



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

**Reconocimiento Molecular de los Hipoglucémicos
(Acarbosa, Metformin) y su Receptor a
Nivel Molecular**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

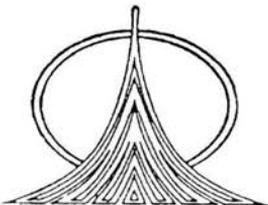
P R E S E N T A :

GABRIELA LÓPEZ OLVERA

DIRECTOR DE TESIS: DR. MANUEL SORIANO GARCIA

ASESOR:

Q.I. ANGEL PAVON LARA



MÉXICO, D.F. 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTA TESIS FUE REALIZADA EN EL INSTITUTO DE QUÍMICA UNAM, CON LA DIRECCIÓN DEL DR. MANUEL SORIANO GARCÍA, EN EL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA 2. Y DURANTE EL DESARROLLO SE CONTÓ CON EL APOYO ECONÓMICO POR MEDIO DE UNA BECA DEL *CONOCYT* NO. EXP. 780 DEL SISTEMA NACIONAL DE INVESTIGADORES.

AGRADECIMIENTOS

A mis profesores, por transmitir sus conocimientos y dedicación a mi formación profesional y muy especialmente a aquellos que se preocupan por la actualización en la carrera; lo cual nos permite a nosotros el desarrollo profesional con la mejor formación.

A mi director de tesis por permitir la visualización a nuevos campos de trabajo y la aplicación de los mismos.

A mi asesor de tesis por la dedicación, la aportación, la confianza y la entrega a la formación de nuevos profesionistas.

A mi familia por apoyarme a llegar a uno de mis objetivos mas valiosos en la vida una formación profesional.

A mis amigos por estar conmigo en los momentos mas difíciles y en los mejores de mi vida profesional.

A todos los encargados de los estudios espectroscópicos en el Instituto de química UNAM.

A mis sinodales:

Dr. Manuel Soriano García
Q.I. Ángel Pavón Lara
M. en C. Rosalinda Escalante Pliego
M. en F. Leticia Cruz Antonio
Q.F.I. Estela Valencia Plata.

Abreviaturas y programas.

- Arg: arginina
- ASP: ácido aspártico
- BIGGER, programa que interacciona proteína-proteína, la representación de la superficie es 3D grid y el scoring es por minimización electrostática y energía de solvatación.
- BUDDA, programa que utiliza algoritmo de características de superficie local, para todas las moléculas y su representación de superficie es Connolly & Lin Ms tiene flexibilidad implícita y busca la complementariedad.
- DOCK, programa que utiliza algoritmo de características de superficie local, para todas las moléculas y su representación de superficie es Connolly Ms y la función del scoring o puntajes es por campo de fuerza AWBER.
- D-Rx. Difracción de rayos x
- GLUT 4. Transportadores de la glucosa
- GLU: ácido glutámico
- GOLD, programa que interacciona fármaco-proteína, la representación de la superficie binaria, representación de ángulos y puentes de hidrógeno y el scoring es energías internas del ligando, fuerzas de van der Waals y puentes de hidrógeno.
- GRASP: Molecular surface Viewer, Graphical representation and Analysis of surface properties Ver. 1.04 Antony Nicolls 1992.
- HEX, programa que interacciona proteína-proteína, la representación de la superficie es esférica armónica y el scoring es por minimización electrostática.
- Homología: semejanza de origen entre dos estructuras que pueden tener una función y un aspecto diferentes.
- Ile: isoleucina
- IR: espectro de infrarrojo
- m/z : relación masa carga.
- Mercury: Crystal structure visualization and exploration Ver 1.1.2 Copyright CCDC 2001.
- PPD, programa que utiliza algoritmo de características de superficie local, para todas las moléculas y su representación de superficie es Connolly Ms y la función del scoring o puntajes es por complementariedad electrostática.
- Phe: fenilalanina
- Pymol: software version 0.93 Delano scientific
- QUANTA - macromolecular crystallography and protein modeling software from Accelrys. Runs on UNIX workstations.
- RI: Receptor insulínico
- RMN: resonancia magnética nuclear.
- RMN H⁺: Espectro de resonancia magnética nuclear de proton
- RMN C¹³: Espectro de resonancia magnética nuclear de carbono
- SHELX-97 ver 5.1 1998 SIEMS.
- SOFTDOCK. programa que interacciona proteína-proteína, la representación de la superficie es Connolly Ms 3d grid y el scoring es mediante complementariedad normal átomo-átomo.
- Tyr: tirosina

Introducción	1
1. Marco teórico	5
1.1 Diabetes mellitus	5
1.1.1 Estadísticas	5
1.1.2 Definición	6
1.1.3 Tipos de diabetes	7
1.1.4 Complicaciones	8
1.1.5 Tratamiento	9
1.2 Diseño de Fármacos	15
1.2.1 Métodos tradicionales	15
1.2.1.1 Búsqueda del compuesto líder	15
1.2.1.2 Sustitución bioisostérica	17
1.2.1.3 Modulación molecular	17
1.2.2 Métodos computacionales	19
1.2.2.1 Técnica REA o modelación molecular	20
1.2.2.2 Técnica REAC	21
1.2.2.3 Reconocimiento molecular	22
2. Planteamiento del problema	26
3. Objetivo	27
4. Hipótesis	27
5. Método	28
5.1 Aislamiento y purificación	29
5.2 Caracterización espectroscópica	29
5.3 Resolución de la estructura	30
5.4 Reconocimiento molecular	31
6. Resultados y discusión	32
6.1 Resultados de metformin	32
6.1.1 Aislamiento y cristalización	32
6.1.2 Caracterización	33
6.1.2.1 Espectro IR	33
6.1.2.2 Espectro de RMN H^1	34
6.1.2.3 Espectro de RMN C^{13}	35
6.1.2.4 Espectro de masas	36
6.1.3 Resolución de la estructura por rayos X	37
6.1.4 Reconocimiento molecular	46
6.2 Resultados de la acarbosa	64
6.2.1 Aislamiento y cristalización	64
6.2.2 Caracterización	65

6.2.2.1 Espectro IR	65
6.2.2.2 Espectro de RMN H ¹	66
6.2.2.3 Espectro de RMN C ¹³	67
6.2.2.4 Espectro DEPT	68
6.2.2.5 Espectro HETCOR	69
6.2.2.6 Espectro de masas	70
6.2.3. Estudio de flexibilidad	71
6.2.4 Reconocimiento molecular	74
7. Conclusiones	78
8. Perspectivas	80
9. Bibliografía	81

Introducción

En esta primera sección se tratarán de manera breve los siguientes aspectos: Antecedentes históricos del fármaco o medicamentos, modelos, etapas de desarrollo, descubrimiento, el efecto costo beneficio, la importancia de las bases biológicas de la enfermedad, la estructura molecular y la obtención de nuevos fármacos. Con la finalidad de presentar un panorama general del trabajo.

La historia del medicamento se remonta a los orígenes de la sociedad humana. Desde los primeros tiempos el hombre acudido a la naturaleza para obtener sustancias que le ayudaran a disminuir su dolor, los síntomas de sus enfermedades o bien le facilitarían la obtención del alimento (veneno para la caza), sus relaciones sociales y religiosas (estimulantes y alucinógenos) etc. Los principios activos descubiertos empíricamente y utilizados sin conocer el compuesto responsable de la actividad farmacológica, ahora, gracias a las técnicas de análisis y determinación estructural es posible conocer con gran precisión la porción de la misma a la que se debe la actividad. A esta primera molécula, conocida como *molécula líder* se le pueden hacer modificaciones que mejoren su actividad y limite sus efectos nocivos. Estas circunstancias han permitido disponer de una amplia información, que sometida a la observación atenta y estudio crítico, ha dado lugar al planteamiento de ideas que, debidamente desarrolladas, han llevado a la obtención de nuevos medicamentos con sustancias líderes.

Emplear productos naturales es un punto de partida para el desarrollo de medicamentos. La historia previa es la causa de que en la actualidad el modelo de aproximadamente la mitad de los productos de que se disponen sean de origen natural. Modelos que han sufrido diferentes modificaciones en el laboratorio, encaminadas a obtener moléculas más potentes y menos tóxicas que las originales, las cuales en realidad no habían sido diseñadas para un tratamiento específico.

El descubrimiento y desarrollo posterior de un nuevo medicamento, son dos fases, que condicionan el logro de un nuevo producto que sea útil en la terapéutica. El desarrollo de un medicamento comprende desde la obtención del principio activo por síntesis aislamiento natural o por biotecnología hasta estudios de fase preclínica y toxicológica, de tal manera que nos confirmen, que el compuesto es aceptable en cuanto a eficacia y seguridad para su ensayo en seres humanos para obtener un nuevo medicamento.

La fase de descubrimiento, o sea desde la obtención hasta la primera aplicación en humanos, estima un tiempo de aproximadamente 42,6 meses (3,55 años) como promedio, en aquellos países y transnacionales farmacéuticas con una amplia infraestructura investigativa. En países con un nivel menor de desarrollo esta fase alcanza aproximadamente unos 5-6 años.

La fase de desarrollo comprende los estudios clínicos y los del registro farmacéutico, y se estima duren entre 68.6 meses y 30.3 meses respectivamente. Todo este largo proceso, desde su obtención hasta su registro comprende un total de 10-15 años de investigación, con un costo promedio de 500 000 000 de dólares por cada nuevo medicamento que se encuentre en el mercado¹.

Sólo una de cada 10 000 moléculas ensayadas pasa a la fase de desarrollo, una de cada 100 000 supera los ensayos clínicos y logra registrarse y sólo 3 de cada 10 nuevos medicamentos registrados recupera su inversión inicial. Esto es un punto importante en el que se debe poner atención, que por cada millón de moléculas que se inician en esta larga cadena para la obtención de un nuevo medicamento, sólo tres recuperen la inversión inicial. Por tal motivo el diseño racional de fármacos, constituye una herramienta casi indispensable en el desarrollo actual de nuevos medicamentos, contribuyendo al aumento de las posibilidades de éxitos y a la disminución de los costos¹.

El desarrollo de medicamentos cada vez más seguros, adecuados y efectivos en el tratamiento de las enfermedades, es una tarea que requiere del esfuerzo coordinado e inteligente de un elevado número de profesionales de distinta formación y dedicación, en la que la capacidad de deducción y en muchos casos, el azar, han jugado un papel fundamental. Reconociendo la importante contribución del azar en el resultado positivo de este esfuerzo, es preciso matizar que su base está sólidamente anclada en un diseño inteligente y racional ya que si sólo se acude al azar, nunca se obtendrán medicamentos eficaces y seguros.

Si se conoce la base biológica de una enfermedad o de un trastorno metabólico, es posible diseñar un medicamento, utilizando un mecanismo de aproximación al proceso patológico. Cuando se conoce el proceso a nivel molecular y se pueden definir las moléculas implicadas en el mismo, es posible desarrollar compuestos que interactúen con el sitio receptor responsable y de esta manera los compuestos desarrollados servirán de guía para el desarrollo de nuevos fármacos².

Para conocer el proceso fisiológico a nivel molecular, es necesario determinar la estructura tridimensional del sitio de acción o receptor, lo cual muy pocas veces es posible, sobre todo por la dificultad de obtener a los receptores en estado cristalino. Con este propósito los métodos espectroscópicos más utilizados son la resonancia magnética nuclear, la cristalografía de rayos X y los estudios teóricos de la estructura del receptor empleando las aproximaciones de la mecánica molecular o dinámica molecular².

La **obtención de nuevos fármacos** se basa actualmente en cuatro estrategias:

- a) La mejora de fármacos ya existentes haciendo modificaciones a la molécula.
- b) La valoración biológica sistemática del conjunto de sustancias de origen diverso en ensayos biológicos determinados sin que existan hipótesis previas sobre su potencial farmacológico o terapéutico.

c) El aprovechamiento de información biológica obtenida de la observación de fenómenos metabólicos en el hombre, los animales e incluso en las plantas y microorganismos, con las que se puede extrapolar la acción terapéutica.

d) El diseño racional de fármacos, basado en el conocimiento a nivel molecular de una situación patológica.

1. Marco teórico

1.1 Diabetes Mellitus

1.1.1 Estadísticas de índice de mortalidad en México.

Con la finalidad de ilustrar las enfermedades mas frecuentes del país se presentan los datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha calculado que en la actualidad existen más de 150 millones de diabéticos en el mundo y que esta cifra podría duplicarse en el 2025.³ Este fenómeno se atribuye principalmente, además de a varios factores genéticos, al hecho que los humanos hemos cambiado significativamente nuestro estilo de vida. Actualmente en nuestra dieta incluimos muchos alimentos ya preparados, ricos en carbohidratos y grasas. En México el índice de defunción debido la diabetes ocupa el tercer lugar según la información del INEGI (Figura1).

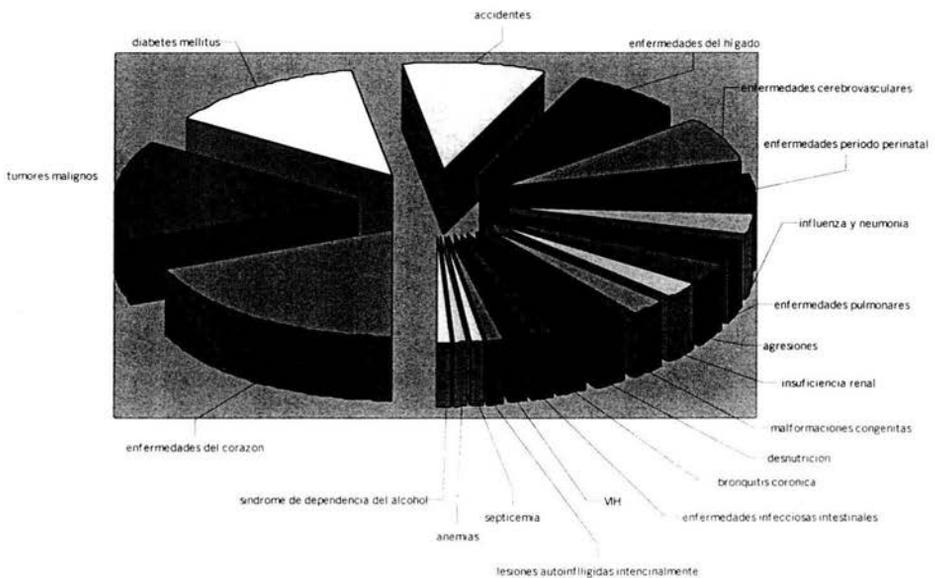


Figura 1. Estadística de mortalida hospitalaria para 2001 INEGI.

1.1.2 Definición

De acuerdo con la información presentada en el apartado anterior la diabetes es una enfermedad importante a nivel nacional por lo que se decidió utilizarla como modelo de estudio.

Diabetes, es la enfermedad sistémica, crónico-degenerativa, de carácter heterogéneo, con grados variables de predisposición hereditaria y con la participación de diversos factores ambientales, y que se caracteriza por hiperglucemia crónica debido a la deficiencia en la producción o acción de la insulina, lo que afecta al metabolismo intermedio de los carbohidratos, proteínas y grasas, la diabetes Tipo 1, es el tipo de enfermedad en la que existe la destrucción de células beta del páncreas, generalmente con la deficiencia absoluta de insulina. La diabetes tipo 2, es el tipo de enfermedad en la que hay capacidad residual de secreción de insulina, pero sus niveles no superan la resistencia a la insulina concomitante, insuficiencia relativa de secreción de insulina o cuando coexisten ambas posibilidades y aparece la hiperglucemia.⁴

Las concentraciones de glucosa en sangre varían durante el día. Aumentan después de cada comida, recuperándose los valores normales al cabo de 2 horas. Éstos se sitúan entre 70 y 110 mg/dl de sangre por la mañana después de una noche de ayuno normal, después de 2 horas de la ingestión de alimentos o líquidos que contengan azúcar u otros hidratos de carbono resultando mayores de 120 a 140 mg/dl. Los valores normales tienden a aumentar ligeramente y de modo progresivo después de los 50 años de edad, sobre todo en las personas que llevan una vida sedentaria. Los primeros síntomas de la diabetes se relacionan con los efectos directos de la alta concentración de azúcar en sangre.⁴ Cuando este valor aumenta por encima de los 160 a 180 mg/dl, la glucosa pasa a la orina. Cuando el valor es aún más alto, los riñones secretan una cantidad adicional de agua para diluir las grandes cantidades de glucosa perdida. Dado que producen orina excesiva, se eliminan grandes volúmenes de orina (poliuria), y en

consecuencia, aparece una sensación anormal de sed (polidipsia). Asimismo, debido a que se pierden demasiadas calorías en la orina, se produce una pérdida de peso y, a modo de compensación, la persona siente a menudo un hambre exagerada (polifagia). Otros síntomas comprenden visión borrosa, somnolencia, náuseas y una disminución de la resistencia durante el ejercicio físico. Por otra parte, si la diabetes está mal controlada, los pacientes son más vulnerables a las infecciones. A causa de la gravedad del déficit insulínico, es frecuente que en los casos de diabetes tipo 1 se pierda peso antes del tratamiento. En cambio, no sucede lo mismo en la diabetes tipo 2.^{5,3}

1.1.3 Tipos de diabetes.

En términos generales se distinguen dos tipos de diabetes: 1 y 2. En la diabetes tipo 1 también conocida como juvenil, el sistema inmune destruye las células que secretan la insulina, lo que produce extrema deficiencia de insulina y hace necesario inyectarse esta hormona de manera regular, como terapia de reemplazo, por lo que también se conoce como la diabetes dependiente de insulina. La diabetes tipo 2 también conocida como la del adulto es más frecuente, el 90% de los casos de la enfermedad corresponden a este tipo. Así en el tipo 2, la manifestación primaria consiste en que las células del hígado, del tejido graso y de los músculos, entre otros, dejan de responder apropiadamente a la insulina, lo cual se conoce como resistencia a la insulina. Lo anterior ocasiona que el nivel de glucosa en la sangre permanezca siempre alto, estimulando a las células secretoras de insulina a secretarla continuamente, hasta que estas células se averían y dejan de producir la hormona en cantidades suficientes.⁵

La insulina es, una hormona producida por el páncreas, y es la principal sustancia responsable del mantenimiento de los valores adecuados de azúcar en sangre. Esta macromolécula permite que la glucosa sea transportada al interior de las células, de modo que éstas produzcan energía o almacenen la glucosa hasta que su utilización sea necesaria. La elevación de las concentraciones de azúcar

en sangre después de comer o beber estimula el páncreas para producir la insulina, la cual evita un mayor aumento de los valores de azúcar y provoca su descenso gradual. Dado que los músculos utilizan glucosa para producir energía, los valores de azúcar en la sangre también disminuyen durante la actividad física.⁴

1.1.4 Complicaciones de la diabetes.

La diabetes produce complicaciones serias que incluye daño a los riñones, al corazón, ceguera, problemas por falta de sensibilidad al dolor y mala circulación e infecciones, que en ocasiones daña a los miembros inferiores hasta causar su amputación. A medida que el trastorno se desarrolla, las concentraciones elevadas de azúcar en la sangre lesionan los vasos sanguíneos, los nervios y otras estructuras internas. Sustancias complejas derivadas del azúcar se acumulan en las paredes de los pequeños vasos sanguíneos, provocando su engrosamiento y rotura. El aumento de grosor es la causa de que los vasos sanguíneos aporten cada vez menos sangre, sobre todo a la piel y a los nervios. Los valores de azúcar poco controlados tienden también a aumentar las concentraciones de grasas en la sangre, y en consecuencia, se produce una arteriosclerosis acelerada (formación de placas en los vasos sanguíneos). La arteriosclerosis es de dos a seis veces más frecuente en los diabéticos que en los no diabéticos y se producen ambos sexos. La disminución de la circulación sanguínea, tanto por los vasos grandes como por los pequeños, puede provocar alteraciones fisiológicas en el corazón, el cerebro, las piernas, los ojos, los riñones, los nervios y la piel, retardando además, la curación de las lesiones.^{6,7}

Tabla 1. Complicaciones de la diabetes a largo plazo.

Tejido u órgano afectado	Qué sucede	Complicaciones
Vasos sanguíneos	Se forman placas ateroscleróticas y obstruyen las arterias medianas o grandes del corazón, cerebro, piernas. Las paredes se dañan de tal modo que los vasos no permiten el paso normal del oxígeno a los tejidos y además pueden romperse y perder sangre.	La escasa circulación causa heridas que sanan con dificultad y pueden producir insuficiencia cardíaca, gangrena en los pies y manos, e infecciones
Ojos	Los pequeños vasos de la retina se dañan	Visión disminuida y finalmente ceguera
Riñón	Los vasos sanguíneos del riñón se engrosan, las proteínas se pierden por la orina, la sangre no se filtra normalmente.	Funcionamiento renal deficiente, deficiencia renal.
Sistema nervioso autónomo	Daño en los nervios que controlan la presión arterial y los procesos digestivos.	Oscilaciones en la presión arterial, dificultades en la deglución y alteraciones del funcionamiento gastrointestinal con episodios de diarrea.
Nervios	Los nervios se dañan porque la glucosa no es metabolizada normalmente y porque el suministro de sangre es inadecuado.	Debilidad repentina o gradual de una pierna, sensibilidad reducida, hormigueo y dolor en las manos y pies, daño crónico a los nervios.
Piel	Mala circulación de la sangre en la piel y pérdida de sensibilidad como resultado de lesiones repetidas.	Llagas, infecciones profundas (úlceras diabéticas) curación muy difícil.
Sangre	Se deteriora el funcionamiento de los glóbulos blancos.	Aumento a la propensión a las infecciones, especialmente al tracto urinario y a la piel.
Tejido conjuntivo.	Metabolismo anormal de la glucosa, haciendo que los tejidos se engrasen y contraigan.	Síndrome del túnel carpiano

1.1.5 Tratamiento.

El objetivo principal del tratamiento de la diabetes es mantener los valores de azúcar en la sangre dentro de los valores normales tanto como sea posible. Aunque es difícil mantener valores completamente normales, se debe intentar que

estén en lo posible cerca de la normalidad para que sea menor la probabilidad de complicaciones, ya sean temporales o a largo plazo. El principal problema al tratar de controlar rigurosamente los valores de azúcar en la sangre, es que se produzca una disminución no deseada de los mismos (hipoglucemia).

