



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE α -GLUCOSIDASA POR GOBERNADORA (*Larrea tridentata*) Y ÁCIDO NORDIHIDROGUAJARÉTICO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGO

P R E S E N T A:

VÍCTOR RAÚL PÉREZ TENORIO



DIRECTOR DE TESIS:
DR. RENÉ DE JESÚS CÁRDENAS VÁZQUEZ

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX. 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno
Pérez
Tenorio
Víctor Raúl
1734 5460
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
308146176
2. Datos del tutor
Dr.
René de Jesús
Cárdenas
Vázquez
3. Datos del sinodal 1
Dr.
Adolfo
Andrade
Cetto
4. Datos del sinodal 2
Dra.
Patricia
Guevara
Fefer
5. Datos del sinodal 3
Dra.
Silvia
Arteaga
Hernández
6. Datos del sinodal 4
Dr.
Saúl
Gómez
Manzo
7. Datos del trabajo escrito
Inhibición de la actividad de α -glucosidasa por Gobernadora (*Larrea tridentata*) y ácido nordihidroguaiarético.
73 p.
2016

A mis padres por su infinito apoyo y gran ejemplo,

A mis queridos hermanos,

Con especial afecto para Natali.

“Nosotros necesitamos aprender que el dador de todas las cosas reside dentro nuestro. Esta es una verdad que frente a toda evidencia, en las cosas más grandes y más pequeñas, nunca se sabe, aunque sea frecuentemente tan necesario, hasta vital, para nosotros saberlo”.

Carl Gustav Jung

Agradecimientos.

A la *Universidad Nacional Autónoma de México*, su *Facultad de Ciencias*, a los profesores y maestros que participaron en mi formación, a todos ellos... ¡gracias!

A *mis padres* que merecen mención individual. Gracias *Rosario* por perseverar en mi educación y formación, gracias por corregir los desvíos del camino, por el apoyo y cariño. Gracias *Raúl* por sembrar con ímpetu en mí la sed de progreso y por demostrarme que los sueños son asequibles. Gracias padres por creer en mí, por el amor brindado y por ser la sinergia de mi vida.

Gracias a *mis hermanos César, Diego y Jimena* por la vida compartida y su respaldo en todos los ámbitos de la vida.

Mi profundo agradecimiento a Natali por compartir parte de su vida conmigo, por su apoyo en la realización de este trabajo y gracias también por el cariño brindado.

Agradezco sobremanera a mi tutor el *Dr. René de Jesús Cárdenas* por admitirme para llevar a cabo este proyecto, a más de su invaluable ayuda para el mismo, por su paciencia, dedicación y por compartirme parte de su vasto conocimiento.

Gracias a mis sinodales Dra. Patricia Guevara, Dr. Adolfo Andrade, Dra. Silvia Arteaga y Dr. Saúl Gómez por su retroalimentación y valiosas observaciones.

A mis compañeros de laboratorio, en especial a la Biól. Dulce J. Bustamante y a la M. en C. Georgina Tenorio por su apoyo en el desarrollo experimental.

Gracias al M. en C. Enrique Llanos por el soporte y asesoramiento brindado para el protocolo de cromatografía en placa fina que se presenta en este trabajo.

CONTENIDO

• ABREVIATURAS	7
• RESUMEN	9
1 INTRODUCCIÓN	10
2 ANTECEDENTES	14
2.1 α -glucosidasas.....	14
2.1.1 α -glucosidasas I.....	15
2.1.2 α -glucosidasas II.....	16
2.2 Inhibidores de α -glucosidasas y sus aplicaciones.....	19
2.2.1 Potencial como plaguicida	20
2.2.2 Control de la hiperglicemia postprandial	21
2.3 DMII en México e importancia de la medicina tradicional.....	26
2.4 <i>Larrea tridentata</i> (Moç. & Seseé ex DC.) Coville (1893)	30
2.5 Ácido nordihidroguaiarético (NDGA).....	33
3 JUSTIFICACIÓN	35
4 OBJETIVOS	35
5 HIPÓTESIS	36
6 MATERIALES Y MÉTODOS	36
6.1 Extracto etanólico de Gobernadora (<i>Larrea tridentata</i>)	36
6.2 Obtención de α -glucosidasa de levadura.....	36

6.3 Obtención de α -glucosidasa intestinal de rata	37
6.4 Actividad <i>in vitro</i> de α -glucosidasa.....	38
6.5 Determinación de Cl_{50} y K_i <i>in vitro</i>	38
6.6 Determinación del tipo de inhibición	39
6.7 Identificación y cuantificación de NDGA en <i>L. tridentata</i>	42
7 RESULTADOS	44
7.1 Actividad <i>in vitro</i> de α -glucosidasa.....	44
7.2 Cl_{50} <i>in vitro</i> de α -glucosidasa de levadura.....	46
7.3 Cl_{50} <i>in vitro</i> de α -glucosidasa de intestino de rata	47
7.4 Tipo de inhibición.....	48
7.5 Presencia y cantidad de NDGA en <i>L. tridentata</i>	52
8 DISCUSIÓN	58
9 CONCLUSIONES	63
10 REFERENCIAS	64

• **ABREVIATURAS**

aa	Aminoácidos
ADA	American Diabetes Association
AG	Aparato de Golgi
Asp	Ácido aspártico
C ₂ H ₆ O	Etanol
C ₄ H ₈ O ₂	Acetato de etilo
C ₆ H ₁₄	Hexano
CH ₃ OH	Metanol
CHCl ₃	Cloroformo
CI ₅₀	Concentración inhibitoria 50
Conabio	Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la biodiversidad
DM	Diabetes mellitus
DMG	Diabetes mellitus gestacional
DMI	Diabetes mellitus tipo 1
DMII	Diabetes mellitus tipo 2
DMNID	Diabetes mellitus no insulino dependiente
E	Enzima
EE	Extracto etanólico
EGTA	Ethylene glycol tetraacetic acid
ES	Complejo enzima-sustrato
FDA	Food and Drug Administration
FeCl ₃	Cloruro férrico
GIP	Polipéptido inhibidor gástrico
GLP-1	Péptido similar al glucagón
HBGI	Honey bee glucosidase I
HBGII	Honey bee glucosidase II
HBGIII	Honey bee glucosidase III
IDF	International Diabetes Federation

IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
K_i	Constante de inhibición
K_m	Constante de Michaelis-Menten
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
$MgCl_2$	Cloruro de magnesio
NDGA	Ácido nordihidroguaiarético
NOM-015-SSA2-2010	Norma Oficial Mexicana para la prevención, tratamiento y control de la diabetes
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
<i>p</i> -NPG	<i>p</i> -nitrofenol- α -D-glucopiranosido
RE	Retículo endoplásmico
V_{max}	Velocidad máxima
WHO	World Health Organization

RESUMEN

Las α -glucosidasas catalizan la liberación de α -D-glucosa de oligosacáridos, su especificidad depende de la longitud de éste. Pueden distinguirse dos familias principales de glucosidasas, en las que se incluyen la mayoría de las α -glucósido hidrolasas 13 (GH13 o α -glucosidasas I) y α -glucósido hidrolasas 31 (GH31 o α -glucosidasas II). Las α -glucosidasas I están presentes en bacterias, levaduras e insectos y tienen elevada afinidad por sustratos heterogéneos. Las plantas, mamíferos y algunos hongos presentan α -glucosidasas II y su afinidad es mayor sobre sustratos homogéneos.

Los inhibidores de α -glucosidasas evitan que dichas enzimas lleven a cabo la hidrólisis de carbohidratos. Entre sus aplicaciones resaltan la inhibición de α -glucosidasas II del intestino humano, para disminuir la absorción de glucosa y controlar los niveles de glucemia en pacientes con DMII. Actualmente la mayor parte de inhibidores de α -glucosidasas utilizados en el tratamiento de DMII ejercen inhibición reversible competitiva. La inhibición de α -glucosidasas I tiene potencial como agentes antimicrobianos o insecticidas, al evitar el aprovechamiento de carbohidratos por bacterias, levaduras e insectos.

Larrea tridentata es una planta nativa de México que ha sido ampliamente utilizada en medicina tradicional para tratar diversos padecimientos, entre los cuales se encuentra su uso para DMII. El principal metabolito de *L. tridentata* es el NDGA, un potente antioxidante e inhibidor de lipooxigenasas, α -glucosidasas y otras enzimas, que mejora la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina de ratas diabéticas y ratones ob/ob. Por lo anterior resulta relevante analizar el efecto inhibitorio del extracto etanólico de *L. tridentata* y del NDGA sobre α -glucosidasa de levadura (α -glucosidasas I) y de intestino de rata (α -glucosidasas II) para determinar su posible uso en el tratamiento de DMII y/o como control de plagas.

Se establecieron ensayos *in vitro* para evaluar el efecto inhibitorio de extracto etanólico de *L. tridentata* y NDGA sobre α -glucosidasa de levadura y de microvellosidades de intestino de rata, obteniendo las CI_{50} y el tipo de inhibición ejercida por ambas sustancias.

El NDGA y el extracto etanólico de *L. tridentata* inhibieron de forma no competitiva la actividad α -glucosidasa de levadura y presentaron CI_{50} de 1.75 y 15 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectivamente. Estos valores fueron mucho más pequeños que los del control positivo (acarbosea). NDGA no inhibió la actividad α -glucosidasa de la fracción de microvellosidades de rata. Acarbosea tuvo una CI_{50} considerablemente menor que la obtenida para la actividad α -glucosidasa de levadura.

La inhibición de α -glucosidasa de levadura por el extracto de *L. tridentata* se atribuye a su contenido de NDGA dado que el EE de *L. tridentata* contiene el 10% de NDGA. Estos resultados son prometedores para emplear estas sustancias en el control de levaduras, insectos y bacterias. Por otro lado, el efecto de NDGA en modelos de diabetes no parece ser a través de la inhibición de las α -glucosidasas intestinales.

1 INTRODUCCIÓN

Las α -glucosidasas (EC 3.2.1.x) son enzimas que catalizan la liberación de α -D-glucosa hidrolizando enlaces α -D-glucosídicos en el extremo no reductor del sustrato (disacáridos y oligosacáridos). Dichas enzimas están ampliamente distribuidas en microorganismos, plantas y tejidos animales, y son importantes para un amplio espectro de funciones biológicas (Chiba, 1997; Kimura, 2000; Asano, 2003; Kimura *et al.*, 2004; Darmawan, 2010). Dentro de las glucósido hidrolasas y de acuerdo con su secuencia de aminoácidos, se pueden distinguir dos familias que incluyen α -glucosidasas: GH13 (α -glucosidasas I) con ejemplos en bacterias, levaduras e insectos y GH31 (α -glucosidasas II) presentes en plantas, mamíferos y algunos hongos (Chiba, 1997; Kimura *et al.*, 1997, Kimura, 2000; Gabrisko, 2013).

Los inhibidores de α -glucosidasas evitan la escisión de oligosacáridos y han sido identificados en plantas, hongos y bacterias. Éstas moléculas son de gran interés para ser empleadas con distintos propósitos de entre los cuales resalta su potencial como agentes plaguicidas e hipoglucémicos.

Las plagas de bacterias, hongos e insectos representan uno de los principales problemas en agricultura, lo cual conduce al diseño de diversos pesticidas. Sin embargo, el uso de estos compuestos puede derivar en degradación ambiental, pérdida de biodiversidad y generación de cepas resistentes. Algunas plantas u hongos micorrízicos producen compuestos capaces de inhibir enzimas relacionadas con la asimilación de carbohidratos (α -glucosidasas y amilasas). En años recientes el estudio de éstas moléculas ha cobrado relevancia para controlar las plagas de insectos, bacterias y hongos en cultivos (Singh *et al.*, 2015).

El uso de fármacos que inhiben la actividad α -glucosidasa es útil para retrasar la liberación de glucosa proveniente de la dieta y por ende su absorción a nivel intestinal; en consecuencia, se produce una disminución importante del pico postprandial de glucosa en sangre. Éstos fármacos también ofrecen la posibilidad de retrasar la progresión de dicha enfermedad y pueden ser usados para el tratamiento de condiciones prediabéticas (Moorthy *et al.*, 2012).

Los estudios de diversas plantas medicinales con efecto hipoglucemiante conducen al descubrimiento de compuestos de vital importancia, dado que algunos de ellos han servido como precursores para la obtención de fármacos (Bnouham *et al.*, 2006; Mishra *et al.*, 2010; Flores-Bocanegra, 2013).

Datos étnicos y etnofarmacológicos sugieren que a nivel mundial el uso de plantas medicinales para el tratamiento de la diabetes es de suma importancia, y se calcula que las plantas utilizadas con este fin son aproximadamente de 800 a 1200 especies. Algunas de éstas ya han sido sujeto de estudio (Israili, 2011).

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad sistémica, crónico-degenerativa, de carácter heterogéneo, con grados variables de predisposición hereditaria y con participación de diversos factores ambientales, que se caracteriza por hiperglucemia crónica debido a la deficiencia en la producción o acción de la insulina, lo que afecta al metabolismo intermedio de los carbohidratos, proteínas y grasas. Actualmente se reconocen 3 tipos de DM a saber:

-DM tipo 1 (DMI): En este tipo de DM existe destrucción de células β -pancreáticas, generalmente con deficiencia absoluta de insulina. Los pacientes son generalmente jóvenes, delgados y presentan un comienzo abrupto de signos y síntomas, tales como insulinopenia antes de los 30 años de edad (Escobar y Tébar, 2009; NOM-015- SSA2-2010); suele ser causada por una reacción autoinmune contra las células productoras de insulina (International Diabetes Federation, 2014).

-DM tipo 2 (DMII): También llamada diabetes mellitus no insulino dependiente (DMNID), se caracteriza por resistencia periférica de la insulina (resultado de un mal funcionamiento de las células β -pancreáticas) y en forma concomitante una deficiencia en su producción, puede ser absoluta o relativa. Es el tipo de DM más frecuente (90%-95% de pacientes diagnosticados con DM) (Escobar y Tébar, 2009; American Diabetes Association, 2013; International Diabetes Federation, 2014). Los pacientes suelen ser mayores de 30 años, con historial de una mala alimentación y estilo de vida sedentario, frecuentemente son obesos y presentan relativamente pocos síntomas clásicos (NOM-015- SSA2-2010). DMII es un proceso complejo que incluye

alteración del metabolismo de lípidos y proteínas con daño vascular generalizado (Gil-Velázquez *et al.*, 2013).

-DM gestacional (DMG): Es una enfermedad que se caracteriza por altos niveles de glucemia en mujeres embarazadas. El antecedente de DMG aumenta el riesgo de padecer DMII. (Escobar y Tébar, 2009; International Diabetes Federation, 2014).

La elevada incidencia de la DMII (Diabetes mellitus tipo II) en México y el apego de la población a usar remedios herbolarios para el tratamiento de la diabetes ha derivado en un extenso listado de especies vegetales de diversas familias (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005; Mata *et al.*, 2013), de las cuales sólo 38 especies han sido analizadas para establecer su potencial como inhibidores de α -glucosidasas (Mata *et al.*, 2013). La validación del uso de éstas especies debe estar sujeta a estudios farmacológicos en animales y humanos (Israili, 2011).

Larrea tridentata (Moç. & Seseé ex DC.) Coville (1893) es una planta común de las regiones áridas del norte de México y sur de Estados Unidos. Se reporta como un agente diurético además de ser empleada para tratar diversos padecimientos entre los cuales se encuentran: infecciones de las vías urinarias, cálculos renales, malestares como dolor de riñón, cálculos biliares, inflamación de la vejiga, problemas de esterilidad, purificación de sangre, hemorroides, fiebre, granos, golpes, cicatrización, fatiga, paludismo, reumatismo, dermatitis, hepatitis, artritis, diabetes (Alarcon-Aguilar y Roman-Ramos, 2005), cáncer, disolución de tumores, desplazamiento de matriz y aborto, entre otros (Arteaga *et al.*, 2005). El padecimiento para el cual es empleado define la parte de la planta utilizada, así como el método de preparación y aplicación.

El lignano más común y mejor representado en la resina de *Larrea tridentata* es el ácido nordihidroguaiarético (NDGA), también conocido como masoprocol (Gisvold y Thaker, 1974; Konno *et al.*, 1990; Sakakibara *et al.*, 1976; Hyder *et al.*, 2002; Abou-Gazar, 2004), éste compuesto se encuentra principalmente en órganos fotosintéticos de la planta (hojas) y en menor medida en tallos y talluelos lo cual indica que pudiera representar una defensa en contra de la herbivoría y protección ante rayos UV (Hyder *et al.*, 2002).

Experimentalmente el NDGA se comporta como agente antioxidante, inhibidor de diversas enzimas, inhibidor de transporte anterógrado retículo endoplásmico (RE)-aparato de Golgi (AG), inductor de transporte retrógrado de proteínas en células epiteliales de riñón de rata, más ampliamente conocidas como células NRK por sus siglas en inglés, es decir, fomenta el tráfico en sentido AG-RE (Drecktrath *et al.*, 1998; Sato *et al.*, 2001 Arteaga *et al.*, 2005) e inhibe de α -glucosidasas de levadura (Sato *et al.*, 2001).

2 ANTECEDENTES.

2.1 α -glucosidasas

Las α -glucosidasas (EC 3.2.1.x) son enzimas que catalizan, por el mecanismo de retención, la ruptura del enlace O-glucosídico con la liberación de α -D-glucosa del extremo no reductor del sustrato (disacáridos y oligosacáridos). Estas enzimas están ampliamente distribuidas en microorganismos, plantas y animales; y son importantes para un amplio espectro de procesos anabólicos y catabólicos, tales como la digestión intestinal y lisosomal (Chiba, 1997; Kimura, 2000; Asano, 2000; Asano, 2003; Kimura *et al.*, 2004; Darmawan, 2010).

La especificidad de las α -glucosidasas se basa en el número de carbohidratos del sustrato, la posición del sitio de escisión (exo o endo, extremo reductor o no reductor) y la configuración de otros grupos hidroxilo del sustrato; con frecuencia suelen tener más de un sustrato afín, razón por la cual sus actividades pueden traslaparse (Kimura, 2000; Kimura *et al.*, 2004).

Las α -glucosidasas obtenidas de distintas fuentes se clasifican en dos familias de acuerdo a la similitud en su secuencia de aminoácidos (estructura primaria) y a la cinética que presentan cuando son ensayadas con inhibidores competitivos como la isoacarbosa (IsoAca), de manera que se distingue entre α -glucosidasas I, dentro de la familia GH13 (también conocida como superfamilia de α -amilasas) y α -glucosidasas II, en la familia GH31 (Janecek, 1997; Chiba, 1997; Kimura, 2000; Kimura *et al.*, 2004; Janecek *et al.*, 2007).

Cada familia presenta cohesión dada la similitud de su estructura primaria, pero a pesar de las diferencias entre la secuencia de aminoácidos de las familias GH13 y GH31 se ha reportado la existencia de una remota, pero significativa homología, pues ambas familias pertenecen al clan GH-H; para pertenecer a este clan las enzimas deben cumplir con las siguientes características: barril de plegamiento (β/α)₈, poseer un aminoácido catalítico Asp (nucleófilo) situado en la hebra β 4, un Glu (donador de protones) en la hebra β 5 y otro Asp (estabilizador del estado de transición) localizado en la hebra β 7, llevar a cabo la reacción enzimática por el mecanismo de retención (esto significa que la configuración inicial del carbono anomérico sea mantenida en el producto) y de 4 a 7 regiones de secuencias conservadas (CSRs, por sus siglas en inglés)

ubicadas preferentemente en las hebras β del dominio catalítico (Chiba, 1997; Janecek, 1997; Janecek *et al.*, 2007).

2.1.1 α -glucosidasas I

Las α -glucosidasas de bacterias, levaduras e insectos son denominadas α -glucosidasas I, pertenecen a la familia GH13 de glucósido hidrolasas, catalizan la degradación de oligosacáridos teniendo principalmente α -glucosa como producto final (Kimura *et al.*, 1997). Las α -glucosidasas I se caracterizan por presentar una alta actividad sobre sustratos heterogéneos tales como sacarosa, *p*-nitrofenol- α -D-glucopiranosido (*p*-NPG) y aril α -glucósidos; además, sobre sustratos homogéneos como malto-oligosacáridos presenta poca actividad y poca o nula sobre α -glucanos (Kimura, 2000).

S. cerevisiae presenta tres α -glucosidasas, a saber:

- Maltasa (α -1,4 glucosidasa): Tienen como sustrato maltosa y maltotriosa, pero no reconoce malto-oligosacáridos mayores a la maltotetrosa.
- Isomaltasa (α -1,6 glucosidasa): Hidroliza principalmente isomaltosa y presenta poca actividad sobre otros enlaces glucosídicos como α -1,2, α -1,3 y α -1,4. Maltosa se comporta como inhibidor competitivo sobre la actividad de esta enzima, evitando así la hidrólisis de la isomaltosa (Francois y Parrou, 2001).
- Glucoamilasa (α -1,4 y α -1,6 glucosidasa): Al igual que la isomaltosa, también presenta poca actividad sobre enlaces α -1,2, dado lo cual ambas enzimas son capaces de hidrolizar sacarosa y *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosido (*p*-NPG).

La abeja mielífera (*Apis mellifera*) presenta al menos 3 α -glucosidasas: HBG-I hidroliza preferentemente maltosa, sacarosa y aril α -glucósidos, HBG-II y HBG-III al igual que la α -glucosidasa de *Bacillus sp.* presentan alta afinidad por malto-oligosacáridos (Kimura, 2000). Se ha demostrado que HBG-I, HBG-II y HBG-III se localizan en distintos órganos; en intestino medio se encuentra HBG-I y HBG-II, en hemolinfa es posible encontrar HBG-II, HBG-III es más

abundante en las glándulas hipofaríngeas y la miel, lo anterior indica un significativo papel fisiológico de HBG-III en el proceso de formación de la miel (Kubota *et al.*, 2004). HBG-III secretada por las glándulas hipofaríngeas sobre el néctar recolectado cumple la función de convertir la sacarosa (principal carbohidrato en néctar) a glucosa y fructosa (principales componentes de la miel) (Wongchawalit *et al.*, 2006).

