



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS



**“Exploración de metabolitos secundarios de extractos de plantas
nativas de Michoacán como inhibidores de la enzima Aldosa
Reductasa”**

TESIS

Que para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

EN:

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Presenta:

Q.F.B. RITA BELTRÁN SÁNCHEZ

Asesor:

DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL MAURO MANUEL
MARTÍNEZ PACHECO.

Co-Asesor:

DOCTORA EN CIENCIAS EN LA ESPECIALIDAD DE QUÍMICA ORGÁNICA
ROSA ELVA NORMA DEL RÍO TORRES

Morelia, Michoacán.

Enero 2015.

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN LOS LABORATORIOS DE “FISIOLOGÍA CELULAR” Y “QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES” DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO CON LA ASESORÍA DE LOS DOCTORES EN CIENCIAS MAURO MANUEL MARTÍNEZ PACHECO Y ROSA ELVA NORMA DEL RÍO TORRES.

Índice

Índice de figuras.....	7
Índice de tablas.....	9
Lista de abreviaturas.....	11
Resumen.....	12
Abstract.....	13
1. Introducción.....	14
2. Antecedentes.....	16
2.2. Aldosa Reductasa.....	16
2.2.1. Estructura de la AKR1B1.....	16
2.2.2. Función biológica de AKR1B1.....	18
2.3. Vía de los polioles.....	19
2.4. <i>Diabetes mellitus</i>	25
2.5. Catarata ocular.....	27
2.6. Comparación entre las enzimas AKR1B1 y AKR1B4.....	30
2.7. Inhibidores de la AKR1B1 (IAR).....	31
2.8. Productos naturales vegetales.....	32
2.9. Uso de plantas medicinales.....	35
3. Justificación.....	38
4. Hipótesis.....	39
5. Objetivo general.....	40
5.1. Objetivos particulares.....	40
6. Metodología.....	41
6.1 Estrategia experimental.....	41

6.2 Extractos vegetales.....	41
6.2.1. Material vegetal.....	41
6.2.2. Obtención de extractos vegetales.....	41
6.2.3. Preparación de los extractos para el ensayo de inhibición	44
6.3. Actividad enzimática de la Aldosa Reductasa.....	44
6.3.1. Aldosa Reductasa de cristalino de rata (AKR1B4).....	44
6.3.2. Actividad enzimática <i>in vitro</i>	45
6.3.2.1. Medición de la actividad enzimática por consumo de NADPH	45
6.3.2.2. Medición de la actividad enzimática por medición de la concentración de glicerol.....	46
6.3.2.3. Actividad enzimática en presencia de dimetilsulfóxido (DMSO).....	47
6.3.3. Ensayo de inhibición de la AKR1B4 <i>in vitro</i>	47
6.4. Selectividad del ácido 13- <i>epi</i> -labdanólico.....	48
6.4.1. Enzima 20 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa recombinante de humano (AKR1C1).....	48
6.4.2. Obtención del extracto crudo de enzima de eritrocitos de humano.....	48
6.4.2.1. Actividad enzimática del extracto crudo de enzima de eritrocitos de humano.....	49
6.4.2.2. Actividad enzimática de la AKR1B1.....	50
6.5. Purificación de compuestos.....	50
6.5.1. Cromatografía en columna	50
6.5.2. Preparación de los compuestos purificados para el ensayo de inhibición	51
6.6. Determinación de la CI_{50} del ácido 13- <i>epi</i> -labdanólico en AKR1B4.....	51

6.7. Determinación de los parámetros cinéticos del ácido 13- <i>epi</i> -labdanólico con AKR1B4.....	51
6.7.1. Tipo de inhibición	51
6.7.2. Constante de inhibición (K_i)	52
6.8. Docking molecular.....	52
6.8.1 Preparación de la macromolécula.....	52
6.8.2. Preparación del ligando.....	52
6.8.3. Generación del mapa de búsqueda y ejecución del software Autodock Vina.....	53
6.9. Análisis de datos.....	53
7. Resultados.....	54
7.1. Obtención de extractos.....	54
7.2. Actividad enzimática de la AKR1B4 <i>in vitro</i>	54
7.2.1 Medición de la actividad enzimática por consumo de NADPH.....	54
7.2.2. Actividad enzimática de la AKR1B4 en presencia de DMSO.....	55
7.3. Ensayo de inhibición de la AKR1B4 <i>in vitro</i>	56
7.3.1 Medición de la actividad inhibitoria por consumo de NADPH.....	56
7.3.2 Medición de la actividad inhibitoria por medición de la concentración de glicerol.....	60
7.4. Purificación de compuestos.....	61
7.4.1. Cromatografía en columna	61
7.4.2. Resonancia magnética nuclear de hidrógeno	62
7.5. Actividad inhibitoria de los compuestos purificados.....	64
7.6. Determinación del tipo de inhibición del ácido 13- <i>epi</i> -labdanólico a la enzima AKR1B4.....	66

7.6.1. Inhibición dependiente de concentración.....	66
7.6.2. Determinación de la concentración inhibitoria media (CI ₅₀).....	67
7.6.3. Tipo de inhibición	68
7.6.4. Constante de inhibición (K_i)	69
7.6.5. Efecto de labdanos de <i>A. jocotepecana</i> en la AKRIB4.....	70
7.6.6. Docking molecular	71
7.6.7. Selectividad del ácido 13- <i>epi</i> -labdanólico.....	74
7.6.7.1 Actividad inhibitoria del ácido 13- <i>epi</i> -labdanólico con AKRs de eritrocito de <i>Homo sapiens</i>	74
7.6.7.2 Actividad inhibitoria del ácido 13- <i>epi</i> -labdanólico con la enzima 20 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa recombinante de humano (AKR1C1)	74
7.6.7.3. Actividad enzimática de la AKR1B1.....	75
8. Discusión.....	76
9. Conclusión.....	86
10. Literatura citada.....	87

Índice de figuras

Fig. 2.1. Estructura terciaria de la AKR1B1(www.med.upenn.edu/akr).	17
Fig. 2.2. Conformaciones del sitio activo de la AKR1B1 (Zhu, 2013).	17
Fig. 2.3. Vía de los polioles (modificado de Brownlee, 2005).	20
Fig. 2.4. Reacciones químicas de la vía de los polioles(Brownlee, 2005).	20
Fig. 2.5. Reacciones del proceso de formación de AGEs a partir de glucosa (González Flecha y Castello, 2000).	22
Fig. 2.6. Mecanismo por el cual, la producción intracelular de AGEs daña una célula vascular. (Brownlee, 2001).	23
Fig. 2.7. Vía de la hexosaminas (Brownlee, 2001).	24
Fig. 2.8. Consecuencias de la activación de isoformas de la proteína cinasa C, inducida por hiperglucemia. (Brownlee, 2001).	25
Fig. 2.9. Incidencia de <i>diabetes mellitus</i> en México (ENSA 2000, ENSANUT 2012)	26
Fig. 2.10. Ojo con catarata ocular.....	28
Fig. 2.11. Estructura del epalrestat (izquierda) y sorbinil (derecha)	32
Fig. 2.12.- Localización de Michoacán.....	36
Fig. 6.1. Obtención de extractos vegetales.	43
Fig. 6.2. Obtención del extracto crudo de AKR1B4.....	44
Fig. 6.3. Reacción enzimática de la AKR1B1, con gliceraldehído como sustrato.....	45
Fig. 7.2. Caída de absorbencia a 340 nm de la mezcla de reacción del blanco.	55
Fig. 7.1. Caída de absorbencia a 340 nm de la mezcla de reacción del control.	55
Fig. 7.3. Espectro de RMN de la fracción 7 del extracto diclorometánico de hoja de <i>E. petiolare</i>	63
Fig.7.4. Estructura del lupeol.....	63

Fig.7.5. Espectro de RMN de la fracción 21 del extracto diclorometánico de hoja de <i>E. petiolare</i>	64
Fig. 7.6. Estructura del ácido 13- <i>epi</i> -labdanólico	66
Fig. 7.7. Inhibición de la AKR1B4 por el ácido 13 <i>epi</i> -labdanólico.	67
Fig. 7.8. CI_{50} del ácido 13 <i>epi</i> -labdanólico con la AKR1B4.....	67
Fig. 7.9. Inhibición tipo competitiva del ácido 13- <i>epi</i> -labdanólico.	68
Fig. 7.10. K_i del ácido 13- <i>epi</i> -labdanólico con la AKR1B4.....	69
Fig. 7.13. Cativato de metilo	70
Fig. 7.12. Ácido catívico insaturado	70
Fig. 7.11. Ácido catívico isomerizado	70
Fig. 7.14. Interacción del ácido 13- <i>epi</i> -labdanólico en el sitio activo de la AKR1B1.....	71
Fig. 7.16. Interacción del fidarestat en el sitio activo de la AKR1B1.....	72
Fig. 7.15. Puentes de hidrógeno de la interacción entre el ácido 13- <i>epi</i> -labdanólico y la AKR1B1.....	72
Fig. 7.17. Interacción de la alrestatina en el sitio activo de la AKR1B1.....	73
Fig. 7.18. Docking molecular del cativato de metilo (izquierda) y el ácido catívico isomerizado (derecha) con la AKR1B1.....	73

Índice de tablas

Tabla 1.1. Azúcares y polioles en cristalinos de ratones normales e hiperglucémicos.	29
Tabla 1.2. Actividad enzimática en cristalinos de la Aldosa Reductasa (AR), Poliol Deshidrogenasa (PD), Glucosa-6-fosfato Deshidrogenasa (G6PD), 6-fosfo-gluconato deshidrogenasa (6PGD) y Hexocinasa (HX)..	29
Tabla 1.3. Nivel de AKR1B4 y velocidad de formación de catarata galactosémica.....	30
Tabla 1.4. Géneros vegetales de especies recolectadas en Michoacán	37
Tabla 6.1. Especies evaluadas como posibles inhibidores de la AKR1B4.....	42
Tabla 6.2. Mezcla de reacción de la actividad de la AKR1B4.....	47
Tabla 6.3. Mezcla de reacción de la actividad de las AKR1A1/AKR1B1 con ácido 13- <i>epi</i> -labdanólico.....	49
Tabla 7.1. Actividad enzimática de la AKR1B4 en presencia de DMSO.....	56
Tabla 7.2. Actividad inhibitoria de extractos vegetales a la AKR1B4.....	57
Tabla 7.3. Actividad inhibitoria de extractos vegetales a la AKR1B4, obtenida por medición de glicerol.	60
Tabla 7.4. Fracciones obtenidas del extracto diclorometánico de hoja de <i>E. petiolare</i>	61
Tabla 7.5. Actividad inhibitoria de las fracciones obtenidas del extracto diclorometánico de hoja de <i>E. petiolare</i>	62
Tabla 7.6. Actividad inhibitoria de los compuestos puros, obtenidos de los extractos que tuvieron una mayor inhibición.....	65
Tabla 7.7. Inhibición de la AKR1B4 a diferentes concentraciones del ácido 13- <i>epi</i> -labdanólico.....	66

Tabla 7.8. Actividad enzimática de la AKR1B4 en presencia de diferentes concentraciones de gliceraldehído y de ácido 13- <i>epi</i> -labdanólico.	68
Tabla 7.9. Efecto de labdanos naturales y modificados de <i>A. jocotepecana</i> en la AKR1B4.....	70
Tabla 7.10. Comparación de resultados del docking molecular	74
Tabla 7.11. Efecto del ácido 13- <i>epi</i> -labdanólico en AKRs.....	75

Lista de abreviaturas

AKRs: Aldo ceto-reductasas

AKR1B1: Aldosa Reductasa de cristalino de *Homo sapiens*

AKR1B4: Aldosa Reductasa de cristalino de *Rattus norvegicus*

AKR1 C1: 20 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa recombinante de *Homo sapiens*

AKR1A1: Aldehído Reductasa de *Homo sapiens*

SDH: Sorbitol Deshidrogenasa

IAR: Inhibidor de la Aldosa Reductasa

NADPH: Nicotinamidilo adeninilo dinucleotido fosfato reducido

NAD⁺: Nicotinamidilo adeninilo dinucleótido oxidado

NADH: Nicotinamidilo adeninilo dinucleótido reducido

NOS: Óxido Nítrico Sintasa

GR: Glutación Reductasa

G3PDH: Gliceraldehído-3-fosfato Deshidrogenasa

AGEs: Productos finales de glicación avanzada

DAG: Diacilglicerol

PKC: Proteína cinasa c

AL: Ácido lipoico

PAI-1: Plasminógeno-1

TGF: Factor de crecimiento transformante

DHAP: Dihidroxiacetona fosfato

G3P: Gliceraldehído-3-fosfato

ENSANUT: Encuesta Nacional de Salud y Nutrición

ENSA: Encuesta Nacional de Salud

CI₅₀: Concentración inhibitoria media

K_i: Constante de inhibición

DMSO: Dimetilsulfóxido

EDTA: Ácido etildiaminotetraacético

TMS: Tetrametilsilano

PDB: Protein data bank

Resumen

En la hiperglucemia crónica la enzima Aldosa Reductasa (AKR1B1) transforma la glucosa a sorbitol. La acumulación de sorbitol en la célula induce la retención de agua por la alteración de la osmorregulación. Esto produce un aumento en el volumen celular y daño en la membrana. La escasa cantidad de inhibidores de la AKR1B1 (IAR) y sus efectos indeseables generan un área de oportunidad farmacológica en la obtención de IAR con potencial terapéutico a partir de plantas nativas, para coadyuvar en el tratamiento y prevención de complicaciones secundarias como la catarata en la creciente población de individuos con hiperglucemia crónica. En este trabajo se seleccionaron plantas nativas de Michoacán de los géneros *Ageratina*, *Caesalpineae*, *Enterolobium*, *Eupatorium* y *Tagetes*. De sus flores, hojas, tallos o raíces se obtuvieron por maceración y extracción secuencial de polaridad ascendente los extractos crudos hexánicos, diclorometánicos y metanólicos. La capacidad inhibitoria hacia la enzima AKR1B1 se determinó midiendo el consumo de NADPH y la concentración de glicerol producido por métodos espectrofotométricos. Los extractos con inhibición mayor a 80% fueron elegidos para evaluar la actividad inhibitoria de algunos de sus metabolitos secundarios. El ácido 13-*epi*-labdanólico purificado del extracto diclorometánico de *A. jocotepecana* de tallo tuvo mayor inhibición con el 97% comparado con el resto de los metabolitos secundarios. Se determinaron las propiedades de inhibición: CI_{50} , tipo de inhibición, K_i , especificidad y mecanismo de acción del ácido 13-*epi*-labdanólico a la AKR1B1. Los resultados obtenidos sugieren al ácido 13-*epi*-labdanólico como una molécula modelo para su modificación química y potenciar su actividad como inhibidor de la AKR1B1.

Palabras clave: Aldosa Reductasa, Inhibición, plantas nativas de Michoacán.

Abstract

In chronic hyperglycemia, the enzyme Aldose Reductase (AKR1B1) transforms glucose to sorbitol. Sorbitol accumulation in cell induced water retention by altered osmoregulation, which produces an increase in cell volume and damage the membrane. The limited amount of AKR1B1 Inhibitors (IAR) and its undesirable effects generates an area of pharmacological opportunity in obtaining IAR with therapeutic potential from native plants to contribute in the treatment and prevention of secondary complications such as the cataract in the growing population of individuals with chronic hyperglycemia. In the present study Michoacan native plants of the genera *Ageratina*, *Caesalpineia*, *Enterolobium*, *Eupatorium* and *Tagetes* were selected. Their flowers, leaves, stems and roots were obtained by maceration and sequential extraction of ascending polarity hexánicos crude extracts, methanolic and dichloromethane. The AKR1B1 inhibitory activity for measuring NADPH consumption and produced glycerol concentration was determined by spectrophotometric methods. The extracts with more than 80% inhibition were chosen to evaluate the inhibitory activity of some secondary metabolites. The 13-*epi*-labdanólico acid purified of stem dichloromethane extract *A. jocotepecana* caused greater inhibition with 97% inhibition compared with other secondary metabolites. The inhibition properties IC₅₀, type of inhibition, K_i, specificity and mechanism of action of acid 13-*epi*-labdanólico to AKR1B1 were determined. The results suggest the 13-*epi*-labdanólico acid as a model molecule for chemical modification and enhance its activity as an inhibitor of AKR1B1.

Keywords: Aldose Reductase, Inhibition, native plants Michoacán.

1. Introducción

En la homeostasis del cristalino humano en condiciones normoglicémicas es fundamental la vía de los polioles, para la producción y mantenimiento intracelular de una concentración constante de sorbitol y cuyo precursor metabólico es la glucosa. El sorbitol excedente es metabolizado a fructosa, un monosacárido que tiene varios destinos celulares. Sin embargo, varias condiciones ambientales y fisiológicas pueden afectar la homeostasis del cristalino (Brownlee, 2001). Por ejemplo, en la hiperglucemia crónica se presenta un desequilibrio osmótico en el cristalino debido a que el sorbitol se acumula, lo que produce daño celular y tisular que se manifiesta con la opacidad del cristalino (catarata)(Kathleen, 2001). Las enzimas que participan en la vía de los polioles son la Aldosa Reductasa (AKR1B1) y la Sorbitol Deshidrogenasa (SDH). La primera enzima utiliza a la glucosa como precursor del sorbitol y la segunda enzima usa al sorbitol como precursor de fructosa. Esto induce un desequilibrio osmótico que causa un daño celular y con ello la aparición de alteraciones tales como la formación de la catarata (Srivastava *et al.*, 2005). Estas alteraciones se presentan a largo plazo como complicaciones secundarias de la *diabetes mellitus*, que es una de las enfermedades con mayor prevalencia en el mundo. La inhibición de la AKR1B1 provocaría el control de los mecanismos alterados en estado de hiperglucemia. Por esto es de suma importancia el diseño y descubrimiento de inhibidores de la enzima Aldosa Reductasa (IARs) que pueden ofrecer un enfoque terapéutico importante para la prevención de complicaciones de la diabetes (Changjin Zhu, 2013). Aunque una gran cantidad de inhibidores se han sintetizado para inhibir a la AKR1B1, la realidad es que muy pocos han alcanzado un ensayo clínico y solo el epalrestat es actualmente

comercializado como IAR en algunos países asiáticos. Además de la obtención de inhibidores sintéticos, la búsqueda se realiza en seres vivos, tal como las plantas que son fuentes interesantes para la búsqueda de estos (De la Fuente *et al.*, 2003). Todas las plantas tienen principios activos que son usados a través del mundo como ayuda para combatir enfermedades e incluso para llegar a prevenirlas. El dominio vegetal cuenta con una amplia riqueza en especies, las cuales contienen dentro de su fisiología una gran cantidad de compuestos, que ofrecen una valiosa fuente de sustancias biológicamente activas, ya sea en forma de medicamento vegetal o de materia prima para la industria farmacéutica. México posee de 20,000 a 30,000 especies vegetales, de las cuales Michoacán tiene aproximadamente 5,000 con abundancia en la familia *Asteraceae*. El conocimiento fitoquímico de las plantas que habitan en Michoacán es correspondiente al 5% (Ramírez López *et al.*, 2010). En éste tópico donde se conjunta el conocimiento de la fisiología celular, bioquímica enzimática y la química de los metabolitos secundarios vegetales, es en donde se realizó el presente estudio. Un marco teórico de referencia se estableció en el que se revisó el estado fisiológico hiperglicémico, la importancia de la vía de los polioles, la enzima limitante AKR1B1 y la importancia de su inhibición para controlar la síntesis de sorbitol en la hiperglucemia, con la consecuente pregunta de investigación, su posible respuesta (hipótesis), con el objetivo de evaluar a los metabolitos secundarios extraídos de plantas nativas de Michoacán como inhibidores de la AKR1B1, las actividades científicas y técnicas para reunir la evidencia experimental que soporte la hipótesis planteada mediante un análisis de los datos obtenidos y su comparación con la información científica preexistente.

2. Antecedentes

2.2. Aldosa Reductasa

La Aldosa Reductasa (AKR1B1, abreviatura para la enzima humana) es una enzima citosólica que pertenece a la superfamilia de las aldo-ceto reductasas. Esta superfamilia agrupa más de 150 enzimas distribuidas en todos los organismos tanto eucariotas como procariotas, levaduras, plantas, vertebrados e invertebrados. Estas son enzimas, que catalizan una variedad de reacciones de oxidación-reducción de grupos carbonilo de una amplia variedad de sustratos tales como aldehídos, cetonas, prostaglandinas, esteroides y xenobióticos (Barski *et al.*, 2009). La AKR1B1 es un monómero proteico de 316 residuos de aminoácidos (PM=36kDa). El sitio activo de la enzima se localiza sobre la región C-terminal y la unión del cofactor NADPH se lleva a cabo en una conformación extendida hacia el fondo de la cavidad del sitio activo. La AKR1B1 muestra gran eficiencia catalítica con aldehídos no ramificados saturados e insaturados. Tiene una escasa afinidad por la glucosa, pero cuando la concentración de glucosa en la célula llega a ser grande, la AKR1B1 reduce la glucosa a sorbitol. Estudios *in vivo* indican que su excelente eficiencia de catalizar es, en parte, debido a la fuerte hidrofobicidad del sitio activo de la enzima, el cual interactúa favorablemente con largas cadenas alquilo (Alexiou *et al.*, 2009).

2.2.1. Estructura de la AKR1B1

En el año 1992, dos primeras estructuras de AKR1Bs fueron establecidas: una de placenta humana (Rondeau *et al.*, 1992) y otra de porcino (Wilson *et al.*, 1992). Ambas estructuras están compuestas por un motivo α/β barril similar, con un centro de ocho láminas β paralelas conectadas por ocho hélices α periféricas (fig. 2.1), este motivo es conservado en todas las AKRs. El sitio activo hidrofóbico está formado por residuos aromáticos (Trp20, Tyr48, Trp79, Trp111, Phe121, Phe122 y Trp219), residuos no polares (Val47, Pro218, Leu300 y Leu301), residuos polares (Gln49, Cys298 e His110) y tres posibles donadores de protones (Tyr48, His110 y Cys298). El sitio activo a

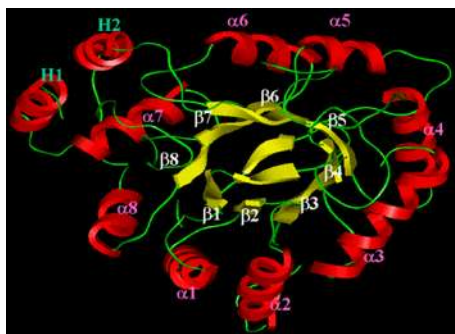


Fig. 2.1. Estructura terciaria de la AKR1B1. Las hélices α representadas en rojo y las láminas β en amarillo (www.med.upenn.edu/akr).

menudo cambia su forma (cambio conformacional) a una variedad de conformaciones de unión dependiendo del inhibidor unido a la AKR1B1. Estas conformaciones posibles indican un remarcado ajuste inducido o flexibilidad del sitio activo. Al menos tres distintos sitios de unión en el sitio activo se proponen de acuerdo a estudios con cristalografía de rayos X de la AKR1B1 y mutagénesis (fig. 2.2). El primero es usualmente ocupado por la cabeza aniónica de un ligando y éste es llamado “sitio de unión aniónica”, la unión se lleva a cabo sobre los residuos Tyr48, His110, Trp20 y Trp111. El segundo es un sitio hidrofóbico, conocido como “sitio específico” que está

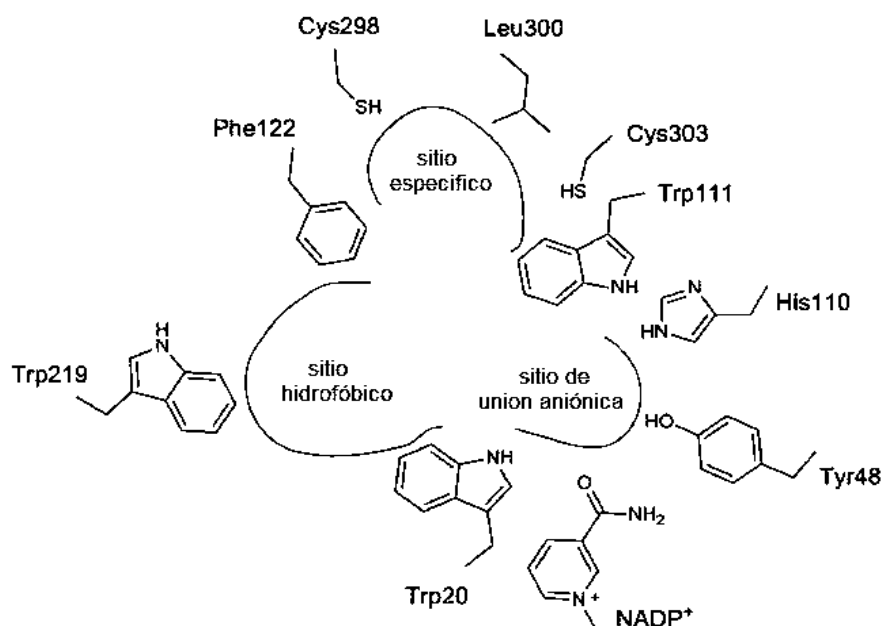


Fig. 2.2. Conformaciones del sitio activo de la AKR1B1. Aminoácidos pertenecientes a las tres diferentes conformaciones del sitio activo (Zhu, 2013).

conformado por los residuos Leu300, Cys298, Cys303, Trp111 y Phe122. En otras aldo-ceto reductasas como la aldehído reductasa el “sitio específico” muestra gran grado de flexibilidad molecular y los residuos que revisten este sitio no son conservados. El tercero es un sitio hidrofóbico formado por los residuos Trp20, Trp111, Phe122 y Trp219 y es conocido como “sitio hidrofóbico” (Zhu, 2013).

