



UNIVERSIDAD DE
GUANAJUATO

Campus Guanajuato

División de Ciencias Naturales y Exactas

Departamento de Química

Posgrado Institucional de Química

Óxido de etileno como agente glicante- estudio analítico

Tesis

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias Químicas

Presenta:

Q.F.B. Jorge Iván Rodríguez Méndez

Guanajuato, Gto.

Contenido

1. Introducción	8
1.1. Usos comerciales y efectos biológicos de óxido de etileno	8
1.2. Fuentes endógenas y exógenas de EtO en el organismo humano	8
1.3. Procesos de glicación	10
1.4. Modificación de biomoléculas por EtO	11
1.5. Albúmina como proteína modelo para estudiar procesos de glicación	15
2. Objetivo general	19
3.2. Reactivos	19
3.3. Análisis de datos y análisis estadístico	20
4. Resultados y discusión	21
4.1 Modificación de aminoácidos libres y de albúmina de suero humano con óxido de etileno en condiciones <i>in vitro</i>.	21
4.2 Caracterización de las modificaciones en aminoácidos	23
4.3 Estudio proteómico de las modificaciones en la secuencia de albúmina causadas por EtO. 33	
4.4 Análisis proteómico de las modificaciones de albúmina mediante capLC-ESI-QTOF-MS 34	
4.5 Efecto de la modificación de albúmina sobre la interacción de proteína con agentes terapéuticos (caso de cloranfenicol).	48
5 Conclusiones	53
Referencias:	56

Índice de figuras.

Figura 1. Estructura del óxido de etileno	8
Figura 2. Rutas de formación de potenciales biomarcadores de exposición a EtO y tipos de muestra analizados. (P450 - citocromo P450; Hgb - hemoglobina; EH – epóxido hidrolasa; GSH – glutatión; GST – glutatión transferasa; N7-HEG - N7-hidroxietil guanina)[13]	9
Figura 3. Las rutas de exposición a etileno y óxido de etileno: 1 – ruta de exposición exógena, 2 – ruta de exposición endógena [10].	9
Figura 4. Esquema de procedimientos de Edman modificado (MED) y de hidrólisis ácida (AH), como preparación de hemoglobina para la determinación de HEV [53].	13
Figura 5. Secuenciación <i>de novo</i> de un péptido de la proteína terapéutica, modificado por EtO en metionina (izquierda) y esquema de reacción correspondiente (derecha) [58].	14
Figura 6. Relaciones molares de EtO respecto a albúmina y a los aminoácidos individuales, utilizadas en experimentos de modificación de HSA <i>in vitro</i>	23
Figura 7. Espectros de cisteína (a) y de cisteína después de incubación con EtO (b), obtenidos por ESI-QTOF-MS en modo positivo.	24
Figura 8. Espectros de cisteína (a) y de cisteína incubada con EtO (b), obtenidos por ESI-QTOF-MS en modo negativo	25
Figura 9. Espectro de fragmentación del aducto Cys+1EtO adquirido por ESI(+)-QTOF-MS/MS, junto con las estructuras asignadas a los fragmentos individuales.	25
Figura 10. Espectro de arginina (a) y de arginina incubada con EtO (b), obtenido por ESI(+)-QTOF-MS.	26
Figura 11. Espectros de arginina (a) y de arginina incubada con EtO (b), obtenidos utilizando ESI(-)-QTOF MS.	27
Figura 12. Espectro de fragmentación del aducto Arg+1EtO adquirido mediante ESI(+)-QTOF-MS/MS, junto con las estructuras asignadas a los fragmentos individuales.	27
Figura 13. Espectros de lisina (a) y lisina incubada con EtO (b), obtenidos utilizando ESI(+)-QTOF-MS.....	28
Figura 14. Espectros de lisina (a) y lisina incubada con EtO (b), obtenidos utilizando ESI(-)-QTOF-MS.....	29
Figura 15. Espectro de fragmentación del ion m/z 191.1360 adquirido en ESI(+), correspondiente al aducto Lys+1EtO, junto con las estructuras asignadas a los fragmentos individuales.....	29
Figura 16. Espectro de histidina (a) e histidina incubada con EtO (b), obtenidos por ESI(+)-QTOF-MS.....	30
Figura 17. Espectro de histidina (a) e histidina incubada con EtO (b), obtenidos por ESI(-)-QTOF-MS.....	30
Figura 18. Espectro de fragmentación del ion m/z 200.1032 adquirido en ESI(+), correspondiente al aducto His+1EtO, junto con las estructuras asignadas a los fragmentos individuales.	31
Figura 19. Espectro de metionina (a) y metionina incubada con EtO (b), obtenidos utilizando ESI(+)-QTOF-MS.....	31
Figura 20. Espectro de metionina (a) y metionina incubada con EtO (b), obtenidos utilizando ESI(-)-QTOF-MS.	32
Figura 21. Espectro de fragmentación del ion m/z 194.0845 adquirido en ESI(+), correspondiente al aducto Met+1EtO, junto con las estructuras asignadas a los fragmentos individuales.	32

Figura 22. Espectros MALDI-TOF-MS de muestra 1 - albúmina control 14.9 $\mu\text{mol/L}$ (a); muestra 6 - albúmina incubada con exceso de EtO 1000:1 (b) y muestra 2 - albúmina incubada con exceso de EtO 100:1 (c).	34
Figura 23. Cromatogramas obtenidos por capLC-ESI(+)-QTOF-MS para albúmina control no expuesta a EtO (a), albúmina incubada con EtO en relación 1:100 (b), y albúmina incubada con EtO en relación 1:1000 (c), las cuales fueron previamente digeridas con tripsina.	35
Figura 24. Numero de péptidos encontrados en las distintas muestras de albúmina	36
Figura 25. Información obtenida mediante herramienta Unimod.org de la modificación tipo etanoyl en la estructura de proteínas	38
Figura 26. Espectro de masas en tándem del péptido K.EFNAETFTFHADICTLSEK.E (tiempo de retención 34.3 min, $m/z= 2249.0478$, carga +3), resultante de los digestos de las muestras de albúmina control.	39
Figura 27. Espectro de masas en tándem del péptido K.ALVLIAFAQYLQQCPFEDHVK.L (tiempo de retención 47.7 min, $m/z= 2587.3089$, carga +3) resultante de los digestos de las muestras de albúmina control.	39
Figura 28. Acercamiento del espectro MS/MS del péptido K.EFNAETFTFHADICTLSEK.E de la Figura 26, visualizando fragmentos y(6) y y(5), correspondientes a la pérdida de cisteína hidroxietilada.	40
Figura 29. Acercamiento del espectro MS/MS del péptido K.ALVLIAFAQYLQQCPFEDHVK.L de la Figura 27, visualizando fragmentos y(8) y y(7), correspondientes a la pérdida de cisteína hidroxietilada.	40
Figura 30. Cromatogramas del ion extraído del péptido K.EFNAETFTFHADICTLSEK.E adquiridos para albúmina control (azul), albúmina incubada con EtO en relación molar 1:100 (rojo) y en relación molar 1:1000 (verde).	41
Figura 31. Cromatogramas del ion extraído del péptido K.ALVLIAFAQYLQQCPFEDHVK.L adquiridos para albúmina control (azul), albúmina incubada con EtO en relación molar 1:100 (rojo) y en relación molar 1:1000 (verde).	41
Figura 32. Espectros de masas en tándem del péptido R.MPCAEDYLSVVLNQLCVLHEK.T resultante de los digestos de: Albúmina control (a); albúmina-EtO en relación 1:100 (b); y albúmina-EtO en relación 1:1000 (c). Se observa $\Delta m/z = 44.0262$ del fragmento b(3) entre albúmina control e incubada con EtO.	45
Figura 33. Anotación de los sitios específicos de modificación por hidroxietilación en la secuencia de 609 aminoácidos de HSA. (azul- residuos encontradas solamente para el exceso molar de EtO respecto a HSA 100:1; rojo – residuos encontrados para el exceso molar 1000:1; azul – residuos encontrados para ambos excesos molares del EtO).	46
Figura 34. Modelo tridimensional de albúmina de origen humano obtenido mediante la página web Uniprot.org	48
Figura 35. Estructura de HSA, en la cual se marcan subdominios y regiones; se observa la cavidad en la región sudoeste I (Sudlow I) donde se encuentra Trp-214 [95] (a) y la estructura de cloranfenicol (b).	49
Figura 36. Efecto de la concentración de cloranfenicol sobre fluorescencia de albúmina modificada con EtO (rojo) y albúmina control que no estaba en contacto con EtO (azul).	53

Índice de tablas.

Tabla 1. Algunos ejemplos de estudios enfocados en la modificación de albúmina in vitro.	16
Tabla 2. Preparación y composición de las soluciones de aminoácidos individuales para su incubación in vitro con óxido de etileno (EtO), los volúmenes se presentan en microlitros; las muestras incluyen aminoácidos control incubados sin EtO (Met-9, Cys-12, His-15, Arg-18 y Lys-21) y aminoácidos incubados con exceso molar de EtO en relación 1:5 (Met-10, 11, His-16, 17, Arg-19, 20 y Lys-22, 23).....	21
Tabla 3. Preparación y composición de las disoluciones de albúmina para su incubación con EtO. Los volúmenes se presentan en microlitros; las muestras incluyen albúmina control sin EtO (1 y 5), con exceso molar de EtO 1:100 y con exceso molar de EtO 1:1000.	22
Tabla 4. Distribución relativa de abundancias de iones en espectros ESI(+)-QTOF-MS adquiridos para aminoácidos incubados con exceso de EtO en relación molar 5:1.....	33
Tabla 5. Resultado de la búsqueda MASCOT de proteínas humanas en la muestra control (albúmina sin exposición a EtO).	36
Tabla 6. Comparación de los porcentajes de cobertura en la secuencia de albúmina de origen humano en las muestras de albúmina control (1,5), albúmina incubada con EtO en relación molar 1:100 (2-4) y albúmina incubada con EtO en relación molar 1:1000 (6-8).....	37
Tabla 7. Secuencias de péptidos modificados encontrados en albúmina control, que no fue expuesta a EtO. (La cisteína marcada en rojo corresponde al sitio de modificación; X - número de veces que se detectó el péptido modificado en base a cuatro replicas; los datos se procesaron empleando el software ProteinScape 3.1 y la base de datos SwissProt 2021_03).	38
Tabla 8. Péptidos identificados en albúmina incubada con EtO en relación 1:100 y 1:1000 (El aminoácido marcado en rojo corresponde al sitio de modificación; X - número de veces que se detectó el péptido modificado en base a cuatro replicas; Los datos se procesaron empleando el software ProteinScape 3.1 y la base de datos SwissProt 2021_03.....	41
Tabla 9. Número de residuos de cada uno de los aminoácidos encontrados como modificados por hidroxietilación, dependiendo de las condiciones de exposición.	46
Tabla 10. Elaboración de las soluciones de albúmina con cloranfenicol	49
Tabla 11. Elaboración de las soluciones de albúmina modificada con EtO (B) con cloranfenicol .	49
Tabla 12. Secuencia de las soluciones preparadas para su análisis.....	50
Tabla 13. Resultados obtenidos por FIA-FLD para muestras de albúmina control (solución A) expuesta a diferentes concentraciones de cloranfenicol.....	51
Tabla 14. Resultados obtenidos por FIA-FLD para muestras de albúmina modificada con EtO (solución B) expuesta a diferentes concentraciones de cloranfenicol.	52

Resumen:

El objetivo de este trabajo de tesis es obtener nuevas evidencias del papel de óxido de etileno (EtO) como agente glicante mediante el análisis de las modificaciones en la secuencia de aminoácidos de la albúmina (HSA) causadas por EtO, utilizando diversas técnicas de espectrometría de masas. Inicialmente se diseñaron condiciones *in vitro* para llevar a cabo la modificación estructural de cinco aminoácidos (Cys, Lys, Arg, His y Met) por acción del EtO [1], para esto, se prepararon soluciones individuales de los aminoácidos en tampón de bicarbonato de amonio pH 7.8 y se incubaron a 37 °C por 24 h con EtO en exceso molar de 5. En paralelo, se obtuvieron muestras control, repitiendo el procedimiento sin agregar EtO. Todas mezclas de reacción se analizaron por ESI-QTOF-MS en modo positivo y negativo para adquirir los espectros de MS y MS/MS. Los datos obtenidos fueron abiertos en DataAnalysis 4.1, donde se realizó la recalibración y extracción de las señales basadas en espectros de MS y autoMS/MS. En base a análisis de datos, se estableció como orden de susceptibilidad a la hidroxietilación: Cys > Met > His > Lys > Arg. Gracias a esta información se identificaron como principales blancos de glicación: el grupo tiol en Cys, ϵ -amino en Lys, guanidino en Arg y α -amino en His y Met. Puesto que los grupos α -amino están implicados en enlaces peptídicos, se descartaron His y Met como posibles blancos de glicación. Para llevar a cabo la modificación de HSA por EtO, se emplearon condiciones similares a las aplicadas en los aminoácidos, pero con excesos molares de 100 y 1000 de EtO, así como un control. Para verificar si la modificación ocurre bajo las condiciones diseñadas, se obtuvieron los espectros de masas de HSA incubada con EtO y HSA control utilizando el sistema MALDI-TOF-MS. Los resultados mostraron un incremento de masa correspondiente a un par de grupos hidroxietilo ($\Delta m/z$ 90.1) para el exceso de 100, mientras que, para el exceso de 1000, el incremento correspondió a la adición de tres grupos hidroxietilo ($\Delta m/z$ 150.1). Después, se realizó el análisis proteómico, para ello se realizó la hidrólisis enzimática de la proteína y los péptidos resultantes se analizaron en el sistema capHPLC-ESI-QTOF MS operando la fuente de ionización en modo positivo. Los datos obtenidos se abrieron en DataAnalysis, donde se realizó la recalibración y desconvolución de las señales de péptidos en base a espectros de MS y auto MS/MS. Las listas de señales generadas se exportaron a ProteinScape 3.1.3 (BrukerDaltonics), donde se determinó número de los péptidos totales en cada una de las muestras. En total, se encontraron 404 péptidos, de estos 19 fueron exclusivos de HSA control, 26 del exceso 1:100 de EtO y 74 del exceso 1:1000 de EtO, lo cual confirma que EtO introduce modificaciones en HSA que aumentan conforme se incrementa su concentración. Se confirmó la identidad de la proteína usando la plataforma MASCOT, definiendo las modificaciones variables permitidas, entre ellas, la adición de un grupo etanoilo (hidroxietilo) ($\Delta m = 44.0262$) en residuos de Cys, Arg y Lys. Posteriormente se identificaron los péptidos y se asignaron los residuos específicos donde ocurrió la hidroxietilación. El aminoácido más susceptible fue Cys, con 20 sitios de modificación totales, siendo dos de HSA control, 12 de HSA expuesta a cualquier exceso de EtO y, además, uno y cinco en HSA incubada con excesos molares de 100 y 1000 de EtO respectivamente. Al evaluar otras posibles modificaciones cuya diferencia de masa es cercana a 44, se aseguró que la asignación de las modificaciones por hidroxietilación fuese la correcta. Finalmente, se evaluó el efecto de la modificación por EtO en HSA respecto a su capacidad de unión y transporte de fármacos, para esto se seleccionó un antibiótico (cloranfenicol), el cual se aplicó en tres diferentes excesos molares respecto a la proteína (43:1, 53:1, y 107:1). En todos los casos se realizó la medición de la fluorescencia nativa de la proteína, utilizando el sistema FIA-FLD. Para HSA control, se observó que después de 24 h de exposición al fármaco, la intensidad de fluorescencia disminuye conforme incrementa la concentración del fármaco llegando hasta un decremento del 15.1% de fluorescencia (relación molar 1:107), mientras que para HSA modificada con EtO, el porcentaje de disminución fue de 17.3% para la misma relación, por lo cual, se propone que la hidroxietilación en HSA causó cambios en la estructura tridimensional de la proteína que favorecieron

el acceso del cloranfenicol a los sitios de unión en albúmina. Sin embargo, dichos efectos fueron observados bajo condiciones específicas que podrían ser distintas al cambiar el tipo de fármaco o su relación molar con la proteína. En resumen, los resultados obtenidos en este trabajo confirmaron el potencial del EtO para introducir las modificaciones en residuos de Cys, Lys y Arg de la HSA mediante su hidroxietilación y que dichas modificaciones tuvieron efecto sobre la capacidad de la proteína para unir el fármaco cloranfenicol.

Palabras clave: Óxido de etileno (EtO), proteómica, ESI-QTOF-MS, DataAnalysis, MALDI-TOF-MS, capHPLC - ESI-QTOF MS, ProteinScape, cisteína, HPLC, ChemStation.

Óxido de etileno como agente glicante- estudio analítico

1. Introducción

1.1. Usos comerciales y efectos biológicos de óxido de etileno

Óxido de etileno (EtO) es un compuesto epoxi, con fórmula química H_2COCH_2 y masa molar de 44.05 g mol^{-1} (Figura 1). Es un gas altamente soluble en agua, reactivo y tóxico. A nivel industrial, EtO es producido para la síntesis de etilenglicol y de algunos surfactantes, pero también es utilizado para esterilización de utensilios médicos o de laboratorio y en preservación de algunos productos alimenticios [2].

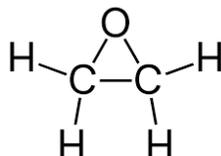


Figura 1. Estructura del óxido de etileno

La efectividad del EtO como biocida se sustenta en su afinidad a los grupos sulfhidrilo, amino, hidroxilo y a los grupos carboxílicos presentes en biomoléculas, provocando adición del grupo hidroxietilo. De esta manera, se altera no solamente la estructura de proteínas, ADN, ARN o de lípidos, pero sobre todo su funcionalidad. Debido a estos efectos tóxicos, EtO ha sido utilizado para eliminar microorganismos patógenos de semillas y/o especies [3].

Igual que en otros tipos de organismos, en humanos EtO forma aductos con biomoléculas, ejerciendo de esta manera efectos tóxicos. Como ejemplo, cabe mencionar que se ha relacionado la reacción anafiláctica de pacientes en diálisis con la modificación de albúmina sérica por EtO proveniente de esterilización de instrumentos médicos [4]. La exposición de humanos a EtO ha sido asociada con diferentes enfermedades, entre ellas padecimientos cardiovasculares [5], diabetes mellitus [6] y cáncer [7, 8].

1.2. Fuentes endógenas y exógenas de EtO en el organismo humano

Los humanos pueden estar expuestos a EtO exógeno, en las siguientes situaciones: (i) exposición ocupacional en sitios de trabajo o exposición crónica de población en cercanía de plantas industriales, (ii) uso de utensilios médicos esterilizados con EtO; (iii) humo de cigarro; (iv) combustión de fósiles u otras fuentes de emisión; (v) agua y productos alimenticios tratados con EtO. Por otro lado, EtO es producido en humanos *in vivo* a partir de etileno [9], el cual se genera en hígado o puede provenir de la actividad microbiana dentro de tracto digestivo [10]. En la Figura 2 y 3, se presentan esquemáticamente diferentes rutas endógenas y exógenas relacionadas con etileno y óxido de etileno [10].

En cuanto a fuentes externas, cabe señalar que EtO presente en aire entra fácilmente por los pulmones para ser distribuido en el organismo con sangre y metabolizado al etilenglicol o en menor grado formar conjugados con glutatión (GSH) [11]. Otras vías de acceso de EtO son por el contacto con la piel y por absorción en el tracto digestivo. Los dos tipos de metabolitos que se acaban de mencionar, forman parte de rutas catabólicas de detoxificación; mientras que etilenglicol se convierte en el ácido oxálico para generar el dióxido de carbono, la conjugación con GSH conduce a la formación de S-(2-hidroxietyl)cisteína (También encontrado en la literatura como: S-(2-carboximetil)cisteína)) y N-acetil-S-(2-hydroxietyl)cisteína [12].

En la Figura 2 se muestra, que el etileno a menudo es un precursor de EtO generado *in vivo*; además, se presentan esquemáticamente las biomoléculas con las que EtO forma aductos o altera su estructura. Estas reacciones se consideran responsables por efectos tóxicos del EtO y en la misma Figura 2 se incluyen posibles biomarcadores de exposición [13].

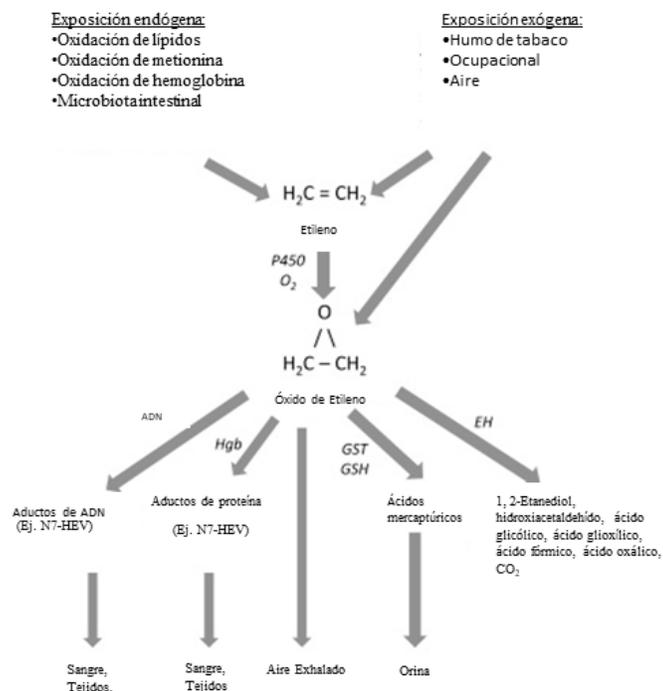


Figura 2. Rutas de formación de potenciales biomarcadores de exposición a EtO y tipos de muestra analizados. (P450 - citocromo P450; Hgb - hemoglobina; EH – epóxido hidrolasa; GSH – glutatión; GST – glutatión transferasa; N7-HEG - N7-hidroxietyl guanina)[13]

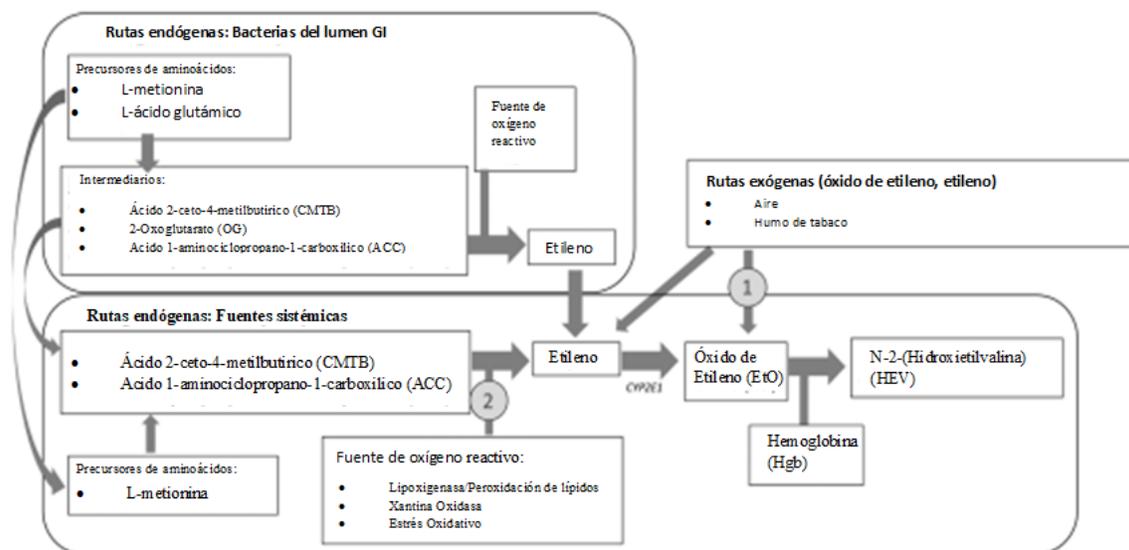


Figura 3. Las rutas de exposición a etileno y óxido de etileno: 1 – ruta de exposición exógena, 2 – ruta de exposición endógena [10].

Para limitar la exposición de los humanos a EtO mediante ingesta de alimentos, la Agencia de Protección Ambiental (USEPA) ha recomendado limitar su uso estableciendo máximas concentraciones permisibles de 7 mg kg⁻¹ y 940 mg kg⁻¹ para residuos de EtO y de su metabolito clorhidrina de etileno (2-cloroetanol: HOCH₂CH₂Cl), respectivamente, en semillas y especies [14].

1.3. Procesos de glicación

La glicación es un proceso químico espontáneo que comienza por la adición de azúcares reductores y/o sus productos de degradación a un grupo amino secundario o primario en proteínas [15], lípidos y ácidos nucleicos [16]. En el caso de proteínas, un grupo terminal amino reacciona con el grupo carbonilo para formar una base de Schiff [17]. Si la reacción sigue en curso, la base de Schiff sufre un reordenamiento para formar un producto de Amadori, el cual después de una serie de reacciones de oxidación, ciclización, deshidratación y condensación, da como resultado la formación de un grupo heterogéneo de compuestos químicamente estables, referidos como productos finales de glicación avanzada (AGEs, por sus siglas en inglés) [18].

Los procesos de glicación que ocurren dentro del organismo humano tienen un profundo efecto en la estructura y funcionalidad de proteínas, sobre todo en el contexto de enfermedades crónico-degenerativas, tales como diabetes mellitus tipo 2. Por otro lado, los procesos de glicación ocurren también durante la elaboración de alimentos, donde se generan diferentes tipos de compuestos, entre ellos los AGEs. Cabe mencionar que los procesos de glicación fueron primeramente estudiados y descritos por Louis Maillard [19] y por ello, de manera muy generalizada se definen como reacción Maillard. Tal como acaba de mencionarse, los AGEs no son los únicos productos de esta reacción. De hecho, algunos otros productos, tales como melanoidinas, aldehídos, compuestos furánicos, derivados de pirazina, etc. mejoran propiedades sensoriales a los alimentos [20].

La formación de AGEs en alimentos y en sistemas biológicos es de gran interés porque los AGEs se han asociado con efectos pro-inflamatorios y pro-oxidativos, especialmente en la diabetes e insuficiencia renal [21]. La N^ε-(carboximetil)lisina (CML) es uno de los AGEs que comúnmente se emplea como biomarcador de procesos de glicación. Para fines del análisis cuantitativo, CML se puede sintetizar a partir de lisina químicamente protegida en nitrógeno alfa para que el grupo amino épsilon reaccione con el grupo carbonilo por ejemplo de glioxal (GO); terminando la reacción, la desprotección se logra mediante la hidrólisis ácida [22]. En condiciones *in vivo* o en alimentos, CML puede formarse a partir de diferentes biomoléculas y glioxal como agente glicante.

La primera proteína glicada en ser descrita, fue la HbA1C (hemoglobina glicosilada), en 1955 por Kunkel y Wallenius, lo cual incrementó el interés en estudio de los procesos de glicación *in vivo* en el cuerpo humano [23].

Dentro del grupo de azúcares reductores, la glucosa es un agente glicante débil a comparación de los compuestos alfa-dicarbonil, como el glioxal (GO), metiglioxal (MGO) y la 3-deoxiglucosona (3-DG) [24], los cuales son precursores, intermediarios y propagadores de los AGEs y pueden ser formados de manera endógena [25]. En particular, MGO se genera como producto secundario en diversas rutas metabólicas [26], o por la descomposición espontánea de las triosas fosfato, autooxidación de carbohidratos, degradación de glucosa o la peroxidación de lípidos [27]. Normalmente la tasa de formación de MGO es de 120 μmol por día, pero algunos estudios demuestran que su formación durante la diabetes incrementa hasta 5 o 6 veces [28] actuando como agente glicante de las proteínas

y ácidos nucleicos [29]. Cabe mencionar que el MGO en proteínas causa la formación directa de AGEs en los residuos de arginina, lisina y cisteína [30].

