



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE

SAN NICOLAS DE HIDALGO



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO
BIOLÓGICAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

TESIS

**Efecto del ácido 13-*epi*-labdanólico de *Ageratina*
jocotepecana B. L. Turner en la formación de catarata en
cristalino aislado de conejo**

Para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA

QFB CELESTE ALONSO VELAZQUEZ

ASESOR:

DC MAURO MANUEL MARTÍNEZ PACHECO

DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL CON ESPECIALIDAD EN BIOQUÍMICA: 94002061

CO-ASESOR:

DC ROSA ELVA NORMA DEL RÍO TORRES

DOCTORA EN CIENCIAS QUÍMICAS:

MORELIA MICHOACÁN, MARZO DEL 2017

ÍNDICE GENERAL

	Página
Índice general.....	I
Índice de figuras.....	II
Índice de cuadros.....	IV
Abstract.....	V
Resumen.....	VI
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
2.1. Incidencia de catarata.....	2
2.2. Mecanismos implicados en la formación de catarata.....	3
2.3. Características de la Aldosa Reductasa.....	6
2.4. Inhibidores de la Aldosa Reductasa con potencial anticatarata.....	8
2.5. Modelos <i>in vitro</i> para evaluar inhibidores de la formación de catarata.....	10
2.5.1. Catarata diabética.....	11
2.5.1.1. Catarata inducida con glucosa.....	11
2.5.1.2. Catarata inducida con galactosa.....	12
2.5.1.3. Catarata inducida con xilosa.....	12
2.5.2. Catarata senil.....	13
2.6. Búsqueda de nuevas moléculas con efecto preventivo de la catarata diabética.....	13
III. JUSTIFICACIÓN	18
IV. HIPÓTESIS	19
V. OBJETIVOS	20
5.1. Objetivo general.....	20
5.2. Objetivos particulares.....	20
VI. METODOLOGÍA	21
6.1. Estrategia experimental.....	21
6.2. Obtención de los extractos de <i>Ageratina jocotepecana</i> B. L. Turner.....	21
6.3. Aislamiento del ácido 13- <i>epi</i> -labdanólico.....	22
6.4. Purificación del ácido 13- <i>epi</i> -labdanólico.....	23

6.5.	Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de protón (RMN ¹ H).....	25
6.6.	Extracción de la enzima AKR1B1 de cristalino de conejo.....	25
6.7.	Determinación de la actividad enzimática AKR1B1 de conejo por consumo de NADPH.....	26
6.8.	Determinación de la CI ₅₀ del ácido 13- <i>epi</i> -labdanólico en AKR1B1 de conejo.....	27
6.9.	Determinación del tipo de inhibición del ácido 13- <i>epi</i> -labdanólico en la enzima AKR1B1 de conejo.....	27
6.10.	Determinación de la constante de inhibición (K _i).....	28
6.11.	Extracción y asepsia de los ojos de conejo.....	28
6.12.	Inducción de la formación de catarata con carbohidratos.....	29
6.13.	Efecto del DMSO en la viabilidad de los cristalinos.....	30
6.14.	Efecto del ácido 13- <i>epi</i> -labdanólico en la viabilidad de los cristalinos de conejo.....	31
6.15.	Inhibición de la formación de catarata con xilosa.....	31
6.16.	Inhibición de la formación de catarata con Selenito de sodio.....	33
6.17.	Procesamiento de los datos.....	33
7.	RESULTADOS	35
7.1.	Rendimiento de los extractos de <i>A. jocotepecana</i> B. L. Turner.....	35
8.	DISCUSIÓN	36
9.	CONCLUSIONES	38
10.	BIBLIOGRAFÍAS	39

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Principales causas de discapacidad visual a nivel mundial.....	2
Figura 2. Daño por catarata.....	3
Figura 3. Catálisis en la vía de los polioles.....	3
Figura 4. Vía de los polioles.....	4
Figura 5. Estructura de la enzima Aldosa Reductasa.....	6
Figura 6. Conformaciones del sitio activo de la AKR1B1.....	7
Figura 7. Inhibidores de la Aldosa Reductasa de tipo ácido carboxílico...	9
Figura 8. Labdanos aislados de <i>Ageratina jocotepecana</i>	14
Figura 9. Inhibición a la AKR1B4 del ácido 13- <i>epi</i> -labdanólico dependiente de la concentración.....	16
Figura 10. Cl ₅₀ del ácido 13- <i>epi</i> -labdanólico con la AKR1B4.....	16
Figura 11. Inhibición tipo competitiva del ácido 13- <i>epi</i> -labdanólico.....	17
Figura 12. Equipo de resonancia magnética nuclear (RMN) del IIQB-UMSNH.....	25
Figura 13. Ojos de conejo en amortiguador de fosfatos salino.....	28
Figura 14. Preparación de los inhibidores en DMSO.....	32

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Porcentajes de identidad y similitud de las enzimas AKR1Bs.	11
Cuadro 2. Actividad inhibitoria de los compuestos puros obtenidos de los extractos.....	15
Cuadro 3. Polaridades del eluyente utilizadas para el aislamiento del ácido 13- <i>epi</i> -labdanólico.....	23
Cuadro 4. Polaridades del eluyente utilizadas para la purificación del ácido 13- <i>epi</i> -labdanólico.....	24
Cuadro 5. Mezcla de reacción para la determinación de inhibición de la AKR1B1 de conejo con el ácido 13- <i>epi</i> -labdanólico.....	27
Cuadro 6. Mezcla de cultivo para la inducción de catarata con carbohidratos en cristalinos de conejo.....	30
Cuadro 7. Mezcla de cultivo para la determinación del efecto del DMSO al 1 % en la viabilidad de cristalinos de conejo.....	30
Cuadro 8. Mezcla de cultivo para la determinación del efecto del ácido 13- <i>epi</i> -labdanólico en la viabilidad de cristalinos de conejo.....	31
Cuadro 9. Mezcla de cultivo para la determinación del efecto del ácido 13- <i>epi</i> -labdanólico en la formación de catarata con xilosa en cristalinos de conejo.....	32
Cuadro 10. Mezcla de cultivo para la determinación del efecto del ácido 13- <i>epi</i> -labdanólico en la formación de catarata con Selenito de sodio en cristalinos de conejo.....	33
Cuadro 11. Rendimiento de los extractos de <i>Ageratina jocosotepecana</i> B. L. Turner.....	35

ABSTRACT

A common cause of vision loss is cataracts. In Mexico, 300,000 adults are reported with this condition. One of the metabolic pathways involved in the formation of diabetic cataract (DC) is the polyol pathway. Where, Aldose Reductase (AR) under hyperglycemic conditions (HG,) converts glucose to sorbitol. The accumulates sorbitol inside the cells of the lens and creates an osmotic stress, thus, the cell membrane is smooth and there is loss of sharpness (cataract). Current, effective treatment has been not known to help at the problem. The inhibitory capacity towards the AR enzyme by the consumption of NADPH was determined by spectrophotometric methods. Purified 13-*epi*-labdanolic acid from the hexanic extract of *A. jocotepecana* inhibited the AKR1B1 of the rabbit lens with an IC₅₀. The type of inhibition and K_i were determined. In the search for compounds that inhibit DC formation, an *in vitro* model is needed to evaluate the progression of cataract in an HG environment. An *in vitro* model for tissue culture was established to evaluate the effect of 13-*epi*-labdanolic acid in the prevention of diabetic cataract formation, where rabbit lens were cultured in medium 199 with 1% penicillin-streptomycin, 0.5 % fetal serum bovine and 20 mM xylose in CO₂: air (5:95 %) environment at 37 ° C. The rabbit lens were observed every 24 h to analyze their transparency using a Gel Logist 200 Image System and the ImageJ program. The *ex vivo* model with 20 mM xylose allowed us to obtain an opacity formation (cataract) from day 2 in comparison with the control that allowed to observe clear lens until day 6. On the other hand, the 13-*epi*-labdanólico acid prevent the formation of opacity at a low concentration. Also, protected the redox state in the rabbit lens exposed to an overdose of sodium selenite.

Key words: aldose reductase, diabetic cataract, lens culture

RESUMEN

Una causa común de la pérdida de visión es la catarata. En México se reportan 300 mil adultos con esta afección. Una de las vías metabólicas implicadas en la formación de la catarata diabética (CD) es la vía de los polioles. Donde, la Aldosa Reductasa (AR) en condiciones hiperglucémicas (HG) convierte la glucosa a sorbitol. Éste último se acumula dentro de las células del cristalino y crea un estrés osmótico por lo que se lisa la membrana celular y ocurre pérdida de nitidez: catarata. Hasta ahora no se conoce ningún medicamento efectivo que coadyuve a la solución del problema. La capacidad inhibitoria hacia la enzima AR mediante el consumo de NADPH se determinó por métodos espectrofotométricos. El ácido 13-*epi*-labdanólico purificado del extracto hexánico de *A. jocotepecana* inhibió a la AKR1B1 del cristalino de conejo con una CI_{50} . Se determinaron el tipo de inhibición y K_i . En la búsqueda de compuestos que inhiban la formación de la CD, se necesita un modelo *in vitro* para evaluar la progresión de catarata en un entorno HG. Un modelo *in vitro* para el cultivo de tejido se estableció para evaluar el efecto del ácido 13-*epi*-labdanólico en la prevención de la formación de catarata, en donde cristalininos de conejo se cultivaron en medio 199 con penicilina-estreptomina 1 %, suero fetal de bovino 0.5 % y xilosa 20 mM en un entorno de CO₂:humedad (5:95, %) a 37 °C. Los cristalininos se observaron cada 24 h para analizar su transparencia mediante un sistema de Imagen Gel Logist 200 y el programa ImageJ. El modelo *ex vivo* con xilosa 20 mM nos permitió obtener una formación de opacidad (catarata) a partir del día 2 en comparación con el control que permitió observar cristalininos transparentes hasta el día 6. Por otra parte, el ácido 13-*epi*-labdanólico previno la formación de opacidad a una baja concentración. Además, protegió el estado redox en el cristalino de conejo expuesto a una sobredosis de Selenito de sodio.

Palabras clave: aldosa reductasa, catarata diabética, cultivo de cristalino



I. INTRODUCCIÓN

La catarata es la principal causa de ceguera a nivel mundial. Uno de los detonantes principales para la aparición de la catarata a temprana edad es la diabetes mellitus. En la hiperglicemia crónica se presenta un daño en el cristalino por una alteración en diferentes mecanismos bioquímicos. En el cristalino, el sorbitol es un producto de reducción de la glucosa proveniente de la vía de los polioles, este se acumula en las células del cristalino y produce daño celular y tisular, que se manifiesta con la opacidad del cristalino (catarata). En la homeostasis del cristalino humano en condiciones normoglicémicas es fundamental la vía de los polioles. El sorbitol excedente es metabolizado a fructuosa, un monosacárido que tiene varios destinos celulares. La Aldosa Reductasa (AR) es la enzima limitante en la vía de los polioles. Tiene una importante función en el mecanismo de la formación de la catarata diabética. La AR induce un desequilibrio osmótico que causa un daño celular y con ello la aparición de alteraciones tales como la formación de la catarata. Estas alteraciones se presentan a largo plazo como complicaciones secundarias de la diabetes mellitus, el cual, es el estado de hiperglucemia de mayor prevalencia en el mundo. La inhibición de la AR puede prevenir las alteraciones de los mecanismos bioquímicos en el cristalino en estado de hiperglucemia. Por ello, prevalece la importancia de diseñar y descubrir inhibidores de la enzima AR (IARs) que puedan ofrecer un enfoque terapéutico para la prevención de la formación de catarata. Aunque existen IARs de origen sintético ya reportados, estos carecen de efectividad en ensayos clínicos y solo el Epalrestat se encuentra comercializado como IAR en algunos países asiáticos. Este trabajo se enfoca en la búsqueda de nuevas moléculas procedentes de fuentes naturales que tengan el potencial para prevenir la formación de catarata. Para lo cual, un modelo *ex vivo* para el cultivo de cristalino se estableció. 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 se llevaron a cabo.