2.2.2. Función biológica de AKR1B1

La AKR1B1 en los humanos se expresa en riñón, glóbulos rojos, tejido mieloide, epidídimo, placenta, glándula suprarrenal y ojo (córnea, cristalino y retina) (Tang *et al.*, 2012). En estos órganos, esta enzima en condiciones de homeóstasis tiene las siguientes funciones:

- Desintoxicación celular. Una de las funciones de la AKR1B1 es participar en procesos de desintoxicación en la célula, reduciendo aldehídos tóxicos a alcoholes inactivos. Esta enzima exhibe especificidad a diferentes sustratos de una gran variedad de aldehídos, incluyendo aldehídos biogénicos generados por el catabolismo de catecolaminas, metabolitos de esteroides como isocorticosteroides, así como aldehídos reactivos de origen exógeno y endógeno, la mayor fuente de aldehídos reactivos *in vivo* es la peroxidación de lípidos, glicación y oxidación de aminoácidos.

El aumento de aldehídos tóxicos, generados de forma endógena durante la peroxidación lipídica o durante la transformación de xenobióticos puede causar interacción entre proteínas, inactivación de enzimas, daño al DNA, lesión mitocondrial y proliferación celular, eventos que conducen a daño en el tejido y contribuye a la patogénesis de varias enfermedades (Alexiou *et al.*, 2009).

- Regulación osmótica. Cuando las células son expuestas a un estrés osmótico en forma permanente se activan mecanismos de adaptación, entre los que se encuentran cambios en la expresión de genes específicos. La inducción de la

expresión genética causada por hiperosmolaridad se controla a nivel transcripcional con la participación del factor de transcripción TonEBP en el caso de células eucariotas. TonEBP induce el incremento en la expresión de los genes de la AKR1B1 y genes de transportadores de betaína. El aumento en la expresión de AKR1B1 incrementa la cantidad de glucosa reducida a sorbitol a través de esta enzima. El aumento en la concentración de sorbitol y betaína intracelular inducen la entrada de agua a la célula y evitan el daño causado por la hiperosmolaridad extracelular (Ben *et al.*, 1997).

- Maduración de espermatozoides. Para que un espermatozoide adquiera su habilidad fertilizante es necesario que este transite por el epidídimo, donde logra su maduración. Durante este tránsito, el epitelio epidídimal secreta epidídimosomas, pequeñas vesículas membranosas que interactúan con el espermatozoide. Las proteínas del epidídimosoma son transferidas para definir dominios en la superficie del espermatozoide. La AKR1B1 es una de las proteínas mayormente asociadas con el epidídimosoma, así como la enzima SDH (segunda enzima de la vía de los polioles). La actividad de estas enzimas aumenta la formación de fructosa, la cual entra a la vía de la glucólisis y produce la energía necesaria para la movilidad del espermatozoide en estado quiescente (Saez *et al.*, 2003).

2.3. Vía de los polioles

La vía de los polioles fue primeramente identificada en vesícula seminal por Hers (1956), quien demostró que a través de esta vía la glucosa es convertida a fructosa, que es usada como fuente de energía para el espermatozoide. Esta vía en condiciones normales, también transforma aldehídos tóxicos en alcoholes inactivos, para participar en el proceso de desintoxicación en la célula. En la vía de los polioles, la primera enzima, la AKR1B1 es la responsable de la reducción irreversible de un aldehído en su respectivo poliol y requiere como coenzima a la nicotinamido

adeninilo dinucleótido fosfato reducido (NADPH). Esta enzima controla la vía y se activa al estar en contacto con niveles altos de glucosa, ya que reduce a esta a sorbitol. Debido a lo anterior aumenta la concentración de sorbitol y disminuye la disponibilidad de NADPH. La SDH es la segunda enzima de la vía, ésta cataliza la reacción donde se transforma el sorbitol a fructosa y utiliza al NAD^+ como cofactor, con esto aumenta la formación de nicotinamidilo adeninilo dinucleótido reducido (NADH) así como la acumulación de la fructosa (fig. 2.3 y 2.4) (Brownlee, 2005).

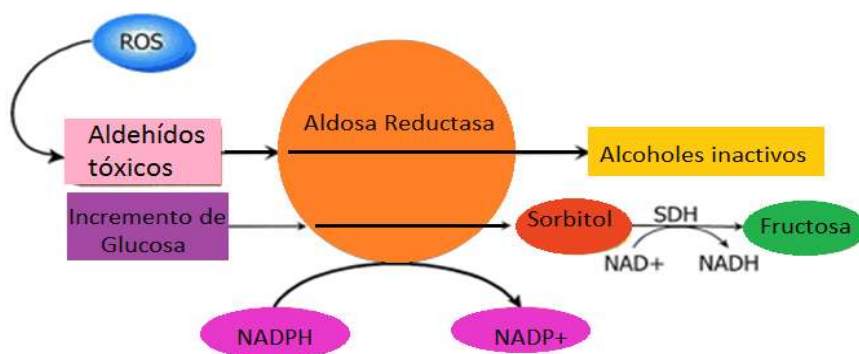


Fig. 2.3. Vía de los polioles. La Aldosa Reductasa (AR) reduce aldehídos generados por especies reactivas de oxígeno (ROS) a alcoholes inactivos, y glucosa a sorbitol. Este es transformado a fructosa por la enzima Sorbitol Deshidrogenasa (SDH) (Brownlee, 2005).

En condiciones normoglicémicas, aproximadamente el 3% de glucosa es metabolizada por la vía de los polioles. Sin embargo, en condiciones hiperglicémicas esta vía metaboliza más del 30% de la glucosa, produciendo una acumulación de sorbitol intracelular y ocasiona un daño al tejido (González *et al.*, 1964).

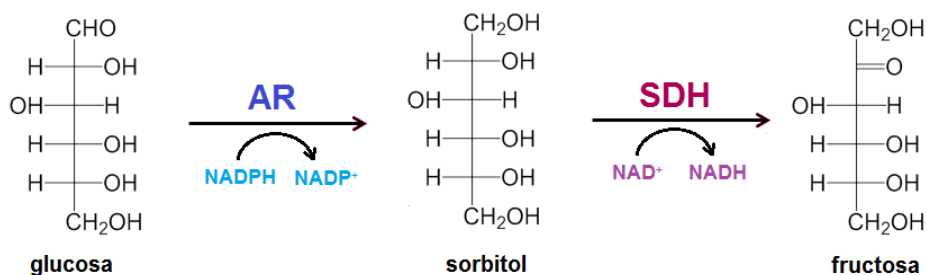


Fig. 2.4. Reacciones químicas de la vía de los polioles. Aldosa Reductasa (AR), Sorbitol Deshidrogenasa (SDH) (Brownlee, 2005).

Ciertos mecanismos se han propuesto para explicar el potente efecto perjudicial del incremento en el flujo de la vía de los polioles inducido por la hiperglucemia crónica en pacientes con *diabetes mellitus*:

- El estrés osmótico inducido por sorbitol
- Decremento de la actividad ATPasa ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)
- Incremento citosólico de NADH/NAD⁺
- Decremento citosólico de NADPH

El decremento en la concentración de NADPH afecta negativamente la actividad de otras enzimas que también lo requieren como cofactor, enzimas como la Óxido Nítrico Sintasa (NOS), la Glutación Reductasa (GR), la Catalasa y la NADPH Oxidasa, estas enzimas participan en los mecanismos antioxidantes de la célula, por lo que la disminución de su actividad produce un aumento en el estrés oxidativo. El aumento de la proporción de NADH/NAD⁺ inhibe la actividad de la enzima Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa (G3PDH). Esta enzima participa en la vía de la glucólisis, y su inhibición produce un incremento en la concentración de triosas fosfato como el gliceraldehído-3-fosfato y la dihidroxiacetona fosfato, los cuales son convertidos por una reacción no enzimática a metilgloxal, un precursor de productos finales de glicación avanzada (AGEs) y diacilglicerol (DAG). Este último es un compuesto que tiene la capacidad de activar algunas isoformas de proteína cinasa C (PKC) (Díaz *et al.*, 2004).

Por otro lado, las células animales sometidas a estrés osmótico tienden a mantener su volumen normal, inicialmente acumulan sales de sodio y potasio, posteriormente captan agua. Sin embargo, esta fase de osmorregulación es temporal, debido a que después de un tiempo prolongado las células en general para regular su osmolaridad acumulan osmolitos orgánicos que provienen del medio o de la síntesis intracelular. El sorbitol, la glicerofosforilcolina y el inositol (polioles) pertenecen a este grupo de compuestos que tienden a acumularse en una gran variedad de organismos expuestos a un ambiente salino. Así, la acumulación de sorbitol, debido a su incapacidad para di-

fundir con facilidad al exterior, conduce a un aumento de estrés osmótico en las células, produciendo una lisis celular causada por el rompimiento de su membrana (Srivastava *et al.*, 2005).

Otros mecanismos que se alteran de forma indirecta son:

- Incremento intracelular en la formación de AGEs.- Los AGEs se originan a través de una reacción no enzimática entre proteínas y glucosa o precursores dicarboxilo derivados de glucosa generados intracelularmente. En la reacción se lleva a cabo una auto-oxidación de glucosa a glioxal, descomposición de los productos de Amadori a 3-deoxiglucosona y fragmentación de gliceraldehído 3 fosfato y dihidroxiacetona fosfato a metilglioxal. El glioxal, metilglioxal y 3-deoxiglucosona reaccionan con aminoácidos de proteínas intracelulares y

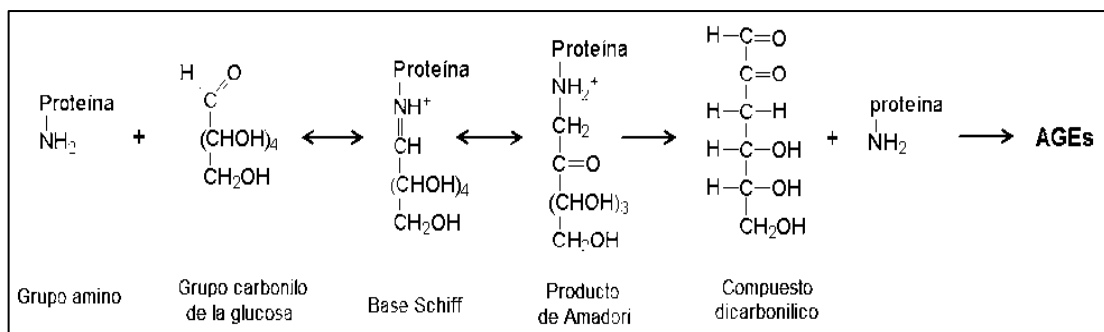
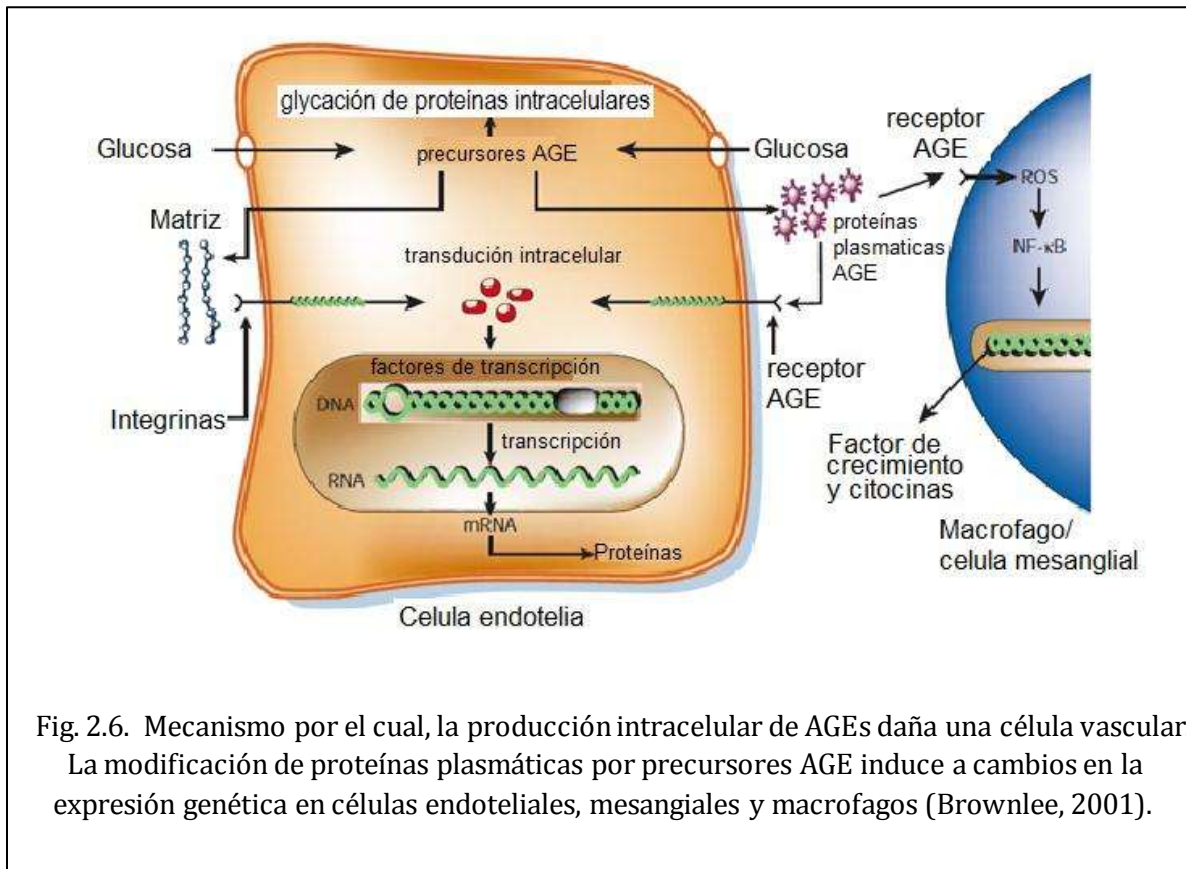


Fig. 2.5. Reacciones del proceso de formación de AGEs a partir de glucosa (González Flecha y Castello, 2000).

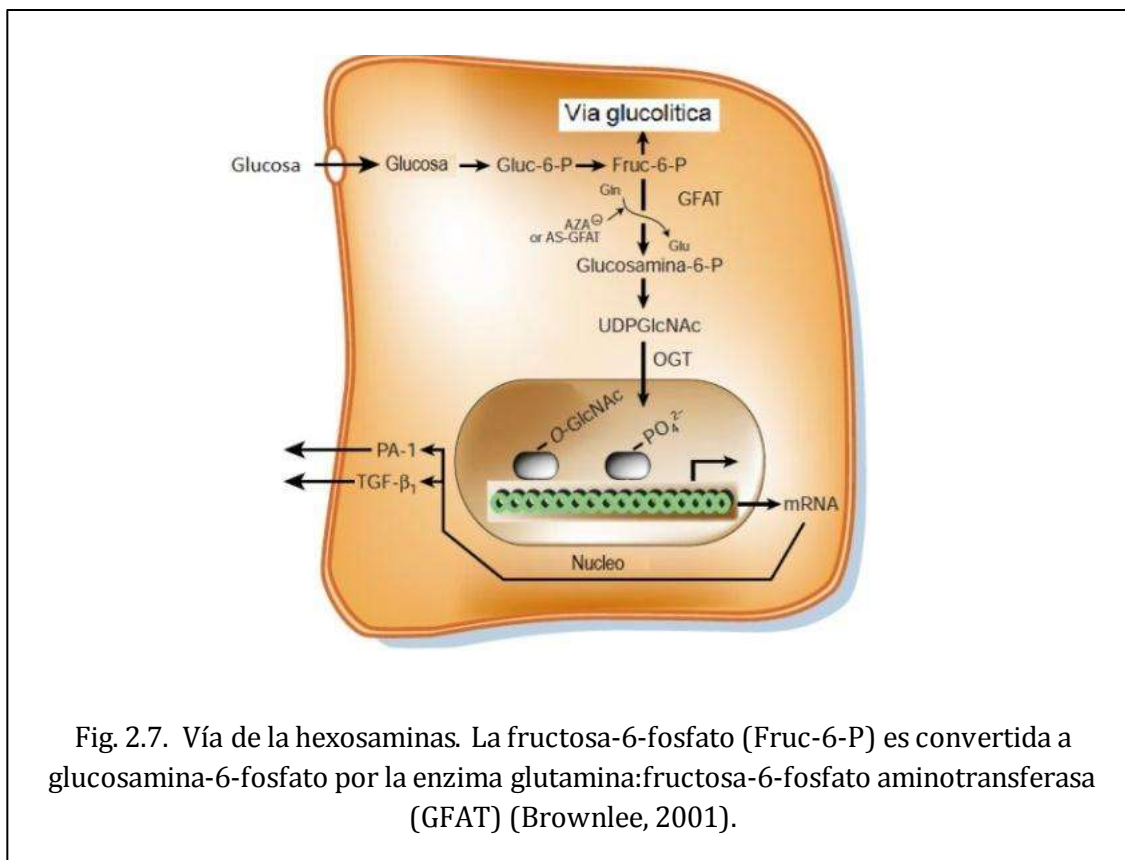
extracelulares y forma AGEs (González Flecha y Castello, 2000) (fig. 2.5). Los AGEs se encuentran en gran cantidad en condiciones hiperglicémicas, en vasos de la retina y glomérulo renal. Estos se presentan cuando se elevan los niveles de azúcares reducidos en circulación. Las proteínas modificadas por los AGE pueden encontrarse en el plasma, en el compartimiento intracelular y en la matriz extracelular (fig. 2.6), especialmente en la pared arterial, el mesanglio glomerular, las membranas basales glomerulares, los vasos capilares sanguíneos,

la vasculatura retiniana, el cristalino y las fibras nerviosas mielínicas y amielínicas. La formación de AGE, altera la importante propiedad funcional de varias moléculas de la matriz extracelular (Brownlee, 2001).



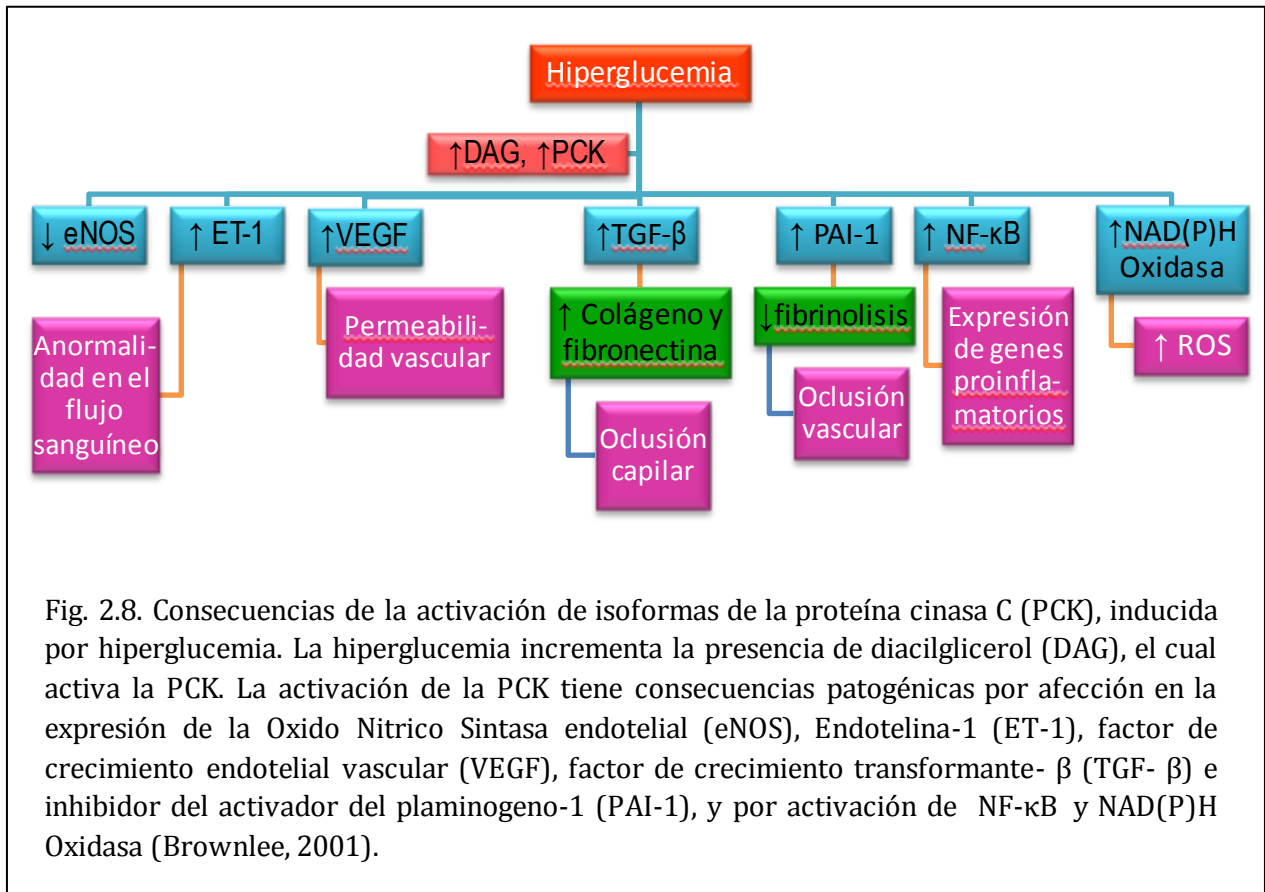
- Incremento en el flujo de la vía de las hexosaminas.- La fructosa vía sorbitol contribuye en la activación de la vía de las hexosaminas (fig. 2.7), donde la formación de glucosamina-6-fosfato proviene exclusivamente de la fructosa-6-fosfato y la glutamina. Ésta posteriormente es transformada a uridin-difosfato *N*-acetil-glucosamina (UDP). El aumento de flujo a través de esta vía se relaciona con algunos efectos de la *diabetes mellitus* y contribuye en parte a la estimulación de la expresión de genes como los del TGF α , TGF β 1 y el inhibidor

del activador del plasminógeno-1 (PAI-1). Este aumento también participa en la inducción de la resistencia a la insulina por lípidos (Kolm *et al.*, 1998).



- Activación de isoformas de la proteína cinasa C (PKC).- La acumulación de DHAP y G3P promueve la producción de DAG y la subsecuente activación de la PKC mismos que también afectan la homeostasis vascular. El DAG es un activador natural de la PKC y su producción aumenta en las células del endotelio, la retina y los glomérulos renales en estado de hiperglucemia. La activación de PKC induce la expresión de diversos genes como los de proteínas de matriz extracelular (fibronectina y colágeno tipo IV), del PAI-1 y del TGF en células mesangiales en cultivo o en glomérulos de ratas hiperglicémicas. Además, afecta la producción de sustancias vasoactivas, por una parte deprime

la producción de óxido nítrico (NO) y por otra estimula la expresión de la ET-1 lo que conduce al decremento del flujo sanguíneo de la retina, los nervios periféricos y el riñón (fig. 2.8) (Brownlee, 2001).



2.4. Diabetes mellitus

El estado de hiperglucemia de mayor prevalencia entre los padecimientos del hombre es la *diabetes mellitus*. Que actualmente es un grave problema mundial de salud pública debido al aumento de su incidencia en países desarrollados o de recién industrialización. En México, el registro realizado por la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición en 2012 (ENSANUT 2012) estimó que existían alrededor de 6.4 millones de adultos mexicanos que padecen *diabetes mellitus*, comparado con la Encuesta Nacional

de Salud en 2000 (ENSA 2000) donde aproximadamente 3.6 millones de adultos mexicanos la padecían. En la figura 2.9 se observa claramente el aumento considerable de la cantidad de personas que padecen esta afección. Estos hechos están asociados principalmente a un cambio en la alimentación y a la poca y nula actividad física realizada por los mexicanos (ENSA 2000, ENSANUT 2012).

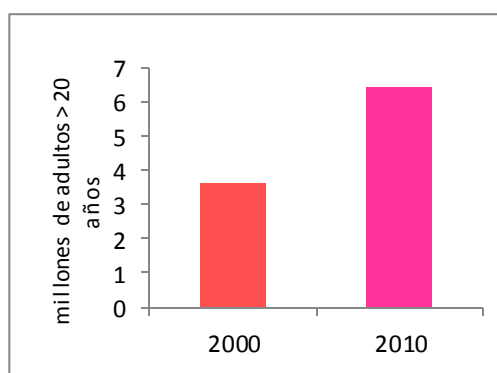


Fig. 2.9. Incidencia de *diabetes mellitus* en México (ENSA 2000, ENSANUT 2012)

El término de *diabetes mellitus* describe diferentes trastornos metabólicos que resultan de alteraciones en la secreción de insulina, en la respuesta periférica a la misma o en ambas. Lo que conduce a un síndrome caracterizado por hiperglucemia crónica y alteraciones del metabolismo de carbohidratos, proteínas y lípidos. Hasta ahora se han descrito por lo menos cuatro variedades de la enfermedades, pero la gran mayoría de los casos corresponde a dos clases principales: la *diabetes mellitus* tipo 1 y la tipo 2. En la primera, la característica más relevante es la destrucción de las células β del páncreas, de manera que la producción de insulina es nula o insignificante. En la segunda, el rasgo principal es la resistencia de los tejidos periféricos a la acción de la insulina (Díaz *et al.*, 2004).

