

Universidad de Guanajuato
Campus Guanajuato
División de Ciencias Naturales y Exactas
Posgrado en Química



**“Marcadores de Estrés Oxidativo y de Glicación de Biomoléculas:
Desarrollo y Aplicación de Nuevos Procedimientos Analíticos”**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN QUÍMICA

PRESENTA

Q. Sarahí Jaramillo Ortiz

Guanajuato, Gto., a 19 de septiembre de 2017

Universidad de Guanajuato

Campus Guanajuato

División de Ciencias Naturales y Exactas

Posgrado en Química



Guanajuato, Gto., a 19 de septiembre de 2017

Por medio de la presente nos responsabilizamos de la autenticidad y originalidad del presente trabajo de investigación que lleva por título “Marcadores de Estrés Oxidativo y de Glicación de Biomoléculas: Desarrollo y Aplicación de Nuevos Procedimientos Analíticos”. Realizado por la Q. Sarahí Jaramillo Ortiz en el laboratorio del Departamento de Química de la sede Pueblito de Rocha de la Universidad de Guanajuato, para obtener el grado de Doctor en Química bajo la dirección del Dr. Kazimierz Wrobel, Dra. Katarzyna Wrobel y la Dra. Ma. Eugenia Garay Sevilla.

“La verdad os hará libres”

Dr. Kazimierz Wrobel

Dra. Katarzyna Wrobel

Dra. Ma. Eugenia Garay Sevilla

Miembros del jurado asignados para el examen que para obtener el grado de Doctor en Química presenta la Q. Sarahí Jaramillo Ortiz.

Dr. Jorge Molina Torres

Dra. Claudia Luévano Contreras

Dr. Armando Gómez Ojeda

Dra. Alma Rosa Corrales Escobosa

Dra. Eunice Yáñez Barrientos

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores, Dr. Kazimierz Wrobel, Dra. Katarzyna Wrobel y Dra. Maru Garay.

A Omar, mi compañero de vida, amigo y cómplice por ser mi apoyo incondicional en todo momento.

A Isaac por traer más alegría a mi vida y ser mi fuente de motivación e inspiración.

A mi mamá Sara por hacer de mi la persona que soy.

A mis hermanos, Laura, Daniel, Mariela, Luis, Ale, Sasy y Emiliano, por su apoyo. Mención especial a Ale, porque sin planearlo la convertí en mamá.

A Aby por estar siempre presente y brindarme su amistad incondicional.

A mis compañeros de laboratorio Armando, Vellayudam, Missael, Tin y Panchito.

A Doña Valentina, Don Pedro, Sandra, Martha, Juan, Pedro y sobrinos por acogerme y abrirme las puertas de su hogar.

A la Universidad de Guanajuato por permitirme tener el honor de formar parte de esta casa de estudios.

A los miembros del jurado calificador por su tiempo empleado en la revisión de mi proyecto, por las correcciones, observaciones y aportaciones tan valiosas hechas a mi trabajo.

A CONACyT por el apoyo financiero durante mis estudios.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE TABLAS	VII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VIII
RESUMEN	10
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	14
I.1 Diabetes mellitus y biomarcadores típicos	14
I.1.2 Los AGEs y la diabetes mellitus	19
I.2 Estrés oxidativo y su papel en la formación de los AGEs.....	19
I.3 Formación de productos finales de glicación avanzada	25
I.3.1 Glioxal y metilglioxal como precursores de AGEs	29
I.4 AGEs endógenos y exógenos	31
I.5 Principales AGEs y su importancia	34
I.5.1 N ^ε -carboximetil-lisina	34
I.5.2 N ^ε -carboxietil-lisina	36
I.5.4 Pirralina.....	38
I.5.5 Argpirimidina.....	39
I.5.6 N ^ω -carboximetil-arginina	40
I.5.7 DOLD, MOLD, GOLD.....	40
I.5.8 MGH1, MGH2 Y MGH3.....	41
I.6 Determinación de los AGEs	42
1.6.1 Ensayos simples para AGEs fluorescentes.....	43
1.6.2 Métodos inmunoquímicos	44
I.6.3 Métodos analíticos basados en separaciones por cromatografía de líquidos.....	45
CAPITULO II. OBJETIVOS	60
II.1 Objetivo general	60

II.1.1 Objetivos específicos	60
CAPÍTULO III. PARTE EXPERIMENTAL	61
III.1. Equipo de laboratorio.....	61
III.1.1 Instrumentación analítica	61
III.1.2. Equipos utilizados en el procesamiento de muestra y preparación de reactivos	62
III.2 Estándares y reactivos.....	62
III.3 Programas de análisis de datos	62
III.4 Material biológico.....	63
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	64
IV.1 SÍNTESIS Y PURIFICACIÓN DE N ^ε -CARBOXIMETIL-LISINA	64
IV.1.1 Introducción	64
IV.1.2 Objetivo particular	66
IV.1.3 Condiciones experimentales	66
IV.1.4 Resultados y discusión	67
IV.1.5 Conclusiones	71
IV.2 EFECTO DE LA PRESENCIA DE TIOLES EN LA FORMACIÓN DE N ^ε - CARBOXIMETIL-LISINA.....	72
IV.2.1 Introducción	72
IV.2.2 Objetivo particular	74
IV.2.3 Condiciones experimentales	75
IV.2.4 Resultados y discusión	76
IV.2.5 Conclusiones	82
IV.3 EFECTO DE LOS IONES ZINC Y COBRE EN LA FORMACIÓN DE N ^ε - CARBOXIMETIL-LISINA EN PRESENCIA DE TIOLES.....	83
IV.3.1 Introducción	83
IV.3.2 Objetivo particular	85
IV.3.3 Condiciones experimentales	85

IV.3.4 Resultados y discusión	86
IV.3.5 Conclusiones	91
IV.4 DESARROLLO DE UN PROCEDIMIENTO DE DETERMINACIÓN DE CML EN ALIMENTOS POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS EN FASE REVERSA CON DETECCIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM	92
IV.4.1 Introducción	92
IV.4.2 Objetivo particular	93
IV.4.3 Condiciones experimentales	93
IV.4.4 Resultados y discusión	95
IV.4.5 Conclusiones	106
IV.5 ESTUDIO DEL IMPACTO DE COBRE PRESENTE DURANTE ELABORACIÓN DE ALIMENTOS SOBRE EL CONTENIDO DE CML EN EL PRODUCTO FINAL	107
IV.5.1 Introducción	107
IV.5.2 Objetivo particular	108
IV.5.3 Condiciones experimentales	109
IV.5.4 Resultados y discusión	111
IV.5.5 Conclusiones	117
IV.6 DETERMINACIÓN DE N^ε-CARBOXIMETIL LISINA POR HPLC-ESI-ITMS/MS EN ALIMENTOS Y EVALUACIÓN COMPARATIVA DE ESTE MÉTODO CON ENSAYOS ELISA.....	119
IV.6.1 Introducción	119
IV.6.2 Objetivo Particular	120
IV.6.3 Condiciones experimentales	120
IV.6.4 Resultados y discusión	122
IV.6.5 Conclusiones	139
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES GENERALES	140
CAPÍTULO VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	143
ANEXO.....	157

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema general de las rutas por las que el estrés oxidativo puede contribuir a complicaciones en la diabetes y a los trastornos relacionados con el envejecimiento [29].	21
Figura 2. Impacto de la hiperglucemia en el estrés oxidativo y en la formación de los AGEs. O_2^- - radical superóxido; NOO^- - radical peroxinitrito [31].	23
Figura 3. Generación de ROS dependiente de glucosa y ácidos grasos en la mitocondria [31].	24
Figura 4. Esquema simplificado de las rutas de glicación, destacando el papel de los compuestos α -dicarbonilo y la formación de los tres AGEs determinados más a menudo: CML, CEL y pentosidina.	26
Figura 5. Rutas de formación y reacciones enzimáticas y no enzimáticas de metilglioxal [62].	30
Figura 6. Sistema glioxalasa responsable de la desintoxicación de metilglioxal y otros compuestos 1,2-dicarbonilo [62].	31
Figura 7. Rutas de la formación de CML en los sistemas alimentarios [74].....	33
Figura 8. Tres rutas de formación de CML [86].	35
Figura 9. Posibles mecanismos para la formación de CEL en la reacción de Maillard [89]...	36
Figura 10. Rutas enzimática y no enzimática para la formación in vivo de 3-desoxiglucosona, el precursor de pirralina [99].	39
Figura 11. Estructuras químicas de los dímeros de lisina. El grupo amino terminal NH_3^+ y el C terminal del grupo carboxilato $-CO_2^-$ es parte de los enlaces peptídicos en proteínas y péptidos.	41
Figura 12. Estructuras de AGEs derivados de arginina, MG-H1, MG-H2, MG-H3, CMA y CEA [59].....	42
Figura 13. Condiciones de reacción para la síntesis de ZCML.	67
Figura 14. Condiciones empleadas para la desprotección de ZCML.	68
Figura 15. Espectro de masas de N^e -carboximetil-lisina obtenido por infusión directa, ESI (+)-QTOF-MS.....	69
Figura 16. Espectro de fragmentación de N^e -carboximetil-lisina, obtenido por infusión directa, ESI (+)-QTOF-MS/MS.	69
Figura 17. Espectros de masas del a) Patrón isotópico experimental del ion molecular de N^e -carboximetil-lisina; b) patrón isotópico teórico del ion molecular de N^e -carboximetil-lisina.	70
Figura 18. Ruta de fragmentación del ion molecular protonado de CML [189].....	70
Figura 19. Estructuras químicas de los compuestos tiol de interés.	74
Figura 20. Cromatograma HPLC-DAD de ZLys (---) y de la mezcla de reacción de ZLys y AGO (—).....	77
Figura 21. Espectro ultravioleta de a) ZLys y b) ZCML. Absorción máxima 269 nm para ambos compuestos.	77
Figura 22. Espectro de masas de la fracción de la columna correspondiente a la elución de ZCML $C_{11}H_{22}N_2O_6$, $[M+H]^+$, 339.1551.....	78

Figura 23. Espectro de masas del patrón isotópico del $[H+H]^+ C_{11}H_{22}N_2O_6$, 339.1551. a) Espectro de masas del patrón isotópico teórico; b) patrón isotópico experimental.....	78
Figura 24. Cromatograma de la formación de ZCML empleando AGO (···) y GO (—) como agentes glicantes.	79
Figura 25. Cromatograma HPLC–DAD de la mezcla de ZLys con AGO (—) y la misma mezcla con adición de ACys (···).	80
Figura 26. Cromatograma HPLC–DAD de la formación de ZCML en ausencia (—) y presencia de los tioles: ACys (—); LCys (—); HCys (—); GSH (—).	80
Figura 27. Efecto de diferentes compuestos de tipo tiol en la formación de ZCML.	81
Figura 28. Cromatogramas HPLC-DAD de las mezclas de reacción conteniendo ZLys y AGO sin y con cada uno de los iones metálicos: Control (—); 25 nmol Zn(II) (—); 25 nmol Cu(II) (—).	87
Figura 29. Efecto de iones metálicos Cu(II) y Zn(II) en la formación de ZCML.	88
Figura 30. Estudio del efecto de los iones metálicos Zn(II) y Cu(II) en la formación de ZCML en presencia de compuestos de tipo tiol: Efecto de Zn(II) en la inhibición por a) ACys; c) GSH; e) efecto HCys; g) LCys; Efecto de Cu(II) en la inhibición b) ACys; d) GSH; f) HCys; h) LCys.	90
Figura 31. Mecanismo general de la derivatización de una amina con etilcloroformato, la reacción de alquilación con etilcloroformato convierte al grupo amino y ácidos orgánicos en ésteres y carbamatos, convirtiéndose en compuestos no polares [219].....	96
Figura 32. Reacción de derivatización de CML (masa molecular 204) con etilcloroformato en medio básico con etanol - piridina formando un derivado de CML de masa molecular 404...	97
Figura 33. Comparación de la derivatización de 1 mg/L de CML con etilcloroformato usando las mezclas metanol: piridina y etanol: piridina, ambas 4:1 v/v para MRM.	98
Figura 34. Cromatogramas en modo MRM que muestran la separación de (—) CML 250 µg/L 405→359 m/z de (—) fenilalanina, 266→220 m/z; cambiando el programa de elución. a) Gradiente de 60% a 95% de MeOH de 0 a 12 min. b) Programa de elución de 40% a 80% de MeOH de 0 a 17 min.	100
Figura 35. Cromatogramas obtenidos en modo MRM para: (—) fenilalanina, 266→220 m/z; (—) CML, 405→359 m/z; (—) CML-D ₂ , 407→361 m/z. a) Solución estándar con matriz igualada con muestras (CML 1000 µg/L, CML-D ₂ 200 µg/L). b) Salmón cocinado en cacerola de vidrio.	101
Figura 36. a) TIC obtenido de una muestra real, queso de cabra semi-curado (—) y para la mezcla de aminoácidos empleada en la calibración (---). b) TIC para la mezcla de aminoácidos empleado para igualar la matriz en la calibración (---) y EIC para los aminoácidos His 256 m/z, Pro 216 m/z, Glu 276 m/z, Met 250 m/z, Lys 319 m/z, Cys 294 m/z, Phe 266 m/z, CML 405 m/z, Tyr 354 m/z (—).	103
Figura 37. Cromatograma en modo MRM para el estándar de CML de 5 µg/L con una relación S/N de 25.5. Límites de detección 0.59 µg/L y límite de cuantificación 1.96 µg/L.....	104
Figura 38. Cromatogramas en modo MRM obtenidos para CML (405→359 m/z) analizando la muestra de salmón cocinado en cacerola de vidrio: (—) sin adición de estándar; (—) 100 ng CML adicionada antes de la hidrólisis ácida y (—) 300 ng CML adicionados.....	105

Figura 39. Relación de la concentración de cobre y CML encontradas en muestras de queso.	112
Figura 40. Concentraciones de CML encontradas en cuatro productos alimenticios cocinados en cacerolas de vidrio, Teflón® y cobre. Diferentes letras indican diferencias significativas estadísticamente encontradas a $p < 0.05$	114
Figura 41. Segunda derivada del espectro UV-Vis de las mezclas Cu:ZLys en una relación molar Cu:ZLys 1:0.8 a 1:20, Tabla 13.....	117
Figura 42. Cromatogramas típicos de HPLC-ESI-ITMS/MS adquiridos en modo MRM; a) — salmón a la parrilla 8 min (CML, 377→331 m/z); estándar interno CML-D ₂ , 150 µg/L, 379→333 m/z. b) — papa hervida y esta misma muestra después de la adición de estándar, 100 µg/L CML (CML, 377→331 m/z).	123
Figura 43. Estructuras moleculares de a) CML C ₁₆ H ₂₈ N ₂ O ₈ masa exacta 376.1846 y b) CML-D ₂ C ₁₆ H ₂₆ D ₂ N ₂ O ₈ masa exacta 378.1971 derivatizadas con etilclorofornato en medio metanol:piridina.....	124
Figura 44. Concentraciones de CML determinadas en los productos alimenticios por HPLC-ESI-ITMS/MS. Las barras muestran los valores promedio de tres réplicas con su respectiva desviación estándar.....	125
Figura 45. Análisis de correlación de los resultados obtenidos por los procedimientos individuales. La línea punteada muestra la regresión lineal marcando el intervalo de confianza a nivel de probabilidad 95%. a) resultados de ELISA con anticuerpo monoclonal anti-CML contra HPLC-ESI-ITMS/MS. b) resultados de ELISA con anticuerpo monoclonal anti-CML contra Lamider®.....	131
Figura 46. Comparación de las concentraciones de CML determinadas en bistec bajo diferente tratamiento culinario por cuatro métodos. Las barras muestran los valores promedio de tres réplicas con su respectiva desviación estándar; letras diferentes indican diferencias significativas estadísticamente, prueba t desapareada, $p < 0.05$	134
Figura 47. Concentraciones de CML encontradas en tres diferentes tratamientos culinarios de carne de pollo utilizando cada uno de los cuatro procedimientos. (Los histogramas presentan valores promedios con respectivas desviaciones estándar, para tres replicas independientes. Las letras diferentes indican diferencias significativas, prueba t desapareada, $p < 0.05$	135
Figura 48. Concentraciones de CML encontradas en dos diferentes tratamientos culinarios de salmón utilizando cada uno de los cuatro procedimientos. Los histogramas presentan valores promedios con respectivas desviaciones estándar, para tres replicas independientes. Las letras diferentes indican diferencias significativas, prueba t desapareada, $p < 0.05$	136
Figura 49. Modelo PCA obtenido para datos de CML y AGEs determinados en 18 alimentos por cuatro procedimientos: a) Gráfica de scores representa la distribución de los productos analizados en las coordenadas de los dos primeros componentes principales; b) Grafica de X-loadings muestra distribución de los cuatro procedimientos utilizados para la determinación de CML y AGEs en estos mismos alimentos.	138

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Criterios para el diagnóstico de diabetes, ADA 2016, [17].	16
Tabla 2. Diferentes tipos de especies reactivas libres [25].	20
Tabla 3. Resumen de algunos artículos publicados de los AGEs N ^ε -carboximetil-lisina y N ^ε -carboxietil-lisina por cromatografía de líquidos.	49
Tabla 4. Resumen de los últimos artículos publicados del análisis de los AGEs argpirimidina, pirralina, pentosidina y MG-H.	52
Tabla 5. Resumen de los últimos artículos publicados del análisis de AGEs por GC-MS.	55
Tabla 6. Resumen de los procedimientos empleados para la síntesis de CML.	65
Tabla 7. Preparación de las mezclas de reacción para el estudio del efecto de compuestos tipo tiol en la síntesis de CML in vitro.	75
Tabla 8. Condiciones cromatográficas utilizadas en el análisis de las muestras de CML.....	76
Tabla 9. Composición de las soluciones de calibración y muestras preparadas para la derivatización.....	94
Tabla 10. Resultados obtenidos en el método de adición de estándar realizado para queso de cabra fresco 1), salmón cocinado en cacerola de vidrio 2) y “carnitas” preparadas en cacerola de vidrio 3). El valor promedio con su respectiva desviación estándar se obtuvo basado en tres réplicas.....	105
Tabla 11. Resultados de la determinación de CML y Cu en muestras de queso.....	111
Tabla 12. Resultados de la determinación de CML y Cu en salmón, pollo, bistec y "carnitas" preparados en cacerolas de diferente material.....	113
Tabla 13. Composición de las muestras analizadas por espectroscopía UV/Vis, soluciones de Cu ²⁺ y Zlys 100 mM, en una relación molar Cu:ZLys 1:0.8 hasta 1:20 y λ_{\max} obtenida para cada una de las mezclas.	116
Tabla 14. Concentraciones de CML determinadas en productos alimenticios por HPLC-ESI-ITMS/MS, comparación con la base de datos de Uribarri y col, determinadas con ensayos ELISA. Se presenta el valor promedio con su respectiva desviación estándar para cada producto.....	126
Tabla 15. Análisis estadístico de correlación evaluando la consistencia de los resultados obtenidos para cada producto alimenticio usando cuatro diferentes procedimientos, valores promedio tomados para comparación $p \leq 0.05$	130
Tabla 16. Análisis estadístico de la correlación evaluando la consistencia de los resultados obtenidos para los productos alimenticios incluidos en la base de datos ELISA (Uribarri y col. 2010) usando cuatro procedimientos diferentes, valores promedio tomados por comparación $p \leq 0.05$	132

LISTA DE ABREVIATURAS

3-DG	3-desoxiglucosona
3DG-H1	Hidroimidazolona de arginina con 3-desoxiglucosona
Acys	<i>N</i> -acetil-cisteína
AGEs	Productos finales de glicación avanzada
AGO	Ácido glioxálico
ALEs	Productos finales de lipoxidación avanzada
AQC	Carbamato de 6- aminoquinolil- <i>N</i> -hidrosuccimida
CEA	Carboxietil-arginina
CEL	<i>N</i> ^ε -carboxietil-lisina
CMA	Carboximetil-arginina
CML	<i>N</i> ^ε -carboximetil-lisina
CML-D₂	<i>N</i> ^ε -carboximetil-lisina deuterada
DAD	Detector espectrofotométrico de arreglo de diodos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOLD	Dímero de oxiglucosona-lisina
ECF	Etilcloroformato
EIC	Cromatograma de Ion Extraído
ELISA	Ensayos por inmunosorción ligado a enzimas
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
ESI	Ionización por electronebulización
FID	Detector de ionización de flama
FLD	Detector fluorimétrico
GC	Cromatografía de Gases
G-H1	Hidroimidazolona de arginina con glioxal
GO	Glioxal
GODIC	Dímero glioxal arginina lisina
GOLD	Dímero de glioxal-lisina
GSH	Glutación
GSSG	Disulfuro de glutación
HbA1c	Hemoglobina glicosilada
HCys	Homocisteína
HEPES	Ácido etanosulfónico 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazina
HILIC	Cromatografía de interacción hidrofílica
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
HPLC-ESI-ITMS/MS	Cromatografía de líquidos de alta resolución con ionización por electro nebulización acoplada a espectrómetro de masas de trampa iónica

HPLC-ESI-QTOFMS	Cromatografía de líquidos de alta resolución con ionización por electro nebulización acoplada a espectrómetro de masas tiempo de vuelo
HSA	Albúmina de suero humano
ICP-MS	Espectrómetro de masas con ionización en plasma acoplado inductivamente
IS	Estándar Interno
LCys	L-Cisteína
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
MALDI-TOFMS	Espectrometría de masas con desorción/ionización mediante láser asistida por matriz tiempo de vuelo
MG-H1	<i>N</i> - δ -(5-hidro-5-metil-4-imidazol-2-il-ornitina
MG-H2	5-(2-amino-5-hidro-5-metil-4-imidazol-1-il) norvalina
MG-H3	(5-(2-amino-4-hidro-4-metil-5-imidazol-1-il) norvalina)
MGO	Metilglioxal
MOLD	Dímero de metilglioxal-lisina
MRM	Monitoreo de Reacciones Múltiples
MS	Espectrometría de Masas
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótida
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NFPA	Ácido nonafluoropentanoico
NIST	National Institute of Standards and Technology
OPA	<i>o</i> -ftaldialdehído
PCA	Análisis de Componentes Principales
RAGEs	Receptores de AGEs
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SIM	Monitoreo de Ion Selectivo
SPS	Smart Parameter Settings
SRM	Monitoreo de Reacción selectiva
TIC	Cromatograma Total de Iones
WHO	Organización Mundial de la Salud
ZLys	Z-lisina-OH

RESUMEN

Diabetes mellitus es una enfermedad crónica degenerativa de carácter complejo que afecta prácticamente a todos los tejidos y sistemas del organismo. La hiperglucemia es la causa de cambios estructurales y de pérdida de funcionalidad de biomoléculas, además del aumento de estrés oxidativo; procesos que con el tiempo agravan el estado clínico del paciente y contribuyen en el desarrollo de complicaciones. La Organización Mundial de la Salud reconoce la diabetes como una epidemia y amenaza mundial. La prevención de diabetes mellitus y la desaceleración de la morbilidad por causa de esta enfermedad son dos importantes retos para la ciencia y medicina del siglo XXI. Con el fin de lograr el objetivo es necesario llevar a cabo el estricto control clínico de pacientes, recomendándoles un estilo de vida sano y una dieta adecuada dos elementos que ayudan desacelerar el progreso de la enfermedad y, en el caso de sujetos sanos o pre-diabéticos, prevenir su incidencia. Una de las líneas de investigación se enfoca en la búsqueda de los marcadores químicos que permitan un diagnóstico temprano y el seguimiento de los pacientes. En este sentido, ha sido demostrado que uno de los factores patológicos en diabetes, entre otras enfermedades crónicas degenerativas y en envejecimiento prematuro, es la aceleración de los procesos de glicación y la acumulación de los llamados productos finales de glicación avanzada (AGEs), en tejidos y órganos de pacientes afectados. Los AGEs son el resultado final de una serie de reacciones no enzimáticas que comienza con la unión de un grupo amino libre de una biomolécula y un grupo carbonilo de un azúcar reductor u otra especie química derivada de esta. Inicialmente, estos procesos se estudiaron durante el procesamiento de alimentos bajo el título de reacción de Maillard. Hoy en día se sabe que los AGEs se forman en condiciones fisiológicas, AGEs endógenos, y durante el procesamiento de alimentos, AGEs exógenos, resultando en dos fuentes que contribuyen a su contenido en el organismo. La ingesta de alimentos ricos en AGEs se ha asociado con niveles altos de estos compuestos en el organismo y con el progreso de diabetes.

Los AGEs es un grupo grande y heterogéneo de compuestos, varios de ellos bien caracterizados y determinados en matrices biológicas. Entre los compuestos conocidos, algunos han sido considerados marcadores de procesos de glicación *in vivo* o en alimentos, aunque no se ha llegado aún a un consenso cuál(es) de los AGEs es(son) el(los) más adecuado(s) y, además, la determinación de los AGEs sigue siendo una tarea retadora. Por otro lado, las dietas bajas en AGEs son recomendables para pacientes con diabetes. Es por ello que hay una clara necesidad de medir el contenido de productos de glicación en alimentos; además, determinar las

condiciones y factores que promueven su formación. Lo anterior con el fin de estimar la ingesta de AGEs para su control y recomendar la mejor forma de cocción de los alimentos para que resulten con los niveles más bajos de AGEs. El objetivo del presente trabajo de tesis ha sido incidir en el desarrollo de metodología analítica para la determinación de los AGEs y estudiar el efecto de seleccionados agentes químicos sobre su formación en alimentos.

El Capítulo I es una introducción general. Después de una corta descripción de diabetes y de su diagnóstico clínico, se describen los procesos de formación de los AGEs y algunos de los compuestos mejor caracterizados y de mayor importancia. A continuación, se presenta una revisión bibliográfica sobre la determinación de los AGEs, entre ellos *N*^ε-carboximetil-lisina (CML), *N*^ε-carboxietil-lisina (CEL) y pentosidina. Cabe mencionar que uno de los productos de la tesis es coautoría en un capítulo de libro en la editorial Taylor & Francis cuyas pruebas de galera se incluyen como Anexo.

En el Capítulo II se exponen los objetivos de tesis. El trabajo ha sido enfocado principalmente en CML, ya que este compuesto ha sido propuesto como indicador de los procesos de glicación *in vivo* y de la formación de los AGEs en alimentos. Se ha demostrado que la hiperglucemia y estrés oxidativo favorecen la síntesis del CML, de hecho, algunos autores clasifican este compuesto como producto de glicación y producto de peroxidación de lípidos. A pesar de la reconocida importancia del CML en diabetes y otras enfermedades relacionadas con estrés oxidativo, su determinación en muestras reales representa un reto. En este contexto, el trabajo de tesis abordó los dos siguientes aspectos: i) desarrollo de metodología analítica para la determinación de CML en matrices químicamente complejas y ii) estudio de efectos que podrían tener algunos agentes químicos sobre la formación de CML.

En el Capítulo III se presenta lista de equipos, materiales, reactivos y programas de análisis de datos, empleados en la ejecución del proyecto.

El Capítulo IV corresponde a la descripción de resultados obtenidos en el desarrollo experimental y su discusión. Este capítulo está dividido en seis secciones correspondientes a los seis objetivos particulares del proyecto. En cada apartado se encuentra una introducción breve relacionada con el tema particular, en seguida se muestra el objetivo particular, los resultados y las conclusiones. En el apartado de resultados de cada sección se describen detalladamente los procedimientos analíticos, resaltando su carácter cuantitativo, exactitud y reproducibilidad, además de la interpretación y discusión de los resultados.

En la primera parte se describe la síntesis de CML para utilizar este procedimiento en estudios posteriores. El sustrato fue ZLys, el cual es lisina protegida en nitrógeno α con grupos t-butoxicarbonilo, simulando de esta manera la incorporación del amino ácido en la cadena peptídica de proteínas. Como el agente glicante se utilizó el ácido glioxálico (AGO). Después de eliminar el grupo protector mediante hidrólisis ácida, el producto fue purificado y su identidad confirmada por espectrometría de masas de alta resolución.

La segunda y tercera sección del Capítulo IV han sido centradas en estudio de efectos de algunos agentes químicos como tioles o iones de metales de transición sobre el rendimiento de la formación CML. Para evaluar el porcentaje de conversión de ZLys en ZCML, se estableció un procedimiento de separación por cromatografía de líquidos en fase reversa con detección espectrofotométrica con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD). Se encontró un efecto inhibitorio de los tioles en la síntesis de la ZCML, en el siguiente orden decreciente: LCys>HCys>GSH>ACys. En cuanto a los iones metálicos, la presencia de Zn(II) durante la síntesis de ZCML tuvo un fuerte efecto inhibitorio, que aumentaba con la creciente concentración de zinc. El efecto de ion Cu(II) fue similar, pero menos notorio. Por su parte, al adicionar iones metálicos junto con los compuestos tipo tiol, potencializó el efecto inhibitorio de tioles, especialmente en la mezcla de Zn(II) con ACys o GSH. Los resultados obtenidos fueron publicados en la revista Acta Universitaria, el artículo se presenta como Anexo.

La cuarta sección del Capítulo IV está dedicada al desarrollo de un procedimiento analítico para la determinación de CML; se propuso realizar la derivatización del analito con etilcloroformato en el medio de etanol:piridina, la separación por cromatografía de líquidos de alta resolución con ionización por electro nebulización acoplada a espectrómetro de masas de trampa iónica (HPLC-ESI-ITMS/MS) y cuantificación en la modalidad de monitoreo de reacciones múltiples (MRM). Como estándar interno se utilizó CML deuterada (CML-D₂).

Una vez puesto a punto y validado el procedimiento, éste fue empleado para estudiar el efecto potencial de cobre sobre la formación de CML en alimentos. Los resultados obtenidos en diferentes tipos de muestras se presentan en la sección quinta del Capítulo IV, se ha demostrado el efecto inhibitorio del ion Cu(II), dependiente de su concentración. De acuerdo con estudios anteriores, el papel protector del cobre se atribuyó a la formación de complejos con lisina u otras especies químicas que participan en la glicación. Los resultados descritos en secciones

IV.4 y IV.5 fueron publicados en la revista *European Food Research and Technology*, el artículo se presenta como Anexo.

En la actualidad, gran parte de los análisis de los AGEs, incluyendo CML, se realizan por ensayos inmunoquímicos, parecía interesante entonces evaluar comparativamente el procedimiento HPLC-ESI-IT-MS/MS con los Ensayos por Inmunsorción Ligado a Enzimas (ELISA) comerciales, en su aplicación al análisis de alimentos. Los resultados obtenidos para 20 productos alimenticios consumidos en México y se realiza una comparación del desempeño del procedimiento cromatográfico respecto a tres diferentes ensayos ELISA, los datos se presentan en la sección IV.6.4. Cabe señalar que los ensayos ELISA no forman parte de este trabajo, los resultados fueron obtenidos en el Departamento de Ciencias Médicas de la Universidad de Guanajuato y se utilizaron aquí para fines comparativos. Se ha demostrado que los ensayos ELISA pueden utilizarse para la medición de CML/AGEs en alimentos; sin embargo, estos ensayos presentan menor precisión y sensibilidad en comparación con el método analítico desarrollado en la tesis. El ensayo ELISA que proporcionó resultados de mayor congruencia con HPLC-ESI-ITMS/MS fue el ensayo competitivo con el anticuerpo monoclonal anti-CML. Es también importante mencionar que uno de los kits ELISA presenta una menor selectividad ya que mide AGEs fluorescentes en la muestra, no CML propiamente; una directa correlación entre AGEs fluorescentes y CML medidos por el método cromatográfico confirma que CML puede ser utilizado como marcador químico de los AGEs en alimentos. Los resultados de esta parte del trabajo han sido enviados para su posible publicación en la revista *Food Chemistry*.

Los resultados obtenidos, fruto del trabajo de tesis completo, permitieron llegar a una serie de conclusiones generales que se presentan en el capítulo V.

El capítulo VI está dedicado a mostrar las fuentes bibliográficas que se citan en este manuscrito. Finalmente, en el Anexo se presentan los trabajos publicados, producto de los resultados obtenidos de esta investigación.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL

I.1 Diabetes mellitus y biomarcadores típicos

El término “diabetes mellitus” describe un desorden metabólico de etiologías múltiples caracterizadas por hiperglucemia crónica con perturbaciones en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas, provocando defectos en la secreción y acción de la hormona insulina [1].

La diabetes mellitus puede presentarse con síntomas característicos tales como poliuria, polidipsia, polifagia, pérdida de peso y visión borrosa. Los síntomas iniciales en la diabetes no son muy severos, así que, si no se recibe el tratamiento adecuado, la hiperglucemia puede causar cambios patológicos y funcionales que se pueden presentar después de largo tiempo del diagnóstico. Adicionalmente a las consecuencias de un metabolismo anormal de glucosa, existen serias complicaciones a largo plazo relacionadas con esta enfermedad.

Los efectos a largo plazo de diabetes mellitus incluyen desarrollo progresivo de retinopatía, nefropatía, neuropatía, riesgo de úlceras en los pies y de progresar, a amputación; además de disfunción y falla de varios órganos [2]. Las personas con diabetes tienen un alto riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares, vasculares periféricas y cerebrovasculares. Por lo que este conjunto de efectos son los responsables de morbilidad, discapacidad y muerte prematura en adultos jóvenes [3].

La actual clasificación de diabetes mellitus está basada en la etiología de la enfermedad. Existen tres formas más comunes de diabetes mellitus: diabetes tipo 1, diabetes tipo 2 y diabetes gestacional. Se cree que estas enfermedades son el resultado de la compleja interacción de diferentes factores, incluyendo los ambientales y genéticos. Adicionalmente, existen otros tipos específicos de diabetes, como por ejemplo, la causada por defectos genéticos de la función de las células β de los islotes, diabetes a causa de enfermedades del páncreas exocrino, diabetes causada por endocrinopatías, diabetes inducida por fármacos o productos químicos, por infecciones, entre otras [4].

La mayoría de los casos de diabetes mellitus tipo 1 surgen de un ataque inflamatorio autoinmune contra las células β en el páncreas, que son las encargadas de la producción de insulina. Esto, por lo tanto conduce a un déficit absoluto de insulina [5]. El proceso autoinmune

le permite a la enfermedad empezar años antes de su detección, pues se requiere que el volumen de las células β disminuya de un 80% a 90% para provocar los primeros síntomas. La tasa de la destrucción de islas de células es variable y con frecuencia es más rápido en niños que en adultos [6]. Diabetes tipo 1 es una enfermedad poligénica; uno de los principales factores genéticos determinantes de incidencia es la herencia de alelos mutantes, otro candidato posible es el gen de la insulina [7].

La diabetes tipo 2 se caracteriza por hiperglucemia crónica debido a la resistencia a la insulina de los tejidos periféricos, tales como músculo esquelético, hígado o tejido adiposo, e insuficiente secreción de insulina compensatoria por las células β del páncreas.

Aunque no hay duda en cuanto a la importancia de los factores genéticos en la diabetes de tipo 2, el análisis genético es difícil debido a la interacción compleja entre varios genes de susceptibilidad entre los factores genéticos, ambientales y metabólicos. Por lo tanto, los estudios genéticos han dado resultados muy diversos, se han identificado a algunos genes que juegan papeles importantes en la secreción de insulina y la transmisión de la señal de insulina [8–14].

La diabetes mellitus tipo 2 resulta del envejecimiento de la población y los factores ambientales adversos del mundo moderno. Esta enfermedad es un problema de salud global y ha alcanzado niveles epidemiológicos en muchos países. La Organización Mundial de la Salud (WHO), dio a conocer en 2016 que, según las estimaciones, 422 millones de adultos en todo el mundo padecían diabetes en 2014, lo que equivale a una prevalencia del 8.5% en la población adulta. La enfermedad está relacionada con el rápido aumento de sobrepeso, obesidad e inactividad física. En 2012, la diabetes provocó 1.5 millones de muertes, y el incremento de la glucemia por encima de los valores provocaron otros 2.2 millones de muertes por efecto de un aumento del riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares y de otros tipos. La mayoría de las personas afectadas tienen diabetes de tipo 2, que solía ser exclusiva de adultos, pero que ahora también ha sido diagnosticada en niños [15].

Según los datos de 2012 de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT), el 71.2% de la población adulta de nuestro país -alrededor de 55, 372, 611 personas- padecían sobrepeso u obesidad, en tanto que el 9.2% -7,154,888 personas- padecían diabetes. En 2016 la prevalencia de diabetes aumentó ligeramente de 9.2 a 9.4% [16].

Debido a que la diabetes afecta a la fuerza laboral, tiene un impacto importante y perjudicial en las personas y en la productividad nacional. Las consecuencias socioeconómicas de la diabetes y sus complicaciones podrían tener un serio impacto negativo en la economía de los países desarrollados y en desarrollo.

Bajo este contexto, el 20 de diciembre de 2006, La Asamblea General de las Naciones Unidas aprobó la Resolución 61/225 declarando a la diabetes un problema de salud pública internacional y declarando también el Día Internacional de la Diabetes como un Día de las Naciones Unidas.

Las pruebas clínicas de diagnóstico de la diabetes juegan un papel muy importante en el tratamiento oportuno de la enfermedad. Según la Asociación Americana de la diabetes (ADA), esta enfermedad puede ser diagnosticada con base en los criterios de glucosa plasmática, ya sea en ayuno o el valor de la glucosa plasmática después de dos horas de una administración oral de 75 g de glucosa, o con una prueba de hemoglobina glicosilada (HbA1c), Tabla 1 [17].

Tabla 1. Criterios para el diagnóstico de diabetes, ADA 2016, [17].

Prueba	Punto de corte
Glucosa plasmática en ayuno (no haber tenido ingesta calórica en las últimas 8 h).	≥ 126 mg/dL (7.0 mmol/L)
Glucosa plasmática después de la administración oral de 75 g de glucosa anhidra disuelta en agua.	≥ 200 mg/dL (11.1mmol/L)
HbA1c (Prueba realizada en laboratorios certificados).	$\geq 6.5\%$ (48 mmol/mol)
Glucosa plasmática al azar en un paciente con síntomas clásicos de hiperglucemia o crisis hiperglucémica.	≥ 200 mg/dL (11.1mmol/L)

Determinación de glucosa plasmática. Se trata de un examen simple indicativo del correcto funcionamiento del metabolismo de los carbohidratos en el que se monitorea la concentración de glucosa. Como la glucosa se metaboliza rápidamente en el cuerpo, el examen sólo refleja el estado glicémico de un paciente en un momento determinado y no permite un pronóstico retrospectivo o prospectivo del metabolismo de glucosa en el cuerpo. Esta prueba constituye un indicador de corto plazo y refleja el estado glicémico de un periodo de 24 horas. Para la determinación de glucosa existen métodos químicos y métodos enzimáticos. Dentro de los métodos químicos de oxidación-reducción se utilizan reactivos como *o*-toluidina, neocuproína

y ferricianuro, reactivos relativamente de bajo costo. Los métodos enzimáticos son más específicos, sin embargo, su costo se ve elevado por el empleo de enzimas como hexoquinasa-G6PDH, glucosa deshidrogenasa, glucosa oxidasa-peroxidasa entre otras. A pesar de las ventajas que ofrece esta prueba como por ejemplo su alta disponibilidad, tiene ciertas desventajas, pues los niveles de glucosa se pueden ver incrementados en personas con enfermedades severas [18].

Prueba de tolerancia a glucosa. La tolerancia a glucosa es la capacidad para regular la concentración de glucosa en la sangre después de la administración de una dosis de glucosa, normalmente 1 g/kg de masa corporal. En una persona normal, la concentración de glucosa plasmática regresa al valor inicial (basal) después de 2 horas de administrar la dosis. El resultado de la prueba es afectado por el estrés metabólico derivado de diversas condiciones clínicas y tratamientos con medicamentos. El examen provee información de estados latentes de diabetes y es usado en estudios epidemiológicos de poblaciones, no es recomendable como prueba de rutina en el diagnóstico de diabetes [19].

Hemoglobina glicosilada (HbA1c). El grupo amino de las proteínas reaccionan en la sangre con glucosa para formar derivados glicosilados. La reacción se lleva a cabo lentamente bajo condiciones fisiológicas y sin la ayuda de enzimas. La glucosa dentro del torrente sanguíneo afecta los niveles de proteínas glicosiladas, dependiendo del número de grupos amino reactivos disponibles para que se lleve a cabo la reacción de glicosilación. De esta manera, el nivel de proteínas glicosiladas puede ser usado como un marcador de la fluctuación en la concentración de glucosa en sangre por un periodo largo, el tiempo de vida útil de la hemoglobina, es de 90-120 días en las células rojas de la sangre. El uso de la HbA1c puede evitar el problema de variabilidad del día a día en los valores de glucosa y una ventaja importante es que el paciente no requiere ninguna preparación alimenticia previa.

A pesar de las ventajas que ofrece esta prueba, existen ciertas discrepancias en que el análisis de HbA1c sea usado como una prueba de diagnóstico y control de diabetes. La exactitud de los niveles de hemoglobina glicosilada es subestimada con relación al estado presente de hiperglucemia, pues hay diversos factores genéticos y hematológicos que influyen en su concentración, como en el caso de numerosas enfermedades crónicas, Tabla 1. Los niveles de HbA1c son afectados en pacientes que sufren de anemia renal o hemolítica, cirrosis hepática, personas sometidas a hemodiálisis, con deficiencia de hierro y personas que han recibido alguna transfusión sanguínea recientemente. Esto debido a que se modifica la producción normal y

vida útil de eritrocitos en el torrente sanguíneo y la prueba no es confiable en estos casos [20,21]. El análisis de HbA1c no está bien estandarizado ni está disponible en muchos países, así que no es un análisis recomendado universalmente.

El análisis de la HbA1c se puede hacer utilizando diversos métodos de ensayo, basados en dos principios; diferencias en la carga y diferencias en la estructura de los componentes. Estos métodos incluyen cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad con boronatos e inmunoensayos. La cromatografía de intercambio iónico se basa en que el punto isoeléctrico de HbA1c es más bajo que el de otros componentes de la hemoglobina, así HbA1c y controlando el pH de la fase móvil, se puede obtener su separación. El método es muy preciso, sin embargo, puede haber interferencias por hemoglobinopatías y con algunos otros tipos de hemoglobina. En la cromatografía de afinidad a boronatos, la glucosa se une al ácido *m*-aminofenilborónico, el método presenta interferencias mínimas. El análisis de HbA1c con inmunoensayos es simple pero puede haber interferencias por hemoglobinopatías [1].

No solamente el diagnóstico de la enfermedad es importante, también lo es el control de pacientes con el fin de prevenir o retardar las complicaciones. Entre las pruebas de laboratorio realizadas para el control rutinario de los diabéticos, las más utilizadas son el monitoreo del nivel de hemoglobina glicosilada y la determinación de glucosa en sangre, también se realizan las pruebas de nivel sérico de glucosa, actividad de insulina, nivel de colesterol y de triglicéridos [22]. Sin embargo, la información que se obtiene de estas pruebas no es suficiente para el control y pronóstico de pacientes con esta afección. Por ejemplo, el nivel sérico de glucosa solamente permite evaluar la ingesta reciente, los niveles de colesterol y de triglicéridos pueden estar elevados en las personas no diabéticas.

Con el adecuado control de hiperglucemia disminuye el riesgo de que estas complicaciones se desarrollen, aún así, la diabetes sigue siendo una carga social, psicológica y económica en las poblaciones de todo el mundo. Las limitaciones en los métodos actuales de diagnóstico y pronóstico de diabetes mellitus han generado interés en otros marcadores y exámenes para la valoración de los niveles de glucosa.

I.1.2 Los AGEs y la diabetes mellitus

En pacientes que viven con diabetes, se han observado niveles elevados de los llamados AGEs, y estos se encuentran relacionados con el progreso de la enfermedad [23].

Los AGEs se forman como resultado de glicación espontánea de proteínas y otras biomoléculas. El proceso se realiza en varias etapas y mediante diferentes rutas de la síntesis, los AGEs se acumulan en tejidos acelerando procesos de envejecimiento y participando en la patogénesis de enfermedades crónico-degenerativas.

En particular, los AGEs contribuyen a las patofisiologías asociadas con complicaciones a largo plazo de diabetes y envejecimiento. De esta forma, los AGEs en general o algunos compuestos de este grupo han sido considerados como marcadores potenciales de diabetes mellitus y sus complicaciones.

Además de los AGEs formados *in vivo*, en los años recientes ha crecido el interés en estudiar posible papel de los AGEs presentes en la dieta como un factor adicional de riesgo en diabetes. El consumo de alimentos altamente procesados, altos en grasas o azúcares aumenta la exposición a los AGEs exógenos. Los procesos de glicación que conducen a la formación de AGEs durante elaboración de alimentos se clasifican dentro del dominio de la reacción Maillard. Cabe mencionar que la reacción Maillard engloba procesos de degradación de azúcares, reacción de grupos carbonilo con grupos amino de biomoléculas, reacciones redox, ciclación, deshidratación, etc., formando una amplia gama de compuestos que confieren a los alimentos el sabor y aroma además de efecto de pardeamiento [24]. Por estas razones, la caracterización y cuantificación de los AGEs en diversos materiales biológicos ha sido una de las tareas más importantes en el área de ciencias biomédicas y también en la química analítica.

I.2 Estrés oxidativo y su papel en la formación de los AGEs

A nivel celular, el estrés oxidativo es causado por un desbalance entre la formación y neutralización de agentes oxidantes, tales como las especies reactivas de oxígeno (ROS) y las especies reactivas de nitrógeno (RNS). Las ROS incluyen el radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxilo ($\bullet OH$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno singlete (1O_2). Las especies

reactivas de nitrógeno incluyen radicales libres como óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$) y dióxido de nitrógeno ($\text{NO}_2\cdot$), y especies como peroxinitrito (OONO^-), Tabla 2 [25].

Tabla 2. Diferentes tipos de especies reactivas libres [25].

Especies Reactivas de Oxígeno	
Radicales	No radicales
Superóxido, $\text{O}_2\cdot^-$	Peróxido de hidrógeno, H_2O_2
Hidroxilo, $\text{OH}\cdot$	Ácido hipocloroso, HOCl
Peroxilo, $\text{ROO}\cdot$	Ozono, O_3
Alcoxilo, $\text{RO}\cdot$	Oxígeno singulete, $^1\text{O}_2$
Hidroperoxilo, $\text{HOO}\cdot$	Peroxinitrito, ONOO^-
Especies Reactivas de Nitrógeno	
Óxido nítrico, (mono nitrógeno) $\text{NO}\cdot$	Peroxinitrito, ONOO^-
Dióxido de nitrógeno, $\text{NO}_2\cdot$	Peroxinitritos alquilo, ROONO
	Trióxido dinitrógeno, N_2O_3
	Tetróxido dinitrógeno, N_2O_4
	Ácido nitroso, HNO_2
	Ion nitronio, NO^{2+}
	Anión nitrosilo, NO^-
	Catión nitrosilo, NO^+
	Cloruro de nitrilo, NO_2Cl
Especies reactivas de Cloro	
Cloro atómico, $\text{Cl}\cdot$	Ácido hipocloroso, HOCl
	Cloruro, Cl_2
	Cloruro de nitronio (nitrilo), NO_2Cl

Existe evidencia sólida que el estrés oxidativo contribuye en los procesos de envejecimiento, en la patogénesis de diabetes y de otras enfermedades crónico-degenerativas.

En personas diabéticas, además de la generación acelerada de especies reactivas, se observa una disminución de los niveles de antioxidantes, lo que agrava el estado de estrés oxidativo y favorece el progreso y complicaciones de diabetes [26]. Otro factor de estrés oxidativo en la diabetes es la hiperglucemia crónica la cual a largo plazo induce disfunción e insuficiencia crónica de los diferentes órganos, especialmente los ojos, los riñones, el sistema nervioso, el corazón y los vasos sanguíneos [27].

El mecanismo por el cual la diabetes conduce a estas complicaciones es multifactorial y todavía no se entiende completamente. Sin embargo, se conoce que el estrés oxidativo y los efectos tóxicos directos de los altos niveles de glucosa, están asociados con la obesidad, con la presión

arterial elevada, niveles anormales de lípidos, enfermedad inflamatoria crónica, hipoxia e isquemia, Figura 1. No se sabe sin embargo, si la diabetes mellitus es la causa o el resultado de que los niveles de estrés oxidativo se incrementen en personas con esta afección [26,28].

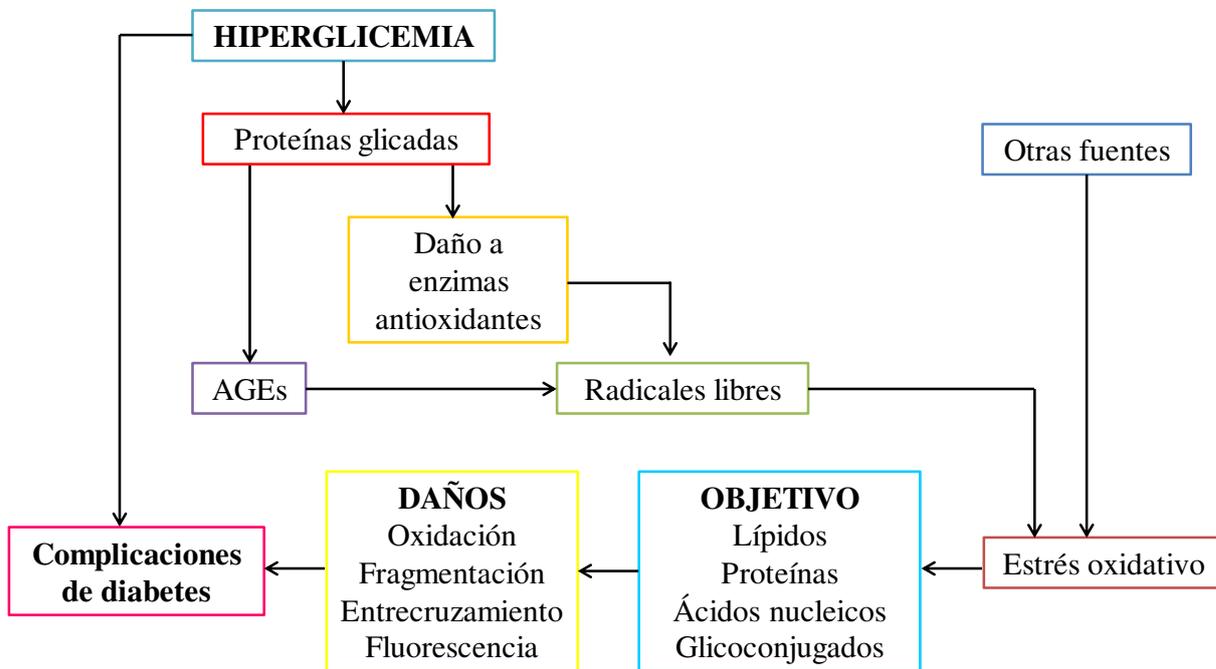


Figura 1. Esquema general de las rutas por las que el estrés oxidativo puede contribuir a complicaciones en la diabetes y a los trastornos relacionados con el envejecimiento [29].

Por otro lado, se conoce que el estrés oxidativo provoca severos daños al DNA (ácido desoxirribonucleico), proteínas y lípidos. También se ha observado que los pacientes con diabetes presentan un incremento del estrés oxidativo y las complicaciones de la enfermedad están parcialmente mediadas por estrés oxidativo.

En cuanto al incremento del estrés oxidativo en pacientes con diabetes, entre sus efectos se mencionan la autooxidación de glucosa, peroxidación de lípidos, glicación no enzimática de proteínas y otras biomoléculas con la formación y acumulación de los AGEs.

Es importante resaltar que la relación entre estrés oxidativo y los AGEs es muy compleja. Como ya se mencionó, las especies reactivas de oxígeno aceleran la síntesis de AGEs y el entrecruzamiento de las proteínas, pero, por otro lado, los productos formados activan generación de las ROS por medio de mecanismos bioquímicos complejos. Como resultado, se genera un círculo vicioso, en el que el exceso de las ROS acelera la producción de los AGEs y, a su vez los AGEs favorecen aún más la formación de las ROS. Durante estas reacciones,

ocurren las modificaciones de proteínas y se forman compuestos carbonílicos, dicarbonílicos–intermediarios y propagadores de AGEs.

Como ya se mencionó antes, no solamente proteínas, pero también otras biomoléculas son blanco de glicación. Varios productos se derivan de la peroxidación de lípidos acumulados en fluidos biológicos y tejidos de pacientes con diabetes. Uno de los marcadores de peroxidación de lípidos el 4-hidroxi-2-nonenal que, además está involucrado en actividades citotóxicas y mutagénicas. Éste compuesto reacciona con sitios específicos de proteínas, como histidina, para generar aductos de Michael. Se han encontrado proteínas modificadas con 4-hidroxi-2-nonenal en suero y tejidos renales de pacientes con diabetes tipo 2 [30].