II. ANTECEDENTES

2.1 Incidencia de catarata

De acuerdo con las estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el 2010, 285 millones de personas en el mundo padecían de discapacidad visual y 39 millones de ellas eran ciegas. La distribución mundial de las principales causas de la discapacidad visual son los errores de refracción no corregidos 43 % (miopía, hipermetropía o astigmatismo), la catarata 33 % y el glaucoma 2 % (Figura 1) (OMS, 2013). La discapacidad visual es más frecuente en los grupos de edad mayor. En el 2010, el 82 % de las personas ciegas y el 65 % de las personas con ceguera moderada o grave eran mayores de 50 años. Tanto la ceguera relacionada con la edad y la debida a la diabetes mellitus (DM) no controlada aumenta en todo el mundo (OMS, 2014).



Figura 1. Principales causas de discapacidad visual a nivel mundial.

La catarata es una condición que nubla u opaca el cristalino, el cual es normalmente transparente. La luz no pasa a través del cristalino como debiera, y no es reflejada apropiadamente en la retina (la capa sensible a la luz que cubre la parte posterior del ojo). Como resultado, la visión se torna nubosa, distorsionada o borrosa. Cualquier persona sin importar la edad, puede ser blanco de ésta enfermedad. Asimismo, un golpe en el ojo, la sobreexposición a los rayos ultravioleta solares, además de la herencia, son sus detonantes (figura 2) (AAO, 2013).

La prevalencia de catarata en el paciente con DM aumenta de tres a cuatro veces más, en comparación con personas sin la enfermedad, debido a que los episodios de elevados niveles de glucosa en la sangre promueven alteraciones en la visión que producen la opacidad del cristalino, signo característico de esta complicación. Por tal motivo, la hiperglucemia acelera el desarrollo de catarata en los adultos y también promueve la formación temprana de catarata en la población joven (HSITO, 2008).

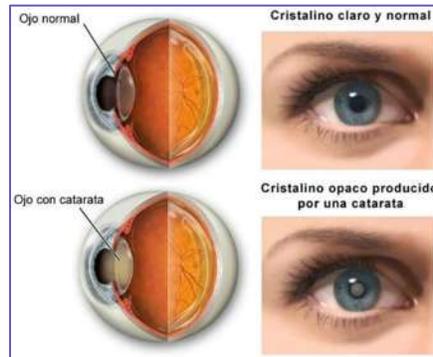


Figura 2. Daño por catarata.

2.2. Mecanismos implicados en la formación de catarata diabética

La catarata diabética es una afección en donde cambios osmóticos participan en una función prominente. En la catarata diabética, la inflamación inicial producida por la acumulación de productos polioles derivados de la vía de los polioles lleva a un desbalance en el equilibrio de la bomba de flujo catiónico y este se vuelve incapaz de conservar el paso de iones a través de las membranas permeables (Kinoshita, 1974).

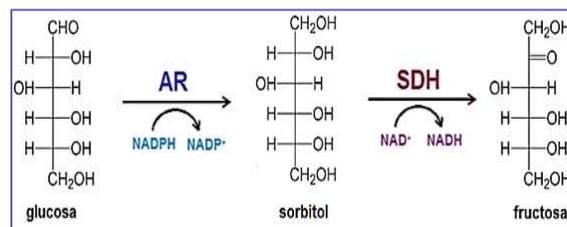


Figura 3. Catálisis en la vía de los polioles.

La enzima Aldosa Reductasa (AR) junto con la Sorbitol Deshidrogenasa (SDH) forman la vía de los polioles. En esta vía, la AR como primer paso enzimático, cataliza la reducción de la forma aldehído de la glucosa para formar el sorbitol de una manera dependiente del NADPH. En un segundo paso enzimático, SDH utiliza el NAD⁺ como aceptor de electrones y oxida el sorbitol a fructosa (figura 3). La conversión de glucosa a sorbitol catalizada por la AR se identificó por primera vez en 1956 por Hers en las vesículas seminales donde la glucosa se convierte en fructosa para proporcionar una fuente de energía para los espermatozoides. Poco después, el sorbitol (vía de los polioles) se encontró en la lente de la rata diabética (**Van-Heyningen, 1959**). Estos descubrimientos llevaron a investigar sobre la participación de la AR y de la vía de los polioles en el desarrollo de las complicaciones diabéticas. Sin embargo, la AR es ahora conocida por que está presente en la mayoría de las células de mamífero. Normalmente, la glucosa se metaboliza por oxidación celular a través de la vía de glucólisis y ciclo de Krebs para producir los productos metabólicos y energía para las células. El metabolismo de la glucosa mediante la vía de los polioles (figura 4) se activa en muchos tipos de células cuando la concentración intracelular de glucosa es grande (hiperglucemia) y esto puede generar estrés celular a través de diversos mecanismos (**Van-Heyningen, 1959; Dagher et al., 2004; Zhu, 2013**).

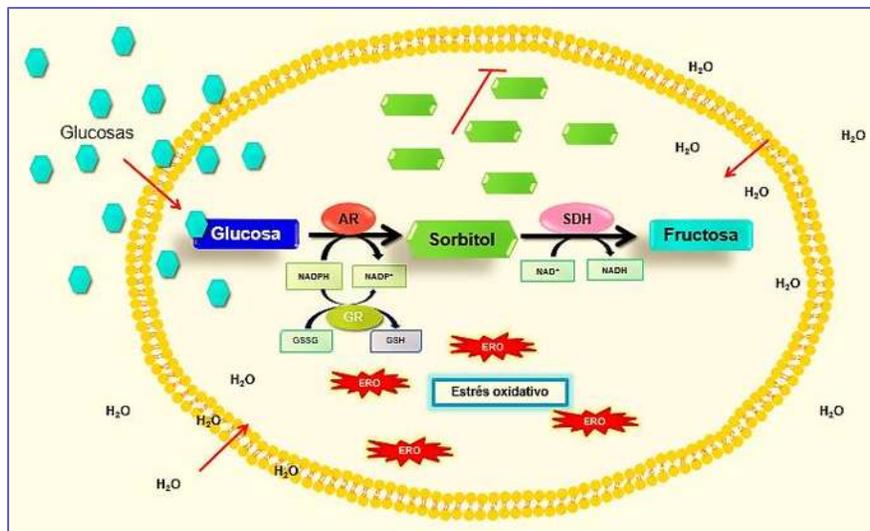


Figura 4. Vía de los polioles. Mecanismo del estrés osmótico, el decaimiento del NADPH y su relación con el estrés oxidativo.



La hipótesis osmótica de las complicaciones diabéticas es debida a la acumulación de sorbitol en tejidos, la cual generó extensas investigaciones en las últimas tres décadas. Estudios recientes sugieren que la glucosa puede ser un sustrato incidental de la AR, que parece ser más eficiente en catalizar la reducción de un amplio intervalo de aldehídos generados de la peroxidación de lípidos. Sin embargo, existen consecuencias del consumo de NADPH. El decaimiento de la concentración de NADPH afecta negativamente la actividad de otras enzimas que también lo requieren, como la Óxido nítrico sintasa (NOS), la Glutación reductasa (GR), la Catalasa y la NADPH oxidasa (figura 4). Algunas de ellas participan en los mecanismos antioxidantes. En la catarata diabética, se sabe que la hiperglucemia induce a un estrés oxidativo, por lo tanto, el decaimiento de NADPH explicaría, en parte, la deficiencia de los sistemas antioxidantes en el paciente diabético (**Díaz-Flores et al., 2004**). Varias investigaciones atribuyen una importante función antioxidante a la enzima. Además, trabajos en marcha indican que la AR es un componente crítico de señalización intracelular, donde observan que la función antioxidante y señalización de la AR están relacionadas y que la AR regula mecanismos de la proteína cinasa C y la proteína de unión al factor nuclear κ (NF- κ B) por la vía óxido-reducción. Sin embargo, el incremento de glucosa dentro de las células altera la función de la proteína cinasa C u otro mecanismo relacionado a la vía de los polioles (**Srivastava et al., 2005; Derylo et al., 1998**). La activación del metabolismo de la glucosa por la vía de los polioles debido a la hiperglucemia genera estrés celular a través de varios mecanismos y estos pueden estar relacionados con diversas afecciones como retinopatía, neuropatía diabética y formación de catarata (**Dagher et al., 2004; Zhu et al., 2013**). La formación de productos finales de glicación avanzada (AGEs), la activación de las isoformas de la proteína cinasa C y el incremento de flujo en la vía de la hexosamina también se conocen como principales factores en las complicaciones asociadas con la diabetes mellitus. La formación y acumulación de AGEs que se forman de proteínas y azúcares reducidos alteran estructural y funcionalmente las proteínas del plasma y de la matriz extracelular, particularmente del entrecruzamiento de proteínas y por interacciones de AGEs con sus receptores y/o proteínas de unión, los cuales llevan

a una proinflamación por citosinas, factores de crecimiento y a la adhesión de moléculas (**Lee et al., 2011**).

Los medios actuales para mantener un estado metabólico “normal” en pacientes con diabetes son imperfectos e incipientes y estos son exitosos en solo una fracción pequeña de los pacientes tratados. Esto puede ser conveniente para complementar terapias antidiabéticas con medicamentos que marquen procesos específicos para las complicaciones de la diabetes (**Dagher et al., 2004**).

2.3. Características de la Aldosa Reductasa

La AR pertenece a la superfamilia de las aldo-ceto reductasas. Complejos cristalizados de AR con ligandos y mutagénesis dirigida permitieron identificar la estructura de la enzima. La enzima es un polipéptido de 316 residuos de aminoácidos (**Schade et al., 1990; El-Kabbani et al., 2004**). La cadena del péptido bloqueado en el amino terminal se pliega en un motivo estructural α/β -barril que contiene 8 láminas- β paralelas que se conectan entre sí por ocho segmentos helicoidales α -periféricos de una forma anti-paralela a las láminas- β . El sitio activo se encuentra en el extremo del C-terminal del barril β y el cofactor NADPH se une en una conformación extendida a la parte inferior del sitio activo (figura 5) (**Rondeau et al., 1992; Barski et al., 2008**). Sin embargo, es probable que el sitio activo a menudo cambie su forma debido a una variedad de conformaciones de unión inferidas por Inhibidores de la Aldosa Reductasa (IAR) representados por los complejos con ligandos. Estas conformaciones ligando-dependiente indican un

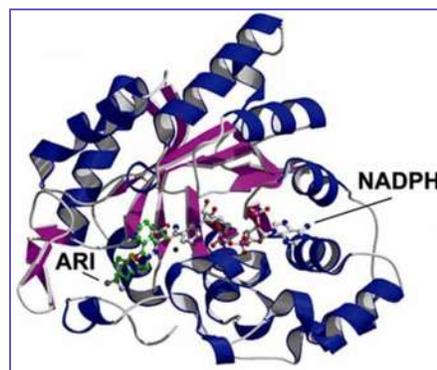


Figura 5. Estructura de la enzima Aldosa Reductasa. (Oates, 2008).

ajuste molecular inducido notable o flexibilidad del sitio activo y al menos tres sitios de unión distintos en el sitio activo son propuestos de acuerdo con un número de estudios con cristalografía de rayos X y mutagénesis realizados en la AR (figura 6). Un sitio activo es por lo general ocupado por la cabeza aniónica del ligando que se denomina "fijación de sitio aniónico", el cual se compone de cadenas laterales de Tyr48, His110, Trp20, Trp111 y la fracción de nicotinamida cargado positivamente del cofactor NADP⁺. El segundo es un sitio hidrofóbico conocido como sitio específico y se compone por los residuos Leu300, Cys298, Cys303, Trp111 y Phe122 (Zhu, 2013). El sitio específico muestra un notable grado de flexibilidad y los residuos que bordean este sitio no se conservan en otras aldo-ceto reductasas tales como aldehídos y el tercero es un sitio hidrofóbico formado por los residuos Trp20, Trp111, Phe122 y Trp219 (Zhu, 2013; El-Kabbani *et al.*, 2004).

