

Inhibición de la α -glucosidasa mediante flavonoides de origen natural como vía de control en el desarrollo de diabetes mellitus

Inhibition of α -glucosidase by naturally flavonoids as a control way in the development of diabetes mellitus

Nelson Giovanni Rincon-Silva¹

Juan David Rincon Silva²

Jairo Steffan Acosta Vargas³

Resumen:

La Diabetes Mellitus es un trastorno crónico del metabolismo que conlleva a un aumento anormal en los niveles de glucosa en plasma, como consecuencia de la producción desequilibrada de insulina y/o la insensibilidad al efecto de esta hormona en la transducción de señales de los receptores celulares. Estos cambios metabólicos van acompañados de modificaciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas y este trastorno puede conllevar al deterioro de diversos órganos como la ceguera e incluso está implicado en causas de muerte. La mayoría de las complicaciones de la diabetes tipo 2 en los pacientes se deben a la hiperglucemia como su causa principal. Una de las estrategias efectivas para el manejo de la diabetes tipo 2 es la inhibición de la hidrólisis de polisacáridos complejos por la α -amilasa pancreática y a limitación de la absorción de glucosa al inhibir la enzima α -glucosidasa. En este sentido, se ha realizado una revisión de la α -glucosidasa, su mecanismo de actuación y se presenta una posible vía de inhibición mediante flavonoides naturales.

Palabras Clave: diabetes mellitus, glucosa, α -glucosidasa, enzima, flavonoides, inhibición.

Abstract:

Diabetes Mellitus is a chronic metabolism disorder that leads to an abnormal increase in plasma glucose levels, as a result of the unbalanced production of insulin and/or the insensitivity to the effect of this hormone on the transduction of signals from cell receptors. These metabolic changes are accompanied by changes in the metabolism of carbohydrates, lipids and proteins and this disorder could lead to deterioration of various organs such as blindness and is even involved in causes of death. Most of the complications of Type 2 Diabetes in patients are due to hyperglycemia as their main cause. One of the effective strategies for the management of type 2 diabetes is the inhibition of the hydrolysis of complex polysaccharides by pancreatic α -amylase and the limitation of glucose absorption by inhibiting the α -glucosidase enzyme. In this sense, a review of α -glucosidase, its mechanism of action has been carried out and a possible route of inhibition by natural flavonoids is presented.

Keywords: diabetes mellitus, glucose, enzyme, α -glucosidase, flavonoids, inhibition.

¹ Universitat de les Illes Balears. Mallorca. España, giovannyrincon@gmail.com

² Universidad Pedagógica Nacional. Bogotá. Colombia. Secretaria de Educación. Boyacá. Colombia.

³ Universidad de Alcalá. Madrid. España

1. Introducción

La Diabetes Mellitus se caracteriza por una hiperglucemia constante, este es uno de los principales problemas de salud del siglo XXI en donde, tanto el número de personas que con diabetes y las muertes atribuidas a esta, están aumentando considerablemente (1). Se estima que el número de personas que padecen esta enfermedad superará los 370 millones para el año 2030 (1). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la diabetes mellitus tipo 2 es la quinta causa de muerte en el mundo. Los síntomas más comunes de la diabetes mellitus son micción excesiva, pérdida de peso, exceso de apetito, entre otros (2). La diabetes mellitus también está asociada con muchas complicaciones micro y macrovasculares, como neuropatía, aterosclerosis, artritis reumatoide, retinopatía, enfermedades renales en etapa terminal y trastornos neurodegenerativos que afectan gravemente la calidad de vida del paciente y es una de las principales causas de mortalidad (3). El control intensivo de la hiperglucemia posprandial puede retrasar o prevenir diversas complicaciones de la diabetes. Las complicaciones diabéticas reflejan la glucemia insuficiente y menos efectiva. control logrado con tratamientos actualmente disponibles. Por lo tanto, se necesitan con urgencia objetivos y enfoques terapéuticos más efectivos para el control glucémico, especialmente en la diabetes mellitus tipo 2 no insulino dependiente (1,3).

Los oligosacáridos hidrolizados con α -glucosidasa liberan glucosa, lo que finalmente puede conducir en una hiperglucemia posprandial (3,4). Un aumento en los niveles de glucosa en sangre conduce también a una acelerada glicación, lo que ayuda a la formación de productos finales de glicación avanzada (AGE), aspecto importante ya que se han identificado alteraciones en la estructura y función de las proteínas causadas por la glicación como un vínculo importante entre la diabetes y sus complicaciones graves, como la retinopatía, la neuropatía y las complicaciones cardiovasculares (3,4). Por lo tanto, la inhibición de la hidrólisis de glucosidasa para liberar glucosa es un método adecuado para reducir la hiperglucemia posprandial. Se conocen dos inhibidores comerciales de la α -glucosidasa, acarbosa y voglibosa, los cuales se han utilizado para controlar la hiperglucemia posprandial, pero estos medicamentos a menudo tienen diversos efectos secundarios como dolor abdominal, hinchazón, náuseas, vómitos (5). Por lo tanto, se han explorado inhibidores naturales de la α -glucosidasa como alternativas viables y de baja toxicidad para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2.

Algunos ingredientes activos extraídos de alimentos y plantas medicinales tradicionales, como flavonoides, ácidos fenólicos y cumarinas, se han utilizado como fuentes importantes de inhibidores de la α -glucosidasa. Una de estas fuentes es el arbusto *Retama raetam*, perteneciente

a la familia de las papilionáceas, fabáceas o leguminosas y fue detallada por primera vez en 1775 por el naturalista filandés Peter Forsskå.(6). La retama moruna como también se le llama, es halófito, hermafrodita, caducifolia y logra alcanzar entre 2,5-3,5 metros de altura, sus ramas son delgadas en forma de varillas y sus tallos son flexibles, comúnmente crece en el Medio Oriente, África del Norte y región del Mediterráneo Oriental, también se encuentra en Sicilia, Asia occidental e Islas Canarias, además de abundar en el desierto de Judea y la península del Sinaí, anteriormente se utilizaba como combustible, obteniendo de su madera un excelente carbón (6). Tradicionalmente, se ha utilizado para el tratamiento de la diabetes y la hipertensión en Arabia Saudita y Marruecos (6). Algunos estudios han sugerido que disminuye los niveles de glucosa y lípidos en plasma en ratas normales y diabéticas además de presentar actividad antihipertensiva (7). Se ha propuesto que su actividad hipoglucémica se debe a la inhibición de la captación de glucosa por los túbulos renales (6,7). Además, el perfil de actividad biológica de la planta también incluye actividades antimicrobianas, antioxidantes e insecticidas (8). El interés en la química medicinal de la planta como posible compuesto antidiabético está respaldado por la evidencia del uso medicinal tradicional de la planta para el tratamiento de la diabetes y de estudios que identificaron algunos compuestos antihiperoglucémicos. A este respecto, se han aislado de la planta varios alcaloides como la retamina, la esparteína, la lupinina y el pinitol, donde se ha demostrado que este último exhibe actividad hipoglucemiante (6).