Las α -glucosidasas I hidrolizan preferentemente sustratos heterogéneos y no son capaces de hidrolizar desoxi-derivados (sustratos en los cuales se llevó a cabo la sustitución de grupos hidroxilo por un átomo de hidrógeno), lo cual significa que cada grupo hidroxil en la estructura glucosil es estrictamente reconocido por el sitio catalítico de la enzima (Kimura, 2000).

2.1.2 α -glucosidasas II

Las α -glucosidasas II de plantas, mamíferos y algunos hongos pertenecen a la familia GH31, tienen mayor afinidad por sustratos homogéneos con respecto a los heterogéneos, son capaces de hidrolizar α -glucanos, a partir de lo cual se deduce que dichas enzimas reconocen la estructura maltosil (Kimura, 2000).

En la dieta humana los monosacáridos son relativamente poco frecuentes, ya que mayoritariamente son oligosacáridos y polisacáridos los más comunes. Los polisacáridos (esencialmente almidón) son hidrolizados por la amilasa salival y posteriormente por la amilasa pancreática en el duodeno y parte superior del yeyuno, generando principalmente maltosa, maltotriosa, isomaltosa y dextrinas α -límite (cadena corta remanente de la hidrólisis de amilopectina con α -amilasa) en proporciones similares (Gray, 1984; Elsenhans y Caspary, 1987; Bischoff, 1994; Jocković *et al.*, 2013).

Las α -glucosidasas II pueden ser denominadas maltasas debido a que en mayor o menor medida presentan afinidad por maltosa (Kimura *et al.*, 2004; Jocković *et al.*, 2013), siendo la maltasa la que muestra mayor afinidad para dicho sustrato y también la más susceptible a inhibición por acarbosa (oligosacárido modificado empleado para tratar DMII dado que se comporta como inhibidor de α -glucosidasa II). Por otra parte, la sacarosa solo es hidrolizada por la sacarasa-isomaltasa (Hoefsloot *et al.*, 1988; Jocković *et al.*, 2013).

El producto de la reacción catalizada por las amilasas es sustrato para las α -glucosidasas II, las cuales degradan los disacáridos y oligosacáridos a monosacáridos, estas enzimas están presentes en las células de borde de cepillo (enterocitos) y se han identificado tres: complejo sacarasa-isomaltasa, maltasa y glucoamilasa. Las dos últimas también se han considerado como complejo maltasa-glucoamilasa, lo cual implica que la actividad α -glucosidasa se debe a heterodímeros que se encuentran unidos a la membrana de los enterocitos y sus sitios activos están dirigidos hacia el lumen intestinal (Elias *et al.*, 1968; Hoefsloot *et al.*, 1988; Kimura *et al.*, 2004; Jocković *et al.*, 2013).

En mamíferos, las α -glucosidasas se encuentran en el intestino delgado. Su actividad ha sido identificada en el duodeno y el tercio superior del yeyuno, distal al ligamento de Treitz (Langman y Rowland, 1990), existen también cantidades considerables de α -glucosidasas en yeyuno inferior e íleon (Newcomer y McGill, 1966; Elias *et al.*, 1968).

En conjunto, las enzimas antes mencionadas son esenciales para el transporte y asimilación de carbohidratos a través de la mucosa del intestino delgado para ser incorporadas al torrente sanguíneo (Elsenhans y Caspary, 1987). La figura 1 esquematiza el papel que cumplen las α -glucosidasas II en la mucosa del intestino.

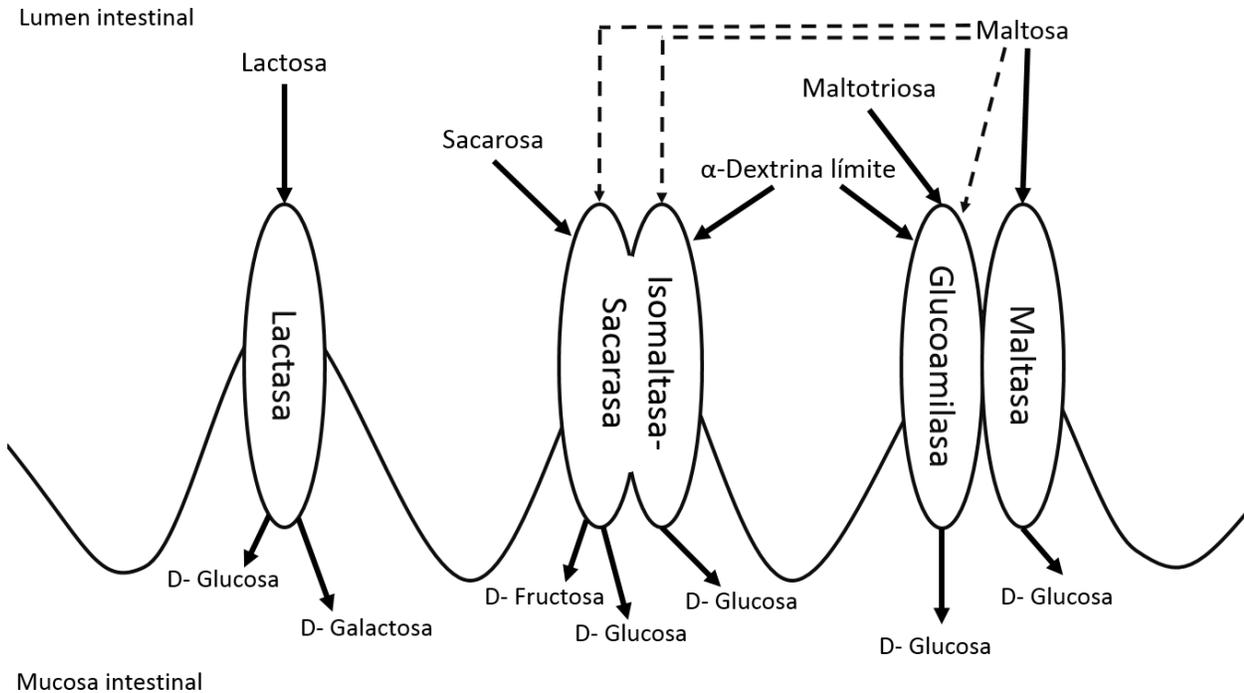


Figura 1. Digestión y absorción de sacáridos en la mucosa intestinal de mamíferos. Maltasa-Glucoamilasa e Isomaltasa-Sacarasa son α -glucosidasas II y todas ellas presentan actividad maltasa (representado con línea punteada); Lactasa pertenece al grupo de β -glucosidasas, tiene como sustrato lactosa (modificado de Caspary, 1992).

La actividad de las α -glucosidasas II sobre el *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosido es relativamente baja comparada con la actividad que presentan las α -glucosidasas I sobre el mismo sustrato, ésta actividad puede duplicarse cuando el *p*-NPG es modificado para obtener un desoxi-derivado. Las α -glucosidasas II aceptan variación estructural, tal como la falta del grupo hidroxilo, variación que no es tolerada por las α -glucosidasas I (Kimura, 2000).

En el caso específico del complejo sacarasa-isomaltasa intestinal de conejo los grupos β -carboxilo implicados en el reconocimiento del sustrato pertenecen a Asp-505 y Asp-1549, en la α -glucosidasa lisosomal humana es el Asp-518, la α -glucosidasa de la remolacha azucarera tiene mayor afinidad por almidón soluble que por maltooligosacáridos y su sustrato se une al β -carboxilo de Asp-469. En α -glucosidasa de *A. niger* el sustrato es reconocido por Asp-224, en α -glucosidasa de la abeja mielífera un residuo de Asp es también el involucrado en el reconocimiento del sustrato y se comporta como un donador de protones (para el enlace

glucosídico) y aceptor de protones (para la molécula de agua en la reacción hidrolítica; Kimura, 2000).

De acuerdo con lo anterior, el grupo carboxilo es necesario para la actividad α -glucosidasa. En las dos familias de α -glucosidasas: el sustrato se une a un β -carboxilo de Asp. Sin embargo, tienen una similitud en su secuencia de aminoácidos (estructura primaria) de apenas el 20%, lo cual justifica su clasificación en familias diferentes (GH13 y GH31 para α -glucosidasas I y II, respectivamente). La afinidad a sustratos homogéneos o heterogéneos podría deberse a las diferencias en su sitio catalítico (Kimura, 2000).

2.2 Inhibidores de α -glucosidasas y sus aplicaciones

Los inhibidores de α -glucosidasas son compuestos que interactúan con dichas enzimas para evitar que lleven a cabo la hidrólisis de carbohidratos, lo cual deriva en una malabsorción de los mismos (Kalra *et al.*, 2014). Algunas de estas moléculas inhibitoras son estructuralmente similares a oligosacáridos y ejercen una inhibición competitiva, pues resultan afines al sitio activo de la enzima (Segel, 1975; Harvey y Ferrier, 2011).

El modelo clásico de inhibición competitiva asume que el I (inhibidor) sólo se une a E (enzima) en su sitio catalítico y no al complejo ES (enzima-sustrato). La inhibición enzimática también puede ser no competitiva, lo que implica que el inhibidor se une a una región distinta del sitio activo, pudiendo unirse a E o al complejo ES, originando así una serie de cambios alostéricos que evitan que la catálisis se lleve a cabo. Otra característica importante de los inhibidores competitivos es que sus efectos pueden ser reducidos con el aumento en la concentración de sustrato, mientras que para inhibidores no competitivos la concentración efectiva para alcanzar la inhibición de la enzima se mantiene constante a distintas concentraciones del sustrato (Harvey y Ferrier, 2011).

Muchas plantas contienen inhibidores endógenos, los cuales reducen la actividad α -glucosidasa, estas sustancias pueden ser proteínas, péptidos y agentes fenólicos, los cuales pueden tener implicaciones en distintos procesos industriales, tales como la elaboración de

cerveza y la industria panadera (Sorensen *et al.*, 2004), así como agentes antivirales, fungicidas y bactericidas (Asano, 2003).

Algunos inhibidores resultan efectivos para α -glucosidasas de la familia I y II, por ejemplo: acarbosa, isoacarbosa, y acarviosín-glucosa son inhibidores competitivos de α -glucosidasas I y II, sin embargo, la eficiencia de inhibición de cada inhibidor varía entre ambas familias (Chakrabarti *et al.*, 1993; Calero *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2004; Kimura *et al.*, 2004). Lo anterior resulta de gran utilidad para diferenciar α -glucosidasas I y II; isoacarbosa es altamente efectivo inhibiendo α -glucosidasa II, y muy poco efectivo a prácticamente nulo inhibiendo α -glucosidasa I (Kimura *et al.*, 2004), acarviosín-glucosa inhibe α -glucosidasa I en el rango de 400-900 veces comparado con acarbosa e isoacarbosa, respectivamente, e inhibe aún con mayor eficiencia a α -glucosidasa II (Kim *et al.*, 1999), esto da indicios de que ambas familias podrían diferir conformacionalmente en su sitio activo o una región muy cercana (Chiba, 1997; Jocković *et al.*, 2013).

La inhibición de α -glucosidasas cuenta con diversas aplicaciones importantes, de entre las cuales cabe resaltar:

-Potencial como plaguicida inhibiendo el sistema digestivo de insectos, lo cual resulta favorable, por ejemplo, para la industria agroquímica (Asano, 2003; Kimura *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2015).

-Aplicación médica para suprimir la actividad de la sacarasa-isomaltasa y maltasa-glucoamilasa (α -glucosidasas II) en el intestino humano, derivando en un decremento de la absorción de glucosa, efecto que resulta relevante en el tratamiento de pacientes con DMII (Bischoff, 1994; Kim *et al.*, 1999; Miyahara *et al.*, 2004; Kimura *et al.*, 2004; Andrade-Cetto *et al.*, 2008).

2.2.1 Potencial como plaguicida

Las plagas son problemas frecuentes que representan un impacto negativo en la agricultura, esto conduce al diseño de diversos plaguicidas químicos para evitar la afectación a los cultivos, sin embargo, su uso deriva frecuentemente en degradación del medioambiente, pérdida de

biodiversidad y generación de cepas resistentes. Dado lo anterior, la búsqueda de alternativas a los plaguicidas sintéticos ha tomado marcada relevancia (Singh *et al.*, 2015)

Trabajos recientes demuestran la importancia de inhibidores de proteasas, amilasas y α -glucosidasas en el control de insectos y otras plagas (Singh *et al.*, 2015). Los inhibidores de α -glucosidasas han cobrado importancia dado que evitan el aprovechamiento de carbohidratos, por ende, limita o inhibe (según la concentración de inhibidor empleado) el metabolismo del organismo no deseado, tratándose ya sea de hongos, bacterias, virus o insectos.

2.2.2 Control de la hiperglicemia postprandial

La regulación de la hiperglucemia postprandial es esencial en el tratamiento de la DMII, por lo tanto, es importante entender los factores que intervienen en este fenómeno, ya que la mayor parte de la glucosa en sangre en ese tiempo proviene de la hidrólisis de los carbohidratos ingeridos en la dieta y que son degradados por enzimas α -amilasas y α -glucosidasas (Elsenhans y Caspary, 1987).

Si la tasa de degradación de los poli, oligo y disacáridos es reducida dichos carbohidratos serán transportados por el tracto digestivo sin ser digeridos lo cual disminuye la absorción de monosacáridos y por tanto, la presencia de éstos en la sangre (Elsenhans y Caspary, 1987).

Los inhibidores de α -glucosidasas reducen la tasa de absorción de carbohidratos en el intestino delgado y se usan en el tratamiento de la DMII como hipoglucémicos orales (Kim *et al.*, 1999; Asano 2000, Asano, 2003; Kalra *et al.*, 2014), su importancia radica en que contribuyen a reducir los niveles de glucosa postprandial en sangre (Hanefeld *et al.* 2004; Van de Laar *et al.* 2005); han sido ampliamente estudiados y recomendados dada su eficacia, seguridad, tolerabilidad, beneficios cardiovasculares, bajo riesgo de hipoglucemia (siempre que sean consumidos en las dosis adecuadas), y además pueden ser administrados en conjunto con otros fármacos orales (Kalra *et al.* 2014). Un beneficio más de los inhibidores de α -glucosidasas es que reducen el nivel de hemoglobina glicada (Chakrabarti *et al.*, 1993; Coniff *et al.*, 1995; Levy *et al.*, 2000).

Los efectos secundarios del consumo de estos fármacos se catalogan como de preocupación menor y son consecuencia de carbohidratos no digeridos que tienden a acumularse en el lumen gastrointestinal antes de ser fermentados por bacterias que se encuentran en el intestino grueso, este proceso es la causa de flatulencia, diarrea y dolor abdominal (Bischoff, 1994; Puls, 1996; Hanefeld *et al.*, 2004; Darmawan, 2010; Kalra, 2014).

En rata como modelo experimental se determinó que la administración de inhibidores de α -glucosidasas afectan variables tales como peso corporal, alimentación, masa de tejido adiposo, lipogénesis, actividad de enzimas lipasa y lipoproteín lipasa, sensibilidad a la insulina en adipocitos y músculo esquelético, además de disminuir la cantidad de lípidos. Cabe destacar que muchos de los experimentos que sustentan lo anterior fueron ensayados usando acarbosa como inhibidor de α -glucosidasas (Puls, 1996).

Unos de los primeros inhibidores de α -glucosidasas disponibles a nivel comercial como antihiper glucémicos orales para el control de la DMII y más ampliamente utilizados son acarbosa, voglibosa y miglitol (Puls, 1996; Asano, 2003).

Estructuralmente la acarbosa es un tetrasacárido lineal de residuos de D-glucosa, y actúa uniéndose al sitio activo de α -glucosidasas intestinales (maltasa-glucoamilasa y sacarasa-isomaltasa). Este inhibidor presenta una CI_{50} de $0.5\mu M$ sobre sacarasa de cerdo (Schmidt *et al.*, 1977) e inhibe también α -amilasa pancreática y α -glucosidasa de *S. cerevisiae* (en todos los casos el tipo de inhibición es competitiva); de manera que retarda y evita la absorción de carbohidratos, maltasa es más susceptible a inhibición por acarbosa con respecto a sacarasa (Lebovitz, 1997; Breitmeier *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1999; Kimura *et al.*, 2005).

Voglibosa es un derivado de la valiolamina, y presenta CI_{50} sobre maltasa y sacarosa de 0.015 y $0.0046\mu M$, respectivamente (Horii *et al.*, 1986). Miglitol inhibe α -glucosidasa lisosomal, sacarasa, maltasa, isomaltasa y maltasa-glucoamilasa presentando valores CI_{50} de: 0.35, 0.11,

1.3, 1.2 y 1.0 μM , respectivamente (Kuriyama *et al.*, 2008; Mohan *et al.*, 2010; Natori *et al.*, 2011). En la figura 2 se presenta la estructura de sustratos e inhibidores de α -glucosidasas.

La efectividad de inhibición de la acarbosa se determinó mediante ensayos *in vitro* e *in vivo* mostrando, incluso, efectos retardantes y/o benéficos como la prevención de padecimientos neurales, enfermedades cardiovasculares, disminución de los niveles de triglicéridos y de la hiperinsulinemia (relacionado directamente con la disminución del nivel de glucosa en sangre) (Puls 1996; Hanefeld *et al.* 2004). Acarbosa y voglibosa no son absorbidas en el intestino, tienen poca biodisponibilidad y sus residuos se eliminan a través de las heces, por el contrario, el miglitol es absorbido en la parte superior del intestino y se excreta a través de los riñones (Lebovitz, 1997).

Los inhibidores de α -glucosidasas presentan ventajas sobre otros fármacos hipoglucémicos; la metformina, por ejemplo, se asocia con el incremento del riesgo a sufrir acidosis láctica, mientras que las tiazolidinedionas incrementan el riesgo de sufrir problemas cardiovasculares (Hamnvik y McMahon, 2009).

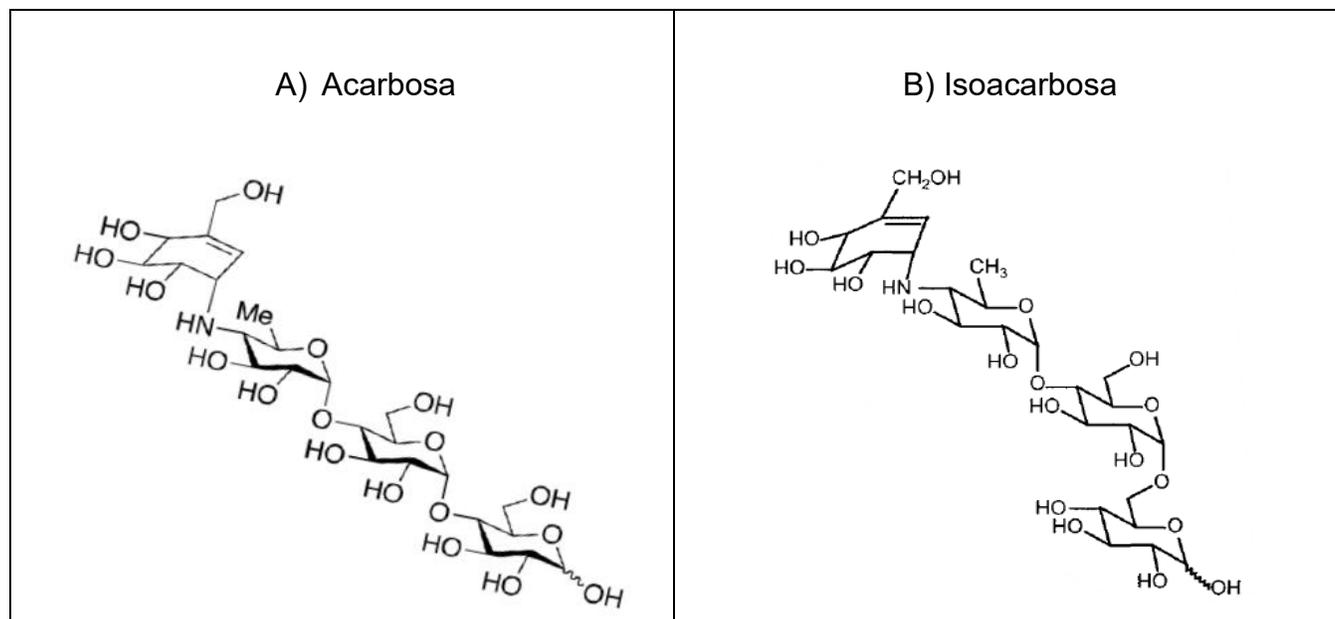
En China y Japón, los fármacos orales más recetados para el control de la DMII son inhibidores de α -glucosidasas, países que se encuentran entre los diez primeros lugares de naciones afectadas por la DMII (Kalra *et al.* 2014). Recomendaciones acerca del uso de estos compuestos han sido emitidos por instituciones como European Diabetes Policy Group y American Diabetes Association (Van de Laar *et al.* 2005).

Actualmente compuestos con potencial inhibidor de α -glucosidasas son inicialmente ensayados *in vitro* para evaluar su efectividad, en la tabla 1 se presentan algunos compuestos evaluados como inhibidores de α -glucosidasas.

