



Universidad de la Sierra Sur

División de Estudios de Posgrado
Maestría en Salud Pública

**Generación de diterpenos hipoglucemiantes por métodos
enzimáticos y microbiológicos como alternativa terapéutica
para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2**

Tesis

Para obtener el grado de:

Maestro en Salud Pública

Presenta

Carlos Jonnathan Castro Juárez

Director de tesis

Dr. Nemesio Villa Ruano

Miahuatlán de Porfirio Díaz, Oaxaca junio de 2014.



Universidad de la Sierra Sur

División de Estudios de Posgrado
Maestría en Salud Pública

**Generación de diterpenos hipoglucemiantes por métodos
enzimáticos y microbiológicos como alternativa terapéutica
para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2**

Tesis

Para obtener el grado de:

Maestro en Salud Pública

Presenta

Carlos Jonnathan Castro Juárez

Director de tesis

Dr. Nemesio Villa Ruano

Tesis realizada gracias al apoyo otorgado a través de la beca 18327 gestionada por el proyecto CB-2010-151144Z del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

Miahuatlán de Porfirio Díaz, Oaxaca junio de 2014.

GENERACIÓN DE DITERPENOS HIPOGLUCEMIANTES POR MÉTODOS ENZIMÁTICOS Y MICROBIOLÓGICOS COMO ALTERNATIVA TERAPÉUTICA PARA EL TRATAMIENTO DE LA DIABETES MELLITUS TIPO 2

Tesis realizada por Carlos Jonnathan Castro Juárez, bajo la dirección del Comité Tutorial indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN SALUD PÚBLICA

Comité Tutorial:

Director Dr. Nemesio Villa Ruano

Asesor Dr. Sergio Alberto Ramírez García

Asesor Dr. Clemente Mosso González

GENERACIÓN DE DITERPENOS HIPOGLUCEMIANTES POR MÉTODOS ENZIMÁTICOS Y MICROBIOLÓGICOS COMO ALTERNATIVA TERAPÉUTICA PARA EL TRATAMIENTO DE LA DIABETES MELLITUS TIPO 2

El jurado revisó y aprobó el examen de grado de Carlos Jonnathan Castro Juárez autor de la presente tesis de Maestro en Salud Pública, estuvo constituido por:

Presidente: Dra. Claudia Chávez López _____

Secretario: Dr. Clemente Mosso González _____

Vocal: Dr. Nemesio Villa Ruano. _____

Suplente: M. C. Guillibaldo Gabriel Zurita Vázquez _____

Suplente: M. C. José Isaías Siliceo Murrieta _____

Dedicatoria

A Mis padres Séfora Graciela Juárez Sánchez y José Alfredo Castro Castro, por su amor, cariño y el gran apoyo que me han dado durante toda mi vida. Quiero que sepan que para mí son los mejores padres.

A mis hermanos, por su compañía y motivación para continuar siempre.

Especial dedicación a Sujey Xochitl por estar conmigo, apoyarme, y demostrarme todo su amor, ¡te amo mi vida!

A Dios, que me cuida siempre, me escucha las veces que lo necesito y sobre todo me da la fuerza para seguir adelante.

Carlos Jonnathan Castro Juárez

Agradecimientos

Me gustaría que estas líneas sirvan para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas e instituciones que con su ayuda han colaborado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo otorgado a través de la beca 18327 gestionada por el proyecto CB-2010-151144Z.

Especial reconocimiento merece Dr. Nemesio Villa Ruano en la realización del presente trabajo, por la orientación, el seguimiento y la supervisión continúa del mismo, pero sobre todo por la motivación y el gran apoyo recibido a lo largo de estos años.

Al interés mostrado por mi trabajo y las sugerencias recibidas de mis asesores Dr. Clemente Mosso González y Dr. Sergio Alberto García Ramírez. A la Universidad de la Sierra Sur por el apoyo otorgado para la realización de mis estudios. A todos los profesores que integran e integraron la Maestría de Salud Pública durante el tiempo que permanecí en sus aulas.