El principal factor de riesgo en la *diabetes mellitus* es la hiperglucemia crónica. Por ello las complicaciones crónicas de ésta son el resultado de las reacciones químicas y de la activación o alteración del metabolismo causado por el exceso de glucosa. Para el entendimiento de los efectos de daño tisular por hiperglucemia, debemos referirnos al daño de un tipo particular de células, entre estas células encontramos las células

endoteliales de la retina, las células mesangiales del glomérulo renal, las neuronas y las células de Schwann de nervios periféricos. Estas células son tan vulnerables a la hiperglucemia debido a que la mayoría de las células son capaces de reducir el transporte de glucosa al citosol cuando son expuestas a hiperglucemia, de modo que su concentración interna de glucosa permanece constante. En contraste, las células dañadas por la hiperglucemia no pueden hacer esto eficientemente. Por lo tanto, se dañan selectivamente las células cuyo transporte de glucosa no declina rápidamente con la hiperglucemia al aumentar la concentración de glucosa en su interior. El paciente con *diabetes mellitus* presenta un riesgo 40 veces mayor de amputación de sus miembros inferiores, 25 veces mayor de insuficiencia renal terminal, 20 veces mayor de ceguera, 2 a 5 veces mayor de accidentes cerebro-vasculares y entre 2 y 3 veces mayor de infarto agudo de miocardio. Asimismo, tiene mayor predisposición de desarrollar hipertensión, dislipidemia y obesidad (Esquivel *et al.*, 2012).

Las complicaciones secundarias causadas por la *diabetes mellitus* son: retinopatía, catarata ocular, neuropatía, aterosclerosis, nefropatía, embriopatía y falta de cicatrización. Estas complicaciones secundarias de largo plazo son consideradas la principal causa de morbilidad y mortalidad de pacientes con *diabetes mellitus* (Fowler, 2008).

2.5. Catarata ocular

La catarata ocular es la nubosidad u opacidad del cristalino, causada por la alteración de las fibras que lo conforman conocidas como cristalinianas (fig., 2.10). La hiperglucemia crónica es uno de los principales factores que contribuyen a la formación de catarata, la cual es considerada una causa líder en la inducción de ceguera en el mundo. La catarata se caracteriza por la pérdida de visión gradual sin dolor ni síntomas. El grado de pérdida de visión depende del tamaño y la localización de la catarata: localizada en el centro del cristalino (nuclear), en el córtex superficial (cortical) o en el área subcapsular posterior (Kathleen, 2001).

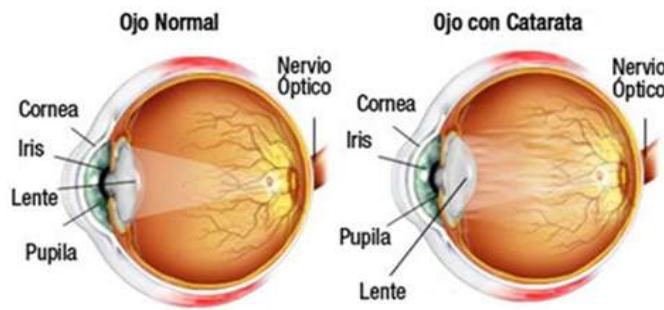


Fig. 2.10. Ojo con catarata ocular. El cristalino con catarata se nubla y distorsiona la visión.

El cristalino es una lente biconvexa que tiene la función de refractar la luz, ayuda a la córnea a formar la imagen sobre la retina, ésta a su vez convierte los rayos luminosos en estímulos nerviosos y a través del nervio óptico los manda al cerebro donde se da el proceso de visión (Gambra *et al.*, 2013). En el cristalino la AKR1B1 tiene la función de osmorregulación y desintoxicación, pero cuando hay un exceso de glucosa, ésta es reducida por la enzima AKR1B1, produce la acumulación de polioles *e.g.* el sorbitol, que induce a una alteración en el equilibrio osmótico. El estrés osmótico en los cristalininos provoca que las células se hinchen, altera la permeabilidad de la membrana y promueve cambios bioquímicos asociados con la formación de la catarata. Con base en estas observaciones y en estudios de células en cultivo y modelos experimentales, se ha postulado que el estrés osmótico es iniciado por el incremento en la actividad de la AKR1B1 (Brownlee, 2001).

Una de las primeras investigaciones que relacionan a la actividad de la AKR1B1 con la formación de catarata causada por hiperglucemia, es la de Varma *et al.* realizada en 1974, ellos utilizaron como modelo de estudio, ratones C₅₇B₁, que no tienen formación de catarata en condiciones de hiperglucemia, de los cuales generaron dos cepas de ratones que padecían hiperglucemia congénita, una de éstas causada por obesidad (C₅₇B₁/6J ob/ob) y la otra causada por *diabetes mellitus* (C₅₇B₁/KSJ db/db). A éstos los sometieron a una dieta basada en glucosa y en sus cristalininos determinaron la concentración de varios azúcares y polioles, encontraron un aumento modesto en la concentración de sorbitol y de fructosa en relación a los ratones control, sugiriendo que esto se debe a una actividad baja de la AKR1B4 en el cristalino de estos ratones

(tabla 1.1). Posteriormente la actividad de la AKR1B4 fue evaluada, así como la de otras enzimas que pudieran intervenir en los resultados, encontraron que

Tabla 1.1. Azúcares y polioles en cristalininos de ratones normales e hiperglucémicos. Los resultados son promedio, $\pm$ desviación estándar con $n=2$ (Varma *et al.*, 1974).

Cepa de ratón	Fructosa	Glucosa	Sorbitol	Inositol
	$\mu\text{mol/g}$ de peso del tejido			
Normales $C_{57}B_1$	Trazas	0.52 ± 0.08	-	3.30 ± 0.08
$C_{57}B_1/6J$ ob/ob	0.25 ± 0.04	2.50 ± 0.08	1.00 ± 0.10	3.26 ± 0.23
$C_{57}B_1/KSJ$ db/db	0.25 ± 0.05	2.80 ± 0.20	1.00 ± 0.20	2.91 ± 0.26

efectivamente, tanto la actividad de AKR1B4 como de la PD es baja, comparada con resultados obtenidos en ratas diabéticas de una semana, que tienen un grado de hiperglucemia similar y que si presentan formación de catarata. En cuanto a las otras enzimas evaluadas su actividad tampoco se alteró (tabla 1.2). La conclusión fue que la causa de que las cepas de ratones $C_{57}B_1$, $C_{57}B_1/KSJ$ db/db y $C_{57}B_1/6J$ ob/ob no presentan la formación de catarata en hiperglucemia, es debido a la baja actividad de AKR1B4 en cristalino, que evita la acumulación de sorbitol y las alteraciones causados por este.

Tabla 1.2. Actividad enzimática en cristalininos de la Aldosa Reductasa (AR), Poliol Deshidrogenasa (PD), Glucosa-6-fosfato Deshidrogenasa (G6PD), 6-fosfo-gluconato deshidrogenasa (6PGD) y Hexocinasa (HX). Los resultados son promedio, $\pm$ desviación estándar con $n=3$ (Varma *et al.*, 1974).

Ratones	AR	PD	G6PD	6PGD	HX
CFW	1.0 ± 0.5	1.4 ± 0.0	2.1 ± 0.1	1.0 ± 0.1	6.0 ± 0.2
Swiss	1.3 ± 0.2	1.5 ± 0.1	1.3 ± 0.2	0.7 ± 0.1	4.5 ± 1.0
Balb C	0.8 ± 0.1	1.5 ± 0.1	2.5 ± 0.5	1.6 ± 0.2	6.0 ± 0.1
$C_{57}B_1$	1.0 ± 0.4	1.6 ± 0.1	1.7 ± 0.3	1.0 ± 0.0	4.5 ± 1.0
$C_{57}B_1/6J$ ob/ob	1.0 ± 0.2	1.6 ± 0.1	2.4 ± 0.2	1.8 ± 0.2	5.5 ± 1.0
$C_{57}B_1/KSJ$ db/db	0.8 ± 0.2	1.3 ± 0.1	2.0 ± 0.1	1.6 ± 0.1	4.9 ± 0.2
Rata					
Sprague-Dawley	11.5 ± 1.2	1.8 ± 0.1	1.8 ± 0.2	0.6 ± 0.1	4.0 ± 1.0

Esta hipótesis fue validada 21 años después por Lee *et al.* (1995), quienes realizaron su investigación con la misma cepa de ratones, a los cuales les sobreexpresaron la

enzima AKR1B4 y los sometieron a una dieta con 50% de galactosa, evaluaron la progresión de formación de catarata dividida en tres estados, el primero representado por la aparición de vacuolas sobre la periferia del cristalino, el segundo cuando las vacuolas cubren el cristalino y se fusionan entre ellas, y el tercero cuando se presenta la opacidad completa del cristalino. También el nivel enzimático de la AKR1B4 se evaluó y se observó que los ratones que tienen mayor actividad de AKR1B4 presentaron la formación de catarata en un tiempo menor que los que tienen menor actividad (tabla 1.3). Con estos dos trabajos se concluye que la vía de los polioles está implicada en la formación de la catarata causada por hiperglucemia. Principalmente, por la acción de la enzima AKR1B4 y la acumulación del sorbitol. Por esto es de suma importancia el diseño y descubrimiento de inhibidores de la enzima AKR1B1 que pueden ofrecer un enfoque terapéutico importante para la prevención de complicaciones de la *diabetes mellitus* como la catarata.

Tabla 1.3. Nivel de AKR1B4 y velocidad de formación de catarata galactosémica. N= catarata no observada. Los resultados son promedio, $\pm$ desviación estándar con $n=3$ (Lee *et al.*, 1995).

no. Línea transgénica de ratón	Nivel enzimático de AR en cristalino nmol/min por mg	Tiempo para alcanzar el estado de catarata galactosémica (dieta de 50% galactosa), días		
		Estado 1	Estado 2	Estado 3
CAR222	37.0 $\pm$ 3.57	2	14	21
CAR223	11.1 $\pm$ 1.20	N	N	N
CAR435	48.9 $\pm$ 3.75	1	14	21
CAR440	11.1 $\pm$ 0.63	N	N	N
CAR648	133.7 $\pm$ 8.50	1	10	14
CAR222+ ARI*		N	N	N
Ratón normal	1.4 $\pm$ 0.09	N	N	N
Rata normal	37.4 $\pm$ 1.30	7	14	21

2.6. Comparación entre las enzimas AKR1B1 y AKR1B4

En la familia de las AKR1Bs se han descubierto 14 enzimas hasta ahora. Estas enzimas son conocidas como Aldosas Reductasas. La AKR1B1 es la enzima que se encuentra en

el cristalino de *Homo sapiens*. La AKR1B4 es la enzima que se encuentra en cristalino de *Rattus norvegicus*. Estas enzimas tienen el 86% de identidad en su secuencia proteica (Pastel *et al.*, 2012). Además, estas enzimas tienen similitud en su actividad enzimática al usar al gliceraldehído como sustrato. Suryanarayana *et al.*, (2004) evaluaron la actividad inhibitoria de una mezcla de tannoides purificados de la planta *Emblica officinalis*. La actividad enzimática de la AKR1B1 y la AKR1B4 fue medida al usar al gliceraldehído como sustrato y el NADPH como cofactor. Los resultados que obtuvieron indican un comportamiento similar de ambas enzimas. La mezcla de tannoides purificados de *Emblica officinalis* inhiben un 80% y 90% a la AKR1B1 y AKR1B4 respectivamente.

2.7. Inhibidores de la AKR1B1 (IAR)

Aunque una amplia variedad de compuestos se han sintetizado para inhibir a la enzima AKR1B1 en modelos experimentales, es pequeño el número de fármacos que han alcanzado un ensayo clínico. Dos principales clases de inhibidores de la AKR1B1 se han establecido:

- IARs con grupo carboxilo.- la más importante y grande clase de IARs, se caracteriza por tener en su estructura un grupo carboxilo, el cual interacciona con la enzima. Ejemplos de estos inhibidores son el tolrestat, la alrestatina (considerado como el inhibidor más potente de esta clase hasta ahora), el zopolrestat y el epalrestat (fig. 2.11), que es el único comercializado y solo disponible en Japón (Alexiou *et al.*, 2009 ; Changjin Zhu, 2013)
- IARs derivados de espirohidantoína.- caracterizados por tener un anillo hidantoína, responsable de la interacción con la AKR1B1. El sorbinil (fig. 2.11) fue el primer IAR sintetizado de este tipo, el cual tuvo buena inhibición a la AKR1B1 *in vitro* e *in vivo*, pero al administrarlo a pacientes con *diabetes mellitus*, éste les ocasionó reacciones de hipersensibilidad, con síntomas como mialgia, fiebre y alteración en la piel (Jaspan *et al.*, 1985). Además, de la

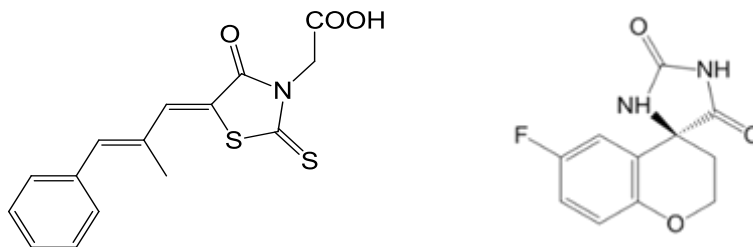


Fig. 2.11. Estructura del epalrestat (izquierda) y sorbinil (derecha)

búsqueda de inhibidores sintéticos, las plantas se manifiestan como fuentes interesantes para la búsqueda de inhibidores para AKR1B1, los flavonoides quercetina, quercitrina y miricitrina han sido reconocidos como potentes inhibidores.

2.8. Productos naturales vegetales

Las plantas son organismos sésiles que poseen mecanismos fisiológicos para detectar y procesar y después para discernir y responder a estímulos del entorno, haciéndolo a lo largo de su ciclo de vida. En cada paso del proceso de desarrollo (germinación, crecimiento, reproducción y defensa) la planta produce metabolitos secundarios (aceites esenciales, taninos, ácidos fenólicos, sesquiterpenlactonas, cetonas y flavonoides) que actúan como mensajeros químicos, los cuales son la base del establecimiento de mecanismos de defensa y comunicación dentro de las diferentes especies y entre estas mismas, forman un arsenal fitoquímico que ofrece una oportunidad excelente para el aislamiento, purificación e identificación de compuestos químicos. Los metabolitos secundarios se agrupan según su origen biosintético común: terpenos y esteroides, flavonoides, cromenos y benzofuranos, cumarinas, quinonas, alcaloides entre otras (Avalos *et al.*, 2009).

Terpenos y esteroides.- el término terpeno se refiere a un grupo de sustancias que se biosintetizan siguiendo la llamada regla del isopreno propuesta por Wallach (1866) se clasifican como monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20)

triterpenos (C30) y tetraterpenos (C40) según el número de unidades del isopreno que lo forma.

- **Monoterpenos.**- Un importante grupo de hidrocarburos, alcoholes y cetonas que son los compuestos mayoritarios de los aceites esenciales obtenidos de hojas, raíces, corteza y flores de diversas plantas, pueden presentarse como compuestos acíclicos, monocíclicos y cíclicos (Williams y Barry, 2006).
- **Sesquiterpenolactonas.**- Derivadas biogenéticamente de los sesquiterpenos son una clase de productos naturales predominantes en la familia *Asteraceae*. En todas las partes de las plantas se encuentran, las concentraciones mayores generalmente se ubican en las hojas (Williams y Barry, 2006).
- **Diterpenos.**- En diversos grupos químicos pueden presentarse *e.g.* en forma de hidrocarburos, alcoholes, cetonas, lactonas y ácidos carboxílicos. De acuerdo a su tipo de esqueleto carbonado se subdividen como bicíclicos, tricíclicos y tetracíclicos (Williams y Barry, 2006).
- **Triterpenoides y esteroides.**- Son compuestos con un esqueleto carbonado basado en seis unidades de isopreno que derivan biogenéticamente del escualeno. Son de estructura relativamente compleja generalmente tetracíclicos o pentacíclicos y pueden contener grupos hidroxilo, cetónico o aldehídico y carboxílico. Los esteroides biogenéticamente muy relacionados a los triterpenoides y con un esqueleto cíclico base al igual que los triterpenoides tetracíclicos, pueden ser clasificados como esteroides (C27 o más) saponinas esteroidales, glicósidos cardíacos, esterocoloides y las llamadas hormonas esteroidales (Williams y Barry, 2006).

Flavonoides.- Los pigmentos flavonoides son uno de los grupos químicos más numerosos y ampliamente distribuidos de los constituyentes naturales. 10 clases de flavonoides se conocen, todos contienen 15 átomos de carbono en su núcleo básico y están arreglados bajo un sistema C6-C3-C6 en el cual dos anillos aromáticos llamados A y B están unidos por tres carbonos que pueden o no formar un tercer anillo (anillo C). Su acción farmacológica es muy extensa y variada, son bien conocidas sus

actividades como dilatadores de las coronarias, espasmolíticos, antihepatotóxicos entre otras (Kumar y Pandey, 2013).

Cumarinas.- Las cumarinas son compuestos ampliamente distribuidos en las plantas principalmente en las familias *Umbelliferae* y *Rutaceae* se encuentran en todas las partes de la planta, desde la raíz a flores y frutos con mayor abundancia en frutos. Un amplio rango de actividad biológica exhiben como por ejemplo acción anticoagulante y antibacterial entre muchas más (Venugopala *et al.*, 2013).

Cromenos y Benzofuranos.- Son productos naturales que se encuentran en algunas especies de las familias *Rutaceae*, *Liliaceae*, *Ciperaceae* y principalmente en ciertas tribus de las *Asteraceae*, entre las cuales parece ser exclusivos de *Astereae*, *Eupatorieae*, *Heliantheae*, *Inulaeae* y *Senecioneae*. Estos compuestos se encuentran presentes generalmente en hojas y tallos, menos comúnmente en raíces. Muchos cromenos y benzofuranos han mostrado ser biológicamente activos como el toxol y la dehidrotremetona que son bacteriostáticos (Lock, 1994).

Xantonas.- Son pigmentos fenólicos amarillos; químicamente son diferentes a los flavonoides, pero son muy similares en sus reacciones de coloración y en su movilidad cromatográfica; se presentan especialmente en *Gutiferae*, *Gentianaceae*, *Moraceae* y *Polignonaceae*. Las Xantonas aisladas hasta ahora pueden ser clasificadas en 5 grupos: xantonas simples oxigenadas, glicosiladas, preniladas, lignoides y misceláneos. El interés de estos compuestos se debe a su actividad farmacológica; inhibidor de la monoaminooxidasa, actividad antipsicótica, efecto tuberculostático, entre otros (Gutiérrez *et al.*, 2013).

Quinonas.- Las quinonas naturales son un grupo de compuestos cuya coloración puede ser desde el amarillo pálido hasta casi negro. Frecuentemente en la corteza, en el corazón de la madera o de la raíz y en algunos casos en las hojas se encuentran. Las quinonas se subdividen en benzoquinonas, naftoquinonas, antraquinonas, quinonas isoprenoide (Gordaliza, 2012).

Alcaloides.- Es el grupo químico más grande de metabolitos secundarios de plantas. Un contenido importante se encuentra en semillas, raíces, cortezas y hojas; al estado libre o como glicósidos o formando sales con ácidos orgánicos. Los alcaloides incluyen aquellas sustancias básicas que contienen uno o más átomos de nitrógeno como parte de un sistema cíclico, que manifiesta significativa actividad farmacológica y han sido sintetizados de aminoácidos como precursores. Debido a la complejidad de estructuras que representan los alcaloides, su nomenclatura no ha sido sistematizada y su clasificación ha sido generalmente con base a la similitud con estructuras moleculares más simples y así son clasificados, por ejemplo como alcaloides indólicos, alcaloide quinólicos y alcaloide del tropano (Lock, 1994).

2.9. Uso de plantas medicinales

Por muchos siglos las plantas se han usado como un posible tratamiento médico debido a sus compuestos específicos. Las plantas medicinales son un elemento importante de sistemas médicos indígenas en México. Estas fuentes son usualmente consideradas como parte de los conocimientos tradicionales de una cultura (Heinrich *et al.*, 1998). Hoy en día, propiedades farmacológicas, indicaciones y dosis se han establecido para muchas plantas. Por lo general, estas plantas pasan por una revisión estricta de investigadores en la búsqueda de una nueva propiedad farmacológica de los múltiples bioactivos, químico y componentes de la planta, pero aún queda mucho por explorar (Morales López *et al.*, 2007).

México tiene una amplia biodiversidad vegetal de 20,000-30,000 especies vegetales. Michoacán (fig. 2.12) posee aproximadamente 5,000 especies vegetales, la familia vegetal más abundante es la Asteraceae con 402 géneros y 3,084 especies. Además, cuenta con una rica tradición en uso de plantas medicinales, un total de 3,000 especies han sido copiladas en un atlas de plantas medicinales, empleadas por diversos grupos étnicos (Ramírez López *et al.*, 2010). Increíblemente de estos solo aproximadamente el 1% han sido estudiados a fondo con respecto a su potencial médico. Además, de que las plantas continúan siendo una valiosa fuente de sustancias biológicamente activas ya sea en forma de medicamento vegetal o de materia prima para la industria

farmacéutica. El aumento de la población mundial demanda un incremento de las fuentes de medicamentos, por lo que, tanto los países desarrollados, como en aquellos en vías de desarrollo dirigen sus esfuerzos hacia la evaluación y explotación de su



Fig. 2.12.- Localización de Michoacán

flora. Se ha incrementado el uso de plantas medicinales como alternativa ante los problemas de salud que se enfrentan. La importancia central en la búsqueda de nuevas drogas en plantas usadas en medicina tradicional se basa en el hecho que el 65% de la población mundial hace uso de plantas medicinales. Temas recurrentes de investigación en el reino vegetal incluyen el aumento en la búsqueda de nuevas moléculas, con efectos específicos farmacológicos no tóxicos y efectivos en control de enfermedades humanas (Ramírez López *et al.*, 2010).

En Michoacán, existen fuertes contrastes entre ambientes diferentes. Esto resulta en una extraordinaria riqueza genética con variaciones entre especies en los diferentes ecosistemas. Algunos de los géneros que han sido recolectados en Michoacán, se encuentran en el tabla 1. 4. En algunas especies de estos géneros se ha iniciado el estudio químico por sus propiedades farmacológicas. Por lo que, está claro que se debe realizar una mayor investigación etnobotánica y clínica, para elucidar el posible beneficio medicinal de estas plantas (García Sánchez *et al.*, 2011).

Aunque no existe aún un estudio en la búsqueda de inhibidores para la enzima AKR1B1 con plantas nativas de Michoacán. En otros países se ha investigado la búsqueda de IARs en plantas. Un grupo de flavonoides son algunos de los IARs naturales más potentes. Además que se ha mostrado que el consumo oral de

quercetina conduce a disminución en la acumulación de sorbitol en cristalinicos de ratas diabéticas así como el retraso en la formación de catarata (Goodari *et al.*, 2005). Un estudio en humanos, aunque no en células del cristalino, encontró que la vitamina C oral sobre dosis bajas de 100-600 mg diarios, fue capaz de normalizar el nivel de sorbitol en glóbulos rojos en un periodo de 30 días en individuos con *diabetes mellitus* tipo 1 (Vincent *et al.*, 1999). El ácido lipoico (LA) se ha encontrado que es útil para evitar la formación de catarata, este tiene un potente efecto antioxidante, es esta propiedad la responsable de gran parte de su efecto protector en la catarata diabética. Otro mecanismo por el que el ácido lipoico puede prevenir la catarata en la *diabetes mellitus* es a través de la inhibición de la AKR1B1, lo cual se determinó en un experimento *in vitro* (Kathlee, 2001).

Género	Moléculas identificadas	Moléculas purificadas	Usos en medicina tradicional	Autor
<i>Ageratina</i>	104	30	<i>Diabetes mellitus</i> y paludismo	García Sánchez <i>et al.</i> , 2011; Ramírez López <i>et al.</i> , (En Prensa)
<i>Tagetes</i>	5	-	Diarrea y vómito	Mejía Barajas <i>et al.</i> , 2012
<i>Eupatorium</i>	34	-	Problemas digestivos	Ramírez López <i>et al.</i> , 2010
<i>Caesalpinia</i>	124	5	Astringente, antipirético y analgésico	Pamatz Bolaños <i>et al.</i> , 2009; Gómez Huratado <i>et al.</i> , 2013
<i>Enterolobium</i>	96	4	Bronquitis y diarrea	Raya González <i>et al.</i> , 2008; 2013
<i>Tabebuia</i>	47	4	Anticancerígeno y antibiótico	Arellano García <i>et al.</i> , 2012

Tabla 1.4. Géneros vegetales de especies recolectadas en Michoacán

3. Justificación

La escasa cantidad de inhibidores de la Aldosa Reductasa (IAR) y sus efectos indeseables genera un área de oportunidad farmacológica en la obtención de IAR con potencial terapéutico a partir de plantas nativas de Michoacán, para coadyuvar en el tratamiento y prevención de complicaciones secundarias como, la catarata en la creciente población de individuos con hiperglucemia crónica.