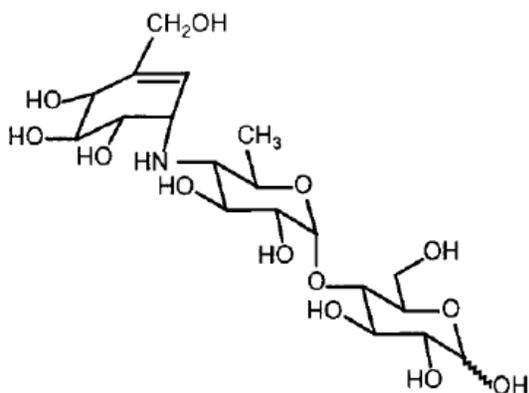
Tabla 1. Algunos inhibidores de α -glucosidasas

Inhibidor	α -glucosidasa	Tipo de inhibición	Referencia
Acarbosa	α -glucosidasa I	Competitiva	Kimura <i>et al.</i> , 2004
	α -glucosidasa II	Competitiva	Breitmeier <i>et al.</i> , 1997; Kimura <i>et al.</i> , 2004; Jocković <i>et al.</i> , 2013
Acarviosín-glucosa	α -glucosidasa I	Competitiva	Kimura <i>et al.</i> , 2004
	α -glucosidasa II	Competitiva	Kimura <i>et al.</i> , 2004
Isoacarbosa	α -glucosidasa I	Competitiva	Kimura <i>et al.</i> , 2004
	α -glucosidasa II	Competitiva	Kimura <i>et al.</i> , 2004
1-deoxinojirimicina	α -glucosidasa II	Competitiva	Breitmeier <i>et al.</i> , 1997
Calistegina A3	α -glucosidasa II	Competitiva	Jocković <i>et al.</i> , 2013
Calistegina B2	α -glucosidasa II	Competitiva	Jocković <i>et al.</i> , 2013

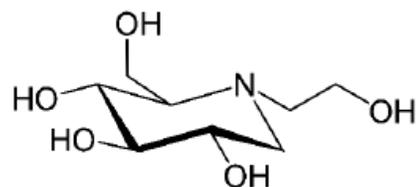
Sin embargo, se debe tener en cuenta que la digestión de carbohidratos en animales y el ser humano es más compleja que la degradación de sustratos específicos *in vitro*. La actividad *in vivo* de las α -glucosidasas puede ser heterogénea. Dado lo anterior, no sorprende que se reporten eficiencias de inhibición distintas de un inhibidor ensayado *in vivo* e *in vitro* (Harvey y Ferrier, 2011; Newcomer y McGill, 1966; Elsenhans y Caspary, 1987; Puls, 1996; Gray, 1984).



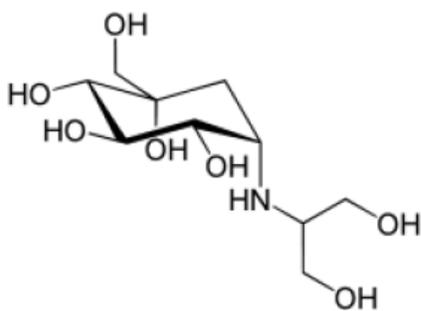
B) Acarviosín-glucosa



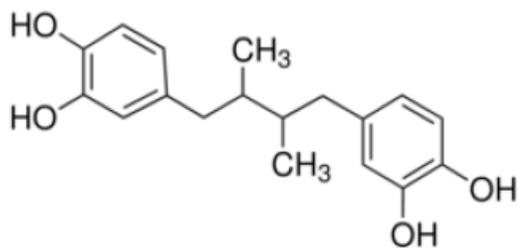
D) Miglitol



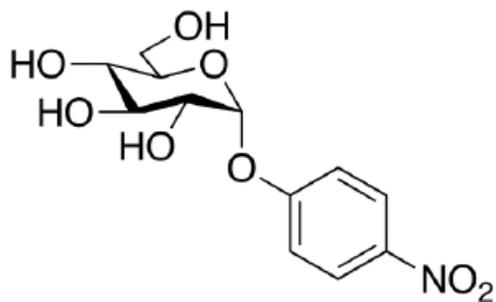
E) Voglibosa



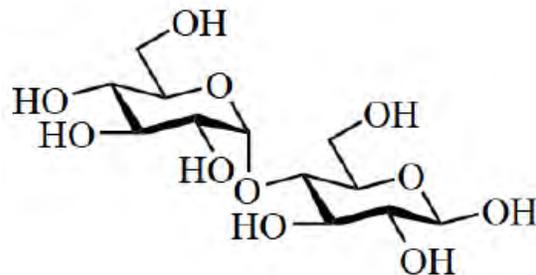
F) Ácido nordihidroguaiarético (NDGA)



G) *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosido (*p*NPG)



H) Maltosa



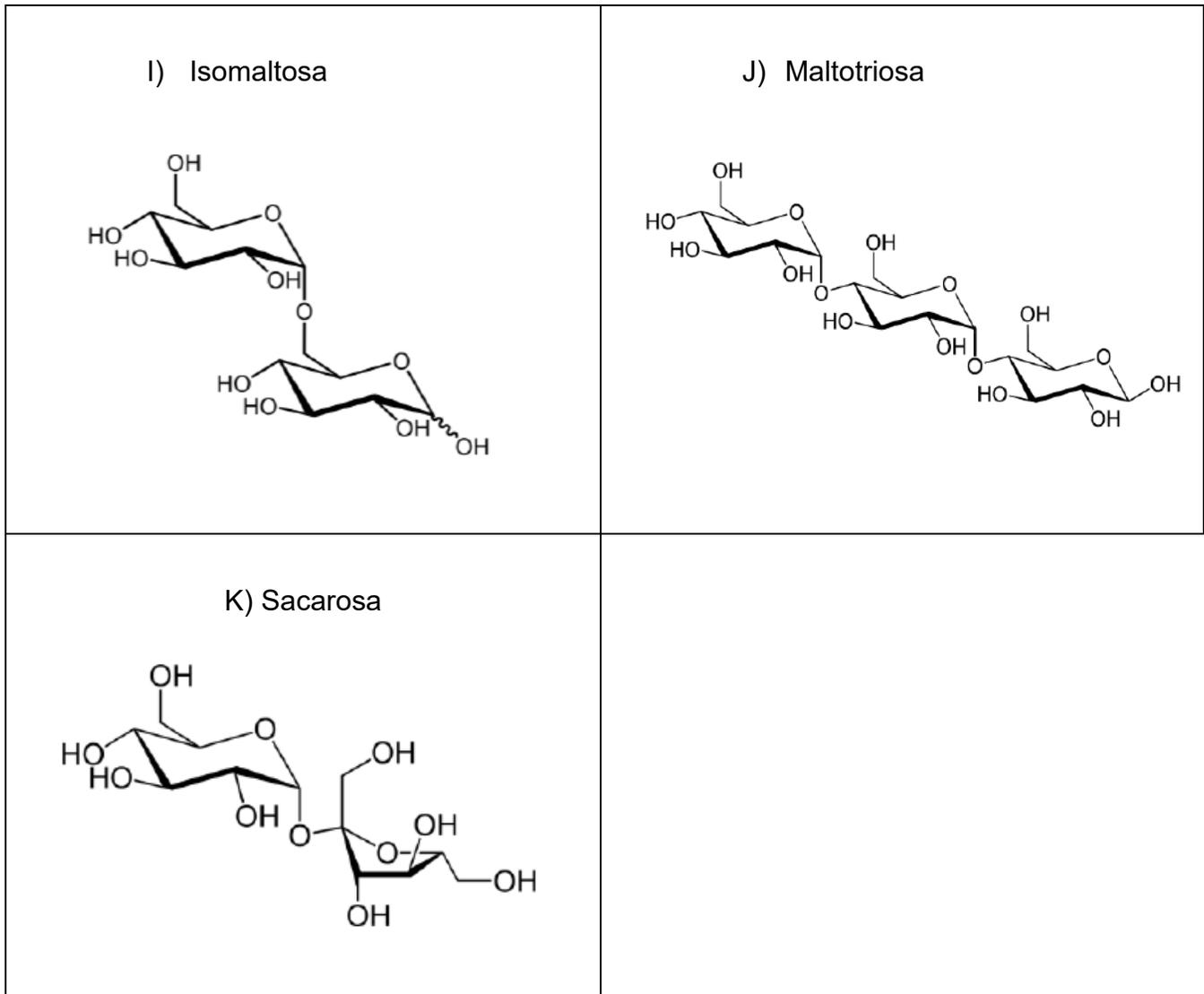


Figura 2. Estructura de inhibidores (A a E), sustratos de α -glucosidasa (G a K) y NDGA (F).

2.3 DMII en México e importancia de la medicina tradicional.

De acuerdo con la Federación Internacional de la Diabetes (IDF, por sus siglas en inglés) para el año 2015, la DM es considerada una epidemia a nivel mundial con mayor prevalencia en hombres con respecto a mujeres. Se calcula que al menos en el año 2015 existían 415 millones de personas con DM y la expectativa es que para el 2040 esta cifra crezca considerablemente (Wild *et al.* 2004; NOM-015-SSA2-2010). También es importante tomar en cuenta que los pacientes diagnosticados podrían comprender solamente el 50% de la población total que padece DM, pues existen personas con dicha enfermedad que por la ausencia de síntomas

ignoran que la padecen (Nathan, 1993; Escobar y Tébar, 2009); el 80% de decesos ocasionados por DM o alguna de sus complicaciones se presentan en países de ingresos bajos a medios (Organización Mundial de la Salud, 2009; NOM-015- SSA2-2010), dentro de los cuales figura nuestro país.

Para México la WHO (World Health Organization) estima que el número de pacientes con DM en el 2002 superaba los 2 millones y se esperaba que esta cifra creciera a 6 millones para el año 2030 (WHO, 2004); sin embargo, para el año 2015 los casos de diabetes en México ya superaban los 11 millones. La DM ocupa el primer lugar en número de defunciones, con una tasa de mortalidad que tiende a incrementar siendo sus complicaciones cardiovasculares las principales causas de defunción. Por lo anterior, la DM representa un gasto importante para las finanzas públicas. En México, al igual que en otros países existen problemas que obstaculizan la contención de dicha enfermedad, tales como el desabasto de medicamentos, falta de instalaciones y equipo ausente o deficiente, limitación o ausencia de apoyo psicológico y nutricional, escaso automonitoreo por parte de los pacientes, entre otros (Bnouham *et al.*, 2006; NOM-015- SSA2-2010).

La norma oficial mexicana para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus (NOM-015- SSA2-2010) exhorta al uso de evidencia científica para constituir programas de manejo primario (prevención, detección y diagnóstico), secundario (pacientes confirmados con DM y cuyo objetivo es evitar la aparición de complicaciones agudas) y terciario (pacientes con complicaciones crónicas) de la DM. La creciente epidemia de DMII enfatiza la necesidad de descubrir y caracterizar agentes hipoglucémicos nuevos, naturales y seguros derivados de productos que se ingieran cotidianamente tales como plantas, frutas y verduras, procurando que los efectos secundarios resulten poco relevantes (Alarcon-Aguilara, 1998; Grover *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2004; Apostolidis *et al.*, 2006; Andadre-Cetto *et al.*, 2008; Darmawan, 2010).

En México diversas poblaciones recurren a la medicina tradicional ya sea por la inaccesibilidad para adquirir fármacos antidiabéticos o bajo la premisa de que “lo natural es inocuo”, debido a lo anterior existen especies de plantas mexicanas recomendadas para el tratamiento de la DMII; sin embargo, es de vital importancia evaluar el efecto de las plantas referidas para determinar

si efectivamente funcionan como coadyuvantes en el tratamiento de la DM y descartar posibles efectos tóxicos (Bnouham *et al.*, 2016). Actualmente existen reportes acerca de distintas plantas nativas de México con actividad inhibitoria de α -glucosidasas; en la tabla 2 se resumen algunas de ellas.

Tabla 2. Plantas Mexicanas Usadas en medicina tradicional como coadyuvantes en el tratamiento de DMII y que han sido reportadas con actividad inhibitoria de α -glucosidasas (tabla modificada de Mata *et al.*, 2013).

Familia	Planta	Extracto	Fuente de α -glucosidasa
Annonaceae	<i>Annona squamosa</i> L. (raíces)	Hidro-alcohólico	Homogenado de intestino de rata
	<i>Malmea depressa</i> (raíces y hojas)	Butanólico	Levadura de panadero
Apiaceae	<i>Cuminum cyminum</i> (semillas)	Acuoso	Homogenado de intestino de rata
Asteraceae	<i>Achillea millefolium</i> (partes aéreas)	Hidro-alcohólico	Homogenado de intestino de rata
	<i>Artemisia absinthium</i> (partes aéreas)	Hidro-alcohólico	Homogenado de intestino de rata
	<i>Bidens pilosa</i> (partes aéreas)	Hidro-alcohólico	Homogenado de intestino de rata
	<i>Brickellia cavanillesii</i> (partes aéreas)	Acuoso	Levadura de panadero
	<i>Calea ternifolia</i> (partes aéreas)	Hidro-alcohólico	Homogenado de intestino de rata
	<i>Iostephane heterophylla</i> (partes aéreas)	Hidro-alcohólico	Homogenado de intestino de rata
	<i>Taraxacum officinale</i> (toda la planta)	Hidro-alcohólico	Homogenado de intestino de rata

Tabla 2. Continuación.

Bignoniaceae	<i>Tecoma stans</i> (ramas)	Hidro-alcohólico	Homogenado de intestino de rata
Bixaceae	<i>Cochlospermum vitifolium</i> (Corteza)	Metanólico	Homogenado de intestino de rata
Boraginaceae	<i>Tournefortia mutabilis</i> (tallos)	Metanólico	Homogenado de intestino de rata
Brassicaceae	<i>Lepidium virginicum</i> (hojas)	Hidro-alcohólico	Homogenado de intestino de rata
Cucurbitaceae	<i>Momordica charantia</i> (hojas y frutos)	Metanólico	Levadura de panadero
Convolvulaceae	<i>Ipomea batatas</i> (raíces)	Orgánico	Intestino de rata (pulverizado)
Euphorbiaceae	<i>Ricinus communis</i> (hojas)	Hidro-alcohólico	Homogenado de intestino de rata
Fabaceae	<i>Acacia farnesiana</i> (ramas)	Hidro-alcohólico	Homogenado de intestino de rata
	<i>Leptolobium panamense</i> (corteza)	Butanólico	Levadura de panadero
	<i>Tamarindus indica</i> (fruto)	Hidro-alcohólico	Homogenado de intestino de rata
Lamiaceae	<i>Marrubium vulgare</i> (toda la planta)	Hidro-alcohólico	Homogenado de intestino de rata
Lauraceae	<i>Persea americana</i> (hojas, semillas y corteza)	Hidro-alcohólico	Homogenado de intestino de rata
Malvaceae	<i>Guazuma ulmifolia</i> (corteza, hojas y fruto)	Hidro-alcohólico	Homogenado de intestino de rata
Meliaceae	<i>Azadirachta indica</i> (hojas)	Metanólico	Homogenado intestino de ratón
Monimiaceae	<i>Peumus boldus</i> (hojas)	Acuoso	Levadura de panadero

Tabla 2. Finaliza.

Myrtaceae	<i>Eucalyptus globulus</i> (hojas y frutos)	Hidro-alcohólico	Homogenado de intestino de rata
	<i>Psidium guajava</i> (hojas)	Hidro-alcohólico	Homogenado de intestino de rata
Onagraceae	<i>Ludwigia octovalvis</i> (partes aéreas)	Hidro-alcohólico	Homogenado de intestino de rata
Pinaceae	<i>Pinus sp.</i> (corteza)	Etanólico	Levadura de panadero
Piperaceae	<i>Piper sanctum</i> (hojas)	Hidro-alcohólico	Homogenado de intestino de rata
Rosaceae	<i>Crataegus mexicana</i> (semillas hojas y ramas)	Hidro-alcohólico	Homogenado de intestino de rata
	<i>Prunus serótina</i> (frutos)	Hidro-alcohólico	Intestino de rata (pulverizado)
Smilacaceae	<i>Smilax officinalis</i> (raíces)	Acuoso	Levadura de panadero
Urticaceae	<i>Cecropia obtusifolia</i> (hojas)	Butanólico	Levadura de panadero
	<i>Urtica dioica</i> (hojas)	Acuoso	Levadura de panadero
Zingiberaceae	<i>Zingiber officinale</i> (rizomas)	Acuoso	Levadura de panadero
Rubiaceae	<i>Hintonia latiflora</i> (corteza)	Hidro-alcohólico	Homogenado de intestino de rata

2.4 *Larrea tridentata* (Moç. & Seseé ex DC.) Coville (1893)

Es una planta perteneciente a la familia Zygophyllaceae, comúnmente conocida como Gobernadora (denominada así porque suele ser dominante en el desierto) o Hediondilla (por el olor característico que despide después de llover). Es un arbusto perennifolio que se distribuye principalmente en el norte del país, de la península de Baja California a Tamaulipas e Hidalgo, así como en el sureste de los Estados Unidos, donde predominan los climas BS (clima seco, estepario, donde la evaporación excede la precipitación anual que va de 380-760 mm) y BW (clima seco, desértico, donde la precipitación anual es inferior a 250 mm) y a una altitud de entre 400 m y 1800 m (Winkelman, 1986; Conabio, 2015); demanda suelos bien drenados y con

alta concentración de oxígeno, es resistente a daños por insectos y cuenta con pocos enemigos naturales (Conabio, 2015).

L. tridentata (figura 3) es uno de los principales componentes de la vegetación árida y semiárida de México, presenta una elevada adaptabilidad, es prolífica y ejerce alelopatía negativa sobre otras plantas (Conabio, 2015). Se ha cultivado dado que su fruto es comestible, presenta varios compuestos químicos en sus hojas (que aparentemente le proporcionan protección contra herbívoros), esta condición se aprovecha por las comunidades de su entorno con varios fines tales como: producción de aceites, adhesivos, polifenoles solubles, hule, forraje, fibra para papel, glucosa, xilosa, metano, suplementos alimenticios, y como recurso medicinal (Conabio, 2015).



Figura 3. *Larrea tridentata* (Moç. & Seseé ex DC.) Coville (1893)

En México y el sur de Estados Unidos los usos medicinales que se le atribuyen son gracias a efectos positivos en infecciones de las vías urinarias, cálculos renales, malestares como dolor de riñón, cálculos biliares, inflamación de la vejiga, problemas de esterilidad, como diurético, purificador de sangre, hemorroides, fiebre, granos, golpes, cicatrización, fatiga, paludismo, reumatismo, dermatitis, hepatitis, artritis, diabetes (Alarcon-Aguilar y Roman-Ramos, 2005), cáncer, disolución de tumores, desplazamiento de matriz y aborto (Winkelman, 1986; Ara-Roldán, 1997; Abou-Gazar *et al.*, 2004; Luo *et al.*, 2004; Timmermann, 1981). Las aplicaciones para las que es destinada definen el método de preparación, así como la dosis y aplicación de la sustancia, de manera que puede ser consumida como agua de tiempo, té, ungüento, etc. (Winkelman, 1989; Conabio, 2015).

Algunas de las propiedades medicinales de *L. tridentata* han sido evaluadas, se sabe, por ejemplo, que su efecto diurético es consecuencia de su contenido de arginina, que también es de utilidad en la insuficiencia hepática y la liberación de insulina y glucagón de los islotes de Langerhans (Ara-Roldán, 1997). Moreno-Limón y colaboradores (2011) demostraron que el extracto etanólico de *L. tridentata* tiene acción anti-fúngica sobre al menos 17 hongos patógenos de importancia económica; sin embargo, se comprobó que el consumo prolongado y de dosis altas se asocia con fallas renales y hepatotoxicidad (Smith y Desmond, 1993; Sheikh *et al.*, 1997; Stickel *et al.*, 2000; Heron y Yarnell, 2001, Lambert *et al.*, 2002).

También es importante tomar en cuenta que el consumo de preparaciones herbales a pesar de aceptarse socialmente como una alternativa natural y segura frente a medicamentos convencionales, se corre el riesgo de que los consumidores no estén conscientes de los efectos secundarios que podrían sufrir al ingerirlos, o las consecuencias de consumir dosis inadecuadas (Arteaga *et al.*, 2005), por ejemplo Bnouhamy colaboradores (2006) mencionan que al menos un tercio de las plantas medicinales utilizadas para el tratamiento de DM se consideran tóxicas.

La resina de *Larrea tridentata* contiene una mezcla de flavonoides, lignanos y saponinas (triterpenoides); el lignano más abundante es el ácido nordihidroguaiarético (NDGA), también conocido como masoprocol (Gisvold y Thaker, 1974; Konno *et al.*, 1990; Sakakibara *et al.*, 1976;

Hyder *et al.*, 2002; Abou-Gazar, 2004). Las hojas y tallos verdes (fotosintéticos) son las partes de la planta en donde se encuentra el NDGA, este compuesto pudiera representar una defensa ante la herbivoría y protección ante rayos UV (Hyder *et al.*, 2002).

En resumen, *L. tridentata* es una planta nativa de México que tiene múltiples aplicaciones, entre las cuales, sobresale su papel en la medicina tradicional debido a la cantidad de químicos que contiene, dicha condición alienta la realización de investigaciones que aporten información biológica y farmacológica de sus metabolitos con la finalidad de comprobar y determinar su efectividad para las enfermedades en las que es empleada (Winkelman, 1986).

2.5 Ácido nordihidroguaiarético (NDGA)

Uno de los compuestos más abundantes en las hojas de *L. tridentata* y muy probablemente el más estudiado es el NDGA, el cual representa entre un 10-15% del peso seco de la planta (Tyler, 1994; Hyder *et al.*, 2002; Lambert *et al.*, 2002).

El NDGA inhibe el crecimiento *in vivo* e *in vitro* de células tumorales cancerígenas en ratas ya que inhibe completamente la glucólisis, respiración aerobia y anaeróbica (Lambert *et al.*, 2001; Foster y Tyler, 2012), es inhibidor de lipoxigenasa, fosfolipasa A₂ y NADH oxidasa (Avis *et al.*, 1996), es un potente antioxidante y fue usado hasta finales de los 60's en los Estados Unidos de América para la preservación de grasas y mantequillas (Ara-Roldán, 1997; Goodman *et al.*, 1970), presenta actividad biocida, antiséptica, antimicrobiana (Lira-Saldivar, 2003; Moreno-Limón *et al.*, 2011) y bactericida además de propiedades analgésicas, lo cual podría justificar su uso en padecimientos como artritis y reumatismo (Conabio, 2015), disminuye la concentración de glucosa sanguínea en ratones con DMII (inducida con streptozotocina) sin afectar la concentración de insulina en sangre; de lo anterior se infiere que el NDGA podría potenciar la actividad de la insulina (Luo *et al.*, 1998; Bnouham *et al.*, 2006), también reduce la lipólisis y el nivel de triglicéridos en ratas (Luo *et al.*, 1998; Reed *et al.*, 1999).

El consumo de NDGA por tiempos prolongados o de altas dosis induce hepatotoxicidad y nefrotoxicidad (Lambert *et al.*, 2002), este fue el motivo por el cual en 1968 fue removido de la

GRAS (List of Generally Recognized as Safe) emitida por la FDA (Food and Drug Administration) (Timmermann, 1981; Foster y Tyler, 2012).