También se ha observado que el plasma de personas diabéticas contiene niveles elevados de productos intermedios y finales de daño oxidativo, sustancias reactivas y peróxidos de lípidos. Estas personas también presentan niveles elevados de isoprostanos-F2, que son el producto final del ataque de radicales libres a la membrana celular de fosfolípidos, y son usados como bioindicadores del estrés oxidativo, analizando plasma sanguínea.

La hiperglucemia es un factor que agrava el estrés oxidativo y participa en la formación de los AGEs; posibles mecanismos responsables de estos procesos se muestran en la Figura 2. La descripción detallada se presenta en la siguiente sección I.3. La autooxidación de glucosa resulta en la formación del radical enediol, que es una especie altamente reactiva, que además de incrementar la formación de AGEs, puede catalizar la conversión de oxígeno molecular a O_2^{\bullet} y así, incrementar la formación de las ROS. Aunque la interacción entre el estrés oxidativo y la reacción de glicación es compleja, el esquema de la Figura 2 sustenta el hecho de que el estrés oxidativo induce la formación de los AGEs y éstos, a su vez, incrementan el estrés oxidativo [29,31,32].

Es también importante que los AGEs son productos de reacciones de oxidación, por lo que se han utilizado diferentes antioxidantes como inhibidores de los AGEs. Un antioxidante, se refiere a cualquier sustancia que presente en bajas concentraciones, retrasa o inhibe la oxidación; estos pueden actuar de diversas formas, por ejemplo: disminuyendo la concentración de oxidantes, evitando que se inicie la reacción en cadena al detener los primeros radicales libres formados, uniéndose a iones metálicos para evitar su efecto en la formación de especies reactivas, entre otras. De esta manera, los antioxidantes protegen el organismo del daño estructural causado por la exposición de proteínas a agentes glicantes bajo condiciones

oxidativas y limitan la fragmentación de azúcares hasta glicoxal (GO) y metilglicoxal (MGO), especies altamente reactivas y promotoras de la síntesis de AGEs [24].

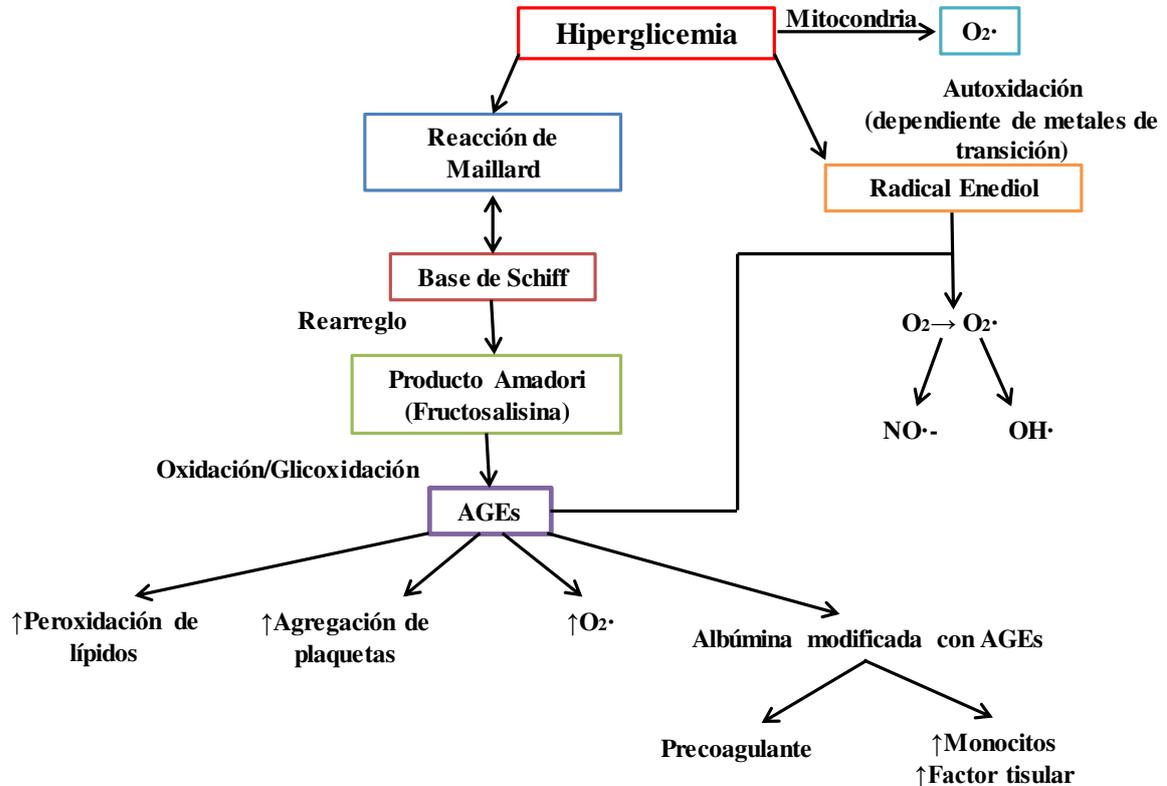


Figura 2. Impacto de la hiperglicemia en el estrés oxidativo y en la formación de los AGEs. O_2^- - radical superóxido; NOO^- - radical peroxinitrito [31].

Las proteínas glicadas pueden crear una plataforma catalítica que promueve aún más el estrés oxidativo e inicia procesos inflamatorios pro-oxidantes. Por otro lado, las proteínas glicadas en diabetes favorecen la oxidación de lípidos, los cuales a su vez pueden también estimular reacciones auto-oxidativas de azúcares, aumentando los daños en lípidos y proteínas, continuando y fortaleciendo así el ciclo de estrés oxidativo y daño celular [33]. La obesidad está relacionada con el desarrollo de la diabetes mellitus tipo 2; en su desarrollo, el exceso de energía en forma de glucosa y ácidos grasos libres entran al ciclo del ácido cítrico, resultando en la regeneración del exceso de NADH (nicotinamida adenina dinucleótida) mitocondrial y consecuentemente las ROS, Figura 3.

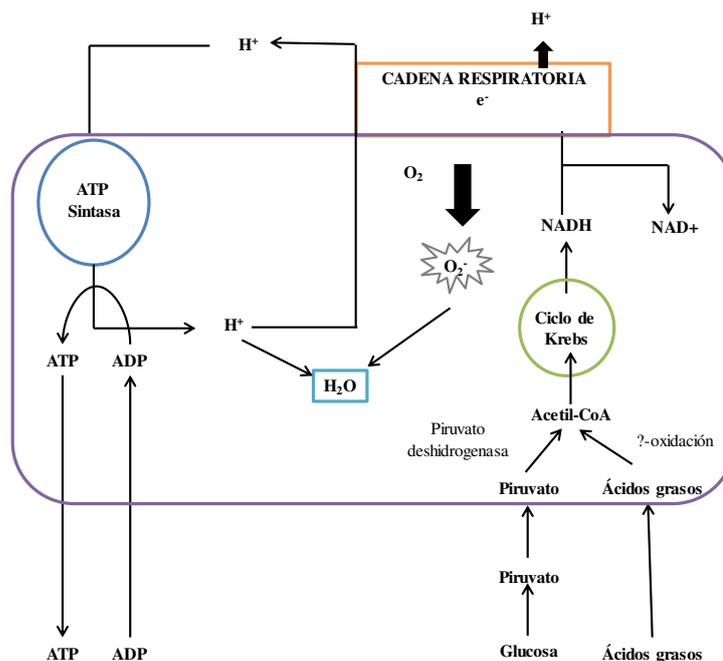


Figura 3. Generación de ROS dependiente de glucosa y ácidos grasos en la mitocondria [31].

La capacidad de las células o tejidos para resistir el estrés oxidativo depende en gran medida de la eficiencia del sistema de defensa antioxidante global para detener el exceso de especies reactivas [34].

El sistema de defensa antioxidante consiste en antioxidantes sintetizados endógenamente que incluyen enzimas antioxidantes, el tripéptido glutatión, vitaminas, y algunas especies de micronutrientes. Las principales enzimas antioxidantes son las de los grupos de superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa. La enzima superóxido dismutasa cataliza la oxidación/reducción en la conversión de radicales superóxido a oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno. La catalasa es una segunda enzima antioxidante clave involucrada en una protección contra el peróxido dañino, ésta es una hemo-enzima que convierte el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno mitigando así sus efectos tóxicos [35].

Al disminuir la actividad de enzimas, el estrés oxidativo provoca disfunción de las células β y resistencia a la insulina debido que estas células tienen bajos niveles de enzimas antioxidantes y son particularmente susceptibles al estrés oxidativo [36]. El aumento de la producción mitocondrial de especies reactivas de oxígeno en las células β resulta de un mayor flujo de glucosa o ácidos grasos por la ruta de la glucólisis y del ciclo del ácido cítrico. Esto genera el

exceso de $O_2^{\cdot -}$ que da lugar a otras especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. La insuficiencia de enzimas antioxidantes para secuestrar estas especies reactivas conduce a estrés oxidativo. En diabetes tipo 1, la evidencia implica el papel de las ROS en la función alterada de células β causada por reacciones autoinmunes, citoquinas y las proteínas inflamatorias. Del mismo modo, en diabetes mellitus tipo 2, el rol de las ROS está implicado en la disfunción de las células β y en la resistencia a la insulina [37]. El páncreas es altamente susceptible al estrés oxidativo, el peróxido de hidrógeno afecta la secreción de insulina en las células pancreáticas [38], los productos del estrés oxidativo inhiben la secreción de insulina estimulada por glucosa.

Existen diversas formas de evaluar el estrés oxidativo en diabetes. Se puede medir la autooxidación de glucosa, los cambios del balance redox, disminución de las concentración tisular de antioxidantes de bajo peso molecular, tales como glutatión reducido (GSH), coenzima Q10, vitamina E y cambios en la actividad de las enzimas de defensa antioxidante [39]. Otros posibles marcadores del estrés oxidativo en la diabetes, son los AGEs.

I.3 Formación de productos finales de glicación avanzada

En esta sección se presenta la descripción de las rutas de los AGEs que son un grupo de compuestos formados por la glicación de proteínas, lípidos o ácidos nucleicos, mediante la “reacción de Maillard”, llamada así en honor del científico francés Louis Camille Maillard (1878-1936).

Esta reacción fue estudiada originalmente para explicar el color marrón dorado de los alimentos cocinados, que se asocia con cambios en el sabor, aroma y textura. Después, se comenzó a estudiar procesos de glicación *in vivo*. Dichos procesos se llevan a cabo en una serie de etapas, las cuales se presentan esquemáticamente en la Figura 4.

En la formación de los AGEs, primero ocurre una reacción reversible entre el grupo carbonilo de un azúcar reductor u otro agente glicante que tenga un grupo carbonilo en su molécula, y un grupo amino terminal de una proteína, lípido o ácido nucleico, generando un compuesto llamado “base de Schiff”.

Por un rearrreglo estructural aún reversible, se forman ceto-aminas más estables, llamadas productos de Amadori. Los productos Amadori son objeto de cambios estructurales posteriores

por oxidación, deshidratación, condensación, reacciones de ciclación y degradación para finalmente formar de manera irreversible los AGEs, que son compuestos muy estables [40].

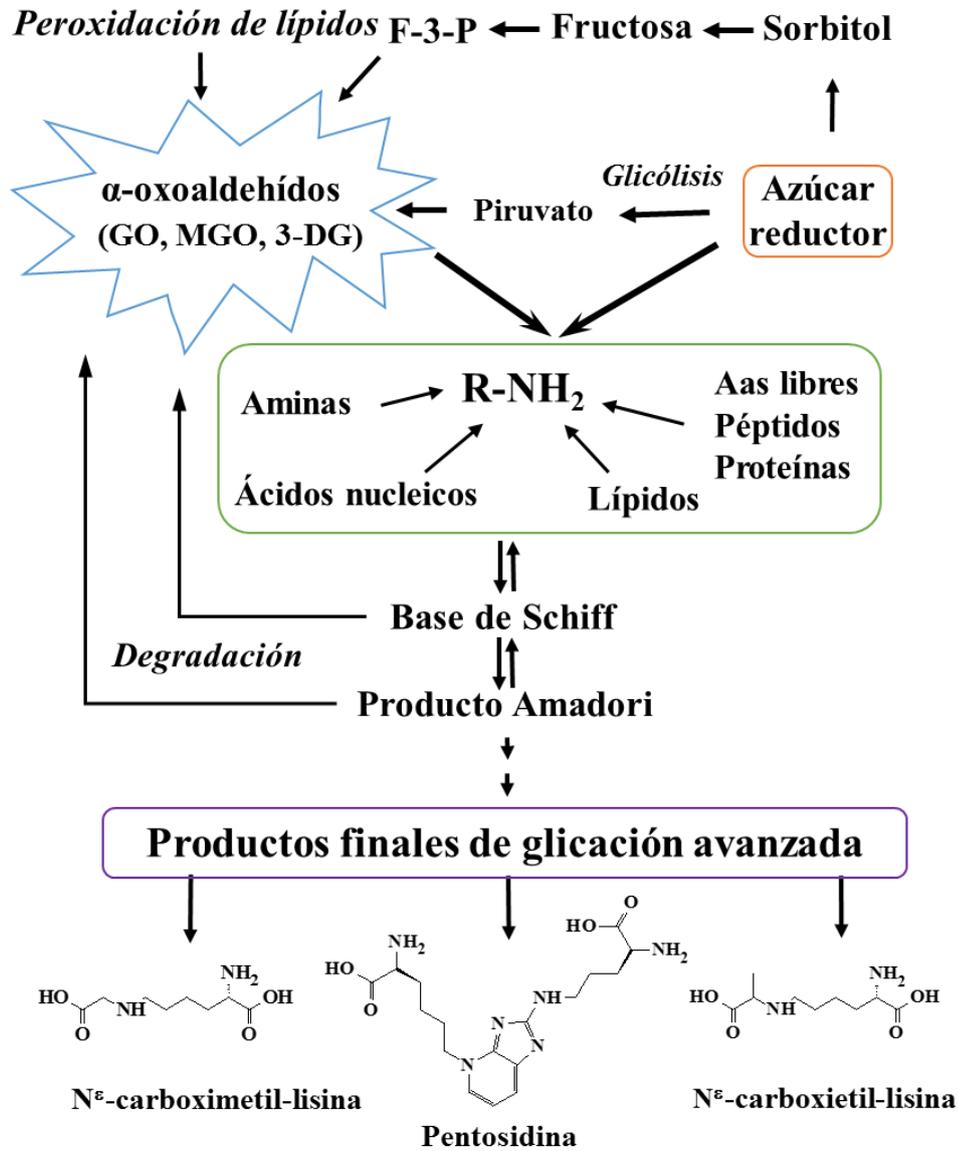


Figura 4. Esquema simplificado de las rutas de glicación, destacando el papel de los compuestos α -dicarbonilo y la formación de los tres AGEs determinados más a menudo: CML, CEL y pentosidina.

Las aminas primarias son más reactivas que las aminas secundarias, mientras que las aminas terciarias no reaccionan con el grupo carbonilo. Así, el grupo amino primario, presente en las cadenas laterales de lisina, es el precursor amino más reactivo en proteínas. También reaccionan el grupo guanidino de arginina, el grupo imidazol de histidina o cualquier grupo amino *N*-terminal [41,42].

Los grupos carbonilo necesarios para que se lleve a cabo la reacción no sólo se originan del metabolismo de carbohidratos, también se pueden originar de la degradación de proteínas o lípidos. Cuando los grupos carbonilo se originan del catabolismo de lípidos, los productos de reacción se nombran con el término ALEs (productos finales de lipooxidación avanzada), en su formación se involucran reacciones carbonilo-amina y condensaciones aldólicas [43]. La reacción de glicación y peroxidación de lípidos sigue rutas de reacción similares y comparten intermediarios [24]. En otras palabras, existe una fuerte interrelación entre la ruta de Maillard y la oxidación de lípidos y ha sido aceptado que los AGEs son iniciados tanto por lípidos como por carbohidratos. Los lípidos participan en la reacción de Maillard mediante el grupo amino de la cabeza polar de fosfolípidos y también mediante los grupos carbonilo que resultan de la oxidación de ácidos grasos insaturados, catalizada por ejemplo por iones metálicos [44].

Así que no siempre se puede diferenciar claramente entre AGEs y ALEs, aunque ambos grupos de compuestos se asocian con el estado de hiperglucemia y estrés oxidativo en pacientes con diabetes. Es importante que el principal objeto de este estudio, CML se puede formar durante el catabolismo de carbohidratos o de lípidos, así que se le puede catalogar en ambos grupos. De hecho, CML es considerada un biomarcador de AGEs y del daño oxidativo.

Los AGEs pueden formarse de una variedad de precursores e intermediarios de la reacción de Maillard. En este contexto, es necesario mencionar la participación de compuestos dicarbonílicos que incluyen MG, GO y 3-desoxiglucosona. Estos α -oxoaldehídos, provienen de la degradación oxidativa de azúcares, de la glicación y degradación de intermediarios y de la peroxidación de lípidos. En particular, el MG se forma durante metabolismo natural de glucosa, principalmente mediante la β -eliminación no enzimática del grupo fosfato de los fosfatos triosa derivados de la glucólisis [45]. El organismo cuenta con mecanismos de defensa, basados en sistema de glioxalinas. La producción excesiva, la ingesta de α -oxoaldehídos con alimentos y el funcionamiento deficiente de los sistemas de defensa provocan un aumento de los niveles celulares de estos compuestos, la subsecuente producción de los AGEs y los daños por envejecimiento prematuro, inflamación, diabetes y aterosclerosis, entre otros.

Aunque las etapas iniciales ocurren rápido y son reversibles, los AGEs son compuestos altamente estables y, en condiciones fisiológicas su formación puede tomar semanas y hasta años. En cuanto al daño a proteínas, resultan afectadas principalmente aquellas de larga vida como el colágeno. En estado de estrés oxidativo, aumenta la cantidad de sustratos y las reacciones se aceleran, resultando afectadas diferentes biomoléculas de vida corta tales como

la insulina, diferentes tipos de enzimas, aminoácidos libres o lípidos [46]. Cabe señalar que los procesos de formación de los AGEs se aceleran sustancialmente por condiciones exógenas a los organismos como los alimentos, siendo factores importantes la temperatura, alteración del pH, contenido de agua o presencia de catalizadores potenciales. Finalmente, se sabe que los AGEs pueden formarse también en etapas tempranas de los procesos de glicación, así el término “productos finales de glicación avanzada” es una denominación errónea. Sin embargo, éste concepto es simple, ampliamente usado, entendible y aceptado [47].

Los AGEs se refieren a un grupo de compuestos entre los cuales se pueden mencionar: CML, CEL, pentosidina, argpirimidina, *N*^o-carboximetil-arginina, dímeros de lisina con glicoxal, metilglicoxal y 3-desoxiglucosona (GOLD, MOLD, DOLD, respectivamente) y AGEs derivados de residuos de arginina y MGO, MG-H1 (*N*-δ-(5-hidro-5-metil-4-imidazolón-2-il-ornitina), MG-H2 (5-(2-amino-5-hidro-5-metil-4-imidazolón-1-il) norvalina) y MG-H3 (5-(2-amino-4-hidro-4-metil-5-imidazolón-1-il) norvalina) [41].

Los efectos dañinos de los AGEs no solamente se relacionan con su síntesis, pero sobre todo con su persistencia en el organismo. Las proteínas glicadas no son reconocidas por el proteosoma, por lo que se van acumulando, provocando un mal funcionamiento del metabolismo celular, y finalmente la muerte por apoptosis [48].

La absorción, distribución y eliminación de AGEs en el organismo aún no es clara, algunos estudios se han llevado a cabo con este fin [49–52]. Se ha estimado que el 10% de los AGEs ingeridos son absorbidos y transportados por el cuerpo, dos terceras partes de estos permanecen en el cuerpo y son incorporados covalentemente a los tejidos; la tercera parte es excretada por los riñones, la cual es la forma predominante de excreción [53,54]. En un estudio de la biodisponibilidad y cinética de pirralina y pentosidina se encontró que la mayor parte de la pirralina proveniente de la ingesta de alimentos es absorbida y rápidamente excretada dentro de las 48 horas siguientes [55]. En otro estudio con sujetos sanos que consumieron ciertos alimentos específicos ricos en AGEs, se obtuvo en un solo día la recuperación de cerca del 50% de la pirralina y el 60% de la pentosidina en muestras de orina de estos AGEs provenientes de los alimentos administrados [52]. Se llevó a cabo un experimento en el que se alimentaron ratas con corteza de pan y se concluyó que la mayor ruta de excreción de CML derivada de la corteza de pan es por la vía fecal y está relacionada directamente con la ingesta [51].

Actualmente el estudio de AGEs ha sido una de las áreas más importantes de la investigación sobre diabetes y estrés oxidativo, debido a su carácter de biomarcadores de desórdenes metabólicos y enfermedades [56,57]. Los Institutos Nacionales de Salud (NIH) y la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de los Estados Unidos en 2001 definieron un biomarcador como un parámetro que es objetivamente medido y evaluado como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos, o respuestas farmacológicas a la intervención terapéutica. Los niveles de un biomarcador ideal deben ser medidos en una muestra como sangre, orina o biopsia de tejido y debe relacionarse al fenotipo clínico ya sea causal o indirecto [58].

I.3.1 Glioxal y metilglioxal como precursores de AGEs

Glioxal y metilglioxal son productos altamente reactivos de la descomposición de azúcares o la peroxidación de lípidos, son identificados como intermediarios clave en la formación de AGEs. Hablamos particularmente de especies dicarbonílicas reactivas, conocidos como α -dicarbonilos o α -oxoaldehídos. Estas especies son agentes glicantes más potentes respecto a los azúcares y modifican rápidamente las cadenas laterales reactivas de proteínas. Específicamente el grupo ϵ -amino de lisina y el grupo guanidino de arginina han sido identificados como los sitios preferenciales para el ataque de especies dicarbonílicas. CML y CEL son las modificaciones de lisina más frecuentes en proteínas glicadas que han sido aisladas de alimentos procesados y encontradas en tejidos del cuerpo humano [59]. La acumulación de especies como glucosa, fructosa, desoxiglucosa, GO, MG y triosa fosfato inducen el llamado “estrés carbonilo” debido a su impacto sobre proteínas o lípidos, desencadenando la formación de AGEs y ALEs [60].

El estrés carbonilo puede ser causado por varios mecanismos, las especies pueden provenir de estrés oxidativo o de fuentes no oxidativas, como por ejemplo la disminución de la tasa de tioles libres. El estrés carbonilo puede alterar la estructura y funcionamiento celular y de proteínas de matriz y también contribuir al desarrollo de complicaciones asociadas con uremia, falla renal y diálisis [61]. En cuanto a metilglioxal, este compuesto ha sido asociado con el aumento de los niveles de AGEs en enfermedades relacionadas con el envejecimiento, en diabetes y Alzheimer [62,63].

El metilglioxal es un intermediario de la reacción de Maillard y se forma por reacciones no enzimáticas de fragmentación de azúcar, catalizadas por aminas o iones metálicos y por la descomposición espontánea de intermediarios triosafosfato en la glucólisis. El metilglioxal puede formarse también durante el catabolismo de treonina o de acetona, Figura 5.

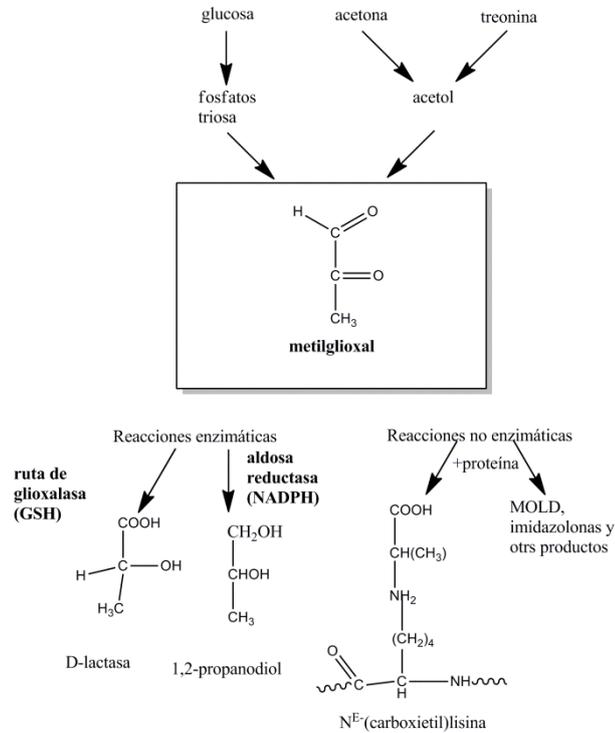


Figura 5. Rutas de formación y reacciones enzimáticas y no enzimáticas de metilglioxal [62].

La desintoxicación de metilglioxal y de otros compuestos 1,2-dicarbonílicos se puede llevar a cabo por una reacción secuencial de dos enzimas, glioxalasa I y glioxalasa II, con ayuda del glutatión como cofactor, y dando como producto D-lactato, en el caso de metilglioxal, Figura 6 [62].

El metilglioxal puede ser transformado a 1,2-propanodiol vía aldosa reductasa, que involucra NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato). Por otro lado, puede reaccionar con los grupos amino en proteínas y otras biomoléculas para formar CEL, MOLD y otros AGEs [64].

El acetol, y el 1,2-propanodiol, se ven incrementados en el plasma de humanos durante la cetoacidosis diabética. Así, la hiperglucemia y cetoacidosis pueden contribuir a elevar las concentraciones de metilglioxal en tejidos de pacientes con diabetes, acelerando la formación de los AGEs, entrecruzamiento de proteínas y a largo plazo, complicaciones diabéticas [65].

Otro dicarbonilo importante es el glioxal; este se forma de la oxidación de glucosa y en la peroxidación de lípidos y reacciona directamente con el grupo ϵ -amino de lisina formando CML.

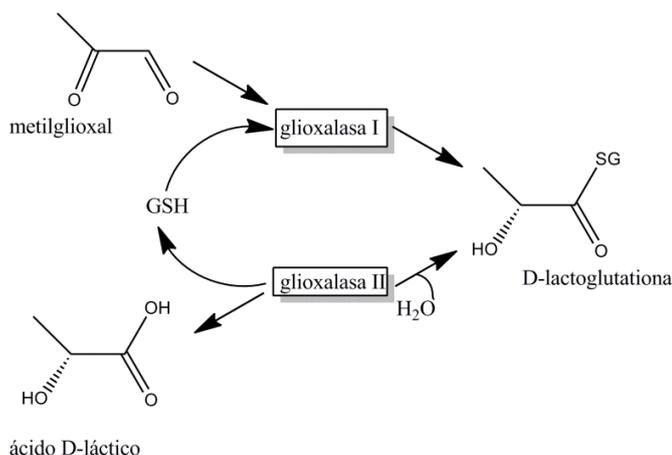


Figura 6. Sistema glioxalasa responsable de la desintoxicación de metilglioxal y otros compuestos 1,2-dicarbonilo [62].

Los compuestos α -dicarbonilo participan en la síntesis de los AGEs de baja masa molecular tales como G-H1, MG-H1, 3DG-H1, CML, CEL y argpirimidina. Por otro lado, estos compuestos también contribuyen al entrecruzamiento de las proteínas mediante AGEs con estructuras heterocíclicas tales como: MOLD, GOLD, GODIC (dímero de glioxal arginina lisina) y pentosidina. [66–69].

Los compuestos α -dicarbonilo participan en la síntesis de los AGEs de baja masa molecular tales como G-H1, MG-H1, CML, CEL y argpirimidina. [66–69].

I.4 AGEs endógenos y exógenos

En las secciones anteriores se mencionó que los AGEs son productos de reacciones que se llevan a cabo *in vivo*, pero también de la manera exógena, principalmente durante elaboración y almacenaje de alimentos. Es por ello que las dos mayores fuentes de la exposición en humanos a AGEs son mediante su formación endógena en el cuerpo y a través de la ingesta de los alimentos que consumimos.

Como ya se ha descrito antes, la síntesis acelerada de AGEs endógenos y su depósito tisular es una de las principales causas de complicaciones en diabetes. Los AGEs interfieren con la función normal de proteínas mediante la alteración de su estructura o actividad biológica provocando serios daños en el organismo y son generados por un metabolismo anormal de glucosa o del producto de peroxidación de lípidos [70].

Algunos autores indican que la contribución de los AGEs ingeridos con alimentos es mucho más grande que la contribución de AGEs generados endógenamente en el organismo humano [24]. En este sentido, los procesos Maillard que ocurren durante elaboración de alimentos conducen a la formación de un rango variado de compuestos con aroma, compuestos coloridos y AGEs.

De manera similar como en procesos *in vivo*, los mecanismos de reacciones en alimentos pueden incluir vías tanto oxidativas como de radicales libres. Las reacciones pueden llevarse a cabo con proteínas para formar AGEs de alta masa molecular o entre pequeñas moléculas para formar AGEs de baja masa molecular [71].

La diversidad de productos de glicación en alimentos depende de la composición de materias primas y de las condiciones de su procesamiento. Algunos productos se pueden formar con rendimiento relativamente alto, por encima del 30%, bajo condiciones específicas, otros compuestos se forman en cantidades muy pequeñas [24].

La velocidad de formación y la diversidad de los AGEs generados en alimentos depende de muchos factores tales como composición, presencia de metales de transición y disponibilidad de antioxidantes, tiempo de reacción, temperatura de procesamiento, concentraciones de reactivos, disponibilidad de agua y condiciones pH. Como regla, la velocidad de reacción de Maillard es al menos el doble cuando la temperatura se eleva 10 °C. Si el pardeamiento es usado para medir el progreso de la reacción de Maillard, entonces 4 semanas a 20 °C, 3 h a 100 °C y 5 min a 150 °C dan aproximadamente el mismo resultado [72].

La CML fue el primer AGE identificado en alimentos, en leche y productos lácteos, y puede formarse por diversas rutas en alimentos, Figura 7 [73], ha sido ampliamente aceptada como indicador de AGEs exógenos.

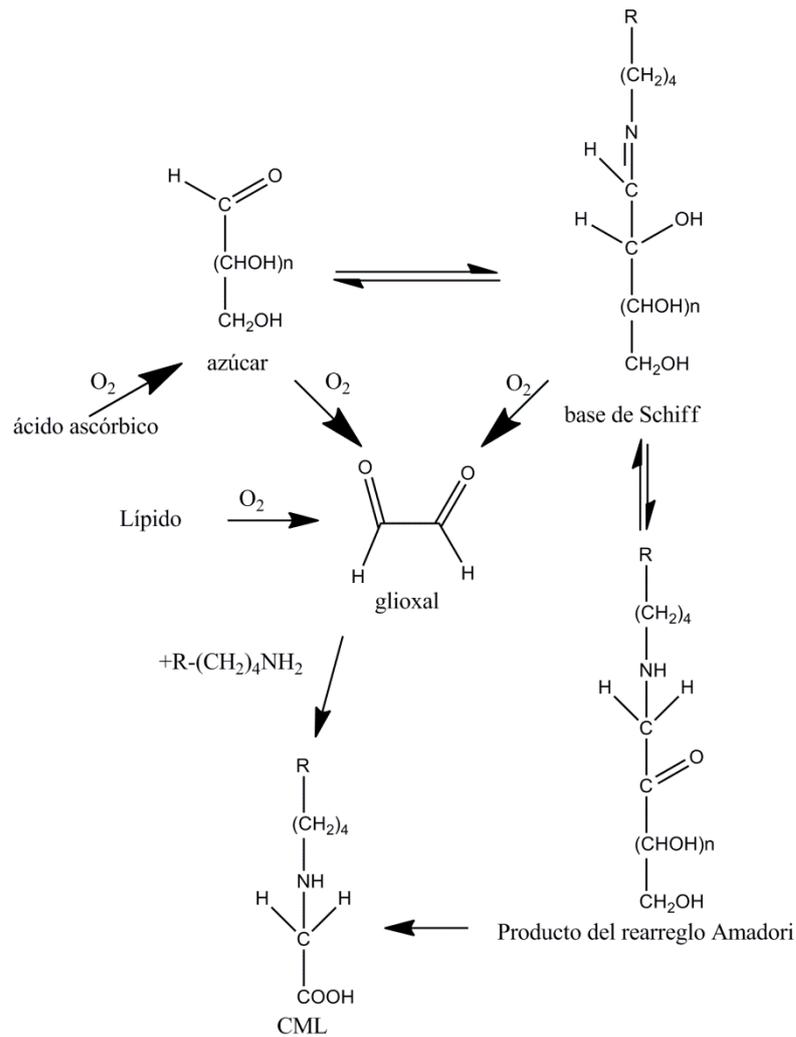


Figura 7. Rutas de la formación de CML en los sistemas alimentarios [74].

Además de derivarse de productos de Amadori, se forma de azúcares, lípidos y ácido ascórbico. CML es también el AGE que más se ha investigado en alimentos, en estudios epidemiológicos humanos y en modelos animales; empleando este compuesto como un marcador de los AGEs inducidos por el procesamiento de alimentos [75,76].

Cabe mencionar que en el grupo de los AGEs exógenos, no solamente se incluyen aquellos provenientes de las fuentes dietéticas sino también formados en el humo del tabaco. Se han encontrado productos reactivos de glicación, específicamente compuestos carbonílicos, en extractos acuosos de tabaco y en humo de tabaco [77,78].

El impacto de los AGEs exógenos sobre la salud humana es actualmente un tema muy debatido. La controversia existe si los alimentos tratados térmicamente pueden elevar los niveles de

especies reactivas de oxígeno y marcadores proinflamatorios en la corriente sanguínea. A pesar de sugerido efecto nocivo de los AGEs dietéticos, es necesario recordar que el proceso de calentamiento de alimentos es de manera general benéfico ya que permite mejorar las propiedades organolépticas, reduce flora microbiana, favorece la generación de actividad antioxidante atribuida a reductonas y melanoidinas que son productos de la reacción de Maillard, etc.

Independientemente de la problemática de los AGEs en dieta, durante cocción pueden ocurrir otros procesos que potencialmente afectan los niveles de antioxidantes endógenos, por ejemplo glutatión, lo cual promueve la formación de especies reactivas de oxígeno que a su vez favorecen la oxidación de la glucosa y lípidos, produciendo especies carbonílicas, precursores de los AGEs *in vivo* [79]. Con base en el sugerido papel de los AGEs exógenos, es importante su determinación en alimentos y al mismo tiempo es necesario profundizar en el conocimiento de factores que afecten su formación.

I.5 Principales AGEs y su importancia

I.5.1 N^ε-carboximetil-lisina

N^ε-carboximetil-lisina es el AGE que frecuentemente es seleccionado como marcador de AGEs tanto exógenos como endógenos [80].

En estudio de la formación de CML, se han definido tres rutas de las síntesis, actuando ε-fructosa-lisina y glioxal como intermediarios, Figura 8.

En la ruta de glicación auto-oxidativa, glioxal se deriva de la oxidación de glucosa, después reacciona con lisina para formar CML. Dentro de la ruta Namiki, glioxal proviene de la reacción de la base de Schiff con lisina para formar CML. La síntesis de CML por la ruta de glicación, involucra un rearrreglo Amadori de la base de Schiff para formar ε-fructosa-lisina, la cual es oxidada para generar finalmente CML [81–85].

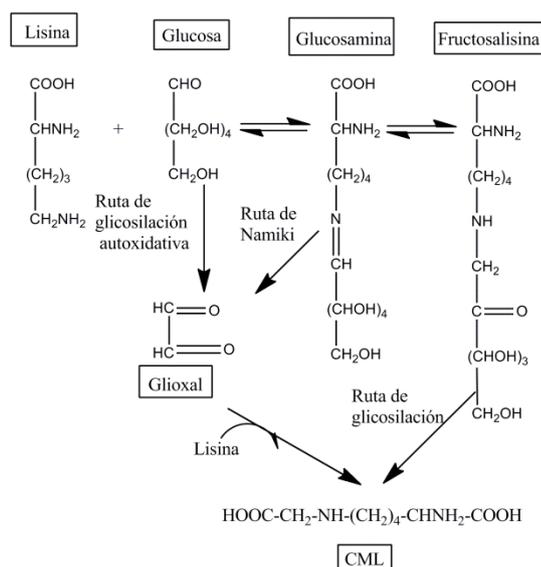


Figura 8. Tres rutas de formación de CML [86].

En 1985, Dr. Mahtab Ahmed estaba estudiando la química de Maillard con proteínas glicadas con *N*^α-formil-*N*^ε-fructosa-lisina. Su incubación resultó en la detección y caracterización de CML como primer producto de glicación avanzada. Su identificación se llevó a cabo con las técnicas de HPLC y GC-MS, se obtuvo un rendimiento de la síntesis del 40% [85,87].

Poco tiempo después, se reportó que la comida procesada a partir de leche en presencia de ascorbato también contenía altas concentraciones de CML, un argumento más para utilizar este compuesto como indicador de los AGEs exógenos. Por otro lado, estudios posteriores revelaron por primera vez que el contenido de CML en proteínas del cristalino y colágeno de la piel se incrementaba con la edad y fue así como se CML se convirtió en un biomarcador de envejecimiento químico de proteínas en tejidos.

En 1993, el Dr. Timothy Lyons y colaboradores estudiaron la glicación de colágeno en pacientes con diabetes, y observaron niveles elevados de fructosa-lisina, CML y pentosidina. Con este estudio, proporcionaron evidencia de la modificación química de colágeno vía reacción de Maillard y que la aceleración de estos procesos en diabetes dependen de la edad [87]. En investigaciones más recientes se ha observado que el contenido en proteínas de CML se incrementa con el envejecimiento y se ha correlacionado con complicaciones de la diabetes [41]. La aparición de CML *in vivo* es favorecida no sólo por concentraciones elevadas de glucosa, sino también por estrés oxidativo.

1.5.2 N^ε-carboxietil-lisina

En 1997 se describió un nuevo producto final de glicación avanzada, N^ε-carboxietil-lisina, la cual se forma durante la reacción de metilglioxal con residuos de lisina de una proteína. CEL se sintetizó por primera vez por medio de la reacción de formil-lisina con piruvato en presencia de cianoborohidruro de sodio, a una relación molar 1:1:3 en tampón de fosfatos 0.2 M, pH 7.4, a 37 °C por 3 días, obteniéndose un rendimiento del 14%. CEL puede formarse no sólo de metilglioxal, sino también de fosfato triosa y de azúcares diferentes de glucosa. Se puede formar por diferentes mecanismos que incluyen el re-arreglo de Cannizzaro, seguido de reacciones de hidratación y deshidratación [88].

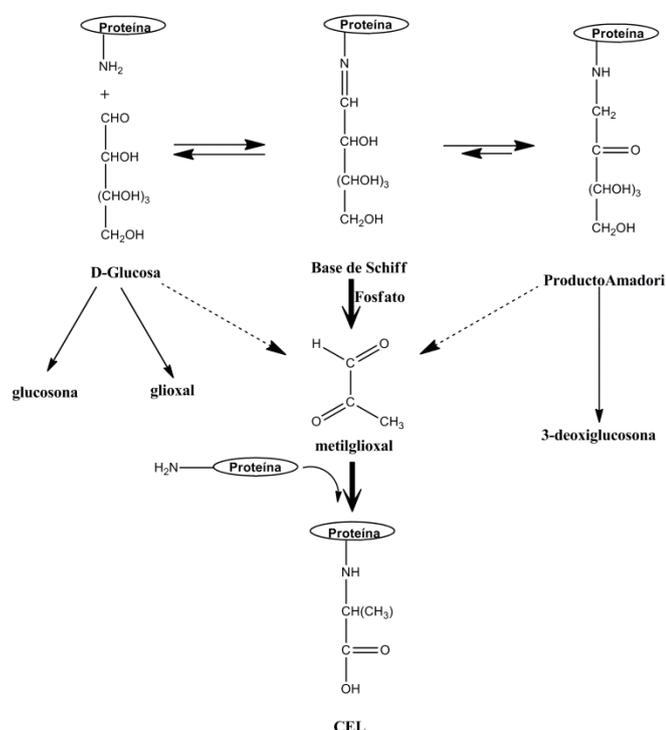


Figura 9. Posibles mecanismos para la formación de CEL en la reacción de Maillard [89].

En cuanto a las rutas propuestas para la formación de CEL *in vivo*, ésta es producto de la reacción de metilglioxal con el grupo amino de lisina. Una de las rutas implica la reducción de la base de Schiff del aducto de piruvato el cual está asociado con actividad enzimática para producir metilglioxal. Otra de las rutas propuestas es la modificación de proteínas con metilglioxal y la tercera es la producción de intermediarios reactivos durante la peroxidación de lípidos, tales como araquidonato que posteriormente puede ser oxidado antes de la aducción a lisina, Figura 9 [89].

I.5.3 Pentosidina

Pentosidina es un AGE que fue aislado y caracterizado por primera vez en 1989 por Sell y Moonier, se trata de un producto fluorescente formado por el entrecruzamiento de residuos de los aminoácidos lisina y arginina unidos a un anillo imidazol-[4,5-b]-piridina. En estudios posteriores se encontró que la pentosidina se acumula con la edad en tejidos y a una velocidad acelerada en pacientes que sufren complicaciones a causa de la diabetes [90].

Muchas investigaciones han reportado un aumento significativo en los niveles de pentosidina en muestras de orina y plasma de personas diabéticas con complicaciones como neuropatía, nefropatía, microalbuminuria, retinopatía y complicaciones microvasculares. Se ha demostrado que los niveles de pentosidina dependen del estado glicémico de los pacientes a largo plazo; en otras palabras, en diabéticos que logran mantener bajos niveles de glucosa, se observan más bajas concentraciones de la pentosidina en el torrente sanguíneo respecto a los pacientes con hiperglucemia no controlada. Así que se ha propuesto el uso de pentosidina como marcador en el control de los pacientes con diabetes, debido a que sus concentraciones séricas proporcionan información retrospectiva a largo plazo en el control metabólico de glucosa [91–94]. Aunado a esto, en diversas investigaciones se ha planteado el análisis de pentosidina como marcador de eventos cardiovasculares en pacientes con diabetes mellitus, de falla renal crónica; retinopatía, falla al corazón, esclerosis múltiple; la enfermedad de Alzheimer y como factor predictivo de las causas de mortalidad de diabetes mellitus tipo 1, entre otros. Sin embargo, aún no se presentan resultados concluyentes que definan a la pentosidina como marcador de estas afecciones [95].

Además del análisis de pentosidina en muestras de suero y orina, se ha desarrollado un método no invasivo para determinar AGEs fluorescentes en la piel. El análisis se hace con la ayuda de lectores de autofluorescencia, y existen sus aplicaciones para predecir complicaciones de diabetes y mortalidad en pacientes con diabetes [96]. Es necesario realizar más investigaciones relacionadas con este método de análisis para lograr una selectividad mayor. Pentosidina no sólo ha sido medida en muestras biológicas, también se ha analizado en alimentos; su aparición se ve favorecida por las altas temperaturas de cocción de los alimentos por un tiempo prolongado. Por otra parte, en su formación influye obviamente la cantidad de los azúcares y proteínas disponibles en las materias primas de las que está elaborado el alimento. Cabe resaltar el papel facilitador del agua en los progreso de la reacción de Maillard: ya que en soluciones

acuosa la reacción se lleva a cabo con mejor cinética y de manera más eficiente; sin embargo, el exceso de agua impide la deshidratación necesaria para formar AGEs y se evita así el pardeamiento en alimentos [97].

I.5.4 Pirralina

Pirralina (ϵ -2-(formil-5-hidroximetil-pirrol-1-il)-L-norleucina) es un derivado del aldehído de pirrol, su síntesis *in vitro* fue publicada por primera vez en 1980; el producto obtenido mediante incubación de D-glucosa y L-Lisina, fue caracterizado por espectroscopía ultravioleta, cromatografía en capa fina y se determinó su estructura con MNR [98]. Más tarde se logró identificar este AGE *in vivo*, en tejidos biológicos y en proteínas plasmáticas de individuos diabéticos, con ayuda de técnicas inmunológicas usando anticuerpos monoclonales y policlonales [28,29].

Portero-Otin y col. determinaron pirralina en muestras de orina de pacientes con diabetes, haciendo uso de las técnicas HPLC, espectrofotometría UV-Vis y espectrometría de masas; encontraron una mayor concentración de pirralina en pacientes con diabetes que en el grupo control. Esto sugiere que la pirralina podría ser implicada en la patogénesis de diabetes [30].

Pirralina se forma de 3-desoxiglucosona en la reacción no enzimática entre glucosa y el grupo ϵ -amino de residuos de lisina en proteínas [47]. La 3-desoxiglucosona se forma por la ruta enzimática y no enzimática. Glucosa por la ruta enzimática, pasa por la vía de la aldosa reductasa formando sorbitol; luego con ayuda de enzimas polioldeshidrogenasa (PDH) arroja fructosa; a partir de fructosa en presencia de fructosa-3-fosfato puede formar espontáneamente 3-desoxiglucosona, Figura 10 [99].

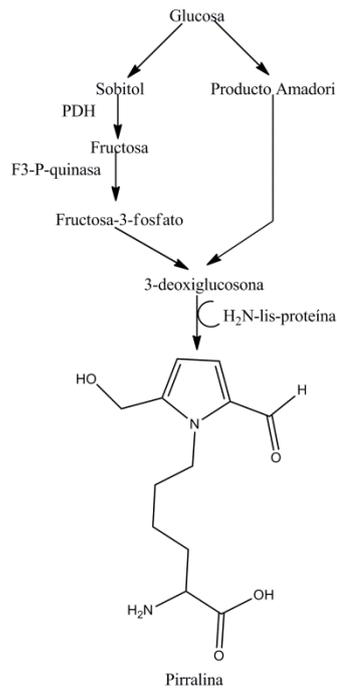


Figura 10. Rutas enzimática y no enzimática para la formación *in vivo* de 3-desoxiglucosona, el precursor de pirralina [99].

I.5.5 Argpirimidina

En 1997, Shipanova y col. descubrieron argpirimidina [N^{δ} -(5-hidroxi-4,6-dimetilpirimidin-2-il)-L-ornitina], un AGE fluorescente, que es el producto final de una modificación proteica a residuos de arginina por metilglioxal [100]. Argpirimidina es un producto azul fluorescente que presenta una absorción máxima de 335 nm y una emisión máxima a 382 nm y. Este producto de glicación es degradado parcialmente con hidrólisis ácida (HCl 6 N, 110 °C, 20 h); sin embargo, en muestras biológicas, puede ser cuantificado por HPLC con detección fluorimétrica si se disminuye el tiempo de hidrólisis [101]. Se han encontrado altas concentraciones de este AGE en proteínas de cristalinos afectados por cataratas, en los tejidos de pacientes con diabetes y con cáncer [102], en las fibrillas de amiloide de pacientes con polineuropatía amiloidótica familiar y también *in vitro* en HSA.

I.5.6 *N*^o-carboximetil-arginina

Es un AGE que fue identificado por primera vez en el año 2000 por K. Iijima y col. Este compuesto no había sido detectado antes debido a su labilidad y degradación durante la hidrólisis de las proteínas. La identificación y caracterización de éste AGE se hizo con MALDI-MS (espectrometría de masas con desorción/ionización mediante láser asistida por matriz) y MNR (Resonancia Magnética Nuclear). Se observó que *N*^o-carboximetil-arginina (CMA) se incrementaba gradualmente en colágeno, además de encontrarse en mayor cantidad que pentosidina. Estos resultados sugieren que CMA es el AGE principal que se forma en colágeno. La ruta por la cual se genera CMA aún no es clara, pero probablemente están involucrados compuestos dicarbonílicos, generados por la autooxidación de glucosa o degradación de los productos Amadori. Estos compuestos reaccionan rápidamente con proteínas para formar entrecruzamientos y productos fluorescentes. CMA puede estar implicada en enfermedades asociadas con el envejecimiento y el desarrollo de diabetes [103].

I.5.7 DOLD, MOLD, GOLD

Se han identificados varios entrecruzamientos en proteínas, tales como dímeros de lisina que resultan de la reacción entre dos cadenas de lisina laterales y dos moléculas de glioxal, metilglioxal o 3-desoxiglucosona, llamados GOLD, MOLD y DOLD, respectivamente, Figura 11.

MOLD y GOLD se encuentran en niveles similares en proteínas de suero; se observa un incremento de estos compuestos en pacientes que padecen uremia y hemodiálisis. El origen de estos AGEs en proteínas de suero de pacientes que padecen uremia, se desconoce; probablemente se deriven directamente de glioxal y metilglioxal en plasma o puede ser que provengan de reacciones de ascorbato o deshidroascorbato con proteínas bajo condiciones oxidativas [104].

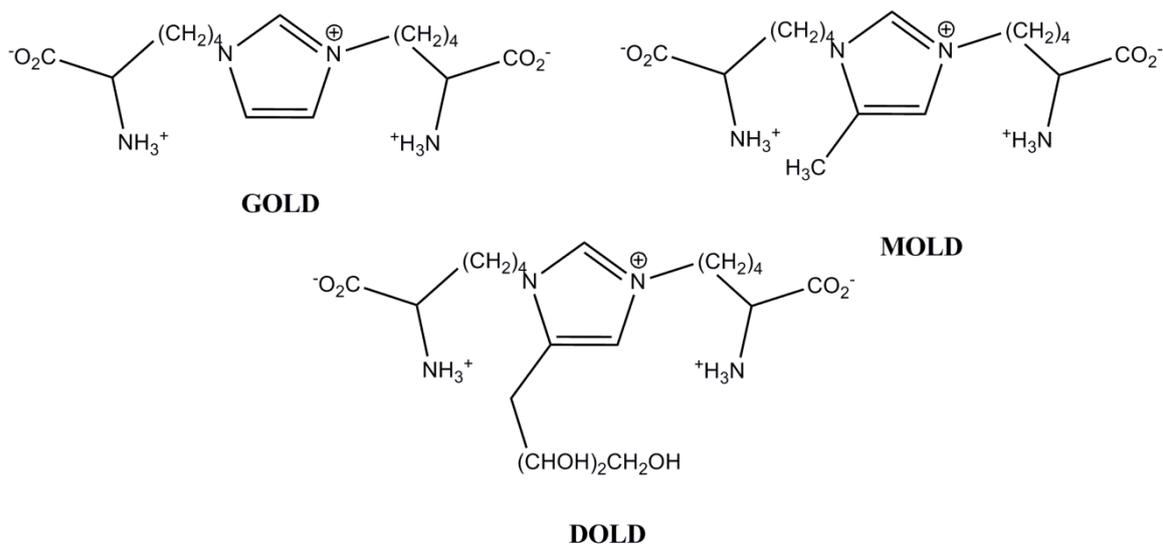


Figura 11. Estructuras químicas de los dímeros de lisina. El grupo amino terminal NH_3^+ y el C terminal del grupo carboxilato CO_2^- es parte de los enlaces peptídicos en proteínas y péptidos.

1.5.8 MGH1, MGH2 Y MGH3

Las estructuras de la Figura 12 han sido identificadas como los principales AGEs formados de residuos de arginina y metilgloxal; formadas por procesos no oxidativos.

Los tres átomos de nitrógeno del grupo guanidino de la arginina sufren una condensación con metilgloxal y resulta la formación de tres AGEs isoméricos, llamados MG-H1 (*N*- δ -(5-hidro-5-metil-4-imidazol-2-il-ornitina), MG-H2 (5-(2-amino-5-hidro-5-metil-4-imidazol-1-il) norvalina) y MG-H3 (5-(2-amino-4-hidro-4-metil-5-imidazol-1-il) norvalina).

Adicionalmente, el isómero MG-H3, se cree que mediante hidrólisis se convierte en carboxietil-arginina (CEA) [59].