De esta manera, es de interés la identificación de los constituyentes de flavonoides de *Retama raetam*, se ha llevado al descubrimiento de la luteolina 4'-neohespiridosida, atalantoflavona, saponarina, retamasina A y B, licoflavona C, genisteína 8-C-glucósido y efedroidina (8,9). Los flavonoides son metabolitos secundarios polifenólicos presentes en plantas, frutas y vegetales, se consideran una clase importante de compuestos en varios productos farmacéuticos, medicinales y nutracéuticos debido a sus efectos terapéuticos que incluyen propiedades antiinflamatorias, actividad anticancerígena y antioxidante. Una variedad de flavonoides han sido identificados como prometedores inhibidores de la α -glucosidasa que incluyen kaempferol, quercetina, kaempferol 3-O- β -glucopiranosida, flavonol ramnosidos acilados, brousochalcone A y dorsilurina F y G (8,10).

En este trabajo se plasman resultados de siete nuevos flavonoides de *Retama raetam* que incluyen tres flavonas, retamasina C – E y cuatro isoflavonas retamasina F – I. Retamasin C, E, F, G y erysubin A y B los cuales, mostraron una estimulación significativa sobre la insulina de los islotes de Langerhans pancreáticos en ratones (6). En este estudio se pretende

Inhibición de la α -glucosidasa mediante flavonoides de origen natural como vía de control en el desarrollo de diabetes mellitus

exponer sobre posibles inhibidores de la α -glucosidasa que pueden convertirse en candidatos para el desarrollo de fármacos anti-diabéticos, se informa sobre la actividad inhibitoria de la α -glucosidasa, y se presentan estudios enzimáticos cinéticos de los flavonoides, obtenidos de la planta. Finalmente, se presenta un estudio mediante acoplamiento molecular que reveló información relevante sobre el sitio activo de unión de los compuestos.

2. Materiales y métodos

En esta investigación se consultaron diversas fuentes de sobre el comportamiento la α -glucosidasa y su inhibición, se presentan las características estructurales de esta enzima, además se expone un ejemplo concreto de estudio de inhibición mediante metabolitos secundarios de la planta. La enzima estudiada fue analizada mediante Software *Chimera* 1.13.1. a partir de los códigos PDB 3AJ7 y 3A4A.

2.1. Extracción, aislamiento y elucidación de la estructura de los compuestos

Los compuestos fueron extraídos y aislados de las partes aéreas de *Retama raetam* junto con la elucidación de la estructura mediante técnicas espectroscópicas como RMN y ESI masas como lo presenta Ghani y colaboradores (9).

2.2. Estudio de inhibición de la α -glucosidasa

En el estudio de inhibición de la α -glucosidasa se utilizó un formato de microplaca de 96 pocillos para todos los ensayos utilizando el lector de microplacas SpectraMax Plus 384 a 400 nm. El volumen total de la mezcla de reacción fue de 300 μ L que contenía tampón de fosfato de sodio (50 mM; pH 6.8), 40 mU de α -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma Chemical Co., St. Louis, EE. UU.) y el sustrato *p*-nitrofenilo- α -D-glucopiranosido (0,7 mM). La enzima primero se incubó con los compuestos a 37 °C durante 15 min, seguido de la adición del sustrato para iniciar la reacción enzimática. Los experimentos de control negativo que no contenían compuestos también se realizaron en paralelo y se utilizó Acarbose como control positivo, cada ensayo se realizó en cuatro experimentos separados para calcular la desviación estándar.

Asimismo, se realizaron pruebas cinéticas de inhibición. La mezcla de ensayo contenía diferentes concentraciones de los compuestos objetivo y un rango de concentraciones de

sustrato (p-nitrofenil- α -D-glucopiranosida 0,25–2,0 mM). Las velocidades iniciales de la enzima se determinaron en presencia y ausencia de los compuestos utilizando solo la porción lineal de las curvas de velocidad de la enzima. Los diagramas de Lineweaver-Burk se construyeron para determinar el tipo de inhibición y la K_i , los valores de los inhibidores se calcularon mediante el ajuste al gráfico de Dixon. Cada ensayo cinético se realizó por cuadruplicado a partir del cual se calcularon los valores medios de K_i y desviación estándar.

Para el estudio computacional, el modelo de homología de la α -glucosidasa de levadura se basó en la estructura cristalina de la isomaltasa de *Saccharomyces Cerevisiae* como plantilla, empleando estudios de simulación de acoplamiento molecular con Swiss Modeller. Los compuestos se construyeron utilizando el módulo constructor en MOE (Molecular Operating Environment) con la posterior aplicación de cargas y minimización utilizando el campo de fuerza MMFF94x (9). La simulación de acoplamiento molecular se llevó a cabo utilizando MOE-dock con protocolos de acoplamiento predeterminados. El sitio activo se identificó utilizando la enzima maltosa del Protein Data Bank que será presentada más adelante (PDB: 3A4A).

3. Análisis y discusión

3.1. Enzima α -glucosidasa

Se conocen como glucósido hidrolasas, son enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces glucosídicos para generar glúcidos menores (11). Son enzimas muy comunes con funciones importantes en la naturaleza como en la degradación de biomasa, como celulosa y hemicelulosa, en la defensa contra las bacterias, en mecanismos de patogénesis y en el normal funcionamiento celular. Las glucosidasas están clasificadas con el número EC 3.2.1 como enzimas catalizadoras de la hidrólisis de O- o S-glucósidos. También pueden ser clasificadas de acuerdo al resultado estereoquímico de la reacción de hidrólisis (12).

