



Universidad de Guanajuato
Posgrado Institucional en Química
Instituto de Investigaciones Científicas

“Diseño y aplicación de procedimientos analíticos para la determinación de productos de glicosilación avanzada (*AGEs*) en muestras biológicas”.

T e s i s

que para obtener el título de
Maestro en Ciencias (Química)

Presenta:

Q. José Guadalupe Juárez Eguía

Guanajuato, Gto.

Agosto de 2006

Jurado Designado

Dr. Kazimierz Wróbel Zasada
Presidente

Dra. Katarzyna Wróbel Kaczmarczyk
Secretario

Dra. Ma. Eugenia Garay Sevilla
Vocal

Dra. Leticia López Martínez
Suplente

Índice General

	Página
Índice	i
Lista de Abreviaturas	iii
Índice de Tablas	v
Índice de Figuras	vi
Capitulo 1 Introducción	1
1.1 Introducción	2
1.1 Diabetes mellitus	2
1.2 Formación de productos finales de glucosilación avanzada (AGEs)	3
1.3 AGEs exógenos y endógenos	6
1.4 Principales AGEs caracterizados y su importancia.	9
1.5 Revisión bibliográfica de los procedimientos utilizados en la determinación de los AGEs	12
1.6 Originalidad y justificación del presente trabajo	19
Capitulo 2 Objetivos	21
2.1 Objetivo general	22
2.2 Objetivos específicos	22
Capitulo 3 Parte Experimental	23
3.1 Instrumentos	24
3.2 Materiales	24
3.3 Reactivos y Disoluciones	25
3.4 Columnas Analíticas	27

Capítulo 4 Resultados y discusión	
4. Resultados y discusión	29
4.1 Síntesis y caracterización cromatográfica de N-ε (carboximetil)-lisina y de furosina	30
4.2 Estudio de la derivatización pre-columna en la separación de amino ácidos por cromatografía de líquidos de alta resolución en fase inversa.	35
4.3 Aplicación del procedimiento cromatográfico desarrollado en la evaluación de grado de conversión de lisina en N-ε (carboximetil)- lisina en albúmina.	39
4.4 Empleo de dos agentes derivatizantes (<i>OPA</i> y <i>AQC</i>) en el análisis de albúmina modificada (<i>CML-BSA</i>) y sin modificar (<i>BSA</i>)	44
4.5 Análisis de grado de conversión de lisina en N-ε (carboximetil)-lisina en muestras de alimentos.	47
Capítulo 5 Conclusiones	
Conclusiones	55
Referencias	59

Tabla de abreviaturas

3-DG	3-Desoxiglucosona.
AGE	Productos de Glicosilación Avanzada.
AMQ	6-Amino Quinolina.
AQC	Carbamato de 6-Aminoquinolil-N-Succinidimilo.
AR	Azúcares reductores.
BME	2-Mercaptoetanol.
BSA-AGEs	Producto de glucosilación de albúmina
BSf	Base de Schiff.
CBZ ó Z	Grupo protector benziloxycarbonilo
CEL	N ϵ carboxietil Lisina.
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.
CLAR-FR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución en Fase Reversa.
CML	N ϵ carboximetil Lisina.
Dabsyl-Cl	Cloruro de 4-dimetilaminoazobenzenosulfonilo
DSC	Carbonato de Di N-succinimidilo.
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FL	Fructosil-lisina
FMOC-Cl	Cloroformato de 9-fluorenilmetilo
Fur	Furosina.
GO	Glioxal.
MeCN	Acetonitrilo.
MeOH	Metanol.
MGO	Metilglioxal.
OPA	Orto-ftaldehido.
PAm	Producto Amadori.
RM	Reacción de Maillard.
t-Boc	Grupo protector grupo t-butiloxycarbonilo
t-Boc-Lys	Lisina protegida en el nitrógeno α con un grupo t-Boc.
UV	Ultravioleta
Z-Lys-OH	Lisina protegida en el nitrógeno α con un grupo CBZ ó Z.

Índice de Tablas

Tablas	Página
1. Programa de gradiente en la separación de los derivados de 16 aminoácidos con <i>AQC</i> .	36
2. Programa de gradiente en la separación de derivados de aminas primarias con <i>OPA</i> .	42
3. Resultados semi-cuantitativos de la conversión de la lisina en <i>CML</i> en muestras de alimentos	53

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Proceso reversible de una unidad de glucosa (forma abierta) a sus dos posibles anómeros cíclicos (formas cerradas).	4
2. Esquema de formación de <i>AGEs</i> , mediante la reacción de Maillard.	5
3. (a) Estructuras principales de los agentes glicantes; Glioxal (<i>GO</i>), Metil glioxal (<i>MGO</i>) y 3-Desoxiglucosona (<i>3-DG</i>). (b) Productos de la reacción de <i>GO</i> , <i>MGO</i> y <i>3-DG</i> .	6
4. Esquema de glucosilación de proteínas a consecuencia de la hiperglicemia crónica.	8
5. Esquema global de la formación de <i>AGEs</i> .	9
6. <i>Productos de Glicosilación Avanzada: CML, CEL, Fur, pentosidina y arginopirimidina.</i>	10
7. Posibles rutas de formación de <i>CML</i>	11
8. (a) Cromatograma de una mezcla de estándares de amino ácidos, (b) espectro de masas y el propuesto padrón de fragmentación de <i>CML</i> .	15
9. Cromatograma de la orina fortificada con <i>CML</i> .	16
10. Separación cromatográfica de aminoácidos en una formulación láctea para bebés.	17
11. Esquema de la reacción de derivatización de aminas primarias con orto-ftalaldehído (<i>OPA</i>).	19

12. Esquema de la reacción de derivatización de aminas primarias y secundarias con AQC.	19
13. Esquema de las condiciones propuestas con el fin de mejorar el rendimiento de la síntesis de CML.	31
14. Cromatografía en capa fina, de reacciones propuestas para mejorar rendimiento de CML	31
15. Esquema de la síntesis del reactivo derivatizante AQC	33
16. Típicos cromatogramas de lisina protegida y de los AGEs sintetizados.	34
17. Típicos cromatogramas de los derivados de dos mezclas de amino ácidos con AQC.	37
18. Aumento de las dos regiones de cromatogramas presentados en la Figura 17	38
19. Cromatograma de hidrolizado de BSA-CML y de BSA, con AQC como agente derivatizante.	40
20. Aumento de las dos regiones de cromatogramas presentados en la Figura 19	41
21. Cromatograma de hidrolizado de BSA-CML y de BSA, con OPA como agente derivatizante.	43
22. Aumento de las dos regiones de cromatogramas presentados en la Figura 21	44
23. Cromatograma de hidrolizado de BSA-CML y de BSA, realizando una doble derivatización con OPA/AQC.	46
24. Aumento de las dos regiones de cromatogramas presentados en la Figura 23.	46

25. Cromatograma de extracto de comida, con <i>OPA</i> como agente derivatizante	49
26. Cromatograma de hidrolizado de muestra de comida utilizando como agente derivatizante <i>OPA</i> .	50
27. Cromatograma de hidrolizado de muestra de comida utilizando como agente derivatizante <i>AQC</i> .	51

Capítulo 1
Introducción

1. Introducción

1.1. Diabetes mellitus

La diabetes mellitus es una enfermedad crónico-degenerativa. Se presenta cuando el organismo no produce suficiente insulina o, esta no actúa debidamente, provocando deficiencias en el proceso de asimilación de la glucosa, aumentando su concentración en el torrente sanguíneo y hay, un desarrollo paulatino de complicaciones en todo el organismo. En México, la diabetes afecta al 8 % de la población y ha sido reportada como la cuarta más importante causa de mortalidad en nuestro país así como la primera causa de los estados terminales de insuficiencia renal, ceguera adquirida y de las amputaciones no relacionadas con accidentes.

La diabetes ocurre principalmente en dos formas: *tipo 1* y *tipo 2*. La diabetes *tipo 1* es caracterizada por una destrucción auto inmune de células pancreáticas tipo beta que, típicamente lleva a déficit absoluto de insulina. Ocurre principalmente en niños o adultos jóvenes, pero puede presentarse a cualquier edad. Este tipo representa entre el 5 y 10% de personas enfermas. El *tipo 2* se caracteriza por resistencia insulínica, acompañado por un déficit relativo de insulina y representa el 90-95% de los casos de diabetes mellitus.

A largo plazo, el exceso de glucosa en el organismo provoca una serie de cambios patológicos los cuales son responsables de las principales complicaciones en diabetes:

- Enfermedades cardiovasculares [1-4]
- Nefropatía [5-10]
- Retinopatía [9,11,12]
- Neuropatía [13,14]

De ahí que, no solamente el diagnóstico de la enfermedad es importante sino también, el control de los pacientes con el fin de prevenir o retardar las complicaciones. Entre las pruebas de laboratorio realizadas en el control rutinario de los diabéticos se encuentran las pruebas de nivel sérico de glucosa,

actividad de insulina, nivel de colesterol y triglicéridos y nivel de hemoglobinas glucosiladas [15,16]. Sin embargo la información obtenida en estas pruebas no es suficiente para el control y pronóstico en los pacientes diabéticos. Por ejemplo, el nivel sérico de glucosa solamente permite evaluar la ingesta reciente, los niveles de colesterol y de triglicéridos pueden ser elevados en las personas no diabéticas, etc.

Los mecanismos responsables de las complicaciones en diabetes no se conocen con exactitud sin embargo, existe un consenso acerca de la importante contribución de los siguientes parámetros [9,17-20]:

- Acelerada glucosilación no enzimática con depósitos de productos finales de la glucosilación avanzada (*AGEs*)
- Aumento de estrés oxidativo
- Activación de isoformas de *proteína cinasa C*
- Activación de la vía de la *aldosa reductasa*.

Varios autores reportaron la correlación estadísticamente significativa entre los niveles de los *AGEs* en fluidos biológicos y en tejidos de los pacientes diabéticos con el desarrollo de complicaciones en estos pacientes [21-23]. Consecuentemente, ha sido reconocida la necesidad de contar con las herramientas analíticas que permitan la determinación de *AGEs* en muestras clínicas.

1.2. Formación de productos finales de glucosilación avanzada (*AGEs*)

Los azúcares reductores (*AR*) son aquellos que pueden ser oxidados por otras sustancias, por poseer en su estructura (forma abierta), a un grupo del tipo carbonilo (Figura 1). Los *AR*, en contacto con algunas biomoléculas provocan su glucosilación, tradicionalmente denominada como *reacción de Maillard (RM)* [1,2].

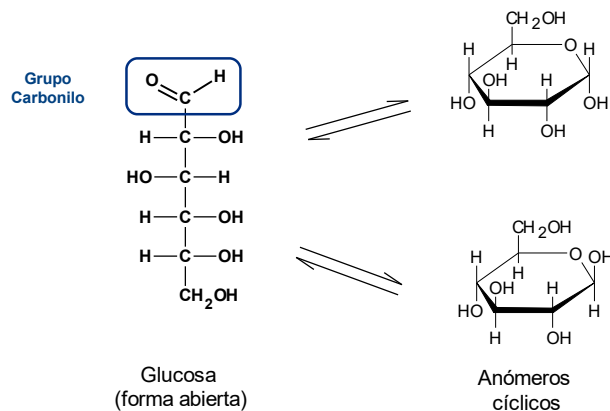


Figura 1. -Proceso reversible de una unidad de glucosa (forma abierta) a sus dos posibles anómeros cíclicos (formas cerradas).

La *RM* tiene carácter no enzimático y reversible, ocurre entre un *AR* (glucosa, fructuosa u otro) y grupos amino (esencialmente arginina y lisina) de biomoléculas como: proteínas, lípidos y ácidos nucleicos formando en primera instancia los compuestos del tipo *base de Schiff (BSf)* [3] (Figura 2). Posteriormente, con cinética más lenta ocurre la re-acomodación de las bases de Schiff en los llamados *Productos Amadori (PAm)*. En el curso de semanas a meses, estos compuestos intermedios pierden agua y se degradan hasta formar estables aductos covalentes como la Fructosil-lisina (*FL*) [9]. El proceso involucra entrecruzamiento de las proteínas con la formación de rígidas estructuras de color amarillo, algunas de ellas fluorescentes – productos finales de glucosilación avanzada (*AGEs* por sus siglas en ingles *Advanced Glycosylation End products*). La formación de los *AGEs* es un proceso irreversible, que afecta principalmente la estructura de proteínas de larga vida tales como colágeno, albúmina, lipoproteínas plasmáticas y hemoglobina [24]. Por otra parte, los *AGEs* pueden encontrarse también en proteínas de corta vida, en constituyentes lipídicos así como en ácidos nucleicos.

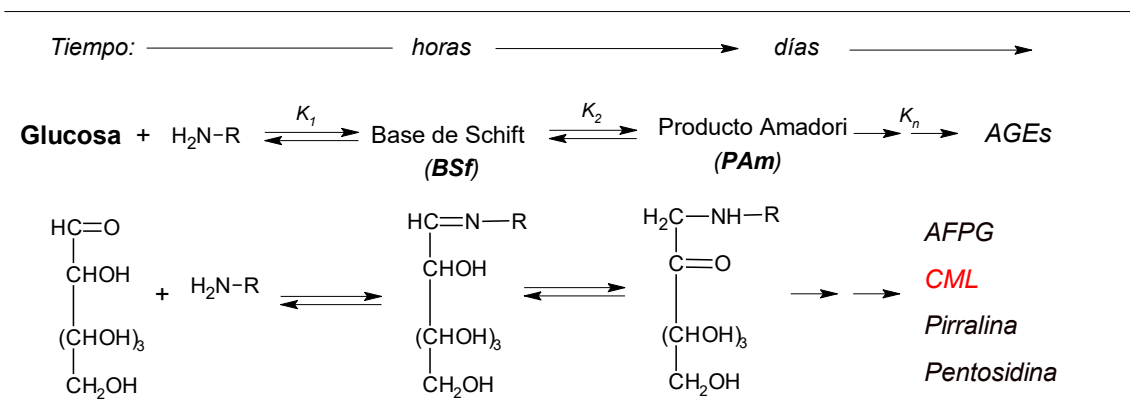


Figura 2. Esquema de formación de AGEs, mediante la reacción de Maillard. (R= proteína, péptido ó lípido), AFPG – glicoproteínas, CML – N-ε (carboximetil)-lisina.

En la formación de proteínas glucosiladas, intermediarios glicolíticos y peroxidación lipídica se suscita un mecanismo secundario que es la degradación de la glucosa (auto oxidación [5]), dando lugar a compuestos del tipo α-dicarbonilos ó oxoaldehídos como: glioxal (GO), metil glioxal (MGO) y la 3-desoxiglucosona (3-DG) [6-8]. A estos compuestos se les llama *agentes glicantes*. (Figura 3a). Los agentes glicantes actúan como propagadores en la transformación de productos Amadori en AGEs [9,10]. De este modo, la auto oxidación de la glucosa acelera aún más la glucosilación no enzimática de proteínas. Tal es el caso de las hidroimidazolonas que son productos con GO, MGO y 3-DG, dando lugar a GO-H1, MG-H1 y 3DG-H, los cuales a su vez son dímeros de los compuestos ya mencionados (Figura 3b).

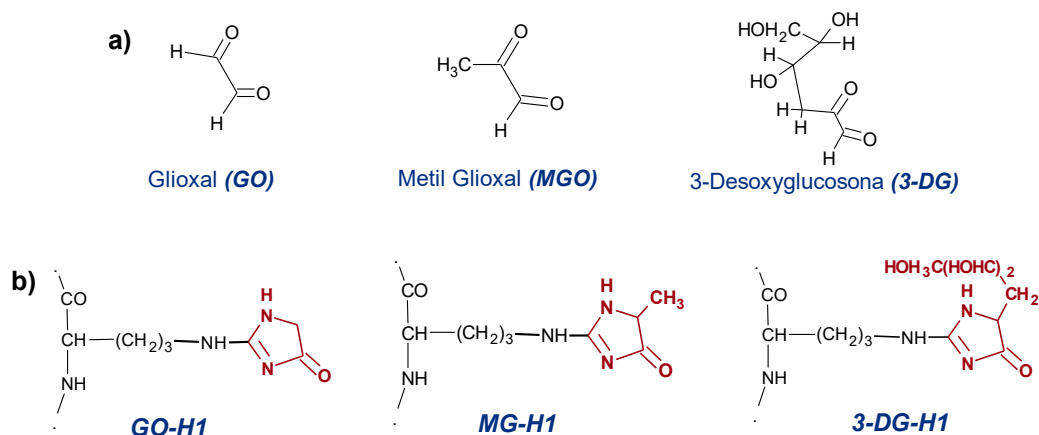


Figura 3. – (a) Estructuras principales de los *agentes glicantes*; *Glioxal (GO)*, *Metil glioxal (MGO)* y *3-Desoxiglucosona (3-DG)*. (b) Productos de la reacción de *GO*, *MGO* y *3-DG* con residuos de lisina y/o arginina (*GO-H1*, *MG-H1* y *3DG-H*).

1.3. AGEs exógenos y endógenos.

Los AGEs endógenos se forman en condiciones *in vivo*, es decir en los tejidos y fluidos corporales de un ser vivo, involucrando las biomoléculas antes mencionadas. Como ya fue señalado, la síntesis acelerada de AGEs endógenos y su depósito tisular es una de las principales causas de complicaciones en diabetes [9]. Los AGEs interfieren con la función normal de proteínas mediante alteración de su estructura y/o actividad biológica. Así, la glucosilación proteínica (Figura 4) afecta la estructura secundaria y terciaria de proteínas. La formación de puentes anormales entre cadenas peptídicas provoca cambios en la actividad biológica de proteínas. Sea el caso de la *Hemoglobina Glucosilada*, la cual es un producto Amadori entre la glucosa y la hemoglobina de la sangre [25,26]. Por otro lado, los AGEs actúan vía receptores específicos de los cuales *RAGE* es el más descrito. La interacción entre AGE y *RAGE* activa el factor nuclear *NF-κB*, responsable por estímulo de la transcripción de genes para citocinas y factores de crecimiento e inducción de la migración de macrófagos [27].

Los estudios recientes sugieren que, no solamente los AGEs endógenos sino también los AGEs provenientes de la comida y/o tabaco contribuyen en el progreso de la enfermedad [28]. Los AGEs exógenos pueden tener importantes propiedades biológicas e incluso genotóxicas cuando se ingieren [13]. Ha sido reportado que, aproximadamente 10 % de los AGEs ingeridos con la comida se absorben en el tracto digestivo y cerca de 60 % de esta cantidad es retenida en tejidos [28,29]. El nivel sérico de los AGEs refleja entonces el balance entre la formación de AGEs endógenos, ingesta de AGEs exógenos, equilibrio entre depósito / liberación de los AGEs en tejidos y su eliminación por vías urinarias [30].