Carlos Jonnathan Castro Juárez

Resumen:

El ácido *ent*-kaurenoico (KA) es un diterpeno que ha mostrado interesantes propiedades hipoglucemiantes. Este trabajo presenta los resultados del uso de enzimas provenientes de semillas de dicotiledóneas de fácil acceso como *Phaseolus vulgaris*, *Cucurbita maxima* y *Vicia faba*, con el objetivo de obtener precursores que puedan ser metabolizados por la cepa INVSc1-PYESDEST52D+MtKO de *Saccharomyces cerevisiae*, una cepa modificada por ingeniería genética, la cual se utilizó posteriormente para generar activamente KA. Se presentan los resultados cualitativos y cuantitativos de la transformación de mevalonolactona comercial en geranilgeraniol, *ent*-kaureno e isokaureno, purificando por cromatografía en placa delgada (TLC) y una identificación sofisticada por cromatografía de gases usando detector de ionización por flama (GC-FID) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). De igual manera se determinó la producción de ácido *ent*-kaurenoico (KA) biotransformado por la cepa de levadura INVSC1-PYESDEST52D+MtKO a partir del *ent*-kaureno generado por estos sistemas. Los resultados logrados indican que *Cucurbita maxima* es una alternativa efectiva para obtener precursores de este compuesto hipoglucemiante, teniendo una eficiencia mayor al 60% en la producción de *ent*-kaureno. Por su parte, la cepa INVSC1-PYESDEST52D+MtKO fue capaz de metabolizar hasta un 91.3% del *ent*-kaureno generado por los sistemas anteriormente mencionados. Se concluye que el sistema biodirigido para la síntesis de KA (compuesto hipoglucemiante) es muy eficiente y es posible generar activamente el producto hipoglucemiante para fines terapéuticos futuros contra diabetes mellitus tipo 2 a partir de esta plataforma.

Palabras clave: endospermo, *ent*-kaureno, síntesis, ácido *ent*-kaurenoico, *Saccharomyces cerevisiae*.

Abstract:

Ent-kaurenoic acid (KA) is a diterpene that has shown interesting hypoglycemic properties. This dissertation presents the results of enzymatic assays by using total protein from the dicotyledonous seeds of *Phaseolus vulgaris*, *Cucurbita maxima* and *Vicia faba* with the objective to obtain diterpenic precursors that can be metabolized by INVSC1-PYESDEST52D+MtKO a genetically engineered strain of *Saccharomyces cerevisiae* able to actively produce KA. Here we present qualitative results for the transformation of commercial mevalonolactone into geranylgeraniol, *ent*-kaurene and isokaurene, which was followed by thin layer chromatography (TLC), gas chromatography-flame ionization detector (GC-FID) and mass spectrometry (GC-MS). According to our results, *Cucurbita maxima* was the most effective alternative for obtaining these diterpenic compounds, specially for the biosynthesis of *ent*-kaurene (> 60%). Simultaneously the INVSC1-PYESDEST52D+MtKO yeast strain was efficiently able to biotransform *ent*-kaurene into KA (>91%). It is concluded that the bio-engineered synthesis of KA (hypoglycemic diterpene) is very efficient and justifies its use as a promising tool for scale their production in order to be further used in the treatment of type 2 diabetes mellitus.

Keywords: endosperm, *ent*-kaurene synthesis, *ent*-kaurenoic acid, *Saccharomyces cerevisiae*.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Págs.
1. INTRODUCCIÓN -----	1
1.1. Definición de Diabetes Mellitus tipo 2 -----	5
1.2. Epidemiología de la Diabetes Mellitus tipo 2 -----	7
1.3. Hipótesis etiológica de la Diabetes Mellitus tipo 2 (relación entre factores ambientales y genéticos) -----	9
1.4. Bases fisiopatológicas de la Diabetes Mellitus tipo 2 -----	14
1.5. Factores epidemiológicos de riesgo -----	18
2. HIPOGLUCEMIANTES ORALES -----	20
3. PLANTAS MEDICINALES UNA OPCIÓN PARA EL TRATAMIENTO DE LA DIABETES MELLITUS TIPO 2 -----	26
4. BIOTECNOLOGÍA EN LA SALUD -----	27
4.1. En busca de nuevos agentes hipoglucemiantes: Ácido <i>ent</i> -Kaurenoico (KA) -----	36
5. JUSTIFICACIÓN -----	39
6. HIPÓTESIS -----	40
7. OBJETIVOS -----	40

	Págs.
7.1. Generales -----	40
7.2. Específicos -----	40
8. MATERIAL Y MÉTODOS -----	41
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN -----	45
10. CONCLUSIONES -----	61
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	63
 ANEXOS	
Curva de calibración para determinar proteína total, utilizando lipasa pancreática porcina -----	73
Curvas de calibración por GC-FID y GC-MS para Geranilgeraniol, <i>ent</i> -Kaureno e Isokaureno -----	74