4. Hipótesis

Algunos metabolitos secundarios de plantas nativas de Michoacán actúan como inhibidores de la enzima Aldosa Reductasa

5. Objetivo general

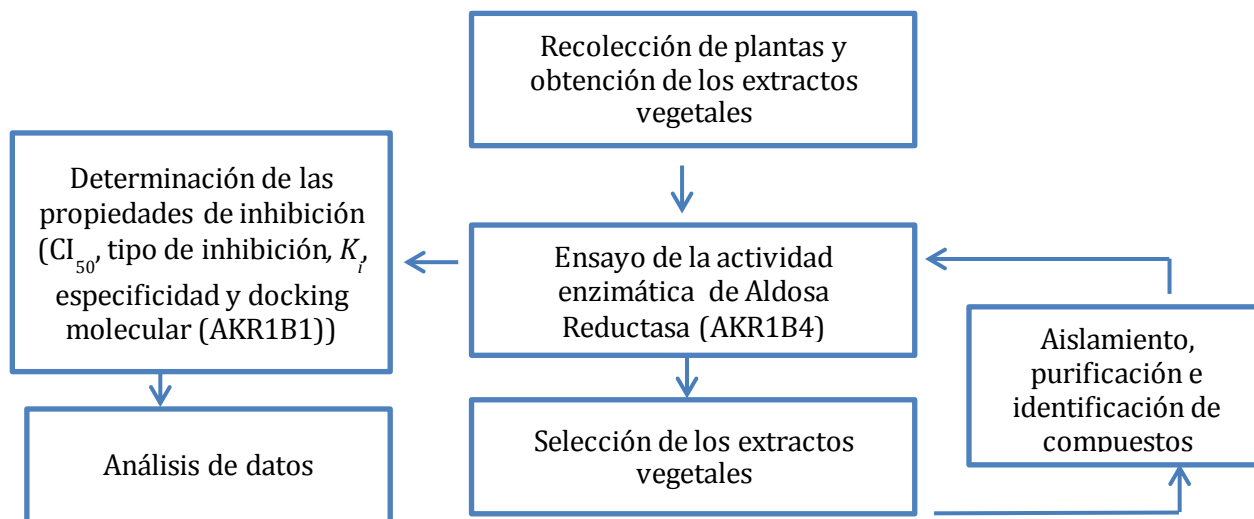
Obtener compuestos inhibidores de la enzima Aldosa Reductasa de plantas nativas de Michoacán

5.1. Objetivos particulares

- Identificar a los extractos vegetales con actividad inhibitoria de la AKR1B4 y seleccionar el extracto con la mayor inhibición
- Identificar al o los inhibidores de la AKR1B4 presentes en el extracto con mayor inhibición
- Determinar la inhibición de la enzima AKR1B4 con los compuestos purificados

6. Metodología

6.1 Estrategia experimental



6.2 Extractos vegetales

6.2.1. Material vegetal

Un total de 106 extractos fueron evaluados en este trabajo (tabla 6.1). La mayoría de estos extractos ya habían sido obtenidos por nuestro grupo de investigación. Estos se encuentran almacenados a 2 °C en frascos sellados y protegidos de la luz.

6.2.2. Obtención de extractos vegetales

La obtención de los extractos se realizó por maceración sucesiva de polaridad ascendente con hexano, cloruro de metileno y metanol. Las muestras de plantas fueron recolectadas (paso 1 de fig. 6.1) y secadas en sombra a temperatura ambiente por tres semanas para eliminar la humedad contenida (paso 2 de fig. 6.1). Posteriormente, las partes de la planta se separaron; hojas, tallos, flores y raíz y cada una de estas se trituró en partes pequeñas, se pesaron y se colocaron en frascos de vidrio protegidos de la luz. Para la primera etapa de extracción se adicionó 200 ml de hexano para 11 g de la muestra vegetal, se maceró por 3 días (paso 3 de fig. 6.1), se

filtró (paso 4 de fig. 6.1) y se concentró en un evaporador rotatorio a 55 °C (paso 5 de fig. 6.1), el hexano que se separó, nuevamente se adicionó al frasco de vidrio con la

Tabla 6.1. Especies evaluadas como posibles inhibidores de la AKRIB4. Los resultados son promedio, $\pm$ desviación estándar con n=3

Género	Especie	Número de extractos
<i>Ageratina</i>	<i>A. jocotepacana</i>	11
<i>Caesalpinia</i>	<i>C. coriaria</i>	6
	<i>C. pulcherrima</i>	8
	<i>C. platyloba</i>	5
<i>Eupatorium</i>	<i>E. aerolare</i>	8
	<i>E. arsenei</i>	4
	<i>E. brevipes</i>	2
	<i>E. dolichobasis</i>	3
	<i>E. glabratum</i>	6
	<i>E. lasioneuron</i>	7
	<i>E. mairetianum</i>	7
	<i>E. petiolare</i>	7
	<i>E. pichinchense</i>	8
	<i>E. pycnocephalum</i>	7
<i>Tabebuia</i>	<i>T. rosea</i>	4
	<i>T. donnell</i>	3
<i>Tagetes</i>	<i>T. lucida</i>	10
Total	18	106

muestra vegetal correspondiente y se maceró por tres días, se filtró y se concentró en un evaporador rotatorio, se repitió éste procedimiento 3 veces más, el concentrado obtenido es un extracto hexánico (no polar), el cual se colocó en un frasco de vidrio pequeño protegido de la luz, se mantuvo abierto en campana de extracción por 24 h para que se evaporara el disolvente, se pesó y se almacenó a 2 °C hasta su uso (paso 6

de fig. 6.1). El frasco de vidrio que contenía la muestra vegetal se mantuvo abierto en campana de extracción para que se evaporara el hexano. Para continuar con la extracción, se adicionó de 200 ml de cloruro de metileno, en el cual se maceró por tres días, se filtró y se concentró en un evaporador rotatorio a 35 °C. El cloruro de metileno que se separó, nuevamente se adicionó al frasco de vidrio y se maceró por tres días, se filtró y se concentró en un evaporador rotatorio. Este procedimiento se repitió tres veces. El concentrado obtenido es un extracto cloruro metilénico (polaridad intermedia). Este se mantuvo abierto en campana de extracción por 24 h para que se evaporara el disolvente, se colocó en un frasco de vidrio pequeño protegido de la luz, se pesó y se almacenó hasta su uso. Para la etapa final de extracción, se siguió el mismo procedimiento que en las etapas pasadas pero se adicionó a la muestra vegetal 200ml de metanol, maceración por tres días, se filtró y se concentró en un evaporador rotatorio a 65 °C, con sus respectivas repeticiones, obteniendo finalmente un extracto metanólico (polar) el cual se mantuvo abierto en campana de extracción por 24 h, se pesó y almacenó en un frasco de vidrio pequeño protegido de la luz.

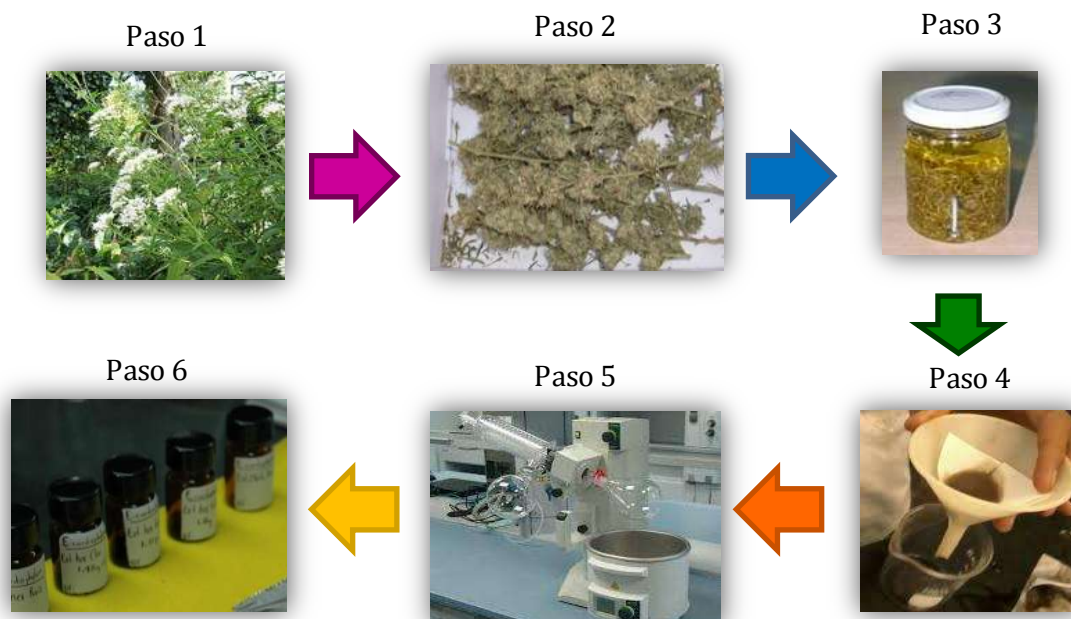


Fig. 6.1. Obtención de extractos vegetales. Paso 1: recolección de la planta, paso 2: secado de la planta, paso 3: maceración en disolvente, paso 4: filtración del extracto, paso 5: concentración del extracto en evaporador rotatorio y paso 6: almacenamiento del extracto.

6.2.3. Preparación de los extractos para el ensayo de inhibición

5 mg de cada extracto se pesaron y se solubilizaron en 1 ml de una mezcla de 2,990 μ l de Agua desionizada y 10 μ l de Tween 20 para los extractos metanólico y 1 ml de una mezcla 2,990 μ l de DMSO al 85% y 10 μ l de Tween 20 para los extractos cloruro metilénicos y los extractos hexánicos. Cada uno de ellos se filtró con membrana de nitrocelulosa de 0.45 μ m (MILLIPORE) y se almacenó en refrigeración y se protegió de la luz, hasta su uso.

6.3. Actividad enzimática de la Aldosa Reductasa

6.3.1. Aldosa Reductasa de cristalino de rata (AKR1B4)

El extracto crudo de enzima se obtuvo de cristalinos de rata siguiendo el método de Hayman y Kinoshita (1966) con modificaciones. Ratas de la cepa Wistar donadas por los laboratorios de Farmacología y Bioquímica del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la UMSNH de entre 300 y 500 g de peso corporal se utilizaron. Los ojos de rata fueron removidos con ayuda de tijera quirúrgica y bisturí (paso 1 de fig. 6.2) y posteriormente se les extrajo el cristalino los cuales fueron colocados en microtubos con solución 1:1 de amortiguador de fosfatos de potasio 0.1 M con pH 6.8 y 2-mercaptoetanol 1mM (150 μ l de la disolución para cada cristalino) y se almacenaron a -20 °C hasta su uso. El día del ensayo enzimático se descongelaron 2 cristalinos, estos fueron homogenizados en 1 ml de buffer de fosfatos de potasio 0.1 M

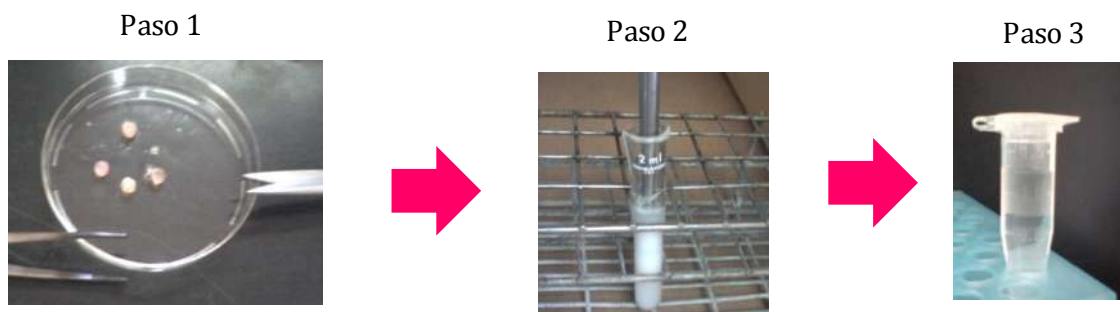


Fig. 6.2. Obtención del extracto crudo de AKR1B4. Paso 1: ojos removidos de rata, paso 2: homogenización de los cristalinos y paso 3: almacenamiento de extracto crudo de AKR1B4

(pH 6.8) y 10 μ l de una mezcla de inhibidores de proteasas de la marca Sigma (P9599) se usó homogenizador manual (paso 2 de fig. 6.2), posteriormente fueron centrifugados a 10,000 rpm durante 15 min, el sobrenadante se separó en microtubos previamente enfriados (paso 3 de fig. 6.2), del cual se utilizó 20 μ l para medir la cantidad de proteína con el método de Lowry (1951) y el resto fue usado como extracto crudo de enzima manteniéndolo en baño de hielo y no postergar su uso más de 2 h para evitar la alteración de la enzima AKR1B4.

6.3.2. Actividad enzimática *in vitro*

La actividad enzimática de la Aldosa Reductasa de cristalino de rata se midió por dos métodos, a través de la medición del consumo de NADPH a 340 nm y la medición de la concentración de glicerol a 540 nm (fig. 6.3).

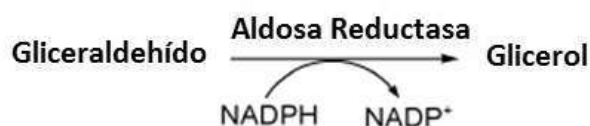


Fig. 6.3. Reacción enzimática de la AKR1B1, con gliceraldehído como sustrato.

6.3.2.1. Medición de la actividad enzimática por consumo de NADPH

La actividad se obtuvo al medir el consumo del NADPH reducido, en una mezcla de reacción que contuvo 2,550 μ l de 0.1 M de buffer de fosfatos de potasio (pH 6.8), 15 μ l de 1 mM de mercaptoetanol, 30 μ l de agua, extracto crudo de enzima a concentración de 8 mg de proteína/ml, 60 μ l de 2mM de NADPH y 300 μ l de 0.1 mM de gliceraldehído. La reacción enzimática se monitorizó por la caída de absorbencia en un espectrofotómetro visible ultravioleta a 340 nm por 2 min. La lectura se inició al agregar el NADPH. Como blanco se utilizó la misma mezcla de reacción pero sin gliceraldehído. El valor obtenido del blanco fue restado al valor obtenido de la muestra. Después de 2 min de la reacción la mezcla se calentó a 80 °C por 1 min para

detener la reacción enzimática y se utilizó para cuantificar la concentración de glicerol.

La actividad enzimática se calculó con la siguiente fórmula (French *et al.*, 2013):

$$\text{Actividad enzimática} \left(\frac{U}{mg} \text{ de proteína} \right) = \frac{\left(\frac{\Delta Abs}{t} \right) (Vt) (1 cm^2)}{(\epsilon) (Vm)} / mg \text{ de proteína} \quad (6.1)$$

dónde:

ΔAbs : Cambio en la absorbencia (1/min)

t: Tiempo (2 min)

Vt: Volumen final de la mezcla de reacción (3 ml)

ϵ : Coeficiente de extinción del NADPH (0.00622 cm²/mol)

Vm: Volumen en la mezcla de reacción del extracto crudo de enzima (0.06 ml)

6.3.2.2. Medición de la actividad enzimática por medición de la concentración de glicerol

El segundo método para medir la actividad de la enzima AKR1B4 fue la determinación de la concentración del producto de la reacción enzimática, el glicerol (Clark et al., 2009). Para ello un reactivo comercial para medición de glicerol libre (Sigma F6428) se utilizó el cual contiene un complejo de enzimas que transforman al glicerol libre presente en la muestra al producto colorido quinoneimida que muestra una absorbencia máxima a 540 nm, el aumento en la absorbencia es directamente proporcional a la concentración de glicerol libre en la muestra.

Para realizar la medición, se etiquetaron tres tubos, uno como blanco, otro como estándar y el último como muestra. A cada uno de los tubos se le colocaron 1,200 μ l del reactivo además, al blanco se agregó 30 μ l de H₂O tridestilada, al estándar 30 μ l de una disolución de glicerol a 0.26 mg glicerol/ml (Sigma G7793) y a la muestra 30 μ l de la mezcla de reacción enzimática previamente centrifugada a 12,000 rpm por 20 min. A temperatura ambiente se incubaron por 15 min y se midió la absorbencia de cada uno de ellos en espectrofotómetro a 540nm.

Para obtener la concentración de glicerol se usó la siguiente ecuación:

$$\text{Glicerol} = \frac{(A \text{ muestra} - A \text{ blanco})}{(A \text{ estandar} - A \text{ blanco})} \times 0.26 \text{ mg glicerol/ml} \quad (6.2)$$

La medición de glicerol se realizó para las mezclas de reacción con extractos que presentaron inhibición mayor al 80% con el primer método. Para obtener el porcentaje de inhibición de acuerdo a la concentración de glicerol, se usó como 0% de inhibición a la concentración obtenida de la mezcla de reacción sin extracto.

6.3.2.3. Actividad enzimática en presencia de dimetilsulfóxido (DMSO)

La evaluación del comportamiento de la enzima AKR1B4 en presencia de DMSO se obtuvo al medir su actividad enzimática con diferentes concentraciones de DMSO. Diluciones de 5, 10, 20, 40, 60, 80, y 100% de DMSO se prepararon, 30 µl de cada una de las diluciones se adicionaron a la mezcla de reacción y a sus respectivos blancos y se midió su actividad por consumo de NADPH.

6.3.3. Ensayo de inhibición de la AKR1B4 *in vitro*

El efecto inhibitor de los extractos de plantas nativas de Michoacán se obtuvo al medir la actividad enzimática de la AKR1B4 en presencia de los extractos evaluados con la caída de absorbencia a 340 nm del control, blancos y muestra, preparados cada uno de ellos como se indica en la tabla 6.2. El porcentaje de inhibición de la AKR1B4

Tabla 6.2. Mezcla de reacción de la actividad de la AKR1B4.

Disoluciones	Volumen (µl)			
	Control	Blanco 1	Muestra	Blanco 2
Gliceraldehído 0.1 mM	300	-	300	-
Amortiguador de fosfato de potasio pH 6.8 0.1 M	2535	2835	2535	2835
Agua o dimetilsulfóxido	30	30	-	-
Extracto vegetal 5 mg/ml	-	-	30	30
Extracto crudo de enzima AKR1B4 8 mg de proteína	60	60	60	60
NADPH 0.2 mM	60	60	60	60
2-mercaptoetanol 1 mM	15	15	15	15

se obtuvo al tomar como 0% de inhibición la actividad de la mezcla de reacción sin extracto.

6.4. Selectividad del ácido 13-*epi*-labdanólico

La selectividad del ácido 13-*epi*-labdanólico fue evaluada con la comparación de su actividad inhibitoria contra las enzimas Aldosa Reductasa de cristalino de rata (AKR1B4), 20 α -hidroxiesteroide Deshidrogenasa Recombinante de humano (AKR1C1) y con el extracto crudo de enzima obtenido de eritrocitos de humano (AKR1A1/AKR1B1).

6.4.1. Enzima 20 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa recombinante de humano (AKR1C1)

La enzima 20 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa (AKR1C1) recombinante de humano expresada en *E. coli* fue obtenida de la casa comercial Sigma-Aldrich (SRP6087). Se midió la actividad de la enzima en presencia y ausencia del ácido 13-*epi*-labdanólico en una mezcla de reacción que contuvo 2,550 μ l de 0.1 M de buffer de fosfatos de potasio (pH 6.8), 15 μ l de 1 mM de mercaptoetanol, 30 μ l de ácido 13-*epi*-labdanólico (5mg/ml DMSO 85%), 3 μ l de enzima AKR1C1, 60 μ l de 2mM de NADPH y 300 μ l de 0.1 mM de gliceraldehído. La reacción enzimática se monitorizó por la caída de absorbencia a 340 nm por 2 min. La mezcla de reacción se calentó a 80 °C por 1 min para detener la reacción enzimática y se utilizó para cuantificar la concentración de glicerol. La actividad inhibitoria del ácido 13-*epi*-labdanólico hacia la enzima AKR1C1 fue calculada tomando como 0% de inhibición la actividad enzimática de la mezcla de reacción sin el ácido 13-*epi*-labdanólico.

6.4.2. Obtención del extracto crudo de enzima de eritrocitos de humano

La obtención del extracto crudo de enzima de eritrocito de humano se llevó a cabo con la siguiente metodología (Das and Srivastava, 1985), se realizó la toma de la muestra sanguínea venosa de una persona sana de sexo masculino en estado de ayuno de 8 h. Esta fue recolectada en tubo con EDTA como anticoagulante, todos los ensayos fueron

realizados en baño de hielo. La muestra de eritrocitos fue lavada con solución salina, para ello se tomaron 0.5 ml de eritrocitos y se colocaron en viales, se adicionó 0.5 ml de solución salina, se mezcló y se centrifugó a 8,000 rpm por 5 min, se desechó el sobrenadante y se volvió a adicionar 0.5 ml de solución salina, repitiendo el mismo procedimiento por 3 veces. Una vez que se desechó el sobrenadante de la última lavada, se adicionó a la muestra de eritrocitos 10 µl de 2-mercaptoetanol 1 mM y 15 µl de una mezcla de inhibidores de proteasas (SIGMA P9599), se congeló la muestra de eritrocitos a -40 °C por 3 h, se descongeló por 1 h y el ciclo de congelación y descongelación se repitió 3 veces, se centrifugó a 12,000 rpm por 15 min, el precipitado fue desechado y el sobrenadante fue utilizado como extracto crudo de enzima.

6.4.2.1. Actividad enzimática del extracto crudo de enzima de eritrocitos de humano

La actividad enzimática del extracto crudo obtenido de eritrocitos de humano, se midió a 37 °C a través del consumo de NADPH y la medición de glicerol de las siguientes mezclas:

Tabla 6.3. Mezcla de reacción de la actividad de las AKR1A1/AKR1B1 con ácido 13-*epi*-labdanólico.

Disoluciones	Volumen (µl)			
	Control	Blanco 1	Muestra	Blanco 2
Gliceraldehído 0.1 mM	300	-	300	-
Amortiguador de fosfato de potasio pH 7 0.1 M	2535	2835	2535	2835
Dimetilsulfóxido 85%	30	30	-	-
Ácido 13- <i>epi</i> -labdanólico 5 mg/ml	-	-	30	30
Extracto crudo de enzimas AKR1A1/AKR1B1 8 mg de proteína	60	60	60	60
NADPH 0.2 mM	60	60	60	60
2-mercaptoetanol 1 mM	15	15	15	15

La actividad inhibitoria del ácido 13-*epi*-labdanólico hacia el extracto crudo de enzima de eritrocito de humano fue calculada tomando como 0% de inhibición la actividad enzimática de la mezcla de reacción sin el ácido 13-*epi*-labdanólico.

6.4.2.2. Actividad enzimática de la AKR1B1

La actividad enzimática de la AKR1B1 se midió a 25 °C a través del consumo de NADPH y la medición de la concentración de glicerol. La enzima recombinante AKR1B1 expresada en *E. coli* fue obtenida de forma comercial de la casa NOVUSBIO. Con las concentraciones finales de 0.1M de buffer de fosfatos de potasio a pH de 7, 10mM DL-gliceraldehído y 0.3mM NADPH se hizo una mezcla A. La mezcla de reacción fue preparada con 2.5 µl de la AKR1B1 más 2800 µl de la mezcla A. Esta fue incubada a 25 °C por 2.5 min. 200µl de DL-gliceraldehído fueron adicionados a la mezcla de reacción e inmediatamente después se midió la caída de absorbencia a 340 nm por tres min. La mezcla de reacción fue calentada a 80 °C y almacenada para posteriormente medir concentración de glicerol con la metodología ya antes mencionada.

6.5. Purificación de compuestos

6.5.1. Cromatografía en columna

La purificación de compuestos en los extractos de plantas nativas de Michoacán se realizó por cromatografía en columna al usar gel de sílice (200-400 mesh) MERCK como fase estacionaria y mezcla de hexano: cloroformo (100:0 - 0:100) en polaridad ascendente como fase móvil. Se midió la actividad inhibitoria a la enzima AKR1B4 de las fracciones vegetales elegidas y a las fracciones que obtuvieron mayor inhibición se corroboró su actividad inhibitoria con la medición de la concentración del producto de la reacción enzimática, el glicerol.

Las fracciones con mayor actividad inhibitoria se analizaron por resonancia magnética nuclear ¹H para dilucidar la estructura de los compuestos encontrados en las fracciones, los espectros fueron obtenidos a 400MHz en un espectrómetro Varian Mercury 400 se usó al CDCl₃ como disolvente y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Para la obtención de los metabolitos secundarios se siguió el

procedimiento reportado por García Sánchez *et al.*, (2014), Ramírez López (2010) y León Hernández (2010).

6.5.2. Preparación de los compuestos purificados para el ensayo de inhibición

Los compuestos puros evaluados en este trabajo fueron solubilizados en DMSO, con el siguiente procedimiento; 10 μg del compuesto puro se pesaron, se disolvieron en 1 ml de DMSO al 85% y se midió su actividad inhibitoria a la AKR1B4 por el método de medición del consumo de NADPH, los que presentaron mayor inhibición se les midió su actividad inhibitoria por medición de la concentración final de glicerol de la reacción.

6.6. Determinación de la CI_{50} del ácido 13-*epi*-labdanólico en AKR1B4

La concentración inhibitoria media (CI_{50}) se determinó al medir la actividad inhibitoria del ácido 13-*epi*-labdanólico a diferentes concentraciones. Una dilución a concentración de 5 mg de ácido-13-*epi*-labdanólico en un ml de DMSO al 85% fue preparada, partiendo de esta se prepararon siete diluciones con base logarítmica de 2, se midió la actividad inhibitoria de cada una de las diluciones. Para obtener el valor de CI_{50} se graficó el porcentaje de inhibición obtenido contra el logaritmo de las concentraciones del inhibidor, la línea de tendencia del gráfico se agregó y con la ecuación se calculó el valor, donde “x” es igual a CI_{50} y “y” es igual al porcentaje de inhibición buscado, en este caso 50%.