En cuanto a los alimentos, aquellos ricos en carbohidratos, proteínas y grasa tienen altos niveles de AGEs. Por otro lado, el contenido de AGEs aumenta cuando la preparación de los alimentos involucra elevadas temperaturas y largos tiempos de cocción. En concreto, los productos con alto contenido de AGEs incluyen *la carne asada, embutidos, huevo, mantequilla, margarina, quesos, salsas, dulces de leche y algunas bebidas (coca-cola, café, cocoa)* [31-33]. Lógicamente, adición de azúcar durante la preparación del alimento provoca un aumento adicional de los AGEs [11,12]. En el caso de los dulces de leche, se ingiere caseína glucosilada [14]. Utilizando análisis inmunoenzimático se observó 200 veces mayor contenido de AGEs en clara de huevo cocinada con *fructosa* respecto a su contenido en clara cocinada sin azúcar [32]. Finalmente cabe señalar que, en alimentos cocidos adecuadamente, los AGEs proporcionan a la comida el olor aromático y agradable. Sin embargo, la cocción por tiempos demasiado prolongados resulta en formación de sabores desagradables, a menudo moléculas polimerizadas y otras como las melanoidinas que presentan bandas de absorción en la región ultravioleta (UV) y propiedades fluorescentes.

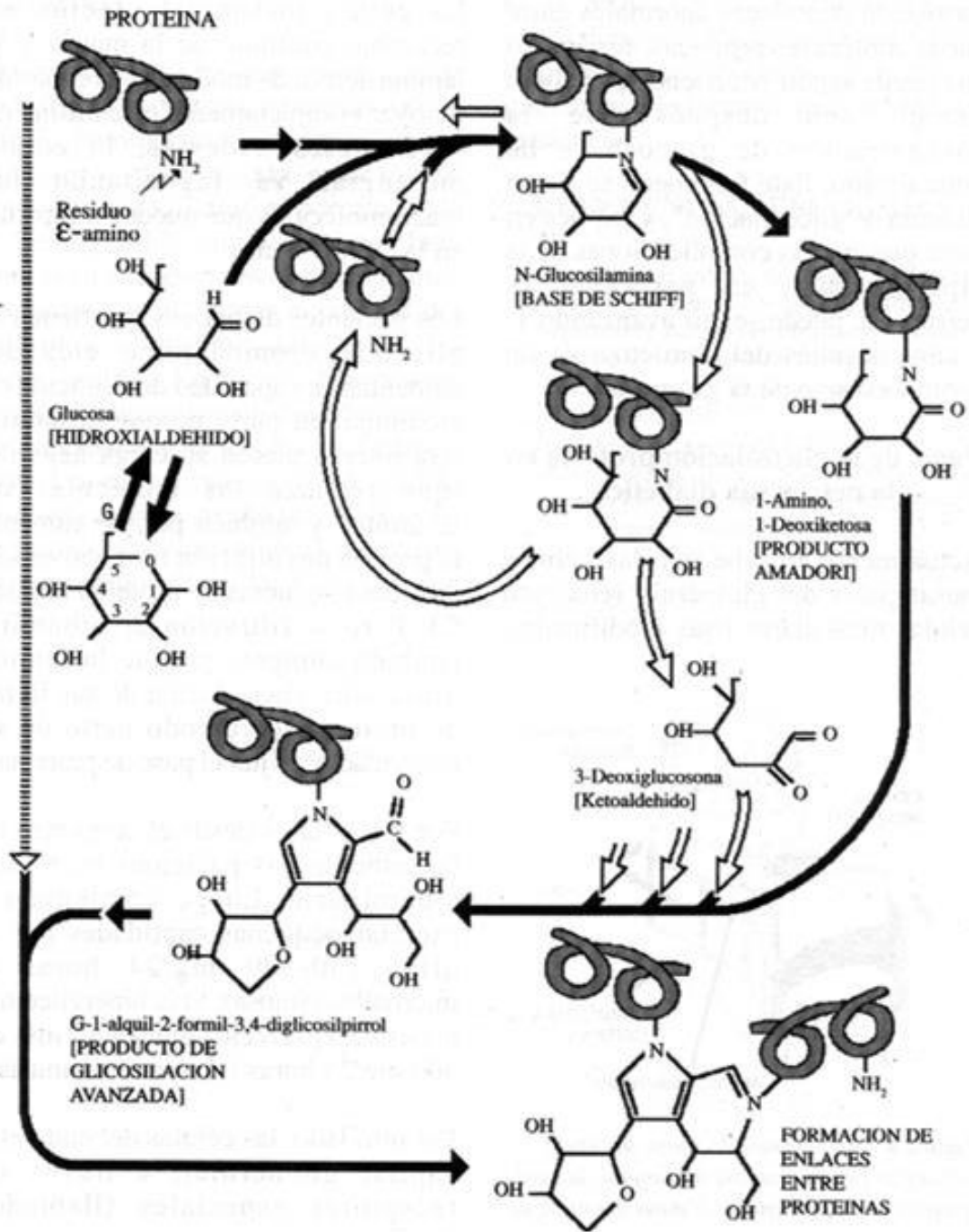


Figura 4.- Esquema de glucosilación de proteínas a consecuencia de la hiperglicemia crónica.

1.4. Principales AGEs caracterizados y su importancia

En la *Figura 5* se presentan esquemáticamente diferentes rutas que conducen a la formación de los AGEs. En primer lugar se puede observar que, los AGEs son un grupo complejo de diferentes compuestos, por lo que su caracterización estructural y cuantitativa es una tarea difícil. La ruta clásica (rearrreglo Amadori) involucra una etapa de oxidación, cuyos principales productos son N-ε-(carboximetil)-lisina (CML) y pentosidina. En el caso de la ruta no oxidativa, el mejor caracterizado AGE es pirralina. Por otra parte, la degradación de glucosa, de las *BSf* o de los *PAm* conduce a los intermediarios altamente reactivos (llamados α-dicarbonilos ó oxoaldehídos) tales como 3-DG y MGO [34-36].

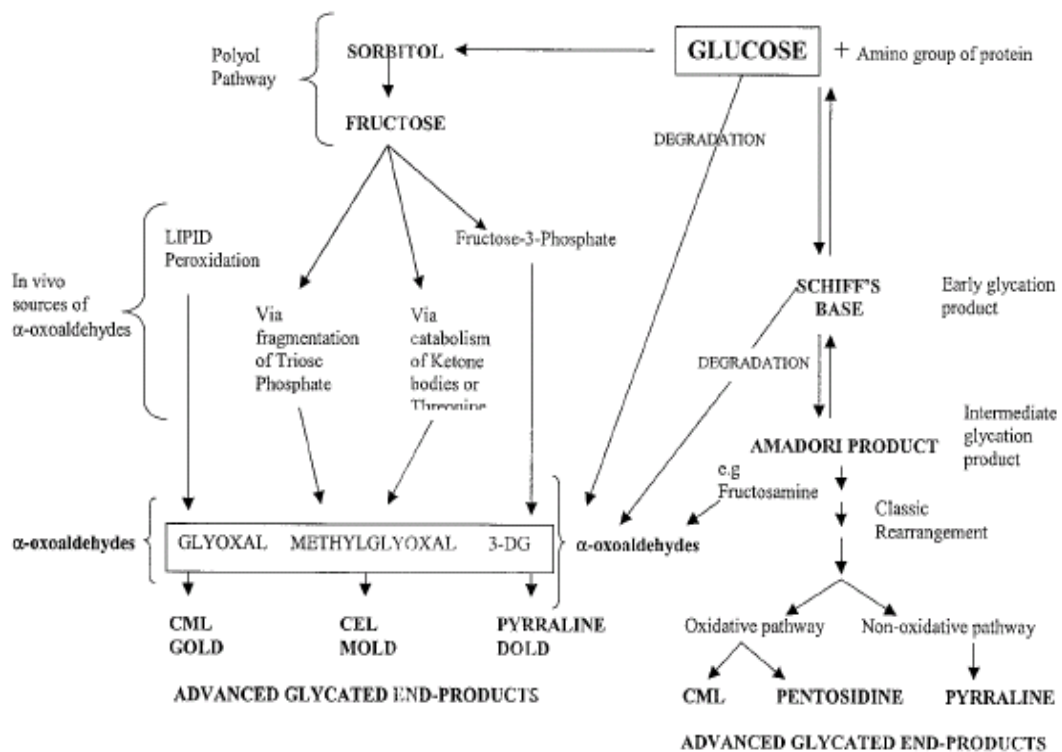


Figura 5.- Esquema global de la formación de AGEs. (CML- N-ε-(carboximetil)-lisina; CEL - N-ε-(carboxietil)-lisina, GOLD – dimero de glioxal-lisina, MOLD – dimero de metilglioxal-lisina, DOLD – dimer de deoxiglucosona-lisina).

Como se describe en la sección anterior, los principales AGEs derivados de esta ruta son dímeros de los compuestos antes mencionados. Es importante resaltar, que los AGEs no necesariamente son el resultado de hiperglucemia, ya que pueden formarse de otros azúcares (no glucosa) y/o de los productos de peroxidación lipídica. De interés para este trabajo es que, la 6-fosfato-glucosa y fructuosa forman AGEs de manera rápida. En particular, se han identificado y caracterizado algunos precursores de AGEs, entre ellos la N-ε-(carboximetil)-lisina (CML) y furosina [37-40].

En la *Figura 6* se presentan esquemáticamente las estructuras de los principales AGEs caracterizados: N-ε-(carboximetil)-lisina (CML), N-ε-(carboxietil)-lisina (CEL), pirralina, pentosidina, furosina (Fur), argipirimidina y tetrahidropirimidina [41-47].

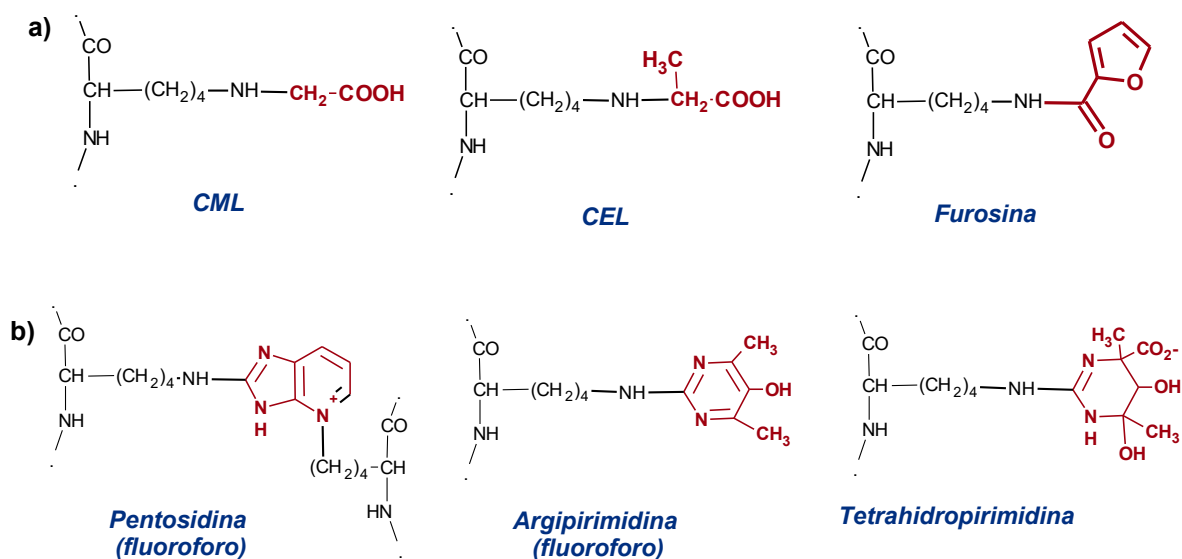


Figura 6. -Productos de Glicosilación Avanzada.- 6a) Principales Productos (finales) de reacciones de glicosilación (AGEs): N-ε-(carboximetil)- lisina (CML), N-ε-(carboxietil)-lisina (CEL) y furosina (Fur). 6b) pentosidina, arginopirimidina, los cuales presentan fluorescencia nativa.

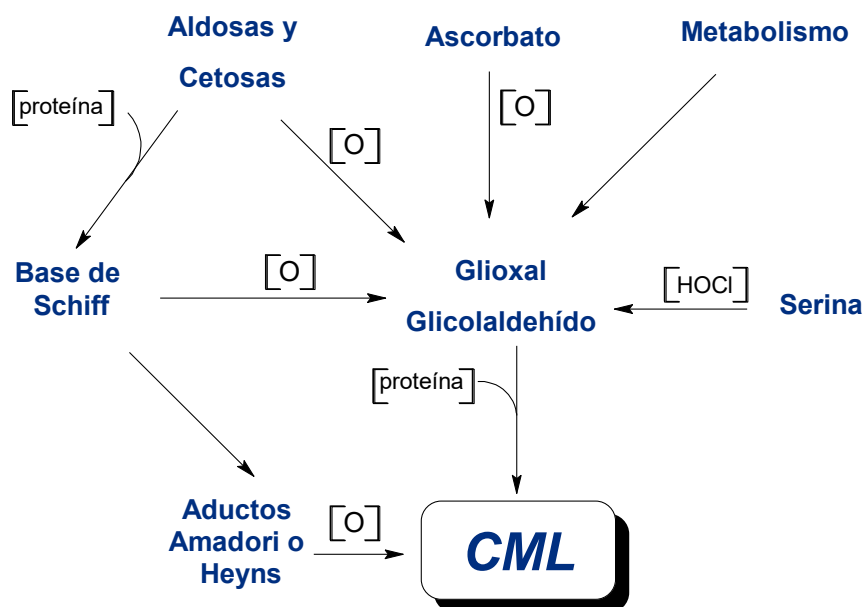


Figura 7. – Posibles rutas de formación de CML.

Entre estos compuestos, la CML es el principal producto de la glucosilación de proteínas. Por otro lado, CML puede ser formada por medio de una compleja red de reacciones secundarias (Figura 7) como es el caso de la autoxidación de carbohidratos, ascorbato, BSf, PAm, ácidos grasos, amino ácidos, intermediarios fosforilados en el metabolismo de carbohidratos, etc. [48-51]. La CML se ha encontrado en concentraciones elevadas en proteínas de vida prolongada en los pacientes diabéticos [52-54] y ha sido propuesta por algunos autores como un biomarcador de los procesos de glucosilación avanzada [14,55,56].

Otro compuesto, cuya formación presenta una cinética rápida es furosina. Este es el producto de reacción de lisina con fructosa y ha sido utilizado como un indicador de la formación de tempranos productos RM en diferentes tejidos y en los alimentos [57].

Este proyecto se enfoca en el análisis de CML y furosina en muestras biológicas.

1.5. Revisión bibliográfica de los procedimientos utilizados en la determinación de los AGEs.

Los AGEs forman un grupo de compuestos altamente heterogéneos, por lo que su análisis es una tarea difícil, especialmente cuando se trata de complejas muestras biológicas y/o clínicas. Las técnicas típicamente empleadas han sido espectrofluorimetría e inmunoensayos, sin embargo estas carecen de selectividad y proporcionan la información sobre grupos de compuestos que comparten ciertas propiedades y no sobre los compuestos individuales [45,55,58-61]. Así, debido a estructura rígida, algunos de los AGEs presentan propiedades fluorescentes (pentosidina, imidazolonas, etc). Típicamente, la excitación se lleva a cabo en la región de longitudes de onda 350-390 nm y la emisión se mide en 440-470 nm [62-65]. Para evitar los errores debido a fluorescencia nativa de algunas proteínas, Makita y col. ajustaron la concentración de proteínas en cada una de las muestras a 1 g L⁻¹ y midieron la señal analítica como porcentaje de fluorescencia relativa respecto el estándar BSA-AGEs (producto de glucosilación de albúmina) [66]. Otros autores propusieron un procedimiento de análisis por inyección en flujo (FIA) con doble sistema de detección: espectrofotométrico para la determinación de péptidos de baja masa molecular (280 nm) y espectrofluorimérico (exc. 247 nm y emisión 440 nm) para los AGEs [67]. Para aumentar la selectividad del procedimiento para los AGEs, la señal analítica fue definida como la relación entre fluorescencia relativa y absorbancia. En la calibración se utilizó el calibrador BSA-AGEs obtenido en el laboratorio. Este procedimiento fue empleado en el análisis de suero, orina, saliva y piel de los pacientes diabéticos. Antes de introducir las muestras en FIA, estas fueron desproteinizadas (ácido tricloroacético) y se eliminaron los lípidos mediante la extracción con cloroformo. El calibrador para AGEs de baja

masa molecular (peptídico) fue *BSA-AGEs* hidrolizado con proteinasa K [22,67,68]. Cabe resaltar que, los resultados obtenidos en estos estudios presentaron una buena correlación con los resultados del inmunoensayo. La limitación más importante en la aplicación de procedimientos espectrofluorimétricos es debido a que varios importantes *AGEs* (*CML*, pirralina) no presentan propiedades fluorescentes [69].

Los métodos inmunoquímicos del análisis de *AGEs* se basan en el uso de anticuerpos específicos. Los primeros anticuerpos de este tipo fueron obtenidos por Makita y col. [70] y luego utilizados en los estudios posteriores [67,71,72]. La preparación de anticuerpos se llevó a cabo mediante la inmunización de los animales experimentales con *AGEs* de diferentes proteínas, los que fueron sintetizados mediante la incubación de glucosa con diferentes proteínas. El enfoque de los trabajos más recientes ha sido en la obtención de los anticuerpos que presenten mayor especificidad. En particular, mediante la incubación de albúmina con glicolaldehído, se ha obtenido proteína modificada con *CML*, con la cual se inmunizó los animales de laboratorio, obteniéndose los anticuerpos poli clónales contra *CML* [73]. Estos fueron empleados en la localización y/o cuantificación de *CML* en muestras clínicas y en el análisis de alimentos [31,74,75]. Entre los métodos inmunoquímicos utilizados por diferentes autores hay que señalar: ensayo inmunohistoquímico, radioinmunoensayo, *ELISA* (enzyme-linked immunosorbent assay) y *WESTERN* [76,77]. El diseño experimental de estas técnicas es diferente. Así, el ensayo inmunohistoquímico se realiza directamente en el corte de tejido para localizar proteínas modificadas [11,78-82], mientras que para *ELISA* se prepara un homogenizado de muestra biológica, a partir del cual ocurre la adsorción indiscriminada de proteínas en la superficie de los posillos en la placa [79,82,83]. En la técnica *WESTERN*, antes de la unión de anticuerpo con la proteína de interés, se lleva a cabo la separación electroforética de proteínas en la muestra, asegurando de esta manera mayor selectividad del ensayo [83-87].

Independientemente del diseño de ensayo, en cada uno de ellos ocurre la unión del anticuerpo específico con la proteína modificada por AGEs. Posteriormente, se agrega un anticuerpo secundario (comercial) que, al unirse con el anticuerpo específico marca los sitios de unión para el análisis cuantitativo. Los anticuerpos secundarios pueden ser marcados con enzimas (por ejemplo fosfatasa alcalina), fluoróforos, o isótopos radioactivos (I^{131}) [64,88].

Otro grupo de métodos analíticos empleados en el análisis de AGEs, se basan en las separaciones cromatográficas. En el caso de cromatografía de gases, los AGEs (después de la hidrólisis de proteínas) requieren de una derivatización pre-columna para formar los compuestos volátiles y estables en temperaturas empleadas para la separación (hasta 300 °C). Los reactivos derivatizantes han sido el trifluoroacetilmetilester [48], diazometano [89] y etilcloroformato [55]. En cuanto a sistema de detección, el más utilizado ha sido el detector por espectrometría de masas, ya que este permite caracterizar y/o confirmar la estructura química de los compuestos. Como ejemplo, en la Figura 8 se presentan los resultados presentados por Petrovic y col. [55]. En este trabajo, se llevó a cabo la reacción de los grupos amino de compuestos de interés con etilcloroformato, obteniendo la separación de veinticinco amino ácidos durante 25 minutos (Figura 8a). Se puede observar que, este método permite la resolución de CML. La estructura del compuesto ha sido confirmada mediante espectros de fragmentación (Figura 8b).

