



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**Búsqueda de compuestos inhibidores de la Aldosa
Reductasa en *Enterolobium cyclocarpum* y
Tabebuia spp**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA:

Q.F.B. LIDIA ALEJANDRA ZARAGOZA CAMACHO

ASESOR:

D.C. MAURO MANUEL MARTÍNEZ PACHECO

DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL CON ESPECIALIDAD EN BIOQUÍMICA:

CO-ASESOR:

D. C. ROSA ELVA NORMA DEL RÍO TORRES

DOCTORA EN CIENCIAS QUÍMICAS:

Marzo de 2017, Morelia Mich.

El presente proyecto de investigación se realizó en el Laboratorio de Fisiología Celular, Laboratorio de Productos Naturales y Laboratorio de Biotecnología Animal-IIAF-CMEB pertenecientes a la Universidad Michoacana de San Nicolás con la asesoría del DC. Mauro Manuel Martínez y la DC. Rosa Elva Norma del Río Torres.

DEDICATORIA

Esta tesis se la dedico a Dios, a mi hermano Joel por todo su apoyo en mis estudios y en especial a mi mami que siempre está pendiente de mí. GRACIAS POR TODO.

*"Quien quiere hacer algo encuentra un medio,
quien no quiere hacer nada encuentra una excusa"*

Proverbio árabe

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a Dios por permitirme un logro más en mi vida. A mi familia por ser mi mayor motivación e inspiración, a mis papás José María y Teresa gracias por su amor incondicional por los valores que me inculcaron que son la base de mi educación.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, a la Facultad de Químico Farmacobiología, al Instituto de Investigaciones Químico Biológicas por abrirme las puertas para mi formación académica.

Gracias a CONACyT por la beca otorgada durante todo este proceso.

A mis hermanos a Joel, Vero, Chema, Mariela, Leticia y Margarita gracias por apoyarme siempre y por sus palabras de motivación, en especial a mi hermano Joel gracias por su bondad, su generosidad y por creer en mí.

Al DC. Mauro, gracias por la confianza, tiempo, tenacidad, orientación, exigencia, comprensión, compromiso, motivación y por sus consejos para seguir superándome. Gracias por su amistad.

A la DC. Rosy por su paciencia y apoyarme en la parte química de éste proyecto.

A DC. Marcos por abrirme las puertas de su laboratorio.

Gracias MC. Alberto por su apoyo, pero sobre todo por su amistad.

A mis compañeros de laboratorio a la MC. María Eugenia, Quique, la niña Karen, la MC. Dochi, Tania, Rocio, Dulce, Celeste, Meli, Roberto, Luz, por alentarme en momentos de angustia. Gracias a mis amigos por compartir sus experiencias para darme ánimo y no dejarme vencer por los problemas.

A mis compañeras de generación Celeste, Nancy, Sarita, Peni, Lupita, Manju y Claudia por los momentos de apoyo, mil gracias niñas.

Un agradecimiento muy especial al MC. Roberto por formar parte de mi vida, apoyarme y no dejarme rendir nunca.

ÍNDICE

I INTRODUCCIÓN	1
II ANTECEDENTES	2
2.1 Vía de los polioles	2
2.2 Aldosa Reductasa	3
2.3 Inhibidores de la Aldosa Reductasa (AKR1B1)	5
2.4 Catarata	7
2.5 Plantas medicinales	9
III JUSTIFICACIÓN	12
IV HIPÓTESIS	13
V OBJETIVO GENERAL	14
VI OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
VII ESTRATEGIA GENERAL	15
VIII MATERIALES Y MÉTODOS	16
8.1 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES	16
8.1.1 Obtención de los extractos de <i>Enterolobium cyclocarpum</i> , <i>Tabebuia rosea</i> y <i>donnell-smithii</i>	16
8.2 OBTENCIÓN DE LOS CRISTALINOS DE RATA	18
8.3 METODO DE LOWRY	18
8.4 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA ALDOSA REDUCTASA (AKR1B4)	19
8.4.1 Actividad enzimática <i>in vitro</i> de la AKR1B4	19
8.4.2 Determinación de la actividad de la AKR1B4 por consumo de NADPH	19
8.4.3 Actividad enzimática <i>in vitro</i> de la AKR1B4 en presencia de DMSO	21
8.5 INHIBICIÓN DE LA ALDOSA REDUCTASA (AKR1B4)	21
8.5.1 Inhibición enzimática <i>in vitro</i> de la AKR1B4 en presencia de quercetina ..	21
8.5.2 Selección de la concentración del extracto vegetal	21
8.5.3 Ensayo de inhibición <i>in vitro</i> de la AKR1B4	21
8.6 ESPECTROMETRÍA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDRÓGENO (RMN- ¹ H)	22
8.7 DETERMINACIÓN DE LA CI_{50} DEL PINITOL EN LA AKR1B4	22
8.8 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS DEL PINITOL EN LA AKR1B4	23
8.8.1 Tipo de inhibición	23

8.9 DOCKING MOLECULAR	23
8.9.1 Preparación de la Aldosa Reductasa (AKR1B1) (macromolécula) y del pinitol (ligando)	23
8.9.2 Mapa de búsqueda y Autodock Vina	23
8.10. Determinación del efecto del pinitol en la viabilidad de los cristalinos	24
8.10.1 Determinación del efecto preventivo del pinitol en la formación de la catarata diabética	25
8.10.2 Determinación del efecto protector del pinitol en la formación de la catarata por estrés oxidativo	25
IX DISCUSIÓN	27
X CONCLUSIONES	29
XI BIBLIOGRAFÍA	30

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vía de los polioles.....	2
Figura 2. Estructura tridimensional de las aldo-ceto reductasas.....	4
Figura 3. Sitios de unión del sitio activo de la AR.....	5
Figura 4. Localización de Michoacán	9
Figura 5. El ácido 13- <i>epi</i> -laddanólico.....	11
Figura 6. Obtención y procesamiento de especímenes de <i>T. rosea</i> y <i>T. donnell-smithii</i>	16
Figura 7. Obtención del polvo de <i>E. cyclocarpum</i>	17
Figura 8. Extracción y obtención de extractos.....	18
Figura 9. Obtención del cristalino de rata.....	18
Figura 10. Curva de calibración de BSA por el método de Lowry.....	19
Figura 11. Esquema de la reacción enzimática de la AR.....	19
Figura 12. Obtención del cristalino de conejo.....	24
Figura 13. Proceso para la obtención de las fotografías de los cristalinos.....	25

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Estructuras químicas de compuestos IAR.....	6
Cuadro 2. Parámetros de la AR en ensayos <i>in vitro</i>	8
Cuadro 3. Parámetros de la AR en ensayos <i>ex vivo</i>	9
Cuadro 4. Géneros en estudio de especies recolectadas en Michoacán.....	10
Cuadro 5. Mezcla de reacción para determinar la actividad enzimática AKR1B4 (1).....	20
Cuadro 6. Mezcla de reacción para determinar la actividad enzimática AKR1B4 (2)	22

RESUMEN

La Aldosa Reductasa (AKR1B1) es una enzima monomérica citosólica, es limitante en la vía de los polioles reduce glucosa a sorbitol, ésta vía metabólica en condiciones normoglucémicas realiza funciones de desintoxicación celular. Sin embargo, en condiciones de hiperglucemia produce acumulación de sorbitol intracelular, éste induce un estrés osmótico que afecta a las fibras del cristalino, conduce a lisis celular y causa la formación de catarata diabética. Los inhibidores de la Aldosa Reductasa (IAR) son escasos y tienen efectos adversos a la salud, debido a ello se establece la oportunidad de buscar y obtener IAR de origen vegetal. En el presente trabajo en cristalinos de rata se determinó la actividad inhibitoria de la AKR1B4 por los extractos de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb., *Tabebuia rosea* (Bertol.) DC. y *T. donnell-smithii* Rose, los extractos se obtuvieron por maceración sucesiva con disolventes con polaridad ascendente hexano, cloruro de metileno y metanol. La actividad de la AKR1B4 se determinó por el consumo de NADPH, de los 33 extractos obtenidos el extracto metanólico de *E. cyclocarpum* de Veracruz inhibió a la enzima un 95 %. El compuesto pinitol se identificó de éste extracto por RMN-¹H y presentó inhibición enzimática del 90 %, con una CI₅₀ de 9.26 µM y una inhibición no competitiva *in vitro*. En ensayos *ex vivo* en cristalinos de conejo (AKR1B1) el pinitol tiene efecto inhibitorio de la AKR1B4 y efecto protector del estado redox del cristalino.

Palabras claves: Aldosa Reductasa, extractos vegetales, inhibición enzimática, vía de los polioles, pinitol.