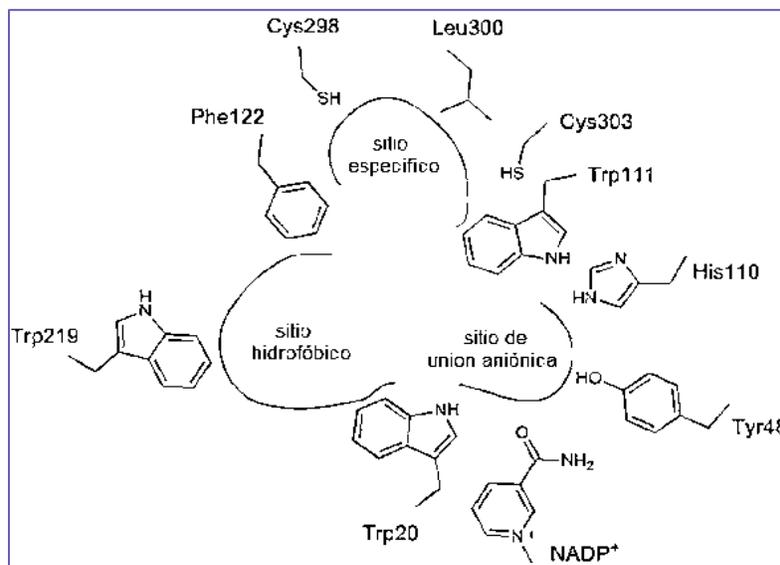


Figura 6. Conformaciones del sitio activo de la AKR1B1. Aminoácidos pertenecientes a las tres diferentes conformaciones del sitio activo (Zhu, 2013).

La evidencia más convincente para la participación de la AR en la formación de catarata por diabetes proviene de experimentos en los que se inhibe esta enzima. En ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina (STZ), modelo de muchos procesos celulares característicos de complicaciones diabéticas en humanos, se comprobó la inhibición de la vía de los polioles con lo cual, se impide una secuencia de alteraciones vasculares retinianas también presentes en la diabetes humana



(Dagher *et al.*, 2004; Matsumoto *et al.*, 2008). IAR en la vía de los polioles de ratas diabéticas impiden la apoptosis en células endoteliales vasculares y el desarrollo de capilares acelulares. Retinas humanas expuestas a un estado hiperglucémico en cultivo de órganos aumentaron la producción de sorbitol por un grado similar a la observada en rata. El exceso de actividad de AR puede ser un mecanismo de activación de la vía de los polioles en retinopatía diabética en humanos (Dagher *et al.*, 2004). Inhibidores sintéticos de la AR se desarrollaron tales como el Epalrestat, Zenarestat, Fidarestat y Ranirestat. Los cuales mostraron su efecto benéfico en experimentos con animales modelo para complicaciones diabéticas como la formación de catarata (Matsumoto *et al.*, 2008; Zhu, 2013). Además, en un estudio donde desarrollaron ratas AKR1B1 knockdown (ARKO) a base de siARN, los cultivos de las lentes de las ratas ARKO demostraron resistencia a la opacidad inducida por glucosa, lo que indica una participación fisiológica de la AR en la fisiopatología de catarata por un estado hiperglucémico (Reddy *et al.*, 2011).

2.4. Inhibidores de la Aldosa Reductasa con potencial anticatarata

De una gama variada estructuralmente de IAR desarrollados hasta la fecha, los ácidos carboxílicos son la clase de mayor importancia y más grande de los IAR (figura 7). Esta clase muestra fácilmente actividad en la inhibición de la AR debido a la característica estructural del grupo de cabeza anión carboxilato que puede encajar bien en el denominado sitio de unión aniónico de la AR descrito anteriormente (Zhu, 2013). Al comienzo de la investigación sobre las propiedades de AR, se encontró que la enzima es sensible a los aniones orgánicos, en particular a los ácidos grasos de cadena larga, lo que lleva a la identificación del ácido tetrametileneglutárico (TMG) como el primer IAR en la década de 1960 (Hayman y Kinoshita, 1965). El número de IAR de ácido carboxílico sigue creciendo, entre los que destaca el Epalrestat, el único IAR con aprobación de comercialización como medicamento terapéutico aplicado en el tratamiento clínico de la neuropatía diabética. El Epalrestat fue desarrollado en 1983 y se ha comercializado en Japón, y recientemente en China y la India (Hotta *et al.*, 2006). Tolrestat, un IAR y fármaco

potencial para el tratamiento de las complicaciones diabéticas, se aprobó en varios mercados, pero fue retirado por la razón de riesgo de toxicidad hepática grave y muerte típica por ácidos carboxílicos (**Hollis et al., 1984**). Los IAR también incluyen Zenarestat, Zopolrestat y Ponalrestat. Zenarestat es un fármaco potencial para el tratamiento de la neuropatía diabética, retinopatía y catarata. El Zopolrestat en fase tardía de los ensayos clínicos se evaluó para la eficacia en complicaciones diabéticas (**Mylari et al., 1991; Inskeep et al., 1994**). El Ponalrestat fue retirado de los ensayos clínicos debido a la falta de eficacia (**Arauz-Pacheco et al., 1992**).

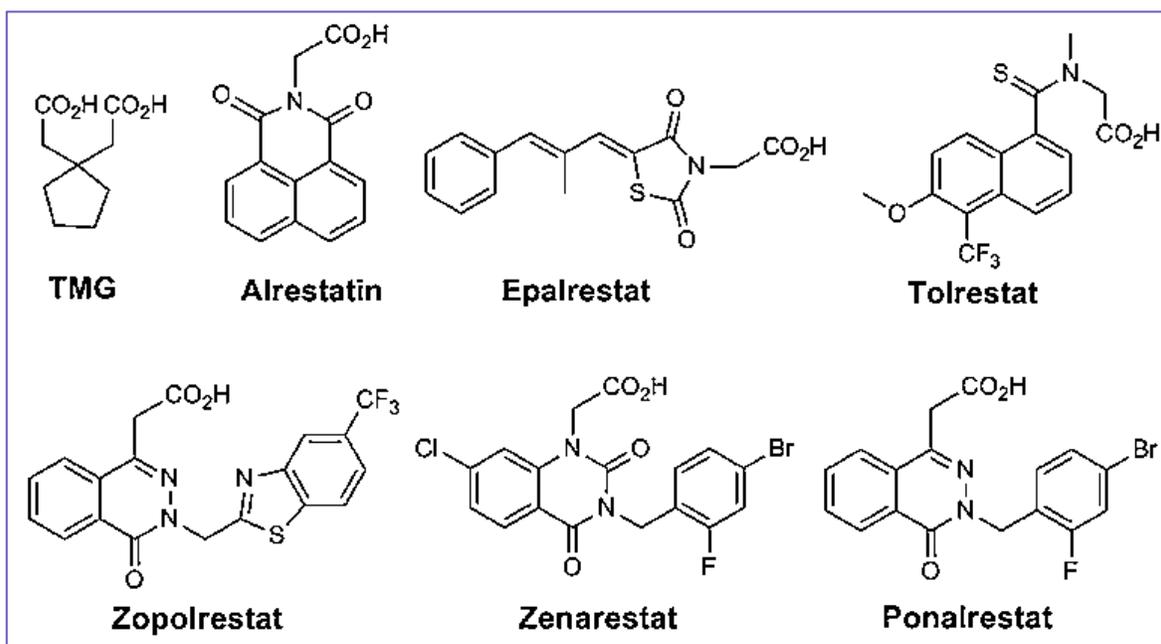


Figura 7. Inhibidores de Aldosa Reductasa de tipo ácido carboxílico.

Además, un número de IAR potentes se diseñaron y sintetizaron basado en diversas estructuras de núcleo químico, incluyendo (benzotiazol-2-il) metilindol (lidorestat) (**Van et al., 2005**). Todos ellos llevan un grupo químico de ácido acético en el núcleo. Sin embargo, la falta de penetración a la célula se observó como el principal inconveniente para algunos IAR individuales de la clase ácido carboxílico (**Zhu, 2013**). El Ranirestat es otro IAR que se ensayó en complicaciones microvasculares asociadas con diabetes, particularmente la neuropatía y formación de catarata en ratas diabéticas (**Matsumoto et al., 2008**).



Aunque el tratamiento con IAR previno daños de tejidos en animales modelo diabéticos, la eficacia clínica de estos medicamentos queda por establecerse. Inhibidores más selectivos y efectivos para personas con diabetes son necesarios para inhibir específicamente la función tóxica de la AR en señalización celular junto con la afección de su función de desintoxicación (**Sun et al., 2006**). Tales inhibidores son posiblemente más efectivos en el tratamiento de complicaciones diabéticas secundarias por la prevención de inflamación debido a la hiperglucemia crónica (**Srivastava et al., 2005**).

2.5. Modelos *in vitro* para evaluar inhibidores de la formación de catarata

Los cambios metabólicos tempranos dentro de las lentes llevan a una pérdida gradual de su transparencia que se conoce como catarata diabética, la cual, es una complicación en la diabetes juvenil. Un daño común en muchos modelos experimentales de catarata es el cambio dramático de la hidratación, este fenómeno se observó tanto en catarata diabética como en catarata senil. Sin embargo, los factores iniciales de la catarata pueden variar en cada una, pero en el estado final aparece un cambio en el flujo de los iones de Sodio y Cloro. Estos mecanismos se han evaluado en diversos animales modelo tanto *in vitro* como *in vivo*, donde e los organismos más utilizado son los roedores. Sin embargo, en estudios con cultivo de tejido se utilizan lentes de otros organismos como son rata, cabra, conejo y bovino (cuadro 2).



Cuadro 2. Porcentajes de identidad y similitud de las enzimas AKR1Bs. Alineaciones proteicas de los animales modelo en investigación de catarata comparados con la AKR1B1 de humano realizadas con los datos del NCBI en el programa Geneious.

Organismo	Identidad (%)	Similitud (%)
Humano	100	100
Rata	85,4	93
Ratón	85,4	92,7
Conejo	89,7	94,7
Bovino	87,5	95,2
Pollo	75,3	86,4
Cabra	86,4	94,3

2.5.1. Catarata diabética

2.5.1.1. Catarata inducida con glucosa

La catarata diabética que se forma por la presencia de grandes concentraciones de glucosa se demostró que puede ocurrir en tejido aislado detallado por primera vez por Chylack y Kinoshita en 1970. El cultivo de tejido del cristalino es un modelo experimental ideal para estudiar mecanismos de acción de la catarata y evaluar compuestos que sean IAR y por lo tanto que prevengan la formación de la catarata ya que se trata de un modelo sencillo y efectivo. De acuerdo a estudios realizados previamente por varios autores, se sabe que la catarata formada de manera experimental en tejido aislado, es similar a la catarata observada *in vivo* (**Chylack y Kinoshita, 1972**). Existen diferentes trabajos donde se reporta que una clara diferencia comienza a aparecer en los cristalinos incubados en concentraciones de glucosa de 55 mM o mayores. En los primeros días de incubación, se observó que los cristalinos a estas condiciones, mantienen la transparencia de las córtices anterior y posterior por 2-3 días después de la incubación, pero la deterioración progresiva de la corteza posterior en el tejido aislado ocurre a partir del cuarto día. Sin embargo, la opacidad completa de los cristalinos se observa hasta los 10 días de incubación (**Chylack y Kinoshita, 1972; Reddy et al., 2011**).