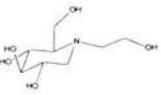
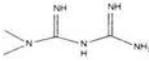
El tratamiento de la diabetes requiere el control de peso, ejercicios y dieta. En muchos casos de diabetes tipo 2, la administración de fármacos no sería necesaria si los pacientes obesos perdieran peso e hicieran ejercicio con regularidad. Sin embargo, reducir el peso y aumentar los ejercicios es difícil para la mayoría de los diabéticos. Por consiguiente, con frecuencia es necesario recurrir a una terapia sustitutiva o bien un tratamiento oral con hipoglucemiantes. El ejercicio favorece el descenso directo de las concentraciones de azúcar en la sangre y reduce la cantidad necesaria de insulina.⁷

La dieta es muy importante. En general, los diabéticos no deberían comer demasiados alimentos dulces y tendrían que regular sus comidas con un programa uniforme. Sin embargo, comer un bocadillo antes de ir a dormir o durante la tarde evita a veces la hipoglucemia en las personas que se inyectan una insulina de acción intermedia por la mañana o por la tarde. Dado que las personas con diabetes tienen también tendencia a presentar valores altos de colesterol, los dietistas generalmente recomiendan limitar la ingestión de grasas saturadas.

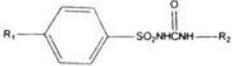
En la actualidad, el médico cuenta con diversas opciones en el tratamiento inicial del paciente con diabetes tipo 2. Los medicamentos que pueden utilizarse para el control de la diabetes son sulfonilureas, biguanidas, insulinas o las combinaciones de estos medicamentos. Asimismo, se podrán utilizar los inhibidores de la alfa glucosidasa, tiazolidinedionas y otros que en su momento sean aprobados por la Secretaría de Salud.⁸ Su empleo es necesario cuando la dieta y el ejercicio no son suficientes para alcanzar las metas del tratamiento.

La mayoría de los pacientes con diabetes tipo 2 reciben una o varias sulfonilureas: tolbutamida, clorpropamida, glibenclamida, glipizida, glicazida, glimepirida en alguna etapa del tratamiento de la diabetes. Las sulfonilureas reducen la glucemia al estimular la secreción de insulina.^{9,10} La tabla 2 muestra los diferentes agentes hipoglucemiantes, su nombre comercial y su mecanismo básico de acción, para tener una información de los diferentes medicamentos y moléculas utilizadas para el tratamiento de la enfermedad.⁷

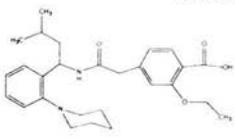
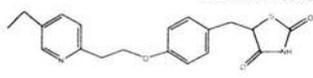
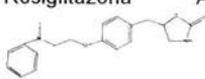
Tabla 2. Agentes Hipoglucémiantes.

AGENTE	NOMBRE COMERCIAL	MECANISMO DE ACCIÓN BÁSICO
INHIBIDORES DE LAS α GLUCOSIDASAS		
Acarbosa	Glucobay Glumida	
		inhibidor competitivo de las α glucosidasas intestinales, que intervienen en la degradación de los oligo, di y polisacáridos, retrasa y reduce el aumento postprandial de la glucemia.
Miglitol	Diastabol Plumarol	
		inhibidor competitivo de las α glucosidasas intestinales, que intervienen en la degradación de los oligo, di y polisacáridos, retrasa y reduce el aumento postprandial de la glucemia.
BIGUANIDAS		
Metformin	Gliformin Glucaminol Glucophage	Reduce la producción hepática de glucosa por inhibición de la gluconeogenesis, indicada en pacientes obesos, nunca produce hipoglu-
	Diaben	cemia y su mecanismo aun no se conoce exactamente.
Phenformin Buformina	Fuera del mercado (produce acidosis láctica)	

Continuación tabla 2. Agentes hipoglucemiantes

AGENTE	NOMBRE COMERCIAL	MECANISMO DE ACCIÓN BÁSICO
SULFONILUREAS		
		
Glibenclamida	Euglacagon Glibenclamida Gilbens Daonil Norglicem	incrementa la secreción de la insulina preformada en las células β pancreáticas
		
Glibuzol		
		
Glimepirida	Amaryl Glimepiridina Glimerid Roname	
		
Glipizida	Minodiabat	Regula la secreción de la insulina mediante el canal de potasio sensible al ATP, en la membrana β .
		
Gliquidona		
Glipentide		
Metahexamida		
Tolazamida		
Tolbutamida		
Gluburida		

Continuación tabla 2. Agentes hipoglucemiantes

AGENTE	NOMBRE COMERCIAL	MECANISMO DE ACCIÓN BÁSICO
MEGLITINONAS		
Replaglinida	Prandin Novonorm	
		Produce una liberación postpandrial de la insulina a través de un receptor diferente a la de la sulfonilureas tienen un menor riesgo de hipoglucemias.
Neteglinida	Starlix	
TIAZONILEDIONAS		
Pioglitazona	Actos clorhidrato de pioglitazona	
		medicamento básico del sector salud
Rosiglitazona	Avandia	
		Mejora en la sensibilidad de la insulina y tejido adiposo inhibe la gluconeogenesis hepática y su actividad es menor a la de las sulfonilureas o metformin su principal indicación sería cuando fracasan las anteriores

De este grupo de moléculas presentadas en la tabla 2 se estudiaron dos agentes hipoglucémiantes, una del grupo de las alfa-glucosidasas (Acarbosa) y una de las Biguanidas (Metformin).

La acarbosa (Precose, Bayer, West Haven, Connecticut). Es un inhibidor de la α - glucosidasa introducido comercialmente en 1990 bajo el nombre de Glucobay.¹¹ Es el primero de una nueva clase de fármacos antigluceimiantes. La acarbosa es un complejo pseudoligosacárido de origen microbiano. Inhibe completamente la capacidad de las α -glucosidasas, se encuentra en los bordes de los cilios del intestino, particularmente su acción es reversible y competitiva.¹⁰ Retrasa la absorción de glucosa por disminución de los procesos de absorción / digestión, retardando la entrada de la glucosa en el sistema circulatorio,

permitiendo que las células β tengan el suficiente tiempo para aumentar la secreción de insulina en respuesta de la presencia de glucosa. La acarbose no revierte ninguna anomalía fisiopatológica en pacientes con diabetes tipo 2.^{7,11,15}

Los azúcares no digeridos alcanzan el colon, donde las bacterias los metabolizan. Los inhibidores de α -glucosidasas generalmente se emplean en terapia combinada.

Las Biguanidas; metformin (Glucopage, Bristol-Myers Squibb, Princeton, NJ), una biguanida que ha sido utilizada clínicamente por 40 años, introducida desde 1995.¹¹ Las biguanidas son los fármacos de primera elección en pacientes obesos con diabetes tipo 2, con poco tiempo de evolución.^{4,8} Estas moléculas reducen la resistencia a la insulina y no tienen efecto sobre la excreción de la hormona. Su actividad hipoglucemiante se debe a dos mecanismos. Primero la inhibición de la producción de glucosa en el hígado y segundo aumenta la utilización de la glucosa en el tejido muscular, estimulando el almacenamiento de glucosa en glucógeno. En este grupo se incluyen dos fármacos: metformin y fenformin (este último a sido recientemente retirado del mercado debido a que produce acidosis láctica).¹⁰

El metformin aumenta la sensibilidad a la insulina en tejidos como el hepático y el periférico (músculo primario) disminuyendo la glucosa hepática, aumenta la sensibilidad del músculo a la insulina a través de efectos directos e indirectos, mejorando la acción de la insulina en el músculo y esto se explica por múltiples acciones, incluyendo el incremento en los receptores de la insulina y la actividad del receptor cinasa de tirosina, Aumentando el número y actividad de transportadores GLUT 4 y aumentando la síntesis de glucógeno. Sin embargo el receptor primario en el que actúa el metformin ejerce sus efectos benéficos en músculo e hígado pero sin embargo se desconoce.^{10,15}

Recientemente se han introducido varios medicamentos hipoglucemiantes en el mercado como las tiazolidindionas, nateglinida y epaglinida. Su mecanismo de acción es distinto al resto de los hipoglucemiantes, estos compuestos activan una familia de proteínas receptoras que están localizadas preferentemente en las células del tejido adiposo.⁴

1.2 Diseño de Fármacos

Existen diferentes métodos empleados en el desarrollo de un fármaco en la actualidad, podemos ver desde los métodos tradicionales hasta los más avanzados basados en los estudios teóricos computacionales.²

1.2.1 Métodos tradicionales

Métodos variacionales.

1.2.1.1 Búsqueda del compuesto líder o cabeza de una serie.

Aunque en la búsqueda de un compuesto líder se pueden aplicar varios métodos los más empleados son:

- *El empleo de productos activos presentes en fármacos utilizadas en la medicina tradicional
- * Estudio de nuevos compuestos de la síntesis química o de la biotecnología.

Ambos métodos requieren de la existencia previa de un amplio desarrollo de ensayos biológicos cuidadosamente diseñados, que permitan determinar con rapidez y de manera inequívoca la actividad biológica de los nuevos compuestos.

En el caso de estudios de compuestos empleados en la medicina tradicional, resulta fácil, en principio, el diseño de la prueba biológica, ya que se cuenta con información previa de la actividad prevista; se trata de comprobar

simplemente de manera científica el empleo popular. Sin embargo, cuando se desconoce la posible actividad, la batería de ensayos ha de ser lo suficientemente amplia, en el intento de no perder ninguna información interesante. Lamentablemente los costos asociados a este tipo de estudios hacen que estos se vean limitados en número y en el espectro de acciones biológicas.

Otras vías de obtener un compuesto líder o cabeza de serie son:

-Aislamiento de los productos responsables de una acción biológica determinada y su posterior identificación y caracterización. Esto se cumple fundamentalmente en productos naturales que no han sido reconocidos por el hombre.

-Detección y observación de efectos secundarios o acciones biológicas inesperadas durante el empleo de compuestos activos.

-Por observación del metabolismo de los compuestos. En ocasiones, algunos de los metabolitos de un fármaco presentan una actividad superior o diferente a la del propio fármaco de partida.

-El análisis de la actividad biológica de productos intermedios de la síntesis de un fármaco.

A estas informaciones se le pueden unir las informaciones obtenidas a partir del estudio del mecanismo de acción de los compuestos, así como consideraciones relativas a la bioquímica de la enfermedad y procesos del organismo enfermo sobre el cual van a actuar los productos.

Posteriormente se lleva a cabo la Variación Molecular, como finalidad de esta técnica se pueden distinguir:

-Mejorar de la potencia del líder.

-Eliminar efectos secundarios no deseados.

-Potenciar las acciones secundarias deseadas, ya sea por complemento sinérgico a la acción principal o por sí misma.

-Separar las actividades en compuestos multiacción.

Tiene como objetivo potenciar alguna de las acciones farmacológicas sobre las demás, o eliminar algunas de ellas en beneficio de las otras.

-Combinar actividades. Se trata de reunir en una entidad actividades diferentes que puedan actuar en común frente a desórdenes asociados

-Modificar la biodisponibilidad del fármaco líder.

1.2.1.2 Sustitución bioisostérica.

En general, el término bioisosterismo se aplica a todo el conjunto de analogías que se puedan establecer entre dos grupos funcionales, incluyendo tanto elementos estéricos como electrónicos, y en general, todos juntos sirvan para definir la estructura de una molécula.¹⁸

Es una estrategia a seguir para mejorar la eficacia del compuesto líder, se refiere al hecho que compuestos con una misma actividad biológica deban poseer también una misma estructura, o al menos sitios comunes en las partes responsables de la actividad biológica, por lo que la sustitución de grupos funcionales con igual distribución electrónica.

1.2.1.3 Modulación Molecular.

Esta técnica consiste en variar al compuesto líder con modificaciones limitadas tanto en extensión (la molécula debe mantener las características iniciales) como en número (posiciones a modificar). Sin embargo a pesar de restringirse aparentemente las posibilidades de variación en esta técnica, es muy frecuente encontrar resultados positivos en su aplicación.²⁰

De manera general existen tres tipos diferentes de proceder:

*Modulación: Comprende isomerización, homología, alquilación, ramificación, desalquilación, saturación, insaturación, cambio en la posición de la insaturación, desplazamiento de una función, sustitución o eliminación de heteroátomos, introducción de sistemas cíclicos, contracción o extensión de ciclos, sustitución de ciclos.

*Simplificación: En ocasiones, es preciso que se rompa la molécula, por parte del investigador, en un intento de encontrar qué partes o partes son responsables de la actividad biológica que se está estudiando.

Con este fin se diseñan compuestos más sencillos, que contengan aisladamente las partes mencionadas. Es necesario aclarar que las partes responsables de la actividad no tienen necesariamente que encontrarse unidas entre sí, sino que pueden encontrarse separadas por una serie de átomos que no forman parte decisiva en la interacción con el receptor. En estos estudios se necesita un verdadero conocimiento de la estructura tridimensional y del comportamiento conformacional del compuesto.

De este tipo de estudio se desprende una evolución en la importancia relativa, de los diferentes métodos empleados en el diseño de nuevos medicamentos. Se observa en primer lugar un aumento progresivo en la importancia que los métodos biológicos tienen como elemento de apoyo y decisión en el planteamiento de las estrategias de síntesis, llegando a ser auténticas piezas clave en muchos casos. También se deduce la necesidad de disponer de técnicas cada vez más avanzadas en el campo del análisis instrumental, como base para la elucidación estructural de los nuevos compuestos. Y siempre como elemento fundamental, la colaboración estrecha entre investigadores de diferentes profesiones que ofrezcan diferentes perspectivas. Los avances previsibles en el campo de la biotecnología, la biología molecular y ciencias afines, están dando un nuevo enfoque al diseño de nuevos medicamentos. El método de las variaciones estructurales siempre se considerará como método de apoyo en el diseño de

estrategias de síntesis, que integran los equipos multidisciplinarios decididos a encontrar los mejores medicamentos.

1.2.2 Métodos Computacionales.

Los científicos han estudiado la determinación de la acción farmacológica basados en la estructura química de las moléculas para lo que desarrollaron métodos que hacen posible relacionar esos dos factores. La relación estructura y actividad nos permite entender la correspondencia entre una propiedad determinada y la estructura química de una serie de moléculas y obtener, por inversión de procesos nuevas estructuras que posean la actividad o propiedad estudiada.¹⁸

En la actualidad, existen numerosos métodos analíticos experimentales para determinar la estructura molecular de una sustancia. Los espectroscópicos: ultravioleta (UV), infrarrojo (IR), y la espectrometría de masas (IM) y la de resonancia magnética nuclear H^1 (RMN-H) y de C^{13} (RMN- C^{13}), así como las técnicas de difracción de rayos X (D-Rx) son las más comunes. No obstante a ello, el desarrollo alcanzado por la computación y la química computacional ha propiciado la generación de sistemas que permitan calcular la geometría y la energía molecular. Estos sistemas son capaces de generar datos con una amplia aplicación en la investigación experimental, tanto para la interpretación de los resultados obtenidos y la planificación de un proceso de reacción química.

A partir de la estructura tridimensional proporcionada por las técnicas de difracción de rayos X, y las de resonancia magnética nuclear, se pueden considerar tres tipos de métodos de cálculos teóricos: Los métodos *ab initio*, los semiempíricos y los de mecánica molecular.¹⁹ La elección de uno u otro método depende fundamentalmente del tamaño de la molécula y del tiempo requerido. En el caso de la mecánica molecular se requiere de menos tiempo de cálculo con respecto a los mecánico-cuánticos, y reproducen los valores experimentales

referentes a geometrías y energías con buena precisión. Por tanto en la actualidad el uso de la mecánica molecular está destinado al campo de las macromoléculas, en las cuales los métodos de cálculos mecánico-cuánticos se tornan prohibitivos en cuanto a tiempo respecta porque considera orbitales atómicos (OA), esta última tiene aplicación en moléculas pequeñas.

1.2.2.1 Técnica de la relación estructura y actividad (REA).

Los métodos REA consideran las propiedades de las moléculas en tres dimensiones y en donde se contemplan, el análisis conformacional, la mecánica-cuántica, los campos de fuerzas y los gráficos moleculares interactivos.² Estos últimos permiten la representación y manipulación de las molécula en tres dimensiones, lo que proporciona una información espacial esencial para comparar moléculas y para estudiar la interacción entre ligandos y receptores macromoleculares. Los estudios REA no sólo se utilizan en el diseño de nuevos fármacos, sino que son aplicables en otras ramas de la ciencia como la ingeniería de proteínas y la química de polímeros.

La técnica inicia con la búsqueda del farmacóforo (son los aspectos estructurales indispensables en una serie de moléculas de fármacos, para lograr la unión al receptor y experimentar una actividad farmacológica), el análisis con el receptor e inserción de estructuras conocidas o construidas intencionalmente, generada para el ajuste exacto al receptor.

El modelado molecular continúa su evolución aplicando una gran variedad de métodos computacionales al problema de identificar las relaciones complejas, existentes entre estructuras moleculares y actividades biológicas, en términos de interacciones entre los átomos constituyentes. La introducción de nuevos métodos de cálculos y de ordenadores cada vez más potentes, generarán sin dudas nuevos resultados que culminarán con la obtención de nuevas estructuras cada vez más potentes y selectivas.

1.2.2.2 Técnica de la relación cuantitativa estructura y actividad REAC

Este método extratermodinámico, pretenden establecer modelos de comportamiento sobre las familias de compuestos biológicamente activos, a fin de obtener los óptimos de actividad a partir de los datos de comportamiento de un número limitado de productos. Estos modelos estudian las variaciones de actividad que se observan en una serie de moléculas derivadas de una estructura común relacionando la estructura con la actividad biológica en el diseño de nuevos fármacos, el compuesto con mayor actividad farmacológica será el líder. Es importante que la actividad biológica del fármaco producto de su interacción con su receptor sea una función de las características estructurales de la molécula, la estructura del fármaco implica ciertas propiedades globales como la hidrofobicidad, carga neta, solubilidad, etc. y ciertas propiedades locales como la distribución de la hidrofobicidad, carga y volumen en determinadas posiciones de la macromolécula. Las propiedades globales y locales pueden ser cuantificadas mediante parámetros como la π : constante hidrofóbica, la σ : constante electrónica de Hammett, Es: constante de parámetro estérico de Taff, MR: refractividad molar y F, R: constantes del efecto inductivo.²⁰

Siempre existe una función que relaciona los cambios de actividad biológica con los cambios en las propiedades globales y locales, aunque puede ser que no resulte sencilla ni evidente, las funciones estructura actividad que propone el método extratermodinámico, constituye un método mediante el cual se pueden encontrar los productos más activos entre un conjunto de candidatos. La técnica se inicia de identificando el farmacóforo o el prototipo de una serie, los sustituyentes, actividad biológica y el tratamiento de la muestra, para proponer un modelo matemático que relacione las estructuras y obtener los productos óptimos. Existen diferentes tipos de REAC el tradicional, el de redes de neuronas y el tridimensional.

El REAC tradicional. Incluye tratamiento estadístico de los datos por métodos de variación múltiple, que incluye análisis regresivo, análisis cluster y análisis por composición principal. En estos se valora la actividad biológica como variable dependiente del conjunto de descriptores moleculares que constituyen las variables independientes.

El REAC tridimensional combina aspectos relacionados con REAC clásico abordando magnitudes con respecto a afinidades y con los estudios REA en cuanto a análogos activos, logrando una interfase entre ambos tipos y el desarrollo de un nuevo análisis

1.2.2.3 Método del Reconocimiento Molecular

En la primera etapa del desarrollo de fármacos, se requiere de bases de datos, donde se realiza una simulación molecular por computadora, ensayos masivos con el fin de hallar moléculas líder de una forma eficiente y relativamente económica.²⁰

El método de reconocimiento molecular o acoplamiento molecular "Docking" es ampliamente utilizado por la industria privada o por instituciones públicas, para el diseño de fármacos, tanto para llevar a cabo las etapas de identificación del sitio de unión con el receptor, como la construcción y la evaluación de los complejos moleculares resultantes.