En el caso del glioxal, de forma endógena se genera por la autooxidación de carbohidratos y ascorbato, degradación de proteínas glicadas y la peroxidación de lípidos [31], también puede ser generado directamente a partir de la glucosa mediante la condensación retroaldol e indirectamente por la autooxidación del intermediario glicolaldehído. El proceso de autooxidación se ve favorecido por la presencia de trazas de iones metálicos (Fe(III) y Cu(II)) en solución [32]. Otra forma en la cual la glucosa se puede transformar en glioxal es mediante un intermediario del tipo base de Schiff [25]. Manini y colaboradores demostraron que el glioxal puede ser formado por otros carbohidratos como la galactosa, fructosa, ribosa, arabinosa, ribulosa, gliceraldehído, adenosina, manitol y glicerol [33]. La 3-deoxiglucosona (3-DG), es sintetizada mediante la reacción de Maillard y también se ha reportado como un producto de la hidrólisis de la fructosa-3-fosfato, siendo este compuesto producido enzimáticamente a partir de la fructosa, lo cual sugiere que la formación de la 3-DG ocurre *in vivo* mediante la ruta del polirol [34].

También se ha propuesto que el humo de cigarro favorece la formación de AGEs dentro del organismo [35]. Cerami y colaboradores, evaluaron la formación de AGEs utilizando el humo de cigarro directamente además de los extractos acuosos de hojas de tabaco. Como resultado, se aislaron glicotoxinas de dichos extractos. Así mismo se demostró el efecto de glicotoxinas aisladas en la promoción de formación de los AGEs *in vivo* e *in vitro*. Se ha demostrado también que el humo de cigarro es 10 veces menos activo en la formación de AGEs a comparación de los extractos acuosos de hojas de tabaco. Las glicotoxinas del humo de cigarro al llegar a los alveolos pulmonares pueden pasar al torrente sanguíneo y, al reaccionar con grupos amino libres de biomoléculas, contribuyen en la formación de AGEs [36].

Como ya se ha mencionado antes, el EtO es considerado como agente glicante, debido a que reacciona con los grupos amino de proteínas; además, se ha mostrado su reactividad con grupo -SH en metionina o cisteína y con grupos carboxílicos. De manera general, la modificación consiste de hidroxietilación, en la cual los grupos carboxilo reaccionan más fácilmente con compuestos epoxi cuando se encuentran disociados, mientras que, en el caso de las aminas la reacción se ve más favorecida cuando se encuentran en su forma neutra [37].

1.4. Modificación de biomoléculas por EtO

Aminoácidos

El óxido de etileno es capaz de reaccionar con los grupos amino primarios, sulfhidrilo, hidroxilo y carboxilo de las proteínas, llegándose a observar la reacción de este compuesto con histidina, metionina, lisina [38], cisteína y tirosina [39]. Inicialmente, se llevó la reacción del óxido de etileno en soluciones acuosas de aminoácidos y en el caso particular de la histidina, se utilizó la proteína intacta como modelo de estudio. En este estudio se demostró que los átomos de nitrógeno del anillo de imidazol en la histidina y el átomo de azufre de la metionina o cisteína, bajo condiciones suaves de reacción sufren de una hidroxietilación en presencia de óxido de etileno, formándose el ion 1,3-bis-(hidroxietil)imidazolio, a partir del grupo imidazol y S-(2-hidroxietil)-N-acetil-metionina mediante reacción con la N-acetil-metionina [38]. En albúmina, la hidroxietilación de los grupos reactivos en aminoácidos depende del pH de la reacción. En el caso de los grupos amino reactivos de la histidina, lisina, tirosina y arginina, se observó un elevado rendimiento de reacción a valores de pH

iguales o mayores a sus respectivos pK. En tanto, los residuos de cisteína y metionina reaccionan con mayor facilidad cuando el pH es mayor a 7 y 3, respectivamente [39].

Cabe mencionar que los estudios que se acaban de mencionar fueron publicados hace más de 50 años, por lo que las herramientas analíticas fueron cromatografía en capa delgada, cromatografía semi-preparativa, electroforesis, entre otros. Hoy en día, al contar con sistemas cromatográficos muy potentes y con espectrometría de masas de alta resolución, es posible obtener evidencias directas sobre identidad de los productos de hidroxietilación de aminoácidos libres y de las proteínas.

Glutación

Se ha reportado que glutación, forma conjugados con EtO. Los metabolitos de dicha modificación presentes en orina es el ácido mercaptúrico, el cual tiene estructura de N-acetilcisteína sustituida en el átomo de azufre con el grupo hidroxietil [40]. Puesto que el glutación es el blanco de varios compuestos electrofílicos, en orina se pueden encontrar diferentes ácidos mercaptúricos; para su determinación se han propuesto procedimientos basados en HPLC-ESI-MS/MS [41, 42].

La hidroxietilación del glutación (HSEG) es un proceso no deseable ya que disminuye su poder antioxidante y de esta manera favorece la formación de especies reactivas de oxígeno y aumento de estrés oxidativo [43]. En animales de laboratorio expuestos a óxido de etileno, se observó una disminución significativa de glutación citosólico en paralelo al aumento de peroxidación de lípidos en hígado de ratas [44]. El metabolismo del óxido de etileno se lleva a cabo por conjugación mediante la enzima glutación S-transferasa (GST) T1 obteniendo como productos de reacción HSEG y N-acetil-S-(2-hidroxietil)-L-cisteína. Otra posible ruta de detoxificación de óxido de etileno es mediante la formación de etilenglicol gracias a la epoxihidrolasa [45].

Proteínas

Para referirse al estudio de aductos de proteínas con diferentes agentes químicos, a menudo se utiliza el término “aductómica” [46]. Como en otras ciencias ómicas, los análisis pueden tener carácter dirigido a la detección/cuantificación de ciertas modificaciones conocidas, o pueden tener carácter no-dirigido [47].

En cuanto a las modificaciones conocidas, algunas pueden ser utilizadas como biomarcadores de exposición a un xenobiótico y del riesgo relacionado con dicha exposición. Cabe mencionar que hemoglobina tiene relativamente larga vida (aprox. 3 meses) y que es un blanco de agentes glicantes. Cuando el agente glicante es glucosa (u otro azúcar reductor), la más abundante forma de hemoglobina glicosilada es la HbA1c y su concentración en la sangre refleja el estatus de glucemia de las últimas 6-8 semanas. La determinación de HbA1c se realiza mediante diversas técnicas, como HPLC, inmuno-aglutinación o electroforesis, siendo el método de rutina para el control de diabetes y sus complicaciones un sistema automatizado en base a cromatografía de intercambio iónico [48]. Cabe señalar que niveles <7 % son indicativos de un buen metabolismo de glucosa o un buen control de pacientes diabéticos. En el caso de EtO, la modificación mejor caracterizada de hemoglobina es la hidroxietilación de la N-terminal valina; de hecho la hidroxietil valina (HEV) se utiliza como biomarcador de la exposición a EtO a largo plazo (aprox. 3 meses) [49]. La sangre tiene composición química muy compleja, por lo que en el primer paso de determinación de HEV se separa la hemoglobina y posteriormente se libera N-terminal valina por el método de Edman. Cabe señalar que este método ha sido modificado para integrar en un solo paso la liberación y la derivatización de aminoácido N-terminal con pentafluorofenil isocianato para su determinación por cromatografía de

gases con detección FID, ECD [50] o por espectrometría de masas [51]. Recientemente, se ha reportado el método de determinación, basado en cromatografía de líquidos – espectrometría de masas en tándem [52]. Varios autores observaron baja reproducibilidad de los resultados obtenidos mediante liberación de HEV por método de Edman; para resolver el recurrente problema, se ha propuesto llevar a cabo la hidrólisis completa de hemoglobina con HCl 9M (viales cerrados, 100 °C, 16 h), seguida por evaporación del ácido y reconstitución en metanol. Para la determinación de HEV en el hidrolizado, se propuso un procedimiento HPLC-ESI-MS/MS con monitoreo de reacciones múltiples (transición m/z 162.1125→116.107) [53]. En la Figura 4, se presentan esquemáticamente los dos procedimientos de tratamiento de hemoglobina que se acaban de mencionar [53]. Cabe señalar que la liberación de aminoácidos en hidrólisis ácida abre la posibilidad de identificar/caracterizar estructuralmente todas modificaciones causadas por EtO, utilizando herramientas de separación cromatográfica y espectrometría de masas.

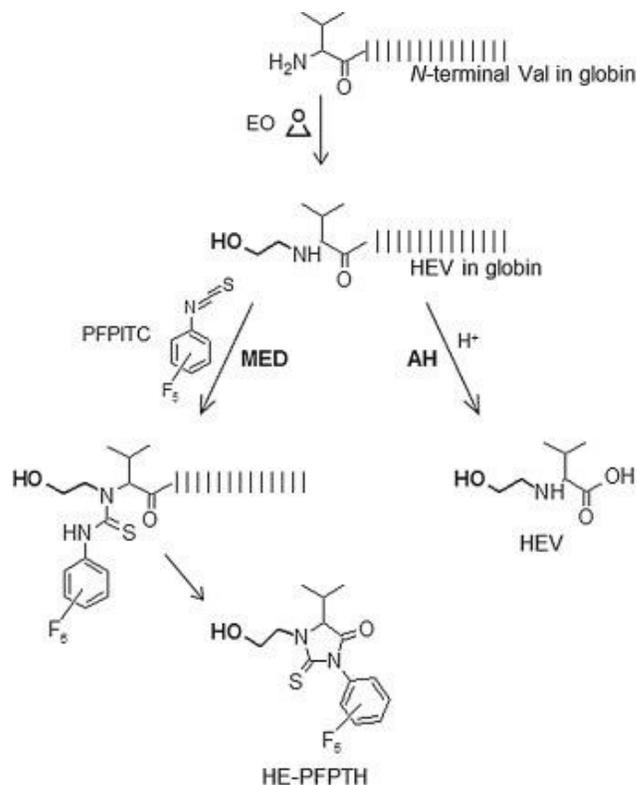


Figura 4. Esquema de procedimientos de Edman modificado (MED) y de hidrólisis ácida (AH), como preparación de hemoglobina para la determinación de HEV [53].

En estudios clínicos existe una preferencia de realizar pruebas en orina, debido a que esta muestra es fácil de obtener y presenta más simple composición química comparando con sangre o suero. En este contexto, se ha considerado N-(2-hidroxi-etil)-L-valil-L-leucina (HEVL) como un posible biomarcador de la exposición a EtO. Dicho dipéptido es el producto de degradación natural de hemoglobina excretado en orina y ha sido determinado mediante HPLC-ESI-MS/MS con transición m/z 275.1965→116.1070 [54].

En el caso de estudios exploratorios, donde el objetivo es caracterizar las modificaciones de proteínas de manera más completa posible, a menudo se utilizan simples sistemas *in vitro*, en los cuales una proteína de interés es incubada con el compuesto estudiado para producir aductos. Tal era el caso de

modificación de albúmina de suero humano por metilglioxal, realizada en nuestro grupo de investigación [55].

Para identificar/anotar las modificaciones, el esquema de análisis típicamente consiste en: (i) hidrólisis de la proteína; (ii) separación de péptidos por electroforesis en gel o por cromatografía de líquidos acoplada con espectrometría de masas de alta resolución; (iii) análisis de datos. La última parte es especialmente desafiante; es necesario definir posibles/esperados aductos, calcular masas exactas correspondientes e incluirlas en los parámetros de búsqueda de péptidos. La anotación de modificaciones se realiza en base a los tiempos de retención, masas exactas y espectros de fragmentación de péptidos. Finalmente, se procede con la cuantificación relativa de péptidos modificados respecto los encontrados en la proteína control, no-modificada. En el caso de EtO, se han estudiado aductos con hemoglobina, albúmina [56, 57] y algunas proteínas terapéuticas [57, 58]. En los trabajos citados principalmente se encontró la hidroxietilación en metionina y cisteína (Figura 5).

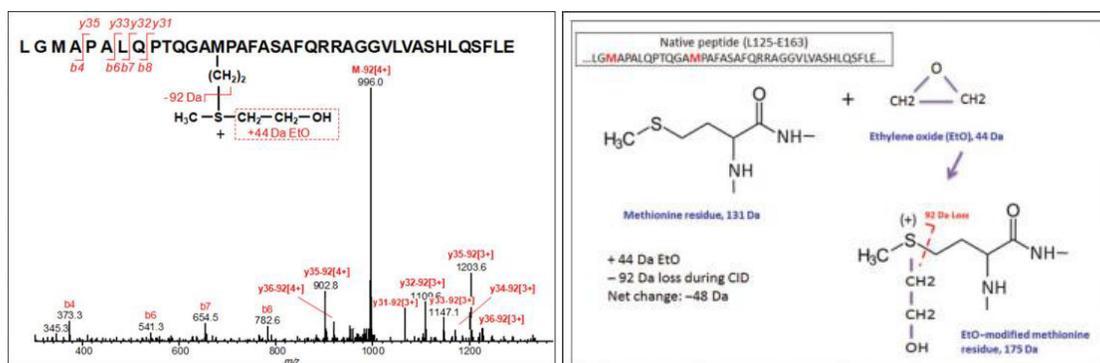


Figura 5. Secuenciación *de novo* de un péptido de la proteína terapéutica, modificado por EtO en metionina (izquierda) y esquema de reacción correspondiente (derecha) [58].

ADN

Se han reportado evidencias experimentales del aducto de EtO con guanina en ADN (N7-HEG); aunque este compuesto se forma también a partir de otros xenobióticos, por ejemplo acrilamida [11, 59]. La interacción del óxido de etileno con el ADN también puede dar lugar a la formación de otros aductos como el O⁶-(2-hidroxiethyl)guanina (O6-HEG) y N3-(2-hidroxiethyl)adenina (N3-HEA) en menores cantidades a comparación del N7-HEG (0.5 y 4.4% respecto al total de N7-HEG) [60]. Es de esperarse que el óxido de etileno reaccione preferentemente con los átomos de nitrógeno endocíclicos y nucleofílicos del ADN a comparación de los átomos de oxígeno exocíclicos con carácter poco nucleofílico [61].

Ácidos grasos de cadena larga

La producción de detergentes no iónicos y algunos agentes surfactantes puede ser llevada a cabo mediante la reacción del óxido de etileno con algunos ácidos grasos de cadena larga como ácido láurico o esteárico en presencia de un catalizador alcalino [62]. En esta reacción se observa únicamente la formación de monoésteres, a diferencia de la reacción de esterificación, en donde se observa también la formación de diésteres [63]. Cuando el óxido de etileno reacciona con ácidos grasos de mayor tamaño, los productos son agentes surfactantes no iónicos solubles en agua del tipo éster, aunque también se observan cantidades apreciables de glicoles, monoésteres y diésteres. Siendo los compuestos del tipo monoéster esperados debido a sus propiedades como agente surfactante y detergente [64].

1.5. Albúmina como proteína modelo para estudiar procesos de glicación

Albúmina es una globulina y proteína abundante en sistema circulatorio. Entre sus múltiples funciones, hay que resaltar la capacidad de unir y transportar diferentes agentes químicos tanto formados *in vivo* como exógenos [65]. Los aductos de albúmina con xenobióticos han sido estudiados extensivamente, utilizando diferentes esquemas de hidrolisis y de análisis instrumental [46, 55].

Debido a su largo tiempo de vida, comparado con otras proteínas (alrededor de 21 días), su alta concentración (normalmente se encuentra entre 35 a 50 g/L), y a su configuración estructural (55% de configuración α -helice y 16% en configuración β), la albúmina sérica es una proteína plasmática muy susceptible a los procesos de glicación [26, 65]. Se han descrito modificaciones por glicación en los residuos de Arg, Lys, Cys, His [66, 67]. En estudios realizados *in vivo*, se ha encontrado que el residuo Lys25 es un sitio principal donde se lleva a cabo un 30% del proceso de glicación [68], el residuo Lys99 también es un importante sitio de glicación, pero su participación total en el proceso de glicación es baja [26]. En estudios *in vitro* de glicación, se identificaron algunos sitios de glicación de arginina (Arg98, 160, 197, 472 y 521) [69] y en seroalbúmina humana, se ha identificado el residuo Lys525 como un sitio predominante de glicación en la superficie de la proteína [68, 70, 71].

En base a las características anteriormente descritas, la albúmina suele ser utilizada como proteína modelo en estudios de procesos de glicación, utilizando agentes glicantes como glucosa, fructosa, galactosa, ribosa o gliceraldehído [72], metilglioxal en presencia de micronutrientes (ácido ascórbico, trolox, ácido fólico, niacina, piridoxina, zinc, hierro, manganeso y selenio) [73]. También se ha estudiado que los glucurónidos de acilo pueden inducir a la glicación de albúmina [74] de manera similar como lo hacen azúcares reductores glucosa y fructosa [75]. Grigoryan y colaboradores centraron su estudio en la formación de aductos de EtO en Cys-34 después de la tripsinólisis de albúmina de suero humano [76]. Cabe señalar que la posición de Cys-34 corresponde a uno de puentes de disulfuro en esta proteína localizado en su superficie y por eso el blanco importante de agentes electrofílicos. En base a los datos LC-MS y MS/MS, se encontraron péptidos que contenían Cys-34, se obtuvieron masas exactas de posibles aductos y, mediante el análisis cuantitativo, se evaluó la eficacia de modificación. [76]. En este trabajo, se obtuvo albúmina a partir de suero o plasma sanguínea humana. Para ello, se tomaron 5 μ L la muestra, se agregó 60 μ L de metanol 50% v/v para precipitar otras proteínas que no correspondieron a albúmina y el precipitado se eliminó por centrifugación. Se procedió con tripsinólisis de albúmina purificada (sobrenadante) utilizando la relación molar tripsina:proteína aproximadamente de 1:10. Posteriormente se agregó ácido fórmico para precipitar tripsina y agregados de proteína. La muestra se diluyó con la fase móvil inicial agregando el estándar interno, el cual fue el aducto del péptido T3 con iodoacetamida. Cabe aclarar que el residuo Cys-34 se encuentra localizado en el péptido T3 (41 LVNEVTEFAK 50) el cual es relativamente neutral y poco susceptible a las modificaciones postraduccionales, además de presentar una ionización eficiente formando ion de doble carga (m/z 575.3111). Es por ello, que para el estudio de la formación de aductos en el residuo Cys-34, como estándar interno se obtuvo y se utilizó el péptido T3 modificado con iodoacetamida. El análisis se realizó por cromatografía de líquidos en escala nano y espectrometría de masas de alta resolución [77]. El análisis de datos generados en estudios de aductómica es desafiante, puesto que es necesario conocer la identidad de posibles modificaciones y calcular la diferencia de masa correspondiente a la formación de dichos aductos en sitios específicos. En estudio de Gregoryan y colaboradores, los iones fueron asignados como aductos

del residuo Cys-34 si correspondieron a los cambios en el péptido T3. Como resultado de este trabajo, se pudieron estimar las concentraciones del aducto en Cys-34 en pmol/mg de albúmina [77].

En otro estudio se evaluó la formación de aductos en albúmina de uso terapéutico, durante su contacto con jeringas esterilizadas con óxido de etileno [57]. Específicamente, se examinó el efecto de diferentes métodos de esterilización, incluyendo el uso de EtO, sobre la estructura de albúmina envasada en jeringas. La cantidad del óxido de etileno en jeringas inmediatamente después de esterilización fue de 5×10^{-6} mol, mientras que en las jeringas almacenadas por 12 días fue de 1.2×10^{-6} mol. En cada jeringa, la cantidad de albúmina fue de 3×10^{-8} mol, lo que significa que el óxido de etileno se encontró todo el tiempo en un exceso molar respecto a proteína pudiendo ocasionar su modificación química. A pesar de que la cantidad de EtO residual era de 220 μg por jeringa (5×10^{-6} mol), es decir muy inferior al valor de 4000 μg /jeringa establecida por la norma ISO 10993-7, el análisis LC-HRMS de digeridos trópticos de albúmina mostró hidroxietilación en Cys y Met. El enfoque específico del estudio era en residuos Cys-34 y Met-329. Como ya se ha mencionado, el Cys-34 es susceptible al ataque de agentes electrofílicos; Met-329 también tiende a formar aductos ya que se encuentra entre los dominios 1 y 2 - en la zona donde ocurre el plegamiento de la albúmina y por lo tanto esta metionina se encuentra expuesta en la superficie de la proteína [78]. El grado de modificaciones encontrado en estos dos residuos era de aprox. 45% en albúmina almacenada 2 semanas en jeringa tratada con EtO. [79].

En el contexto del uso de EtO para esterilización de envases utilizados para albúmina, se ha sugerido que la modificación de dicha proteína puede ser la causa de una reacción anafiláctica en diálisis, debido a la actividad antigénica de albúmina modificada por EtO [80].

En la Tabla 1, se resume brevemente algunos otros ejemplos de estudios sobre modificaciones químicas de albúmina por agentes glicantes *in vitro*.

Tabla 1. Algunos ejemplos de estudios enfocados en la modificación de albúmina *in vitro*.

Objetivo	Sistema <i>in vitro</i>	Tratamiento de muestra	Herramientas de análisis	ref
Efecto de Cu(II) en glicación de albúmina por MGO	450 mmol/L HSA, 50 mmol/L MGO en 100 mmol/L HEPES con adición de NaN_3 , pH 7.2; se agregaron diferentes concentraciones de Cu(II). Incubación: 7 días, 37 °C. Purificación mediante precipitación en acetona frío.	Tripsinólisis	capHPLC-ESI-QTOF-MS	[55]
Efecto del Zn (II) en glicación de albúmina por MGO y GA	35 mg/mL HSA incubado con 30 mmol/L MGO o GA y Zn (II) 1 $\mu\text{mol/L}$ o 100 $\mu\text{mol/L}$ en PBS pH 7.4, con adición de NaN_3 0.02%. Incubación: 7 días para HSA-MGO-Zn(II) y 15 días para HSA-GA-Zn(II), 37 °C. Diálisis 5 h con agua desionizada seguido de solución salina 0.09%	Dilución- Espectrometría UV, fluorimetría. Filtración con Milipore 0.22 μm -HPLC, detector de matriz de diodos de alta sensibilidad.	Efecto del Zn(II) sobre la formación de aductos de HSA-MGO y HSA-GA por Espectrofotometría UV/Vis y por espectrofluorimetría ; Determinación de aductos HSA-MGO-Zn(II) y HSA-GA-Zn(II) por HPLC-	[81]

			DAD; AGES por MALDI-TOF MS	
Glicación por ácido ascórbico (AAsc) y efecto de antioxidantes o pro-oxidantes en dicha modificación	0.09 mmol/L BSA, 1 mmol/L AAsc en 0.1 mmol/L PBS, pH 7.4, 1 mmol/L NaN ₃ . Incubación: 6 días a 37 °C con 0.05, 0.1, 0.2, 0.1 y 1 mmol/L nitroxidos (TEMPO), oxidantes 0.1 mmol/L H ₂ O ₂ , 5 mmol/L AAPH y 1 mmol/L FeCl ₃ , antioxidantes 1 mM: Captrocril, tiron y trolox; agentes quelantes (EDTA, EGTA, DTPA, NTA); ácidos orgánicos (ácido 1-ciano-4-hidroxinámico, ácido 4-hidroxinámico); polifenoles (ácido cafeico, ácido elálgico, ácido ferúlico, ácido gálico y galato de propilo).	Sin tratamiento	Espectrofluorimetría para AGEs totales. EPR para evaluar la presencia de radicales libres	[82]
Glicación de BSA por glucosa	50 mg/mL BSA, con diferentes concentraciones de glucosa en PBS, pH 7.4, esterilización usando filtros 0.2 µmol/L. Incubación: 37 °C por 50 días. Purificación de BSA por diálisis inversa con PBS.	Sin tratamiento	Productos de Amadori por cromatografía de afinidad a boronatos; Glicación de BSA por electroforesis en gel sin SDS; Determinación de grupos Tiol por método de Ellman; Medición de reflectancia por espectroscopía FTIR	[83]
Rol del Zn con AAsc y AF durante la glicación de albúmina con glucosa	5 porciones de BSA (10 mg/mL) con 0.5 mmol/L glucosa, a 3 se les agregó 375 µmol/L Zn, 400 µmol/L AAsc o 270 µmol/L AF, a los 2 sets restantes Zn+AAsc y Zn+AF, esterilización usando filtros 0.2 µmol/L. Incubación: 37 °C por 150 días. Purificación por diálisis.	Digestión con HNO ₃ para la determinación de Zn. Otros análisis – sin digerir BSA	AGES por Espectrofluorimetría; Grupos carbonilo por espectrofotometría UV/Vis, previa derivatización con 2,4-dinitrofenilhidrazina; Zn por AAS; Grupos Tiol por método de Ellman	[84]
Modificación estructural e identificación de productos de oxidación en BSA mediante la oxidación catalizada por metal.	0.05 mM BSA en 10 mM PBS, 0.05 mM FeCl ₂ /EDTA, 0.1 mmol/L H ₂ O ₂ (Ox_2) o 0.25 mmol/L FeCl ₂ /EDTA, 0.5 mmol/L H ₂ O ₂ (Ox_10). Incubación: 37 °C por 0.5-24 h. Acidificación con 1% TFA y congelamiento con N ₂ líquido.	Solubilización con 8 M urea, tratamiento con SDS, Tris, glicerol y 2-mercaptoetanol. Tripsinólisis	Grupos carbonilo por espectrofotometría UV/Vis, previa derivatización con 2,4-dinitrofenilhidrazina; Modificación de BSA: electroforesis en gel y tripsinólisis	[85]

			seguida por capHPLC de fase inversa y colección de fracciones para su análisis por MALDI-TOF MS	
--	--	--	---	--

Abreviaciones:

MGO: Metilglioxal; **HSA:** Seroalbúmina humana; **HEPES:** Ácido 4-(2-hidroxiethyl)piperazin-1-iletanosulfónico; **capHPLC-ESI-QTOF-MS:** Cromatografía capilar de líquidos de alta eficacia con ionización por electronebulización con analizador de masas tiempo de vuelo cuadrupolo acoplado a espectrometría de masas; **GA:** Gliceraldehído; **HPLC:** Cromatografía de líquidos de alta resolución; **DAD:** detector espectrofotométrico de arreglo de diodos; **AGES:** Productos finales de glicación avanzada; **MALDI-TOF MS:** Desorción/ionización laser asistida por matriz con – espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo; **BSA:** Seroalbúmina bovina; **PBS:** Tampón salino de fosfatos; **EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético; **EGTA:** Etilenglicol-bis(β-aminoetil éter)-N-N'-N'-ácido tetraacético; **DTPA:** Pentaacetato de dietilentriamina; **NTA:** Ácido nitrilotriacético; **FTIR:** Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier; **AAse:** Ácido ascórbico; **AF:** Ácido fólico. **EPR:** Espectroscopía de resonancia paramagnética de electrones

En base a la revisión bibliográfica realizada, en el presente trabajo de tesis se propone estudiar la actividad glicante del óxido de etileno en disolución (a concentraciones variadas) sobre la albúmina de origen humano a un pH fisiológico, empleando un tiempo de incubación de 24 horas a 37 °C. De forma paralela, se evaluará el efecto del óxido de etileno sobre la estructura de algunos aminoácidos en disolución como lisina, cisteína, glicina, metionina e histidina, los cuales han demostrado tener reactividad con el óxido de etileno en la estructura de la albúmina [38, 39]. Para conocer las modificaciones provocadas por EtO en la estructura de albúmina, se realizará un análisis proteómico utilizando diversas técnicas instrumentales como MALDI-TOF MS y capLC-ESI-QTOFMS, así como diferentes herramientas de análisis de datos como ProteinScape, DataAnalysis y ChemStation.

