

## Inhibidores de la Glicación de Proteínas Purificados a Partir del Extracto de *Sphingomonas* sp. 3a-1, una Bacteria Endofita de *Piper auritum*.

<sup>1</sup>Javier Ayala Manríquez, <sup>1</sup>Adriana María Neira González, <sup>2</sup>Rosa Martha Pérez Gutierrez, <sup>3</sup>Geiser Cuéllar Rivera, <sup>1</sup>Luis Bernardo Flores Cotera.

<sup>1</sup>Laboratorio de Metabolitos Secundarios Microbianos, Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Cinvestav, México 07360 DF, México

<sup>2</sup>Laboratorio de Investigación de Productos Naturales, Escuela de Ingeniería Química e Industrias Extractivas, México 07758 DF, México

<sup>3</sup>Laboratorio de Espectroscopia de Masas, Departamento de Química, Cinvestav, México 07360 DF, México

Tel: 57473800 ext 4310; E-mail: lfcotera@cinvestav.mx

### RESUMEN

*Sphingomonas* sp. 3a-1 fue aislada de hojas de *Piper auritum* (Hoja Santa). Extractos de acetato de etilo obtenidos de cultivos de la bacteria son capaces de inhibir la glicación de proteínas (85%), *in vitro* (método BSA-glucosa). El objetivo de el presente trabajo fue purificar el extracto mediante varias técnicas de cromatografía y hacer una caracterización inicial de las fracciones obtenidas. Se obtuvieron 3 fracciones purificadas (A, B y C) que inhibieron la glicación de proteínas en 88, 87 y 86%, respectivamente, en comparación con 54% de aminoguanidina que se usó como control positivo. Las 3 fracciones se analizaron por espectroscopia de masas, obteniendo los iones moleculares respectivos; para la fracción A 282.279301 m/z y formula molecular C<sub>18</sub>H<sub>36</sub>NO, para la fracción B 424.263424 m/z y formula molecular C<sub>30</sub>H<sub>34</sub>NO, y para la fracción C 353.266418 m/z y formula molecular C<sub>19</sub>H<sub>38</sub>O<sub>4</sub>Na. Se concluye en base en lo anterior que, *P. auritum* aloja bacterias endofitas capaces de producir varios compuestos que inhiben la glicación de proteínas, *in vitro*.

**Palabras clave:** *inhibidores de la glicación de proteínas, acuyo, yerba santa, productos finales de glicación avanzada, metabolitos secundarios, diabetes.*

### ABSTRACT

*Sphingomonas* sp. 3a-1 was isolated from leaves of *Piper auritum* (hoja santa). Ethyl acetate extracts obtained from cultures of the bacterium, inhibited the glycation of proteins (85%), *in vitro* as determined by the BSA-glucose method. The aim of this study was to purify the extract by various chromatographic techniques and make an initial characterization of the fractions obtained. Three purified fractions (A, B and C) inhibited protein glycation in 88, 87 and 86%, respectively, compared to 54% aminoguanidine, the later was used as positive control. The molecular ions of the three

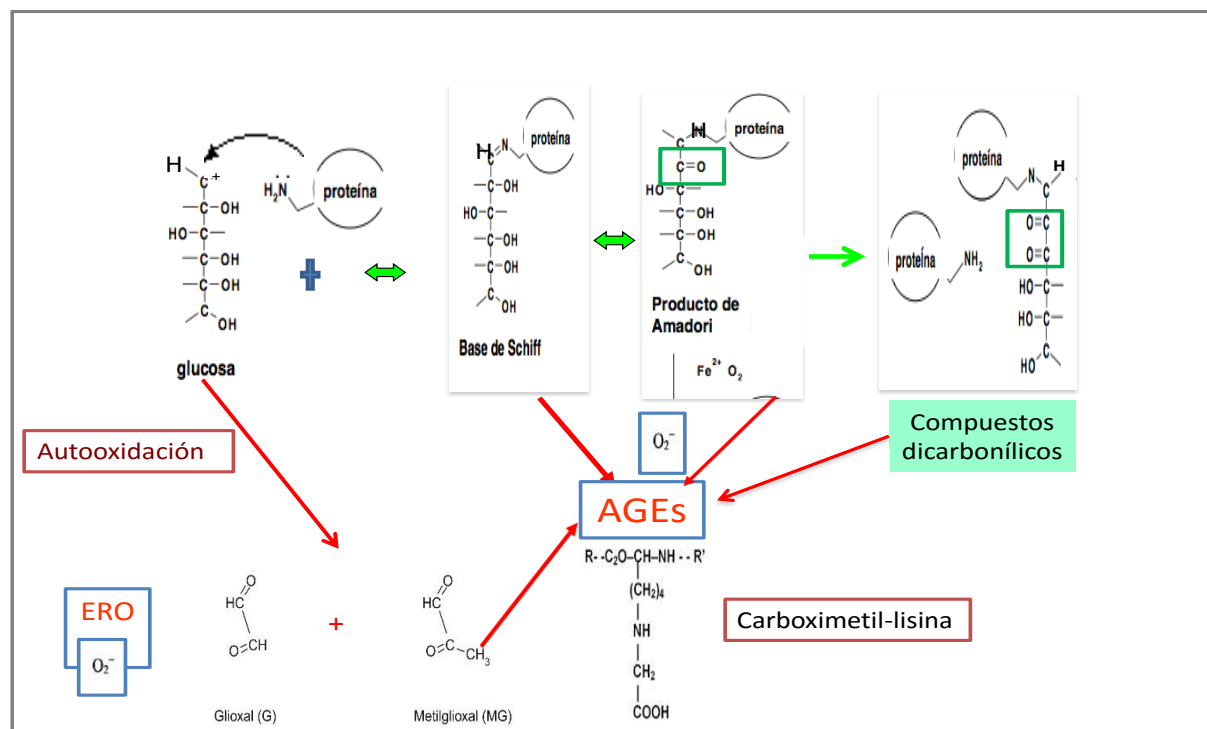
fractions were attained by mass spectroscopy analysis, and were as follows: fraction A 282.279301 m / z and molecular formula  $C_{18}H_{36}NO$ ; fraction B 424.263424 m / z and molecular formula  $C_{30}H_{34}NO$ ; and fraction C 353.266418 m / z and molecular formula  $C_{19}H_{38}O_4Na$ . Thus, it is concluded that *P. auritum* hosts endophytic bacteria capable of producing several compounds that inhibit the glycation of proteins *in vitro*.