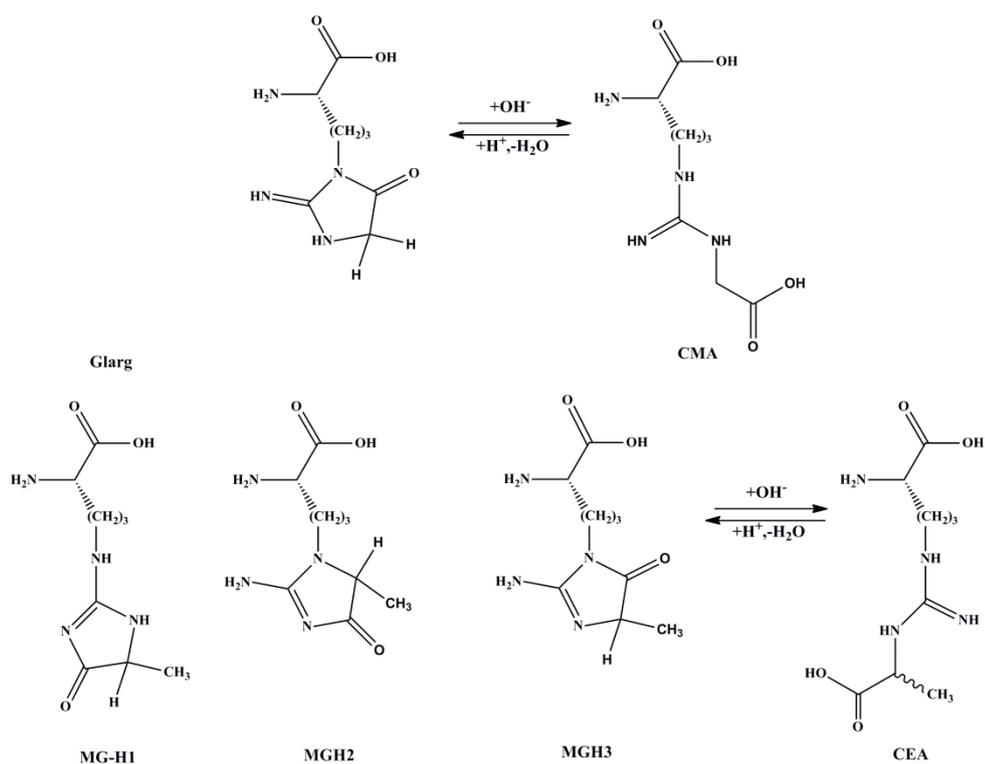


Figura 12. Estructuras de AGEs derivados de arginina, MG-H1, MG-H2, MG-H3, CMA y CEA [59].

Las hidroimidazonas no son estables durante la hidrólisis ácida y solo se detectan bajo condiciones suaves del análisis [105]. La detección cuantitativa de varios AGEs en proteínas plasmáticas, incluyendo HSA (albúmina de suero humano), mostró que una de las importantes modificaciones que ocurren en HSA es con hidroimidazonas. De éstas, se estimó que MG-H1 está presente en aproximadamente el 2% de HSA en individuos sanos normales [106].

I.6 Determinación de los AGEs

Debido a la importancia de los AGEs en patologías humanas y posible papel de los AGEs exógenos, la determinación de estos compuestos es altamente demandada. La medición de los productos finales de glicación avanzada puede llevarse a cabo por varios métodos, dependiendo del número de los compuestos a identificar, la selectividad requerida, la concentración esperada y la composición química de la muestra.

De manera general, la medición de productos finales de glicación avanzada puede llevarse a cabo mediante varios enfoques: i) ensayos que permiten la estimación de AGEs basados en su fluorescencia nativa; ii) métodos inmunoquímicos iii) determinación de compuestos individuales por procedimientos analíticos altamente selectivos; iv) estudios exploratorios enfocados en la caracterización estructural de nuevos compuestos o entrecruzamientos de AGEs.

Existe una variedad de procedimientos que han sido propuestos para este fin, cada uno de ellos presenta diferente capacidad en cuanto a la selectividad y sensibilidad. Las dos vertientes en el análisis de los AGEs son: confirmar/identificar compuestos individuales con base en la elucidación de su estructura molecular y lograr cuantificación de compuestos conocidos a nivel de trazas y en matrices químicamente complejas como muestras clínicas y de alimentos. La información obtenida de estos análisis permite avanzar en el entendimiento de los mecanismos responsables de procesos de glicación, elucidar el papel de los AGEs en la patogénesis y en el progreso de las enfermedades crónico-degenerativas. Considerando papel de algunos AGEs como bioindicadores, se buscan también los procedimientos de su determinación relativamente simples, pero confiables, adecuados para su aplicación en el análisis rutinario.

1.6.1 Ensayos simples para AGEs fluorescentes

La rigidez estructural de los entrecruzamientos de AGEs, principalmente vía lisina y arginina, es responsable de las propiedades fluorescentes de varios compuestos tales como pentosidina, GOLD, MOLD, argpirimidina, pirralina, etc. Como ejemplo, pentosidina ha sido cuantificado en varios estudios por HPLC-FLD [98,124,125,127,129,130,107]. Las mediciones fluorimétricas directas proporcionan información útil del daño a tejidos causado por la acumulación de AGEs, pero son incapaces de cuantificar compuestos individuales. Por otra parte, estos ensayos son sencillos, no hay necesidad de instrumentación sofisticada ni de un analista entrenado, y pueden ser adoptados en el control de laboratorio de rutina, especialmente cuando se realizan en un sistema de flujo o directamente en la piel expuesta. Típicamente, se utilizan longitudes de onda de excitación en el intervalo de 350-390 nm con medición de emisión de fluorescencia a 440-470 nm; se recomienda eliminar los lípidos de la muestra analizada y las interferencias potenciales de los péptidos/proteínas que son naturalmente

fluorescentes y pueden eliminarse mediante la normalización de la señal utilizando la absorbancia de la muestra adquirida a 280 nm [107]. Los ensayos fluorimétricos se han utilizado preferentemente para evaluar los AGE endógenos en suero, saliva, orina o piel [108]. Al analizar los fluidos biológicos, los AGEs pueden ser evaluados en fracciones de baja y alta masa molecular después de la precipitación de proteínas con ácido tricloroacético o ácido perclórico [109,110]. El lector de AGEs comercialmente disponible de DiagnOptics B.V. (Groningen, Países Bajos) fue diseñado para la medición no invasiva de la auto-fluorescencia de la piel; la reflectancia relativa de la piel también se mide con este dispositivo con el fin de compensar las diferencias en la pigmentación de la piel [111].

A pesar de la conveniencia evidente de los ensayos de fluorescencia, sigue siendo incierto qué unidades se deben utilizar para expresar el contenido de AGEs, qué AGEs se miden, qué calibrante debe ser aplicado y cómo asegurar la confiabilidad analítica de los resultados obtenidos.

1.6.2 Métodos inmunoquímicos

El enfoque bioquímico más común para la medición de AGEs se basa en los ensayos ELISA. Se había aceptado generalmente que la CML podría ser el epítipo dominante reconocido por los anticuerpos AGEs, especialmente los policlonales [26]; sin embargo, en las últimas dos décadas, varios estudios han informado sobre la producción de anticuerpos contra otros compuestos específicos, tales como albúmina glicosilada, metilglioxal, CEL, pentosidina, entre otros, que demostraron su viabilidad en el análisis de muestras clínicas y alimentos [112–115]. Los kits ELISA comerciales también están disponibles de varios proveedores internacionales (por ejemplo, OxiSelect™ de Cell Biolabs) o locales. Estos kits se utilizan preferentemente en estudios clínicos o, de manera más general, cuando se deben ejecutar grandes series de muestras y cuando no se requiere una cuantificación exacta/precisa. Aunque son muy populares y fáciles de usar, los kits de ELISA presentan varios inconvenientes que a menudo han sido destacados en la literatura científica [116]. Los principales problemas incluyen una especificidad incierta y una posible reactividad cruzada de los anticuerpos aplicados. Hoy en día se dificultan las comparaciones directas altamente demandadas de los resultados obtenidos en diferentes estudios, por lo que hace falta un método de cuantificación universal y fiable que, además, de

la evaluación de los AGEs enlazados o de las estructuras de entrecruzamiento requiere la digestión de las proteínas. Cabe destacar, que los resultados ELISA han sido a menudo validados por procedimientos analíticos basados en la separación cromatográfica y detección por espectrometría de masas [24,116–119]

I.6.3 Métodos analíticos basados en separaciones por cromatografía de líquidos

La mayor ventaja de los procedimientos de química analítica se basa en su alta especificidad hacia los compuestos individuales y su capacidad para la determinación precisa y exacta. Los resultados obtenidos se expresan directamente como la masa de analito por unidad de masa o volumen de la muestra inicial o por contenido de proteínas; este enfoque cuantitativo es extremadamente importante cuando se deben comparar las concentraciones de compuestos específicos entre grupos experimentales, entre diferentes procedimientos analíticos o ensayos clínicos, en los estudios de dosis-respuesta y también en la evaluación de la ingesta dietética de AGE exógenos.

El pretratamiento de la muestra es el paso crítico en el análisis de AGEs. Como ya se ha mencionado anteriormente, los datos sobre el contenido de AGEs libres, unidos y totales son de interés y para los dos últimos, se tiene que realizar una hidrólisis de proteínas ácida o enzimática [120]. El protocolo típico implica la eliminación por extracción de lípidos con una mezcla de metanol-cloroformo 2:1 v/v, cloroformo o hexano, la reducción con borohidruro de sodio necesario para prevenir de artefactos formados por oxidación durante la hidrólisis. Pues los productos de la reacción de Maillard, tales como fructosa lisina pueden convertirse en CML por escisión oxidativa durante la etapa posterior de hidrólisis, así, con la adición de borohidruro de sodio, fructosa lisina se convierte en hexitol-lisina, evitando así la formación de CML *de novo* [121]. El paso siguiente es la precipitación de proteínas, recuperación de la pastilla y finalmente hidrólisis ácida o enzimática; en la hidrólisis enzimática se emplean enzimas tales como pepsina, pronasa, aminopeptidasa, colagenasa, leucina y proteasa [122–126]. Para una mayor protección de las muestras contra la oxidación, especialmente durante la hidrólisis ácida químicamente fuerte, los tubos a menudo son enjuagados con nitrógeno antes de ser sellados [119]. Por último, el sobrenadante después de la precipitación de proteínas se puede utilizar para la determinación de AGEs libres [119,127–129].

Para la determinación de varios compuestos en una sola inyección analítica y también para una selectividad mejorada, la separación cromatográfica se suele acoplar a un sistema de detección conveniente [74,130]. Debido a que los AGEs no son volátiles y los compuestos individuales difieren en polaridad, la cromatografía líquida de alta resolución se ha utilizado preferentemente con el modo de separación de fase reversa o de pares iónicos. Varios ejemplos representativos de aplicaciones de HPLC en el análisis de muestras clínicas y de alimentos se resumen brevemente a continuación y en la Tabla 3.

La detección fluorimétrica con las longitudes de onda de excitación/emisión adaptadas para compuestos específicos, ofrece alta selectividad y sensibilidad; este sistema de detección es de especial interés en el análisis de AGEs fluorescentes, como la pentosidina o argpirimidina [131]. En la literatura se pueden encontrar varios métodos para la determinación de estos dos compuestos en plasma sanguíneo, orina, tejidos humanos y productos alimenticios. La separación en fase reversa con pares iónicos y fases móviles que contienen ácido trifluoroacético o ácido heptafluorobutírico ha sido reportada usualmente y las longitudes de onda de excitación/emisión empleadas se encuentran en el rango 320-330 nm y 378-385 nm, respectivamente [97,101,131-134].

Por otra parte, la detección fluorimétrica ha demostrado su utilidad en la determinación de AGEs no fluorescentes después de su adecuada derivatización previa a la inyección en columna. Cabe destacar que la reacción de derivatización no sólo confiere un marcaje fluorescente, sino que también modifica las propiedades fisicoquímicas de los compuestos originales facilitando su separación cromatográfica, por lo que la selección del agente derivatizante es un punto importante. En este sentido, el orto-ftalaldehído (OPA) se usa típicamente para derivatizar aminas primarias con longitudes de onda de detección de excitación/emisión 340 nm/455 nm respectivamente [74].

Otro agente derivatizante es el 6-aminoquinolil-*N*-hidroxisuccinimidil-carbamato (AQC); el cual se une a aminas tanto primarias como secundarias y permite la detección fluorimétrica a 230-245 nm/395 nm [135,136]. Los sistemas HPLC-FLD se han utilizado para la determinación de CML y CEL en muestras clínicas y de alimentos, tal como se describe en varios artículos de investigación [74,136-140].

Con el arribo del desarrollo instrumental y metodológico de la espectrometría de masas, la cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas es el estándar por excelencia en

lo que se refiere a la determinación de AGEs [24,130]. Debido a la selectividad excepcional y capacidad de detección de la espectrometría de masas y la resolución cromatográfica de los compuestos, con esta técnica no es necesaria una derivatización previa a la inyección en columna. Típicamente, el efluente de la columna se introduce directamente en la fuente de ionización por electronebulización suave, se selecciona y fragmenta el ion padre apropiado formado para cada compuesto y permite la cuantificación en modo de monitoreo de reacciones múltiples o selectiva (MRM o SRM).

Una vez que se ha establecido la transición iónica específica para cada analito, la cuantificación se basa en la intensidad del ion fragmento, producto. A pesar de que la intensidad del producto es menor en comparación con la del ion padre, la gran ventaja de MRM se basa en la selectividad mejorada hacia las especies objetivo y la eliminación eficiente del fondo espectral con beneficios evidentes en la exactitud y precisión. Cabe destacar que MRM es especialmente adecuado para la práctica clínica de rutina, ya que puede realizarse utilizando espectrómetros de triple cuadrupolo o trampa iónica que son relativamente rentables, con baja susceptibilidad a la variación de las condiciones instrumentales y fácil de operar.

Una ventaja adicional de la detección por espectrometría de masas es el uso de compuestos los compuestos de interés enriquecidos isotópicamente como estándares internos (IS). Para un compuesto dado, pueden introducirse en la molécula hasta ocho átomos del isótopo estable menos abundante de hidrógeno (^2H), carbono (^{13}C) o nitrógeno (^{15}N) y este IS se comporta durante todo el procedimiento idénticamente como el analito, aunque es detectado como una especie separada. De esta manera, cualquier imprecisión ejecutada durante la manipulación de la muestra se elimina eficientemente, así como cualquier problema de supresión de ionización.

Las condiciones típicas de MRM para el análisis de CML implican la transición iónica $205 \rightarrow 84$ m/z o $205 \rightarrow 130$ m/z ($207 \rightarrow 84$ m/z para CML-D₂ y $20 \rightarrow 88$ para CML-D₄ m/z); las transiciones iónicas usadas para CEL son $219 \rightarrow 130$ m/z o $219 \rightarrow 84$ m/z ($223 \rightarrow 88$ m/z para CML-D₄); para la transición de pentosidina $379 \rightarrow 135$ m/z ; en cada caso, la precisión de masa depende de la capacidad de resolución del instrumento [106,119,120,122–129,141–146]. La técnica con IS no sólo asegura mayor exactitud y precisión, sino que también permite una mayor robustez y la adopción de protocolos no tan rigurosos, una cuestión importante en el análisis de rutina de grandes series de muestras biológicas y clínicas.

En la Tabla 3 se resumen algunos trabajos publicados en los últimos años sobre el análisis de AGEs por cromatografía de líquidos en su mayoría con detección por espectrometría de masas en modo MRM. Pentosidina es una especie catiónica, CML y CEL son compuestos polares, por lo que la retención/separación de estos AGEs en las columnas de fase reversa se lleva a cabo a menudo en presencia de pares iónicos, típicamente ácido nonafluoropentanoico (NFPA) [119,123–126,128,141,143,146].

Alternativamente, también se pueden emplear columnas cromatográficas de interacción hidrofílica (HILIC) o columnas de sílice modificadas con grupos amino [129,142,144]. Por último, la cromatografía de líquidos de alta resolución debe ser mencionada como la técnica de separación eficaz en términos de velocidad, sensibilidad y resolución, lo que la hace muy adecuada para la detección en espectrometría de masas [122,123,126,128]

Tabla 3. Resumen de algunos artículos publicados de los AGEs *N*^ε-carboximetil-lisina y *N*^ε-carboxietil-lisina por cromatografía de líquidos.

Tipo de muestra	Analito	Pretratamiento	Quipo Instrumental	Cuantificación	LOD, LOQ	Resultados	Referencia
Pan	CML	Eliminación de lípidos, reducción, hidrólisis	HPLC-FLD, (derivatización con OPA)	–	LOD 0.42 ng, LOQ 1.29 ng	49.71 mg/kg en corteza 15.09 mg/kg en migas	[147]
Té	CML, CEL	Eliminación de lípidos, reducción, hidrólisis, SPE	HPLC-ESI (+)-TQMS (pares iónicos con NFPA)	MRM IS CML-D ₄ , CEL-D ₄	CML: LOD 3.5 ng/mL, LOQ 8.5 ng/mL CEL: LOD 1.7 ng/mL, LOQ: 4.3 ng/mL	CML: 11.0 a 1701 μg/g CEL: 4.6 a 133 μg/g	[148]
Plasma y orina	CML, CEL, MG-H1	Reducción, eliminación de lípidos, hidrólisis	HPLC-ESI (+)-TQMS (derivatización con HCl en butanol)	MRM IS CML-D ₂ , CEL-D ₄ , MG-H1-D ₃	–	–	[149]
Órganos y tejidos de rata	CML	Reducción, hidrólisis, pares iónicos con NFPA	HPLC-ESI (+)-LTQ (pares iónicos con NFPA)	MRM IS CML-D ₂ , CML-D ₄	LOD 0.26 μg/g	3.1-43.6 μg/g	[150]
Ciruelas frescas y secas	CML	Reducción, hidrólisis	HPLC-FLD (derivatización con OPA)	–	–	0.02-69.46 mg/100 g	[151]
Carnes (cerdo, res, pollo)	CML, CEL	Eliminación de lípidos, SPE	HPLC-ESI (+)-TQMS (HILIC)	MRM IS CML-D ₄	–	CML libre 0.13-0.85 mg/kg; CML unida 1.83-21.98 mg/kg CEL libre 0.09-8.80 mg/kg; CEL unida 2.62-19.64 mg/kg	[152]

Continuación

Tipo de muestra	Analito	Pretratamiento	Equipo Instrumental	Cuantificación	LOD, LOQ	Resultados	Referencia
Leche	CML, pirralina, MGH	Eliminación de lípidos,	HPLC-ESI (+)-TQMS (pares iónicos con NFPA)	MRM, IS [2H ₂] CML, [13C ₆] MG-H[13C ₆ ,15N ₂]	CML LOD 16.3 pmol/mL, MG/H LOD 5.7 pmol/mL, Pirralina 1.8 pmol/mL	CML 47-119 pmol/mL, MG-H 8-67 pmol/mL, Pirralina 14-1295 pmol/mL	[153]
Pan blanco	CML	Reducción, hidrólisis, pares iónicos con NFPA	HPLC-ESI (+)-LTQ (pares iónicos con NFPA)	MRM IS CML-D ₂	–	0.70-0.97 mg/100 g	[154]
Carne de res	CML	Reducción, hidrólisis, SPE	HPLC-ESI (+)-TQMS (pares iónicos con NFPA)	MRM IS CML-D ₄	CML: LOD 0.03 mg/100 g	1.2 mg/100 g	[155]
Amplia variedad de alimentos	CML	Eliminación de lípidos, reducción, hidrólisis	HPLC-ESI (+)-TQMS (derivatización HCl en butanol)	MRM IS CML-D ₂	LOQ 0.02 mg/100 g	0.02 mg/100 g	[122]
Cerdo, res, cordero, pollo, carpa	CML, CEL	Eliminación de lípidos, reducción, hidrólisis, SPE	HPLC-ESI (+)-TQMS (pares iónicos con NFPA)	MRM IS CML-D ₂ , CML-D ₄	–	58.56-184.63 mg/kg proteína	[156]
Amplia variedad de alimentos	CML, CEL	Eliminación de lípidos, reducción, hidrólisis, derivatización, SPE.	HPLC-ESI (+)-TQMS (derivatización con FMOC-Cl)	MRM IS CML-D ₄ , CEL-D ₄	CML y CEL LOQ 7 ng/mL, LOD 2 ng/mL	CML 2.29-480 mg/kg; CEL 0.56-107 mg/kg	[126]

Abreviaturas: CML, *N*^ε-carboximetil-lisina; CML-D₂ *N*^ε-carboximetil-lisina deuterada; CEL, *N*^ε-carboxietil-lisina; CEL-D₄, *N*^ε-carboxietil-lisina deuterada; MG-H hidroimidazolona derivada de metilglioal; NFPA, ácido nonafluoropentanoico; SPE, extracción en fase sólida; HPLC-FLD, cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de fluorescencia; HPLC-ESI (+)-TQMS, cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas triple cuadrupolo con ionización por electronebulización positiva; HPLC-ESI (+)-LTQ, cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas cuadrupolo con trampa iónica lineal; MRM, monitoreo de reacciones múltiples; IS, estándar interno; LOD, límite de detección; LOQ, límite de cuantificación.

El análisis de AGEs no sólo se limita a muestras biológicas como sangre, suero, plasma, orina y tejidos; también se determinan en una gran variedad de alimentos, principalmente en alimentos lácteos, carne de diferente tipo, pan, algunas frutas y té.

Los AGEs que se determinan con mayor frecuencia en las diferentes matrices son CML y CEL, las cuales se encuentran en un amplio rango y los resultados son expresados en diferentes unidades: pmol/mL, mg/100 g, mg/kg proteína, mg/kg, µg/g. Así, no existe un consenso de las unidades de medida a utilizar para reportar el contenido de AGEs, por lo que muchas veces los resultados son difíciles de comparar.

Otros AGEs que se determinan en tejidos, biofluidos y alimentos por cromatografía de líquidos son: argpirimidina, pirralina, pentosidina e hidroimidazolona derivada de metilglioxal Tabla 4. El pretratamiento de muestras es recurrente en cada una de las investigaciones con muy pocas variaciones. Al igual que en el análisis de CML y CEL, las unidades en que se expresan el contenido de estos otros AGEs varían de un estudio a otro, muchas se encuentran normalizadas a la cantidad de proteína, colágeno, creatinina, lisina o hidroxiprolina que tiene cada muestra.

Tabla 4. Resumen de los últimos artículos publicados del análisis de los AGEs argpirimidina, pirralina, pentosidina y MG-H.

Tipo de muestra	Analito	Pretratamiento	Equipo Instrumental	Cuantificación	LOD, LOQ	Resultados	Referencia
Orina	Pirralina	SPE	HPLC-APCI-LTQ	MS	–	1.42±0.65 μmol/mmol creatinina	[157]
Tejido adiposo	Argpirimidina	Extracción de lípidos, hidrólisis enzimática	HPLC-FLD (derivatización con cloruro de dansilo)	–	–	205±19 pmol/g proteína	[132]
Plasma	MGH	SPE	HPLC-ESI (+)-TQMS (HILIC)	MRM IS ¹⁵ N ₂ - MGH	LOD 68.9 nmol/L	583-1318 nM	[158]
Carne de res y pavo	Pentosidina	Desnaturalización de proteínas	HPLC-ESI (+)-LTQ Orbitrap MS	–	LOD 20 μg/100 g	No se detectó	[127]
Cartílago	Pentosidina	Hidrólisis	HPLC-FLD	–	–	1.92-5.2 nmol/mol colágeno	[159]
Piel	Pentosidina	Hidrólisis	HPLC-FLD	–	–	1.88-2.83 mmol/pmol colágeno	[96]
Plasma de ponis	Pentosidina	Hidrólisis	HPLC-FLD	–	–	5.26-9.75 pmol/mg proteína	[160]
Suero	CML Pentosidina	CML: Hidrólisis, Pentosidina: Hidrólisis, SPE	HPLC-ESI (+)-TQMS (HILIC para CML)	MRM IS CML- D ₂ , MG-H1-D ₃	–	CML 0.32-0.59 mmol/mol Lis Pentosidina 1.5- 7.75 μmol/mol Lis	[142]

Continuación

Tipo de muestra	Analito	Pretratamiento	Equipo Instrumental	Cuantificación	LOD, LOQ	Resultados	Referencia
Tejido de hueso cortical	Pentosidina	Hidrólisis	HPLC-FLD	–	–	2.1-13.8 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ colágeno	[161]
Plasma de rata	MGH1, CEL, CML y Argpirimidina	Hidrólisis	HPLC-ESI (+)-LTQ (derivatización con TNBS)	IS MGH1-D ₃ , CEL-D ₄		MGH1 148.2-444.2 pmol/mg proteína, CEL 8.1-11.6 pmol/mg proteína CML 94.2-169.9 nmol/L Argpirimidina 1.0-2.5 nmol/L proteína	[162]
Colágeno de piel	Pentosidina	Eliminación de lípidos, hidrólisis	HPLC-FLD	–	–	28.4-36.7 pmol/ μmol hidroxiprolina	[163]
Suero y hueso	Pentosidina	Hidrólisis, SPE	HPLC-FLD	–	LOD 1.76 nmol/L, LOQ 5.87 nmol/L.	Suero: 27.1-73.6 nmol/L Hueso: 0.93-2.57 nmol/L	[164]
Bebidas enriquecidas con péptidos	Pirralina	Hidrólisis enzimática, SPE	UPLC-UV-MS	–	LOD 30.4 ng/mL LOQ 70.3 ng/mL	2.95-7.75 mg/100 g proteína	[165]
Sistema modelo lisina-sacárido	Pirralina	SPE	HPLC-ESI (+)-QMS	–	–	1.21-92.9 $\mu\text{mol}/\text{L}$	[166]
Vítreo	Pentosidina	Hidrólisis	HPLC-FLD	–	–	2.24-2.94 $\mu\text{mol}/\text{mol}$ colágeno	[106]

Abreviaturas: MG-H hidroimidazolona derivada de metilglioxal; SPE, extracción en fase sólida; HPLC-FLD, cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de fluorescencia; HPLC-ESI (+)-TQMS, cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas triple cuadrupolo con ionización por electronebulización positiva; HPLC-ESI (+)-LTQ, cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas cuadrupolo con trampa iónica lineal; UPLC-UV-MS, cromatografía de líquidos de ultra alta resolución con detector UV acoplada a espectrometría de masas; IS, estándar interno; LOD, límite de detección; LOQ, límite de cuantificación.

I.6.4 Análisis por Cromatografía de Gases

La cromatografía de gases es una técnica atractiva en términos de la simplicidad de condiciones en el mecanismo de separación, alto poder de resolución y alta tolerancia a la matriz de la muestra; sin embargo, los productos finales de glicación avanzada necesitan convertirse en compuestos volátiles y termoestables antes de su introducción en columna.

Existen pocos estudios usando GC para la determinación de AGEs; el pretratamiento de la muestra es similar a como se lleva a cabo para el análisis por cromatografía de líquidos; adicional a estas etapas, es necesario una derivatización química de los AGEs liberados. Cuando se utiliza metanol/cloruro de tionilo en condiciones ácidas fuertes, se produce esterificación de grupos carboxílicos con metanol [117,119,167].

A temperatura elevada (65-70 °C), la *N*-ter-butildimetilsilil-*N*-metiltrifluoroacetamida (MTBSTFA) es reactiva hacia el hidrógeno activo en grupos funcionales y produce derivados volátiles de *N*-ter-butildimetilsililo (tBDMSi) de AGEs tales como CML o CEL [168]. Alternativamente, se pueden obtener derivados de CML y CEL de éster metílico de trifluoroacetilo (TFAME) [169,170].

En algunas aplicaciones, se ha utilizado detector de ionización de llama; sin embargo, la espectrometría de masas en tándem con la cuantificación por MRM [117] o con monitoreo de iones selectivos (SIM) [167,169,170] ofrece ventajas indiscutibles.

Las muestras analizadas por cromatografía de gases al igual que en cromatografía de líquidos, son diversas, se ha reportado el contenido de CML y CEL en alimentos (leche, huevo, pan, galletas, carne de res y pescado, cacahuates y zanahoria), tejidos y orina, Tabla 5.

Tabla 5. Resumen de los últimos artículos publicados del análisis de AGEs por GC-MS.

Tipo de muestra	Analito	Pretratamiento	Equipo Instrumental	Cuantificación	LOD, LOQ	Resultados	Referencia
Orina	CML CEL	Eliminación de proteínas	GC-MS (Derivados de ECF)	IS CML-D ₄ CEL-d ₈	LOD 0.1 µmol/L	CML 0.46-6.25 mmol/mol creatinina CEL 0.55-10.35 mmol/mol creatinina	[171]
Alimentos infantiles, huevos hervidos, leche, pan, bebidas de soya	CML	Reducción, hidrólisis	GC-FID (Derivados de MTBSTFA)	-	LOD 3.35 mg/100 g proteína LOQ 11.16 mg/100 g proteína	62-440 mg/100 g proteína	[168]
Galletas	CML	Eliminación de lípidos, hidrólisis	GC-MS Esterificación, acilación, metilación	IS Cicloleucina	–	1.8-14.4 µg/g proteína	[172]
Modelos de leche y galletas, fórmulas infantiles, salmón y carne de res.	CML	Eliminación de lípidos, reducción, hidrólisis	GC-MS Trampa iónica (Derivados TFAME)	IS Cicloleucina	LOD 0.1 ng/mg proteína LOQ 1 ng/mg proteína	5-25 ng/mg proteína	[117]
Productos derivados de zanahoria	CML	Hidrólisis, SPE	GC-MS (Derivados TFAME)	SIM IS Carboximetil-orinitina	–	47-308 mg/kg proteína	[173]
Cacahuates	CML	Eliminación de lípidos, hidrólisis	GC-MS (Derivados TFAME)	SIM IS Carboximetil-orinitina	LOD 40 mg/kg proteína	50-203 mg/kg proteína	[174]

Continuación

Tipo de muestra	Analito	Pretratamiento	Equipo Instrumental	Cuantificación	LOD, LOQ	Resultados	Referencia
Tendones de cola de rata	CML	Hidrólisis	GC-MS (Derivados TFAME)	SIM IS CML-D ₄	–	51-102 mmol/mol lisina	[51]
Tejido muscular de rodaballo y alimentos acuáticos enlatados	CML	Eliminación de lípidos, reducción, hidrólisis	GC-MS (Esterificación, acilación)	SIM IS CML	LOD 1 mg/kg LOQ 5 mg/kg	9.6-335.21 mg/kg	[167]

Abreviaturas: CML, *N*^ε-carboximetil-lisina; CEL, *N*^ε-carboxietil-lisina; SPE, extracción en fase sólida; GC-QMS; Cromatografía de gases cuadrupolo acoplado a masas; GC-FID, cromatografía de gases con detector de ionización de llama; ECF, etilcloroformato; MTBSTFA, *N*-ter-butildimetilsilil-*N*-metiltrifluoroacetamida; TFAME, *N*, *o*-trifluoroacetil metil éster; SIM, modo monitoreo de ion selectivo; IS, estándar interno; LOD, límite de detección; LOQ, límite de cuantificación.

I.6.5 Herramientas de espectrometría de masas en estudios exploratorios de procesos de glicación

Para una mejor comprensión de los mecanismos moleculares del papel que juegan los AGEs en el envejecimiento humano y en las enfermedades, es necesaria la identificación/caracterización de los sitios de glicación y estructuras en biomoléculas. En este sentido, la espectrometría de masas basada en técnicas de proteómica se utilizan debido a su capacidad excepcional de caracterización estructural y evaluación cuantitativa de tales modificaciones [175,176].

Típicamente, las modificaciones de péptidos se detectan/caracterizan en proteínas digeridas, por medio de cromatografía de líquidos acoplada vía ESI a espectrometría de masas de alta resolución, más a menudo utilizando el analizador de masas cuadrupolo-tiempo de vuelo (HPLC-ESI-QTOFMS) [177] o espectrometría de masas tiempo de vuelo mediante ionización por desorción con láser asistida por matriz (MALDI-TOFMS) [178].

También se han llevado a cabo análisis de proteínas intactas con un enfoque descendente mediante el empleo de espectrómetros de masa de alta precisión y resolución, instrumentos tales como QTOF, trampa orbitante o espectrómetro de masas de resonancia ion-ciclotrón con transformada de Fourier [179].

Se ha logrado un progreso sustancial en el tema de proteínas glicadas individuales *in vitro*. La albúmina de suero es una proteína circulante de larga vida relativamente y abundante, representa un objetivo importante de glicación con 59 lisinas encontradas modificadas por los productos fructosil-lisina, Amadori o AGEs [21].

Utilizando compuestos alfa-dicarbonilo como agentes glicantes, se han identificado varios AGEs como modificaciones de lisina, entre ellas el derivado de metilglioxal MG-H1, derivado de glioxal G-H1, derivado de 3-desoxiglucosona N^ε-[5-(2,3,4-trihidroxi-butil)-5-hidro-4-imidazolona-2-il]ornitina (3-DG-H1), CEL y CML [21,178]. También se han reportado modificaciones del grupo guanidina de residuos de arginina como tetrahidropirimidina o argpirimidina [21,180].

El análisis de la glicación de proteínas en muestras reales es más difícil porque las proteínas/péptidos glicosados menos abundantes tienen que ser separados de la muestra. Con este fin, las proteínas intactas pueden ser analizadas por electroforesis en gel bidimensional y las manchas de proteínas glicosadas pueden ser digeridas en gel antes de su análisis por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas o MALDI-TOFMS [179].

Por otra parte, las proteínas/péptidos glicosados pueden ser separados/ concentrados sometiendo una muestra preparada adecuadamente a cromatografía de afinidad con ácido borónico; en esta técnica la retención de especies glicosadas se produce por la interacción del anión tetraédrico formado a partir del ácido borónico a pH alcalino con los grupos 1,2-*cis*-diol de los péptidos modificados [175,181].

La evaluación comparativa de los sitios de modificación/estructuras encontradas en sujetos con diferentes condiciones clínicas es muy demandada y particularmente útil para el descubrimiento de nuevos biomarcadores para el diagnóstico temprano de diabetes y otras enfermedades relacionadas [181,182]. Como ejemplo de un enfoque relativamente simple y de alto rendimiento, un cambio de masa $\Delta m/z = 162$ o su multiplicación detectada por MALDI-TOFMS en proteínas intactas es indicativa de una modificación única o múltiple por el producto Amadori debido a la condensación de glucosa en la proteína, y se ha utilizado para comparar la extensión de la glicación temprana en sujetos sanos frente a los de diferentes etapas en el progreso de la diabetes [176,183].

Un sistema similar por MALDI-TOFMS también se ha utilizado para estudiar las modificaciones de hemoglobina en pacientes que padecen diabetes; los resultados revelaron que tanto las fracciones β globina (15866 m/z) como α -globina (15126 m/z) son glicosadas y glico-oxidadas [184], lo que parece ser un argumento adicional de que HbA1c está lejos de ser un perfecto biomarcador del control de glucosa en diabetes.

Las pérdidas neutras de las marcas de glicación lábiles pueden detectarse rápidamente mediante espectrometría de masas en tándem; este método se ha usado a menudo para analizar la glicación de péptidos y para comparar la cantidad de restos glicosados entre diferentes muestras clínicas. Con este enfoque, las modificaciones de la albúmina de suero humana se han determinado en individuos sanos y los productos encontrados fueron 3DG-H1 (el más abundante), G-H1, CML, CEL, pentosidina y MOLD; la cantidad de estas modificaciones tiende a aumentar en pacientes con insuficiencia renal [21,106].

A pesar de la importancia crucial en patologías humanas, las estructuras/sitios responsables del entrecruzamiento de proteínas se han estudiado en menor grado en comparación con las modificaciones de AGEs lineales tales como CML, CEL, G-H1, MG-H1, 3DG-H1, hidroimidazolona derivada de 3-desoxigalactosona, tetrahidropirimidina, etc. Tales estudios usualmente se basan en la digestión enzimática de proteínas, MALDI-TOFMS o espectrometría de masas en tándem LC-ESI-QTOF seguida del análisis de datos bioinformáticos.

Como ejemplo, se han detectado *in vitro* y en extractos proteicos de ratas diabéticas valores de masa carga correspondientes a la suma de dos péptidos entrecruzados por pentosidina, imidazolio derivado de 3-desoxiglucosona y especies que contienen glucosepano [185,186].

Se pueden encontrar muchos artículos con una descripción más detallada de las aplicaciones de prosobre las aplicaciones en el mundo real [21,105].

CAPITULO II. OBJETIVOS

II.1 Objetivo general

Desarrollar nuevos procedimientos analíticos que permitan identificar, caracterizar estructuralmente y cuantificar los marcadores de estrés oxidativo y de progreso de diabetes, para su aplicación en el análisis de muestras de origen diverso y en estudios sobre efecto de diversos factores en la formación de los AGEs.

II.1.1 Objetivos específicos

1. Establecer las condiciones de la síntesis de *N*^ε-carboximetil-lisina para su uso en estudios posteriores.
2. Estudiar el posible efecto de diferentes compuestos de tipo tiol la síntesis de ZCML *in vitro*, utilizando para ello un procedimiento analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución con detección espectrofotométrica que permita monitorear la reacción de síntesis y evaluar el rendimiento de conversión de ZLys a ZCML.
3. Evaluar el impacto de iones Zn(II) y Cu(II) en la formación de *N*^ε-carboximetil-lisina en presencia o en ausencia de tioles, empleando el procedimiento analítico por cromatografía de líquidos desarrollado en el apartado anterior.
4. Poner a punto nuevo procedimiento HPLC-ESI-ITMS/MS para la determinación de CML en alimentos.
5. Evaluar el efecto de cobre presente durante la elaboración o almacenamiento de alimentos sobre el contenido de CML en el producto final, mediante el análisis de Cu y CML en una serie de productos alimenticios comerciales y cocinados en cacerolas de cobre, vidrio y Teflón[®].
6. Aplicar el procedimiento HPLC-ESI-ITMS/MS desarrollado para la determinación de CML en variedad de alimentos y evaluar comparativamente el desempeño de este método respecto a inmunoensayos ELISA.

CAPÍTULO III. PARTE EXPERIMENTAL

III.1. Equipo de laboratorio

III.1.1 Instrumentación analítica

1. Espectrómetro de masas con ionización en plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) modelo 7500ce (Agilent Technologies), con celda de colisiones/reacciones tipo octapolo.
2. Cromatógrafo de líquidos de alta resolución modelo 1200 de (Agilent Technologies) equipado con automuestreador, detector espectrofotométrico de arreglo de diodos y detector fluorimétrico.
Columna Columna Luna C8 (250 x 3 mm, 5 μm) con pre-columna (Phenomenex).
3. Cromatógrafo de líquidos UltiMate 3000 (Dionex, Thermo Scientific) equipado con una bomba binaria, desgasificador, compartimento con termostato para columna y un automuestreador.
Columna Kinetex C18 (150 x 3 mm, 2.6 μm) con la pre-columna (4 x 2 mm) (Phenomenex).
4. Espectrómetro de masas trampa iónica Amazon SL equipado con una fuente de ionización por electro nebulización (ESI-ITMS) (Bruker Daltonics).
5. Espectrómetro de masas de alta resolución maXis Impact: ionización ESI y cuadrupolo-tiempo de vuelo ESI-QTOF-MS (Bruker Daltonics).
6. Espectrofotómetro UV/Vis Spectronic 3000 con detector de arreglo de diodos (Milton Roy)

III.1.2. Equipos utilizados en el procesamiento de muestra y preparación de reactivos

Purificador de agua Mili Q WaterPro PS (Labconco)

pH metro 3200P (Agilent Technologies)

Liofilizador FreeZone 2.5 Plus y frasco Fast-Freeze 600 mL (Labconco)

Centrífuga Z 36 HK (Hermle)

Concentrador al vacío Vacufuge Plus (Eppendorf)

Baño seco digital Accu Block (Labnet)

Termómetro IR, (SPER Scientific)

III.2 Estándares y reactivos

Agua desionizada 18.2 MΩ cm (Labconco).

N-acetil-cisteína, ácido glutámico, L-arginina, L-fenilalanina, glicina, glioxal, glutatión, histidina, homocisteína, L-alanina, L-cisteína, L-lisina, L-prolina, L-tirosina, Z-lisina-OH, piridina, ácido bórico, bicarbonato de sodio, borohidruro de sodio, carbonato de amonio, formato de amonio, fosfato de sodio, HEPES, hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, cianoborohidruro de sodio y etilcloroformato son de Sigma-Aldrich.

N^ε-carboximetil-lisina y *N*^ε-carboximetil-lisina deuterada son de PolyPeptide group.

Ácido glioxálico, metionina, acetonitrilo, ácido clorhídrico, ácido fórmico y sulfato de cobre son de Fluka.

Cloroformo, metanol y sulfato de zinc son de Karal.

III.3 Programas de análisis de datos

ChemStation (Agilent Technologies)

Data Analysis 4.1 (Bruker Daltonics)

QuantAnalysis 2.1 (Bruker Daltonics)

Statistica for Windows (StatSoft Inc.)

GRAMS 5.0 (Thermo Scientific)

III.4 Material biológico

Once tipos de queso (1- edam, 2- gruyere, 3- grana padano, 4- emmental (suizo), 5- emmental (USA), 6- "asadero", 7- ricota, 8- mascarpone, 9- queso de cabra fresco, 10- queso de cabra semi-curado; 11- queso de cabra curado).

Salmón, bistec de res, lomo de cerdo, pechuga de pollo, tortilla de maíz, tortilla de harina, tocino, "chicharrón", atún, manzana, chile serrano, papa fresca, papas fritas, nuggets de pollo, yogurt natural y queso americano.

Todos los productos se compraron de supermercados regionales en la ciudad de Guanajuato.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1 SÍNTESIS Y PURIFICACIÓN DE N^ε-CARBOXIMETIL-LISINA

IV.1.1 Introducción

El compuesto de interés en este trabajo ha sido N^ε-carboximetil-lisina con dos objetivos principales: i) desarrollar procedimientos analíticos para su determinación en matrices químicamente complejas y ii) estudiar efectos de algunos compuestos sobre la formación de CML. Ambos aspectos son relevantes debido a que CML ha sido propuesto como biomarcador de reacciones de glicación y del estrés oxidativo y también porque es necesario buscar estrategias para disminuir sus niveles en organismos vivos y en alimentos.

Para cumplir con el primer objetivo, se contó con un estándar de CML adquirido en la compañía PolyPeptide y con un estándar deuterado N^ε-carboxi[²H₂]metil-lisina para ser utilizado como estándar interno (PolyPeptide).

Para cumplir con el segundo objetivo, era necesario establecer las condiciones de la síntesis de CML similares a las fisiológicas o a las condiciones que simulen elaboración de alimentos; sistema necesario para evaluar los efectos de diferentes especies químicas sobre el rendimiento de conversión de lisina en CML.

Cabe mencionar que originalmente CML ha sido aislado de material biológico, *Sagittaria pygmaea* Alismataceae [187] y después se han publicado varios procedimientos de síntesis de este compuesto, las cuales se muestran en la Tabla 6. En los últimos años ya no se han publicado procedimientos de síntesis de CML, debido a que CML como reactivo se encuentra disponible comercialmente.

Como se puede notar en la Tabla 6, en la síntesis se emplean, generalmente, como reactivos: lisina protegida en nitrógeno α con grupos formilo, acetilo y t-butoxicarbonilo; como agente glicante ácido glioxálico, ácido yodoacético, ácido 2-bromoacético o yodoacetamida; en la reducción de la base de Schiff, se emplea cianoborohidruro de sodio.

Tabla 6. Resumen de los procedimientos empleados para la síntesis de CML.

Reactivos	Condiciones de reacción	Tratamiento posterior	Referencia
N α -formil-lisina y ácido glioxálico	Tampón de fosfatos, pH 10. Temperatura ambiente, 36 h.	Hidrólisis HCl 2 N a 95 °C, 30 min.	[91]
N α -acetil-lisina y ácido glioxálico. NaBH ₃ CN	—	Purificar en columna de intercambio iónico.	[191]
N α -acetil-lisina y ácido glioxálico. NaBH ₃ CN	—	Hidrólisis HCl 6 N a 110 °C, 24 h.	[78]
	THF. Temperatura ambiente, 15 h.	Purificar en columna de silica gel. Hidrólisis HCl 6 N por 3 h. Liofilizar.	[192]
N α -formil-lisina y ácido yodoacético.	Tampón de fosfatos 0.2 M pH 10. Temperatura ambiente, 40 h.	Remover yodoacetato con NaOH, centrifugar e incubar 24 h. Hidrólisis HCl 2 N a 110 °C, 30 min. Purificar con Dowex 50-X8.	[193]
N α -acetil lisina y ácido glioxálico. NaBH ₃ CN	Na ₂ CO ₃ 0.1 M pH 10. Temperatura ambiente.	Hidrólisis HCl 6 M a 110 °C, 24 h	[95]
Complejo de cobre con lisina y ácido 2-bromoacético	NaOH 1M. Temperatura Ambiente, 72 h.	Ajustar pH a 2 con HCl. Remover Cu con H ₂ S. Filtrar y secar con flujo de N ₂ .	[193]
N α -acetil-lisina y yodoacetamida	Na ₂ CO ₃ 10 mM pH 11.3. Temperatura 37 °C, 24 h.	Hidrólisis HCl 6 M a 110 °C, 12 h bajo atmósfera de N ₂ .	[44]
N α -acetil-lisina y ácido glioxálico. NaBH ₃ CN	Na ₂ CO ₃ 100 mM pH 10. Temperatura 37 °C, 17 h.	Eliminar NaBH ₃ CN residual con HCl al 37%. Hidrólisis HCl 3 N en n-butanol a 65 °C. Evaporar. Resuspender en H ₂ O y purificar en HPLC, detección 214 nm.	[128]
N α -acetil-L-lisina y ácido glioxálico	NaOH 1 M pH 8.7	Hidrogenación catalítica 10% Pd/C, 5 atm. Filtrar. Hidrólisis HCl 3 M a 110 °C, 3 h. Filtrar. Purificar en columna de intercambio iónico y en HPLC, detección 210 nm.	[194]

Las condiciones bajo las cuales se ha reportado la síntesis son muy similares se propone un pH básico regulado por soluciones tampón de fosfatos o carbonato de sodio o simplemente en hidróxido de sodio. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente o 37 °C durante al menos 15 h y hasta 72 h. Después de completar la reacción, es necesario llevar a cabo una hidrólisis con ácido clorhídrico para desproteger el nitrógeno α de CML. Finalmente, se emplean varios pasos de purificación tales como pasar la mezcla por una columna de intercambio iónico, separar las impurezas por cromatografía de líquidos de alta resolución, recogiendo fracción de interés (detección espectrofotométrica a 210 o 214 nm) o filtración. El procedimiento publicado en 2009, en donde se reporta relativamente alto rendimiento de la síntesis, relativamente alto de 46%, resulta complicado, pues la desprotección de grupo amino se realiza por hidrogenación catalítica en 10 % Pd/C en autoclave con una presión de 5 atm [188].

Expuesto lo anterior, en esta parte de la investigación se pretende realizar la síntesis de CML con el fin de utilizar esta reacción en el estudio del efecto potencial de los antioxidantes y de iones metálicos sobre conversión de lisina en CML.

IV.1.2 Objetivo particular

Establecer las condiciones de la síntesis de *N*^ε-carboximetil-lisina para su uso en estudios posteriores.

IV.1.3 Condiciones experimentales

Para la síntesis del compuesto se utilizaron los siguientes reactivos: Z-Lisina-OH, ácido glioxálico, cianoborohidruro de sodio, tampón de fosfatos 0.2 M pH 10. Se empleó el concentrador al vacío Vacufuge Plus (Eppendorf) para secar las muestras a 60 °C. Para remover el grupo Z (grupo protector benzoxicarbonilo) se llevó a cabo la hidrólisis con HCl 6 N. La purificación de *N*^ε-carboximetil-lisina se realizó mediante extracción en fase sólida (Supelco Clean LC-18 SPE, tubo 3 mL, producto 57012 SUPELCO), eluyendo el compuesto con 0.1 % ácido fórmico en acetonitrilo.

La caracterización del producto se hizo mediante espectrometría de masas de alta resolución con dilución de muestra (1:2000) en acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico (v/v), por infusión directa a un espectrómetro de masas maXis Impact ESI-QTOF-MS equipado con Data Analysis 4.1 (Bruker Daltonics). La ionización ESI fue en modo positivo, utilizando el voltaje en capilar de 4500 V, flujo del gas de secado 4 L/min (N₂) y temperatura 180 °C. A partir del espectro de masas (intervalo de 50 -1250 *m/z*) se obtuvo la masa exacta del compuesto y se comparó el patrón isotópico experimental con el teórico.

IV.1.4 Resultados y discusión

Las condiciones experimentales de la reacción fueron seleccionadas con base en la revisión bibliográfica y haciendo varias pruebas y modificaciones. Para ello se preparó una mezcla de 0.0520 g de Z-Lisina-OH al 98% de pureza y 0.0206 g de ácido glioxálico monohidratado de pureza 97%, misma que se disolvió en 3 mL de tampón de fosfatos 0.2 M a pH 10 (relación molar de sustratos 1:1). Posteriormente se le adicionaron 500 µL de cianoborohidruro de sodio 1 M como agente reductor y se dejó incubar a 80 °C por 4 horas, Figura 13.

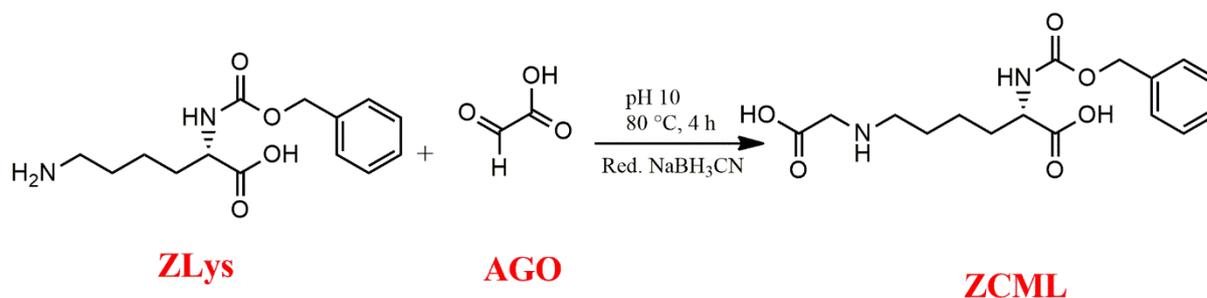


Figura 13. Condiciones de reacción para la síntesis de ZCML.

De esta manera se obtuvo el producto ZCML, el cual se evaporó a sequedad a 60 °C en un concentrador a vacío. Con el fin de eliminar el grupo protector benzoxicarbonilo, la muestra seca de ZCML se sometió a hidrólisis ácida con 3 mL de ácido clorhídrico 6 N a 110 °C por 24 horas para obtener finalmente el producto *N*^c-carboximetil-lisina, Figura 14. El compuesto se reconstituyó en 3 mL de agua desionizada. La purificación se hizo pasando la solución por el cartucho C18 de extracción en fase sólida. Para acondicionar el cartucho, se pasaron 3 mL de

acetonitrilo; luego 3 mL de MeCN/H₂O 30:70 y 3 mL de H₂O. Enseguida se pasó la alícuota de 3 mL de la muestra para retener la CML y finalmente, el compuesto retenido se eluyó con 3 mL de 0.1% de ácido fórmico en acetonitrilo. La solución se evaporó a sequedad en un concentrador a vacío y reconstituyó en 3 mL de agua desionizada.

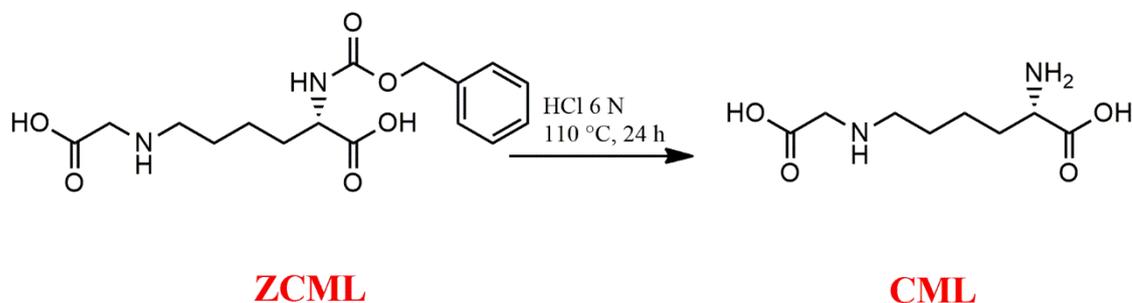


Figura 14. Condiciones empleadas para la desprotección de ZCML.

Con objeto de confirmar que el producto de la síntesis corresponde a CML, se hizo el análisis del producto obtenido por espectrometría de masas de alta resolución. Antes de la introducción al espectrómetro, la muestra se centrifugó a 14000 g por 10 min y el sobrenadante fue diluido dos veces con 0.1% ácido fórmico en acetonitrilo para su inyección directa al espectrómetro de masas.

En la Figura 15, se muestra el espectro de masas de *N*^c-carboximetil-lisina sintetizada y purificada. Enseguida se observa el espectro de MS/MS del ion molecular de CML, el cual arroja los fragmentos en que se rompe CML; estos tienen valores de *m/z* 84.0809; 130.0863. y 142.0866, Figura 16.