2. Objetivo general

2.1. Objetivos general

Obtener nuevas evidencias de la actividad glicante de óxido de etileno, mediante el análisis de modificaciones de aminoácidos de una globulina por diferentes técnicas de espectrometría de masas.

2.2. Objetivos específicos

1. Diseñar las condiciones de glicación *in vitro* de albúmina de suero humano y de seleccionados aminoácidos con el óxido de etileno y obtener productos modificados.
2. Caracterizar modificaciones de los aminoácidos causadas por EtO, mediante el análisis comparativo de aminoácidos incubados con el agente glicante y los controles no expuestos a EtO por espectrometría de masas de alta resolución (ESI-QTOF-MS y MS/MS)
3. Caracterizar las modificaciones en la secuencia de aminoácidos en albúmina, realizando el análisis proteómico de muestras de proteína incubada con EtO y de proteína control.
4. Evaluar la capacidad de interacción de la proteína modificada con algunos agentes terapéuticos (caso de cloranfenicol)

3. Parte experimental

3.1. Instrumentación

- Espectrómetro de masas Maxis Impact con ionización por electronebulización y separador de masas de cuadrupolo y tiempo de vuelo (ESI-QTOF-MS) de Bruker Daltonics
- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución modelo LC ultimate RLSCnano 3000 de Dionex Thermo Scientific.
- Espectrómetro de masas con sistema de desorción/ionización laser asistida por matriz equipado con láser smartbeam-II y analizador de masas de tiempo de vuelo a 10 Hz modelo Autoflex Speed de Bruker Daltonics (MALDI-TOF MS).
- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución modelo 1200 de Agilent Technologies equipado con automuestreador, detector espectrofotométrico de arreglo de diodos y fluorimétrico (HPLC-DAD, HPL-FLD, respectivamente).
- Purificador de agua Milli-Q Labconco.
- Baño María Fanem LTDA.
- Centrifuga Legend Micro 17, Thermo Scientific
- Micropipetas de 1000 μ L, 200 μ L, 20 μ L, y 10 μ L.

3.2. Reactivos

- Óxido de etileno (EtO), 50mg/mL en metanol (Supelco)
- Agua desionizada.
- Metanol grado LC-MS (Sigma)
- Acetonitrilo (Sigma)
- Ditiotreitól (DTT)
- Iodoacetamida (IAM)
- Ácido clorhídrico
- Tripsina
- Ácido fórmico

- Ácido α -ciano-3, 4-hidroxicinámico (HCCA)
- Bicarbonato de amonio (Sigma)
- Albúmina de suero humano (Sigma)
- Arginina (Sigma)
- Cisteína (Sigma)
- Lisina (Sigma)
- Metionina (Sigma)
- Histidina (Sigma)
- Cloruro de sodio
- Cloranfenicol
- Formiato de amonio

3.3. Análisis de datos y análisis estadístico

- Data Analysis V4.1 (Bruker Daltonics)
- ProteinScape V3.1 (Bruker Daltonics)
- Mascot
- ChemStation (Agilent Technologies)
- ChemSketch Freeware (ACD/Labs)
- Página en línea: cfmid.wishaerlab.com
- Página en línea: uniprot.org
- Página en línea: unimod.org
- Paquetería Office 365 (Microsoft Excel, Power Point, Word)

4. Resultados y discusión

4.1 Modificación de aminoácidos libres y de albúmina de suero humano con óxido de etileno en condiciones *in vitro*.

Se seleccionaron cinco aminoácidos susceptibles a procesos de glicación y de hidroxietilación; estos fueron lisina, histidina, arginina, metionina y cisteína. Se prepararon las soluciones de cada uno de ellos con el exceso molar de EtO 5:1. En paralelo, se obtuvieron soluciones control, con la misma concentración del aminoácido, pero sin agregar EtO. Cabe mencionar que el producto Supelco utilizado en este estudio contenía 50 mg EtO en un mL de metanol, por lo que a las soluciones control se agregó este solvente en la misma proporción que se tuvo en las soluciones expuestas a EtO. Para asegurar las condiciones similares a las fisiológicas, a todas soluciones se adicionó el tampón de bicarbonato de amonio 50 mM, pH 7.8. Para lograr la modificación de aminoácidos, todas las soluciones fueron incubadas a 37 °C durante 24 h. En la Tabla 2 se especifica el proceso de preparación de las soluciones, su anotación y la composición final.

Tabla 2. Preparación y composición de las soluciones de aminoácidos individuales para su incubación *in vitro* con óxido de etileno (EtO), los volúmenes se presentan en microlitros; las muestras incluyen aminoácidos control incubados sin EtO (Met-9, Cys-12, His-15, Arg-18 y Lys-21) y aminoácidos incubados con exceso molar de EtO en relación 1:5 (Met-10, 11, His-16, 17, Arg-19, 20 y Lys-22, 23).

Exceso EtO:Aminoácido 5:1						
Muestra	Aminoácido	Solución del aminoácido 10 mmol/L en tampón, μL	Tampón, μL	Metanol:Tampón 1:20, μL	*EtO en tampón (56.7 mmol/L; 2.50 mg/mL), μL	Composición (Volumen Final 1000 μL)
9	Met	500	60	440	0.0	$Cf_{\text{Met}} = 5.0 \text{ mmol/L};$ 0.75 mg/mL
10,11		500	60	0.0	440	$Cf_{\text{Met}} = 5.0 \text{ mmol/L};$ 0.75 mg/mL $Cf_{\text{EtO}} = 25 \text{ mmol/L};$ 1.10 mg/mL
12	Cys	500	60	440	0.0	$Cf_{\text{Cys}} = 5.0 \text{ mmol/L};$ 0.61 mg/mL
13,14		500	60	0.0	440	$Cf_{\text{Cys}} = 5.0 \text{ mmol/L};$ 0.61 mg/mL $Cf_{\text{EtO}} = 25 \text{ mmol/L};$ 1.10 mg/mL
15	His	500	60	440	0.0	$Cf_{\text{His}} = 5.0 \text{ mmol/L};$ 0.78 mg/mL
16,17		500	60	0.0	440	$Cf_{\text{His}} = 5.0 \text{ mmol/L};$ 0.78 mg/mL $Cf_{\text{EtO}} = 25 \text{ mmol/L};$ 1.10 mg/mL
18	Arg	500	60	440	0.0	$Cf_{\text{Arg}} = 5.0 \text{ mmol/L};$ 0.87 mg/mL
19,20		500	60	0.0	440	$Cf_{\text{Arg}} = 5.0 \text{ mmol/L};$ 0.87 mg/mL

						Cf _{EtO} = 25 mmol/L; 1.10 mg/mL
21	Lys	500	60	440	0.0	Cf _{Lys} = 5.0 mmol/L; 0.73 mg/mL
22,23		500	60	0.0	440	Cf _{Lys} = 5.0 mmol/L; 0.73 mg/mL Cf _{EtO} = 25 mmol/L; 1.10 mg/mL

El objetivo de esta primera parte del trabajo ha sido examinar si las condiciones *in vitro* propuestas permitan hidroxietilación de los cinco aminoácidos, además de obtener la evidencia directa de dicha modificación mediante el análisis por espectrometría de masas de alta resolución y en base a espectros de fragmentación de iones precursores. Los resultados obtenidos fueron de ayuda en la definición de las modificaciones variables de los aminoácidos durante el análisis de datos proteómicos.

Para la parte de proteómica, se decidió trabajar con albúmina de suero humano, principalmente debido a su función en el transporte de ciertos iones metálicos, hormonas, algunos lípidos y medicamentos. Tal como se describió en Introducción, las modificaciones por glicación y/o hidroxietilación afectan la capacidad de albúmina para unir y transportar diferentes compuestos causando efectos adversos en el organismo.

En Tabla 3 se resume el proceso de preparación de albúmina para su modificación con EtO *in vitro*. La solución inicial de albúmina se preparó en la concentración de 2.0 mg/mL en el tampón de bicarbonato de amonio 50 µmol/L a pH 7.8, obteniéndose una completa solubilización de la proteína. Antes de agregar EtO a la solución de HSA, el producto Supelco se diluyó en proporción 1:20 con el tampón de bicarbonato para disminuir la concentración de metanol y evitar la precipitación de la proteína. De manera similar como para aminoácidos, para cada experimento de exposición de HSA a EtO se preparó una muestra control que no contenía EtO (Tabla 3). Se decidió utilizar dos excesos molares de EtO respecto albúmina, es decir 100:1 y 1000:1, ver Figura 6. Tomando en cuenta todos aminoácidos en la secuencia de HSA, la relación molar EtO respecto a cualquier aminoácido era de 1:5 y 1:1, respectivamente. Al considerar solamente cinco aminoácidos de la secuencia de HSA vulnerables a proceso de hidroxietilación, la relación molar de EtO con cualquier de estos era de 2:1 y 10:1, respectivamente (Figura 7). Para la modificación de la proteína, las mezclas obtenidas fueron incubadas a 37 °C durante 24 horas.

Tabla 3. Preparación y composición de las disoluciones de albúmina para su incubación con EtO. Los volúmenes se presentan en microlitros; las muestras incluyen albúmina control sin EtO (1 y 5), con exceso molar de EtO 1:100 y con exceso molar de EtO 1:1000.

Muestra	Albúmina en tampón (2.0 mg/mL; 30 µmol/L), µL	Tampón, µL	Metanol:Tampón 1:20, µL	*EtO en tampón (2.50 mg/mL; 56.7 mmol/L), µL	Composición (Volumen Final: 1000 µL)
Exceso EtO:Albúmina 100:1					
1	500	475	25	0	Cf _{Alb} = 1.0 mg/mL; 1.49 mmol/L
2 - 4	500	475	0	25	Cf _{Alb} = 1.0 mg/mL; 1.49 mmol/L

					$C_{f_{EtO}} = 65.7 \mu\text{g/mL}; 1.49 \text{ mmol/L}$
Exceso EtO:Albumina 1000:1					
5	500	235	265	0	$C_{f_{Alb}} = 1.0 \text{ mg/mL}; 1.49 \text{ mmol/L}$
6-8	500	235	0	265	$C_{f_{Alb}} = 1.0 \text{ mg/mL}; 1.49 \text{ mmol/L}$ $C_{f_{EtO}} = 657 \mu\text{g/mL}; 1.49 \text{ mmol/L}$

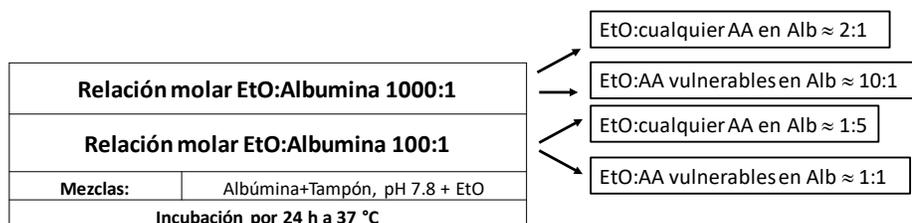


Figura 6. Relaciones molares de EtO respecto a albúmina y a los aminoácidos individuales, utilizadas en experimentos de modificación de HSA *in vitro*.

Antes del análisis proteómico, la concentración de albúmina en cada una de las soluciones fue confirmada por el método espectrofotométrico de Bradford. El proceso de calibración se realizó utilizando soluciones estándar de HSA 0, 0.2, 0.4, 0.6, y 1.0 mg/mL, obteniéndose la función de calibración $A_{590}/A_{450} = 2.96C_{Alb} + 0.99$ con un coeficiente de regresión lineal (R^2) de 0.9954.

Una vez realizados los experimentos *in vitro* planeados, se continuó con el análisis de cada una de las mezclas por espectrometría de masas de alta resolución.

4.2 Caracterización de las modificaciones en aminoácidos

Las mezclas Met-9, Met-10, Met-11, Cys-12, Cys-13, Cys-14, His-15, His-16, His-17, Arg-18, Arg-19, Arg-20, Lys-21, Lys-22, Lys-23 (Tabla 2) fueron analizadas por ESI-QTOF-MS, operando la fuente de ionización en modo positivo y negativo y adquiriendo espectros MS y MS/MS. Para ello, las mezclas fueron centrifugadas a 10 000 g por 10 min, se recolectaron 200 μL de cada tubo por duplicado y estas alícuotas se colocaron en nuevos tubos Eppendorf. Para el análisis ESI(+), a cada solución se añadieron 800 μL de ácido fórmico 0.1% en agua:acetonitrilo 1:1, mientras que para el análisis en modo ESI(-), se agregaron 800 μL de carbonato de amonio 0.1% en agua:acetonitrilo 1:1. Las muestras fueron introducidas por infusión directa a un flujo de 3 $\mu\text{L}/\text{min}$, el voltaje del rociado fue de 4500 V, se utilizó nitrógeno como gas de secado (180 °C), con un flujo de 4 L/min y una presión de 0.4 bar. Los espectros fueron adquiridos con la frecuencia de 2 Hz, en un intervalo de m/z 25-600. La calibración de la masa exacta se llevó a cabo utilizando aductos de formiato de sodio, introduciendo su solución 10 mM directamente en la fuente de ionización.

Los datos fueron abiertos en DataAnalysis 4.1, se realizó la recalibración y se extrajeron las señales basadas en los espectros de MS y autoMS/MS para las muestras de los cinco aminoácidos incubados con EtO en exceso 5.

En las **Figuras 7a y 7b** se presentan los espectros de masas adquiridos para cisteína en el modo ESI(+) y en las **Figuras 8a y 8b** en el modo ESI(-), así como también las estructuras asociadas a las modificaciones inducidas por EtO en los sitios vulnerables.

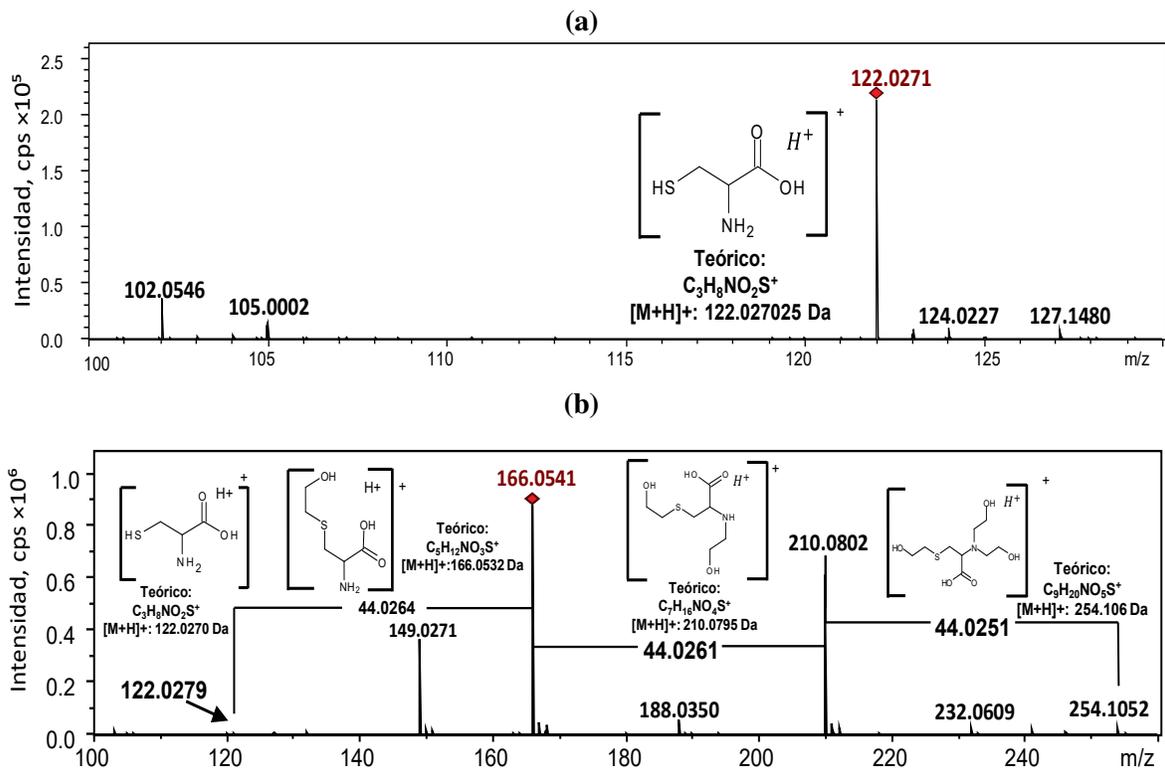


Figura 7. Espectros de cisteína (a) y de cisteína después de incubación con EtO (b), obtenidos por ESI-QTOF-MS en modo positivo.

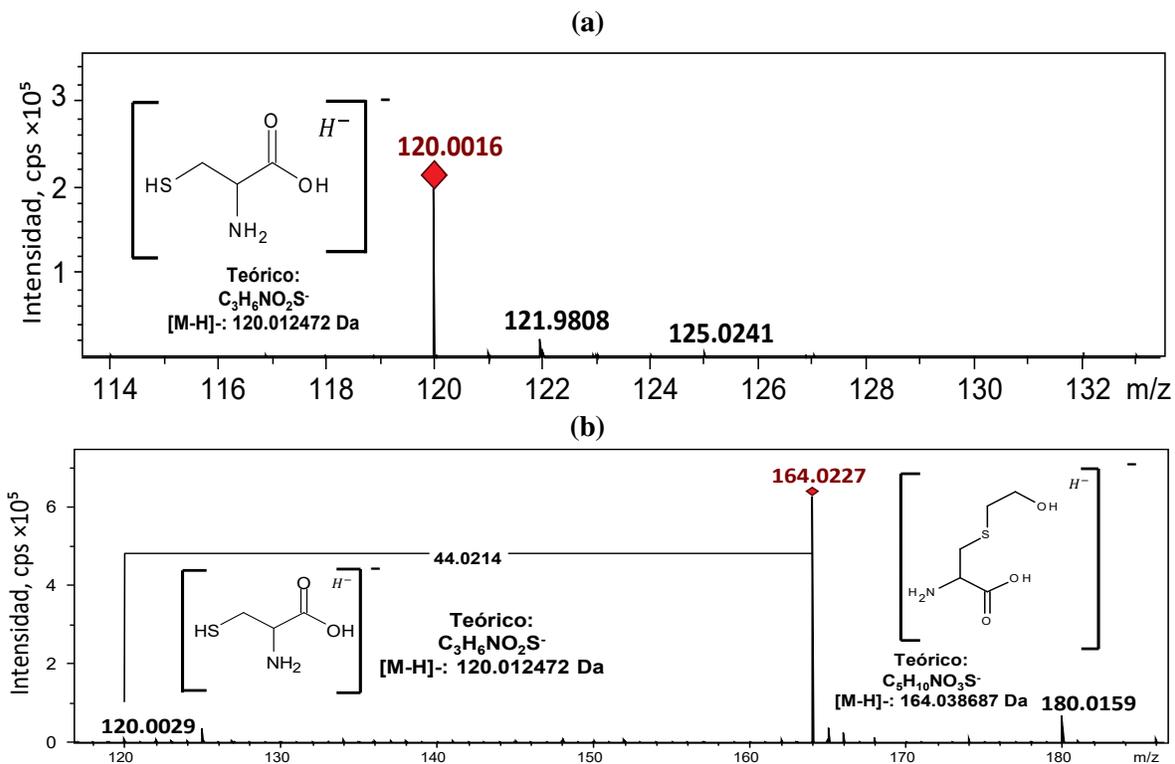


Figura 8. Espectros de cisteína (a) y de cisteína incubada con EtO (b), obtenidos por ESI-QTOF-MS en modo negativo

En el caso del modo ESI(+), el ion correspondiente a cisteína protonada, aparece en m/z 122.0271 (Figura 7a), en el caso de la cisteína incubada con EtO, se observa la formación de tres iones adicionales cuyos incrementos de m/z (44.0264, 44.0251, y 44.0251) coinciden con la masa teórica del grupo hidroxietilo (44.0262). Cabe mencionar que la hidroxietilación del grupo -SH en cisteína ha sido reportada por H.G. Windmuller, C.J. Ackerman y R.W. Engel [38], pero en base a evidencias indirectas y sin utilizar técnicas de análisis estructural. Los resultados obtenidos en este trabajo mediante el análisis por ESI-QTOF-MS, proporcionan la evidencia directa de que el grupo amino de cisteína es modificado bajo exposición a EtO por dos grupos hidroxietilo y que la hidroxilación ocurre también sobre el grupo tiol (-SH); en total, la cisteína libre puede modificarse mediante unión de tres grupos hidroxietilo. Es importante que los iones de Cys y Cys hidroxietilada presentan diferentes abundancias; en particular, se observa la conversión prácticamente total de cisteína en aductos, así como la formación de aductos con el grupo hidroxietilo con el siguiente orden de abundancia: Cys+1EtO > Cys+2EtO > Cys+3EtO. También es necesario señalar que, en base a los espectros MS no es posible asignar el sitio específico (grupo amino o grupo tiol), donde ocurre la modificación, por lo que las estructuras en la Figura 8b han sido propuestas de manera tentativa.

En el modo ESI(-) únicamente se detectó una de las modificaciones por hidroxietilación (Figura 8b). Para confirmar las estructuras de los aductos de Cys con EtO, se adquirieron sus espectros de fragmentación utilizando el modo de ionización positiva. Como ejemplo, en la Figura 9 se presenta el espectro MS/MS del ion m/z 166.0555 que corresponde al aducto de cisteína con una molécula de EtO (Cys+1EtO); las estructuras presentadas en esta Figura fueron asignadas con ayuda de la página web cfmid.wishartlab.com, utilizando el código SMILES generado por el software ChemSketch.

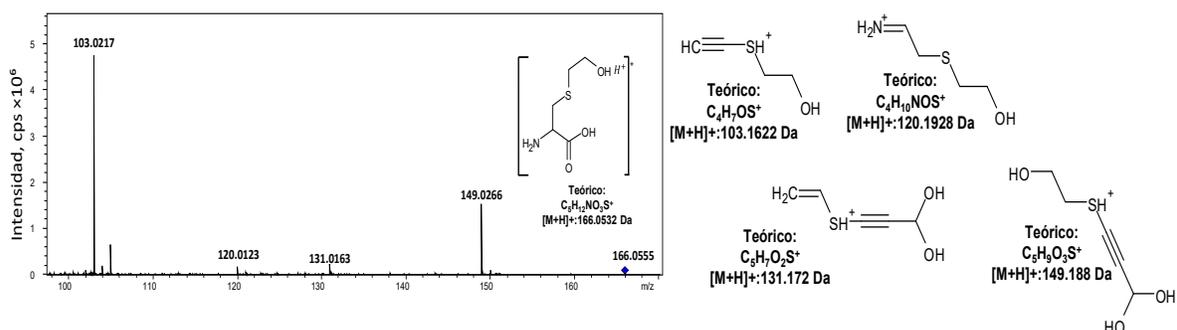


Figura 9. Espectro de fragmentación del aducto Cys+1EtO adquirido por ESI(+)-QTOF-MS/MS, junto con las estructuras asignadas a los fragmentos individuales.

Es interesante que el ion precursor genera fragmentos con el grupo hidroxietilo unido a ambos grupos vulnerables en cisteína; sin embargo, los iones producto de mayor abundancia (m/z 149.0267 y 103.0213) corresponden a la modificación del grupo -SH bajo exposición del aminoácido a EtO. Se puede concluir entonces que el EtO tiene mayor afinidad a grupo -SH en cisteína y que la modificación ocurre preferencialmente sobre este grupo tiol.

Para el caso de arginina, en el modo ESI(+) se observa su ion protonado en m/z 175.1208 (Figura 10 a), mientras que para la arginina incubada con EtO aparecen tres iones adicionales con un incremento

sucesivo de m/z de 44.0250 (Figura 10 b). De esta manera se confirma la modificación de arginina mediante adición de hasta tres grupos hidroxietilo. Arginina libre tiene tres grupos amino vulnerables a la modificación por EtO con posibilidad de unir hasta seis grupos hidroxietilo; se observó un menor número de aductos lo que podría deberse a la relación molar EtO:Arg de 5:1 utilizada para la modificación. De manera similar como para Cys, la hidroxietilación de Arg ha sido reportada anteriormente, pero sin proporcionar evidencia directa del número y de la estructura de aductos ya que no se utilizó ninguna técnica de análisis estructural [38]. Los resultados obtenidos en el modo ESI(-), confirman la modificación de Arg con adición de uno y dos grupos hidroxietilo (Figura 11) En las Figuras 10 y 11, la anotación de la posición del grupo hidroxietilo en estructuras de aductos es solamente tentativa. Por otro lado, la abundancia de iones en Figura 11b presenta el siguiente orden decreciente: Arg > Arg+1EtO > Arg+2EtO > Arg+3EtO, lo que parece confirmar que la afinidad del EtO a grupo -SH es mayor respecto a los grupos amino. Efectivamente, el ion de cisteína prácticamente desapareció después de su incubación con EtO mientras que en las mismas condiciones de incubación se quedó relativamente gran porción de Arg no modificada.

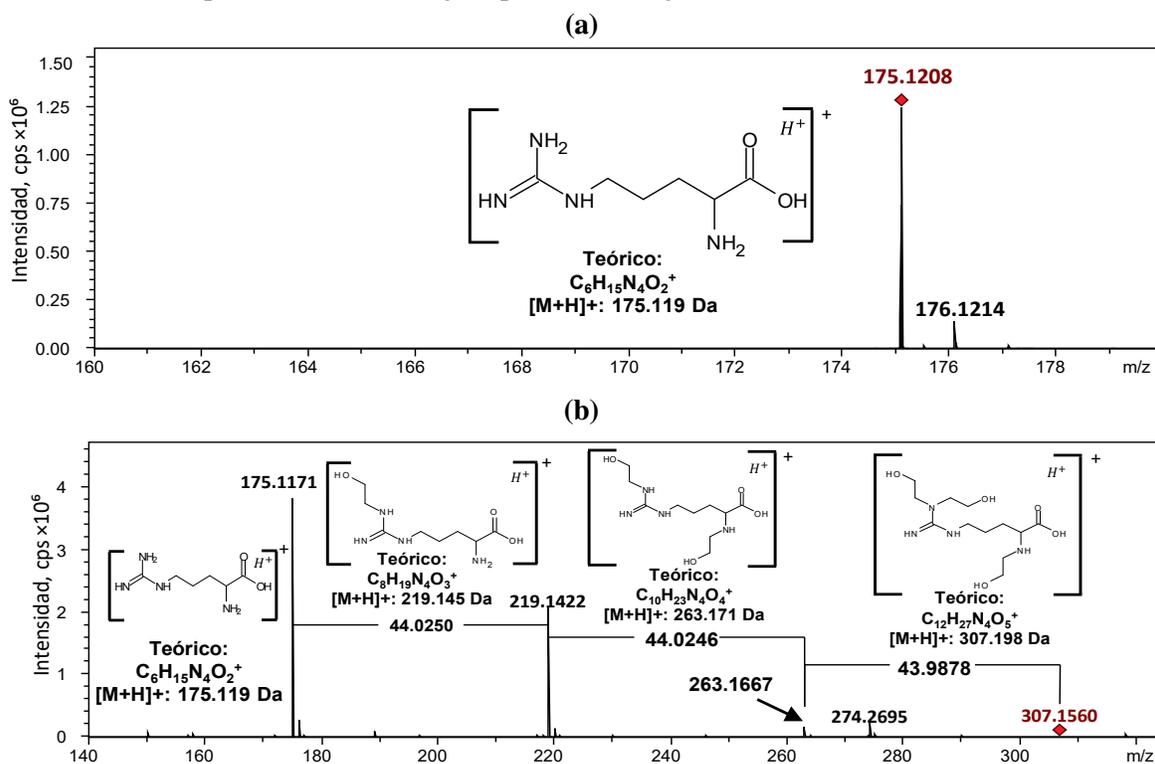
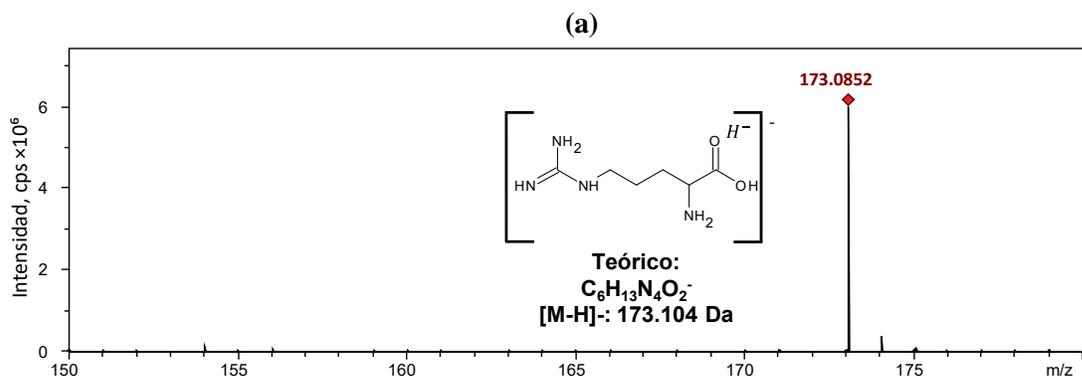


Figura 10. Espectro de arginina (a) y de arginina incubada con EtO (b), obtenido por ESI(+)-QTOF-MS.