**Keywords:** *inhibitors of protein glycation, acuyo, yerba santa, advanced glycation end products, secondary metabolites, diabetes.*

## INTRODUCCIÓN

La diabetes es una enfermedad crónica de elevada incidencia y prevalencia a nivel mundial. Por ello, la diabetes es también un grave problema de salud y socioeconómico. Esta enfermedad se caracteriza por episodios de hiperglucemia crónica, lo que puede ocasionar a corto y largo plazo; cardiopatías, insuficiencia renal, ceguera, cataratas, aterosclerosis y afecciones del sistema nervioso entre otras (Brownlee y Cerami 1981; Setter et al. 2003; Srivastava et al. 2011). Estas complicaciones de la diabetes se deben, al menos en parte, a que la hiperglucemia promueve la formación de compuestos complejos conocidos como AGEs (Advanced Glycation End Products), compuestos fluorescentes y muy reactivos, cuya formación se inicia al reaccionar los grupos carbonilo de los azúcares reductores, con los grupos amino de las proteínas (glicación no enzimática), ver figura 1. La formación de AGEs comprende una compleja red de reacciones, e.g., condensación, rearreglos y entrecruzamientos intermoleculares y producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) (Cohen y

Ziyadeh 1996; DCCT 1993; Giacco y Brownlee 2010). La acumulación de AGEs en los tejidos se considera un marcador en la patogénesis de la diabetes, y se ha asociado con el desarrollo de muchas de las complicaciones tales como; daño renal e hígado graso, cardiopatías, microangiopatía y retinopatía diabética (Goh y Cooper 2008; Park et al. 2012; Vitek et al. 1994; Vlassara et al. 2002; Yan et al. 2003). Se ha planteado que compuestos inhibidores de la glicación de proteínas pueden ayudar a reducir la formación y acumulación de AGEs, en consecuencia, podrían ser útiles para reducir la incidencia y/o retardar la evolución de las complicaciones de la diabetes. No obstante, los tratamientos actuales hacen poco para prevenirlas. Importantes esfuerzos de investigación en varias partes del mundo están dirigidos actualmente a la búsqueda fármacos que eviten la acumulación de AGEs, y así retardar la evolución de las complicaciones de la diabetes (Abbas et al., 2015; Jahan y Choudhary 2015; Kumagai et al., 2015; Perez y Martinez 2015; Shin et al., 2015).



**Fig. 1.** Esquema de reacción de la formación de AGEs

*Piper auritum*, llamada comúnmente acuyo, tlanepa, hierba santa, Santamaría de anís, anisillo o tlanepaquequite, es una planta aromática medicinal. Es una especie comestible endémica de México a Colombia. Las hojas se emplean en la medicina tradicional de México como hipoglucemiante (Andrade-Cetto y Heinrich 2005). El extracto hidroalcohólico obtenido de las hojas de *P. auritum* inhibe notablemente (*in vitro*) la glicación de albumina de suero bovino, BSA por sus siglas en inglés (Pérez-Gutiérrez et al., 2010). Además, el extracto hexánico de *P. auritum* inhibe tanto la glicación de BSA como la glicación de lípidos de baja densidad, LDL por sus siglas en inglés (Pérez-Gutiérrez et al., 2012). El extracto hexánico de la planta aplicado por vía oral (por 28 días) a ratas

diabéticas, disminuyó la hemoglobina glicosilada (36%), la formación de AGEs y eleva los niveles de insulina (Neira et al., 2014). Por lo tanto, *P. auritum* parece ser una fuente potencial de compuestos que podrían usarse para inhibir el desarrollo de las disfunciones diabéticas.