La α -glucosidasa (EC 3.2.1.20) hidroliza los enlaces α -glucosídicos del extremo no reductor de su sustrato para liberar α -D-glucosa. Esta enzima es importante para la generación de D-glucosa a partir de fuentes de carbono, incluida la maltodextrina y la sacarosa, en diversos organismos vivos. La especificidad del sustrato de las α -glucosidasas difiere mucho dependiendo de la fuente de las enzimas (13).

En el estudio se realizaron las aproximaciones de modelación computacional, así como el estudio de inhibición, con la oligo-1,6-glucosidasa (EC 3.2.1.10; oligosacárido oligo-1,6-

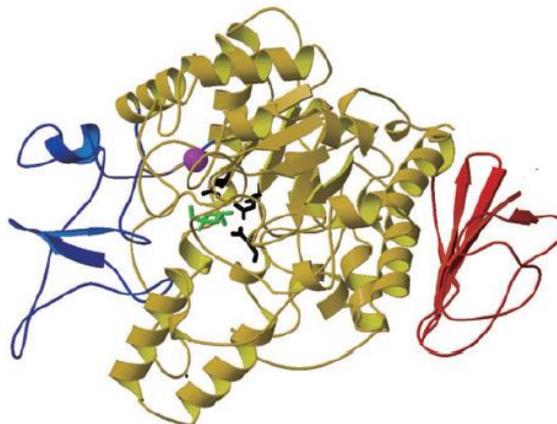
Inhibición de la α -glucosidasa mediante flavonoides de origen natural como vía de control en el desarrollo de diabetes mellitus

glucosidasa). Esta es una enzima que hidroliza el enlace α -1,6-glucosídico de isomaltoligosacáridos y dextrano (14,15). Sin embargo, a diferencia de las α -1,4-glucosidasas (EC 3.2.1.20), la oligo1,6-glucosidasa no logra hidrolizar los enlaces α -1,4-glucosídicos de los maltosacáridos. Sobre la base de las similitudes de la secuencia de aminoácidos, la oligo-1, 6-glucosidasa se ha clasificado como un miembro de la familia 13 de la glucosida hidrolasa (GH de retención), también llamada la familia de la α -amilasa que incluyen α -amilasas, α -glucosidasas, ciclodextrina glucantransferasas, pululanasas, isoamilasas, enzimas de ramificación y neopululanasas (16). Los miembros de la familia 13 de GH comparten poca similitud de secuencia. Sin embargo, contienen cuatro regiones altamente conservadas (regiones I-IV) y tres residuos ácidos catalíticos ubicados en estas regiones (15,17). Todos los miembros de esta familia de enzimas están compuestos por tres dominios, A, B y C (6). El dominio A es un dominio catalítico que contiene un sistema de barriles $(\beta/\alpha)_8$. El dominio B se inserta entre la tercera hoja β y la hélice del sistema $(\beta/\alpha)_8$ del dominio A. El dominio C comprende ocho cadenas β antiparalelas en un motivo de doble *clave griega* (17). Las Asp (región II) y Glu (región III) ubicadas en el extremo carbono de la cadena β_4 y la cadena β_5 actúan como el nucleófilo catalítico y el catalizador ácido-base general, respectivamente. El tercer residuo, Asp (región IV), ubicado entre la hebra 7 y la hélice 7, puede estabilizar el sustrato durante la catálisis para ayudar a acelerar la reacción de hidrólisis ácido-base (15,18). La disposición tridimensional de los tres residuos catalíticos también está altamente conservada entre las enzimas de la familia 13 de GH.(18) Por lo tanto, la diferencia en la especificidad del sustrato entre las enzimas de la familia 13 de GH depende de la estructura del sitio activo (15,17).

Las características estructurales generales de la isomaltasa son similares a las de oligo-1,6-glucosidasa de *Bacillus cereus* O16G,(17,19) glucosidasa de dextrano DGasa y α -amilasas (20). Esta enzima consta de tres dominios, A, B y C, como se muestra en la Figura 2. El dominio A contiene los residuos 1–113 y 190–512, consta de ocho cadenas- β y α -hélices paralelas, que forman el sistema de 8barriles β/α comunes de la familia 13 de GH. El dominio A contiene los residuos catalíticos Asp215, Glu277 y Asp352 en el lado C-terminal del barril.(15) El dominio B (residuos 114–189) tiene una estructura con presencia de *bucles* que contiene una hélice corta y una lámina- β antiparalela. La *hendidura* activa del sitio creada por los dominios A y B forma una estructura en forma de *bolsillo* similar a la observada en las estructuras de O16G, DGasa, amilasucreasa y sacarosa fosforilasa.(19,21) Es notable que el pliegue del dominio C es diferente de los de otras enzimas de la familia 13 de GH, este consiste en un motivo de barril- β de ocho cadenas antiparalelas. Sin embargo, el dominio C (residuos 513 a 589) consiste en una hoja β

antiparalela de cinco cadenas; por lo tanto, solo la mitad del motivo de ocho barriles β cerca del dominio A está presente en la isomaltasa.(15)

Figura 1. Estructura de la isomaltasa en complejo con el azúcar maltosa.

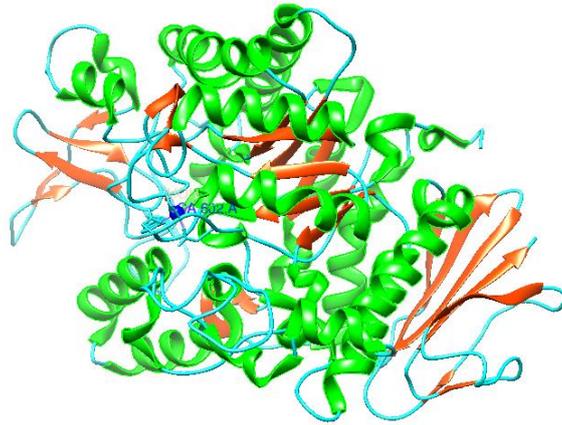


Fuente: Elaboración de los autores

El dominio A (residuos 1–113 y 190–512) se muestra en amarillo, el dominio B en azul (residuos 114–189) y el dominio C en rojo (residuos 513–589).