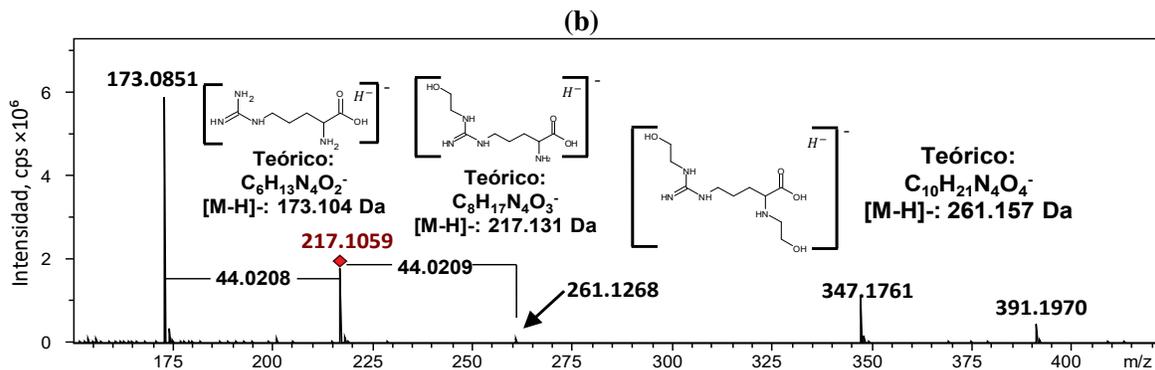


Figura 11. Espectros de arginina (a) y de arginina incubada con EtO (b), obtenidos utilizando ESI(-)-QTOF MS.

En la Figura 12, de manera de ejemplo se presenta el espectro de fragmentación del ion aducto Arg+1EtO (m/z 219.145) junto con las estructuras asignadas a los iones producto mediante el programa cfmid.wishartlab.com, utilizando el código SMILES.

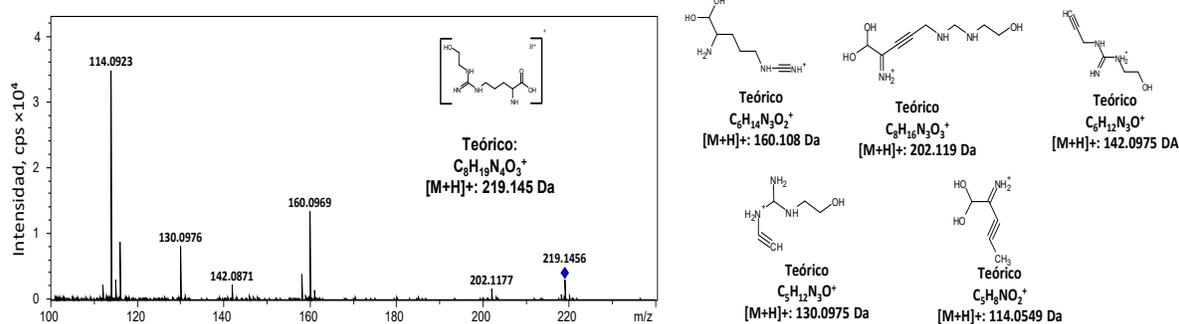


Figura 12. Espectro de fragmentación del aducto Arg+1EtO adquirido mediante ESI(+)-QTOF-MS/MS, junto con las estructuras asignadas a los fragmentos individuales.

Dos iones de mayor abundancia (m/z 114.0923 y 160.0969) no contienen el grupo hidroxietilo, pero el ion m/z 130.0977 corresponde a un fragmento, en el cual hidroxietilo se encuentra unido a uno de nitrógenos del grupo guanidino, confirmando la modificación por EtO de Arg libre y la susceptibilidad de este aminoácido presente en la secuencia de proteínas a dicha modificación.

De manera similar que en el caso de Cys y Arg, para el resto de los aminoácidos (Lys, His, y Met), se obtuvieron los espectros de masas en modo ESI(+) y ESI(-) y también los espectros de fragmentación de seleccionados aductos asignando estructuras de iones producto en base al programa disponible en la página web cfmid.wishartlab.com, utilizando el código SMILES.

En Figura 13a y 13b se muestran espectros MS adquiridos en modo de ionización positivo de Lys y Lys modificada, respectivamente, mientras que los espectros obtenidos en ESI(-) se presentan en Fig. 15a y 15b. También se obtuvo el espectro de fragmentación del ion correspondiente al aducto Lys+1EtO en ESI(+), mismo que se presenta en la Fig. 16.

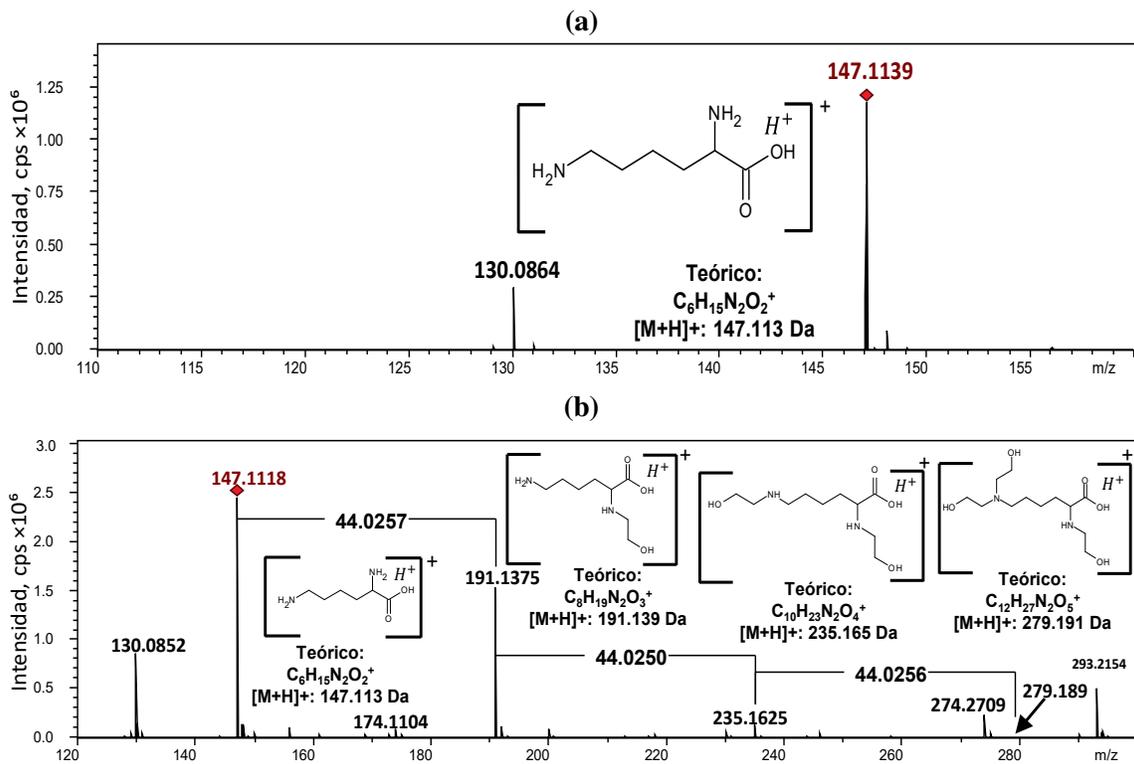


Figura 13. Espectros de lisina (a) y lisina incubada con EtO (b), obtenidos utilizando ESI(+)-QTOF-MS.

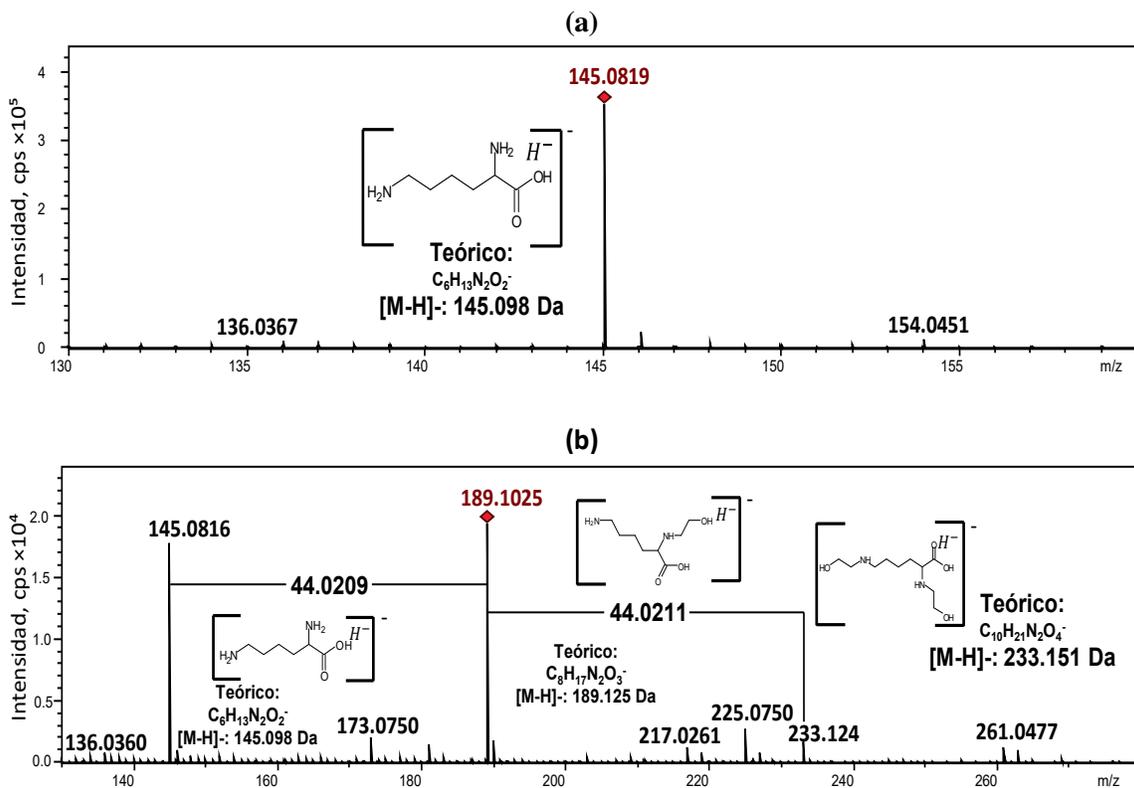


Figura 14. Espectros de lisina (a) y lisina incubada con EtO (b), obtenidos utilizando ESI(-)-QTOF-MS.

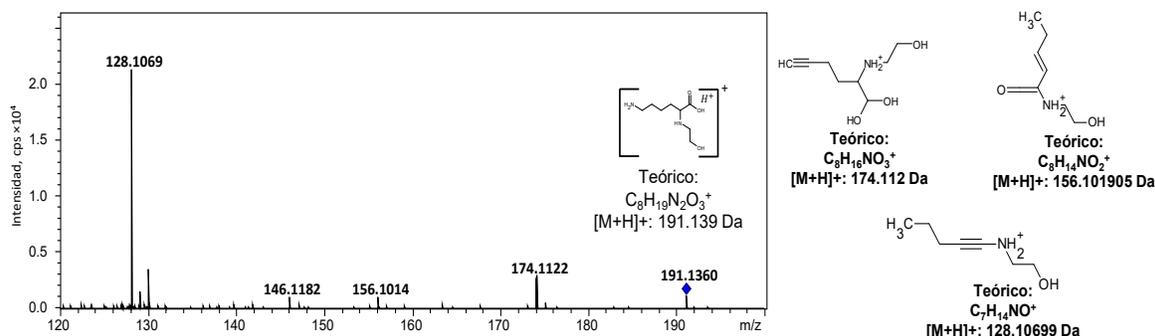
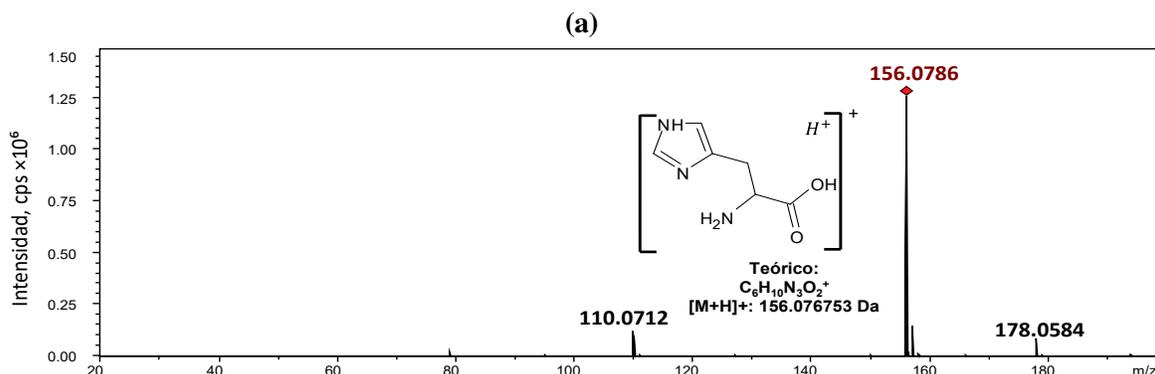


Figura 15. Espectro de fragmentación del ion m/z 191.1360 adquirido en ESI(+), correspondiente al aducto Lys+1EtO, junto con las estructuras asignadas a los fragmentos individuales.

Los resultados obtenidos indican que lisina se modificó durante incubación con EtO, formando aductos con hasta tres grupos hidroxietilo. De manera similar como ocurrió con Arg, después de la incubación se quedó Lys no modificada y la abundancia de aductos decrecía conforme aumentaba el número de grupos hidroxietilo en la molécula modificada. En cuanto al sitio específico de hidroxietilación, el más abundante ion fragmento del aducto Lys+1EtO presentó m/z 128.1069 y correspondió a la unión del grupo hidroxietilo al grupo ϵ -amino de Lys mientras que menos abundante ion m/z 174.1122 fue asignado a un fragmento de aducto en el cual hidroxietilación tuvo lugar en el grupo α -amino. De esta manera se confirma la susceptibilidad del grupo ϵ -amino de Lys disponible en la estructura de proteínas a la hidroxietilación por EtO. Los resultados obtenidos para histidina se presentan en las figuras 16, 17 y 18. De manera similar como para Lys y Arg, después de la incubación con EtO en exceso molar 5:1, una parte de His se quedó sin ser modificada, pero también se observó la formación de hasta tres aductos con decreciente abundancia de sus respectivos iones: His > His+1EtO > His+2EtO > His+3EtO. En cuanto a los iones de fragmentación del aducto His+1EtO (Fig. 19), el más abundante correspondió al ion en el cual el grupo hidroxietilo estaba unido al grupo α -amino de His. La mayor afinidad del EtO con el grupo α -amino sugiere que His presente en la secuencia de proteínas podría ser menos susceptible a la hidroxietilación comparando con Cys, Lys o Arg.



(b)

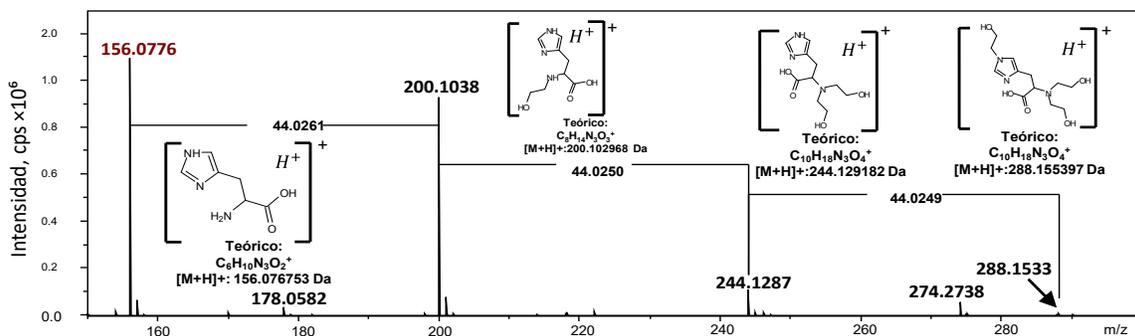
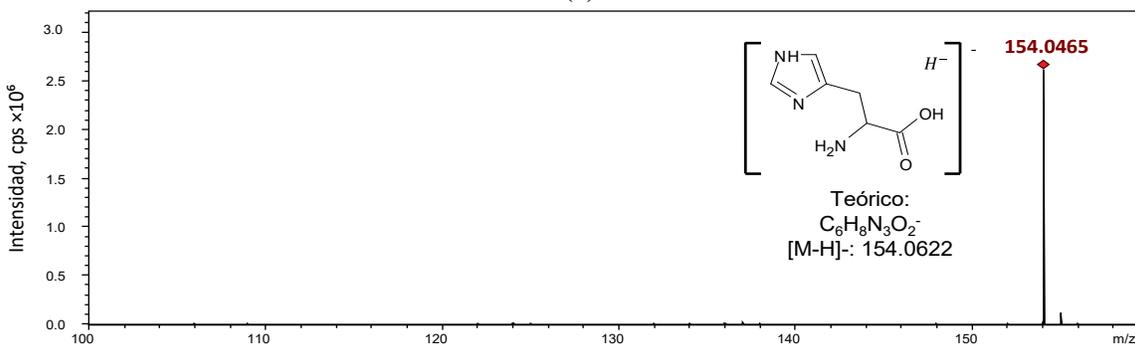


Figura 16. Espectro de histidina (a) e histidina incubada con EtO (b), obtenidos por ESI(+)-QTOF-MS.

(a)



(b)

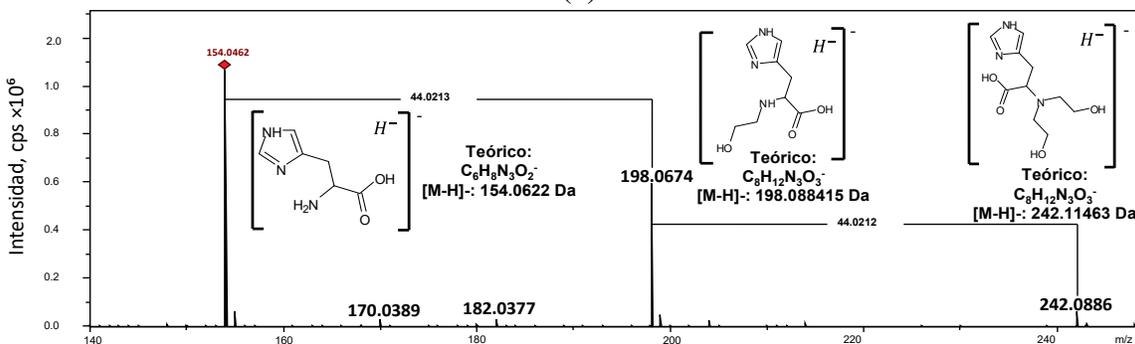


Figura 17. Espectro de histidina (a) e histidina incubada con EtO (b), obtenidos por ESI(-)-QTOF-MS

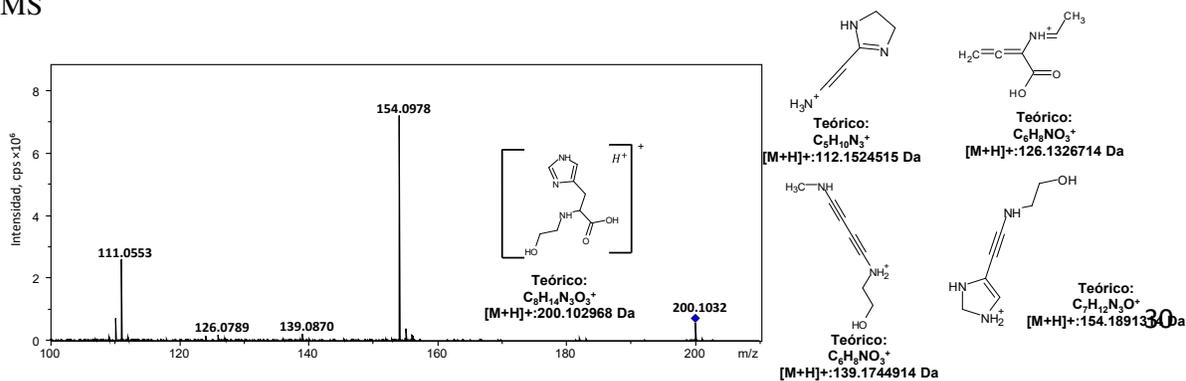


Figura 18. Espectro de fragmentación del ion m/z 200.1032 adquirido en ESI(+), correspondiente al aducto His+1EtO, junto con las estructuras asignadas a los fragmentos individuales.

Los espectros adquiridos para metionina y metionina después de su incubación con EtO se presentan en las figuras 19, 20 y 21. Después de la incubación con EtO, se formaron dos aductos con EtO y se quedó una parte de metionina sin modificación, con el siguiente orden decreciente de abundancia de iones: Met+1EtO > Met > Met+2EtO. En base al espectro de fragmentación del ion Met+1EtO (Fig. 22), se confirma la hidroxietilación del grupo α -amino de Met. Cabe señalar que no se encontró evidencia de una posible modificación sobre el átomo de azufre, por lo cual la metionina integrada en estructura de las proteínas no parece un blanco viable de hidroxietilación.

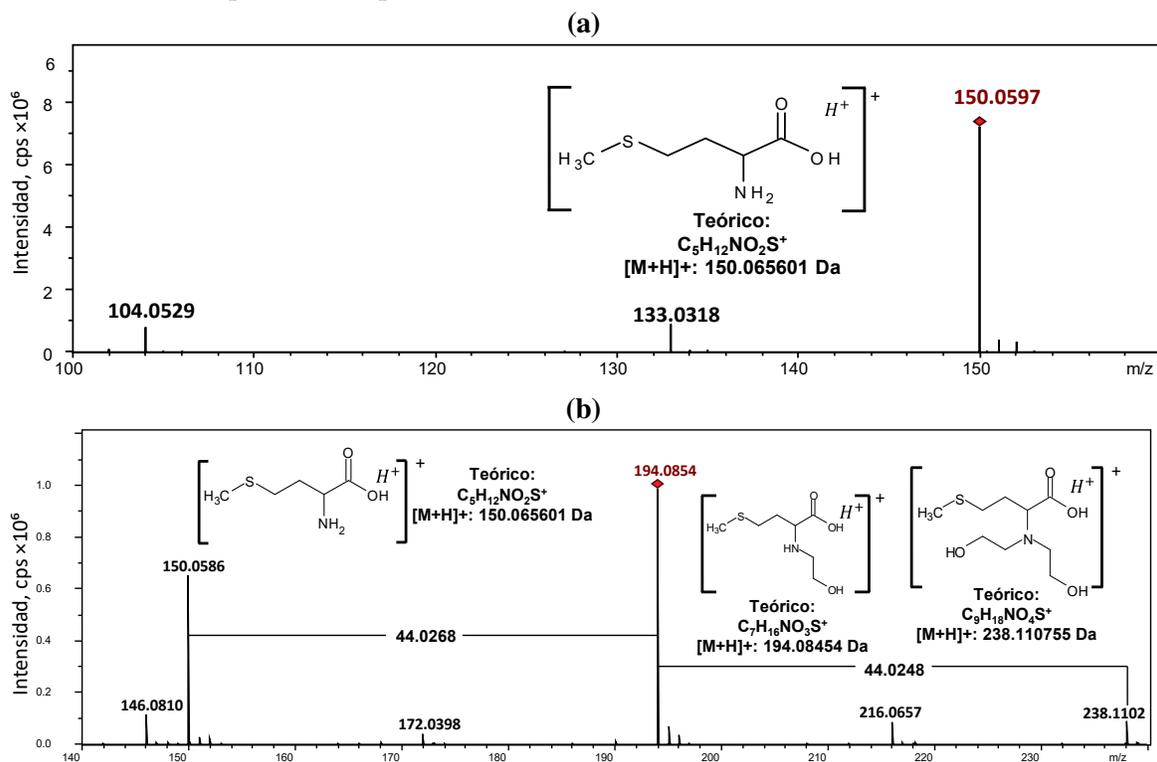
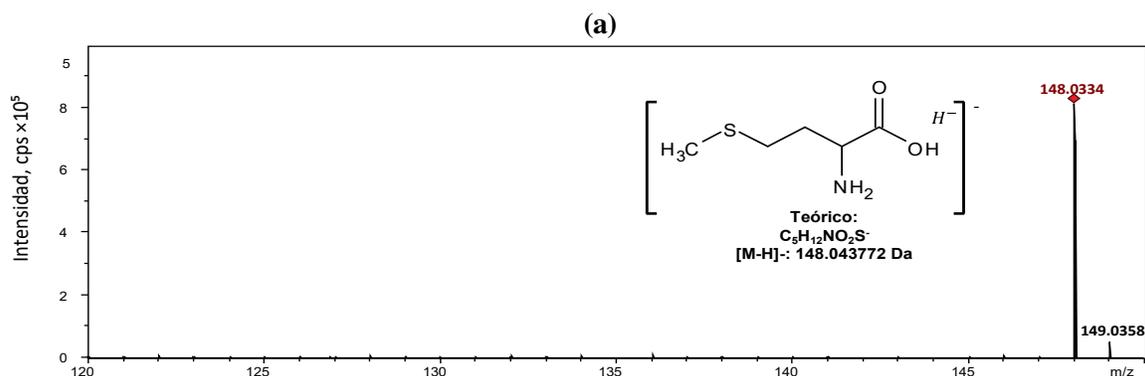


Figura 19. Espectro de metionina (a) y metionina incubada con EtO (b), obtenidos utilizando ESI(+)-QTOF-MS.