Las plantas tropicales y subtropicales en particular, son ricas en su diversidad de microorganismos endofitos (Banerjee 2011). Los endofitos aislados de distintas plantas, han sido reconocidos como fuentes de novedosos compuestos con diversas actividades biológicas tales como, antibiótica, anticancerígena y antioxidante entre otras (Aravind et al., 2009; Kusari et al. 2012; Strobel et al., 2004). En algunas ocasiones, los microorganismos endofitos son capaces

de sintetizar metabolitos secundarios similares o análogos a los producidos por sus respectivas plantas huésped. Así, algunos compuestos que anteriormente se consideraban metabolitos secundarios solo de plantas, hoy en día se sabe que son producidos también por microorganismos endofitos (Kusari et al., 2012). Sabiendo que *P. auritum* es capaz de sintetizar compuestos que inhiben la formación de AGEs, de manera análoga a la planta, sus endofitos podrían ser una fuente potencial de compuestos para inhibir la glicación de proteínas. Las bacterias son microorganismos fácilmente manipulables que crecen rápido, pueden cultivarse en medios simples a gran escala y de manera económica, consistente y reproducible, lo que los hace ideales para la producción comercial de moléculas biológicamente activas. Un total de 75 morfotipos bacterianos se aislaron a partir de hojas, flores y tallos de *P. auritum* recolectados en 2 sitios de la Sierra Madre Norte de Oaxaca. Los extractos de cultivo de 23 de ellos (obtenidos por extracción con acetato de etilo) fueron estudiados de manera preliminar para determinar su capacidad para inhibir la formación de AGEs (Neira González, 2015). Entre 9 extractos que inhibieron la formación de AGEs *in vitro* (en el rango de 75 a 95%), se seleccionó el extracto de *Sphingomonas* sp. 3a-1 por su notable actividad (94.6%), para purificar las fracciones responsables de la actividad inhibitoria. El objetivo de este trabajo fue purificar parcialmente el compuesto activo del extracto de *Sphingomonas* sp. 3a-1, mediante varias

técnicas de cromatografía, y hacer una caracterización inicial de las fracciones que inhiben la formación de AGEs. Se presenta el aislamiento 3 compuestos que inhiben la formación de AGEs. Este es el primer reporte de la purificación de moléculas que inhiben la formación de AGEs a partir de bacterias endofitas de *P. auritum*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

*Sphingomonas* sp. 3a-1, se aisló a partir de hojas sanas de *P. auritum* que fueron recolectadas en el sitio conocido como "antiguo Trapiche" cerca de Chiquihuitlán de Benito Juárez, distrito de Cuicatlán dentro del rango de la Sierra Madre del Norte, en el estado de Oaxaca. La colecta se realizó a 704 msnm entre las coordenadas 17 ° 89 'N y 96 1.7" ° 98' W 7.8". Un ejemplar fue depositado en el Herbario Nacional de la Universidad Nacional Autónoma de México con el código de colección (Nº 1340281). El aislamiento, conservación y la identificación taxonómica (derivada del gen 16S rDNA) fueron descritas por Neira González, 2015. La bacteria fue crecida en caldo nutritivo (marca Difco) y se conserva en nuestro laboratorio, en proceso de registro en la Colección Nacional de Cultivos Microbianos de el CINVESTAV, México, en; a). en 15% (v/v) de glicerol a -70 °C, y b). liofilizada en leche deslactosada "light". La bacteria tiene una coloración amarilla, una textura de bordes gruesos brillantes y una consistencia mucosa en agar nutritivo y BHI. Una secuencia parcial del gen 16S rDNA de la bacteria tiene un 98% de

similitud con la de *Sphingomonas mucosissima*.

## *Condiciones de cultivo*

*Sphingomonas* sp. 3a-1 se cultivó a 22 °C y 120 RPM (48 h), en matraces Erlenmeyer (250 ml) que contenían cada uno 100 ml de medio S-7 y 1 mL de inóculo. La incubación se realizó en una incubadora refrigerada modelo Innova 4330 (New Brunswick Scientific Co., Inc. NJ, USA). El medio S7 contiene por litro (g/l); glucosa 1, fructosa 3, sacarosa 6, extracto de levadura 0.5, peptona de soya 1, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.0036, solución amortiguadora de fosfatos 1 M (pH 6.8), ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.0025, MnCl<sub>2</sub> H<sub>2</sub>O 0.005, FeCl<sub>3</sub> 4H<sub>2</sub>O 0.002, CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 0.002, Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O 0.0065, acetato de sodio 1, benzoato sódico 0.1 y fenilalanina 0.005. El medio de cultivo fue esterilizado por calor a 121°C durante 15 min previo a su inoculación con la bacteria.