Adicionalmente, se logró determinar, que todas las conformaciones de los aminoácidos del sitio activo fueron similares entre la isomaltasa libre y el complejo isomaltasa-maltosa. Por lo tanto, la unión del inhibidor no afecta la estructura general de la isomaltasa. Además, en la estructura, se encuentra un ion de calcio unido en el bucle ubicado justo antes de la hélice 1 del dominio A (Figura 2 y 3), con geometría octaédrica coordinada por las cadenas laterales de Asp30 OD1, Asn32 OD1, Asp34 OD1 y Asp38 OD2, la cadena principal de oxígeno de Trp36 y una molécula de agua. Una estructura similar se encuentra en la DGasa nativa (21). Durante la purificación y la cristalización, no se añadieron sales de calcio a las soluciones tampón. Por lo tanto, la unión de este ion de calcio debe ser muy fuerte. Todas las α -amilasas conocidas contienen un ion de calcio conservado que se encuentra en la interfaz entre los dominios A y B (20). Este ion de calcio es esencial para la estabilidad y la actividad de la enzima, sin embargo, el sitio de unión al calcio de la isomaltasa no es idéntico al de las α -amilasas, (20) este ion se visualiza en color azul oscuro en la Figura 2.

Figura 2. Estructura de la isomaltasa obtenida a partir del archivo PDB 3AJ7.



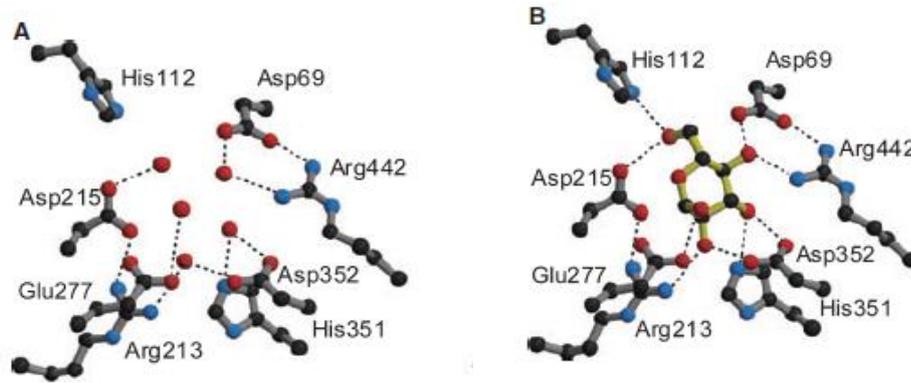
Fuente: Elaboración de los autores

3.2. Mecanismo de la Enzima

Es importante destacar que antes de la unión del sustrato o inhibidor, el sitio activo de la isomaltasa está ocupado por cinco moléculas de agua (Figura 3). Las posiciones de tres de estas cinco moléculas de agua son casi idénticas a las de O2, O3 y O4 del residuo de glucosa, y las dos moléculas de agua restantes están cerca de O1 y O6 del residuo de glucosa (15). Estas moléculas de agua deben desplazarse por el sustrato entrante, después de la unión del sustrato o inhibidor, el extremo no reductor del residuo de glucosa se une al fondo de la bolsa del sitio activo (subsitio) 1 (Figura 5) mediante nueve enlaces de hidrógeno y se apila contra Tyr72 (15).

Los tres residuos ácidos catalíticos también están involucrados en la red de enlaces de hidrógeno (9). Asp215 OD2 forma un enlace de hidrógeno con O6 del residuo de glucosa en el subsitio 1. La distancia entre C1 de la glucosa y Asp215 OD1 es 2.6 Å. Glu277, que actúa como un catalizador ácido-base general, forma un enlace de hidrógeno con O1 del residuo de glucosa, con una distancia de enlace de 2.8 Å. Las longitudes de los enlaces de hidrógeno entre Asp352 OD1 y O3 del resto de glucosa y entre OD2 y O2 son 2.7 y 2.5 Å, respectivamente. Las interacciones del enlace de hidrógeno entre la proteína y el residuo de glucosa también se enumeran en la Tabla 1. Siete de los nueve enlaces de hidrógeno se conservan entre la α -amilasa y otras enzimas de la familia 13 de GH, los dos enlaces de hidrógeno restantes son específicos de las oligo-1,6-glucosidasas (6). Asp69 OD2 y Arg442 NH1 forman enlaces de hidrógeno con O4 del residuo de glucosa.(15) El reconocimiento del extremo no reductor de la glucosa se logra predominantemente por estas dos interacciones. Aquí, la isomaltasa difiere de otras enzimas de la familia 13 de GH, aunque se observa una estructura similar en la DGasa.(21)

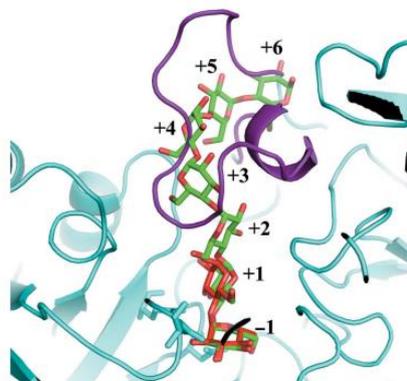
Figura 3. Vista general de la red de enlaces de hidrogeno en el sitio activo de isomaltasa (como líneas discontinuas). (A) Antes de la unión al sustrato y (B) Después de la unión de la maltosa al sitio activo.



Fuente: Elaboración de los autores

Para complementar el mecanismo, se consultó el trabajo de Shen y colaboradores, donde se señala que este se basa en una serie de pasos, se considera que el paso a la cadena $\beta \rightarrow \alpha$ bucle 4, es el responsable del reconocimiento estricto de los disacáridos debido a un impedimento estérico en el subsitio +2 (Figura 5), la especificidad del enlace glicosídico en el subsitio +1 es determinada por interacciones con dos residuos, Thr y Phe, y también está asistida por otro residuo, Gly.(22)