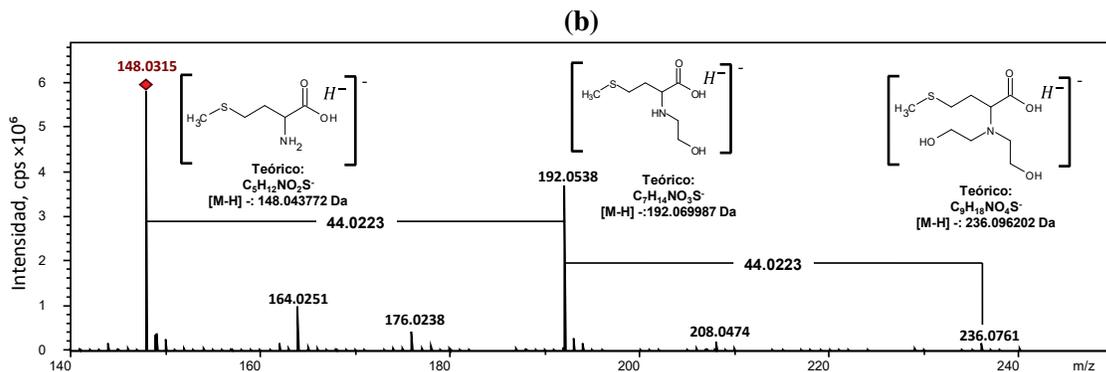


Figura 20. Espectro de metionina (a) y metionina incubada con EtO (b), obtenidos utilizando ESI(-)-QTOF-MS.

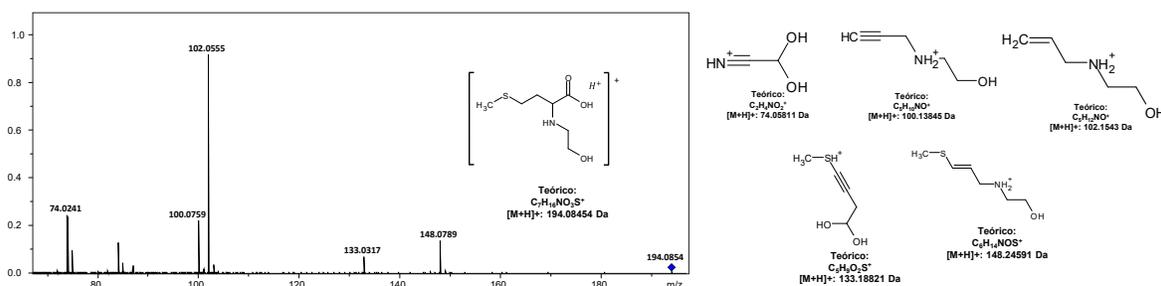


Figura 21. Espectro de fragmentación del ion m/z 194.0845 adquirido en ESI(+), correspondiente al aducto Met+1EtO, junto con las estructuras asignadas a los fragmentos individuales.

Para resumir la información obtenida para cinco aminoácidos, en base a los espectros ESI(+)-QTOF-MS y MS/MS se calculó la distribución relativa de abundancias de los iones correspondientes a aminoácido no modificado y a cada uno de los aductos con EtO. Para ello, la intensidad de cada uno de los iones fue dividida por la suma de intensidades de todos los iones fragmento; los resultados expresados en porcentajes se presentan en la Tabla 4. En primer lugar, es de notar que la cisteína resultó ser la más susceptible a la modificación por EtO, ya que no se detectó la Cys residual después de la incubación. Para todos cinco aminoácidos, el grado de conversión (modificación) decrecía en el siguiente orden: Cys > Met > His > Lys > Arg. Cabe resaltar sin embargo, que en estos experimentos se incubaron con EtO los aminoácidos libres; para Met e His los sitios más vulnerables a la hidroxietilación fueron los grupos α -amino que participan en los enlaces peptídicos de proteínas y por ello no son accesibles a las modificaciones. De allí, los aminoácidos susceptibles a la hidroxietilación en las proteínas deberían ser Cys, Lys y Arg.

Bajo las condiciones de exposición de aminoácidos a EtO, se formaron aductos con hasta tres moléculas de EtO, dependiendo del número de sitios vulnerables y su afinidad a EtO. Tal como ya se mencionó antes, en base a espectros MS no era posible asignar la posición exacta de los grupos hidroxietilo en las moléculas de aminoácidos. Para aductos con un solo grupo hidroxietilo, que fueron más abundantes en espectros MS, se obtuvieron respectivos espectros de fragmentación. La anotación de iones fragmento abundantes permitió sugerir los grupos más vulnerables a hidroxietilación de la

siguiente manera: (i) -SH en Cys, (ii) ϵ -amino en Lys, (iii) guanidino en Arg, (iv) α -amino en Met y His.

Tabla 4. Distribución relativa de abundancias de iones en espectros ESI(+)-QTOF-MS adquiridos para aminoácidos incubados con exceso de EtO en relación molar 5

Aminoácido	Distribución relativa de abundancia de iones en función del número de modificaciones (0-3%)			
	0	1	2	3
Arginina	63.7	33.9	2.3	0
Cisteína	0	50.2	47.6	2.2
Lisina	60	36.5	3.3	0.2
Metionina	9.2	47.1	43.6	0
Histidina	43.7	44	11.5	0.9

Una vez evaluada la susceptibilidad de los cinco aminoácidos libres a la hidroxietilación por EtO, se procedió con el estudio proteómico de albúmina de suero humano comparando proteína incubada con EtO contra proteína control que no estaba en contacto con EtO.

4.3 Estudio proteómico de las modificaciones en la secuencia de albúmina causadas por EtO.

Con el fin de verificar si bajo las condiciones de exposición de albúmina a EtO descritas en la sección 4.1 ocurre la modificación de proteína, se obtuvieron espectros de masa de las muestras 1-8 (Tabla 2), utilizando el sistema MALDI-QTOF-MS. Para ello, en la placa GroundSteel se depositó 1 μ L de muestra y 1 μ L de matriz (HCCA 0.2 mg/mL en CH₃OH: H₂O 98:2, la deposición de la muestra en la placa fue por secado de gota), la adquisición de datos fue en un intervalo m/z 400-5000, en modo lineal positivo, con una intensidad relativa de laser del 80%, en modalidad media y frecuencia de 1000 Hz. Para cada muestra, se adquirió la suma de espectros a partir de tres lecturas de la misma muestra. Para la calibración interna se utilizó el estándar de péptidos (Peptide Standard II for Mass Spectrometry, Bruker Daltonics) que cubre el intervalo de masas 700 - 3200 Da, el cual fue reconstituido al añadir 500 μ L de TFA 0.1%. Los datos espectrales crudos fueron procesados en flexAnalysis 3.4 (Bruker Daltonics). De manera de ejemplo, en la **Figura 22** se presentan espectros obtenidos para muestra control (a), muestra de albúmina incubada con exceso molar de EtO 1000:1 (b) y para la muestra de albúmina incubada con exceso molar de EtO 100:1 (c). En cada uno de los espectros se aprecian señales correspondientes a albúmina y a su dímero, pero los valores m/z de albúmina control (a) son diferente respecto muestras 2 y 6 que fueron incubadas con EtO. Para el exceso 100:1 de EtO, el incremento de masa correspondió a la adición de dos grupos hidroxietilo ($\Delta m/z$ 90.1, Figura 22c), mientras que, para el exceso 1000:1, el incremento de masa sugiere la adición de tres grupos hidroxietilo ($\Delta m/z$ 150.1, figura 22b).

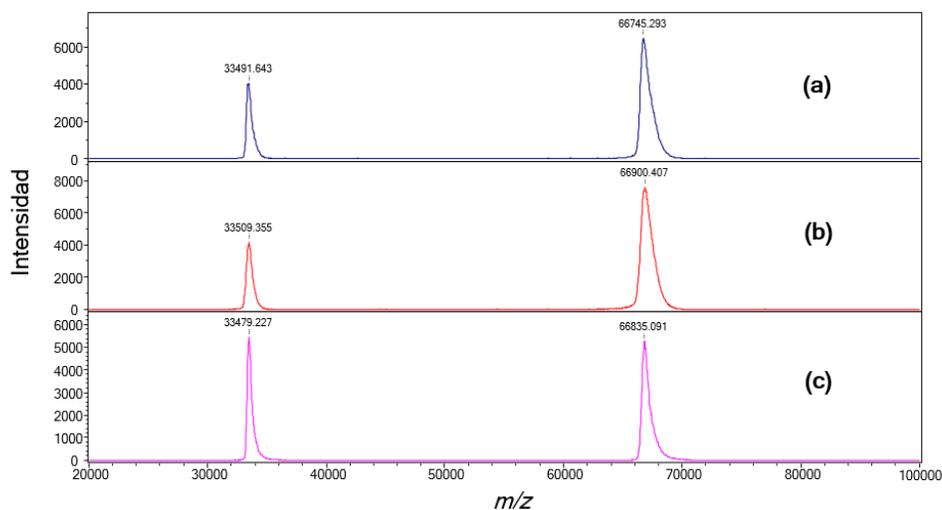


Figura 22. Espectros MALDI-TOF-MS de muestra 1 - albúmina control 14.9 $\mu\text{mol/L}$ (a); muestra 6 - albúmina incubada con exceso de EtO 1000:1 (b) y muestra 2 - albúmina incubada con exceso de EtO 100:1 (c).

Aunque el análisis de las muestras de albúmina por MALDI-TOF MS confirmó que la incubación con EtO introduce modificaciones en la proteína manifestados por el aumento de su masa, estos datos son solamente orientativos. Para conocer las modificaciones específicas en la estructura de HSA, se continuó con el estudio proteómico.

4.4 Análisis proteómico de las modificaciones de albúmina mediante capLC-ESI-QTOF-MS

Antes del análisis cromatográfico, se llevó a cabo la hidrólisis enzimática de la albúmina de las muestras 1-8 (Tabla 3). Para ello, se recolectaron 250 μL de cada una de las soluciones, se les agregaron 35 μL de ditioneitol (DTT) 80 mmol/L en tampón de bicarbonato de amonio 50 mmol/L , pH 7.8 y los tubos se incubaron a 30 $^{\circ}\text{C}$ por 60 min con el fin de reducir los puentes de disulfuro. Después, a cada tubo se adicionaron 35 μL de la solución de iodoacetamida (IAM) 160 mM (30 $^{\circ}\text{C}$ por 90 min en oscuridad), para obtener la alquilación de los grupos -SH libres. El exceso de IAM fue eliminado agregando una nueva porción del DTT. Para la digestión enzimática se utilizaron 25 μL de tripsina (0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en HCl 1 mmol/L), las muestras fueron incubadas a 30 $^{\circ}\text{C}$ por 14 h y después, la reacción fue detenida al adicionar 40 μL de ácido fórmico al 50% v/v. A continuación, se adicionaron 5 μL de acetonitrilo y 75 μL de agua desionizada, para obtener un volumen final de 500 μL (concentración de albúmina 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), las muestras se centrifugaron a 10 000 g x 10 min antes de su introducción al sistema capHPLC acoplado con ESI(+)-QTOF-MS. El espectrómetro de masas fue el modelo maxisImpact de Bruker Daltonics, equipado con DataAnalysis 4.1 (Bruker Daltonics), el cual fue acoplado a un sistema cromatográfico LC Ultimate RPLCnano 3000 operado por el software Hystar 3 (Dionex Cientific de Thermo). Se utilizó la columna 300Extend C18 (150 x 0.3 mm, 3.5 μm) con cartucho ZORBAX 300SB (0.30 x 5 mm, 5 μm). Se inyectaron 10 μL de cada una de las muestras de albúmina digerida al cartucho ZORBAX (5 μg de proteína) con el fin de retener los péptidos; el flujo fue de 15 $\mu\text{L}/\text{min}$ con la fase móvil del ácido fórmico 0.1% v/v en agua: acetonitrilo (99:1). Después de 2 minutos, el flujo se cambió a la columna capilar, donde se realizó la separación de péptidos. Se aplicó el flujo de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$, las fases móviles fueron A: ácido fórmico 0.1% v/v en agua desionizada y B: ácido fórmico 0.1% v/v en acetonitrilo con el siguiente programa de gradientes lineales: 5% B durante 2 minutos, 5-50% B durante 51 min, 50-95% B por 1 min, 95% B por 1 min, 95-5% B por 1 min, y 5% B durante 4 min; equilibrando la columna con 5% de B durante 4 minutos. La ionización por electronebulización fue en el modo positivo con voltaje de 4500 V, utilizando nitrógeno como gas de secado (4 L/min , 180 $^{\circ}\text{C}$); la presión del gas nebulizador fue de 0.4 bar. Para la calibración de masa, se aplicó el fijador de masa ($m/z = 1221.9907$) directamente en la fuente de ionización. Los cromatogramas se obtuvieron con frecuencia de adquisición de 1 Hz, en un intervalo de m/z 20-2400. Para el modo auto MS/MS, la velocidad de adquisición se fijó en 0.5 Hz y 1.0 Hz

para baja intensidad de señal (<15 000) y alta (>100 000), respectivamente. Para cada muestra, se corrieron dos replicas técnicas.

Los datos crudos obtenidos en estos análisis se abrieron en el programa DataAnalysis 4.1, con el cual se realizó la recalibración y la desconvolución de las señales de péptidos, en base a espectros de MS y auto MS/MS. En la Figura 23 se presentan ejemplos de cromatogramas obtenidos para albúmina control y albúmina incubada con exceso de EtO 100:1 y 1000: 1, respectivamente, observándose diferencias en perfiles de elución lo que confirma que EtO introduce modificaciones en los péptidos de HSA y que estas modificaciones dependen de la concentración del EtO.

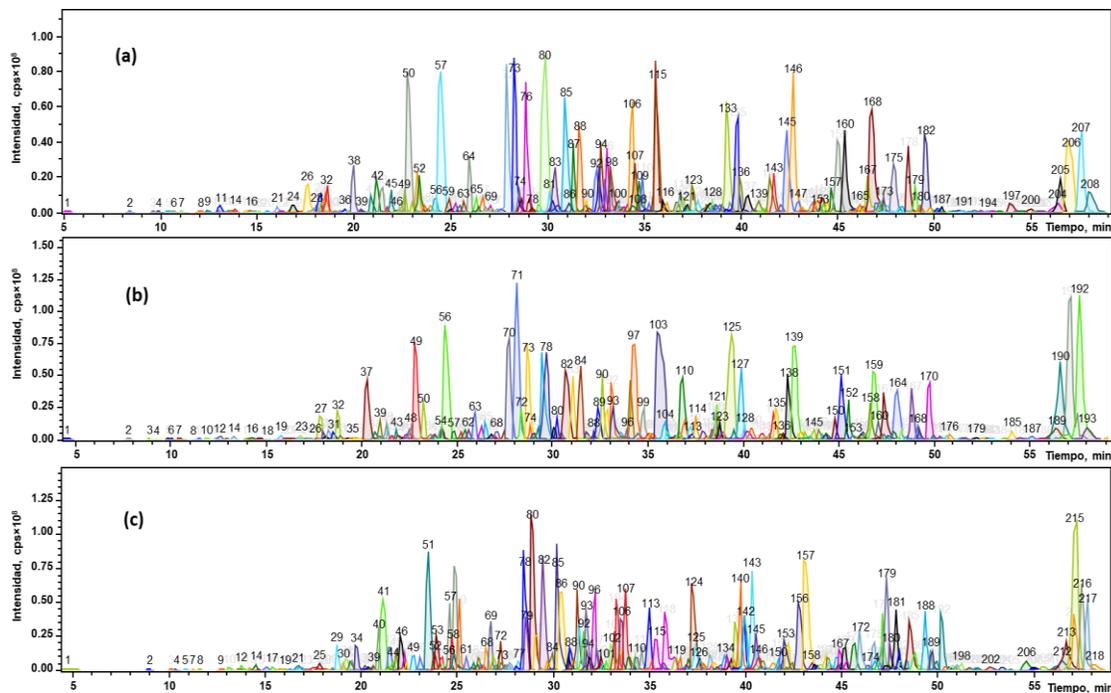


Figura 23. Cromatogramas obtenidos por capLC-ESI(+)-QTOF-MS para albúmina control no expuesta a EtO (a), albúmina incubada con EtO en relación 1:100 (b), y albúmina incubada con EtO en relación 1:1000 (c), las cuales fueron previamente digeridas con tripsina.

Las listas de las señales MS y MS/MS generadas para cada uno de los cromatogramas se exportaron al programa ProteinScape 3.1.3 (BrukerDaltonics). Con ayuda de este programa, en primer lugar, se determinó la cantidad de péptidos en las muestras analizadas, presentando los resultados de muestras 1, 2 y 6 en la Figura 24. Como se puede observar en esta figura, el número total de los péptidos encontrados en tres muestras era de 404, entre ellos 176 fueron comunes para todas muestras (1,2,6) y 260 fueron comunes para albúmina modificada con EtO (muestras 2 y 6). Es también notorio que 19 de los péptidos fueron encontrados solamente en albúmina control, 26 en albúmina con exceso de EtO 100:1 (muestra 2) y 74 de los péptidos fueron exclusivamente presentes en la muestra con exceso de EtO 1000:1 (muestra 6). Estos resultados claramente confirman que EtO introduce modificaciones en los péptidos y que estas modificaciones van en aumento conforme aumenta el exceso molar de EtO respecto a la proteína.

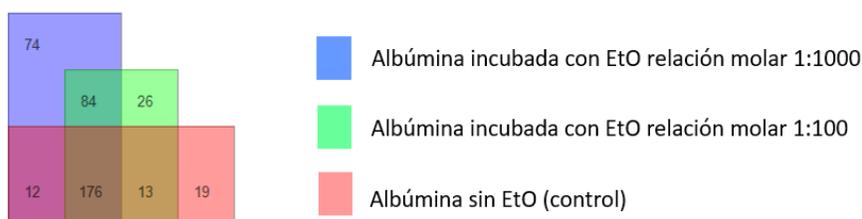


Figura 24. Numero de péptidos encontrados en las distintas muestras de albúmina

La siguiente etapa de trabajo correspondió a la búsqueda de sitios específicos donde ocurrieron las modificaciones. Primeramente, se utilizó la plataforma en línea MASCOT para confirmar la identidad de HSA en las muestras control y en aquellas modificadas con EtO, en base a la lista de datos MS y MS/MS de los péptidos, seleccionando como taxonomía *Homo sapiens* (Human) y definiendo las modificaciones variables a permitir. Dichas modificaciones fueron las siguientes: carbamidometilación en cisteína ($\Delta m = 57.0215$), la adición de un grupo etanoilo (hidroxietilo) ($\Delta m = 44.0262$) en residuos de cisteína, arginina y lisina, así como las modificaciones Gln \rightarrow pyro-Glu en el extremo N-terminal de la glutamina ($\Delta m = -17.0265$) y Gln \rightarrow pyro-Glu en el extremo N-Terminal del ácido glutámico ($\Delta m = -18.0106$). Como resultado de la búsqueda realizada para muestra 1 (control sin contacto con EtO), se obtuvo una lista de proteínas ordenadas por decreciente score de identificación (Tabla 5). De esta manera se confirma la identidad de HSA con 121 péptidos reconocidos, el más alto score y con 85.6% de cobertura de secuencia. Cabe mencionar sin embargo que el producto HSA de Sigma es obtenido a partir de suero humano por lo que se encontraron trazas de algunas otras proteínas, principalmente serotransferina y haptoglobina.

Tabla 5. Resultado de la búsqueda MASCOT de proteínas humanas en la muestra control (albúmina sin exposición a EtO).

Número	Identificación	Nombre en base de datos	Proteína	MM [kDa]	#Péptidos	SC [%]
1	VERDADERO	ALBU_HUMAN	Albumin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALB PE=1 SV=2	69.3	121	85.6
2	VERDADERO	TRFE_HUMAN	Serotransferrin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TF PE=1 SV=3	77	24	51.1
3	VERDADERO	HPT_HUMAN	Haptoglobin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HP PE=1 SV=1	45.2	27	55.4
4	VERDADERO	HEMO_HUMAN	Hemopexin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HPX PE=1 SV=2	51.6	13	49.1
5	VERDADERO	A1AT_HUMAN	Alpha-1-antitrypsin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SERPINA1 PE=1 SV=3	46.7	7	24.9

MM -masa molecular en kDa; pI: punto isoeléctrico; Score: el mejor puntaje de acuerdo con espectro de masas (M: score de Mascot); #Péptido: número de péptidos identificados; SC [%]: porcentaje cobertura de la secuencia; RMS 90: media cuadrática del error con nivel de confianza del 90%, en ppm; OS: nombre del organismo; OX: identificador taxonómico; GN: nombre del gen; PE: proteína existente; SV: versiones de secuencia.

En la Tabla 6, se muestra el número de péptidos identificados y el porcentaje de cobertura de la secuencia de HSA, obtenidos en la búsqueda realizada para todas las muestras preparadas (1-8). Se observan muy similares porcentajes de cobertura para diferentes condiciones de exposición a EtO y en albúmina sin modificar. Además, el número de péptidos identificados para albúmina con EtO es

mayor que para albúmina control. Estos resultados indican fuera de cualquier duda que las modificaciones por EtO fueron definidas correctamente y que los péptidos modificados fueron reconocidos y asignados a HSA en la búsqueda en MASCOT.

Tabla 6. Comparación de los porcentajes de cobertura en la secuencia de albúmina de origen humano en las muestras de albúmina control (1,5), albúmina incubada con EtO en relación molar 1:100 (2-4) y albúmina incubada con EtO en relación molar 1:1000 (6-8)

Muestra	#Péptidos*	Porcentaje de cobertura de la secuencia (%)
1,5: Alb sin EtO	120 ± 5	84 ± 1
2,3,4: Alb:EtO relación molar 1:100	181 ± 11	85 ± 2
6,7,8: Alb:EtO relación molar 1:1000	191 ± 20	83 ± 2

*Se presenta valor promedio con desviación estándar, en base a dos replicas biológicas y dos técnicas de cada una de las muestras.

Un aspecto importante en el análisis de modificaciones por el grupo ethanolyl (hidroxietilo) es que existen otras posibles modificaciones que introducen valor de $\Delta m/z$ cercano a 44. Para obtener la lista de estas posibles modificaciones adicionales, se utilizó la plataforma de libre acceso en línea Unimod.org, donde se tienen recolectadas las modificaciones que pueden ser detectadas por espectrometría de masas, ya sea aquellas naturales o inducidas. En esta base de datos se incluyen los cambios de masa que ocurren en el análisis de espectrometría de masas en tándem, así como se indican también los residuos específicos dentro del péptido o proteína que son susceptibles a una modificación dada. En aplicación de esta herramienta, se encontraron cinco modificaciones que provocan diferencia de masas de aproximadamente 44, de las cuales, la modificación cuyo número de accesoión es 278, corresponde a la adición de un grupo ethanolyl (hidroxietilo). En la Figura 25, se muestra el resultado específico arrojado para el grupo ethanolyl. Se observa que dicha modificación ocurre en los residuos de cisteína, lisina y arginina con el aumento de masa asociado a esta modificación de 44.0262. Cabe señalar que los datos arrojados con ayuda de Unimod.org coinciden con los resultados obtenidos en este trabajo de manera experimental, exponiendo los aminoácidos individuales a EtO (sección 4.2)

Accession #	278	PSI-MS Name	Ethanolyl	Interim Name	EtOH
Description	Ethanolation				
Alt. Description	Hydroxy ethyl				
Composition	H(4) C(2) O	Monoisotopic	44.026215	Average	44.0526
Specificity Definition 1					
Site	C	Position	Anywhere	Classification	Chemical derivative
Comment	from reaction of SH group with iodoethanol				
Specificity Definition 2					
Site	K	Position	Anywhere	Classification	Chemical derivative
Comment	reduced form of oxidation product				
Specificity Definition 3					
Site	R	Position	Anywhere	Classification	Chemical derivative
Comment	reduced form of oxidation product				
Notes and References					
Source	Journal	Reference	J Biol Chem. 1995 Apr 28;270(17):10017-26.		
Source	Journal	Reference	A simplified procedure for the reduction and alkylation of cysteine residues in proteins prior to proteolytic digestion and mass spectral analysis. Hale JE, Butler JP, Gelfanova V, You JS, Kniernan MD. Anal Biochem. 2004 Oct 1;333(1):174-81		
Source	PubMed PMID	Reference	15351294		
Source	PubMed PMID	Reference	7730303		
Curator	kniernan	Last Modified	2017-10-09 15:47:39	Verified	Yes

Figura 25. Información obtenida mediante herramienta Unimod.org de la modificación tipo etanolil en la estructura de proteínas

De manera similar se obtuvo información sobre otras modificaciones con $\Delta m/z$ cercanas a 44, encontrándose las siguientes: “Gly→ thr substitution” con $\Delta m/z = 44.0262$ en residuos de glicina, “Cys→phe substitution” con $\Delta m/z = 44.0592$ en residuos de cisteína, “Oxidation to nitro” con $\Delta m/z = 44.9850$ en residuos de triptófano, tirosina y fenilalanina, y “Ser→Met substitution” con $\Delta m/z = 44.00845$ en residuos de serina. Se calcularon diferencias absolutas entre valor de cada una de estas modificaciones respecto $\Delta m/z$ correspondiente a grupo ethanoly, mismos que se presentan a continuación:

- |Ethanoly – Gly → thr substitution| = |44.0262 - 44.0262| = **0.0**
- |Ethanoly – Cys → phe substitution| = |44.0262 - 44.0592| = **0.0330**
- |Ethanoly – Oxidation to nitro| = |44.0262 - 44.9850| = **0.9588**
- |Ethanoly – Ser -> Met substitution| = |44.0262 - 44.0085| = **0.0178**

Es de notar que la sustitución de glicina por treonina, de serina por metionina y de cisteína por fenilalanina son las modificaciones que proporcionan el aumento de masa del péptido más cercano a la del grupo hidroxietilo. Ninguna de estas modificaciones se relaciona con la exposición de proteína a EtO y solamente sustitución de cisteína por fenilalanina ocurre sobre el residuo de aminoácido susceptible a la hidroxietilación.

Una vez definidas las modificaciones variables en aminoácidos, se procedió con la identificación de los péptidos asignando residuos específicos en los que ocurrió la hidroxietilación en cada una de las muestras hidrolizadas (muestras 1-8), con ayuda del programa ProteinScape. Para ello, se analizaron los datos espectrales obtenidos en la secuenciación *de novo* de los péptidos. En la Tabla 7 se muestran dos péptidos modificados que fueron encontrados en la albúmina control; ambas modificaciones corresponden a residuos de cisteínas y se detectaron prácticamente en todas repeticiones de muestras control. Por su parte, en la Tabla 8, se presenta lista de los péptidos modificados encontrados en albúmina incubada con exceso 100:1 y 1000:1 de EtO, ordenando estos péptidos en función de decreciente número de muestras en las que fueron detectados.

En ambas tablas (Tabla 7 y 8) se marca el aminoácido modificado con el grupo ethanoly.

Tabla 7. Secuencias de péptidos modificados encontrados en albúmina control, que no fue expuesta a EtO. (La cisteína marcada en rojo corresponde al sitio de modificación; X - número de veces que se detectó el péptido modificado en base a cuatro replicas; los datos se procesaron empleando el software ProteinScape 3.1 y la base de datos SwissProt 2021_03).

Secuencia	Alb sin EtO	Posición en la secuencia de AA	m/z	z	Mr calc.	$\Delta m/z$ ppm.	Rt[min]	Score
K.ALVLIAFAQYLQQ C PFEDHVK.L	XXXX	45 - 65	862.4363	3	2476.2825	1.87	47.70	95.3
K.EFNAETFTFHADI C TLSEK.E	XXX	525 - 543	749.6826	3	2246.0201	2.55	34.27	29.6

Como evidencia de la correcta asignación de cisteínas modificadas en HSA control, en las Figuras 26 y 27 se presenta la secuenciación *de novo* del péptido K.EFNAETFTFHADICTLSEK.E y del péptido

K.ALVLIAFAQYLQQ**C**PFEDHVK.L, respectivamente (Tabla 7). En las siguientes Figuras 28 y 29 se muestran acercamientos de ambos espectros para visualizar mejor los fragmentos tipo y, entre los cuales ocurrió la pérdida de cisteína modificada en el grupo hidroxietilo. En particular, para el péptido K.EFNAETFTFHADI**C**TLSEK.E, la pérdida corresponde a los fragmentos y(6) y y(5) (Figura 28) mientras que para el péptido K.ALVLIAFAQYLQQ**C**PFEDHVK.L fueron los fragmentos y(8) y y(7) (Figura 29).