## *Obtención del extracto crudo*

La extracción de los metabolitos del caldo de cultivo completo (28 L) se realizó mediante particiones líquido/líquido con acetato de etilo (EtOAc). Se extrajo tres veces con EtOAc (2:1 v/v en cada caso). El extracto crudo de EtOAc se separó de la fase acuosa y se concentró (a 37 °C, 240 mbar) en un Rotavapor Büchi R-200/20 hasta que presentó una consistencia semisólida, color café oscuro y olor característico. El extracto concentrado se colocó en un vial ámbar y el disolvente remanente se evaporó hasta sequedad en atmósfera de nitrógeno para obtener 3.6 g de

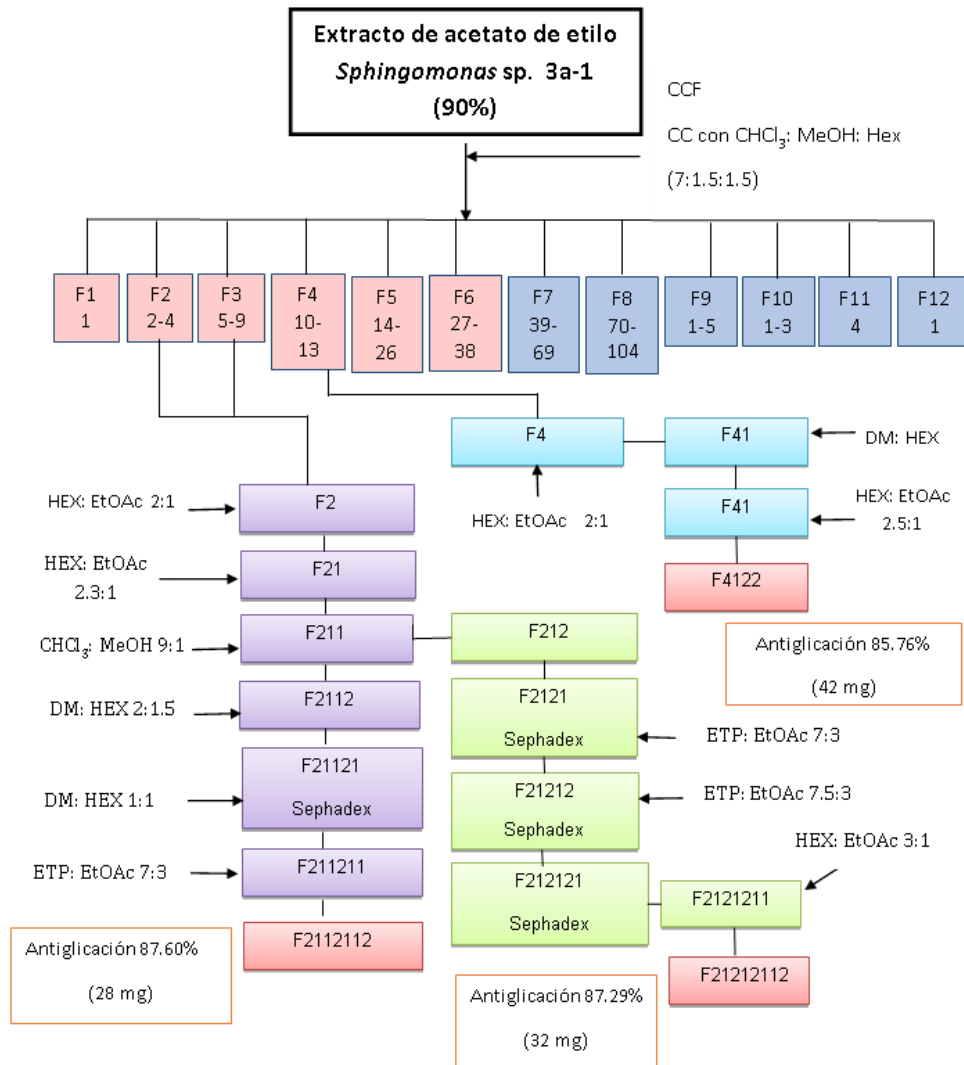
extracto crudo seco. El vial una vez cerrado y sellado se guardó en refrigeración a 4-7 °C hasta su análisis.

## *Purificación del extracto de cultivo de Sphingomonas sp. 3a-1*

El extracto crudo se analizó mediante Cromatografía en Capa Fina (CCF) usando varias mezclas de disolventes, la mejor separación se obtuvo con la mezcla CHCl<sub>3</sub>: MeOH: Hex 7:1.5:1.5. Entonces, una primera purificación del extracto se llevó a cabo mediante cromatografía en columna (CC1), eluyendo consecutivamente con CHCl<sub>3</sub>: MeOH: Hex 7:1.5:1.5, seguida de Me<sub>2</sub>CO, luego con MeOH y finalmente con MeOH: H<sub>2</sub>O. Se usó una relación de extracto:sílica gel (1:20 g/g). En la primera purificación (CC1) se recolectaron en total 117 fracciones, las cuales se analizaron mediante CCF (con el mismo eluyente de la CC) para identificar las fracciones con perfil cromatográfico similar y agruparlas en 12 nuevas fracciones a las que denominamos F1 a F12. La purificación se continuó siguiendo el esquema mostrado en la figura 2. Las fracciones de cada etapa de la purificación que inhibieron la formación de AGEs, se continuaron purificando siguiendo un procedimiento similar al descrito para la primera purificación.

