose tolerance to NIDDM: an analysis of six prospective studies. *Diabetes*; 46: 701-10.

- ¹⁰ Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. (2003). Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*; 26 (Suppl. 1): S5-20.
- ¹¹ Fischer P.B., Collin M., Karlsson G.B., James W. Butters T.D., Davis S.J., Gordon S. Dwek R.A. y Platt F.M. (1995). The α -Glucosidase Inhibitor N-Butyldeoxynojirimycin Inhibits human Immunodeficiency Virus Entry at the Level of Post-CD4 Binding. *Journal of Virology*; 69(9): 5791–5797.
- ¹² Fischer P.B., Karlsson G.B., Dwek R.A. y Platt F.M. (1996) N-Butyldeoxynojirimycin-Mediated Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Entry Correlates with Impaired gp120 Shedding and gp41 Exposure. *Journal Of Virology*; 70(10): 7153–7160.
- ¹³ Frieden C. (1979). Slow transitions and hysteretic behavior in enzymes. *Annual review of biochemistry*; 48: 471-489
- ¹⁴ Frieden C. (1970). Kinetic aspects of regulation of metabolic processes: The hysteretic enzyme concept. *The Journal of Biological Chemistry*; 245(21): 5788-5799.
- ¹⁵ Fuller J.H., Shipley M.J., Rose G., Jarrett R.J., Keen H. (1980). Coronary-heart disease risk and impaired glucose tolerance: the Whitehall Study. *Lancet*, I: 1373–1376.
- ¹⁶ Goodman H.M. (1998). The Pancreatic Islets. En: Johnson L.R. Essential Medical Physiology. New York: Lippincott-Raven Publishers.
- ¹⁷ Guyton A.C. y Hall J.E. (2001). Tratado de Fisiología Médica (10ª Ed.). México, D.F.: McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V.
- ¹⁸ Hanozet G., Pircher H.P., Vanni P., Oesch B. y Semenza G. (1981). An Example of Enzyme Hysteresis. The slow and tight interaction of some fully competitive inhibitors with small intestinal sucrase. *The journal of biological Chemistry*; 256(8): 3703-3711.
- ¹⁹ Hoff J. (2000). Methods of Blood Collection in the Mouse. *Lab Animal*; 9(10): 47-53.
- ²⁰ Jacob G.S. (1995). Glycosylation inhibitors in biology and medicine. *Curr. Opin. Struct. Biol*; 5(5): 605-11.

- ²¹ Janssen W., Harff G., Caers M., Schellekens A. (1998) Positive interference of icodextrin metabolites in some enzymatic glucose methods. *Clin Chem*; 44: 2379-2380.
- ²² Jeon J.H., Lee B.J., Kim T.Y., Lew J.H., Kim N.J. y Ryu K.S. (2000) The effects of silkworm powder on blood glucose and lipid levels in NIDDM (Type II) patients. *Journal of Oriental Medicine*; 5(1).
- ²³ Karato M., Yamaguchi K., Takei S., Kino T. y Yazawa K. (2006). Inhibitory effects of Pasuchaca (*Geranium dielsiaum*) extract on α -glucosidase in mouse. *Biosci. Biotechnol. Biochem*; 70(6): 1482-1484.
- ²⁴ Kasper D.L., Braunwald E., Fauci A.S., Hauser S.L., Longo D.L. Jameson J.L. e Isselbacher K.J. (2006). Harrison Principios de Medicina Interna (16^a Ed.). México, D.F.: McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V.
- ²⁵ Kim, M. (2002). Revival of the Silkworm. *Korea Now - Biweekly Magazine*.
- ²⁶ Kim Y.M., Jeong Y.K., Wang M.H., Lee W.Y. y Rhee H.I. (2005). Inhibitory effect of pine extract on α -glucosidase activity and postprandial hyperglycemia. *Nutrition*; 21: 756-761.
- ²⁷ Knowler W.C., Barrett-Connor E., Fowler S.E., Hamman R.F., Lachin J.M., Walker E.A. (2002). Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med*; 346: 393-403.
- ²⁸ Kumar V., Abbas A.K. y Fausto N. (2005). Robbins y Cotran Patología Estructural y Funcional (7^a Ed.). Madrid: Elsevier España, S.A.
- ²⁹ Larsen M.L., Hørder M., Mogensen E.F. (1990). Effect of long-term monitoring of glycosylated hemoglobin levels in insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 323 (15): 1021-5.
- ³⁰ Lehninger A.L. (1981). Bioquímica: Las bases moleculares de la estructura y función celular (2^a Ed.). La Habana: Edición Revolucionaria.
- ³¹ Lerman G.Y. (1994). Atención integral del paciente diabético. México, D.F.: Interamericana.