Inicialmente, la Gobernadora fue el recurso comercial del ácido nordihidroguaiarético (NDGA) por más de 20 años, posteriormente fue reemplazado por síntesis química, sin embargo, en la medicina tradicional la fuente de NDGA continúa siendo *L. tridentata*.

3 JUSTIFICACIÓN

Los inhibidores de α -glucosidasas tienen potencial en aplicaciones agroquímicas y farmacológicas, sobresaliendo su uso en el tratamiento y control de la DMII. *L. tridentata* es usada tradicionalmente para tratar DMII. Su principal metabolito es el NDGA, un agente antioxidante, hipoglucemiante e inhibidor de α -glucosidasa de levadura (Reed *et al.*, 1999; Sato *et al.*, 2001), dicha característica es de sumo interés para ser empleado en el control de plagas. Además, no se ha estudiado su desempeño sobre α -glucosidasas intestinales de mamífero, por lo que el efecto hipoglucémico y biocida del NDGA pudiera ser debido, al menos en parte, a la inhibición de la actividad de estas enzimas.

4 OBJETIVOS

Objetivo general

- Determinar el efecto inhibitorio de partes aéreas de *Larrea tridentata* y de su metabolito, el ácido nordihidroguaiarético (NDGA), sobre la actividad de α -glucosidasas I y II.

Objetivos particulares

- Establecer un ensayo *in vitro* para evaluar el efecto inhibitorio del extracto etanólico (EE) de *L. tridentata* y del NDGA sobre α -glucosidasa I y II
- Determinar la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) tanto para el EE de *L. tridentata* como el NDGA.
- Determinar el tipo de inhibición del NDGA y el EE de *L. tridentata*
- Comprobar la presencia y cantidad de NDGA en el EE de *L. tridentata*

5 HIPÓTESIS

El EE de *L. tridentata* y su metabolito el NDGA, inhibirán la actividad α -glucosidasa *in vitro* tanto de levadura como de intestino de rata.

Puesto que el NDGA es el metabolito principal de *L. tridentata* y que su estructura contiene 2 anillos aromáticos de 6 carbonos con grupos OH, estos anillos se insertarán reversiblemente en el sitio activo de las α -glucosidasas provocando una inhibición competitiva.

Se comprobará la presencia y cantidad de NDGA en el EE de *L. tridentata*.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Extracto etanólico de Gobernadora (*Larrea tridentata*)

Se utilizó planta seca colectada en San Luis Potosí durante el mes de Julio del año 2013, los especímenes se encuentran depositados en el Herbario Nacional, Instituto de Biología, de la Universidad Nacional Autónoma de México (MEXU) (no. 534807), y en el Herbario de Plantas Medicinales, Centro Médico Siglo XXI (IMSS) (nos 11 319–11 321). El extracto de Gobernadora se obtuvo de la siguiente manera: a 100 g de hojas y talluelos de planta seca se le agregó 1 L de etanol absoluto y se agitó durante 30 min a temperatura ambiente; posteriormente se filtró y se evaporó el etanol en un rota vapor. La resina obtenida fue liofilizada y las hojuelas y polvo resultantes se almacenaron en un envase de aluminio y en desecación. El rendimiento obtenido fue de 11 g por cada 100 g de planta.

6.2 Obtención de α -glucosidasas de levadura

La obtención del extracto de *Saccharomyces cerevisiae* con actividad de α -glucosidasa (Figura 4) se llevó a cabo de acorde con la metodología de Rangel y colaboradores (2011) con las siguientes consideraciones: 200 mg de levadura seca comercial Tradipan®, fueron colocados en un tubo de ensayo de 10 mL. Se adicionaron 5 mL de amortiguador de fosfatos NaPO_4 0.1M pH 6.8 y 70 mg de sacarosa al tubo; la mezcla levadura-amortiguador-sacarosa fue agitada durante 30 segundos con el apoyo de un vórtex y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo la mezcla fue centrifugada a 2700 rpm (equivalentes a 1000 g) en una centrífuga Sol-Bat C-300 durante 5 minutos.

De la mezcla centrifugada se eliminó el sobrenadante y el precipitado fue re-suspendido en 5 mL de amortiguador de fosfatos NaPO_4 0.1 M pH 6.8, se agregaron micro esferas de lisis cuyo volumen comprendía una tercera parte del volumen total. La mezcla fue sometida a cinco ciclos de agitación en vórtex durante 60 s a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C), alternados con cinco ciclos de incubación a 4 °C (colocando la muestra en un recipiente con hielo) 120 s.

Posteriormente la mezcla de células lisadas se centrifugó a 1600 g (4500 rpm) durante 5 minutos en la centrífuga Spectrafuge (Labnet International Inc., NJ, USA) manteniendo una temperatura de 4 °C. El precipitado fue descartado y el sobrenadante (fuente de enzima) fue colectado en tubos eppendorf® de 1,5 mL; los tubos fueron almacenados a -20 °C.

6.3 Obtención de α -glucosidasa intestinal de rata

La obtención de microvellosidades de intestino de rata se realizó por una modificación del método de Cheeseman y O'Neill (2006) de la siguiente forma: 3 ratas Wistar hembras, en ayuno por 16 h, de 416, 337 y 357 g de peso corporal, fueron anestesiadas con una inyección intraperitoneal de pentobarbital a una dosis de 45 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Se hizo una incisión en la parte ventral (abdomen) y se identificó el intestino delgado. Con el animal anestesiado, se realizaron 2 incisiones, una al inicio del intestino delgado (duodeno) y otra en su parte final (íleon), posteriormente, por el lumen del intestino delgado se hizo pasar un volumen aproximado de 50mL de solución fría salina isotónica adicionada con PMSF (inhibidor de proteasas para preservar las proteínas celulares) 0.1 mM. A continuación, los vasos que irrigan al intestino delgado fueron cortados y la sección de intestino se transfirió a un vidrio que se mantenía frío gracias a que estaba asentado sobre una cama de hielo. El animal fue sacrificado cortando la aorta. Con ayuda de una espátula se ejerció una presión moderada y sostenida a lo largo del intestino delgado, para desprender la mucosa intestinal obtenida de los tres ejemplares, la cual se colectó y homogeneizó en partes en un homogeneizador Dounce de 7 mL con una solución de manitol 300 mM, EGTA 5 mM, Tris·Cl 2 mM pH 7.4 y PMSF 0.1 mM (Esta mezcla comprende la solución 1). En todos los casos el PMSF se agregó justo antes de usar la solución. El homogenado se llevó a 65 mL con solución 1, se diluyó con 65 mL de agua desionizada y se

adicionaron 18 mL de $MgCl_2$ 100 mM, con lo cual las membranas basolaterales y gran parte de la porción intracelular se congregan. Esta mezcla se agitó durante 15 min con la ayuda de una parrilla de agitación y su respectivo magneto. Todas las soluciones se mantuvieron a una temperatura de 4 °C (Figura 5).

La mezcla fue centrifugada a 1,600 g durante 15 min, a 4 °C. El precipitado fue descartado y el sobrenadante se centrifugó nuevamente a 20,000 g durante 30 min a 4 °C. De la centrifugación anterior se descartó el sobrenadante y el precipitado fue suspendido manualmente en 30 mL de una solución de manitol 150 mM, EGTA 2.5 mM, Tris·Cl 6 mM pH 7.4 y PMSF 0.05 mM de a 4°C (esta mezcla comprendía la Solución 2), para esta solución se repitió un proceso de precipitación adicionando 4 mL de $MgCl_2$ 100mM y agitándola durante 15 min con la ayuda de una parrilla de agitación y su respectivo magneto. Posteriormente se centrifugó la mezcla a 1,600 g durante 15 min. Se descartó el precipitado y se colectó el sobrenadante, mismo que se centrifugó nuevamente a 20,000 g durante 30 min. Se descartó el sobrenadante y el precipitado (fuente de enzima) fue suspendido en amortiguador de fosfatos $NaPO_4$ 0.1 M pH 6.8.

6.4 Actividad *in vitro* de α -glucosidasa

La actividad α -glucosidasa fue determinada de acuerdo con el método de Matsui y colaboradores (1996), el cual se basa en la liberación de 4-nitrofenol del *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosido (*p*-NPG). La mezcla de reacción tenía un volumen total de 250 μ L y contenía: amortiguador de fosfato de sodio $NaPO_4$ 0.1 M pH 6.8, *p*-NPG 2.3 mM, y fuente de enzima. Se realizaron ensayos previos para ajustar un volumen de enzima equivalente a una actividad de 0.06 unidades de absorbancia por minuto. El ensayo se llevó a cabo en microplaca de 96 pozos y la reacción fue iniciada con la adición de enzima. El cambio de absorbancia a 405 nm fue monitoreado durante 5 minutos (a intervalos de 30 s) con un lector de microplacas Elx800 (BioTek). El ensayo se realizó por triplicado

6.5 Determinación de CI_{50} y K_i *in vitro*

Los ensayos para determinar la existencia de efecto inhibitorio por parte del NDGA y/o EE de *L. tridentata* fueron llevados a cabo de acuerdo con la metodología descrita en la sección 6.4

con la adición de distintas concentraciones de NDGA (Sigma-Aldrich) ó EE de *L. tridentata* en las mezclas de reacción dentro de los siguientes rangos:

- Para el NDGA se probaron concentraciones entre 0.264-122 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
- Para el EE de *Larrea tridentata* se probaron concentraciones entre 4.84-1,000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
- Como control positivo de la inhibición de α -glucosidasas se emplearon concentraciones de acarbosa entre 50 -16,000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$.

El valor de Concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) expresa la concentración de inhibidor necesaria para reducir al 50% la actividad enzimática; estos valores fueron calculados por el método gráfico, se realizó también una prueba de ANOVA con *post-hoc* de Bonferroni para determinar si existían diferencias significativas con un α de 0.05 entre las CI_{50} para los distintos inhibidores. Adicionalmente se llevó a cabo el cálculo de K_i (constante de inhibición) por el método de Brandt y colaboradores (1987), que demuestra que en inhibición competitiva, $K_i = CI_{50}/3$, mientras que para inhibición no competitiva, $K_i = CI_{50}$.

6.6 Determinación del tipo de inhibición

NDGA y EE de *L. tridentata* inhibieron la actividad α -glucosidasa de levadura, lo mismo que el control positivo acarbosa, por lo cual se procedió a determinar el tipo de inhibición replicando la metodología de la sección 6.4, con la diferencia de que se emplearon concentraciones de *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosido (*p*-NPG) entre 0.1-2.5 mM con las siguientes concentraciones de inhibidor: CI_{50} de NDGA, CI_{50} de EE de *L. tridentata*, y CI_{50} de acarbosa. La liberación de 4-nitrofenol se monitoreó durante 10 min a intervalos de 40 s.

Los resultados obtenidos fueron graficados de acuerdo con el método de Hanes-Wolf (Hanes, 1932) para la determinación del tipo de inhibición. Se obtuvieron los parámetros K_m y V_{max} para cada caso y se realizó una prueba de ANOVA con *post-hoc* de Bonferroni para determinar si existían diferencias significativas con un α de 0.05 en los parámetros obtenidos bajo las distintas condiciones de estudio.

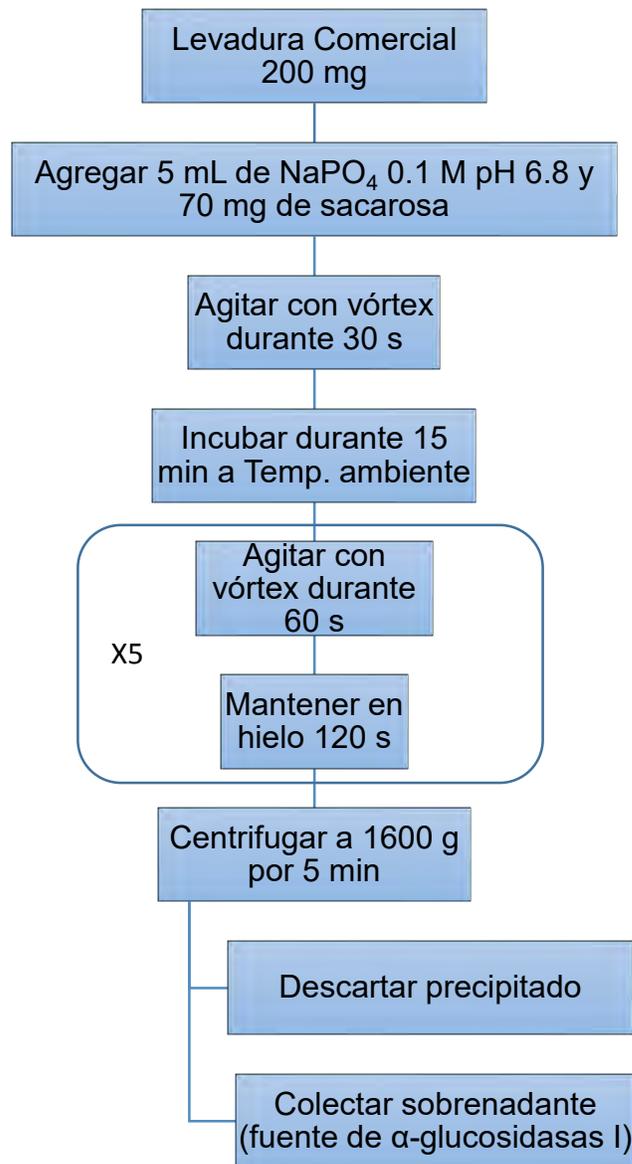


Figura 4. Diagrama de flujo de la metodología empleada para obtener un extracto crudo de levadura con actividad de α -glucosidasas I

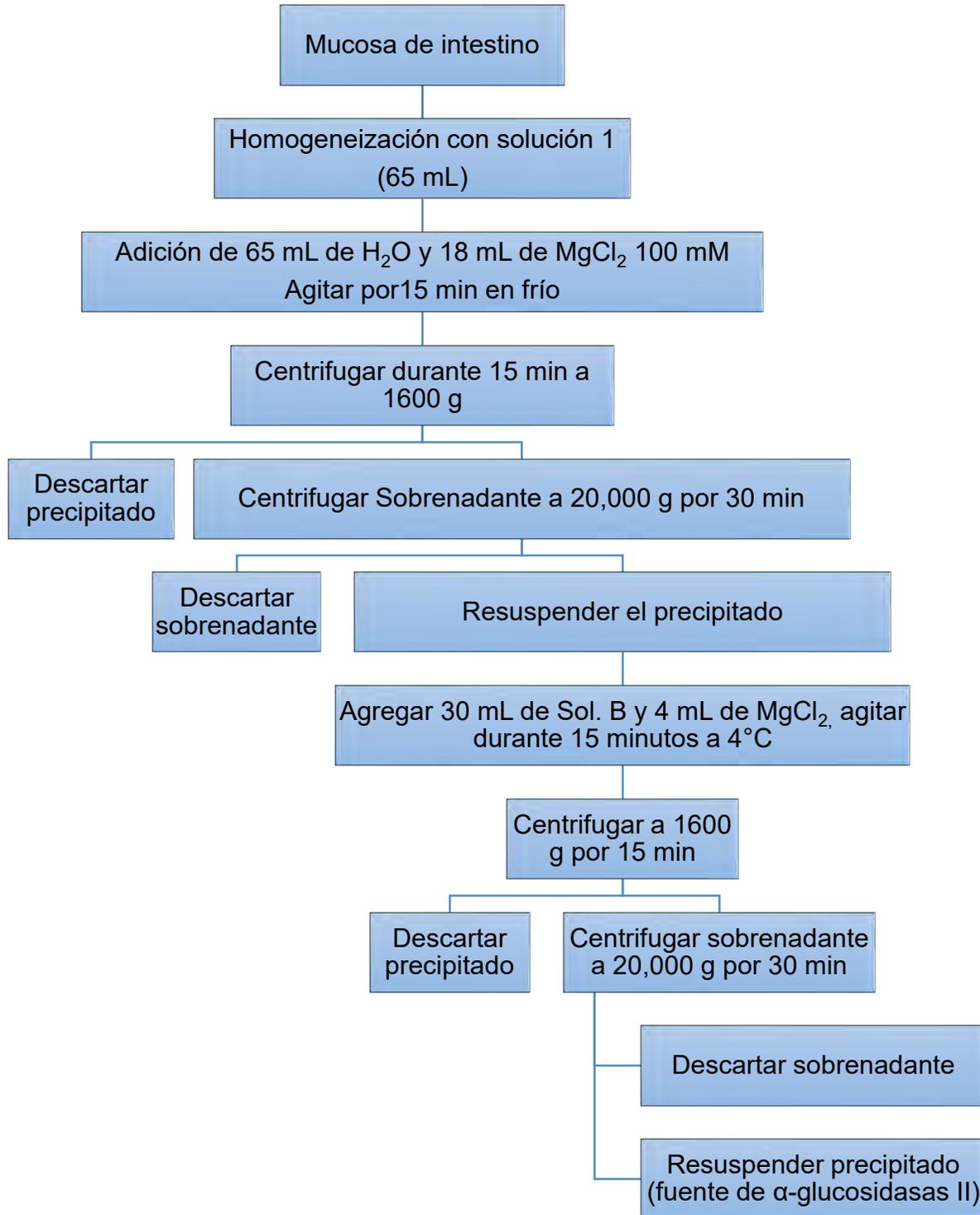


Figura 5. Diagrama de flujo de la metodología empleada para obtener una fracción de microvellosidades de intestino con actividad de α -glucosidasas II.

6.7 Identificación y cuantificación de NDGA en *L. tridentata*.

Para determinar la presencia y cantidad de NDGA en el EE de *L. tridentata* se utilizó la técnica de cromatografía en capa fina (TLC, por sus siglas en inglés). Como estándar se corrió una solución de NDGA (Sigma-Aldrich con un grado de pureza \geq al 97%) a una concentración de $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de etanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$).

Para realizar la curva de calibración de NDGA de la solución estándar se tomaron alícuotas de los siguientes volúmenes: 0.5, 2.5, 5, 7.5 y $10 \mu\text{L}$, que se aplicaron en los carriles 1-2, 3-4, 6-7, 9-10 y 11-12, respectivamente; la muestra a resolver fue una solución del EE de *L. tridentata* a una concentración de $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de etanol, de la cual se colocaron $3 \mu\text{L}$ en el carril 5 y 8. Las alícuotas fueron aplicadas con el equipo CAMAG ATS 4[®] sobre una placa de $10 \cdot 10 \text{ cm}$ de sílica gel (MERCK) con diámetro de poro de 60 \AA y grosor de capa de $250 \mu\text{m}$ adherida a una superficie de vidrio. Cabe señalar que la placa fue pre-eluida con metanol (CH_3OH) y posteriormente activada a 120°C durante 20 minutos.

El desarrollo de la placa se llevó a cabo en una cámara horizontal (CAMAG), la fase móvil contenía Hexano (C_6H_{14}), Cloroformo (CHCl_3) y Acetato de etilo ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$) en proporción 2:4:6, la distancia de migración fue de 70 mm. La placa fue escaneada en un densitómetro CAMAG TLC Scanner 3[®] en distintas longitudes de onda entre 200-400 nm (en saltos de 20 nm), los resultados se analizaron con el software winCATS Planar Chromatography Manager (CAMAG) para determinar el R_f (parámetro que es igual a la distancia recorrida por la muestra \cdot la distancia recorrida por el solvente o fase móvil⁻¹) del NDGA y la longitud de onda (λ) a la cual presenta mayor absorbancia. Para constatar que la muestra de *L. tridentata* tuviera NDGA se procedió a obtener el espectro de absorción de todos los carriles (190-400 nm, en saltos de 1 nm), acotado al R_f obtenido para el NDGA. Los resultados fueron graficados.

Posteriormente, la placa se asperjó de manera uniforme con una solución de cloruro férrico (FeCl_3) 0.1% m/v (ampliamente utilizado en pruebas colorimétricas para identificar grupos fenoles). La placa derivatizada fue escaneada en longitudes de onda que van de 400-800 nm

(a intervalos de 50 nm), los resultados fueron analizados por el software winCATS Planar Chromatography Manager (CAMAG®) para:

-Identificar la longitud de onda (λ) a la cual el NDGA presenta mayor absorbancia (una vez derivatizada la placa).

-Obtener la curva de calibración con los estándares de NDGA (a través de la regresión polinómica de área bajo la curva).

-Determinar la cantidad de NDGA en el EE de *L. tridentata* al compararlo con la curva patrón de NDGA.

7 RESULTADOS

7.1 Actividad *in vitro* de α -glucosidasa

Inicialmente se evaluó la actividad del extracto de levadura para verificar que la concentración de enzima en el ensayo tuviera una relación lineal con la velocidad inicial medida como cambio de absorbancia a 405 nm por minuto. Se observó una correspondencia lineal de la actividad de α -glucosidasa (figura 6) a medida que aumenta la concentración de extracto de levadura (fuente de α -glucosidasa I) entre actividades de 0 y 0.3 unidades de absorbancia por minuto.

Dicho resultado nos indica que la fuente de α -glucosidasas I era confiable para continuar con los procedimientos posteriores; dado lo cual, a partir de este ensayo se realizó el cálculo para determinar el volumen de extracto que diera una actividad de 0.06 unidades de absorbancia por minuto para la determinación de los CI_{50} de Acarbosa, NDGA y EE de *L. tridentata*. Para los ensayos de determinación del tipo de inhibición el cambio de absorbancia por minuto se ajustó a 0.2 unidades de absorbancia por minuto.