## *Inhibición de la formación de AGEs in vitro*

La inhibición de la formación de AGEs se evaluó mediante el método albúmina sérica bovina (BSA)-glucosa (Brownlee et al., 1986).



**Fig. 2.** Estrategia de purificación del extracto de cultivo de *Sphingomonas* sp. 3a-1 mediante cromatografía.

Brevemente, las reacciones se llevaron a cabo por triplicado a 37°C por 15 días, en un volumen de 5 ml que contenían; 1 mL de BSA (10 mg/mL) en tampón de fosfatos 0.1 M (PBS, pH de 7.4); 1 ml de los posibles inhibidores (50 mg de extracto crudo o 0.6 mg de las fracciones semi-purificadas); 1 ml de glucosa (500 mM en agua destilada), 100 µL de azida sódica al 0.02% y PBS hasta 5 mL. Como control positivo se empleó

aminoguanidina (10 mM equivalente a 0.6 mg/ml). La fluorescencia de los AGEs formados se evaluó en un fluorómetro (modelo Fluoromax 3X, Jobin-Yvon/Horiba, E. Setauket, New York, USA) (excitación 370 nm, emisión 440 nm). La inhibición de la formación de AGEs se calculó como sigue:

$$\% \text{ de inhibición} = \left[ \frac{Ab-As}{Ab} \right] \times 100$$



donde As es la fluorescencia de la mezcla de reacción con la muestra problema, y Ab la fluorescencia de la mezcla de reacción sin muestra problema (control blanco).

## *Espectroscopía de masas*

Los espectros de masas (HRESI-MS) de las fracciones puras se obtuvieron usando un espectrómetro de masas (LCMSD TOF 1100 series Agilent Technologies, Santa Clara, California).

## RESULTADOS

Se realizaron 2 cultivos de *Sphingomonas* sp. 3a-1 para obtener un total de 28 L de cultivo (Tabla 1), se prepararon los extractos de cada cultivo (extracción con EtOAc) y se analizó la capacidad de cada extracto para inhibir la formación de AGEs. Los extractos obtenidos de los dos cultivos, inhibieron la formación de AGEs, aun cuando el rendimiento de los extractos varió apreciablemente. Adicionalmente, la CCF de los extractos de acetato de etilo mostró perfiles semejantes en los dos casos. Por ello, los dos extractos (en total 3.6 g) fueron mezclados y el extracto resultante total (EA)

**Tabla 1.** Actividad antiglicación y rendimientos de dos extractos crudos (secos) obtenidos de cultivos de *Sphingomonas* sp. 3a-1.

N.º de cultivo	Volumen de cultivo (L)	Peso del extracto (g)	Inhibición de la formación de AGEs (%)	% de rendimiento
1	15	2.5	85.04	0.37
2	13	1.1	85.68	0.14

fue purificado por CC, para obtener finalmente 3 fracciones purificadas (A, B y C) que inhiben la formación de AGEs. La purificación se llevó a cabo como se muestra en la figura 2.

Se utilizaron varias etapas de purificación por cromatografía en columna (CC), cada una seguida de análisis de actividad anti-AGEs a las fracciones obtenidas en cada etapa.

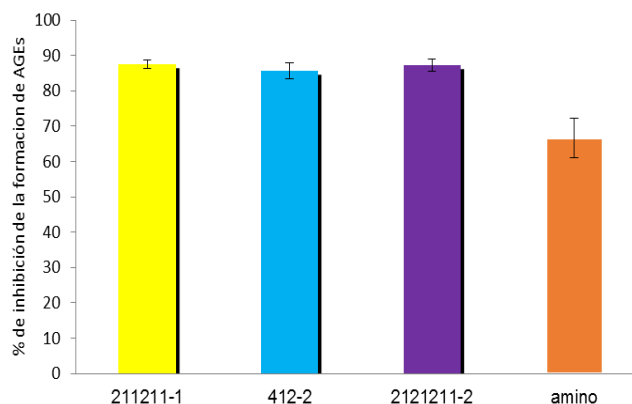
CC1. A partir del fraccionamiento inicial del extracto crudo se obtuvieron 12 fracciones, a las cuales se les realizó actividad anti-AGEs. Las fracciones 2, 3 y 4 inhibieron la formación de AGEs. Considerando que el perfil en CCF de las fracciones 2 (101 mg) y 3 (197 mg) fue semejante, y que ambas inhibieron la formación de AGEs (92.5 y 91.9% respectivamente), éstas se mezclaron y se renombró para conformar la fracción F2 (298 mg). A continuación se describe la purificación por CC de la fracción 2, y más adelante la purificación de la fracción 4 (164 mg), que inhibió la formación de AGEs en 93.4%.