2.5.1.2. Catarata inducida con galactosa

Sin embargo, existen otros modelos para estudiar la catarata diabética, tal es el caso de la catarata galactosémica, este es un modelo comúnmente utilizado en la investigación de la catarata diabética en ratas debido a que la galactosa tienen mayor afinidad con la AR en comparación con la glucosa y además de que el galactitol que es el poliol resultante, es más difícil de metabolizar por la enzima SDH comparado con el sorbitol el cual, se acumula dentro de las células del cristalino ocasionando un estrés osmótico, alteración en la permeabilidad celular y en la homeostasis redox. Por ello, el modelo con galactosa es interesante ya que produce catarata diabética en un periodo corto que la observada con glucosa, el cual es comúnmente utilizado para investigar el mecanismo o medicamentos para la catarata. En modelos de tejido aislado del cristalino de rata, se observó una opacidad en los cristalinos a los 6 días de incubación con galactosa 30 mM en el medio (**Kim et al., 2013; Kim et al., 2013; Ji et al., 2015**).

2.5.1.3. Catarata inducida con xilosa

En otro modelo utilizado para analizar la catarata diabética, se utiliza xilosa 20 mM como el carbohidrato para producir las condiciones de hiperglucemia. La xilosa es extremadamente metabolizada por la AR produciendo el poliol xilitol. La acumulación de xilitol ocasiona un estrés osmótico, cambios en la peroxidación lipídica y en el contenido de glutatión reducido provocando un estrés osmótico dentro de la célula similares a los daños ocasionados en la catarata diabética (**Ohta et al., 1996**). En ensayos *ex vivo* con tejido aislado se observó el daño ocasionado en lentes de rata, en donde a las 24 h de incubación con xilosa, la lente presentaba opacidad en forma de anillo y un incremento significativo en el radio de glutatión oxidado/glutatión reducido y a los tres días ya se presentaba una opacidad completa (**Kim et al., 2011; Lee et al., 2011**).



2.5.2. Catarata senil

Por otro lado, la catarata inducida con Selenito de sodio es un modelo extremadamente rápido y conveniente para producir catarata nuclear similar a la catarata senil en humanos, pero de manera experimental, este mecanismo fue descrito por primera vez en 1977 por Oštálová. El principal evento de este modelo es la pérdida en la homeostasis del calcio, la generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) y el decremento de proteínas solubles en agua. Varios estudios afirman que el estrés oxidativo participa significativamente en la formación de la catarata y que el metabolismo oxidativo es importante para mantener la transparencia de las lentes (**Shearer et al., 1997;**). En cultivo de tejido aislado de rata, el desarrollo de la opacidad con Selenito de sodio 100 μM se observó en las primeras 24 h de incubación, por ello, este modelo es utilizado para analizar moléculas con potencial antioxidante y anticataratogénico (**Sasikala et al., 2010; Radha et al., 2012; Asha et al., 2016**).

2.6. Búsqueda de nuevas moléculas con efecto preventivo de la catarata diabética

Moléculas de origen natural siguen proporcionando una fuente de inspiración para los avances en química orgánica y en el tratamiento de enfermedades. Los terpenos son una clase de productos naturales con variada actividad biológica. El número de unidades de isoprenos de los que estos están compuestos biológicamente sirven para su clasificación. Por ejemplo, los diterpenos son un grupo del que varios compuestos con actividad biológica se producen. Diterpenos del tipo labdano son ejemplos excelentes de productos naturales con importante actividad farmacológica. Muchos de estos derivados poseen propiedades biológicas significantivas, tales como, actividad antifúngica y antibacteriana, antimutagénica, antiinflamatoria o actividades analgésicas. Estudios recientes muestran que los labdanos exhiben efecto citotóxico y citostático significativo en líneas celulares leucémicas de origen humano e interviene con las vías bioquímicas de apoptosis y

las fases del ciclo celular (Frija *et al.*, 2011; Demetzos y Dimas, 2001). Un estudio fitoquímico de la planta *Ageratina jocosotepecana* llevado a cabo en nuestro grupo de trabajo, demostró un contenido de compuestos diterpenos del tipo labdano (figura 8) como los principales componentes a los que les atribuye una actividad antimicrobiana y citotóxica (García-Sánchez *et al.*, 2014; León-Hernández, 2010; Ramírez-López, 2009).

En nuestro grupo de trabajo, Beltrán-Sánchez en el 2015, realizó un escrutinio en plantas nativas de Michoacán en la búsqueda de IAR. Las plantas nativas utilizadas

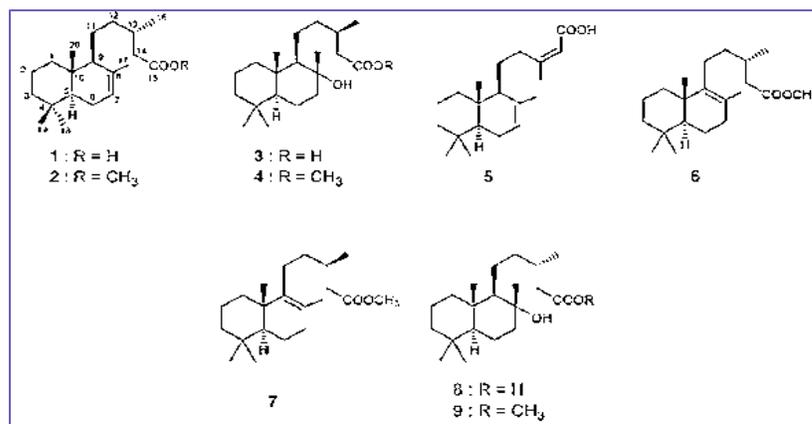


Figura 8. Labdanos aislados de *Ageratina jocosotepecana*. **1** Ácido (-)-(5S,9S,10S,13S)-labd-7-en-oico (ácido catívico), **2** metil (-)-(5S,9S,10S,13S)-labd-7-en-15-oato, **3** ácido (+)-13-*epi*-labdanólico, **4** metil (+)-13-*epi*-labdanolato, **5** ácido (-)-(5S,9S,10S,13Z)-labda-7,13-dien-15-oico, **6** metil (+)-(5S,10S,13S)-labd-8-en-15-oato, **7** metil (+)-(5S,10S,13R)-labd-8-en-15-oato, **8** ácido (-)-labdanólico, **9** metil (-)-labdanolato.

en su trabajo fueron los géneros *Ageratina*, *Caesalpineia*, *Enterolobium*, *Eupatorium* y *Tagetes* con los cuales obtuvo un total de 106 extractos, mismos que utilizó para determinar su capacidad inhibitoria hacia la enzima AKR1B4 en donde se midió el consumo de NADPH y la concentración de glicerol producido mediante métodos espectrofotométricos. Los extractos que presentaron inhibición mayor al 80 % fueron seleccionados para evaluar la actividad inhibitoria de los metabolitos secundarios mayoritarios (Beltrán-Sánchez, 2015). Los compuestos mayoritarios

se disolvieron en DMSO al 85 % con una concentración final de 10 mg/ml. El ácido 13-*epi*-labdanólico purificado del extracto diclometánico de flor y hoja de *Ageratina jocosotepecana* tuvo una inhibición del 97 % para la enzima AKR1B4 *in vitro* en comparación con otros labdanos naturales y modificados de *A. jocosotepecana* evaluados (cuadro 2).

Cuadro 2. Actividad inhibitoria de los compuestos puros obtenidos de los extractos.

Planta	Tipo de extracto	Órgano de la planta	Compuestos identificados	% inhibición	
				NADPH	Glicerol
A. <i>jocosotepecana</i>	Hexánico*	Flor, hoja	ácido catívico	29 ± 5.2	33 ± 3.7
			ácido 13-<i>epi</i>-labdanólico**	97 ± 3.3	80 ± 0.2
			5-hidroxi, 3,7,4-trimetoxi flavona	53 ± 0.2	49 ± 7.3

*García-Sánchez *et al.*, 2014; **Beltrán-Sánchez, 2015

En nuestro grupo de trabajo, García-Sánchez en el 2015, determinó la configuración absoluta del compuesto ácido 13-*epi*-labdanólico por el método de espectroscopía de dicroísmo circular vibracional (VCD). Por el método de resonancia magnética nuclear de protón (RMN ¹H) corrobora las diferencias del compuesto ácido labdanólico y su epímero natural el ácido (+)13-*epi*-labdanólico en *A. jocosotepecana*.

La inhibición del ácido 13-*epi*-labdanólico a la AKR1B4 fue evaluada a diferentes concentraciones del inhibidor con los dos métodos establecidos. Los resultados que obtuvo con el primer método fue la inhibición del 44 % con la concentración menor de DMSO a 95 % con la concentración mayor de DMSO y con el segundo método fueron de 39 % a 80 % de inhibición. Los resultados obtenidos determinan que la inhibición del ácido 13-*epi*-labdanólico es dependiente de su concentración (figura 9).

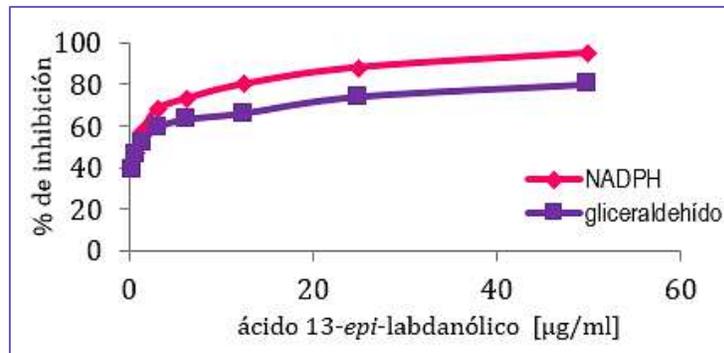


Figura 9. Inhibición a la AKR1B4 del ácido 13-*epi*-labdanólico dependiente de la concentración. Beltrán-Sánchez, 2015.

La CI_{50} se determinó al graficar el porcentaje de inhibición contra el logaritmo de la concentración del ácido 13-*epi*-labdanólico. El valor de CI_{50} lo obtuvo con la ecuación de la línea de regresión, donde “x” es igual a CI_{50} y “y” es igual al porcentaje de inhibición deseado (50 %). Los resultados que obtuvo fueron un CI_{50} de 0.76 µg/ml equivalentes a 2 300 nM (figura 10).

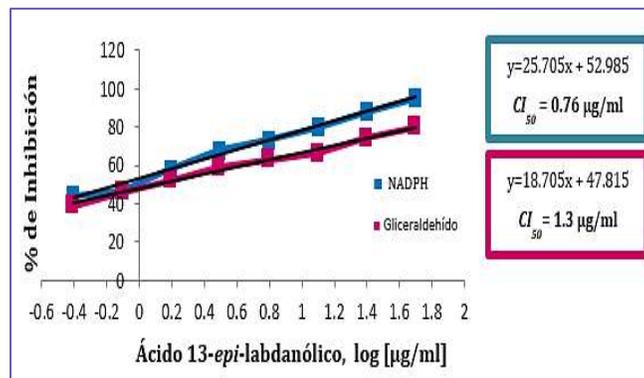


Figura 10. CI_{50} del ácido 13-*epi*-labdanólico con la AKR1B4. Beltrán-Sánchez, 2015.

La alrestatina, un inhibidor sintético considerado como el mejor de los inhibidores con grupo carboxilo, tiene reportado una CI_{50} de 1 500 nM de acuerdo con la base de datos de DeRuiter *et al.*, (1986). Lo que indica que el ácido 13-*epi*-labdanólico puede ser un inhibidor efectivo de la actividad enzimática de la AKR1B4.

