



Universitat de les Illes Balears

Programa de doctorado de Ciencia y Tecnología Química

**FORMACIÓN DE BASES DE SCHIFF DE ANÁLOGOS DE
AMINOFOSFOLÍPIDOS CON COMPUESTOS GLICANTES Y
EFECTO COMPETITIVO DE VITÁMEROS B₆**

AUTOR: Catalina Caldés Melis

DIRECTORES: Dra. Josefa Donoso Pardo

Dr. Bartolomé Vilanova Canet

Tesis Doctoral

2012

**FORMACIÓN DE BASES DE SCHIFF DE ANÁLOGOS DE
AMINOFOSFOLÍPIDOS CON COMPUESTOS GLICANTES Y
EFECTO COMPETITIVO DE VITÁMEROS B₆**

Memoria presentada para aspirar al grado de Doctor por la UIB
en el Programa de Doctorado de Ciencia y Tecnología Química

Fdo.: Catalina Caldés Melis

La Dra. Josefa Donoso Pardo, Catedrática de Química Física de la Universidad de las Islas Baleares y el Dr. Bartolomé Vilanova Canet, Profesor Titular de Química Física de la Universidad de las Islas Baleares,

certifican:

Que el presente trabajo de investigación, titulado **“Formación de bases de Schiff de análogos de aminofosfolípidos con compuestos glicantes y efecto competitivo de vitámeros B₆”**, ha sido realizado bajo su dirección por la Sra. Catalina Caldés Melis y constituye la memoria de su Tesis Doctoral.

Palma de Mallorca, 2012

Firmado
Dra. Josefa Donoso Pardo
Catedrática de la UIB

Firmado
Dr. Bartolomé Vilanova Canet
Profesor titular de la UIB

Directores de este trabajo

A la meva família

AGRADECIMIENTOS

Recordant els anys transcorreguts realitzant aquest treball d'investigació és inevitable pensar en totes aquelles persones que d'una manera o una altra hi han contribuït. Vull agrair-vos a tots que m'hagueu fet més fàcil caminar entre gegants.

Al Dr. Bartolomé Vilanova, per la magnífica direcció d'aquesta tesi doctoral, la qual sense la seva experiència i les seves ensenyances no hauria estat possible. També vull agrair-li el seu immillorable tracta personal, el seu suport diari i la seva dedicació.

A la Dra. Josefa Donoso, per la seva excel·lent direcció d'aquest treball, pel seu assessorament, pel temps dedicat i la seva ajuda. Vull agrair-li que hagi compartit amb jo els seus coneixements i m'hagi ajudat a aprendre i a millorar.

Al Dr. Miquel Adrover, company de laboratori i de despatx, gràcies sincerament per instruir-me i donar-me consells com a investigador. També li vull agrair la seva amistat i els bons moments que hem compartit en el dia a dia.

Al Dr. Francisco Muñoz, Dr. Juan Frau i Dr. Joaquin Ortega, membres del grup de recerca, per la seva ajuda, per crear un bon ambient de treball i donar-me l'oportunitat de participar i compartir amb ells tasques docents i activitats divulgatives.

Als tècnics i al personal dels serveis científicotècnics de la UIB, per facilitar-me l'ús i la disposició dels diferents equips, per la seva accessibilitat i per l'ajuda rebuda en la realització d'alguns experiments.

A la Dra. Catalina Genestar, pel seu assessorament, comprensió i simpatia.

A tots els amics estudiants de màster i de doctorat, amb els que he compartit preocupacions i alegries durant aquests anys. Gràcies especialment a en Rodrigo, en David, en Carlos Palomino i en Carlos Maya per donar-me el vostre suport, consells i opinions, sobretot en aquest darrer any, i per totes les estones divertides que hem viscut junts.

A na Marga Pol i en Toni Pomar per ser els meus amics i conèixer de ben a prop les meves vivències. Gràcies per tots els moments que hem compartit dins i defora de la UIB, per escoltar-me, per ajudar-me i per encoratjar-me des del principi.

A les meves amigues, na Joana Fons i na Maria Antònia Amer per ser un pilar de la meva vida. A na Joana Font, n'Aina, na Bel i na Maria Antònia Bordoy per fer-me costat i per la seva amistat desinteressada. Als meus amics i amigues de Manacor i de Petra, amb els que em diverteixo i fan que desconnecti els caps de setmana.