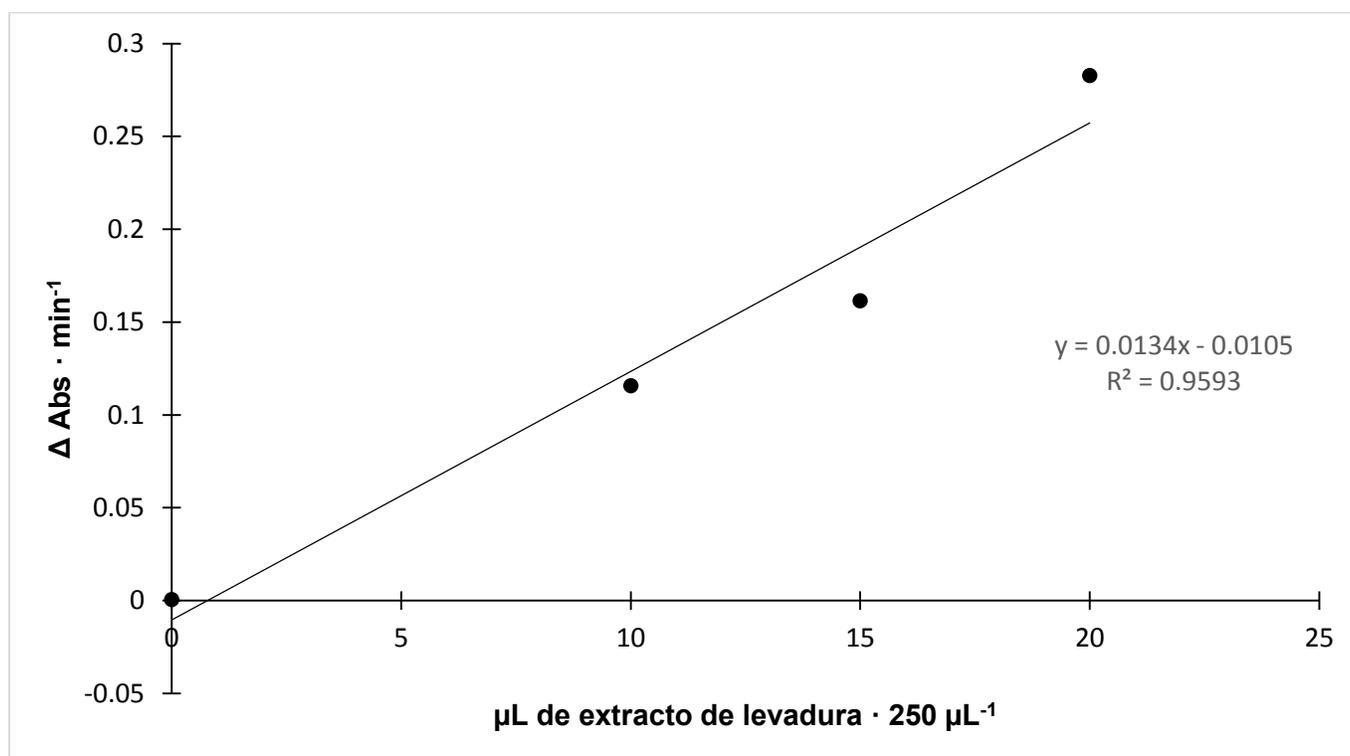


Figura 6. Relación entre actividad de α -glucosidasa y el volumen del extracto de levadura.

La figura 7 muestra que la actividad α -glucosidasa de la fracción de microvellosidades de intestino de rata aumenta de manera lineal a medida que la cantidad de enzima en el ensayo se eleva. Tal como en el caso de la actividad α -glucosidasa del extracto de levadura, los resultados de la actividad α -glucosidasa de la fracción de microvellosidades permitieron realizar los cálculos correspondientes para ajustar la velocidad de actividad enzimática en los ensayos posteriores.

Se observa que la velocidad fue mayor para la actividad enzimática de levadura, esto no es de sorprender dado que el sustrato utilizado (heterosustrato) es hidrolizado más rápidamente por α -glucosidasa I con respecto a α -glucosidasa II.

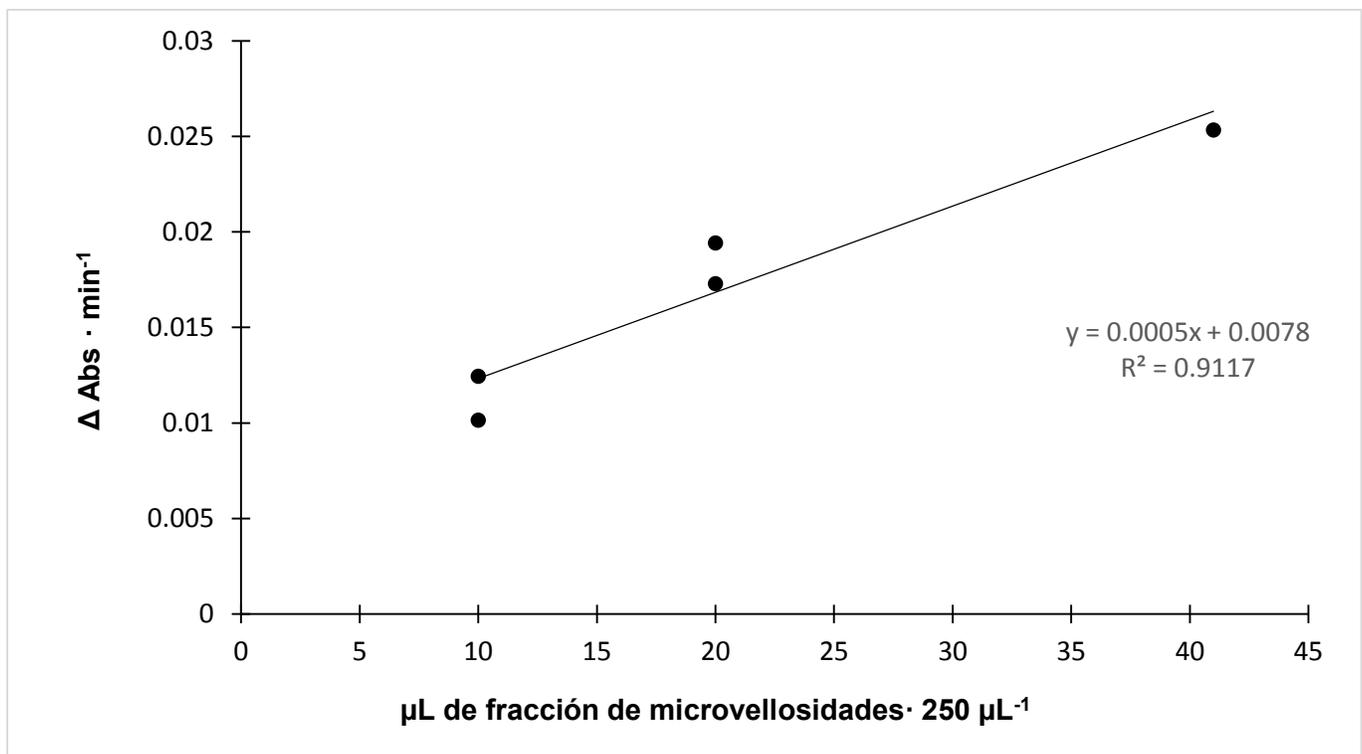


Figura 7. Relación entre actividad de α -glucosidasa y el volumen de la fracción de microvellosidades intestinales.

7.2 CI_{50} *in vitro* de α -glucosidasa de levadura

En la figura 8 se presentan las curvas de inhibición, el eje de las ordenadas corresponde al porcentaje de actividad enzimática obtenida bajo diferentes concentraciones de acarbosa, NDGA y EE de *L. tridentata*. Las pendientes del EE de *Larrea tridentata* y de NDGA son similares, mientras que la de acarbosa es menor. Claramente se observa que el NDGA es un inhibidor potente de α -glucosidasa de levadura, mientras que acarbosa es el más débil (nótese que el eje de las abscisas se presenta en escala logarítmica, esta transformación permite realizar más rápidamente el cálculo gráfico de la CI_{50}). La inhibición de α -glucosidasas I sería de utilidad para aplicaciones agroquímicas o biocidas, dado que inhibe el metabolismo de carbohidratos. *L. tridentata* también ejerció una inhibición considerable, aunque a mayores concentraciones (aproximadamente un orden de magnitud mayor).

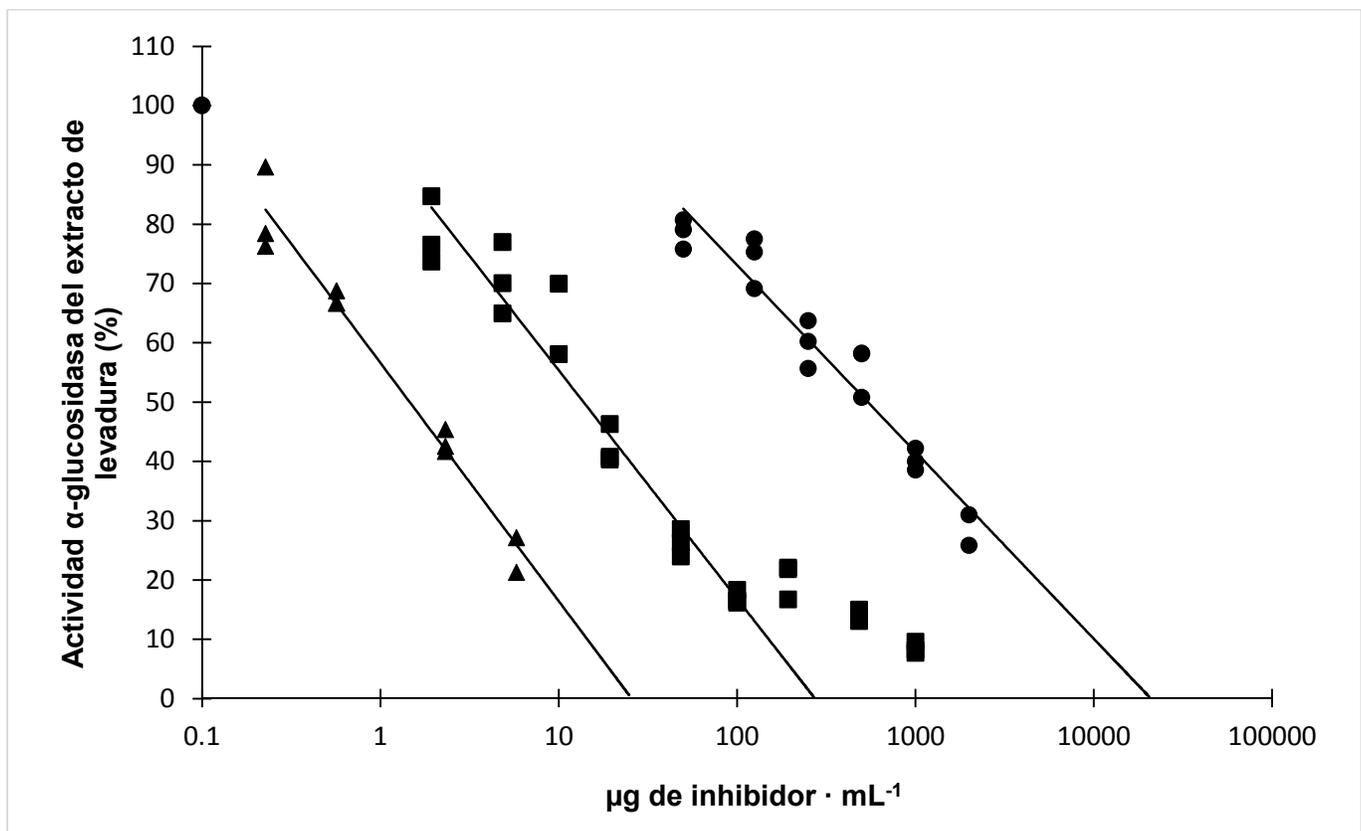


Figura 8. Determinación de la concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) para Acarbosa (●), NDGA (▲) y EE de *L. tridentata* (■) sobre la actividad α -glucosidasa del extracto levadura (*Saccharomyces cerevisiae*); glucosidasa I.

El valor de CI_{50} nos muestra de manera clara la eficiencia de inhibición de algún compuesto sobre la actividad enzimática, como era de esperarse (según el gráfico anterior), NDGA presenta una CI_{50} más pequeña, mientras que acarbosa presenta el valor de CI_{50} más elevado, los valores precisos de CI_{50} para estos tres inhibidores pueden ser consultados en la tabla 3 (recuérdese que estos resultados son válidos únicamente para α -glucosidasa de levadura).

Tabla 3. Concentraciones inhibitorias 50 para α -glucosidasa de levadura obtenidos para cada uno de los inhibidores ensayados. Los valores son media \pm DS (n = 3). Letras distintas denotan diferencias significativas (P<0.05, ANOVA y Bonferroni).

	CI_{50} ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
Acarbosa	579 \pm 33.6a
NDGA	1.75 \pm 0.4b
EE de <i>L. tridentata</i>	15 \pm 2.5c

7.3 CI_{50} *in vitro* de α -glucosidasa de intestino de rata

El ensayo para identificar la CI_{50} de los compuestos evaluados evidenció que el NDGA y EE de *L. tridentata* no ejercen inhibición sobre la actividad α -glucosidasa de la fracción de microvellosidades, mientras que para el control positivo (acarbosa) se determinó una CI_{50} de 23.6 μg de acarbosa $\cdot \text{mL}^{-1}$ (ver figura 9). La CI_{50} de acarbosa fue más de 20 veces menor con respecto a la obtenida para el mismo inhibidor, pero sobre la actividad α -glucosidasa de levadura, esta diferencia podría ser explicada como consecuencia de la estructura de dicho inhibidor, ya que asemeja a una tetramaltosa (es decir, una configuración de sustrato homogéneo).

El hecho de presentar valores de CI_{50} tan dispares refleja que entre los sitios activos de ambas familias (α -glucosidasas I y II) existen diferencias importantes, e incluso, como señala Kimura (2000), las α -glucosidasas II reconocen preferentemente la estructura maltosil.

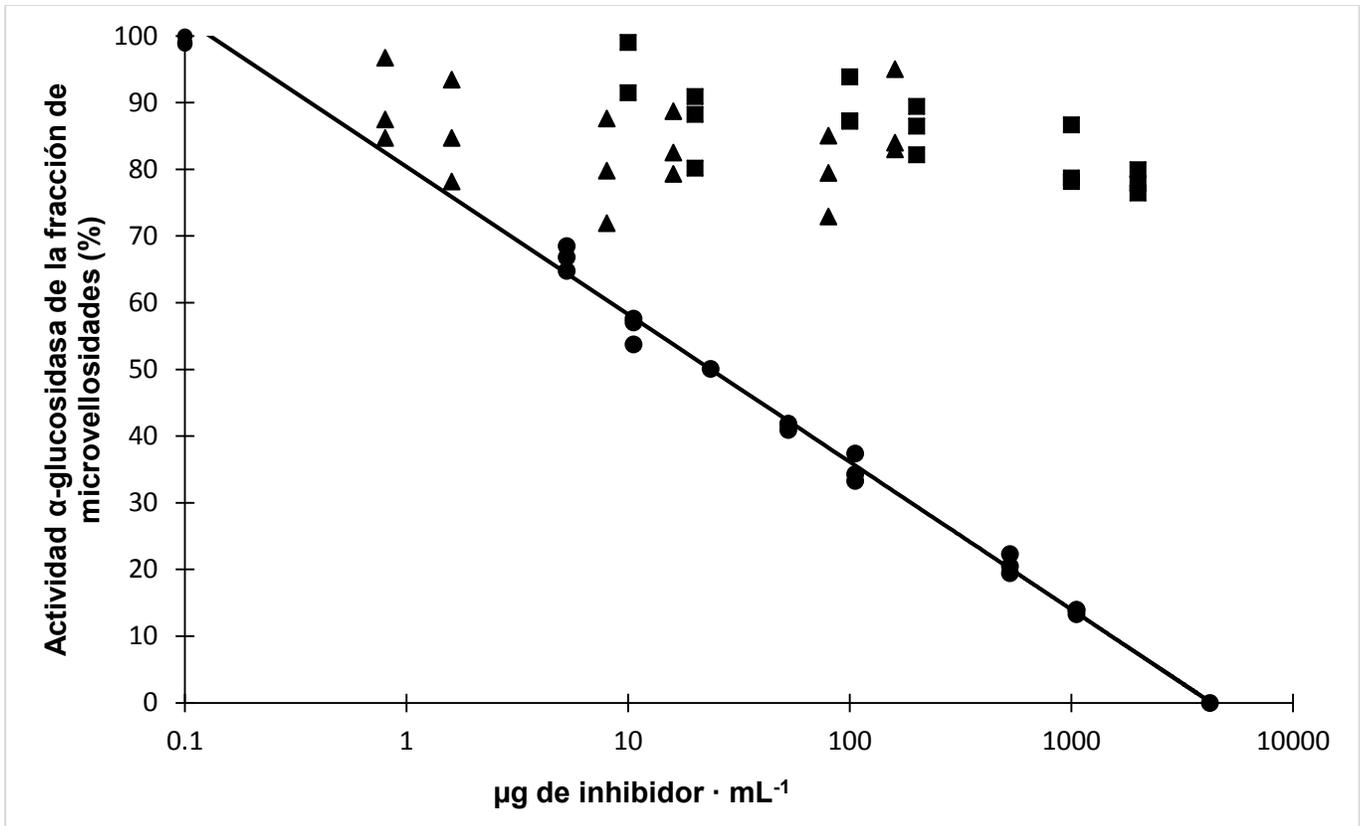


Figura 9. Determinación de la concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) para para Acarbosa (●), NDGA (▲) y extracto etanólico de *L. tridentata* (■) sobre la actividad α -glucosidasa de la fracción de microvellosidades de rata (α -glucosidasa II).

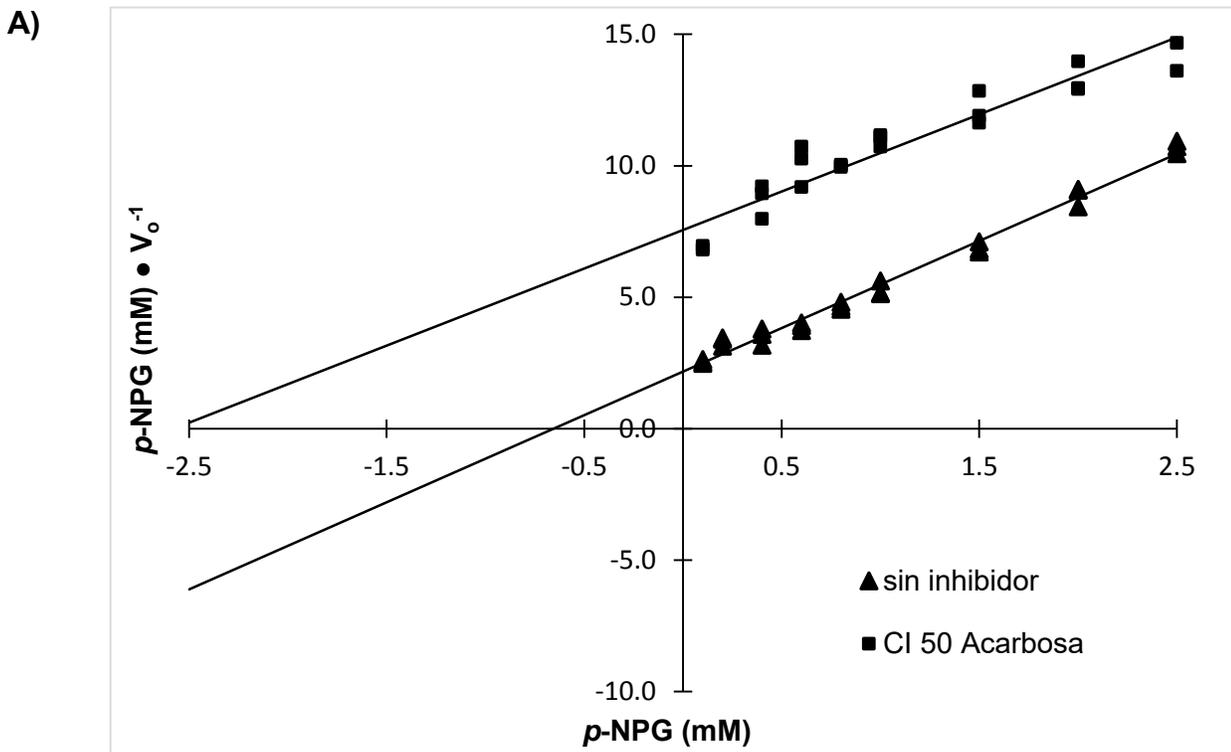
7.4 Tipo de inhibición

Conocer el tipo de inhibición es de suma importancia para entender el comportamiento de las enzimas, además, tiene implicaciones importantes acorde a las distintas aplicaciones de un inhibidor; por ejemplo, en el diseño y eficacia de productos farmacéuticos. Para la determinación del tipo de inhibición se ensayaron distintas concentraciones de *p*-NPG (sustrato) en presencia y ausencia de una concentración fija de inhibidor.

La curva resultante se linearizó por el método de Hanes-Wolf. En dicho gráfico la pendiente equivale a $1/V_{max}$ y la abscisa al origen corresponde a $-K_m$. En este tipo de gráfico, una inhibición competitiva se refleja con líneas de pendientes similares, mientras que los interceptos en la abscisa resultan dispares. En una inhibición no competitiva los resultados esperados son V_{max}

distintas y K_m iguales o muy similares. Gráficamente el tipo de inhibición para acarbosa corresponde al tipo competitivo (Fig. 10A), mientras que para NDGA y EE de *L. tridentata* se aprecia una inhibición del tipo no competitivo (Fig. 10 B y C, respectivamente). Cabe mencionar que el cálculo de las variables K_m y V_{max} se realizaron acorde al análisis del mismo tipo de gráfico.

Tal como se menciona al principio de esta sección determinar el tipo de inhibición permite conocer aspectos del acoplamiento enzima-inhibidor. En una inhibición competitiva el inhibidor se une en el sitio activo de la enzima, mientras que en una inhibición no competitiva el inhibidor generalmente se une a un sitio distinto del sitio activo y reduce o impide que la enzima lleve a cabo la catálisis. Otro aspecto importante es que el efecto de inhibidor competitivo (como lo es la acarbosa) puede ser revertido con el aumento en la concentración de sustrato; mientras que un inhibidor no competitivo (NDGA, acorde con este trabajo), ejerce el mismo efecto de manera independiente a la concentración de sustrato.