La fracción F2, se purificó en CC (sílica gel) con una mezcla Hex: ETOAc 2:1. Se obtuvieron 35 fracciones (3mL c/u), que se agruparon en 4 fracciones (F21, F22, F23 y F24) por su perfil en CCF. La fracción más activa F21, se separó por CC (sílica gel) con una mezcla Hex: ETOAc (2.3:1) y se obtuvieron 5 fracciones, dos de ellas presentaron actividad (F211 y F212). La F211 se fraccionó por CC (sílica gel) con una mezcla CHCl<sub>3</sub>: MeOH (9:1) para obtener 3 fracciones. La fracción activa F2112, se fraccionó por CC (sílica gel) con DM:Hex (2:1.5) y se obtuvieron 3 fracciones. La

fracción activa F21121, se fraccionó en una columna de Sephadex LH-20, utilizando DM:Hex (1:1) y en seguida MeOH para obtener 4 fracciones. La F211211 (activa), se purificó por CC (sílica gel), eluyendo con ETP: ETOAc (7:3) y en seguida con MeOH y se obtuvieron 3 fracciones. La fracción F2112112 se analizó en CCF con varias mezclas de solventes, en todos los casos se observó la presencia de una sola mancha. La fracción **F2112112** (28 mg) es aceitosa, de color amarillo, inhibe la formación de AGEs en 87.6% (a 1 mg/mL). A esta fracción se le denominó **fracción A**.

La fracción activa F212, se fraccionó por CC (sílica gel) usando Hex: Me<sub>2</sub>CO (2:1) y se obtuvieron 5 fracciones. La fracción F2121(activa), se fraccionó por CC (Sephadex LH-20) usando ETP: ETOAc (7:3), se obtuvieron 3 fracciones. La F21212 se continuó purificando, en CC (Sephadex LH-20) usando ETP: ETOAc (7.5:3), seguido con MeOH, se obtuvieron 3 fracciones. La F212121 se sometió a CC (Sephadex LH-20) con el sistema de elución ETP: ETOAc (7.5:3), seguido con MeOH se obtuvo 2 fracciones. La fracción F2121211 (activa) se sometió a CC (Sephadex LH-20) usando Hex: ETOAc (3:1), seguido con MeOH, y se obtuvieron 2 fracciones. La fracción **F21212112** al analizarse mediante CCF con diferentes sistemas de eluyentes, mostró en todos los casos una sola mancha. La fracción **F21212112** se renombró **fracción B**, la cual inhibió la formación de AGEs en 87%.

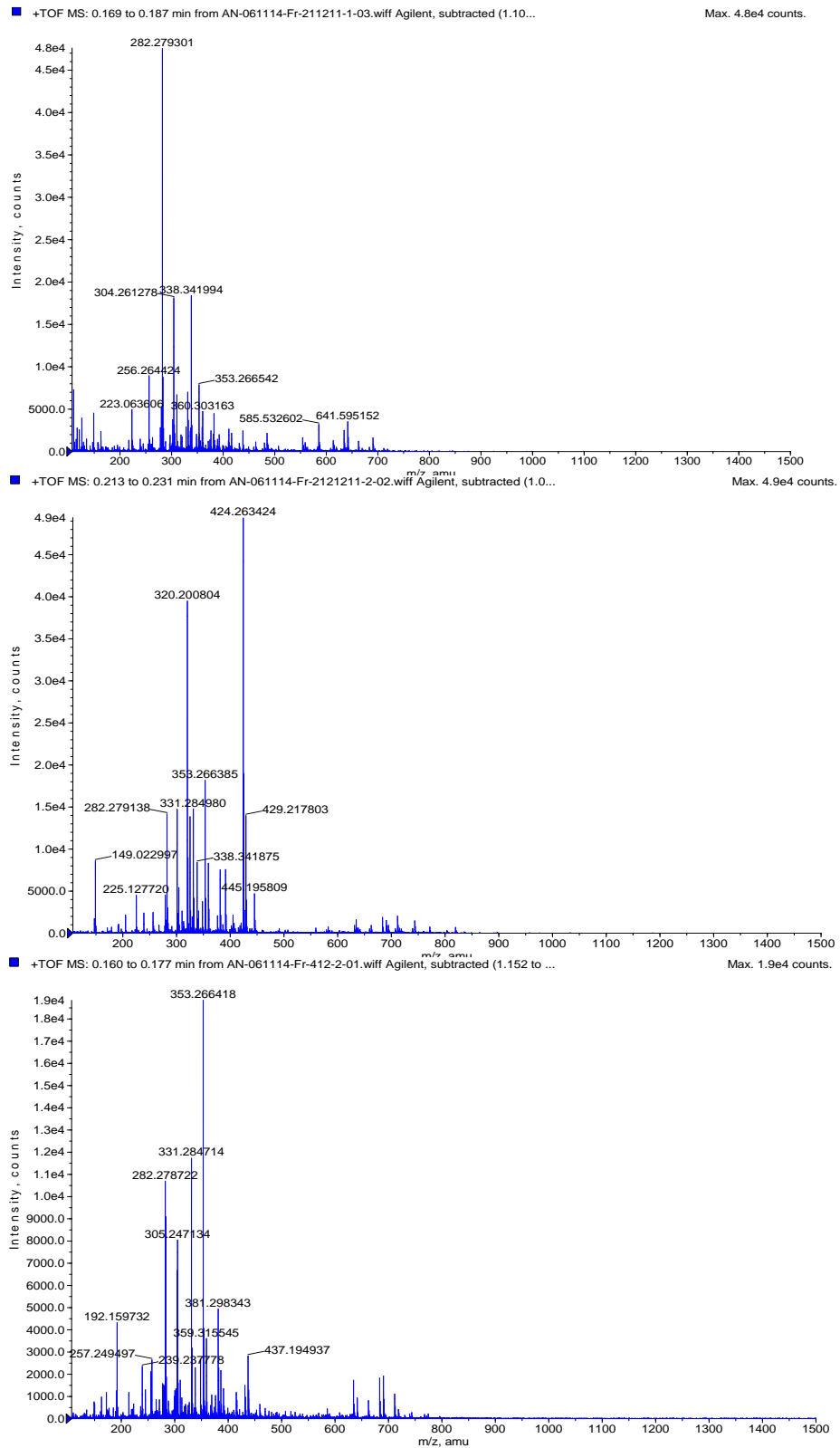
La fracción F4 (164mg) se fraccionó mediante CC (sílica gel) empleando Hex: ETOAc (2:1) y se obtuvieron 3 fracciones. La activa, F41, se purificó en CC (sílica gel), utilizando DM: Hex (2:1.5), se obtuvieron nuevas 3 fracciones. La F412 se continuó purificando en CC (Sephadex LH-20), eluyendo con Hex: ACE (2.5:1), seguido de una elución final con MeOH y se obtuvieron 2 fracciones. Análisis por CCF a la fracción activa, **F4122**, con diferentes sistemas eluyentes, mostró una mancha única, que inhibió la formación de AGEs en 86 %, de esta forma se obtuvo la **fracción C**.