Als meus pares, gràcies per tot el que heu fet per jo, per la vostra estimació, per la formació i educació que m'heu donat. A la meva germana, el meu cunyat i el meu fillol, per fer-me costat en totes les meves decisions i per ajudar-me en els bons i els mals moments. Als meus padrins, que s'han preocupat pel meu futur des de que vaig començar a la UIB. A la meva cosina Cati, que sempre m'escolta pacientment. En definitiva, a tota la meva família, gràcies per ser-hi i haver-hi estat.

Finalment, vull agrair la concessió d'una beca predoctoral al Govern de les Illes Balears (Conselleria d'Educació, Cultura i Universitats), mitjançant un programa operatiu cofinançat pel Fons Social Europeu. Aquesta beca m'ha donat l'oportunitat de realitzar aquest treball amb una total dedicació.

Invertim en el seu futur



Unió Europea
Fons Social Europeu



Govern de les Illes Balears

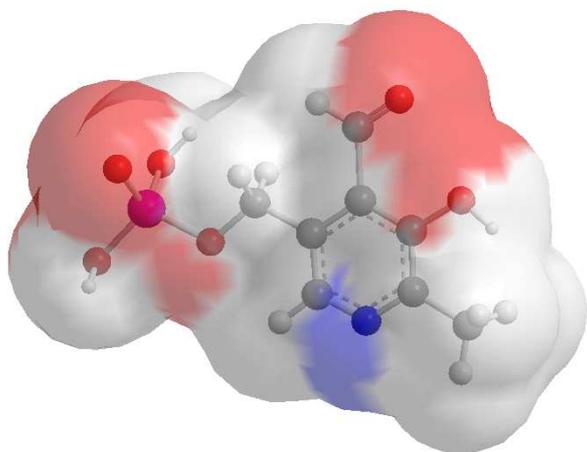
Conselleria d'Educació, Cultura i Universitats
Direcció General d'Universitats,
Recerca i Transferència del Coneixement

Índice

OBJETIVOS	1
Capítulo 1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. Aspectos generales de la Vitamina B₆	7
1.1.1. Absorción, transporte, almacenamiento y metabolismo	8
1.1.2. La vitamina B ₆ como cofactor enzimático	9
1.1.3. Patologías asociadas a absorciones inadecuadas de vitamina B ₆	17
1.2. Bases de Schiff derivadas de vitámeros B₆	19
1.2.1. Bases de Schiff de piridoxal y 5'-fosfato de piridoxal	19
1.2.2. Bases de Schiff de piridoxamina y 5'-fosfato de piridoxamina	24
1.3. Características físico-químicas de la vitamina B₆ y sus bases de Schiff	29
1.3.1. Equilibrios de ionización, tautomerización e hidratación	29
1.3.2. Propiedades espectroscópicas	37
1.3.2.1. <i>Espectroscopia UV-Visible de absorción</i>	37
1.3.2.2. <i>Espectroscopia UV-Visible de emisión. Fluorescencia</i>	39
1.3.2.3. <i>Procesos fotoinducidos</i>	41
1.3.2.4. <i>Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN)</i>	41
1.3.2.5. <i>Espectroscopia de absorción infrarroja (FTIR)</i>	43
1.3.2.6. <i>Otras propiedades espectroscópicas</i>	43
1.4. Glicación no enzimática de biomoléculas	45
1.4.1. Compuestos responsables de la glicación	46
1.4.2. Bases de Schiff derivadas de compuestos carbonílicos con capacidad glicante	48
1.4.3. Compuestos de Amadori derivados de azúcares	50