Para determinar el tipo de inhibición del ácido 13-*epi*-labdanólico a la AKR1B4, se llevó a cabo la determinación de los parámetros cinéticos de K_m y V_{max} , calculados con los datos obtenidos de la medición de la actividad enzimática con el segundo método. Los valores de K_m y V_{max} los obtuvo con un gráfico de Lineweaver-Burk, donde se grafica el inverso de la V contra el inverso de la concentración del gliceraldehído con diferentes concentraciones del inhibidor (0.6 y 0.156 $\mu\text{g/ml}$). La V_{max} que obtuvo fue igual para las dos concentraciones del inhibidor, así como para la actividad sin inhibidor, con un valor de 0.5. Con esto concluye que la inhibición del ácido 13-*epi*-labdanólico a la AKRIB4 es de tipo competitiva (figura 11).

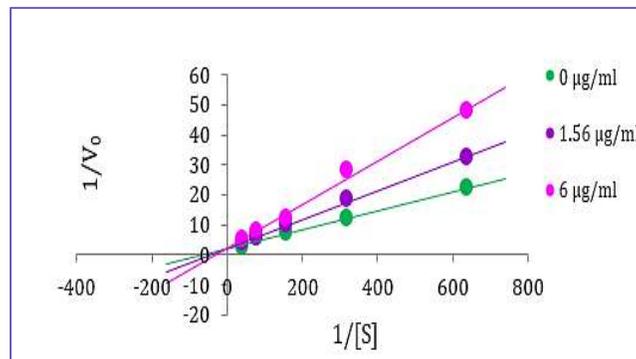


Figura 11. Inhibición tipo competitiva del ácido 13-*epi*-labdanólico. El recíproco de la V_0 de la reacción graficado contra el recíproco de la concentración del gliceraldehído. Beltrán-Sánchez, 2015.



III. JUSTIFICACIÓN

En estudios *in vitro*, el ácido 13-*epi*-labdanólico inhibió a la enzima Aldosa Reductasa AKR1B4 de rata, la cual, está implicada en la formación de catarata.

Por lo tanto, la demostración de la inhibición de la catarata en el cristalino aislado de conejo permitirá continuar su evaluación *in vivo* para en el futuro postularlo como un posible inhibidor de la catarata.



IV. HIPÓTESIS

El ácido 13-*epi*-labdanólico inhibe la formación de catarata en cristalino aislado de conejo.



V. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

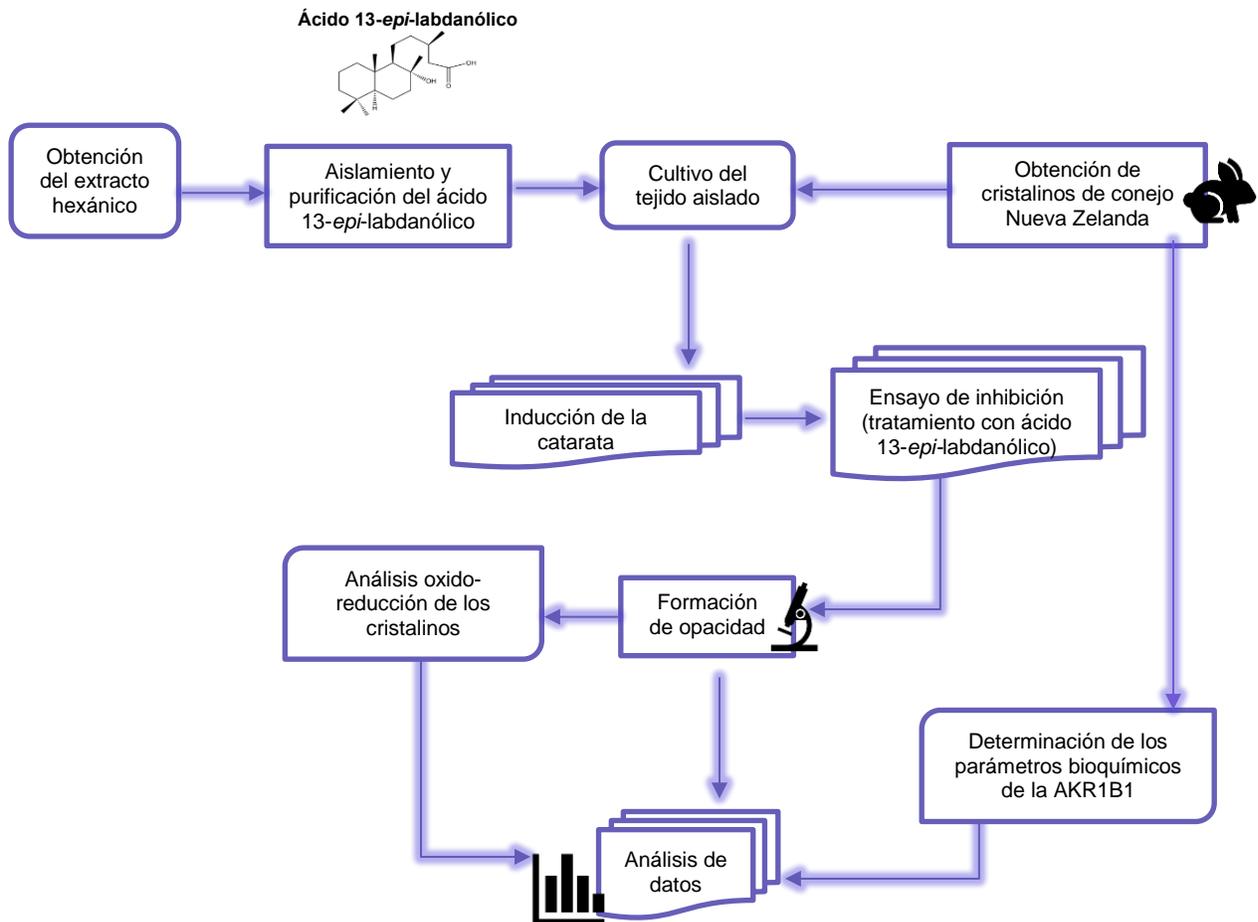
Evaluar la actividad inhibitoria del ácido 13-*epi*-labdanólico en la formación de catarata en cristalino aislado de conejo.

5.2. Objetivos particulares

1. Purificar el ácido 13-*epi*-labdanólico del extracto hexánico de *A. jocosotepecana*.
2. Determinar la inhibición del ácido 13-*epi*-labdanólico en la formación de catarata en el tejido aislado de conejo.

VI. METODOLOGÍA

6.1. Estrategia experimental



6.2. Obtención de los extractos de *Ageratina jocosotepecana* B. L. Turner

235 g de hojas y 170 g de tallos de *A. jocosotepecana* se pesaron y se maceraron con 3.8 y 1.8 litros de hexano respectivamente a temperatura ambiente por 3 días, este proceso se realizó 3 veces para extraer la mayor cantidad posible de materia prima de la planta. El mismo procedimiento se realizó, pero con cloruro de metileno y metanol. El extracto se filtró y se evaporó el disolvente del macerado mediante la

destilación a vacío en un rotavapor. El extracto se dejó secar hasta obtener un peso constante.



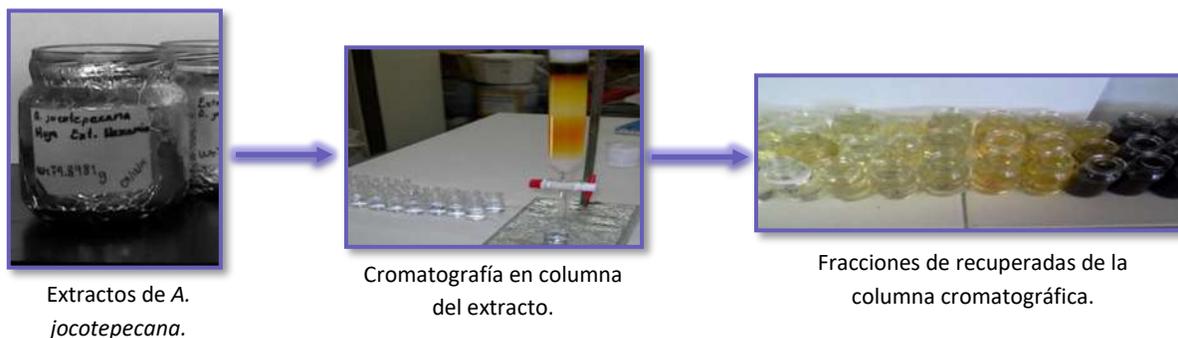
6.3. Aislamiento del ácido 13-*epi*-labdanólico

Para la obtención del ácido 13-*epi*-labdanólico se siguió el método reportado por García-Sánchez en el 2015. Brevemente 6 g de sílice gel se impregnaron con 6 g del extracto hexánico disuelto en 6 ml de cloruro de metileno, esta mezcla se homogeneizó y se dejó secar a totalidad. Posteriormente se adicionó a una columna de 4 cm de diámetro con 12 cm de sílice gel como fase estacionaria empaquetada con hexano. Para la fase móvil se utilizaron 300 ml de hexano y mezclas de los disolvente de hexano:acetato de etilo en polaridad ascendente, iniciando con 100 ml de hexano:acetato de etilo (9:1, v/v), donde se colectaron fracciones de 20 ml aproximadamente (cuadro 3).

Cuadro 3. Polaridades del eluyente utilizadas para el aislamiento del ácido 13-*epi*-labdanólico.

Eluyente (ml)	Polaridad		Fracciones
	Hexano	Acetato de etilo	
300	10	0	1-15
100	9	1	16-21
100	8	2	22-26
200	7	3	27-36
100	6	4	37-42
100	5	5	43-47
100	4	6	48-52
100	3	7	53-111
100	2	8	112-115
100	1	9	116-119

Las fracciones 34-36 colectadas de las polaridades hexano:acetato de etilo (7:3 a 6:4, v/v) se obtuvo una miel color verde, donde se identificaron señales correspondientes a un diterpeno impuro con señales características del ácido 13-*epi*-labdanólico de acuerdo al análisis realizado de RMN de ^1H .



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

Para la purificación del ácido 13-*epi*-labdanólico se siguió la metodología descrita por García-Sánchez en el 2015. Brevemente, 4.9 g del diterpeno impuro se impregnó en cloruro de metileno y se recromatografio en una columna de vidrio 3.7 cm de diámetro por 12 cm de altura de sílice impregnada con hexano y se le adicionó

el extracto previamente impregnado. Como fase móvil se utilizó una mezcla de hexano:acetona de polaridad ascendente. Un total de 119 fracciones de 15 ml aproximadamente se recolectaron (cuadro 4).

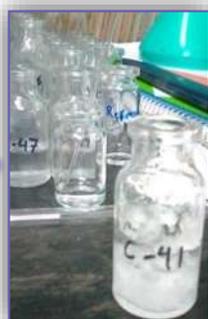
Cuadro 4. Polaridades del eluyente utilizadas para la purificación del ácido 13-*epi*-labdanólico.

Eluyente (ml)	Polaridad		Fracciones
	Hexano	Acetona	
100	10	0	1-13
100	9	1	14-21
400	8	2	22-91
50	7	3	92-96
50	6	4	97-99
50	5	5	100-103
50	4	6	104-108
50	3	7	109-111
50	2	8	112-115
50	1	9	116-119

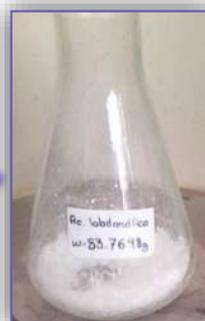
En las fracciones 36 a la 61 que pertenecen a las polaridades hexano:acetona (8:2, v/v) se encontraron cristales blancos en forma de aguja.