ABSTRACT

Aldose Reductase (AKR1B1) is a cytosolic monomeric enzyme, is limiting in the pathway of the polyols reduces glucose to sorbitol; this metabolic pathway under normoglycemic conditions performs cellular detoxification functions. However, under conditions of hyperglycemia produces accumulation of intracellular sorbitol, this induces osmotic stress that affects the fibers of the lens, conducts cellular lysis and causes the formation of diabetic cataract. Inhibitors of Aldose Reductase (IAR) are scarce and have adverse effects on health; because of this the opportunity to seek and obtain IAR of vegetal origin is established. In the present work on rat crystals the inhibitory activity of AKR1B4 was determined by the extracts of *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. *Tabebuia rosea* (Bertol.) DC. and *T. donnell-smithii* Rose, the extracts were obtained by successive maceration with ascending polarity solvents hexane: methylene chloride and methanol. The activity of AKR1B4 was determined by the consumption of NADPH, out of the 33 extracts obtained the methanolic extract of *E. cyclocarpum* from Veracruz inhibited the enzyme by 95%. The pinitol compound was identified with ¹H-NMR by this extract and showed 90% enzymatic inhibition, with an CI_{50} of 9.26 μ M and a non-competitive inhibition *in vitro*. In *ex vivo* essays on rabbit lens (AKR1B1), pinitol has an inhibitory effect on AKR1B4 and a protective effect on the redox state of the lens.

Key words: Aldose reductase, plants extracts, enzymatic inhibition, polyol pathway, pinitol.

I INTRODUCCIÓN

Las plantas son organismos sésiles que tienen mecanismos fisiológicos para responder a estímulos bióticos y abióticos, mediante metabolitos secundarios, aunque su función exacta se desconoce en los procesos vitales de la planta. Los metabolitos secundarios se producen en el desarrollo de la planta y son una excelente oportunidad para el aislamiento, identificación, purificación y su posible aplicación farmacológica. En México tradicionalmente se utilizan las plantas con fines curativos, por diferentes grupos étnicos en la medicina tradicional. Las plantas medicinales son base importante para búsqueda de nuevos compuestos con efectos farmacológicos no tóxicos y específicos, eficientes en el control de enfermedades humanas y así mismo en el desarrollo de nuevos fármacos.

La Aldosa Reductasa (AKR1B1) es la primera enzima en la vía de los polioles reduce la glucosa a sorbitol mediante la coenzima NADPH. Posteriormente, el sorbitol se oxida a fructosa por la enzima Sorbitol Deshidrogenasa (SD). Dicha vía metabólica en condiciones normoglucémicas realiza funciones de desintoxicación celular. Sin embargo, en condiciones de hiperglucemia; provoca un desequilibrio osmótico en las fibras del cristalino y produce catarata diabética. Con la finalidad de prevenir la formación de catarata diabética se reportan compuestos inhibidores de la Aldosa Reductasa (IAR), éstos son derivados de dos grupos funcionales y son escasos. La mayoría presentan deficiencias farmacológicas, algunos causan efectos secundarios no deseados y otros son ineficientes para penetrar los tejidos. El Epalrestat es el único producto farmacéutico que se encuentra de manera comercial en China e India. Los compuestos obtenidos del metabolismo secundario vegetal representan la oportunidad para la búsqueda de compuestos con actividad inhibitoria de la enzima AR, en el Reino Plantae. Por tal motivo a continuación estableceré las bases teóricas y experimentales que conforman éste trabajo de investigación.

II ANTECEDENTES

2.1 Vía de los polioles

La vía de los polioles es controlada por dos enzimas: la Aldosa Reductasa y la Sorbitol Deshidrogenasa. La reacción de la conversión de glucosa a sorbitol catalizada por la AR fue identificada por primera vez en 1956 por Hers en las vesículas seminales donde la glucosa se convierte en fructosa para proporcionar energía a los espermatozoides. Tiempo después en 1959 Van Heyningen, determinó que el sorbitol se encuentra en los cristalinos de rata diabética. En 1965 Kinoshita, reportó por primera vez en los cristalinos de ratas los efectos patogénicos de la AR asociada a la vía de los polioles, debido a esto surge la primera hipótesis que el estrés osmótico participa en la formación de catarata diabética. Diversas publicaciones apoyan la hipótesis que el mecanismo de iniciación en la formación de la catarata diabética es por la participación de la vía de los polioles, lo que resulta en un aumento del estrés osmótico en las fibras del cristalino que ocasiona hinchazón y ruptura celular (Figura 1) (Brownlee, 2006; Pollreisz y Schmidt 2010; Chistiakov, 2011; Zhu, 2013).

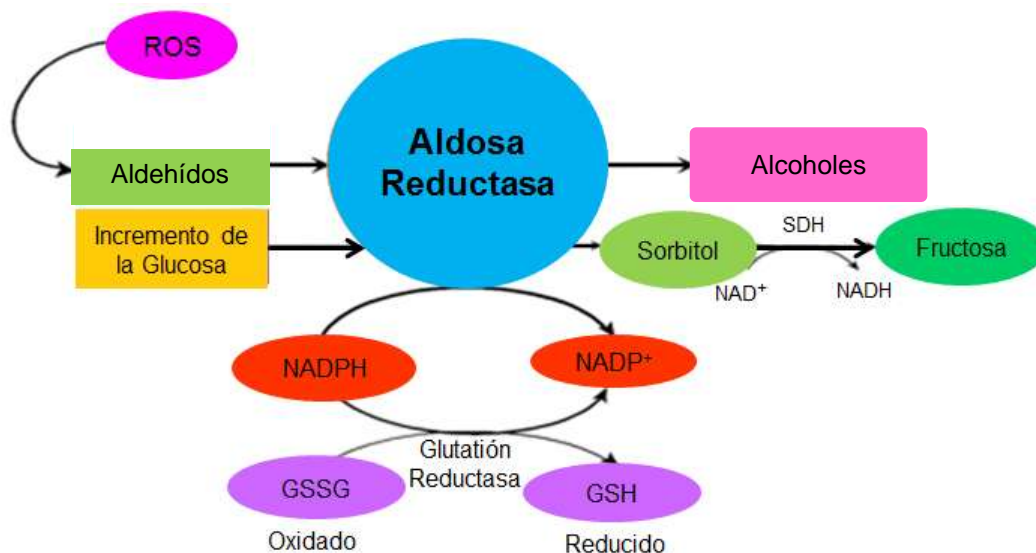


Figura 1. Vía de los polioles (Brownlee, 2006).

En la vía de los polioles acontecen dos fenómenos en concentraciones diferentes de glucosa; en condiciones normoglucémicas aproximadamente el 3 % de la glucosa es reducida a sorbitol. Sin embargo, en condiciones hiperglucémicas más del 33 % de la glucosa es metabolizada. En condiciones normoglucémicas, la AKR1B1 participa en el proceso de desintoxicación celular, pero en condiciones hiperglucémicas, la Aldosa Reductasa reduce la glucosa a sorbitol, que posteriormente se oxida a la fructosa por la enzima Sorbitol Deshidrogenasa. En el proceso de la reducción de la glucosa a sorbitol, la AKR1B1 utiliza la coenzima NADPH, también esencial para la generación intracelular de glutatión reducido intracelular, al disminuir la cantidad de glutatión reducido aumenta la susceptibilidad de estrés oxidativo intracelular (Petrasch *et al.*, 2004; Brownlee, 2006).

2.2 Aldosa Reductasa

La Aldosa Reductasa (AKR1B1, nomenclatura en humano y conejo) es una enzima citosólica que pertenece a la superfamilia de las aldo-ceto reductasas que cataliza la reducción de glucosa a sorbitol dependiente de NADPH. La AKR1B1 se expresa en riñón, tejido mieloide, epidídimo, placenta, glándula suprarrenal y ojo (córnea, cristalino y retina). En éstos órganos en condiciones normales de homeóstasis la enzima tiene diversas funciones: desintoxicación celular mediante una reducción de aldehídos a alcoholes, regulación osmótica y maduración de espermatozoides (Petrasch, 2004; Alexiou, 2009; Tang *et al.*, 2012).

La AKR1B1 se encuentra en procariontes, protozoos, levaduras, plantas y animales entre ellos el humano; se describen más de 100 integrantes de ésta familia, basado en el nivel de homología de secuencia, la superfamilia AKRs se divide en 15 familias y algunas de estas se dividen en subfamilias. Las integrantes de cada familia comparten más del 40 % de homología entre sí y menos del 40 % con los integrantes de cualquier otra familia. La mayoría de AKRs catalizan

reacciones de óxido-reducción de grupos carbonilo como aldehídos y cetonas (Barski *et al.*, 2008).

En 1992, las dos primeras estructuras cristalinas de la AR se reportaron, fueron de placenta humana y de cerdo. Estructuralmente, están compuestas por un motivo proteico α/β barril que contiene ocho láminas β paralelas conectadas por ocho hélices α periféricas. El sitio activo se encuentra en el extremo C-terminal del barril β y el cofactor NADPH se une en una conformación extendida a la parte inferior del sitio activo. La enzima tiene un peso molecular de 36 kDa (Figura 2) (Alexiou, 2009; Barski *et al.*, 2008).