Los pasos que conforman el acoplamiento molecular, se dividen en tres partes como se esquematiza en la Figura 2. En la primera parte se estudia la molécula blanco, la segunda parte estudia el ligando y la última al complejo molecular. Para cada ligando se debe de conocer la estructura tridimensional, la cual debe ser acondicionada, contemplando la información requerida para los cálculos subsecuentes y en el caso del receptor identificar el sitio de unión. La tercera parte, que es la medular del método consiste en el empleo de un algoritmo

de computadora que toma en consideración las características de espacio tridimensional, la presencia de grupos cargados y la conformación de residuos de aminoácidos presentes en la cavidad del receptor y que deben ser complementados con las características fisicoquímicas del ligando.

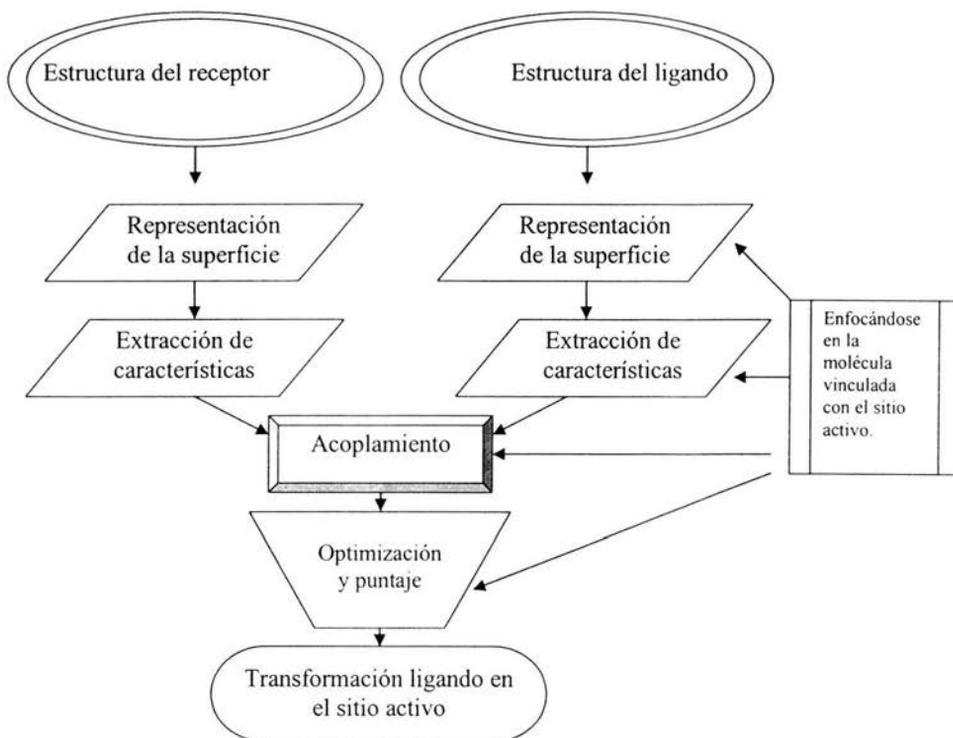


Figura 2. Diagrama de las etapas de simulación del reconocimiento molecular.

Durante la etapa de la formación simulada del complejo, es indispensable emplear un criterio numérico para distinguir cual de todas las posiciones probadas es la mas adecuada, es decir, la que adoptaría el ligando si tuviera acceso al sito de unión, a este criterio se le llama puntaje.¹⁸⁻²¹ El proceso de optimización se realiza mediante cálculos de geometría molecular y energía, los átomos se tratan como esferas elásticas de diferentes tamaños (definidos por el tipo de átomo)

aproximándolos. Para el cálculo de la energía potencial se usa la ley de Hooke el cálculo de la energía total mediante la Ecuación 1, es minimizada con respecto a las coordenadas atómicas donde:¹⁸

$$E_{\text{tot}} = E_{\text{enlace}} + E_{\text{ángulos}} + E_{\text{torsión}} + E_{\text{electrostática}} + E_{\text{vdW}} \dots\dots \quad (1)$$

Donde E_{tot} es la energía total de la molécula, E_{enlace} es el termino de energía de enlace; considera la distorsión que tiene cada enlace covalente en la molécula respecto a la distancia óptima, $E_{\text{ángulo}}$ es el termino de energía para ángulo de enlace, E_{torsion} es el termino para la energía de torsión, E_{vdw} es el termino para la energía de van der Waals y $E_{\text{electrostática}}$ y términos de la energía electrostática. La Ecuación 2 describe el cambio de energía de estiramiento de enlace y la fuerza interatómica armónica en términos de energía mediante una función cuadrática.

$$E_{\text{enlace}} = \frac{1}{2} K_b (b - b_0)^2 \quad (2)$$

K_b es la constante de la fuerza de estiramiento, b_0 es la longitud de enlace inicial y b la longitud de enlace final. Para el ángulo de enlace la energía se calcula mediante la Ecuación 3.

$$E_{\text{ángulo}} = \frac{1}{2} K_\theta (\theta - \theta_0)^2 \quad (3)$$

K_θ es la constante, θ_0 es el equilibrio del ángulo evaluado en θ en términos de ángulo de enlace entre dos átomos, y θ es el ángulo final de θ . La energía potencial dihedra esta en términos de coseno como en la Ecuación 4.

$$E_{\text{torsión}} = \frac{1}{2} K_\phi (1 + \cos(n\phi - \phi_0)) \quad (4)$$

K_ϕ es el barrido de torsión, ϕ es el ángulo actual, n es la periodicidad (número de mínima energía en todos los ciclos) y ϕ_0 es la referencia del ángulo de torsión.

La energía de van der Waals se reporta usualmente mediante la energía de Lennard-Jones en la ecuación 5.

$$E_{\text{vdW}} = \sum \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \quad (5)$$

Donde A_{ij} es el coeficiente de repulsión, B_{ij} es el coeficiente de atracción y r_{ij} es la distancia entre los átomos i y j . La Ecuación 6 permite calcular la energía electrostática mediante la interacción de Coulomb.

$$E_{\text{electrostática}} = \frac{1}{\epsilon} \left(\frac{Q_1 \cdot Q_2}{r} \right) \quad (6)$$

ϵ es la constante dieléctrica, Q_1 y Q_2 cargas atómicas y r es la distancia interatómica.

Una vez establecidas las condiciones descritas anteriormente, el proceso para probar las orientaciones de cada ligando se repite y finalmente el programa de cómputo ordena los diferentes compuestos probados de acuerdo al puntaje de la conformación preferente y óptima. La parte final del acoplamiento molecular se muestra en la Figura 3.²¹

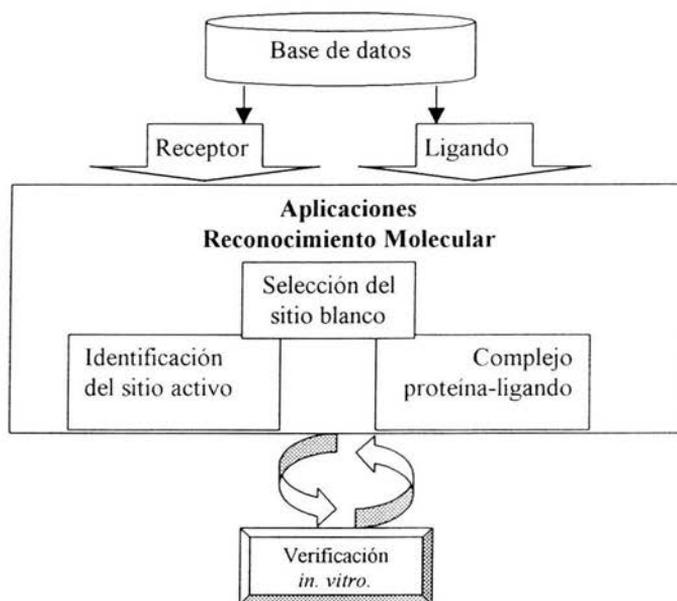


Figura 3. Diagrama de flujo empleado en el reconocimiento molecular.

Para llevar a cabo este trabajo se requiere de programas de cómputo que utilizan diferentes algoritmos como “fuerza-bruta”, características de forma local,

algoritmo evolucionario o búsqueda al azar. En este campo de trabajo existen diferentes programas que nos permiten desarrollar el acoplamiento molecular como son: HEX, BIGGER, SOFTDOCK, estos para interacción proteína-proteína; DOCK, PPD, BUDDA, QUANTA, para todas las moléculas y GOLD para interacción fármaco-proteína entre otros paquetes mas.²¹

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el ámbito nacional, la practica tradicional para la comercialización de principios activos, destinadas a restablecer la salud, debe cubrir varias etapas; muchas de ellas de carácter empírico y determinado por el azar antes de asegurar que su utilidad no este en posición desventajosa por los posibles efectos secundarios.

En una etapa histórica intermedia, requiere la intervención multidisciplinaria de profesionales con formaciones distintas, respecto a la cooperación y el trabajo en equipo lo que mantiene en buena parte la influencia del azar en el desarrollo aceptable de fármacos novedosos.

Este escenario no solo requiere un cambio de perspectivas hacia enfoques mas modernos, influenciados tanto por la celeridad requerida con la actualidad para comercializar un fármaco, como el imperativo de llevarlo a cabo en las condiciones de mayor conveniencia económica. De manera esencial para producir opciones de tratamiento eficaz y seguro, esto conduce a la necesidad de desarrollar estrategias para el diseño inteligente y racional de fármacos, que reduzcan sustancialmente la ingerencia del azar, los costos en las etapas de investigación y la participación organizada de los recursos humanos y el empleo de las técnicas modernas de análisis, síntesis y aplicaciones computacionales.

Para este desarrollo se requiere del conocimiento de las enfermedades o trastornos metabólicos, con esto es posible diseñar fármacos mediante

aproximaciones al proceso patológico. Conocer el proceso a nivel molecular, definiendo las moléculas involucradas nos permite diseñar fármacos a la medida del receptor.

En el estudio de reconocimiento molecular de los hipoglucemiantes y sus sitios receptores se puede conocer las características fisicoquímicas de la cavidad (presencia de grupos cargados, hidrofobicidad del ambiente, el volumen de la cavidad etc.) y del ligante (conformación, presencia de grupos cargados, longitud de las cadenas laterales, configuración absoluta etc.) como resultado de lo anterior permitirá estudiar la interacción molecular de los hipoglucemiantes con los diferentes grupos reactivos y estabilizadores de la cavidad en los diferentes receptores, permitiendo inferir en el diseño de nuevos hipoglucemiantes que posiblemente sean mas efectivos.

3. OBJETIVOS

GENERAL

- Estudiar el reconocimiento molecular de acarbosa y metformin en su sitio receptor a nivel molecular, determinando las características fisicoquímicas y estructurales que permitirán inferir en el desarrollo de nuevos agentes hipoglucemiantes.

PARTICULAR

- Extraer y purificar el principio activo a partir de una muestra comercial.
- Caracterización espectroscópica de acarbosa y metformin.
- Determinar la estructura tridimensional de la Acarbosa y Metformin
- Estudiar el acoplamiento de las estructuras moleculares de la acarbosa y el metformin en su sitio receptor o cavidades de receptores moleculares.

4. HIPÓTESIS

Si se conocen las estructuras tridimensionales de la acarbosa y el metformin se puede estudiar el modo de interacción con su sitio receptor y determinar los requisitos fisicoquímicos que le permitan mayor estabilidad, de esta manera poder modificar a la molécula líder llevando a cabo modificaciones de grupos funcionales reactivos y desarrollar nuevos fármacos para el tratamiento de la diabetes tipo 2.

5. MÉTODO

5.1 Aislamiento y purificación de la acarbosa y metformin a partir de muestras comerciales.

Metformin®:

- Se disolvieron 10 tabletas de Glucophage en 5 ml de agua destilada en seguida agitar, filtrar y liofilizar la solución hasta obtener un polvo blanco.

-Efectuar pruebas de cristalización con diferentes disolventes como etanol, metanol, acetato de etilo, hexano, diclorometano, acetona y mezclas de los diferentes disolventes.

Acarbosa®:

- Se disolvieron 10 tabletas de Glucobay en 5 ml de agua destilada en seguida agitar, filtrar y liofilizar la solución hasta obtener un polvo blanco.

-llevar a cabo pruebas de cristalización con diferentes disolventes como etanol, metanol, acetato de etilo, hexano, diclorometano, acetona y mezclas de los diferentes disolventes.

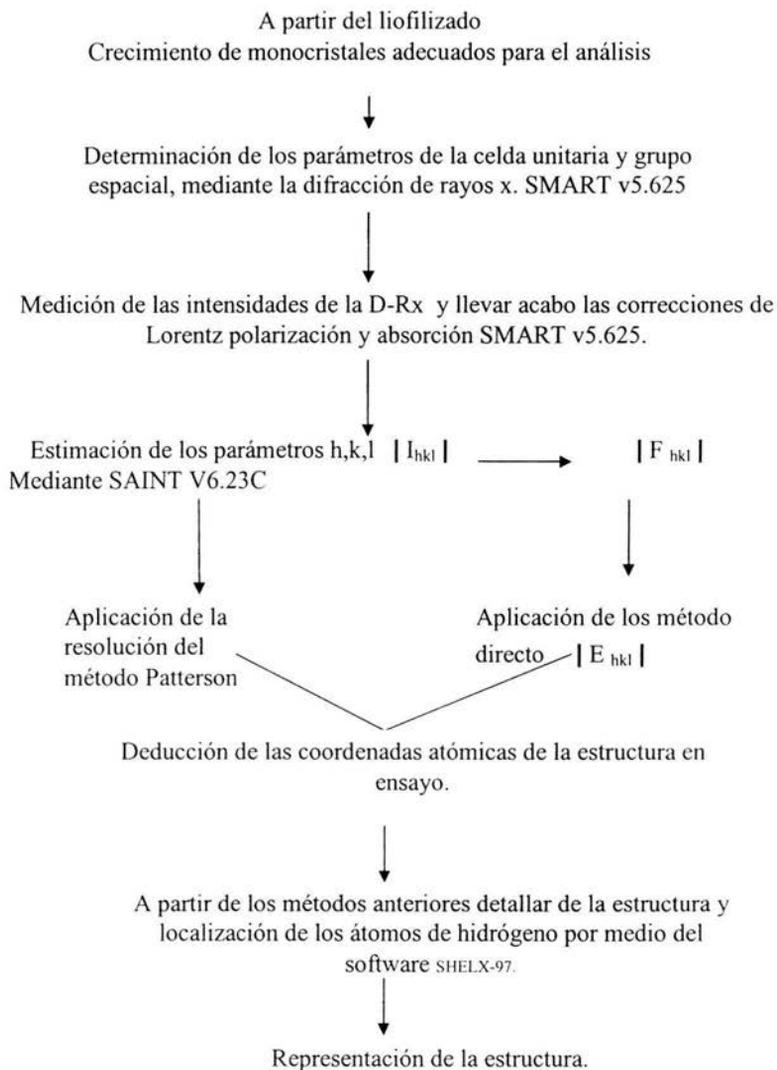
5.2 Caracterización espectroscópica de los agentes hipoglucemiantes mediante las técnicas de infrarrojo y resonancia magnética nuclear.

*Para llevar a cabo estas técnicas analíticas, se requiere que la muestra esté completamente pura.

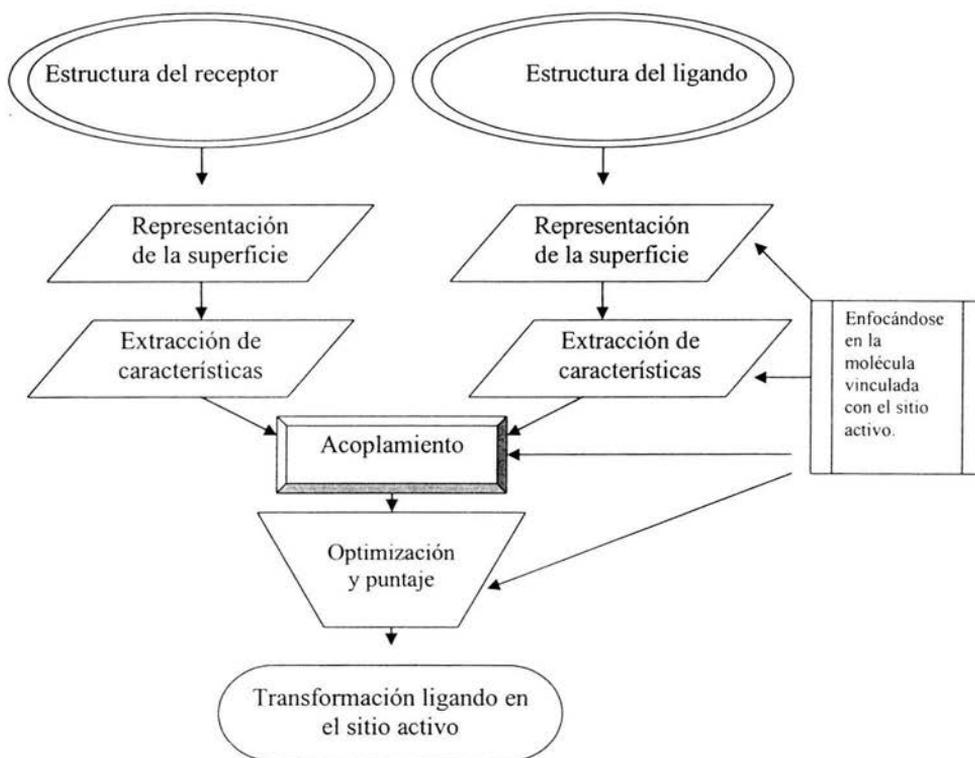
*En el espectro de IR se realiza en pastilla de KBr, y se obtiene un barrido en el zona infrarroja del espectro.

* En el espectro de RMN H^+ y C^{13} , se disuelve en metanol deuterado para llevar a cabo el análisis.

5.3 Resolución de las estructuras mediante la técnica de difracción de rayos X



5.4 Estudios de Reconocimiento Molecular: Acoplamiento de las estructuras moleculares de los agentes hipoglucemiantes en los sitios o cavidades de los receptores moleculares.



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

6.1 METFORMIN

6.1.1 Aislamiento y cristalización

El aislamiento se realizó a partir de la forma comercial Glucophage, obteniendo un polvo blanco. La cristalización se llevó a cabo en etanol obteniendo cristales como se muestra en la Figura 4.



Figura 4. Cristal de metformin de etanol.

6.1.2 Caracterización

6.1.2.1 Espectro de infrarrojo

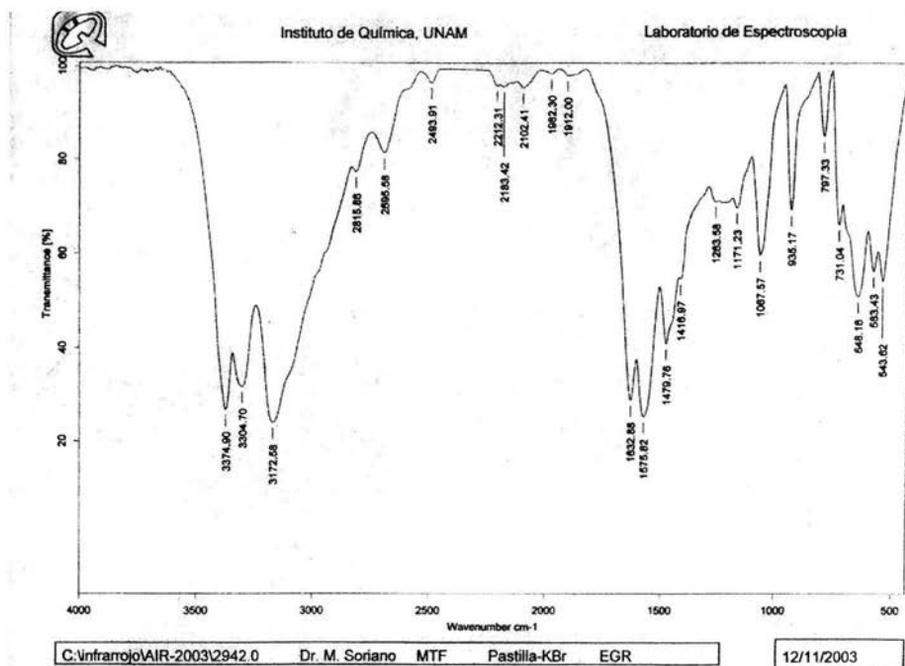
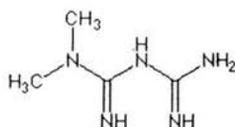


Figura 5. Espectro de infrarrojo de metformin el equipo utilizado fue Bruker Tensor 27 FTIR mediante pastilla de KBr.

En este espectro de IR (Figura 5) se observan absorciones características entre 3172-3374 debido a los enlaces N-H, en 2815 a la interacción C-H de los metilos, entre 2212-1912 se encuentran bandas que nos muestran las insaturaciones que presenta la molécula; en 1632 la presencia de el grupo imino y en 1067 la presciencia del enlace C-N en resumen, el espectro muestra la presencia de los grupos funcionales de la molécula.