Finalmente, se han reportado varios procedimientos analíticos para la separación / cuantificación de AGEs por cromatografía de líquidos, típicamente con la detección fluorescente. En el análisis de muestras biológicas no hidrolizadas, la separación se obtuvo mediante la cromatografía de exclusión por tamaño molecular y mediante electroforesis capilar [90,91].

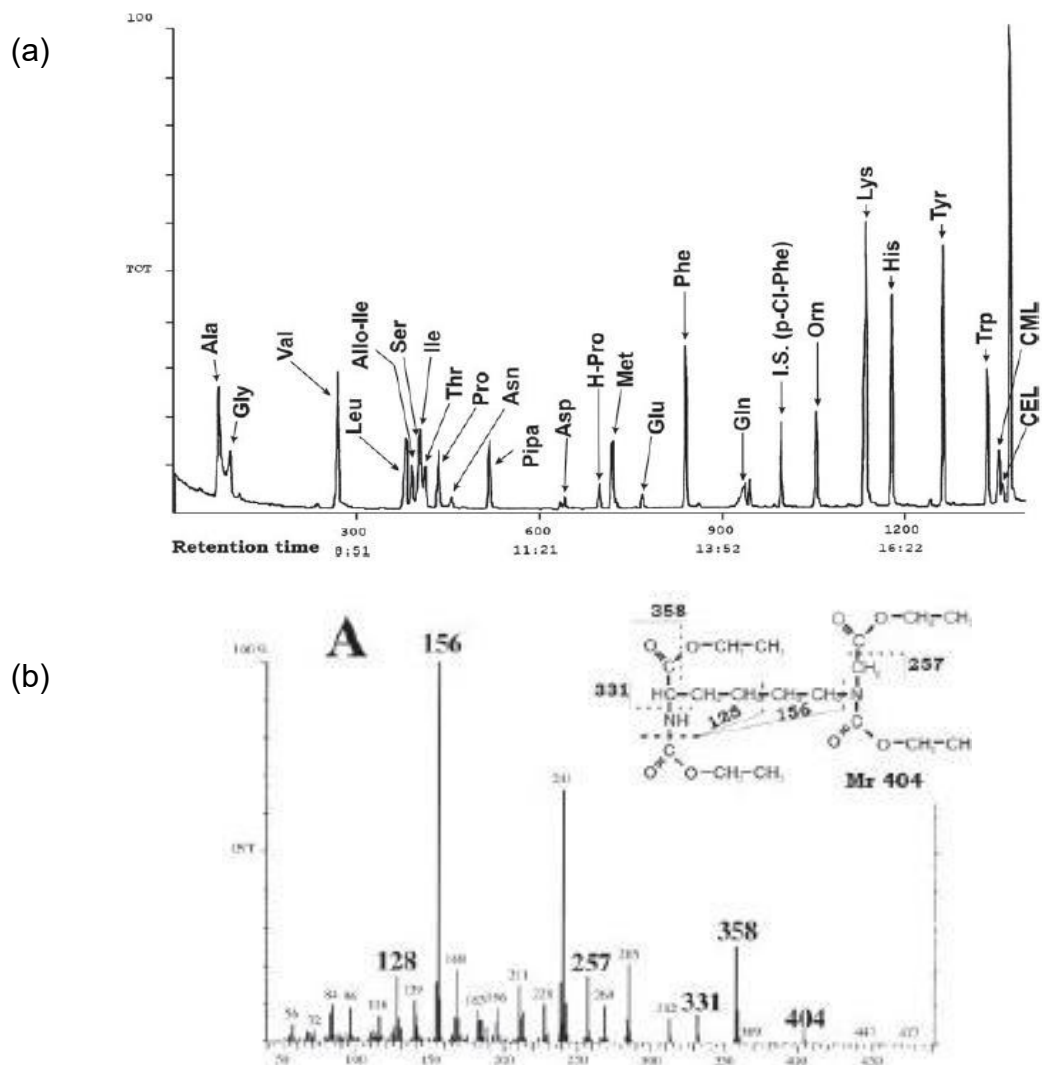


Figura 8. (a) Cromatograma de una mezcla de estándares de amino ácidos (Lys, Glu 1000 μM ; His, Ala - 800 μM ; Lys, Leu, Ile, Val, - 400 μM ; Ser, Thr, Pro - 300 μM ; el resto en la concentración 200 μM) y la solución de CML y CEL (N- ϵ -(carboxietil)-lisina) (cada uno 20 μM) después de la derivatización con etilcloroformato. (b) espectro de masas y el propuesto padrón de fragmentación de CML [55].

La separación de los compuestos de baja masa molecular (después de hidrólisis) se llevó a cabo por cromatografía de intercambio iónico y/o en fase

inversa [44,56,92-97]. Los primeros trabajos fueron basados en la fluorescencia nativa de algunos AGEs (pentosidina, fructosamina) [92,93]. Posteriormente, para poder aplicar la detección espectrofluorimétrica a mayor número de AGEs y para aumentar la selectividad del procedimiento, se han explorado varias reacciones de derivatización pre-columna. Debido a presencia de grupo amino en la estructura de AGEs (amina secundaria, o primaria en las muestras hidrolizadas), de particular interés han sido los reactivos utilizados para amino ácidos. Entre estos reactivos hay que mencionar orto-ftalaldehído (*OPA*), Cloroformato de 9-fluorenilmetilo (*FMOC-Cl*), Cloruro de 4-dimetilaminoazobenzenosulfonilo (*Dabsyl-Cl*), 7-fluoro-4-nitrobenzeno-2-oxa-1,3-diazol (*NBD-F*) y Carbamato de 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidilo (*AQC*) [94,98]. En la evaluación comparativa de estos agentes, Cohen y col.[94] sugieren el uso de *AQC* ya que otros agentes presentan ciertas limitaciones debido a su fluorescencia, inestabilidad de los derivados y, en algunos casos bajo rendimiento de la reacción de derivatización.

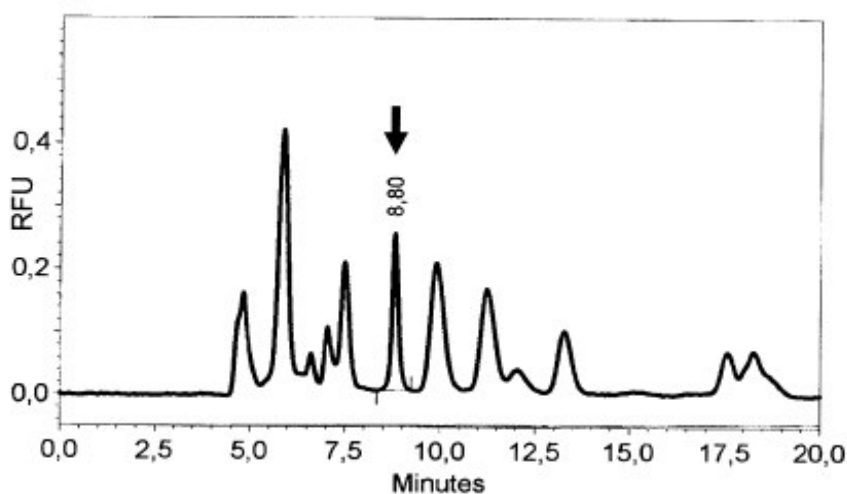


Figura 9- Cromatograma de la orina fortificada con *CML*, obtenido en la separación en fase inversa por Friess y col., después de la derivatización de grupos amino con *OPA* (se marca el pico de elución de *CML*). (La concentración de *CML* en la solución introducida en la columna $0.5 \mu\text{M}$ y las condiciones de detección: $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 455 \text{ nm}$) [56].

En base a la revisión, cuyos resultados se acaban de presentar, en el presente trabajo se optó por utilizar cromatografía de líquidos de alta resolución en fase inversa y dos reactivos derivatizantes: *OPA* y *AQC*. En la Figura 9 se presenta un cromatograma de orina fortificada con *CML* [56].

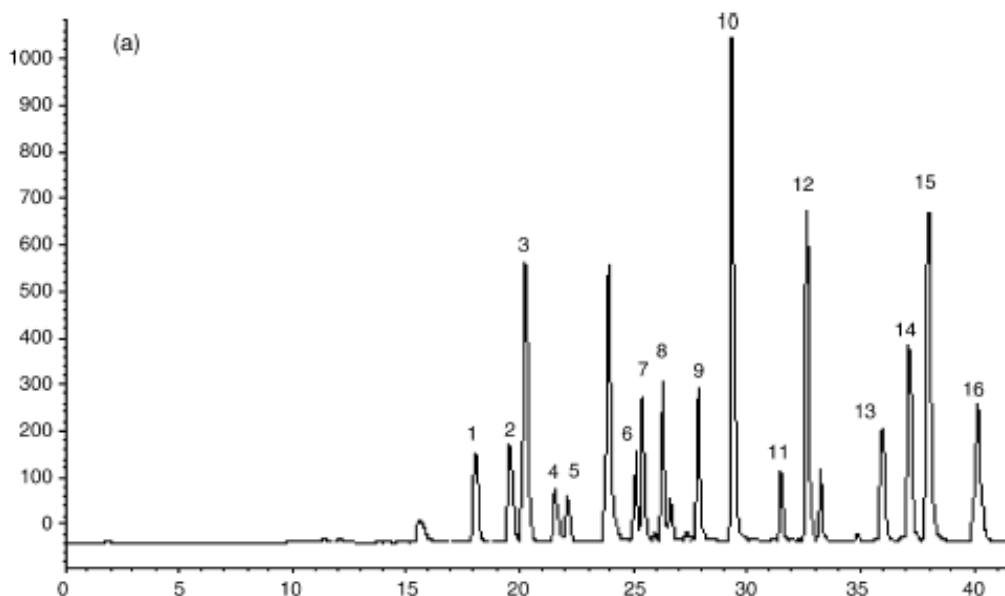


Figura 10. Separación cromatográfica de aminoácidos en una formulación láctea para bebés, obtenida por Bosch y col.[99] mediante la cromatografía de líquidos en fase inversa, en gradiente de acetonitrilo. El pre-tratamiento de muestra consistió en la hidrólisis ácida (6 M HCl) y derivatización pre-columna con *AQC*. Las condiciones de detección: $\lambda_{ex} = 250$ nm y $\lambda_{em} = 395$ nm. Los límites de cuantificación reportados fueron desde 0.044 μ M para-phenilalanina hasta 1.07 μ M para lisina. (1 – á. aspártico, 2 – serina, 3 – á. glutámico, 4 – glicina, 5 – histidina, 6 – arginina, 7 – treonina, 8 – alanita, 9 – pirolina, 10 – estándar interno, 11 – tirosina, 12 – valina, 13 – lisina, 14 – isoleucina, 15 – leucina, 16 – fenilalanina)

El pre-tratamiento de muestra consistió en la hidrólisis ácida (7 M HCl), eliminación de residuos de ácido y derivatización con *OPA*. La separación se llevó a cabo en la columna de fase inversa en el gradiente de acetonitrilo y

tetrahidrofurano (pH 7.2). Cabe señalar que, este método permitió la detección de *CML* en las muestras provenientes de los pacientes diabéticos. Es importante señalar que, *OPA* reacciona principalmente con aminas primarias, por lo que se puede discriminar entre la *CML* libre y enlazada a proteínas.

En el caso de *AQC*, este ha sido reportado como agente derivatizante de aminas primarias y secundarias, lo que en principio permite su uso para los *AGEs* enlazados a biomoléculas. En la Figura 10 se presenta el cromatograma obtenido en el análisis de una fórmula láctea para bebés por Bosch y col. [99], donde se observa la separación de 16 compuestos en 42 min.

1.6. Originalidad y justificación del presente trabajo.

Numerosos estudios han demostrado que los *AGEs* exógenos provocan daño *in vivo* [31,100-102]. Se ha observado una correlación positiva entre los *AGEs* en la dieta y los niveles séricos de estos compuestos [32,103,104]. Los estudios con ratones revelaron que, la dieta alta en *AGEs* contribuye en el desarrollo de daño renal, trastornos cardiovasculares y procesos de envejecimiento [28,105,106]. Asimismo, la restricción de consumo de *AGEs* exógenos provoca una disminución de los *AGEs* circulantes y mejora la sensibilidad a insulina [105,107-110].

Una limitación general de los trabajos realizados hasta la fecha es falta de un balance cuantitativo entre la ingesta de específicos *AGEs* y los niveles de biomarcadores de cambios *in vivo*. De ahí, la importancia del desarrollo de herramientas analíticas, adecuadas para la cuantificación de *AGEs* específicos en los alimentos.

En el presente trabajo se proponen dos procedimientos por cromatografía de líquidos para la determinación de *CML* en comida preparada. En particular, se emplean dos agentes derivatizantes reportados en la

bibliografía: orto-ftalaldehído (*OPA*) y Carbamato de 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidilo (*AQC*). Cabe señalar que, *OPA* es un agente recomendado para la derivatización de aminas primarias, de acuerdo con el esquema de reacción que se presenta en la Figura 11.

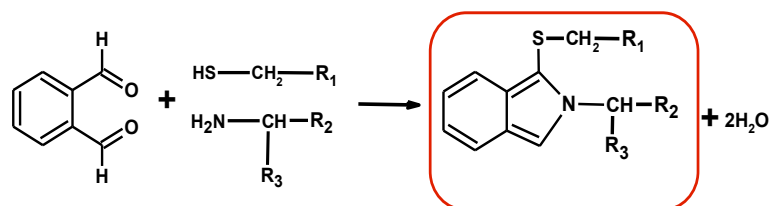


Figura 11- Esquema de la reacción de derivatización de aminas primarias con orto-ftalaldehído (*OPA*) en presencia de 2-mercaptoetanol (*BET*).

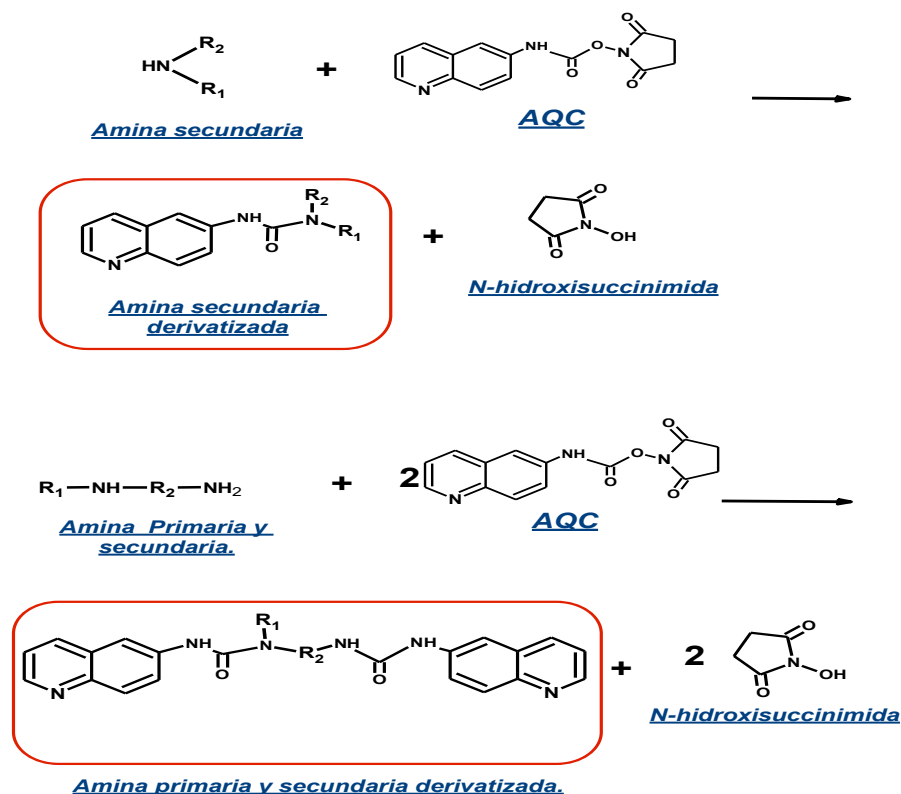


Figura 12- Esquema de la reacción de derivatización de aminas primarias y secundarias con *AQC*.

En el caso de AQC, este reactivo forma derivados de aminas primarias y secundarias, tal como se observa en el esquema de la reacción (Figura 12).

El uso de dos diferentes reactivos de derivatización permite aumentar la confiabilidad de los resultados obtenidos. Además, utilizando dos agentes derivatizantes en secuencia (primero OPA y luego AQC) se abre la posibilidad de desarrollar un procedimiento selectivo para los compuestos de carácter de amina secundaria, como es el caso de CML.

En cuanto a las aplicaciones de la metodología analítica a desarrollar, es importante mencionar el estudio clínico realizado en el Instituto de Investigaciones Medicas de la Universidad de Guanajuato. Dicho estudio se enfoca en el posible efecto de los AGEs exógenos en el desarrollo de las complicaciones en diabetes. Se consideran tres grupos de pacientes diabéticos, definidos en base al estado de desarrollo de las complicaciones microvasculares. Después de un periodo de consumo de dietas con diferente contenido de los AGEs, en estos pacientes se evaluarán los marcadores clínicos relacionados con diabetes. La metodología propuesta permitirá evaluar las dietas utilizadas en el estudio.

Por otra parte, los procedimientos desarrollados en este trabajo permitirán optimizar el proceso de obtención de albúmina modificada con CML, mediante evaluación de grado de conversión de lisina en CML. El estándar CML-BSA se empleará en la inmunización de conejos de laboratorio para más eficiente producción de anticuerpos específicos contra CML.

Capítulo 2
Objetivos

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

El objetivo general de este estudio fue desarrollar la metodología analítica de determinación de los precursores de AGEs en diferentes muestras biológicas para su aplicación en un estudio clínico sobre relevancia de los niveles de AGEs en alimentos en el desarrollo de diabetes.

2.2 Objetivos específicos

Con el fin de lograr el objetivo general se definieron los siguientes objetivos particulares:

1. Sintetizar *N-ε(carboximetil)-lisina* y furosina.
2. Desarrollar metodologías cromatográficas, basados en la derivatización pre-columna de las aminas primarias y/o secundarias, para la separación y determinación de los compuestos sintetizados.
3. Aplicar los procedimientos cromatográficos en el estudio de la glucosilación de albúmina (*BSA*) con el fin de obtener el estándar de *CML-BSA*.
4. Determinar los *AGEs* en las muestras de alimentos, provenientes del estudio clínico enfocado al posible impacto de *AGEs* exógenos en los pacientes diabéticos.

Capítulo 3
Parte
Experimental

3 Parte experimental

3.1 Instrumentos

Cromatógrafo de líquidos de alta resolución, modelo 1050 de Hewlett-Packard
Detector espectrofotométrico de onda múltiple, modelo 1050a de Hewlett Packard.

Detector espectrofluorimétrico modelo 1046a de Hewlett Packard.

Paquete de software *ChemStation*, para la manipulación de los detectores y del cromatógrafo de líquidos de alta resolución.

Purificador de Agua Millipore, LabConco Water Pro PS. Para obtener calidad de agua Mili-Q $18\text{M}\Omega\text{-cm}^2$.

Hidrogenador Catalítico marca Cole-Palmer

Micro centrífuga, Labnet International, Inc.