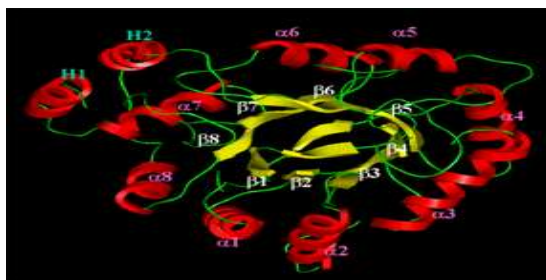


Figura 2. Estructura tridimensional de las aldo-ceto reductasas
(www.med.upenn.edu/akr).

El sitio activo es hidrofóbico formado por residuos aromáticos (Trp20, Tyr48, Trp79, Trp111, Phe121, Phe122 y Trp219); residuos apolares (Val47, Pro218, Leu300 y Leu301); residuos polares (Gln49, Cys298 y His110) y tres posibles donantes de protones (Tyr48, His110 y Cys298). El sitio activo de la enzima con frecuencia cambia su estructura conformacional dependiendo de los inhibidores. Esto indica la flexibilidad molecular del sitio activo, por lo tanto se describen tres distintos sitios de unión en el sitio activo (Figura 3), en acuerdo con las estructuras cristalinas de AR, obtenidas por cristalografía de rayos X y mutagénesis. La primera es el sitio de unión aniónica que se caracteriza por cadenas laterales de Tyr48, His110, Trp20, y Trp111. El segundo es un sitio hidrofóbico, conocido como sitio de especificidad con residuos de Leu300, Cys298, Cys303, Trp111, Cys303 y Phe122. El sitio específico tiene flexibilidad ya que los residuos no se conservan

en otras aldo-ceto reductasas como en las Aldehído Reductasas. El tercero es un sitio hidrofóbico formado por los residuos Trp20, Trp111, Phe122 y Trp219 (Urzhumtsev *et al.*, 1997; Alexiou, 2009; Zhu, 2013).

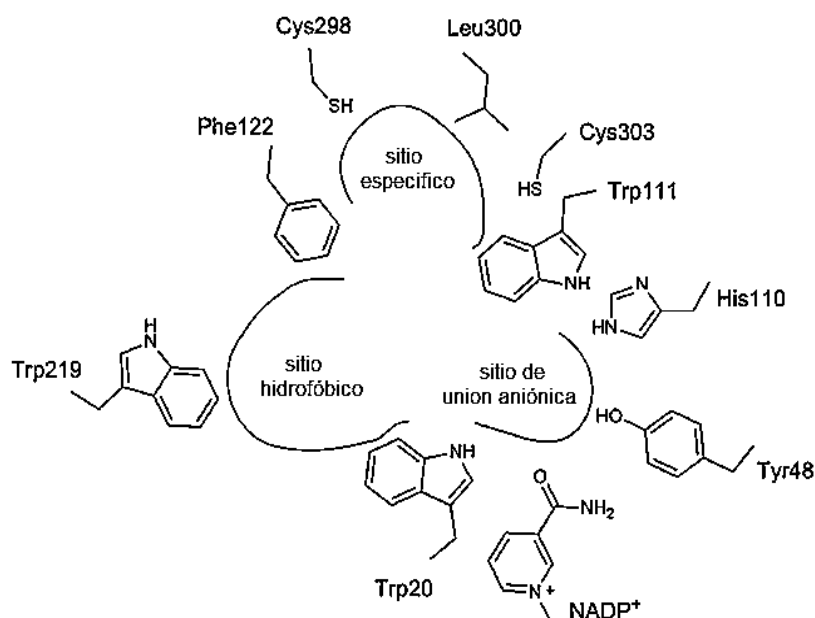


Figura 3. Sitios de unión del sitio activo de la AR (Zhu, 2013).

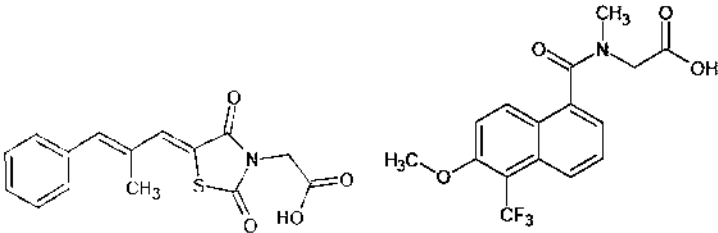
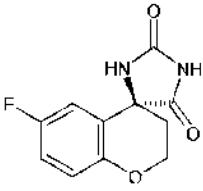
2.3 Inhibidores de la Aldosa Reductasa (AKR1B1)

En las últimas décadas, una serie de compuestos prometedores como IAR poseen una eficacia significativa *in vitro* en modelos de animales. Sin embargo, en la fase de evaluación en los ensayos clínicos no se aprueban por los efectos secundarios indeseados y debido a su perfil farmacológico. La característica común de los IAR es la presencia de uno o más grupos aromáticos que se unen de manera hidrofóbica con la región lipofílica de la enzima. En la actualidad existen dos grupos principales de IAR: los que tienen en su estructura química ácido carboxílico y los derivados de espirohidantoína. Los IAR que tienen ácido carboxílico son químicamente variados y abundantes; éste grupo tiene actividad inhibitoria de la AR debido a la característica estructural del grupo anión carboxilato que se ensambla en el sitio de unión aniónica de la AR. Los IAR Alrestatin, Tolrestat, Epalrestat y Zopolrestat pertenecen al grupo de los ácidos carboxílicos. El

Epalrestat fue descrito en 1983 y comercializado en China e India. El Tolrestat, es un fármaco eficaz para el tratamiento de las complicaciones diabéticas, fue retirado del mercado por provocar toxicidad hepática severa (Alexiou, 2009; Zhu, 2013).

El sorbinil es un IAR derivado de la espirohidantoína, éste fue el primer compuesto capaz de prevenir todo el proceso cataratogénico en rata, es un excelente inhibidor tanto *in vitro* como *in vivo*. Sin embargo, en los ensayos clínicos se determinó que el 10 % de los pacientes tratados con sorbinil presentaron reacciones de hipersensibilidad caracterizadas por fiebre, erupciones en la piel y mialgias debido a un efecto potencialmente tóxico en el hígado. La interacción de unión en el sitio activo de la AR, es el anillo de hidantoína que interactúa en el sitio de unión aniónica al igual que los inhibidores que tienen ácido carboxílico (Cuadro 1) (Alexiou, 2009; Zhu, 2013).

Cuadro 1. Estructuras químicas de compuestos IAR (Alexiou, 2009; Zhu, 2013).

Grupo de IAR	Nombre y estructura química
Derivados del ácido carboxílico	 <p data-bbox="542 1461 691 1495">Elparestat</p> <p data-bbox="1049 1461 1175 1495">Tolrestat</p>
Espirohidantoína	 <p data-bbox="893 1764 997 1797">Sorbinil</p>

2.4 Catarata

La enzima AKR1B1 cataliza la reducción de glucosa en sorbitol a través de la vía de los polioles, éste es un proceso que se relaciona con el desarrollo de la catarata diabética, la acumulación de sorbitol aumenta la presión osmótica en las células de las fibras del cristalino y causa hinchazón, formación de vacuolas de agua y eventualmente opacidad irreversible del cristalino. En el cristalino, el sorbitol se produce más rápido de lo que se convierte en fructosa por la enzima Sorbitol Deshidrogenasa, una característica del sorbitol es que es compuesto polar lo que impide su eliminación intracelular mediante la difusión, éste incremento en la concentración de sorbitol genera un efecto hiperosmótico (Pollreisz y Schmidt 2010; Wang *et al.*, 2014).

La catarata es la opacidad del cristalino por una pérdida indolora y gradual de la visión, es la principal causa de ceguera en el mundo y la diabetes es un factor importante que predispone la formación de catarata. La pérdida de visión depende del tamaño y la ubicación de la catarata, pueden estar situados en el centro del cristalino (nuclear), en la superficie de la corteza (cortical), o en el área subcapsular posterior. También se puede clasificar según su color, ya que corresponde con la ubicación y la densidad; amarillo pálido son opacidades leves de la corteza, región subcapsular, o ambos; amarillas o marrones claro opacidad de moderada a intensa de la corteza, núcleo, o ambos; por último el color marrón está asociado con la catarata nuclear densa. Distintos factores están implicados en la aparición de la catarata, envejecimiento (catarata senil), tabaquismo, exposición a UV-B, estrés oxidativo, diabetes, obesidad, medicamentos, exposiciones a esteroides, a metales pesados como el cadmio, cobre, plomo y hierro (Head, 2001).