6.1.2.2 Espectro de RMN H⁺

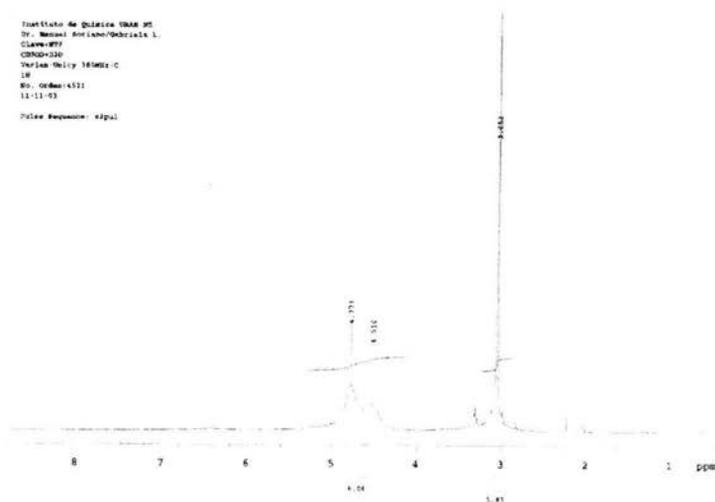
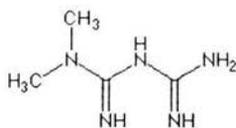


Figura 6. espectro de RMN H⁺.

En el espectro de RMN H⁺ (Varian-Unity 300 MHz-C) en la Figura 6 se muestra un singulete a 3.053 que corresponde a los 6 hidrógenos presentes en los metilos C-H, en el intervalo de 4.5-4.7 se observa un doblete de los 6 hidrógenos del grupo N-H, aunque no se presentan picos bien definidos esto se debe a que existe un desplazamiento de electrones.

6.1.2.3 RMN C¹³.

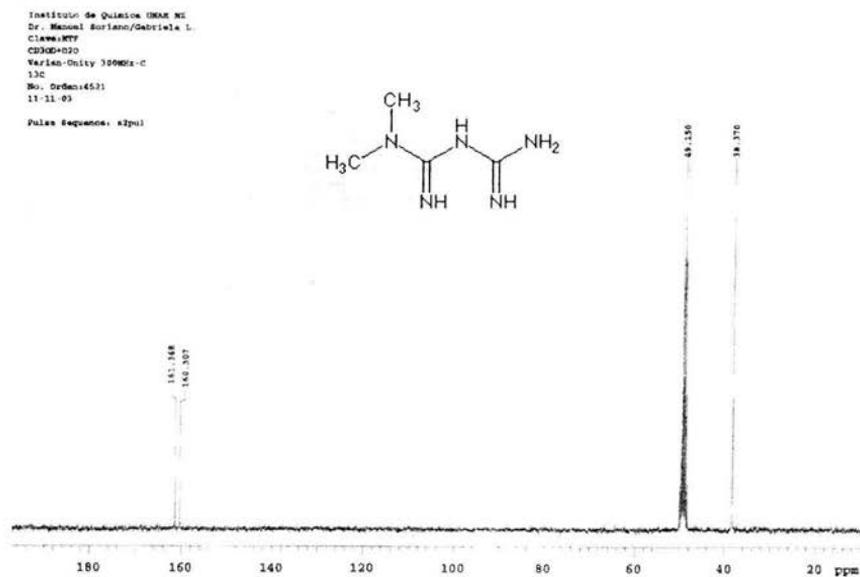


Figura 7. Espectro de RMN C¹³.

En la Figura 7 presenta el espectro de RMN C¹³(Varian-Unity 300 MHz-C); se muestra a 38.370 el desplazamiento que corresponde a los metilos de la molécula, y a 160.307 y 1601.368 los carbonos del grupo imino.

6.1.2.4 Espectro Masas

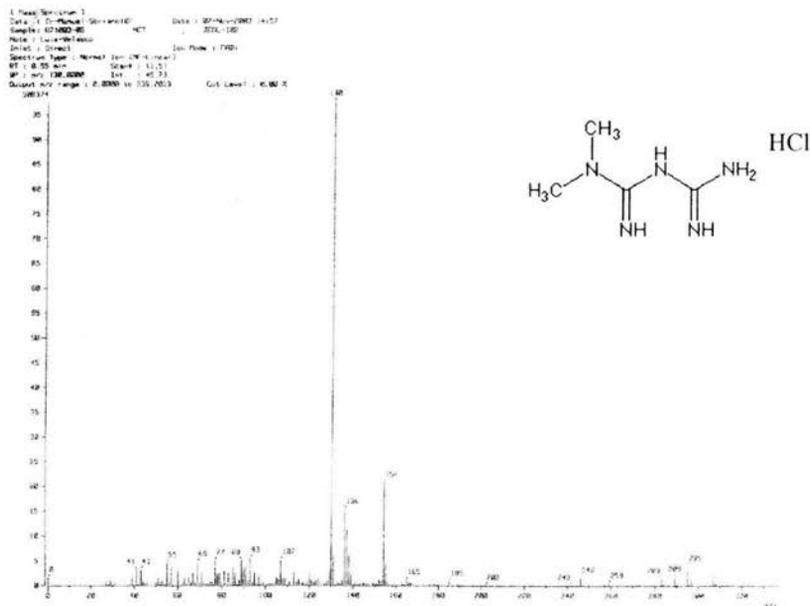


Figura 8. Espectro de Masas.

En la Figura 8 muestra el espectro de masas el cual se realizo mediante la técnica de impacto electrónico, tiene un fragmento base a $m/z= 130$ para la molécula sin el átomo de Cl y el de $m/z = 165$ que corresponde a la molécula total.

6.1.3 Resolución de estructura del metformin.

Datos cristalográficos del metformin.

El sistema cristalino es monoclinico, con grupo espacial $P2_1/c$, con dimensiones de la celda $a = 7.9857 \text{ \AA}$, $b = 13.9506 \text{ \AA}$, $c = 8.0137 \text{ \AA}$, $\alpha = 90.000$, $\beta = 114.979$, $\gamma = 90.000$, $V = 809.3 \text{ \AA}^3$ y $Z = 4$. La Figura 3 se muestra el tipo de cristal que se obtuvo experimentalmente.

Determinación de la estructura tridimensional del metformin.

La muestra utilizada para la determinación de la estructura fue cristalizada en etanol a la temperatura ambiente, colectados en el instituto de Química UNAM en un difractor automático equipado con un detector de área CCD marca Bruker Smart Apex ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$). La estructura se resolvió empleando métodos directos con el programa SHELX-97 y detallada la estructura usando el método de mínimos cuadrados SHELX-97. Los datos de longitudes de enlaces y ángulos se muestran en la tabla 4. Los datos del cristal y el detallado de la estructura se muestran en la Tabla 5 y las coordenadas atómicas finales y la constante isotrópica con los parámetros de desplazamiento se proporcionan en la Tabla 6.

Tabla 4. Longitudes de los enlaces (\AA) y los ángulos ($^\circ$) en el metformin.

N(1)-C(1)	1.337(3)	N(4)-C(2)	1.324(4)
N(2)-C(1)	1.330(3)	N(5)-C(2)	1.332(3)
N(3)-C(1)	1.324(3)	N(5)-C(3)	1.453(3)
N(3)-C(2)	1.349(3)	N(5)-C(4)	1.456(3)
C(1)-N(3)-C(2)	122.4(2)	N(3)-C(1)-N(1)	118.2(3)
C(2)-N(5)-C(3)	122.4(2)	N(2)-C(1)-N(1)	117.8(3)
C(2)-N(5)-C(4)	122.3(2)	N(4)-C(2)-N(5)	120.3(3)
C(3)-N(5)-C(4)	114.9(2)	N(4)-C(2)-N(3)	116.8(3)
N(3)-C(1)-N(2)	123.8(3)	N(5)-C(2)-N(3)	122.5(3)

Tabla 5. Datos cristalográficos para la celda unitaria del cristal del metformin colectados con difractor automático equipado con un contador de CCD marca Bruker Smart Apex ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$) . .

Formula química : $C_4H_{12}N_5Cl$
Peso molecular = 165.64
Sistema cristalino : Monoclínico
Grupo espacial: $P2_1/c$
 $a = 7.9857(19) \text{ \AA}$
 $b = 13.951(4) \text{ \AA}$
 $c = 8.0137(19) \text{ \AA}$
 $\beta = 114.979^\circ$
Volumen $\text{\AA}^3 = 809.3(3)$
 $D_x = 1.359 \text{ g/cm}^3$
 $\mu(\text{Mo K}\alpha) = 0.410 \text{ mm}^{-1}$
Temperatura, 291° K
Incoloro
 $F(000) = 352$
 $0.42 \times 0.07 \times 0.03 \text{ mm}$
Radiación: $\text{Mo K}\alpha$
w scans con $2\theta_{\text{Max}} = 25^\circ$
 $R = 0.0460$
 $R_w = 0.0849$
 $(\Delta/\sigma)_{\text{max}} = 0.001$
 $(\Delta\rho)_{\text{max}} = 0.349 \text{ e}\text{\AA}^{-3}$
 $(\Delta\rho)_{\text{min}} = -0.178 \text{ e}\text{\AA}^{-3}$
No. de reflexiones medidas = 6477
No. de reflexiones usadas = 1428
No. de parámetros = 111
Goodness of fit on $F^2 = 0.930$

Tabla 6. Coordenadas atómicas ($\times 10^{-4}$) y parámetros de desplazamiento isotropico equivalente ($\text{\AA}^2 \times 10^{-4}$) software SHELX-97.

	x	y	z	Ueq
Cl1	6556	158	7801	37
N1	6607	1096	1680	38
N2	7353	1468	4687	34
N3	8733	2276	3029	28
N4	10343	3574	4633	38
N5	11492	2069	5693	30
C1	7612	1615	3172	26
C2	10175	2669	4507	26
C3	13084	2453	7242	43
C4	11557	1042	5405	45

$$U(\text{eq}) = (1/3) \sum_i \sum_j U_{ij} (a_i^* a_j^*) (\mathbf{a}_i \cdot \mathbf{a}_j).$$

La estructura tridimensional del metformin, que nos da la difracción de rayos-x se muestra en la Figura 9.

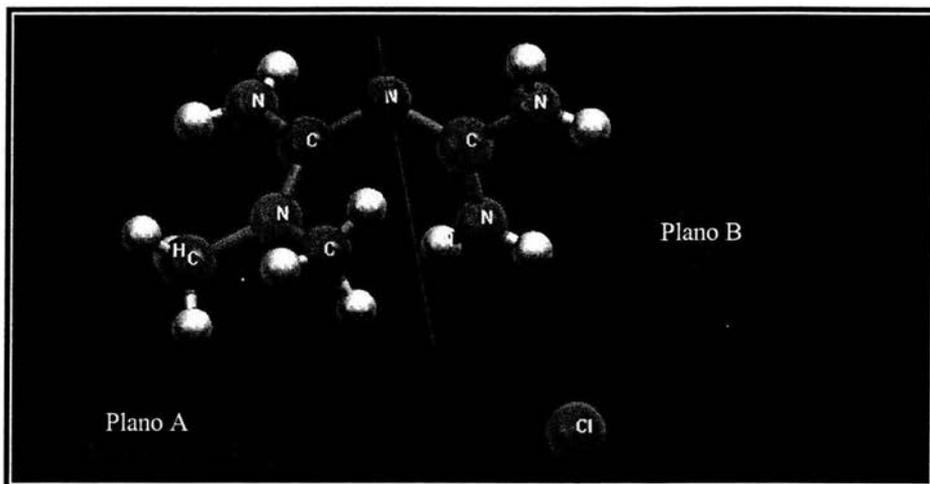


Figura 9. Estructura tridimensional de Metformin realizada con el software Mercury.

En la Figura 9 se muestran los dos planos que definen a la molécula en el plano A se encuentran los grupos metilos, y el plano b se encuentran los grupos di-imino. Si comparamos la estructura con la reportada en la literatura se ve que existe un tautomerismo en la molécula ver Figura 10, en donde existe un intercambio de protones en la molécula. Para estudiar al tautomerismo se analizan las distancias interatómicas de la molécula.

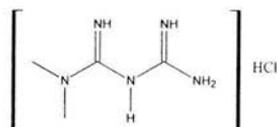


Figura 10. Estructura reportada

En los enlaces C1-N3 y C3-N4 existe una distancia de enlace de 1.324 Å indicando su carácter de doble enlace, el enlace C3-N5, C4-N5 de los grupos metilos es de 1.453 y 1.456 Å este representa un enlace sencillo, ver la Figura 11.

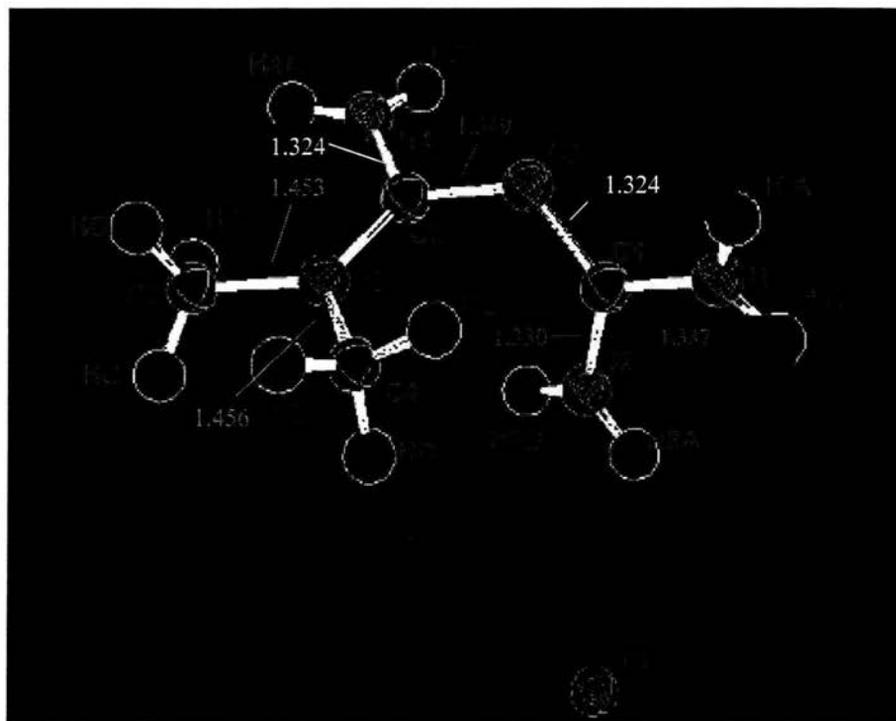


Figura11. Estructura molecular del metformin mostrando un grupo selecto de distancias interatómicas construido por SHELX-97.

Como se muestra en la Figura 11 los átomos de nitrógeno presentes en la molécula tienen dos átomos de hidrógeno cada uno a excepción del N3, si se compara con la estructura de la Figura 10 reportada en la literatura existe un intercambio de un protón en la molécula. La evidencia de dicho intercambio de protones (Figura 12) y su deslocalización (Figura 13) se puede analizar y visualizar

en un mapa de diferencia de densidad electrónica del metformin. Donde se observa la presencia del átomo de hidrogeno. El mapa se construye con el programa de SHELX-97 que permite la visualización de los diferentes contornos de densidad electrónica en diferentes regiones de la celda unitaria (Figura 12), se toma sobre el plano B (Figura 9) donde se observa la presencia de los dos pares de protones en el N1, N2 y N4, así como la ausencia de protones en el N3. Al comparar esta información estructural con los datos de espectroscopia se proponen las diferentes formas tautoméricas para el metformin mostrados en la Figura13.



Figura 12. Mapa de diferencia de densidad electrónica del metformin.

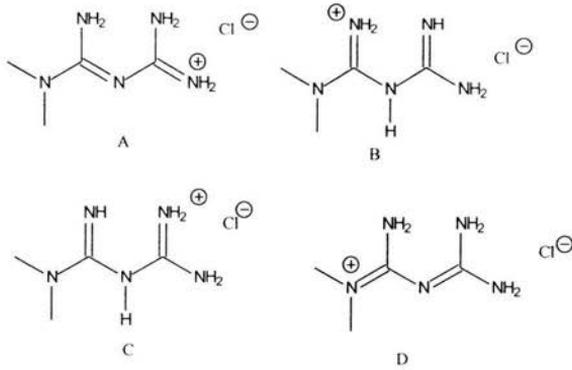


Figura13 Formas tautoméricas del Metformin

La estructura del estado sólido cristalino corresponde al diagrama de la Figura14.

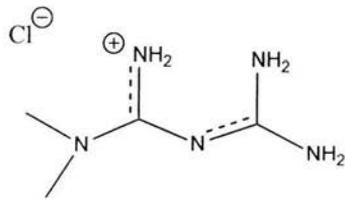


Figura 14. Estructura del metformin en el estado sólido cristalino.

Las moléculas del metformin en el cristal se encuentra estabilizada por una red de puentes de hidrogeno e interacciones de van der Waals. (ver Figura 15)

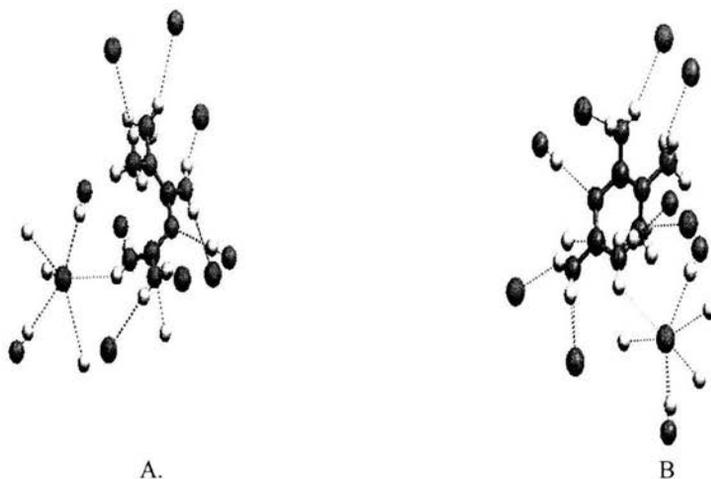


Figura 15. Se observa en A algunos de los puentes de hidrógeno, en B algunas de las interacciones moleculares que estabilizan las moléculas de metformin en el cristal, se muestran los átomos de nitrógeno en azul, en verde los de Cl, de negro los de C y blanco los de hidrógeno se realizó con el software Mercury.

Tabla 7. Donadores y aceptores de puentes de hidrógeno.

D-H...A	d(D-H)	d(H-A)	d(D...A)	<(DHA)
N(4)-H(4B)...Cl(1)#1	0.84(3)	2.43(3)	3.269(3)	176(3)
N(4)-H(4A)...Cl(1)#2	0.88(3)	2.46(3)	3.308(3)	161(2)
N(2)-H(2B)...N(3)#3	0.89(3)	2.10(3)	2.994(3)	173(3)
N(2)-H(2A)...Cl(1)	0.85(3)	2.75(3)	3.364(3)	130(2)
N(1)-H(1B)...Cl(1)#4	0.86(3)	2.40(3)	3.240(3)	165(3)
N(1)-H(1A)...Cl(1)#5	0.86(3)	2.60(3)	3.357(3)	148(2)

Una vez resuelta la estructura en cristalografía es importante analizar el empaquetamiento de las moléculas dentro de la celda unitaria. Los datos cristalográficos se encuentran en la tabla 5. El sistema cristalino es monoclinico, las dimensiones a, b y c son diferentes, dos de los ángulos son de 90° , mientras que uno de ellos es de 114.979° . Dentro de la celda unitaria se encuentran cuatro moléculas del metformin estabilizadas con puentes de hidrogeno y contactos cortos N...Cl y N...N entre diferentes moléculas adyacentes(Figura16).

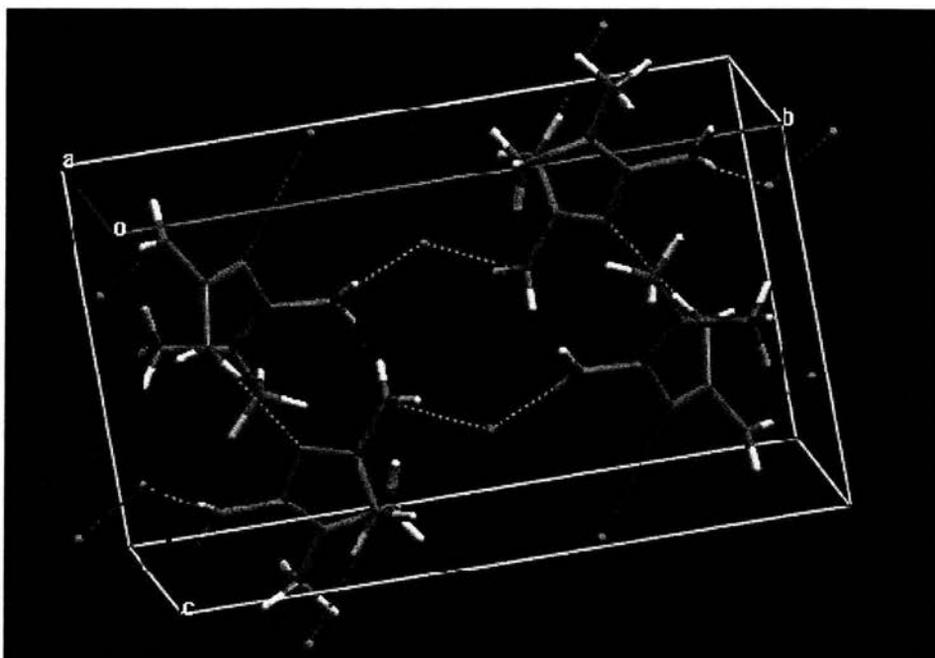


Figura 16. Empaquetamiento de moléculas de metformin, dentro de la celda unitaria, los átomos de color azul son de nitrógeno, los verdes cloro, los gris carbono y blancos hidrógeno la estructura fue construida con software Mercury.