Figura 4. Extensión tipo $\beta \rightarrow \alpha$ bucle 4 en el sitio activo



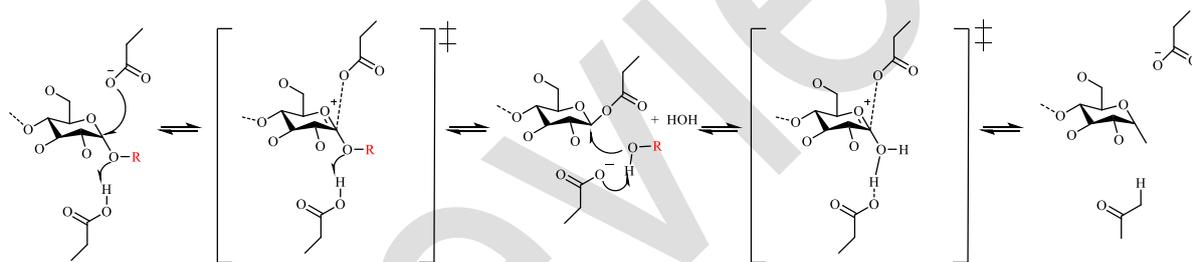
Fuente: Elaboración de los autores

Se considera que la reacción procede de un mecanismo de doble desplazamiento (Figura 5). Durante el primer desplazamiento, un grupo ácido en la enzima (Glu) protona el oxígeno

Inhibición de la α -glucosidasa mediante flavonoides de origen natural como vía de control en el desarrollo de diabetes mellitus

glicosídico, lo que provoca la escisión del enlace C1-O y la formación transitoria de un estado de transición similar al ión oxocarbenio. Un grupo de ácido nucleófilo (Asp) de la proteína ataca el centro anomérico del azúcar para dar un intermedio de enzima L-glicosilo, mientras que la aglicona del sustrato abandona el sitio activo (23). En la hidrólisis, durante el segundo desplazamiento, el proceso que se acaba de describir se invierte esencialmente mediante un ataque, en el centro anomérico, por una molécula de agua activada por la forma carboxilato del ex donador de protones (Figura 5). Esta segunda etapa de la reacción transcurre a través de un estado de transición similar a un ión, como antes, para producir un producto con configuración anómera K y reprotonación del grupo ácido original. La transglicosilación puede ocurrir si el grupo atacante en el segundo desplazamiento de la reacción es un hidroxilo libre de un residuo de azúcar en lugar de agua (23).

Figura 5. Mecanismo general de la enzima glucosidasa.

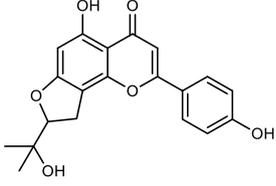
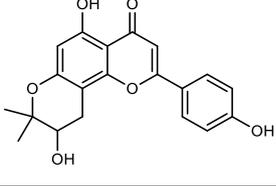
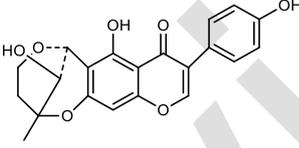
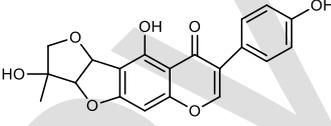
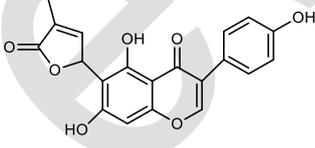
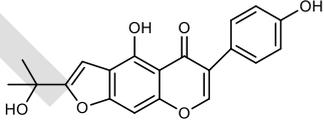
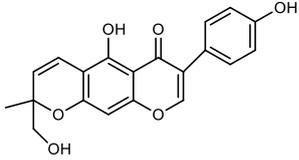
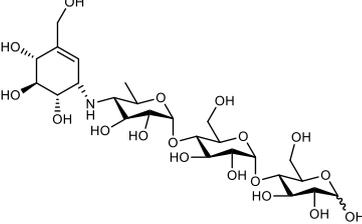


Fuente: Elaboración de los autores

3.3. Inhibición de la α -glucosidasa y estudios cinéticos

En el estudio de inhibición los compuestos disminuyeron significativamente la velocidad de reacción de la α -glucosidasa de una manera dependiente de la concentración en comparación con los controles negativos que no contenían inhibidores. Los flavonoides mostraron un grado variable de actividades inhibitorias según lo indicado por sus valores de K_i . Algunos compuestos exhibieron valores de K_i comparables, mientras que otros tuvieron diferencias de actividad. Las estructuras y los valores de K_i de los compuestos se enumeran en la Tabla 1. Los valores K_i de los compuestos oscilan entre 12.08 y 72.37 μ M. Dado que los compuestos presentan diferentes grupos químicos sustituyentes además de que los flavonoides son estructuralmente similares, sé intuye que las diferencias en su potencia de inhibición se deben principalmente a los grupos sustituyentes, de los cuales se tratará más adelante.

Tabla 1. Estructuras de los flavonoides analizados con sus valores de K_i y el tipo de inhibición.

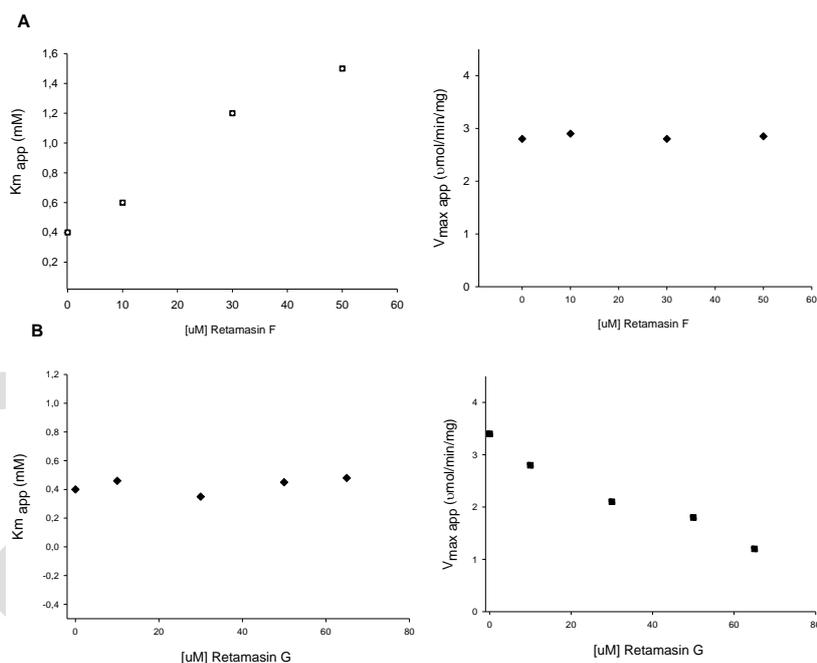
Nombre del compuesto y tipo	Estructura química	K_i μ M	Tipo de inhibición
Retamasina C (Flavonoide)		19.93 +/- 0.77	Competitivo
Retamasina D (Flavonoide)		39.17 +/- 0.86	No competitivo
Retamasina F (Isoflavonoide)		14.45 +/- 0.83	Competitivo
Retamasina G (Isoflavonoide)		56.61 +/- 0.95	No competitivo
Retamasina H (Isoflavonoide)		12.08 +/- 0.57	No competitivo
Erisubina A (Isoflavonoide)		16.42 +/- 0.18	No competitivo
Erisubina B (Isoflavonoide)		72.37 +/- 0.64	No competitivo
Acarbosa		4.72 +/- 0.38	Competitivo