Cromatografía del compuesto impuro.



Fracciones con cristales del compuesto.



Cristales del compuesto puro recuperados.



Almacenamiento del ácido 13-*epi*-labdanólico puro.

6.5. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H fueron obtenidos en un equipo Varian Mercury plus 400. Los espectros de Hidrógeno (^1H) se obtuvieron a 400 MHz en 60 repeticiones, la ventana espectral fue de 6,000 Hz, el disolvente utilizado fue cloroformo deuterado (CDCl_3) y el disolvente de referencia interna fue tetrametilsilano (TMS) obtenidos a temperatura ambiente (Figura 12).



Figura 12. Equipo de resonancia magnética nuclear (RMN) del IIQB-UMSNH.

6.6. Extracción de la enzima AKR1B1 de cristalino de conejo

Los ojos de conejo se removieron con tijera quirúrgica. Los cristalinos se extrajeron y se colocaron en microtubos con solución 1:1 de amortiguador de fosfatos de potasio 0.1 M con pH 6.8 y 2-mercaptoetanol 1 mM (200 μl de la disolución para cada cristalino). Se almacenaron a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su uso. 1 cristalino se descongeló y se homogeneizó en 1 ml de buffer de fosfatos de potasio 0.1 M (pH 6.8) y 10 μl de una mezcla de inhibidores de proteasas de la marca Sigma (P9599). El homogeneizado se centrifugó a 10 000 rpm durante 15 min, se separó el sobrenadante en microtubos previamente enfriados. 20 μl se tomaron para medir la cantidad de proteína con el método de Lowry (1951). El resto se utilizó como extracto crudo de enzima manteniéndolo en baño de hielo y no postergando su uso más de 2 h para evitar la alteración de la enzima AKR1B1 de conejo.



6.7. Determinación de la actividad enzimática AKR1B1 de conejo por consumo de NADPH

La actividad enzimática se siguió de acuerdo a la metodología reportada por Beltrán-Sánchez en el 2015. Esta se obtuvo al medir el consumo del NADPH reducido en una mezcla de reacción que contiene 2 550 μ l de buffer de fosfatos de potasio 0.1 M (pH 6.8), 15 μ l de 2-mercaptoetanol 1 mM, 30 μ l de DMSO 85 % o del inhibidor ácido 13-*epi*-labdanólico, extracto crudo de enzima a concentración de 8 mg de proteína/ml, 60 μ l de NADPH 2 mM y 300 μ l de gliceraldehído 0.1 mM (cuadro 5). 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 el gliceraldehído. El valor obtenido del blanco se le resta 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.

La actividad enzimática se calculó con la siguiente fórmula:

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

dónde:

Δ Abs: -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 cm^2/mol)

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



Cuadro 5. Mezcla de reacción para la determinación de inhibición de la AKR1B1 de conejo con el ácido 13-*epi*-labdanólico.

Disoluciones	Volumen (µl)			
	Control	Blanco 1	Muestra	Blanco 2
Amortiguador de fosfato de potasio 0.1 M (pH 6.8)	2 535	2 835	2 535	2 835
2-mercaptoetanol 1 mM	15	15	15	15
Dimetilsulfóxido (DMSO) 85%	30	30	-	-
Ácido 13- <i>epi</i> -labdanólico 5 mg/ml	-	-	30	30
Extracto crudo de enzima AKR1B1 8 mg de proteína	60	60	60	60
Gliceraldehído 0.1 mM	300	-	300	-
NADPH 0.2 mM	60	60	60	60

6.8. Determinación de la CI_{50} del ácido 13-*epi*-labdanólico en AKR1B1 de conejo

La concentración inhibitoria media (CI_{50}) se determinó mediante la medición de la actividad inhibitoria del ácido 13-*epi*-labdanólico a diferentes concentraciones. Una dilución de la concentración de 5 mg de ácido 13-*epi*-labdanólico en un ml de DMSO al 85 % se preparó. A partir de esta concentración se prepararon siete diluciones con base logarítmica de 2. La actividad inhibitoria de cada concentración se determinó para así poder obtener la CI_{50} , donde se graficó el porcentaje de inhibición obtenido contra el logaritmo de las concentraciones del inhibidor y la línea de tendencia del gráfico se agregó. Mediante la ecuación proporcionada de la línea de regresión se calculó el valor de la CI_{50} , donde “x” es igual a la CI_{50} y “y” es igual al porcentaje de inhibición, en este caso 50 %.

6.9. Determinación del tipo de inhibición del ácido 13-*epi*-labdanólico en la enzima AKR1B1 de conejo

El K_m y la V_{max} de la enzima AKR1B1 de conejo se determinaron en ausencia y presencia de diferentes concentraciones del ácido 13-*epi*-labdanólico y con diferentes concentraciones de gliceraldehído. Las concentraciones partieron de

0.025 μM y en total se prepararon cuatro diluciones con base logarítmica de 2. Los resultados obtenidos se graficaron mediante un gráfico de doble recíproco de Lineweaver-Burk, mismo con el que se determinó el tipo de inhibición.

6.10. Determinación de la constante de inhibición (K_i)

La constante de inhibición (K_i) se determinó al graficar el valor de la pendiente que es igual a K_m/V_{\max} , valores que se obtuvieron del gráfico de Lineweaver-Burk contra las concentraciones del 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 .

6.11. Extracción y asepsia de los ojos de conejo

Los ojos de conejos de la cepa Nueva Zelanda de 3 meses de edad fueron donados del rastro en la posta de la facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, los cuales se enuclearon con tijeras quirúrgicas. Los ojos se transportaron en 100 ml de amortiguador salino de fosfatos (PBS, pH 7,3) con hipoclorito de sodio 10 % (Haddad *et al.*, 1967).



Figura 13. Ojos de conejo en amortiguador de fosfatos salino.

La asepsia se llevó a cabo en una campana de flujo laminar previamente esterilizada con luz ultravioleta. El PBS con el que se transportaron, se decantó para colocar nuevamente 100 ml de PBS con hipoclorito de sodio 10 % y se dejó reposar durante

15 minutos. Transcurrido este tiempo, se decantó y se adicionó nuevamente PBS solamente para enjuagar los restos de la disolución de hipoclorito de sodio. Los ojos se dejan en PBS hasta la extracción del cristalino (figura 13).

6.12. Inducción de la formación de catarata con carbohidratos

Los cristalinos se diseccionaron de los ojos de conejo con la ayuda de un bisturí con el cual se le realizó una pequeña hendidura y luego con tijeras quirúrgicas se cortó lo suficiente para extraer el cristalino. Estos se limpiaron bien del humor vítreo para posteriormente colocarlos en placas de 24 pocillos, los cuales contenían 1.5 ml de medio 199 pH 7.8 (sigma, M3769), HEPES (ácido N-[2-Hidroxietil]piperazin-N´-[2-etanesulfónico] 5.96 g/l (**Bormusov et al., 2012**), suero fetal de bovino 0.5 %, Penicilina-estreptomicina 1 %, Neomicina 0.5 mg/ml, Anfotericina B 2.5 µg/ml y los carbohidratos glucosa (**Reddy et al., 2011**), galactosa (**Kim et al., 2013**) y xilosa (**Lee et al., 2011**) (cuadro 6). Las placas se cultivaron en un ambiente de CO₂ 5 %, humedad 95 % a una temperatura de 37 °C durante 6 días.



Extracción del cristalino de conejo.



Placa de 24 pocillos con medio 199 y cristalinos de conejo.



Incubación de los cristalinos con CO₂ 5 %, humedad 95 % a 37 °C.

El medio 199 se preparó con HEPES como amortiguador de pH en condiciones estériles en una campana de flujo laminar y se filtró junto con el suero fetal de bovino y la mezcla de antibióticos Penicilina-estreptomicina (GIBCO®, 15140).

**Cuadro 6.** Mezcla de cultivo para la inducción de catarata con carbohidratos en cristalinos de conejo.

Reactivos	Volumen (µl)			
	Control	Glucosa (50 mM)	Galactosa (30 mM)	Xilosa (20 mM)
Medio 199 pH 7.8 (suero fetal de bovino 0.5 %, Penicilina-estreptomicina 1 %)	1 467	1 440	1 440	1 440
Neomicina 50 mg/ml	15	15	15	15
Anfotericina B 250 µg/ml	15	15	15	15
Glucosa 2.5 M	3	30	-	-
Galactosa 1.5 M	-	-	30	-
Xilosa 1 M	-	-	-	30

6.13. Efecto del DMSO en la viabilidad de los cristalinos de conejo

Los cristalinos obtenidos por el procedimiento descrito en la sección 1.8 se colocaron en placas de 24 pocillos, los cuales contenían 1.5 ml de medio 199 pH 7.8 (sigma, M3769), suero fetal de bovino 0.5 %, Penicilina-estreptomicina 1 %, Neomicina 0.5 mg/ml, Anfotericina B 2.5 µg/ml y el Dimetilsulfóxido al 1 % (DMSO) (cuadro 7). Las placas se cultivaron en un ambiente de CO₂ 5 %, humedad 95 % a una temperatura de 37 °C durante 6 días.

Cuadro 7. Mezcla de cultivo para la determinación del efecto del DMSO al 1 % en la viabilidad en cristalinos de conejo.

Reactivos	Volumen (µl)			
	Xilosa	Xi + DMSO	Control	Control + DMSO
Medio 199 a pH 7.8 (suero fetal de bovino al 0.5 %, Penicilina-Estreptomicina al 1 %)	1 440	1 425	1 440	1 425
Neomicina 0.5 mg/ml	15	15	15	15
Anfotericina B 2.5 µg/ml	15	15	15	15
Xilosa 20 mM	30	30	-	-
Glucosa 5 mM	-	-	3	3
DMSO al 1 %	-	15	-	15

6.14. Efecto del ácido-13-*epi*-labdanólico en la viabilidad de los cristalinos de conejo

Los cristalinos obtenidos por el procedimiento descrito en la sección 1.8 se colocaron en placas de 24 pocillos, los cuales contenían 1.5 ml de medio 199 pH 7.8 (sigma, M3769), suero fetal de bovino 0.5 %, Penicilina-estreptomina 1 %, Neomicina 0.5 mg/ml, Anfotericina B 2.5 µg/ml y el ácido 13-*epi*-labdanólico a 0.4, 4, 40 y 400 µM (cuadro 8). Las placas se cultivaron en un ambiente de CO₂ 5 %, humedad 95 % a una temperatura de 37 °C durante 6 días.

Cuadro 7. Mezcla de cultivo para la determinación del efecto del ácido 13-*epi*-labdanólico en la viabilidad en cristalinos de conejo.

Reactivos	Volumen (µl)	
	Control	Control + ácido 13- <i>epi</i> -labdanólico
Medio 199 pH 7.8 (suero fetal de bovino 0.5 %, Penicilina-estreptomina 1 %)	1 467	1 452
Neomicina 50 mg/ml	15	15
Anfotericina B 250 µg/ml	15	15
Glucosa 2.5 M	3	3
Ácido 13- <i>epi</i> -labdanólico	-	15

6.15. Inhibición de la formación de catarata con xilosa

Para la evaluación del efecto inhibitorio de la catarata *ex vivo*, el ácido 13-*epi*-labdanólico se solubilizó en DMSO puro (figura 14), donde se partió de la *CI*₅₀ del compuesto para inhibir la actividad enzimática de la AKR1B4 de rata el cual fue de 4 µM (Beltrán-Sánchez, 2015). Cuatro concentraciones se evaluaron las cuales fueron preparadas en una base logarítmica de 10 (0.4, 4 y 40 µM).



Figura 14. Preparación de los inhibidores en DMSO.