6.7. Determinación de los parámetros cinéticos del ácido 13-*epi*-labdanólico con AKR1B4

6.7.1. Tipo de inhibición

El K_m y la V_{max} de la enzima AKR1B4 fueron determinados en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de ácido 13-*epi*-labdanólico y con diferentes concentraciones de gliceraldehído. El inicio fue a partir de una dilución de 0.025 μM , cuatro diluciones con base logarítmica 2 se prepararon. Los resultados obtenidos se

graficaron en un gráfico de doble recíproco de Lineweaver-Burk, con el cual también se determinó el tipo de inhibición

6.7.2. Constante de inhibición (K_i)

La constante de inhibición (K_i) fue determinada al graficar el valor de la pendiente que es igual a K_m/V_{max} , valores obtenidos del gráfico de Lineweaver-Burk contra las concentraciones de ácido 13-*epi*-labdanólico, la línea de tendencia del gráfico se agregó y el valor en el intercepto en el eje de las abscisas es igual al valor de la K_i

6.8. Docking molecular

El Docking molecular se realizó en el programa (software) Autodock Vina descargado de la página <http://vina.scripps.edu> siguiendo el procedimiento indicado en el tutorial y que a continuación se describe.

6.8.1 Preparación de la macromolécula

La estructura de la enzima se obtuvo de la base de datos Protein Data Bank (PDB) con identificación (ID) de 1PMW en formato pdb la cual corresponde a la Aldosa Reductasa de cristalino de *Homo sapiens* (AKR1B1), la estructura fue modificada con el software Autodock tools, donde se eliminaron las moléculas de agua presentes en la estructura, los hidrógenos faltantes se adicionaron y se almacenó en formato pdbqt.

6.8.2. Preparación del ligando

La estructura del ácido 13-*epi*-labdanólico fue modelada en el programa Maestro 9.8 (Schrodinger inc), con el método computacional semiempírico AM1. La estructura para docking molecular en Autodock tools se ajustó en cuanto a las cargas atómicas parciales, tipos de átomos y una descripción de las interacciones rotables en la estructura. Finalmente el archivo se almacenó en formato pdbqt.

6.8.3. Generación del mapa de búsqueda y ejecución del software Autodock Vina

Para hacer docking molecular en el software Autodock Vina es necesario definir el mapa de búsqueda, el cual consiste en delimitar el espacio en la macromolécula donde interaccionará el ligando, para ello se indican las coordenadas x , y y z , así como su tamaño en Angstrom, para obtener las coordenadas nos basamos en la interacción que tiene el fidarestat, un inhibidor competitivo co-cristalizado con la AKR1B1. Un archivo de texto de configuración se creó en el cual se indican la molécula, el ligando y las coordenadas del mapa de búsqueda y se ejecutó el docking molecular en Autodock Vina.

6.9. Análisis de datos.

Todos los experimentos biológicos se hicieron tres veces de forma independiente, por triplicado cada uno de ellos. El programa Statistic 7.0, fue usado para realizar el análisis de varianza y para calcular el promedio de las datos y la desviación estándar.

7. Resultados

7.1. Obtención de extractos

Un total de 106 extractos pertenecientes a 18 especies de 5 diferentes géneros se evaluaron. Estas fueron elegidas debido a que ya han sido investigadas en nuestro grupo de trabajo y todas son nativas de Michoacán. Entre estos extractos se encuentran extractos metanólicos, diclorometánicos y hexánicos, de diferentes partes de la planta como son flor, hoja, tallo y raíz. Estos fueron obtenidos por maceración sucesiva de polaridad ascendente. Posteriormente, los extractos fueron evaluados como posibles inhibidores de la AKR1B4. Los extractos metanólicos se disolvieron en H₂O desionizada. Los extractos diclorometánicos y hexánicos se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) al 85%. Esta concentración de DMSO fue establecida a través de un ensayo de disolución, donde se evaluaron diferentes concentraciones de DMSO y se obtuvo que la concentración de 85% fue la que disolvió a todos los extractos diclorometánicos y hexánicos. La concentración final del extracto a evaluar fue de 250 µg/ml del disolvente.

7.2. Actividad enzimática de la AKR1B4 *in vitro*

La actividad enzimática del extracto crudo de enzima AKR1B4 se midió a través de dos métodos: la medición del consumo de NADPH y la medición de la concentración de glicerol.

7.2.1 Medición de la actividad enzimática por consumo de NADPH

El consumo de NADPH se midió con la caída de absorbencia a 340 nm, de la mezcla de reacción del control (fig. 7.1), y su blanco (mezcla de reacción sin sustrato) (fig. 7.2). La actividad enzimática se obtuvo con el valor de la pendiente. El valor obtenido en el blanco fue restado al valor del control en todos los casos. La actividad enzimática que se obtuvo fue de 2.2 U/mg de proteína, en la cual se consideró una unidad de enzima la que se asocia a la oxidación de 1 nmol de NADPH por min.

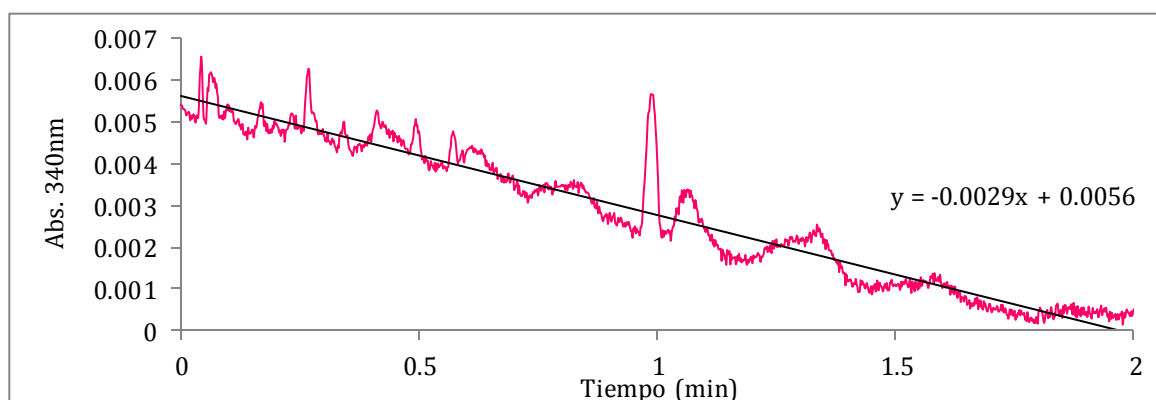


Fig. 7.1. Caída de absorbencia a 340 nm de la mezcla de reacción del control.

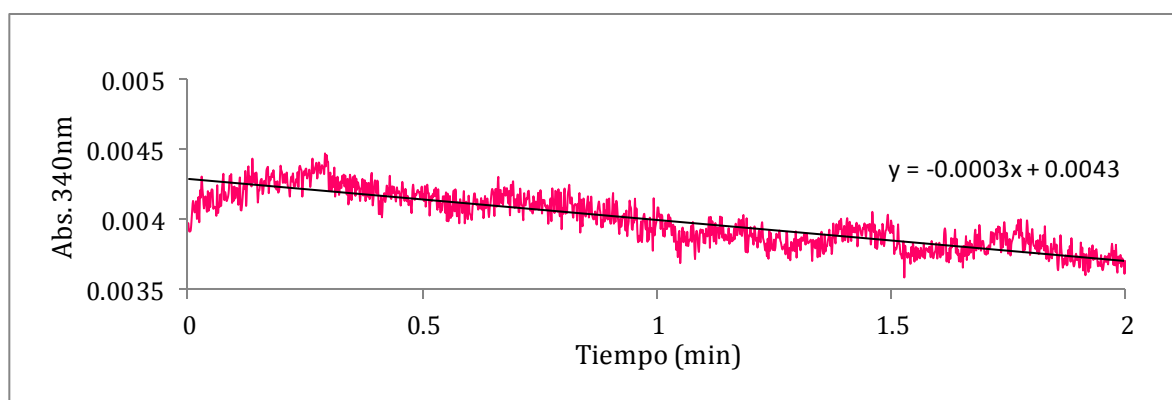


Fig. 7.2. Caída de absorbencia a 340 nm de la mezcla de reacción del blanco.

7.2.2. Actividad enzimática de la AKR1B4 en presencia de DMSO

Con el objetivo de evaluar si la actividad enzimática del extracto crudo de AKR1B4 se afecta por la presencia de DMSO en la mezcla de reacción. La actividad enzimática se midió con diferentes concentraciones de DMSO. Los resultados obtenidos son actividades enzimáticas que van de 1.92 ± 0.2 U/mg de proteína a 0.4% de DMSO a 2.83 ± 0.85 U/mg de proteína a 0.05% de DMSO (tabla 7.1). La actividad enzimática obtenida sin DMSO fue de 2.21 ± 0.4 U/mg de proteína. Con estos resultados se comprueba que el DMSO no afecta la actividad enzimática del extracto crudo de AKR1B4.

Tabla 7.1. Actividad enzimática de la AKR1B4 en presencia de DMSO. Los resultados son promedio, $\pm$ desviación estándar con $n=3$.

DMSO	Actividad Enzimática (U/mg de proteína)
0 %	2.21 $\pm$ 0.40
0.05%	2.83 $\pm$ 0.85
0.1 %	2.7 $\pm$ 0.58
0.2 %	2.44 $\pm$ 0.25
0.4 %	1.92 $\pm$ 0.2
0.6 %	2.09 $\pm$ 0.3
0.8 %	2.35 $\pm$ 0.36
1.0 %	2.32 $\pm$ 0.85

7.3. Ensayo de inhibición de la AKR1B4 *in vitro*

7.3.1 Medición de la actividad inhibitoria por consumo de NADPH

La actividad inhibitoria de los extractos se evaluó al medir la caída de absorbencia por consumo de NADPH. Los resultados que se obtuvieron se pueden observar en la tabla 7.2 ordenados de mayor a menor porcentaje de inhibición. Los extractos fueron divididos en 3 grupos conforme al resultado de inhibición que se obtuvo:

- Los extractos que tuvieron inhibición mayor al 80%, con un total de 12 extractos. De estos, los extractos diclorometánicos de hoja y de flor de *A. jocotepecana* fueron los que tuvieron mayor inhibición con el 96 y 93% respectivamente.
- Los extractos que tuvieron inhibición de 1 a 79%, con un total de 45 extractos. Entre estos encontramos a los extractos metanólico de raíz de *T. lucida* y flor de *C. platyloba* con el 75 y 71% respectivamente.
- Los extractos que no tuvieron inhibición con un total de 42 extractos. Entre estos encontramos los extractos metanólicos de flor y de tallo de *E. lasioneuron* y de flor de *E. aerolare*.

Tabla 7.2. Actividad inhibitoria de extractos vegetales a la AKR1B4. NP: no presentó. Los resultados son promedio, $\pm$ desviación estándar con $n=3$.

Extracto	Órgano	Tipo de extracto	% inhibición
<i>A. jocotepecana</i>	Hoja	Diclorometánico	96 $\pm$ 1.7
<i>A. jocotepecana</i>	Flor	Diclorometánico	93 $\pm$ 4.7
<i>T. lucida</i>	Tallo	Metanólico	92 $\pm$ 3.3
<i>C. coriaria</i>	Albura	Hexánico	91 $\pm$ 3.1
<i>A. jocotepecana</i>	Tallo	Diclorometánico	91 $\pm$ 3.2
<i>A. jocotepecana</i>	Flor	Hexánico	90 $\pm$ 7.8
<i>E. petiolare</i>	Hoja	Diclorometánico	87 $\pm$ 9.8
<i>E. petiolare</i>	Tallo	Hexánico	86 $\pm$ 8.8
<i>E. lasioneuron</i>	Hoja	Diclorometánico	84 $\pm$ 9.6
<i>T. lucida</i>	Raíz	Diclorometánico	83 $\pm$ 11
<i>E. brevipes</i>	Hoja	Diclorometánico	83 $\pm$ 2.6
<i>C. platyloba</i>	Tallo	Metanólico	82 $\pm$ 5.5
<i>T. lucida</i>	Raíz	Metanólico	75 $\pm$ 7.0
<i>C. platyloba</i>	Flor	Metanólico	71 $\pm$ 3.5
<i>E. mairetianum</i>	Tallo	Diclorometánico	68 $\pm$ 3.2
<i>C. coriaria</i>	Corteza	Hexánico	68 $\pm$ 1.1
<i>E. aerolare</i>	Flor	Diclorometánico	67 $\pm$ 1.4
<i>E. glabratum</i>	Tallo	Hexánico	66 $\pm$ 7.1
<i>E. mairetianum</i>	Hoja	Hexánico	65 $\pm$ 9.5
<i>A. jocotepecana</i>	Tallo	Hexánico	64 $\pm$ 1.1
<i>C. coriaria</i>	Duramen	Hexánico	63 $\pm$ 4.3
<i>E. pycnocephalum</i>	Tallo	Diclorometánico	63 $\pm$ 5.0
<i>E. adenophorum</i>	Tallo	Diclorometánico	62 $\pm$ 7.1
<i>T. rosea</i>	Flor	Hexánico	61 $\pm$ 6.0
<i>A. jocotepecana</i>	Raíz	Hexánico	61 $\pm$ 10
<i>E. aerolare</i>	Hoja	Diclorometánico	58 $\pm$ 3.2
<i>E. aerolare</i>	Tallo	Diclorometánico	58 $\pm$ 5.0
<i>C. coriaria</i>	Fruto	Metanólico	58 $\pm$ 6.8
<i>T. rosea</i>	Tallo	Hexánico	56 $\pm$ 17
<i>E. pichinchense</i>	Tallo	Hexánico	55 $\pm$ 10

<i>E. pycnocephalum</i>	Tallo	Hexánico	54 ± 4.9
Extracto	Órgano	Tipo de extracto	% inhibición
<i>E. pichinchense</i>	Flor	Hexánico	53 ± 7.0
<i>E. arsenei</i>	Flor	Metanólico	50 ± 7.5
<i>A. jocotepecana</i>	Tallo	Metanólico	50 ± 9.0
<i>E. glabratum</i>	Tallo	Diclorometánico	50 ± 10
<i>E. petiolare</i>	Hoja	Hexánico	50 ± 3.5
<i>C. pulcherrima</i>	Flor	Hexánico	47 ± 7.0
<i>T. rosea</i>	Hoja	Hexánico	47 ± 10
<i>A. jocotepecana</i>	Hoja	Hexánico	42 ± 7.1
<i>E. pichinchense</i>	Hoja	Hexánico	42 ± 7.1
<i>C. pulcherrima</i>	Flor	Diclorometánico	42 ± 8.0
<i>E. adenophorum</i>	Hoja	Diclorometánico	37 ± 7.1
<i>C. pulcherrima</i>	Tallo	Hexánico	35 ± 10
<i>E. glabratum</i>	Hoja	Hexánico	35 ± 1.4
<i>T. donnell</i>	Tallo	Hexánico	33 ± 9.8
<i>E. pycnocephalum</i>	Hoja	Metanólico	33 ± 7.0
<i>T. lucida</i>	Hoja	Hexánico	28 ± 8.0
<i>T. lucida</i>	Tallo	Hexánico	28 ± 5.2
<i>E. pycnocephalum</i>	Flor	Diclorometánico	28 ± 7.5
<i>E. pichinchense</i>	Flor	Diclorometánico	23 ± 6.8
<i>T. donnell</i>	Corteza	Hexánico	23 ± 9.1
<i>T. lucida</i>	Raíz	Metanólico	22 ± 6.8
<i>E. dolichobasis</i>	Flor	Metanólico	19 ± 1.1
<i>E. aerolare</i>	Tallo	Hexánico	17 ± 10
<i>C. pulcherrima</i>	Fruto	Hexánico	17 ± 8
<i>C. pulcherrima</i>	Hoja	Diclorometánico	17 ± 3.5
<i>C. pulcherrima</i>	Fruto	Diclorometánico	8 ± 10
<i>E. lasioneuron</i>	Flor	Metanólico	NP
<i>E. lasioneuron</i>	Tallo	Metanólico	NP
<i>E. aerolare</i>	Flor	Metanólico	NP
<i>E. aerolare</i>	Hoja	Metanólico	NP
<i>T. lucida</i>	Hoja	Metanólico	NP
<i>E. arsenei</i>	Tallo	Metanólico	NP
<i>E. petiolare</i>	Hoja	Metanólico	NP
<i>E. petiolare</i>	Flor	Metanólico	NP

<i>E. glabratum</i>	Flor	Metanólico	NP
Extracto	Órgano	Tipo de extracto	% inhibición
<i>E. glabratum</i>	Tallo	Metanólico	NP
<i>E. mairetianum</i>	Hoja	Metanólico	NP
<i>E. mairetianum</i>	Flor	Metanólico	NP
<i>E. mairetianum</i>	Tallo	Metanólico	NP
<i>E. pycnocephalum</i>	Tallo	Metanólico	NP
<i>E. adenophorum</i>	Hoja	Metanólico	NP
<i>E. pichichense</i>	Hoja	Metanólico	NP
<i>E. pichichense</i>	Flor	Metanólico	NP
<i>E. cyclocarpum</i>	Duramen	Metanólico	NP
<i>C. platyloba</i>	Hoja	Metanólico	NP
<i>C. platyloba</i>	Fruto	Metanólico	NP
<i>C. coriaria</i>	Flor	Metanólico	NP
<i>C. coriaria</i>	Hoja	Metanólico	NP
<i>E. lasioneuron</i>	Flor	Diclorometánico	NP
<i>E. glabratum</i>	Hoja	Diclorometánico	NP
<i>E. pycnocephalum</i>	Hoja	Diclorometánico	NP
<i>E. pichichense</i>	Hoja	Diclorometánico	NP
<i>E. pichichense</i>	Tallo	Diclorometánico	NP
<i>E. mairetianum</i>	Hoja	Diclorometánico	NP
<i>E. mairetianum</i>	Flor	Diclorometánico	NP
<i>E. petiolare</i>	Flor	Diclorometánico	NP
<i>E. petiolare</i>	Tallo	Diclorometánico	NP
<i>E. lasioneuron</i>	Tallo	Diclorometánico	NP
<i>C. pulcherrima</i>	Tallo	Diclorometánico	NP
<i>E. aerolare</i>	Flor	Hexánico	NP
<i>E. aerolare</i>	Hoja	Hexánico	NP
<i>C. pulcherrima</i>	Hoja	Hexánico	NP
<i>E. lasioneuron</i>	Hoja	Hexánico	NP
<i>T. donnell</i>	Flor	Hexánico	NP
<i>T. rosea</i>	Corteza	Hexánico	NP
<i>T. lucida</i>	Flor	Hexánico	NP
<i>A. jocotepecana</i>	Raíz	Diclorometánico	NP
<i>E. pycnocephalum</i>	Hoja	Hexánico	NP

7.3.2 Medición de la actividad inhibitoria por medición de la concentración de glicerol

Los extractos que obtuvieron inhibición mayor al 80% con el primer método fueron elegidos para medir su actividad inhibitoria con el segundo método en el que se mide la cantidad de producto de la reacción enzimática (glicerol) a una absorbencia de 540 nm. Los resultados obtenidos de inhibición de los diferentes extractos fueron de 64% el mayor y de 58% el menor. Los extracto diclorometánicos de hoja de *A. jocotepecana*, *E. lasioneuron*, *E. petiolare*, de flor y de tallo de *A. jocotepecana* y de raíz de *T. lucida*, los extracto metanólicos de tallo de *C. platyloba* y *T. lucida* y los extractos hexánicos de tallo de *E. petiolare* y de albura de *C. coriaria* presentaron inhibición mayor a 60% (tabla 7.3).

Tabla 7.3. Actividad inhibitoria de extractos vegetales a la AKR1B4, obtenida por medición de glicerol. Los resultados son promedio, $\pm$ desviación estándar con $n=3$

Extracto	Órgano de la planta	Tipo de Extracto	% Inhibición	
			NADPH	Glicerol
<i>A. jocotepecana</i>	Hoja	Diclorometánico	96 $\pm$ 1.7	64 $\pm$ 0.3
<i>A. jocotepecana</i>	Flor	Diclorometánico	93 $\pm$ 4.7	64 $\pm$ 6.4
<i>C. platyloba</i>	Tallo	Metanólico	82 $\pm$ 5.5	64 $\pm$ 0.7
<i>T. lucida</i>	Tallo	Metanólico	92 $\pm$ 9.3	63 $\pm$ 7.8
<i>A. jocotepecana</i>	Tallo	Diclorometánico	91 $\pm$ 3.1	62 $\pm$ 5.6
<i>C. coriaria</i>	Albura	Hexánico	91 $\pm$ 3.2	61 $\pm$ 10
<i>T. lucida</i>	Raíz	Diclorometánico	83 $\pm$ 11	61 $\pm$ 5.6
<i>E. petiolare</i>	Hoja	Diclorometánico	87 $\pm$ 9.8	61 $\pm$ 9.2
<i>E. petiolare</i>	Tallo	Hexánico	86 $\pm$ 8.8	60 $\pm$ 9.9
<i>E. lasioneuron</i>	Hoja	Diclorometánico	84 $\pm$ 9.6	60 $\pm$ 2.1
<i>A. jocotepecana</i>	Flor	Hexánico	90 $\pm$ 7.8	58 $\pm$ 7.1
<i>E. brevipes</i>	Hoja	Diclorometánico	83 $\pm$ 2.6	58 $\pm$ 5.6

7.4. Purificación de compuestos

Los compuestos puros obtenidos de los extractos que tuvieron mayor porcentaje de inhibición fueron identificados y purificados por nuestro grupo de trabajo. Con el fin de ejemplificar la metodología usada para purificar estos compuestos. El extracto diclorometánico de hoja de *E. petiolare* se eligió, debido a que este extracto tuvo una inhibición alta a la AKR1B4 y de éste no se tenía disponible ningún compuesto purificado por nuestro grupo de trabajo para evaluarlo como inhibidor de la AKR1B4.

7.4.1. Cromatografía en columna

El extracto se sometió a cromatografía en columna para obtener los compuestos puros. 200 mg del extracto se adicionaron a una columna cargada con gel de sílice. El extracto se eluyó con diferentes mezclas de hexano:cloroformo en orden ascendente de polaridad. 70 fracciones de ± 10 ml fueron obtenidas de las cuales se evaluaron sus características físicas y conforme a éstas y a la cantidad de compuestos obtenido se eligieron las que fueron evaluadas como inhibidores de la AKR1B4, que fueron la fracción 7, 12, 21, 28, 29, 31, 33, 35, 39, 50 y 53 (tabla 7.4). Los resultados obtenidos al

Tabla 7.4. Fracciones obtenidas del extracto diclorometánico de hoja de *E. petiolare*.

Mezcla de disolventes (ml)	# de fracciones	Fracciones evaluadas como inhibidores de AKR1B4
Hexano 100	1-10	7
Hexano-cloroformo 90:10 v/v	11-21	12 y 21
Hexano-cloroformo 80:20 v/v	22-31	28, 29, 31
Hexano-cloroformo 70:30 v/v	32-36	33, 35
Hexano-cloroformo 50:50 v/v	37-36	39
Hexano-cloroformo 40:60 v/v	44-50	50
Hexano-cloroformo 20:80 v/v	51-57	53
Hexano-cloroformo 10:90 v/v	58-64	-
Cloroformo 100	65-69	-
MeOH 100	70	-

evaluar las fracciones como posibles inhibidores son los presentados en la tabla 7.5. Estos resultados indican inhibición de todas las fracciones a excepción de la fracción 35. Las fracciones que obtuvieron mayor inhibición fueron la fracción 7 y la fracción 21 con un 66% y 59% respectivamente. A estas dos fracciones se les midió su actividad inhibitoria con el segundo método. Los resultados obtenidos fueron una inhibición de 55% para la fracción 7 y 49% para la fracción 21.

Tabla 7.5. Actividad inhibitoria de las fracciones obtenidas del extracto diclorometánico de hoja de *E. petiolare*. NP: no presentó, ND: no determinado. Los resultados son promedio, $\pm$ desviación estándar con $n=3$

Fracción	% inhibición	
	NADPH	Glicerol
7	66 $\pm$ 5.2	55 $\pm$ 4.2
12	37 $\pm$ 5.2	ND
21	59 $\pm$ 5.2	49 $\pm$ 5.0
28	22 $\pm$ 5.2	ND
29	6 $\pm$ 2.6	ND
31	29 $\pm$ 1.2	ND
33	16 $\pm$ 0.2	ND
35	NP	ND
39	25 $\pm$ 3.8	ND
50	40 $\pm$ 0.3	ND
53	29 $\pm$ 2.1	ND

7.4.2. Resonancia magnética nuclear de hidrógeno

Con el fin de dilucidar el o los compuestos presentes en la fracción 7 y la fracción 21 se analizaron las muestras de las fracciones por espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear ^1H (H-RMN). El espectro presentado en la figura 7.3 es para la fracción 7 y el presentado en la figura 7.5 para la fracción 21.