1.4.4. Productos finales de la glicación avanzada (AGEs)	52
1.4.5. Productos finales de la lipoxidación avanzada (ALEs)	55
1.4.6. Inhibidores de la glicación no enzimática	57
1.4.6.1. <i>La vitamina B₆ como inhibidor de la glicación no enzimática</i>	58
1.4.6.2. <i>Otros inhibidores</i>	59
Capítulo 2. MATERIALES Y MÉTODOS	63
2.1. Materiales	65
2.1.1. Síntesis del compuesto 2-aminometilfenilfosfato (APP)	65
2.2. Técnicas experimentales	66
2.2.1. Cromatografía líquida de alta resolución con detección UV-Visible	66
2.2.2. Espectroscopia UV-Visible	66
2.2.3. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN)	67
2.2.4. Potenciometría (pH-Stat)	68
2.3. Tratamiento matemático de los resultados experimentales	68
2.3.1. Determinación de constantes cinéticas y de equilibrio. Programa Dynafit	68
2.3.2. Determinación de constantes cinéticas y de equilibrio. Programa SigmaPlot	70
Capítulo 3. RESULTADOS	79
ARTÍCULO I. Understanding non-enzymatic aminophospholipid glycation and its inhibition. Polar head features affect the kinetics of Schiff base formation	81
ARTÍCULO II. El sustituyente hidrofóbico afecta a la cinética de formación de las bases de Schiff de aminofosfolípidos	91
ARTÍCULO III. Schiff base formation between pyridoxal 5'-phosphate and O-phosphorylethanolamine and O-phospho-DL-serine. Experimental and theoretical studies	111
ARTÍCULO IV. Phenol group in pyridoxamine acts as a stabilizing element for its carbinolamines and Schiff bases	123

Capítulo 4. DISCUSIÓN	141
4.1. Formación de bases de Schiff de análogos de aminofosfolípidos con compuestos glicantes	143
4.2. Efecto competitivo de vitámeros B₆ en la glicación no enzimática de biomoléculas	147
4.2.1. Papel inhibidor de la piridoxamina	147
4.2.2. Papel inhibidor del 5'-fosfato de piridoxal	151
CONCLUSIONES	157
BIBLIOGRAFÍA	161
ABREVIATURAS	189



OBJETIVOS

OBJETIVOS

Las reacciones que transcurren sin control enzimático entre los grupos amina de las biomoléculas y los grupos carbonilo de azúcares reductores, como por ejemplo la glucosa, se conocen con el nombre de reacciones de glicación. Inicialmente, se identificaron los residuos proteicos [REYNOLDS, 1965][TAKAHASHI, 1977] como dianas de la glicación, siendo los aminoácidos lisina y arginina [SHAPIRO, 1980][AHMED, 2005] los centros de reacción más destacados. Posteriormente, se comprobó que las bases nitrogenadas del ADN [BUCALA, 1984], principalmente la 2'-desoxiguanosina [KNERR, 1994], también sufren procesos de glicación. Actualmente, se sabe que la fosfatidiletanolamina (PE) y la fosfatidilserina (PS), dos componentes esenciales de las membranas celulares de los mamíferos, también reaccionan con este tipo de compuestos glicantes [BUCALA, 1993]. Las reacciones implicadas en los procesos de glicación no enzimática de las biomoléculas son de enorme interés ya que se han relacionado con las complicaciones patológicas de la diabetes (algunas nefropatías, retinopatías y enfermedades cardiovasculares) [SCHALKWIJK, 2012], con varias enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer o el Parkinson [MÜNCH, 2012] y con otras enfermedades asociadas al envejecimiento [ANSARI, 2011].

En la última década, se ha incrementado notablemente el número de estudios relacionados con la glicación, particularmente con la detección y cuantificación de las proteínas glicadas, y con el desarrollo de agentes terapéuticos [RABBANI, 2012]. La glicación de los aminofosfolípidos ha sido uno de los temas menos estudiado, aunque no carece de interés porque genera especies oxigenadas radicalarias (ROS) que también pueden reaccionar con las biomoléculas [MIYAZAWA, 2008] e induce cambios estructurales en la bicapa lipídica [OBSIL, 1999], lo que puede inactivar las enzimas de membrana y causar la muerte celular [LEVI, 2008].

Los estudios sobre la modificación de las cabezas polares de los aminofosfolípidos han puesto de manifiesto que la PE y la PS reaccionan de una manera análoga a las proteínas, formando una base de Schiff (BS) con la glucosa [BREITLING-UTZMANN, 2001], la cual se reordena generando un compuesto de Amadori [LETSIRI, 1998][UTZMANN, 2000], que, finalmente, evoluciona hacia los productos finales de la glicación avanzada (AGEs) [FOUNTAIN, 1999][NAKAGAWA, 2005A][MIYAZAWA, 2005][SHOJI, 2010]. La glicación de los aminofosfolípidos en personas sanas es inferior al 1 %, mientras que en pacientes diabéticos está en torno al 15 % [RAVANDI, 1996]. A pesar de ello, los estudios cinéticos de la reacción entre la PE y la PS con compuestos carbonílicos glicantes son escasos y se desconoce, hasta la fecha, la magnitud de las constantes cinéticas, o su dependencia con la naturaleza de los reactivos y las condiciones de reacción.