6.1.4 RECONOCIMIENTO MOLECULAR.

En el reconocimiento molecular es importante tomar en cuenta las características de la cavidad del receptor, así como la superficie del ligando en estudio. Se muestra la superficie (Figura 17) y dos representaciones del volumen de la molécula de metformin en términos de su volumen de van der Waals.

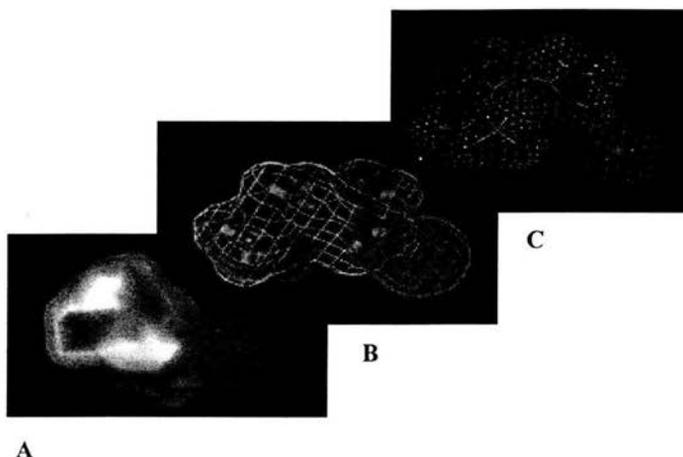


Figura17. Densidad electrónica del Metformin representado en A: como superficie, en B: como mapa de densidad electrónica y en C: como superficie de van der Waals.

En la literatura existe información de la posible interacción del metformin con varios receptores. Para llevar a cabo los estudios de reconocimiento molecular entre el metformin y sus posibles receptores,³¹⁻³⁷ se analizó las estructuras de los receptores (Figura 18), reportados en el banco de datos estructurales de macromoléculas biológicas, conocido como el Protein Data Bank (PDB) ver tabla 9. La representación esquemática de los receptores considerados se muestra en la Figura 18, indicando un código correspondiente al PDB. Cabe mencionar que se desconoce el sitio y mecanismo de acción de la interacción del metformin con los receptores descritos.

Tabla 9. Receptores utilizados para el Reconocimiento Molecular del Metformin.

PDB ID	Receptor
1 GAG	Receptor Insulinico en el dominio de la cinasa de tirosina sinónimo: RI
1K3A	Factor de crecimiento RI; Fragmento β del dominio de la cinasa
1 G1H	Domino de la proteína fosfatasa de tirosina

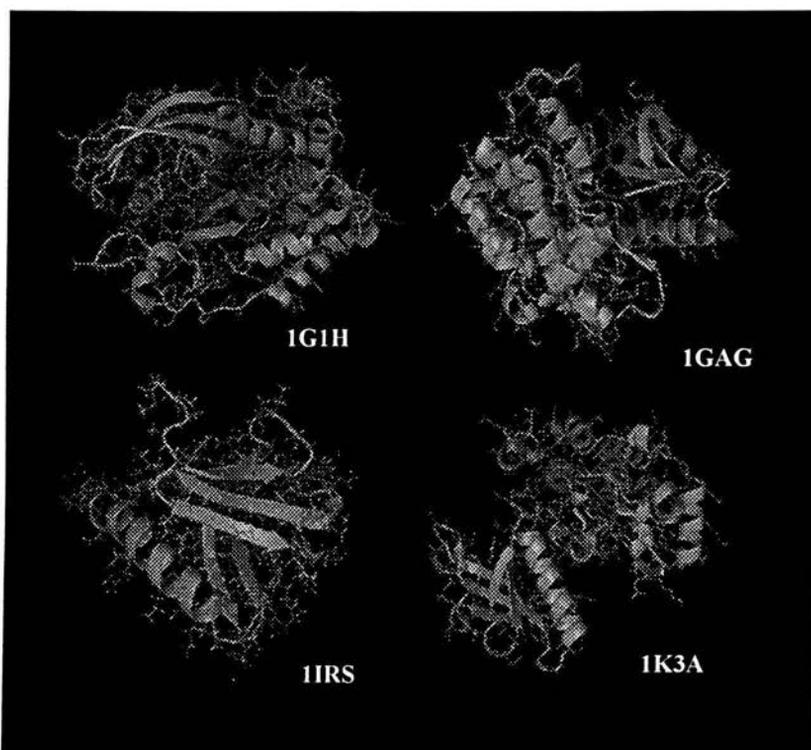


Figura 18. Estructura cristalográfica de los receptores utilizados para el estudio de reconocimiento molecular del complejo molecular metformin-receptor estructuras realizadas con el software Pymol.

Una vez elegidos los receptores se estudiaron las propiedades de cada uno de ellos en términos de su superficie electrostática para determinar la cavidad en donde pueda localizarse posiblemente el metformin, para esto se emplea el programa GRASP el cual nos proporciona información del volumen de la cavidad

en \AA^3 , el potencial electrostático debido al flujo de átomos que se encuentra en la superficie y la carga total de la molécula. En la Figura19 se muestra la imagen del receptor Insulinico en el dominio de la cinasa de tirosina en la que se analiza la superficie para localizar una cavidad optima para el ligando, en este receptor solo se localizó una cavidad, la que presenta como característica un potencial electrostático positivo (color de la superficie azul) en donde se puede alojar el metformin con carga electrostática negativa, estabilizando las cargas del sitio receptor.

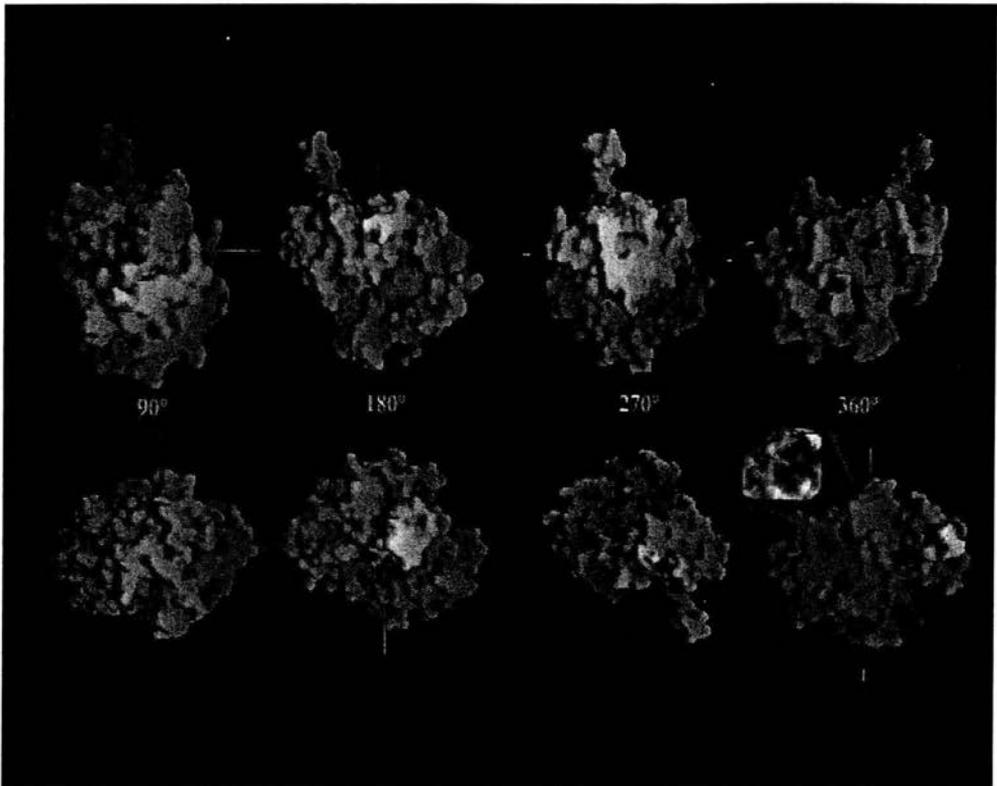


Figura19. Estructura tridimensional del Receptor Insulinico en el dominio de la cinasa de tirosina que muestra el potencial de la superficie en diferentes ángulos. Durante la localización del sitio de unión del ligando en la rotación de 360° en la parte inferior de la figura muestra la cavidad donde la zona azul indica que tiene aminoácidos que le dan una potencial de superficie positivo y la roja potencial de superficie negativo, elaborado con GRASP.

Se utiliza un método indirecto para calcular el volumen de la cavidad del receptor proteínico (Figura 20). Se toma como base el volumen total de la proteína, estimado con el programa GRASP,. La cavidad localizada con la capacidad de alojar al ligando, se llena con moléculas de agua a toda su capacidad, se determina nuevamente el volumen total con el programa GRASP. Esta medición no considerara la cavidad llena de agua de ahí que si se resta a esta segunda medición el volumen total original, se obtendrá el volumen de la cavidad.

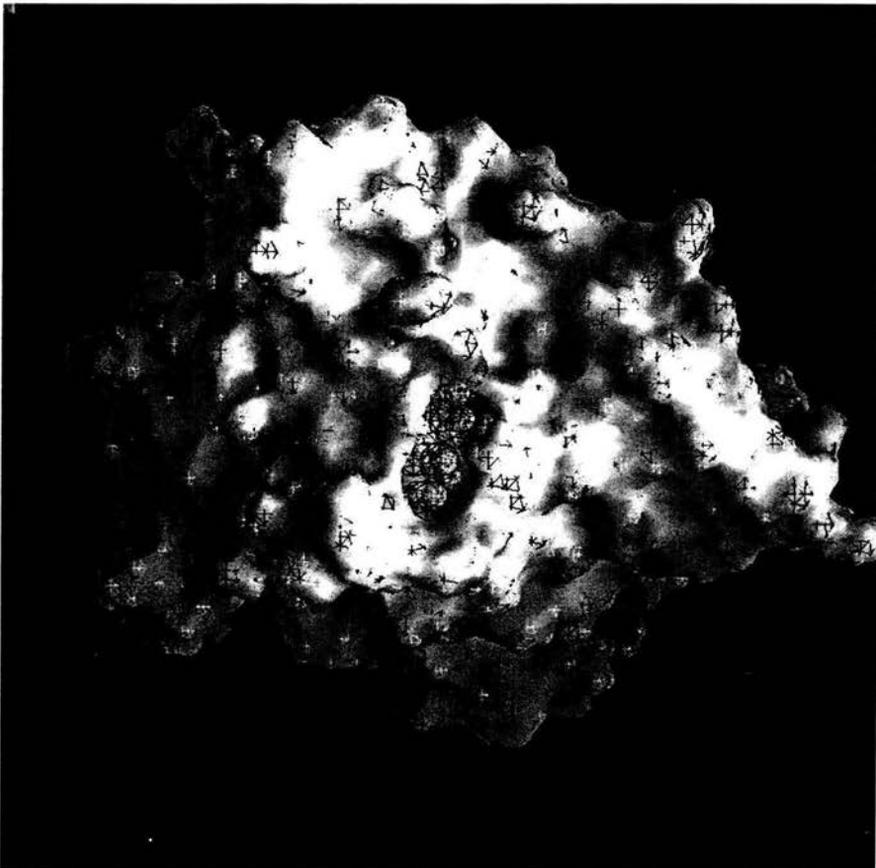


Figura 20. Dominio de la proteína fosfatasa de tirosina mostrando su superficie con el potencial de carga y la cavidad ocupada por moléculas de agua que nos permite determinar aproximadamente el volumen del sitio receptor.

Una vez determinadas las características del ligando mediante técnicas espectroscópicas IR, RMN, D-Rx y del receptor localizando la cavidad, en la sección anterior, se coloca el ligando en el receptor, procedimiento que se efectuó de una forma directa en la cavidad ya que si lo hace el sistema de computo tardaría mucho tiempo ya que buscaría alrededor de toda la superficie el mejor puntaje y requeriría varios días, por lo que se coloca y se mide la energía para evaluar la estabilidad del complejo fármaco-receptor.

Reconocimiento Molecular del Receptor Insulinico en el dominio de la cinasa de tirosina sinónimo: RI



Figura 21. Reconocimiento molecular en la cavidad Receptor Insulinico en el dominio de la cinasa de tirosina con metformin, acomodo inicial en A, con 200 ciclos de optimización en B, y con 500 ciclos de optimización en C.

La Figura 21 muestra el monómero del Receptor Insulinico en el dominio de la cinasa de tirosina con una energía inicial de -10014.9463 Kcal/mol, al colocar el ligando se tiene una energía de -9618.5713 Kcal/mol, indicando que el sistema

requiere de una optimización ya que la energía aumenta y desestabiliza el sistema. El complejo fármaco-receptor es optimizado con 200 ciclos y observamos que la energía es menor -14796.041 Kcal/mol aun así se tiene una diferencia de 9.9394 Kcal/mol entre el ultimo ciclo de optimización (ciclo 195-200), indicando que el sistema requiere de más ciclos de optimización pero si se observa que hay un cambio de conformación de la enzima. Se continúa optimización dando 300 ciclos más obteniéndose la energía de -15337.0039 Kcal/mol teniendo en el ciclo final una diferencia de 0.37 Kcal/mol lo que se considera el sistema optimizado (es decir la variación entre cada ciclo de la minimización es de menos de 0.5 Kcal/mol por lo cual se considera estable).

El análisis de las contribuciones individuales de cada una de las energías al efecto total en la contribución electrostática debido a las características fisicoquímicas del ligando con electrones deslocalizados y las característica de la cavidad de poseer cargas positivas obteniéndose la estabilización del complejo se muestra en la Tabla 10. También se observa en las optimizaciones que la conformación de la cavidad se abre un poco para que la molécula de metformin entre y se pueda estabilizar. El volumen de la cavidad es de 565.12 \AA^3 donde se acomoda el ligando con un volumen de superficie de 118.73 \AA^3 . Un análisis grafico del proceso de minimización de energía para el sistema Receptor Insulinico en el dominio de la cinasa de tirosina y metformin se ha mostrado en la Figura 22.

Tabla 10. Energía del sistema del Receptor Insulinico en el dominio de la cinasa de tirosina con Metformin.

	Monómero	Monómero-ligando	Optimización	
			200 ciclos	500 ciclos
La energía total CHARMM es: en Kcal/mol	-10014.9463	-9618.5713	-14796.041	-15337.0039
Contribución individual:				
Energía de enlace	234.1777	338.267	85.7595	89.6912
Energía de ángulo	894.5466	930.775	643.362	652.7762
Energía Dihedra	598.0375	605.6547	712.8686	741.0551
Energía impropia	12.4904	13.0938	60.1114	62.834
Energía Lennard-Jones	-1574.1332	-1584.5408	-2255.4646	-2245.7551
Energía electrostática	-10180.0654	-9921.8213	-14042.6777	-14637.6055
Otras contribuciones				

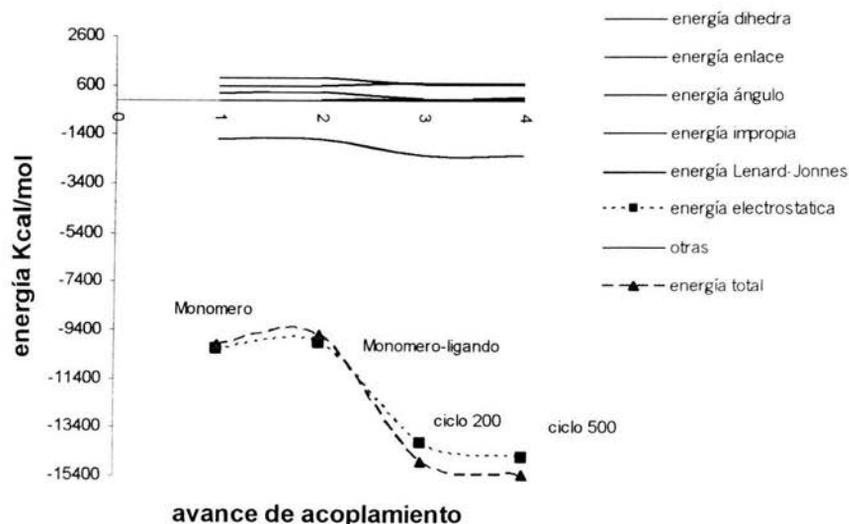


Figura 22. Contribuciones de energía del Receptor Insulinico en el dominio de la cinasa de tirosina con metformin.

La estabilidad del complejo fármaco-receptor y su interacción con los átomos de NH con GLY 1152 a 2.012 Å y NH ARG 1155 a 3.4 Å dentro de la cavidad, se muestra en la Figura 23

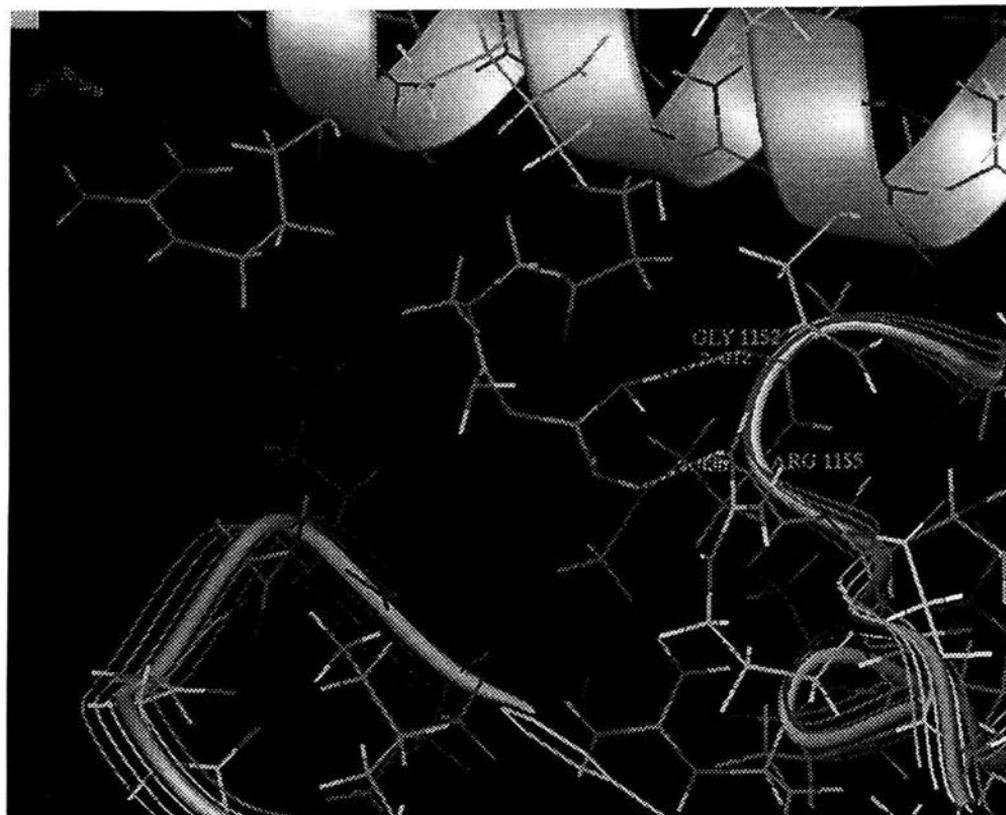


Figura 23 Estructura tridimensional del reconocimiento molecular del Receptor Insulinico en el dominio de la cinasa de tirosina, utilizado como blanco para el metformin.

Factor de crecimiento RI; Fragmento β del dominio de la cinasa

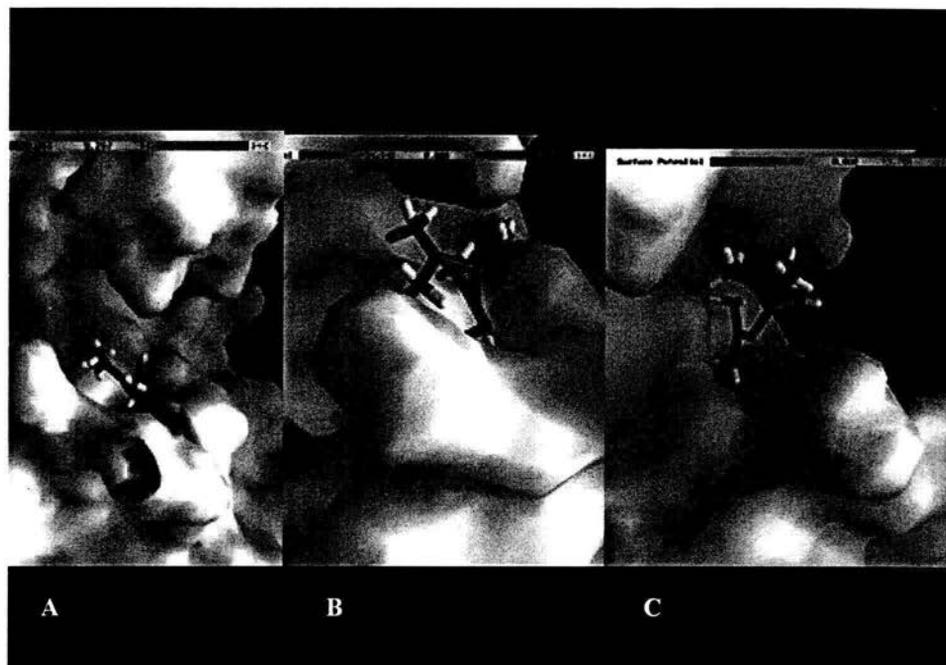


Figura 24. Reconocimiento molecular en la cavidad Factor de crecimiento RI; Fragmento β del dominio de la cinasa con metformin, en A el acomodo inicial, en B con 200 ciclos de optimización y en C con 500 ciclos de optimización.