- ³² Lineweaver H. y Burk D. (1934). The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *Journal of the American Chemical Society*; 56: 658-666.
- ³³ Martin, O. (2007). Iminosugars: current and future therapeutic applications. *Ann Pharm Fr.* 65(1): 5-13.
- ³⁴ McKee T. y McKee J.R. (2003). Bioquímica: La base molecular de la vida (3ª Ed.). Colombia: The McGraw-Hill Companies, Inc.
- ³⁵ Ministerio de Salud Pública del Ecuador. (2006). Indicadores Básicos de Salud. Ecuador 2006 (En línea). Disponible en: www.msp.gov.ec
- ³⁶ Mitchell, M. N. (2005). Strategically using General Purpose Statistics Packages: A Look at Stata, SAS and SPSS (Technical Report Series, Report Number 1, Version Number 1). Statistical Consulting Group: UCLA Academic Technology Services. Disponible en: <http://www.ats.ucla.edu/stat/technicalreports/>
- ³⁷ Miyahara C., Miyazawa M., Satoh S., Sakai A. y Mizusaki S. (2004). Inhibitory effects of mulberry leaf extract on postprandial hyperglycemia in normal rats. *J Nutr Sci Vitaminol*; 50: 161-164.
- ³⁸ Mural R.J., *et al.* (2002). A comparison of whole-genome shotgun-derived mouse chromosome 16 and the human genome. *Science*; 296(5573): 1661-1671.
- ³⁹ Murphy E.F., Gilmour S.G., Crabbe M.J. (2003) Efficient and accurate experimental design for enzyme kinetics: Bayesian studies reveal a systematic approach. *J. Biochem. Biophys. Methods*; 55: 155–178
- ⁴⁰ Murray R.K., Mayes P.A., Granner D.K. y Rodwell V.W. (2001). Bioquímica de Harper (15ª edición). México D.F: El Manual Moderno.
- ⁴¹ Oku T., Yamada M., Nakamura M., Sadamori M. y Nakamura S. (2006) Inhibitory effects of extractives from leaves of *Morus alba* on human and rat small intestinal disaccharidase activity. *British Journal of Nutrition*; 95: 933-938.
- ⁴² Pan X.R., Li G.W., Hu Y.H., Wang J.X., Yang W.Y., An Z.X. (1997). Effects of diet and exercise in preventing NIDDM in people with impaired glucose tolerance. The Da Qing IGT and Diabetes Study. *Diabetes Care*;

20: 537-44.

- ⁴³ Peterson J.I. (1967). Estados Unidos: Urinary Glucose Measurement. Symposium on Urinary Constituents of Low Molecular Weight.
- ⁴⁴ Ramlo-Halsted B.A., Edelman S.V. (1999). The natural history of type 2 diabetes. Implications for clinical practice. *Prim Care*; 26: 771-89.
- ⁴⁵ Roglic G., Unwin N., Bennett P.H., Mathers C., Tuomilehto J., Nag S., Connolly V. y King H. (2005). The burden of Mortality Attributable to Diabetes. Realistic estimates for the year 2000. *Diabetes Care*; 28: 2130-2135.
- ⁴⁶ Ryu, K.S., Lee H.S., Kim I. (2002). Effects and Mechanisms of Silkworm Powder as a Blood Glucose-Lowering Agent. *Int. J. Indust. Entomol*; 4 (2): 93-100.
- ⁴⁷ Shi H.C., Huang Q.Y., Yamah R., Inui H., Fujita T., Miyatake K., Nakano Y., Tada T. y Nishimura K. (1998). Supression by water extracts of *Sophora* plants of sucrose-induced hyperglycemia in rats and inhibition of intestinal disaccharidases *in vitro*. *Biosci. Biotechnol. Biochem*; 62(6): 1225-1227.
- ⁴⁸ Shim Y.J., Doo H.K., Ahn S.Y., Kim Y.S., Seong J.K., Park I.S. y Min B.H. (2003). Inhibitory effect of aqueous extract from the gall of *Rhus chinensis* on alpha-glucosidase activity and postprandial blood glucose. *Journal of Ethnopharmacology*; 85: 283-287.
- ⁴⁹ Shobha S., Rao, M.D., Disraeli P. y McGregor Tamara (2004). Impaired Glucose Tolerance and Impaired Fasting Glucose. *American Family Physician*; 69 (8): 1961-1968.
- ⁵⁰ Soria S. (2006). Resumen de la Sericultura en Ecuador. *Boletín Andino de la Seda*; 3(10): 8-9.
- ⁵¹ Tuomilehto J., Lindstrom J., Eriksson J.G., Valle T.T., Hamalainen H., Ilanne-Parikka P. (2001) Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Engl J Med*; 344: 1343-50.