Balanza Analítica, Kern ALS 120

Potenciómetro con electrodo combinado (Corning)

Vortex Genie 2, Fisher Scientific.

3.2 Materiales

Tubos Falcón de 50 mL

Tubos Falcón de 25 mL

Tubos Eppendorf de 1.5 mL

Micro viales de reacción de 3mL Supelco

Micro pipetas Eppendorf 2, 20 μL , 10-100 μL , marca Labpette.

Micro pipetas Eppendorf 20-200 μL , 10-1000 μL , marca Nichiryo.

Matraces volumétricos de 10, 25, 50 mL.

Pipetas Volumétricas de 10, 20 mL.

3.3 Reactivos

Z-Lys-OH: Lisina protegida en el nitrógeno α con un grupo benziloxicarbonilo (CBZ ó Z) fue de Fluka, con un grado de pureza de $\geq 99\%$.

t-Boc-Lys: Lisina protegida en el nitrógeno α con un grupo t-butiloxicarbonilo (t-BOC) fue de Fluka, con un grado de pureza de $\geq 99\%$.

Lys: Lisina monohidroclorada, sustrato y blanco de reacción, fue de Sigma, con un grado de pureza de $\geq 98\%$ (TLC).

OPA: O-ftalaldehído ó Benceno-1,2-dicarboxialdehído, para derivatización pre-columna para amino ácidos por medio de HPLC, fue de Sigma, con un grado de pureza de $\geq 97\%$.

DSC: Carbonato de N,N' disuccinimidilo, sustrato para preparar un agente derivatizante el cual es un carbamato (AQC), fue de Sigma, con un grado de pureza de $\geq 95\%$ (NMR)

6-AMQ: 6-Amino-quinolina, sustrato para preparar un agente derivatizante (AQC), fue de Sigma, con un grado de pureza de $\geq 98\%$.

BME: 2-mercaptoetanol ó β -mercaptoetanol, se adiciona en la preparación de OPA como agente anti-oxidante por los grupos sulfhidrilos, fue de Sigma, con un grado de pureza de $\geq 98.5\%$.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético, se utiliza para eliminar traza de metales, fue de Reactivos Monterrey, con un grado de pureza de $\geq 95\%$.

D-Fructosa (C₆H₁₂O₆): Fructuosa o azúcar de la fruta, sustrato de reacción, fue de Sigma, con un grado de pureza de $\geq 99\%$.

MeCN: Acetonitrilo, fue de Caledon Laboratories, con un grado de pureza del tipo HPLC.

MeOH: Metanol, fue de Caledon Laboratories, con un grado de pureza del tipo HPLC.

H₃BO₃: Ácido Bórico, para preparar buffer de boratos salino, fue de Sigma, con un grado de pureza de $\geq 99.5\%$.

H_3PO_4 : Ácido Fosfórico, para preparar buffer de fosfatos salino, fue de Sigma, con un grado de pureza de $\geq 85\%$

NaH_2PO_4 : Fosfato monosódico, para preparar buffer de fosfatos salino, fue de Sigma, con un grado de pureza de $\geq 98\%$.

$NaBH_3CN$: Cianoborohidruro de sodio, es una agente reductor de aminación de aldehídos, cetonas y en nuestro caso de alquilación de aminas, fue de Sigma, con un grado de pureza de $\geq 90\%$.

CH_3COONH_4 : Acetato de amonio, para preparar buffer de acetatos, fue de Sigma, con un grado de pureza de $\geq 99\%$.

CH_3COONa : Acetato de sodio, para preparar buffer de acetatos, fue de Sigma, con un grado de pureza de $\geq 99\%$.

$OHCCOOH$: Ácido glioxálico ó ácido oxoetanoico, sustrato de reacción, fue de Fluka, con un grado de pureza de $\geq 97\%$.

HCl : Ácido clorhídrico concentrado (Solución), para preparar disoluciones con diversas concentraciones, fue de Karal SA de CV.

$NaOH$: Hidróxido de sodio, para preparar disoluciones con diversas concentraciones, fue de Fluka, con un grado de pureza de $\geq 98\%$.

$(C_2H_5)_3N$: Trietil amina, modificador en la separación RP-HPLC de acuerdo a su polaridad así como mejora la resolución de aminoácidos por medio de HPLC suprimiendo la cola de picos cromatográficos, fue de Sigma, con un grado de pureza de $\geq 99\%$.

Dowex 50WX8: Resina de intercambio catiónico, purificación de medio de reacción, fue de Sigma.

Ile: Isoleucina, blanco de reacción, fue de Sigma, con un grado de pureza de $\geq 98\%$ (TLC).

Asp: Ácido aspártico, blanco de reacción, fue de Sigma, con un grado de pureza de $\geq 98\%$ (TLC).

Phe: Fenilalanina, blanco de reacción, fue de Sigma, con un grado de pureza de $\geq 98\%$ (TLC).

His: Histidina, blanco de reacción, fue de Sigma, con un grado de pureza de $\geq 98\%$.

Glu: Ácido glutámico, blanco de reacción, fue de Sigma, con un grado de pureza de $\geq 98\%$ (TLC).

Leu: Leucina, blanco de reacción, fue de Sigma, con un grado de pureza de $\geq 98\%$.

Ser: Serina, sustrato y blanco de reacción, fue de Sigma, con un grado de pureza de $\geq 98\%$ (TLC).

Val: Valina, blanco de reacción, fue de Sigma, con un grado de pureza de $\geq 98\%$.

Arg: Arginina, blanco de reacción, fue de Sigma, con un grado de pureza de $\geq 98\%$.

Thr: Treonina, blanco de reacción, fue de Sigma, con un grado de pureza de $\geq 98\%$ (TLC).

Met: Metionina, blanco de reacción, fue de Sigma, con un grado de pureza de $\geq 98\%$ (TLC).

Ala: Alanina, blanco de reacción, fue de Sigma, con un grado de pureza de $\geq 98\%$.

Cys: Cisteína, blanco de reacción, fue de Sigma, con un grado de pureza de $\geq 98\%$ (TLC).

Pro: Prolina, blanco de reacción, fue de Sigma, con un grado de pureza de $\geq 98\%$ (TLC).

Gly: Glicina, blanco de reacción, fue de Sigma, con un grado de pureza de $\geq 98\%$.

Disoluciones

Tampón de carbonatos 400 mM ajustando a pH 10.3 con hidróxido de sodio.

Tampón de fosfatos 25 mM ajustando a pH 7.4 con hidróxido de sodio.

Tampón de acetatos 50 mM a pH 6.5.

Tampón de acetatos 10 mM, trietilamina 10 mM y ajustado con ácido fosfórico a pH 6.5.

Tampón de boratos 400 mM ajustando el pH 9.7 con hidróxido de sodio.

3.4 Columnas Analíticas

LC-PAH C18 (5 μm , 150 x 4.6 mm), marca Supelco

Luna C18 (5 μm , 150 x 4.6 mm), marca Phenomenex.

Capítulo 4
Resultados y
Discusión

4. Resultados y discusión

Para avanzar en el conocimiento sobre posible efecto de los *AGEs* exógenos en el desarrollo de las complicaciones en diabetes, en este trabajo se desarrolla la metodología analítica para la determinación de los precursores de *AGEs* en muestras de alimentos. En primer lugar se presentan los resultados obtenidos en la síntesis de *CML* y furosina a partir de lisina con el nitrógeno α protegido químicamente. En este caso, se llevó a cabo el seguimiento de la reacción mediante la cromatografía en capa fina y mediante la cromatografía de líquidos en fase inversa con derivatización pre-columna. Una vez demostrada la conversión de lisina formando precursores de *AGEs*, se a puesto a punto el procedimiento cromatográfico para la separación/detección de amino ácidos, basado en la derivatización de los grupos amino con carbamato de 6-aminoquinolil-N-hidrosuccimidilo (*AQC*). A continuación, se demostró la utilidad de este procedimiento en la determinación de grado de conversión de lisina en N- ϵ (carboximetil)-lisina en albúmina (*BSA*). Los resultados obtenidos fueron confirmados mediante un procedimiento alternativo, en el que para la derivatización fluorescente se utilizó orto-ftalaldehído (*OPA*). Finalmente, se llevó a cabo el análisis de una serie de muestras de comida, provenientes del estudio clínico. Dependiendo de la composición nutricional y manera de elaborar los alimentos, estas muestras han sido clasificadas de manera preliminar como “altas” y “bajas” en *AGEs*. Puesto que, el enfoque del estudio clínico ha sido en el posible impacto de los *AGEs* exógenos en el desarrollo de complicaciones en diabetes, ha sido de suma importancia obtener la información más específica de los *AGEs* en la comida a utilizar. En este capítulo se describen sistemáticamente los resultados obtenidos en el desarrollo del trabajo analítico.

4.1. Síntesis y caracterización cromatográfica de N- ϵ (carboximetil)-lisina y de furosina

En cromatografía de líquidos la identificación de los compuestos requiere el uso de estándares de los solutos de interés. En el caso de compuestos no identificados, estos pueden ser caracterizados mediante técnicas de análisis estructural tales como espectroscopia de resonancia magnética nuclear, o espectrometría de masas con la fuente de ionización suave. En la bibliografía sobre AGEs se han encontrado trabajos, en los que los estándares fueron obtenidos mediante incubación de proteínas (albúmina, colágeno, lisosoma, etc.) con ácido glioxálico, o fructosa [111-113]. Relativamente pocos reportes han sido enfocados a la obtención de precursores de AGEs (en particular CML y furosina) a partir de lisina con el nitrógeno α protegido químicamente [114-116]. Así, Glomb y col.[48] utilizaron lisina protegida con un grupo terbutiloxicarbonilo (*t-Boc*) y el ácido yodo acético como el agente glicante. La reacción se llevó a cabo a pH 10 (tampón de fosfatos) y, para la desprotección del nitrógeno α se utilizó el ácido clorhídrico 3 M. Es importante que, el rendimiento de la síntesis fue relativamente bajo (22 %) [48,117].

Con el fin de mejorar el rendimiento de la síntesis, en el presente trabajo se han examinado diferentes condiciones químicas de la síntesis, los que se presentan esquemáticamente en la Figura 13. Se estudió también el efecto de diferentes soluciones reguladoras (tampones de fosfatos, boratos y carbonatos), pH (7 – 10.5), temperatura y tiempo de reacción. En cada uno de los casos, se caracterizó el producto obtenido mediante la cromatografía en capa fina.

Los mejores resultados fueron obtenidos utilizando la *ruta (C)* (Figura 13). En concreto, la reacción Maillard se llevó a cabo con (*Z-Lys-OH*) y el ácido glioxálico (relación molar 1:1), en la solución de tampón de fosfatos a pH 7.4. Para reducir la *BSf* formada, se agregó un exceso de cianoborohidruro de sodio.

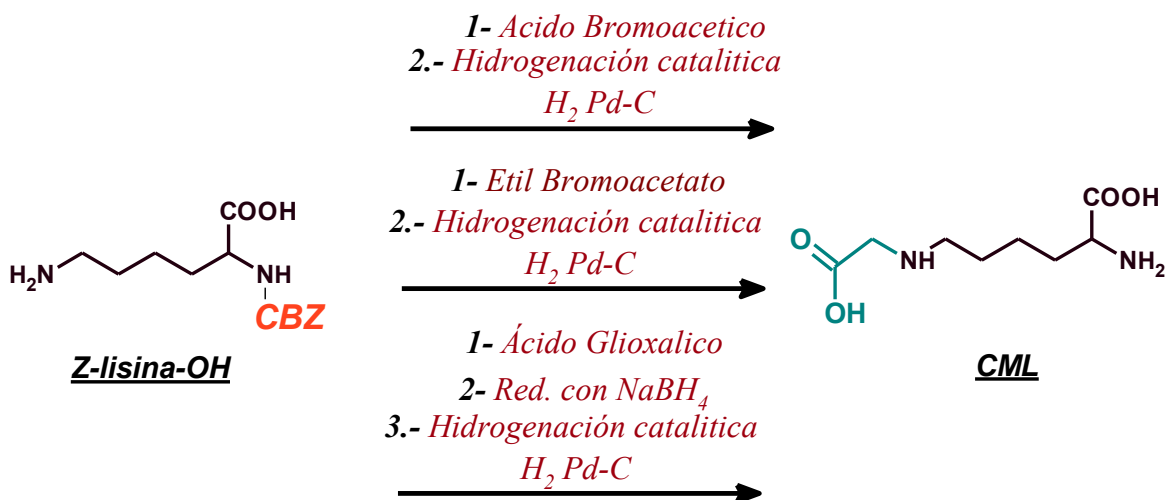


Figura 13. Esquema de las condiciones propuestas con el fin de mejorar el rendimiento de la síntesis de CML. (1 – agente glicante, 2 y 3 – condiciones de desprotección).

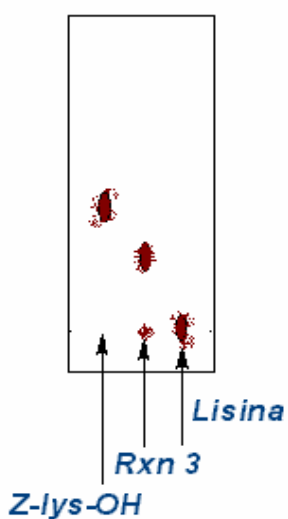


Figura 14. Evidencia de la formación de lisina modificada (Rxn 3) en la ruta de síntesis de CML a partir de Z-Lys-OH y ácido glioxálico. Las condiciones de la cromatografía en capa fina: fase estacionaria – silica gel soportado en aluminio y fase móvil – n-butanol:ácido acético: agua (4:1:5)

de sodio (37 °C, 72 hr.)[114]. Después de la síntesis, la desprotección del nitrógeno α se obtuvo mediante la hidrogenación catalítica ($H_2/Pd/C$). El producto obtenido fue purificado en el cartucho relleno con intercambiador catiónico (Dowex 50-X8). En la Figura 14 se presentan la placa de cromatografía en capa fina, donde claramente se observa la formación de un nuevo compuesto ($R_f = 0.31$).

En el caso de furosina, la síntesis se obtuvo a partir de lisina protegida con el grupo t-butiloxicarbonilo (*t-Boc-Lys-OH*) y fructosa (relación molar 1:1). La desprotección del nitrógeno α se obtuvo mediante hidrólisis ácida (3 mol L⁻¹ HCl) [115]. El producto obtenido fue purificado de la misma manera que *CML*.

Para evaluar el rendimiento de la síntesis de *CML* y de furosina se adaptó el procedimiento cromatográfico basado en la derivatización pre-columna con el reactivo *AMQ* para formar los compuestos fluorescentes, derivados de lisina protegida (*t-BOC-Lys-OH*, *Z-Lys-OH*), lisina, *CML* y furosina.

El carbamato de 6- aminoquinolil-N-hidrosuccimidilo (*AQC*) fue sintetizado de acuerdo con la literatura [94]. Para evitar presencia de trazas de agua, el acetonitrilo fue secado con carburo de calcio. Se pesaron 24 mg (0.1mmol) de carbonato de di (N-succimidilo) (*DSC*), se agregó 1 mL de acetonitrilo seco y la mezcla se calentó en reflujo. Posteriormente, a la solución de *DSC/MeCN* seco en reflujo, se agregaron en pequeñas porciones 12 mg (0.1 mmol) de 6-Aminoquinolina (*AMQ*) y se dejó por un periodo de 30 minutos. Finalmente, la solución se concentró en un rota vapor y, después de enfriar (24 hr.), los cristales obtenidos se filtraron y lavaron con acetonitrilo seco. Se tomaron 6 mg de producto para preparar una solución de *AQC* 20 mM en acetonitrilo seco. La reacción se presenta esquemáticamente en la Figura 15.

Para la reacción de derivatización se tomaron 10 μ L de la solución de lisina protegida, o de *CML*, ó de furosina, a cada una se agregaron 20 μ L de tampón de boratos (0.2 M, pH 8.8), 10 μ L de reactivo (*AQC*) y 400 μ L de agua. Después de mezclar las soluciones, estas se dejaron por 1 min y se tomaron 20 μ L para el análisis cromatográfico.

Partiendo de las condiciones de separación cromatográfica reportados en bibliografía [94], en el desarrollo experimental se examinaron diferentes columnas de fase inversa, diferentes fases móviles y condiciones de elución.

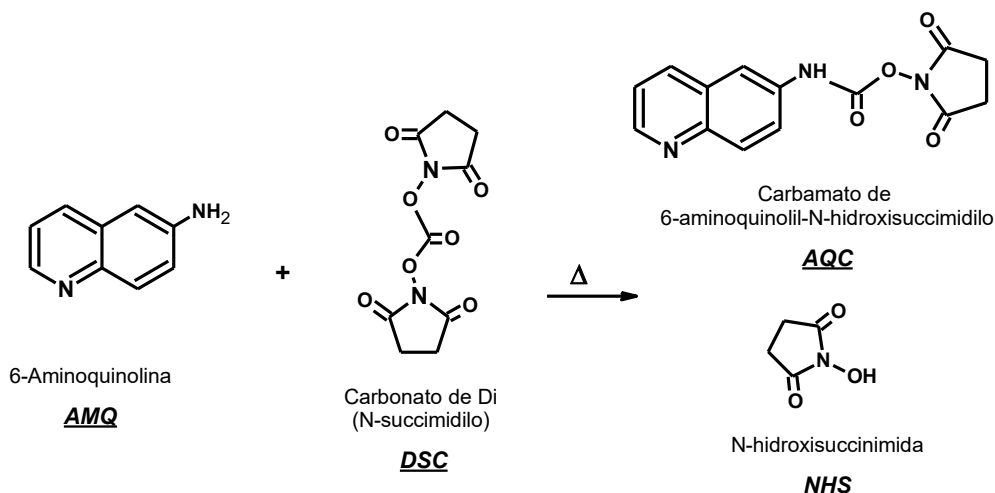


Figura 15. Esquema de la síntesis del reactivo derivatizante AQC.

Las condiciones finales se describen a continuación. Se utilizó la columna de fase inversa utilizando la fase móvil de tampón de acetatos (60 mM) con 20 mM trietilamina (pH 5.0) en gradiente de acetonitrilo (de 10 % a 50 % ACN de 0 a 15 min) y el flujo de 0.9 mL/min. En la detección espectrofluorimétrica la excitación se obtuvo a 245 nm y emisión se midió a 395 nm. El tiempo de separación fue de 15 minutos.

En primer lugar se llevó a cabo el análisis de los estándares de lisina, t-BOC-Lys-OH y Z-Lys-OH, observándose en cada uno de los casos un solo pico cromatográfico con tiempo de retención respectivamente 6.1 min, 10.9 min y 12.3 min. Estos resultados demuestran la viabilidad de utilizar el reactivo derivatizante AQC para este tipo de análisis y también permiten identificar los picos cromatográficos observados en el análisis de la composición de la solución después de la síntesis de *CML* y de furosina. Típicos cromatogramas obtenidos en estos experimentos se presentan en la Figura 16.