El cristalino es una estructura transparente que es parte del ojo, cuya función es refractar la luz. La transparencia es una característica indispensable para el funcionamiento adecuado del cristalino y es debido al acomodo de las proteínas estructurales llamadas cristalinas. En mamíferos las fibras del cristalino son parte

de tres familias α -, β - y gamma-cristalinas: la α -cristalina es una chaperona su función es proteger el cristalino contra la formación de la catarata diabética mediante la agregación no específica de proteínas sub-lenticulares, la disminución en la actividad de la chaperona α -cristalina predispone a la formación de catarata diabética (Sankeshi *et al.*, 2013). La acumulación intracelular de sorbitol conduce al estrés osmótico en el cristalino e induce apoptosis en las células epiteliales, que finalmente resulta en el desarrollo de catarata diabética (Kinoshita, 1965, 1974; Li *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1995; Takamura *et al.*, 2001).

En experimentos *in vitro* determinaron los niveles de AKR1B4 y de sorbitol en ratas diabéticas. Como se puede observar en el cuadro 2, los niveles de AR y el sorbitol aumentaron significativamente comparados con el grupo control (Sankeshi *et al.*, 2013).

Cuadro 2. Niveles de AKR1B4 y sorbitol en ratas diabéticas inducidas con STZ (Sankeshi *et al.*, 2013).

Parámetros	Control normal (Grupo I)	Control diabético (Grupo II)
AR	36.50 \pm 1.32	47.39 \pm 0.03*
Sorbitol	34.19 \pm 0.11	77.76 \pm 0.013*

Los datos son la media \pm SD (n=5). * Estadísticamente significativos con el grupo I (análisis de ANOVA; $p \leq 0,05$).

Por otra parte en el ensayo *ex vivo* en el grupo control obtuvieron niveles normales tanto para la AKR1B4 como para el sorbitol, no así para el grupo tratado con 50 mM glucosa donde los niveles se incrementaron significativamente (Cuadro 3) (Sankeshi *et al.*, 2013).

Cuadro 3. Actividad de la AKR1B4 (μ moles de oxidación de NADPH/h/100 mg de proteína) y sorbitol (nmoles/g en lentes) (Sankeshi *et al.*, 2013).

Parámetros	Control normal (Grupo I)	Glucosa 50 mM (Grupo II)
AR	35.75 \pm 1.63	43.98 \pm 2.94*
Sorbitol	29.39 \pm 3.13	74.98 \pm 2.93*

Los datos son la media \pm SD (n=5). * Estadísticamente significativos con el grupo I (análisis de ANOVA; $p \leq 0,05$).

2.5 Plantas medicinales

Las plantas en su ciclo de vida (germinación, crecimiento y reproducción) producen metabolitos secundarios para su defensa y actúan como mensajeros químicos entre las especies, dichos compuestos son de interés farmacológico por sus propiedades descritas en la medicina tradicional. México posee una amplia biodiversidad vegetal de 20 000-30 000 especies vegetales, siendo la familia *Asteraceae* la más abundante. Michoacán posee aproximadamente 5 000 especies vegetales (Figura 4). En la medicina tradicional mexicana existe un grupo de aproximadamente 3 000 plantas medicinales utilizadas para tratamientos de enfermedades comunes, pero la mayoría de estas especies de plantas no tienen un estudio fitoquímico y toxicológico en la investigación farmacológica. Las plantas tienen variabilidad biológica y química que modifican la cantidad de los principios activos, debido a su heterogeneidad química (Ramírez *et al.*, 2010).



Figura 4. Localización de Michoacán (Ramírez *et al.*, 2010).

En Michoacán existe variabilidad genética entre las especies vegetales debido a los diferentes ecosistemas. En nuestro grupo de trabajo son de interés los diferentes géneros vegetales para su estudio fitoquímico por sus posibles propiedades farmacológicas (Cuadro 4), aunque se debe realizar un estudio más detallado para dilucidar su beneficio medicinal (García *et al.*, 2011; Beltrán, 2015).

Cuadro 4. Géneros vegetales de especies recolectadas en Michoacán (Beltrán, 2015).

Género	Usos en la medicina tradicional	Estudios realizados en el grupo de investigación
<i>Ageratina</i>	Paludismo y diarrea	García <i>et al.</i> , 2011; Ramírez <i>et al.</i> , 2011; Beltrán, 2015
<i>Tagetes</i>	Diarrea y vómito	Mejía <i>et al.</i> , 2012
<i>Eupatorium</i>	Problemas digestivos	Ramírez <i>et al.</i> , 2010
<i>Enterolobium</i>	Bronquitis, diarrea e HIPOGLUCÉMICO	Raya <i>et al.</i> , 2008; 2013
<i>Tabebuia</i>	Anticancerígeno, antibiótico e HIPOGLUCÉMICO	Arellano, 2012

Los primeros inhibidores ensayados fueron algunos flavonoides como la quercetina y la naringenina que mostraron una reducción en la concentración de glucosa en sangre en comparación con las ratas control; además reportaron que el consumo oral de éstos flavonoides pueden tener actividad inhibitoria de la AKR1B4 (Goodarzi *et al.*, 2014). El ácido elágico inhiben a la AKR1B4, esto podría prevenir la catarata en ratas diabéticas experimentales debido a la disminución de la concentración de sorbitol (Goodarzi *et al.*, 2006; Akileshwari *et al.*, 2014). En nuestro grupo de trabajo Bertrán en el 2015, realizó una exploración de metabolitos secundarios en extractos de plantas nativas de Michoacán como posibles inhibidores de la enzima Aldosa Reductasa (AKR1B1), de los compuestos ensayados reportó al ácido 13-*epi*-labdanólico (Figura 5) obtenido del tallo de Q.F.B. Lidia Alejandra Zaragoza Camacho

Ageratina jocotepecana por García *et al.*, 2015, como el compuesto que presentó mayor inhibición comparado con el resto de los metabolitos secundarios.

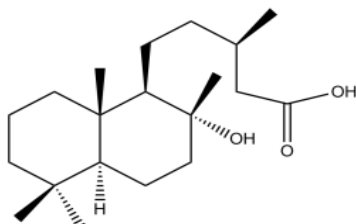


Figura 5. El ácido 13-*epi*-labdanólico (García *et al.*, 2015).

En nuestro grupo de trabajo se obtiene, identifica y purifica a un gran número de compuestos de plantas con diferente actividad biológica (antimicrobiana, antifúngica, antitermita) por ello continua la búsqueda de éstos metabolitos secundarios como alternativa para prevenir diferentes afecciones. Actualmente la prevención de la formación de catarata, representa un desafío, por lo tanto persiste un interés en la investigación de productos naturales debido a la insuficiencia de los métodos para la obtención de compuestos terapéuticos.

III JUSTIFICACIÓN

La contribución de novedosos compuestos inhibidores de la enzima Aldosa Reductasa (AKR1B1) obtenidos de especies vegetales, coadyuvará al aumento del acervo molecular de inhibidores para la prevención de la catarata.

IV HIPÓTESIS

Los compuestos presentes en los extractos de *E. cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. y *Tabebuia* spp presentan actividad inhibitoria de la enzima Aldosa Reductasa.