Fuente: Elaboración de los autores

Inhibición de la α -glucosidasa mediante flavonoides de origen natural como vía de control en el desarrollo de diabetes mellitus

Los datos cinéticos de inhibición se analizaron utilizando la ecuación de Michaelis-Menten, seguido del ajuste en el método de Lineweaver-Burk para determinar el tipo de inhibición (6,24). Para Retamasina C y F se demuestra una inhibición competitiva de la enzima como se indica por sus correspondientes graficas Lineweaver-Burk que muestran variables interceptos en el eje x con todas las líneas que convergen en el mismo punto en el eje y, comportamiento típico de inhibición competitiva. El valor aparente de K_m ($K_{m, app}$) se calculó a partir de cada intercepto en el eje x $[I]$. Adicionalmente, se construyeron gráficos de Dixon y los valores de K_i se calcularon directamente a partir de la intersección con el eje y de los gráficos, cuyo patrón también se ajusta con la inhibición competitiva (6,25). Los valores de V_{max} y K_m estuvieron de acuerdo con la inhibición competitiva que se caracteriza por un aumento en K_m sin cambio en el valor de V_{max} , los datos para Retamasina F se presentan en la Figura 7 A.

Figura 6. (A). Gráficos representativos para los inhibidores competitivos que indican un aumento de $K_{m, app}$ sin cambios en el valor de $V_{max, app}$ (B).



Fuente: Elaboración de los autores

Gráficos representativos que indican una disminución de $V_{max, app}$ sin cambio en el valor de $K_{m, app}$ consistente con la inhibición no competitiva de la enzima (6).

Los gráficos de Lineweaver-Burk para retamasina D, G, H y erisubina A y B muestran una inhibición no competitiva de la α -glucosidasa. En la Figura 7(B) se presenta específicamente para ratamasina G indicaban intercepciones de la variable y con todas las líneas convergen en el mismo punto en el eje x, de acuerdo con la inhibición no competitiva. A partir de cada

intersección con el eje y, se calculó el valor aparente de V_{\max} ($V_{\max, \text{app}}$) en cada [I]. Los valores de K_i se calcularon directamente a partir de la intersección con el eje x de las gráficas de Dixon, es decir, $1/v$ versus [I], que también se ajusta a una inhibición no competitiva. La V_{\max} y los valores de K_m fueron consecuentes a una inhibición no competitiva que se caracteriza por una disminución en V_{\max} y ningún cambio en el valor de K_m .(6)

3.4. Identificación de grupos químicos activos de los inhibidores

Todas las isoflavonas y flavonas estudiadas en el trabajo tienen sustituciones en las posiciones C6 y C8 respectivamente y en todas estas sustituciones, los grupos hidroxilo y metilo se sitúan terminalmente como grupos laterales, que están en configuración simple o germinal. La variabilidad en las potencias de inhibición de los compuestos objetivo está influenciada principalmente por estas sustituciones junto con los grupos hidroxilo y metilo junto al resto flavonoide original. El inhibidor más potente de la serie fue la retamasina H ($K_i = 12.08 \mu\text{M}$), una isoflavona que posee una γ -lactona sustituyente en C6 del resto principal que inhibe de forma no competitiva la α -glucosidasa. La potente actividad del compuesto parece deberse principalmente a la presencia de la cadena lateral de la γ -lactona.

Las actividades inhibitorias de la retamasina D (que lleva un anillo de dihidropirano en C8 del resto flavona principal con grupos metilo geminales), y la retamasina C (que lleva un anillo de dihidrofurano con grupos metilo germinales) tienen una marcada diferencia a pesar de que ambos llevan grupos metilo germinales. La única diferencia estructural contrastante entre estos dos inhibidores se debe a los anillos dihidropirano y dihidrofurano. Dado que ambos compuestos son isómeros estructurales y no estereoisómeros la comparación entre ellos proporcionará poca información en términos de estructura y relación de actividad, debido a que la diferencia reside en los anillos de dihidropirano y dihidrofurano, es posible una comparación limitada que podría concluir en cierta medida que el anillo de dihidrofurano con grupos metilo germinales en la retamasina C es más importante para la inhibición potente de la α -glucosidasa.

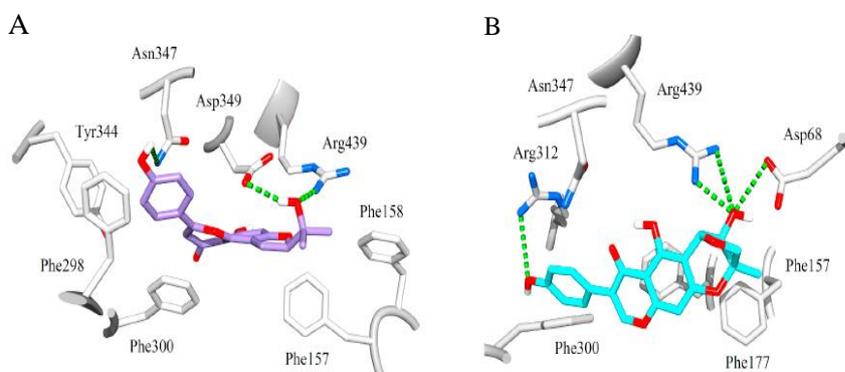
La erisubina B, que lleva un anillo de dihidropirano con los grupos metilo e hidroxilo en el C6 del resto de isoflavona, inhibió la enzima con un valor K_i de $71.17 \mu\text{M}$, su actividad inhibidora mejoró más de 4 veces cuando su sustitución en C6 se reemplaza por un anillo de lactona que lleva un grupo hidroxilo y grupos metilo geminales, como se presenta en la erisubina A ($K_i = 16.42 \mu\text{M}$). Es importante mencionar que la retamasina H, el compuesto más potente de la serie, también posee un anillo de lactona y un grupo metilo en la misma posición. Por lo tanto, es evidente que la presencia del anillo de lactona unido a grupos hidroxilo y metilo geminal en la

Inhibición de la α -glucosidasa mediante flavonoides de origen natural como vía de control en el desarrollo de diabetes mellitus

posición C6 del resto de isoflavona contribuye a la potente inhibición de la α -glucosidasa. El tipo de sustitución de C6 en la retamasina F es único entre todos los compuestos estudiados, esta posee un bicilo fusionado con el núcleo de isoflavona en las posiciones C6 y C7 con un metino C2'' ($K_i = 14.45 \mu\text{M}$). Tanto así que es el siguiente inhibidor competitivo más potente después de la retamasina H con un valor de K_i comparable al de la erisubina A y la retamasina C.