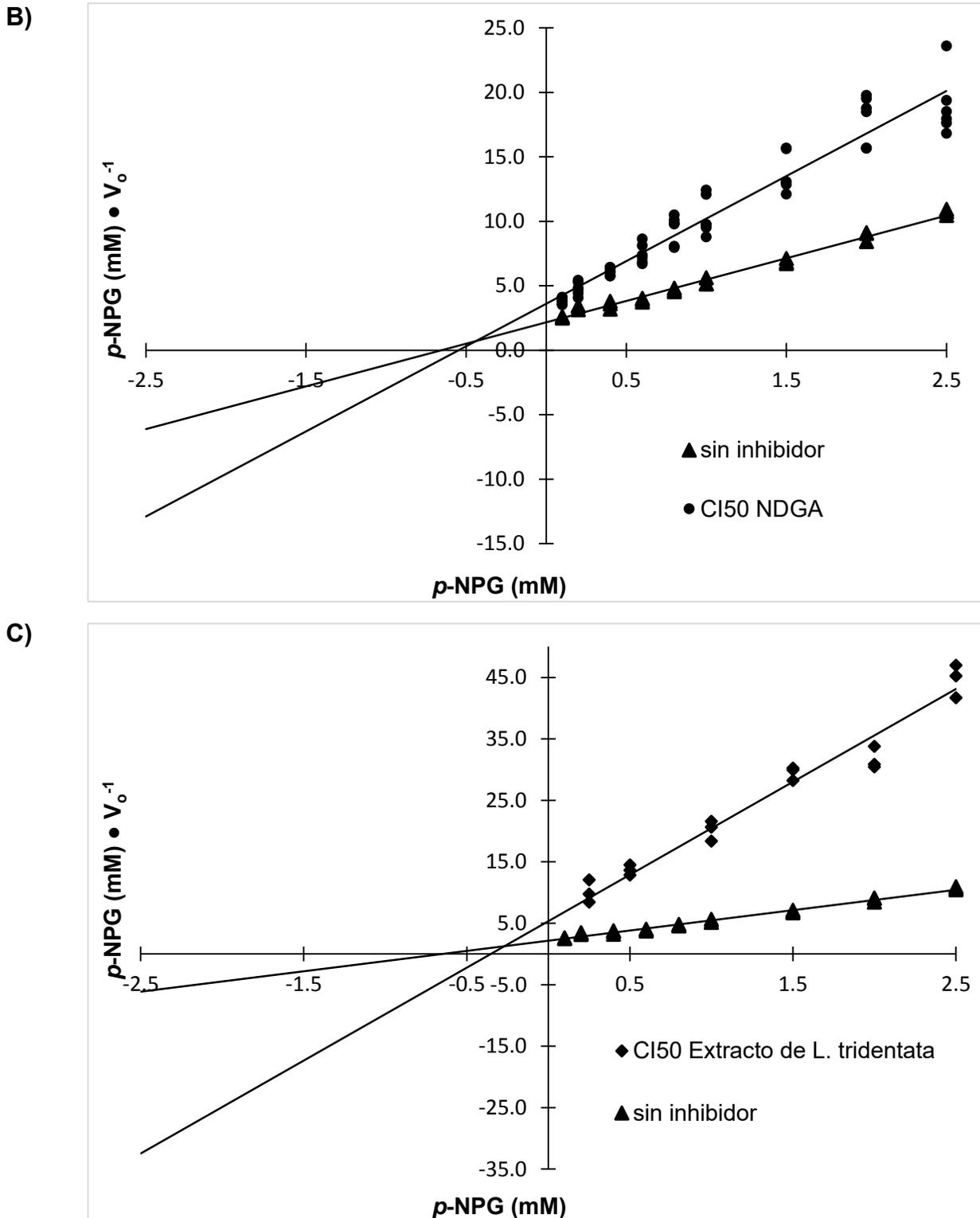


Figura 10. Determinación del tipo de inhibición inducido por Acarbosa (A), NDGA (B) y EE de *L. tridentata* (C) sobre la actividad α -glucosidasa del extracto de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), las curvas fueron linearizados por el método de Hanes-Woolf.

Adicionalmente se realizó la curva de saturación de sustrato para identificar que el comportamiento de la actividad enzimática mostrara una cinética del tipo Michaelis-Menten (figura 11), la saturación de α -glucosidasa del extracto de levadura se obtiene a una concentración de *p*-NPG de 2.5 mM (con una actividad inicial equivalente a 0.2 unidades de absorbancia por minuto).

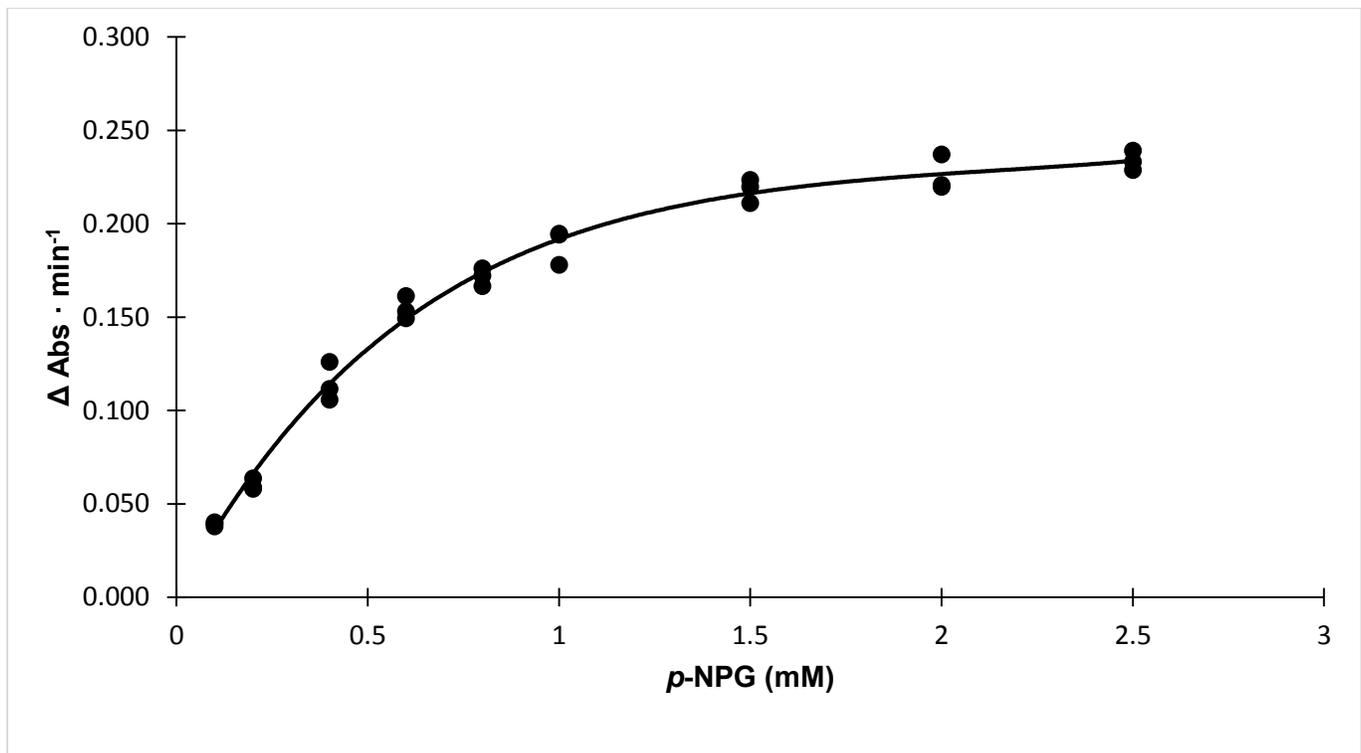


Figura 11. Comportamiento cinético Michaelis-Menten de la actividad α -glucosidasa del extracto de levadura.

Los resultados de la prueba de ANOVA con *post-hoc* de Bonferroni se reportan en la Tabla 4. Estadísticamente las V_{\max} calculadas en presencia de NDGA y EE de *L. tridentata*) son diferentes de la obtenida en ausencia de inhibidor, indicando una inhibición no competitiva. V_{\max} en presencia de acarbosa es distinta a V_{\max} en ausencia del inhibidor, sin embargo, la apreciación gráfica y la literatura refieren a la acarbosa como un inhibidor competitivo; esta diferencia puede atribuirse a que no se usó α -glucosidasa pura. Por otro lado, las K_m 's calculadas con NDGA y con el EE de *L. tridentata* no son estadísticamente diferentes con

respecto a K_m obtenida sin inhibidor (Tabla 4). Estos resultados de V_{max} diferentes y K_m iguales son los esperados para una inhibición no competitiva tanto para NDGA como para el EE de Gobernadora (lo anterior es válido para la actividad α -glucosidasa del extracto de levadura). En el caso de acarbosa, la K_m obtenida fue significativamente diferente de la obtenida en el ensayo sin inhibidor. Este comportamiento es característico de una inhibición competitiva, la cual coincide con lo publicado para este inhibidor.

Tabla 4. Valores de K_m , V_{max} y K_i obtenidos en ausencia y presencia de cada uno de los inhibidores de α glucosidasa de levadura. *Diferencia significativa respecto al mismo parámetro del ensayo en ausencia de inhibidor. Se presentan medias \pm DS.

	K_m (mM)	V_{max} (abs \cdot min $^{-1}$)	K_i (μ g \cdot mL ensayo $^{-1}$)
Sin inhibidor	0.65 \pm 0.03	0.302 \pm 0.007	----
CI₅₀ Acarbosa	2.58 \pm 0.17*	0.342 \pm 0.014*	193 (0.299mM)
CI₅₀ NDGA	0.54 \pm 0.05	0.153 \pm 0.017*	1.75 (0.0058mM)
CI₅₀ EE de <i>L. tridentata</i>	0.42 \pm 0.02*	0.069 \pm 0.004*	15

Las K_i calculadas se presentan en la Tabla 4, la K_i de NDGA es la más baja, mientras que la del extracto de *L. tridentata* es casi 10 veces mayor que la de NDGA. La K_i de acarbosa fue 2 órdenes de magnitud superior a la de NDGA. La K_i calculada para acarbosa, a partir de su IC₅₀ (23.6 μ g \cdot mL $^{-1}$) en el ensayo de actividad de α -glucosidasa de intestino de rata fue de 7.9 μ g \cdot mL $^{-1}$ (0.05 mM), 24 veces menor con respecto a la K_i de acarbosa con α -glucosidasa de levadura. Los resultados anteriores son prometedores para la posible aplicación del NDGA y del EE de *L. tridentata* como agente biocida y/o insectida ya que inhibe fuertemente la actividad de α -glucosidasa I.

7.5 Presencia y cantidad de NDGA en *L. tridentata*

Para determinar el Rf y la longitud de onda a la cual el NDGA presenta mayor absorbancia se realizó el escaneo de la placa de 200-400 nm (a saltos de 20 nm), el Rf obtenido fue de 0.26 (recordemos que la composición de la fase móvil fue: C₆H₁₄, CHCl₃ y C₄H₈O₂ en proporción 2:4:6) y la longitud de onda a la cual presenta mayor absorbancia fue de 200 nm. El espectro

de absorción realizado entre 190-400 nm (a saltos de 1 nm) confirmó la presencia de NDGA en el EE de *L. tridentata*. Estos resultados se pueden apreciar gráficamente en las figuras 12 y 13.

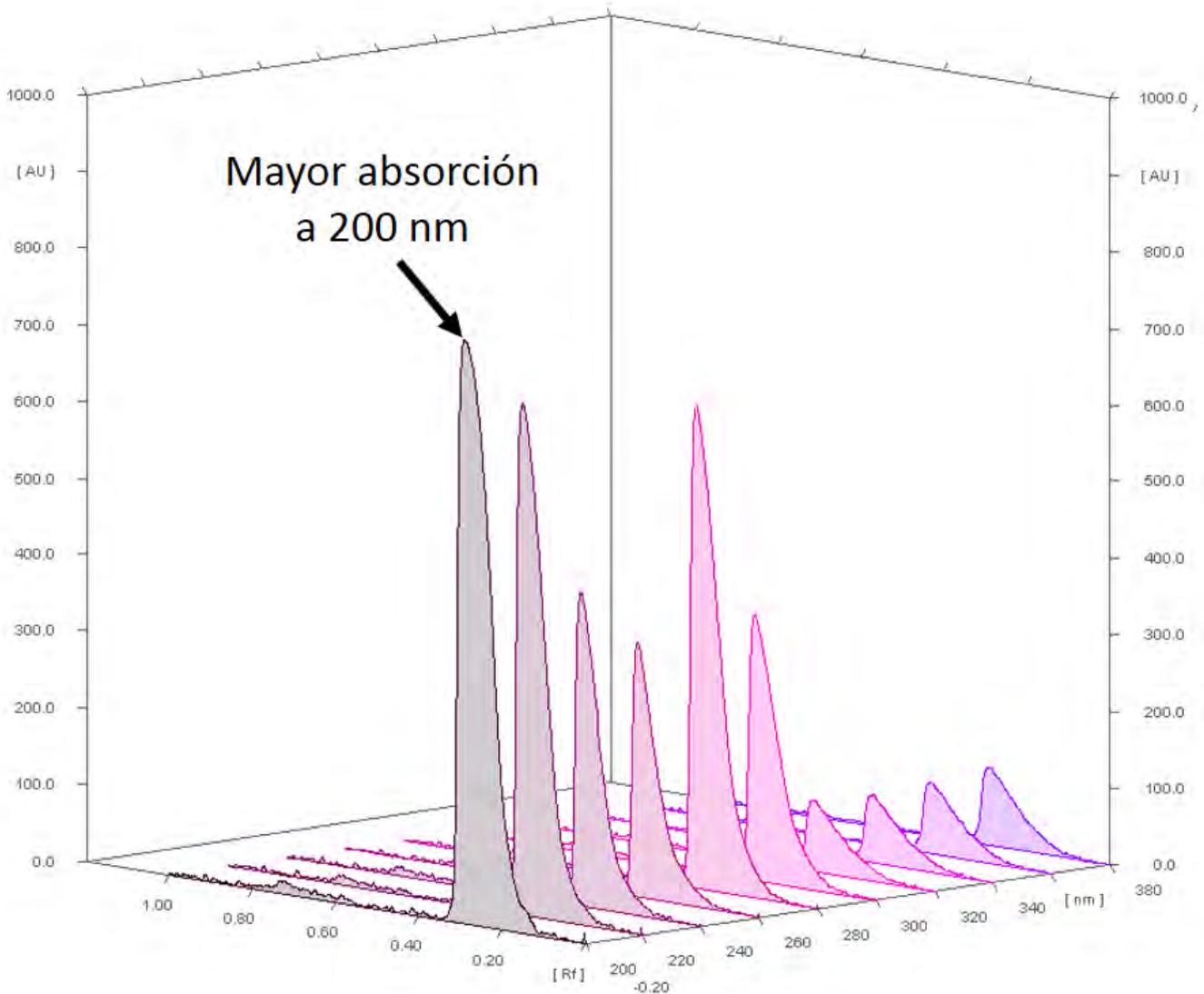


Figura 12. Muestra la absorción del NDGA a distintas longitudes de onda. La concentración de NDGA que se presenta corresponde a la alícuota de 10 μ L (de una solución con concentración de 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Como se indica en el texto la longitud de onda a la cual el NDGA presentó mayor absorción fue 200 nm y un valor Rf de 0.26.

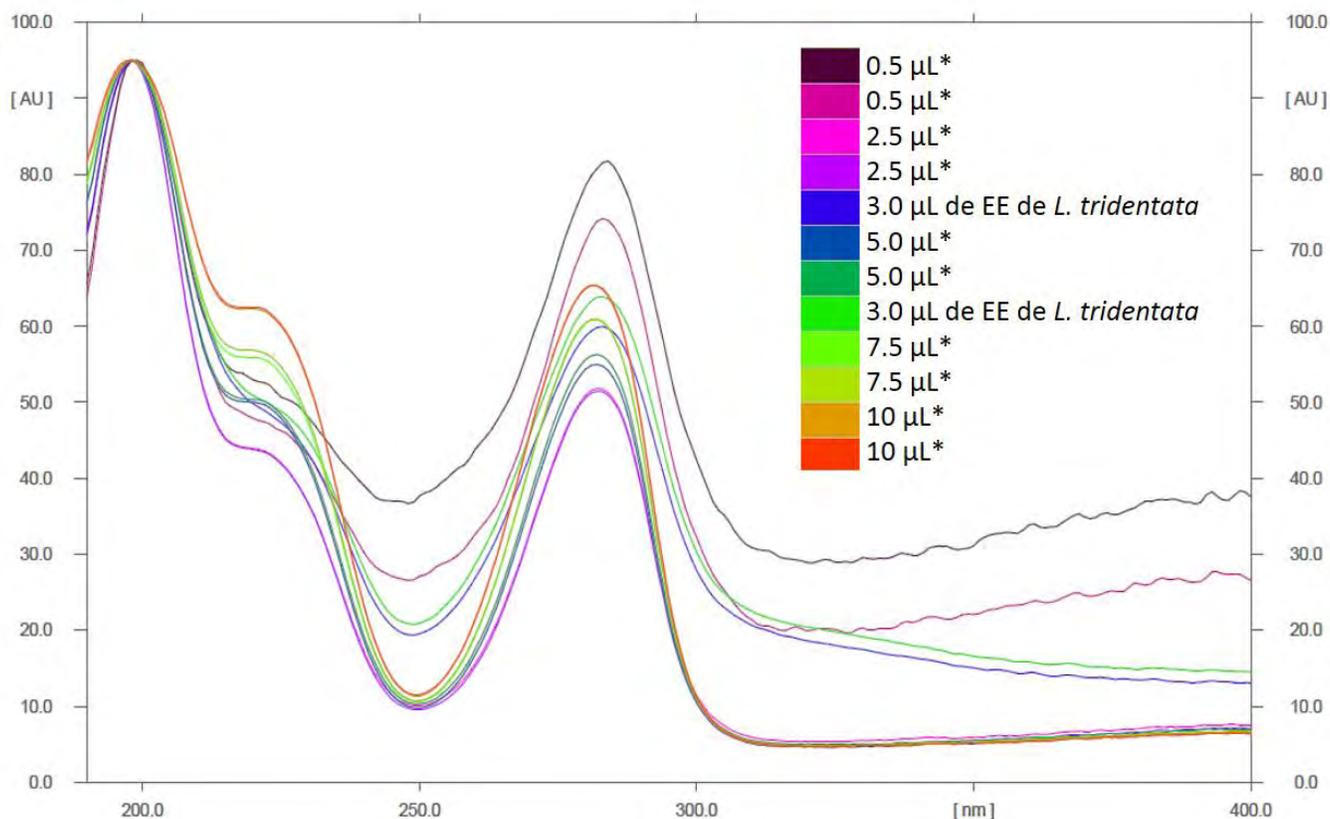


Figura 13. Muestra el espectro de absorción de 190-400 nm (a saltos de 1 nm), * indica que la alícuota fue tomada de una solución de NDGA con concentración de $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Las alícuotas de EE de *L. tridentata* fueron tomadas de una solución con concentración de $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Dada la similitud de los espectros de absorción del estándar con respecto a la muestra de *L. tridentata* se confirma la presencia de NDGA en la misma.

La placa revelada se escaneó nuevamente y se obtuvo máxima absorción del NDGA derivatizado a una longitud de onda de 620 nm, en la figura 14 se muestra el resultado. En la fotografía de la placa derivatizada (figura 15) y la lectura de todos los carriles a 620 nm (figura 16), es posible observar otros compuestos con grupos fenoles (esto de acuerdo con el revelador usado) y la presencia de NDGA comparado con un carril con solución estándar de NDGA en un R_f de 0.26.

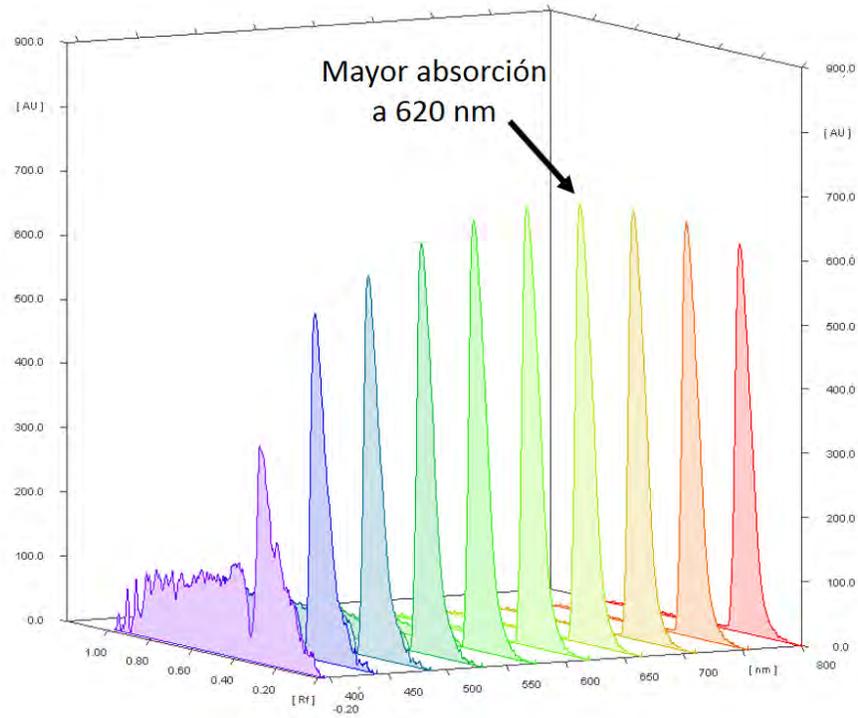


Figura 14. Muestra la absorción del NDGA derivatizado con FeCl₃ 0.1% m/v a distintas longitudes de onda (400-800 nm). La concentración de NDGA que se presenta corresponde a la alícuota de 10 μ L (de una solución con concentración de 1 mg·mL⁻¹). La longitud de onda a la cual el NDGA derivatizado presentó mayor absorción fue 620 nm.