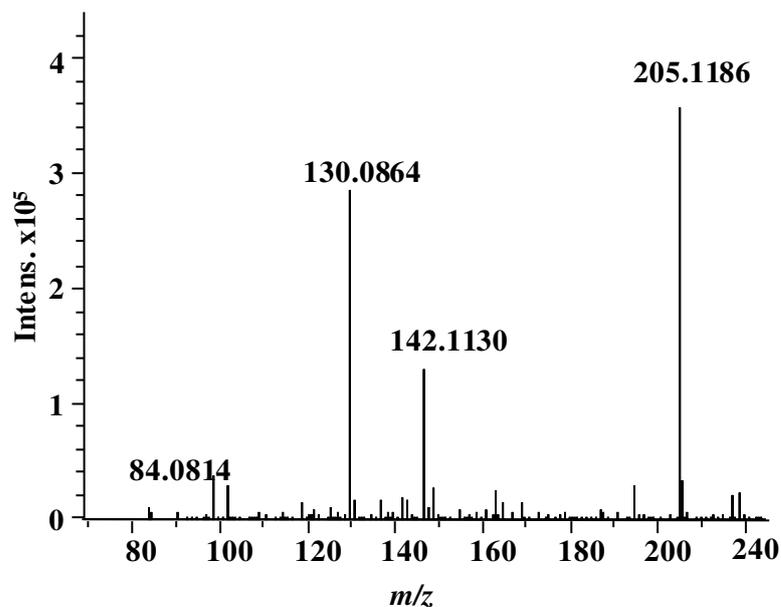


Figura 15. Espectro de masas de *N*^ε-carboximetil-lisina obtenido por infusión directa, ESI (+)-QTOF-MS.

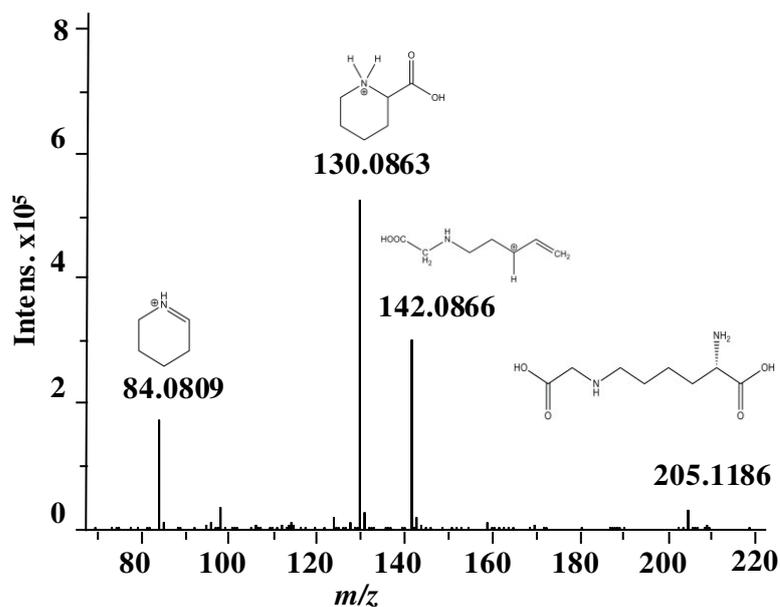


Figura 16. Espectro de fragmentación de *N*^ε-carboximetil-lisina, obtenido por infusión directa, ESI (+)-QTOF-MS/MS.

Con el fin de corroborar que el compuesto analizado se trata efectivamente de CML, en la Figura 17a se presenta el patrón isotópico experimental del ion molecular de CML y el patrón isotópico teórico de CML en la Figura 17b.

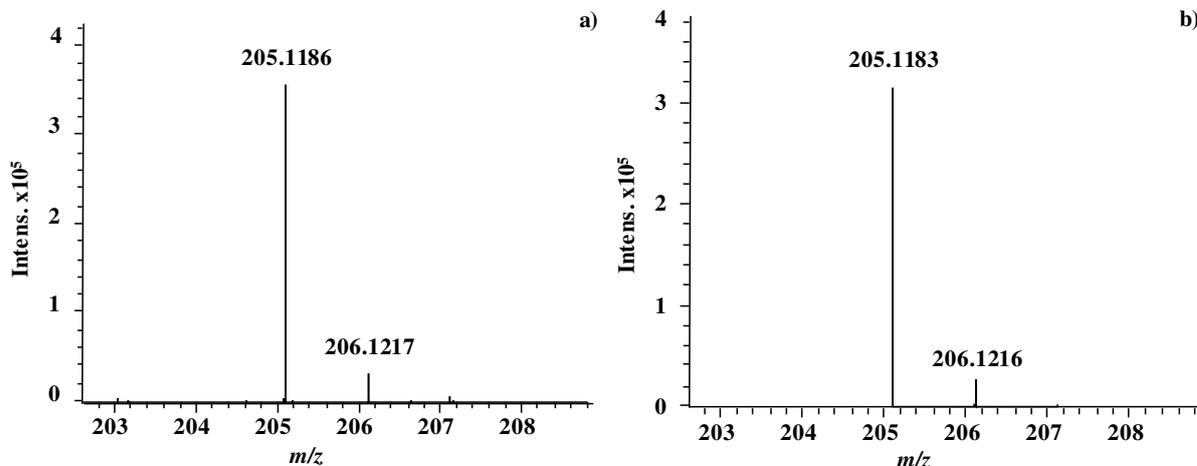


Figura 17. Espectros de masas del a) Patrón isotópico experimental del ion molecular de N^ϵ -carboximetil-lisina; b) patrón isotópico teórico del ion molecular de N^ϵ -carboximetil-lisina.

En 2006 Delatour y col. proponen un mecanismo para la fragmentación de CML, el cual se ilustra en la Figura 18. La fragmentación del ion $[M+H]^+$ de CML en la zona CID (disociación inducida por colisiones) resulta en formación de tres iones mayoritarios en el espectro MS/MS: con una relación de m/z 84.0809, 130.0863 y 142.0866, de acuerdo con nuestros resultados.

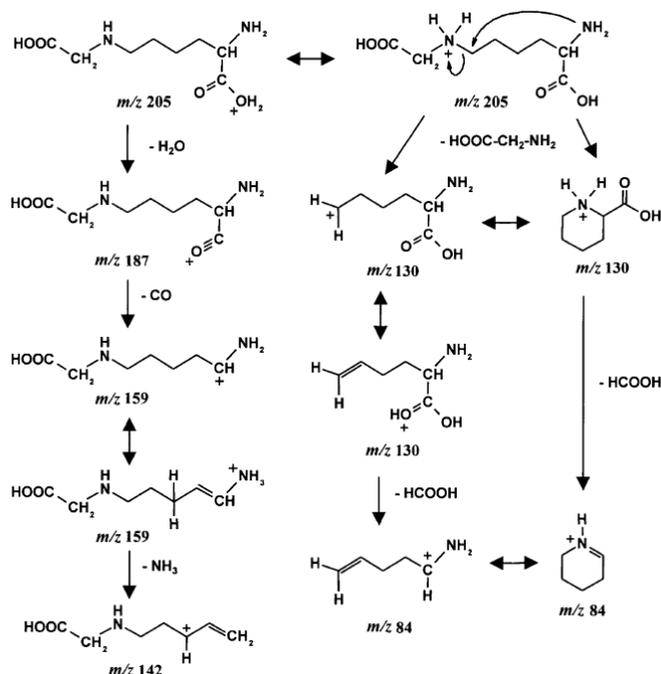


Figura 18. Ruta de fragmentación del ion molecular protonado de CML [189].

En particular, la molécula protonada con 205 m/z pierde una molécula de agua y una molécula de monóxido de carbono, permitiendo así la formación de un carbocatión que posteriormente a través de un arreglo conduce a una forma tautomérica con el grupo amino protonado en la posición 2, el cual al eliminar una molécula de amoniaco genera la especie con 142 m/z que observamos en el espectro de MS/MS. La intensidad de las especies con 187 m/z y 159 m/z son tan pequeñas en nuestro experimento que no se logran distinguir en el espectro de MS/MS de la Figura 16, mostrado anteriormente.

El ion CML también puede ser protonado sobre el átomo de nitrógeno en la posición 6 y por medio de la eliminación de ácido 2-aminoetanoico, forma el ion de 130 m/z . Este mismo ion de 130 m/z puede fragmentarse eliminando ácido fórmico y producir el ion de 84 m/z . Así mismo, el ion de 205 m/z bajo una ciclación simultánea forma un anillo de seis miembros, mismo que puede conducir a que se fragmente en los iones de 84 m/z y 130 m/z [189].

IV.1.5 Conclusiones

Se obtuvo el producto final de glicación avanzada CML con algunas modificaciones a los procedimientos reportados en bibliografía. Se utilizó Z-Lisina-OH en vez de N^{α} -formil-lisina o N^{α} -acetil-lisina, el tiempo de reacción se acortó a tan sólo 4 horas elevando la temperatura a 80 °C. N^{ϵ} -carboximetil-lisina fue purificada por extracción en fase sólida y caracterizada por espectrometría de masas. Una vez confirmada la identidad del producto, las condiciones de reacción serán modificadas para simular las que ocurren durante elaboración de alimentos, pH, y se van a utilizar en el estudio del impacto de diferentes factores químicos en la formación de CML.

IV.2 EFECTO DE LA PRESENCIA DE TIOLES EN LA FORMACIÓN DE N^ε-CARBOXIMETIL-LISINA

IV.2.1 Introducción

Una importante línea de investigación importante relacionada con los AGEs se enfoca en las estrategias de inhibición de su formación. Para ello se requieren modelos simples de la síntesis de los AGEs, así como los procedimientos analíticos de carácter sensible y muy selectivo que permitan observar y evaluar cuantitativamente el efecto inhibitor de diferentes agentes químicos que ya son utilizados en la práctica clínica y que podrían introducirse como agentes terapéuticos en un futuro.

A lo largo de los últimos años se han propuesto varios compuestos como posibles inhibidores de la formación de AGEs. Como ejemplo se puede mencionar la aminoguanidina que bloquea los grupos carbonílicos debido a su mayor reactividad hacia estos grupos respecto al grupo ε-amino de lisina en proteína. Las aminoguanidinas han sido ampliamente investigadas e inhiben eficazmente la formación de AGEs *in vivo* e *in vitro* [82].

Otro grupo de potenciales inhibidores de los AGEs son los diferentes compuestos de tipo tiol que se utilizan como agentes terapéuticos de propiedades antioxidantes. Su acción consiste en la reducción del estrés oxidativo y en particular, la inhibición de la autooxidación de glucosa y por lo tanto la deseable disminución de la cantidad de compuestos dicarbonílicos, como precursores e intermediarios de los AGEs [190,191].

La *N*-acetil-cisteína perteneciente a este grupo, es un producto endógeno del metabolismo de cisteína, pero también es un medicamento ampliamente usado en la práctica clínica por varias décadas. Se ha empleado no solamente como antioxidante, sino sobre todo como agente mucolítico administrado dentro del tracto respiratorio y para el tratamiento de numerosos desórdenes incluyendo desintoxicación por ingesta excesiva de paracetamol, bronquitis, toxicidad por metales pesados y desórdenes psiquiátricos. Éste tiol también ha sido empleado en el tratamiento de esclerosis sistémica [192].

Otro de estos compuestos, el GSH es sintetizado en las células por la acción secuencial de la γ-glutamylcisteína sintetasa y la glutatióna sintetasa por medio de una serie de reacciones, las cuales se han denominado como ciclo γ-gutamyl [193]. GSH es el antioxidante endógeno

mayoritario producido por las células, desempeña un papel fundamental en numerosas reacciones metabólicas y bioquímicas como la síntesis y reparación del DNA, la síntesis de proteínas, la síntesis de prostaglandinas y el transporte de aminoácidos. Por lo tanto, todos los sistemas del cuerpo pueden ser afectados por el estado del sistema glutatión. El estrés oxidativo contribuye a un desequilibrio entre las reacciones oxidativas y reductivas, lo cual se refleja en el estado redox tiol intracelular y tiol/tiol oxidado extracelular [194].

En condiciones oxidativas, la función protectora de glutatión consiste en su oxidación a disulfuro de glutatión (GSSG); cuando su concentración se incrementa dentro de la célula, el GSSG es exportado al espacio extracelular donde puede ser reducido. GSH es constantemente re-sintetizado a partir de sus aminoácidos constituyentes. La disponibilidad de cisteína representa la etapa limitante en la biosíntesis de GSH, y todo el proceso está regulando la cantidad actual de GSH y GSSG. Los niveles alterados de tioles en plasma se han relacionado con condiciones patológicas específicas. Así, se ha sugerido que la disminución de GSH, el incremento de GSSG, y la baja relación GSH/GSSG son factores importantes que contribuyen a algunas enfermedades humanas tales como inflamación de pulmón, falla renal crónica, diabetes, Parkinson, Alzheimer y formación de cataratas [195].

Los compuestos con grupos tiol de baja masa molecular son componentes celulares críticos que juegan numerosos papeles en el metabolismo y homeóstasis, son importantes en una variedad de procesos fisiológicos y patológicos, Figura 19. Las funciones de los tioles incluyen la protección de las células de especie tóxicas, tales como radicales libres.

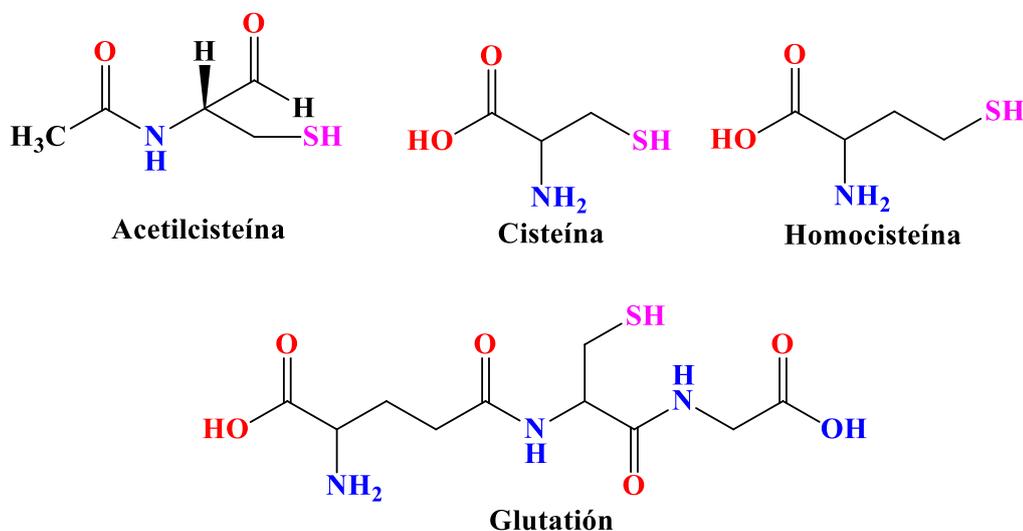


Figura 19. Estructuras químicas de los compuestos tiol de interés.

Los tioles son producto del metabolismo del azufre en el organismo. La metionina que proviene de la ingesta de alimentos, se convierte intracelularmente en homocisteína vía S-adenosilmetionina y S-adenosil-homocisteína. La homocisteína puede ser re-metabolizada a metionina por la ruta de re-metilación o puede ser convertida por medio de la ruta de trans-sulfuración a cistationina y cisteína, que es un sustrato fundamental para la biosíntesis de glutatión.

A pesar de su acción indudablemente benéfica, existe cierta controversia acerca del uso de compuestos tipo tiol como inhibidores de los AGEs. Algunos autores, han presentado evidencias experimentales que la *N*-acetil-cisteína, administrada como antioxidante, puede catalizar la reacción de formación de CML, incluso se propone un mecanismo de reacción en la que *N*-acetil-cisteína forma un aducto con hipuril-lisina por medio del cual la formación de CML es favorecida [196,197].

En el contexto de dicha controversia acerca del efecto benéfico o nocivo de tioles administrados como inhibidores de los AGEs, específicamente en pacientes que sufren diabetes, es importante estudiar dicho efecto utilizando para ello un modelo relativamente simple. En esta parte del trabajo se evalúa el efecto de los tioles: glutatión, L-Cisteína (LCys), homocisteína (HCys) y *N*-acetil-cisteína (ACys) en la formación de CML mediante la reacción de Z-lisina-OH (ZLys) con ácido glioxálico (AGO) como agente glicante.

IV.2.2 Objetivo particular

Estudiar el posible efecto de diferentes compuestos de tipo tiol en la síntesis de ZCML *in vitro*, utilizando para ello un procedimiento analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución con detección espectrofotométrica que permita monitorear la reacción de síntesis y evaluar el rendimiento de conversión de ZLys a ZCML.

IV.2.3 Condiciones experimentales

Para el análisis se empleó un cromatógrafo de líquidos Agilent 1200 equipado con una bomba cuaternaria, automuestreador, termostato de columna y detector espectrofotométrico de arreglo de diodos.

En la Tabla 7 se muestra cómo se lleva a cabo la preparación de las mezclas de reacción empleadas en el experimento. Las soluciones 5 mM de Z-Lys, AGO, GO (glioxal) y los tioles (ACys, LCys, HCys y GSH) se preparan en HEPES 25 mM pH 7.4. El agente reductor, cianoborohidruro de sodio, se prepara en agua desionizada.

Tabla 7. Preparación de las mezclas de reacción para el estudio del efecto de compuestos tipo tiol en la síntesis de CML *in vitro*.

Reactivo	Concentración (mM)	Volumen (μL)	Concentración final (μM)
ZLys	5	100	500
ACys	5	100	500
LCys	5	100	500
HCys	5	100	500
GSH	5	100	500
AGO	5	150	750
GO	5	150	750
NaBH ₃ CN	5	200	1000

Para estudiar el efecto de diferentes tioles en la síntesis de CML, en una serie de los tubos Eppendorf se colocaron: 100 μL de la solución estándar de Z-lisina-OH (500 nmol) y después, a cada uno de los tubos se agregó una alícuota de la solución estándar de uno de los tioles (500 nmol de ACys, LCys, HCys o GSH).

A continuación, se agregaron a cada tubo 150 μL de la solución estándar de ácido glioxálico (750 nmol y 200 μL de cianoborohidruro de sodio 5 mM). En cada uno de los tubos, se completó el volumen a 1 mL con HEPES 25 mM pH 7.4 Las muestras se agitaron brevemente en vórtex. Los tubos Eppendorf con las mezclas, se incubaron por 4 h a 80 °C. Las muestras a analizar se centrifugaron por 10 minutos a 13,000 g, el sobrenadante se diluyó con la fase móvil B, 200 μL

de muestra más 100 μL de fase móvil, para su introducción en la columna cromatográfica. En la Tabla 8 se muestran las condiciones cromatográficas empleadas en el análisis.

Tabla 8. Condiciones cromatográficas utilizadas en el análisis de las muestras de CML.

Columna	Luna C8 250 mm x 3 mm, 5 μm
Fases móviles	A: MeCN B: Formato de amonio 50 mM pH 6.4 C: H ₂ O
Programa de elución	0-13 min 12% A, 50% B, 38% C
Temperatura	30 °C
Flujo	0.5 mL/min
Volumen de inyección	40 μL
Detección UV	259 nm

Puesto que durante la síntesis de CML el pH se ajustó a las condiciones fisiológicas (pH 7.4, versus pH 10 utilizado en la sección IV.1), se confirmó la formación de la ZCML; se recolectó la fracción de la columna correspondiente a tiempos 7.6-8.4 min del cromatograma y se diluyó 10 veces con 0.1% ácido fórmico en acetonitrilo.

Esta solución se inyectó mediante infusión directa al espectrómetro de masas de alta resolución maXis Impact ESI-QTOF-MS (Bruker Daltonics). La ionización ESI fue en modo positivo, utilizando el voltaje en capilar de 4500 V, flujo de N₂ de gas de secado 4 L/min (N₂) y temperatura 180 °C. A partir del espectro de masas (intervalo de 50-160 m/z) se obtuvo la masa exacta del compuesto y se comparó el patrón isotópico experimental con el patrón isotópico teórico.

IV.2.4 Resultados y discusión

En la Figura 20 se presentan dos cromatogramas que fueron obtenidos para la solución de ZLys y para la mezcla de reacción de lisina protegida y ácido glioxálico. Se observa que ZLys se eluye con tiempo de retención 11.4 min y que en la mezcla de reacción se observa un nuevo

pico con tiempo de retención de 7.8 min, lo que indica la formación del producto de reacción ZCML.

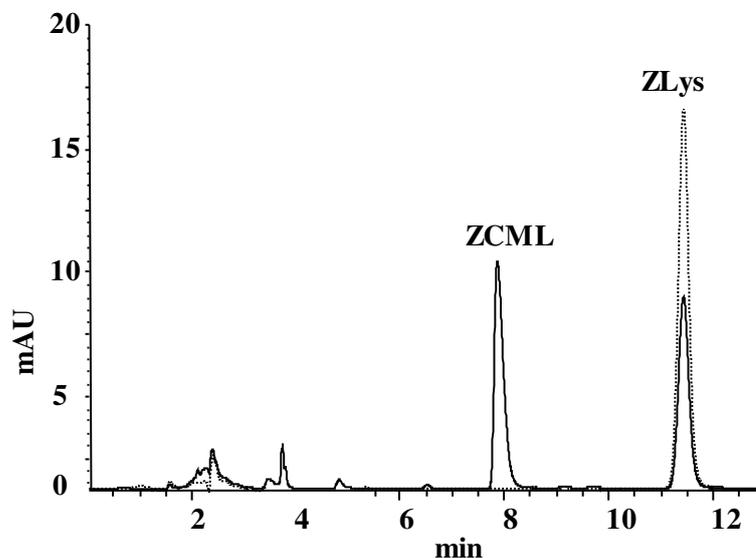


Figura 20. Cromatograma HPLC–DAD de ZLys (···) y de la mezcla de reacción de ZLys y AGO (—).

Es importante señalar que la detección espectrofotométrica se llevó a cabo a 259 nm, debido a que esta longitud de onda correspondió al máximo de las bandas de absorción registradas en el máximo de ambos picos cromatográficos, el ácido glioxálico no se detecta bajo estas condiciones, Figura 21.

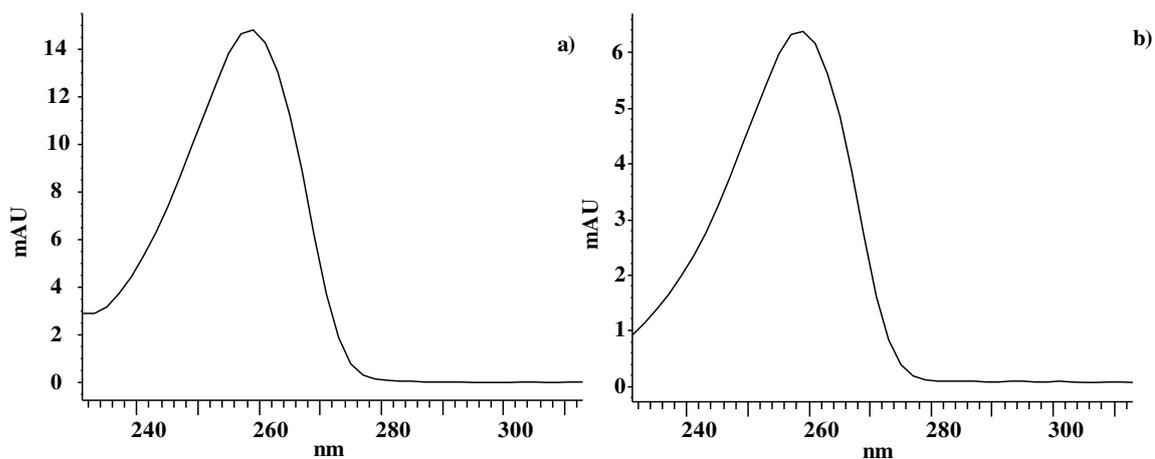


Figura 21. Espectro ultravioleta de a) ZLys y b) ZCML. Absorción máxima 269 nm para ambos compuestos.

Para poder confirmar la identidad de ZCML, se recolectó la fracción de la columna en la que se eluyó este compuesto para su análisis por QTOF-MS obteniéndose los datos de masa exacta y de patrón isotópico. En la Figura 22, se encuentra el espectro de masas obtenido, donde el valor de m/z para molécula protonada es 339.1551, y está en concordancia con el valor teórico. Por otra parte, en las Figuras 23a y 23b se muestra el patrón isotópico experimental y patrón teórico del ion $[M+H]^+$, respectivamente. De esta manera se demuestra que la señal que aparece en los cromatogramas al minuto 7.8 corresponde a la formación de ZCML.

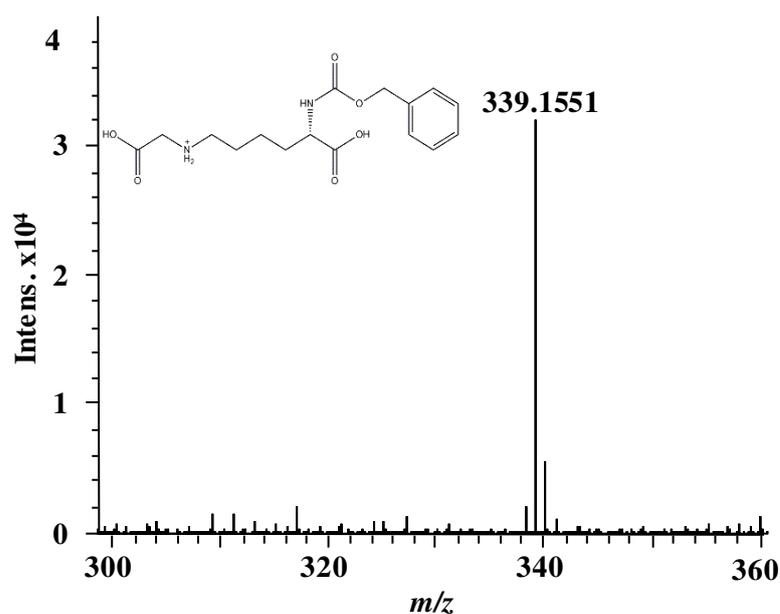


Figura 22. Espectro de masas de la fracción de la columna correspondiente a la elución de ZCML $C_{11}H_{22}N_2O_6$, $[M+H]^+$, 339.1551.

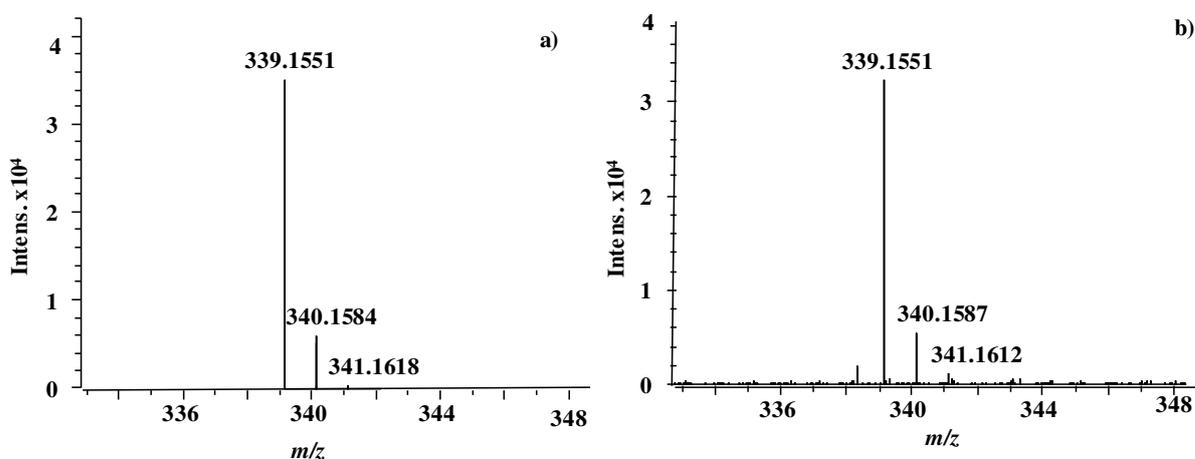


Figura 23. Espectro de masas del patrón isotópico del $[M+H]^+$ $C_{11}H_{22}N_2O_6$, 339.1551. a) Espectro de masas del patrón isotópico teórico; b) patrón isotópico experimental.

En los experimentos que se acaban de describir, se utilizó el ácido glioxálico como agente glicante. Para examinar si la eficacia de síntesis podría mejorarse utilizando otro compuesto dicarbonílico, se realizó un experimento en el que se incubó ZLys con glioxal y con ácido glioxálico por separado. En base a las áreas de los picos de ZCML y ZLys de cada uno de los cromatogramas, se evaluó el porcentaje de conversión de ZLys en ZCML, para cada una de las muestras. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 24, en la cual se observa un rendimiento mayor cuando se emplea AGO (50.9%) que con GO (19.0%). Es por ello, que el ácido glioxálico ha sido utilizado en todos los experimentos subsecuentes.

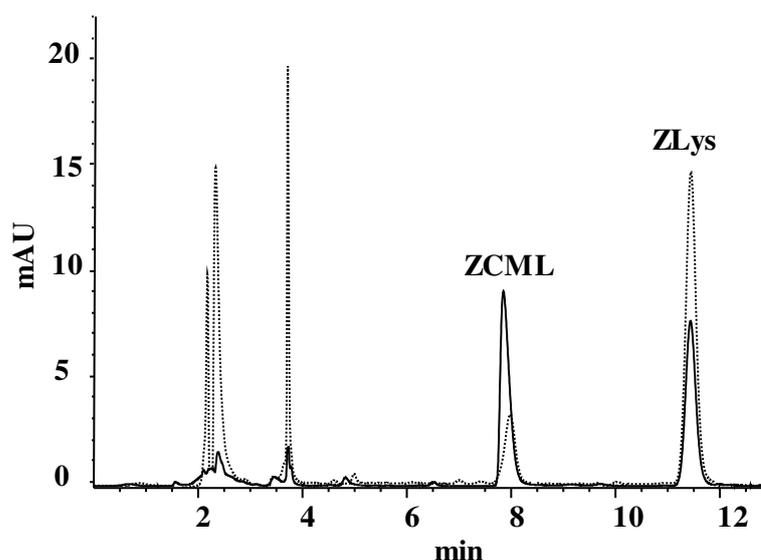


Figura 24. Cromatograma de la formación de ZCML empleando AGO (···) y GO (—) como agentes glicantes.

Una vez demostrada la formación de ZCML en las condiciones de reacción utilizadas en este trabajo, se analizaron por el mismo procedimiento de HPLC–DAD las mezclas de reacción a las que se les agregó uno de los tioles.

A manera de ejemplo, en la Figura 25 se presenta el cromatograma obtenido para la mezcla con y sin adición de ACys. Se observa la formación de ZCML en ambas soluciones; sin embargo, la señal que corresponde a ZCML se ve considerablemente disminuida cuando ZLys y AGO son incubados junto con ACys respecto a la mezcla sin tiol.

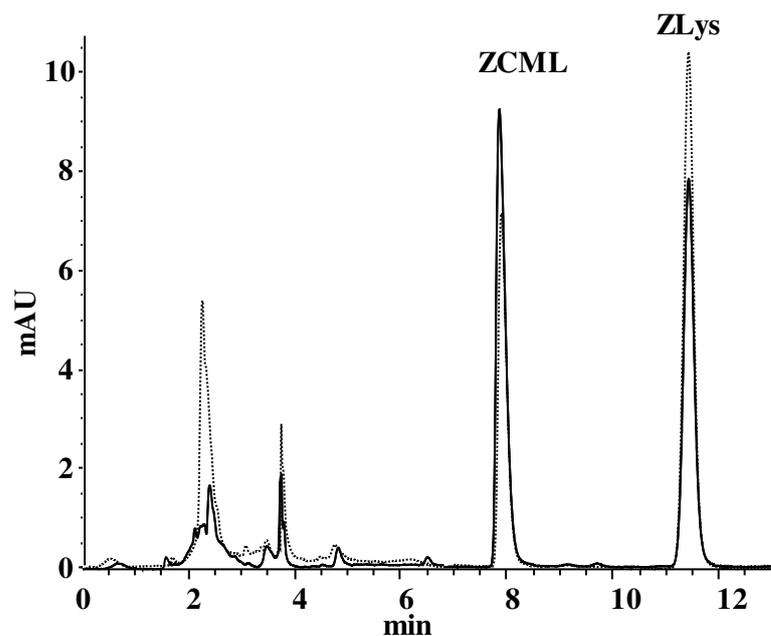


Figura 25. Cromatograma HPLC–DAD de la mezcla de ZLys con AGO (—) y la misma mezcla con adición de ACys (⋯).

Un efecto similar se observa en la Figura 26, donde se presentan los cromatogramas obtenidos en ausencia y presencia de todos los tioles empleados: ACys, LCys, HCys y GSH.

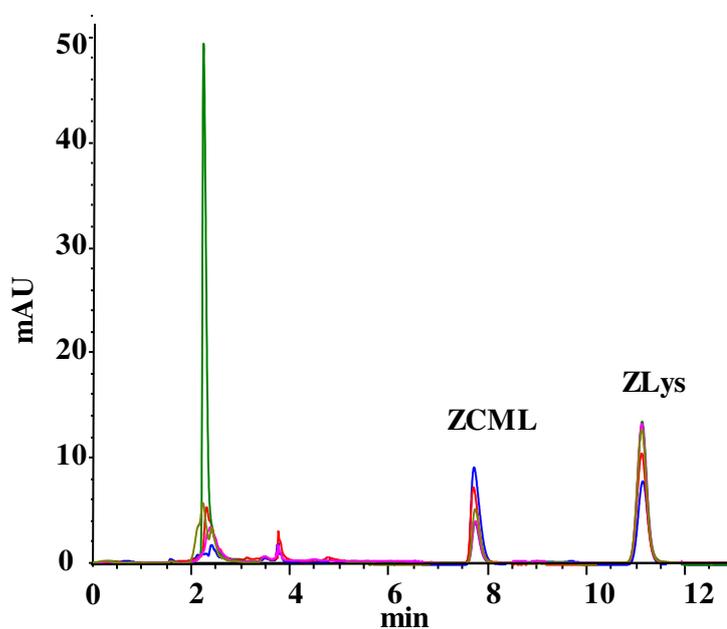


Figura 26. Cromatograma HPLC–DAD de la formación de ZCML en ausencia (—) y presencia de los tioles: Acys (—); LCys (—); HCys (—); GSH (—).

En base a las áreas de los picos de ZCML y ZLys en cada uno de los cromatogramas, Figura 26, Figura 27, se evaluó el porcentaje de conversión de ZLys en ZCML ($A_{7.8\text{min}} / (A_{7.8\text{min}} + A_{11.4\text{min}})$) para cada una de las mezclas analizadas. Los resultados obtenidos para tres réplicas independientes se presentan en la Figura 27, donde se observa claramente que la formación de ZCML es más eficiente cuando se incubaba ZLys y AGO sin ningún tiol. En la misma Figura 27 se observa que cada uno de los tioles, causó una disminución significativa del rendimiento de la síntesis del ZCML. Los resultados obtenidos demostraron que los tioles actúan como inhibidores de glicación por AG, pero el efecto fue diferente para cada uno de los compuestos examinados (HCys>LCys>GSH>ACys). Se sabe que el efecto antioxidante de compuestos tipo tiol puede estar relacionado con el valor de pKa del grupo sulfhidrilo, su actividad incrementa cuando disminuye su valor de pKa (LCys pKa 8.53, HCys pKa 8.70, GSH pKa 8.56, ACys pKa 9.52 [198]. Recordemos que en un estudio similar, otros autores observaron el efecto contrario, efecto favorable, de tioles en la síntesis de CML [196,197]. En los trabajos citados, sin embargo, se utilizó el glioxal, mientras que en el presente estudio el agente glicante fue el ácido glioxálico, lo que sugiere que el efecto del grupo tiol podría ser diferente dependiendo de la estructura del agente glicante

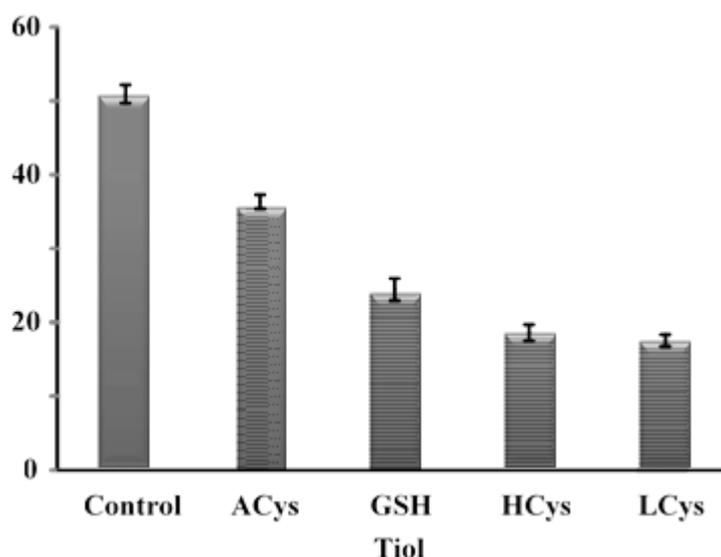


Figura 27. Efecto de diferentes compuestos de tipo tiol en la formación de ZCML.

IV.2.5 Conclusiones

Se estableció un procedimiento por cromatografía de líquidos en fase reversa con detección espectrofotométrica DAD, 259 nm, que permite hacer el seguimiento de la síntesis de ZCML a partir de la ZLys y ácido glioxálico *in vitro*.

Asimismo, se ha confirmado la formación de ZCML en dicha reacción, mediante espectrometría de masas de alta resolución. Se estudió el efecto de *N*-acetil-cisteína, cisteína, homocisteína y glutatión sobre el rendimiento de la formación de ZCML. Los resultados obtenidos indican que estos compuestos, utilizados ampliamente como antioxidantes, no favorecen la formación de CML, como lo han sugerido algunos autores [151, 152].

Al contrario, en experimentos realizados en este trabajo se observó un efecto inhibitorio de los tioles en la síntesis de la ZCML, en el siguiente orden decreciente: HCys>LCys>GSH>ACys. Cabe resaltar sin embargo que, en el presente trabajo se utilizó lisina protegida en el nitrógeno α con un grupo benziloxycarbonilo y el ácido glioxálico como agente glicante, mientras que otros autores utilizaron el grupo hipuril para la protección de lisina y el glioxal como agente glicante.

En un trabajo futuro es necesario verificar si el efecto inhibitorio de tioles se presenta también para otros agentes glicantes, además de ácido glioxálico.

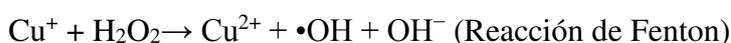
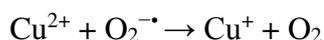
IV.3 EFECTO DE LOS IONES ZINC Y COBRE EN LA FORMACIÓN DE N^ε-CARBOXIMETIL-LISINA EN PRESENCIA DE TIOLES

IV.3.1 Introducción

Los metales juegan un papel muy importante en una amplia variedad de procesos de los sistemas vivos. La disrupción de la homeóstasis de los metales esenciales en los organismos vivos tiene implicaciones en una gran cantidad de enfermedades. En el estado de desequilibrio, potencialmente aumenta la concentración de iones libres y, en el caso de metales de transición que pueden cambiar su estado de oxidación en el ambiente celular como hierro, cobre, cromo y cobalto, el impacto directo es la generación de radicales libres. Existen también evidencias experimentales de que los iones de metales de transición como hierro y cobre intervienen en la reacción de Maillard. Junto con oxígeno, catalizan la formación de especies dicarbonílicas y ROS, que contribuyen al daño oxidativo y a la formación de AGEs. Por otro lado, elementos traza como zinc y manganeso han sido estudiados frecuentemente en diabetes y otras patologías, pero su efecto sobre la formación de AGEs es reportado escasamente. Las investigaciones que se centran en el estudio de AGEs, generalmente sólo incluyen los efectos que producen metales como cobre y hierro [196].

El cobre puede inducir estrés oxidativo a través de dos mecanismos: i) acción catalítica durante la generación de ROS por medio de la reacción de Fenton y ii) disminución de los niveles de glutatión.

En cuanto al primero de los mecanismos, los iones cúpricos y cuprosos pueden actuar en reacciones de oxidación y reducción. El ion cúprico Cu(II), en presencia del radical anión superóxido o compuestos reductores biológicos como el ácido ascórbico o glutatión, puede reducirse al ion cuproso Cu(I), el cual es capaz de catalizar la formación de radical hidroxilo a través de la descomposición de peróxido, reacción de Fenton. El radical hidroxilo es extremadamente reactivo con cualquier molécula biológica vecina [199].



Considerando el segundo mecanismo, glutatión en principio suprime la toxicidad de cobre mediante formación de la unión de Cu(II) con grupo tiol, lo que previene la participación de cobre en procesos redox. Sin embargo, el resultante agotamiento de glutatión potencialmente aumenta la generación de las ROS, [200].

El Zn(II) es necesario para actividad de más de 70 enzimas que regulan muchos aspectos del metabolismo celular [201]. Este elemento no participa directamente en reacciones de oxidación/reducción. La función de zinc como antioxidante incluye dos mecanismos: i) La protección de los grupos sulfhidrilo de proteínas frente al ataque de radicales libres y ii) la reducción de la formación de radicales libres como antagonista de los metales activos redox [202]. La función de zinc no sólo es actuar como antioxidante, sino también como agente anti-inflamatorio [196].

La autooxidación de glucosa catalizada por cantidades traza de iones metálicos conduce a la formación de especies dicarbonílicas reactivas y ROS, que aceleran la modificación de proteínas. Aunque las reacciones de oxidación inducidas por especies reactivas están relacionadas, los procesos de glicación que conducen a la formación de AGEs durante elaboración de alimentos se clasifican dentro del dominio de la reacción Maillard. La secuencia de reacciones de oxidación en el proceso de glicación aún es incierta. No se ha elucidado si la oxidación precede a la glicación o viceversa.

El ion cobre (II) es aceptado generalmente como contribuyente a la reacción de Maillard *in vitro* e *in vivo* a través de la generación de ROS. Algunos estudios revelan que la ceruloplasmina se incrementa en pacientes que padecen diabetes mellitus tipo 1 y 2 respecto a los sujetos sanos [203]. Adicionalmente, algunos estudios reportan un incremento de las concentraciones de cobre en plasma de pacientes con complicaciones a causa de la diabetes, tales como hipertensión y retinopatía [204]. El metabolismo alterado de cobre ha sido asociado con el incremento de proteínas glicadas, por lo que se ha sugerido que este metal puede contribuir al progreso de la diabetes y patologías relacionadas. Por otro lado, algunos autores han reportado que las proteínas glicadas tienen mayor capacidad de unir a los iones de metales en transición, incluyendo cobre, en comparación con proteínas no modificadas [196]. Aunado a esto, existen reportes de estudios *in vitro* que demuestran un efecto inhibitorio de cobre durante la glicación de proteínas [205–207].

Con base en la revisión bibliográfica que se acaba de presentar, se detecta cierta controversia en cuanto al papel del cobre en la formación de los AGEs. Cabe señalar que este metal interactúa con varios componentes del ambiente celular o con alimentos estableciendo un equilibrio multifactorial y complejo. En particular, su afinidad a los grupos tiol afecta potencialmente el estado redox del sistema en el que se encuentran antioxidantes endógenos y terapéuticos. Aunque el Zn(II) no participa en la reacción de Fenton como lo hace el cobre, este ion metálico también se une a los grupos tiol, afectando de esta manera el estado redox y, posiblemente, la formación de los AGEs. Por ello, resulta interesante evaluar experimentalmente si la presencia de estos dos iones metálicos tiene un impacto sobre la formación de CML comparando los posibles efectos en presencia y en ausencia de los tioles utilizados en la sección IV.2.

IV.3.2 Objetivo particular

Evaluar el impacto de iones Zn(II) y Cu(II) en la formación de *N*^ε-carboximetil-lisina en presencia o en ausencia de tioles, empleando el procedimiento analítico por cromatografía de líquidos desarrollado en el apartado anterior.

IV.3.3 Condiciones experimentales

Las soluciones empleadas en el experimento se prepararon de igual manera que en el experimento anterior. Con el fin de observar los cambios que pudieran presentarse en la formación de ZCML en presencia de iones metálicos como cobre y zinc. Adicionalmente a las soluciones preparadas según la Tabla 7, se prepararon soluciones de 1 mM de estos metales en agua desionizada a partir de las sales sulfatadas: CuSO₄ y ZnSO₄, respectivamente.

La reacción de glicación se llevó a cabo en tubos Eppendorf, de forma similar a la sección IV.2.3. Se depositó una alícuota de 100 μL de ZLys (500 nmol), enseguida se le adicionaron 150 μL (750 nmol) del agente glicante, AGO. Posteriormente se añadieron diferentes concentraciones de los metales zinc y cobre: 100 μL (100 nmol), 50 μL (50 nmol), 25 μL (25 nmol) o 10 μL (10 nmol) de la solución estándar, según corresponda, a cada tubo. Finalmente,

se adicionó a la mezcla el agente reductor en exceso 200 μL (1000 nmol). El volumen de cada tubo se completó a 1 mL con HEPES 25 mM pH 7.4.

En otro experimento, se buscó detectar si los iones metálicos podrían tener alguna influencia sobre el efecto inhibitorio que ejercen los tioles en la formación de ZCML. De manera análoga a lo descrito anteriormente, se preparó una serie de mezclas de reacción que contenían ZLys, AGO, NaBH_3CN y los iones metálicos, además, 100 μL (500 nmol) de uno de los tioles ACys, HCys, LCys o GSH. Una vez que se han adicionado todos los reactivos, los tubos se agitaron brevemente en vórtex e incubaron por 4 h a 80 °C. Después de la incubación, las mezclas se centrifugaron por 10 minutos a 13,000 g, el sobrenadante se diluyó con la fase móvil B, 200 μL de muestra más 100 μL de fase móvil, para su análisis en el equipo de HPLC, bajo las mismas condiciones presentadas anteriormente en la Tabla 8.

IV.3.4 Resultados y discusión

En los experimentos con iones metálicos se trató de simular las condiciones fisiológicas. Por ello, de acuerdo con otros estudios y esperando un efecto catalítico, se utilizaron bajas concentraciones de iones metálicos con relaciones molares ZLys:M(II) 1:0.4 (500:200 nmol), 1:0.2 (500:100 nmol), 1:0.1 (500:50 nmol) y 1:0.05 (500:25 nmol) con cada uno de los metales [199,208–210].

En la Figura 28 se presentan los cromatogramas de HPLC–DAD obtenidos para las mezclas de reacción de ZLys con ácido glioxálico: sin agregar iones metálicos, con adición de Cu(II) y con adición de Zn(II) (relación molar ZLys: ion metálico 1:0.05). Se puede distinguir fácilmente que zinc presenta un efecto inhibitorio sobre esta reacción de glicación, mientras que el cobre no presenta un efecto significativo.

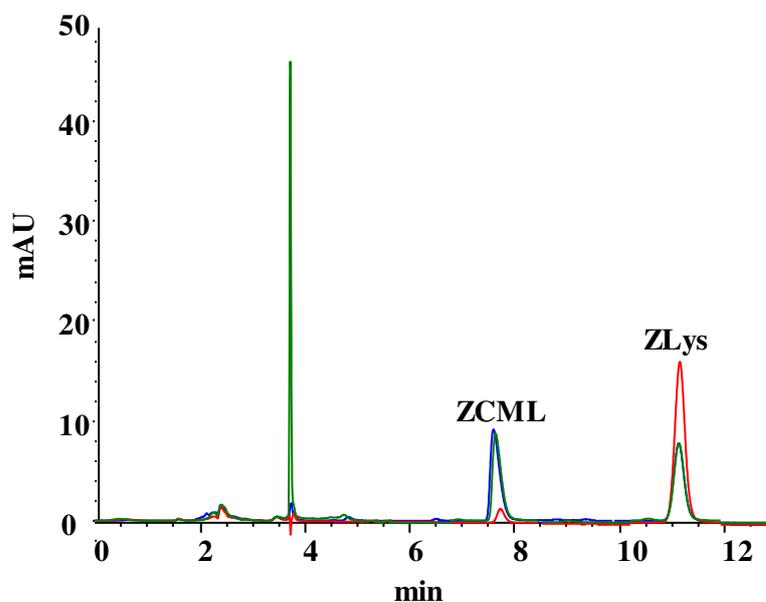


Figura 28. Cromatogramas HPLC-DAD de las mezclas de reacción conteniendo ZLys y AGO sin y con cada uno de los iones metálicos: Control (—); 25 nmol Zn(II) (—); 25 nmol Cu(II) (—).

De manera similar a la sección IV.2.4, para cada una de las mezclas de reacción, se evaluó el porcentaje de conversión de ZLys y ZCML con base en las áreas de los picos cromatográficos de estos dos compuestos para cada una de las concentraciones de los metales adicionados.

Los resultados se presentan en la Figura 29 en forma de gráfica de barras, presentando el promedio con su respectivo valor de desviación estándar, para tres réplicas. El efecto inhibitor de Zn(II) en la formación de ZCML es estadísticamente significativo en todo el intervalo de concentraciones estudiadas (prueba *t*, $p < 0.05$).

Se sabe que este ion metálico ejerce múltiples funciones en el organismo, actuando como antioxidante a través de diversos mecanismos; sin embargo, su efecto inhibitor en la formación de ZCML no ha sido reportado aún y en este sentido, los resultados obtenidos en este trabajo son muy alentadores. En el caso de cobre, nuestros resultados muestran que este metal, al igual que zinc, inhibe la reacción de Maillard en la que se forma ZCML, pero su efecto es menos notorio comparando con zinc.

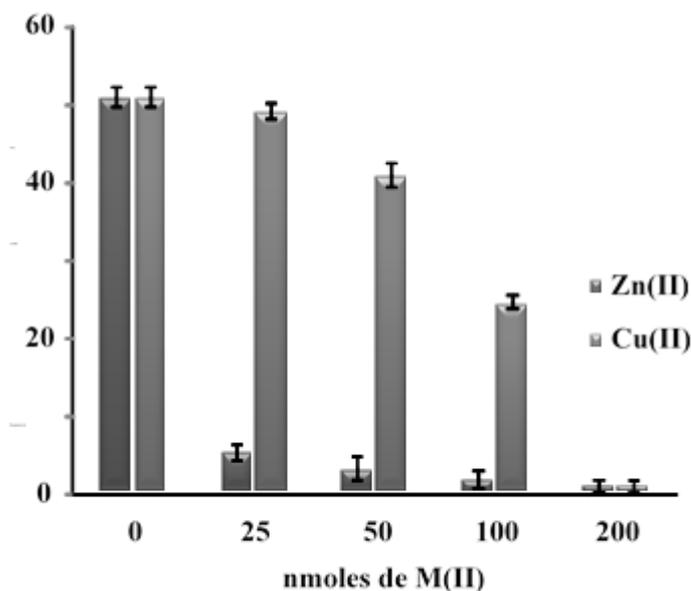


Figura 29. Efecto de iones metálicos Cu(II) y Zn(II) en la formación de ZCML.

En la siguiente etapa, se examinó si los iones metálicos podrían tener alguna influencia sobre el efecto que ejercen tioles en la síntesis de ZCML. Para ello, tal como se describe en la parte experimental, se obtuvieron mezclas de reacción ZLys, ácido glioxálico y tiol, cada una de ellas con y sin adición de Cu(II) o Zn(II). Las mezclas fueron analizadas por el procedimiento HPLC-DAD, evaluando el porcentaje de formación de ZCML en cada uno de los casos.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 30. En concordancia con la sección IV.2, la presencia de tioles sin adición de iones metálicos provocó una disminución de formación de ZCML. En las mismas mezclas con adición de iones metálicos, se observan cambios en la formación del AGEs, dependiendo del compuesto tiol utilizado.

En particular, en presencia de ACys y GSH, la adición de una concentración creciente de Zn(II) resultó en una disminución gradual del rendimiento de la formación de ZCML respecto al efecto observado cuando la mezcla de reacción contenía solamente uno de estos dos tioles. Estos resultados sugieren que Zn(II) no solamente inhibe la formación de CML, pero también potencializa el efecto inhibitor de ACys y GSH. En el caso de HCys y LCys, adición de Zn(II) a la mezcla de reacción no ha tenido un efecto notorio en el rendimiento de formación de la ZCML.

Los resultados obtenidos adicionando ion Cu(II) a la mezcla de reacción que contenía tioles, fueron diferentes. Para HCys y LCys, la adición de Cu(II) provocó disminución significativa del ZCML formado respecto a la cantidad sintetizada en presencia de cualquier de estos tioles. Para las mezclas con ACys y diferentes concentraciones de cobre, la síntesis de ZCML aumentó con 25 y 50 nmol de iones Cu(II); con una mayor concentración de cobre (100 y 200 nmol) la cantidad de ZCML disminuyó, Figura 30b. Algo similar sucede con GSH, sólo se logra disminuir el porcentaje de formación de ZCML cuando se adicionan 200 nmol de Cu(II), Figura 30d.