**Fig. 3.** Inhibición de la formación de AGEs por las fracciones **A** (F2112112), **C** (F4122), **B** (F21212112) y aminoguanidina.

La figura 3 muestra el efecto de las fracciones aisladas del extracto de cultivo de *Sphingomonas* sp. 3a-1 en la formación de los AGEs, y comparadas con el control positivo de aminoguanidina (67%). Esto nos indica que *Sphingomonas* sp. 3a-1 produce compuestos que inhiben la formación de AGEs en mayor medida que la aminoguanidina.





**Fig. 4.** Espectros de masas de las fracciones A (F2112112), B (F21212112) y C (F4122).

Las fracciones A, B, C, se analizaron mediante HR-ESIMS y se obtuvieron los espectros de masas (Figura 4). Cada ión molecular obtenido se comparó con la base de datos (calculadora) del equipo. La fracción A presentó un ión molecular de 282.279301 m/z, en comparación con el valor calculado 282.979141 m/z para la fórmula molecular  $C_{18}H_{36}NO$ , i.e., 0.565013 ppm de error. La fracción B presentó un ión molecular de 424.263424 m/z, comparado con el valor calculado 424.263491 m/z para la fórmula molecular  $C_{30}H_{34}NO$ , i.e., -0.135359 ppm de error. La fracción C presentó un ión molecular de 353.266418 m/z, comparado con el valor calculado 353.266231 m/z para la fórmula molecular  $C_{19}H_{38}O_4Na$ , i.e., 0.528778 ppm de error.

## CONCLUSIONES

Extractos de acetato de etilo de cultivos de la bacteria endofita *Sphingomonas* sp. 3a-1, contienen compuestos que inhiben la formación de AGEs. Mediante cromatografía en columna (silica gel) y Sephadex se obtuvieron tres fracciones A, B y C que inhiben la formación de AGEs en un grado superior a la aminoguanidina. Será necesario analizar, mediante resonancia magnética nuclear RMN<sup>13</sup>C y <sup>1</sup>H e infrarrojo, cada una de las fracciones aisladas para identificar los compuestos A, B y C.