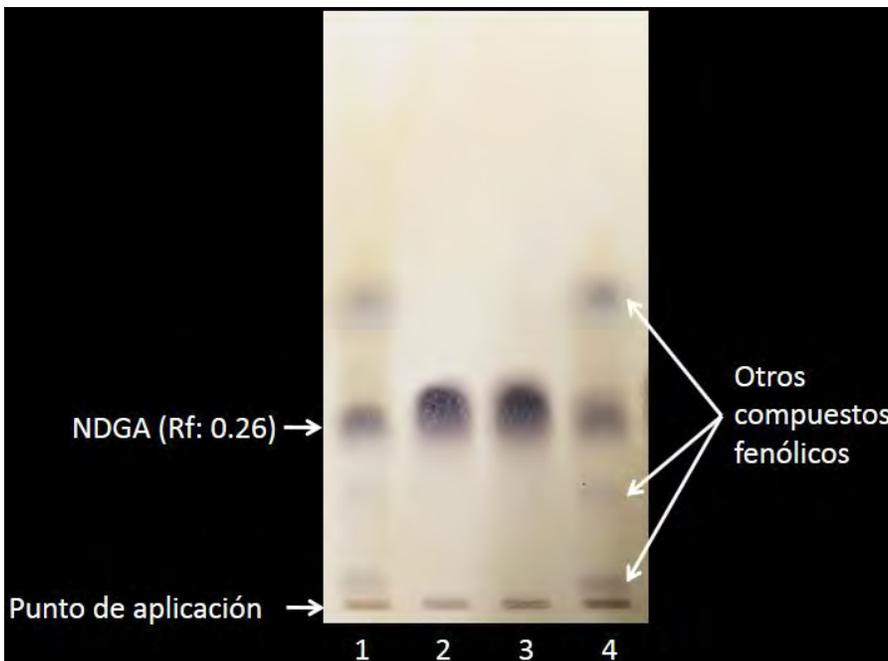


Figura 15. Fotografía de la placa derivatizada con FeCl₃ 0.1% m/v, en el carril 1 y 4 se desarrollaron alícuotas de 3 μ L de una solución stock de EE de *L. tridentata* 5 mg·mL⁻¹

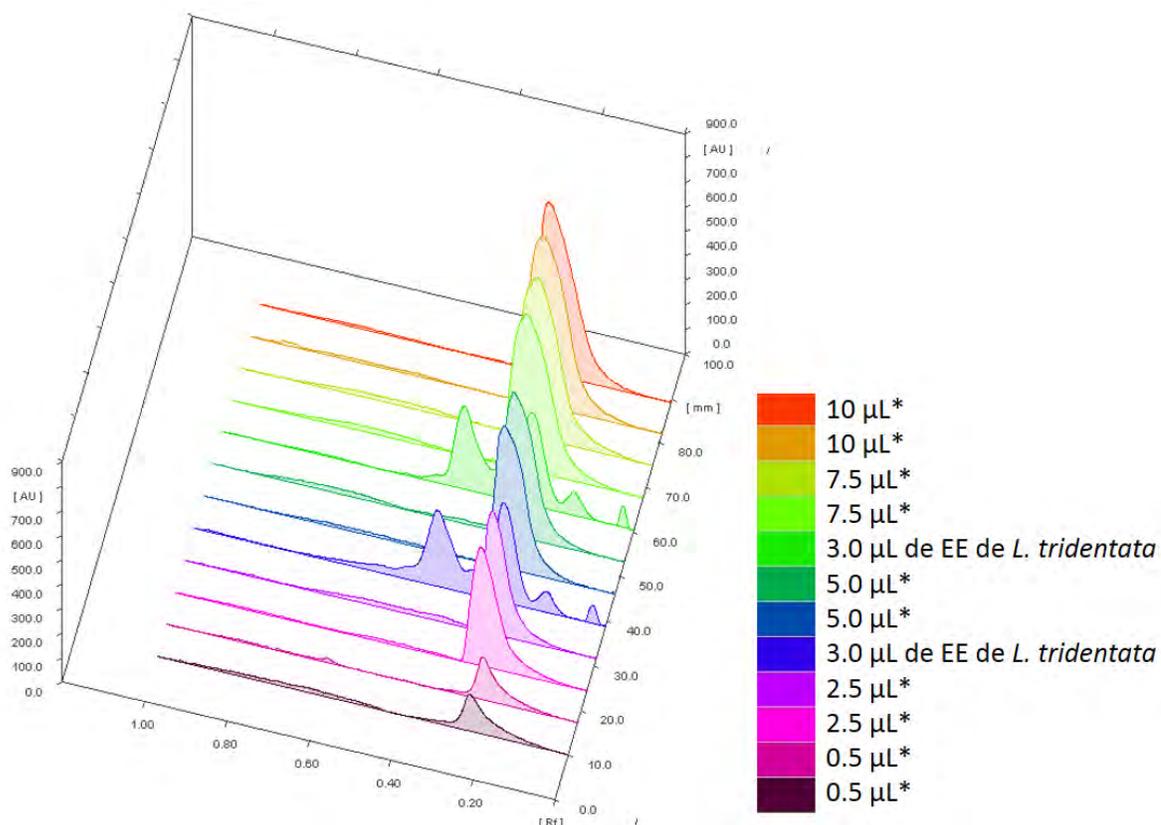


Figura 16. Perfil de absorbancia a 620 nm de los carriles con estándar de NDGA y la muestra (EE de *L. tridentata*). * indica que la alícuota fue tomada de una solución de NDGA con concentración de $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Las alícuotas de EE de *L. tridentata* fueron tomadas de una solución con concentración de $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. De acuerdo con el derivatizador usado, los picos en la gráfica denotarían la presencia de NDGA en un Rf de 0.26; además de otros compuestos con grupos fenólicos a distintos Rf.

Como se menciona en la sección de materiales y métodos la evaluación de los distintos volúmenes de alícuotas del estándar se realizó con la finalidad de obtener una curva de calibración del NDGA a través de la regresión polinómica de área bajo la curva para cuantificar la cantidad de NDGA presente en la alícuota de EE de *L. tridentata*. El coeficiente de correlación para la curva con 5 volúmenes de NDGA: 0.5, 2.5, 5, 7.5 y 10 μL que equivalían a 0.5, 2.5, 5, 7.5, y 10 μg , respectivamente; y la muestra de *L. tridentata* (5 μL) fue de 0.991. La ecuación ajustada resultante de la regresión fue:

$$Y = 3517.48 + (15.21 \cdot x) + (-0.001 \cdot x^2)$$

La estimación de la concentración de NDGA en el EE de *L. tridentata* de acuerdo a este ajuste es 0.1 μg de NDGA por cada μg del EE de *L. tridentata*, o dicho de otra forma, el 10% del EE de *L. tridentata* es NDGA. En la figura 17 se muestra la gráfica resultante.

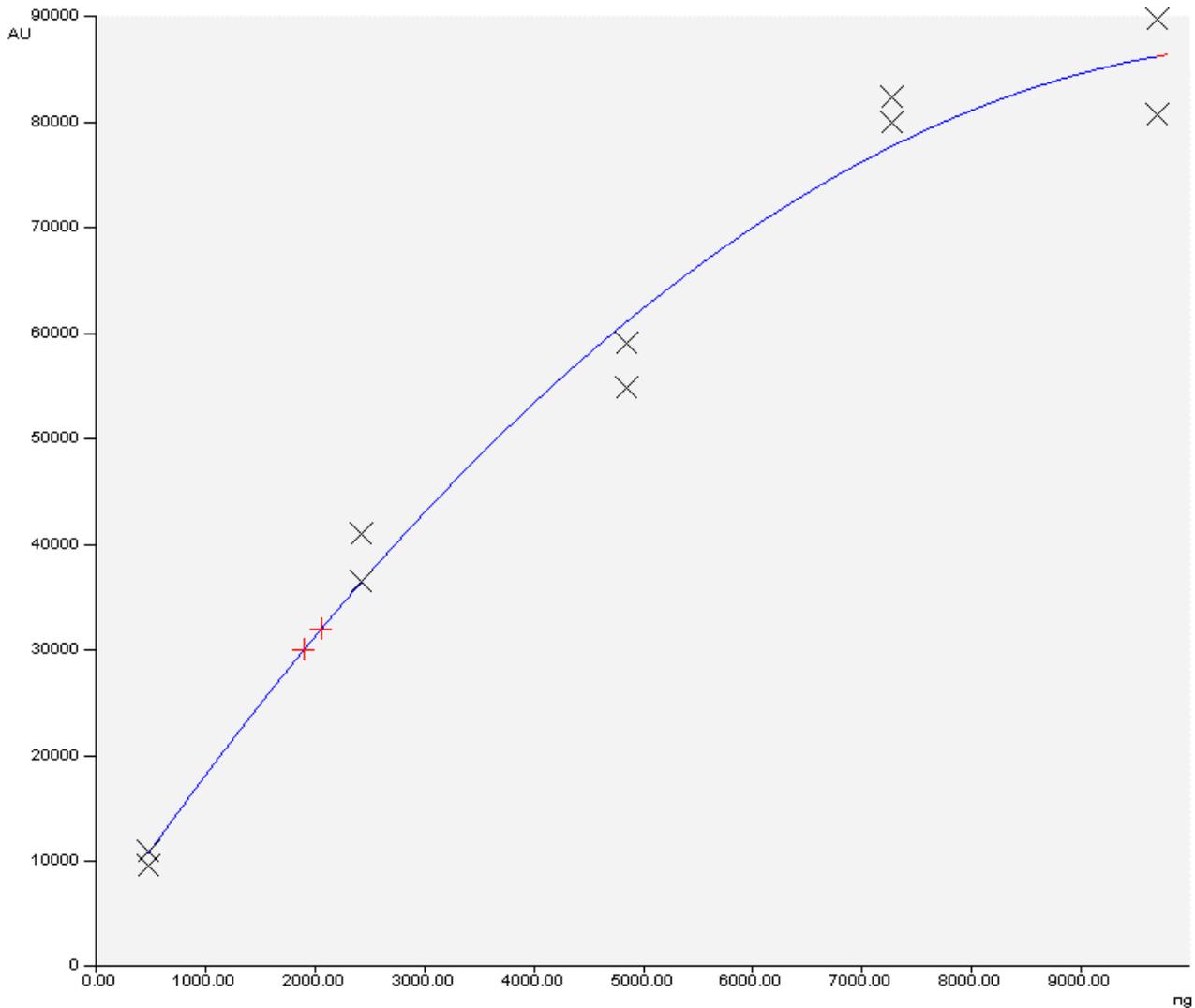


Figura 17. Curva de calibración de NDGA obtenida por regresión polinómica de área, del estándar de NDGA (cruces negras) fueron duplicados de 0.5, 2.5, 5, 7.5, y 10. Las cruces rojas representan las alícuotas de 3 μL de una solución stock de EE de *L. tridentata* 5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; de acuerdo con estos resultados se determinó que el EE de *L. tridentata* contiene el 10% de NDGA.

8 DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados obtenidos es posible señalar que el NDGA inhibe *in vitro* la actividad α -glucosidasa de levadura (tipo I), pero no la de glucosidasa de mamífero (tipo II). Sato y colaboradores (2001) reportan al NDGA como un inhibidor de α -glucosidasas I, con una CI_{50} de $0.5 \mu\text{g de NDGA} \cdot \text{mL}^{-1}$, mientras que el valor CI_{50} en nuestro ensayo fue de $1.75 \mu\text{g de NDGA} \cdot \text{mL}^{-1}$, lo cual es muy parecido.

Los valores de CI_{50} para un mismo compuesto pueden diferir entre distintos investigadores debido a diferencias en las condiciones de reacción, para dicha limitante conviene calcular la K_i . En nuestro caso, la K_i obtenida para el NDGA es considerablemente menor con respecto a la K_i obtenida para acarbosa (siendo esto válido para actividad de α -glucosidasa de levadura). El valor de la K_i de acarbosa sobre la actividad α -glucosidasa de mamífero fue hasta 24 veces menor con respecto a la que se obtuvo sobre la actividad α -glucosidasa de levadura, siendo indicativo de que acarbosa se une con mayor afinidad a α -glucosidasa II, este hecho puede deberse en gran parte a las diferencias entre ambas familias de glucosidasas. Inclusive, Kimura (2000) indica que α -glucosidasas II reconocen preferentemente la estructura maltosil, recordemos que acarbosa estructuralmente es una tetramaltosa modificada.

Se ha publicado que la presencia de albúmina y otras proteínas en el medio previenen la inhibición ejercida por el NDGA sobre la glucosidasa de levadura, este efecto modifica la CI_{50} incrementándola hasta 460 veces (Sato *et al.*, 2001). El uso del extracto de levadura en lugar de enzima purificada tuvo como propósito evaluar el comportamiento inhibitorio del NDGA en una mezcla heterogénea de proteínas (extracto de levadura), lo cual cobra relevancia si consideramos que es prácticamente nulo el escenario en donde enzima y sustrato se encuentren aislados de otras proteínas a las cuales pueda unirse el NDGA (Sato *et al.*, 2001). Como consecuencia, cuando se intentan conciliar resultados obtenidos *in vivo* con los obtenidos *in vitro* generalmente surgen discrepancias en dichos valores que pueden ser incluso de uno o más órdenes de magnitud. En el caso de levadura, aparentemente no hay proteínas en el homogenado que inhiban el efecto del NDGA.

El EE de *L. tridentata* también inhibió la actividad α -glucosidasa de levadura, este resultado se atribuye completamente a su contenido de NDGA. Según la concentración reportada de NDGA para *L. tridentata* es del 10-15% del peso seco (Hyde *et al.*, 2005; Arteaga *et al.*, 2005). El valor experimental que obtuvimos se corresponde con un 10% de NDGA en el EE de *L. tridentata*.

Conviene mencionar que de acuerdo con los resultados de la TLC la inhibición de la actividad α -glucosidasa de levadura por el EE de *L. tridentata* puede atribuirse por completo a su contenido de NDGA, pues se determinó que la concentración de NDGA en el extracto era del 10%. Este se relaciona directamente en los valores de CI_{50} de 1.75 y 15 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ para NDGA y el EE de *L. tridentata*, respectivamente.

Así mismo, la V_{max} disminuyó más que con NDGA y la K_m en presencia del inhibidor fue menor. Estos resultados no coinciden del todo con una inhibición no competitiva, aunque el gráfico si semeja este tipo de inhibición. Quizás la interacción o presencia de otros componentes del extracto (en este trabajo se reportan la presencia de al menos otros tres compuestos que contienen grupos fenoles en su estructura), que incluye isómeros del NDGA, además de flavonoides (Sing *et al.*, 2015), sean la causa de este comportamiento. Solo otros estudios, como fraccionamiento del extracto, podrán responder a estas diferencias.

La inhibición de α -glucosidasas I por acción del EE de *L. tridentata* refleja posibles futuras utilidades para el control de organismos que expresen α -glucosidasas tipo I, como en levaduras, insectos y bacterias, dado que evitaría la disponibilidad de los carbohidratos para los organismos mencionados. El NDGA se ha reportado como bactericida, fungicida e insecticida (Arteaga *et al.*, 2005); este trabajo señala que la inhibición de α -glucosidasas I es al menos uno de los mecanismos por los cuales el NDGA ejerce su acción biocida, y que el EE de *L. tridentata* pudiera emplearse para este fin.

La mayor parte de los inhibidores comerciales de α -glucosidasas ejercen una inhibición competitiva (Bischoff, 1994; Bischoff, 1995; Lebovitz, 1997; Kimura *et al.*, 2004), tal es el caso para acarbose y miglitol (Lebovitz, 1997). Los gráficos de Hanes-Wolf y parámetros cinéticos obtenidos para el tipo de inhibición en el caso del NDGA y del EE de *L. tridentata* son

característicos de una inhibición no competitiva, es decir, el NDGA se une a una región distinta al sitio activo.

El hecho de que el NDGA se comporte como inhibidor no competitivo representa una ventaja sobre los inhibidores competitivos, dado que la concentración para inhibir a la enzima se comporta de manera independiente a la concentración de sustrato, mientras que para el caso de un inhibidor competitivo su efectividad depende en gran medida de la concentración del sustrato, debido a que los efectos de un inhibidor competitivo se revierten al aumentar la concentración de sustrato.

Para determinar si el NDGA inhibe la actividad de α -glucosidasas II de la fracción de microvellosidades de intestino de rata se usó inicialmente homogenado de epitelio intestinal, Sin embargo, el NDGA no inhibió la actividad de α -glucosidasas del homogenado (resultados no mostrados). Para evitar que otras proteínas en el homogenado bloquearan la acción del NDGA, se obtuvo una fracción enriquecida en microvellosidades.

No obstante, a pesar de que en la fracción enriquecida se evaluaron concentraciones de NDGA incluso más altas que en el caso del extracto de levadura, tampoco hubo inhibición. Este escenario puede interpretarse al menos de dos formas:

1. El NDGA no inhibe la actividad de α -glucosidasas II. Entre enzimas α -glucosidasas I y II existen diferencias en la eficiencia catalítica registrada con distintos tipos de sustrato, condición que es consecuencia de que ambas familias de α -glucosidasas presentan una estructura primaria distinta, con apenas un 20% de similitud (Chiba, 1997; Kimura, 2000; Kimura *et al.*, 2004). Estas diferencias pudieran implicar que en α -glucosidasa II no existe el sitio de unión para que el NDGA induzca la inhibición, como en la α -glucosidasa I.
2. En la fracción enriquecida en microvellosidades existen aún proteínas que interactúan con el NDGA y previenen que la inhibición se lleve a cabo.

Tal y como se menciona al principio de este trabajo (antecedentes), *L. tridentata* es usada en el tratamiento de DM por comunidades del nor-oeste de México y sur-oeste de Estados Unidos (Winkelman., 1986; Arteaga *et al.*, 2005; Alarcon-Aguilar y Roman-Ramos, 2005). Al identificar que el NDGA (principal metabolito de la Gobernadora) había sido reportado como inhibidor de α -glucosidasas (Sato *et al.*, 2001), se supuso que la utilidad de *L. tridentata* en el tratamiento de la DM podría deberse, al menos en parte, a dicha propiedad. Lo anterior no se descarta por completo, y se sugiere realizar las siguientes pruebas:

-Evaluar *in vitro* el efecto del NDGA sobre una preparación de α -glucosidasa II pura para evitar que otras proteínas protejan a la α -glucosidasa II de la inhibición por NDGA. También de manera indirecta se podría ensayar si la actividad α -glucosidasa I de levadura adicionada al medio con microvellosidades u homogenado de epitelio intestinal deja de ser inhibida por NDGA.

-Analizar la posibilidad de que la inhibición por NDGA ocurra utilizando como sustrato maltosa o sacarosa, dado que α -glucosidasa II es más afín a sustratos homogéneos (p.ej. maltosa) que a sustratos heterogéneos (*p*-NPG), mientras que para α -glucosidasas I la afinidad a sustratos es inversa (Kimura, 2000; Kimura, 2004). Vale la pena recordar aquí que acarbosa inhibe tanto la actividad de α -glucosidasa I como la de la II. Sin embargo, en este estudio, la CI_{50} para α -glucosidasa I fue 24 veces mayor con respecto a la de la α -glucosidasa II.

-Realizar pruebas en modelos animales de diabetes de tolerancia a glucosa y maltosa, con y sin la administración de NDGA o EE de *L. tridentata*. Si los resultados de la prueba de tolerancia a la glucosa y maltosa reflejaran un efecto hipoglucémico del NDGA y EE de *L. tridentata* sobre ambos sustratos (y que el efecto hipoglucémico sea cuantitativamente similar para maltosa y glucosa), entonces podríamos concluir que el efecto hipoglucémico observado por el NDGA no se debe a que se comporte como un inhibidor de α -glucosidasas II, por lo que su mecanismo hipoglucémico habría de ser uno distinto, como por ejemplo, la sensibilización de los tejidos periféricos a la insulina (Reaven, 1999). Sólo si se observara

un efecto hipoglucémico mayor en la prueba de tolerancia a maltosa, que en la de glucosa podríamos deducir que el efecto observado es debido, al menos en parte, a la inhibición de α -glucosidasas II de las microvellosidades del intestino.

Nos parece importante señalar que hasta el momento diversos artículos acerca de la utilidad de inhibidores de α -glucosidasas para el tratamiento de DMII evalúan el efecto de los compuestos prospecto con α -glucosidasa I, generalmente proveniente de levadura (*S. cerevisiae*), calificándolos como prometedores para la inhibición de α -glucosidasas II del epitelio intestinal de humanos, sin tomar en cuenta que las enzimas provenientes de ambas fuentes pertenecen a familias distintas que presentan diferencias en su estructura primaria, y que ambas familias pueden incluso ser diferenciadas por la afinidad a distintos tipos de sustratos (Kimura *et al.*, 2004).

En nuestro estudio se utilizó la α -glucosidasa II de las microvellosidades intestinales. También sería interesante comparar el efecto del NDGA y el extracto etanólico de *L. tridentata* sobre la actividad de la α -glucosidasa lisosomal (enzima relacionada con la enfermedad de Pompe y también conocida como α -glucosidasa ácida). Se ha determinado que existe homología entre α -glucosidasa intestinal y α -glucosidasa lisosomal, pero cada una tiene una actividad óptima a distintos valores de pH, siendo un valor de 7 para α -glucosidasa intestinal y pH 4 a 5 para α -glucosidasa lisosomal. Los aminoácidos catalíticos (residuos de ácido aspártico) se encuentran conservados en ambas versiones de la enzima. Aun así, es posible que NDGA inhiba esta forma de glucosidasa II. Se ha demostrado que acarbosa inhibe ambas formas de la enzima (Miyahara *et al.*, 2004; Jocković *et al.*, 2013).