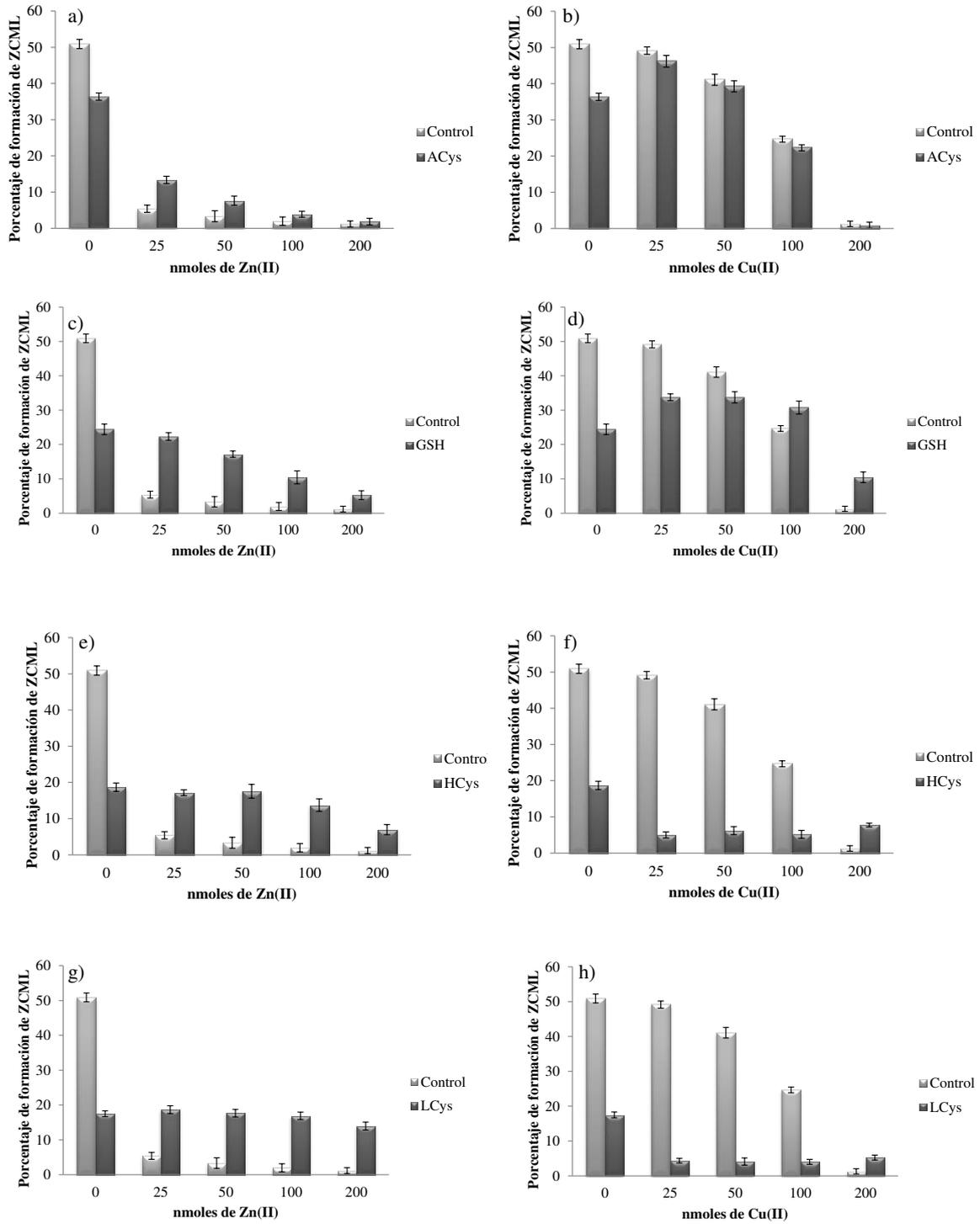


Figura 30. Estudio del efecto de los iones metálicos Zn(II) y Cu(II) en la formación de ZCML en presencia de compuestos de tipo tiol: Efecto de Zn(II) en la inhibición por a) ACys; c) GSH; e) efecto HCys; g) LCys; Efecto de Cu(II) en la inhibición b) ACys; d) GSH; f) HCys; h) LCys.

IV.3.5 Conclusiones

Los resultados obtenidos en esta sección muestran que los iones metálicos Zn(II) conducen sin duda alguna a la inhibición de la reacción de formación de ZCML en una reacción de Z-Lys-OH con ácido glioxálico. Resulta muy interesante que en las mezclas de reacción que contenían ACys y GSH, la adición del ion Zn(II) potencializó el efecto inhibitor observado para cada uno de los tioles por separado.

El efecto de Cu(II) sobre la formación de ZCML en ausencia de tioles fue similar pero menos notorio respecto al observado para Zn(II). Por otra parte, en las mezclas que contenían HCys o LCys, adición de ion Cu(II) provocó un decremento significativo de ZCML formado, pero este efecto no fue observado para los otros dos tioles, ACys y GSH.

Estos resultados son muy prometedores ya que sugieren un nuevo mecanismo de acción benéfica de tioles y de Zn(II) en el contexto de la formación de los AGEs. En estudio futuro, se planea estudiar el efecto iones metálicos con mayor profundidad.

IV.4 DESARROLLO DE UN PROCEDIMIENTO DE DETERMINACIÓN DE CML EN ALIMENTOS POR CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS EN FASE REVERSA CON DETECCIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM

IV.4.1 Introducción

Una de las vertientes del presente trabajo ha sido el desarrollo metodológico para determinación de CML, como marcador de los AGEs, en matrices químicas complejas. Se decidió analizar alimentos ya que existe la necesidad de controlar y reducir el consumo de los AGEs exógenos [211]. De la revisión bibliográfica realizada en la introducción general, se concluyó que la cuantificación de CML es una tarea retadora, pues se destaca la ausencia de un método universal y estandarizado para su medición y en varios reportes se mencionan diferentes tipos de interferencias.

La cromatografía de líquidos es una técnica muy versátil debido a la variedad de mecanismos de separación, tipos y dimensiones de columnas disponibles, fases móviles y condiciones de elución que se pueden elegir dependiendo de la composición de la muestra. En particular, la separación en fase reversa ofrece beneficios de una buena resolución, el uso de columnas de núcleo sólido con un buen desempeño y duraderas, además del uso de fases móviles compatibles con fuentes de ionización suaves y con detectores másicos. Es por ello que el objetivo de este trabajo ha sido desarrollar un procedimiento de determinación de CML por cromatografía de líquidos en fase reversa; sin embargo, la CML es una molécula soluble en agua y altamente polar que no es retenida en la columna de fase reversa. En esta situación, ha sido necesario llevar a cabo una derivatización pre-columna, en la que CML sea transformada en una molécula de menor polaridad.

Los alquilcloroformatos han sido empleados en cromatografía de gases durante muchos años, pues son especies altamente reactivas frente a aminas, ácidos carboxílicos y fenoles, la reacción de derivatización tiene una serie de ventajas, pues ocurre excepcionalmente rápido comparado con otros métodos de derivatización. Para que se lleve a cabo la reacción no es necesario calentamiento y además de que las muestras pueden ser tratadas en fase acuosa [212]. Los derivados formados son semi-volátiles y pueden ser analizados por cromatografía de líquidos, aunque esta opción ha sido muy poco utilizada [213–216].

En cuanto al sistema de detección, en este trabajo se optó por espectrometría de masas en tándem, utilizando un espectrómetro de masas de baja resolución, una trampa iónica como filtro de masas. De esta manera, se puede emplear la modalidad de MRM. En este método, el analito es detectado por su tiempo de retención, la relación m/z del ion precursor y m/z de su ion cuantificador y de su ion calificador; la transición ion precursor \rightarrow ion cuantificador permite compensar por resolución cromatográfica incompleta y permite aumentar considerablemente la relación señal/ruido mejorando el límite de detección y de cuantificación [217,218].

Por otro lado, con el detector másico se tiene la opción de utilizar CML marcada con deuterio como estándar interno para aumentar la confiabilidad de los resultados, por reducción o eliminación de los errores cometidos durante la manipulación de la muestra y durante la adquisición de la señal.

Resumiendo, en este trabajo, se propone utilizar etilclorofornato como agente derivatizante para CML y CML-D₂ (usado como estándar interno) y llevar a cabo la determinación del CML por cromatografía de líquidos en fase reversa. El reto ha sido utilizar las condiciones cromatográficas compatibles con ESI-MS, establecer las condiciones de cuantificación por MRM y demostrar la utilidad del método en el análisis de alimentos.

IV.4.2 Objetivo particular

Poner a punto nuevo procedimiento HPLC-ESI-ITMS/MS para la determinación de CML en alimentos.

IV.4.3 Condiciones experimentales

El tratamiento de los alimentos para la determinación de CML consiste en el hidrolisis con HCl 6 N. Para simular la composición química de muestras reales, a todas las soluciones de calibración se agregó una mezcla de aminoácidos tal como se detalla en Tabla 9. Específicamente, en una serie de tubos Eppendorf se colocaron 30 μ L de esta mezcla, 50 μ L CML-D₂ (800 μ g/L), 20 μ L de NaOH 1 M, para neutralización y alícuotas variables del estándar de CML (2000 μ g/L) llevando a volumen final de 400 μ L con agua desionizada; las concentraciones finales de CML fueron las siguientes: 0, 50, 100, 200, 400, 600, 800 μ g/L.

Tabla 9. Composición de las soluciones de calibración y muestras preparadas para la derivatización.

Nombre	Volumen adicionado, μL				
	CML 2000 $\mu\text{g/L}$	CML-D ₂ 800 $\mu\text{g/L}$	Mezcla de aminoácidos*	NaOH 1M	H ₂ O
Blanco	-	50	30	20	300
Calibración (50 $\mu\text{g/L}$ CML)	10	50	30	20	290
Calibración (100 $\mu\text{g/L}$ CML)	20	50	30	20	280
Calibración (200 $\mu\text{g/L}$ CML)	40	50	30	20	260
Calibración (400 $\mu\text{g/L}$ CML)	80	50	30	20	220
Calibración (600 $\mu\text{g/L}$ CML)	120	50	30	20	180
Calibración (800 $\mu\text{g/L}$ CML)	160	50	30	20	140
Hidrolizado de muestra evaporada	-	50	-	70	280

* - Solución stock de aminoácidos: alanina, glicina, arginina, prolina, fenilalanina, histidina, lisina, metionina, cisteína, ácido glutámico, tirosina, 250 mg de cada uno se disolvió en 25 mL de agua desionizada con la adición de 1 mL de HCl 6 M. Esta solución se agregó para igualar la matriz química de los alimentos hidrolizados; 30 μL de la mezcla de aminoácidos corresponde a cerca de 3 mg de proteína presente en 400 μL de muestra reconstituida, antes de la derivatización (el contenido de proteína presente en las muestras analizadas es de aproximadamente el 30%).

Para la derivatización, a 400 μL de la solución de calibración o hidrolizado de alimento se agregaron 500 μL de una mezcla etanol: piridina (4:1, v/v), seguido de dos adiciones sucesivas de 25 μL de etilcloroformato. Después de cada adición, las mezclas se agitaron y destaparon para permitir que saliera el dióxido de carbono generado durante la reacción. Finalmente, se agregaron 500 μL de bicarbonato de sodio 50 mM para ajustar el pH a 9.0 que fue necesario para la extracción de los compuestos derivatizados a la fase de cloroformo, 500 μL . Después de centrifugar a 13,000 g por 10 min, y obtener la separación de dos fases, la fase acuosa se desechó y la fase orgánica se evaporó a temperatura ambiente y se reconstituyó en 200 μL de la fase móvil, formato de amonio 5 mM: metanol, 60:40 v/v.

Las muestras fueron filtradas (filtros Whatman 0.22- μm) y analizadas por HPLC-ESI-ITMS/MS. Se usó la columna cromatográfica Kinetex C18 (150 x 3 mm, 2.6 μm) con una pre-columna (4 x 2 mm), ambas de Phenomenex. La columna se mantuvo a una temperatura de 35 °C y el volumen de inyección fue de 5 μL . Se usaron dos fases móviles, formato de amonio 5 mM pH 3.5 A) y metanol B) con un programa de elución lineal, 0 min 40% B, 0-17 min 80% B, 17-20 min 40% B (re-equilibrio de columna) y flujo de 0.3 mL/min.

El efluente de la columna se introdujo a la fuente ESI operada en modo positivo bajo los siguientes parámetros: voltaje de spray 4500 V; voltaje de placa 500 V; presión del gas nebulizador 14 psi (N₂); gas de secado 6 L/min (N₂) y temperatura de la fuente 200 °C. Los espectros de masas se obtuvieron en modo UltraScan en el rango de m/z 100-450, con ICC (Control de Carga de Iones) en 100, 000 y el tiempo máximo de acumulación de los iones en trampa de 70 ms. El parámetro SPS (Smart Parameter Settings), usado para la optimización automática de la trampa se fijó en 405 m/z y la estabilidad del compuesto 100%.

En el modo de monitoreo de reacciones múltiples, la amplitud de fragmentación se fijó en 0.4 V, anchura de aislamiento $m/z \pm 2$ y cut-off 200 aplicado para cada ion monitoreado. Las transiciones usadas para los compuestos individuales fueron m/z 405→359 para CML y 407→361 para CML-D₂. La relación m/z para los iones cuantificadores fue 331 y 333, respectivamente. Para fenilalanina, el principal interferente, la amplitud de fragmentación fue de 0.6 V, cut-off 150 y transición m/z 266→220 (192 m/z para el ion calificador). La cuantificación se llevó a cabo con la ayuda del software de Bruker QuantAnalysis, tomando el área de pico de los iones cuantificadores de sus respectivos cromatogramas de MRM y tomando en cuenta los valores normalizados con el IS para determinar la concentración de CML en cada muestra.

Para los experimentos de recuperación se emplearon las muestras de queso de cabra fresco, salmón y “carnitas” preparados en cacerola de vidrio. Las condiciones de tratamiento de muestra se describen en la siguiente sección IV.5.3; antes de hidrólisis ácida, se adicionaron 50 μ L y 150 μ L of CML de estándar 2000 μ g/L a las alícuotas de muestras liofilizadas, 100 ng y 300 ng of CML, respectivamente.

IV.4.4 Resultados y discusión

La derivatización con etilcloroformato convierte grupos amino primarias y secundarios en respectivos etilcarbamatos, mientras que dos grupos carboxílicos son esterificadas con alcohol presente en el medio de reacción [34, 35]. En la Figura 31 se detalla el mecanismo general de la reacción de derivatización. El etilcloroformato es muy reactivo y se descompone fácilmente

en presencia de agua produciendo ácido clorhídrico y etanol. Sin embargo, cuando se encuentra en presencia de piridina y bajo condiciones alcalinas, sufre un ataque nucleofílico, con el cloro como grupo saliente generando ácido clorhídrico.

El oxígeno en los grupos carboxilo o el nitrógeno en los grupos amino primarios o secundarios de los metabolitos funciona como base y reemplaza al cloro. En los ácidos carboxílicos, se forma un anhídrido como especie de transición, el cual es rápidamente atacado por el par de electrones del oxígeno del etanol, obteniendo como productos un éster y una molécula de etilcarbonato. Para grupos amino el etilcarbonato se enlaza al nitrógeno, el cual pierde un protón, formando un grupo carbamato [219].

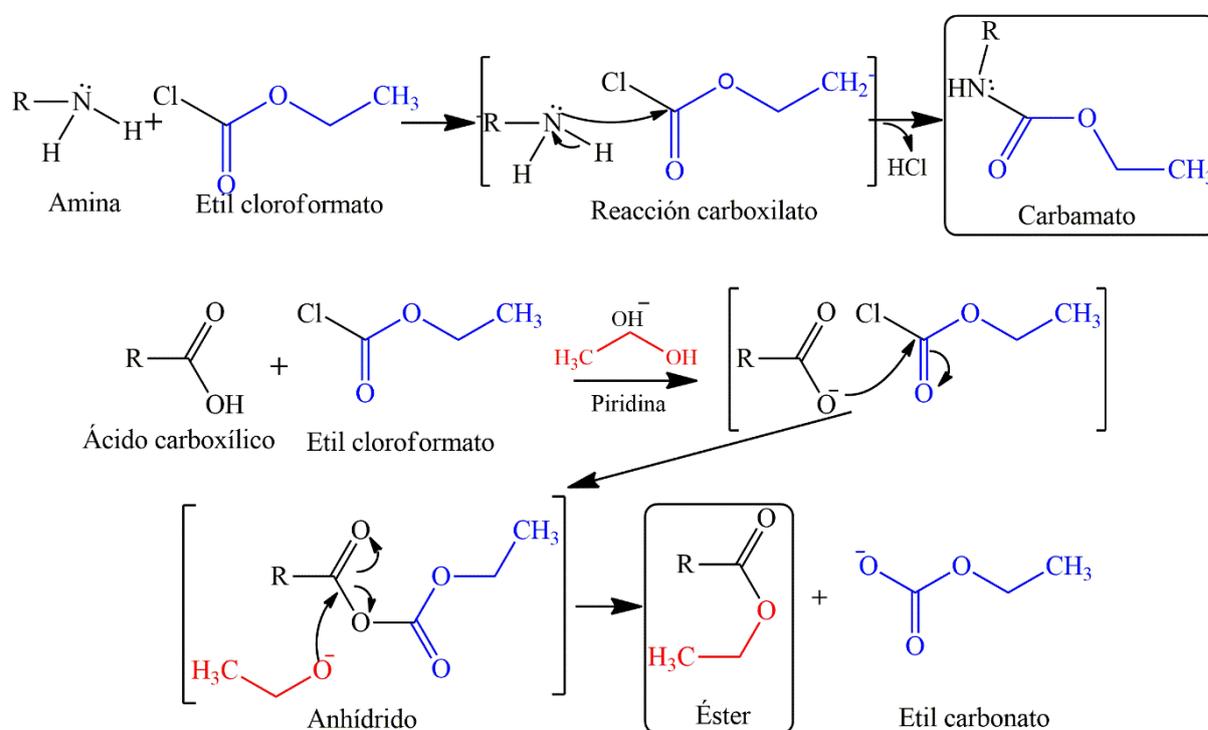


Figura 31. Mecanismo general de la derivatización de una amina con etilcloroformato, la reacción de alquilación con etilcloroformato convierte al grupo amino y ácidos orgánicos en ésteres y carbamatos, convirtiéndose en compuestos no polares [219].

Después de la derivatización con etilcloroformato, cada compuesto sufre un incremento de 28 uam (unidades de masa atómica) por cada grupo carboxilo presente en la molécula y de 72 uam para cada grupo amino primario o secundario derivatizados. De esta manera, en la CML de masa molecular 204 se derivatizan dos grupos carboxílicos (2×28 uam) y dos grupos amino (2×72 uam), arrojando un derivado de CML de masa molecular 404, tal como lo muestra la Figura 32.

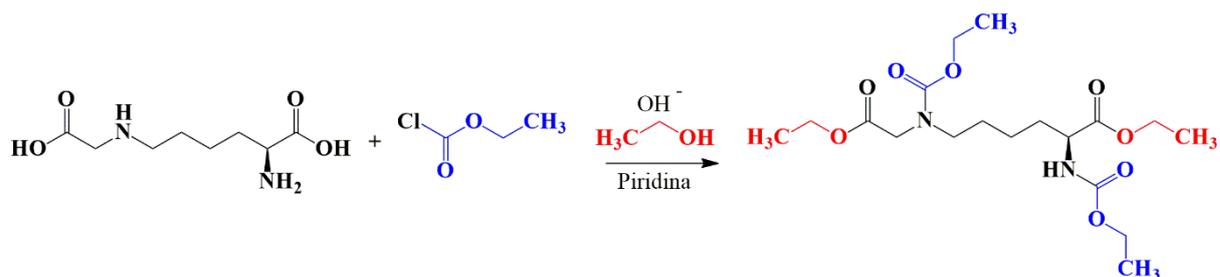


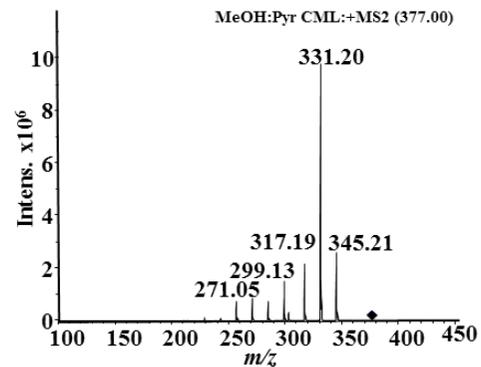
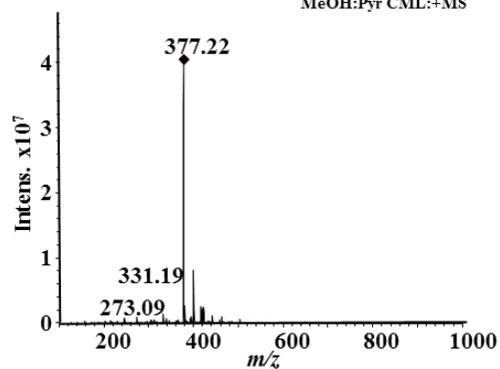
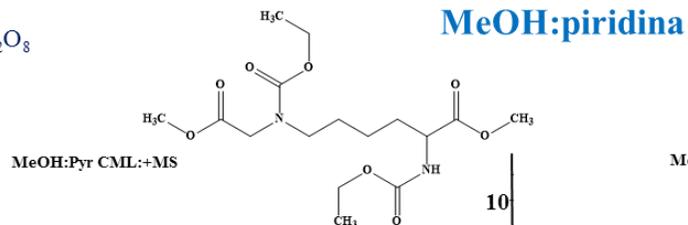
Figura 32. Reacción de derivatización de CML (masa molecular 204) con etilcloroformato en medio básico con etanol - piridina formando un derivado de CML de masa molecular 404.

Cuando se determina CML en alimentos, todos los aminoácidos presentes en los hidrolizados son susceptibles a derivatización con etilcloroformato por lo que es necesario evitar interferencias al aplicar el análisis por HPLC-ESI-ITMS/MS. Con el fin de obtener resultados confiables, se tomaron en cuenta los siguientes cuatro aspectos: i) eliminar interferentes potenciales antes de la inyección en columna, ii) asegurar la resolución cromatográfica de CML iii) igualar la matriz de los alimentos en las soluciones de calibración y iv) alcanzar una alta sensibilidad en modo de monitoreo de reacciones múltiples.

Para cumplir con el primer punto, las muestras de alimentos fueron desgrasadas antes de la hidrólisis ácida, sección IV.6. Para eliminar especies iónicas y polares presentes en los hidrolizados de alimentos, después de la derivatización se ajustó a pH 9 con bicarbonato de sodio 50 mM lo que permitió extraer compuestos derivados a la fase orgánica de cloroformo. Cabe resaltar que es necesario un control estricto de pH en este procedimiento.

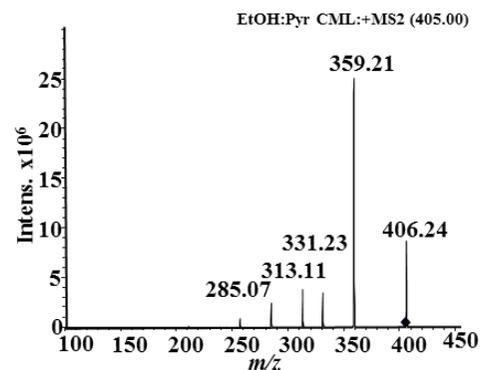
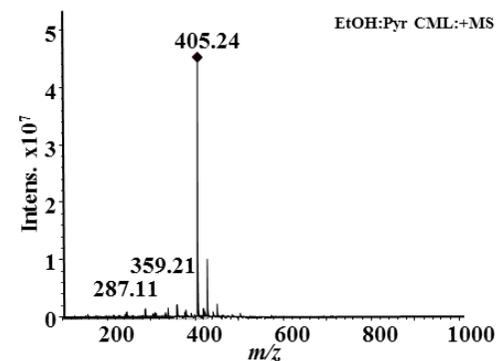
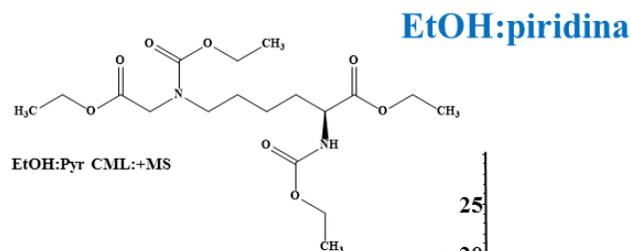
Las condiciones para MRM fueron seleccionadas cuidadosamente evaluando la mezcla de piridina con metanol o etanol para la derivatización. En cada caso, diferentes amplitudes de fragmentación y valores de cut off fueron valorados resultando cerca de dos veces más alta la intensidad del ion cuantificador de CML en presencia de etanol (405→359 *m/z*) que cuando se usa metanol (377→331 *m/z*), Figura 33, por lo cual se empleó etanol en el procedimiento de derivatización.

Fórmula química: $C_{16}H_{28}N_2O_8$
 Masa exacta: 376.1846
 $[M+H]^+$ 377.1918



Amplitud	Intensidad x 10 ⁶	
	Cuantificador m/z 331.20	Calificador m/z 317.19
1.0	7.19	2.42
0.8	8.22	20.02
0.7	8.77	28.28
0.6	9.01	24.45
0.5	9.12	25.13
0.4	6.91	20.26
Cut off		
100	8.55	2.48
150	8.02	2.35
200	9.74	2.16
250	11.44	1.4
300	10.11	1.12

Fórmula química: $C_{18}H_{32}N_2O_8$
 Masa exacta 404.2159
 $[M+H]^+$ 405.2231



Amplitud	Intensidad x 10 ⁷	
	Cuantificador m/z 359.21	Calificador m/z 331.23
1.0	1.69	0.45
0.8	1.73	0.42
0.6	1.8	0.44
0.4	1.96	0.45
0.3	0.3	0.11
Cut off		
100	1.93	0.47
110	1.85	0.51
150	2.04	0.33
200	2.50	0.21
250	2.30	0.12

Figura 33. Comparación de la derivatización de 1 mg/L de CML con etilcloroformato usando las mezclas metanol: piridina y etanol: piridina, ambas 4:1 v/v para MRM.

El tiempo de retención del derivado de CML era de 5.5 min, empleando las fases móviles formato de amonio 5 mM y metanol con un gradiente de 60% a 95% de MeOH en 12 min. Sin embargo, fenilalanina co-eluyó con el analito, suprimiendo la señal de CML, pues la concentración de fenilalanina está muy por encima que CML en muestras reales. Este efecto es debido a la supresión de ionización de CML en la fuente ESI, la interferencia por fenilalanina se presenta en la Figura 34a.

Para evitar la supresión de pico de CML, era necesario mejorar la separación de CML y fenilalanina, para lo cual se modificó el gradiente de elución empezando de un porcentaje menor de MeOH y se extendió el tiempo total de elución; de esta manera el gradiente con el que se analizaron todas las muestras fue de 40% a 80% de MeOH en 17 min. Con este programa se logró separar CML de fenilalanina y evitar así la supresión de pico. La señal de CML se incrementó aproximadamente 3 veces para la misma concentración, Figura 34b.

En la Figura 35, ya con el ajuste adecuado del gradiente de elución se muestran cromatogramas obtenidos en el modo MRM para la solución estándar y para el hidrolizado de una muestra de salmón, ambas con estándar interno.

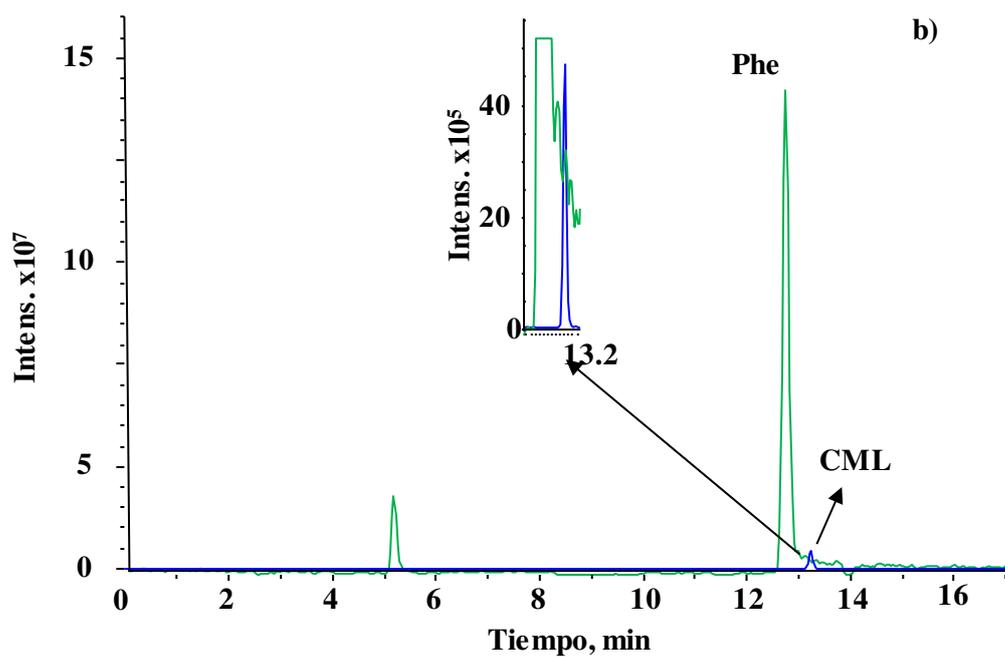
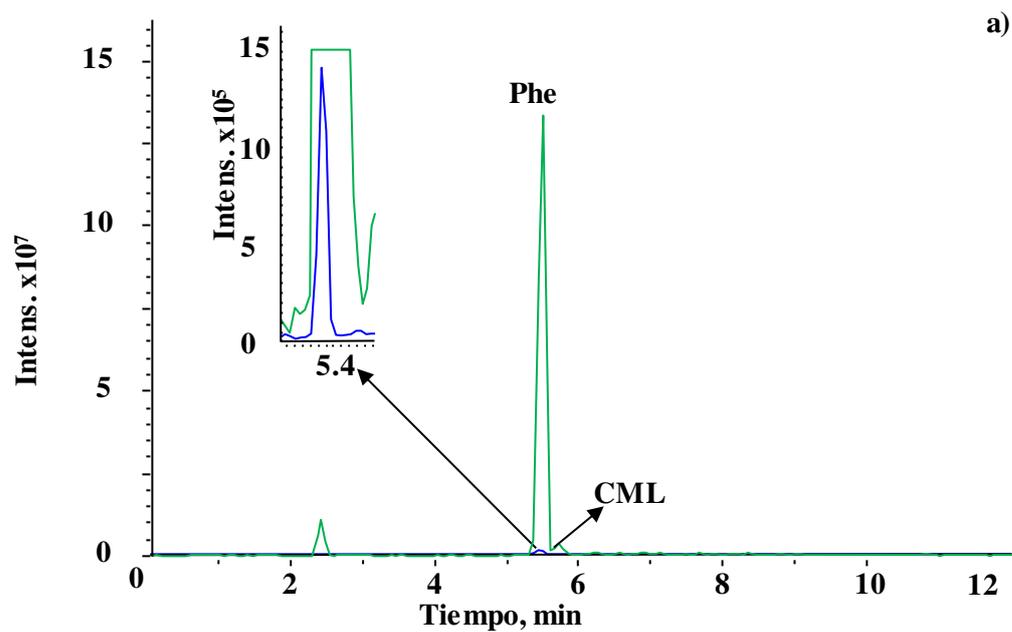


Figura 34. Cromatogramas en modo MRM que muestran la separación de (—) CML 250 $\mu\text{g/L}$ 405 \rightarrow 359 m/z de (—) fenilalanina, 266 \rightarrow 220 m/z ; cambiando el programa de elución. a) Gradiente de 60% a 95% de MeOH de 0 a 12 min. b) Programa de elución de 40% a 80% de MeOH de 0 a 17 min.

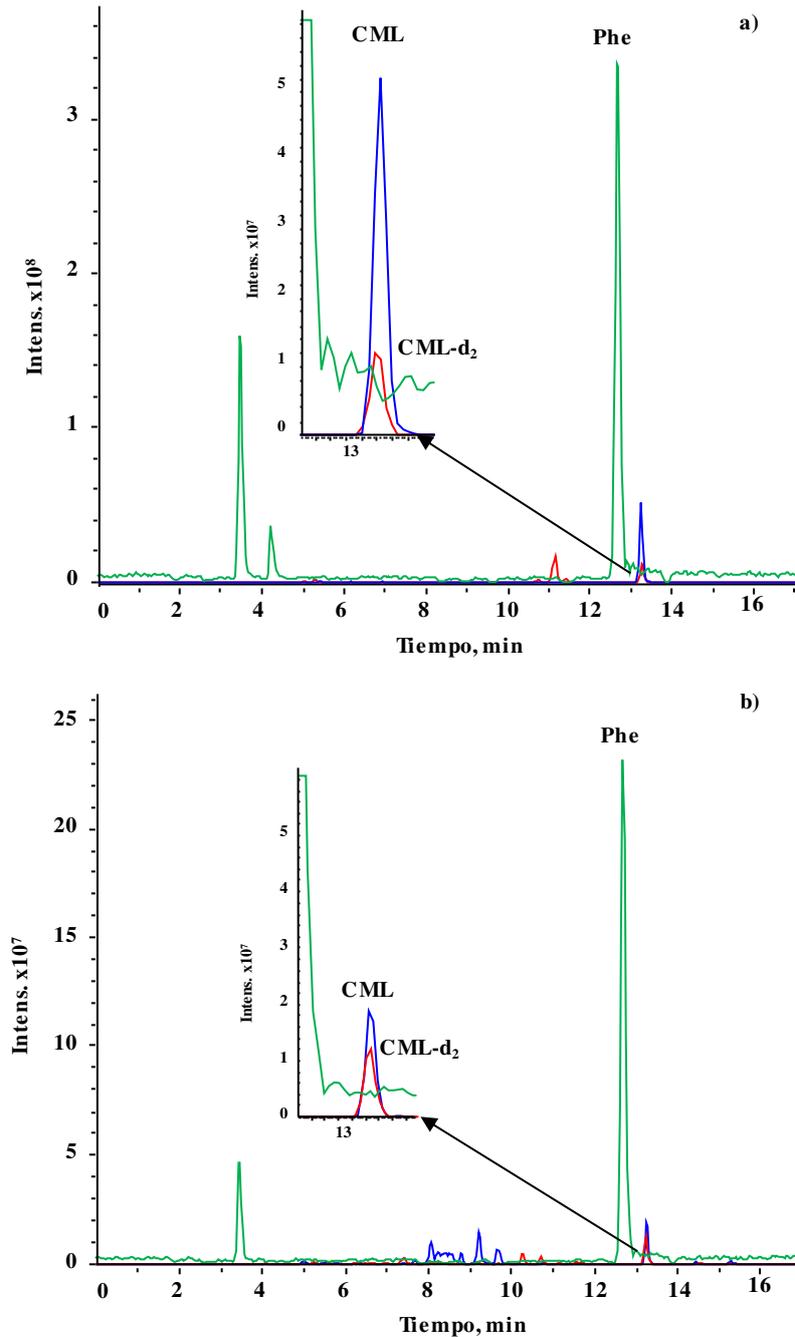


Figura 35. Cromatogramas obtenidos en modo MRM para: (—) fenilalanina, 266→220 m/z ; (—) CML, 405→359 m/z ; (—) CML-D₂, 407→361 m/z . a) Solución estándar con matriz igualada con muestras (CML 1000 $\mu\text{g/L}$, CML-D₂ 200 $\mu\text{g/L}$). b) Salmón cocinado en cacerola de vidrio.

Los tiempos de retención para los derivados de fenilalanina, CML y CML-D₂ fue de 12.69 ± 0.08 min, 13.24 ± 0.03 min y 13.22 ± 0.02 min, respectivamente, con una corrida cromatográfica total de 20 min, 17 min de separación y 3 min para el re-equilibrio de la columna.

Para evitar cualquier otra interferencia debido al exceso de aminoácidos presentes en la matriz respecto a CML, se decidió igualar la composición de las soluciones de calibración a la de las muestras de alimentos. Una alícuota de una mezcla de estándares de aminoácidos conteniendo alanina, glicina, arginina, fenilalanina, histidina, lisina, metionina, cisteína, ácido glutámico y tirosina, se adicionó a cada solución de calibración en una cantidad equivalente a cerca de 3 mg de proteínas digeridas presentes en la alícuota de muestra tomada para derivatizar, la composición de las soluciones de calibración se muestra en la Tabla 9.

La simulación de la matriz de muestra propuesta en este trabajo resultó adecuada como lo muestra la Figura 36; en la Fig. 38a se observan muy similares perfiles de elución en los cromatogramas TIC de mezcla de aminoácidos comparando con una muestra real.

En la Figura 36b se presentan los cromatogramas de la solución de calibración con la matriz igualada y para salmón cocinado en cacerola de vidrio, ambos obtenidos en modo MRM para CML, CML-D₂ y fenilalanina. Se puede notar claramente la separación de CML del principal interferente tanto en la solución de calibración como en las muestras reales.

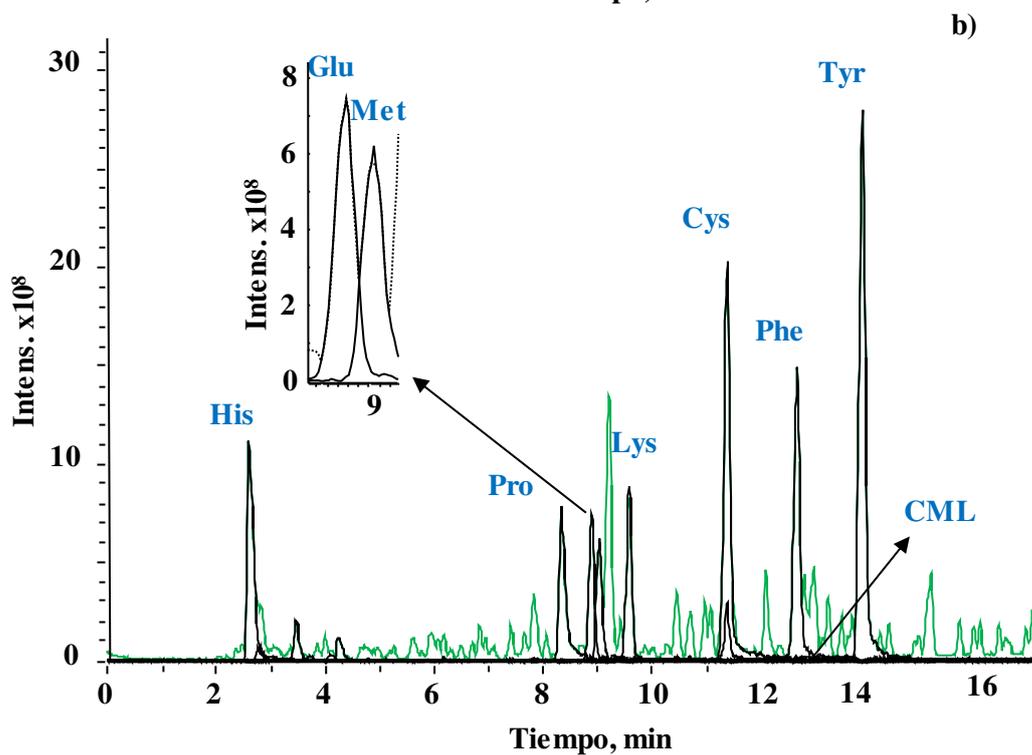
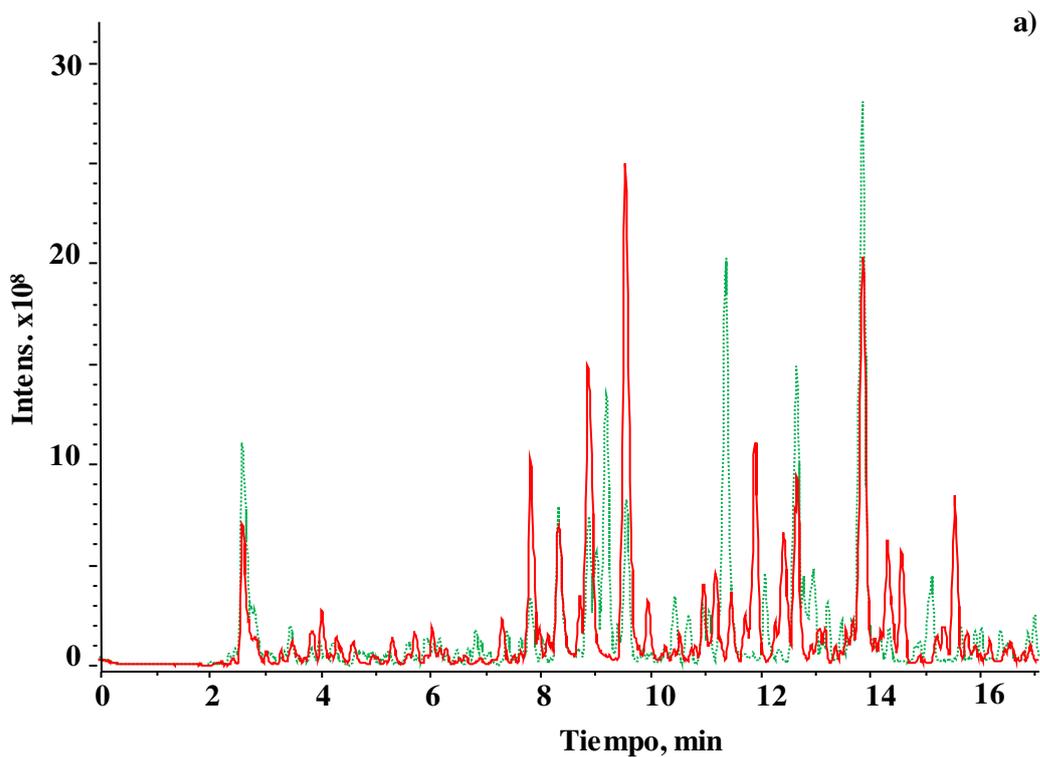


Figura 36. a) TIC obtenido de una muestra real, queso de cabra semi-curado (—) y para la mezcla de aminoácidos empleada en la calibración (---). b) TIC para la mezcla de aminoácidos empleado para igualar la matriz en la calibración (---) y EIC para los aminoácidos His 256 m/z , Pro 216 m/z , Glu 276 m/z , Met 250 m/z , Lys 319 m/z , Cys 294 m/z , Phe 266 m/z , CML 405 m/z , Tyr 354 m/z (—).

La curva calibración obtenida por el método de regresión lineal mostró una linealidad aceptable ($R^2 > 0.999$) con los límites de detección y cuantificación de $0.59 \mu\text{g/L}$ y $1.96 \mu\text{g/L}$ respectivamente, Figura 37; los límites de detección y cuantificación del método fueron: $23 \mu\text{g/kg}$ y $98 \mu\text{g/kg}$ tomando la masa liofilizada de alimento [220].

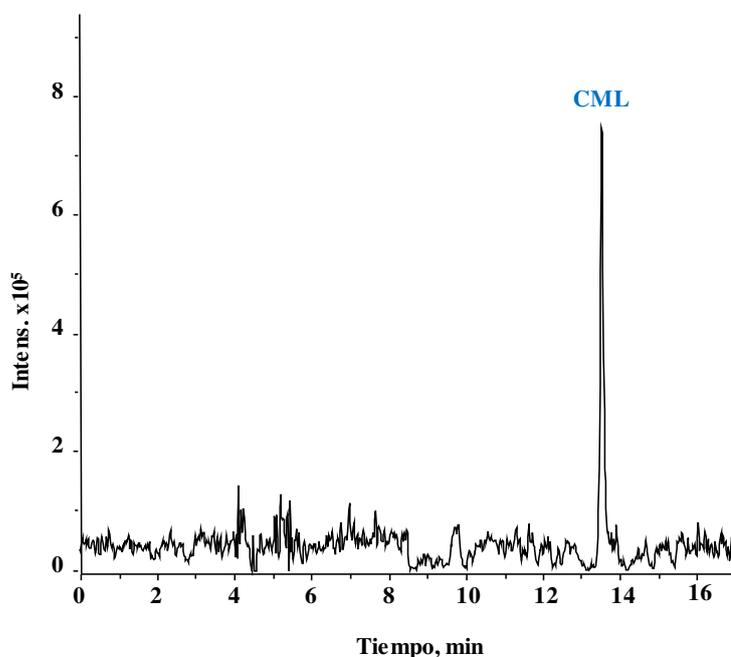


Figura 37. Cromatograma en modo MRM para el estándar de CML de $5 \mu\text{g/L}$ con una relación S/N de 25.5. Límites de detección $0.59 \mu\text{g/L}$ y límite de cuantificación $1.96 \mu\text{g/L}$.

Con el objetivo de evaluar la exactitud del procedimiento HPLC-ESI-ITMS/MS, se analizaron las muestras a las que se le adicionó el estándar de CML, evaluando su recuperación. La adición de estándar se realizó para tres muestras diferentes de alimentos liofilizados, agregando el CML antes de la hidrólisis ácida tal como se describe en la parte experimental.

A manera de ejemplo, en la Figura 38, se presentan los cromatogramas MRM obtenidos para dos puntos de la adición de estándar a salmón cocinado en cacerola de vidrio. En la Tabla 10 se resumen los resultados obtenidos para tres tipos de alimentos, reportando el porcentaje de recuperación del CML en cada uno de los casos. Los valores obtenidos fueron en el intervalo $86.0\% - 105\%$ lo cual es indicativo de una buena exactitud del procedimiento propuesto.

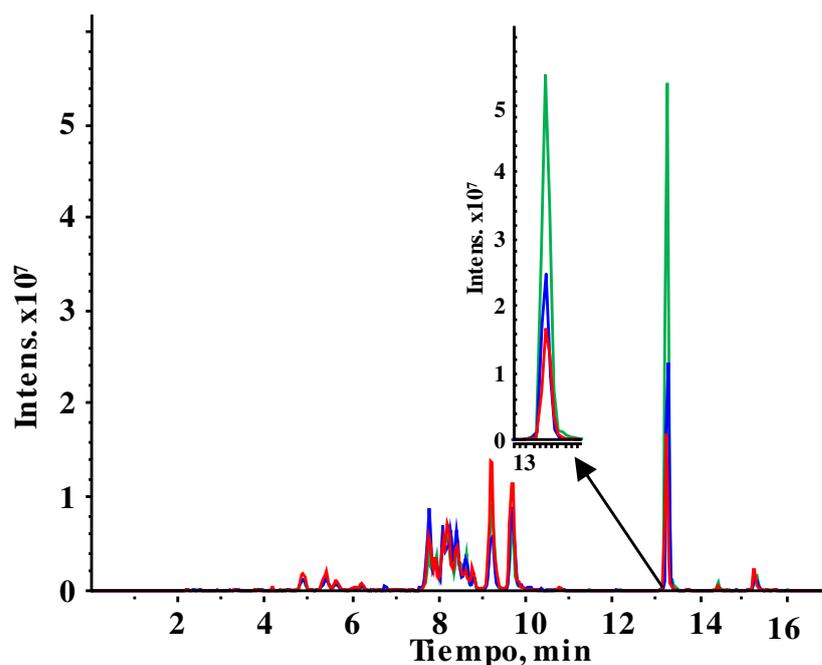


Figura 38. Cromatogramas en modo MRM obtenidos para CML ($405 \rightarrow 359$ m/z) analizando la muestra de salmón cocinado en cacerola de vidrio: (—) sin adición de estándar; (—) 100 ng CML adicionada antes de la hidrólisis ácida y (—) 300 ng CML adicionados.

Tabla 10. Resultados obtenidos en el método de adición de estándar realizado para queso de cabra fresco 1), salmón cocinado en cacerola de vidrio 2) y “carnitas” preparadas en cacerola de vidrio 3). El valor promedio con su respectiva desviación estándar se obtuvo basado en tres réplicas.

CML adicionada, ng	CML encontrada, promedio \pm SD (ng por 50 mg de muestra liofilizada)		
	1	2	3
0	210 \pm 12	406 \pm 15	725 \pm 10
100	296 \pm 19	499 \pm 18	827 \pm 13
<i>Recuperación, %</i>	<i>86.0</i>	<i>93.0</i>	<i>102</i>
300	509 \pm 31	674 \pm 20	1041 \pm 28
<i>Recuperación, %</i>	<i>99.7</i>	<i>89.3</i>	<i>105</i>

IV.4.5 Conclusiones

Se ha puesto a punto el procedimiento HPLC-ESI-ITMS/MS en modo MRM para determinar CML en los productos alimenticios, previa derivatización con etilcloroformato.

Con el objeto de evitar interferencias debido a la matriz química tan compleja de estos alimentos, en la primera etapa se propuso eliminar lípidos mediante extracción con un solvente orgánico.

Se utilizó etil cloroformato como reactivo derivatizante en el medio de etanol: piridina, seleccionando las condiciones de ionización, fragmentación y las condiciones MRM con base en los experimentos sistemáticos. Los compuestos derivatizados fueron extraídos a cloroformo ajustando el pH 9 de la muestra, lo que permitió eliminar potenciales interferentes presentes en forma de iones.

En la etapa de calibración, se simuló la composición química de las muestras, mediante adición de una mezcla de aminoácidos.

La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna de fase reversa con fases móviles compatibles con el sistema ESI-MS, el programa de gradiente empleado permitió la separación de CML de potenciales interferentes, como fenilalanina.

Se evaluaron los típicos parámetros analíticos y se demostró la exactitud del método mediante experimentos de recuperación.

IV.5 ESTUDIO DEL IMPACTO DE COBRE PRESENTE DURANTE ELABORACIÓN DE ALIMENTOS SOBRE EL CONTENIDO DE CML EN EL PRODUCTO FINAL

IV.5.1 Introducción

Se ha demostrado que una dieta restringida en AGEs permite reducir los niveles séricos de estos, así como los índices de grasa corporal [221]. En cuanto a la evaluación de la toxicidad de los AGEs exógenos y especialmente de CML, en un estudio reciente con ratones se estimó que la dosis letal media de CML era $DL_{50} > 5000$ mg/kg. En la exposición a este compuesto, se observaron alteraciones histopatológicas en pulmón, hígado, riñón y bazo. La toxicidad subaguda de la CML implicó estrés oxidativo causado por la reducción de la actividad de las enzimas antioxidantes; concluyeron que la administración repetida podría producir efectos deletéreos, especialmente induciendo daño hepático y renal a través del estrés oxidativo [222]. Es por ello que existe una necesidad de determinar AGEs en los alimentos y buscar estrategias de reducir su ingesta. En muchos trabajos publicados, se utiliza CML como un indicador de este grupo de compuestos [74,79,122,123,126,128,138,223].

Se sabe que la formación de los AGEs en alimentos depende de muchos factores, principalmente de la composición de la materia prima, temperatura y tiempo del tratamiento, pH, presencia de compuestos antioxidantes y antiglicantes, condiciones de almacenamiento, etc. En el caso de quesos, su elaboración incluye procesos de pasteurización o maduración en el que son mantenidos por largos periodos de tiempo a temperatura ambiente. Durante este tiempo, las reacciones de oxidación y glicación siguen teniendo lugar, lo cual resulta en la acumulación de AGEs a largo plazo [224]. Por ejemplo, el queso ricota es un queso italiano típico sin madurar, es obtenido a través del calentamiento inducido (85–90 °C) por la coagulación de proteínas de suero, después de la adición de agentes acidificantes como jugo de limón o vinagre.

Un factor de relevancia en la formación de los AGEs en comida que no ha sido estudiado aún, es la presencia de iones metálicos que pueden presentarse en los productos cocinados o pueden ser agregados, intencionalmente o no, durante el procesamiento. Tal como ya se ha discutido a lo largo del documento, los iones de metales de transición pueden activar la reacción de

Maillard acelerándola o inhibiéndola, dependiendo del tiempo de interacción, la naturaleza y concentración, particularmente la formación de la CML [225].

Muchas cocinas tradicionales utilizan utensilios de cobre porque este metal es un excelente conductor de calor así que los alimentos pueden cocinarse eventualmente sin quemar. Una de las especialidades gastronómicas mexicanas, consiste en carne de cerdo sazonada con sal y jugo de naranja cocinada en cazos de cobre con manteca también de cerdo aproximadamente por 3 horas. Por otro lado, se usan también grandes recipientes de cobre en la elaboración de quesos de tipo suizos, como el emmental, por ejemplo.