Los cristalinicos se obtuvieron de acuerdo a la sección 1.8 y se colocaron en placas de 24 pocillos, los cuales contenían 1.5 ml de medio 199 pH 7.8 (sigma, M3769), suero fetal de bovino 0.5 %, Penicilina-estreptomomicina 1 %, Neomicina 0.5 mg/ml, Anfotericina B 2.5 μ g/ml, Xilosa 20 mM y Quercetina 100 μ M como inhibidor de la catarata ya reportado o el ácido 13-*epi*-labdanólico a las concentraciones 0.4, 4 y 40 μ M (cuadro 9). Las placas se cultivaron en un ambiente de CO₂ 5 %, humedad 95 % a una temperatura de 37 °C durante 4 días.

Cuadro 9. Mezcla de cultivo para la determinación del efecto del ácido 13-*epi*-labdanólico en la formación de catarata con xilosa en cristalinicos de conejo.

Reactivos	Volumen (μ l)		
	Xilosa	Xi + Quercetina	Xi + ácido 13- <i>epi</i> -labdanólico
Medio 199 pH 7.8 (suero fetal de bovino 0.5 %, Penicilina-Estreptomomicina 1 %)	1 440	1 425	1 425
Neomicina 50 mg/ml	15	15	15
Anfotericina B 250 μ g/ml	15	15	15
Xilosa 1 M	30	30	30
Quercetina 10 mM	-	15	-
Ácido 13- <i>epi</i> -labdanólico	-	-	15

6.16. Inhibición de la formación de catarata con Selenito de sodio

La formación de catarata por estrés oxidativo se realizó de acuerdo al método descrito por Radha *et al.*, (2012) y con la utilización de Selenito de sodio. Los cristalinicos obtenidos por el procedimiento descrito en la sección 1.8 se colocaron en placas de 24 pocillos, los cuales contenían 1.5 ml de medio 199 pH 7.8 (sigma, M3769), suero fetal de bovino 0.5 %, Penicilina-estreptomicina 1 %, Neomicina 0.5 mg/ml, Anfotericina B 2.5 µg/ml, Selenito de sodio 100 µM y Quercetina 100 µM como inhibidor de la catarata ya reportado o el ácido 13-*epi*-labdanólico a 4 µM (cuadro 10). Las placas se cultivaron en un ambiente de CO₂ 5 %, humedad 95 % a una temperatura de 37 °C durante 6 días.

Cuadro 10. Mezcla de cultivo para la determinación del efecto del ácido 13-*epi*-labdanólico en la formación de catarata con selenito de sodio en cristalinicos de conejo.

Reactivos	Volumen (µl)				
	Control	Selenito de sodio	Se + Quercetina	Se + ac. 13- <i>epi</i> -labdanólico	Control + ac. 13- <i>epi</i> -labdanólico
Medio 199 pH 7.8 (suero fetal de bovino 0.5 %, Penicilina-estreptomicina 1 %)	1 467	1 440	1 425	1 425	1 452
Neomicina 50 mg/ml	15	15	15	15	15
Anfotericina B 250 µg/ml	15	15	15	15	15
Glucosa 2.5 M	3	-	-	-	3
Selenito de sodio		30	30	30	-
Quercetina 10 mM		-	15	-	-
Ácido 13- <i>epi</i> -labdanólico 0.4 mM		-	-	15	15

6.17. Procesamiento de los datos

Para la determinación de la opacidad formada, se tomaron fotografías a los cristalinicos con los distintos tratamientos cada 24 h durante 6 días en un equipo con el sistema de imagen Gel 200 imaging system, UV transillumination. Las fotografías

de cada cristalino se acomodaron en un mismo tamaño para estandarizar la imagen. Las imágenes se analizaron mediante el programa ImageJ de la siguiente manera:

1. Se midió la intensidad del cristalino: **Analyze/Measure**.
2. Se restó el valor mínimo asignado a toda la imagen: **Process/Math/Subtract**, en **Value** se le colocó el valor mínimo asignado para cada imagen.
3. Se volvió a medir la intensidad del cristalino y este dio igual a cero: **Analyze/Measure**.
4. Se determinó el coeficiente ($256/Max$) y el valor resultante se multiplicó por toda la imagen: **Process/Math/Multiply**, se colocó en **Value** el valor resultante del coeficiente.
5. Para conocer la nueva intensidad total nuevamente se analizó la intensidad: **Analyze/Measure**.
6. Para conocer el número total de píxeles analizados en la imagen se multiplicaron los valores del número de píxeles de la imagen (**Count**) con el valor medio de la intensidad (**Mean**).

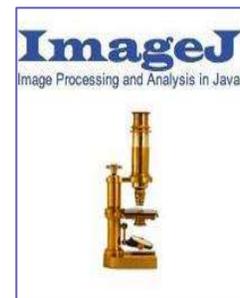
Para este proceso, el área analizada de la imagen del cristalino debe ser el mismo valor, para este experimento fue: $Count = 11214$.



Sistema de imagen
Gel 200 logist.



Estandarización del tamaño de
las fotografías de los cristalinos.



Análisis de los cristalinos
en el programa ImageJ.



VII. RESULTADOS

7.1. Rendimiento de los extractos de *A. jocotepecana* B. L. Turner

A. jocotepecana se colectó en el kilómetro 51 de la carretera Morelia-Zacapu, a una altitud de 2247 msnm, latitud N 19° 42' 216" y W 101° 35' 962". Los rendimientos obtenidos de las maceraciones realizadas a las hojas y tallos de *A. jocotepecana* con los diferentes disolventes se presentan en el cuadro 3. Donde se encontró que el mejor rendimiento lo tiene el extracto hexánico de tallos con un 11.37 %, seguida del extracto metanólico de hojas con 9.02 % y el extracto hexánico de hojas con un 8.9 % (cuadro 11). Sin embargo, de los reportes realizados por García-Sánchez en el 2011, el ácido 13-*epi*-labdanólico se encuentra en mayor proporción en el extracto hexánico de hojas.

Cuadro 11. Rendimiento de los extractos de *Ageratina jocotepecana* B. L. Turner.

Órgano de la planta	Rendimiento (g)		
	Hexánico	Diclorometánico	Metanólico
Hojas (235 g)	21 (8.9 %)	3.5 (1.7 %)	19 (9.02 %)
Tallos (170 g)	19 (11.17 %)	4.5 (3 %)	9.3 (6.35 %)



VIII. DISCUSIÓN

La catarata es la principal causa de ceguera a nivel mundial. Una de las principales causas que acelera la aparición de la catarata es la diabetes mellitus (**OMS, 2014**). La glucosa intracelular tiene varias alternativas metabólicas dependiendo de los requerimientos de la célula. Sin embargo, en el cristalino la hiperglucemia altera la vía de los polioles, la glicación no enzimática y el estrés oxidativo. Los cuales son mecanismos que están implicados en el desarrollo de la catarata.

La AR es la enzima clave en la vía de los polioles, la cual tiene una importante función en el mecanismo de formación de la catarata diabética en cristalinos ya que se demostró que en cristalinos de ratones knockdown existía una resistencia a la opacidad inducida por glucosa (**Reddy et al., 2011**). La inhibición de la AR puede prevenir la formación de catarata. Sin embargo, no existen medicamentos que puedan prevenir la formación de la opacidad. Existen reportes de la efectividad de los IAR de origen sintético que previenen la formación de la catarata diabética en modelos *in vivo*, pero estos carecen de efectividad ya en fase clínica. El Epalrestat es el único inhibidor de la AR que se encuentra en el mercado como tratamiento, pero solo está disponible en la India, China y Japón y es utilizado principalmente para tratar la neuropatía y la nefropatía (**Ramírez y Borja, 2008; Alexiou et al., 2009; Zhu, 2013**). Esto motivó a la búsqueda de nuevas moléculas que tengan el potencial para prevenir la formación de la catarata principalmente aquellas procedentes de fuentes naturales como son las plantas.

En Michoacán se cuenta con una amplia biodiversidad vegetal con escasos estudios fitoquímicos y los metabolitos secundarios de las plantas son prometedores para su uso farmacológico. Este trabajo se realizó con el propósito de encontrar nuevos compuestos que puedan prevenir la formación de catarata en el cristalino aislado de conejo. En el cristalino de conejo se encuentra la enzima AKR1B1 la cual tiene un porcentaje de identidad de un 89.7 % con la enzima AKR1B1 de humano, lo que lo hace un modelo conveniente para evaluar los compuestos IAR comparado con la enzima AKR1B4 que se encuentra en el cristalino de rata, la cual tiene un 87 % de identidad con la enzima de humano.



El ácido 13-*epi*-labdanólico se evaluó para prevenir la formación de catarata y se obtuvo del extracto hexánico de hojas de *Ageratina jocosotepecana* B. L. Turner, este compuesto tiene reportes antimicrobianos tal como lo reporta García-Sánchez en el 2015. La purificación del compuesto se comprobó mediante el método de resonancia magnética nuclear, con la comparativa de las señales características del compuesto con los de la literatura (figura 15).

La Concentración Inhibitoria Media (CI_{50}) es la concentración de un compuesto necesaria para inhibir el 50 % de la actividad de una enzima. Este parámetro se usó para comparar la eficacia del ácido 13-*epi*-labdanólico con los IAR ya reportados.

En la formación de catarata diabética, el principal mecanismo al cual se le atribuye la opacidad es la generación de un estrés osmótico ocasionado por la acumulación de productos polioles por la sobreactividad de la AR. Aunque el mecanismo exacto de la formación de catarata no está claro, varios estudios utilizan diferentes modelos de catarata para buscar compuestos que puedan prevenir la opacidad. El cultivo de cristalino es un modelo muy bien conocido para inducir la catarata por hiperglucemia (**Haddad et al., 1967**).

La Quercetina es un inhibidor no competitivo potente de la AR muy bien establecido y aceptado como control positivo para metabolitos vegetales bioactivos, puede producir una inhibición reversible de la AR bloqueando satisfactoriamente la vía de los polioles que conduce a la formación de la catarata, se reporta que quizá se una a la enzima libre o cerca del sitio activo, pero no al complejo enzima-sustrato (ES) (**Chethan et al., 2008**).

Debido a la efectividad obtenida del ácido 13-*epi*-labdanólico para prevenir la formación de catarata en el cultivo de cristalino aislado de conejo, surge la pregunta de si realmente el compuesto previene la formación de la opacidad en el cristalino debido a la inhibición de la AR o está actuando por un mecanismo alterno.



IX. CONCLUSIONES

En ensayos *ex vivo* el ácido 13-*epi*-labdanólico previene la formación de catarata y mantiene el equilibrio del estado redox en el cristalino de conejo y se propone evaluar el efecto preventivo del ácido 13-*epi*-labdanólico en un modelo *in vivo*.



X. REFERENCIAS

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

American Academy of Ophthalmology. (2013). La diabetes y la catarata. <http://www.aaopt.org/salud-ocular/consejos/la-diabetes-las-cataratas>. Recuperada en marzo 28 del 2016

Arauz-Pacheco C., Ramirez L.C., Pruneda L., Sanborn G.E., Rosenstock J., Raskin P. (1992). The effect of the aldose reductase inhibitor, podarestat, on the progression of diabetic retinopathy. *Journal of Diabetes and Its Complications*. 6(2), 131-137

Asha R., Devi V.G., Abraham A. (2016). Lupeol, a pentacyclic triterpenoid isolated from *Vernonia cinerea* attenuate selenite induced cataract formation in Sprague Dawley rat pups. *Chemico-Biological Interactions*. 245, 20-29

Barski O.A., Tipparaju S.M. and Bhatnagar A. (2008). The aldo-keto reductase superfamily and its role in drug metabolism and detoxification. *Drug Metabolism Reviews*. 40(4), 553-624

Beltrán-Sánchez. (2015). Exploración de metabolitos secundarios de extractos de plantas nativas de Michoacán como inhibidores de la enzima aldosa reductasa. *Tesis de Maestría*, IIQB-UMSNH.