Una de las estrategias terapéuticas usadas para prevenir las enfermedades derivadas de la glicación no enzimática se basa en la utilización de moléculas que inhiban estos procesos. Se ha sugerido que la aminoguanidina inhibe la glicación lipídica y proteica [BUCALA, 1993], que la

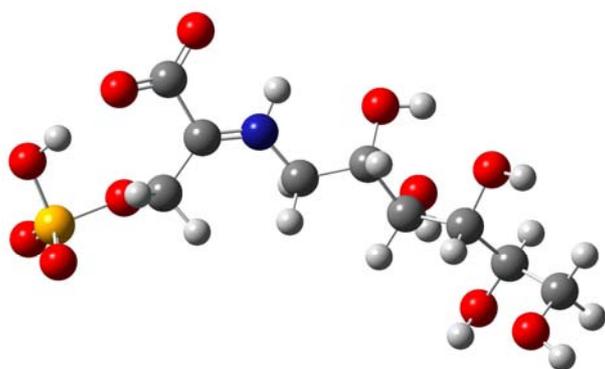
urea protege frente a la formación de AGEs [AGUILAR-HERNÁNDEZ, 2007] y que un suplemento dietético de 5'-fosfato de piridoxal (PLP) en ratas diabéticas reduce los niveles fisiológicos de Amadori-PE [HIGUCHI, 2006].

El PLP es un vitámero natural de la vitamina B₆ cuya química ha sido ampliamente estudiada debido a su implicación, juntamente con la 5'-fosfato de piridoxamina (PMP), en multitud de procesos biológicos, entre los que destaca su acción como cofactor enzimático en un gran número de reacciones del metabolismo de los aminoácidos [CHRISTEN, 1985][DOLPHIN, 1986][JANSONIUS, 1998][ELIOT, 2004][TONEY, 2011]. La vitamina B₆ también es importante por su acción inhibitoria y de control de los procesos de la glicación no enzimática inducidos por la hiperglucemia. La piridoxamina (PM) es el vitámero B₆ con mayor capacidad inhibidora [BOOTH, 1997][KHALIFAH, 1999], siendo capaz de prevenir el desarrollo de la nefropatía y de la retinopatía diabética [TANIMOTO, 2007]. Uno de los mecanismos principales de acción de la PM es el secuestro de compuestos carbonílicos implicados en la modificación de biomoléculas, por formación de una BS [VOZIYAN, 2005].

En los últimos años, el grupo de investigación de Reactividad Molecular y Diseño de Fármacos de la UIB se ha interesado en la glicación de biomoléculas. Se ha estudiado la glicación proteica [ADROVER, 2008B, 2009A] y el papel inhibitor de la PM, tanto su función secuestradora de grupos carbonilo, como su función quelatante de los cationes metálicos que catalizan estos procesos [ADROVER, 2008A, 2009A], y se han identificado los productos de reacción de la PM con un conjunto de aldosas [ADROVER, 2005, 2007]. Recientemente, sus estudios sobre la reacción en condiciones periódicas sobre una monocapa modelizada han contribuido a profundizar en el conocimiento de la glicación de aminofosfolípidos [SOLÍS-CALERO, 2010, 2011].

La presente tesis doctoral se enmarca dentro de los objetivos del grupo de investigación, y pretende ampliar la comprensión del proceso de glicación de los aminofosfolípidos y de su inhibición por vitámeros B₆. En particular, los objetivos se concretan en los siguientes puntos:

- Estudiar las cinéticas de formación de las BSs de análogos de aminofosfolípidos con glucosa, arabinosa y acetol, como compuestos aldehídicos y cetónicos con capacidad glicante.
- Profundizar en el estudio del papel de la PM como secuestrador de grupos carbonílicos.
- Evaluar el efecto competitivo del PLP en la glicación de aminofosfolípidos, estudiando la formación de BSs del PLP con compuestos análogos de los aminofosfolípidos.
- Analizar la influencia de los grupos funcionales de los aminofosfolípidos en el proceso cinético de la formación de BSs con el PLP.