Finalmente, para el estudio de modelado molecular, se analizaron específicamente la retamasina C ($K_i = 19.93 \mu\text{M}$) y la F ($K_i = 14.45 \mu\text{M}$) (flavona e isoflavona, respectivamente). Estos estudios se dirigieron para determinar cómo los compuestos objetivo se unen al sitio activo de la α -glucosidasa. Se desarrolló un modelo de homología de la α -glucosidasa de levadura utilizando la estructura cristalina de la isomaltasa de *Saccharomyces cerevisiae* como plantilla. El análisis de acoplamiento reveló que ambos compuestos objetivo estaban bien alojados en el sitio activo con las puntuaciones de acoplamiento de -5.68 y -5.80 para la retamasina C y F, respectivamente. La Figura 7 A muestra el complejo del sitio activo de retamasina C modelado. Es evidente que el inhibidor forma una serie de interacciones polares y no polares con los residuos del sitio activo de la enzima. El grupo hidroxilo, junto a los grupos metilo geminales y en proximidad al anillo de dihidrofurano, media los enlace hidrógeno con Asp349 y Arg439, que son los residuos catalíticos importantes de la enzima. El átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo en la posición de 4'' del anillo de benceno está involucrado en contacto polar con Asn347. Las interacciones de apilamiento π entre Phe298, Phe300 y el inhibidor estabilizan aún más los contactos.

Figura 7. La posición de unión simulada de (A) retamasina C y En la Figura 7 B retamasina F.



Fuente: Elaboración de los autores

Los residuos del sitio activo de la α -glucosidasa se presentan como barras, los átomos de carbono están coloreados en gris, los átomos de oxígeno en rojo y los átomos de nitrógeno en

azul. Los átomos de carbono de la retamasina C y F se representan en dos colores diferentes. Los enlaces de hidrógeno están representados como guiones verdes.

En la Figura 7 B se presenta además, el complejo de sitio activo de retamasina F modelado, donde se observa que el inhibidor influye en los contactos hidrófobos con los residuos del sitio hidrófobo del sitio activo que incluye Phe157, Phe177 y Phe300. Además, el grupo hidroxilo en el metino C2" está involucrado en la interacción del enlace de hidrógeno con los residuos de Asp68, Arg312 y Arg439. Como se mencionó anteriormente, el metino C2" en la retamasina F es parte del biciclo fusionada con el núcleo de isoflavona en las posiciones C6 y C7.

4. Conclusiones

Las glucosidasas, son enzimas importantes para el metabolismo de los glucósidos en prácticamente todos los ámbitos de la vida. La deficiencia de estas enzimas puede conducir a una serie de enfermedades de depósito lisosomal que conllevan a problemas en el desarrollo o en la muerte. Las glucosidasas se encuentran en el tracto intestinal y en la saliva, donde se degradan los hidratos de carbono complejos catalizando la hidrólisis de su enlace glucosídico en el extremo no reductor del sustrato, como la lactosa, el almidón, la sacarosa, entre otras. Asimismo, las glucosidasas también participan en la biosíntesis y degradación de glucógeno en el cuerpo.

En este estudio se determinó el rol de la especie *Retama Raetam* en la medicina tradicional para el tratamiento de la diabetes mellitus y la hipertensión, algunos estudios han señalado las propiedades terapéuticas de la planta al aislar varios compuestos con actividad antihiper glucémica. Asimismo, se revisaron siete flavonoides con actividad inhibidora de la α -glucosidasa, la mayoría de los cuales eran inhibidores no competitivos (retmasina D, G, H y la erisubina A y B), la potencia inhibitoria de la mayoría de los compuestos diana se comparó entre sí, donde se evidencia que las sustituciones C6 en las isoflavonas y C8 en las flavonas influyen enormemente en la actividad inhibidora de la α -glucosidasa. Estas sustituciones incluyen la γ -lactona, un resto de biciclo fusionado con metilo C2", grupos hidroxilo y metilo geminal. Además, la retamasina C, F, G y la erisubina A y B mostraron una actividad prometedora doble al estimular la secreción de insulina de los islotes pancreáticos de Langerhans en ratones además de inhibir la enzima α -glucosidasa.

Inhibición de la α -glucosidasa mediante flavonoides de origen natural como vía de control en el desarrollo de diabetes mellitus

Los compuestos revisados se pueden convertir en candidatos potenciales para el desarrollo de fármacos antidiabéticos, especialmente debido a su actividad dual; como estimuladores de la secreción de insulina y como inhibidores de la α -glucosidasa.

Finalmente, mediante estudios de modelación molecular para 2 metabolitos, se evidencia que los compuestos se adaptan bien en el bolsillo '*pocket*' del sitio activo de α -glucosidasa al interactuar con varios residuos importantes del sitio activo, además la comprensión del sitio activo junto con los grupos químicos activos de los inhibidores identificados en la actual revisión es interesante para el desarrollo de fármacos prometedores contra la diabetes.

5. Agradecimientos

Se extiende un agradecimiento especial a la Universidad de las Islas Baleares y especialmente al Departamento de Química y al Dr. Bartolomé Vilanova por sus observaciones.