## REFERENCIAS

- Abbas G, Al-Harrasi AS, Hussain H, Hussain J, Rashid R, Choudhary MI (2015). Antiglycation therapy: Discovery of promising antiglycation agents for the management of diabetic complications. *Pharm Biol.* 8:1-9.
- Andrade-Cetto A, Heinrich M (2005). Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *J Ethnopharmacol.* 99: 325 -348.
- Aravind R, Kumar A, Eapen SJ, Ramana KV (2009). Endophytic bacterial flora in root and stem tissues of black pepper (*Piper nigrum* L.) genotype: isolation, identification and evaluation against *Phytophthora capsici*. *Lett. Appl. Microbiol.* 48: 58-64.
- Banerjee D (2011). Endophytic fungal diversity in tropical and subtropical plants. *Res. J. Microbiol.* 6: 54-62.
- Base de datos estructuras químicas. Consultada El 5 de febrero del 2015 en: <http://www.chemspider.com/>
- Brownlee M, Cerami A (1981). The Biochemistry of the complications of diabetes mellitus. *Annu. Rev. Biochem.* 50: 335-432.
- Brownlee M, Vlassara H, Kooney A, Ulrich P, Cerami A (1986). Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. *Science.* 232 (4758): 1629-1632.
- Cohen MP, Ziyadeh FN (1996). Role of Amadori-modified nonenzymatically glycosylated serum proteins in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 7:183-190.

# Artículos

- DCCT (1993) The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long term complications in insulin dependent diabetes mellitus. The diabetes control and complications trial research group. N. Engl. J. Med. 329(14): 977-986.
- Giacco F, Brownlee M (2010). Oxidative stress and diabetic complications. Circ.Res. 107(9):1058-1070.
- Goh S, Cooper ME (2008). The role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes. J. Clin. Endocrinol. Metab. 93: 1143-1152.
- Jahan H, Choudhary M (2015). Glycation, carbonyl stress and AGEs inhibitors: a patent review. Expert. Opin. Ther. Pat. 21:1-18.
- Kumagai Y, Nakatani S, Onodera H, Nagatomo A, Nishida N, Matsuura Y, Kobata K, Wada M (2015). Anti-glycation effects of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit extract and its components in vivo and in vitro. J. Agric. Food Chem.
- Kusari S, Hertweck C, Spiteller M (2012). Chemical ecology of endophytic fungi: Origins of secondary metabolites. Chem. Biol. 19: 792-798.
- Neira González, AD, Perez R M, Flores Cotera LB (2014). Antidiabetic activity of *Piper auritum* leaves in streptozotocin-induced diabetic rat, beneficial effect on advanced glycation endproduct. Chin. J. Integr. Med. DOI: 10.1007/s11655-014-1753-2 Online.
- Neira González AD (2015). Actividad hipoglucemiante, antioxidante, antiglicación de hojas y endofitos de *Piper auritum*. Tesis Doctorado en Biotecnología y Bioingeniería. Cinvestav-IPN, México, D.F.
- Park L, Raman K, GLee KJ, Lu Y, Ferran LJ, Chow WS, Stern D, Schmidt AM (2012). Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation end products. Nat. Med. 4: 1025-1031.
- Pérez-Gutierrez RM, Flores-Cotera LB, Neira-Gonzalez AM (2012). Evaluation of the antioxidant and anti-glycation effects of the hexane extract from *Piper auritum* leaves in vitro and beneficial activity on oxidative stress and advanced glycation end-product-mediated renal injury in streptozotocin-treated diabetic rats. Molecules 17: 11897-11919.
- Pérez-Gutierrez R, Lugardo S, Cordova I, Neira González A (2010). Anti-glycation effect of spices and chilies uses in traditional mexican cuisine. J. Nat. Prod. 3: 95 -102.
- Perez Gutierrez RM, Martinez DJ (2014). Beneficial effect of *Azadirachta indica* on advanced glycation end-product in streptozotocin-diabetic rat. Pharm Biol. 52(11):1435-44.
- Setter SM, Campbell RK, Cahoon CJ (2003). Biochemical pathways for microvascular complications of diabetes mellitus. Ann. Pharmacother. 37: 1858-1866.

# Artículos

- Shin S, Lee JA, Kim M, Kum H, Jung E, Park D. (2015). Anti-glycation activities of phenolic constituents from *Silybum marianum* (Milk Thistle) flower in vitro and on human explants. *Molecules*. 20(3):3549-64.
- Srivastava SK, Yadav UC, Reddy AB, Saxena A, Tammali R, Shoeb M, Ansari NH, Bhatnagar A, Petrash MJ, Srivastava S, Ramana KV (2011). Aldose reductase inhibition suppresses oxidative stress-induced inflammatory disorders. *Chem Biol Interact*. 191: 330-338.
- Strobel, G, Daisy, B, Castillo U, Harper J 2004. Natural products from endophytic microorganisms. *J Nat. Prod*. 67: 257-268.
- Vitek MP, Bhattacharya K, Glendening JM, Stopa E, Vlassara H, Bucala R, Manogue K, Cerami A (1994). Advanced glycation end products contribute to amyloidosis in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91: 4766-4770.
- Vlassara H, Palace MR (2002). Diabetes and advanced glycation end products. *J. Intern. Med*. 251(2): 87-101.
- Yan SF, Ramasamy R, Naka Y, Schmidt AM (2003). Glycation, inflammation, and RAGE: A scaffold for the macrovascular complications of diabetes and beyond. *Circ. Res*. 93: 1159-1169.