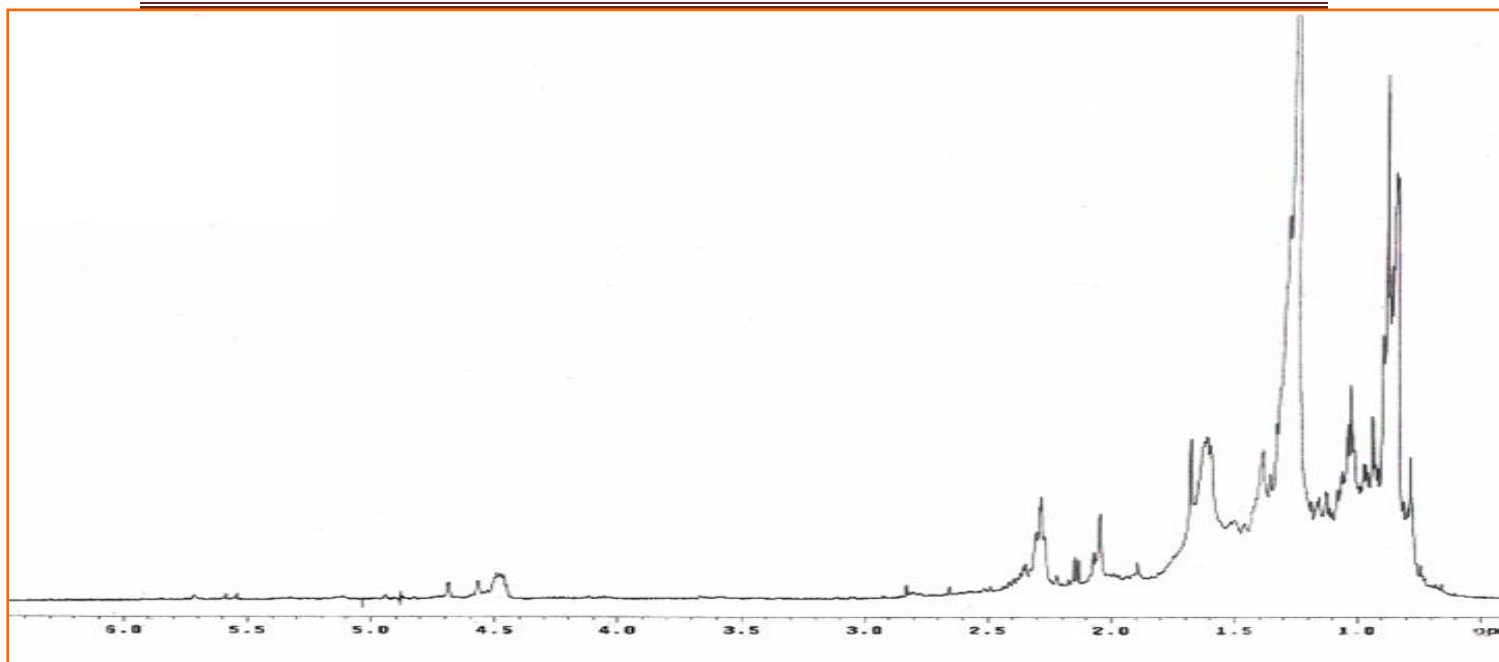


Fig. 7.3. Espectro de RMN de la fracción 7 del extracto diclorometánico de hoja de *E. petiolare*.

En el espectro de la fracción 7, señales a 4.5 ppm corresponden a compuestos derivados de lupeol (fig. 7.4), Además, las señales entre la zona 0 y 2.5 ppm corresponden a señales de compuestos con cadenas alifáticas como los ácidos grasos. En el espectro de la fracción 21 (fig 7.3) se obtuvieron señales sobre 4.5 y 5.2 ppm, correspondientes a una mezcla de triterpenos, también se obtuvieron señales de compuestos con cadenas alifáticas entre 0 y 2.5 ppm.

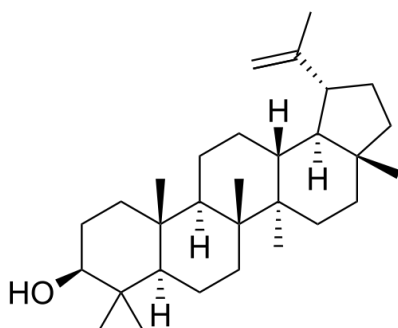


Fig.7.4. Estructura del lupeol.

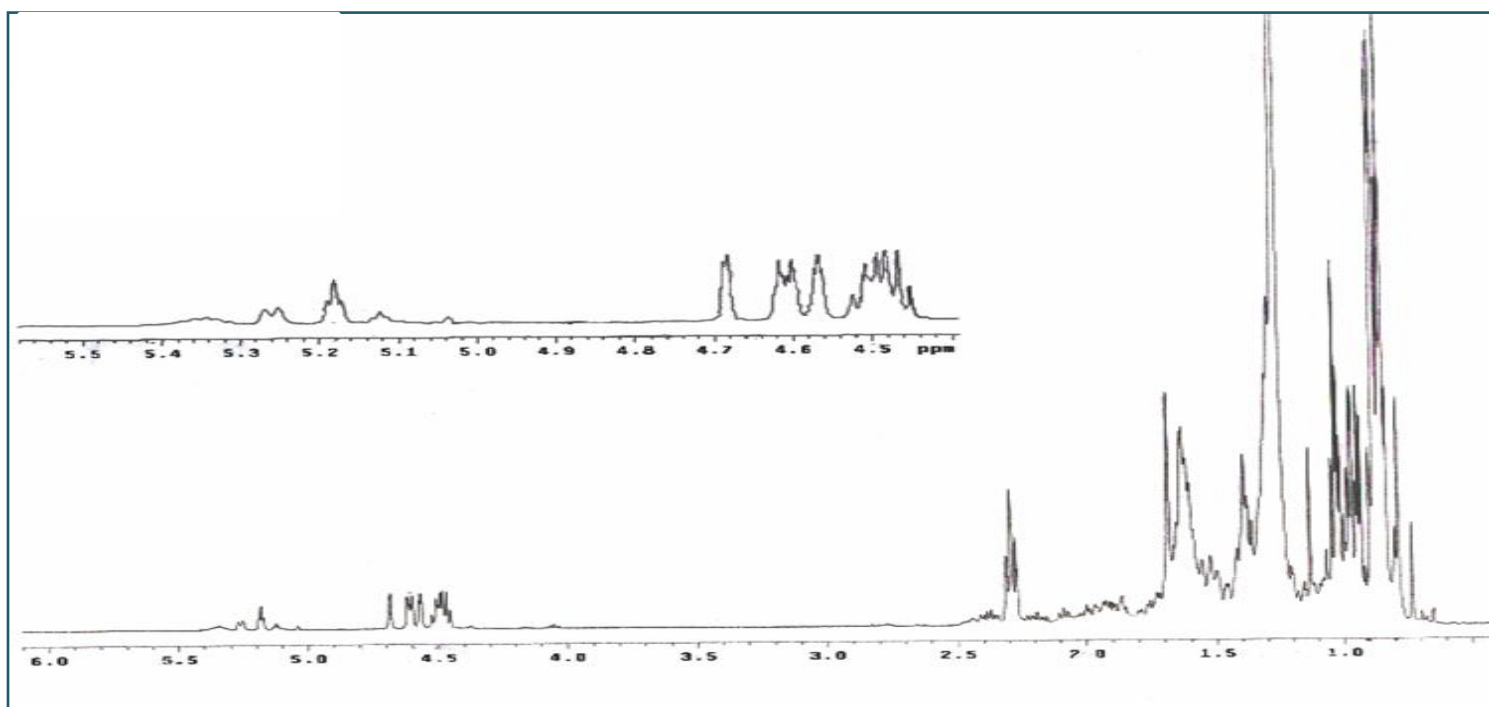


Fig.7.5. Espectro de RMN de la fracción 21 del extracto diclorometánico de hoja de *E. petiolare*.

7.5. Actividad inhibitoria de los compuestos purificados

Quince compuestos o mezclas de compuestos purificados por nuestro grupo de trabajo de los extractos que obtuvieron mayor actividad inhibitoria con los dos métodos fueron evaluados como inhibidores de la AKR1B4. Los compuestos se disolvieron en DMSO al 85% con una concentración final de 10 $\mu\text{g/ml}$. La actividad inhibitoria se midió con el primer método. El ácido 13-*epi*-labdanólico purificado del extracto diclorometánico de flor y de hoja de *A. jocotepecana* con una inhibición del 97%, un derivado de lupeol purificado del extracto diclorometánico de tallo de *E. petiolare* con el 66%, una mezcla de triterpenos purificada del extracto diclorometánico de tallo de *E. petiolare* con el 59%, el ácido-3-oxo- γ -cóstico purificado del extracto metanólico del tallo de *E. glabratum* con el 57%, la encecalina purificada del extracto hexánico de flor de *E. arsenei* con el 54 % y la 5-hidroxi,3,7,4-trimetoxi flavona purificada del extracto diclorometánico de flor y hoja de *A. jocotepecana* con el 53% de inhibición (tabla 7.6) fueron obtenidos como los mejores inhibidores. A estos

extractos se les midió su actividad inhibitoria con el segundo método (concentración de glicerol).

Tabla 7.6. Actividad inhibitoria de los compuestos puros, obtenidos de los extractos que tuvieron una mayor inhibición. Los resultados son promedio, $\pm$ desviación estándar con $n=3$

Planta	Tipo de extracto	Órgano de la planta	Compuestos identificados	% inhibición	
				NADPH	Glicerol
<i>E. arsenei</i>	Hexánico	Flor	Encecalina	54 $\pm$ 0.9	49 $\pm$ 1.3
			Metilripariocromeno A	43 $\pm$ 6.6	ND
			Desmetilencecalina	24 $\pm$ 1.2	ND
<i>E. glabratum</i>	Metanólico	Tallo	Ácido-3-oxo- γ cóstico	57 $\pm$ 0.3	50 $\pm$ 1.4
	Hexánico	Tallo	mezcla de triterpenos	18 $\pm$ 7.9	ND
			derivado de Timol I	24 $\pm$ 13	ND
<i>E. aerolare</i>	Hexánico	Tallo	derivado de Timol 2	37 $\pm$ 0.2	ND
			derivado del ácido 2-OH-eperuico	42 $\pm$ 10	ND
	Diclorometánico	Flor	Lupeol	49 $\pm$ 7.4	ND
<i>A. jocotepecana</i>	Diclorometánico	Flor, hoja	ácido catívico	29 $\pm$ 5.2	33 $\pm$ 3.7
			ácido 13-<i>epi</i>-labdanólico	97 $\pm$ 3.3	80 $\pm$ 0.2
			5-hidroxi, 3,7,4-trimetoxi flavona	53 $\pm$ 0.2	49 $\pm$ 7.3
<i>T. lucida</i>	Diclorometánico	Raíz	2,3-bitiofeno	21 $\pm$ 9.2	ND
<i>E. petiolare</i>	Diclorometánico	Hoja	derivado de lupeol	66 $\pm$ 5.2	55 $\pm$ 4.2
			Mezcla de triterpenos	59 $\pm$ 5.2	49 $\pm$ 5.0

Los mejores resultados obtenidos fueron los del ácido-3-oxo- γ -cóstico con un 50% de inhibición, una mezcla de triterpenos con 55% de inhibición y la mayor actividad inhibitoria la tuvo el ácido 13-*epi*-labdanólico (fig. 7.6) con el 80% de inhibición.

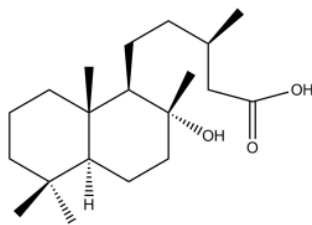


Fig. 7.6. Estructura del ácido 13-*epi*-labdanólico (García Sánchez *et al.*, 2013).

7.6. Determinación del tipo de inhibición del ácido 13-*epi*-labdanólico a la enzima AKR1B4

7.6.1. Inhibición dependiente de concentración

La inhibición del ácido 13-*epi*-labdanólico a la AKR1B4 se midió a diferentes concentraciones del inhibidor con los dos métodos establecidos. Los resultados obtenidos con el primer método fueron inhibición del 44% con la concentración menor de DMSO a 95% con la concentración mayor de DMSO y con el segundo método fueron inhibición de 39% a 80% de inhibición. Estos resultados indican que conforme disminuye la concentración del inhibidor, también disminuye el porcentaje de inhibición (tabla 7.7). Esto indica que la inhibición del ácido 13-*epi*-labdanólico es dependiente de su concentración (fig. 7.7).

Tabla 7.7. Inhibición de la AKR1B4 a diferentes concentraciones del ácido 13-*epi*-labdanólico. Los resultados son promedio, $\pm$ desviación estándar de $n=3$

Ácido 13- <i>epi</i> - labdanólico ($\mu\text{g/ml}$)	% inhibición	
	NADPH	Glicerol
50	95 $\pm$ 3.4	80 $\pm$ 3.0
25	88 $\pm$ 3.0	74 $\pm$ 2.1
12.5	80 $\pm$ 4.9	66 $\pm$ 4.9
6.25	73 $\pm$ 2.2	63 $\pm$ 2.0
3.125	68 $\pm$ 2.9	59 $\pm$ 1.0
1.56	58 $\pm$ 6.4	52 $\pm$ 4.4
0.78	47 $\pm$ 2.3	46 $\pm$ 2.8
0.39	44 $\pm$ 2.0	39 $\pm$ 6.3

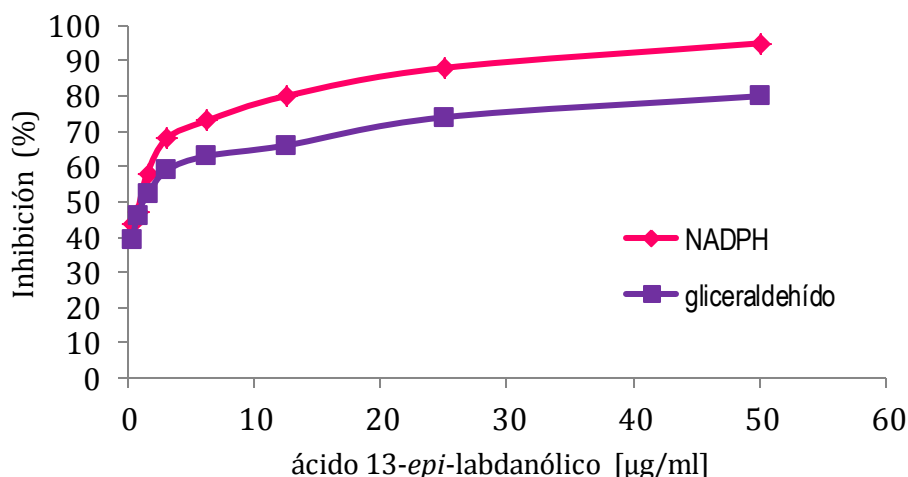


Fig. 7.7. Inhibición de la AKR1B4 por el ácido 13 *epi*-labdanólico. Porcentaje de inhibición a concentraciones decrecientes del ácido 13 *epi*-labdanólico.

7.6.2. Determinación de la concentración inhibitoria media (CI₅₀)

La CI₅₀ se determinó al graficar el porcentaje de inhibición contra el logaritmo de la concentración del ácido 13-*epi*-labdanólico. El valor de CI₅₀ se obtuvo con la ecuación de la línea de regresión, donde “x” es igual a CI₅₀ y “y” es igual al porcentaje de inhibición deseado (50%). Los resultados obtenidos fueron un CI₅₀ de 0.76 µg/ml con el primer método y un CI₅₀ de 1.3 µg/ml con el segundo método (fig. 7.8).

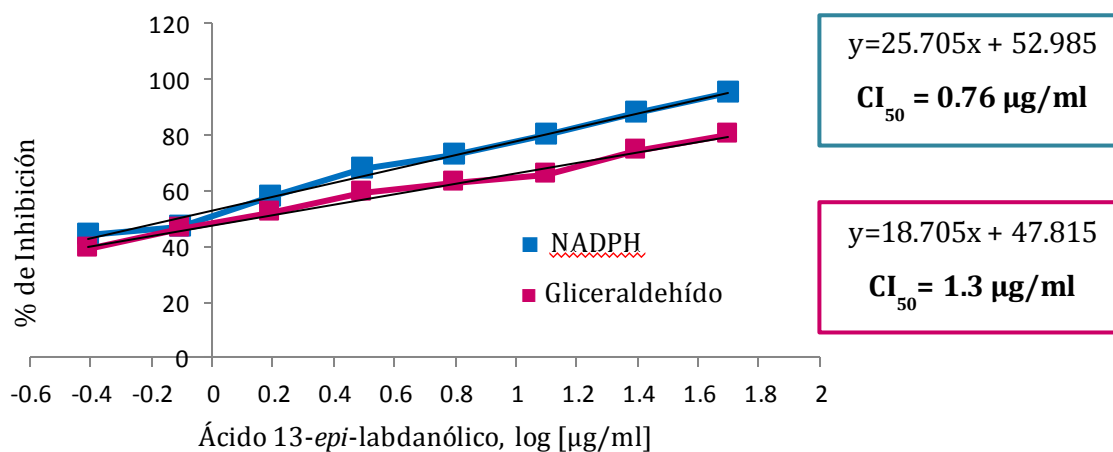


Fig. 7.8. CI₅₀ del ácido 13 *epi*-labdanólico con la AKRIB4.

7.6.3. Tipo de inhibición

Con el fin de determinar el tipo de inhibición del ácido 13-*epi*-labdanólico a la AKR1B4, los parámetros cinéticos de K_m y V_{max} se calcularon con los datos obtenidos de la medición de la actividad enzimática con el segundo método. Los valores de K_m y V_{max} se obtuvieron con un gráfico de Lineweaver-Burk, donde se grafica el inverso de

Tabla 7.8. Actividad enzimática de la AKR1B4 en presencia de diferentes concentraciones de gliceraldehído y de ácido 13-*epi*-labdanólico. Los resultados son promedio, $\pm$ desviación estándar de $n=3$.

Gliceraldehído		Ácido 13- <i>epi</i> -labdanólico					
		0 $\mu\text{g/ml}$		1.56 $\mu\text{g/ml}$		6 $\mu\text{g/ml}$	
[μM]	1/[μM]	V	1/V	V	1/V	V	1/V
0.025	40	0.432	2.31	0.26	3.84	0.199	5.02
0.0125	80	0.184	5.43	0.18	5.55	0.13	7.69
0.00625	160	0.135	7.4	0.1	10	0.085	11.76
0.003125	320	0.0852	11.73	0.055	18.18	0.036	27.77
0.00156	640	0.045	22.22	0.031	32.25	0.021	47.61

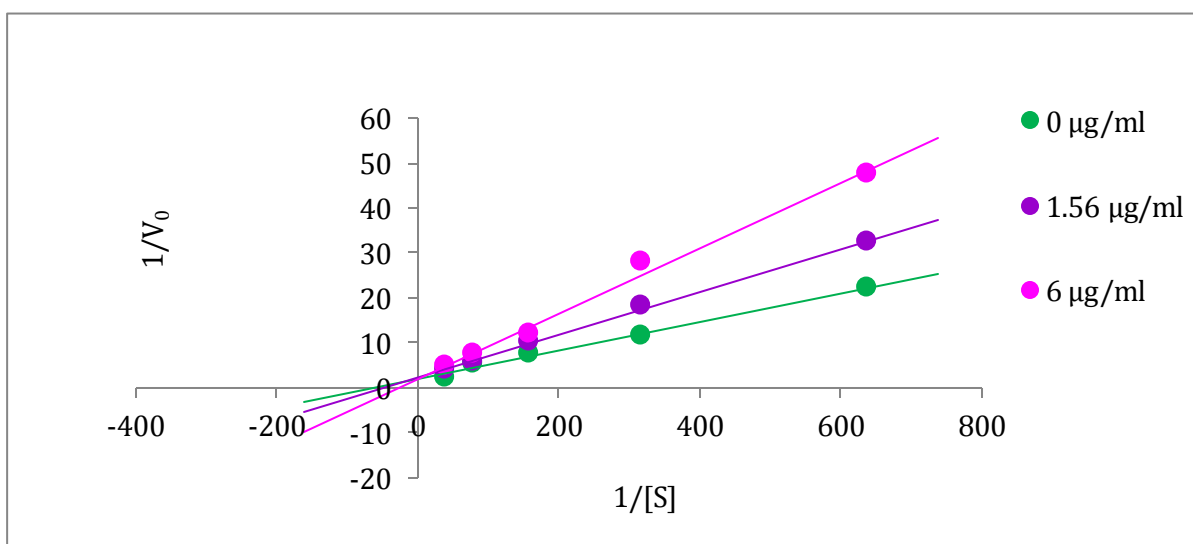


Fig. 7.9. Inhibición tipo competitiva del ácido 13-*epi*-labdanólico. El recíproco de la V_0 de la reacción graficado contra el recíproco de la concentración del gliceraldehído.

la V_0 contra el inverso de la concentración del gliceraldehído con diferentes concentraciones del inhibidor (0.6 y 0.156 $\mu\text{g/ml}$) (tabla 7.8). La V_{max} obtenida fue igual para las dos concentraciones de inhibidor así como para la actividad sin inhibidor, con un valor de 0.5. Las K_m obtenidas fueron: 0.02 en la concentración de 0.156 $\mu\text{g/ml}$, 0.0357 en la concentración de 0.6 $\mu\text{g/ml}$ y 0.016 para la muestra sin inhibidor. Con esto podemos concluir que la inhibición del ácido 13-*epi*-labdanólico a la AKRIB4 es de tipo competitiva (Fig. 7.9).

7.6.4. Constante de inhibición (K_i)

Para obtener el valor de K_i se graficó el valor de la pendiente obtenido de la división entre el K_m y V_{max} , contra la concentración del ácido 13-*epi*-labdanólico, se trazó la línea de tendencia y el valor donde intercepte ésta sobre el eje de las abscisas, será igual a la K_i . El resultado obtenido fue de 4.6 $\mu\text{g/ml}$ (fig. 7.10).

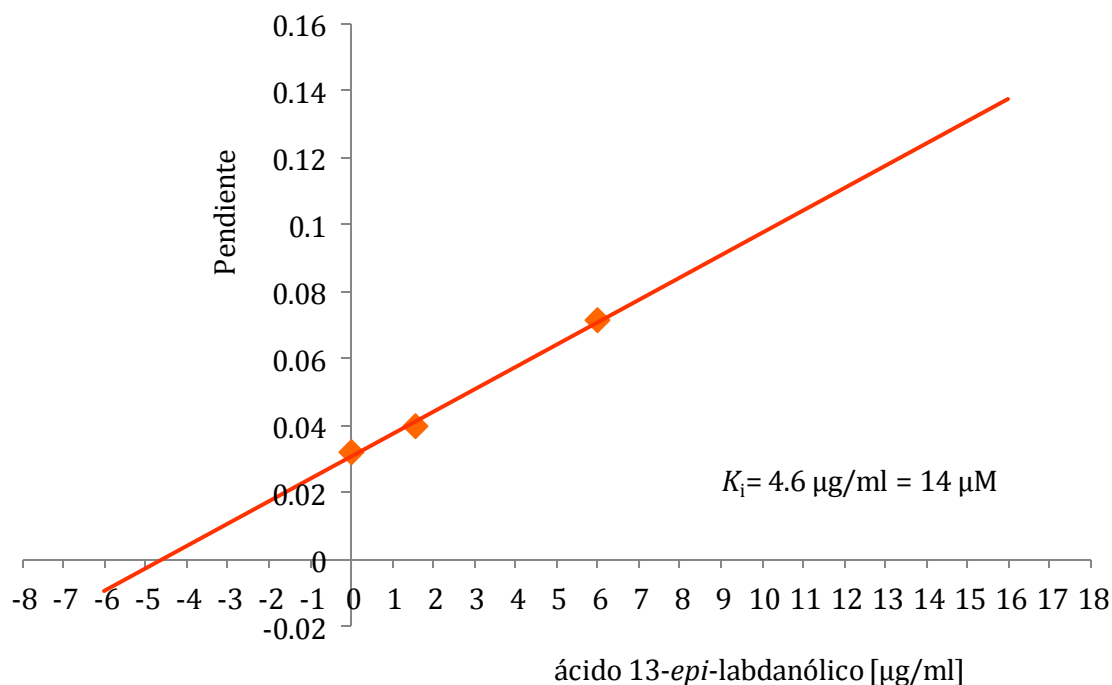
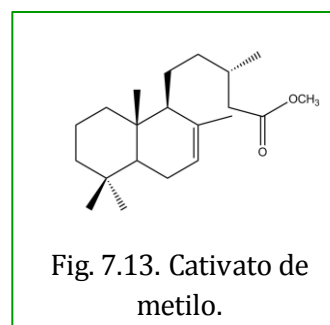
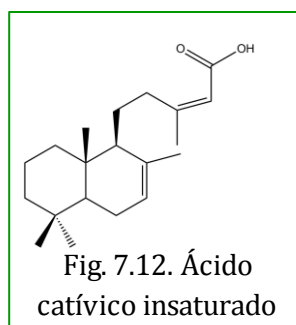


Fig. 7.10. K_i del ácido 13-*epi*-labdanólico con la AKRIB4.

7.6.5. Efecto de labdanos de *A. jocotepecana* en la AKR1B4

Con el fin de evaluar si otros compuestos de tipo labdano obtenidos de *A. jocotepecana* de forma natural o compuestos modificados, presentan actividad inhibitoria a la AKR1B4 como el caso del ácido 13-*epi*-labdanólico. La actividad inhibitoria del ácido catívico insaturado (fig. 7.12) purificado de *A. jocotepecana* se evaluó. La actividad inhibitoria obtenida fue del 79% con el primer método y del 57% con el segundo método (tabla 7.9).