En este receptor del Factor de crecimiento RI; Fragmento β del dominio de la cinasa se observa una cavidad optima en la superficie de la proteína, que inicialmente tiene una energía de 159223.734 Kcal/mol, que se acopla inicialmente con ligando como se muestra en la Figura 24 en A, en el receptor β cinasa se obtuvo una energía de 159467.8281 Kcal/mol; después de 200 ciclos de optimización se tiene un nueva orientación del ligando con una energía de -14414.8008 Kcal/mol y la energía mínima se obtiene a los 500 ciclos con un valor de -15068.8682 cal/mol del sistema. La contribución de la energía electrostática es la parte fundamental en la estabilidad del sistema fármaco-receptor.

El receptor no tiene una cavidad profunda como la anterior, por lo que su acomodo final ocurre en un canal de la proteína. La tabla 11 y la Figura 25 muestra los valores de energía obtenidos durante la optimización del sistema Factor de crecimiento RI; Fragmento β del dominio de la cinasa y el metformin.

Tabla 11. Energía del sistema Factor de crecimiento RI; Fragmento β del dominio de la cinasa con el metformin.

	Monómero	Monómero-ligando	Optimización	
			200 ciclos	500 ciclos
La energía total CHARMM es: en Kcal/mol	159223.734	159467.8281	-14414.8008	-15068.8682
Contribución individual:				
Energía de enlace	205.3572	309.5333	87.0511	86.7447
Energía de ángulo	823.2375	859.4595	667.7924	647.2574
Energía Dihedra	563.5006	571.118	717.1077	748.1367
Energía impropia	157.4657	158.0787	65.2971	65.4061
Energía Lennard-Jones	167621.875	167613.5781	-2207.1917	-2197.2327
Energía electrostática	-10147.7031	-10043.9385	-13744.8574	-14419.1797
Otras contribuciones	0	0.001	0.001	-0.002

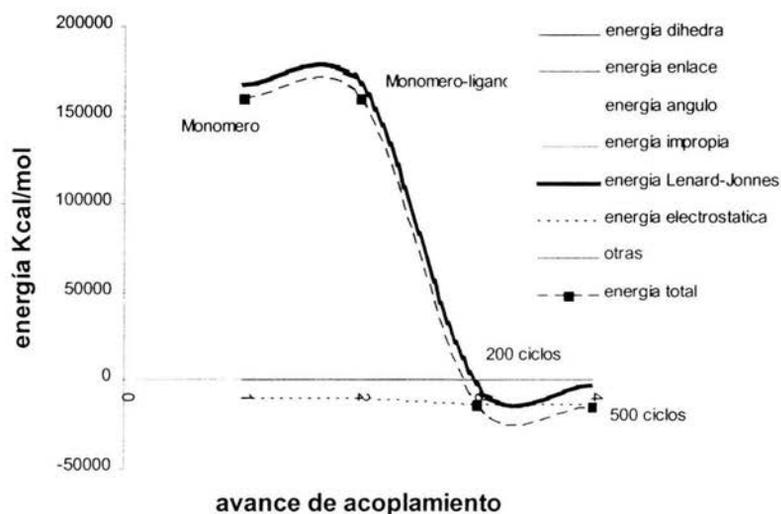


Figura 25 Grafica de avance de acoplamiento del Factor de crecimiento RI; Fragmento β del dominio de la cinasa con el metformin.

En la Figura 26 se muestra la estabilidad del complejo del Factor de crecimiento RI; Fragmento β del dominio de la cinasa con el metformin, observando la interacción por puentes de hidrógeno de los NH que se estabilizan con GLY 1125, GLU 1016 y MET 1126.

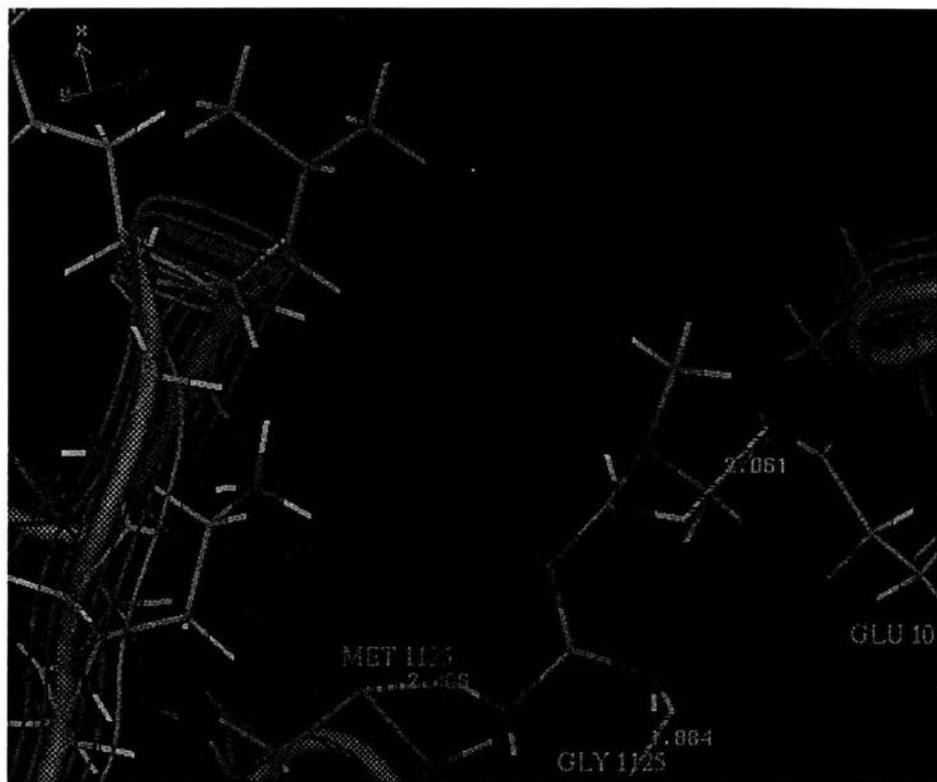


Figura 26. Estructura tridimensional del reconocimiento molecular del Factor de crecimiento RI; Fragmento β del dominio de la cinasa con el metformin.

Domino de la proteína fosfatasa de tirosina

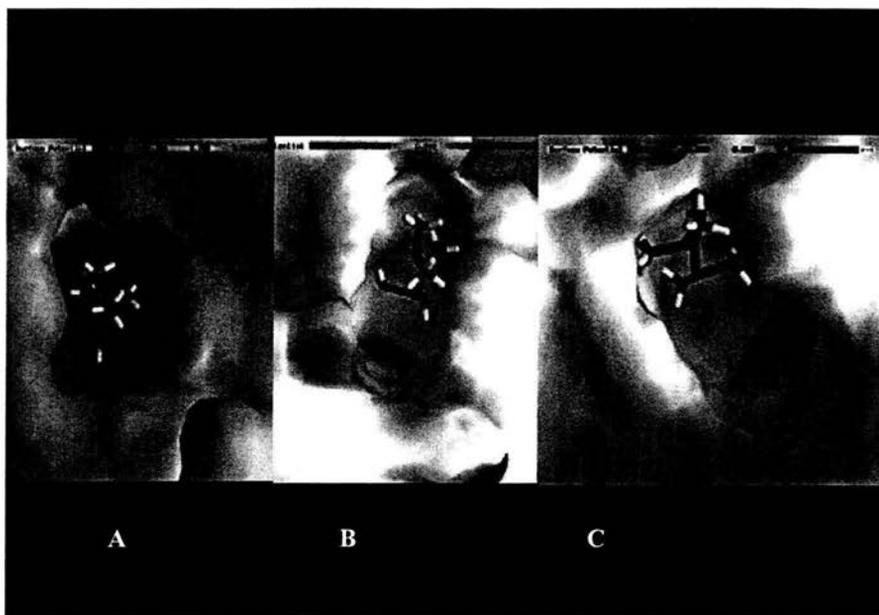
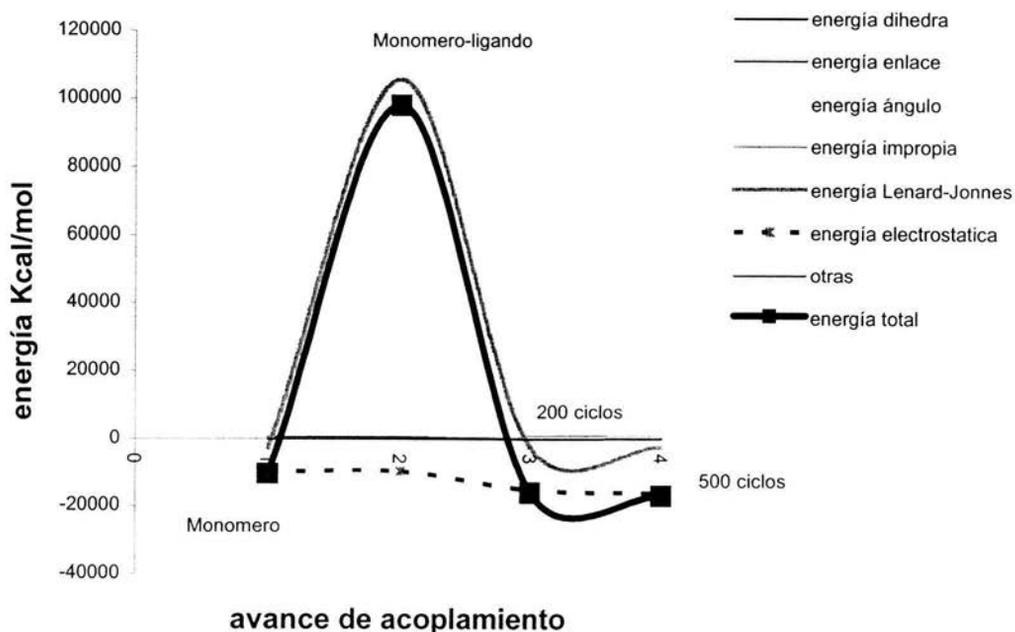


Figura 27. Reconocimiento molecular en la cavidad del Domino de la proteína fosfatasa de tirosina con metformin, el acomodo inicial en A, con 200 ciclos de optimización en B y con 500 ciclos de optimización en C.

La enzima del domino de la proteína fosfatasa de tirosina, tiene una energía inicial de -10476.4844 Kcal/mol y en A de la Figura 27, su acomodo inicial del ligando dando una energía de 98080.0313 kcal/mol, en B se muestra como se orienta la molécula y presenta una energía de -16017.8574 kcal/mol, finalmente en C se muestra el acomodo del ligando dentro de la cavidad que reúne las características para su estabilidad y presenta una energía de -16944.5449 Kcal/mol, para el complejo final, la energía electrostática es la que tiene mayor contribución a la estabilidad del complejo la figura 28 y en la Tabla 12 contiene los datos de energía y acoplamiento, en este receptor la cavidad tiene un volumen de 416.89 \AA^3 donde entra muy bien el ligando que tiene un volumen de superficie de 118.73 \AA^3 .

Tabla 12. Energía sistema dominio de Domino de la proteína fosfatasa de tirosina con el metformin.

	Monómero	Monómero- ligando	Optimización	
			200 ciclos	500 ciclos
La energía total CHARMM es: en Kcal/mol	-10476.4844	98080.0313	-16017.8574	-16944.5449
Contribución individual:				
Energía de enlace	363.2832	465.8156	100.9574	101.5691
Energía de ángulo	1123.9227	1152.0736	701.9545	704.3928
Energía Dihedra	647.2228	654.8066	764.9834	794.7655
Energía impropia	40.6796	41.3063	77.7653	78.2229
Energía Lennard-Jones	-2669.9351	105527.0547	-2410.3279	-2392.2361
Energía electrostática	-9981.6582	-9761.0322	-15253.1895	-16231.2598
Otras contribuciones	0	0.0166	-0.002	0.002



En la Figura 28 Se muestra el avance de acoplamiento del complejo del Domino de la proteína fosfatasa de tirosina con Metformin

La estabilidad de la molécula de metformin al igual que en los receptores anteriores se estabiliza por puentes de hidrogeno con amino ácidos como GLN262, ARG221, GLY 220 y el carbonilo de la ALA 217 (Figura 29)

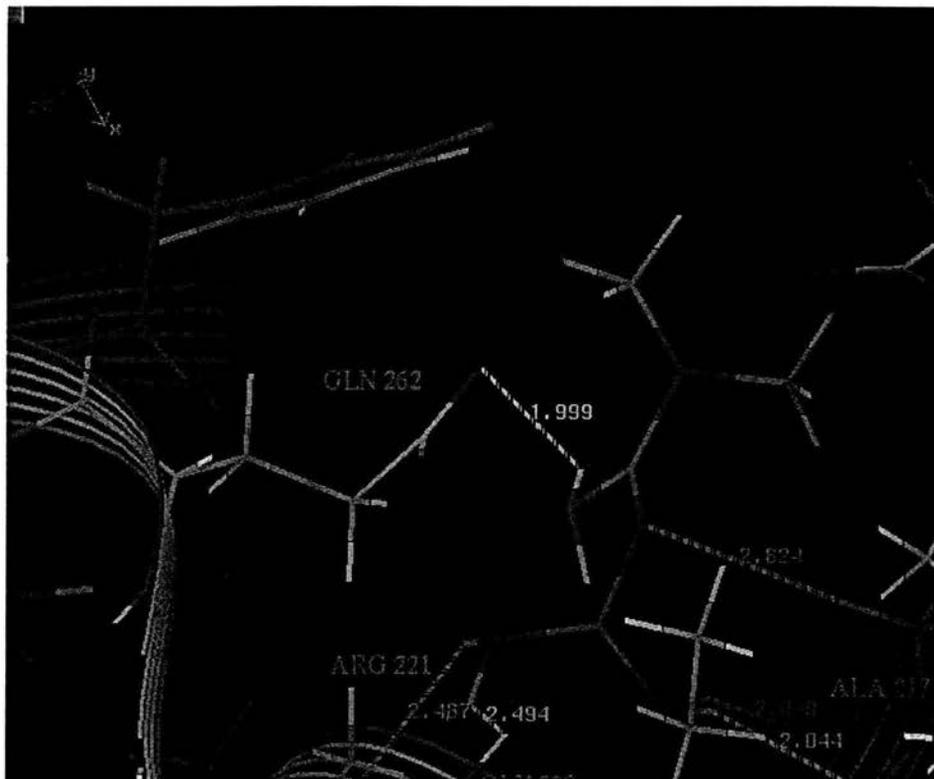


Figura 29. Reconocimiento molecular del complejo del Domino de la proteína fosfatasa de tirosina con Metformin estabilizado en la cavidad.

Hasta ahora solo se realizaron cálculos al vacío, es decir no toma en cuenta la presencia de las moléculas de agua que hay en el sistema por lo que se debe de tomar en cuenta que las interacciones en el organismo son en medio acuoso o hidratado. En la Figura 30 se muestra el Receptor Insulico en el dominio de la cinasa de tirosina Sinonimo: RI con una capa de moléculas de agua de 8 Å de la superficie, porque lo

que tiene contacto con los solvatos es la superficie de la proteína y en la Figura 31 la grafica muestra la adición del agua que estabiliza mas el sistema haciendo la energía mas negativa debido a los puentes de hidrogeno que presenta al tener contacto con el agua, hidratándose.

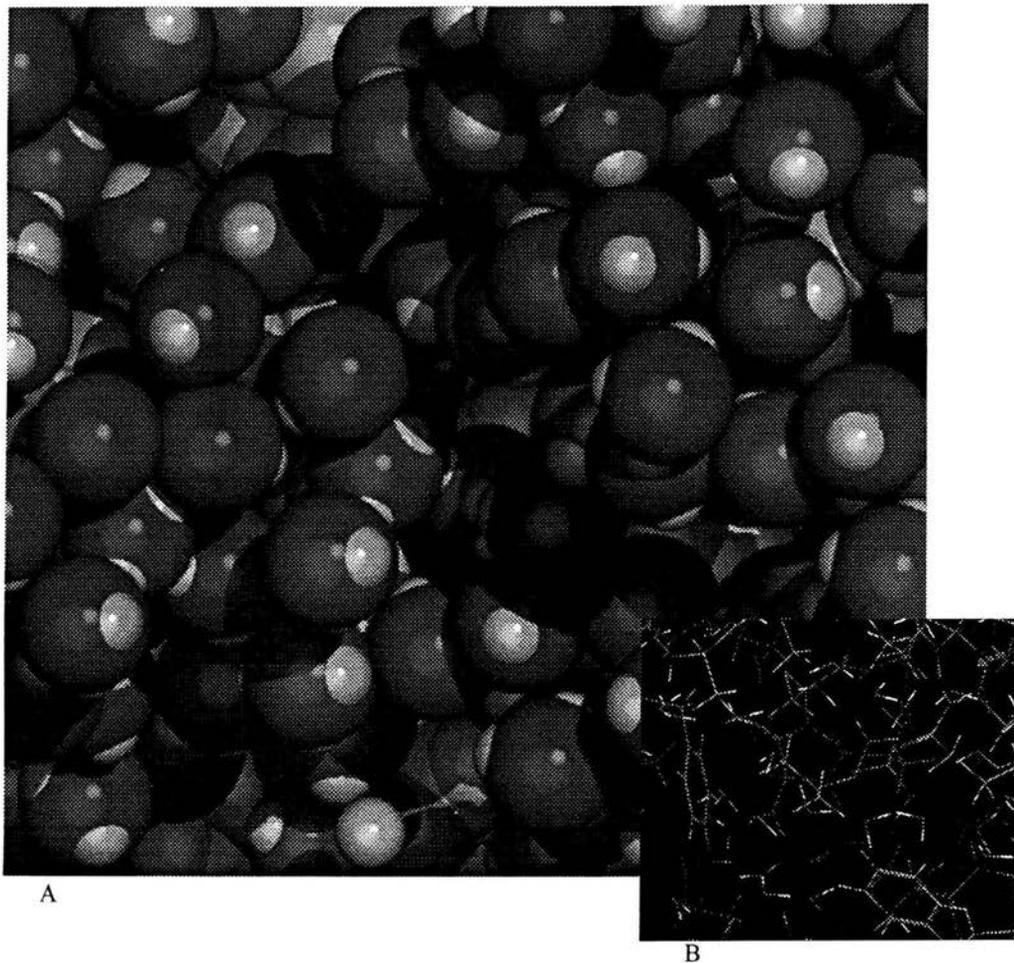


Figura 30 en A Representación en esferas, en B representación molecular de la adición de agua a 8 Å en el complejo Domino de la proteína fosfatasa de tirosina con metformin.

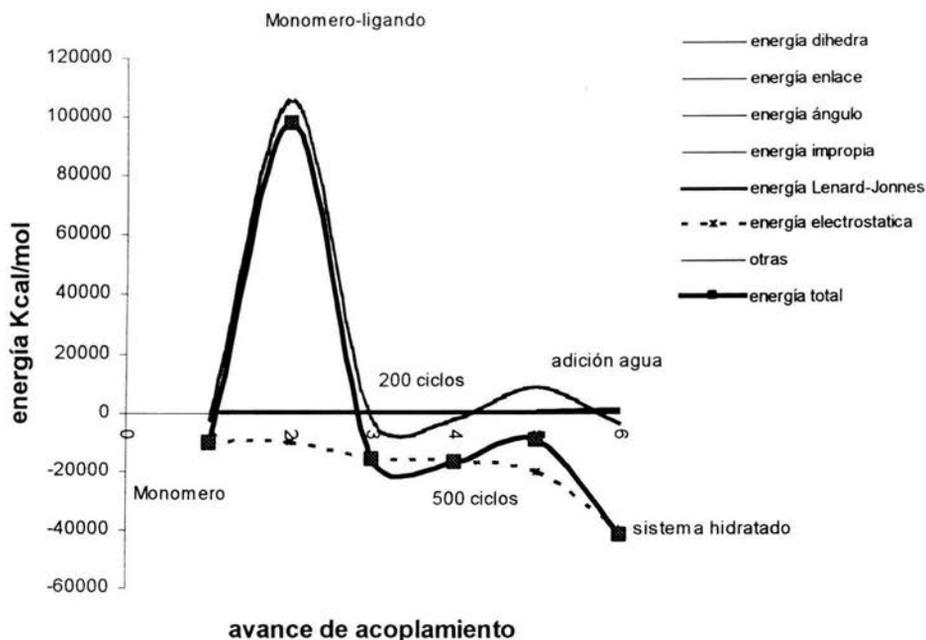


Figura 31 Se muestra el acoplamiento mas la adición de moléculas de agua a 8 Å y la contribución individual de cada parámetro de energía del complejo dominio de la proteína fosfatasa de tirosina- metformin.

Una vez hecho el análisis fisicoquímico del sitio de unión del metformin en los diferentes receptores estudiados mencionados en la literatura se propone una serie de moléculas que son modificada de acuerdo al análisis estructural y conformacional del complejo para ajustarla al sitio receptor.