- ⁵² Voet D., Voet J.G., Pratt C.W. (2006). *Fundamentals of Biochemistry: Life at the molecular level* (2^a Ed.). Estados Unidos: John Wiley & Sons, Inc.
- ⁵³ Watson A.A., Fleet G., Asano N., Molyneux R.J. y Nash R.J. (2001). Polyhydroxylated alkaloids. Natural occurrence and therapeutic applications. *Phytochemistry*; 56: 265-295.
- ⁵⁴ Wild S., Roglic G., Green A., Sicree R. y King H. (2004). Global Prevalence of Diabetes. Estimates for the year 200 and projections for 2030. *Diabetes Care*; 27: 1047-1053.
- ⁵⁵ Wing R.R., Blair E.H., Bononi P., Marcus M.D., Watanabe R. y Bergman R.N. (1994). Caloric restriction per se is a significant factor in improvements in glycemic control and insulin sensitivity during weight loss in obese NIDDM patients. *Diabetes Care*; 17: 30-36.
- ⁵⁶ World Health Organization (1999). *Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications*. Geneva: Department of Noncommunicable Disease Surveillance.
- ⁵⁷ World Health Organization (2006). *Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and Intermediate Hyperglycaemia*. Geneva: WHO Document Production Services.
- ⁵⁸ Wyngaarden J.B. y Smith L.H. (1991). *Tratado de Medicina Interna* (Vol. 2). México, D.F.: McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V.
- ⁵⁹ Yagi M., Kouno T., Aoyagi T. y Muray H. (1976). The structure of moranoline, a piperidine alkaloid from *Morus* species. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*; 50: 571-572.
- ⁶⁰ York J.L. *Enzimas: Clasificación, cinética y control*. En: Delvin T.M. (2004). *Bioquímica* (4^a Ed.). España: Editorial Reverté, S.A.

ANEXO A: Valores de absorbancia y concentraciones de glucosa formada en los diferentes ensayos enzimáticos.

LEYENDA	
BHS	Blanco (Hidrólisis espontánea + glucosa presente antes de la reacción enzimática)
A	Primera repetición
B	Segunda repetición
0-10	Intervalo de tiempo de 0 a 10 minutos
.10-20	Intervalo de tiempo de 10 a 20 minutos
Valores que utiliza el kit para la detección cuantitativa de glucosa (Sigma)	
RB	Reactivo kit + agua
SB	Muestra + agua
SAMPLE	Muestra + Reactivo kit
Factor	Factor de dilución

Continúa en la siguiente página...

CONCENTRACION DE ELGS **0** mg solido/ml

ABSORBANCIA (340 nm)

RB 0.0470

SB	25 A		25 B		28.5 A		28.5 B		50 A		50 B		100 A		100 B		500 A		500 B	
	BHS	0.0050	0.0050	0.0050	0.0178	0.0235	0.0205	0.0125	0.0302	0.0192	0.0058	0.0090	0.0136	0.0180	0.0071	0.0179	0.0180	0.0118	0.0062	0.0062
	0.0225	0.0150	0.0150	0.0065	0.0185	0.0175	0.0040	0.0175	0.0175	0.0084	0.0132	0.0132	0.0132	0.0071	0.0179	0.0136	0.0118	0.0062	0.0062	0.0062