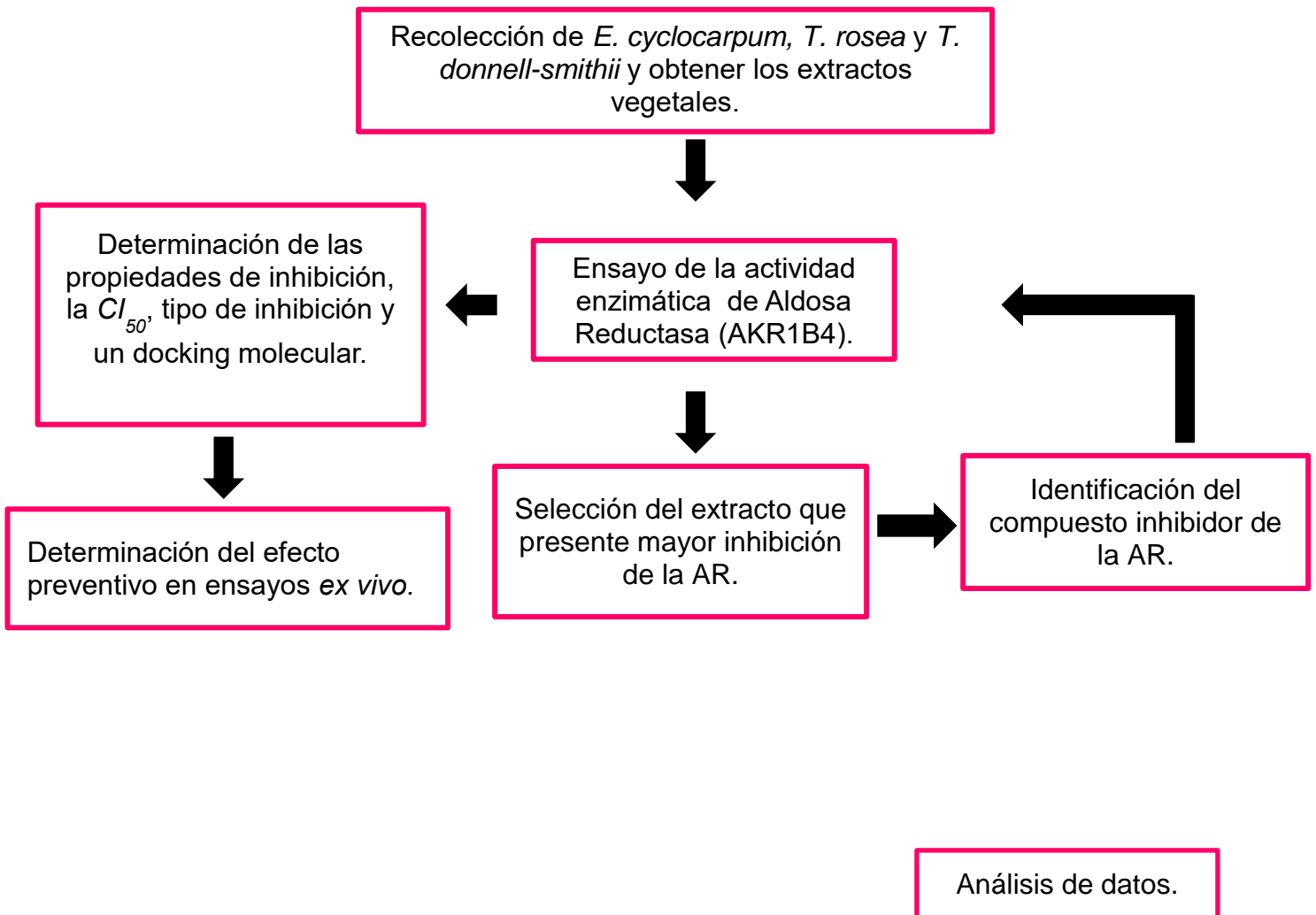
V OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad inhibitoria de los extractos de *E. cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. y *Tabebuia* spp en la enzima Aldosa Reductasa.

VI OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar el compuesto inhibidor de la enzima AR presente en el extracto vegetal con mayor actividad inhibitoria.
2. Determinar el efecto preventivo del compuesto identificado en la formación de la catarata diabética en ensayos *ex vivo*.

VII ESTRATEGIA GENERAL



VIII MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES

8.1.1 Obtención de los extractos de *Enterolobium cyclocarpum*, *Tabebuia rosea* y *donnell-smithii*

Las muestras de las *T. rosea* y *T. donnell-smithii* fueron colectadas en la Huacana, Michoacán con las siguientes coordenadas 18°58'15"N 101°48'46"O y secadas a la sombra a temperatura ambiente el tiempo necesario hasta la eliminación total de humedad. Las partes de la planta (hojas, madera, corteza, flores y raíz) se separaron, limpiaron, trituraron, pesaron y colocaron en frascos de vidrio previamente pesados (figura 6). Las flores y hojas se trituraron de manera manual, mientras que la corteza, madera y raíz se molieron. La raíz de *T. rosea* se obtuvo de Morelia Michoacán con coordenadas de 19°46'06"N 101°11'22"O.



Figura 6. Obtención y procesamiento de especímenes de *T. rosea* y *T. donnell-smithii*.

Las muestras de duramen de *E. cyclocarpum* se obtuvieron de dos diferentes lugares Aguililla, Michoacán con coordenadas de 18°58'15"N 101°48'46"O y de Veracruz con las siguientes coordenadas 18°58'15"N 101°48'46"O. El duramen se astilló, secó, molió para obtener una partícula de menor tamaño ya que el último

paso consistió en tamizar en un poro de 0.45 μm , éste proceso se realizó con la finalidad de que exista mayor interacción entre duramen-disolvente (Figura 7).



Figura 7. Obtención del polvo de *Enterolobium cyclocarpum*.

La obtención de los extractos se realizó por maceración sucesiva con disolventes de polaridad ascendente hexano, cloruro de metileno y metanol y se concentraron en un rotavapor a diferentes temperaturas 55, 35 y 65 °C, respectivamente. El proceso se realizó de la siguiente manera: primeramente se adicionó hexano al frasco hasta cubrir la muestra, se cerró, se dejó macerar por tres días, se filtró en papel filtro Whatman número 1 y se concentró en el rotavapor a 55 °C. El hexano recuperado se volvió adicionar al frasco de vidrio con la muestra. El concentrado se colocó en un frasco de vidrio ámbar o cubierto de aluminio previamente pesado, para proteger a los componentes fotosensibles y éste proceso se realizó tres veces o hasta agotar componentes. El frasco con el extracto se colocó en campana para que el disolvente se evapore, se pesa hasta obtener peso constante se cierra y se deja a 2 °C hasta su uso.

El frasco con la muestra se dejó en la campana para evaporar el hexano, una vez la muestra libre de hexano se le adicionó cloruro de metileno se repitió el proceso anteriormente descrito y por último se realizó dicho proceso con metanol. Los extractos hexánicos y cloruro metilénicos de *E. cyclocarpum* y los extractos hexánicos de *T. rose* y *T. donnell-smithii* fueron desengrasados, se adicionó acetona al extracto se dejó en frío, se filtró y colectó en un frasco y se dejó en la campana hasta peso constante (Figura 8).



Figura 8. Extracción y obtención de extractos.

8.2 OBTENCIÓN DE LOS CRISTALINOS DE RATA

Los ojos de rata Wistar se enuclearon con ayuda de una tijera quirúrgica, los cristalinos se expusieron mediante una incisión de la parte fibrosa de los ojos, se extrajeron, se colocaron en un vial que contenía una disolución (1:1 v/v) de amortiguador de fosfato de potasio 0.1 M a pH de 6.8 y 2-mercaptoetanol 1 mM (100 μ l de cada disolución para un par de cristalinos) y se almacenaron -25 °C hasta su uso. Los cristalinos se descongelaron, se colocaron en un homogeneizador manual con 1 ml de amortiguador de fosfato de potasio 0.1 M a pH de 6.8 y 10 μ l de una mezcla de inhibidores de proteasas, se homogeneizaron y centrifugaron a 10 000 rpm durante 15 min; el precipitado se desechó, el sobrenadante se colocó en un vial previamente enfriado, del cual se utilizaron 10 μ l para determinar la cantidad de proteína por el método de Lowry (1951), el resto se utilizó como extracto crudo de enzima (AKRB14) y se almacenó -25 °C hasta su uso (Figura 9).

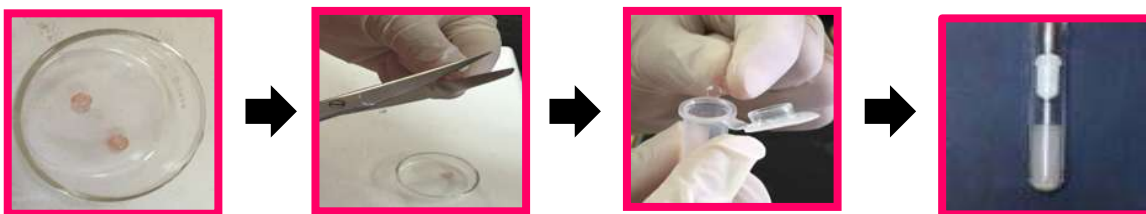


Figura 9. Obtención del cristalino de rata.

8.3 METODO DE LOWRY

El método de Lowry permite determinar la concentración de proteínas, se fundamenta en la reacción de Biuret y en la reacción de Folin-Ciocalteu, la cantidad de proteína es proporcional a la intensidad de color de la muestra de acuerdo a la ley de Lambert-Beer (Lowry *et al.*, 1951).

Q.F.B. Lidia Alejandra Zaragoza Camacho

La curva estándar se preparó con albumina sérica bovina (BSA) 5mg/ml y se obtuvo una pendiente igual a $y=11.734x + 0.0524$. La pendiente se utilizó para cuantificar la cantidad de proteína en las muestras problema. La mezcla de reacción se (10).