El cobre lixiviado de las paredes de los recipientes le confieren propiedades sensoriales mejoradas en su mayoría porque los iones cobre ayudan a regular las comunidades bacterianas durante la elaboración y maduración del queso [226,227]. En Finlandia y en USA, se usan contenedores de acero inoxidable en su elaboración, pero se adiciona sulfato de cobre directamente a la leche hasta una concentración de 15 mg/kg de cobre en el queso [227].

El objetivo de esta parte de trabajo ha sido examinar si el cobre desprendido de las paredes o añadido intencionalmente durante la preparación de alimentos puede tener un impacto en el contenido de CML en el producto final. Con este propósito, se llevó a cabo la determinación de Cu y CML en una serie de productos; estos fueron diferentes tipos de quesos, “carnitas” hechas en casa, en bistec y pescado; los tres últimos preparados en cacerolas de cobre y cacerolas de otros materiales.

En cuanto a los procedimientos analíticos, el cobre se determinó en alimentos digeridos por ICP-MS y para la determinación de CML se utilizó el procedimiento desarrollado en este trabajo, HPLC-ESI-ITMS/MS.

IV.5.2 Objetivo particular

Evaluar el efecto de cobre presente durante la elaboración o almacenamiento de alimentos sobre el contenido de CML en el producto final, mediante el análisis de Cu y CML en una serie de productos alimenticios comerciales y cocinados en cacerolas de cobre, vidrio y Teflón®.

IV.5.3 Condiciones experimentales

Todos los productos alimenticios se compraron de supermercados regionales en la ciudad de Guanajuato; estos incluyen once tipos de queso (1- edam, 2- gruyere, 3- grana padano, 4- emmental (suizo), 5- emmental (USA), 6- “asadero”, 7- ricota, 8- mascarpone, 9- queso de cabra fresco, 10- queso de cabra semi-curado; 11- queso de cabra curado), salmón fresco, bistec de res de carne magra, lomo de cerdo y pechuga de pollo.

Las muestras de queso congeladas fueron rayadas con un rayador de plástico fino y se liofilizaron. Tres porciones, aproximadamente de 100 g cada una, de carne cruda o salmón se cocinaron en paralelo en tres diferentes cacerolas hechas de cobre, Teflón® y vidrio Pyrex®. Se cortaron rebanadas de bistec, salmón y pechuga de pollo, aproximadamente 1.5 cm de grosor, las cacerolas se precalentaron con 30 mL de aceite de canola por 5 min a 150 °C y las piezas se frieron por 8 min, 4 min de cada lado. La temperatura interna medida inmediatamente después de cocinar estaba en el rango 59-62 °C para el vidrio Pyrex®, 67-71 °C para Teflón® y 69-73 °C para la cazuela de cobre.

El lomo de cerdo se cortó en cubos de 4 cm, se roció con jugo de naranja, 5 mL en cada cacerola, y se mantuvo en el horno a 170 °C durante 60 min. La temperatura interna de las "carnitas" preparadas fue de 82-87 °C en cada cacerola; sin embargo, el pardeamiento de la carne se observó solamente en recipientes de cobre y Teflón®. No se adicionó sal o condimentos en ninguno de los tratamientos anteriores. Después de cocinar, cada uno de los productos fue homogenizado en una licuadora con la adición de agua desionizada. Las mezclas obtenidas se liofilizaron.

Con el objetivo de eliminar la grasa de los alimentos, a una alícuota de 50 mg del alimento liofilizado se agregaron 2 mL de metanol: cloroformo (1:2 v/v), se agitaron en vórtex, se centrifugaron a 13,000 g por 10 min, y se recuperaron las pastillas. La etapa de reducción se llevó a cabo de la siguiente manera: se le adicionó a cada pastilla 0.5 mL de NaBH₄ 2 M (en NaOH 0.1 M) y 2 mL de tampón de boratos 0.2 M, pH 9.2, y se dejó toda la noche reposar a 4 °C. La hidrólisis ácida se realizó agregando a cada una de las muestras 2.5 mL de ácido clorhídrico 12 N, obteniendo así una concentración 6 N de HCl. Los viales fueron purgados con nitrógeno, sellados y calentados a 110 °C por 24 h. Los hidrolizados fueron llevados a 5 mL;

se tomó 1 mL de las alícuotas y se evaporó en una placa de calentamiento a 60 °C. El residuo se reconstituyó en agua desionizada con la adición del estándar interno, 50 µL CML-D₂ 800 µg/L, e hidróxido de sodio 1 M para obtener un volumen final de 400 µL y pH 10.

La determinación de CML se llevó a cabo con el procedimiento descrito en la sección IV.4.

La determinación de cobre en los alimentos seleccionados se hizo por ICP-MS; la digestión ácida se realizó usando de 50 mg del material liofilizado al que se añadieron 250 µL de la solución de estándar interno (2 mg/L de In, Y, Bi, Rh, 5 mg/L de Sc y 10 mg/L de Li) y 500 µL de ácido nítrico concentrado. Las muestras se dejaron durante una noche, y luego se calentaron a 120 °C en un bloque de calentamiento durante 3 h, se mezclaron con 500 µL de peróxido de hidrógeno y se calentaron de nuevo a 120 °C por 30 min. La adición de peróxido de hidrógeno se repitió, y el volumen final se llevó a 2 mL con agua desionizada.

Las muestras se centrifugaron a 13,000 g por 10 min, porciones de 200 µL se diluyeron 25 veces con agua desionizada y se introdujeron en el sistema ICP-MS. Se utilizó un espectrómetro de masas de plasma acoplado inductivamente (Modelo 7500ce, Agilent Technologies) con un nebulizador Meinhard y una cámara de niebla refrigerada Peltier a 2 °C, con las condiciones de funcionamiento instrumental previamente descritas [228]. Los isótopos ⁶⁵Cu, ⁶³Cu fueron monitoreados y normalizados a las señales ⁸⁹Y y ¹¹⁵In. La calibración se realizó con el estándar comercial de Agilent Technologies a concentraciones de cobre de 0, 0,5, 1,0, 2,0, 5,0, 10, 25 y 50 µg/L, y con los estándares internos, Y e In 10 µg/L cada uno.

El límite de detección instrumental de cobre fue 51 ng/L; el límite de detección del método fue de 57 µg/kg, se evaluó utilizando cuatro veces la muestra diluida del queso mascarpone digerido [220]. Para verificar la exactitud, se utilizaron dos materiales de referencia certificados; National Institute of Standards and Technology (NIST) 1643d Trace Elements in Water and NIST 1572 Citrus Leaves. Las concentraciones de cobre encontradas en el análisis triplicado de estos dos materiales de referencia fueron 19.7 ± 0.8 µg/L y 16.3 ± 0.5 µg/g, respectivamente, valores certificados: 20.5 ± 3.8 µg/L y 16.5 ± 1.0 µg/g.

IV.5.4 Resultados y discusión

En la aplicación del procedimiento HPLC-ESI-ITMS/MS al análisis de once muestras de quesos comerciales, se encontraron concentraciones de CML en el intervalo desde 3.70 ± 0.03 $\mu\text{g/g}$ para queso de cabra curado hasta $8.58 \mu\text{g g}^{-1}$ para queso ricota, el valor promedio para todas las muestras fue de $4.75 \pm 1.26 \mu\text{g/g}$.

Cabe resaltar que concentraciones similares, $0.1 - 5.8 \mu\text{g/g}$, han sido reportadas previamente en diferentes tipos de queso [79,122] y esta congruencia confirma adicionalmente la confiabilidad analítica de nuestros datos. Los resultados obtenidos para CML en todas las muestras se presenta en la Tabla 11 junto con las concentraciones de cobre determinadas en estas mismas muestras por ICP-MS.

Tabla 11. Resultados de la determinación de CML y Cu en muestras de queso.

Muestra	Queso	CML, promedio \pm SD ($\mu\text{g/g}$)	Cobre, promedio \pm SD ($\mu\text{g/g}$)
1	Edam	4.84 ± 0.24	0.28 ± 0.02
2	Gruyere	4.24 ± 0.03	15.5 ± 0.6
3	Grana padana	4.14 ± 0.04	7.20 ± 0.57
4	Emmental (Suiza)	$4.03 \pm 0,04$	10.4 ± 0.6
5	Emmental (USA)	4.37 ± 0.09	0.41 ± 0.04
6	Asadero	4.91 ± 0.29	0.62 ± 0.04
7	Ricota	8.58 ± 0.61	0.42 ± 0.03
8	Mascarpone	4.79 ± 0.11	0.08 ± 0.01
9	Cabra fresco	4.19 ± 0.01	1.01 ± 0.01
10	Cabra semi-curado	4.45 ± 0.11	1.60 ± 0.09
11	Cabra curado	3.70 ± 0.03	1.25 ± 0.05

Las concentraciones de cobre determinadas en las muestras de quesos van desde 0.08 ± 0.01 $\mu\text{g/g}$ para queso mascarpone a $15.53 \pm 0.61 \mu\text{g/g}$ para el queso gruyere, con un promedio para todas las muestras $3.53 \pm 4.96 \mu\text{g/g}$. Este rango relativamente amplio parece confirmar que el cobre se lixivió de las paredes de los recipientes en los que se procesaron algunos de los quesos, o pudo haber sido adicionado intencionalmente para mejorar propiedades organolépticas [227].

En la Figura 39, se observan los valores de CML encontrados en 9 muestras de queso, el queso ricota y el queso de cabra curado se excluyeron, graficados contra las concentraciones de cobre. El gráfico sugiere una relación inversa entre estos dos parámetros. Como se indica en la misma figura, la relación observada puede ser descrita por una función logarítmica con $R^2 = 0.5965$. Aunque lejos de establecer una relación cuantitativa entre Cu y CML, estos resultados preliminares, sugieren un efecto inhibitorio por parte de cobre sobre la reacción de formación de CML en alimentos.

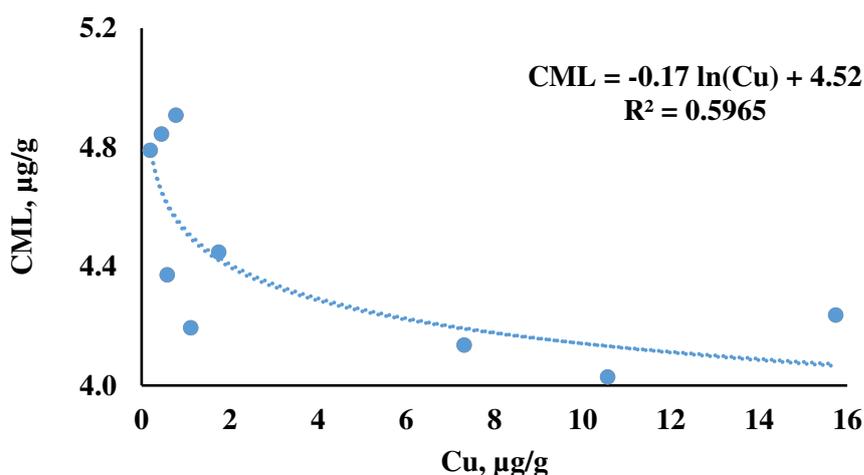


Figura 39. Relación de la concentración de cobre y CML encontradas en muestras de queso.

Para obtener evidencia adicional del efecto que ejerce cobre sobre la formación de CML en alimentos, se diseñó un experimento en el que se cocinaron en paralelo cuatro tipos de carne: pollo, cerdo, res y pescado; en tres tipos de recipientes: cacerolas de vidrio, Teflón® y cobre; posteriormente se determinaron las concentraciones de CML y de cobre en cada muestra. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 12. En primer lugar, se observa que para los productos preparados en cacerolas sin cobre, la concentración de cobre disminuyó en el siguiente orden: res > cerdo > pollo > pescado, de acuerdo con los datos existentes acerca del contenido de metales esenciales en este tipo de productos [229,230]. En salmón se encontraron concentraciones relativamente más bajas, lo cual nos sugiere que el pescado analizado provenía de un ambiente no contaminado [231]. Cuando la carne o el pescado fueron cocinados en cacerola de cobre, las concentraciones de este elemento se incrementaron, intervalo de $7.66 \pm 0.03 \mu\text{g/g}$ para salmón a $139.3 \pm 0.5 \mu\text{g/g}$ para “carnitas”, comparando con los productos cocinados en vidrio, de $1.01 \pm 0.03 \mu\text{g/g}$ para salmón a $14.50 \pm 0.18 \mu\text{g/g}$ para “carnitas” y en

cacerola de Teflón® de $7.66 \pm 0.03 \mu\text{g/g}$ para salmón a $139.3 \pm 0.5 \mu\text{g/g}$ para “carnitas”. Las concentraciones relativamente altas de CML en “carnitas” se deben al largo tiempo de cocción, 1 h, respecto a otros tipos de platillos para los que el pescado, res y pollo fueron cocinados sólo 8 min; además la carne de puerco fue sazonada con jugo de naranja favoreciendo la lixiviación de cobre de la cacerola. Por lo tanto, no es sorprendente que la carne de cerdo cocinada bajo la receta estilo mexicano, contenía la concentración más alta de cobre de todas las muestras, $139.3 \pm 0.5 \mu\text{g/g}$. Los resultados detallados que muestran los niveles encontrados de Cu y CML en los productos cárnicos se presenta en la Tabla 12. En la Figura 40 se presentan estos resultados en forma de histogramas. Se presentan las concentraciones de CML contenidas en cada uno de los cuatro productos, cada uno de ellos preparado en cacerolas de diferente tipo.

Tabla 12. Resultados de la determinación de CML y Cu en salmón, pollo, bistec y "carnitas" preparados en cacerolas de diferente material.

Producto alimenticio	CML, promedio \pmSD ($\mu\text{g/g}$)	Cobre, promedio \pmSD ($\mu\text{g/g}$)
Salmón vidrio	8.11 ± 0.21	1.01 ± 0.03
Salmón Teflón®	9.56 ± 0.32	0.92 ± 0.01
Salmón cobre	9.32 ± 0.04	7.66 ± 0.03
Pollo vidrio	11.66 ± 0.24	1.67 ± 0.03
Pollo Teflón®	12.39 ± 0.04	1.86 ± 0.07
Pollo cobre	10.42 ± 0.21	65.6 ± 0.1
Bistec vidrio	13.03 ± 0.11	2.98 ± 0.06
Bistec Teflón®	14.20 ± 0.14	2.09 ± 0.08
Bistec cobre	13.61 ± 0.11	55.9 ± 0.8
"Carnitas" vidrio	14.50 ± 0.18	2.17 ± 0.05
"Carnitas" Teflón®	15.20 ± 0.18	2.46 ± 0.06
"Carnitas" cobre	15.60 ± 0.05	139.3 ± 0.5

A primera vista, se puede observar que el contenido más alto de CML corresponde a “carnitas”, seguido de res, pollo y salmón, esta tendencia está de acuerdo con dos bases de datos reportadas

recientemente [112,122]. Nótese que salmón, pollo y res preparados en cacerola de cobre contienen una concentración más baja de CML con respecto a estos mismos alimentos preparados en recipientes de Teflón® o de vidrio, tal como revela la prueba *t* desapareada, $p < 0.05$, excepto para “carnitas” Figura 40.

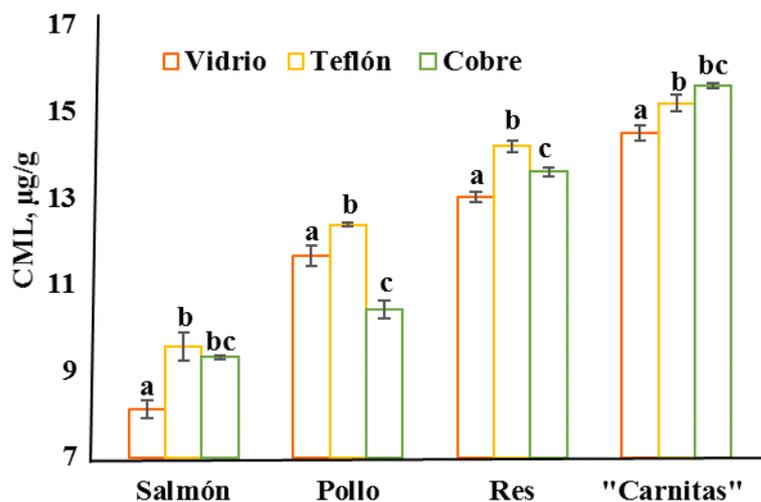


Figura 40. Concentraciones de CML encontradas en cuatro productos alimenticios cocinados en cacerolas de vidrio, Teflón® y cobre. Diferentes letras indican diferencias significativas estadísticamente encontradas a $p < 0.05$.

Como resultado de mayor relevancia, el salmón, pollo y carne de res preparadas en recipiente de cobre contenían más bajas concentraciones de CML respecto a los mismos productos cocinados en Teflón® o vidrio, como lo demostró prueba estadística *t*, $p < 0.05$, excepto bistec cocinado en cobre versus bistec en Teflón®. Este resultado está soportando nuestra inicial observación hecha en base al análisis de quesos, confirmando la hipótesis del efecto inhibitorio de Cu en la formación de CML durante elaboración y almacenamiento de alimentos.

Por otro lado, el contenido de CML en productos cocinados en vidrio fue estadísticamente más bajos respecto a los preparados en Teflón® o en cobre, excepto pollo, lo que debe explicarse con base en una menor conductividad térmica de vidrio en comparación con otros dos materiales. A pesar que los alimentos fueron cocinados en la misma estufa, empleando el mismo tiempo y los mismos ajustes de temperatura, la temperatura de la carne registrada inmediatamente después de retirar del fuego era: 59-62 °C para cacerola de vidrio, 67-71 °C para Teflón® y 69-73 °C para cobre, lo que confirma que las condiciones de cocción afectan de manera importante la formación de CML [232]. Debido a que Teflón® y cobre ofrecen la

capacidad de calentamiento muy similar, más bajas concentraciones de CML encontradas en cacerola de cobre demuestra el efecto inhibitorio directo de este metal.

El impacto de cobre sobre la formación de CML parece ser dependiente de la concentración de este metal, pero se tienen que considerar también otros factores que afectan los procesos de glicación. El carácter multifactorial de las reacciones de glicación se observa claramente en “carnitas” preparadas en cacerola de cobre; este producto contenía más altos niveles de CML en comparación con este mismo platillo preparado en recipientes de otros materiales, indicando que largo tiempo de cocción tenía un impacto prevalente respecto a cobre.

Es necesario resaltar que, en nuestro estudio, se evalúa el efecto de cobre sobre la formación de CML en alimentos por primera vez, pero existen reportes previos sobre el impacto de este elemento en la formación de los AGEs en otros sistemas experimentales [199,205,206,233–237]. En particular, se ha demostrado la influencia de Cu(II), dependiente de su concentración, en un estudio proteómico de glicación de albumina de suero humano *in vitro*; mientras que las concentraciones sub-fisiológicas y fisiológicas inhibieron procesos de glicación, el exceso de cobre claramente favoreció dichos procesos [206]. Finalmente, la hipótesis sobre el efecto inhibitorio de Cu está de acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo y presentados en la sección IV.3.

IV.5.4.1 Posible mecanismo del efecto inhibitorio de Cu en la formación de CML en alimentos

El impacto de Cu durante la reacción de Maillard es el resultado de un compromiso entre la acción pro-oxidante de su forma libre y el efecto protector que ejerce el cobre debido a la inactivación de especies participantes en la glicación mediante su complejación [238–240]. En particular, se ha demostrado la formación de complejos de Cu(II) con aminoácidos tales como alanina, glicina o lisina [210,238,241]. Se ha demostrado también de Cu causa incremento de la producción de aldehídos tipo Strecker, que se forman mediante descaboxilación oxidativa de sus complejos con cobre a temperatura elevada; para aminoácidos libres, esta reacción favorece la formación de compuestos volátiles que son responsables del aroma [239,242] mientras que para aminoácidos incorporados en la estructura de proteínas, la interacción con Cu(II) puede evitar la formación de AGEs [243]. Efectivamente, se ha reportado la disminución de AGEs en presencia de Cu [205,206] y de otros iones de metales de transición [236,244].

En este trabajo, se confirmó la interacción de Cu(II) con ZLys mediante espectrofotometría UV-Vis. En una serie de las mezclas que se prepararon para cubrir el intervalo de relaciones molares Cu:ZLys desde 1:0.8 hasta 1:20, Tabla 13.

Se observó una disminución gradual de la longitud de onda correspondiente al máximo de absorción de la solución de sulfato de cobre, a la que se adicionaban concentraciones crecientes de ZLys, en concordancia con reportes anteriores sobre la formación de complejo Cu(II)-Lys, Figura 41 [241,245].

Debido a que ZLys contiene un sustituyente unido al grupo alfa-amino mediante un enlace que simula el enlace peptídico, los resultados obtenidos sugieren reactividad de aquellas lisinas de la cadena peptídica de proteínas que son accesibles para Cu(II) en la estructura terciaria.

Tabla 13. Composición de las muestras analizadas por espectroscopía UV/Vis, soluciones de Cu²⁺ y Zlys 100 mM, en una relación molar Cu:ZLys 1:0.8 hasta 1:20 y λ_{\max} obtenida para cada una de las mezclas.

Muestra	Cu ²⁺ , μL	ZLys, μL	H ₂ O, μL	Cu ²⁺ /ZLys	λ_{\max} , nm
—	200	—	1800	—	809.0
—	200	10	1790	20	809.0
—	200	25	1775	8.0	808.5
—	200	50	1750	4.0	808.0
—	200	100	1700	2.0	806.5
—	200	200	1600	1.0	804.0
—	200	250	1550	0.80	802.0

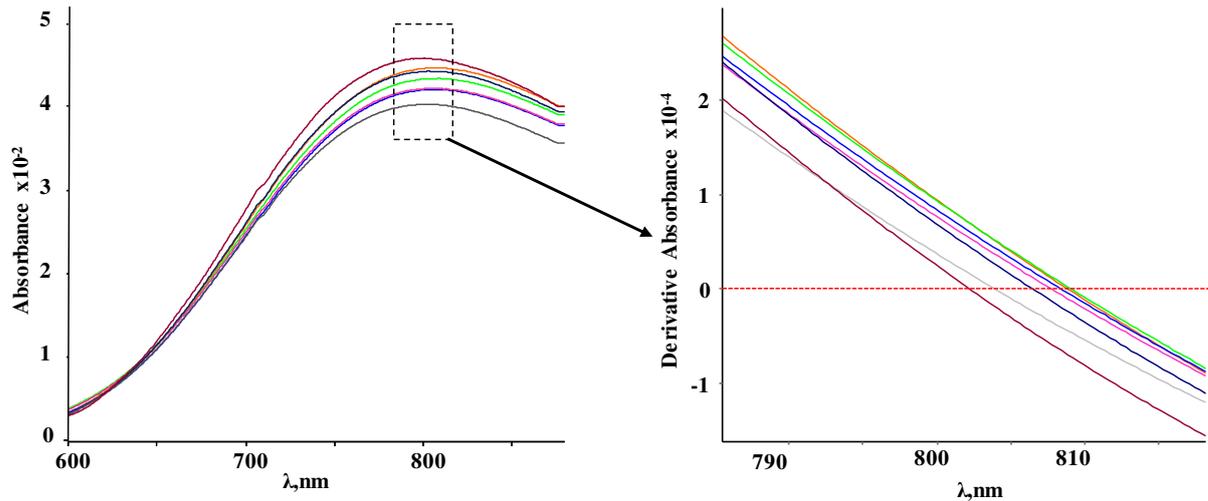


Figura 41. Segunda derivada del espectro UV-Vis de las mezclas Cu:ZLys en una relación molar Cu:ZLys 1:0.8 a 1:20, Tabla 13.

Tal como ya se ha mencionado, la formación de los AGEs en comida ocurre en una serie de procesos complejos que son modulados principalmente por la composición de los productos cocinados y las condiciones de elaboración y almacén de alimentos [24,232]. En este sentido, el contenido de CML encontrado en varios productos en este trabajo, ha sido afectado no solamente por la presencia de cobre, sino también por otros factores. De esta manera, la temperatura de cocción inferior en cacerola de vidrio respecto a Teflón® o cobre, fue el factor decisivo de que la concentración de CML fuera la más baja en cacerola de vidrio. En el caso de “carnitas”, el factor prevalente fue el tiempo de cocción que sobrepasaba los tiempos empleados para otros platillos.

Los resultados obtenidos ponen claramente de manifiesto que, para estudiar el efecto específico de Cu u otros metales, en los procesos de glicación en alimentos, es necesario controlar estrictamente todos otros factores que influyen en la reacción de Maillard y pueden solaparse con efectos de cobre.

IV.5.5 Conclusiones

Muchos alimentos contienen cobre como un componente natural de las materias primas y adicionalmente, el cobre puede liberarse del recipiente en el que se preparó el alimento o puede añadirse a propósito para mejorar las propiedades sensoriales.

El papel del cobre y otros iones metálicos redox durante la reacción de Maillard ha sido discutido en la literatura, mientras que en este trabajo se ha estudiado la relación entre las concentraciones de cobre y *N*^ε-carboximetil-lisina en diferentes alimentos ha sido estudiado por primera vez.

Entre los múltiples factores que contribuyen a la formación de CML en los alimentos, los resultados obtenidos señalaron consistentemente el efecto inhibitorio, dependiente de la concentración del cobre. De acuerdo con algunos estudios anteriores, el papel protector del cobre se atribuyó a la formación de complejos con lisina u otras especies químicas que participan en la glicación.

El proporcionar una cuantificación confiable de CML por HPLC-ESI-ITMS/MS fue un aspecto importante de este estudio.

El procedimiento se puso a punto estableciendo las condiciones experimentales de derivatización previa a la columna con etilcloroformato; para evitar interferencias potenciales causadas por la matriz química compleja de alimentos y el exceso de aminoácidos presentes después de la hidrólisis ácida, se llevó a cabo la eliminación de lípidos, se extrajeron los compuestos derivatizados de la solución alcalina, pH 9, a cloroformo y se usaron soluciones estándar ajustadas a la matriz para la calibración.

La exactitud de la determinación de CML se demostró mediante recuperaciones porcentuales satisfactorias (86.0%-105%) obtenidas en un experimento de adición estándar de dos puntos realizado en tres alimentos diferentes.

Se requieren más estudios para comprender mejor el efecto del Cu sobre la formación de AGEs en los alimentos a nivel molecular; sin embargo, el uso tradicional de las cacerolas de cobre parece tener un efecto benéfico adicional en términos de disminución de la glicación de las proteínas.

IV.6 DETERMINACIÓN DE N^ε-CARBOXIMETIL LISINA POR HPLC-ESI-ITMS/MS EN ALIMENTOS Y EVALUACIÓN COMPARATIVA DE ESTE MÉTODO CON ENSAYOS ELISA

IV.6.1 Introducción

En este documento se hace énfasis en la determinación de los AGEs y específicamente, CML como marcador de los AGEs, en matrices complejas químicamente. Se decidió analizar alimentos ya que existe necesidad de conocer y reducir el consumo de los AGEs exógenos [211]. Actualmente la mayoría de los análisis en los que se determina CML en muestras biológicas, se realizan mediante inmunoensayos ELISA, pues este es un método rápido y simple con el que se pueden procesar varias muestras a la vez y no se necesita instrumentación analítica costosa.

El punto débil de ELISA es que se usan diferentes anticuerpos y calibrantes y que se presentan interferencias de matriz; de hecho, la gran mayoría de los kits comerciales han sido desarrollados para el análisis de fluidos biológicos y no para el análisis de alimentos. Por otro lado, existen varios procedimientos analíticos para la determinación de CML, mayoría de ellos basados en el uso de cromatografía de líquidos con detección por espectrometría de masas [122,152–156,211,246–248], incluyendo el desarrollado en el presente trabajo.

Los métodos cromatográficos tienen algunas ventajas sobre los métodos inmunoquímicos, pues presentan una alta selectividad, alto poder de detección y son robustos en el sentido de que las condiciones de separación y detección se pueden adecuar a los compuestos y matrices de interés. Además, una diferencia importante entre métodos ELISA y los de química analítica son las unidades en las que se reporta la concentración del CML y de otros AGEs. En el caso de métodos inmunoquímicos, la concentración de CML es expresada en unidades, U CML/kg alimento o U CML/kg de proteína, que se definen dependiendo del tipo de anticuerpo y del calibrante utilizados en el ensayo. En los métodos de química analítica la concentración de CML se expresa en mg/kg proteína, mg/kg muestra, o como concentración molar. Esta falta de uniformidad entre unidades de concentración hace difícil la comparación de los resultados obtenidos por diferentes métodos en los mismos productos y además es una limitación a la hora de establecer y utilizar bases de datos con niveles de referencia para diferentes alimentos. En

este sentido, el uso de los procedimientos analíticos y estándares auténticos de compuestos de interés es una ventaja muy importante ya que los resultados pueden ser fácilmente comparados contra diferentes tipos de alimentos, alimentos procesados, experimentos o análisis en diferentes laboratorios.

Para la cuantificación de CML en muestras de alimentos en este trabajo, se utilizó el procedimiento desarrollado en la sección IV.4 por HPLC-ESI-ITMS/MS en modo MRM previa derivatización pre-columna de CML con etilcloroformato, empleando en este caso metanol: piridina como medio de reacción.

Los alimentos seleccionados para ser analizados cubren el rango de los que son consumidos típicamente en México. Así se escogieron alimentos provenientes de granos, carne, derivados lácteos y frutas y vegetales. A algunos de los alimentos se les dio diferente tratamiento culinario. Como un punto adicional, se llevó a cabo la comparación del desempeño analítico del procedimiento cromatográfico con tres ensayos ELISA.

IV.6.2 Objetivo Particular

Aplicar el procedimiento HPLC-ESI-ITMS/MS desarrollado para la determinación de CML en variedad de alimentos y evaluar comparativamente el desempeño de este método respecto a inmunoensayos ELISA.

IV.6.3 Condiciones experimentales

Entre los productos alimenticios que se seleccionaron para analizar el contenido de CML, se incluyó a la tortilla de maíz y de harina que es un alimento de consumo básico en la alimentación de la población mexicana; además carne de res, pollo, tocino y "chicharrón" como productos cárnicos; se analizaron dos tipos de pescado, atún y salmón; manzana, chile serrano y papas como frutas y vegetales. Todos los productos se compraron de supermercados regionales en la ciudad de Guanajuato.

Las papas, la carne de res, pollo y pescado se sometieron a diferentes tratamientos culinarios. Se analizaron solamente productos frescos, evitando aquellos congelados, secados o enlatados. Los procedimientos de cocción fueron: hervir en agua, escalfar, freír y asar. No se agregaba sal ni condimentos, excepto salsa de soya para asar el atún. Las papas fueron hervidas por 20 min.

La pechuga de pollo y salmón fueron escalfados poniendo la rebanada en 500 mL de agua a 90 °C por 10 minutos. Para freír la pechuga de pollo y bistec de res, se calentó el sartén con 30 mL de aceite a 170 °C y las piezas colocaron por 10 minutos, cambiando de lado cada 2 min. El bistec fue asado en la parrilla a 150 °C por 4 minutos y por 8 min (cambiando de lado cada 2 min). El salmón y el atún fueron asados en la parrilla, en las mismas condiciones, por 8 min; el atún también fue asado con 15 mL de salsa de soya. El tocino ahumado se frió a 170 °C con 5 mL de aceite por 4 min. Las papas fritas y los nuggets de pollo fueron adquiridos en un puesto local de comida rápida.

Cada procedimiento se realizó por duplicado y las dos porciones fueron homogenizadas juntas. La homogenización se llevó a cabo en una licuadora con la adición de agua desionizada. Las mezclas obtenidas se liofilizaron.

En un tubo Eppendorf se pesaron 20 mg de cada alimento liofilizado y se sometió a reducción toda la noche a 4 °C con una mezcla de 400 µL de borohidruro de sodio 2 M (en NaOH 0.1 M) y 1 mL de tampón de boratos 0.2 M pH 9.2. Las proteínas se precipitaron con 200 µL de ácido perclórico 2 M por 10 min a -20 °C y los lípidos fueron extraídos usando 1 mL de metanol: cloroformo 1:2 (v/v). La hidrólisis ácida se llevó a cabo con la adición a la pastilla de 1 mL de ácido clorhídrico 6 N, enseguida el vial fue lavado con nitrógeno, sellado y calentado a 110 °C por 20 horas. El hidrolizado se evaporó en una placa de calentamiento a 60 °C, el residuo obtenido se reconstituyó en agua desionizada con adición de NaOH 1 M obteniendo el volumen final de 1 mL y pH 9. Se tomaron 200 µL para derivatizar. La calibración se realizó usando alícuotas de 200 µL de soluciones estándar de 5.0, 10, 50, 100, 250 y 500 µg/L de CML. A las muestras de alimentos y curva de calibración se adicionaron 50 µL de estándar interno CML-D₂ de 600 µg/L.

Para la derivatización de CML y del estándar interno, se añadieron 500 µL de metanol: piridina (4:1, v/v) y 50 µL de etilcloroformato adicionado en dos porciones iguales agitando con vórtex

entre cada una de ellas. Finalmente, se agregó bicarbonato de sodio 50 mM para ajustar pH 9 y los compuestos derivatizados fueron extraídos a la fase orgánica con 500 μ L de cloroformo [181]. La fase orgánica se evaporó en una placa de calentamiento a 60 °C y se reconstituyó en 200 μ L de metanol: formato de amonio 5 mM (55:45 v/v).

Enseguida, las muestras fueron filtradas (filtros Whatman 0.22- μ m) y analizadas usando un cromatógrafo de líquidos UltiMate 3000 (Dionex, Thermo Scientific) con ionización por electro nebulización acoplado a un espectrómetro de masas con trampa iónica AmaZon SL (Bruker Daltonics). Se empleó una columna cromatográfica Kinetex C18 (150 x 3 mm, 2.6 μ m) con pre-columna (4 x 2 mm). Se inyectaron 10 μ L de volumen de muestra, la columna se mantuvo a una temperatura de 30 °C, y el gradiente de elución con la fase A formato de amonio 5 mM pH 3.5 y fase B metanol fue como sigue: 0-8 min, 55% B; 8-9 min, 95% B; 9-10 min 95% B; 10-12 min 55% B (re-equilibrio de columna) a un flujo de 0.2 mL/min.

Se utilizó la fuente ESI en modo positivo bajo los siguientes parámetros: voltaje de spray 2000 V; voltaje en placa 500 V; presión del gas nebulizador 0.8 bar (N₂); flujo de gas de secado 6 L min⁻¹ (N₂); temperatura de fuente 250 °C. Los espectros de masas se obtuvieron en modo UltraScan en el rango de 100-450 *m/z*, control de carga de iones ICC de 100, 000 o máxima acumulación de tiempo en trampa de 70 ms. Para MRM la amplitud de fragmentación se fijó en 0.6 V y la anchura de aislamiento ± 2 *m/z*. Se monitorearon las transiciones: 377→331 *m/z* ion cuantificador; 377→345 *m/z* ion calificador para CML y 379→333 *m/z* ion cuantificador; 379→347 *m/z* ion calificador para CML-D₂.

Los ensayos ELISA no fueron considerados entre los objetivos de este trabajo de tesis y fueron realizados en el Departamento de Ciencias Médicas. Los datos proporcionados por el Dr. Armando Gómez Ojeda se utilizaron solamente con fines de comparación con los resultados HPLC-ESI-ITMS/MS.

IV.6.4 Resultados y discusión

Se seleccionaron veinte productos alimenticios consumidos típicamente en México, incluyendo tortillas de maíz y trigo como productos derivados de cereales; carne de res, pollo, tocino y "chicharrón" como productos cárnicos; dos diferentes tipos de pescado; manzana, chile serrano

y patatas como frutas y verduras. Se utilizaron diferentes métodos culinarios para los siguientes alimentos: patatas, carne, pollo y pescado, con el fin de: i) evaluar el efecto de estos tratamientos sobre la formación de CML y ii) examinar la sensibilidad del procedimiento cromatográfico respecto ELISA a los pequeños cambios de concentración relacionados con diferentes tratamientos culinarios de la misma materia prima. Este último aspecto es particularmente relevante en el contexto de la discusión actual que existe sobre la confiabilidad de los inmunoensayos en el análisis de CML en los alimentos.

Para el análisis de CML por HPLC-ESI-ITMS/MS, el pretratamiento de las muestras fue el desarrollado en la sección IV.4 excepto por el medio de reacción de la derivatización con etilcloroformato, en este caso en particular se empleó metanol:piridina, por lo que el gradiente de elución y las transiciones iónicas para MRM fueron diferentes.

Con el gradiente de fases móviles empleado, 0-8 min, 55% B; 8-9 min, 95% B; 9-10 min 95% B; 10-12 min 55% B, se logró la elución de CML en el minuto 7.8 en un tiempo total de análisis de 12 min. En la Figura 42 a) se presentan cromatogramas típicos adquiridos en modo MRM en donde se observa CML-D₂ empleado como IS, y CML en una muestra de salmón asado a la parrilla por 8 min. En la Figura 42b, se muestran cromatogramas MRM obtenidos para CML en el análisis de papa cocida sin y con adición de estándar.

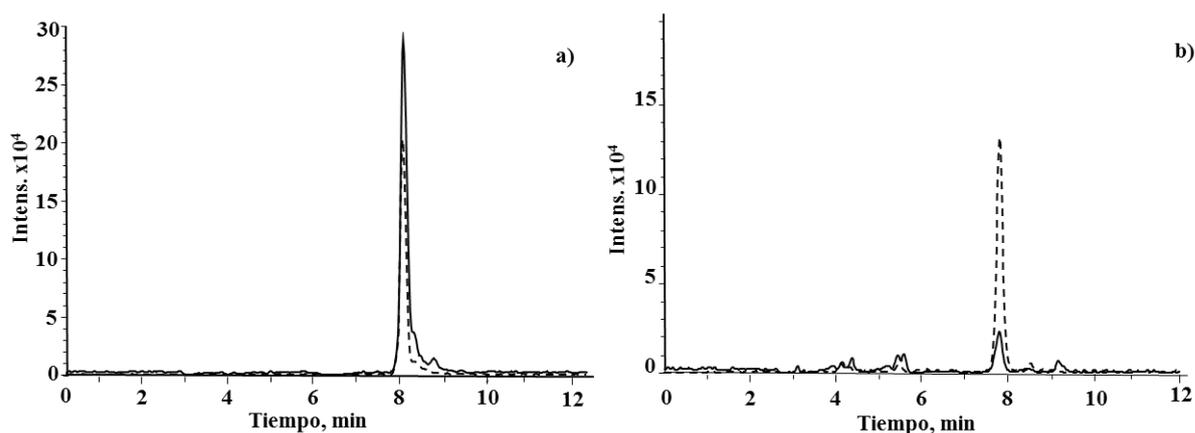


Figura 42. Cromatogramas típicos de HPLC-ESI-ITMS/MS adquiridos en modo MRM; a) — salmón a la parrilla 8 min (CML, 377→331 *m/z*); estándar interno CML-D₂, 150 µg/L, 379→333 *m/z*. b) — papa hervida y esta misma muestra después de la adición de estándar, 100 µg/L CML (CML, 377→331 *m/z*).

En la Figura 43 se muestran las estructuras moleculares de los productos derivatizados de CML y del estándar interno CML-D₂ en medio metanol:piridina. Con base en estas estructuras, su espectro de MS y de MS/MS de los estándares, se eligieron las condiciones para el análisis de CML por MRM, Figura 43.

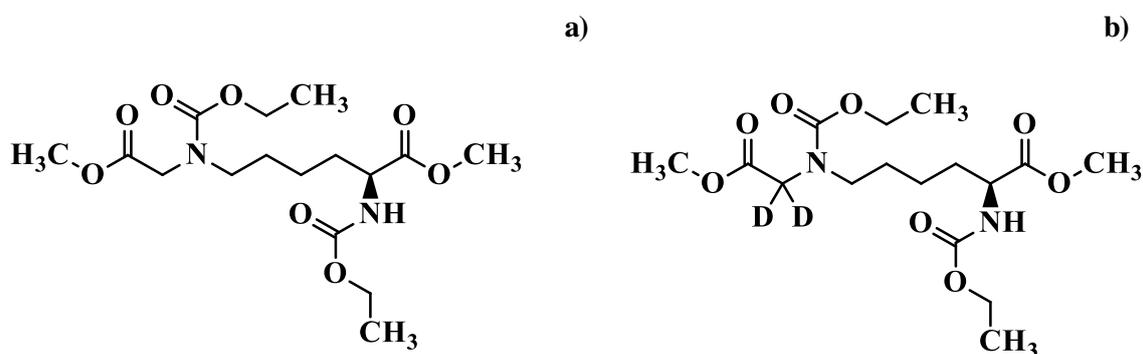


Figura 43. Estructuras moleculares de a) CML C₁₆H₂₈N₂O₈ masa exacta 376.1846 y b) CML-D₂ C₁₆H₂₆D₂N₂O₈ masa exacta 378.1971 derivatizadas con etilcloroformato en medio metanol:piridina.

Se obtiene la curva de calibración con linealidad aceptable ($R^2 > 0.997$); el límite de cuantificación para CML fue de 3.4 µg/L en columna y 0.18 µg/g en masa de muestras ya liofilizadas. Con el fin de revisar la exactitud, 100 ng del estándar de CML se adicionó a la muestra de papa hervida antes de la hidrólisis ácida. Los cromatogramas obtenidos en este experimento se presentan en la Figura 42b. El porcentaje de recuperación de 108% es indicativo de la buena exactitud del método.

IV.6.4.1 Resultados de los análisis de CML en alimentos por HPLC-ESI-ITMS/MS

En la Tabla 14 se detallan los resultados obtenidos en el análisis de todos los productos alimenticios que se seleccionaron por el método propuesto y también se incluyen los resultados de los ensayos ELISA, provenientes del estudio realizado en el Departamento de Ciencias Médicas. Para cada uno de los procedimientos, los niveles de analito se presentan en unidades de concentración de este procedimiento los valores medios con sus respectivas desviaciones estándar se obtuvieron en base a tres réplicas independientes.

Cabe destacar que la base de datos de ELISA es tomada de Uribarri y col [112] como la única fuente de referencia disponible para la comparación de diferentes ensayos ELISA, nótese que los valores disponibles en esa base de datos, KU/100 g, se incluyen en la última columna de la Tabla 14.

Por otro lado, en la revisión bibliográfica se encontraron varios estudios previos basados en el uso de procedimientos analíticos, mismos que se discuten a continuación con el fin de confirmar los resultados obtenidos en este trabajo y también con el fin de hallar posibles tendencias en la concentración de CML entre tipos de alimentos y su preparación.

En la Figura 44 se presentan los resultados del contenido de CML, obtenidos por HPLC-ESI-ITMS/MS se observa claramente que existe el siguiente orden de disminución en el contenido de CML en los alimentos analizados: bistec y tocino > pollo > pescado > productos lácteos > productos de grano > frutas y vegetales.

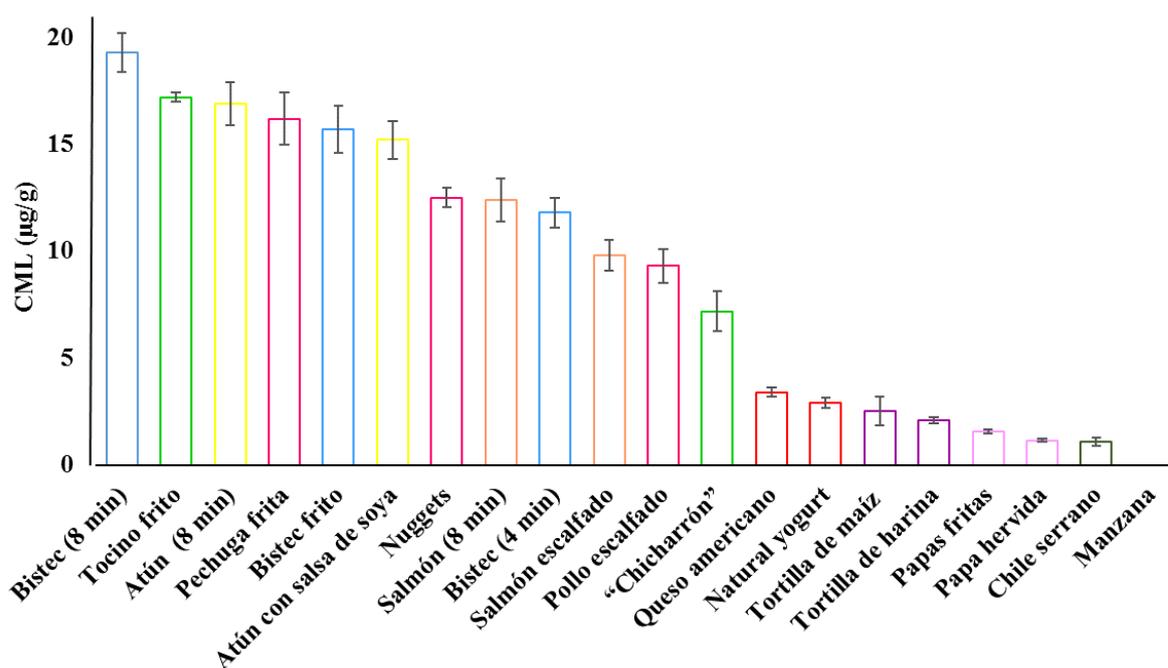


Figura 44. Concentraciones de CML determinadas en los productos alimenticios por HPLC-ESI-ITMS/MS. Las barras muestran los valores promedio de tres réplicas con su respectiva desviación estándar.

Un orden similar se puede apreciar en los resultados de tres diferentes ensayos ELISA y en la base de datos ELISA, Tabla 14. Este mismo orden puede ser deducido de algunos estudios

recientes realizados usando procedimientos por cromatografía de líquidos en tándem con espectrometría de masas; 7.3 µg/g CML en bistec de res a la parrilla por 5 min, 7.5 µg/g en pollo frito empanizado, 4.1 µg/g en salmón frito, 0.4 µg/g en queso con 32% de grasa, 0.1 µg/g en yogurt bebible de frambuesa, 0.1 µg/g en papas hervidas o fritas [122].

Tabla 14. Concentraciones de CML determinadas en productos alimenticios por HPLC-ESI-ITMS/MS, comparación con la base de datos de Uribarri y col, determinadas con ensayos ELISA. Se presenta el valor promedio con su respectiva desviación estándar para cada producto.

Producto alimenticio	HPLC-ESI-ITMS/MS	MyBioSource®	Lamider®	Anticuerpo monoclonal	(Uribarri y col. 2010,) ⁴
	(µg/g) ¹	(CEQ ng/mL) ²	(mU AGEs/g) ³	(µg/g) ¹	kU/100g
Manzana fresca	<LOQ	1.48 ± 0.90	4.63 ± 1.54	1.00 ± 0.11	13
Chile serrano fresco	1.10 ± 0.18	11.2 ± 0.8	ND	1.22 ± 0.25	NR
Tortilla de harina	2.09 ± 0.15	6.74 ± 0.35	5.73 ± 1.95	1.73 ± 0.34	NR
Tortilla de maíz	2.51 ± 0.67	2.78 ± 0.73	8.88 ± 2.23	1.96 ± 0.45	NR
Papas fritas	1.57 ± 0.11	5.71 ± 0.66	4.55 ± 0.74	1.61 ± 0.24	1522
Papa hervida	1.15 ± 0.08	2.59 ± 0.25	5.91 ± 2.47	1.29 ± 0.11	17
Natural yogurt	2.92 ± 0.25	2.90 ± 0.41	2.81 ± 0.52	2.4 ± 0.32	3
Queso americano	3.40 ± 0.21	3.10 ± 0.68	6.01 ± 0.26	4.1 ± 0.19	4040
Salmón escalfado	9.81 ± 0.72	5.71 ± 0.75	24.6 ± 3.4	10.2 ± 1.3	2292
Salmón a la parrilla (8 min)	12.4 ± 1.0	7.51 ± 1.21	29.1 ± 2.3	12.0 ± 0.9	3347
Atún a la parrilla con salsa de soya	15.2 ± 0.9	8.89 ± 0.43	25.0 ± 3.7	12.1 ± 2.2	5113
Atún a la parrilla (8 min)	16.9 ± 1.0	9.08 ± 0.46	21.5 ± 7.3	21.2 ± 2.9	NR
Bistec de res frito en sartén	15.7 ± 1.1	5.37 ± 0.96	25.9 ± 2.9	16.8 ± 1.4	10058
Bistec de res a la parrilla (4 min)	11.8 ± 0.7	4.32 ± 0.63	22.8 ± 2.3	12.7 ± 0.9	7416
Bistec a la parrilla (8 min)	19.3 ± 0.9	6.43 ± 0.25	33.4 ± 1.4	19.8 ± 1.2	NR
Nuggets de pollo	12.5 ± 0.45	6.85 ± 0.21	25.7 ± 3.8	14.3 ± 1.4	7722
Pollo escalfado	9.31 ± 0.8	5.82 ± 0.14	12.6 ± 2.5	9.42 ± 1.1	1101
Pechuga de pollo frita en sartén	16.2 ± 1.2	8.60 ± 1.04	29.2 ± 3.3	19.4 ± 0.8	4938
Tocino frito	17.2 ± 0.2	9.63 ± 0.92	34.7 ± 5.2	15.7 ± 1.2	9158
“Chicharrón”	7.19 ± 0.93	6.13 ± 0.64	19.1 ± 4.2	5.73 ± 0.48	NR

¹- microgramos de CML por gramo de alimento liofilizado; ²- calibrante equivalente a ng de CML por mL de solución; ³- U definida como señal de fluorescencia obtenida para 1 mg/mL de solución ⁴- U unidad equivalente a la cantidad de calibrante glicado (AGE-BSA). NR, no reportado.

Se sabe que las condiciones de cocción alteran el contenido inicial de AGEs de los ingredientes en los alimentos y en el estudio citado anteriormente, CML en pollo hervido y sin empanizar fue más baja que en pechuga frita empanizada, 1.8 µg/g, 3.4 µg/g y 7.5 µg/g, respectivamente [122].

De acuerdo con los datos reportados, la concentración de CML encontrada en pollo escalfado fue más baja respecto a los nuggets o pechuga frita en sartén; sin embargo, pechuga frita contenía más CML que nuggets de pollo, Tabla 14. Este resultado aparentemente sorprendente es debido al tipo de carne cruda utilizada para estos alimentos: los nuggets de pollo comercial fueron elaborados con carne molida y fueron empanizados mientras que el pollo frito fue la pechuga entera sin empanizado. En otra investigación científica, la aplicación de cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas arrojó un contenido de CML más alto en el bistec de res bien cocido contra el bistec a medio cocinar, 14.38 µg/g, 12.30 µg/g, y también un contenido más alto en pollo empanizado contra la pechuga de pollo frita, 44.48 µg/g contra 23.54 µg/g [123], están de acuerdo con los datos obtenidos en este trabajo.

En otro estudio, se encontró cerca de seis veces más baja concentración de CML en la parte interior comparada con la capa de la superficie de bistec frito, 3.13 µg/g versus 20.3 µg/g, pollo, 2.99 µg/g versus 17.6 µg/g, y salmón, 1.68 µg/g versus 12.2 µg/g [138]; aunque para este trabajo se homogenizaron las piezas enteras de alimento, los resultados obtenidos son comparables con los que corresponden a la capa superior, 15.7 µg/g en bistec frito, 16.2 µg/g en pollo frito y 12.4 µg/g en salmón a la parrilla, Tabla 14.

A pesar de que la mayoría de los resultados de este trabajo fueron consistentes con datos bibliográficos, [122,123,138], se detectaron también algunas discrepancias; tal fue el caso de un análisis en alimentos de China [126], donde se reporta el contenido de CML en papas fritas más alto comparado con nuestros resultados, 12.3-19.5 µg/g versus 1.57 µg/g, mientras que para tocino frito la concentración en el trabajo citado fue más baja que el nuestro, 8.64 µg/g contra 17.2 µg/g. Además, el contenido de CML reportado en queso cheddar fue de 23.2 µg/g [79] versus 3.4 µg/g que obtuvimos con nuestro método analítico, Tabla 14.

La variabilidad en concentraciones de CML observada entre diferentes estudios para productos similares indica que la glicación en alimentos es un proceso complejo y multifactorial y, por otro lado, que la determinación de CML sigue siendo una tarea retadora. En el caso de productos

cárnicos, frecuentemente se han discutido diferencias de los niveles de CML asociándolos con el uso de diferentes cortes de carne, picado, contenido de grasa inicial, el uso de conservadores y condimentos, el contenido de agua, el tipo de tratamiento térmico, etc. [138,223,249]. En este estudio, una porción de bistec de carne magra, un corte delgado, se frió en un sartén y otra porción se cocinó a la parrilla por 4 u 8 min sin sal u condimentos; mientras que un tiempo corto a la parrilla resultó en la menor concentración de CML comparado con el procedimiento de freírlo. Un efecto opuesto se observó cuando el tiempo que se cocinó a la parrilla aumentó a 8 minutos. La concentración que se determinó por un método de cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en bistec a la parrilla por 4 min, 11.8 µg/g es consistente con lo que se reportó para carne molida baja en grasa cocinada en aluminio por 10 minutos sin aditivos, 12.37 µg/g [223]. Como se mencionó anteriormente, Hull y col., también reportaron un incremento de CML al aumentar el tiempo de asar en la parrilla [123].