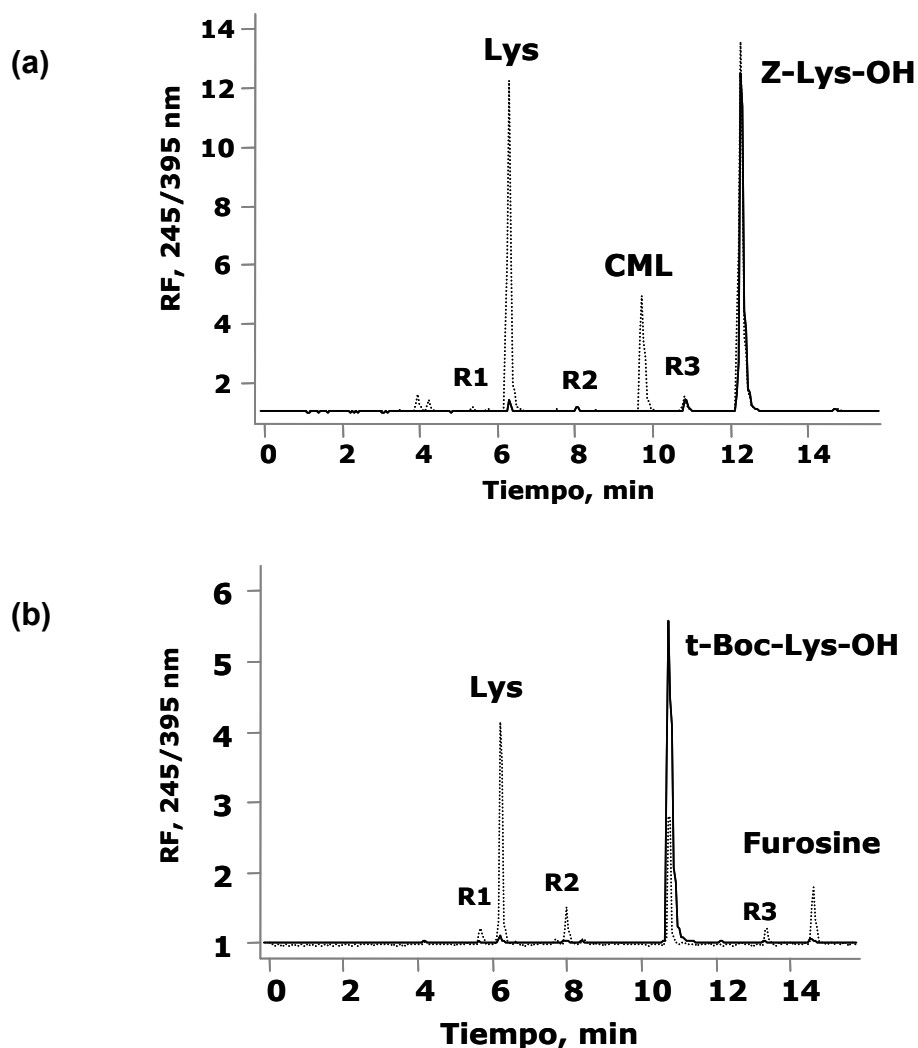


Figura 16 Típicos cromatogramas de lisina protegida (—) y de los AGEs sintetizados (----), obtenidos después de la derivatización de estos compuestos con AQM: (a) síntesis de CML y (b) síntesis de furosina. Condiciones de la síntesis, de derivatización y de separación cromatográfica se detallan en el texto.

En el caso de la síntesis de CML (Fig 16a), en el cromatograma se observa la elución de lisina (descomposición de Z-Lys-OH), de lisina protegida y CML ($t_{ret} = 9.8$ min). Los tres picos marcados en los cromatogramas como R₁,

R₂ y R₃ aparecen también en el cromatograma de blanco (reactivo derivatizante), por lo que han sido adscritos a fluorescencia del reactivo (AQC y intermediarios en su síntesis, de acuerdo a la bibliografía). Se puede estimar que el rendimiento de la síntesis de *CML* fue de aprox. **33 %**. De manera análoga, en la Fig. 16b se presentan cromatogramas obtenidos en el análisis de la *t-BOC-Lys-OH* y de los productos de la síntesis de furosina (la solución después de DOWEX 50-W8).

Resumiendo, en esta parte de trabajo se logró sintetizar *CML* y furosina. El rendimiento de la síntesis fue mas alto con respecto con los datos bibliográficos, dichos compuestos se pueden emplear como estándares en el análisis de dos precursores de *AGEs* en alimentos. En segundo lugar, se propuso el procedimiento analítico basado en la derivatización pre-columna, separación por *CLAR* en fase inversa y detección espectrofluorimétrica de lisina, *Z-Lys-OH*, *CML*, *t-BOC-Lys-OH* y furosina (15 min). Este procedimiento permite llevar a cabo el control analítico de la síntesis de los precursores de *AGEs*.

4.2. Estudio de la derivatización pre-columna en la separación de amino ácidos por cromatografía de líquidos de alta resolución en fase inversa

Una vez demostrada la factibilidad de utilizar el reactivo AQC en la derivatización pre-columna de los precursores de *AGEs*, se continuó con el desarrollo de los procedimientos analíticos para el análisis de muestras de alimentos. Como se describe en la Introducción, el AQC reacciona con aminas primarias y secundarias. Lógicamente, en el extracto proteolítico de comida se van a encontrar una serie de amino ácidos, que forman derivados fluorescentes con AQC y que tienen que ser resueltos de los derivados de *AGEs* en la columna cromatográfica. Así que, en primer lugar se llevó a cabo la separación de una mezcla estándar de amino ácidos. Para ello, se preparó una solución de isoleucina (Ile), ácido aspártico (Asp), fenilalanina (Phe), histidina (His) ácido

glutámico (Glu), leucina (Leu), serina (Ser), valina (Val), arginina (Arg), treonina (Thr), metionina (Met), alanina (Ala), cisteína (Cys), lisina (Lys), prolina (Pro) y glicina (Gly), conteniendo una concentración de 4 mM de cada uno de los compuestos. Para la reacción de derivatización, se tomaron 20 μ L de esta solución, se agregaron 80 μ L de tampón de boratos (400 mM) y 20 μ L de la solución de AQC (10 mM). Después de 1 minuto, la mezcla se diluyó con 180 μ L de agua desionizada para llegar a un volumen final de 300 μ L.

De manera semejante como en la sección anterior, las condiciones de separación cromatográfica fueron seleccionadas experimentalmente, probando diferentes columnas de fase inversa así como variando la composición de fase móvil y las condiciones de elución. El criterio de selección fue lograr la separación de los compuestos a línea base en un tiempo razonablemente corto. Las condiciones finales fueron: la columna *LC-PAH C18* (150 x 4.6 mm, 5 μ m,), marca Supelco, elución con el tampón de acetatos (50 mM, pH 6.3) en gradiente de acetonitrilo y con el flujo 0.9 mL/min. El programa de gradiente se muestra en la Tabla 1. En la detección espectrofluorimétrica, la excitación se llevó a cabo a 245 nm y la emisión se midió en la longitud de onda de 395 nm.

Tabla 1 Programa de gradiente en la separación de los derivados de 16 aminoácidos con AQC.

Tiempo, min	% MeCN, v/v	% Tampón de acetatos, v/v
0	7.0	93.0
4.0	11.5	88.5
4.5	13.5	86.5
13.0	18.0	82.0
13.5	20.0	80.0
17.5	22.0	78.0
18.0	46.0	54.0
22.0	55.0	45.0

En la Figura 17 se presentan los cromatogramas obtenidos. Para visualizar mejor la elución de lisina y que esta fuera libre de contribución de otros compuestos, se comparan los resultados obtenidos para dos mezclas de amino ácidos: una sin lisina y otra conteniendo lisina.

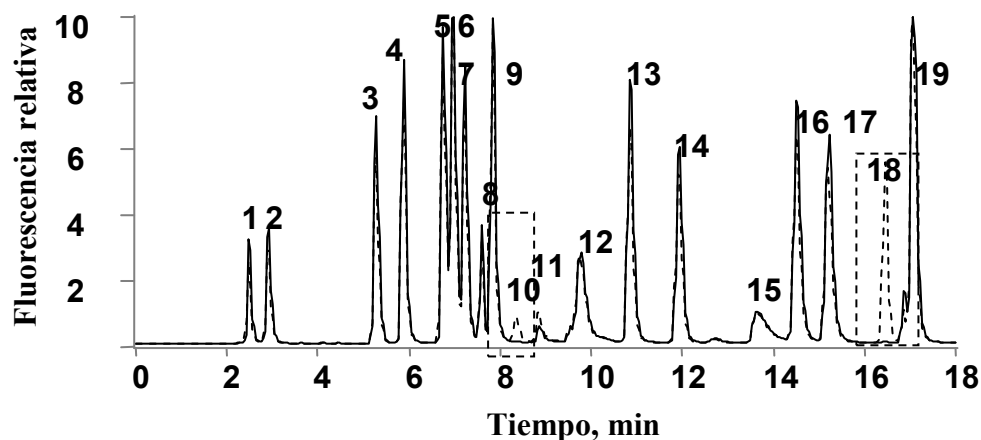


Figura 17. Típicos cromatogramas de los derivados de dos mezclas de amino ácidos con AQC: (—) – amino ácidos sin lisina y (---) amino ácidos con lisina. Los detalles del procedimiento en el texto. 1.- á. aspártico, 2.- á. glutámico, 3.- serina, 4.-glicina, 5.-treonina, 6.- histidina, 7.- prolina, 8.- alanina , 9.-arginina,10.- derivado de lisina, 11.- metionina, 12.- aminoquinolina (AMQ), 13.- leucina, 14.- fenilalanina, 15.- amoniaco, 16.-valina, 17.- isoleucina, 18.- derivado de lisina, 19.- cisteína

En primer lugar es necesario resaltar que, las condiciones cromatográficas propuestas en este trabajo permitieron reducir significativamente el tiempo de separación, respecto a los resultados reportados por otros autores (Fig. 10, [99]). Como se observa en la Figura 17, los amino ácidos fueron resueltos en 22 minutos, mientras que en el trabajo citado, el tiempo de cromatograma fue de 45 min. Por otro lado, en la Figura 17 se observa muy buena reproducibilidad de separación de amino ácidos que presentan estructura de aminas primarias. En cuanto a lisina, al agregar este amino ácido a la mezcla estándar aparecen dos

nuevos picos de elución con tiempos de retención 8.4 min y 16.45 min respectivamente. En la Figura 18 se presenta un aumento de las zonas de cromatogramas de mezclas de amino ácidos correspondientes a las regiones de elución de estos picos.

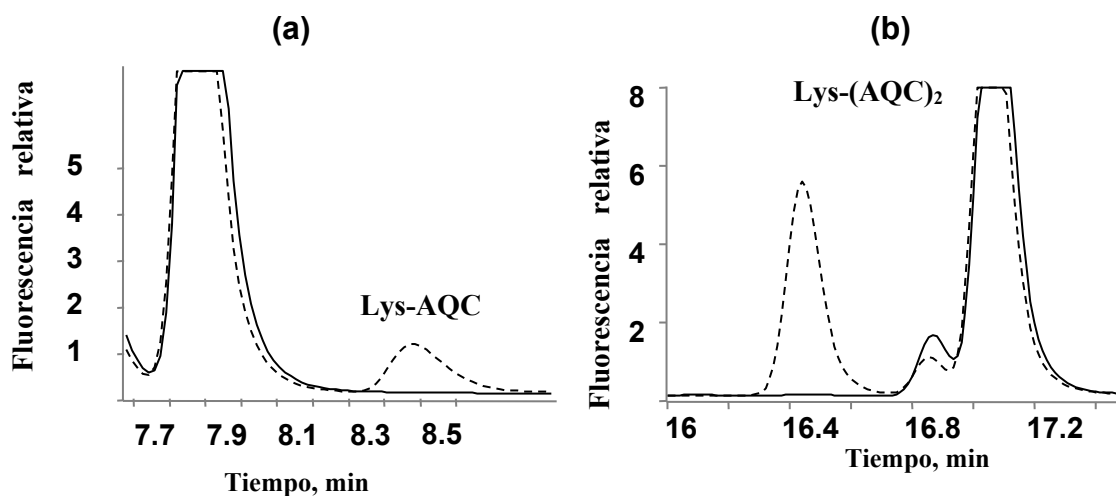


Figura 18. Aumento de las dos regiones de cromatogramas presentados en la Figura 17, correspondientes a la elución de lisina derivatizada con AQC: **(a)** el derivado obtenido en la reacción de grupo $-NH_2$ de lisina con AQC y **(b)** el derivado obtenido en la reacción de dos grupos amino en la molécula de lisina con AQC (ver Fig. 12)

Como se hace notar en la parte de introducción, el reactivo AQC puede reaccionar con las aminas primarias y secundarias (Figura 12). Puesto que lisina presenta dos grupos de amina primaria en su estructura, en el cromatograma se observa la elución de dos compuestos, formados con participación de un grupo amino o dos. Tomando en cuenta la mayor polaridad del derivado con una molécula de AQC, se asume que el pico con $t_{ret} = 8.4$ min corresponde a la elución de Lys-AQC, mientras que el pico con $t_{ret} = 16.45$ min corresponde a la elución de Lys – (AQC)₂.

En conclusión, el procedimiento cromatográfico propuesto asegura la resolución de derivados de lisina con AQC de otros amino ácidos esperados en las muestras de comida.

4.3. Aplicación del procedimiento cromatográfico desarrollado en la evaluación de grado de conversión de lisina en N-ε (carboximetil)-lisina en albúmina

La siguiente etapa de trabajo consistió en emplear el procedimiento cromatográfico propuesto en evaluación de grado de conversión de lisina en albúmina (*BSA*), mediante incubación con un agente glicante. De esta manera se pretende lograr la separación de *CML* de los amino ácidos, después de la hidrólisis de proteínas y derivatización pre-columna con AQC.

Para obtener la proteína modificada con *CML*, en 1 mL de tampón de fosfatos (400 mM, pH 7.2) se disolvieron 50 mg de *BSA*. A esta solución se agregaron 14 mg (0.2 mmol) de ácido glioxálico y 29 mg (0.4 mmol) de cianoborohidruro de sodio (para facilitar la reducción de la *BSA*). La mezcla se incubó en 37 °C durante 24 hrs. El blanco fue preparado siguiendo el mismo protocolo, pero sin agregar al agente glicante (ácido glioxálico).

En las dos muestras se llevó a cabo la hidrólisis de proteínas. Para ello, se tomaron 20 µL de cada una de las soluciones y, junto con 1 mL de ácido clorhídrico 6 M, se colocaron en microviales de 3 mL. La hidrólisis se llevó a cabo a temperatura 110 °C durante 24 horas. Finalmente, las muestras se evaporaron hasta sequedad y se re-disolvieron en 250 µL de una solución de tampón de boratos (400 mM).

En las muestras hidrolizadas, con alto contenido de aminoácidos libres (incluyendo *CML*), se realizó la reacción de derivatización con AQC. En concreto, a 20 µL del hidrolizado de *BSA* ó *BSA-CML* se agregaron 80 µL de tampón de boratos (400 mM) y 20 µL de AQC (10 mM). Después de 1 min, la mezcla se diluyó hasta 300 µL con agua desionizada y se inyectaron 20 µl de

cada una de las soluciones al sistema cromatográfico. Las condiciones de separación y de detección espectrofluorimétrica fueron las mismas que las propuestas para la separación de derivados de aminoácidos en la sección anterior.

En la Figura 19 se presentan los cromatogramas obtenidos. Al comparar el cromatograma de hidrolizado de *CML-BSA* y de blanco (*BSA sin modificar*), se observa muy buena concordancia entre los tiempos de retención e intensidad de mayoría de los picos, lo que indica muy buena reproducibilidad del procedimiento para aminoácidos. Por otro lado, existen diferencias entre los dos cromatogramas. En concreto, en el cromatograma de *BSA* modificado con ácido glicoxálico, aparecen dos nuevos picos, entre cuarto y quinto minuto de cromatograma. Estos picos se pueden observar con mayor claridad en la Figura 20a, donde se amplía la región de elución de estos picos (entre cuarto y sexto minuto de cromatograma). Por otro lado, en el cromatograma de hidrolizado de *CML-BSA* presentado en la Figura 19, los picos de derivados de lisina (Lys – AQC, $t_{ret} = 8.4$ min, Lys –(AQC)₂, $t_{ret} = 16.45$ min, ver Fig. 18 a) se ven suprimidos respecto a su intensidad en el cromatograma de blanco (*BSA sin modificación*).

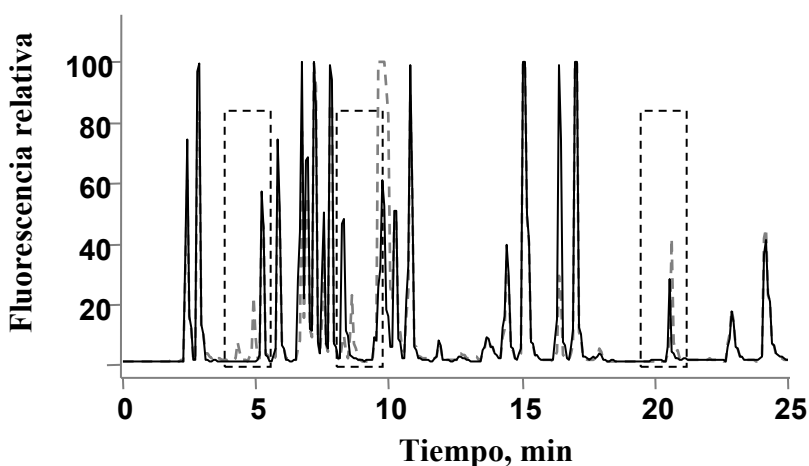


Figura 19. Cromatograma de hidrolizado de albúmina modificada (—) y de albúmina sin modificar (---) después de la derivatización con AQC (Las condiciones cromatográficas iguales que en las Figuras 17 y 18).