6. Referencias

1. Stojkovic D, Smiljkovic M, Ciric A, Glamoclija J, Van Griensven L, Ferreira ICFR, et al. An insight into antidiabetic properties of six medicinal and edible mushrooms: Inhibition of α -amylase and α -glucosidase linked to type-2 diabetes. *South African J Bot.* 1 de enero de 2019;120:100-3.
2. Kim DJ, Kang YH, Kim KK, Kim TW, Park JB, Choe M. Increased glucose metabolism and alpha-glucosidase inhibition in *Cordyceps militaris* water extract-treated HepG2 cells. *Nutr Res Pract.* 1 de junio de 2017;11(3):180-9.
3. Huang Q, Chai WM, Ma ZY, Ou-Yang C, Wei QM, Song S, et al. Inhibition of α -glucosidase activity and non-enzymatic glycation by tannic acid: Inhibitory activity and molecular mechanism. *Int J Biol Macromol.* 1 de diciembre de 2019;141:358-68.
4. Wen H, Tang B, Stewart AJ, Tao Y, Shao Y, Cui Y, et al. Erythritol Attenuates Postprandial Blood Glucose by Inhibiting α -Glucosidase. *J Agric Food Chem.* 14 de febrero de 2018;66(6):1401-7.
5. Abbas G, Al Harrasi A, Hussain H, Hamaed A, Supuran CT. The management of diabetes mellitus-imperative role of natural products against dipeptidyl peptidase-4, α -glucosidase and sodium-dependent glucose co-transporter 2 (SGLT2). Vol. 86, *Bioorganic Chemistry.* Academic Press Inc.; 2019. p. 305-15.

6. Ghani U, Nur-e-Alam M, Yousaf M, Ul-Haq Z, Noman OM, Al-Rehaily AJ. Natural flavonoid α -glucosidase inhibitors from *Retama raetam*: Enzyme inhibition and molecular docking reveal important interactions with the enzyme active site. *Bioorg Chem.* 1 de junio de 2019; 87:736-42.
7. Maghrani M, Michel J-B, Eddouks M. Hypoglycaemic activity of *Retama raetam* in rats. *Phyther Res.* febrero de 2005; 19(2):125-8.
8. Hayet E, Maha M, Samia A, Mata M, Gros P, Raida H, et al. Antimicrobial, antioxidant, and antiviral activities of *Retama raetam* (Forssk.) Webb flowers growing in Tunisia. *World J Microbiol Biotechnol.* 10 de diciembre de 2008; 24(12):2933-40.
9. Nur-e-Alam M, Yousaf M, Parveen I, Hafizur RM, Ghani U, Ahmed S, et al. New flavonoids from the Saudi Arabian plant *Retama raetam* which stimulates secretion of insulin and inhibits α -glucosidase. *Org Biomol Chem.* 2019 ; 17(5):1266-76.
10. Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci.* 29 de diciembre de 2016; 5:e47.
11. Proença C, Freitas M, Ribeiro D, Oliveira EFT, Sousa JLC, Tomé SM, et al. α -Glucosidase inhibition by flavonoids: an in vitro and in silico structure-activity relationship study. *J Enzyme Inhib Med Chem.* diciembre de 2017; 32(1):1216-28.
12. Zeng L, Zhang G, Liao Y, Gong D. Inhibitory mechanism of morin on α -glucosidase and its anti-glycation properties. *Food Funct.* 14 de septiembre de 2016;7(9):3953-63.
13. Joshi SR, Standl E, Tong N, Shah P, Kalra S, Rathod R. Therapeutic potential of α -glucosidase inhibitors in type 2 diabetes mellitus: an evidence-based review. *Expert Opin Pharmacother.* 2015;16(13):1959-81.
14. Suzuki Y, Aoki R, Hayashi H. Assignment of a of *Bacillus cereus* ATCC 7064 to an exo-oligo-1,6-glucosidase. *Biochim Biophys Acta - Protein Struct Mol Enzymol.* junio de 1982; 704(3):476-83.
15. Yamamoto K, Miyake H, Kusunoki M, Osaki S. Crystal structures of isomaltase from *Saccharomyces cerevisiae* and in complex with its competitive inhibitor maltose. *FEBS J.* octubre de 2010;277(20):4205-14.
16. Kuriki T, Imanaka T. The concept of the alpha-amylase family: structural similarity and common catalytic mechanism. *J Biosci Bioeng.* 1999; 87(5):557-65.

17. Svensson B. Regional distant sequence homology between amylases, alpha-glucosidases and transglucanosylases. FEBS Lett . 28 de marzo de 1988; 230(1-2):72-6.
18. Hasegawa K, Kubota M, Matsuura Y. Roles of catalytic residues in alpha-amylases as evidenced by the structures of the product-complexed mutants of a maltotetraose-forming amylase. Protein Eng. octubre de 1999;12(10):819-24.
19. Watanabe K, Hata Y, Kizaki H, Katsube Y, Suzuki Y. The refined crystal structure of *Bacillus cereus* oligo-1,6-glucosidase at 2.0 Å resolution: structural characterization of proline-substitution sites for protein thermostabilization. J Mol Biol. 30 de mayo de 1997; 269(1):142-53.
20. Machius M, Wiegand G, Huber R. Crystal Structure of Calcium-depleted *Bacillus licheniformis* α -amylase at 2.2 Å Resolution. J Mol Biol. 3 de marzo de 1995; 246(4):545-59.
21. Hondoh H, Saburi W, Mori H, Okuyama M, Nakada T, Matsuura Y, et al. Substrate Recognition Mechanism of α -1,6-Glucosidic Linkage Hydrolyzing Enzyme, Dextran Glucosidase from *Streptococcus mutans*. J Mol Biol. mayo de 2008; 378(4):913-22.
22. Shen X, Saburi W, Gai Z, Kato K, Ojima-Kato T, Yu J, et al. Structural analysis of the α -glucosidase HaG provides new insights into substrate specificity and catalytic mechanism. Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr. 1 de junio de 2015; 71(6):1382-91.
23. Macgregor EA, Janec-ek S, Svensson B. Relationship of sequence and structure to specificity in the K-amylase family of enzymes. Biochim Biophys Acta. 2001;1546(1):1-20.
24. Lineweaver H, Burk D. The Determination of Enzyme Dissociation Constants. J Am Chem Soc. marzo de 1934; 56(3):658-66.
25. Welk B, McArthur E, Ordon M, Morrow SA, Hayward J, Dixon S. The risk of dementia with the use of 5 alpha reductase inhibitors. J Neurol Sci. 15 de agosto de 2017; 379:109-11.