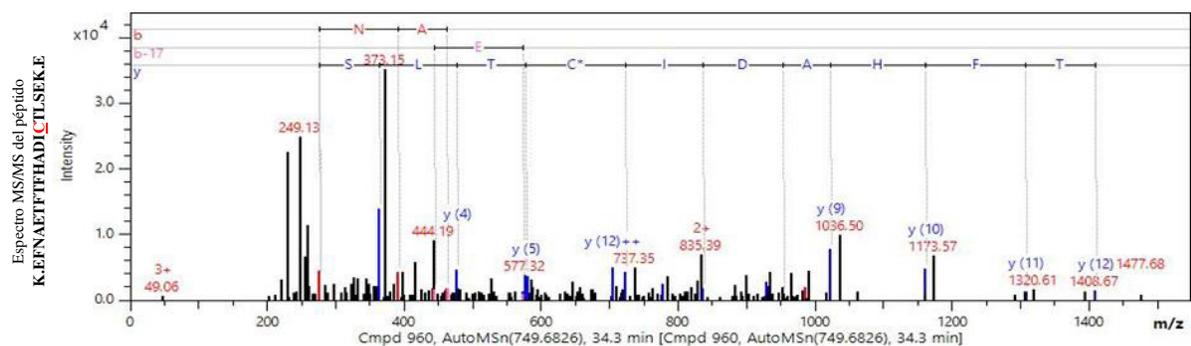


Figura 26. Espectro de masas en tándem del péptido K.EFNAETFTFHADI**C**TLSEK.E (tiempo de retención 34.3 min, $m/z= 2249.0478$, carga +3), resultante de los digestos de las muestras de albúmina control.

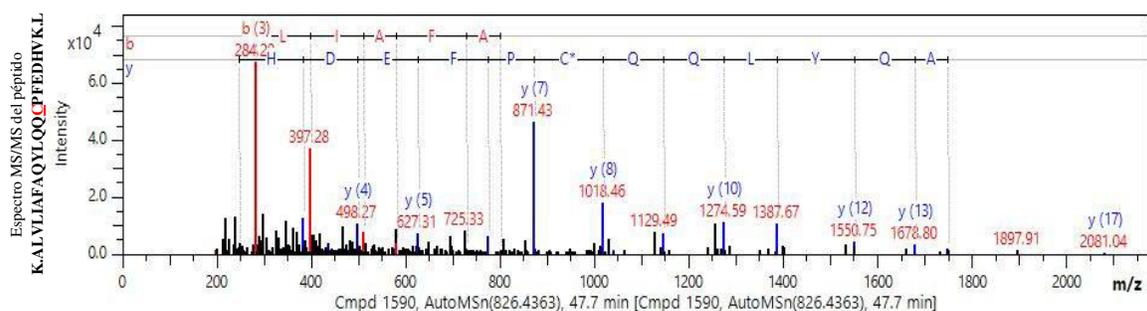


Figura 27. Espectro de masas en tándem del péptido K.ALVLIAFAQYLQQ**C**PFEDHVK.L (tiempo de retención 47.7 min, $m/z= 2587.3089$, carga +3) resultante de los digestos de las muestras de albúmina control.

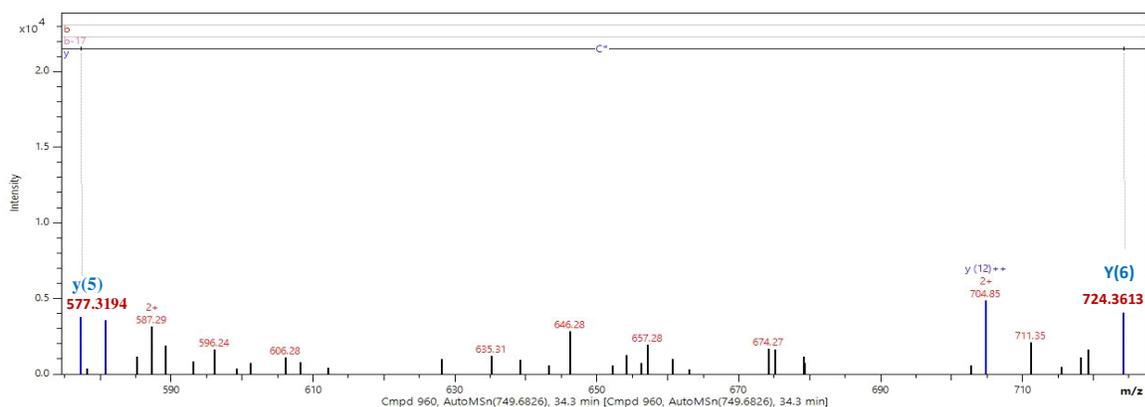


Figura 28. Acercamiento del espectro MS/MS del péptido K.EFNAETFTFHADI**C**TLSEK.E de la Figura 26, visualizando fragmentos y(6) y y(5), correspondientes a la pérdida de cisteína hidroxietilada.

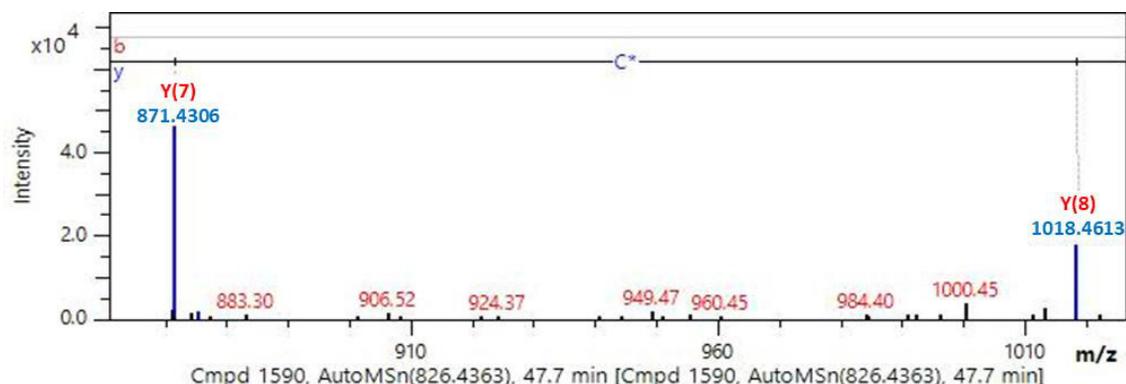


Figura 29. Acercamiento del espectro MS/MS del péptido K.ALVLIAFAQYLQQ**C**PFEDHVK.L de la Figura 27, visualizando fragmentos y(8) y y(7), correspondientes a la pérdida de cisteína hidroxietilada.

En el caso del péptido K.EFNAETFTFHADI**C**TLSEK.E, este se eluyó de la columna con el tiempo de retención de 34.3 min y el valor experimental m/z del ion con una carga +3 correspondió a 749.6826 (masa del péptido 2249.0478 Da). La pérdida de masa entre fragmento y(6) y y(5) es de 147.0419. Considerando que la masa del residuo de cisteína en la cadena peptídica es de 103.0091, la masa del grupo que modificó la cisteína en esta posición resultó ser 44.0309, en buena concordancia con el valor teórico del grupo hidroxietilo (44.0262); sin embargo, el error de masa corresponde a 0.009, por lo que podría tratarse de la sustitución de cisteína por fenilalanina.

Por su parte, el péptido K.ALVLIAFAQYLQQ**C**PFEDHVK.L se eluyó de la columna con el tiempo de retención 47.7 min, su valor m/z para el ion con carga +3 correspondió a 862.4363 (masa del péptido 2587.3089 Da). La pérdida de masa entre fragmentos y(8) e y(7) es de 147.0307, igual que para el péptido anterior. Siguiendo el mismo razonamiento, es posible que la modificación encontrada en el péptido con tiempo de retención 47.7 min también fue una sustitución de cisteína por fenilalanina. Cabe mencionar que ambos péptidos modificados fueron encontrados no solamente en HSA control, sino también en HSA incubada con EtO. En las Figuras 30 y 31 se presentan cromatogramas de iones extraídos de estos péptidos, correspondientes a sus respectivos tiempos de retención, mismos que fueron obtenidos con ayuda de DataAnalysis. Se observa que la abundancia de ambos iones en albúmina control fue relativamente baja, pero aumentó paulatinamente conforme aumentaba la concentración del EtO a la que se expuso HSA. Como conclusión, no es posible distinguir entre hidroxietilación y sustitución de cisteína por fenilalanina en albúmina control; sin embargo, está claro que la exposición de HSA a EtO causó la hidroxietilación de ambos péptidos.

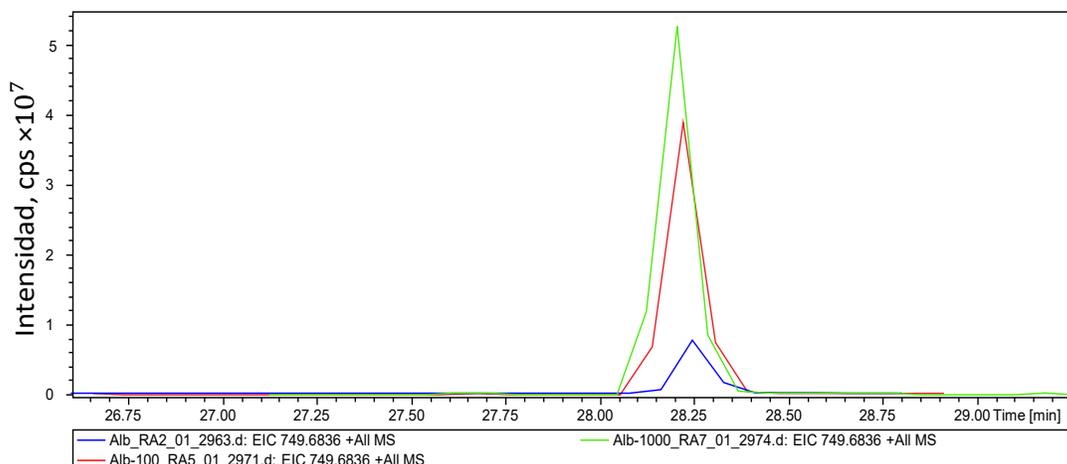


Figura 30. Cromatogramas del ion extraído del péptido K.EFNAETFTFHADICTLSEK.E adquiridos para albúmina control (azul), albúmina incubada con EtO en relación molar 1:100 (rojo) y en relación molar 1:1000 (verde).

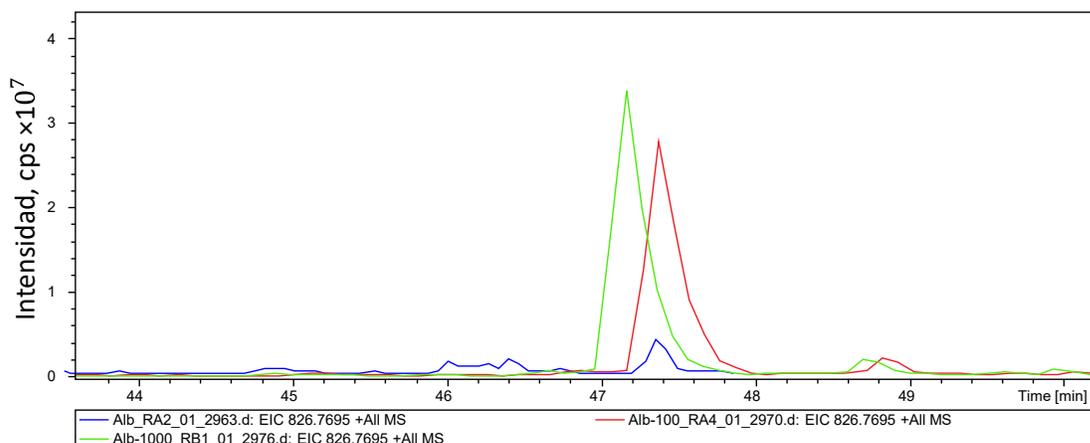


Figura 31. Cromatogramas del ion extraído del péptido K.ALVLIAFAQYLQQCPFEDHVK.L adquiridos para albúmina control (azul), albúmina incubada con EtO en relación molar 1:100 (rojo) y en relación molar 1:1000 (verde).

Tabla 8. Péptidos identificados en albúmina incubada con EtO en relación 1:100 y 1:1000 (El aminoácido marcado en rojo corresponde al sitio de modificación; X - número de veces que se detectó el péptido modificado en base a cuatro replicas; Los datos se procesaron empleando el software ProteinScape 3.1 y la base de datos SwissProt 2021_03.

Secuencia	Alb:EtO 1:100	Alb:EtO 1:1000	Posición en la secuencia de AA	m/z	z	Mr calc.	Δ m/z ppm.	Rt[min]	Score
K.ALVLIAFAQYLQQ C PFEDHVK.L	XXXX	XXXX	45 - 65	862.4363	3	2476.2825	1.66	47.4	110.7
K.EFNAETFTFHADI C TLSEK.E	XXXX	XXXX	525 - 543	749.6818	3	2246.0201	5.31	34	62.1
R. R HDPDYSVLLLR.L	XXXX	XXXX	361 - 372	504.6301	2	1510.862	3.88	30.2	75.5
K. K VPQVSTPTLVEVSR.N	XXXX	XXXX	438 - 452	561.8807	3	1682.9567	3.35	24.6	88.1
R. R HPLYFYAPPELLFFAK.R	XXXX	XXXX	169 - 183	648.3479	3	1942.0141	4.51	39.6	75.5
R.MP C AEDYLSVVLNQLCVLHEK.T	XXXX	XXXX	470 - 490	816.7391	3	2447.1899	1.35	49.2	113.3
K.QN C ELFEQLGEYK.F	XXXX	XXXX	414 - 426	822.8847	2	1643.7501	2.85	31	92.9
K.SH C IAEVENDEMPADLPSLAADFVESK.D	XXXX	XXXX	311 - 337	987.7892	3	2960.342	0.43	40.4	114.7
K.QN C ELFEQLGEYK.F	XXXX	XXXX	414 - 426	814.3707	2	1643.7501	1.29	34.3	70.6
K.VFDEF K PLVEEPQNLK.Q	XXXX	XXXX	397 - 413	697.0462	3	2088.1143	1.15	35.9	62.3
K.QEPERNE C FLQHKDDNPNLPR.L	XXXX	XXXX	118 - 138	656.5658	4	2622.2245	3.61	20.7	38.1
R.LVRPEVDVM C TAFHDNEETFLKK.Y	XXXX	XXXX	139 - 161	692.0968	4	2764.3564	0.59	31.9	76.3
K.AVMDDFAAFVE K CCK.A	XXXX	XXXX	570 - 584	574.2644	3	1719.767	2.59	43.6	69.3
K.AVMDDFAAFVE K .C	XXXX	XXXX	570 - 581	693.8342	2	1385.6537	0.13	34.9	54.8
K.EFNAETFTFHADI C TLSEKER.Q	XXXX	XXXX	525 - 545	633.7996	4	2531.1639	2.21	32.3	80
R.MPCAEDYLSVVLNQL C VLHEK.T	XXXX	XXXX	470 - 490	816.7379	3	2447.1899	0.8	48.2	132.7
R.FKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQ C PFEDHVK.L	XXXX	XXXX	35 - 65	737.7833	5	3683.8968	2.84	48.3	61.6
K. K LVAASQAALGL.-	XXX	XXXX	598 - 609	593.3654	2	1184.7129	2.76	47.4	79.5
R.RP C FSALEVDETYVPK.E	XXX	XXXX	509 - 524	949.4729	2	1896.9292	1.14	28.9	73
R.NE C FLQHKDDNPNLPR.L	XXX	XXXX	123 - 138	496.7409	4	1982.9269	3.74	19.1	65.9
K.RMP C AEDYLSVVLNQLCVLHEK.T	XXX	XXXX	469 - 490	868.7722	3	2603.291	1.39	47.2	93.2
K.AAFTE C CQAADK.A	XXX	XXXX	187 - 198	651.2797	2	1300.5428	1.58	16.4	81.7
K.L C TVATLR.E	XX	XXXX	98 - 105	460.768	2	919.9161	5.82	19.4	38.9
K.LVNEVTEFA K .T	XX	XXXX	66 - 75	597.3258	2	1192.6340	2.62	23.3	45.8

R.RHPYFYAPELLFFA <u>K</u> R.Y	X	XXXX	169 - 184	525.5388	4	2098.1153	5.2	36.4	55
R.LVRPEVDVM <u>C</u> TAFHDNEETFLK.K	XXXX	XXX	139 - 160	660.0733	4	2636.2615	8.31	33.9	50.7
K.RMPCAEDYLSVVLNQLCVLHE <u>K</u> TPVSDR.V	XX	XXX	469 - 496	652.7326	5	3258.6199	2.000	46.2	52.5
K.DLGEENFKALVLIIFAQYLQQ <u>C</u> PFEDHVK.L	XX	XXX	37 - 65	853.1865	4	3408.7064	3.04	50.5	81
R.MPCAEDYLSVVLNQLCVLHE <u>K</u> TPVSDR.V	XX	XXX	470 - 496	776.6392	4	3102.5188	2.81	48	38.1
K.YI <u>C</u> ENQDSISSK.L	X	XXX	287 - 298	715.8316	2	1429.6395	6.40	14.2	71.1
R.LVRPEVDVMCTAFHDNEETFL <u>K</u> K.Y	X	XXX	139 - 161	692.0975	4	2764.3564	1.67	33.1	31.3
K.VHTECCHGDLLE <u>C</u> ADDRADLAK.Y		XXX	265 - 286	615.2785	4	2457.0723	5.11	22.6	39.2
K.QEPE <u>R</u> NECFLQHKDDNPPLPR.L	XXXX	XX	118 - 138	656.5665	4	2622.2245	4.66	21.2	10.6
K.VHTE <u>C</u> CHGDLLECADDRADLAK.Y	XXXX	XX	265 - 286	615.2764	4	2457.0723	1.71	22.9	36
K.SLHTLFGDKL <u>C</u> TVATLR.E	XXXX	XX	89 - 105	640.3523	3	1918.0346	0.25	32.4	97.7
K.KVPQVSTPTLVEVS <u>R</u> .N	XXX	XX	438 - 452	561.9947	3	1682.9567	3.22	24.9	32.5
R.RPCFSALEVDETYVP <u>K</u> .E	XX	XX	509 - 524	633.3193	3	1896.9292	3.61	29.5	17.8
K.QEPERNE <u>C</u> FLQHKDDNPPLPR.L	XX	XX	118 - 138	656.5656	4	2622.2245	3.4	18.4	50.1
K.QEPE <u>R</u> NECFLQHKDDNPPLPR.L	XX	XX	118 - 138	656.5658	4	2622.2245	3.61	18.7	55.8
R.LVRPEVDVM <u>C</u> TAFHDNEETFL <u>K</u> .K		XX	139 - 160	671.0823	4	2680.2877	4.6	34.5	30.7
K.RMP <u>C</u> AEDYLSVVLNQL <u>C</u> VLHEK.T		XX	469 - 490	662.838	4	2647	2.1	45.9	62.6
K.TYETTLE <u>K</u> CCAAADPHECYAK.V		XX	376 - 396	598.5154	4	2390.0229	4.04	27.2	13.7
R.LVRPEVDVM <u>C</u> TAFHDNEETFL <u>K</u> K.Y		XX	139 - 161	703.1049	4	2808.3826	2.47	32.6	21.4
K.QEPERNE <u>C</u> FLQHKDDNPPLPR.L	X	XX	118 - 138	656.5656	4	2622.2245	3.4	18.66	50
K.EQL <u>K</u> AVMDDFAAFVEK.C	X	XX	566 - 581	628.9874	3	1883.9339	3.49	39.8	60.7
K. <u>C</u> TESLVNR.R	X	XX	500 - 508	534.748	2	1067.474	7.01	14.5	46
K. <u>R</u> MPCAEDYLSVVLNQL <u>C</u> VLHEK.T	XX		469 - 490	662.8393	4	2647.3172	4.06	46.1	19.6
K.QEPERNECFLQH <u>K</u> DDNPPLPR.L	X	X	118 - 138	656.5652	4	2622.2245	2.77	18.7	30.2
R.ETYGEMAD <u>C</u> CAK.Q	X	X	106 - 117	628.7630	2	1363.5094	1.45	17.3	56.2
K.ALVLIAFAQYLQQ <u>C</u> PFEDHVKLNEVTEFAK.T	X	X	45 - 75	902.7292	4	3606.8796	2.24	49.6	26.6

K.CCTESLVNR.R		X	500 - 508	534.7462	2	1067.474	3.65	15.7	53
K.LKECCEKPLLEK.S		X	299 - 310	492.9346	3	1475.7728	6.28	16.7	18.3
K.TCVADESAENCDK.S		X	76 - 88	714.7895	2	1427.5545	6.92	11.5	14.5
R.MPCAEDYLSVVLNQLC _V LHEK.T		X	470 - 490	1246.6201	2	2496.2161	3.86	48.2	51.5
K.QEPE _R NE _C FLQHKDDNP _N LPR.L		X	118 - 138	667.5730	4	2666.2507	4.55	18.4	40.3
K.QEPE _R NE _C FLQHKDDNP _N LPR.L		X	118 - 138	663.313	4	2649.2242	-0.51	19.5	22.7
K.QEPE _R NE _C FLQ _H KDDNP _N LPR.L		X	118 - 138	534.2578	5	2666.2507	0.79	19.6	14.3
K.VHTEC _C HGD _L LECADD _R AD _L AK.Y		X	265 - 286	615.2772	4	615.2772	3.00	22.5	23.7
K.NYAEA _K DVFLGMFLY _E YAR.R		X	342 - 360	782.0522	3	2343.1246	4.35	43.4	30.9
R.ETYGEMADC _C AK.Q		X	106 - 117	682.7621	2	1363.5094	0.18	17.3	40.8
K.QNCELFEQLGEY _K .F		X	414 - 426	822.8834	2	1643.7051	1.30	32.4	26.8
K.ALVLIAFAQYLQ _C PFEDHV _K LVNEVTEFAK.T		X	45 - 75	913.7353	4	902.7292	1.67	49.2	22.5
K.VFDEFKPLVEEPQNLI _K .Q		X	397 - 413	697.0477	3	2088.1143	3.36	35.9	15.9
R.LVRPEVDVMCTAFHDNEETFL _K .K		X	139 - 160	660.0757	4	2636.2615	4.6	35.6	14.1
R. _R PCFSALEVDETYVPK.E	X		509 - 524	633.3184	3	1896.9292	2.24	28.4	69
K. _R MPCAEDYLSVVLNQLC _V LHEK.T	X		469 - 490	651.8323	4	2603.291	3.48	46.9	96.6
K.AAFTEC _C QAADK.A	X		187 - 198	651.2823	2	1300.5428	5.63	16.2	57.1

Como un ejemplo de aquellos péptidos modificados que solamente se encontraron en HSA incubada con EtO y no en muestras control, se tomó el R.MPCCAEDYLSVVLNQLC**VL**HEK.T. Los espectros de secuenciación *de novo* de este péptido obtenidos para albúmina control, albúmina incubada con EtO en relación molar 1:100 y 1:1000 se presentan en la Figura 32. Dicho péptido equivale a los aminoácidos 470 – 490 de la secuencia de HSA de 609 AA. La diferencia de masa para fragmento b(3) entre albúmina control e incubada con EtO era de 44.0262, confirmando hidroxietilación en residuo de cisteína 472. Cabe señalar que el error de masa entre valor teórico y experimental resultó ser nulo, lo que confirma que la diferencia encontrada corresponde a la modificación por hidroxietilación. En importante, que la modificación solamente fue detectada en albúmina expuesta a EtO.

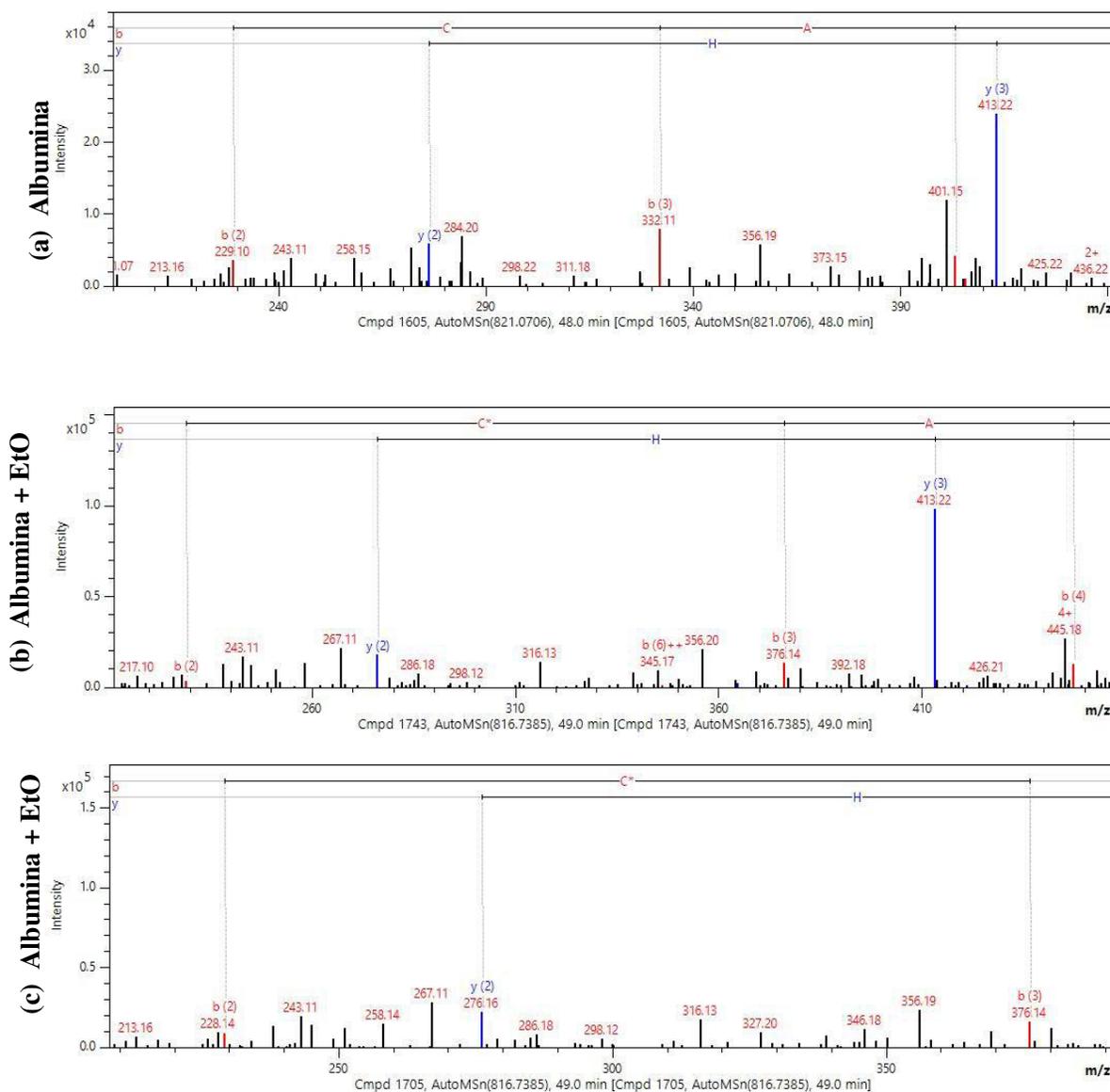


Figura 32. Espectros de masas en tándem del péptido R.MPCCAEDYLSVVLNQLC**VL**HEK.T resultante de los digestos de: Albúmina control (a); albúmina-EtO en relación 1:100 (b); y albúmina-

EtO en relación 1:1000 (c). Se observa $\Delta m/z = 44.0262$ del fragmento b(3) entre albúmina control e incubada con EtO.