Sample	25 A		25 B		28.5 A		28.5 B		50 A		50 B		100 A		100 B		500 A		500 B	
	BHS	0.4734	0.4734	0.2253	0.2141	0.6759	0.6795	0.3518	0.6342	0.9749	0.9989	0.6460	1.1013	1.1127	0.6699	0.7898	0.6885	0.9374	0.9374	0.9374
	0.2160	0.7025	0.7025	0.2141	0.6759	0.6795	0.3714	0.9749	0.9749	0.9989	0.6460	1.5580	1.5772	0.6699	0.7898	0.6885	0.9374	0.9374	0.9374	0.9374

Factor: 1 5

CONCENTRACION GLUCOSA mg/ml

10 min 20 min	25 A		25 B		28.5 A		28.5 B		50 A		50 B		100 A		100 B		500 A		500 B	
	BHS	0.1466	0.1466	0.0559	0.0559	0.2124	0.2140	0.1017	0.1938	0.3168	0.3244	0.2057	0.3661	0.5212	0.5263	1.0525	1.2719	1.1039	1.5385	1.5385
	0.0510	0.2229	0.2229	0.0559	0.2124	0.2140	0.1115	0.3168	0.3168	0.3244	0.2055	0.3638	0.5263	0.5263	0.5263	1.0525	1.2719	1.1039	1.5385	1.5385

CONCENTRACION GLUCOSA mmol/l

10 min 20 min	25 A		25 B		28.5 A		28.5 B		50 A		50 B		100 A		100 B		500 A		500 B	
	BHS	0.8140	0.8140	0.3100	0.3102	1.1791	1.1879	0.5646	1.0759	1.7585	1.8008	1.1408	2.0191	2.8932	2.9212	5.8422	7.0601	6.1271	8.5397	8.5397
	0.2830	1.2372	1.2372	0.3102	1.1791	1.1879	0.6189	1.7585	1.7585	1.8008	1.1408	2.8932	2.9212	2.8932	2.9212	5.8422 <td>7.0601 <td>6.1271 <td>8.5397 <td>8.5397</td> </td></td></td>	7.0601 <td>6.1271 <td>8.5397 <td>8.5397</td> </td></td>	6.1271 <td>8.5397 <td>8.5397</td> </td>	8.5397 <td>8.5397</td>	8.5397

CONCENTRACION GLUCOSA - BLANCO mmol/l

10 min 20 min	25 A		28.5 A		50 A		100 A		500 A		25 B		28.5 B		50 B		100 B		500 B	
	BHS	0.5310	0.5310	0.3915	0.4105	1.1397	1.1820	0.8771	1.7524	1.7804	1.2179	0.8903	1.2179	1.2179	1.2179	1.2179	1.2179	1.2179	1.2179	1.2179
	0.9851	0.9851	0.8688	0.8777	1.1397	1.1820	1.7524	1.7804	1.7804	2.4126	2.4126	2.4126	2.4126	2.4126	2.4126	2.4126	2.4126	2.4126	2.4126	2.4126

VELOCIDAD mmol glucosa/min/l

Intervalo	25 mM		50 mM		100 mM		500 mM	
	A				B			
0-10	0.0531	0.0392	0.0511	0.0877	0.1218	0.1195	0.1218	0.1195
10-20	0.0454	0.0477	0.0628	0.0875	0.1195	0.1195	0.1195	0.1195
Intervalo	A				B			
0-10	0.0531	0.0410	0.0505	0.0890	0.1218	0.1195	0.1218	0.1195
10-20	0.0454	0.0467	0.0677	0.0890	0.1195	0.1195	0.1195	0.1195

VELOCIDAD µmol glucosa/min/mg proteina

Intervalo	25 mM		50 mM		100 mM		500 mM	
	A				B			
0-10	1.0620	0.7831	1.0226	1.7543	2.4358	2.3894	2.4358	2.3894
10-20	0.9082	0.9546	1.2567	1.7504	2.3894	2.3894	2.3894	2.3894
Intervalo	A				B			
0-10	1.0620	0.8209	1.0106	1.7806	2.4358	2.3894	2.4358	2.3894
10-20	0.9082	0.9345	1.3533	1.7802	2.3894	2.3894	2.3894	2.3894

CONCENTRACION DE ELGS **0.1** mg solido/ml

ABSORBANCIA (340 nm)