Bormusov E., Dovrat A., Chevion M. y Reznick A.Z. (2012). Antioxidants prevention of diabetic damage in the organ culture bovine lenses. *Metabolomics*. S:1-004, 1-7

Chethan S., Dharmesh S.M., Malleshi N.G. (2008). Inhibition of aldose reductase from cataracted eye lenses by finger millet (*Eleusine coracana*) polyphenols. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 16, 10085-10090

Chylack L.T., Kinoshita H. (1972). The interaction of the lens and the vitreous I. The high glucose cataract in a lens-vitreous preparation. *Experimental Eye Research*. 14, 58-64

Dagher Z., Seek P.Y., Asnaghi V., Hoehn T., Gerhardinger C., Lorenzi M. (2004). Studies of rat and human retinas predict a role for the polyol pathway in human diabetic retinopathy. *American Diabetes Association*. 53, 2404-2411

Demetzos C., Dimas K.S. (2001). Labdane-type diterpenes: chemistry and biological activity. *Studies in Natural Products Chemistry*. 25, 235-292

DeRuiter J., Brubaker A.N., Whitmer W.L., Stein J.L. (1986). Synthesis and aldose reductase inhibitory activity of substituted 2-Oxoquinoline-1-acetic acid derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*. 29(10), 2024-2028

Derylo B., Babazono T., Glogowski E., Kapor-Drezgic J., Hohman T., Whiteside C. (1998). High glucose-induced, mesangial cell altered contractility: role of the polyol pathway. *Diabetologia*. 41, 507-515

Díaz-Flores M., Baiza-Gutman L.A., Ibáñez-Hernández M.A., Pascoe-Lira D., Guzmán-Greenfel A.M., Kumate-Rodríguez J. (2004). Aspectos moleculares del daño tisular inducido por la hiperglucemia crónica. *Gaceta Médica de México*. 140(4), 437-448

El-Kabbani O., Darmanin C., Schneider T.R., Hazemann I., Ruiz F., Oka M., Joachimiak A., Schulze-Briese C., Tomizaki T., Mitschler A., Podjarny A. (2004). Ultrahigh resolution drug desing. II. Atomic resolution structures of human aldose reductase holoenzyme complexed with fidarestat and minalrestat: implications for the binding of cyclic imide inhibitors. *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics*. 55, 805-813

Frija L.M.T., Frade R.F.M., Afonso C.A.M. (2011). Isolation, chemical, and biotransformation routes of labdane-type diterpenes. *Chemical Reviews*. 111, 4418-4452



García-Sánchez. (2014). Caracterización etnofarmacológica de especies de *Eupatorium* nativas de Michoacán. *Tesis de Doctorado*, IIQB-UMSNH.

García-Sánchez E., Ramírez-López C.B., Talavera-Alemán A., León-Hernández A., Martínez-Muñoz R.E., Martínez-Pacheco M.M., Gómez-Hurtado M.A., Cerda-García-Rojas C.M., Joseph-Nathan P., Del Río R.E. (2015). Absolute configuration of (13*R*)- and (13*S*)-labdane diterpenes coexisting in *Ageratina jocotepecana*. *Journal Natural Products*. 77, 1005-1012

Haddad H.M., Shore B., Furman M. y Okas S. (1967). Lens organ culture. *American Journal of Ophthalmology*. 63(6), 1731-1737

Hayman S. and Kinoshita J.H. (1965). Isolation and properties of lens aldose reductase. *The Journal of Biological Chemistry*. 240(2), 877-882

Healthy Sight Institute y Transitions Optical. (2008). Diabetes and the eye. http://en-us.transitions.com/NR/rdonlyres/2BA02235-668C-437D-9C65-6A76B8DA3B69/0/0600446_Whitepap_singlepagerevised.pdf. Recuperada en octubre 28 del 2016

Hers HG. (1956). The Mechanism of the transformation of glucose in fructose in the seminal vesicles. *Biochimica et Biophysica*. 22(1), 202-203

Hollis H.D., Jhonson J.L., Werbel L.M., Leopold W.R., Jackson R.C. and Elslager E.F. (1984). *N*-[[5-(Trifluoromethyl)-6-methoxy-1-naphthalenyl]thioxomethyl]-*N*-methylglycine (Tolrestat), a potent, orally active aldose reductase inhibitor. *Journal of Medicinal Chemistry*. 27(3), 255-256

Hotta N., Akanuma Y., Kawamori R., Matsuoka K., Oka Y., Shichiri M., Toyota T., Nakashima M., Yoshimura I., Sakamoto N. and Shigeta Y. (2006). Long-term clinical effects of Epalrestat, an aldose reductase inhibitor, on diabetic peripheral neuropathy. *Diabetes Care*. 29(7), 1538-1544



Inskeep P.B., Ronfeld R.A., Peterson M.J., Gerber N. (1994). Pharmacokinetics of the aldose reductase inhibitor, Zopolrestat, in humans. *Pharmacokinetics*. 34(7), 760-766

Ji L., Li C., Shen N., Huan Y., Liu Q., Liu S., Shen Z. (2015). A simple and stable galactosemic cataract model for rats. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 8(8), 12874-12881

Kim C-S., Kim J., Lee Y.M., Sohn E., Jo K. y Kim J.S. (2011). Inhibitory effects of chlorogenic acid on aldose reductase activity *in vitro* and cataractogenesis in galactose-fed rats. *Archives of Pharmacal Research*. 34(5), 847-852

Kim J., Kim C-S., Lee Y-M., Sohn E., Jo K., Shin S.D., Kim J.S. (2013). Scopoletin inhibits rat aldose reductase activity and cataractogenesis in galactose-fed rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 1-8

Kim T.H., Kim J.K., Kang Y-H., Lee J-Y., Kang I.J., Lim S.S. (2013). Aldose reductase inhibitory activity of compounds from *Zea mays* L. *BioMed Research International*. 1-8

Kim Y.S., Kim N.H., Yoo N.H., Lee Y.M., Jeong I-H., Kim J.S. (2011). Quercitrin gallate inhibits aldose reductase activity and xylose-induced lens opacity and oxidation. *Biomedicine & Aging Pathology*. 1, 123-127

Kinoshita J.H. (1974). Mechanisms initiating cataract formation. *Investigative Ophthalmology*. 13(10), 713-724

Lee J., Jang D.S., Kim N.H., Lee Y.M., Kim J., Kim J.S. (2011). Gallyol glucoses from the seeds of *Cornus officinalis* whit inhibitory activity against protein glycation, aldose reductase, and cataractogenesis *ex vivo*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 34(3), 443-446

León-Hernández, A. (2010). Actividad citotóxica de *Eupatorium cardiophyllum*. *Tesis de Maestría*, IIQB-UMSNH



Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. 265-275

Matsumoto T., Ono Y., Kuromiya A., Toyosawa K., Ueda Y. and Brill V. (2008). Long-term treatment with ranirestat (AS-3201), suppresses diabetic neuropathy and cataract formation in rats. *Journal of Pharmacological Sciences*. 107, 340-348

Mylari B.L., Larson E.R., Beyer T.A., Zembrowski W.J., Aldinger C.E., Dee M.F., Siegel T.W. and Singleton D.H. (1991). Novel, potent aldose reductase inhibitors: 3,4-dihydro-4-oxo-3-[[5-(trifluoromethyl)-2-benzothiazolyl]methyl]-1-phthalazine-acetic acid (Zopolrestat) and congeners. *Journal of Medicinal Chemistry*. 34, 108-122

Oates P.J. (2008). Aldose reductase, still a compelling target for diabetic neuropathy. *Current Drug Targets*. 9, 14-36

Obazawa H., Merola L.O. y Kinoshita J.H. (1974). The effects of xylose on the isolated lens. *Investigative Ophthalmology*. 13(3), 204-209

Organización Mundial de la Salud. (2013). Proyecto de plan de acción para la prevención de la ceguera y la discapacidad visual evitables 2014-2019. 66.^a Asamblea Mundial de la Salud. A66/11 1-21

Organización Mundial de la Salud. (2014). Ceguera y discapacidad visual. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs282/es/>. Recuperada en octubre 28 del 2016

Ohta Y, Torii H, Okada H, Hattori H, Majima Y, Ishiguro I. (1996). Involvement of oxidative stress in D-xylose-induced cataractogenesis in cultured rat lenses. *Current Eye Research*. 15(1) 1-7

Radha A., Rukhmini D.S., Vilasini S., Sakunthala P.R., Sreedharan B., Velayudhan M.P., Abraham A. (2012). Bioactive derivatives of curcumin attenuate cataract formation *in vitro*. *Chemical Biology drug design*. 80, 887-892



Ramírez-Lopez B. (2009). Protección de la madera de *Quercus rugosa* Née y *Pinus* sp. Con extractos de *Eupatorium cardiophyllum* B. L. Rob. Tesis de Maestría. FITECMA-UMSNH

Ramirez M.A. y Borja N.L. (2008). Epalrestat: an aldose reductase inhibitor for the treatment of diabetic neuropathy. *Pharmacotherapy*. 28(5), 646-655

Reddy A.B., Tammali R., Mishra R., Srivastava S. (2011). Aldose reductase deficiency protects sugar-induced lens opacification in rats. *Chemico-Biological Interactions*. 191, 346-350

Rondeau J.M., Tête-Favier F., Podjarny A., Reymann J.M., Barth P., Biellmann J.F. and Moras D. (1992). Novel NADPH-binding domain revealed by the crystal structure of aldose reductase. *Nature*. 355, 469-472

Sasikala V., Rooban B.N., Siva Priya S.G., Sahasranamam V., Abraham A. (2010). *Moringa oleifera* prevents selenite-induced cataractogenesis in rat pups. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. 26(5), 441-446

Schade S.Z., Early S.L., William T.R., Kezdy F.J., Henrikson R.L., Grimshaw C.E. and Doughty C.C. (1990). Sequence analysis of bovine lens aldose reductase. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology*. 265(7), 3628-3635

Shearer T.R., Ma H., Fukiage C., Azuma M. (1997). Selenite nuclear cataract: Review of the model. *Molecular Vision*. 3(8), 1-9

Srivastava S.K., Ramana K.V., and 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

Sun W., Oates P.J., Coutcher J.B., Gerhardinger C. and Lorenzi M. (2006). A selective aldose reductase inhibitor of a new structural class prevents or reverses early retinal abnormalities in experimental diabetic retinopathy. *American Diabetes Association*. 55, 2757-2762



Suryanarayana P., Kumar P.A., Saraswat M., Petrash J.M. y Reddy G.B. (2004). Inhibition of aldose reductase by tannoid principles of *Emblica officinalis*: implications for the prevention of sugar cataract. *Molecular Vision*. 10, 148-154

Van Heyningen R. (1959). Formation of polyols by the lens of the rat with "sugar" cataract. *Nature*. 184(4681), 194-195

Van Z.M.C., Jones M.L., Gunn D.E., Geraci L.S., Jones J.H., Sawicki D.R., Sredy J., Jacot J.L., DiCioccio A.T., Petrova T., Mitschler A. and Podjarny A.D. (2005). Discovery of 3-[(4,5,7-trifluorobenzothiazol-2-yl)methyl]indole-*N*-acetic acid (Lidorestat) and congeners as highly potent and selective inhibitors of aldose reductase for treatment of chronic diabetic complications. *Journal of Medicinal Chemistry*. 48, 3141-3152

Zhu C. (2013). Aldose reductase inhibitors as potential therapeutic drug of diabetic complications. *Diabetes Mellitus-Insights and Perspectives*. 23, 17-46