La actividad inhibitoria a la AKR1B4 del ácido catívico isomerizado (fig. 7.11) un compuesto modificado químicamente derivado del ácido catívico también fue evaluada. El compuesto no presentó inhibición con el primer método, por lo que no se realizó la medición con el segundo método (tabla 7.9). Por último la actividad inhibitoria del cativato de metilo (fig. 7.13) otro compuesto modificado químicamente fue evaluada. Éste tampoco tuvo inhibición de la AKR1B4 (tabla 7.9). Los tres compuestos fueron evaluados a una concentración de 50 µg/ml de DMSO.

Tabla 7.9. Efecto de labdanos naturales y modificados de *A. jocotepecana* en la AKR1B4. Los resultados son promedio, $\pm$ desviación estándar de $n=3$. ND=no determinado.

Compuesto puro	Inhibición (%)	
	NADPH	Glicerol
Ácido 13- <i>epi</i> -labdanólico	97 $\pm$ 3.3	80 $\pm$ 0.2
Ácido catívico	29 $\pm$ 5.2	33 $\pm$ 3.7
Ácido catívico insaturado	79 $\pm$ 3.3	57 $\pm$ 8.9
Ácido catívico isomerizado	0	ND
Cativato de metilo	0	ND

7.6.6. Docking molecular

Con el fin de dilucidar la forma de interacción entre el ácido 13-*epi*-labdanólico y la enzima AKR1B1, un docking molecular fue realizado. La estructura del ácido 13-*epi*-labdanólico fue construida en el programa Maestro Elements 1.8. La estructura de la molécula de la AKR1B1 obtenida de cristalografía de rayos X fue capturada de la base de datos Protein Data Bank (PDB), con la clave de acceso 1PWM. El docking molecular fue realizado en el programa Autodock Vina. La estructura de la AKR1B1 fue obtenida unida al NADPH y al fidarestat, un inhibidor competitivo que tiene en su estructura un grupo carboxilo el cual interacciona con el sitio activo de la AKR1B1. El fidarestat fue eliminado en Autodock tools una herramienta de Autodock que es usado para modificar la molécula. De acuerdo con los resultados obtenidos, el ácido 13-*epi*-labdanólico interacciona sobre el sitio activo de la enzima AKR1B1 conocido como sitio aniónico, con una energía de afinidad de -7.6 kcal/mol (Fig. 7.14).

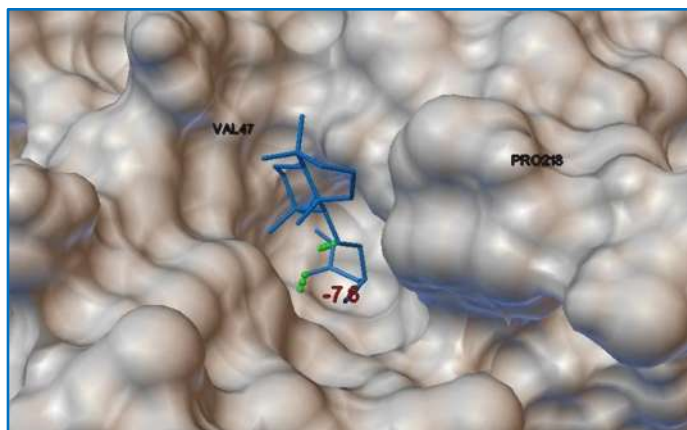


Fig. 7.14. Interacción del ácido 13-*epi*-labdanólico en el sitio activo de la AKR1B1. La estructura en azul corresponde al ácido 13-*epi*-labdanólico el resto a la estructura de la AKR1B1.

El estudio de docking propone dos interacciones por puentes de hidrógeno (fig. 7.15). El primero formado entre el grupo OH del carbono 15 de ácido 13-*epi*-labdanólico y la cadena lateral de la histidina 110 de la AKR1B1. El segundo formado entre el oxígeno del carbono 15 del ácido 13-*epi*-labdanólico y la cadena lateral del triptófano 111 de la AKR1B1. El docking molecular para el fidarestat fue realizado con el fin de comparar

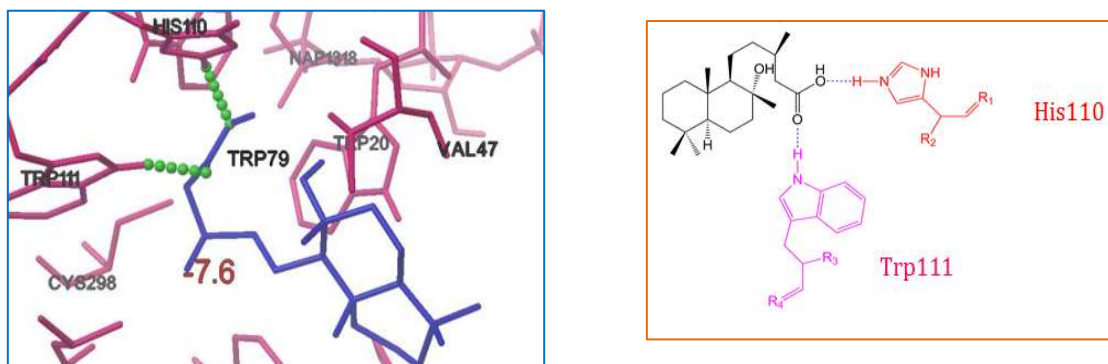


Fig 7.15. Puentes de hidrógeno de la interacción entre el ácido 13-*epi*-labdanólico y la AKR1B1. Puentes de hidrógeno: esferas verdes en la imagen izquierda y línea punteada azul en la imagen derecha.

los resultados obtenidos con el ácido 13-*epi*-labdanólico, así como para comprobar que el docking realizado dio resultados correctos. Los resultados obtenidos indican que el fidarestat interacciona con el sitio activo de la enzima, con una energía de afinidad de -8.3 kcal/mol. En el modelo de interacción obtenido del docking se observan tres puentes de hidrógeno que se forman entre las cadenas laterales del triptófano 111, la histidina 110 y leucina 300 de la AKR1B1, además de un enlace pi que se establece entre la tirosina 48 de la AKR1B1 y el fidarestat (fig 7.16).

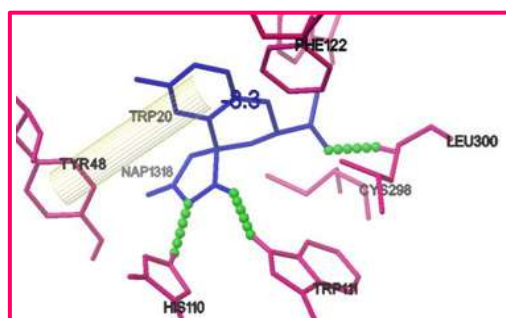


Fig. 7.16. Interacción del fidarestat en el sitio activo de la AKR1B1. La estructura en azul corresponde al fidarestat y las estructuras en rosa corresponden a residuos de la AKR1B1.

El docking molecular para la alrestatina, un inhibidor competitivo, considerado como el más potente hasta ahora del tipo de inhibidores con grupo carboxilo fue realizado.

Los resultados que se obtuvieron, se muestran en la figura 7.17, donde se observa que la interacción se lleva a cabo en el sitio activo de la AKR1B1 con una energía de afinidad de -8.6 kcal/mol. En este caso se observó que la histidina 110 y el triptófano 111 de la AKR1B1 interaccionan con el grupo carboxilo de la alrestatina y forman dos puentes de hidrógeno.

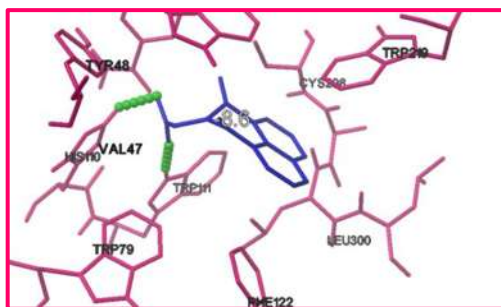


Fig. 7.17. Interacción de la alrestatina en el sitio activo de la AKR1B1. La estructura en azul corresponde al alrestatina y las estructuras en rosa corresponden a residuos de la AKR1B1.

Por último, el docking molecular con el cativato de metilo y con el ácido catívico isomerizado, compuestos que no presentaron actividad inhibitoria a la AKR1B1 fue realizado. Los resultados obtenidos indican que ninguno de éstos presenta interacción con la estructura de la enzima (fig. 7.18), lo cual coincide con los datos experimentales obtenidos.

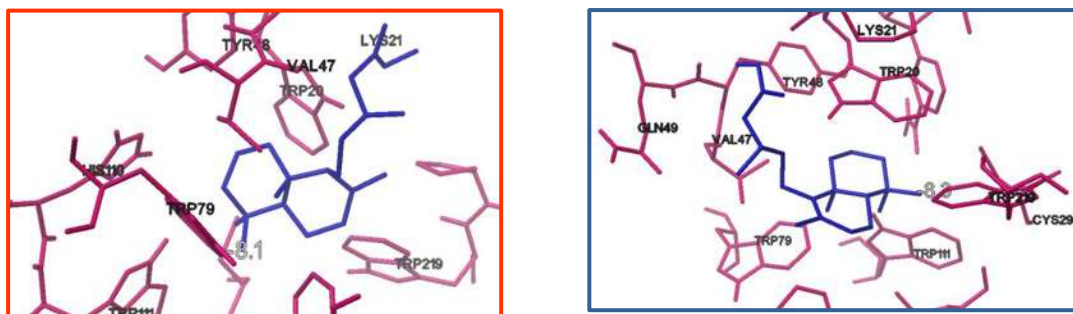


Fig. 7.18. Docking molecular del cativato de metilo (izquierda) y el ácido catívico isomerizado (derecha) con la AKR1B1.

Tabla 7.10. Comparación de resultados del docking molecular. NP= no presentó, ND= no determinado.

Compuesto	Ki (μM)	Interacción
Ácido 13- <i>epi</i> -labdanólico	14	His110, Trp111
Alrestatina	2	His110, Trp111
Fidarestat	ND	His110, Trp111, Leu300,
Cativato de metilo	ND	NP
Ácido catívico isomerizado	ND	NP

7.6.7. Selectividad del ácido 13-*epi*-labdanólico

7.6.7.1 Actividad inhibitoria del ácido 13-*epi*-labdanólico con AKRs de eritrocito de *Homo sapiens*

La demostración de que el ácido 13-*epi*-labdanólico inhibe a la AKR1B4 está hecha. Sin embargo, el siguiente paso razonable de esta investigación es la evaluación del efecto del ácido 13-*epi*-labdanólico en la AKR1B1 (humano). El posible efecto inhibitorio de este compuesto fue evaluado en un extracto crudo de eritrocito de *Homo sapiens*, pues estas células poseen AKR1B4 y otras enzimas similares. La actividad enzimática de AKRs presentes en el eritrocito se midió. Con base en el consumo de NADPH. Una actividad enzimática de 2.15 U/mg de proteína fue obtenida. El ensayo de inhibición se realizó con los dos métodos establecidos a una concentración del inhibidor de 50 μg/ml de DMSO al 85%. Los resultados obtenidos indican que el ácido 13-*epi*-labdanólico inhibe a las AKRs presentes en eritrocito de humano en un 32% con el primer método y un 48% con el segundo (tabla 7.10).

7.6.7.2 Actividad inhibitoria del ácido 13-*epi*-labdanólico con la enzima 20 α-hidroxiesteroide deshidrogenasa recombinante de humano (AKR1C1)

Para evaluar la selectividad de ácido-13-*epi*-labdanólico, su actividad inhibitoria fue medida con la enzima 20 α-hidroxiesteroide Deshidrogenasa (AKR1C1). La enzima fue

obtenida de forma comercial. A ésta se le midió su actividad enzimática, se usó como sustrato al gliceraldehído. Una actividad de 1.9 U/mg de proteína fue obtenida. El ensayo de inhibición se realizó con los dos métodos establecidos a una concentración del inhibidor de 50 µg/ml de DMSO al 85%. De acuerdo a los resultados obtenidos, el ácido 13-*epi*-labdanólico inhibe 29% a la AKR1C1 con el primer método y 17% con el segundo método (tabla 7.10)

7.6.7.3. Actividad enzimática de la AKR1B1

La actividad inhibitoria del ácido 13-*epi*-labdanólico a la enzima pura AKR1B1 recombinante de humano fue medida con el fin de corroborar la inhibición observada en el extracto crudo de eritrocito de humano. La actividad enzimática de la AKR1B1 obtenida fue de 1.08 U/mg de proteína. La inhibición se midió con los dos métodos ya establecidos. Los resultados obtenidos indican que el ácido 13-*epi*-labdanólico inhibe a la AKR1B1 recombinante de humano un 98% con el primer método y 96% con el segundo método (tabla 7.10).

Tabla 7.11. Efecto del ácido 13-*epi*-labdanólico en AKRs. Los resultados son promedio, $\pm$ desviación estándar con n=3.

Enzima	Fuente	Nombre común	% Inhibición	
			NADPH	Glicerol
AKR1B4	<i>Rattus norvegicus</i> (cristalino)	Aldosa reductasa	97 $\pm$ 3.3	80 $\pm$ 0.2
AKR1B1/AKR1A1	<i>Homo sapiens</i> (eritrocito)	Aldosa reductasa/ Aldehído reductasa	32 $\pm$ 2.12	48 $\pm$ 1.76
AKR1C1	<i>Homo sapiens</i> (hígado) expresada en <i>E.coli</i>	20 α -hidroxiesteroide Deshidrogenasa	29 $\pm$ 1.32	17 $\pm$ 4.1
AKR1B1	<i>Homo sapiens</i> (cristalino) expresada en <i>E.coli</i>	Aldosa reductasa	98 $\pm$ 4.0	96 $\pm$ 0.5

8. Discusión

En las últimas décadas, la búsqueda de IAR naturales y sintéticos ha sido un campo muy explorado; sin embargo, en la actualidad no existe ningún tratamiento para prevenir o tratar la formación de catarata u otras complicaciones de la *diabetes mellitus* en México. El epalrestat es el único inhibidor de AKRs comercializado en el mundo y solo se encuentra disponible en China. Este inhibidor está dirigido a tratar complicaciones de la *diabetes mellitus* como la neuropatía y la nefropatía (Alexiou *et al.*, 2009; Changjin Zhu, 2013). Los productos vegetales son una buena propuesta para la búsqueda de IAR. Ya que las plantas han sido utilizadas durante muchos años como una opción para tratar enfermedades, debido a que producen metabolitos secundarios que presentan actividad terapéutica para algunas afecciones en el hombre. En Michoacán se cuenta con una gran biodiversidad en el reino vegetal con aproximadamente 5,000 de las 30,000 especies que existen en todo el país (Ramírez López *et al.*, 2010). También, la medicina tradicional es muy común en nuestro estado. Sin embargo se sabe que solamente el 1% de un total de 3,000 especies registradas como plantas medicinales han sido investigadas a fondo. Por ello, es necesario extender la investigación en este campo (Ramírez López *et al.*, 2010). Plantas nativas de Michoacán de los géneros *Ageratina*, *Caesalpineia*, *Eupatorium*, *Tabebuia* y *Tagetes* se usaron en el presente escrutinio. Un total de 106 extractos obtenidos de estas plantas por nuestro grupo de trabajo fueron evaluados como IAR.

La AKR1B4 fue obtenida de cristalino de rata. Según Jedziniak *et al.*, (1981) *Rattus norvegicus* es una de las especies que expresan genéticamente mayor cantidad de *akr1bs* en sus cristalinos. La actividad enzimática fue medida por dos métodos. El primero basado en el descrito por Kinoshita *et al.*, (1974) y en éste se mide la absorbencia a 340 nm. El segundo método consiste en medir la concentración de producto de la reacción, el glicerol (Clark *et al.*, 2009). Este es realizado para corroborar los resultados obtenidos con el primer método. Un análisis de correlación de Pearson se realizó con el fin de justificar el uso de los dos métodos para medir actividad enzimática. Con este ensayo se determina la relación que hay entre dos

variables. En este caso se usaron como variables a los dos métodos con los que se midió la actividad inhibitoria. La actividad inhibitoria obtenida con el primer método contra la actividad obtenida con el segundo método de los resultados de inhibición con los extractos vegetales fueron graficados. El valor obtenido de R^2 fue de 0.72 el cual indica que hay relación entre las dos variables. Con esto concluimos que los dos métodos para medir actividad inhibitoria son correctos. El escrutinio se realizó con el primer método debido a que este es más práctico al ser un método rápido, confiable y accesible. Los resultados con mayor actividad inhibitoria fueron corroborados con el segundo método. Una vez que se tuvieron los resultados de actividad inhibitoria con los compuestos puros se realizó el mismo análisis de correlación. Los resultados obtenidos fueron mejores. El valor obtenido de R^2 fue de 0.97. La mejoría en el coeficiente de determinación la adjudicamos al hecho de tratarse de compuestos puros que no tienen otros compuestos que generen interferencia en los resultados como en el caso de los extractos vegetales.

Los resultados de actividad inhibitoria obtenidos con el primer método (tabla 7.2) se clasificaron en tres grupos: los que no presentaron inhibición, los que tuvieron inhibición del 1 al 79% y los que tuvieron inhibición mayor al 80%. Como primer criterio de selección nos planteamos elegir a los extractos que tienen una inhibición mayor al 80%, partiendo de que en estos extractos un compuesto mayoritario es el responsable de dicha inhibición, por lo cual al momento de la purificación obtendremos mayor cantidad del compuesto. Doce extractos pasaron nuestro primer criterio de selección. La actividad inhibitoria de la AKR1B4 de estos doce extractos se corroboró con el segundo método (tabla 7.3). Los extractos que presentan una inhibición mayor al 60% con el segundo método son el extracto diclorometánico de hoja de *A. jocotepecana* del cual García Sánchez et al., (2011) identificaron y purificaron como compuestos mayoritarios al ácido catívico y al ácido 13-epi-labdanólico, los extractos diclorometánicos de hoja de *E. lasioneuron*, *E. petiolare*, de flor y de tallo de *A. jocotepecana* y de raíz de *T. lucida* del cual Mejía Barajas et al., (2012) identificaron y purificaron compuestos tipo bitiofeno y cumarinas, los extractos metanólicos de tallo de *C. platyloba* y *T. lucida* y los extractos hexánicos de tallo de *E.*

petiolare y de albura de *C. coriaria* del cual Espinoza Madrigal *et al.*, (2010), identificaron ácidos grasos.

El extracto diclorometánico de hoja de *E. petiolare* se eligió con el fin de ejemplificar la metodología que siguieron los autores antes mencionados para la identificación y purificación de compuestos. Este extracto tuvo una actividad inhibitoria alta y de él no se tienen compuestos identificados y purificados en nuestro grupo de trabajo. Una cromatografía en columna con este extracto fue realizada. Setenta fracciones fueron obtenidas (tabla 7.4). Las fracciones 7, 12, 21, 28, 29, 31, 33, 35, 39, 50 y 53 se eligieron para determinada su actividad inhibitoria, se tomó como criterio de selección su polaridad, se eligieron una o dos fracciones de cada una de las polaridades, sus características físicas fueron evaluadas de forma visual como su color y su forma, también se tomó en cuenta la cantidad de muestra obtenida después de que se evaporó el disolvente. La inhibición de todas las fracciones fue obtenida a excepción de la fracción 35 (tabla 7.5). La actividad inhibitoria de las fracciones que tuvieron inhibición mayor a 50% se corroboró con el segundo método. Con los resultados obtenidos podemos deducir que el efecto inhibidor del extracto diclorometánico de hoja de *E. petiolare* es debido a una participación sinergista de los compuestos presentes en el extracto ya que se obtuvo inhibición de casi todas las fracciones y el porcentaje fue menor que el obtenido con el extracto. En los espectros obtenidos en RMN¹-H en la fracción 7 (fig. 7.3) se aprecian señales características de un lupeol esterificado. La señal en 4.69 ppm corresponde al protón vinílico H-29a, la señal en 4.57 ppm corresponde al H-29b, la señal en 2.38 ppm corresponde al H-19. También se observan señales entre 0.7 y 2.5 ppm correspondientes a señales de compuestos con cadenas alifáticas como los ácidos grasos. En la fracción 21 (fig. 7.5) se observan señales entre 4.2 y 4.7 ppm, también señales en 5.2 ppm. Estas señales se identificaron como una mezcla de triterpenos. En este espectro también se observan las señales de compuestos con cadena alifáticas.

Los compuestos puros obtenidos de los extractos con mayor actividad inhibitoria se evaluaron con el primer método. Los resultados de los compuestos que tuvieron

inhibición mayor al 50% fueron corroborados con el segundo método (tabla 7.6). Los compuestos que tuvieron buena inhibición a la AKR1B4 fueron el ácido 13-*epi*-labdanólico purificado del extracto diclorometánico de flor y hoja de *A. jocotepecana*, un derivado de lupeol obtenido del extracto diclorometánico de tallo de *E. petiolare*, una mezcla de triterpenos obtenido del extracto diclorometánico de tallo de *E. petiolare*, el ácido-3-oxo- γ -cóstico purificado del extracto metanólico del tallo de *E. glabratum*, la encecalina obtenido del extracto hexánico de flor de *E. arsenei* y la 5-hidroxi-3,7,4-trimetoxi flavona obtenido del extracto diclorometánico de flor y hoja de *A. jocotepecana*. El compuesto que obtuvo la mayor inhibición fue el ácido 13-*epi*-labdanólico con el 97% con el primer método y de 80% obtenido con el segundo método por ello elegimos a este para continuar con la investigación. Una vez que determinamos que el ácido 13-*epi*-labdanólico es el mejor inhibidor de la AKR1B4, nos surgió la pregunta de ¿cómo se lleva a cabo la inhibición de la AKR1B4 por el ácido 13-*epi*-labdanólico?, para contestar esta pregunta, determinamos las propiedades de inhibición del ácido 13-*epi*-labdanólico con la enzima AKR1B4.

La actividad inhibitoria del ácido 13-*epi*-labdanólico (tabla 7.7) se evaluó a diferentes concentraciones. Los resultados que obtuvimos nos indican que conforme disminuye la concentración del inhibidor, disminuye la inhibición (fig. 7.7), con lo cual deducimos que la inhibición del ácido 13-*epi*-labdanólico a la AKR1B4 es dependiente de su concentración.

La concentración inhibitoria media (CI_{50}) es la concentración necesaria para inhibir al 50% la actividad de una enzima. Este dato fue usado para comparar la potencia del ácido 13-*epi*-labdanólico con la de otros inhibidores reportados en la literatura. Este valor fue obtenido al realizar un análisis de regresión lineal. En este análisis se grafica el porcentaje de inhibición contra el logaritmo de la concentración del inhibidor. La CI_{50} obtenida con el primer método fue de 0.76 μ g/ml equivalentes a 2,300 nM. La CI_{50} obtenida con el segundo método fue de 1.3 μ g/ml (fig. 7.8). Muthema *et al.*, (2009) reportaron la CI_{50} de la cúrcuma, un inhibidor competitivo de origen natural purificado de la cúrcuma. Esta CI_{50} fue determinada en las mismas condiciones que en

este trabajo. El valor que ellos obtuvieron fue de 10 μM . Con estos datos nosotros demostramos que la potencia inhibitoria del ácido 13-*epi*-labdanólico es mejor comparada con la curcumina. Brownlee *et al.*, (2007) registraron una CI_{50} de 1.5 μM para la alrestatina, un inhibidor sintético tipo competitivo considerado hasta ahora como el mejor de los inhibidores con grupo carboxílico (Zhu, 2013). Nuestros datos obtenidos con el ácido 13-*epi*-labdanólico fueron comparados con los obtenidos de la literatura con la alrestatina. Con esto establecimos que ambos resultados son muy similares. Por ello, posicionamos al ácido 13-*epi*-labdanólico como un buen inhibidor de la actividad enzimática de la AKR1B4 con respecto a su CI_{50} obtenido.

Para conocer el tipo de inhibición del ácido 13-*epi*-labdanólico a la AKR1B4. La K_m (constante de Michaelis-Menten que refleja la afinidad de la enzima por un sustrato) y V_{max} (velocidad que se alcanzaría cuando toda la enzima disponible se encuentra unida al sustrato) del extracto crudo de enzima AKR1B4 fueron calculadas con diferentes concentraciones del sustrato, con y sin inhibidor. El inverso de la V_0 se graficó contra el inverso de la concentración del gliceraldehído (tabla 7.8). El valor de K_m se obtuvo en el eje de las abscisas y el valor de V_{max} se obtuvo en eje de las ordenadas. Un valor de K_m de 0.02 en la concentración de 0.156 $\mu\text{g}/\text{ml}$ del inhibidor, 0.0357 en la concentración de 0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 0.016 para la muestra sin inhibidor fueron obtenidos. El valor obtenido de V_{max} fue de 0.5 para la actividad con y sin inhibidor. Estos resultados nos indican que el V_{max} no cambia a pesar de agregar el inhibidor, sin embargo la K_m aumenta conforme aumenta la concentración del inhibidor (fig. 7.9). Este comportamiento corresponde a una inhibición tipo competitiva, dónde el ácido 13-*epi*-labdanólico compite con el sustrato para unirse al sitio activo de la enzima e inhibir su actividad.