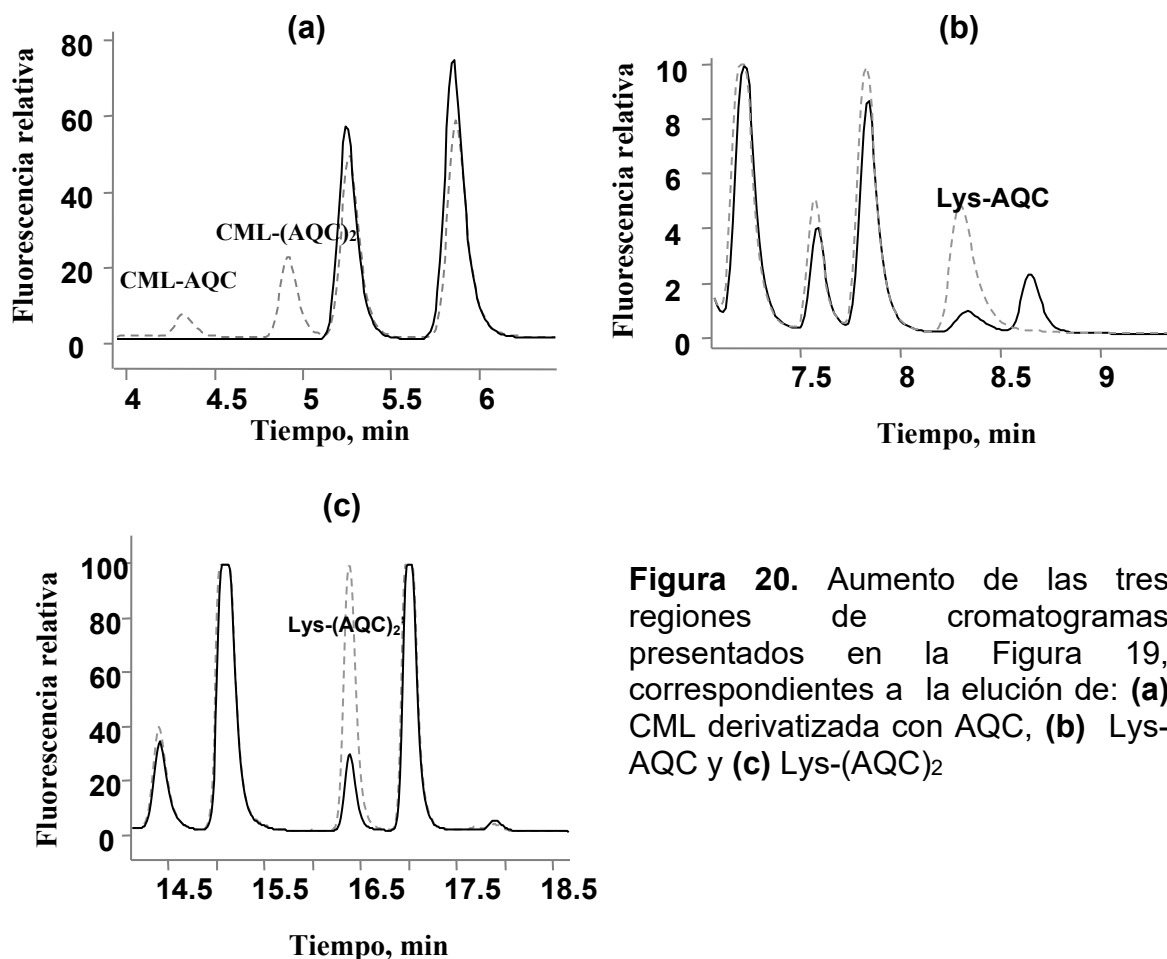


Figura 20. Aumento de las tres regiones de cromatogramas presentados en la Figura 19, correspondientes a la elución de: **(a)** CML derivatizada con AQC, **(b)** Lys-AQC y **(c)** Lys-(AQC)₂

En este caso, también se presenta una ampliación de las regiones de cromatograma: 7 - 9 min (Figura 20 b) y 14 - 18 min (Figura 20 c). Los resultados obtenidos indican que, al incubar BSA con agente glicante, se logró la modificación de lisina formando *CML*.

Para confirmar estos resultados, se llevó a cabo el análisis cromatográfico de las mismas muestras (después de la hidrólisis), pero utilizando otro reactivo derivatizante. Se optó por emplear orto-ftalaldehído que es un derivatizante común en el análisis de aminas primarias (Figura 11) [98]. Para la reacción se tomaron 20 μL de la muestra, se agregaron 100 μL de tampón de boratos (400 mM) y 50 μL de la solución de *OPA* (40 mM). Después

de 1 minuto, se inyectaron 20 μ L de la solución al sistema cromatográfico. La separación se realizó en la columna de fase inversa *LC-PAH C18* (150 x 4.6 mm, 5 μ m) de *Supelco*, utilizando elución en gradiente con el flujo 1 mL/min. El programa de gradiente fue seleccionado experimentalmente y se presenta en la Tabla 2. En la detección espectrofluorimétrica se utilizaron las longitudes de onda de excitación y emisión de 330 nm y 450 nm respectivamente.

Tabla 2. Programa de gradiente en la separación de derivados de aminas primarias con *OPA*. Fase móvil A – tampón de fosfatos 25 mM, pH 7.2; fase móvil B – acetonitrilo y fase móvil C - metanol

Tiempo, min	% A, v/v	% B, v/v	% C, v/v
0	10	5	5
1	10	5	5
19	25	35	40

Los cromatogramas obtenidos para los hidrolizados de *BSA* y de *CML-BSA* se presentan en la Figura 21. De manera similar que el procedimiento con *AQC*, este también presenta muy buena reproducibilidad en el análisis de amino ácidos, puesto que se observa concordancia entre tiempos de retención e intensidad de mayoría de los picos en los cromatogramas de dos muestras. Sin embargo, cuando la derivatización se lleva a cabo con *OPA*, en el cromatograma de *CML-BSA* aparece solamente un nuevo pico, respecto al cromatograma de *BSA*. En la Figura 22 a se presenta ampliación de la zona de cromatograma correspondiente a la elución de este pico ($t_{ret} = 7.85$ min). En cuanto a la elución de lisina derivatizada con *OPA*, se observa un pico con $t_{ret} = 20.56$ min, cuya intensidad en el cromatograma de *CML-BSA* es menor en comparación con el cromatograma de *BSA* (Figura 22 b presenta la ampliación de esta región de cromatograma). Es importante señalar que, de acuerdo con la reactividad de *OPA*, la lisina forma un solo derivado. Los resultados obtenidos

confirman que, al incubar la albúmina con el ácido glicoxálico, ocurrió la modificación de lisina contenida en la estructura de proteína formando *CML-BSA*.

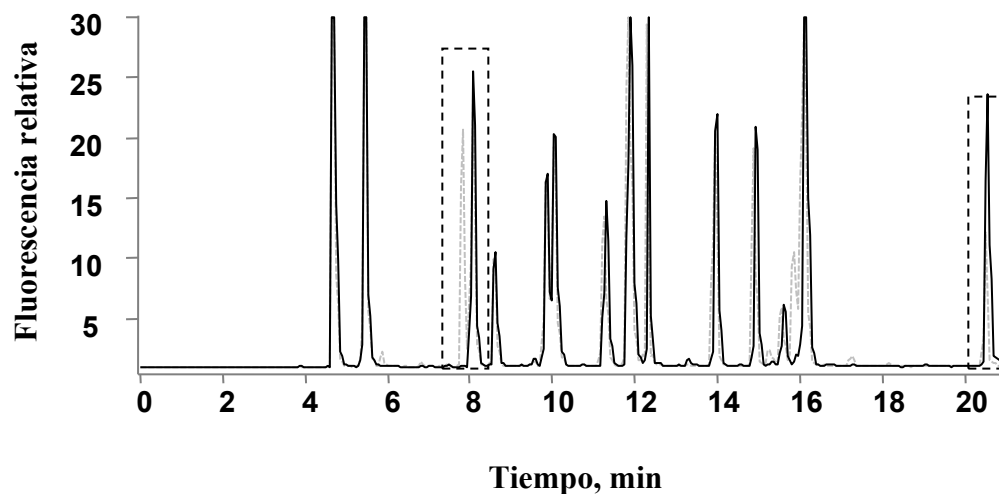


Figura 21. Cromatograma de hidrolizado de albúmina modificada (----) y de albúmina sin modificar (—) después de la derivatización con *OPA* (Las condiciones cromatográficas se describen en el texto).

Finalmente, en base a medición de áreas de picos cromatográficos, se evaluó el grado de conversión de lisina en *CML* en *BSA* modificado por incubación con el ácido glicoxálico. Los porcentajes de conversión obtenidos en el procedimiento con *AQC* y con *OPA* fueron $52.4 \pm 9.7 \%$ y $62.3 \pm 4.1 \%$ respectivamente. Aceptable concordancia entre estos resultados confirma la validez de ambos procedimientos empleados. Por otra parte, el grado de conversión de lisina a *CML* fue relativamente alto, por lo que *CML-BSA* obtenida en el estudio puede ser utilizada como estándar de este *AGE* y también puede emplearse en la producción de anticuerpos contra *CML*.

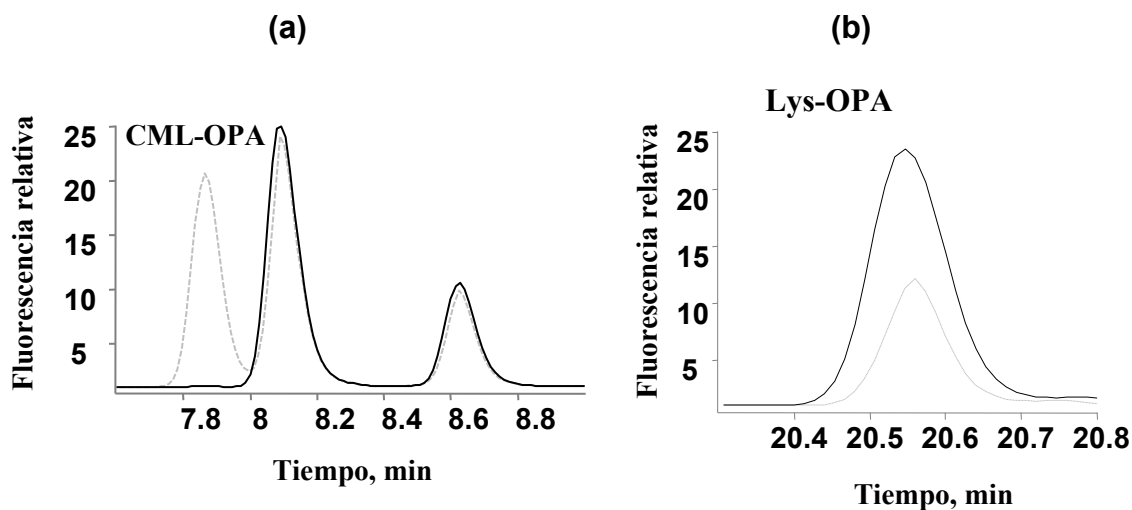


Figura 22. Aumento de dos regiones de cromatogramas presentados en la Figura 21, correspondientes a la elución de: **(a)** *CML* derivatizada con *OPA* y **(b)** *Lys-OPA*

4.4. Empleo de dos agentes derivatizantes (*OPA* y *AQC*) en el análisis de albúmina modificada (*CML-BSA*) y sin modificar (*BSA*)

De acuerdo con los esquemas de reacciones de aminas con *OPA* y *AQC* presentadas en las Figuras 11 y 12 (Introducción), los resultados presentados en la sección anterior confirman la diferente reactividad de estos dos compuestos con grupos amino primarias ($-NH_2$) y secundarias ($-NH-$). Así, aminas primarias forman un solo derivado con *OPA*, mientras que en la reacción con *AQC* se forman dos derivados (*CML-AQC* y *CML-(AQC)₂*). La idea original en esta parte de trabajo ha sido llevar a cabo dos reacciones de derivatización en serie con el fin de aumentar la selectividad del procedimiento hacia las aminas secundarias (*CML*). Así, en la primera reacción con *OPA* se podría esperar su unión con aminas primarias y, al emplear el segundo reactivo derivatizante (*AQC*), solamente se llevaría a cabo la reacción con aminas secundarias. En consecuencia, utilizando las condiciones de detección espectrofluorimétrica para los derivados con *AQC*, es de esperar un menor

número de picos en el cromatograma, facilitando de esta manera la determinación de *CML*.

Para este experimento se tomaron 20 μL de hidrolizado de *BSA*, o de *CML-BSA*, se agregaron 80 μL de tampón de boratos (400 mM) y 20 μL de la solución *OPA* (10 mM). Se dejaron las muestras 5 minutos para completar la reacción y se les adicionaron 20 μL de la solución de *AQC* (10 mM). Después de 1 min, las muestras fueron introducidas al sistema cromatográfico (volumen de inyección 20 μL). La separación se llevó a cabo en la columna *LC-PAH C18* (150 x 4.6 mm, 5 μm) de Supelco, utilizando las condiciones de elución iguales que en el procedimiento propuesto para los derivados *AQC* (Tabla 1). Las condiciones de flujo en la columna (0.9 mL/min) y las condiciones de detección ($\lambda_{\text{ex}} = 245 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 395 \text{ nm}$) fueron los mismos que en el procedimiento propuesto.

Los cromatogramas de hidrolizados de *BSA* y de *CML-BSA* obtenidos se presentan en la Figura 23. De acuerdo con lo esperado, se observa la supresión de mayoría de los picos respecto a los cromatogramas obtenidos con un solo agente derivatizante (Figuras 19 y 21). Las mayores diferencias entre los dos cromatogramas se observan en las regiones de elución entre 8 - 10 y 18 - 20 min. La ampliación de estas regiones se presenta en las Figuras 24a y 24b respectivamente. En la Figura 24 a se observa claramente la formación de un nuevo pico de elución en el hidrolizado de *CML-BSA*, que no existe en el cromatograma de *BSA*. Puesto que el pico de elución de lisina derivatizada disminuyó como resultado de incubación de *BSA* con ácido glioxálico, el nuevo pico se puede adscribir a la formación de lisina modificada (*CML*). En cuanto a los compuestos derivatizados detectados en el cromatograma, se propone que *OPA* está unido al grupo $-\text{NH}_2$ libre de *CML* y *AQC* se une con el grupo $-\text{NH}-$. Es de notar que, el tiempo de retención de compuesto derivado (8.7 min, Fig. 24 a) no coincide con los tiempos de retención de derivado con *AQC* (4.4 min, 4.9 min, Fig. 20 a) ni con el de derivado con *OPA* (7.9 min, Fig. 22a). El carácter

más hidrófobo de la nueva especie parece confirmar que en este caso ocurre una derivatización doble.

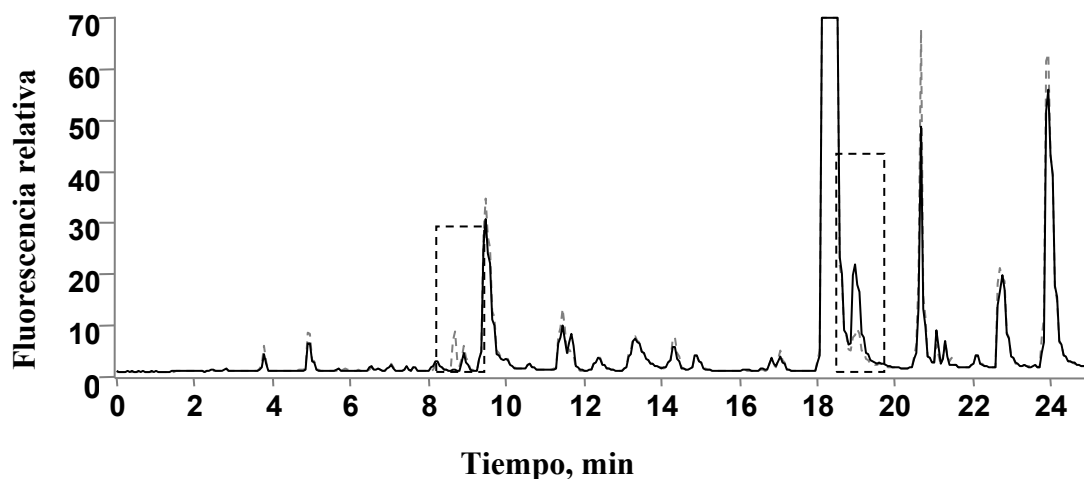


Figura 23. Cromatograma de hidrolizado de albúmina modificada (----) y de albúmina sin modificar (—) después de la derivatización con OPA y AQC (Las condiciones cromatográficas se describen en el texto).

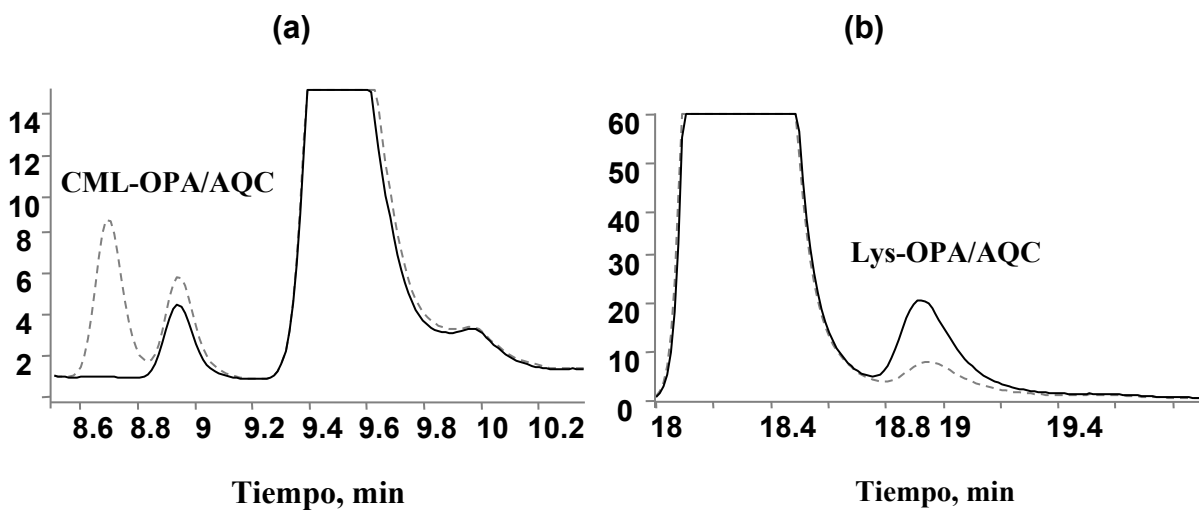


Figura 24. Aumento de dos regiones de cromatogramas presentados en la Figura 23, correspondientes a la elución de: **(a)** CML derivatizado y **(b)** Lys derivatizada

En el caso de lisina (Fig. 24 b), sus dos grupos $-NH_2$ deberían ser saturadas con *OPA* y de esta manera la sensibilidad de su detección en las condiciones empleadas ($\lambda_{ex} = 245$ nm, $\lambda_{em} = 395$ nm) debería ser mas baja respecto a las condiciones propuestas para el procedimiento con *OPA* ($\lambda_{ex} = 330$ nm, $\lambda_{em} = 450$ nm). Comparando la intensidad de picos de lisina derivatizada con *OPA* ($t_{ret} = 20.56$ min, Fig 22 b) con lisina en el procedimiento con *OPA* y *AQC* ($t_{ret} = 18.9$ min, Fig. 24 b), no se aprecia la diferencia esperada, lo que sugiere la formación de un derivado mixto *Lys – OPA/AQC*.

En conclusión, la derivatización con *OPA* y *AQC* en serie parece ser una interesante alternativa para estudios futuros, ya que los resultados preliminares indican la mayor selectividad de este procedimiento hacia los compuestos que contienen en su estructura los grupos de amina secundaria (*CML*).

4.5. Análisis de grado de conversión de lisina en N- ϵ (carboximetil)-lisina en muestras de alimentos.

De acuerdo con los objetivos, en última parte de trabajo, se llevó a cabo el análisis de alimentos provenientes del estudio clínico. Se analizaron 13 muestras, preparadas mediante homogeneización de alimentos utilizados en dietas de tres grupos experimentales. A partir de estas muestras se prepararon los extractos de proteínas de la siguiente manera: se pesaron 3 g de cada muestra, se le agregaron 3 mL de la solución NaOH 1 M (extracción alcalina). Posteriormente, se precipitaron las proteínas con acetonitrilo y después de una centrifugación, se eliminó el sobrenadante. Para la hidrólisis de proteínas, a la pastilla se le agregó 1 mL del ácido clorhídrico 6 M y los viales se calentaron a 120 °C durante 24 hrs. Posteriormente, las muestras se evaporaron hasta sequedad y los residuos se disolvieron en 250 μ l de tampón de boratos (400 mM, pH 9.5). Finalmente, para cada una de las muestras, se llevaron a cabo

dos procedimientos de derivatización y separación cromatográfica, propuestos en las secciones anteriores.