Siguiendo la misma estrategia para todos péptidos modificados, se anotaron los residuos de aminoácidos en los que ocurrió la hidroxietilación; estos residuos se marcaron en color rojo en la primera columna de Tabla 8. En base a la secuencia de 609 aminoácidos en albúmina (la secuencia fue obtenida mediante la página web uniprot.org), en la Figura 33 se marcan los residuos encontrados con grupo etanoyl. Con color verde se presentan modificaciones encontradas para ambos excesos de EtO respecto HSA, en color azul se resaltan aquellas modificaciones encontradas exclusivamente en la relación molar 1:100 y con rojo las modificaciones exclusivas para la relación 1:1000.

<u>1</u>	MKWVTFISLL	FLFSSAYSRG	VFRRDAHKSE	VAHRFKDLGE	ENFKALVLIA
<u>51</u>	FAQYLQQ C PF	EDHV K LVNEV	TEFA K TCVAD	ESAENCD K SL	HTLFGDKL C T
<u>101</u>	VATLRETYGE	MAD C C A K QEP	E R NE C FLQH K	DDNPNLPRLV	RPEVDVM C T A
<u>151</u>	FHDNEETFL K	K YLYEIAR R H	PYFYAPELLF	FAK R YKAAFT	E C C QAAD K AA
<u>201</u>	CLLP K LDELRL	DEG K ASSAKQ	RLKCASLQKF	GERAFKAWAV	ARLSQRFPKA
<u>251</u>	EFAEVSKLVT	DLTKVHTEC C	HGDLLCADD	RADLAKYI C E	NQDSISSKL K
<u>301</u>	E C C E K PLLE K	SH C IAEVEND	EMPADLPSLA	ADFVES K DVC	KNYAEAKDVF
<u>351</u>	LGMFLYEYAR	R HPDYSVLL	LRLAKTYETT	LE K CCAAADP	HECYAKVFDE
<u>401</u>	F K PLVEEPQN	LI K QN C ELFE	QLGEY K FQNA	LLVRYTK K VP	QVSTPTLVEV
<u>451</u>	SRNLGKVGSK	CCKHPEAK R M	P CAEDYLSVV	LNQL C VLHE K	TPVSDRVTKC
<u>501</u>	C TESLVNR R P	C FSALEVDET	YVPKEFNAET	FTFHADI C T L	SE K ERQIKKQ
<u>551</u>	TALVELVKHK	PKATKEQLKA	VMDFFAAFVE	K C C K ADDKET	CFAEEGKKLV
<u>601</u>	AASQAALGL				

Figura 33. Anotación de los sitios específicos de modificación por hidroxietilación en la secuencia de 609 aminoácidos de HSA. (azul- residuos encontradas solamente para el exceso molar de EtO respecto a HSA 100:1; rojo – residuos encontrados para el exceso molar 1000:1; azul – residuos encontrados para ambos excesos molares del EtO).

A manera de resumen, en la Tabla 9 se señala el número de cada una de las modificaciones encontradas, dependiendo de las condiciones de exposición. De acuerdo con los datos obtenidos en el análisis de aminoácidos libres (sección 4.2), el aminoácido más susceptible a la modificación por EtO resultó ser cisteína, con 20 sitios de hidroxietilación en total; entre ellos, dos sitios comunes con HSA control, 12 más en la HSA expuesta a cualquier exceso de EtO, una y cinco en HSA incubada con exceso de EtO 100:1 y 1000:1, respectivamente. Es importante que, en contraste a otros aminoácidos, el grupo más vulnerable a hidroxietilación en cisteína es el grupo tiol y que el número de modificaciones aumentó con el creciente exceso molar de EtO respecto a la proteína.

Tabla 9. Número de residuos de cada uno de los aminoácidos encontrados como modificados por hidroxietilación, dependiendo de las condiciones de exposición.

Muestra	Número de modificaciones en aminoácidos individuales			
	Cisteína (C)	Lisina (K)	Arginina (R)	total
HSA control	2	0	0	2
EtO:HSA 100:1 y 1000:1	14	10	4	28

EtO:HSA 100:1	1	0	2	3
EtO:HSA 1000:1	5	7	0	12

En el caso de lisina, no se encontraron residuos modificados en la proteína control, mientras que la incubación con EtO causó adición de diez grupos etanoyl comunes para dos diferentes condiciones de exposición y siete adicionales, cuando el exceso molar de EtO era de 1000:1. En total, fueron 17 residuos de lisina hidroxietilados en el grupo ϵ -amino (ver la sección 4.2).

Los residuos de arginina fueron relativamente menos susceptibles a la hidroxilación con seis modificaciones detectadas en un total de las muestras y sus repeticiones. Cabe recordar que, en este aminoácido, el grupo vulnerable es el de guanidino; como se observa en la Tabla 9, cuatro argininas hidroxietiladas fueron encontradas tanto para exceso de EtO 100:1 como 1000:1; dos adicionales fueron detectadas para el exceso 100:1.

En total, se hallaron 43 sitios de modificación por hidroxietilación en la secuencia del HSA (Tabla 9); este resultado sugiere una parecida reactividad de EtO comparando con típicos agentes glicantes. Por ejemplo, en un estudio anterior donde HSA fue expuesto a metilglioxal en relación molar 1:110, el número total de modificaciones encontradas en lisina, arginina y cisteína era de 39 [86].

Finalmente, es importante mencionar que los cambios estructurales en los residuos de cisteína, arginina, y lisina por hidroxietilación parecen no afectar la eficacia del corte de sus respectivos enlaces peptídicos por actividad de la tripsina. Como se puede observar en la Tabla 8, varios de los péptidos tienen modificados residuos de aminoácidos terminales, es decir, a pesar de grupo ethanoyl unido al aminoácido (grupo tiol en C, grupo guanidino en Arg, grupo ϵ -amino en L), la enzima realiza el corte de la cadena peptídica en este sitio.

Otro aspecto importante, digno de señalar es que la cisteína modificada en el péptido K.ALVLIAFAQYLQQ**C**PFEDHVK.L corresponde al residuo 54 de la secuencia de 609 aminoácidos en HSA (34 en base a la secuencia de 585 AA). Este resultado queda confirmado por la presencia de Cys-34 hidroxietilada en otros péptidos que contienen parte de la misma secuencia, por ejemplo: K.DLGEENFKALVLIAFAQYLQQ**C**PFEDHVK.L y K.ALVLIAFAQYLQQ**C**PFEDHVKLVNEVTEFAK.T (Tabla 8).

La estructura tridimensional de la albúmina de suero humano consiste en tres dominios homólogos, I (residuos 1-195), II (196-383) y III (384-585), los cuales se encuentran dispuestos en α -hélice antiparalelas y son estructuralmente similares, a su vez, se encuentran subdivididos en dos subdominios (A con 6 hélices y B con 4 hélices). HSA contiene 35 residuos de cisteína, de los cuales 34 están involucrados en 17 puentes de disulfuro, que estabilizan la estructura globular de esta macromolécula, además HSA tiene 58 residuos de Lisina y 24 de Arginina [87]. La Figura 32 muestra el modelo de la estructura tridimensional de HSA. La Cys-34 se encuentra en el fondo de una grieta semiabierta en subdominio IA, es la única cisteína en la secuencia HSA que no participa en la formación de puentes disulfuro y contribuye fuertemente en las propiedades antioxidantes de la proteína. Por otro lado, este residuo participa en la unión de algunos iones metálicos y de varios fármacos tales como cisplatino, D-penicilamina y N-Acetilamina, pero es también un blanco de modificaciones [88]. Es importante que la modificación de residuos de AA en una proteína mediante agentes glicantes y por hidroxietilación puede afectar la capacidad de dicha proteína para unir y transportar diferentes tipos de compuestos [89].

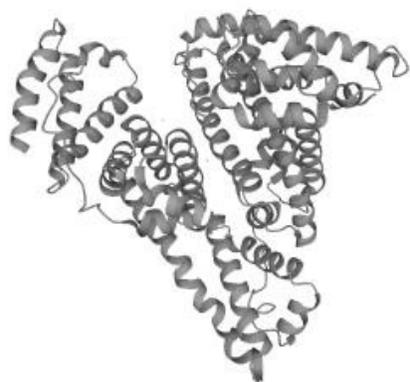


Figura 34. Modelo tridimensional de albúmina de origen humano obtenido mediante la página web Uniprot.org

Aunado a los residuos de cisteína, se sabe que también los residuos de arginina y lisina, son susceptibles al proceso de glicación, debido a sus fuertes propiedades nucleofílicas, y que este tipo de modificación puede afectar tanto la estructura tridimensional como la funcionalidad de las proteínas [86].

Con estos antecedentes, parecía importante verificar si las modificaciones introducidas en HSA por el contacto con EtO podrían afectar su capacidad para unir los fármacos.

4.5 Efecto de la modificación de albúmina sobre la interacción de proteína con agentes terapéuticos (caso de cloranfenicol).

La albúmina en el suero representa un 52-60% de las proteínas solubles circulando en el torrente sanguíneo y tiene múltiples funciones fisiológicas; entre ellas, al combinarse con compuestos tanto endógenos como exógenos, facilita su transporte hasta los sitios específicos de acción [90, 91]. Los subdominios IIA y IIIA de la estructura tridimensional de HSA son considerados como principales sitios de enlace de fármacos. El subdominio IIA tiene una cavidad hidrófoba cuya geometría determina la unión con fármacos. En esta cavidad (región Sudoeste I, Sudlow I en inglés), se encuentra el único residuo de triptófano (Trp-214), el cual actúa como fluoróforo intrínseco de la proteína (Figura 33a). Es por ello que, cambios de fluorescencia de HSA se utilizan para monitorear la captación de un fármaco por la proteína [92]. El “quenching” de fluorescencia es usualmente observado en la región 300-350 nm, al utilizar las longitudes de onda de excitación 280-290 nm [93], [94].

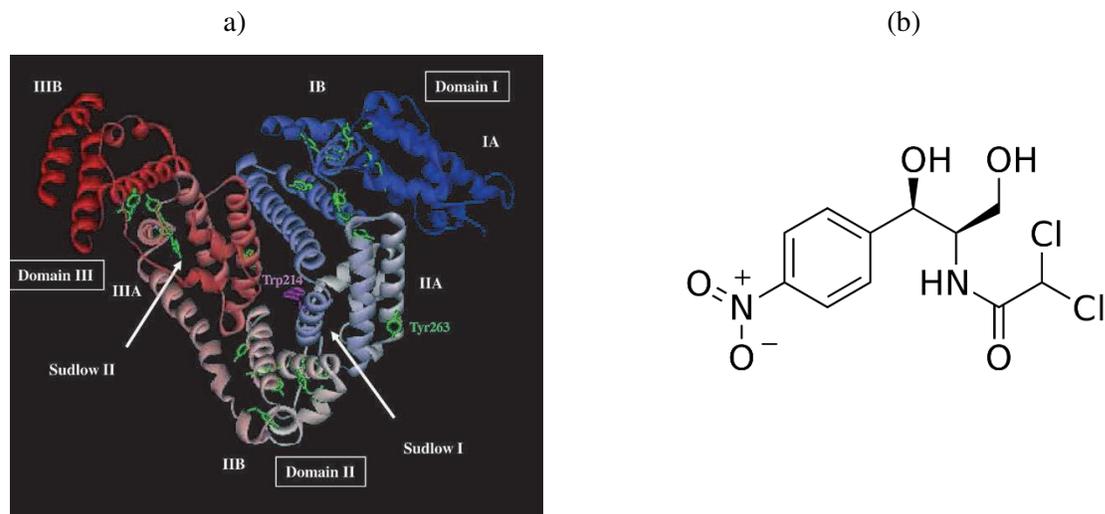


Figura 35. Estructura de HSA, en la cual se marcan subdominios y regiones; se observa la cavidad en la región sudoeste I (Sudlow I) donde se encuentra Trp-214 [95] (a) y la estructura de cloranfenicol (b).

Se ha estudiado la interacción de diferentes tipos de fármacos con HSA, entre ellos, el cloranfenicol (clornitromicina). Es un antibiótico de amplio espectro, efectivo contra bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas, incluyendo bacterias anaeróbicas. Se utiliza principalmente en preparaciones tópicas (pomadas y gotas para los ojos) para el tratamiento de conjuntivitis bacteriana [96]. Se ha reportado su interacción con HSA y relacionado con ello quenching de fluorescencia nativa del HSA [97]. El objetivo de esta parte del proyecto de tesis ha sido evaluar el efecto de la modificación del HSA por EtO en la capacidad de la proteína de unir cloranfenicol, utilizando para ello el sistema de inyección de muestra al flujo continuo de un portador (FIA) y detección fluorimétrica (FLD).

Para realizar el trabajo experimental, se prepararon las siguientes soluciones:

- Tampón de bicarbonato de amonio, 50 mmol/L, pH 7.8;
- Albúmina de suero humano 0.5 mg/mL (7.5 μ M) en el tampón de bicarbonato de amonio;
- Solución de NaCl, 5 mol/L;
- Solución stock de cloranfenicol 3 mmol/L en tampón de bicarbonato;
- Solución de EtO en metanol, diluida 1:20 con el tampón de bicarbonato de amonio;
- Mezclas de reacción albúmina:óxido de etileno 1:1000:

A. Blanco - solución de albúmina 0.5 mg/mL (7.5 μ mol/L) en el tampón de bicarbonato de amonio. En un tubo Eppendorf, agregar 75 μ L de la solución stock de albúmina 0.50 mg/mL (0.0075 mmol/L, 7.5 μ mol/L), completar hasta un volumen de 150 μ L con tampón de bicarbonato de amonio (0.0037 mmol/L, 3.7 μ mol/L de albúmina)

B. Solución de albúmina:óxido de etileno 1:1000 en tampón de bicarbonato de amonio;

- Mezclas de reacción albúmina (A) : cloranfenicol; se examinaron tres concentraciones del farmaco preparando las soluciones de acuerdo con Tabla 10. Cada una de las soluciones contenía albúmina 1.875 μ mol/L, NaCl 0.15 mol/L y el volumen final fue de 300 μ L. Todas las mezclas fueron incubadas por 24 h a 37°C.

Tabla 10. Elaboración de las soluciones de albúmina con cloranfenicol

Solución A, μ L	Cloranfenicol 3mmol/L, μ L	Conc. Final cloranfenicol, mmol/L	NaCl (5 mol/L), μ L	Tampón, μ L
150	0	0	9.0	141
150	8.0	0.08	9.0	133
150	10	0.10	9.0	131
150	20	0.20	9.0	121

- Mezclas de reacción albúmina modificada con EtO (B):cloranfenicol; se examinaron tres concentraciones del farmaco preparando las soluciones de acuerdo con Tabla 11. Cada una de las soluciones contenía albúmina 1.875 μ mol/L, NaCl 0.15 mol/L y el volumen final fue de 300 μ L. Todas las mezclas fueron incubadas por 24 h a 37°C.

Tabla 11. Elaboración de las soluciones de albúmina modificada con EtO (B) con cloranfenicol

Solución B, μL	Cloranfenicol 3mmol/L, μL	Conc. Final cloranfenicol, mmol/L	NaCl (5 mol/L), μL	Tampón, μL
150	0	0	9.0	141
150	8.0	0.08	9.0	133
150	10	0.10	9.0	131
150	20	0.20	9.0	121

- Blancos de cloranfenicol: se prepararon soluciones del farmaco 0, 0.08, 0.10, 0.20 mmol/L, igual como se presenta en las Tablas 10 y 11, pero sin agregar albúmina. Estas soluciones tambien se incubaron por 24 h a 37°C.

Todas las soluciones que se acaban de describir, se prepararon por duplicado. En la tabla 12, se presenta anotacion de las soluciones preparadas, en secuencia de su análisis.

Tabla 12. Secuencia de las soluciones preparadas para su análisis

#	Composicion	Cloranfenicol, μmol/L	Albúmina, μmol/L	Relacion molar albúmina:farmaco
1	Albúmina (A)	0	1.875	-
2	Albúmina (A)	0	1.875	-
3	Cloranfenicol	80	0	-
4	(A):cloranfenicol	80	1.875	1:43
5	(A):cloranfenicol	80	1.875	1:43
6	Cloranfenicol	100	0	-
7	(A):cloranfenicol	100	1.875	1:53
8	(A):cloranfenicol	100	1.875	1:53
9	Cloranfenicol	200	0	-
10	(A):cloranfenicol	200	1.875	1:107
11	(A):cloranfenicol	200	1.875	1:107
12	Blanco albúmina	0	1.875	-
13	Albúmina:EtO (B)	0	1.875	-
14	Albúmina:EtO (B)	0	1.875	-
15	Cloranfenicol	80	0	-
16	(B):Cloranfenicol	80	1.875	1:43
17	(B):Cloranfenicol	80	1.875	1:43
18	Cloranfenicol	100	0	-
19	(B):Cloranfenicol	100	1.875	1:53
20	(B):Cloranfenicol	100	1.875	1:53
21	Cloranfenicol	200	0	-
22	(B):Cloranfenicol	200	1.875	1:107
23	(B):Cloranfenicol	200	1.875	1:107

Las soluciones obtenidas fueron introducidas al sistema FIA-FLD. Para esto, cada una de ellas fue transferida a un vial, el cual fue colocado en el automuestreador siguiendo la secuencia presentada en Tabla 12. Se utilizo el cromatógrafo de líquidos modelo 1200 de Agilent Technologies, sin columna.

Con ayuda del automuestreador, las alícuotas de 5 µL de cada solución fueron inyectadas al flujo continuo del formiato de amonio 40 mmol/L en agua, manteniendo la velocidad del flujo 0.5 mL/min. De esta manera, se realizó el transporte de las soluciones al detector fluorimétrico (modelo G1321 A, Agilent Technologies) utilizando la longitudes de onda de excitación 275 nm y midiendo la emisión a 305 nm. Los datos obtenidos fueron calibrados y procesados en modo Batch mediante el Software ChemStation, con la finalidad de obtener el reporte basado en altura de picos en fiagrama.

Como resultado de interacción de HSA con cloranfenicol se espera la disminución de fluorescencia nativa de la proteína; para observar este efecto, se prepararon las soluciones 1-11 (Tabla 12). Para examinar si la modificación de HSA con EtO influye en la capacidad de la proteína para unir el fármaco, se prepararon las soluciones 13-23 (Tabla 12). En todas estas soluciones se realizó la medición de fluorescencia de HSA, empleando el sistema FIA-FLD descrito en el párrafo anterior. Cabe señalar que FIA permite un rápido y altamente reproducible transporte de pequeñas porciones de la muestra al detector, registrando un fiagrama en el modo de adquisición de datos en tiempo real. De esta manera, el fiagrama está compuesto por una serie de señales simétricos y angostos, cuya altura y área son proporcionales a la concentración de analito en la muestra. Al medir señal de fluorescencia específico para HSA nativa (conferida por Trp-214) se pueden detectar cambios de la señal fluorimétrica debidas a la interacción de la proteína con el fármaco.

Los primeros experimentos en esta parte de trabajo se realizaron sin agregar cloruro de sodio a las soluciones 1-23 y no se observó el efecto de quenching de fluorescencia de HSA por interacción con el fármaco. Sabiendo que la concentración fisiológica de la sal es de 0.9% m/v (0.15 mol/L) y que el incremento de fuerza iónica causa una mejor interacción entre especies en la solución acuosa, se decidió agregar cloruro de sodio 0.15 mol/L a todas soluciones que fueron preparadas (1-23). El otro punto importante es que los blancos de cloranfenicol (muestras 3, 6, 9, 15, 18, 21, Tabla 12) no presentaron señal de fluorescencia en las condiciones utilizadas.

Para albúmina control que no fue expuesta a EtO, los resultados de medición de fluorescencia en presencia de diferentes concentraciones de cloranfenicol se presentan en la Tabla 13. Se observa que, después de 24 horas de exposición al fármaco, ocurre la disminución de fluorescencia de HSA y que esta disminución aumenta conforme incrementa la concentración del fármaco, llegando al 15.1% de quenching de fluorescencia en presencia de cloranfenicol 200 µmol/L (relación molar cloranfenicol:HSA 107:1).

Tabla 13. Resultados obtenidos por FIA-FLD para muestras de albúmina control (solución A) expuesta a diferentes concentraciones de cloranfenicol.

Muestras*	Cloranfenicol, µmol/L	Altura de señal FLD**	CV, %***	Señal relativa, %****
1, 2	0	20.4	3.0	100
4, 5	80	18.5	4.2	90.7
7, 8	100	18.1	10.2	88.8
10, 11	200	17.3	4.3	84.9

* - números corresponden a la anotación de secuencia en la Tabla 12; ** - Valor promedio en base a tres inyecciones de dos muestras preparadas de manera independiente (n=6); *** - coeficiente de variación en base a valores FLD individuales n=6; ****- calculado normalizando la señal promedio por la de albúmina sin agregar fármaco

Para albúmina modificada con EtO, los resultados de medición de fluorescencia después de 24 horas del contacto con diferentes concentraciones de cloranfenicol se presentan en la Tabla 14. En este caso

también ocurre disminución de fluorescencia; sin embargo, el efecto observado es más notorio comparando con albúmina no modificada, con el quenching de 17.3% en presencia de cloranfenicol 200 $\mu\text{mol/L}$ (relación molar cloranfenicol:HSA 107:1).

Tabla 14. Resultados obtenidos por FIA-FLD para muestras de albúmina modificada con EtO (solución B) expuesta a diferentes concentraciones de cloranfenicol.

Muestras*	Cloranfenicol, $\mu\text{mol/L}$	Altura de señal FLD**	CV, %***	Señal relativa, %****
13, 14	0	22.6	7.8	100
16, 17	80	20.2	8.4	89.2
19, 20	100	18.8	1.0	87.0
22, 23	200	18.7	3.0	82.7

* - números corresponden a la anotación de secuencia en la Tabla 12; ** - Valor promedio en base a tres inyecciones de dos muestras preparadas de manera independiente (n=6); *** - coeficiente de variación en base a valores FLD individuales n=6; ****- calculado normalizando la señal promedio por la de albúmina modificada con EtO y sin agregar fármaco

Los resultados correspondientes a la disminución de fluorescencia causada por interacción con el fármaco de proteína control y la modificada con EtO se presentan de manera gráfica en la Figura 34. En particular, se trazan cambios relativos de la fluorescencia de HSA nativa (en azul) y de HSA modificada con EtO (en rojo), en función de la concentración del cloranfenicol. Se presentan valores promedios con respectivas desviaciones estándar y se observa claramente que el fármaco causó un mayor quenching de fluorescencia para albúmina modificada respecto control. Este resultado sugiere que la modificación de HSA con EtO aumentó la capacidad de proteína en la interacción con el cloranfenicol en las condiciones *in vitro* empleadas. Cabe señalar que para albúmina, no se encontraron estudios previos sobre efecto de hidroxilación en la secuencia de aminoácidos sobre la interacción de la proteína con fármacos. Por otro lado, en el caso de albúmina glicada, se ha reportado tanto incremento como la disminución en su interacción con diferentes agentes, incluyendo fármacos, dependiendo del tipo de ligando y de las condiciones de exposición [98, 99, 100, 101].

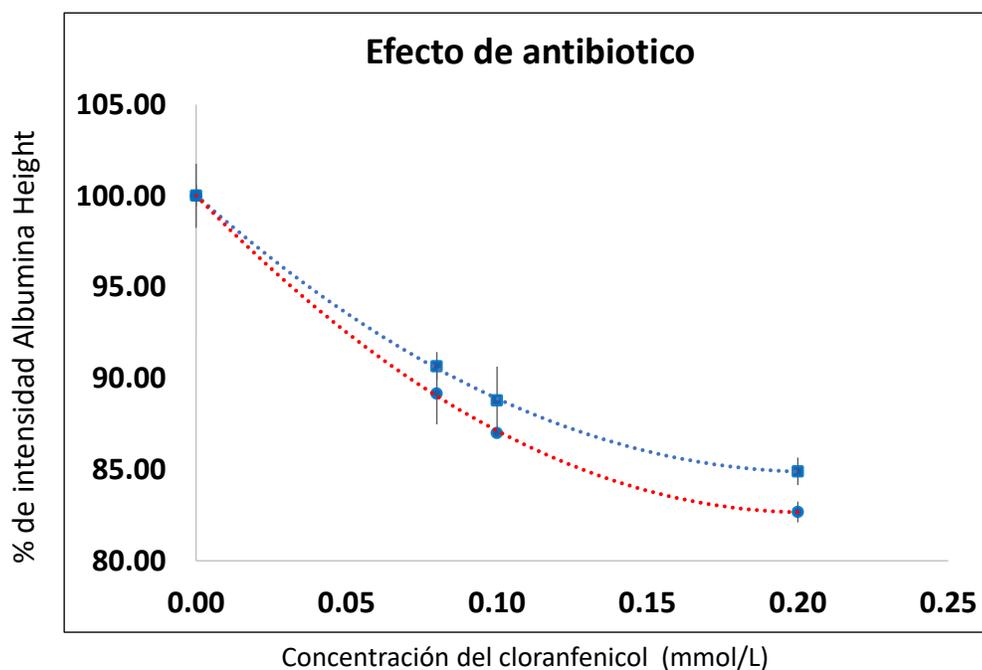


Figura 36. Efecto de la concentración de cloranfenicol sobre fluorescencia de albúmina modificada con EtO (rojo) y albúmina control que no estaba en contacto con EtO (azul).

En base a las modificaciones encontradas en la secuencia de HSA después de su incubación con EtO (Fig. 16), se propone que la hidroxilación en algunos o en todos residuos de aminoácidos causó cambios en estructura tridimensional de la proteína que favorecieron el acceso de cloranfenicol a los sitios de su unión, sobre todo en la región sudoeste IA. No obstante, no se puede hacer ningún tipo conclusión general ya que los efectos fueron observados en condiciones *in vitro* específicos y estos efectos podrían ser diferentes al cambiar tipo de fármaco, la relación molar fármaco:proteína o al modificar la composición de las mezclas.

5 Conclusiones

El objetivo del proyecto de tesis fue obtener nuevas evidencias sobre las modificaciones de albúmina de suero humano (HSA) por exposición al óxido de etileno (EtO), empleando como herramienta analítica la espectrometría de masas. El trabajo se realizó en tres etapas: (1) análisis de las modificaciones de aminoácidos libres por EtO; (2) asignación de sitios específicos modificados por hidroxietilación en la secuencia de aminoácidos de HSA; (3) evaluación del efecto de las modificaciones en HSA sobre la capacidad de la proteína para captar fármacos, utilizando como ejemplo el cloranfenicol. Las conclusiones formuladas en base dos resultados obtenidos en las tres etapas se presentan a continuación.

Etapa 1.