En la tabla 13 se muestra un conjunto de estructuras químicas con las que se modificada uno de los grupos metilos presentes en el metformin ya que estos no participan de forma necesaria en la estabilidad de la molécula, este grupo metilo por eso esta orientado hacia aminoácidos como Ile, Phe que son grupos no polares, con los cuales tiene interacción hidrofóbica, pero también dentro de esta cavidad hay aminoácidos como: Glu; Asp; Tyr Y Arg) que permiten contactos con

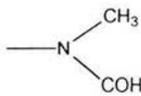
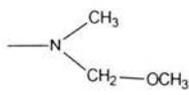
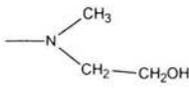
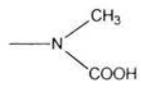
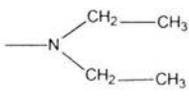
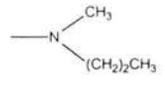
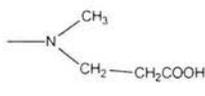
grupos aceptores o donadores de puentes de hidrógeno. En la Tabla 13 se muestra la sustitución del grupo metilo por otros grupos funcionales como: aminas, alcoholes, aldehídos, ácidos carboxílicos y éteres, que satisfacen la característica para estabilizar la molécula en el sitio de acción por puentes de hidrógeno y algunas cadenas alifáticas que interaccionan con Ile y Phe por contactos hidrofóbicos. Estos datos se analizaron y se infiere que:

1. La limitante del volumen de la cavidad lo da el domino de la proteína fosfatasa de tirosina por lo que las moléculas con un volumen entre 159.39 -172.9 Å³ no modifican la cavidad y de 181-203 Å³ generan un canal en la cavidad; ya que como no se conoce su mecanismo de acción se hace el diseño con base en los receptores que tienen un sitio de unión molecular para el Metformin
2. El grupo funcional que da mayor estabilidad al complejo es la presencia de un grupo funcional éter, que actúa como aceptor de puentes de hidrógeno; no requiere de grupo carbonilo como el aldehído que es una molécula pequeña pero muy polar porque desestabiliza la molécula.

Tabla 13. Estructuras químicas propuestas para el análisis del sitio de unión del Metformin en los receptores estudiados.

Estructura química de los sustituyentes	Volumen de la superficie	Energía Kcal/mol
	159.39 Å ³	-40506.6094
	161.69 Å ³	-40404.6055
	166.44 Å ³	-40545.0273

Continuación tabla 13.

Estructura química de los sustituyentes	Volumen de la superficie	Energía Kcal/mol
	166.99 Å ³	-38378.1797
	172.92 Å ³	-40602.4805
	181.09 Å ³	-38591.9492
	184.16 Å ³	-38528.2165
	184.3 Å ³	-38366.75
	187.52 Å ³	-38300.5039
	203.43 Å ³	-38512.8984

De estos datos inferimos que los grupos que tienen una energía menor a los -40000 Kcal/mol serían buenos candidatos a evaluar para agentes hipoglucemiantes.

6.2 Resultados Acarbosa

6.2.1 Aislamiento y cristalización

El aislamiento se hizo a partir de tabletas de Glucobay obteniendo un polvo blanco que se trato para las pruebas de cristalización ver punto 5.1.

No se obtuvieron cristales de la molécula de acarbosa con ninguno de los disolventes utilizados, solo se obtuvieron sólidos amorfos en las paredes del vaso de cristalización como se muestra en la Figura 32.



Figura 32. Muestra el medio de cristalización de acarbosa con metanol-acetato de metilo.

6.2.2 Resultados de caracterización de acarbosa.

6.2.2.1 Espectros de IR

El espectro de IR para la muestra de acarbosa se muestra en la Figura 33 el espectro muestra señales en la región de de 3380.17 cm^{-1} con una banda ancha debido al grupo hidroxilo de los alcoholes, con menor intensidad la señal en 2922.82 cm^{-1} se debe a la interacción C-H, la señal en 1638.06 se debe a la interacción C=C a 1035.30 se obtiene la señal para los enlaces C-O identificándose de esta manera los grupos funcionales en la molécula.

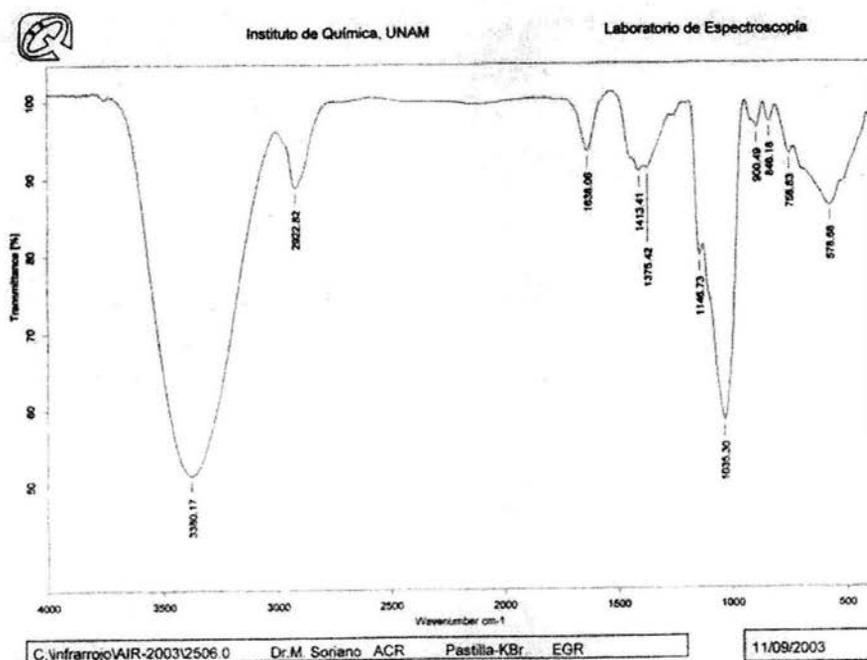


Figura 33. Espectro de Infrarrojo de acarbosa el equipo utilizado fue Bruker Tensor 27 FTIR mediante pastilla de KBr.

6.2.2.2 Espectro de RMN H⁺

En el espectro de RMN del H⁺ se pueden identificar las señales de protones característicos correspondientes a la molécula como se muestra en la Figura 34 en campo alto se presenta un doblete 1.317 que corresponde al metilo de el anillo B correspondiente los protones 18, en el triplete de 2.44 se encuentra el H 16, en el intervalo de 3-4.2 mHz se tienen señales de OH y CH de los anillos.

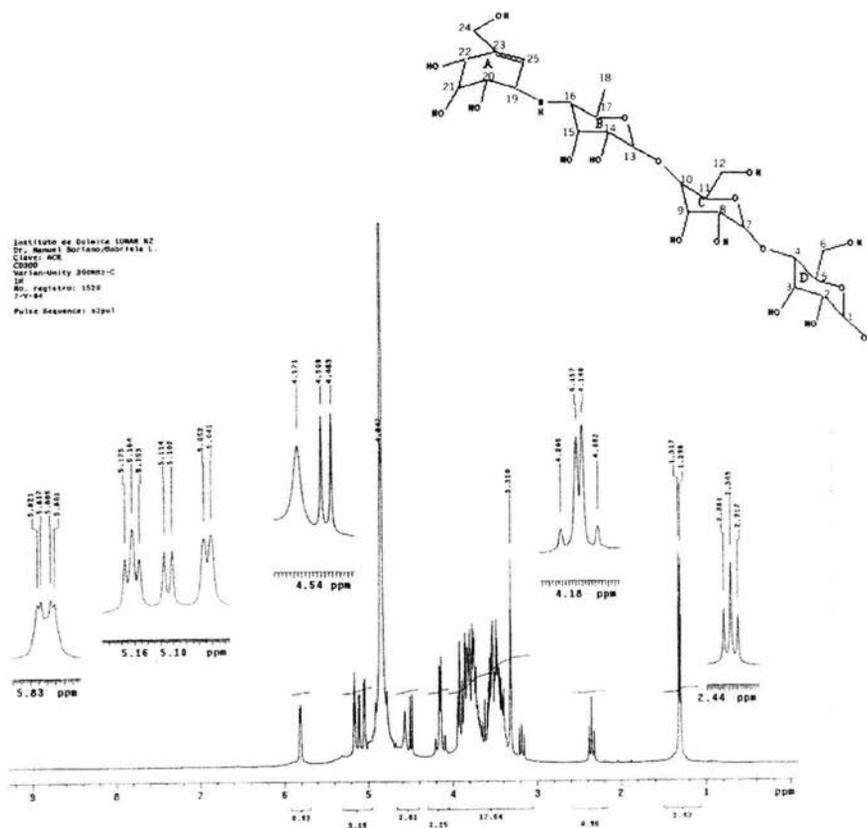


Figura 34 Espectro de RMN H⁺ (Varian-Unity 300 MHz-C) para la acarbosa.

En campo mas bajo encontramos los CH₂ correspondiente al 24 en 4.15 en 4.5 el CH alílico se desplaza debido a la cercanía de la doble ligadura, pero integra para 2 protones, en el pico mas ancho esta el protón de NH a 4.57, en 5 ppm están los tres protones de los cetales en 5.16, el 1 que estaría a campo mas

bajo, el 7 y 13 en 5.11 y 5.05 respectivamente, por ultimo podemos identificar el protón vinílico 25 a 5.8 ppm que es el mas desplazado en todo el espectro.

6.2.2.3 Espectro de C¹³.

En el espectro de C¹³ se pueden observar señales en la región de 18.8 ppm que corresponde al carbono 18, en 57.9 ppm el 19, en 62 ppm el 6 y 12 ya que son equivalentes, la señal en 63.4 ppm es el 24, en 66.9 ppm esta el C 16, en el intervalo de 7.14-81 ppm se encuentran todos los carbonos unidos –OH, y en campo bajo identificamos señales de carbono de los cetales 13 a 93.9 ppm, el 1 a 102 ppm y el 7 a 103 ppm. También se presenta señales de carbono alílico 22 a 98.3ppm mas a campo bajo esta el vinílico 25 a 123.8ppm y el cuaternario 23 a 141.7 ppm lo que representa la Figura 35.

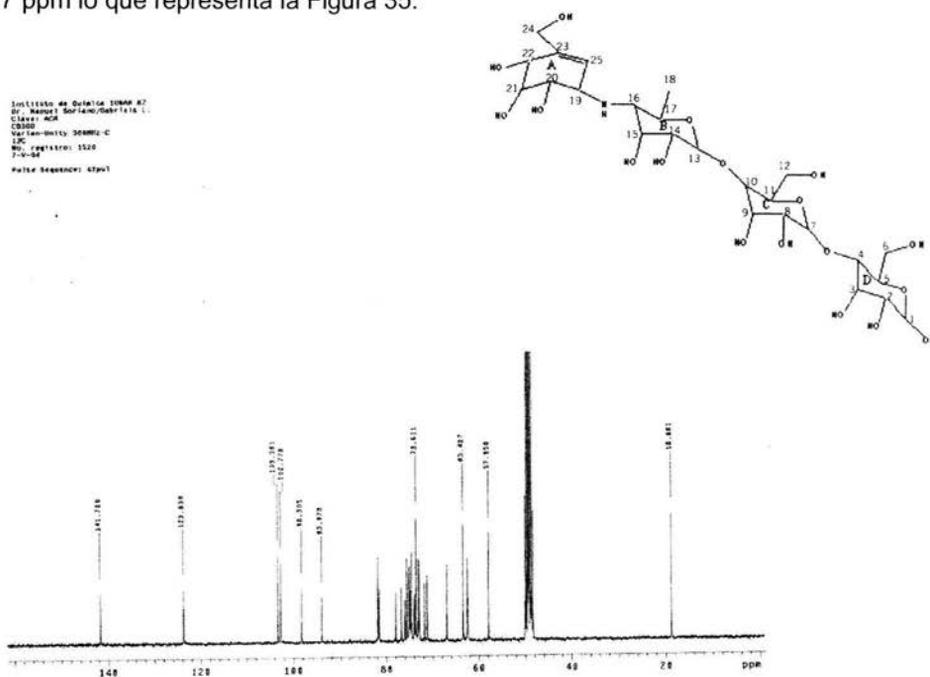


Figura 35 Espectro de RMN C¹³ (Varian-Unity 300 MHz-C) de la acarbosa.

β.2.2.4 Espectro DEPT.

Otra de las técnicas que ayudan al análisis en la identificación de la estructura de la acarbosa es el espectro DEPT, el cual nos permite identificar los CH₂ presentes en la molécula como los que se encuentra en 62 y 63 ppm, que tenemos presentes en el anillo A, C y D la presencia de la doble ligadura en el anillo A desplaza la señal del carbono a campo bajo, señal en 63 ppm, que corresponde al carbono 24 esto nos permite estudiar el espectro de la Figura 36.

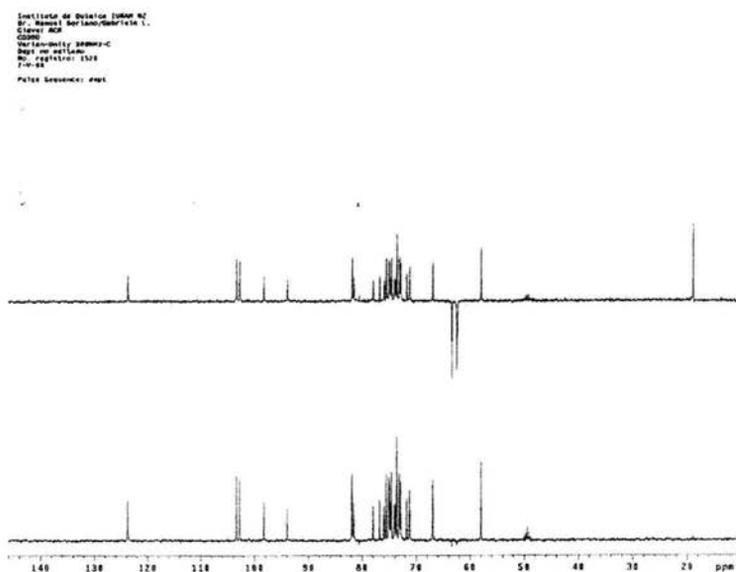


Figura 36 Espectro DEPT en CD₃OD (Varian-Unity 300 MHz-C)

6.2.2.5 Espectro HETCOR

En los resultados de espectros de 2-dimensiones (Figura 37) se realizó el HETCOR, en el cual podemos observar las correlaciones de protón-carbono a un enlace de distancia.

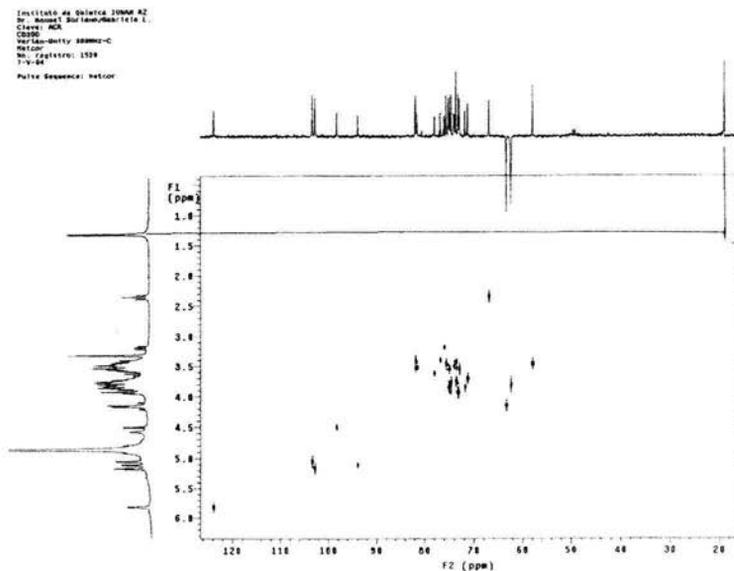


Figura 37 Espectro de dos dimensiones (Varian-Unity 300 MHz-C) que muestra la correlación de carbono – hidrogeno a un enlace de distancia.

Con este podemos comparar la relación que existe y corroborar el acoplamiento con los dos diferentes espectros de H^+ y C^{13} .

6.2.2.6. Espectro de Masas.

En el espectro de masas de la acarbosa (Figura 38) el pico base esta en $m/z = 154$ y el pico padre esta en $m/z = 646$ que proporciona información de la formula estructural $C_{25}H_{43}O_{18}N$.

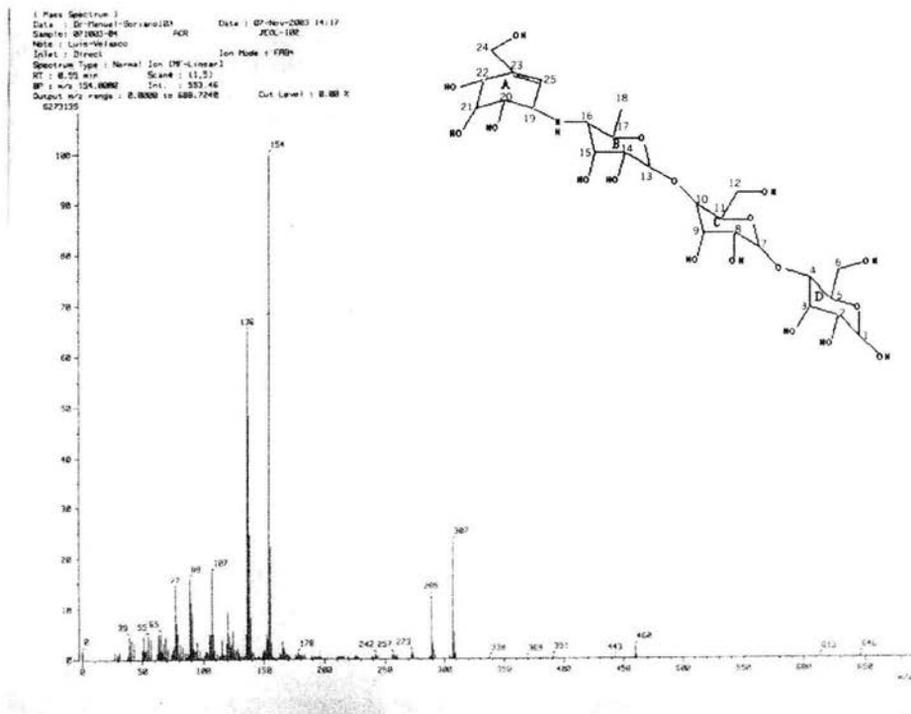


Figura 38 Espectro de masas técnica Ion (MF lineal) de Acarbosa presentado como gráfica de barras.

6.2.3 Estudio de flexibilidad de la acarbosa.

La estructura molecular de los monosacáridos muestra una conformación definida debida a su estabilización interna a través de puentes de hidrógeno intramoleculares. La acarbosa consta de 4 subunidades (2 unidades de glucosa, una unidad de fucosamina y un anillo de ciclohexeno polihidroxilado). Las unidades de glucosa están unidas a través de un enlace glicosídico. Las uniones de la segunda glucosa con la fucosamina y la unión de la fucosamina con el anillo de ciclohexeno polihidroxilado se hace a través del grupo amino. Debido a la intensa flexibilidad de rotación de los enlaces glicosídicos y del enlace amino resulta muy difícil obtener monocristales para su estudio estructural. Sin embargo, en esta sección se analizó la flexibilidad de la molécula de acarbosa para poder entender su modo de interacción con su sitio receptor.

La flexibilidad de la molécula de la acarbosa se analizó empleando la técnica de mecánica molecular. La Figura 39 muestra el cambio de la energía de la molécula en relación con los ciclos de optimización, mostrando la flexibilidad de la molécula. La Figura 40 muestra también las diferentes conformaciones de la acarbosa. La molécula A corresponde a la estructura de la acarbosa en el vacío que presenta una estructura compacta estabilizada por puentes de hidrógeno intramoleculares. La molécula B corresponde a la acarbosa en un máximo de energía que presenta corresponde a una estructura inestable. Finalmente, la molécula C corresponde a la estructura de la acarbosa en el sitio receptor de las α -glucosidasas. Como se puede apreciar, la molécula de acarbosa presenta una gran flexibilidad. Como molécula independiente su estructura es compacta y cuando interacciona con el sitio receptor adopta una conformación extendida, ambas estabilizadas por puentes de hidrógeno.