RB **0.0470**

SB	25 A		25 B		28.5 A		28.5 B		50 A		50 B		100 A		100 B		500 A		500 B	
	BHS	0.0255	0.0455	0.0430	0.0251	0.0392	0.0380	0.0197	0.0164	0.0260	0.0180	0.0240	0.0202	0.0085	0.0079	0.0030	0.0109	0.0030	0.0109	0.0115
Factor:	1	0.0411	0.0346	0.0070	0.0146	0.0146	0.0146	0.0279	0.0315	0.0302	0.0144	0.0228	0.0250	0.0144	0.0228	0.0250	0.0144	0.0228	0.0109	0.0115
Sample	25 A		25 B		28.5 A		28.5 B		50 A		50 B		100 A		100 B		500 A		500 B	
	BHS	0.1952	0.3612	0.3659	0.2448	0.4309	0.4371	0.3580	0.6179	0.6270	0.6590	1.0340	1.0214	0.6515	0.7904	0.6730	0.9302	0.6515	0.7904	0.9302
Factor:	1	0.4742	0.4706	0.2440	0.5500	0.5543	0.5543	0.3503	0.8215	0.7944	0.6630	1.3100	1.3300	0.6630	1.3100	1.3300	0.6730	0.9302	0.6730	0.9302
Factor:	1	0.0411	0.0346	0.0070	0.0146	0.0146	0.0146	0.0279	0.0315	0.0302	0.0144	0.0228	0.0250	0.0144	0.0228	0.0250	0.0144	0.0228	0.0109	0.0115
Factor:	1	0.0411	0.0346	0.0070	0.0146	0.0146	0.0146	0.0279	0.0315	0.0302	0.0144	0.0228	0.0250	0.0144	0.0228	0.0250	0.0144	0.0228	0.0109	0.0115

CONCENTRACION GLUCOSA mg/ml

10 min 20 min	25 A		25 B		28.5 A		28.5 B		50 A		50 B		100 A		100 B		500 A		500 B	
	BHS	0.0427	0.0935	0.0960	0.0601	0.1200	0.1225	0.1014	0.1930	0.1928	0.2067	0.3321	0.3321	0.10370	1.2798	1.0840	1.5178	1.0370	1.2798	1.2862
Factor:	1	0.1344	0.1354	0.0661	0.1700	0.1715	0.1715	0.0958	0.2586	0.2496	0.2094	0.4316	0.4378	0.2094	0.4316	0.4378	1.0840	1.5178	1.0840	1.5178

CONCENTRACION GLUCOSA mmol/l

10 min 20 min	25 A		25 B		28.5 A		28.5 B		50 A		50 B		100 A		100 B		500 A		500 B	
	BHS	0.2370	0.5190	0.5329	0.3336	0.6658	0.6801	0.5627	1.0711	1.0701	1.1474	1.8601	1.8431	0.5627	1.0711	1.1474	2.3956	2.4300	6.0170	7.1035
Factor:	1	0.7458	0.7514	0.3670	0.9434	0.9517	0.9517	0.5320	1.4352	1.3854	1.1621	2.3956 <td>2.4300 <td>1.1621</td> <td>2.3956 <td>2.4300 <td>6.0170 <td>8.4247 <td>6.0170 <td>8.4247 </td></td></td></td></td></td></td>	2.4300 <td>1.1621</td> <td>2.3956 <td>2.4300 <td>6.0170 <td>8.4247 <td>6.0170 <td>8.4247 </td></td></td></td></td></td>	1.1621	2.3956 <td>2.4300 <td>6.0170 <td>8.4247 <td>6.0170 <td>8.4247 </td></td></td></td></td>	2.4300 <td>6.0170 <td>8.4247 <td>6.0170 <td>8.4247 </td></td></td></td>	6.0170 <td>8.4247 <td>6.0170 <td>8.4247 </td></td></td>	8.4247 <td>6.0170 <td>8.4247 </td></td>	6.0170 <td>8.4247 </td>	8.4247

CONCENTRACION GLUCOSA - BLANCO mmol/l

10 min 20 min	25 A		25 B		28.5 A		28.5 B		50 A		50 B		100 A		100 B		500 A		500 B	
	BHS	0.2820	0.2959	0.3322	0.3465	0.5084	0.5074	0.7128	0.6958	1.3473	1.3830	1.3830	1.3830	0.7128	0.6958	1.3473	2.4078	2.4290	6.0170	7.1035
Factor:	1	0.5057	0.5764	0.5847	0.9032	0.8534	0.8534	1.2335	1.2679	2.4078	2.4290	2.4290	2.4290	1.2335	1.2679	2.4078	2.4078	2.4290	6.0170 <td>7.1035 </td>	7.1035