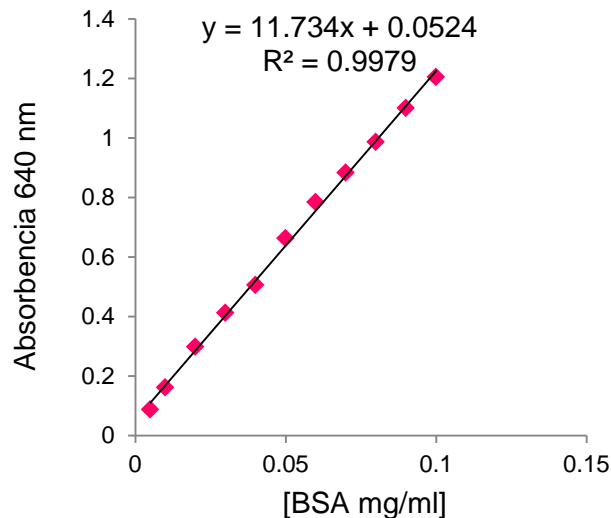


Figura 10. Curva de calibración de BSA por el método de Lowry.

8.4 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA ALDOSA REDUCTASA (AKR1B4)

8.4.1 Actividad enzimática *in vitro* de la AKR1B4

La actividad enzimática de la AR de cristalino de rata se determinó con la disminución en la absorbencia a 340 nm por la oxidación del NADPH (Figura 11).

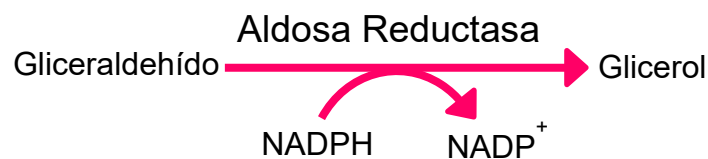


Figura 11. Esquema de la reacción enzimática de la AR.

8.4.2 Determinación de la actividad de la AKR1B4 por consumo de NADPH

La actividad enzimática se determinó con el decremento en la absorbencia a 340 nm por la oxidación del NADPH de acuerdo al método reportado por Kinoshita, 1965 y modificado por Beltrán, 2015. Las disoluciones se adicionaron en tubos de cristal en el orden que se muestra en el cuadro 5, excepción del NADPH. La Q.F.B. Lidia Alejandra Zaragoza Camacho

Búsqueda de compuestos inhibidores de la Aldosa Reductasa en *Enterolobium cyclocarpum* y *Tabebuia* spp

mezcla de reacción se agitó y colocó en una celda de plástico de 1 cm², posteriormente se le adicionó el NADPH, se mezcló y midió el decremento de la absorbencia de 340 nm durante 2 min en un espectrofotómetro CARY 50 Bio. La mezcla de reacción contenía un volumen final de 3 ml.

Cuadro 5. La mezcla de reacción para determinar la actividad enzimática AKR1B4 (1).

Disoluciones	Volumen (µl)			
	Control	Blanco 1	Muestra	Blanco 2
Amortiguador de fosfato de potasio 0.1 M a pH 6.8	2 535	2 835	2 535	2 835
2-mercaptoetanol 1 mM	15	15	15	15
Dimetilsulfóxido (DMSO) 1 %	30	30	-	-
Inhibidor	-	-	30	30
Extracto crudo de enzima AKR1B4	60	60	60	60
Gliceraldehído 0.1 mM	300	-	300	-
NADPH 0.2 mM	60	60	60	60

La absorbencia obtenida de los blancos 1 y 2 fue restada del control y la muestra, respectivamente. La actividad enzimática se calculó con la siguiente fórmula:

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

Dónde:

ΔAbs: decremento de la absorbencia.

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).

8.4.3 Actividad enzimática *in vitro* de la AKR1B4 en presencia de DMSO

La evaluación del comportamiento de la enzima AKR1B4 en presencia de DMSO se obtuvo al medir su actividad enzimática en diferentes concentraciones del compuesto. Las diluciones de DMSO fueron de 20, 40, 60, 80 y 100 %, 30 µl de cada una de las diluciones se colocaron a la mezcla de reacción enzimática y se midió la actividad enzimática.

8.5 INHIBICIÓN DE LA ALDOSA REDCTASA (AKR1B4)

8.5.1 Inhibición enzimática *in vitro* de la AKR1B4 en presencia de quercetina

La determinación de la inhibición enzimática de la AKR1B4 en presencia de un inhibidor comercial se ensayó a diferentes concentraciones de quercetina 0.1, 0.01 y 0.001 M.

8.5.2 Selección de la concentración del extracto vegetal

La concentración del extracto vegetal para utilizar en los ensayos de inhibición *in vitro* de la AKR1B4 se determinó de un extracto vegetal al azar que representa a total de los 33 extractos obtenidos previamente de *E. cyclocarpum*, *T. rosea* y *donnell-smithii*. Las concentraciones del extracto vegetal que se ensayaron fueron 2, 4, 6, 8 y 10 mg/ml.

8.5.3 Ensayo de inhibición *in vitro* de la AKR1B4

El efecto inhibitorio de los extractos obtenidos de *E. cyclocarpum*, *T. rosea* y *T. donnell-smithii* en la actividad enzimática de la AKR1B4 se realizó de acuerdo al cuadro 6 ya una vez establecida la concentración de proteína y la concentración de extracto a utilizar. La mezcla de reacción enzimática se midió a una absorbencia de 340 nm durante 2 min. El porcentaje de inhibición de la AKR1B4 se obtuvo al tomar como 0 % de inhibición la actividad de la mezcla de reacción sin extracto vegetal.

Cuadro 6. La mezcla de reacción para determinar la inhibición de la AKR1B4 (2).

Disoluciones	Volumen (μ l)			
	Control	Blanco 1	Muestra	Blanco 2
Amortiguador de fosfato de potasio 0.1 M a pH 6.8	2 535	2 835	2 535	2 835
2-mercaptoetanol 1 mM	15	15	15	15
DMSO 1 %	30	30	-	-
Extracto vegetal 6 mg/mL	-	-	30	30
Extracto crudo de enzima AKR1B4 6.67 mg/ml	60	60	60	60
Gliceraldehído 0.1 mM	300	300	300	300
NADPH 0.2 mM	60	60	60	60

8.6 ESPECTROMETRÍA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDRÓGENO (RMN- 1 H)

Los espectros de resonancia magnética nuclear de 1 H fueron obtenidos en un equipo Varian Mercury plus 400, los espectros de 1 H se obtuvieron a 400 MHz en ocho repeticiones, la ventana espectral fue de 6 000 Hz, el disolvente utilizado fue DMSO deuterado para los extractos metanólicos y el disolvente de referencia interna fue Tetrametilsilano (TMS).

8.7 DETERMINACIÓN DE LA CI_{50} DEL PINITOL EN LA AKR1B4

La actividad inhibitoria de la AKR1B4 por el compuesto pinitol a diferentes concentraciones se determinó para conocer la concentración inhibitoria media (CI_{50}). La concentración inicial fue de 6 mg/ml de pinitol disuelto en H_2O , a partir de ésta disolución se prepararon seis diluciones con base logarítmica de 2. El valor de CI_{50} se obtuvo al graficar el porcentaje de inhibición obtenido contra el logaritmo de las ocho concentraciones ensayadas. El valor se calculó con la ecuación de la pendiente, donde "x" es igual a CI_{50} "y" es igual al porcentaje de inhibición buscado, es decir, 50 %.

8.8 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS DEL PINITOL EN LA AKR1B4

8.8.1 Tipo de inhibición

La V_{max} y el K_m de la enzima AKR1B4 se determinaron en ausencia y presencia de diferentes concentraciones del pinitol y con diferentes concentraciones de gliceraldehído. El inicio fue a partir de 0.025 μ M, cuatro concentraciones con base logarítmica 2 se prepararon, con los resultados obtenidos se construyó un gráfico de doble recíproco de Lineweaver-Burk.

8.9 DOCKING MOLECULAR

8.9.1 Preparación de la Aldosa Reductasa (AKR1B1) (macromolécula) y del pinitol (ligando)

El Docking Molecular se realizó siguiendo las indicaciones descritas en el tutorial del programa Autodock Vina descargado de la página <http://vina.scripps.edu>.

La estructura de la enzima Aldosa Reductasa de cristalino de *Homo sapiens* (AKR1B1), se obtuvo de Protein Data Bank (PDB) en formato pbd con identificación 1ADS. Posteriormente a la estructura se le eliminaron las moléculas de agua, se le adicionaron hidrógenos en Autodock tools, ya modificada la estructura se guardó en formato pdbqt. La estructura del pinitol fue modelada en el programa Maestro 9.8 y se guardó en formato pdb, posteriormente la estructura se manipuló en Autodock tools y finalmente se guardó en formato pdbqt.

8.9.2 Mapa de búsqueda y Autodock Vina

Para conocer la interacción entre la AKR1B1 y el pinitol, primero se estableció el mapa de búsqueda de acuerdo al sitio activo de la enzima, es decir, en que residuos de la estructura de la AR el pinitol interaccionaría, una vez establecidas las condiciones se inició el Docking Molecular en Autodock Vina.