Para la derivatización con *OPA*, se tomaron 20 μL de hidrolizado de muestra de comida, 100 μL de tampón de boratos (400 mM) y se les agregaron 50 μL de la solución de *OPA* (40 mM). Las condiciones cromatográficas y de detección espectrofluorimétrica fueron iguales que aquellos utilizados en el análisis de albúmina (Tabla 2).

En la Figura 25 a se presenta el cromatograma de muestra de comida, clasificada de manera preliminar como “baja” en AGEs (línea continua) junto con el cromatograma de una mezcla de *CML* y lisina (línea punteada). En primer lugar, es de notar la presencia de lisina en el hidrolizado de comida ($t_{\text{ret}} = 20.56$, Fig. 25 b). Por otro lado, no se observa la elución de pico con el tiempo de retención correspondiente al derivado de *CML* (Fig. 25 a). De manera general, este resultado confirma la clasificación de la muestra como “baja” en AGEs.

De manera de un ejemplo, en la Figura 26 a se presentan cromatogramas obtenidos para tres diferentes muestras de comida y las ampliaciones de las dos regiones de interés (Fig 26 b y 26 c). En este caso, también se confirma la clasificación preliminar de las muestras como “altas” y “bajas” en AGEs. En particular, en el cromatograma de la muestra “alta” en AGEs se observa mayor contribución de *CML* respecto a las muestras “bajas” en AGEs. Por otra parte es de señalar la excelente reproducibilidad de los tiempos de retención de mayoría de los picos en los cromatogramas, correspondientes a derivados de amino ácidos presentes en el hidrolizado.

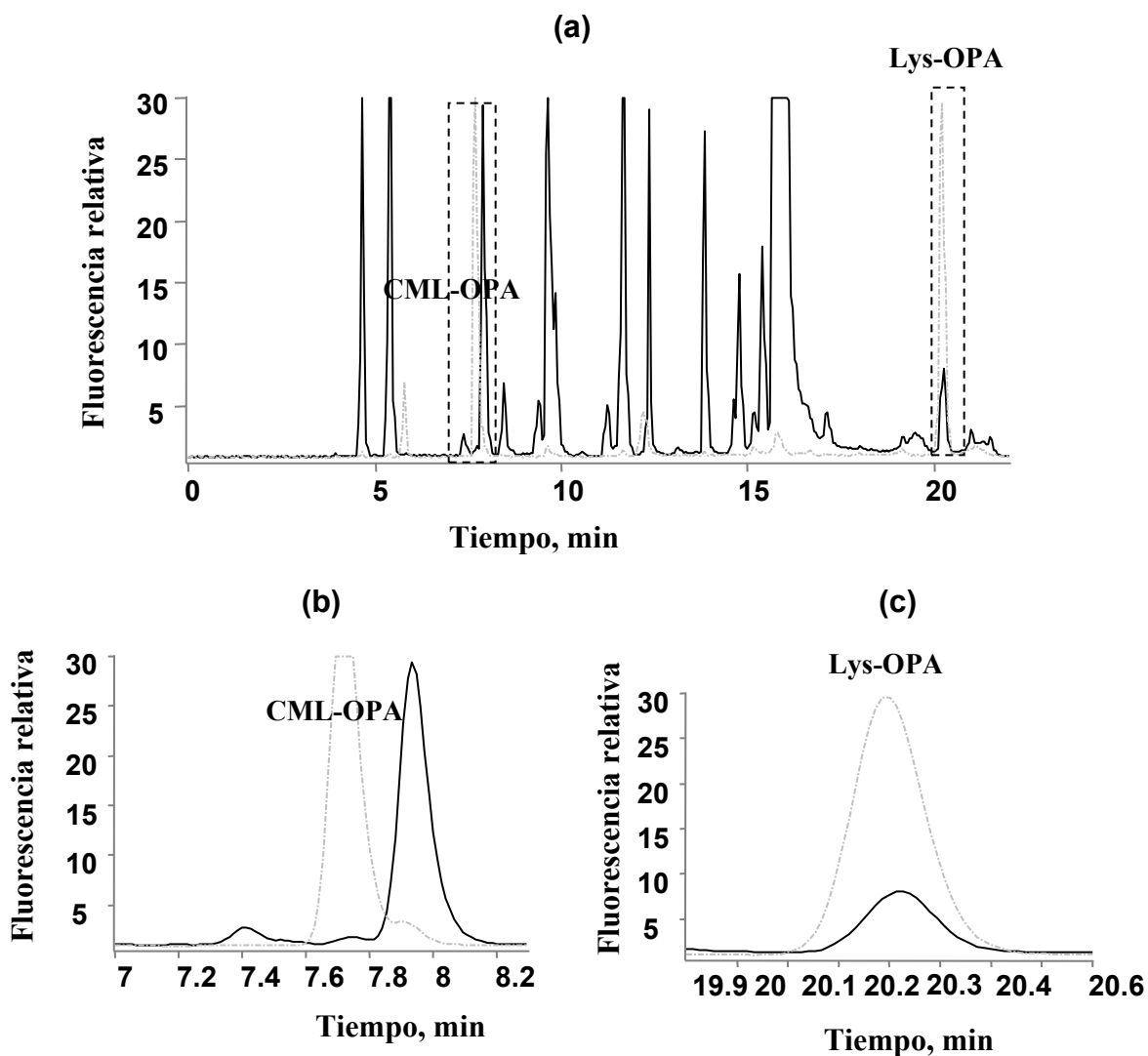


Figura 25. Cromatogramas de hidrolizado de muestra de comida (—) y de la mezcla de *CML* y lisina (---) utilizando el procedimiento de derivatización con *OPA*: (a) el cromatograma completo; (b) aumento de la región 7 – 8 min y (c) aumento de la región de cromatogramas 19.5 – 20.5 min.

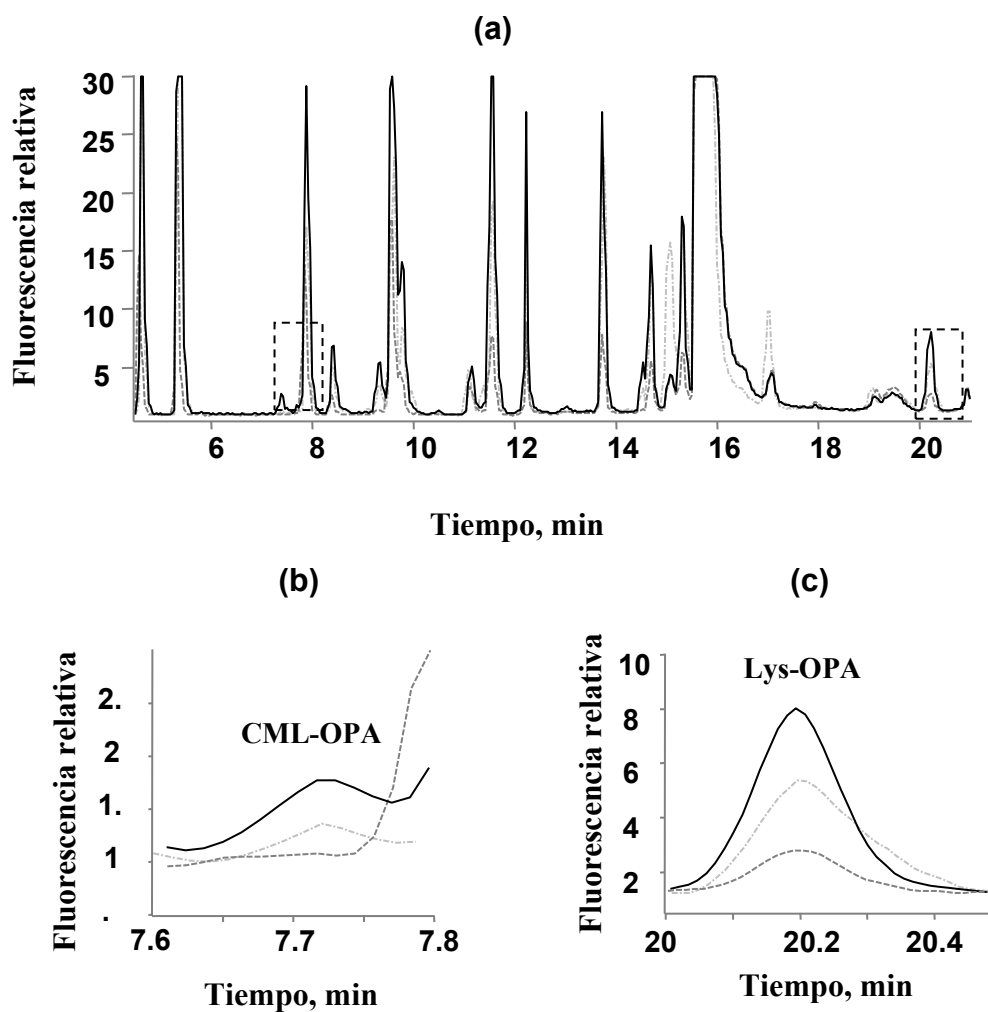


Figura 26. Cromatogramas de hidrolizado de la muestra de comida clasificada como “alta” en AGEs (—) y de dos muestras clasificadas como “bajas” en AGEs (.....) y (---), obtenidos utilizando el procedimiento de derivatización con OPA: **(a)** el cromatograma completo; **(b)** aumento de la región 7.6– 7.8 min y **(c)** aumento de la región de cromatogramas 20.0 – 20.5 min.

Las mismas trece muestras de los alimentos fueron analizadas utilizando como reactivo derivatizante el AQC. Se utilizaron las condiciones de

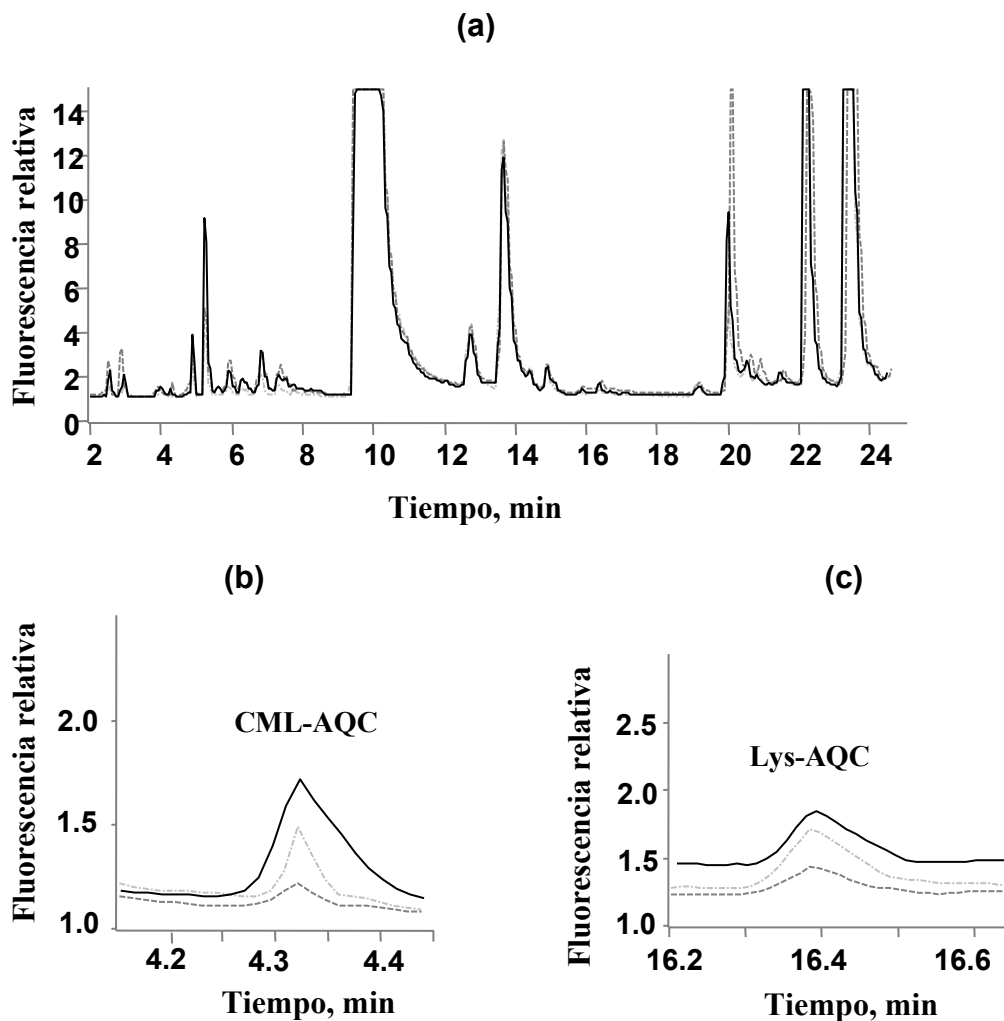


Figura 27. Cromatogramas de hidrolizados de las mismas muestras que se presentaron en la Figura 26, pero obtenidos utilizando el procedimiento de derivatización con AQC: muestra clasificada como “alta” en AGEs (—) y de dos muestras clasificadas como “bajas” en AGEs (.....) y (---): **(a)** el cromatograma completo; **(b)** aumento de la región 4.2 – 4.5 min y **(c)** aumento de la región de cromatogramas 16.2 – 16.6 min.

de separación cromatográfica y de detección espectrofluorimétrica, propuestas para el análisis de amino ácidos y de hidrolizado de CML-BSA. En la Figura 27 se presentan cromatogramas obtenidos en el análisis de las mismas muestras que se presentan en la Figura 26.

Los resultados obtenidos confirman la clasificación preliminar de las muestras como “altas” y “bajas” en AGEs y también confirman los resultados del análisis con OPA. Sin embargo, en el caso de derivatización con AQC, la magnitud de los picos cromatográficos fue significativamente menor respecto al procedimiento con OPA, lo que sugiere problemas en la etapa de pretratamiento y/o derivatización. En consecuencia, en el trabajo futuro es necesario estudiar más a fondo el proceso de pretratamiento de muestra y las condiciones de derivatización con AQC.

Para evaluar los porcentajes de conversión de lisina en CML en muestras analizadas, se tomaron los datos cromatográficos del procedimiento con OPA. Los resultados obtenidos en base a medición de área de los picos, se presentan en la Tabla 3. En esta Tabla, de nuevo puede observarse una buena concordancia entre la evaluación preliminar de alimentos y los datos de análisis semi-cuantitativo de CML. Por otra parte, los resultados obtenidos en este trabajo pueden ser utilizadas en el análisis estadístico de los resultados del estudio clínico, abriendo la posibilidad de buscar las correlaciones más específicas entre los niveles de CML en comida y los parámetros clínicos en pacientes del estudio.

Tabla 3. Los resultados semi-cuantitativos de la conversión de lisina en CML en muestras de alimentos, obtenidos en aplicación del procedimiento de derivatización pre-columna con OPA.

Muestra de comida	% de CML
BSA (blanco)	0
CML-BSA	62.3
Comida 1	17.2
Comida 2	1.8
Comida 3	2.4
Comida 4	2.6
Comida 5	2.9
Comida 6	0.8
Comida 7	2.8
Comida 8	1.8
Comida 9	2.8
Comida 10	3.0
Comida 11	2.3
Comida 12	3.3
Comida 13	2.6

Capítulo 5
Conclusiones

5. Conclusiones

El presente trabajo ha sido enfocado en el desarrollo de la metodología analítica para la determinación de algunos precursores de los *AGEs* en comida. Es necesario resaltar que, a pesar de relativamente extensa bibliografía sobre este tópico, no existen hoy en día los procedimientos analíticos confiables que aseguren el análisis cuantitativo de compuestos individuales. Los principales problemas analíticos se pueden clasificar en los siguientes puntos:

- Las rutas de formación de los *AGEs* endógenos y exógenos no se conocen con exactitud.
- Los *AGEs* forman un grupo de compuestos altamente heterogéneo y no todas estructuras de los *AGEs* han sido caracterizadas.
- Falta de estándares comerciales de los compuestos individuales (incluyendo *CML*).
- Falta de métodos y de materiales de referencia.
- Falta de selectividad de los métodos reportados.
- Existen discrepancias entre los resultados reportados por diferentes grupos de investigación.

Una vez realizada la búsqueda bibliográfica y el análisis comparativo de los datos reportados por diferentes autores, el trabajo se concentró en aplicación de cromatografía de líquidos con detección espectrofluorimétrica optando por dos agentes derivatizantes: *OPA* y *AQC*. De esta manera se pretendió asegurar buena selectividad del procedimiento hacia *CML*. Se planearon 5 etapas de trabajo, que se presentan a continuación, junto con las conclusiones específicas formuladas en base a los resultados obtenidos.

ETAPA I: Síntesis y caracterización cromatográfica de N- ϵ (carboximetil)-lisina y de furosina.

Se logró la síntesis de ambos compuestos, mediante la modificación de las condiciones reportadas en literatura. Como resultado de estas modificaciones, se aumento el rendimiento de la síntesis hasta 33 % (22 % reportado en trabajos anteriores). Se propuso el procedimiento analítico basado en la derivatización pre-columna con AQC, separación por CLAR en fase inversa y detección espectrofluorimétrica de lisina, Z-Lys-OH, CML, t-BOC-Lys-OH y furosina con un tiempo de separación de 15 min. Este procedimiento permite llevar a cabo el control analítico de la síntesis de los precursores de AGEs.

ETAPA II: Estudio de la derivatización pre-columna en la separación de amino ácidos por cromatografía de líquidos de alta resolución en fase inversa

Esta etapa fue necesaria para asegurar la resolución de CML de otros compuestos que contienen en su estructura grupos amino y por lo tanto forman derivados fluorescentes con AQC. En el caso de análisis de alimentos, principalmente se trata de amino ácido. Se desarrollo un procedimiento cromatográfico, que permite resolver la mezcla de 16 amino ácidos en 22 min, lo que forma una contribución importante en términos de acortar el tiempo de análisis (otros autores reportaron el procedimiento, en el que la separación duró 45 min [99]. En particular, se demostró también que, el procedimiento cromatográfico propuesto asegura la resolución de derivados de lisina con AQC de otro amino ácidos esperados en las muestras de comida.

ETAPA III: Aplicación del procedimiento cromatográfico desarrollado en la evaluación de grado de conversión de lisina en N-ε (carboximetil)-lisina en albúmina

Para demostrar la utilidad del procedimiento cromatográfico en la determinación de *CML*, en esta etapa se obtuvo la albúmina modificada con *CML*, mediante la incubación de *BSA* con ácido glioxálico. Se obtuvo la resolución cromatográfica de *CML-AQC* de los derivados de otros amino ácidos presentes en hidrolizado de *CML-BSA*. El porcentaje de conversión de lisina en *CML* fue de 52.4 ± 9.7 %. Los resultados obtenidos fueron confirmados, utilizando un procedimiento cromatográfico alternativo, basado en la derivatización de aminas primarias con *OPA*. En este caso, el porcentaje de conversión evaluado fue 62.3 ± 4.1 %. Es de resaltar la buena concordancia entre los resultados de los dos procedimientos cromatográficos, lo que indica la validez del procedimiento desarrollado con *AQC*. Por otra parte, el grado de conversión de lisina a *CML* fue relativamente alto, por lo que *CML-BSA* obtenida en el estudio puede ser utilizada como estándar de este *AGE* y también puede emplearse en la producción de anticuerpos contra *CML*.