La constante de inhibición (K_i) es la constante de disociación del complejo enzima-inhibidor. Este dato nos indica el potencial del inhibidor, es decir que tan fuerte se une el inhibidor a la enzima. A mayor K_i será más débil la unión, y viceversa a menor K_i será más fuerte la interacción enzima-inhibidor. Este valor en una inhibición tipo competitiva es obtenido al graficar el valor de la pendiente contra la concentración del

ácido 13-*epi*-labdanólico. La presencia del inhibidor afecta la pendiente de la línea de la gráfica de Lineweaver-Burke, que es precisamente el recíproco de V_{max}/K_m . Un incremento en el valor de la pendiente fue obtenido. El valor que se obtuvo para la K_i del ácido 13-*epi*-labdanólico fue de 4.6 $\mu\text{g/ml}$ equivalentes a 14 μM (fig. 7.10). El inhibidor competitivo curcumina tiene una K_i de 40 μM (Muthenna *et al.*, 2009), comparado con los resultados obtenidos en este trabajo, el ácido 13-*epi*-labdanólico presenta mayor fuerza de unión a la AKR1B4 que la curcumina. Si comparamos nuestros resultados con los obtenidos para la alrestatina por Brownlee *et al.*, (2007), quienes obtuvieron una K_i de 2 μM , la fuerza de unión del ácido 13-*epi*-labdanólico a la AKR1B4 es menor que la fuerza de interacción de la alrestatina con la AKR1B4, hay que tomar en cuenta que la alrestatina es un inhibidor sintético el cual fue diseñado específicamente para interaccionar con el sitio activo de la AKR1B4 y producir una inhibición en su actividad enzimática, Además, si destacamos que este inhibidor es considerado hasta ahora el mejor de los IARs con grupo carboxilo, nuestros resultados son muy alentadores y posicionan al ácido 13-*epi*-labdanólico como un buen IAR de origen vegetal y deja como perspectiva la modificación química de su estructura para potencializar los resultados obtenidos en este trabajo.

Al retomar los resultados de inhibición de los compuestos purificados y comparar la actividad inhibitoria del ácido 13-*epi*-labdanólico (97%) con la del ácido catívico (29%) y destacar la similitud entre sus estructuras. La duda nos surgió de si otros compuestos de tipo labdano inhibían la actividad de la AKR1B4. García Sánchez *et al.*, (2012), identificaron otros compuestos de tipo labdano presentes en *Ageratina jocotepecana* aparte del ácido catívico y del ácido 13-*epi*-labdanólico. Uno de estos es el ácido catívico insaturado. Éste difiere en su estructura con el ácido catívico por tener una insaturación entre los carbonos 13 y 14. En nuestro grupo de investigación, se modificaron algunas de estas moléculas para probar sus actividades antibióticas. De estas modificaciones obtuvieron al ácido catívico isomerizado el cual tiene insaturación entre los carbonos 9 y 8 y al catívato de metilo el cual tiene un grupo metilo en el OH del carbono 15. Estos tres compuestos fueron evaluados como inhibidores de la AKR1B4. Los resultados obtenidos (tabla 7.9), para el ácido catívico

insaturado fueron una inhibición del 79% con el primer método y del 57% con el segundo método. El ácido catívico isomerizado y el cativato de metilo no tuvieron inhibición con el primer método por lo que no se realizó la determinación con el segundo método. De acuerdo a los resultados y a la comparación entre las estructuras químicas de estos compuestos, podemos deducir que la posición de las insaturaciones en su estructura, así como, la presencia de grupos OH son importantes para que tengan actividad inhibitoria contra la AKR1B4. La estructura química del ácido catívico comparada con la estructura del ácido 13-*epi*-labdanólico indica que el ácido catívico tiene una insaturación entre los carbonos 7 y 8, lo cual le brinda mayor rigidez, además no tiene el grupo OH sobre el carbono 8. Estas diferencias son las responsables de que el ácido 13-*epi*-labdanólico presente mayor actividad inhibitoria a la AKR1B4 que el ácido catívico. En el ácido catívico insaturado, la saturación entre los carbonos 13 y 14 produce un aumento en su actividad inhibitoria comparado con el ácido catívico. En el cativato de metilo el grupo metilo unido al grupo OH del carbono 15 produce que no presente actividad inhibitoria a la AKR1B4.

El “*docking molecular*” es una técnica de predicción *in silico* que fue utilizada para dilucidar la forma en que ocurre la interacción del ácido 13-*epi*-labdanólico con la AKR1B1. Esta calcula las interacciones posibles entre una molécula y un ligando, con la finalidad de producir complejos estables. Muchos programas para realizar *docking molecular* existen tanto comerciales como de uso gratuito. En este trabajo se usó el programa Autodock Vina. Éste se encuentra libre en la red, es fácil de utilizar y el procedimiento por el cual se lleva a cabo el docking es rápido. La estructura de la AKR1B1 fue obtenida de la base de datos PDB, en la cual la AKR1B1 se encuentra unida al NADPH y al inhibidor competitivo fidarestat. El fidarestat fue eliminado de la molécula. Posteriormente este fue sometido a *docking molecular* con la misma estructura de la AKR1B1 en Autodock Vina, con el fin de comprobar que las coordenadas del sitio activo eran las correctas. Los resultados obtenidos indican la interacción del fidarestat a través de puentes de hidrógeno con las cadenas laterales de la histidina 110, triptófano 111 y leucina 300, así como un enlace *pi* con la tirosina 48 (fig. 7.16). Estos cuatro aminoácidos se encuentran en el sitio activo de la AKR1B1.

Estos datos coinciden con los obtenidos en cristalografía de rayos X por Kabbani *et al.*, (2004). Ellos obtuvieron que la interacción se lleva a cabo con las cadenas laterales del triptófano 111, tirosina 48 y leucina 300 a través de puentes de hidrógeno y una interacción hidrofóbica con el triptófano 20. Con esto podemos corroborar que la metodología a usar para el *docking molecular* nos da resultados correctos. Posteriormente, el *docking molecular* del ácido 13-*epi*-labdanólico con la AKR1B1 se realizó. Los resultados obtenidos indican que la interacción se lleva a cabo sobre el sitio activo de la enzima, conocido como sitio aniónico (fig 7.14), entre el grupo OH del carbono 15 de ácido 13-*epi*-labdanólico y la cadena lateral de la histidina 110 de la AKR1B1 y entre el oxígeno del carbono 15 del ácido 13-*epi*-labdanólico y la cadena lateral del triptófano 111 de la AKR1B1 (fig. 7.15) con dos puentes de hidrógeno. Estos resultados corroboran que la inhibición es de tipo competitiva. El *docking molecular* para la alrestatina y para el cativato de metilo y el ácido catívico isomerizado fueron realizados con el fin de comparar los resultados obtenidos. El resultado obtenido del *docking molecular* de la alrestatina con la AKR1B1 fue el siguiente: interacción con puentes de hidrógeno entre el grupo carboxilo de la alrestatina con la histidina 110 y el triptófano 111 del sitio activo de la AKR1B1 (fig. 7.17) Estos resultados comparados con los obtenidos con el ácido 13-*epi*-labdanólico nos indican que la interacción de estos dos compuestos con la AKR1B1 se lleva a cabo de forma muy similar a excepción de la energía de afinidad obtenida, la cual está dada por la energía interna de la molécula y la fuerza de interacción del complejo. Este dato fue más favorable para la alrestatina con un valor de -8.6 kcal/mol, que para el ácido 13-*epi*-labdanólico con un valor de -7.6 kcal/mol. Estos datos coinciden con el orden de los valores de K_i antes mencionados donde la alrestatina (2 μ M) tiene un K_i mejor que el ácido 13-*epi*-labdanólico (14 μ M). Los resultados obtenidos con el cativato de metilo y el ácido catívico isomerizado nos indican que estos no tienen interacción con la AKR1B1 (fig. 7.18), lo cual coincide con los datos obtenidos de forma experimental, pues estos compuestos no presentan inhibición a la AKR1B1.

La validez de un inhibidor enzimático medicinal es determinada en gran parte por su especificidad que es la incapacidad de unirse a otras enzimas. Una especificidad alta

asegura que el inhibidor va a tener pocos efectos secundarios o baja toxicidad. La especificidad del ácido 13-*epi*-labdanólico con la AKR1B4 se evaluó al medir la actividad inhibitoria del ácido 13-*epi*-labdanólico hacia la enzima 20 α -hidroxiesteroide Deshidrogenasa (AKR1C1). Esta enzima pertenece a la superfamilia de las AKRs, se expresa principalmente en pulmón e hígado (Quinkler *et al.*, 2003) y sus funciones son vitales, pues participa en controlar la concentración celular de progesterona reduciéndola a un compuesto inactivo, la 20 α -hidroxiprogesterona en una reacción dependiente de NADPH. Esta enzima tiene una gran función en el proceso de desintoxicación en la célula. Esta tiene la capacidad de reducir aldehídos tóxicos a compuestos inactivos, tiene una alta especificidad hacia el 4-hidroxi-3-nonenal un aldehído citotóxico derivado de la peroxidación de lípidos (Burczynski *et al.*, 2001). Los resultados obtenidos fueron una inhibición del 29% con el primer método y del 17% con el segundo método (tabla 7.10). Al comparar estos resultados con los obtenidos con la AKR1B4 con un 97% de inhibición con el primer método y el 80% con el segundo, podemos deducir que el ácido 13-*epi*-labdanólico tiene mayor selectividad a la AKR1B4 que a la AKR1C1.

Posterior a la realización de las propiedades de inhibición del ácido 13-*epi*-labdanólico a la AKR1B4, con el fin de reforzar nuestros resultados, nos planteamos la siguiente pregunta: ¿inhibe el ácido 13-*epi*-labdanólico a la AKR1B1?, para contestar esta cuestión medimos la actividad inhibitoria del ácido 13-*epi*-labdanólico en un extracto crudo de enzima, obtenido de eritrocito de humano. Das y Srivastava en 1985 demostraron que en eritrocito de humano se encuentra la enzima AKR1B1 así como la enzima Aldehído Reductasa (AKR1A1). La AKR1A1 es una enzima perteneciente a la superfamilia de las AKRs, esta también reduce al gliceraldehído a glicerol en una reacción dependiente de NADPH, por lo que al medir actividad de AKRs en eritrocito humano obtendríamos la actividad de ambas enzimas. El ensayo se realizó en las mismas condiciones en las que se midió la actividad inhibitoria del ácido 13-*epi*-labdanólico a la AKR1B4. Los resultados que obtuvimos indican que el ácido 13-*epi*-labdanólico inhibe a las AKRs presentes en eritrocito de humano en un 32% con el primer método y un 48% con el segundo método (tabla 7.10). Estos resultados no son

tan favorables como los obtenidos con la AKR1B4, pero al estar obteniendo una inhibición cercana al 50%, podemos deducir que el ácido 13-*epi*-labdanólico si inhibe a las AKRs presentes en eritrocito de humano. Con el fin de corroborar la inhibición observada en el extracto crudo de eritrocito de humano y para comprobar que el ácido 13-*epi*-labdanólico inhibe la AKR1B1 de humano la actividad inhibitoria del ácido 13-*epi*-labdanólico a la enzima pura AKR1B1 recombinante de humano fue medida. Los resultados obtenidos indican que el ácido 13-*epi*-labdanólico inhibe a la AKR1B1 un 93% con el primer método y 96% con el segundo método. Con esto se concluye que el ácido 13-*epi*-labdanólico inhibe a la AKR1B1 de humano. Incluso este tiene mayor porcentaje de inhibición a la AKR1B1 comparando con la AKR1B4.

9. Conclusión

Los extractos de plantas nativas de Michoacán evaluados en este trabajo contienen metabolitos secundarios que actúan como inhibidores de la enzima AKR1B. El ácido 13-*epi*-labdanólico obtenido del tallo de *Ageratina jocotepecana* causa mayor inhibición comparado con el resto de los metabolitos secundarios y se propone como una molécula modelo para su modificación química y potenciar su actividad.

10. Literatura citada

- Alexiou P, Pegklidou K, Chatzopoulou M, Nicolaou I, Vassilis J, (2009), Aldose reductase enzyme and its implication to major health problems of the 21 century, *Current Medicinal Chemistry*, 16, 734-752.
- Argueta A, Cano L, Rodarte M, Tomo 1-3. Instituto Nacional Indigenista En: Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana, México D.F. 1994. pp. 1786
- Barski OA, Tippparaju SM, Bhatnagar A, (2008), The aldo-keto reductase superfamily and its role in drug metabolism and detoxification, *Drug Metabolism Reviews*, 40(4), 553-624.
- Ben CB Ko, Barbara Ruepp, Kurt M Bohren, Kenneth H Gabbay, (1997), Identification and characterization of multiple osmotic response sequence in the human aldose reductase gene, *The Journal of Biological Chemistry*, 272(26), 16431-16437.
- Bhanuprakash RG, Satyanarayana A, Balakrishna N, Ayyagari R, Padma M, Viswanath K, Mark PJ, (2008), Erythrocyte aldose reductase activity and sorbitol levels in diabetic retinopathy, *Molecular Vision*, 14, 593-601.
- Browlee M, (2001), Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications, *Nature*, 414, 813-818.
- Brownlee M, (2006), The pathobiology of diabetic complications a unifying mechanism, *Diabetes*, 54, 1615-1625.

- Burczynski ME, Sridhar GR, Palackal NT, Penning TM, (2001), The reactive oxygen species- and Michael acceptor-inducible human aldo-keto reductase AKR1C1 reduces the α,β -unsaturated aldehyde 4-hydroxy-2-nonenal to 1,4-dihydroxy-2-nonene, *The Journal of Biological Chemistry*, 276 (4), 2890–2897.
- Clark AM, Sousa KM, Jennings C, MacDougald OA, Kennedy RT, (2009), Continuous-flow enzyme assay on a microfluidic chip for monitoring glycerol secretion from cultured adipocytes *Analytical Chemistry*, 81(6), 2350–2356.
- Constantino L, Rastelli G, Vescovini K, Cignarella G, Vianello P, Del Corso A, Cappiello M, Mura U, Barlocco D, (1996), Synthesis, activity, and molecular modeling of a new series of tricyclic pyridazinones as selective Aldose Reductase inhibitors, *Journal of Medicinal Chemistry*, 39, 4396-4405.
- Creager MA, Lüscher TF, Cosentino F, Beckman JA, (2003), Diabetes and Vascular Disease Pathophysiology, Clinical Consequences, and Medical Therapy: Part I, *Circulation*, 108, 1527-1532.
- Damian Badillo LM, Salgado Garciglia R, Martinez Muños RE, Martínez Pacheco MM, (2008), Antigungal properties of some mexican medicinal plants, *The Open Natural Products Journal*, 1, 27-33.
- Das B and Srivastava SK, (1985), Purification and properties of Aldose Reductase and Aldehyde Reductase II from human erythrocyte, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 238 (2), 670-679.

- De la Fuente JA and Manzanaro S, (2003) Aldose reductase inhibitors from natural sources, *Natural Product Reports*, 20, 243–251.
- Díaz Flores M, Balza Gutman LA, Ibáñez Hernández A, Pascoe Lira D, Guzmán Greenfel AM, Kumate Rodríguez J, (2004), Aspectos moleculares del daño tisular inducido por la hiperglucemia crónica, *Gac Med Méx*, 140 (4), 437-447.
- Dixit BL, Balendiran GK, Watowich SJ, Srivastava S, Ramana KV, Petrashi JM, Bhatnagar A, Srivastava SK, (2000), Kinetic and structural characterization of the glutathione-binding site of Aldose Reductase, *The Journal of Biological Chemistry*, 275 (28), 21587–21595.
- El-Kabbania O, Dhagata U, Harab A, (2011), Inhibitors of human 20-hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C1), *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 125, 105–111.
- Esquivel Gutiérrez ER, Noriega Cisneros R, Bello González MA, Saavedra-Molina A, Salgado Garciglia R, (2012), Plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana con propiedades antidiabéticas y antihipertensivas, *Ciencias Biologicas Agropecuarias*, 14(1), 45-52.
- Ferro Bartolo EA, Degen de Arrúa R, (2011), Actividad inhibitoria de extractos de plantas medicinales de Paraguay sobre Aldosa Reductasa de cristalino de rata, *Rojasiana*, 10(2), 31-42.

- Fowler MJ, (2008), Microvascular and macrovascular complications of diabetes, clinical diabetes, 26(2), 77-82
- French PL, Rodríguez CMM, Bisset LJA, Leyva RY, Gutiérrez BG, Fuentes LI, (2013), Increased activity of cytochrome P450 monooxygenase enzymes in reference insecticide-resistant *Aedes aegypti* strains from Cuba, Revista Cubana de Medicina Tropical, 65(3), 328-338
- Gambra E, Ortiz S, Merino PP, Gora M, Wojtkowski M, Marcos S, (2013), Static and dynamic crystalline lens accommodation evaluated using quantitative 3-DOCT, Biomedical Optics Express, 4(9), 1595-1609.
- García Sánchez E, Ramirez Lopez CB, Rosa Elva del Río, Martinez Pacheco MM, (2011), A revisión of *Eupatorium* (Compositae : *Eupatorieae*) from Michoacan, Oyton, 80, 139-146.
- García Sánchez E, Ramírez López CB, Talavera Alemán A, León Hernández A, Martínez Muñoz RE, Martínez Pacheco MM, Gómez Hurtado MA, Cerda García-Rojas CM, Joseph Nathan P, Del Río RE, (2014), Absolute configuration of (13R)- and (13S) labdane diterpenes coexisting in *Ageratina jocotepecana*, Journal of Natural Products, 77, 1005-1012.
- González F L, Castello PR, (2000), La glucosilación no enzimática de proteínas. Mecanismo y papel de la reacción en la diabetes y el envejecimiento, Ciencia al día internacional, 3 (2), 1-17.

- González RG, Barnett P, Aguato J, Cheng HM, Chylack LT, (1964), Direct measurement of polyol pathway activity in the ocular lens, *Diabetes*, 33, 196-199.
- Goodarzi MT, Zal F, Malakooti M, Safari MR, Sadeghian S, (2006), Inhibitory activity of flavonoids on the lens aldose reductase of healthy and diabetic rats, *Acta Medica Iranica*, 44, 41-44.
- Gordaliza M, (2012), Synthetic strategies to terpene quinones/hydroquinones, *Marina Drugs*, 10, 358-402.
- Gutierrez OF, Failla ML, (2013), Biological activities and bioavailability of mangosteen xanthonones: a critical review of the current evidence, *Nutrients*, 5, 3163-3183.
- Hayman S, Kinoshita J, (1965), Isolation and properties of lens Aldose Reductase, *The Journal of Biological Chemistry*, 240 (2), 877-882.
- Heinrich M, Ankli A, Frei B, Weimann C, Sticher O, (1998), Medicinal plants in Mexico: healers' consensus and cultural importance, *Soc Sci Med*, 47(11), 1859-1871.
- Hyeon Kim T, Kyu Kim J, Kang YH, Lee JY, Kang J, Sung Lim S, (2013), Aldose Reductase Inhibitory Activity of Compounds from *Zea mays* L. *BioMed Research International*, 2013, 1-8.
- Iwata N, Inazu N, Satoh T, (1990), The purification and properties of Aldose Reductase from rat ovary, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 228(1), 70-77.

Jaspan JB, Herold K, Bartkus C, (1985), Effects of sorbinil therapy in diabetic patients with painful peripheral neuropathy and autonomic neuropathy, *The American Journal of Medicine*, 79(5, Supplement 1), 24-37.

Jedziniak JA, Chylack, LT, Cheng HM, Kathryn M, Kalustian AA, Tung WH, (1981), The sorbitol pathway in the human lens: aldose reductase and polyol dehydrogenase, *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 20 (3), 314-326.

Kathlee Head ND, (2001), Natural therapies for ocular disorders part two: cataracts and glaucoma, *Alternative Medicine Review*, 6(2), 141-161.

Ko BCB, Ruepp B, Bohren KM, Gabbay KH, Chung SSM, (1997), Identification and characterization of multiple osmotic response sequences in the human Aldose Reductase gene, *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 16431-16437.

Kolm-Litty V, Sauer U, Nerlich A, Lehmann R, Schleiche ED, (1998), High glucose-induced transforming growth factor beta 1 production is mediated by the hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells, *The Journal of Clinical Investigatio*, 101, 160-169.

Kumar S, Pandey AK, (2013), Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview, *The ScientificWorld Journal*, 2013, 1-16.

Lee YW, Chung SK, Chung Stephen SM, (1995), Demonstration that polyol accumulation is responsible for diabetic cataract by the use of transgenic mice

- expressing the aldose reductase gene in the lens, *Medical Sciences*, 92, 2780-2784.
- Lee YW, Chung SSM, (1999), Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract, *The FASEB Journal*, 13, 23-29.
- Malone JI, Knox G, Benford S, Tedesco TA, 1980, Red cell sorbitol an indicator of diabetic control, *Diabetes*, 20, 861-864.
- Morales Lopez ME, Martínez Muñoz RE, Ron Echeverría O, Rubio Morales NA, Martínez Pacheco MM, Salgado Garciglia R, (2007), Effect of bornyl-o-deca-2E,6Z,8E-trienate on growth of several pathogens, *Pharmacologyonline*, 3, 96-103.
- Muthenna P, Suryanarayana P, Gunda SK, Petrash JM, Bhanuprakash RG, (2009), Inhibition of aldose reductase by dietary antioxidant curcumin: Mechanism of inhibition, specificity and significance, *FEBS letters*, 583, 3637-3642.
- Ortiz S, Pérez MP, Gamba E, de Castro A, and Marcos S, (2012), In vivo human crystalline lens topography, *Biomedical Optics Express*, 3(10), 2471-2488.
- Pastel E, Pointud JC, Volat F, Martinez A, Martinez AML, (2012), Aldo-keto reductases 1B in endocrinology and metabolism, *Frontiers in Pharmacology*, 3, 1-15.
- Quinkler, Bumke-Vogt, Meyer, Bahr, Oelkers, Diederich, (2003), The human kidney is a progesterone-metabolizing and androgen-producing organ, *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 88 (6), 2803-2809.

- Ramírez López CB, García Sánchez E, León Hernández A, Raya González D, Rosa Elva del Rio, Flores García A, Martínez Pacheco MM, (2010), Phytochemical perspective of *Eupatorium spp.*, Pharmacologyonline, 3, 682-890.
- Rim THT, Kim M, KimWC, Kim TI, Kim EK, (2014), Cataract subtype risk factors identified from the Korea National Health and Nutrition Examination survey 2008–2010, BMC Ophthalmology, 14(4), 1-15.
- Rondeau JM, Tete Favier F, Podjarny A, Reymann J, Barth P, Biellmann JF, Moras D, (1992), Novel NADPH-binding domain revealed by the crystal structure of aldose reductase, Nature, 355, 469-472.
- Saez, F, Frenete G, Sullivan R, (2003), Epididymosomes and prostasomes: Their roles in posttesticular maturation of the sperm cells, Journal of Andrology, 24, 149-154.
- Spycher S, Tabataba-Vakili S, O'Donnell VB, Palomba L, Azzi A, (1996), 4-Hydroxy-2,3-trans-nonenal Induces Transcription and Expression of Aldose Reductase, Biochemical and Biophysical Research Communications, 226, 512–516.
- Srivastava SK, Ansari NH, Hair GA, Jaspan J, Rao MB, Das B, (1986), Hyperglycemia-induced activation of human erythrocyte aldose reductase and alterations in kinetic properties, Biochimica et Biophysica Acta, 870, 302-311.

Srivastava SK, Ramana KV, Bhatnagar A, (2005), Role of aldose reductase and oxidative damage in diabetes and the consequent potential for therapeutic options, *Endocrine Reviews*, 26(3), 380-392.

Suryanarayana P, Kumar PA, Saraswat M, Petrash JM, Reddy GB, (2004). Inhibition of aldose reductase by tannoid principles of *Embllica officinalis*: Implications for the prevention of sugar cataract, *Molecular Vision*, 10, 148.154.

Suryanarayana P, Saraswat M, Mrudula T, Krishna TP, Krishnaswamy K, Reddy GB, (2005), Curcumin and turmeric delay streptozotocin-induced diabetic cataract in rats, *Investigative ophthalmology & visual science*, 46, 2092-2099.

Tang WH, Martin K.A, Hwa J, (2012), Aldose reductase, oxidative stress, and diabetic mellitus, *Frontiers in pharmacology*, 3, 1-5.

Tomlinson DR , Robinson P, Compton AM, Keen P, (1989), Essential fatty acid treatment - effects on nerve conduction, polyol pathway and axonal transport in streptozotocin diabetic rats, 32, 655-659.

Varma SD, Kinoshita JH, (1974), The absence of cataracts in mice with congenital hyperglycemia, *Experimental Eye Research*, 19, 577-582.

Venugopala KN, Rashmi V, Odhav B, (2013), Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity, *BioMed Research International*, 2013, 1-14.

Vincent TE, Mendiratta S, May JM, (1999), Inhibition of aldose reductase in human erythrocytes by vitamin C, *Diabetes Research and Clinical Practice*, 43, 1-8.

Wilson DK, Bohren KM, Gabbay KH, Quijcho FA, (1992), An unlikely sugar substrate site in the 1.65 Å structure of the human aldose reductase holoenzyme implicated in diabetic complications, *Science*, 257, 81-84.

Wride MA, (2011), Lens fibre cell differentiation and organelle loss: many paths lead to clarity, *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 366, 1219–1233.

Zhu Changjin, (2013), Aldose reductase inhibitors as potential therapeutic drugs of diabetic complications, *Diabetes Mellitus-Insights and Perspectives*, 2, 17-36.