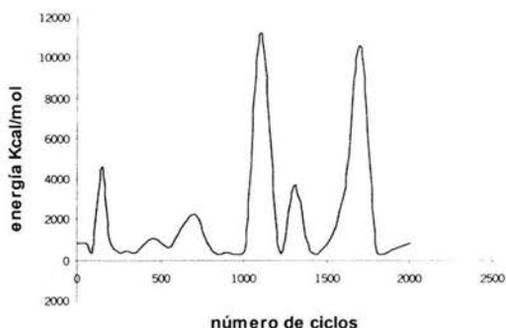


Figura 39. Energía total de las diferentes conformaciones que presenta la molécula de acarbosa al ser sometida a un proceso de dinámica molecular. (Software Quanta)

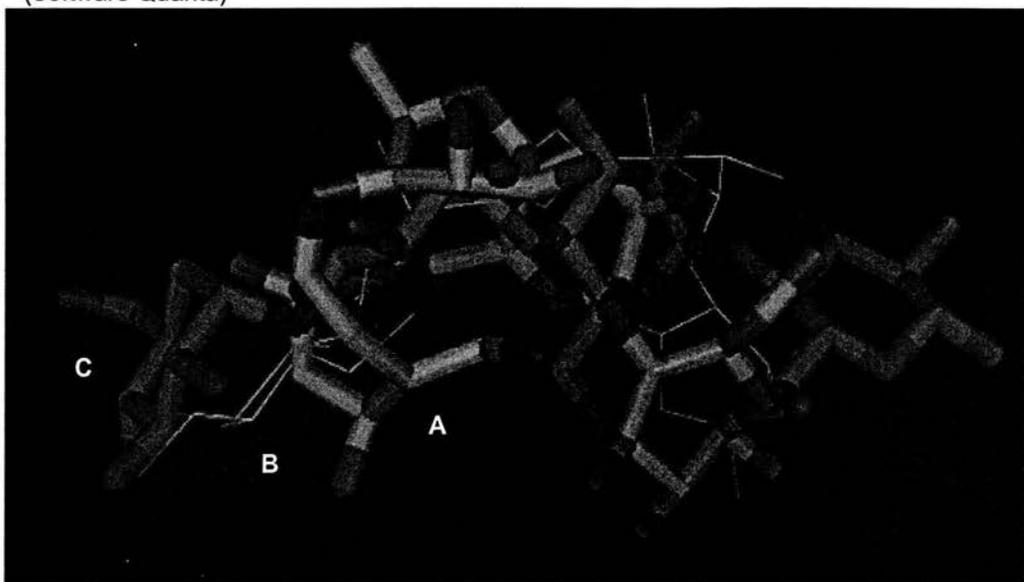


Figura 40. Estructura tridimensional de la acarbosa a la que se aplicó la técnica de Mecánica molecular para determinar la energía de estabilización de la molécula, en A se representa la conformación más estable sola, en B la conformación de mayor energía y en C la conformación más estable dentro del sitio receptor.

En la Figura 40, se presentan las estructuras para la molécula de Acarbosa después de aplicarle varios tratamientos. La estructura B, que es la de mayor energía, corresponde a la contribución a la energía molecular por atracción-repulsión de Van der Waals, representada por la ecuación de Lennard Jones. Si

esta contribución se optimizara hasta conseguir un mínimo, entonces se obtendrá una estabilización de la molécula. Sin embargo se aprecian varios mínimos de energía mostrando de esta manera la relativa flexibilidad de los enlaces de la molécula.

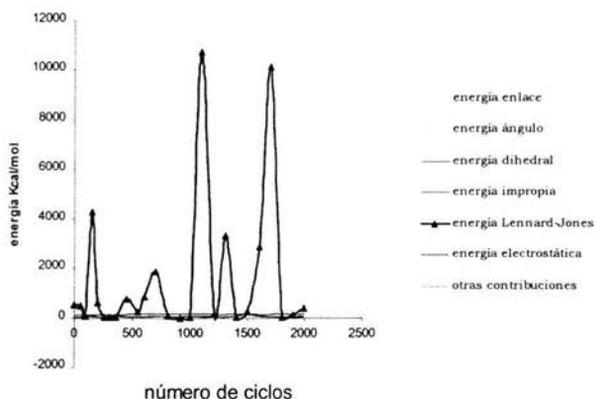


Figura 41 Aportación individual de energía evaluada en la molécula de Acarbosa software utilizado Quanta.

El valor mínimo de energía del sistema debe ser obtenido en las contribuciones electrostáticas de la molécula ya que en su estructura presenta un número grande grupos OH que requieren de una estabilización. Sin embargo la contribución electrostática es pequeña en comparación con la contribución de Lennard-Jones (Figura 42)

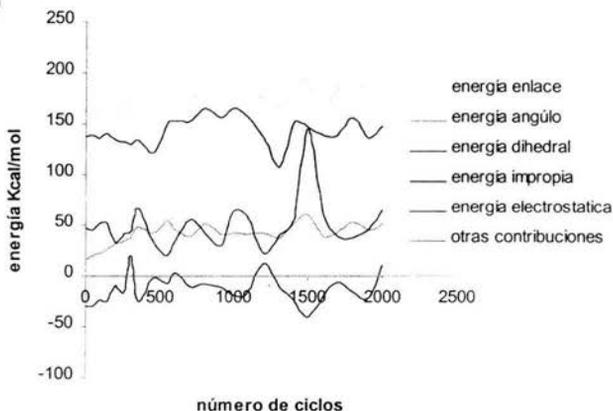


Figura 42 Aportación de la energía individual calculado por Mecánica Molecular software Quanta.

6.2.4 RECONOCIMIENTO MOLECULAR

Resultados del reconocimiento molecular de α glucosidasas-acarbosa.

Existe en un banco de datos con información estructural de macromoléculas biológicas, tales como proteínas, enzimas, ácidos nucleicos y algunos polisacáridos conocido como el banco de datos, Protein Data Bank (PDB). De este banco de datos se selecciono el archivo con clave 1GAM que contiene los datos estructurales del complejo α -glucosidasas con acarbosa, esta información estructural es otra de las herramientas del reconocimiento molecular que nos permite inferir sobre el diseño de nuevos fármacos, ya que se puede cristalizar la molécula blanco con el ligando y obtener datos cristalográficos, de esta manera es posible analizar la cavidad del ligando en la Figura 43; cuales son los grupos funcionales que interacciona directamente con el receptor y cuales son los aminoácidos de la proteína involucrados.

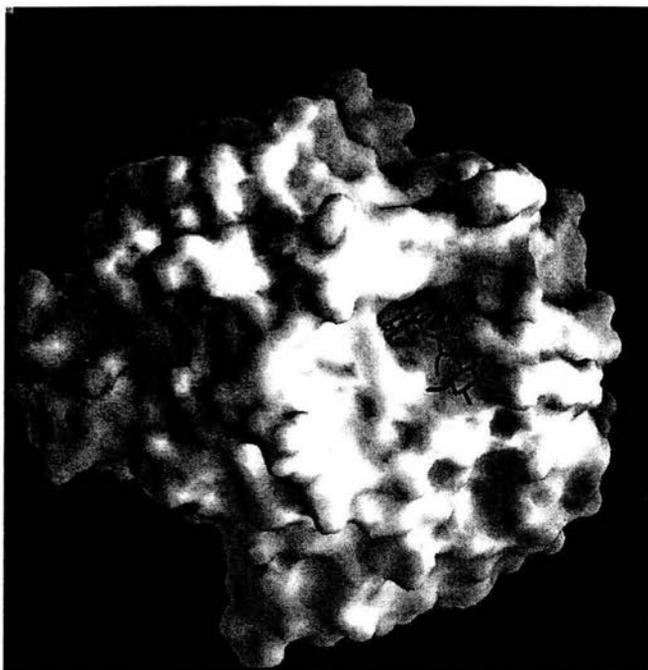


Figura 43 Representación de la superficie de las α -glucosidasas-acarbosa en su sitio receptor.

El complejo macromolecular de α -glucosidasa-acarbosa se encuentra estabilizado por la contribución de la energía electrostática, debido principalmente a la formación de puentes de hidrogeno entre los grupos OH de la acarbosa y diferentes residuos del sitio activo de la enzima. La Figura 44 muestra las interacciones de la acarbosa con el grupo carbonilo de la glicina 121 y los grupos iminos de las argininas 54 y 305.



Figura 44 Representación molecular del complejo de la α -glucosidasa con acarbosa en su sitio receptor (sitio activo) estabilizada por puentes de hidrógeno.

La aportación en la energía del complejo se muestra en la Figura 45 donde se tiene la aportación mayor por la energía electrostática, debido a dicha estabilidad de la acarbosa dentro su sitio receptor mediante puentes de hidrogeno.

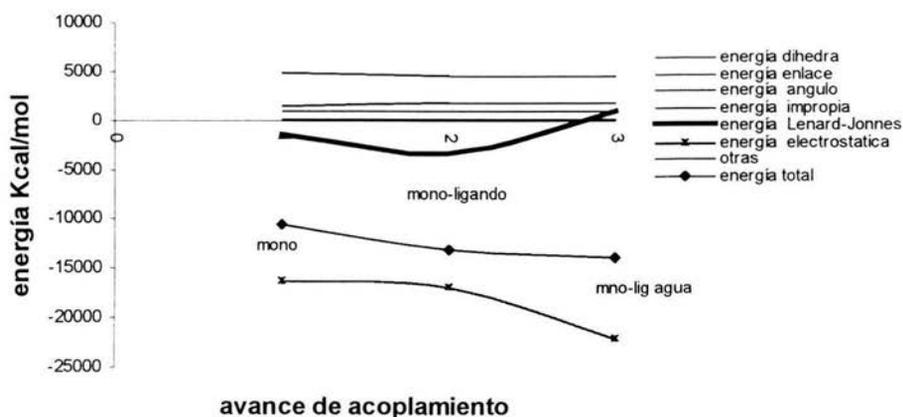
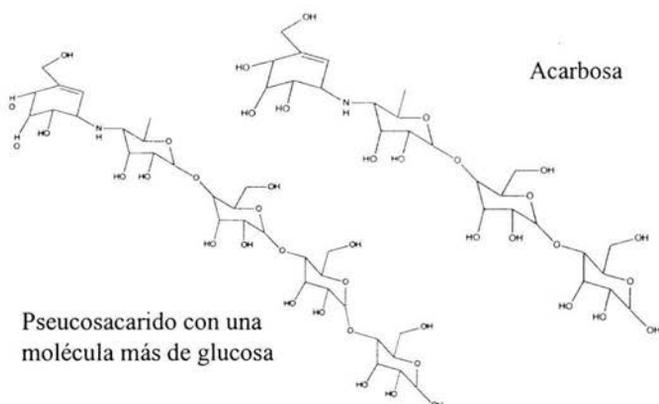


Figura 45 Gráfica de avance del acoplamiento en el complejo α -glucosidasa con acarbosa el software utilizado fue Quanta.

El análisis fisicoquímico y estructural, del complejo así como el mecanismo de acción de la acarbosa con las α -glucosidasas nos permite inferir que:

1. La función bioquímica de la α -glucosidasa es la ruptura de los enlaces glicosídicos. Como se ha mencionado anteriormente, la acarbosa cuenta con dos unidades de glucosa unidas a través de un enlace glicosídico. En base a esta información, la adición de una tercera molécula de glucosa permitirá a la enzima poder actuar sobre un enlace glicosídico extra, esto trae como consecuencia una mayor estabilidad al ligando en su sitio receptor.



2. La energía del complejo del α -glucosidasa-acarbosa es de -18902.3569 Kcal/mol y del complejo α -glucosidasa-molécula modificada es de -35884.2070 Kcal/mol. Como se puede apreciar existe una mayor estabilización del sistema α -glucosidasa-molécula modificada y por lo tanto se puede inferir como un posible candidato para un nuevo fármaco.

7. CONCLUSIONES

Se probó los modelos de proteínicos reportados en la literatura como candidatos a contar como sitios receptores para el metformin.

Los resultados indican que tres de los cuatro modelos probados, existe una región con las características idóneas para considerarlo como receptor para el metformin.

Mediante el empleo de técnicas analíticas espectroscópicas, difracción de rayos x y Mecánica Molecular, para el reconocimiento molecular, fue posible estimar, el probable volumen, el potencial de superficie, y la geometría del sitio receptor, y su acoplamiento preciso con el fármaco, con una complementariedad definida por la deslocalización electrónica del fármaco con un ambiente negativo y el ambiente de aminoácidos en el receptor que proporcionan la superficie positiva.

El análisis molecular del metformin nos permite inferir una estructura para el ligando con características de aceptor o donador de puentes de hidrógeno y que no tenga un volumen de superficie mayor a 180 \AA^3 . Así, para la estabilidad del complejo, la sustitución del grupo metilo por un grupo éter es una buena alternativa para el diseño de nuevos fármacos.

Si existe ya información estructural previamente reportada en la literatura y depositada en el banco de datos del PDB, no es necesario empezar desde la obtención de los cristales de una molécula o proteína y con ellos hacer el diseño de fármacos basados en las características estructurales del complejo.

El análisis molecular del sitio de acción de la acarbosa nos permite conocer la estabilidad de la molécula en el complejo que es debido a puentes de hidrogeno y conociendo el mecanismo de acción podemos diseñar una molécula que tenga una mejor estabilidad al adicionar molécula de glucosa en el ligando inicial ya que

las alfa-glucosidasas reconocen los enlaces glicosídicos en su mecanismo de acción. Cabe mencionar que la energía del nuevo ligando muestra una mayor estabilidad en el complejo.

Con los modelos empleados y el procedimiento señalado fue posible identificar un sitio activo en un plazo mas corto que con la metodología tradicional, con la consecuente reducción de costos, por otra parte, la introducción de nuevos sustituyentes a la molécula líder permitió encontrar alternativas para nuevos fármacos con efecto sobre el mismo sitio receptor.

Por lo tanto los estudios de reconocimiento molecular son una técnica de la química computacional que nos permite hacer simulaciones moleculares y diseñar fármacos a la medida del sitio de acción y posteriormente realizar la evaluación biológica en sistemas *in vitro* e *in vivo* y de esta manera el desarrollo de nuevos fármacos sería mas rápido y eficaz que obtener cientos de moléculas modificadas al azar y que sólo pocas de ellas tengan actividad.

El contenido del conocimiento profesional que logré, fue desde revisar la literatura en forma rápida y eficiente, el acopio de materiales, aplicación de técnicas de análisis espectroscópico, interpretación de espectros de IR, RMN H⁺, RMN C¹³, IM, difracción de Rayos X, hasta el uso y explicación de programas de química computacional tales como QUANTA, GRASP en lenguaje Unix empleando el sistema gráfico Silicon Graphics, con aplicación practica e identificación de necesidades desde el punto de vista costo-beneficio y diseño de nuevos medicamentos.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

8. PERSPECTIVAS

Los estudios de reconocimiento molecular permiten el desarrollo de moléculas basadas en los requerimientos estructurales y energéticos del sitio receptor, lo cual nos permite reducir el número de candidatos que deben ser sintetizados y posteriormente evaluados en su actividad biológica.

A partir de este reconocimiento molecular se pueden realizar:

1. La síntesis de los compuestos propuestos
2. La evaluación biológica para poder probar su efecto farmacológico.

Para obtener un fármaco con mayor afinidad por el receptor.

9. BIBLIOGRAFIA

1. **Lilly Argentina.** El proceso de descubrir, evaluar y desarrollar un nuevo medicamento es una que en sentido general los periodos de tiempo de desarrollo puedan reducirse. Argentina: http://www.lilly-argentina.com/about_04.html (en línea) 9/03/04.
2. **Gago F.** Métodos computacionales de modelado molecular y diseño de farmacos. Madrid (en línea). (www://indy2.fisfar.uah.es/~fagago/Public/PDF_files/RAF_1993.pdf). 09/03/04.
3. **Hiriart M.** La historia natural de la diabetes. *Ciencia*. 2002;53 No 3:4-7
4. **Secretaria de salud.** Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-015-ssa2-1994, para la Prevención, Tratamiento y Control de la Diabetes Mellitus en la atención primaria para quedar Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-1994, para la Prevención, Tratamiento y Control de la Diabetes.
5. **Williams F.** et al. Principles of Medical Chemistry . 5^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. 2002. 629-648.
6. **Guillen GM.** Diabetes Mellitus cómo se manifiesta, como evoluciona, como se complica. *Ciencia*. 2002;53 No 3:54-62.
7. **Zeckskemeti V. et al.** New Trends in the development oral antidiabetic Drugs. (en línea). www.bentham.org/sample-issues-cmc9-1/kecskemti/kecskemti-ms.html.
8. **Secretaria de salud.** Novena actualización del cuadro basico y catálogo de medicamentos del sector salud. (en línea). México: secretaria de salud, www.salud.gob.mx/unidades/csg/cuads_bas_cat2002/medicamentos/ACTUA...11/08/03.
9. **Murcia-Soler M. et al.** QSAR Analysis of Hypogluceic Agents Using the Topical Indices. *Journal Chem. Inf. Sci.* 2001; 41: 1345-1354.
10. **De Fronzo RA.** Pharmacology Therapy for Type 2 Diabetes Mellitus. *Annals of internal medicine*. 1999;131No 4: 281-303.
11. **Zbigniemi J.** Carbohydrates in Drug Design. New York: Marcel Dekker, 1997: 7-11

12. **Talamond P. et al.** Isolation, characterization and inhibition by acarbose of de α -glucoamilasa from lactobacillus fermentum: comparison with Lb. Manihotivotans and Lb plantarum amylases. *Comparative biochemistry and Physiology part B.* 2002;351-360.
13. **Feruze Y. et al.** Inhibition of gastric emptying by acarbose is correlated with GLP-1 response and accompanied by CCK release. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001;281: G752-G763.
14. **Paiva L. et al.** Chronic Acarbose-feeding increases GLUT1 protein without changing intestinal glucose absorption function. *European J of Pharmacology.* 2002; 434: 197-204.
15. **Bradley J. et al.** The Antidiabetic Drug Metformin Elevates Receptor Tyrosine Kinase Activity and Inositol 1,4,5-Trisphosphate Mass in Xenopus Oocytes. *The Endocrinology Society.* 1996; 137: 2990-2999.
16. **Dmitri K. et al.** Metformin: An Update. *American College of Physicians – American Society of International Medicine.* 2002;137:E25-E32
17. **Gaochao Z. et al.** Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *The journal of clinical investigation.* 2001;108:1167-117
18. **Hans-Dieter H.** Methods and principles Medical Chemistry. New York. VCH .1997; 5: 13-57
19. **JJ Irwin. et al.** Molecular Docking and Drug Design. *Computational Nanosciencie and Tecnology.* 2002:50-51
20. **Padilla J, et al.** Simulación del reconocimiento entre proteínas y moléculas orgánicas o docking. Aplicación al diseño de fármacos. *Mensaje bioquimico.* 2002: XXVI; 129-145.
21. **Schneidman D. et al.** Predictions molecular interactions in silico: II. Protein-protein and protein-drug docking. *Current Medical Chemistry.* 2004;11;91-107
22. **Oranit D. et al.** Prediction molecular interaction's in silico : I A guide to pharmacophore identification and its applications to Drugs desing. *Current Medical Chemistry.* 2004;11;71-90

23. **Willians L.** The many roles of computation in drug discovery. *Science*. 2004;303; 1813-1818.
24. **Inbal H. et al.** Principles of Docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions. *Proteins: Structures, Function, and genetics*.2002;47;409-443.
25. **Caterina B. et al.** Protein-based virtual screening of chemical database. 1. evaluation of different docking/scoring combinations. *J. Med. Chem*.2002;43;4759-4769.
26. **Lorbert M. et al.** Protein-protein docking whit multiple residue conformations and residue substitutions. *Protein science*. 2002;11;1393-1408.
27. **Sobolev B. et al.** Molecular docking using surface complementary. *Proteins: Structures, Function, and genetics*.1996;25;120-129.
28. **Baxter C. et al.** Flexible docking using tabu search and an empirical estimate of binding affinity. *Proteins: Structures, Funtion, and genetics*.1998;33;367-382.
29. **Cohen N.** Guidebook on Molecular Modeling in Drug Desing. by a academic press.inc.1996.
30. **Hans-Dieter Holtje and Gerd Folkers.** Molecular Modeling basic principles and applications. ed VCH. Tokyo.2000.14-163.
31. **Kumar N. et al.**Metformin chanches insulin signaling in insulin-dependent and independent phatways in insulin resistant muscle cells. *British Journal of Pharmacology*. 2002;137;329-336.
32. **Lee G. et al.** The Anti-diabetic Drugs rosiglitazone and Metformin Stimulate AMP-activated Protein Kinase through distinct signalin phatway. *The Journal of Biological Chemistry*. 2002;No 28, issue of july 12; 25226-25232.
33. **Gadalla A, et al.** The antidiabetic Drug Metformin Activates the AMP-Activated protein Kinasa Cascade cia an Adenina Nucleotic-Independent Mechanism. *Diabetes*.2002;55;2420-2425.

34. **Yong B, et al.** Troglitazone but not Metformin Restore Insulin-Stimulate Phosphoinositide 3-kinase activity and increases p 110b Protein levels in skeletal muscle of type diabetic subjects.

35. **Zhang Z, et al.** Inverse relationship between peripheral insulin removal and action: studies whit metformin. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001;281;E1240-E1248.

36. **Harinder S., et al.** Cellular Mechanism of Metformin action involves glucose transporter translocation from an intracellular pool to the plasm membrane in muscle cells. *Endocrinology.*1992;131;1156-1173.

37. **Gunton J, et al.** Metformin Rapidly increases insulin receptor activation in human liver and signals preferentially through insulin –receptor substrate-2. *The Journal of Clinical endocrinology and metabolism.* 2003: 88 ;1323-1332.

38. **Myo J, et al.** Comparative Study of inhibition of α -glucosidase, α -amilase, and Cyclomaltodextrin Glucanosyltransferasa by isoacarbose, and Acarviosene-glucose. *A of Biochemistry and Biophysics.*1999; 371: 277-238.

39. **Aleshin A, et al.** Refined Structure for the Complex of Acarbose with Glucoamilase from *Aspergillus awamori* var. X100 to 2.4-°A Resolution. *The Journal of Biological Chemistry.*1994;269: 15631-15639

40. **Ing P, et al.** X-Ray structure of acarbose bound to amyloamylase from *Thermus aquaticus*. *Eur. J. Biochemistry.*2000;267: 6903-6913.
United States Patente:4, 062 950.

41. **Severan D.** Polysaccharides structural diversity and functional versatility. Marcel dekker, inc. 1998.1-51