Se establecieron las condiciones de exposición *in vitro* de Cys, Lys, Arg, His y Met a EtO y las soluciones obtenidas fueron introducidas al espectrómetro de masas de alta resolución mediante electronebulización, utilizando el sistema ESI-QTOF-MS, modelo maxis Impact de Bruker Daltonics. En base a espectros MS y MS/MS adquiridos, se estableció el siguiente orden decreciente de la susceptibilidad de aminoácidos a la hidroxietilación: Cys > Met > His > Lys > Arg. En estos aminoácidos se detectaron aductos con hasta tres grupos hidroxietilo, siendo principales blancos de modificación, el grupo tiol en Cys, el grupo ϵ -amino en Lys, el grupo guanidino en Arg, el grupo α -amino en Met e His. Puesto que los grupos α -amino participan en los enlaces peptídicos, no son susceptibles a las modificaciones si forman parte de la estructura de las proteínas. De allí, los aminoácidos potencialmente modificados por EtO en HSA deberían ser Cys, Lys y Arg.

Etapa 2.

El primer reto consistió en proponer las condiciones de exposición de HSA a EtO, siendo los puntos críticos: la solubilidad de HSA, la cantidad de EtO disponible, la presencia de metanol en el producto comercial del EtO, la selección de la relación molar EtO:HSA, la selección del tampón y del pH para asegurar las condiciones cercanas a las fisiológicas. Una vez establecidos todos parámetros, se realizaron experimentos planeados y se llevó a cabo el análisis por MALDI-QTOF MS para verificar que la proteína quedó modificada. Aunque los resultados obtenidos fueron solamente orientativos, se observó claramente el aumento de masa de HSA después de la incubación con EtO, el cual fue más notorio cuando se aplicó relación molar EtO:HSA 1000:1 respecto 100:1. A continuación, se realizó el análisis proteómico tipo bottom-up utilizando el sistema capHPLC - ESI-QTOF MS y el programa

ProteinScape para análisis de datos. Los perfiles de elución de péptidos presentaron diferencias entre muestras de HSA control y la proteína incubada con EtO en dos diferentes relaciones molares. En cuanto al número de los péptidos, se encontraron en total 404, de los cuales 176 fueron comunes para todas muestras y 260 fueron comunes para albúmina modificada con EtO. El aumento de péptidos en HSA expuesta a EtO así como la detección de 26 y 74 péptidos adicionales, presentes solamente en albúmina con exceso de EtO 100:1 y 1000:1, respectivamente, indica que EtO introdujo modificaciones en los péptidos, incrementando el grado de modificación conforme aumentaba el exceso molar de EtO respecto a la proteína. En base a los resultados de la etapa I, se definieron seis modificaciones variables permitidas en la identificación de péptidos. Con estas modificaciones se identificó la albúmina de suero humano en todas las muestras, con muy similar porcentaje de cobertura para proteína control e incubada con EtO, lo que reafirmó adecuada definición de las modificaciones. En la secuenciación *de novo*, se encontraron en total 68 péptidos modificados, de los cuales 28 fueron encontrados al menos tres veces en el análisis de HSA incubado con EtO en exceso molar 100:1; en HSA incubado con EtO en exceso molar 1000:1, el número de péptidos modificados encontrados al menos tres veces fue de 33. Cabe mencionar que, en ambos casos se obtuvieron dos replicas biológicas y dos técnicas, es decir se adquirieron cuatro conjuntos de datos por muestra en total. Se marcaron los residuos de aminoácidos modificados en la secuencia de albúmina, obteniéndose 43 sitios hidroxietilados, lo que sugiere una parecida reactividad de EtO comparando con típicos agentes glicantes. Es importante señalar que, mediante la evaluación de otras posibles modificaciones correspondientes a la diferencia de masas de aprox. 44, se aseguró que la asignación de las modificaciones a la hidroxietilación era correcta en todos los casos. El aminoácido más susceptible a la formación del aducto con EtO resultó ser cisteína, con 20 sitios de hidroxietilación en total; entre ellos, dos sitios comunes con HSA control, 12 más en la HSA expuesta a cualquier exceso de EtO, una y cinco en HSA incubada con exceso de EtO 100:1 y 1000:1, respectivamente. Puesto que, en cisteína, el grupo tiol es el más vulnerable a hidroxietilación mientras que en otros aminoácidos la modificación ocurre sobre grupos amino, parece que el blanco principal del EtO en HSA es el grupo tiol. En el caso de lisina y arginina, no se encontraron residuos modificados en la proteína control, mientras que la incubación con EtO causó adición de diez y cuatro grupos etanoyl comunes para dos diferentes condiciones de exposición, respectivamente. Además, para la relación molar EtO:HSA 1000:1, siete modificaciones más fueron detectadas el residuos de lisina. Puesto que la hidroxietilación en lisina ocurre sobre el grupo ϵ -amino y en arginina sobre el grupo guanidino, el primero de ellos presentó mayor susceptibilidad a dicha modificación en HSA.

En el análisis de los péptidos, se ha demostrado que los cambios estructurales en los residuos de cisteína, arginina, y lisina por hidroxietilación no tuvieron efecto sobre la eficacia del corte de sus respectivos enlaces peptídicos por actividad de la tripsina, ya que en varios péptidos tal corte correspondió al residuo de aminoácido hidroxietilado.

En el contexto del papel de HSA como proteína transportadora de diferentes tipos de especies, entre ellos fármacos, el importante hallazgo del trabajo era obtener evidencia de las modificaciones en sitios de unión de fármacos, principalmente Cys-34.

Etapa 3

Para evaluar el efecto de la modificación del HSA bajo exposición al EtO sobre su capacidad de unir/transportar fármacos, se seleccionó un antibiótico de amplio espectro - el cloranfenicol. Se midieron los cambios de fluorescencia nativa del HSA después de su incubación con el fármaco,

aplicado en tres diferentes concentraciones para asegurar su exceso molar respecto a la proteína de 43:1, 53:1 y 107:1. Las mediciones de fluorescencia se realizaron utilizando el sistema FIA-FLD, en el cual el flujo fue controlado por la bomba HPLC y las longitudes de onda de excitación y de emisión, empleadas en el detector, fueron 275 nm y 305 nm, respectivamente. Se verificó que la hidroxietilación de HSA no tuvo efecto significativo sobre sus propiedades fluorescentes, ya que las señales FLD promedio con respectivas desviaciones estándar fueron 20.4 ± 3.0 y 22.6 ± 7.8 , en HSA control y en HSA incubado con EtO en relación molar 1:1000, respectivamente. En presencia de crecientes concentraciones de cloranfenicol, se observó el decremento paulatino de la señal de fluorescencia tanto para HSA control como para HSA-EtO; sin embargo, el quenching de fluorescencia fue más notorio para albúmina modificada respecto control. Específicamente, después de 24 horas de contacto de albúmina con el exceso molar del fármaco 107:1, el porcentaje de quenching para HSA control fue de 15.1% mientras que para la proteína modificada con EtO el porcentaje fue de 17.3%. En base a estos resultados, se propone que la hidroxilación encontrada en los residuos de aminoácidos causó cambios en estructura tridimensional de la proteína que favorecieron el acceso de cloranfenicol a los sitios de su unión, sobre todo en la región sudoeste IA. No obstante, no se puede hacer ningún tipo conclusión general ya que los efectos fueron observados en condiciones *in vitro* específicas y podrían ser diferentes al cambiar tipo de fármaco, la relación molar fármaco:proteína o al modificar la composición de las mezclas.

Como la prospectiva para un posible trabajo futuro, es necesario realizar el estudio utilizando suero humano con el fin de confirmar las modificaciones por hidroxietilación encontradas en este trabajo y proponer un posible biomarcador de la exposición a EtO *in vivo*. En cuanto a la interacción del HSA con fármacos, sería interesante incluir otro tipo de moléculas de diferente estructura para entender mejor el mayor quenching de fluorescencia observado para HSA-EtO incubada con cloranfenicol respecto proteína control que no estaba en contacto con EtO.

Finalmente, los resultados obtenidos en este trabajo proporcionan una evidencia más del gran potencial de espectrometría de masas de alta resolución en la caracterización estructural de diferentes compuestos y en la confirmación/identificación de los productos de reacciones químicas.

Referencias:

1. Windmueller, H.G., C.J. Ackerman, and R.W. Engel, *Alterations in the nutritive value of casein by exposure to ethylene oxide*. The Journal of Nutrition, 1956. **60**(4): p. 527-537.
2. Mendes, G.C., T.R. Brandao, and C.L. Silva, *Ethylene oxide sterilization of medical devices: a review*. Am J Infect Control, 2007. **35**(9): p. 574-581.
3. Chen, L., et al., *Inactivation of Salmonella enterica and Enterococcus faecium NRRL B2354 on cumin seeds using gaseous ethylene oxide*. Food Microbiol, 2021. **94**: p. 103656.
4. Grammer, L.C., et al., *Characterization of an antigen in acute anaphylactic dialysis reactions: Ethylene oxide-altered human serum albumin*. J Allergy Clin Immunol, 1985. **76**(5): p. 670-675.
5. Zeng, G., et al., *Association between blood ethylene oxide levels and the risk of cardiovascular diseases in the general population*. Environ Sci Pollut Res, 2021.
6. Guo, J., et al., *Association of exposure to ethylene oxide with risk of diabetes mellitus: results from NHANES 2013–2016*. Environ Sci Pollut Res, 2021.
7. Pottenger, L.H., et al., *Understanding the importance of low-molecular weight (ethylene oxide-and propylene oxide-induced) DNA adducts and mutations in risk assessment: Insights from 15 years of research and collaborative discussions*. Environ Mol Mutagen, 2019. **60**(2): p. 100-121.
8. Marsh, G.M., et al., *Ethylene oxide and risk of lympho-hematopoietic cancer and breast cancer: a systematic literature review and meta-analysis*. Int Arch Occup Environ Health, 2019. **92**(7): p. 919-939.
9. Walker, V.E., et al., *Biomarkers of exposure and effect as indicators of potential carcinogenic risk arising from in vivo metabolism of ethylene to ethylene oxide*. Carcinogenesis, 2000. **21**(9): p. 1661-1669.
10. Kirman, C.R., et al., *Ethylene oxide review: Characterization of total exposure via endogenous and exogenous pathways and their implications to risk assessment and risk management*. J Toxicol Environ Health Part B, 2021. **24**(1): p. 1-29.
11. Jinot, J., et al., *Carcinogenicity of ethylene oxide: key findings and scientific issues*. Toxicol Mech Methods, 2018. **28**(5): p. 386-396.
12. Fennell, T.R. and C.D. Brown, *A physiologically based pharmacokinetic model for ethylene oxide in mouse, rat, and human*. Toxicol Appl Pharmacol, 2001. **173**(3): p. 161-175.
13. Kirman, C.R. and S.M. Hays, *Derivation of endogenous equivalent values to support risk assessment and risk management decisions for an endogenous carcinogen: ethylene oxide*. Regul Toxicol Pharmacol, 2017. **91**: p. 165-172.
14. EPA, *Report of the Food Quality Protection Act (FQPA) Tolerance Reassessment and Risk Management Decision (TRED) for Ethylene Oxide*. 2006.
15. Anguizola, J., et al., *Glycation of human serum albumin*. Clinica chimica acta, 2013. **425**: p. 64-76.
16. Singh, R., et al., *Advanced glycation end-products: a review*. Diabetologia, 2001. **44**(2): p. 129-146.
17. Cho, S.J., et al., *The road to advanced glycation end products: a mechanistic perspective*. Current medicinal chemistry, 2007. **14**(15): p. 1653-1671.
18. Baynes, J.W., et al., *The Amadori product on protein: structure and reactions*. Progress in clinical and biological research, 1989. **304**: p. 43-67.
19. Hodge, J.E., *Chemistry of browning reactions in model systems*. Agric. Fd Chem. 1,928, 1953. **943**.

20. Vistoli, G., et al., *Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation*. Free radical research, 2013. **47**(sup1): p. 3-27.
21. Šebeková, K. and V. Somoza, *Dietary advanced glycation endproducts (AGEs) and their health effects—PRO*. Molecular nutrition & food research, 2007. **51**(9): p. 1079-1084.
22. Gómez-Ojeda, A., et al., *Comparative evaluation of three different ELISA assays and HPLC-ESI-ITMS/MS for the analysis of Nε-carboxymethyl lysine in food samples*. Food Chemistry, 2018. **243**: p. 11-18.
23. Kunkel, H.G. and G. Wallenius, *New hemoglobin in normal adult blood*. Science, 1955. **122**(3163): p. 288-288.
24. Wrobel, K., et al., *What are AGEs, their chemical structure, and how can they be measured?*, in *Dietary Ages and their Role in Health and Disease*. 2017, CRC Press. p. 3-18.
25. Thornalley, P.J., A. Langborg, and H.S. Minhas, *Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose*. Biochemical Journal, 1999. **344**(1): p. 109-116.
26. Rondeau, P. and E. Bourdon, *The glycation of albumin: structural and functional impacts*. Biochimie, 2011. **93**(4): p. 645-658.
27. Penezić, A.Z., et al., *HSA carbonylation with methylglyoxal and the binding/release of copper (II) ions*. Metallomics, 2015. **7**(10): p. 1431-1438.
28. Lapolla, A., et al., *Glyoxal and methylglyoxal levels in diabetic patients: quantitative determination by a new GC/MS method*. 2003.
29. Thornalley, P.J., *Dicarbonyl intermediates in the Maillard reaction*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2005. **1043**(1): p. 111-117.
30. Gruber, P. and T. Hofmann, *Chemoselective synthesis of peptides containing major advanced glycation end-products of lysine and arginine*. The Journal of peptide research, 2005. **66**(3): p. 111-124.
31. O'Brien, P.J., A.G. Siraki, and N. Shangari, *Aldehyde sources, metabolism, molecular toxicity mechanisms, and possible effects on human health*. Critical reviews in toxicology, 2005. **35**(7): p. 609-662.
32. Lange, J.N., et al., *Glyoxal formation and its role in endogenous oxalate synthesis*. Advances in urology, 2012. **2012**.
33. Manini, P., et al., *Glyoxal formation by Fentoeinduced degradation of carbohydrates and related compounds*. Carbohydrate research, 2006. **341**(11): p. 1828-1833.
34. Niwa, T., *3-Deoxyglucosone: metabolism, analysis, biological activity, and clinical implication*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 1999. **731**(1): p. 23-36.
35. Yamagishi, S., T. Matsui, and K. Nakamura, *Possible involvement of tobacco-derived advanced glycation end products (AGEs) in an increased risk for developing cancers and cardiovascular disease in former smokers*. Medical hypotheses, 2008. **71**(2): p. 259-261.
36. Cerami, C., et al., *Tobacco smoke is a source of toxic reactive glycation products*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1997. **94**(25): p. 13915-13920.
37. Fraenkel-Conrat, H., *The action of 1, 2-epoxides on proteins*. Journal of biological chemistry, 1944. **154**(1): p. 227-238.
38. Windmueller, H.G., C.J. Ackerman, and R.W. Engel, *Reaction of ethylene oxide with histidine, methionine, and cysteine*. J. biol. Chem, 1959. **234**(4): p. 895-9.
39. Starbuck, W.C. and H. Busch, *Hydroxyethylation of amino acids in plasma albumin with ethylene oxide*. Biochimica et Biophysica Acta, 1963. **78**(4): p. 594-605.

40. Pluym, N., et al., *Analysis of 18 urinary mercapturic acids by two high-throughput multiplex-LC-MS/MS methods*. *Anal Bioanal Chem*, 2015. **407**(18): p. 5463-5476.
41. Frigerio, G., et al., *Urinary mercapturic acids to assess exposure to benzene and other volatile organic compounds in coke oven workers*. *Int J Environ Res Publ Health*, 2020. **15**(5): p. 1801.
42. Kenwood, B.M., et al., *Characterization of the association between cigarette smoking intensity and urinary concentrations of 2-hydroxyethyl mercapturic acid among exclusive cigarette smokers in the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2011–2016*. *Biomarkers*, 2021. **26**(7): p. 656-664.
43. Zhang, F., et al., *A novel approach for concurrent quantitation of glutathione, glutathione disulfide, and 2-hydroxyethylated glutathione in lungs of mice exposed to ethylene oxide, using liquid chromatography–positive electrospray tandem mass spectrometry*. *Biomedical Chromatography*, 2015. **29**(9): p. 1364-1374.
44. Katoh, T., K. Higashi, and N. Inoue, *Sub-chronic effects of styrene and styrene oxide on lipid peroxidation and the metabolism of glutathione in rat liver and brain*. *The Journal of Toxicological Sciences*, 1989. **14**(1): p. 1-9.
45. Haufroid, V., et al., *Exposure to ethylene oxide in hospitals: biological monitoring and influence of glutathione S-transferase and epoxide hydrolase polymorphisms*. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 2007. **16**(4): p. 796-802.
46. Sabbioni, G. and B.W. Day, *Quo vadis blood protein adductomics?* *Arch Toxicol*, 2021.
47. Nunes, J., et al., *Mass spectrometry-based methodologies for targeted and untargeted identification of protein covalent adducts (Adductomics): current status and challenges*. *High-throughput*, 2019. **8**(2): p. 9.
48. Schnedl, W.J., et al., *Evaluation of HbA1c determination methods in patients with hemoglobinopathies*. *Diabetes Care*, 2000. **23**(3): p. 339-344.
49. Wu, K.Y., et al., *Formation of N-(2-hydroxyethyl) valine in human hemoglobin—effect of lifestyle factors*. *Mut Res Gen Toxicol Environ Mutagen*, 2004. **559**(1-2): p. 73-82.
50. Mowrer, J., et al., *Modified Edman degradation applied to hemoglobin for monitoring occupational exposure to alkylating agents*. *Toxicol Environ Chem*, 1986. **11**(3): p. 215-231.
51. Bailey, E., et al., *Hydroxyethylvaline adduct formation in haemoglobin as a biological monitor of cigarette smoke intake*. *Arch Toxicol*, 1988. **62**(4): p. 247-253.
52. Yang, M., et al., *High-throughput, simultaneous quantitation of hemoglobin adducts of acrylamide, glycid amide, and ethylene oxide using UHPLC-MS/MS*. *J Chromatogr B*, 2018. **1086**: p. 197–205.
53. Mráz, J., et al., *Determination of N-(2-hydroxyethyl) valine in globin of ethylene oxide-exposed workers using total acidic hydrolysis and HPLC–ESI–MS²*. *Toxicol Lett*, 2018. **298**: p. 76-80.
54. Mráz, J., et al., *N-(2-Hydroxyethyl)-L-valyl-L-leucine: A novel urinary biomarker of ethylene oxide exposure in humans*. *Toxicol Lett*, 2020. **326**: p. 18-22.
55. Ramirez Segovia, A.S., et al., *Effect of Cu(II) on in vitro glycation of human serum albumin by methylglyoxal: a LC-MS-based proteomic approach* *Metallomics*, 2017. **9**: p. 132-140.
56. Carlsson, H., S.M. Rappaport, and M. Törnqvist, *Protein adductomics: methodologies for untargeted screening of adducts to serum albumin and hemoglobin in human blood samples*. *High-throughput*, 2019. **8**(1): p. 6.
57. Funatsu, K., et al., *Impact of ethylene oxide sterilization of polymer-based prefilled syringes on chemical degradation of a model therapeutic protein during storage*. *J Pharm Sci*, 2019. **108**(1): p. 770-774.

58. Chen, L., et al., *Chemical Modifications of Therapeutic Proteins Induced by Residual Ethylene Oxide*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2015. **104**(2): p. 731-739.
59. Huang, Y.F., et al., *Feasibility of using urinary N7-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl) Guanine as a biomarker for acrylamide exposed workers.*, 28(6), 589-598. J Expo Sci Environ Epidemiol, 2018. **28**(6): p. 589-598.
60. Segerbäck, D., *Reaction products in hemoglobin and DNA after in vitro treatment with ethylene oxide and N-(2-hydroxyethyl)-N-nitrosourea*. Carcinogenesis, 1990. **11**(2): p. 307-312.
61. Ehrenberg, L. and S. Hussain, *Genetic toxicity of some important epoxides*. Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology, 1981. **86**(1): p. 1-113.
62. Wrigley, A.N., F.D. Smith, and A.J. Stirton, *Reaction of ethylene oxide or propylene oxide with long-chain fatty acids. Mono-and diester formation*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1959. **36**(1): p. 34-36.
63. Schwartz, A.M. and J.W. Perry, *SURFACE ACTIVE AGENTS, THEIR CHEMISTRY AND TECHNOLOGY*. 1949.
64. Malkemus, J.D. and J.D. Swan, *Analysis of polyethylene glycol esters*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1957. **34**(7): p. 342-344.
65. Rabbani, G. and S.N. Ahn, *Structure, enzymatic activities, glycation and therapeutic potential of human serum albumin: A natural cargo*. Int J Biol Macromol, 2019. **123**: p. 979-990.
66. Hartog, J.W.L., et al., *Advanced glycation end-products (AGEs) and heart failure: pathophysiology and clinical implications*. European journal of heart failure, 2007. **9**(12): p. 1146-1155.
67. Wa, C., et al., *Characterization of glycation adducts on human serum albumin by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*. Clinica chimica acta, 2007. **385**(1-2): p. 48-60.
68. Iberg, N. and R. Flückiger, *Nonenzymatic glycosylation of albumin in vivo. Identification of multiple glycosylated sites*. Journal of Biological Chemistry, 1986. **261**(29): p. 13542-13545.
69. Lapolla, A., et al., *Enzymatic digestion and mass spectrometry in the study of advanced glycation end products/peptides*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2004. **15**(4): p. 496-509.
70. Shaklai, N., R.L. Garlick, and H.F. Bunn, *Nonenzymatic glycosylation of human serum albumin alters its conformation and function*. Journal of Biological Chemistry, 1984. **259**(6): p. 3812-3817.
71. Garlick, R.L. and J.S. Mazer, *The principal site of nonenzymatic glycosylation of human serum albumin in vivo*. Journal of Biological Chemistry, 1983. **258**(10): p. 6142-6146.
72. Srový, I., *Glycation of albumin: reaction with glucose, fructose, galactose, ribose or glyceraldehyde measured using four methods*. Journal of biochemical and biophysical methods, 1994. **28**(2): p. 115-121.
73. Tarwadi, K.V. and V.V. Agte, *Effect of micronutrients on methylglyoxal-mediated in vitro glycation of albumin*. Biological trace element research, 2011. **143**(2): p. 717-725.
74. Chiou, Y.-j., K.B. Tomer, and P.C. Smith, *Effect of nonenzymatic glycation of albumin and superoxide dismutase by glucuronic acid and suprofen acyl glucuronide on their functions in vitro*. Chemico-biological interactions, 1999. **121**(2): p. 141-159.
75. Smith, P.C. and W. Chyoan, *Nonenzymic glycation of albumin by acyl glucuronides in vitro comparison of reactions with reducing sugars*. Biochemical pharmacology, 1992. **44**(8): p. 1661-1668.

76. Grigoryan, H., et al., *Adductomics pipeline for untargeted analysis of modifications to Cys34 of human serum albumin*. *Anal Chem*, 2016. **88**(21): p. 10504-10512.
77. Grigoryan, H., et al., *Adductomics pipeline for untargeted analysis of modifications to Cys34 of human serum albumin*. *Analytical chemistry*, 2016. **88**(21): p. 10504-10512.
78. Levine, R.L., et al., *Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage*. *Mechanisms of ageing and development*, 1999. **107**(3): p. 323-332.
79. Funatsu, K., et al., *Impact of ethylene oxide sterilization of polymer-based prefilled syringes on chemical degradation of a model therapeutic protein during storage*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2019. **108**(1): p. 770-774.
80. Grammer, L.C., et al., *Characterization of an antigen in acute anaphylactic dialysis reactions: Ethylene oxide-altered human serum albumin*. *Journal of allergy and clinical immunology*, 1985. **76**(5): p. 670-675.
81. Seneviratne, C., et al., *The in vitro glycation of human serum albumin in the presence of Zn (II)*. *Journal of inorganic biochemistry*, 2011. **105**(12): p. 1548-1554.
82. Sadowska-Bartosz, I., et al., *Glycation of bovine serum albumin by ascorbate in vitro: Possible contribution of the ascorbyl radical?* *Redox biology*, 2015. **6**: p. 93-99.
83. Chesne, S., et al., *Effects of oxidative modifications induced by the glycation of bovine serum albumin on its structure and on cultured adipose cells*. *Biochimie*, 2006. **88**(10): p. 1467-1477.
84. Tupe, R.S. and V.V. Agte, *Role of zinc along with ascorbic acid and folic acid during long-term in vitro albumin glycation*. *British journal of nutrition*, 2010. **103**(3): p. 370-377.
85. Guedes, S., et al., *Oxidation of bovine serum albumin: identification of oxidation products and structural modifications*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry*, 2009. **23**(15): p. 2307-2315.
86. Ramirez Segovia, A.S., et al., *Effect of Cu (II) on in vitro glycation of human serum albumin by methylglyoxal: a LC-MS-based proteomic approach*. *Metallomics*, 2017. **9**(2): p. 132-140.
87. Rabbani, G. and S.N. Ahn, *Structure, enzymatic activities, glycation and therapeutic potential of human serum albumin: A natural cargo*. *International journal of biological macromolecules*, 2019. **123**: p. 979-990.
88. Maciążek-Jurczyk, M., et al., *Alteration of human serum albumin binding properties induced by modifications: A review*. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2018. **188**: p. 675-683.
89. Lee, P. and X. Wu, *Modifications of human serum albumin and their binding effect*. *Current pharmaceutical design*, 2015. **21**(14): p. 1862-1865.
90. Yu, J., et al., *Molecular simulation of the interaction between novel type rhodanine derivative probe and bovine serum albumin*. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2009. **74**(1): p. 277-281.
91. Abboud, R., C. Charcosset, and H. Greige-Gerges, *Interaction of triterpenoids with human serum albumin: A review*. *Chemistry and Physics of Lipids*, 2017. **207**: p. 260-270.
92. Sudlow, G., D.J. Birkett, and D.N. Wade, *Further characterization of specific drug binding sites on human serum albumin*. *Molecular pharmacology*, 1976. **12**(6): p. 1052-1061.
93. Pal, B., P.K. Bajpai, and T.S.B. Baul, *Binding of 5-(2'-carboxyphenyl) azoquinolin-8-ol to bovine serum albumin: a spectroscopic study*. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2000. **56**(12): p. 2453-2458.
94. Sułkowska, A., *Interaction of drugs with bovine and human serum albumin*. *Journal of molecular structure*, 2002. **614**(1-3): p. 227-232.

95. Abou-Zied, O.K. and N. Al-Lawatia, *Exploring the drug-binding site Sudlow I of human serum albumin: the role of water and Trp214 in molecular recognition and ligand binding*. ChemPhysChem, 2011. **12**(2): p. 270-274.
96. Zhang, J., et al., *Study on the binding of chloroamphenicol with bovine serum albumin by fluorescence and UV-vis spectroscopy*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2013. **105**: p. 74-79.
97. Ding, F., et al., *Chloramphenicol binding to human serum albumin: determination of binding constants and binding sites by steady-state fluorescence*. Journal of Molecular Structure, 2009. **929**(1-3): p. 159-166.
98. Matsuda, R., et al., *Analysis of drug interactions with modified proteins by high-performance affinity chromatography: binding of glibenclamide to normal and glycosylated human serum albumin*. Journal of Chromatography A, 2012. **1265**: p. 114-122.
99. Joseph, K.S., J. Anguizola, and D.S. Hage, *Binding of tolbutamide to glycosylated human serum albumin*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2011. **54**(2): p. 426-432.
100. Joseph, K.S., et al., *Chromatographic analysis of acetohexamide binding to glycosylated human serum albumin*. Journal of Chromatography B, 2010. **878**(28): p. 2775-2781.
101. Tao, P., et al., *Chromatographic studies of chlorpropamide interactions with normal and glycosylated human serum albumin based on affinity microcolumns*. Journal of Chromatography B, 2018. **1097**: p. 64-73.