El "chicharrón" en México, se elabora friendo la piel del cerdo en manteca. Se encontró un bajo contenido de CML en este producto comparado con carne roja, lo que era de esperarse, dado su alto contenido de colágeno Tabla 14. Una explicación probable del inesperadamente bajo nivel de CML en "chicharrón" es que los carbohidratos están prácticamente ausentes en la piel y las grasas son en su mayoría saturadas, por lo tanto, no se encuentran los componentes principales para que suceda la reacción de Maillard.

Según nuestros conocimientos, CML no ha sido medida en tortillas de maíz ni de trigo antes; sin embargo los resultados obtenidos, 2.09 µg/g y 2.51 µg/g, respectivamente, Tabla 14, fueron más bajos que el intervalo reportado para productos basados en cereales 7.6-54.2 µg/g [123]. Se ha reportado que la formación de CML en corteza de pan se favorece en comparación con el migajón; en pan integral Assar y col, reportaron valores de 46.1 µg/g y 4.45 µg/g, respectivamente [79]. Aparentemente, el procesamiento de granos de maíz y de trigo durante la elaboración de las tortillas tuvo un efecto menos importante en la formación de CML respecto a la producción de otros alimentos elaborados con estos mismos cereales.

No se han encontrado datos de métodos analíticos que hayan analizado atún a la parrilla; sin embargo, en la base de datos de ELISA, el contenido de CML, 5113 KU/100 g, supera el valor de salmón escalfado y salmón a la parrilla, 2292 y 3347 KU/100 g, respectivamente. Nuestros resultados confirman la alta concentración de CML en atún con respecto a salmón, de acuerdo

con la base de datos existente y también con el contenido relativamente alto de lisina y arginina en atún comparado con otros peces [250,251].

IV.6.4.2 Evaluación comparativa del desempeño de HPLC-ESI-ITMS/MS respecto ensayos ELISA

Para evaluar comparativamente el procedimiento propuesto en este trabajo con ensayos inmunoquímicos, se seleccionaron tres diferentes ensayos ELISA que presentan diferente selectividad y se basan en diferentes diseños. El primer ensayo, MyBioSource[®] fue un kit de ELISA directo de tipo sándwich, comercializado para el análisis de fluidos biológicos. El kit emplea dos anticuerpos, uno monoclonal para CML y otro secundario policlonal marcado con biotina, obteniéndose alta selectividad hacia CML. El calibrante está descrito como el “estándar CML-AGE humano” sin mayor información sobre el contenido del CML; los resultados son reportados como la masa de CML equivalente a estándar (CEQ) por volumen de la solución que se somete a ensayo, CEQ ng/mL, el intervalo de concentración es 1.56 - 100 CEQ ng/mL.

El segundo ensayo fue un kit Lamider[®] de baja selectividad, comercializado para la determinación de AGEs fluorescentes totales en suero humano. La unidad de AGEs se define como señal de fluorescencia obtenido para la solución del calibrante 1 mg/mL, $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 370$ nm/440 nm; los resultados se reportan en mU/mL; el intervalo de calibración es 2.5–100 mU/mL. El kit Lamider[®] fue incluido en el análisis comparativo de resultados con el fin de obtener más evidencias experimentales de que si CML podría servir como marcador de los AGEs totales en comida.

Finalmente, para el tercer ensayo, se utilizó el anticuerpo monoclonal producido específicamente para CML y utilizado ampliamente en estudios anteriores para la determinación de CML en comida; la base de datos cuyos valores se presentan en la última columna de Tabla 14 fueron obtenidos utilizando este mismo anticuerpo [112]. El ensayo ELISA es de tipo competitivo. Para el presente estudio, el calibrante fue preparado en laboratorio, mediante incubación de albumina con el ácido glioxálico. Después de dializar la mezcla de reacción, la proteína fue digerida con tripsina, determinando la cantidad de CML por el método HPLC-ESI-ITMS/MS. De esta manera, utilizando el intervalo de calibración 1.2-154 ng CML/mL, la concentración de CML en las muestras de comida pudieron ser reportados

como ng CML/mL. Es de notar que, en estudios anteriores [112,118], los resultados de este ensayo ELISA fueron reportados en unidades de AGEs por 100 g de comida, kU/100 g, refiriendo el contenido del analito a la cantidad de proteína glicada, calibrante, sin cuantificar CML en la proteína [112].

Con el fin de evaluar el grado de consistencia entre los resultados obtenidos para cada uno de alimentos en diferentes procedimientos, se realizó el análisis estadístico de correlación, utilizando los valores promedio para cada uno de los alimentos en cada uno de los procedimientos; los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 15.

Tabla 15. Análisis estadístico de correlación evaluando la consistencia de los resultados obtenidos para cada producto alimenticio usando cuatro diferentes procedimientos, valores promedio tomados para comparación $p \leq 0.05$.

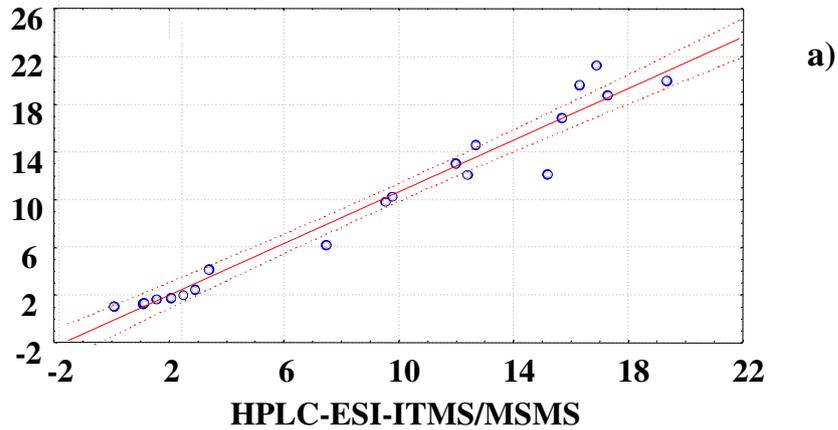
	HPLC-ESI-ITMS/MS	MyBioSource®	Lamider®	Anticuerpo monoclonal
HPLC-ESI-ITMS/MS	-	$\beta = 0.5237$ $p = 0.018$	$\beta = 0.9387$ $p = 0.000$	$\beta = 0.9796$ $p = 0.000$
MyBioSource®	-	-	$\beta = 0.4402$ $p = 0.052$	$\beta = 0.5096$ $p = 0.022$
Lamider®	-	-	-	$\beta = 0.9027$ $p = 0.000$
Anticuerpo monoclonal	-	-	-	-

Como se observa, se encontró diferencia estadística significativa para cada par de ensayos; la mejor correlación, $\beta = 0,9796$, $p = 0,000$, corresponde a HPLC-ESI-ITMS/MS y ELISA realizada con anticuerpo monoclonal anti-CML, Figura 45a, mientras que la relación menor, $\beta = 0,4402$, $p = 0,052$, se encontró para el kit MyBioSource® con Lamider®. Por otra parte, los resultados de Lamider® se correlacionaron bien con el procedimiento de química analítica Figura 45b. Existe buena correlación directa entre los resultados obtenidos para CML, método

HPLC-ESI-ITMS/MS, y el ensayo ELISA competitivo con anticuerpo monoclonal anti-CML y MyBioSource® con el contenido de AGEs obtenidos por Lamider®, lo cual parece confirmar la utilidad de CML como indicador de los AGEs en la dieta.

$$(\text{Anticuerpo monoclonal}) = -0.2723 + 1.0825 * (\text{HPLC-ESI-ITMS/MS})$$

$$R = 0.97962$$



$$(\text{Anticuerpo monoclonal}) = -0.4793 + 0.57652 * (\text{Lamider®})$$

$$R = 0.90275$$

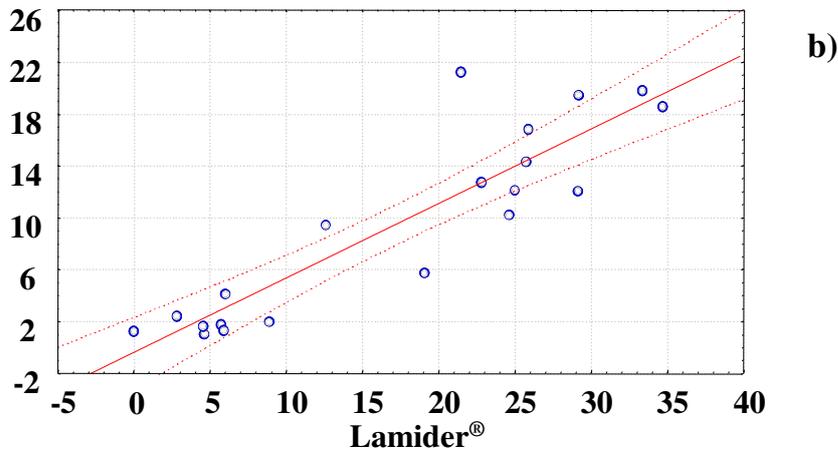


Figura 45. Análisis de correlación de los resultados obtenidos por los procedimientos individuales. La línea punteada muestra la regresión lineal marcando el intervalo de confianza a nivel de probabilidad 95%. a) resultados de ELISA con anticuerpo monoclonal anti-CML contra HPLC-ESI-ITMS/MS. b) resultados de ELISA con anticuerpo monoclonal anti-CML contra Lamider®.

Para aumentar el alcance de la evaluación comparativa, en el análisis de correlación se agregaron los valores de CML de la base de datos disponible, excluyendo seis productos no reportados en esta base de datos, Tabla 14.

La significancia estadística de la relación directa se conservó para cada par de procedimientos utilizados en este trabajo. De hecho, la eliminación de los seis productos, resultó en una mejor correlación de MyBioSource® con otros procedimientos. Cabe destacar en este punto que los kits de Lamider® y MyBioSource® fueron diseñados para muestras clínicas y no para análisis de alimentos, por lo que la composición compleja y heterogénea de los alimentos en este estudio podría interferir potencialmente durante el inmunoensayo.

En particular, el chile serrano fresco parecía ser una muestra problemática porque no había sido detectado por Lamider® mientras que quedó claramente sobrestimado usando MyBioSource®, Tabla 14.

Tabla 16. Análisis estadístico de la correlación evaluando la consistencia de los resultados obtenidos para los productos alimenticios incluidos en la base de datos ELISA (Uribarri y col. 2010) usando cuatro procedimientos diferentes, valores promedio tomados por comparación $p \leq 0.05$.

	HPLC-ESI-ITMS/MS	MyBioSource®	Lamider®	Anticuerpo monoclonal	Base de datos ELISA
HPLC-ESI-ITMS/MS	-	$\beta = 0.8419$ $p = 0.000$	$\beta = 0.9507$ $p = 0.000$	$\beta = 0.9773$ $p = 0.000$	$\beta = 0.4614$ $p = 0.097$
MyBioSource®		-	$\beta = 0.8261$ $p = 0.000$	$\beta = 0.7960$ $p = 0.001$	$\beta = 0.5079$ $p = 0.064$
Lamider®			-	$\beta = 0.9433$ $p = 0.000$	$\beta = 0.5021$ $p = 0.067$
Anticuerpo monoclonal				-	$\beta = 0.4801$ $p = 0.082$
Base de datos ELISA					-

Por otra parte, los valores de CML de la base de datos de ELISA no presentaron correlación significativa con ninguno de los cuatro procedimientos, Tabla 16; sin embargo, este resultado no debería ser alarmante debido a los coeficientes de correlación relativamente altos, $\beta > 0,46$, Tabla 16, y debido a que nuestro estudio se llevó a cabo utilizando alimentos idénticos para todos los procedimientos mientras que la base de datos se construyó analizando los ingredientes y procedimientos de preparación sin un estricto control.

Aunque el análisis de correlación realizado para valores promedio sugirió la capacidad de todos los ensayos ELISA para la determinación de CML y AGEs en alimentos, proporcionando datos consistentes con el método HPLC-ESI-ITMS/MS la repetibilidad de estos ensayos fue menor claramente.

Específicamente, las desviaciones estándar relativas evaluadas con base en tres replicas independientes de cada muestra, fueron en el rango de 2,41-60,8% (promedio 13,5%) para MyBioSource®, 4,20-41,8% (promedio 18,5%) para Lamider®, 4,10-23,0% (promedio 10,9%) para ELISA utilizando anticuerpo monoclonal anti-CML, mientras que para el método analítico el intervalo fue de 1,20-16,4% (promedio 7,88%). Para examinar más a fondo la viabilidad del ELISA en las mediciones de CML y AGEs en los alimentos, para cada uno de ellos se compararon los resultados obtenidos para carne de res, pollo y salmón cocinados usando diferentes recetas.

En la Figura 46, se presentan el contenido de CML en tres diferentes preparaciones de bistec de res mostrando este mismo orden decreciente según se evaluó en los cuatro procedimientos: bistec asado a la parrilla 8 min > bistec frito > bistec asado a la parrilla 4 min; no obstante, el análisis estadístico, prueba *t* desapareada, $p \leq 0.05$, indicó diferencias significativas sólo para HPLC-ESI-ITMS/MS y para ELISA utilizando anticuerpo monoclonal anti-CML. Los datos obtenidos para dos kits comerciales permitieron distinguir solamente las concentraciones de CML en la carne a la parrilla aplicando diferentes períodos de tiempo, 4 min y 8 min.

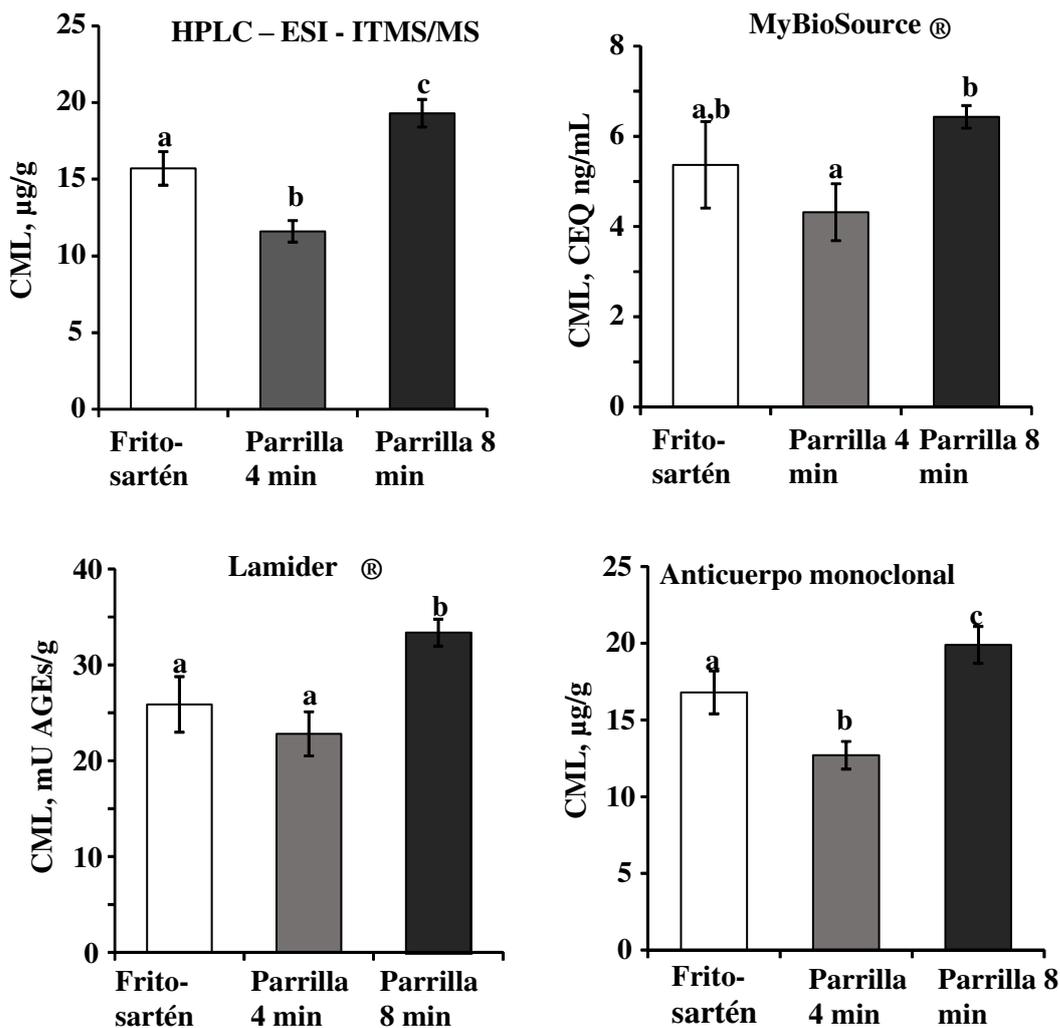


Figura 46. Comparación de las concentraciones de CML determinadas en bistec bajo diferente tratamiento culinario por cuatro métodos. Las barras muestran los valores promedio de tres réplicas con su respectiva desviación estándar; letras diferentes indican diferencias significativas estadísticamente, prueba *t* desapareada, $p < 0.05$.

Los resultados obtenidos para los productos de pollo también presentaron una tendencia similar en cada uno de los cuatro procedimientos: pechuga frita > nuggets > pollo escalfado; sin embargo, en este caso, sólo las concentraciones obtenidas con Lamider® en pechuga frita y nuggets de pollo no pudieron diferenciarse con significación estadística Figura 47. Los resultados obtenidos para el salmón escalfado y el salmón a la parrilla se muestran en la Figura 48; el contenido de CML significativamente menor fue detectado en el producto escalfado respecto asado, sólo por HPLC-ESI-ITMS/MS. Finalmente, las concentraciones de CML encontradas en papas hervidas y fritas no presentaron diferencias significativas con ningún procedimiento, mientras que el contenido de CML en tortilla de maíz fue significativamente mayor que en tortilla de trigo por HPLC-ESI-ITMS/MS y por ELISA con anticuerpo

monoclonal anti-CML, $p < 0,05$. Cabe destacar que ambos kits comerciales indicaron un contenido de CML estadísticamente mayor en tortilla de trigo comparado con tortilla de maíz, lo cual parece confirmar la susceptibilidad de estos kits a las interferencias de matriz, Tabla 14.

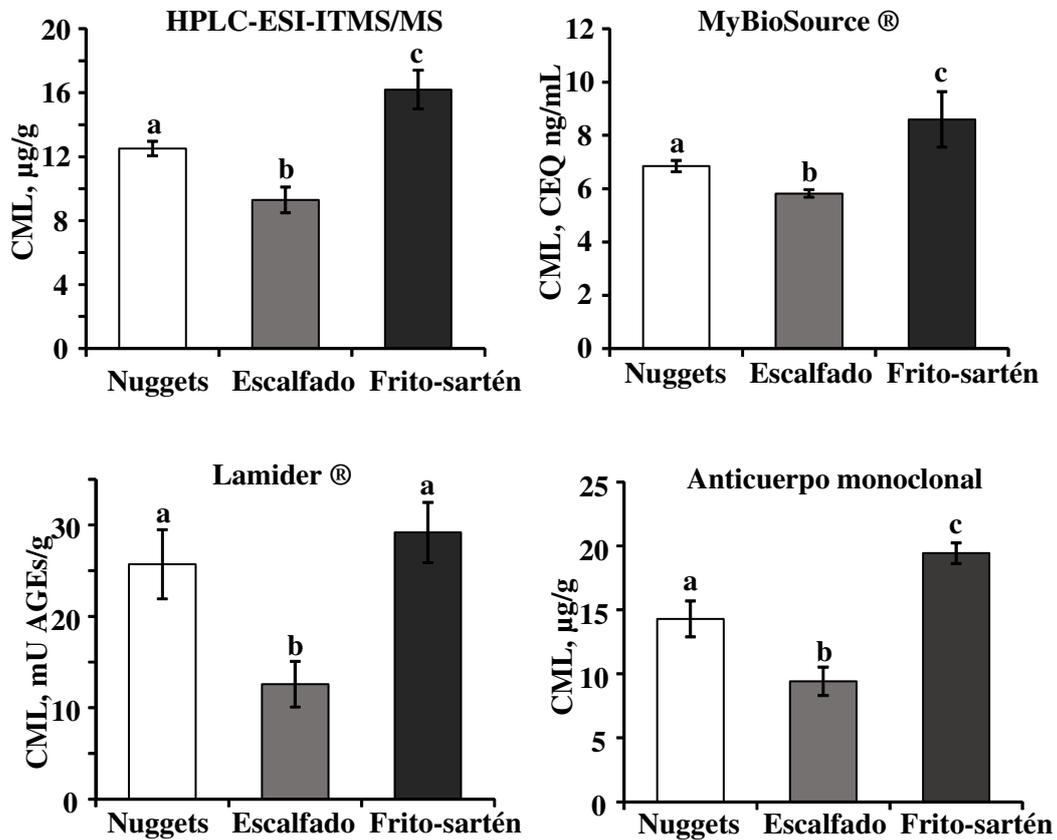


Figura 47. Concentraciones de CML encontradas en tres diferentes tratamientos culinarios de carne de pollo utilizando cada uno de los cuatro procedimientos. (Los histogramas presentan valores promedios con respectivas desviaciones estándar, para tres replicas independientes. Las letras diferentes indican diferencias significativas, prueba t desapareada, $p < 0.05$).

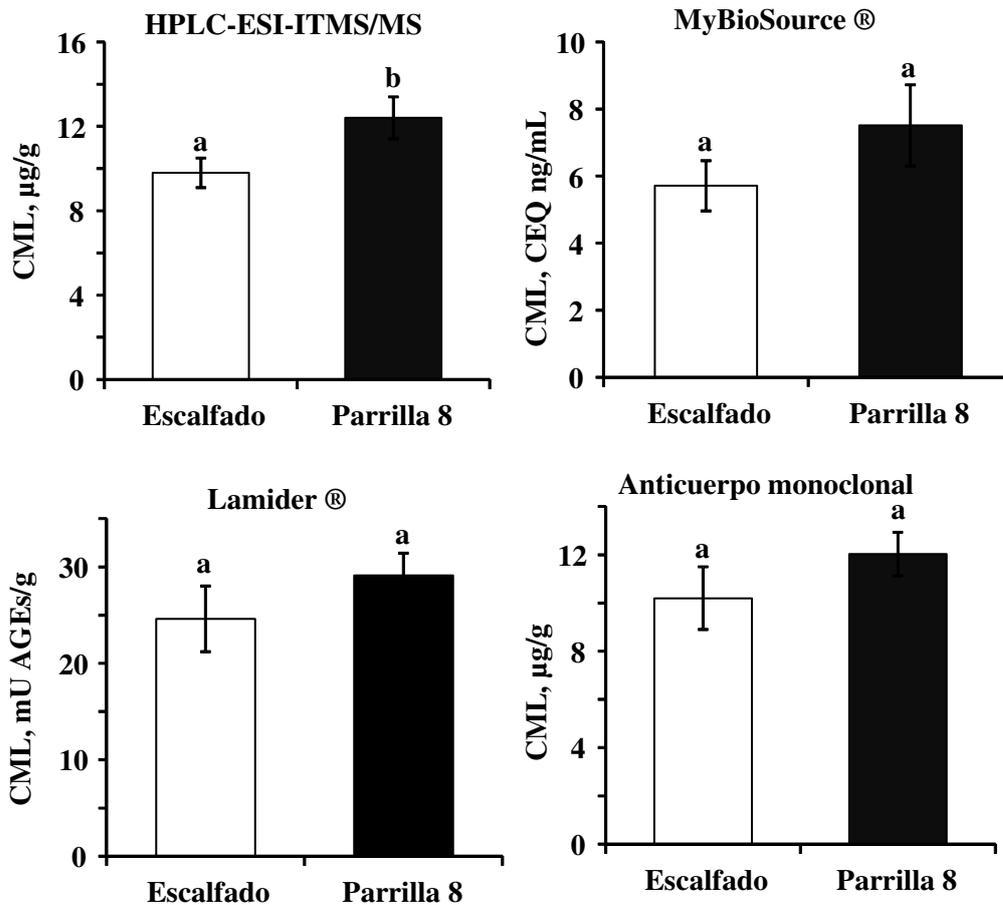


Figura 48. Concentraciones de CML encontradas en dos diferentes tratamientos culinarios de salmón utilizando cada uno de los cuatro procedimientos. Los histogramas presentan valores promedios con respectivas desviaciones estándar, para tres replicas independientes. Las letras diferentes indican diferencias significativas, prueba *t* desapareada, $p < 0.05$.

Los resultados que se acaban de presentar, demuestran una mejor sensibilidad del procedimiento cromatográfico HPLC-ESI-ITMS/MS respecto a los ensayos ELISA, en su aplicación al análisis de alimentos; en otras palabras, el método cromatográfico tiene mejor capacidad para hallar pequeñas diferencias en la concentración del analito entre dos diferentes muestras, por ejemplo, debido a diferente tratamiento térmico que se hizo para elaborar alimentos a partir de los mismos ingredientes. Esta capacidad del procedimiento analítico es muy importante en el contexto de búsqueda de las estrategias para restringir ingesta de los AGEs con la dieta.

Finalmente, para complementar la evaluación comparativa del método cromatográfico respecto a los ensayos ELISA, se llevó a cabo el análisis multivariante por método de componentes

principales (PCA). El objetivo fue conocer posibles similitudes en el desempeño de estos cuatro procedimientos en la determinación de CML y AGEs en las mismas 20 muestras de alimentos. En la construcción del modelo PCA, se detectaron que las muestras de chile serrano y de atún asado salen del modelo; tal como ya se hizo notar, los niveles de CML en estas dos muestras fueron inconsistentes, especialmente en aplicación de dos kits ELISA comerciales, probablemente debido a interferencias de matriz. El color oscuro del tejido de atún, su alto contenido de arginina y lisina, comparando con otros tipos de pescado, sugieren que durante cocción se pueden formar otros tipos de AGEs potencialmente afectando la determinación de CML. De acuerdo con ello, el contenido de AGEs en atún y también en carne de animales fue más alta para ELISA Lamider® respecto a los otros procedimientos, Tabla 14.

El modelo PCA obtenido excluyendo las dos muestras, chile y atún, se presenta en la Figura 49; los dos primeros componentes principales describen 99% de varianza total de los datos, indicando la significancia estadística del modelo. En la Figura 49a, se presenta la distribución de los alimentos analizados en este trabajo. La reducción de la dimensionalidad del espacio permitió ordenar las muestras, acorde a su contenido de CML y AGEs determinado por cada uno de los métodos. Se observa que PC1 permite separar los productos a base de carne y pescado que son generalmente altos en AGEs de los productos derivados de leche y de las plantas que por lo general presentaron más bajas concentraciones de CML y AGEs.

En la Figura 49b, se presenta la distribución de procedimientos en las mismas coordenadas PC1 y PC2. Se observa una asociación cercana entre el método por HPLC-ESI-ITMS/MS y el ensayo ELISA competitivo con el anticuerpo monoclonal anti-CML, lo que confirma similar desempeño de estos dos métodos en el análisis de alimentos. Los dos kits comerciales, MyBioSource® y Lamider® quedaron alejados de estos dos métodos, indicando su menor capacidad analítica, observada también en el análisis de correlación y en las pruebas de sensibilidad. Para los cuatro procedimientos, sus valores PC1 fueron positivos, es decir la consistencia entre resultados de estos cuatro métodos aumentaba al analizar los alimentos con altas concentraciones de CML y AGEs.

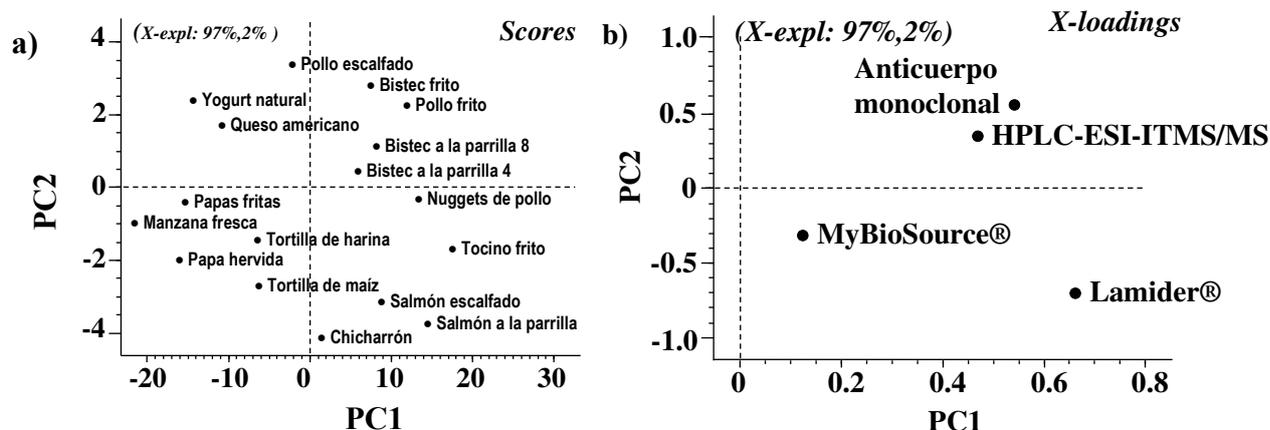


Figura 49. Modelo PCA obtenido para datos de CML y AGEs determinados en 18 alimentos por cuatro procedimientos: a) Gráfica de scores representa la distribución de los productos analizados en las coordenadas de los dos primeros componentes principales; b) Gráfica de X-loadings muestra distribución de los cuatro procedimientos utilizados para la determinación de CML y AGEs en estos mismos alimentos.

En general, los resultados obtenidos en este trabajo proporcionan pruebas sólidas de que los ensayos ELISA pueden utilizarse para la medición de CML y AGEs en alimentos; sin embargo, estos ensayos presentan menor precisión en comparación con el método de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas y aparentemente se vieron afectados por la presencia de la matriz. Además, el procedimiento de química analítica permitió distinguir las concentraciones de CML entre los alimentos elaborados del mismo ingrediente, pero empleando diferentes condiciones térmicas y del tiempo; dichas diferencias no siempre se pudieron detectar a nivel estadístico mediante ensayos ELISA.

En este sentido, los datos menos consistentes con los resultados de HPLC-ESI-ITMS/MS fueron los obtenidos con MyBioSource®. Por otra parte, la concentración de CML en los productos alimenticios siempre se ve afectada por la selección de las materias primas y la receta culinaria, por lo tanto, es necesario una descripción detallada para garantizar la fiabilidad de cualquier evaluación comparativa.

IV.6.5 Conclusiones

El método desarrollado por cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas y cuantificación en el modo MRM, previa derivatización con etilcloroformato, demostró su utilidad para la determinación de CML en una serie de alimentos consumidos en México. En general, las concentraciones de CML tuvieron buena concordancia con los reportados en otros estudios que utilizaron tanto métodos cromatográficos como inmunoquímicos.

Dentro de los productos analizados, existe un orden en los niveles de CML: bistec y tocino > pollo > pescado > productos lácteos > productos de grano > frutas y vegetales. Se observa un orden similar en la base de datos obtenida por ensayos ELISA que referimos y con los ensayos inmunoquímicos empleados. La formación de CML y AGEs se favorece cuando los alimentos son calentados a altas temperaturas por tiempos prolongados.

Se ha demostrado que los ensayos ELISA pueden utilizarse para la medición de CML en alimentos; sin embargo, estos ensayos presentan menor precisión en comparación con el método analítico descrito.

El procedimiento cromatográfico propuesto en este trabajo, permite distinguir las concentraciones de CML en alimentos sometidos a diferentes tratamientos culinarios.

El ensayo ELISA que proporcionó resultados de mayor congruencia con HPLC-ESI-ITMS/MS ha sido el ensayo competitivo en el anticuerpo monoclonal anti-CML. Por otro lado, hay una buena correlación entre AGEs fluorescentes medidos con Lamider® y CML medidos por otros métodos confirma que CML puede ser utilizada como marcador químico de los AGEs en alimentos.

Finalmente, hay que resaltar que la concentración de los AGEs y de CML en productos alimenticios depende de muchos factores, entre ellos del material crudo y el tratamiento culinario, por lo que cuando se reportan los valores es necesaria una descripción detallada del tratamiento para asegurar la confiabilidad de los resultados en caso de querer hacer alguna evaluación comparativa.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES GENERALES

El propósito principal de este trabajo ha sido avanzar en el conocimiento relacionado con marcadores de estrés oxidativo y de glicación de moléculas, particularmente de CML. Con este fin se llevó a cabo el desarrollo de procedimientos analíticos nuevos que nos permitan cuantificar este compuesto, para su posterior aplicación en el análisis de muestras reales y para poder estudiar el efecto que tienen diversos factores sobre su formación, principalmente en alimentos.

Se estableció un procedimiento por HPLC-DAD para evaluar el efecto que tiene la adición de compuestos con actividad antioxidante de tipo tiol y de iones de dos metales de transición sobre la reacción de formación de CML. Se ha desarrollado y validado un procedimiento para la determinación de CML en muestras químicamente complejas, proponiendo la derivatización con etilcloroformato para lograr la separación por cromatografía de líquidos en fase reversa.

Se han establecido las condiciones de detección por espectrometría de masas en tándem en el modo MRM logrando el límite de cuantificación del método $98 \mu\text{g kg}^{-1}$. Este método fue utilizado para estudiar el efecto de cobre potencialmente presente durante elaboración o almacenaje de alimentos sobre la formación de CML. Así mismo, se utilizó este método para la determinación de CML en 20 alimentos diferentes consumidos en México. Finalmente, se realizó una evaluación comparativa del método propuesto con el desempeño de los ensayos ELISA, en aplicación al análisis de los mismos alimentos.

De la realización de tesis y de la participación en los estudios que no forman directamente la parte del proyecto, se obtuvieron los siguientes productos:

1. S. Jaramillo Ortiz, K. Wrobel, A. Gómez Ojeda, F. Acevedo Aguilar, A. R. Corrales Escobosa, E. Yañez Barrientos, M. E. Garay Sevilla, K. Wrobel. *N^e-carboxymethyl lysine content in cheese, meat and fish products is affected by the presence of copper during elaboration process. *European Food Research and Technology*, 2017 (aceptado)*
2. Jaramillo Ortiz, S. Wrobel, K., Corrales Escobosa, A. R. & Wrobel, K. Efecto de diferentes agentes químicos en la formación de *N^e-carboximetil-lisina* utilizando el ácido glioxílico, un metabolito universal asociado con el desarrollo y progreso de la diabetes. *Acta Universitaria*, (2015)25(NE-1), 17-21.
3. A. Gómez Ojeda, S. Jaramillo Ortiz, K. Wrobel, K. Wrobel, G. Barbosa Sabanero, C. Luévano Contreras, M. P. de la Maza, J. Uribarri, M. D. del Castillo. Comparative

evaluation of three different ELISA assays and HPLC-ESI-ITMS/MS for the analysis of N^ε-carboxymethyl lysine in food samples. *Food Chemistry* (enviado)

4. A.R. Corrales Escobosa, K. Wrobel, E. Yanez Barrientos, S. Jaramillo Ortiz, A.S. Ramirez Segovia, K. Wrobel, Effect of different glycation agents on Cu(II) binding to human serum albumin, studied by liquid chromatography, nitrogen microwave-plasma atomic-emission spectrometry, inductively-coupled-plasma mass spectrometry, and high-resolution molecular-mass spectrometry, *Anal Bioanal Chem*, 407 (2015) 1149-1157.
5. Capítulo de libro: Wrobel, K., Jaramillo Ortiz, S., Corrales Escobosa, A. and Wrobel, K. (2017). What are AGEs; their chemical structure and how can they be measured. In: J. Uribarri, ed., *Dietary AGEs and their role in Health and Disease*, 1st ed. New York: Taylor & Francis.

A continuación, se enlistan las principales conclusiones y contribución de este trabajo:

1. Mediante la reacción de glicación de ZLys con ácido glioxálico se adoptaron las condiciones para la síntesis de CML cuya identidad fue confirmada por espectrometría de masas de alta resolución.
2. Se estableció un procedimiento por HPLC-DAD que permite evaluar el porcentaje de conversión de ZLys en ZCML. Este procedimiento se utilizó para examinar efecto de varios agentes químicos sobre la formación de CML.
3. Dentro del análisis del efecto que ejercen los iones metálicos sobre la formación *in vitro* de ZCML, se demostró un efecto inhibitorio de los iones Zn(II). En relación con las mezclas de reacción que contenían ACys y GSH, la adición del ion Zn(II) potencializó el efecto inhibitorio observado para cada uno de los tioles por separado. El efecto de Cu(II) sobre la formación de ZCML en ausencia de tioles fue similar pero menos notorio respecto al observado para Zn(II). En las mezclas de reacción que contenían HCys o LCys, adición de ion Cu(II) provocó una disminución de ZCML formado, pero este efecto no fue observado para los otros dos tioles, ACys y GSH.
4. El procedimiento HPLC-ESI-ITMS/MS desarrollado tiene los siguientes elementos de novedad: i) extracción de lípidos antes del tratamiento de muestra; ii) aplicación de etilclorofornato en el medio etanol:piridina para la derivatización de CML logrando su retención en una columna de fase reversa, iii) ajuste de pH 9 para extraer los compuestos

de derivatizados con cloroformo, logrando su pre concentración y eliminado los compuestos polares, iv) simulación de la composición de muestra en la etapa de calibración adicionando una mezcla de amino ácidos, v) selección de las condiciones de separación para eliminar la interferencia de fenilalanina, como interferente principal. Este método ha sido validado para la determinación de CML en alimentos con el límite de cuantificación 98 µg/kg de alimento liofilizado.

5. Con el procedimiento por HPLC-ESI-ITMS/MS en modo MRM puesto a punto, se estudió por primera vez la relación entre los niveles de cobre y CML en diferentes productos alimenticios. Los resultados de la relación entre CML Y Cu sugieren que cobre presenta un efecto inhibitor en la formación de CML en alimentos. Los resultados son consistentes en todas las muestras, excepto para la muestra de “carnitas”, que presentó una tendencia contraria. Dadas las diferentes condiciones de cocción, se confirma que la glicación es un proceso muy complejo y que el efecto del cobre puede ser atenuado por una variedad de otros factores. No obstante, el uso tradicional de cacerolas de cobre parece tener un efecto beneficioso adicional en términos de disminución de la glicación de proteínas.
6. En la aplicación del procedimiento cromatográfico con detección por espectrometría de masas en tándem al análisis de CML en 20 diferentes alimentos consumidos en México, se observó un orden en los niveles de CML: bistec y tocino > pollo > pescado > productos lácteos > productos de grano > frutas y vegetales. Estos resultados fueron consistentes con la base de datos de ELISA existente y con varios trabajos publicados recientemente. Además, se obtuvo resultados que indican un cambio de la concentración de CML, dependiendo del tratamiento térmico aplicado para el mismo producto en la elaboración de alimentos.
7. En la evaluación comparativa del procedimiento HPLC-ESI-ITMS/MS con los tres diferentes ensayos ELISA, se ha demostrado una buena concordancia de los resultados obtenidos para los 20 alimentos seleccionados; sin embargo, el método cromatográfico ofrece mejor precisión y mejor sensibilidad respecto ensayos inmunoquímicos.
8. Se observó una correlación directa entre AGEs fluorescentes medidos con Lamider® y CML medidos por otros métodos lo que confirma que CML puede ser utilizado como marcador químico de los AGEs en alimentos.

CAPÍTULO VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Summary, E. Use of glycated haemoglobin (HbA1c) in the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **2011**, *93*, 299–309.
2. Hanssen, K. F.; Bangstad, H.-J.; Brinchmann-Hansen, O.; Dahl-Jørgensen, K. Blood Glucose Control and Diabetic Microvascular Complications: Long-term Effects of Near-normoglycaemia. *Diabet. Med.* **1992**, *9*, 697–705.
3. Fox, C. S.; Coady, S.; Sorlie, P. D.; D'Agostino, R. B. S.; Pencina, M. J.; Vasan, R. S.; Meigs, J. B.; Levy, D.; Savage, P. J. Increasing cardiovascular disease burden due to diabetes mellitus: the Framingham Heart Study. *Circulation* **2007**, *115*, 1544–1550.
4. WHO *Definition, Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus and its Complications*; Geneva, 1999;
5. Robertson, A. P. Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 42351–42354.
6. Burtis, A. C.; Edwr, R.; Bruns, E. D. *Fundamentals of Clinical Chemistry*; Saunders, Ed.; 6th ed.; Elsevier Inc: Philadelphia, PA, USA, 2008;
7. Davies, J. L.; Kawaguchi, Y.; Bennett, S. T.; Copeman, J. B.; Cordell, H. J.; Pritchard, L. E.; Reed, P. W.; Gough, S. C. L.; Jenkins, S. C.; Palmer, S. M.; Balfour, K. M.; Rowe, B. R.; Farrall, M.; Barnett, A. H.; Bain, S. C.; Todd, J. A. A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes. *Nature* **1994**, *371*, 130–136.
8. Doria, A.; Patti, M.-E.; Kahn, C. R. The Emerging Genetic Architecture of Type 2 Diabetes. *Cell Metab.* **2008**, *8*, 186–200.
9. Kaneto, H.; Matsuoka, T.; Nakatani, Y.; Kawamori, D.; Miyatsuka, T.; Matsuhisa, M.; Yamasaki, Y. Oxidative stress, ER stress, and the JNK pathway in type 2 diabetes. *J. Mol. Med.* **2005**, *83*, 429–439.
10. Sakai, K.; Matsumoto, K.; Nishikawa, T.; Suefuji, M.; Nakamaru, K.; Hirashima, Y.; Kawashima, J.; Shirotani, T.; Ichinose, K.; Brownlee, M.; Araki, E. Mitochondrial reactive oxygen species reduce insulin secretion by pancreatic β -cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *300*, 216–222.
11. Kaneto, H.; Xu, G.; Song, K.-H.; Suzuma, K.; Bonner-Weir, S.; Sharma, A.; Weir, G. C. Activation of the Hexosamine Pathway Leads to Deterioration of Pancreatic β -Cell Function through the Induction of Oxidative Stress. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 31099–31104.
12. Matsuoka, T.; Kajimoto, Y.; Watada, H.; Kaneto, H.; Kishimoto, M.; Umayahara, Y.; Fujitani, Y.; Kamada, T.; Kawamori, R.; Yamasaki, Y. Glycation-dependent, reactive oxygen species-mediated suppression of the insulin gene promoter activity in HIT cells. *J. Clin. Invest.* **1997**, *99*, 144–50.
13. K. Eto, T. K. Role of the NADH Shuttle System in Glucose-Induced Insulin Secretion. *Nihon Rinsho* **1999**, *57*, 503–514.
14. Novelli, M.; Fabregat, M. E.; Fernandez-Alvarez, J.; Gomis, R.; Masiello, P. Metabolic and functional studies on isolated islets in a new rat model of type 2 diabetes. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2001**, *175*, 57–66.
15. Organización Mundial de la Salud *Informe mundial sobre la diabetes*; Geneva, Switzerland, 2016;
16. Pública, I. N. de S. *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016*; CD. MX, 2016; Vol. 2016;.
17. ADA Standards of Medical Care in Diabetes -2016. *Diabetes Care* **2016**, *39*.
18. WHO *Laboratory Diagnosis and Monitoring of Diabetes Mellitus*; Geneva, Switzerland, 2002;
19. Bartoli, E.; Fra, G. P.; Schianca, G. P. C. The oral glucose tolerance test (OGTT) revisited. *Eur. J. Intern. Med.* **2011**, *22*, 8–12.
20. Rondeau, P.; Bourdon, E. Biochimie The glycation of albumin: Structural and functional impacts. *Biochimie* **2011**, *93*, 645–658.
21. Anguizola, J.; Matsuda, R.; Barnaby, O. S.; Hoy, K. S. S.; Wa, C.; DeBolt, E.; Koke, M.; Hage,

- D. S. Review: Glycation of human serum albumin. *Clin. Chim. Acta* **2013**, *425*, 64–76.
22. Roohk, H. V.; Zaidi, A. R. A Review of Glycated Albumin as an Intermediate Glycation Index for Controlling Diabetes. *J. Diabetes Sci. Technol.* **2008**, *2*, 1114–1121.
 23. Beisswenger, P. J.; Drummond, K. S.; Nelson, R. G.; Howell, S. K.; Szwergold, B. S.; Mauer, M. Susceptibility to Diabetic Nephropathy Is Related to Dicarbonyl and Oxidative Stress. *Diabetes* **2005**, *54*.
 24. Poulsen, M. W.; Hedegaard, R. V.; Andersen, J. M.; de Courten, B.; Bügel, S.; Nielsen, J.; Skibsted, L. H.; Dragsted, L. O. Advanced glycation endproducts in food and their effects on health. *Food Chem. Toxicol.* **2013**, *60*, 10–37.
 25. Matough, F. A.; Budin, S. B.; Hamid, Z. A.; Alwahaibi, N.; Mohamed, J. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Diabetic Complications. *SQU Med J* **2012**, *12*, 5–18.
 26. Moresco, R. N.; Sangoi, M. B.; Carvalho, J. A. M. De; Tatsch, E.; Bochi, G. V Diabetic nephropathy : Traditional to proteomic markers. *Clin. Chim. Acta* **2013**, *421*, 17–30.
 27. Diabetes, D. O. F. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* **2009**, *32 Suppl 1*, S62-7.
 28. Wu, L. L.; Chiou, C.-C.; Chang, P.-Y.; Wu, J. T. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clin. Chim. Acta* **2004**, *339*, 1–9.
 29. Nimbalkar, V. V; Mandlik, R. V; Naik, S. R.; Maseeh, A. Nonenzymatic glycosylation : A biochemical link between chronic hyperglycemia and pathophysiologic processes associated with diabetic complications and aging related debilities. *Biomed. Aging Pathol.* **2012**, *2*, 133–142.
 30. Calabrese, V.; Cornelius, C.; Leso, V.; Trovato-Salinaro, A.; Ventimiglia, B.; Cavallaro, M.; Scuto, M.; Rizza, S.; Zanolli, L.; Neri, S.; Castellino, P. Oxidative stress, glutathione status, sirtuin and cellular stress response in type 2 diabetes. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1822*, 729–736.
 31. Stephens, J. W.; Khanolkar, M. P.; Bain, S. C. The biological relevance and measurement of plasma markers of oxidative stress in diabetes and cardiovascular disease. *Atherosclerosis* **2009**, *202*, 321–9.
 32. Evans, J. L.; Goldfine, I. D.; Maddux, B. A.; Grodsky, G. M. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: A unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr. Rev.* **2002**, *23*, 599–622.
 33. Yamaguchi, K.; Homma, T.; Nomi, Y.; Otsuka, Y. Characterisation of Maillard reaction products derived from LEKFD – A pentapeptide found in b-lactoglobulin sequence, glycated with glucose – By tandem mass spectrometry, molecular orbital calculations and gel filtration chromatography coupled with contin. *Food Chem.* **2014**, *145*, 892–902.
 34. Halliwell, B. Free radicals and antioxidants - Quo vadis? *Trends Pharmacol. Sci.* **2011**, *32*, 125–130.
 35. Kasznicki, J.; Kosmalski, M.; Sliwinska, A.; Mrowicka, M.; Stanczyk, M.; Majsterek, I.; Drzewoski, J. Evaluation of oxidative stress markers in pathogenesis of diabetic neuropathy. *Mol. Biol. Rep.* **2012**, *39*, 8669–78.
 36. Tiedge, M.; Lortz, S.; Drinkgern, J.; Lenzen, S. Relation Between Antioxidant Enzyme Gene Expression and Antioxidative Defense Status of Insulin-Producing Cells. *Diabetes* **1997**, *46*.
 37. Drews, G.; Krippeit-Drews, P.; Duifer, M. Oxidative stress and beta-cell dysfunction. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **2010**, *460*, 703–718.
 38. Maechler, P.; Jornot, L.; Wollheim, C. B. Hydrogen Peroxide Alters Mitochondrial Activation and Insulin Secretion in Pancreatic Beta Cells. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 27905–27913.
 39. Shen, Q.; Pierce, J. D. Supplementation of Coenzyme Q10 among Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Healthcare* **2015**, *3*, 296–309.
 40. Ahmed, N. Advanced glycation endproducts - Role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **2005**, *67*, 3–21.
 41. Cervantes-Laurean, D.; Roberts, M. J.; Jacobson, E. L.; Jacobson, M. K. Nuclear proteasome activation and degradation of carboxymethylated histones in human keratinocytes following glyoxal treatment. *Free Radic. Biol. Med.* **2005**, *38*, 786–95.
 42. Tsukahara, H.; Sekine, K.; Uchiyama, M.; Kawakami, H.; Hata, I.; Todoroki, Y.; Hiraoka, M.;

- Kaji, M.; Yorifuji, T.; Momoi, T.; Yoshihara, K.; Beppu, M.; Mayumi, M. Formation of advanced glycosylation end products and oxidative stress in young patients with type 1 diabetes. *Pediatr. Res.* **2003**, *54*, 419–424.
43. Niwa, H.; Takeda, A.; Wakai, M.; Miyata, T.; Yasuda, Y.; Mitsuma, T.; Kurokawa, K.; Sobue, G. Accelerated formation of N epsilon-(carboxymethyl) lysine, an advanced glycation end product, by glyoxal and 3-deoxyglucosone in cultured rat sensory neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *248*, 93–7.
 44. Zamora, R.; Hidalgo, F. J. Coordinate Contribution of Lipid Oxidation and Maillard Reaction to the Nonenzymatic Food Browning. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2005**, *45*, 49–59.
 45. Richard, J. P. Mechanism for the formation of methylglyoxal from triosephosphates. *Biochem. Soc. Trans.* **1993**, *21*, 549–53.
 46. Schiekofer, S.; Andrassy, M.; Chen, J.; Rudofsky, G.; Schneider, J.; Wendt, T.; Stefan, N.; Humpert, P.; Fritsche, A.; Stumvoll, M.; Schleicher, E.; Häring, H.-U.; Nawroth, P. P.; Bierhaus, A. Acute hyperglycemia causes intracellular formation of CML and activation of ras, p42/44 MAPK, and nuclear factor kappaB in PBMCs. *Diabetes* **2003**, *52*, 621–33.
 47. Rabbani, N.; Thornalley, P. J. Methylglyoxal, glyoxalase 1 and the dicarbonyl proteome. *Amino Acids* **2012**, *42*, 1133–42.
 48. Edeas, M.; Attaf, D.; Mailfert, A.; Nasu, M.; Joubet, R. Maillard Reaction , mitochondria and oxidative stress : Potential role of antioxidants ` action de Maillard , mitochondrie et stress oxydatif : quel ro `le pour les antioxydants ? *Re. Pathol. Biol.* **2010**, *58*, 220–225.
 49. Tessier, J.; Fre, C. D.; C. Delgado-Andrade, F. J. Tessier, C. Niquet-Leridon, I. Seiquer, M. P. N. Study of the urinary and faecal excretion of N e -carboxymethyllysine in young human volunteers. *Amino Acids* **2012**, *43*, 595–602.
 50. Semba, R. D.; Ang, A.; Talegawkar, S.; Crasto, C.; Dalal, M.; Jardack, P.; Traber, M. G.; Ferrucci, L.; Arab, L. Dietary intake associated with serum versus urinary carboxymethyl-lysine, a major advanced glycation end product, in adults: the Energetics Study. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2012**, *66*, 3–9.
 51. Roncero-Ramos, I.; Delgado-Andrade, C.; Tessier, F. J.; Niquet-Léridon, C.; Strauch, C.; Monnier, V. M.; Navarro, M. P. Metabolic transit of N(ε)-carboxymethyl-lysine after consumption of AGEs from bread crust. *Food Funct.* **2013**, 1032–1039.
 52. Förster, A.; Kühne, Y.; Henle, T. Studies on absorption and elimination of dietary Maillard reaction products. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2005**, *1043*, 474–481.
 53. Ahmed, N.; Babaei-Jadidi, R.; Howell, S. K.; Beisswenger, P. J.; Thornalley, P. J. Degradation products of proteins damaged by glycation, oxidation and nitration in clinical type 1 diabetes. *Diabetologia* **2005**, *48*, 1590–1603.
 54. Koschinsky, T.; He, C. J.; Mitsuhashi, T.; Bucala, R.; Liu, C.; Buenting, C.; Heitmann, K.; Vlassara, H. Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): an environmental risk factor in diabetic nephropathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 6474–9.
 55. Foerster, A.; Henle, T. Glycation in food and metabolic transit of dietary AGEs (advanced glycation end-products): studies on the urinary excretion of pyrraline. *Biochem. Soc. Trans.* **2003**, *31*.
 56. Méndez, J. D.; Xie, J.; Aguilar-Hernández, M.; Méndez-Valenzuela, V. Trends in advanced glycation end products research in diabetes mellitus and its complications. *Mol. Cell. Biochem.* **2010**, *341*, 33–41.
 57. Lyons, T. J.; Silvestri, G.; Dunn, J. A.; Dyer, D. G.; Baynes, J. W. Role of glycation in modification of lens crystallins in diabetic and nondiabetic senile cataracts. *Diabetes* **1991**, *40*, 1010–5.
 58. Stoner, L.; Lucero, A. a; Palmer, B. R.; Jones, L. M.; Young, J. M.; Faulkner, J. Inflammatory biomarkers for predicting cardiovascular disease. *Clin. Biochem.* **2013**.
 59. Hofmann, T. Chemoselective synthesis of peptides containing major advanced glycation end-products of lysine and arginine. *J. Pept. Res.* **2005**, *66*, 111–124.
 60. Thorpe, S. R.; Baynes, J. W. Role of the Maillard reaction in diabetes mellitus and diseases of aging. *Drugs Aging* **1996**, *9*, 69–77.
 61. Miyata, T.; Kurokawa, K.; van Ypersele de Strihou, C. Relevance of oxidative and carbonyl