Capítulo 1.

INTRODUCCIÓN

1.1. ASPECTOS GENERALES DE LA VITAMINA B₆

Vitamina B₆ es el término genérico con el que se denomina al conjunto de seis compuestos piridínicos interconvertibles (vitámeros): piridoxina (PN, comúnmente conocido como vitamina B₆), piridoxamina (PM), piridoxal (PL) y sus formas 5'-fosforiladas (PNP, PMP y PLP, respectivamente). Su estructura química se representa en la figura 1.1, donde se puede observar que se diferencian entre sí por el sustituyente presente en la posición 4'.

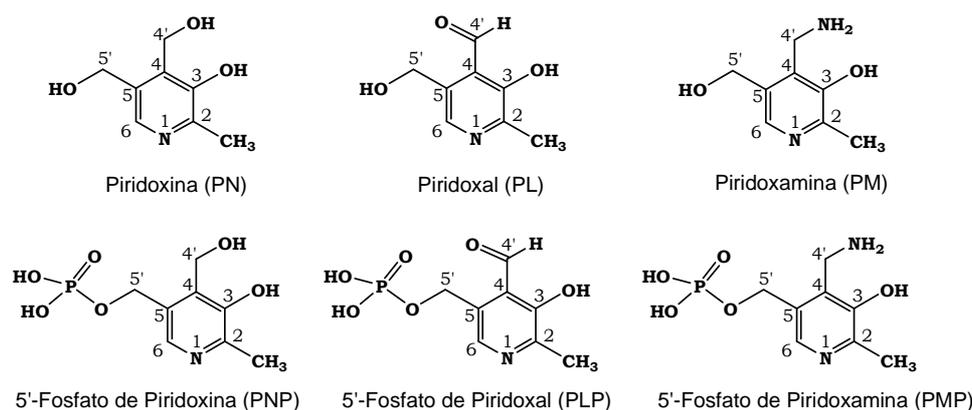


Figura 1.1. Estructura química de los seis vitámeros B₆.

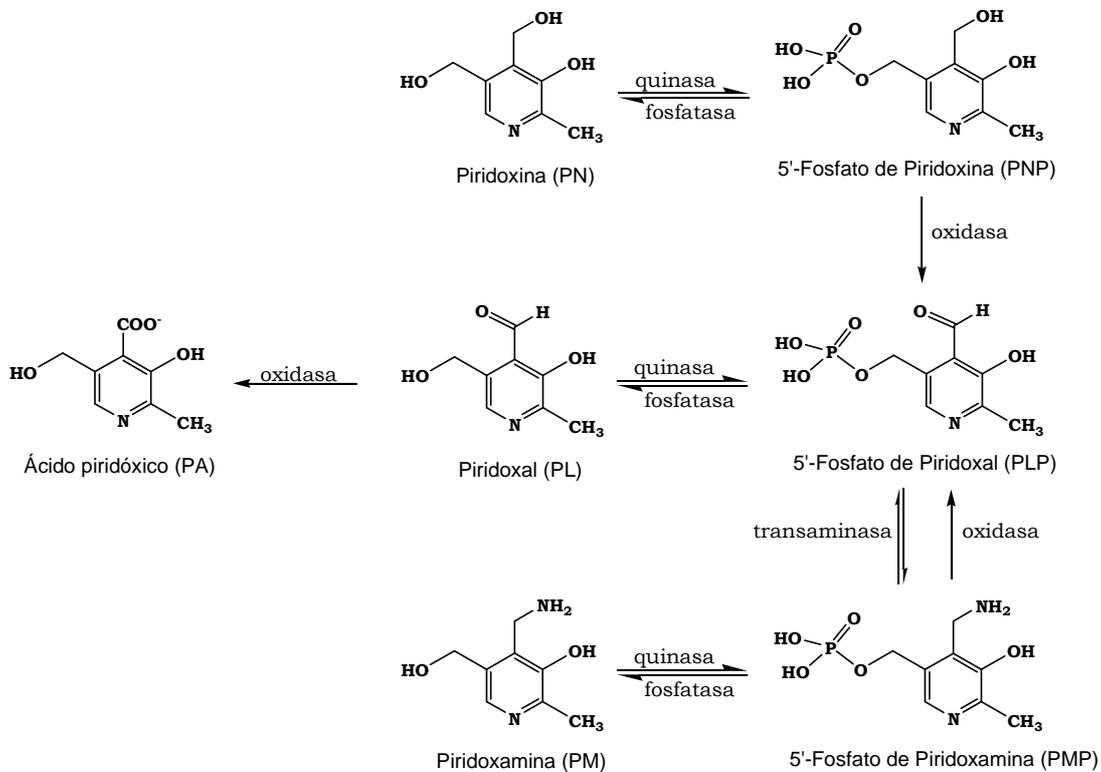
La vitamina B₆ es un compuesto soluble en agua descubierto en la década de 1930, cuando se detectó su presencia en muestras de riboflavina impurificada que se habían obtenido en diversos estudios nutricionales [GYÖRGY, 1934]. Posteriormente, se cristalizó a partir del extracto de salvado de arroz [LEPKOVSKY, 1938], y se sintetizó, caracterizándose como PN [HARRIS, 1939]. Años más tarde, Snell demostró la existencia de las estructuras de la PL y la PM [SNELL, 1942], mientras que las formas fosforiladas (PNP, PLP y PMP) se detectaron en estudios sobre el efecto de la fosforilación en la actividad de la tirosina descarboxilasa [GUNSALUS, 1944][HUFF, 1944].