8.10 OBTENCIÓN DE LOS CRISTALINOS DE CONEJO

Los ojos de conejo raza Nueva Zelanda se enuclearon con ayuda de una tijera quirúrgica, se colocaron en una disolución que contenía cloro al 10 % y amortiguador fosfato salino (PBS) a pH de 7.4. Los ojos se lavaron tres veces una con las mismas condiciones de colecta y las otras solo con amortiguador PBS. Posteriormente los cristalinos se expusieron mediante una incisión de la parte fibrosa de los ojos, se extrajeron, se colocaron en los pocillos de una placa de 24 pocillos (Figura 12). Para los experimentos *ex vivo* se utilizó medio de cultivo 199 al cual se le adicionó ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico (HEPES), suero fetal de bovino al 0.5 % y penicilina-estreptomicina al 1 %. Posteriormente se preparó un stock de 50 ml que contenía 49 ml de medio 199, 500 µl de neomicina y 500 µl de anfotericina B. Todos los pocillos de la placa contenían 1.5 ml del medio 199 más los tratamientos correspondientes que se describen a continuación. La metodología para los tres experimentos en condiciones *ex vivo* se realizó de acuerdo a lo establecido en nuestro grupo de trabajo por Alonso, 2017.

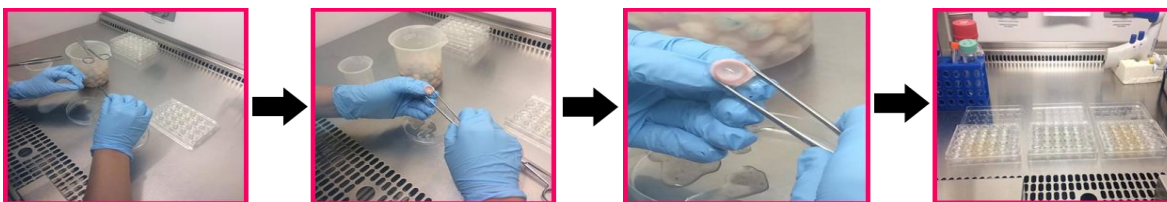


Figura 12. Obtención del cristalino de conejo.

8.10.1 Determinación del efecto del pinitol en la viabilidad de los cristalinos

Para la determinación de la viabilidad de los cristalinos en presencia del pinitol se realizaron dos experimentos:

1. **Control:** 3 µl de glucosa 1.25 M.
2. **Control + pinitol:** 3 µl de glucosa 1.25 M + 15 µl de pinitol 180 µg/ml.

Los dos experimentos se colocaron en una incubadora con CO₂ al 5 % a 37 °C. Al día siguiente a los cristalinos se les cambio el medio 199 y los tratamientos con ayuda de una pipeta Pasteur conectada a un sistema de vacío. Posteriormente,

Q.F.B. Lidia Alejandra Zaragoza Camacho

éste proceso se realizó cada tercer día; el experimento duró cinco días. Diariamente se les hizo un registro fotográfico con el equipo EL LOGIC 200 IMAGING SYSTEM y las fotos de los cristalinos se procesaron en el programa ImageJ para determinar la opacidad en el cristalino (Figura 13).

8.10.2 Determinación del efecto preventivo del pinitol en la formación de la catarata diabética

Para la determinación del efecto preventivo del pinitol en los cristalinos se realizaron tres tratamientos:

1. **Control:** 3 µl de glucosa 1.25 M.
2. **Xilosa:** 30 µl 1 M.
3. **Xilosa + quercetina:** 30 µl de xilosa 1 M + 15 µl de quercetina 10 mM.

El experimento se colocó en una incubadora con CO₂ al 5 % a 37 °C. Al día siguiente de haber sido montados se les cambio el medio 199 y los tratamientos con ayuda de una pipeta Pasteur conectada a un sistema de vacío, posteriormente éste proceso se realizó cada tercer día. El experimento con xilosa duró cinco días. Diariamente se les hizo un registro fotográfico con el equipo EL LOGIC 200 IMAGING SYSTEM y las fotos de los cristalinos se procesaron en el programa ImageJ para determinar la opacidad en el cristalino (Figura 13).

8.10.3 Determinación del efecto protector del pinitol en la formación de la catarata por estrés oxidativo

Para la determinación del efecto preventivo de los cristalinos en presencia del pinitol se realizaron tres tratamientos:

1. **Control:** 3 µl de glucosa 1.25 M.
2. **Selenito de sodio:** 15 µl 10 mM.
3. **Selenito de sodio + quercetina:** 15 µl de selenito de sodio 10m M + 15 µl de quercetina 10 mM.

Búsqueda de compuestos inhibidores de la Aldosa Reductasa en *Enterolobium cyclocarpum* y *Tabebuia* spp

El experimento se colocó en una incubadora con CO₂ al 5 % a 37 °C, al día siguiente de haber sido montados se les cambio el medio 199 y los tratamientos con ayuda de una pipita Pasteur conectada a un sistema de vacío, posteriormente éste proceso se realizó cada tercer día. El experimento duró cuatro días; diariamente se les tomó foto a los cristalinos en el equipo EL LOGIC 200 IMAGING SYSTEM y las fotos de los cristalinos se procesaron en el programa ImageJ para determinar la opacidad en el cristalino (Figura 13).

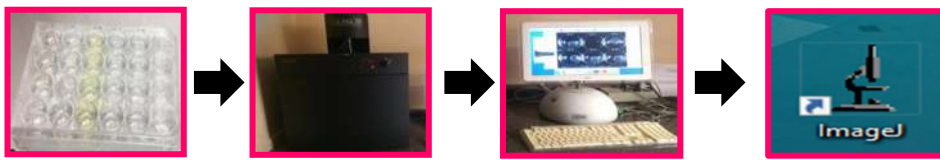


Figura 13. Proceso para la obtención de las fotografías de los cristalinos.

IX DISCUSIÓN

La Aldosa Reductasa (AKR1B1) participa en la vía de los polioles reduce glucosa a sorbitol en presencia de NAPH. La AKR1B1 está involucrada en las complicaciones secundarias de la diabetes tal como la catarata diabética. Diversos mecanismos se describen como posibles responsables de la biogénesis de dichas complicaciones, entre ellos el estrés oxidativo y la vía de los polioles específicamente la enzima AKR1B1 (Kumar *et al.*, 2015). El tratamiento con inhibidores de la AKR1B1 es de interés para las compañías farmacéuticas. Sin embargo, ninguno de los fármacos candidatos demuestra ser eficiente. La patogénesis de la neuropatía diabética se trató con Elparestat el único fármaco que se comercializó en países de Asiáticos, pero presentó efectos no deseados en los pacientes y como se cree que dicha patogénesis es similar a la de la catarata diabética continúa la búsqueda de éstos compuestos (Akileshwari *et al.*, 2014). Por ello, es una tarea ardua, amplia y representa un reto por lo cual se implementan diversas formas de obtener IAR ya sea de origen natural o de manera sintética; con la finalidad de tener un fármaco eficiente y seguro. Solo un grupo limitado de fármacos llegan a la fase de ensayos clínicos, esto se debe a la selectividad que tienen para AKR1B1 contra la AKR1A1. Estos compuestos inhibidores tienen la característica química de poseer en su estructura un grupo carboxílico o un anillo de espirohidantoína. Otros compuestos son las flavonas de origen vegetal como la quercetina, debido a que ninguno de los inhibidores estudiados hasta el momento presentó éxito interesante por los efectos adversos reportados, surge la oportunidad de continuar con la búsqueda IAR y una alternativa son los compuestos producidos por el metabolismo secundario vegetal, México se tiene gran diversidad, por lo cual facilita la obtención de la materia prima (Akileshwari *et al.*, 2014; Snow *et al.*, 2015).

El incremento de personas con diabetes en el mundo es alarmante se estima que 366 millones de personas padecerán diabetes para el año 2030 (Sivakumar *et al.*, 2010). Por ello, la necesidad surge de encontrar IAR eficientes con escaso o nulo Q.F.B. Lidia Alejandra Zaragoza Camacho

efecto colateral. En la literatura se reportan diversos compuestos de origen natural como posibles candidatos. Entre ellos los flavonoides de algunas especias, frutas y verduras tienen potencial para inhibir a la enzima AKR1B1 en condiciones *in vitro* (Saraswat *et al.*, 2008; Testa *et al* 2016). En este trabajo se realizó un escrutinio de los extractos de dos especies *E. cyclocarpum* y *Tabebuia* spp (los árboles *Tabebuia rose* y *T. donnell-smithii*) con la finalidad de encontrar moléculas de interés, como posibles candidatos para la inhibición de la enzima Aldosa Reductasa. En total se obtuvieron 33 extractos a los cuales se les determinó su capacidad para inhibir a dicha enzima en ensayos *in vitro*, se utilizó extracto enzimático de los cristalinos de rata (AKR1B4).

X CONCLUSIONES

El pinitol presentó inhibición de la enzima Aldosa Reductasa *in vitro* y un efecto protector antioxidante la formación de catarata en un modelo *ex vivo*.