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

	Págs.
Figura 1. Esperanza de vida en México -----	3
Figura 2. Principales causas de defunción entre las personas de 60 años o más según género, año 2000 -----	4
Figura 3. Principales causas de muerte en el adulto mayor durante el 2010 -----	5
Figura 4. Incidencia de Diabetes Mellitus en el año 2010 por grupo de edad a Nivel nacional -----	8
Figura 5. Incidencia de Diabetes Mellitus en el año 2010 por grupo de edad en Oaxaca -----	9
Figura 6. Deterioro de la célula β y el desarrollo de la Diabetes Mellitus tipo 2 -----	14
Figura 7. Etiología de la Diabetes Mellitus tipo 2 -----	19
Cuadro 1. Diferencias de prevalencias de Diabetes Mellitus en grupos étnicos de 1987 a 1997 -----	20
Cuadro 2. Grupo farmacológico en el tratamiento de la Diabetes Mellitus tipo 2, mecanismos de acción, ventajas y desventajas -----	22

	Págs.
Figura 8. Esquema representativo del procedimiento general para la obtención de fitofármacos por medios de ingeniería genética metabólica -----	35
Figura 9. Estructura química del ácido <i>Ent</i> -Kaurenoico y sus precursores <i>Ent</i> -Kaureno, Geranilgeranil pirofosfato y Geranilgeraniol -----	38
Cuadro 3. Número de mediciones de lipasa pancreática de puerco por el método colorimétrico de Bradford -----	47
Cuadro 4. Determinación de cantidad de proteína total por especie -----	48
Figura 10. Ensayos enzimáticos, concentración y cromatografía de las fracciones hexánicas de los extractos proteicos en las tres especies -----	49
Figura 11. Identificación cualitativa de geranilgeraniol en extractos hexánicos de <i>Cucurbita maxima</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i> y <i>Vicia faba</i> -----	50
Figura 12. Identificación cualitativa de <i>ent</i> -kaureno en extractos hexánicos de <i>Cucurbita maxima</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i> y <i>Vicia faba</i> -----	50
Figura 13. Cromatograma usando un detector de ionización por flama (FID) de los compuestos Geranilgeraniol, <i>ent</i> -kaureno e isokaureno -----	51

	Págs.
Figura 14. Identificación cualitativa de <i>ent</i> -kaureno y geranilgeraniol en extractos hexánicos de <i>Cucurbita maxima</i> por cromatografía de gases usando un detector de ionización por flama (FID)	52
Figura 15. Identificación cualitativa de <i>ent</i> -kaureno y geranilgeraniol en extractos hexánicos de <i>Phaseolus vulgaris</i> por cromatografía de gases usando un detector de ionización por flama (FID)	53
Cuadro 5. Producción de <i>ent</i> -kaureno mediante la conversión de 6 mg de mevalonolactona comercial usando proteína total de endospermo de semillas de calabaza, frijol y haba	55
Cuadro 6. Producción de isokaureno mediante la conversión de 6 mg de mevalonolactona comercial usando proteína total de endospermo de semillas de calabaza, frijol y haba	55
Cuadro 7. Producción de geranilgeraniol mediante la conversión de 6 mg de mevalonolactona comercial usando proteína total de endospermo de semillas de calabaza, frijol y haba	55

	Págs.
Figura 16. Crecimiento de la cepa INVSc1--PYESDEST52D-MTKO de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> con glucosa y galactosa sin la presencia de la base nitrogenada uracilo y con <i>ent</i> -kaureno (muestra) y sin <i>ent</i> -kaureno (control) -----	57
Figura 17. Verificación por TLC de las reacciones de <i>ent</i> -kaureno a ácido <i>ent</i> -kaurenoico por la cepa INVSc1--PYESDEST52D-MTKO de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -----	58
Figura 18. Detección de ácido <i>ent</i> -kaurenoico (KA) mediante GC-MS, mostrando el espectro de masas silanizado -----	59
Cuadro 8. Producción de ácido <i>ent</i> -kaurenoico (KA) biotransformado a partir de <i>ent</i> -kaureno por la cepa de levadura INVSC1-PYESDEST52D+MtKO a distintas concentraciones -----	60
Figura 19. Producción de ácido <i>ent</i> -kaurenoico (KA) por la cepa de levadura INVSC1--PYESDEST52D+MtKO ante la adición de distintas concentraciones de <i>ent</i> -kaureno. Las barras representan la desviación estándar de experimentos hechos por quintuplicado -----	60