- stress to long-term uremic complications. *Kidney Int. Suppl.* **2000**, *58*, S120–S125.
62. Krautwald, M.; Münch, G. Review Advanced glycation end products as biomarkers and gerontotoxins – A basis to explore methylglyoxal-lowering agents for Alzheimer's disease? *Exp. Gerontol.* **2010**, *45*, 744–751.
 63. HIPKISS, A. R. Does Chronic Glycolysis Accelerate Aging? Could This Explain How Dietary Restriction Works? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2006**, *1067*, 361–368.
 64. Morgan, P. E.; Sheahan, P. J.; Pattison, D. I.; Davies, M. J. Methylglyoxal-induced modification of arginine residues decreases the activity of NADPH-generating enzymes. *Free Radic. Biol. Med.* **2013**, *61C*, 229–242.
 65. Degenhardt, T. P.; Gi, L.; Reddy, S.; Thorpe, S. R.; Diamandis, E. P.; Baynes, J. W. The serum concentration of the advanced glycation end-product N-(carboxymethyl)lysine is increased in uremia. *Kidney Int.* **1997**, *52*, 1064–1067.
 66. Degenhardt, T. P.; Thorpe, S. R.; Baynes, J. W. Chemical modification of proteins by methylglyoxal. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*. **1998**, *44*, 1139–45.
 67. Lederer, M. O.; Bühler, H. P. Cross-linking of proteins by Maillard processes--characterization and detection of a lysine-arginine cross-link derived from D-glucose. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 1081–8.
 68. Miller, A. G.; Meade, S. J.; Gerrard, J. A. New insights into protein crosslinking via the Maillard reaction: structural requirements, the effect on enzyme function, and predicted efficacy of crosslinking inhibitors as anti-ageing therapeutics. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 843–52.
 69. Sell, D. R.; Biemel, K. M.; Reihl, O.; Lederer, M. O.; Strauch, C. M.; Monnier, V. M. Glucosepane Is a Major Protein Cross-link of the Senescent Human Extracellular Matrix. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 12310–12315.
 70. Eguía, J. G. J. Diseño y aplicación de procedimientos analíticos para la determinación de productos de glicosilación avanzada (AGEs) en muestras biológicas, Universidad de Guanajuato, 2006.
 71. Bierhaus, A.; Hofmann, M. A.; Ziegler, R.; Nawroth, P. P. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. *Cardiovasc. Res.* **1998**, *37*, 586–600.
 72. Lederer, M. O.; Klaiber, R. G. Cross-linking of proteins by Maillard processes: characterization and detection of lysine-arginine cross-links derived from glyoxal and methylglyoxal. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 2499–507.
 73. Hartkopf, J.; Pahlke, C.; Ledermann, G.; Erbersdobler, H. F. Determination of Nε-carboxymethyllysine by a reversed-phase high-performance liquid chromatography method. *J. Chromatogr. A* **1994**, *672*, 242–246.
 74. Ames, J. M. Determination of N epsilon-(carboxymethyl)lysine in foods and related systems. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2008**, *1126*, 20–24.
 75. Reddy, S.; Bichler, J.; Wells-Knecht, K. J.; Thorpe, S. R.; Baynes, J. W. N epsilon-(carboxymethyl)lysine is a dominant advanced glycation end product (AGE) antigen in tissue proteins. *Biochemistry* **1995**, *34*, 10872–10878.
 76. Uribarri, J.; Cai, W.; Ramdas, M.; Goodman, S.; Pyzik, R.; Xue, C.; Li, Z.; Striker, G. E.; Vlassara, H. Restriction of advanced glycation end products improves insulin resistance in human type 2 diabetes: Potential role of AGER1 and SIRT1. *Diabetes Care* **2011**, *34*, 1610–1616.
 77. Yamagishi, S.; Matsui, T.; Nakamura, K. Possible involvement of tobacco-derived advanced glycation end products (AGEs) in an increased risk for developing cancers and cardiovascular disease in former smokers. *Med. Hypotheses* **2008**, *71*, 259–261.
 78. Cerami, C.; Founds, H.; Nicholl, I.; Mitsuhashi, T.; Giordano, D.; Vanpatten, S.; Lee, A.; Al-Abed, Y.; Vlassara, H.; Bucala, R.; Cerami, A. Tobacco smoke is a source of toxic reactive glycation products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 13915–20.
 79. Assar, S. H.; Moloney, C.; Lima, M.; Magee, R.; Ames, J. M. Determination of Nepsilon-(carboxymethyl)lysine in food systems by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Amino Acids* **2009**, *36*, 317–26.
 80. Rodriguez-Aller, M.; Gurny, R.; Veuthey, J.-L.; Guilleme, D. Coupling ultra high-pressure

- liquid chromatography with mass spectrometry: constraints and possible applications. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1292*, 2–18.
81. Erbersdobler, H. F.; Somoza, V. Forty years of furosine - Forty years of using Maillard reaction products as indicators of the nutritional quality of foods. *Mol. Nutr. Food Res.* **2007**, *51*, 423–430.
 82. Ferreira, A. E. N.; Ponces Freire, A. M. J.; Voit, E. O. A quantitative model of the generation of N ϵ -(carboxymethyl)lysine in the Maillard reaction between collagen and glucose. *Biochem. J.* **2003**, *376*, 109–121.
 83. Wolff, S. P.; Dean, R. T. Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of “autoxidative glycosylation” in diabetes. *Biochem. J.* **1987**, *245*, 243–50.
 84. Glomb, M. A.; Monnier, V. M. Mechanism of protein modification by glyoxal and glycolaldehyde, reactive intermediates of the Maillard reaction. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 10017–26.
 85. Ahmeds, M. U.; Thorpe, S. R.; Baynes, J. W. Identification of W-Carboxymethyllysine as a Degradation Product of Fructoselysine in Glycated Protein. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 4889–4894.
 86. Han, L.; Li, L.; Li, B.; Zhao, D.; Li, Y.; Xu, Z.; Liu, G. Hydroxyl radical induced by lipid in Maillard reaction model system promotes diet-derived N ϵ -carboxymethyllysine formation. *Food Chem. Toxicol.* **2013**, *60*, 536–541.
 87. Thorpe, S. R.; Baynes, J. W. CML: a brief history. *Int. Congr. Ser.* **2002**, *1245*, 91–99.
 88. Wells-Knecht, K. J.; Zyzak, D. V.; Litchfield, J. E.; Thorpe, S. R.; Baynes, J. W. Mechanism of autoxidative glycosylation: identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autoxidative modification of proteins by glucose. *Biochemistry* **1995**, *34*, 3702–9.
 89. Nagai, R.; Araki, T.; Hayashi, C. M.; Hayase, F.; Horiuchi, S. Identification of N epsilon-(carboxyethyl)lysine, one of the methylglyoxal-derived AGE structures, in glucose-modified protein: mechanism for protein modification by reactive aldehydes. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2003**, *788*, 75–84.
 90. Dyer, D. G.; Blackledge, J. A.; Thorpe, S. R.; Baynes, J. W. Formation of Pentosidine during Nonenzymatic Browning of Proteins by Glucose. **1991**, 0–6.
 91. Calabrese, V.; Mancuso, C.; Sapienza, M.; Puleo, E.; Calafato, S.; Cornelius, C.; Finocchiaro, M.; Mangiameli, A.; Di Mauro, M.; Stella, A. M. G.; Castellino, P. Oxidative stress and cellular stress response in diabetic nephropathy. *Cell Stress Chaperones* **2007**, *12*, 299–306.
 92. Piarulli, F.; Sartore, G.; Ceriello, A.; Ragazzi, E.; Reitano, R.; Nollino, L.; Cosma, C.; Fedele, D.; Lapolla, A. Relationship between glyco-oxidation, antioxidant status and microalbuminuria in type 2 diabetic patients. *Diabetologia* **2009**, *52*, 1419–1425.
 93. Kerkeni, M.; Saidi, A.; Bouzidi, H.; Letaief, A.; Ben Yahia, S.; Hammami, M. Pentosidine as a biomarker for microvascular complications in type 2 diabetic patients. *Diabetes Vasc. Dis. Res.* **2012**, *10*, 239–245.
 94. Lapolla, A.; Reitano, R.; Baccarin, L.; Sartore, G.; Plebani, M.; Fedele, D. Pentosidine Plasma Levels and Relation with Metabolic Control in Diabetic Patients. *Horm. Metab. Res.* **2005**, *37*, 252–256.
 95. Gillery, P.; Jaisson, S. Usefulness of non-enzymatic post-translational modification derived products (PTMDPs) as biomarkers of chronic diseases. *J. Proteomics* **2013**, *92*, 228–38.
 96. Vos, P. A. J. M.; Welsing, P. M. J.; Huisman, A. M.; Oostveen, J. C. M.; Reijman, M.; Damen, J.; Mastbergen, S. C.; Lafeber, F. P. J. G.; DeGroot, J.; Huisman, A. M.; Oostveen, J. C. M.; Reijman, M.; Damen, J.; Mastbergen, S. C.; Lafeber, F. P. J. G. Skin pentosidine in very early hip/knee osteoarthritis (CHECK) is not a strong independent predictor of radiographic progression over 5 years follow-up. *Osteoarthritis Cartilage* **2013**, *21*, 823–30.
 97. Henle, T.; Schwarzenbolz, U.; Klostermeyer, H. Detection and quantification of pentosidine in foods. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* **1997**, *204*, 95–98.
 98. Nakayama, T.; Hayase, F.; Kato, H. Formation of .EPSILON.- (2-formyl-5-hydroxymethylpyrrol-1-yl)-L-norleucine in the maillard reaction between D-glucose and L-lysine. *Agric. Biol. Chem.* **1980**, *44*, 1201–1202.
 99. Portero-Otin, M.; Nagaraj, R. H.; Monnier, V. M. Chromatographic evidence for pyralline

- formation during protein glycation in vitro and in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1247*, 74–80.
100. Shipanova, I. N.; Glomb, M. a; Nagaraj, R. H. Protein modification by methylglyoxal: chemical nature and synthetic mechanism of a major fluorescent adduct. *Arch. Biochem. Biophys.* **1997**, *344*, 29–36.
 101. Wilker, S. C.; Chellan, P.; Arnold, B. M.; Nagaraj, R. H. Chromatographic quantification of argpyrimidine, a methylglyoxal-derived product in tissue proteins: comparison with pentosidine. *Anal. Biochem.* **2001**, *290*, 353–8.
 102. Nakadate, Y.; Uchida, K.; Shikata, K.; Yoshimura, S.; Azuma, M.; Hirata, T. Biochemical and Biophysical Research Communications The formation of argpyrimidine , a methylglyoxal – arginine adduct , in the nucleus of neural cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *378*, 209–212.
 103. Iijima, K.; Murata, M.; Takahara, H.; Irie, S.; Fujimoto, D. Identification of N ω - carboxymethylarginine as a novel acid-labile advanced glycation end product in collagen. *Biochem. J.* **2000**, *347*, 23–27.
 104. Odani, H.; Shinzato, T.; Usami, J.; Matsumoto, Y.; Brinkmann Frye, E.; Baynes, J. W.; Maeda, K. Imidazolium crosslinks derived from reaction of lysine with glyoxal and methylglyoxal are increased in serum proteins of uremic patients: evidence for increased oxidative stress in uremia. *FEBS Lett.* **1998**, *427*, 381–5.
 105. Arena, S.; Salzano, A. M.; Renzone, G.; Ambrosio, C. D.; Scaloni, A. Non enzymatic glycation and glycooxidation protein products in foods and diseases: an interconnected, complex scenario fully open to innovative proteomic studies. *Mass Spectrom. Rev.* **2014**, *33*, 49–77.
 106. Thornalley, P. J.; Battah, S.; Ahmed, N.; Karachalias, N.; Agalou, S.; Babaei-Jadidi, R.; Dawnay, A. Quantitative screening of advanced glycation endproducts in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry. *Biochem. J.* **2003**, *375*, 581–92.
 107. Wro, K.; Garay-sevilla, M. E.; Nava, L. E.; Malacara, J. M. Novel analytical approach to monitoring advanced glycosylation end products in human serum with on-line spectrophotometric and spectrofluorometric detection in a flow system. *Clin. Chem.* **1997**, *43*, 1563–1569.
 108. Garay-Sevilla, M. E.; Regalado, J. C.; Malacara, J. M.; Nava, L. E.; Wróbel-Zasada, K.; Castro-Rivas, A.; Wróbel, K. Advanced glycosylation end products in skin, serum, saliva and urine and its association with complications of patients with Type 2 diabetes mellitus. *J. Endocrinol. Invest.* **2005**, *28*, 223–230.
 109. Sharp, P. S.; Rainbow, S.; Mukherjee, S. Serum levels of low molecular weight advanced glycation end products in diabetic subjects. *Diabet. Med.* **2003**, *20*, 575–9.
 110. Münch, G.; Keis, R.; Weßels, A.; Riederer, P.; Bahner, U.; Heidland, A.; Niwa, T.; Lemke, H.; Schinzel, R.; I, P. C.; Hubland, A. Determination of Advanced Glycation End Products in Serum by Fluorescence Spectroscopy and Competitive ELISA 1). *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **1997**, *35*, 669–677.
 111. Mulder, D. J.; Water, T. Van De; Lutgers, H. L.; Graaff, R.; Gans, R. O.; Zijlstra, F.; Smit, A. J. Skin Autofluorescence, a Novel Marker for Glycemic and Oxidative Stress-Derived Advanced Glycation Endproducts: An Overview of Current Clinical Studies, Evidence, and Limitations. *Diabetes Technol. Ther.* **2006**, *8*, 523–535.
 112. Uribarri, J.; Woodruff, S.; Goodman, S.; Cai, W.; Chen, X. U. E.; Pyzik, R.; Yong, A.; Striker, G. E.; Vlassara, H. Advanced Glycation End Products in Foods and a Practical Guide to Their Reduction in the Diet. *J. Am. Diet. Assoc.* **2010**, *110*, 911–916.e12.
 113. Nagai, R.; Fujiwara, Y.; Mera, K.; Yamagata, K.; Sakashita, N.; Takeya, M. Immunochemical detection of N ϵ -(carboxyethyl)lysine using a specific antibody. *J. Immunol. Methods* **2008**, *332*, 112–120.
 114. Sanaka, T.; Funaki, T.; Tanaka, T.; Hoshi, S.; Niwayama, J.; Taitoh, T.; Nishimura, H.; Higuchi, C. Plasma pentosidine levels measured by a newly developed method using ELISA in patients with chronic renal failure. *Nephron* **2002**, *91*, 64–73.
 115. Makita, Z.; Vlassara, H.; Cerami, A.; Bucala, R. Immunochemical detection of advanced glycosylation end products in vivo. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 5133–8.

116. Onorato, J. M.; Thorpe, S. R.; Baynes, J. W. Immunohistochemical and ELISA assays for biomarkers of oxidative stress in aging and disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1998**, *854*, 277–90.
117. Charissou, A.; Ait-Ameur, L.; Birlouez-Aragon, I. Evaluation of a gas chromatography/mass spectrometry method for the quantification of carboxymethyllysine in food samples. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1140*, 189–94.
118. Goldberg, T.; Cai, W.; Peppas, M.; Dardaine, V.; Baliga, B. S.; Uribarri, J.; Vlassara, H. Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods. *J. Am. Diet. Assoc.* **2004**, *104*, 1287–91.
119. Tareke, E.; Forslund, A.; Lindh, C. H.; Fahlgren, C.; Östman, E. Isotope dilution ESI-LC-MS/MS for quantification of free and total Nε-(1-Carboxymethyl)-L-Lysine and free Nε-(1-Carboxyethyl)-L-Lysine: Comparison of total Nε-(1-Carboxymethyl)-L-Lysine levels measured with new method to ELISA assay in gruel samples. *Food Chem.* **2013**, *141*, 4253–9.
120. Troise, A. D.; Fiore, A.; Wiltafsky, M.; Fogliano, V. Quantification of Nε-(2-Furoylmethyl)-l-lysine (furosine), Nε-(Carboxymethyl)-l-lysine (CML), Nε-(Carboxyethyl)-l-lysine (CEL) and total lysine through stable isotope dilution assay and tandem mass spectrometry. *Food Chem.* **2015**, *188*, 357–364.
121. Drusch, S.; Faist, V.; Erbersdobler, H. F. Determination of Nε-carboxymethyllysine in milk products by a modified reversed-phase HPLC method. *Food Chem.* **1999**, *65*, 547–553.
122. Scheijen, J. L. J. M.; Clevers, E.; Engelen, L.; Dagnelie, P. C.; Brouns, F.; Stehouwer, C. D. A.; Schalkwijk, C. G. Analysis of advanced glycation endproducts in selected food items by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry: Presentation of a dietary AGE database. *Food Chem.* **2016**, *190*, 1145–1150.
123. Hull, G. L. J.; Woodside, J. V.; Ames, J. M.; Cuskelly, G. J. Nε-(carboxymethyl)lysine content of foods commonly consumed in a Western style diet. *Food Chem.* **2012**, *131*, 170–174.
124. Niquet-Léridon, C.; Tessier, F. J. Quantification of Nε-carboxymethyl-lysine in selected chocolate-flavoured drink mixes using high-performance liquid chromatography–linear ion trap tandem mass spectrometry. *Food Chem.* **2011**, *126*, 655–663.
125. Teerlink, T.; Barto, R.; Ten Brink, H. J.; Schalkwijk, C. G. Measurement of Nε-(carboxymethyl)lysine and Nε-(carboxyethyl)lysine in human plasma protein by stable-isotope-dilution tandem mass spectrometry. *Clin. Chem.* **2004**, *50*, 1222–8.
126. Zhou, Y.; Lin, Q.; Jin, C.; Cheng, L.; Zheng, X.; Dai, M.; Zhang, Y. Simultaneous Analysis of Nε-(Carboxymethyl)Lysine and Nε-(Carboxyethyl)Lysine in Foods by Ultra-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry with Derivatization by 9-Fluorenylmethyl Chloroformate. *J. Food Sci.* **2015**, *80*, C207–C217.
127. Giorgio, P.; Medana, C.; Visentin, S.; Dal, F.; Meineri, G. Effect of cooking method on carnosine and its homologues, pentosidine and thiobarbituric acid-reactive substance contents in beef and turkey meat. *Food Chem.* **2012**, *132*, 80–85.
128. Hull, G. L. J.; Woodside, J. V.; Ames, J. M.; Cuskelly, G. J. Validation study to compare effects of processing protocols on measured Nε-(carboxymethyl)lysine and Nε-(carboxyethyl)lysine in blood. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **2013**, *53*, 129–133.
129. Kuang, L.; Jing, Z.; Wang, J.; Ma, L.; Liu, X.; Yang, J. Quantitative determination of ε-N-carboxymethyl-L-lysine in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2014**, *90*, 1–6.
130. Vogeser, M.; Seger, C. A decade of HPLC–MS/MS in the routine clinical laboratory — Goals for further developments. *Clin. Biochem.* **2008**, *41*, 649–662.
131. Scheijen, J. L. J. M.; van de Waarenburg, M. P. H.; Stehouwer, C. D. a; Schalkwijk, C. G. Measurement of pentosidine in human plasma protein by a single-column high-performance liquid chromatography method with fluorescence detection. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2009**, *877*, 610–614.
132. Gomes, R.; Silva, M. S.; Quintas, A.; Cordeiro, C. Argpyrimidine, a methylglyoxal-derived advanced glycation end-product in familial amyloidotic polyneuropathy. **2005**, *345*, 339–345.
133. Pavel, M. A. Pentosidine in osteoarthritis: HPLC determination in body fluids and in tissues. **2006**, 923–927.
134. Mikulíková, K.; Eckhardt, A.; Kunes, J.; Zicha, J.; Miksík, I. Advanced glycation end-product

- pentosidine accumulates in various tissues of rats with high fructose intake. *Physiol. Res.* **2008**, *57*, 89–94.
135. Ahmed, N.; Argirov, O. K.; Minhas, H. S.; Cordeiro, C. A. A.; Thornalley, P. J. Assay of advanced glycation endproducts (AGEs): surveying AGEs by chromatographic assay with derivatization by 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate and application to Nepsilon-carboxymethyl-lysine- and Nepsilon-(1-carboxyethyl)lysine-modified albumin. *Biochem. J.* **2002**, *364*, 1–14.
 136. Naila, A.; Thornalley, P. Chromatographic assay of glycation adducts in human serum albumin glycated in vitro by derivatization with 6-aminoquinolyl-N- hydroxysuccinimidyl-carbamate and intrinsic fluorescenc. *Biochem. J.* **2002**, *364*, 15–24.
 137. Friess, U.; Waldner, M.; Wahl, H. G.; Lehmann, R.; Haring, H. U.; Voelter, W.; Schleicher, E. Liquid chromatography-based determination of urinary free and total N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine excretion in normal and diabetic subjects. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2003**, *794*, 273–280.
 138. Chen, G.; Scott Smith, J. Determination of advanced glycation endproducts in cooked meat products. *Food Chem.* **2015**, *168*, 190–195.
 139. Mildner-Szkudlarz, S.; Siger, A.; Szwengiel, A.; Bajerska, J. Natural compounds from grape by-products enhance nutritive value and reduce formation of CML in model muffins. *Food Chem.* **2015**, *172*, 78–85.
 140. Fujiwara, Y.; Kiyota, N.; Tsurushima, K.; Yoshitomi, M.; Mera, K.; Sakashita, N.; Takeya, M.; Ikeda, T.; Araki, T.; Nohara, T.; Nagai, R. Natural compounds containing a catechol group enhance the formation of Nε-(carboxymethyl)lysine of the Maillard reaction. *Free Radic. Biol. Med.* **2011**, *50*, 883–91.
 141. Zhang, G.; Huang, G.; Xiao, L.; Mitchell, A. E. Determination of advanced glycation endproducts by LC-MS/MS in raw and roasted almonds (*Prunus dulcis*). *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 12037–46.
 142. Kerkeni, M.; Santos, I.; Jaisson, S.; Dandana, A.; Addad, F.; Gillery, P.; Hammami, M. Increased serum concentrations of pentosidine are related to presence and severity of coronary artery disease. *Thromb. Res.* **2014**, *134*, 6–11.
 143. Gonzalez-reche, L. M.; Kucharczyk, A.; Musiol, A. K.; Kraus, T. Determination of N e - (carboxymethyl) lysine in exhaled breath condensate using isotope dilution liquid chromatography / electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, 2747–2752.
 144. Kawabata, K.; Yoshikawa, H.; Saruwatari, K.; Akazawa, Y.; Inoue, T.; Kuze, T.; Sayo, T.; Uchida, N.; Sugiyama, Y. The presence of N(ε)-(Carboxymethyl) lysine in the human epidermis. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1814*, 1246–52.
 145. Tessier, F. J.; Birlouez-Aragon, I. Health effects of dietary Maillard reaction products: the results of ICARE and other studies. *Amino Acids* **2012**, *42*, 1119–31.
 146. Delgado-Andrade, C.; Tessier, F. É. J.; Niquet-Leridon, C.; Seiquer, I.; Navarro, M. P. Study of the urinary and faecal excretion of Ne-carboxymethyllysine in young human volunteers. *Amino Acids* **2012**, *43*, 595–602.
 147. Mildner-Szkudlarz, S.; Siger, A.; Szwengiel, A.; Przygo??ski, K.; Wojtowicz, E.; Zawirska-Wojtasiak, R. Phenolic compounds reduce formation of N??-(carboxymethyl)lysine and pyrazines formed by Maillard reactions in a model bread system. *Food Chem.* **2017**, *231*, 175–184.
 148. Jiao, Y.; He, J.; Li, F.; Tao, G.; Zhang, S.; Zhang, S.; Qin, F.; Zeng, M.; Chen, J. Nε - (carboxymethyl)lysine and Nε -(carboxyethyl)lysine in tea and the factors affecting their formation. *Food Chem.* **2017**, *232*, 683–688.
 149. Jean L.J.M. Scheijen, Nordin M.J. Hanssen, Marleen M. van Greevenbroek, Carla J. Van der Kallen, Edith J.M. Feskens, Coen D.A. Stehouwer, C. G. S. Dietary intake of advanced glycation endproducts is associated with higher levels of advanced glycation endproducts in plasma and urine : The CODAM study. *Clin. Nutr.* **2017**, 1–7.
 150. Tessier, F. J.; Niquet-L??ridon, C.; Jacolot, P.; Jouquand, C.; Genin, M.; Schmidt, A. M.; Grossin, N.; Boulanger, E. Quantitative assessment of organ distribution of dietary protein-

- bound ¹³C-labeled N^ε-carboxymethyllysine after a chronic oral exposure in mice. *Mol. Nutr. Food Res.* **2016**, *60*, 2446–2456.
151. Michalska, A.; Honke, J.; Węsyński, G.; Andlauer, W. Effect of drying parameters on the formation of early and intermediate stage products of the Maillard reaction in different plum (*Prunus domestica* L.) cultivars. *LWT - Food Sci. Technol.* **2016**, *65*, 932–938.
 152. Sun, X.; Tang, J.; Wang, J.; Rasco, B. A.; Lai, K.; Huang, Y. Formation of free and protein-bound carboxymethyllysine and carboxyethyllysine in meats during commercial sterilization. *Meat Sci.* **2016**, *116*, 1–7.
 153. Schwarzenbolz, U.; Hofmann, T.; Sparmann, N.; Henle, T. Free Maillard Reaction Products in Milk Reflect Nutritional Intake of Glycated Proteins and Can Be Used to Distinguish “organic” and “conventionally” Produced Milk. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 5071–5078.
 154. Helou, C.; Gadonna-Widehem, P.; Robert, N.; Branlard, G.; Thebault, J.; Librere, S.; Jacquot, S.; Mardon, J.; Piquet-Pissaloux, A.; Chapron, S.; Chatillon, A.; Niquet-Léridon, C.; Tessier, F. J. The impact of raw materials and baking conditions on Maillard reaction products, thiamine, folate, phytic acid and minerals in white bread. *Food Funct.* **2016**, *7*, 2498–2507.
 155. Trevisan, A. J. B.; De Almeida Lima, D.; Sampaio, G. R.; Soares, R. A. M.; Markowicz Bastos, D. H. Influence of home cooking conditions on Maillard reaction products in beef. *Food Chem.* **2016**, *196*, 161–169.
 156. Yu, L.; He, Z.; Zeng, M.; Zheng, Z.; Chen, J. Effect of irradiation on N^ε-carboxymethyl-lysine and N^ε-carboxyethyl-lysine formation in cooked meat products during storage. *Radiat. Phys. Chem.* **2016**, *120*, 73–80.
 157. Yoshihara, K.; Kiyonami, R.; Shimizu, Y.; Beppu, M. Determination of urinary pyrroline by solid-phase extraction and high performance liquid chromatography. *Biol. Pharm. Bull.* **2001**, *24*, 863–6.
 158. Han, Y.; Randell, E.; Vasdev, S.; Gill, V.; Curran, M.; Newhook, L. A.; Grant, M.; Hagerty, D.; Schneider, C. Plasma advanced glycation endproduct, methylglyoxal-derived hydroimidazolone is elevated in young, complication-free patients with Type 1 diabetes. *Clin. Biochem.* **2009**, *42*, 562–9.
 159. Vos, P. a J. M.; Mastbergen, S. C.; Huisman, a M.; Boer, T. N. De; DeGroot, J.; Polak, A. A.; Lafeber, F. P. J. G.; de Boer, T. N.; DeGroot, J.; Polak, A. A.; Lafeber, F. P. J. G. In end stage osteoarthritis, cartilage tissue pentosidine levels are inversely related to parameters of cartilage damage. *Osteoarthritis Cartilage* **2012**, *20*, 233–40.
 160. Valle, E.; Storace, D.; Sanguineti, R.; Carter, R.; Odetti, P.; Geor, R.; Bergero, D. Association of the glycoxidative stress marker pentosidine with equine laminitis. *Vet. J.* **2013**, *196*, 445–450.
 161. Sroga, G. E.; Siddula, A.; Vashishth, D. Glycation of human cortical and cancellous bone captures differences in the formation of maillard reaction products between glucose and ribose. *PLoS One* **2015**, *10*, 1–19.
 162. Chen, S. J.; Aikawa, C.; Yoshida, R.; Matsui, T. Methylglyoxal-derived hydroimidazolone residue of plasma protein can behave as a predictor of prediabetes in Spontaneously Diabetic Torii rats. *Physiol. Rep.* **2015**, *3*, e12477.
 163. Sternberg, M.; M'bemba, J.; Urios, P.; Borsos, A. M.; Selam, J. L.; Peyroux, J.; Slama, G. Skin collagen pentosidine and fluorescence in diabetes were predictors of retinopathy progression and creatinemia increase already 6 years after punch-biopsy. *Clin. Biochem.* **2016**, *49*, 225–231.
 164. Vaculík, J.; Braun, M.; Dungal, P.; Pavelka, K.; Stepan, J. J. Serum and bone pentosidine in patients with low impact hip fractures and in patients with advanced osteoarthritis. *BMC Musculoskelet. Disord.* **2016**, *17*, 308.
 165. Liang, Z.; Li, L.; Qi, H.; Zhang, X.; Xu, Z.; Li, B. Determination of free-form and peptide bound pyrroline in the commercial drinks enriched with different protein hydrolysates. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1–15.
 166. Liang, Z.; Li, L.; Fu, Q.; Zhang, X.; Xu, Z.; Li, B. Formation and elimination of pyrroline in the Maillard reaction in a saccharide-lysine model system. *J. Sci. Food Agric.* **2016**, *96*, 2555–2564.
 167. Wang, J.; Tian, S.-L.; Sun, W.-H.; Lin, H.; Li, Z.-X. Determination of N^ε-Carboxymethyl-lysine Content in Muscle Tissues of Turbot by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Chinese J. Anal. Chem.* **2015**, *43*, 1187–1192.

168. Bosch, L.; Sanz, M. L.; Montilla, A.; Alegría, A.; Farré, R.; del Castillo, M. D. Simultaneous analysis of lysine, N ϵ -carboxymethyllysine and lysinoalanine from proteins. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2007**, *860*, 69–77.
169. Ahmed, M. U.; Brinkmann Frye, E.; Degenhardt, T. P.; Thorpe, S. R.; Baynes, J. W. N-epsilon-(carboxyethyl)lysine, a product of the chemical modification of proteins by methylglyoxal, increases with age in human lens proteins. *Biochem. J.* **1997**, *324* (Pt 2, 565–70.
170. Mesías, M.; N, L. P. Determination of carboximetilysine in toasted and baked foods. *ARS Pharm.* **2010**, *51*, 23–29.
171. Petrovič, R.; Futas, J.; Chandoga, J.; Jakuš, V. Rapid and simple method for determination of N ϵ -(carboxymethyl)lysine and N ϵ -(carboxyethyl)lysine in urine using gas chromatography[so]l mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr.* **2005**, *19*, 649–654.
172. Charissou, A.; Ait-Ameur, L.; Birlouez-Aragon, I. Kinetics of formation of three indicators of the maillard reaction in model cookies: influence of baking temperature and type of sugar. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 4532–9.
173. Wellner, A.; Huettl, C.; Henle, T. Formation of Maillard reaction products during heat treatment of carrots. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 7992–7998.
174. Wellner, A.; Nußpickel, L.; Henle, T. Glycation compounds in peanuts. *Eur Food Res Technol* **2012**, *234*, 423–429.
175. Zhang, Q.; Ames, J. M.; Smith, R. D.; Baynes, J. W.; Metz, T. O. A Perspective on the Maillard Reaction and the Analysis of Protein Glycation by Mass Spectrometry : Probing the Pathogenesis of Chronic Disease research articles. *J. Proteome Res.* **2009**, *8*, 754–769.
176. Lapolla, A.; Molin, L.; Traldi, P. Protein glycation in diabetes as determined by mass spectrometry. *Int. J. Endocrinol.* **2013**, *2013*, 412103.
177. Lapolla, A.; Fedele, D.; Reitano, R.; Aricò, N. C.; Seraglia, R.; Traldi, P.; Marotta, E.; Tonani, R. Enzymatic digestion and mass spectrometry in the study of advanced glycation end products/peptides. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2004**, *15*, 496–509.
178. Barnaby, O. S.; Cerny, R. L.; Clarke, W.; Hage, D. S. Comparison of modification sites formed on human serum albumin at various stages of glycation. *Clin. Chim. Acta* **2011**, *412*, 277–285.
179. Colzani, M.; Aldini, G.; Carini, M. Mass spectrometric approaches for the identification and quantification of reactive carbonyl species protein adducts. *J. Proteomics* **2013**, *92*, 28–50.
180. Ahmed, N.; Dobler, D.; Dean, M.; Thornalley, P. J. Peptide Mapping Identifies Hotspot Site of Modification in Human Serum Albumin by Methylglyoxal Involved in Ligand Binding and Esterase Activity. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 5724–5732.
181. Zhang, Q.; Tang, N.; Schepmoes, A. A.; Phillips, L. S.; Smith, R. D.; Metz, T. O. Proteomic profiling of nonenzymatically glycated proteins in human plasma and erythrocyte membranes. *J. Proteome Res.* **2008**, *7*, 2025–32.
182. Frolov, A.; Blüher, M.; Hoffmann, R. Glycation sites of human plasma proteins are affected to different extents by hyperglycemic conditions in type 2 diabetes mellitus. *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, *406*, 5755–5763.
183. Lapolla, A.; Fedele, D.; Seraglia, R.; Catinella, S.; Baldo, L.; Aronica, R.; Traldi, P. A new effective method for the evaluation of glycated intact plasma proteins in diabetic subjects. *Diabetologia* **1995**, *38*, 1076–81.
184. Hempe, J. M.; Gomez, R.; McCarter, R. J.; Chalew, S. A. High and low hemoglobin glycation phenotypes in type 1 diabetes: a challenge for interpretation of glycemic control. *J. Diabetes Complications* *16*, 313–20.
185. Shao, C. H.; Capek, H. L.; Patel, K. P.; Wang, M.; Tang, K.; DeSouza, C.; Nagai, R.; Mayhan, W.; Periasamy, M.; Bidasee, K. R. Carbonylation Contributes to SERCA2a Activity Loss and Diastolic Dysfunction in a Rat Model of Type 1 Diabetes. *Diabetes* **2011**, *60*, 947–959.
186. Dai, Z.; Wang, B.; Sun, G.; Fan, X.; Anderson, V. E.; Monnier, V. M. Identification of Glucose-Derived Cross-Linking Sites in Ribonuclease A. *J. Proteome Res.* **2008**, *7*, 2756–2768.
187. Matsutani, H.; Kusumoto, S.; Koizumi, R.; Shiba, T. N ϵ -(carboxymethyl)-l-lysine in the acid hydrolysate of *Sagittaria pygmaea*. *Phytochemistry* **1979**, *18*, 661–662.
188. Csuk, R.; Stark, S.; Barthel, A.; Kluge, R.; Ströhl, D. A Robust Synthesis of N ϵ -(Carboxymethyl)-l-lysine (CML). *Synthesis (Stuttg)*. **2009**, *2009*, 1933–1934.

189. Teerlink, T. Measurement of CML in human plasma protein by Stable-Isotope. Dilution Tandem Mass Spectrometry. *Clin. Chem.* **2004**, *50*, 1222–1228.
190. Delatour, T.; Fenaille, F.; Parisod, V.; Vera, F. A.; Buetler, T. Synthesis, tandem MS- and NMR-based characterization, and quantification of the carbon 13-labeled advanced glycation endproduct, 6-N-carboxymethyllysine. *Amino Acids* **2006**, *30*, 25–34.
191. Furfaro, A. L.; Menini, S.; Patriarca, S.; Pesce, C.; Odetti, P.; Cottalasso, D.; Marinari, U. M.; Pronzato, M. A.; Traverso, N. HNE-dependent molecular damage in diabetic nephropathy and its possible prevention by N-acetyl-cysteine and oxerutin. *Biofactors* **2005**, *24*, 291–8.
192. Kuśmierk, K.; Chwatko, G.; Głowacki, R.; Bald, E. Determination of endogenous thiols and thiol drugs in urine by HPLC with ultraviolet detection. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2009**, *877*, 3300–3308.
193. Michailidis, Y.; Karagounis, L. G.; Terzis, G.; Jamurtas, A. Z.; Spengos, K.; Tsoukas, D.; Chatzinikolaou, A.; Mandalidis, D.; Stefanetti, R. J.; Papassotiriou, I.; Athanasopoulos, S.; Hawley, J. A.; Russell, A. P.; Fatouros, I. G. Thiol-based antioxidant supplementation alters human skeletal muscle signaling and attenuates its inflammatory response and recovery after intense eccentric exercise. *Am. J. Clin. Nutr.* **2013**, *98*, 233–245.
194. Monostori, P.; Wittmann, G.; Karg, E.; Túri, S. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples: an in-depth review. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2009**, *877*, 3331–46.
195. Giustarini, D.; Dalle-Donne, I.; Milzani, A.; Rossi, R. Low molecular mass thiols, disulfides and protein mixed disulfides in rat tissues: influence of sample manipulation, oxidative stress and ageing. *Mech. Ageing Dev.* **2011**, *132*, 141–8.
196. Schwarzenbolz, U.; Henle, T. Cysteine Mediated Formation of N -ε-Carboxymethyllysine (CML) on Proteins. **2009**, *27*, 25–28.
197. Schwarzenbolz, U.; Mende, S.; Henle, T. Model Studies on Protein Glycation Influence of Cysteine on the Reactivity of Arginine and Lysine Residues toward Glyoxal. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2008**, *1126*, 248–252.
198. Danehy, J. P.; Parameswaran, K. N. Acidic dissociation constants of thiols. *J. Chem. Eng. Data* **1968**, *13*, 386–389.
199. Jomova, K.; Valko, M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* **2011**, *283*, 65–87.
200. Barbusiński, K. Fenton reaction - controversy concerning the chemistry. *Ecol. Chem. Eng. S* **2009**, *Vol. 16*, 347–358.
201. Mattie, M. D.; Freedman, J. H. Copper-inducible transcription: regulation by metal- and oxidative stress-responsive pathways. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **2004**, *286*.
202. Benters, J.; Flögel, U.; Schäfer, T.; Leibfritz, D.; Hechtenberg, S.; Beyersmann, D. Study of the interactions of cadmium and zinc ions with cellular calcium homeostasis using ¹⁹F-NMR spectroscopy. *Biochem. J.* **1997**, *322 (Pt 3)*, 793–9.
203. Bray, T. M.; Bettger, W. J. The physiological role of zinc as an antioxidant. *Free Radic. Biol. Med.* **1990**, *8*, 281–91.
204. Uriu-Adams, J. Y.; Keen, C. L. Copper, oxidative stress, and human health. *Mol. Aspects Med.* **2005**, *26*, 268–298.
205. Baraka-Vidot, J.; Navarra, G.; Leone, M.; Bourdon, E.; Militello, V.; Rondeau, P. Deciphering metal-induced oxidative damages on glycated albumin structure and function. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2014**, *1840*, 1712–1724.
206. Ramirez Segovia, A. S.; Wrobel, K.; Acevedo Aguilar, F. J.; Corrales Escobosa, A. R.; Wrobel, K. Effect of Cu(II) on in vitro glycation of human serum albumin by methylglyoxal: LC-MS - based proteomic approach. *Metallomics* **2016**, *9*, 132–140.
207. Wu, Q.; Li, S.-Y.; Yang, T.; Xiao, J.; Chu, Q.-M.; Li, T.; Xie, B.-J.; Sun, Z.-D. Inhibitory effect of lotus seedpod oligomeric procyanidins on advanced glycation end product formation in a lactose-lysine model system. *Electron. J. Biotechnol.* **2014**, *1–9*.
208. Winther, J. R.; Thorpe, C. Quantification of thiols and disulfides. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**.
209. Zhuang, X.; Pang, X.; Zhang, W.; Wu, W.; Zhao, J.; Yang, H.; Qu, W. Effects of zinc and manganese on advanced glycation end products (AGEs) formation and AGEs-mediated

- endothelial cell dysfunction. *Life Sci.* **2012**, *90*, 131–139.
210. Argirova, M. D.; Ortwerth, B. J. Activation of protein-bound copper ions during early glycation: study on two proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* **2003**, *420*, 176–184.
 211. Niquet-L??ridon, C.; Jacolot, P.; Niamba, C. N.; Grossin, N.; Boulanger, E.; Tessier, F. J. The rehabilitation of raw and brown butters by the measurement of two of the major Maillard products, N??-carboxymethyl-lysine and 5-hydroxymethylfurfural, with validated chromatographic methods. *Food Chem.* **2015**, *177*, 361–368.
 212. Hušek, P. Chloroformates in gas chromatography as general purpose derivatizing agents. *J. Chromatogr. B* **1998**, *717*, 57–91.
 213. Ubhi, B. K.; Davenport, P. W.; Welch, M.; Riley, J.; Griffin, J. L.; Connor, S. C. Analysis of chloroformate-derivatised amino acids, dipeptides and polyamines by LC-MS/MS. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2013**, *934*, 79–88.
 214. Leung, E. M. K.; Chan, W. A novel reversed-phase HPLC method for the determination of urinary creatinine by pre-column derivatization with ethyl chloroformate: Comparative studies with the standard Jaffé and isotope-dilution mass spectrometric assays. *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, *406*, 1807–1812.
 215. Kostić, N. D. S.; Dotsikas, Y.; Malenović, A. D. S.; Medenica, M. Effects of derivatization reagents consisting of n-alkyl chloroformate/n-alcohol combinations in LC-ESI-MS/MS analysis of zwitterionic antiepileptic drugs. *Talanta* **2013**, *116*, 91–99.
 216. Park, J.-Y.; Myung, S.-W.; Kim, I.-S.; Choi, D.-K.; Kwon, S.-J.; Yoon, S.-H. Simultaneous measurement of serotonin, dopamine and their metabolites in mouse brain extracts by high-performance liquid chromatography with mass spectrometry following derivatization with ethyl chloroformate. *Biol. Pharm. Bull.* **2013**, *36*, 252–8.
 217. Delatour, T.; Hegele, J.; Parisod, V.; Richoz, J.; Maurer, S.; Steven, M.; Buetler, T. Analysis of advanced glycation endproducts in dairy products by isotope dilution liquid chromatography – electrospray tandem mass spectrometry . The particular case of carboxymethyllysine. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 2371–2381.
 218. Thornalley, P. J.; Rabbani, N. Detection of oxidized and glycated proteins in clinical samples using mass spectrometry - A user's perspective. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**.
 219. Smart, K. F.; Aggio, R. B. M.; Van Houtte, J. R.; Villas-Bôas, S. G. Analytical platform for metabolome analysis of microbial cells using methyl chloroformate derivatization followed by gas chromatography-mass spectrometry. *Nat. Protoc.* **2010**, *5*, 1709–1729.
 220. ICH Harmonised Tripartite Guideline Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). In *ICH Harmonised Tripartite Guideline*; 2005; p. 17.
 221. Macías-Cervantes, M. H.; Rodríguez-Soto, J. M. D.; Uribarri, J.; Díaz-Cisneros, F. J.; Cai, W.; Garay-Sevilla, M. E. Effect of a diet restricted in advanced glycation end products and exercise on metabolic parameters in adult overweight men. *Nutrition* **2014**, *31*, 446–451.
 222. Liu, X.; Zheng, L.; Zhang, R.; Liu, G.; Xiao, S.; Qiao, X.; Wu, Y.; Gong, Z. Toxicological evaluation of advanced glycation end product N??-(carboxymethyl)lysine: Acute and subacute oral toxicity studies. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2016**, *77*, 65–74.
 223. Sun, X.; Tang, J.; Wang, J.; Rasco, B. A.; Lai, K.; Huang, Y. Formation of Nε-carboxymethyllysine and Nε-carboxyethyllysine in ground beef during heating as affected by fat, nitrite and erythorbate. *J. Food Meas. Charact.* **2017**, *11*, 320–328.
 224. Gao, X.; Pujos-Guillot, E.; Martin, J. F.; Galan, P.; Juste, C.; Jia, W.; Sebedio, J. L. Metabolite analysis of human fecal water by gas chromatography/mass spectrometry with ethyl chloroformate derivatization. *Anal. Biochem.* **2009**, *393*, 163–175.
 225. Dittrich, R.; Dragonas, C.; Kannenkeril, D.; Hoffmann, I.; Mueller, A.; Beckmann, M. W.; Pischetsrieder, M. A diet rich in Maillard reaction products protects LDL against copper induced oxidation ex vivo, a human intervention trial. *Food Res. Int.* **2009**, *42*, 1315–1322.
 226. Rodríguez, L. M.; Alatossava, T. Effects of copper supplement on growth and viability of strains used as starters and adjunct cultures for Emmental cheese manufacture. *J. Appl. Microbiol.* **2008**, *105*, 1098–1106.
 227. Mato Rodriguez, L.; Ritvanen, T.; Joutsjoki, V.; Rekonen, J.; Alatossava, T. The role of copper in the manufacture of Finnish Emmental cheese. *J. Dairy Sci.* **2011**, *94*, 4831–42.

228. Ojeda, A. G.; Wrobel, K.; Escobosa, A. R. C.; Elguera, J. C. T.; Garay-Sevilla, M. E.; Wrobel, K. Molybdenum and Copper in Four Varieties of Common Bean (*Phaseolus vulgaris*): New Data of Potential Utility in Designing Healthy Diet for Diabetic Patients. *Biol. Trace Elem. Res.* **2015**, *163*, 244–254.
229. Batista, B. L.; Grotto, D.; Carneiro, M. F. H.; Barbosa, F. Evaluation of the Concentration of Nonessential and Essential Elements in Chicken, Pork, and Beef Samples Produced in Brazil. *J. Toxicol. Environ. Heal. Part A* **2012**, *75*, 1269–1279.
230. Gerber, N.; Brogioli, R.; Hattendorf, B.; Scheeder, M. R. L.; Wenk, C.; Günther, D. Variability of selected trace elements of different meat cuts determined by ICP-MS and DR-ICPMS. *animal* **2009**, *3*, 166–172.
231. Saiki, M. K.; Martin, B. A.; Thompson, L. D.; Welsh, D. Copper, cadmium, and zinc concentrations in juvenile Chinook salmon and selected fish-forage organisms (aquatic insects) in the upper Sacramento River, California. *Water. Air. Soil Pollut.* **2001**, *132*, 127–139.
232. Nguyen, H. T.; van der Fels-Klerx, H. J.; van Boekel, M. A. J. S. N ϵ -(carboxymethyl)lysine: A Review on Analytical Methods, Formation, and Occurrence in Processed Food, and Health Impact. *Food Rev. Int.* **2014**, *30*, 36–52.
233. Sarahí, J. O.; Kazimierz, Wrobel. Alma Rosa, Corrales Escobosa. Katarzyna, W. Efecto de diferentes agentes químicos en la formación de N ϵ -carboximetil-lisina utilizando el ácido glioxílico, un metabolito universal asociado con el desarrollo y progreso de la diabetes. *Acta Univ.* **2015**, *25*, 17–21.
234. Tanaka, A.; Kaneto, H.; Miyatsuka, T.; Yamamoto, K.; Yoshiuchi, K.; Yamasaki, Y.; Shimomura, I.; Matsuoka, T.-A.; Matsuhisa, M. Role of copper ion in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Endocr. J.* **2009**, *56*, 699–706.
235. Meyer, J. A.; Spence, D. M.; Tsang, S. S.; Davison, A.; Moon, J.; Orgiazzi, J.; Hodgkin, D. M. C.; Hubbard, R. E.; Al., N. W. I. et; Zhao, H.; Cnaan, A. A perspective on the role of metals in diabetes: past findings and possible future directions. *Metallomics* **2009**, *1*, 32–41.
236. Tarwadi, K. V.; Agte, V. V. Effect of Micronutrients on Methylglyoxal-Mediated In Vitro Glycation of Albumin. *Biol. Trace Elem. Res.* **2011**, *143*, 717–725.
237. Saari, J. T.; Dahlen, G. M. Early and advanced glycation end-products are increased in dietary copper deficiency. *J. Nutr. Biochem.* **1999**, *10*, 210–214.
238. Wilker, D.; Heinrich, A. B.; Kroh, L. W. Model Studies on the Antioxidative Effect of Polyphenols in Thermally Treated D-Glucose/ L-Alanine Solutions with Added Metal Ions. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 10973–10979.
239. Nashalian, O.; Yaylayan, V. A. Sugar-Conjugated Bis(glycinato)copper(II) Complexes and Their Modulating Influence on the Maillard Reaction. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 4353–4360.
240. Ramonaitytė, D. T.; Keršienė, M.; Adams, A.; Tehrani, K. A.; Kimpe, N. De The interaction of metal ions with Maillard reaction products in a lactose–glycine model system. *Food Res. Int.* **2009**, *42*, 331–336.
241. Conato, C.; Contino, A.; Maccarrone, G.; Magri, A.; Remelli, M.; Tabbi, G. Copper(II) complexes with L-lysine and L-ornithine: is the side-chain involved in the coordination? *Thermochim. Acta* **2000**, *362*, 13–23.
242. Nashalian, O.; Yaylayan, V. A. Thermally Induced Oxidative Decarboxylation of Copper Complexes of Amino Acids and Formation of Strecker Aldehyde. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 8518–8523.
243. Corrales Escobosa, A. R.; Wrobel, K.; Yanez Barrientos, E.; Jaramillo Ortiz, S.; Ramirez Segovia, A. S.; Wrobel, K. Effect of different glycation agents on Cu(II) binding to human serum albumin, studied by liquid chromatography, nitrogen microwave-plasma atomic-emission spectrometry, inductively-coupled-plasma mass spectrometry, and high-resolution molecular-mass spect. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407*.
244. Seneviratne, C.; Dombi, G. W.; Liu, W.; Dain, J. A. The in vitro glycation of human serum albumin in the presence of Zn(II). *J. Inorg. Biochem.* **2011**, *105*, 1548–1554.
245. Stanila, A.; Marcu, A.; Rusu, D.; Rusu, M.; David, L. Spectroscopic studies of some copper(II) complexes with amino acids. *J. Mol. Struct.* **2007**, *834–836*, 364–368.

246. Helou, C.; Jacolot, P.; Niquet-Léridon, C.; Gadonna-Widehem, P.; Tessier, F. J. Maillard reaction products in bread: A novel semi-quantitative method for evaluating melanoidins in bread. *Food Chem.* **2016**, *190*, 904–911.
247. Nguyen, H. T.; van der Fels-Klerx, H. J.; van Boekel, M. A. J. S. Kinetics of N ϵ -(carboxymethyl)lysine formation in aqueous model systems of sugars and casein. *Food Chem.* **2016**, *192*, 125–133.
248. Roldan, M.; Loebner, J.; Degen, J.; Henle, T.; Antequera, T.; Ruiz-Carrascal, J. Advanced glycation end products, physico-chemical and sensory characteristics of cooked lamb loins affected by cooking method and addition of flavour precursors. *Food Chem.* **2015**, *168*, 487–495.
249. Sun, X.; Tang, J.; Wang, J.; Rasco, B. A.; Lai, K.; Huang, Y. Formation of advanced glycation endproducts in ground beef under pasteurisation conditions. *Food Chem.* **2015**, *172*, 802–807.
250. Chalamaiyah, M.; Dinesh kumar, B.; Hemalatha, R.; Jyothirmayi, T. Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. *Food Chem.* **2012**, *135*, 3020–3038.
251. USDA Agriculture HComposition of foods: finfish and shellfish products; USDA, 1987;

ANEXO