VELOCIDAD mmol glucosa/min/l

Intervalo	25 mM	28.5 mM	50 mM	100 mM	500 mM
	A				
0-10	0.0282	0.0332	0.0508	0.0713	0.1347
10-20	0.0218	0.0244	0.0395	0.0521	0.1060
Intervalo	B				
	0-10	0.0296	0.0347	0.0507	0.0696
10-20	0.0210	0.0238	0.0346	0.0572	0.1046

VELOCIDAD µmol glucosa/min/mg proteina

Intervalo	25 mM	28.5 mM	50 mM	100 mM	500 mM
	A				
0-10	0.5640	0.6645	1.0168	1.4255	2.6946
10-20	0.4362	0.4883	0.7896	1.0415	2.1209
Intervalo	B				
	0-10	0.5918	0.6931	1.0149	1.3915
10-20	0.4195	0.4763	0.6919	1.1443	2.0919

ANEXO B: Estadística descriptiva de los valores de glucosa sanguínea en ayunas y glucosa sanguínea postprandial obtenidos en el ensayo con ratones.

Tiempo	Tratamiento	Repeticiones	Media	Desviación Estándar	Error Estándar	95% Intervalo de Confianza		Mínimo	Máximo
						Límite Inferior	Límite Superior		
0 minutos	Agua	5	70.80	11.520	5.152	56.50	85.10	61	86
	Maltosa	5	63.60	8.503	3.803	53.04	74.16	54	74
	M+Acarbosa	5	62.40	5.771	2.581	55.23	69.57	55	69
	M+ELGS(0.08g/kg)	5	58.00	5.657	2.530	50.98	65.02	51	63
	M+ELGS(0.4g/kg)	5	56.00	4.637	2.074	50.24	61.76	50	63
	Total	25	62.16	8.726	1.745	58.56	65.76	50	86
30 minutos	Agua	5	75.80	8.289	3.707	65.51	86.09	67	85
	Maltosa	5	183.00	9.618	4.301	171.06	194.94	171	197
	M+Acarbosa	5	91.20	12.677	5.669	75.46	106.94	72	105
	M+ELGS(0.08g/kg)	4	111.75	15.196	7.598	87.57	135.93	92	129
	M+ELGS(0.4g/kg)	5	73.80	9.365	4.188	62.17	85.43	65	85
	Total	24	106.92	43.202	8.819	88.67	125.16	65	197
60 minutos	Agua	5	80.80	7.190	3.216	71.87	89.73	74	89
	Maltosa	5	152.60	7.893	3.530	142.80	162.40	143	163
	M+Acarbosa	5	108.60	6.656	2.977	100.34	116.86	101	119
	M+ELGS(0.08g/kg)	4	136.00	17.607	8.803	107.98	164.02	123	162
	M+ELGS(0.4g/kg)	4	128.75	15.370	7.685	104.29	153.21	111	147
	Total	23	120.39	27.998	5.838	108.28	132.50	74	163
90 minutos	Agua	5	78.80	7.190	3.216	69.87	87.73	70	87
	Maltosa	5	133.80	3.701	1.655	129.20	138.40	129	138
	M+Acarbosa	5	109.20	8.585	3.839	98.54	119.86	100	120
	M+ELGS(0.08g/kg)	4	127.75	8.732	4.366	113.86	141.64	117	138
	M+ELGS(0.4g/kg)	4	134.50	3.109	1.555	129.55	139.45	130	137
	Total	23	115.57	22.829	4.760	105.69	125.44	70	138
150 minutos	Agua	5	71.40	9.099	4.069	60.10	82.70	60	78
	Maltosa	5	93.80	8.012	3.583	83.85	103.75	85	104
	M+Acarbosa	5	93.60	9.290	4.155	82.07	105.13	80	106
	M+ELGS(0.08g/kg)	4	90.50	12.450	6.225	70.69	110.31	77	105
	M+ELGS(0.4g/kg)	5	94.80	10.780	4.821	81.42	108.18	85	107
	Total	24	88.75	12.868	2.627	83.32	94.18	60	107