XI BIBLIOGRAFÍA

1. Akileshwari C., Raghu G., Muthenna P., Mueller H. N., Suryanaryana P., Petrash M. J., Reddy B. G. 2014. Bioflavonoid ellagic acid inhibits aldose reductase: implications for prevention of diabetic complications. *Journal of functional foods*, 6:374 -383.
2. Alonso V. C., 2017. Efecto del ácido 13-*epi*-labdanolico de *Ageratina jocosotepecana* B. L. Turner en la formación de catarata en cristalino aislado de conejo. Tesis de maestría. UMSNH, pág. 28-34.
3. 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.
4. Barski A. O., Tipparaju M. S., Bhatnagar A. 2008. The aldo-keto reductase superfamily and its role in drug metabolism and detoxification. *Drug Metabolism Reviews*, 40: 553-624.
5. Beltrán S. R., 2015. Exploración de metabolitos secundarios de extractos de plantas nativas de Michoacán como inhibidores de la enzima Aldosa Reductasa. Tesis de maestría. UMSNH. pág. 37-39.
6. Brownlee M., 2006. The pathobiology of diabetic complications a unifying mechanism. *Diabetes*, 54:1615-1625.
7. Chistiakov A. D., 2011. Diabetic retinopathy: Pathogenic mechanisms and current treatments. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 5:165–172.

8. Fatmawati S., Ersama T., Shimizu T. 2015. The inhibitory activity of aldose reductase *in vitro* by constituents of *Garcinia mangostana* Linn. *Phytomedicine*, 22:49-51.
 9. García S. E., Ramirez L. C. B., Rosa E. R., Martinez P. M. M. 2011. A revisión of *Eupatorium* (Compositae: *Eupatorieae*) from Michoacan. *Phyton*, 80:139-146.
 10. García S. E., Ramirez L. C. B., Talavera A. A., León H. A., Martínez M. R. E., Martínez P. M. M., Gómez H. M. A., Cerda G. R. C. M., Joseph N. P., del Rio R. E. 2015. Absolute configuration of (13*R*)-and (13*S*)-labdane diterpenes coexisting in *Ageratina Jocotepecana*. *Journal of Natural Products*, 77:1005-1012.
 11. Geethan A. M. K. P. y Prince M. S. P. 2008. Antihyperlipidemic effect of D-Pinitol on streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 22: 220-224.
 12. Geraldine P., Sneha B. B., Elanchezhian R., Ramesh E., Kalavathy M. C., Kaliyamurthy J., Thomas A. P. 2006. Prevention of selenite-induced cataractogenesis by acetyl-L-carnitine: an experimental study. *Experimental Eye Research*, 83:1340-1349.
 13. Goodarzi M. T., Zal F., Malakooti M., Safari M. R., Sadeghian S. 2006. Inhibitory activity of flavonoids on the lens aldose reductase of healthy and diabetic rats. *Acta Medica Iranica*, 44:41-44.
 14. Head K. 2001. Natural therapies for ocular disorders, part two: cataracts and glaucoma. *Alternative Medicine Review*, 6:141-66.
 15. Kinoshita J. H. 1965. Cataracts in galactosemia. *Investigative Ophthalmology*, 786-799.
- Q.F.B. Lidia Alejandra Zaragoza Camacho

16. Kinoshita J. H. 1974. Mechanisms initiating cataract formation. *Investigative Ophthalmology*, 713-724.
17. Kumar P. M., Sankeshi V., Naik R. R., Thirupathi P., Das B., Raju N. T. 2015. The inhibitory effect of isoflavones isolated from *Caesalpinia pulcherrima* on aldose reductase in STZ induced diabetic rats. *Chemico-Biological Interactions*, 237:18-24.
18. Lee Y. A., Chung S. K., Chung S. S. 1995. Demonstration that polyol accumulation is responsible for diabetic cataract by the use of transgenic mice expressing the aldose reductase gene in the lens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92:2780-2784.
19. Lee J., Kim H. N., Nam W. J., Lee M. J., Jang S. D., Kim S. Y., Nam H. S., Seo E-K., Yang S. M., Kim S. J. 2010. Scopoletin from the flower buds of *Magnolia fargesii* inhibits protein glycation, aldose reductase, and cataractogenesis *ex vivo*. *Archives of Pharmacal Research*. 33:1317-1323.
20. Li W. C., Kuszak J. R., Dunn K. 1995. Lens epithelial cell apoptosis appears to be a common cellular basis for noncongenital cataract development in humans and animals. *Journal of Cell Biology*, 130:169-181.
21. Lowry D. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193:268-275.
22. Pamatz B. T. 2008. Estudio parcial fitoquímico y evaluación antitermita de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq) Griseb. Tesis de licenciatura. UMSNH, pág. 33-77.

23. Petrash J. M. 2004. All in the family: aldose reductase and closely related aldoketo Reductases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61:737-749.
24. Pollreisz A. y Schmidt E. U. 2010. Diabetic cataract-pathogenesis, epidemiology and treatment. *Journal of Ophthalmology*, 2010:1-8.
25. Raya G. D., Pamatz B. T., del Rio T. R. E., Martinez M. R. E., Ron E. O., Martinez P. M. M. 2008. D-(+)-Pinitol, a component of the heartwood of *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. *Zeitschrift für Naturforschung C, A Journal of Biosciences*, 63:922-9224.
26. Ramírez L. C. B., García S. E., León H. A., Raya G. D., del Rio R. E., Flores G. A., Martínez P. M. M. 2010. Phytochemical perspective of *Eupatorium* spp. *Pharmacology Online*, 3:682-890.
27. Sakthivel M., Elanchezhian R., Ramesh E., Isai M., Jesudasan N. C., Thomas A. P., Geraldine P. 2008. Prevention of selenite-induced cataractogenesis in Wistar rats by the polyphenol, ellagic acid. *Experimental Eye Research*, 86:251-259.
28. Sankeshi V., Kummar A. P., Naik R. R., Sridhar G., Kumar P. M., Gopal H. V. V., Raju N. T. 2013. Inhibition of aldose reductase by *Aegle marmelos* and its protective role in diabetic cataract. *Journal of Ethnopharmacology*, 149:215-221.
29. Saraswat M, Muthenna P, Suryanarayana P, Petrash J. M, Reddy G. B. 2008. Dietary sources of aldose reductase inhibitors: prospects for alleviating diabetic complications. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 17:558-565.

30. Sivakumar S., Palsamy P., Subramanian P. S. 2010. Impact of D-pinitol on the attenuation of proinflammatory cytokines, hyperglycemia-mediated oxidative stress and protection of kidney tissue ultrastructure in streptozotocin-induced diabetic rats. *Chemico-Biological Interactions*, 188: 237-245.
31. Sivakumar S. y Subramanian P. S. 2009. Pancreatic tissue protective nature of D-Pinitol studied in streptozotocin-mediated oxidative stress in experimental diabetic rats. *European Journal of Pharmacology*, 622:65-70.
32. Snow A., Shieh B., Chang C. K., Pal A., Lenhart P., Ammar D., Ruzycki P., Palla S., Reddy B. G., Petrash M., J. 2015. Aldose reductase expression as a risk factor for cataract. *Chemico-Biological Interactions*, 234:247-253.
33. Takamura Y., Sugimoto Y., Kubo E., Takahashi Y., Akagi Y. 2001. Immunohistochemical study of apoptosis of lens epithelial cells in human and diabetic rat cataracts. *Journal of Ophthalmology*, 45:559-563.
34. Tang W. H., Martin K. A, Hwa J. 2012. Aldose reductase, oxidative stress, and diabetic mellitus. *Frontiers in Pharmacology*, 3:1-5.
35. Testa R., Bonfigli A. R., Genovese S., De Nigris V., Ceriello A. 2016. The possible role of flavonoids in the prevention of diabetic complications. *Nutrients*, 8: 310.

36. Urzhumtsev A., Tête-Favier F., Mitschler A., Barbanton J., Barth P., Urzhumtseva L., Biellmann J-F., Podjarny A. D., Moras D. 1997. A 'specificity' pocket inferred from the crystal structures of the complexes of aldose reductase with the pharmaceutically important inhibitors tolrestat and sorbinil. *Structure*, 5:601-12.
37. Wang Y., Lunk O. Y. A., Maggie C. Y., Pang C. P. C., Lam V., Lee C. S., Lam S. C. D., Choy W. K., Ma C. W. R., So Y. W., Chan C. N. J. 2014. Additive effect of aldose reductase Z-4 microsatellite polymorphism and glycaemic control on cataract development in type 2 diabetes. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 28:147-151.
38. Zhu C. 2013. Aldose reductase inhibitors as potential therapeutic drugs of diabetic complications. *Diabetes mellitus-insights and perspectives*, 2:17-36.