9 CONCLUSIONES.

- NDGA y extracto etanólico de *L. tridentata* inhiben *in vitro* la actividad α -glucosidasa de levadura, siendo la inhibición no competitiva.
- La CI_{50} de NDGA sobre la actividad α -glucosidasa I es alrededor de 300 veces menor comparada con la CI_{50} de acarbosa para la misma enzima, bajo las condiciones del presente ensayo.
- NDGA no inhibió la actividad α -glucosidasa II de la fracción de microvellosidades de intestino.
- La CI_{50} de acarbosa fue hasta 24 veces mayor para α -glucosidasa I que para α -glucosidasa II.
- El 10% de cada gramo de extracto etanólico de *L. tridentata* es NDGA

10 REFERENCIAS

- Abou-Gazar H, E Bedir, S Takamatsu, D Ferreira e IA Khan. 2004. Antioxidant lignans from *Larrea tridentata*. *Phytochemistry* 65: 2499-2505.
- Alarcon-Aguilar FJ y R Roman-Ramos. 2005. Antidiabetic plants in Mexican and Central American Medicine. En: Soumyanath A (ed.). *Traditional Medicines for Modern Times: Antidiabetic Plants*. CRC Press. p: 179-194.
- Alarcon-Aguilara FJ, R Roman-Ramos, S Perez-Gutierrez, A Aguilar-Contreras, CC Contreras-Weber y JL Flores-Saenz. 1998. Study of the anti-hyperglycemic effect of plants used as antidiabetics. *Journal of Ethnopharmacology* 61: 101-110.
- American Diabetes Association (ADA). 2013. Información básica de la diabetes: diabetes tipo 2. Recuperado de: <http://www.diabetes.org/>. Fecha de consulta: 21-Agosto-2014.
- American Diabetes Association (ADA). 2013. Standards of medical care in diabetes-2013. *Diabetes Care* 36: S11-S65.
- Andrade-Cetto A, J Becerra-Jiménez y R Cárdenas-Vázquez. 2008. Alfa-glucosidase-inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes. *Journal of Ethnopharmacology* 116: 27-32.
- Andrade-Cetto A y M Heinrich. 2005. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology* 99: 325-348.
- Apostolidis E, YI Kwon y K Shetty. 2006. Potential of cranberry-based herbal synergies for diabetes and hypertension management. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 15 (3): 433-441.
- Ara-Roldán A. 1997. 100 plantas medicinales escogidas: Una guía de plantas de todo el mundo seleccionadas por su valor terapéutico. EDAF. p: 125-127.
- Arechavaleta GR. 2006. El efecto fisiológico de las hormonas incretinas. *Johns Hopkins Advanced Studies in Medicine* 6 (7A): S581-S585.
- Arteaga S, A Andrade-Cetto y R Cárdenas. 2005. *Larrea tridentata* (Creosote bush), an abundant plant of Mexican and US-American deserts and its metabolite nordihydroguaiaretic acid. *Journal of Ethnopharmacology* 98: 231-239.
- Asano N. 2000. Sugar mimic glycosidase inhibitors: natural occurrence, biological activity and prospects for therapeutic application. *Tetrahedron asymmetry* 11: 1645-1680.

- Asano N. 2003. Glucosidase inhibitors: update and perspectives on practical use. *Glycobiology* 13 (10): 93R-104R.
- Avis IM, M Jett, T Boyle, MD Vos, T Moody, AM Treston, A Martinez y JL Mulshine. 1996. Growth control of lung cancer by interruption of 5-lipoxygenase- mediated growth factor signaling. *Journal of Clinical Investigation* 97 (3): 806-813.
- Bischoff H. 1994. Pharmacology of α -glucosidase inhibition. *European journal of Clinical Investigation* 24: Suppl. 3, 3-10.
- Bischoff H. 1995. The mechanism of α -glucosidase inhibition in the management of diabetes. *Clinical and Investigative Medicine* 18 (4): 303-311.
- Bnouham M, A Ziyat, H Mekhf, A Tahri y A Legssyer. 2006. Medicinal plants with potential antidiabetic activity - A review of ten years of herbal medicine research (1990-2000). *International Journal of Diabetes and Metabolism* 14: 1-25
- Brandt RB, JE Laux y SW Yates. 1987. Calculation of inhibitor K_i and inhibitor type from the concentration of inhibitor for 50% inhibition for Michaelis-Menten Enzymes. *Biochemical Medicine and Metabolic Biology* 37: 344-349.
- Breitmeier D, S Günther y H Heymann. 1997. Acarbose and 1-Deoxynojirimycin Inhibit Maltose and Maltooligosaccharide Hydrolysis of Human Small Intestinal Glucoamylase – Maltase in Two Different Substrate-Induced Modes. *Archives Of Biochemistry And Biophysics* 346 (1): 7-14
- Calero JR, V Martínez y F Salcedo. 1997. Nuevas perspectivas en el tratamiento de la diabetes tipo II. Vol. 43 de colección de estudios. Universidad de Castilla. p: 95-109.
- Caspary WF. 1992. Physiology and pathophysiology of intestinal absorption. *The American Journal of clinical nutrition*: 299S-308S.
- Chakrabarti S, PV Cherian y AF Sima. 1993. The effect of acarbose on diabetes- and age- related basement membrane thickening in retinal capillaries of the BB/W-rat. *Diabetes research and clinical practice* 20: 123-128.
- Cheeseman C y B O'Neill. 2006. Isolation of intestinal brush-border membranes. *Current Protocols in Cell Biology*. Supplement 30, unit 3.21.1-3.21.10.
- Chiba S. 1997. Molecular mechanism in α -Glucosidase and Glucoamylase. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 61 (8): 1233-1239

- Conabio. 2015. *Larrea tridentata*. Consultado el 10 de octubre del 2014 en: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/zygophyllaceae/larrea-tridentata/fichas/ficha.htm>
- Coniff RF, JA Shapiro, D Robbins, R Kleinfield, TB Seaton, P Beisswenger y JB McGill. 1995. Reduction of glycosylated hemoglobin and postprandial hyperglycemia by acarbose in patients with NIDDM: A placebo-controlled dose-comparison study. *Diabetes Care* 18(6): 817-824.
- Darmawan R. 2010. Antioxidant and antihyperglucemic potential of soybean hydrolysates. Tesis de Maestría en Ciencias (Ciencias de la alimentación y nutrición humana), Colegio de posgraduados, Universidad de Illinois at Urbana-Champaign. 121pp.
- Drecktrath P, R De Figueiredo, M Mason y W Brown. 1998. Retrograde trafficking of both Golgi complex and TGN markers to the ER induced by NDGA and cyclophenil diphenol. *Journal of Cell Science* 111: 951–965.
- Elias E, GJ Gibson, LF Greenwood, JN Hunt y JH Tripp. 1968. The slowing of gastric emptying by monosaccharides and disaccharides in test meals. *The Journal of physiology* 194: 317-326.
- Elsenhans B y WF Caspary. 1987. Absorption of carbohydrates. En: WF Caspary, ed. Structure and function of the small intestine. *Amsterdam: Excerpta Medica*: p: 139-S9
- Escobar JF y MF Tébar. 2009. La Diabetes Mellitus en la Práctica Clínica. Médica Panamericana. Madrid. 520pp.
- Foster S y V Tyler. 2012. Tyler's Honest Herbal: A Sensible Guide to the Use of Herbs and Related Remedies. Routledge. New York. p: 109-112.
- Flores-Bocanegra LC. 2013. Inhibidores de α -glucosidasas de *Vauquelinia corymbosa*. Tesis que para obtener el grado de Maestra en Ciencias, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. 70pp
- Francois J y JL Parrou. 2001. Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews* 25: 125-145.
- Gabrisko M. 2013. Evolutionary history of eukaryotic α -glucosidasas from the α -amylase family. *Journal of Molecular Evolution* 76: 129-145.

- Gil-Velázquez L, M Sil-Acosta, E Domínguez-Sánchez, L Torres Arreola y J Medina-Chávez. 2013. Guía práctica y clínica: Diagnóstico y tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social* 51 (1): 104-119.
- Gisvold O y E Thaker. 1974. Lignans from *Larrea divaricata*. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 63 (12): 1905-1907.
- Goodman T, HC Grice, GC Becking y FA Salem. 1970. A cystic nephropathy induced by nordihydroguaiaretic acid in the rat. *Laboratory Investigations* 23 (1): 93-107.
- Gray GM. 1984. Carbohydrate absorption and malabsorption. En: Green M y HL Greene, eds. The role of the gastrointestinal tract in nutrient delivery. Academic Press. p: 133-144.
- Grover JK, S Yadav y V Vats. 2002. Medicinal plants of India with anti-diabetic potential. *Journal of Ethnopharmacology* 81: 81-100.
- Hamnvik OP y GT McMahon. 2009. Balancing Risk and Benefit with Oral Hypoglycemic Drugs. *Mount Sinai Journal of Medicine* 76 (3): 234-3243.
- Hanefeld M, M Cagatay, T Petrowitsch, D Neuser, D Petzinna y M Rupp. 2004. Acarbose Reduces the Risk for Myocardial Infarction in Type 2 Diabetic Patients: Meta-Analysis of Seven Long-Term Studies. *European Heart Journal* 25(1): 10-16.
- Hanes CS. 1932. Studies on plant amylases: The effect of starch concentration upon the velocity of hydrolysis by the amylase of germinated barley. *Biochemical Journal* 26(5):1406-1421.
- Harvey RA y DR Ferrier. 2011. Biochemistry. 5th edition. Lippincott Williams & Wilkins. p:53-69.
- Heron S y E Yarnell. 2001. The Safety of Low-Dose *Larrea tridentata* (DC) Coville (Creosote Bush or Chaparral): A Retrospective Clinical Study. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine* 7(2): 175-185.
- Horii S, H Fukase, T Matsuo, Y Kameda, N Asano y K Matsui. 1986. Synthesis and α -D-glucosidase inhibitory activity of N-substituted valiolamine derivatives as potential oral antidiabetic agents. *Journal of Medicinal Chemistry* 29: 1038-1046.
- Hoefsloot LH, M Hoogeveen-Westerveld, MA Kroos, JV Beeumen, AJ Reuser y BA Oostra. 1988. Primary structure and processing of lysosomal α -glucosidase: homology with the intestinal sucrase-isomaltase complex. *The EMBO Journal* 7 (6): 1697-1704.

- Hyder PW, EL Fredrickson, RE Estell, M Tellez y RP Gibbens. 2002. Distribution and concentration of phenolics, condensed tanins and nordihydroguaiaretic acid (NDGA) in creosote bush (*Larrea tridentata*). *Biochemical Systematics and Ecology* 30: 905-912
- International Diabetes Federation (IDF). 2014. About Diabetes. Recuperado de: <http://www.idf.org/> Fecha de consulta: 21-agosto-2014
- Israili ZH. 2011. Advances in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *American Journal of Therapeutics* 18: 117-152.
- Janecek S. 1997. A-amylase family: molecular biology and evolution. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 67 (1): 67-97.
- Janecek S, B Svensson y EA MacGregor. 2007. A remote but significant sequence homology between glycoside hydrolase clan GH-H and family GH31. *FEBS Letters* 581 (7):1261-8.
- Jocković N, W Fischer, M Brandsch, W Brandt y B Drägerj. 2013. Inhibition of human intestinal α - glucosidase by calystegines. *Agricultural and food chemistry* 61: 5550-5557.
- Kalra S, M Chadha, SK Sharma y G Unnikrishnan. 2014. Untapped Diamonds for Untamed Diabetes: The A-Glucosidase Inhibitors. *Indian journal of endocrinology and metabolism* 18(2): 138–41.
- Kalra S. 2014. Alpha glucosidase inhibitors. *Recent Advances in Endocrinology* 64 (4): 474-476.
- Kim M, S Lee, H Lee, S Lee, J Baek, D Kim, T Moon, J Robyt, y K Park. 1999. Comparative study of the inhibition of α -Glucosidase, α -Amylase, and Cyclomaltodextrin Glucanotransferase by Acarbose, Isoacarbose, and Acarviosine-Glucose. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 371 (2): 277-283
- Kim Y, M Wang y H Rhee. 2004. A novel α -glucosidase inhibitor from pine bark. *Carbohydrate Research* 399: 715-717
- Kimura A, S Takewaki, H Matsui, M Kubota y S Chiba. 1990. Allosteric properties, substrate specificity, and sussite affinities of Honeybee α -glucosidase I. *Journal of Biochemistry* 197: 762-768.

- Kimura A, A Somoto, H Mori, O Sakai, H Matsui y S Chiba. 1997. Identification of essential ionizable groups in active site of *Aspergillus niger* α -glucosidase. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 61(3): 475-479.
- Kimura A. 2000. Molecular anatomy of α -glucosidase. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 12: 373-380
- Kimura A, J Lee, I Lee, H Lee, K Park, S Chiba y D Kim. 2004. Two potent competitive inhibitors discriminating α -glucosidase family I from family II. *Carbohydrate Research* 339(6):1035-40.
- Konno C, ZZ Lu, HZ Xue, CAJ Erdelmeier, DD Meksuriyen, CT Che, GA Cordell, DD Soejarto, DP Waller y HHS Fong. 1990. Furanoid lignans from *Larrea tridentata*. *Journal of Natural Products* 53 (2): 396-406.
- Kubota M, M Tsuji, M Nishimoto, J Wongchawalit, M Okuyama, H Mori, H Matsui, R Surarit, J Svasti, A Kimura, y S Chiba. 2004. Localization of α -glucosidases I, II, and III in organs of European honeybee, *Apis mellifera* L., and origin of α -glucosidase in honey. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 68: 2346-2352.
- Kuriyama C, O Kamiyama, K Ikeda, F Sanae, A Kato, I Adachi, T Imahori, H Takahata, T Okamoto y N Asano. 2008. *In vitro* inhibition of glycogen-degrading enzymes and glycosidases by six-membered sugar mimics and their evaluation in cell cultures. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16(15): 7330-7336.
- Lambert JD, D Zhao, RO Meyers, RK Kuester, BN Timmermann y RT Dorr. 2002. Nordyhydroguaiaretic acid: hepatotoxicity and detoxification in the mouse. *Toxicol* 40: 1701-1708
- Lambert JD, S Sang, A Dougherty, CG Caldwell, RO Meyers, RT Dorr y BN Timmermann. 2005. Cytotoxic lignans from *Larrea tridentata*. *Phytochemistry* 66: 811-815.
- Langman JM y R Rowland. 1990. Activity of duodenal disaccharidases in relation to normal and abnormal mucosal morphology. *Journal of Clinical Pathology* 43: 537-540.
- Lebovitz HE. 1997. Alpha-glucosidase Inhibitors. *Endocrinology & Metabolism Clinics of North America* 26 (3):539-551.
- Levy I, C Piñol y E Guardiola. 2000. La utilización de la acarbosa en atención primaria: evaluación de la tolerancia y seguridad a largo plazo en 2.799 pacientes diabéticos tipo 2. *Avances en Diabetología* 16: 135-140.

- Li WL, HC Zheng, J Bukuru y N De Kimpe. 2004. Natural medicines used in the traditional Chinese medical system for therapy of diabetes mellitus. *Journal of Ethnopharmacology* 92: 1-21.
- Lira-Saldívar RH. 2003. Estado Actual del Conocimiento sobre las Propiedades Biocidas de la Gobernadora [*Larrea tridentata* (D.C.) Coville]. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21 (2): 214-222.
- Luo J, T Chuang, J Cheung, J Quan, J Tsai, C Sullivan, RF Hector, MJ Reed, K Meszaros, SR King, TJ Carlson y GM Reaven. 1998. Masoprocol (nordihydroguaiaretic acid): a new antihyperglycemic agent isolated from the creosote bush (*Larrea tridentata*). *European Journal of Pharmacology* 346: 77-79.
- Mata R, S Cristians, S Escandón-Rivera, K Juárez-Reyes e I Rivero-cruz. 2013. Mexican antidiabetic herbs: valuable source of inhibitors of α -glucosidases. *Journal of Natural Products* 76: 468-483.
- Matsui T, C Yoshimoto, K Osajima, T Oki y Y Osajima. 1996. *In vitro* survey of α -glucosidase inhibitory food components. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 60, 2019-2022.
- Mishra SB, Ch Rao, SK Ojha, 2, M Vijayakumar y A Verma. 2010. An Analytical Review Of Plants For Anti Diabetic Activity With Their Phytoconstituent & Mechanism Of Action.
- Miyahara C, M. Miyazawa, S Satoh, A Sakai y S Mizusaki. 2003. Inhibitory effects of mulberry leaf extract on postprandial hyperglucemia in normal rats. *Nutritional science and vitaminology* 50: 161-164.
- Mohan S, L Sim, DR Rose y BM Pinto. 2010. Probing the active-site requirements of human intestinal N-terminal maltase-glucoamylase: Synthesis and enzyme inhibitory activities of a six-membered ring nitrogen analogue of kotalanol and its de-O-sulfonated derivative. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 18(22): 7794-7798.
- Moreno-Limón S, LN González Solís, SM Salcedo-Martínez, ML Cárdenas-Ávila y A Perales-Ramírez. 2011. Efecto antifúngico de extractos de gobernadora (*Larrea tridentata*) sobre la inhibición *in vitro* de *Aspergillus flavus* y *Penicillium sp.* *Polibotánica* 32: 193-205.
- Moorthy NSHN, MJ Ramos y PA Fernández. 2012. Studies on α -glucosidase inhibitors development: Magic molecules for the treatment if carbohydrate mediated diseases. *Mini-reviews in Medicinal Chemistry* 12 (8): 1-8.

- Nathan M. 1993. Long term complications of diabetes mellitus. *The new england journal of medicine* 328(23): 1676-1685.
- Nathan M. 2002. Initial Management of glicemia in type 2 diabetes mellitus. *The new england journal of medicine* 347(17): 1342-1349.
- Natori Y, T Imahori, K Murakami, Y Yoshimura, S Nakagawa, A Kato, I Adachi y H Takahata. 2011. The synthesis and biological evaluation of 1-C-alkyl-L arabinosaminofuranoses, a novel class of α -glucosidase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 21(2): 738-741.
- Newcomer AD y DB McGill. 1966. Distribution of disaccharidase activity in the small bowel of normal and lactase-deficient subjects. *Gastroenterology* 51 (4): 481-488.
- Norma Oficial Mexicana para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus 2010 (NOM-0150SSA2-2010). Recuperado de: <http://dof.gob.mx/>. Fecha de consulta: 11-Ago-2014
- Organización Mundial de la Salud. 2009. Diabetes Mellitus control. Recuperado de: <http://www.afro.who.int/>. Fecha de consulta: 22-ago-14
- Puls W. 1996. "Pharmacology of Glucosidase Inhibitors." In Oral Antidiabetics, eds. Jochen Kuhlmann y Walter Puls. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 497–534.
- Reed M, K Meszaros, L Entes, M Claypool, J Pinkett, D Brignetti, J Luo, A Khandwala, y Reaven G. 1999. Effect of masoprocol on carbohydrate and lipid metabolism in a rat model of Type II diabetes. *Diabetologia* 42 (1): 102–106.
- Romero A. 2007. Polipéptido insulino-trópico dependiente de glucosa y péptido semejante al glucagón tipo 1: acciones fisiológicas e implicaciones en la diabetes tipo 2 y la obesidad. *Revista de endocrinología y nutrición* 15 (3): 156-164
- Ross IA. 2005. Medicinal plants of the world Vol. 3, Chemical constituents traditional and modern medicinal uses. Humana Press Inc. 648pp.
- Sáenz A, I Fernández, A Mataix, M Ausejo, M Roqué y D Moher. 2005. Metformina para la diabetes mellitus tipo 2. Revisión sistemática y meta análisis. *Atención Primaria* 36 (4): 183-193.

- Sakakibara M, D DiFeo, N Nakatani, B Timmermann y TJ Mabry. 1976. Flavonoid methyl ethers on the external leaf surface of *Larrea tridentata* and *L. divaricata*. *Phytochemistry* 15: 727-731.
- Sato K, M Muroi, M Nakamura, M Fujimura y A Takatsuki. 2001. Co-existing proteins interfere with the action of nordihydroguaiaretic acid on retrograde Golgi-to-ER protein trafficking in NRK cells and α -glucosidase reaction *in vitro*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 65 (4): 996-998.
- Schmidt DD, W Frommer, L Müller, B Junge, W Wingender, y E Truscheit. 1977. α -Glucosidase inhibitors, new complex oligosaccharides of microbial origin. *Naturwissenschaften* 64: 535–536.
- Segel I. 1975. Enzyme Kinetics: Behaviour and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems. Wiley. New York. pp. 185-192.
- Sheikh NM, RM. Philen y LA Love. 1997. Chaparral-Associated Hepatotoxicity. *Archives of Internal Medicine* 157 (8): 913-919.
- Singh B, T Kaur, S Kaur, RK Manhas y A Kaur. 2015. An alpha-glucosidase inhibitor from an endophytic *Cladosporium sp.* with potential as a biocontrol agent. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 175: 2020-2034.
- Smith BC, Desmond PV. 1993. Acute hepatitis induced by ingestion of the herbal medication chaparral. *Australian and New Zealand Journal of Medicine* 23 (5):526.
- Sorensen J F, KM Kragh, O Sibbesen, J Delcour, H Goesaert, B Svensson, TA Tahir, J Brufauf, AM Perez-Vendrell, D Bellincampi, R D'Ovidio, L Camardella, A Giovane, E Bonnin y N Juge. 2004. Potential rol of glycosidase inhibitors in industrial biotechnological applications. *Biochimica et biophysica* 1696: 275-287.
- Stickel, F, G Egerer y H Seitz. 2000. Hepatotoxicity of botanicals. *Public Health Nutrition* 3 (2): 113-124.
- Timmermann B. 1981. *Larrea*: potential uses. En: Campos L, J Mabry y T Fernández (Eds.). *Larrea*. CONACYT. Pags: 237-246
- Van de Laar F, PL Lucassen, RP Akkermans, EH Van de Lisdonk, GE Rutten y C van Weel. 2005. α -Glucosidase Inhibitors for Patients Results from a Cochrane Systematic Review and Meta-Analysis. *Diabetes Care* 28(1): 154–63.

- Wild, Sarah *et al.* 2004. Global prevalence of diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27(5): 1047-1053.
- Winkelman M. 1986. Frequently used medicinal plants in Baja California Norte. *Journal of Ethnopharmacology* 18: 109-131.
- Wongchawalit J, T Yamamoto, H Nakai, Y Kim, N Sato, M Nishimoto, M Okuyama, H Mori, O Saji, C Chanchao, S Wongsiri, R Surarit, J Svasti, S Chiba Y A Kimura. 2004. Purification and Characterization of α -Glucosidase I from Japanese Honeybee (*Apis cerana japonica*) and Molecular Cloning of Its cDNA. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 70 (12): 2889-2898.
- World Health Organization. 2004. Web page: <http://www.who.org>
- World Health Organization. 1999. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Report of WHO consultation. Geneva, p. 66.
- Yamamoto S, T Nakadata, T Nakaki, K Ishii y R Kato. 1982. Prevention of glucose induced insulin secretion by lipoxigenase inhibitor. *European Journal of Pharmacology*. 78: 225-227.