ETAPA IV: Empleo de dos agentes derivatizantes (*OPA* y *AQC*) en el análisis de albúmina modificada (*CML-BSA*) y sin modificar (*BSA*)

La idea original ha sido llevar a cabo dos reacciones de derivatización en serie con el fin de aumentar la selectividad del procedimiento hacia las aminas secundarias (*CML*). Así, en la primera reacción con *OPA* se podría esperar su unión con aminas primarias y, al emplear el segundo reactivo derivatizante (*AQC*), solamente se llevaría a cabo la reacción con aminas secundarias. En consecuencia, utilizando las condiciones de detección espectrofluorimétrica para los derivados con *AQC*, es de esperar un menor número de picos en el cromatograma, facilitando de esta manera la determinación de *CML* que

contiene en su estructura el grupo –NH-. Se realizaron solamente algunos experimentos preliminares, pero los resultados obtenidos fueron alentadores. En futuro, es necesario llevar a cabo un estudio sistemático enfocado a la elucidación de estructura de compuestos formados, de sus propiedades cromatográficas y fluorescentes.

ETAPA V: Análisis de grado de conversión de lisina en N-ε (carboximetil)-lisina en muestras de alimentos.

Utilizando dos procedimientos cromatográficos (derivatización pre-columna con *AQC*, o *OPA*), se analizaron 13 muestras de comida. Estas muestras fueron los homogenizados de alimentos utilizados en dietas de tres grupos experimentales. Los resultados obtenidos en los dos procedimientos presentaron relativamente buena concordancia y además confirmaron la clasificación preliminar de las muestras como “altas” y “bajas” en *AGEs*. Sin embargo, en el caso de derivatización con *AQC*, la magnitud de los picos cromatográficos fue significativamente menor respecto al procedimiento con *OPA*. La solución de problemas relacionados con la etapa de pre-tratamiento y/o derivatización requiere de un estudio sistemático. En base a los cromatogramas con *OPA*, se obtuvieron resultados semi-cuantitativos de los porcentajes de conversión de lisina en *CML* en alimentos analizados. Estos datos son muy útiles para el análisis estadístico de los resultados del estudio clínico, ya que permiten buscar las correlaciones más específicas entre los niveles de *CML* en comida y los parámetros clínicos en pacientes del estudio.

Referencias

- [1] Xu, B., Chibber, R., Ruggiero, D., Kohner, E., Ritter, J. and Ferro, A. (2003) *Faseb J* 17, 1289-91.
- [2] Rudeman, N., Williamson, J. and Brownlee, M. (1992) *Faseb J* 6, 2905-2914.
- [3] Mendez, J.D. (2003) *Gac Med Mex* 139, 49-55.
- [4] Miura, J., Yamagishi, S., Uchigata, Y., Takeuchi, M., Yamamoto, H., Makita, Z. and Iwamoto, Y. (2003) *J Diabetes Complications* 17, 16-21.
- [5] Bucala, R. and Vlassara, H. (1995) *Am J Kidney Dis* 26, 875-88.
- [6] Cohen, M.P. and Ziyadeh, F.N. (1996) *J Am Soc Nephrol* 7, 183-90.
- [7] Daimon, M. et al. (1999) *Diabetes Care* 22, 877-8.
- [8] Dominguez, J.H. et al. (2000) *Kidney Int* 57, 92-104.
- [9] Friedman, E.A. (1999) *Diabetes Care* 22 Suppl 2, B65-71.
- [10] Kalousova, M., Zima, T., Tesar, V., Stipek, S. and Sulkova, S. (2004) *Kidney Blood Press Res* 27, 18-28.
- [11] Endo, M. et al. (2001) *Horm Metab Res* 33, 317-22.
- [12] Hirata, K. and Kubo, K. (2004) *Endocr J* 51, 537-44.
- [13] Karachalias, N., Babaei-Jadidi, R., Ahmed, N. and Thornalley, P.J. (2003) *Biochem Soc Trans* 31, 1423-5.
- [14] Singh, R., Barden, A., Mori, T. and Beilin, L. (2001) *Diabetologia* 44, 129-46.
- [15] Wrobel, K., Garay-Sevilla, M.E., Malacara, J.M., Fajardo, M.E. and Wrobel, K. (1999) *Tr Elem Electrol* 16, 199-205.
- [16] Tietz.
- [17] Turk, Z., Mesic, R. and Benko, B. (1998) *Clin Chim Acta* 277, 159-70.
- [18] Vlassara, H., Brownlee, M. and Cerami, A. (1986) *Clin Chem* 32, B37-41.
- [19] Urata, Y. et al. (2002) *Free Radic Biol Med* 32, 688-701.
- [20] Lalla, E., Lamster, I.B., Stern, D.M. and Schmidt, A.M. (2001) *Ann Periodontol* 6, 113-8.
- [21] Makino, H. et al. (1996) *Nephrol Dial Transplant* 11 Suppl 5, 76-80.
- [22] Garay-Sevilla, M.E., Nava, L.E., Malacara, J.M., Wrobel, K. and Perez, U. (2000) *Diabetes Metab Res Rev* 16, 106-13.
- [23] Garay-Sevilla, M.E., Regalado, J.C., Malacara, J.M., Nava, L.E., Wrobel, K., Casrto-Rivas, A. and Wrobel, K. (2005) *J Endocrinol Invest* 28, 223-230.
- [24] DeGroot, J. (2004) *Curr Opin Pharmacol* 4, 301-5.
- [25] Krone, C.A. and Ely, J.T. (2004) *Med Hypotheses* 62, 275-9.
- [26] Makita, Z., Vlassara, H., Rayfield, E., Cartwright, K., Friedman, E., Rodby, R., Cerami, A. and Bucala, R. (1992) *Science* 258, 651-3.
- [27] Bierhaus, A., Hofmann, M.A., Ziegler, R. and Nawroth, P.P. (1998) *Cardiovasc Res* 37, 586-600.
- [28] Hofmann, S.M. et al. (2002) *Diabetes* 51, 2082-9.
- [29] He, C., Sabol, J., Mitsuhashi, T. and Vlassara, H. (1999) *Diabetes* 48, 1308-15.

- [30] Vlassara, H. and Palace, M.R. (2002) *J Intern ed* 251, 87-101.
- [31] Goldberg, T., Cai, W., Peppia, M., Dardaine, V., Baliga, B.S., Uribarri, J. and Vlassara, H. (2004) *J Am Diet Assoc* 104, 1287-91.
- [32] Koschinsky, T., He, C.J., Mitsuhashi, T., Bucala, R., Liu, C., Buenting, C., Heitmann, K. and Vlassara, H. (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6474-9.
- [33] Goldberg, T., Cai, W., Peppia, M. and Vlassara, H. (2003) *Diabetes* 52(Suppl.1), A167.
- [34] Artenie, A., Artenie, R., Ungureanu, D., Haulica, I. and Artenie, V. (2003) *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 107, 727-32.
- [35] Horvat, S. and Jakas, A. (2004) *J Pept Sci* 10, 119-37.
- [36] Thornalley, P.J., Langborg, A. and Minhas, H.S. (1999) *Biochem J* 344, 109-116.
- [37] Kumano, K. et al. (1997) *Adv Perit Dial* 13, 53-7.
- [38] Sell, D.R. (1997) *Mech Ageing Dev* 95, 81-99.
- [39] Sell, D.R. et al. (2003) *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 58, 508-16.
- [40] Weiss, M.F., Erhard, P., Kader-Attia, F.A., Wu, Y.C., Deoreo, P.B., Araki, A., Glomb, M.A. and Monnier, V.M. (2000) *Kidney Int* 57, 2571-85.
- [41] Niwa, T. (1999) *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 731, 23-36.
- [42] Niwa, H., Takeda, A., Wakai, M., Miyata, T., Yasuda, Y., Mitsuma, T., Kurokawa, K. and Sobue, G. (1998) *Biochem Biophys Res Commun* 248, 93-7.
- [43] Hanssen, K.F. (1998) *Int Diabetes Monitor* 10, 1-5.
- [44] Ahmed, N., Argirov, O.K., Minhas, H.S., Cordeiro, C.A. and Thornalley, P.J. (2002) *Biochem J* 364, 1-14.
- [45] Meerwaldt, R. et al. (2004) *Diabetologia* 47, 1324-30.
- [46] Bar, K.J., Franke, S., Wenda, B., Muller, S., Kientsch-Engel, R., Stein, G. and Sauer, H. (2003) *Neurobiol Aging* 24, 333-8.
- [47] Ahmed, N., Dobler, D., Dean, M. and Thornalley, P.J. (2005) *J Biol Chem* 280, 5724-32.
- [48] Glomb, M.A. and Monnier, V.M. (1995) *J Biol Chem* 270, 10017-26.
- [49] Anderson, M.M., Requena, J.R., Crowley, J.R., Thorpe, S.R. and Heinecke, J.W. (1999) *J Clin Invest* 104, 103-13.
- [50] Hamada, Y., Araki, N., Koh, N., Nakamura, J., Horiuchi, S. and Hotta, N. (1996) *Biochem Biophys Res Commun* 228, 539-43.
- [51] Hamada, Y. et al. (2000) *Diabetes Care* 23, 1539-44.
- [52] Dunn, J.A., McCance, D.R., Thorpe, S.R., Lyons, T.J. and Baynes, J.W. (1991) *Biochemistry* 30, 1205-10.
- [53] Dunn, J.A., Ahmed, M.U., Murtiashaw, M.H., Richardson, J.M., Walla, M.D., Thorpe, S.R. and Baynes, J.W. (1990) *Biochemistry* 29, 10964-70.
- [54] Dworacka, M., Winiarska, H., Szymanska, M., Szczawinska, K. and Wierusz-Wysocka, B. (2002) *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 13, 201-13.
- [55] Petrovic, R., Futas, J., Chandoga, J. and Jakus, V. (2005) *Biomed Chromatogr* 19, 649-654.

- [56] Friess, U., Waldner, M., Wahl, H.G., Lehmann, R., Haring, H.U., Voelter, W. and Schleicher, E. (2003) *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 794, 273-80.
- [57] Erbersdobler, H.F. (1989) *Bibl Nutr Dieta*, 140-55.
- [58] Aoki, Y., Yanagisawa, Y., Oguchi, H. and Furuta, S. (1992) *Metabolism* 41, 1025-7.
- [59] Kilhovd, B.K., Giardino, I., Torjesen, P.A., Birkeland, K.I., Berg, T.J., Thornalley, P.J., Brownlee, M. and Hanssen, K.F. (2003) *Metabolism* 52, 163-7.
- [60] Krajcovicova-Kudlackova, M., Sebekova, K., Schinzel, R. and Klvanova, J. (2002) *Physiol Res* 51, 313-6.
- [61] Melling, M., Pfeiler, W., Karimian-Teherani, D., Schnallinger, M., Sobal, G., Zangerle, C. and Menzel, E.J. (2000) *Anat Rec* 259, 327-33.
- [62] Coussons, P.J., Jacoby, J., McKay, A., Kelly, S.M., Price, N.C. and Hunt, J.V. (1997) *Free Radic Biol Med* 22, 1217-27.
- [63] Galler, A., Muller, G., Schinzel, R., Kratzsch, J., Kiess, W. and Munch, G. (2003) *Diabetes Care* 26, 2609-15.
- [64] Horiuchi, S., Shiga, M., Araki, N., Takata, K., Saitoh, M. and Morino, Y. (1988) *J Biol Chem* 263, 18821-6.
- [65] Jakas, A. and Horvat, S. (2003) *Biopolymers* 69, 421-31.
- [66] Makita, Z., Radoff, S., Rayfield, E.J., Yang, Z., Skolnik, E. and Delaney, V. (1991) *N Engl J Med* 325, 836-41.
- [67] Wrobel, K., Garay-Sevilla, M.E., Nava, L.E. and Malacara, J.M. (1997) *Clin Chem* 43, 1563-9.
- [68] Garay-Sevilla, M.E., Regalado, J.C., Malacara, J.M., Nava, L.E., Wrobel, K., Castro-Rivas, A. and Wrobel, K. (2005) *J Endocrinol Invest* 28, 223-230.
- [69] Turk, Z., Ljubic, S., Turk, N. and Benko, B. (2001) *Anal Chim Acta* 303, 105-115.
- [70] Makita, Z., Vlassara, H., Cerami, A. and Bucala, R. (1992) *J Biol Chem* 267, 5133-5138.
- [71] Vlassara, H., Striker, L.J., Teichberg, S., Fuh, H., Li, Y.M. and Steffes, M. (1994) *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 11704-11708.
- [72] Yang, C.W., Vlassara, H., Striker, G.E. and Striker, L.J. (1995) *Kidney Int* 47(Suppl), S55-S58.
- [73] Farboud, B., Aotaki-Keen, A., Miyata, T., Hjelmeland, L.M. and Handa, J.T. (1999) *Mol Vis* 5, 11.
- [74] Schalkwijk, C.G., Baidoshvili, A., Stehouwer, C.D., van Hinsbergh, V.W. and Niessen, H.W. (2004) *Biochim Biophys Acta* 1636, 82-9.
- [75] Kobayashi, S., Suzuki, M., Tsuneki, H., Nagai, R., Horiuchi, S. and Hagino, N. (2004) *Biol Pharm Bull* 27, 1565-71.
- [76] Taneda, S. and Monnier, V.M. (1994) *Clin Chem* 40, 1766-1773.
- [77] Papanastiou, P., Grass, L., Rodela, H., Patrikarea, A., Oreopoulos, D. and Diamandis, E.P. (1994) *Kidney Int* 46, 216-222.

- [78] Brancaccio, D., Gallieni, M., Niwa, T., Braidotti, P. and Coggi, G. (2000) *J Nephrol* 13, 129-36.
- [79] Hamelin, M., Borot-Laloi, C., Friguet, B. and Bakala, H. (2003) *Arch Biochem Biophys* 411, 215-22.
- [80] Hoshii, Y., Kawano, H., Gondo, T., Takahashi, M., Ishihara, T., Higuchi, K. and Horiuchi, S. (1996) *Pathol Int* 46, 738-42.
- [81] Kamalvand, G. and Ali-Khan, Z. (2004) *Free Radic Biol Med* 36, 657-64.
- [82] Onorato, J.M., Thorpe, S.R. and Baynes, J.W. (1998) *Ann N Y Acad Sci* 854, 277-90.
- [83] Chibber, R., Molinatti, P.A. and Kohner, E.M. (1999) *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 45, 47-57.
- [84] Kiho, T., Usui, S., Hirano, K., Aizawa, K. and Inakuma, T. (2004) *Biosci Biotechnol Biochem* 68, 200-5.
- [85] Ko, L.W., Ko, E.C., Nacharaju, P., Liu, W.K., Chang, E., Kenessey, A. and Yen, S.H. (1999) *Brain Res* 830, 301-13.
- [86] Mironova, R., Niwa, T., Hayashi, H., Dimitrova, R. and Ivanov, I. (2001) *Mol Microbiol* 39, 1061-8.
- [87] Zarina, S., Zhao, H.R. and Abraham, E.C. (2000) *Mol Cell Biochem* 210, 29-34.
- [88] Cerami, A., Vlassara, H. and Brownlee, M. (1988) *Diabetes Care* 11 Suppl 1, 73-9.
- [89] Cai, J. and Hurst, H.E. (1999) *J Mass Spectrom* 34, 537-43.
- [90] Henle, T., Deppisch, R., Beck, W., Hergesell, O., Hansch, G.M. and Ritz, E. (1999) *Nephrol Dial Transplant* 14, 1968-75.
- [91] Liu, H., Cho, B.Y., Krull, I.S. and Cohen, S.A. (2001) *J Chromatogr A* 927, 77-89.
- [92] Odetti, P., Fogarty, J., Sell, D.R. and Monnier, V.M. (1992) *Diabetes* 41, 153-9.
- [93] Requena, J.R., Vidal, P. and Cabezas-Cerrato, J. (1993) *Diabetes Res Clin Pract* 19, 23-30.
- [94] Cohen, C.D. and Michaud, D.P. (1993) *Anal Biochem* 211, 279-287.
- [95] Cohen, S.A. and Michaud, D.P. (1993) *Anal Biochem* 211, 279-87.
- [96] De Antonis, K.M., Brown, P.R. and Cohen, S.A. (1994) *Anal Biochem* 223, 191-7.
- [97] Merali, S. and Clarkson, A.B., Jr. (1996) *J Chromatogr B Biomed Appl* 675, 321-6.
- [98] Blau, K., Halket, J. and (Eds) (1996) John Wiley & Sons, Chichester.
- [99] Bosch, L., Alegria, A. and Farre, R. (2006) *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 831, 176-83.
- [100] Henle, T. (2003) *Kidney Int Suppl*, S145-7.
- [101] Sebekova, K., Faist, V., Hofmann, T., Schinzel, R. and Heidland, A. (2003) *Am J Kidney Dis* 41, S48-51.
- [102] Vlassara, H., Cai, W., Crandall, J., Goldberg, T., Oberstein, R., Dardaine, V., Peppas, M. and Rayfield, E.J. (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15596-601.

- [103] Uribarri, J., Peppia, M., Cai, W., Goldberg, T., Lu, M., Baliga, S., Vassalotti, J.A. and Vlassara, H. (2003) *Am J Kidney Dis* 42, 532-8.
- [104] Sebekova, K., Krajcovicova-Kudlackova, M., Schinzel, R., Faist, V., Klvanova, J. and Heidland, A. (2001) *Eur J Nutr* 40, 275-81.
- [105] Zheng, F., He, C., Cai, W., Hattori, M., Steffes, M. and Vlassara, H. (2002) *Diabetes Metab Res Rev* 18, 224-37.
- [106] Masoro, E.J., Katz, M.S. and McMahan, C.A. (1989) *J Gerontol* 44, B20-2.
- [107] Uribarri, J., Peppia, M., Cai, W., Goldberg, T., Lu, M., He, C. and Vlassara, H. (2003) *J Am Soc Nephrol* 14, 728-731.
- [108] Zheng, F., He, C., Li, J. and Vlassara, H. (2000) *Diabetes* 49Suppl, A161.
- [109] Novelli, M., Masiello, P., Bombara, M. and Bergamini, E. (1998) *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 53, B94-101.
- [110] Teillet, L., Verbeke, P., Gouraud, S., Bakala, H., Borot-Laloi, C., Heudes, D., Bruneval, P. and Corman, B. (2000) *J Am Soc Nephrol* 11, 1488-97.
- [111] Humeny, A., Kislinger, T., Becker, C.M. and Pischetsrieder, M. (2002) *J Agric Food Chem* 50, 2153-2160.
- [112] Ferreira, A.E., Ponces Freire, A.M. and Voit, E.O. (2003) *Biochem J* 376, 109-21.
- [113] Borrebaek, J., Prydz, K., Fjeldstad, K., Vuong, T.T., Berg, T.J., Holkov, C. and Kolset, S.O. (2001) *Diabetologia* 44, 488-94.
- [114] Glomb, M. and Monnier, V.M. (1995) *J Biol Chem* 270, 10017-10026.
- [115] Henle, T. (2005) *Amino Acids* DOI 10.1007/s00726-005-0200-2.
- [116] Ahmed, M.U., Brinkmann Frye, E., Degenhardt, T.P., Thorpe, S.R. and Baynes, J.W. (1997) *Biochem J* 324 (Pt 2), 565-70.
- [117] Ahmed, M.U., Thorpe, S.R. and Baynes, J.W. (1986) *J Biol Chem* 11, 4889-4894.