La vitamina B₆ participa en una amplia variedad de funciones biológicas: es el cofactor de más de cien enzimas involucradas en el metabolismo de proteínas y se necesita para la fabricación de muchas otras proteínas esenciales para el organismo, por ejemplo la hemoglobina. Diversos estudios ponen de manifiesto la enorme importancia de la vitamina B₆ en la supervivencia de los organismos superiores, ya que su deficiencia puede disminuir la producción de anticuerpos y suprimir la respuesta inmunológica [SHIBATA, 1995]. Sin embargo, sólo los microorganismos y las plantas son capaces de sintetizarla [DI SALVO, 2011]; mientras que los demás organismos adquieren la vitamina B₆ de los nutrientes e interconvierten sus diferentes formas en función de sus necesidades.

1.1.1. ABSORCIÓN, TRANSPORTE, ALMACENAMIENTO Y METABOLISMO

El requerimiento promedio de vitamina B₆ en adultos es de 1,3 – 1,4 mg/día [BENDER, 2011] y puede provenir de dos fuentes, del suplemento dietético y del bacteriano (producida por la microflora intestinal). Las evidencias sugieren que esta última fuente de vitamina B₆ también es biodisponible, ya que la cantidad de vitamina excretada es significativamente superior a la cantidad total consumida oralmente [SAID, 2008].

La absorción de la vitamina B₆ implica la hidrólisis de las formas fosforiladas de los vitámeros en el intestino, proceso catalizado por fosfatasa alcalinas. Los productos no fosforilados son absorbidos por difusión pasiva, siendo posteriormente oxidados y/o fosforilados (esquema 1.1). La PN, el PL y la PM son fosforilados por quinasa, proceso en equilibrio con su desfosforilación catalizada por fosfatasa. Por otro lado, el PNP y el PMP pueden transformarse irreversiblemente en PLP por acción de la enzima oxidasa correspondiente. La transformación de PMP a PLP también es catalizada por transaminasa, siendo en este caso un proceso reversible. Finalmente, el PL se oxida a ácido 4-piridóxico (PA) que se excreta en la orina. La concentración de PA es utilizada como parámetro de control del nivel de vitamina B₆ en el organismo, considerándose adecuada la eliminación de 3 μmol/día [LEKLEM, 1990].



Esquema 1.1. Interconversión de los vitámeros de la vitamina B₆.

El PLP es el vitámero de mayor concentración, tanto en el plasma como en los glóbulos rojos, con un valor aproximado de 160 nM y 100 nM, respectivamente. La concentración del resto de los vitámeros es mucho menor. Por ejemplo, en los glóbulos rojos, las concentraciones de PL y PMP son 72 nM y 7 nM, respectivamente, mientras que la concentración de PA no es detectable [BUSCH, 2010] y las concentraciones de PL y PA en plasma son de 52 y 46 nM, respectivamente [BUSCH, 2010].

1.1.2. LA VITAMINA B₆ COMO COFACTOR ENZIMÁTICO

El PLP es el vitámero B₆ biológicamente más activo porque actúa como cofactor enzimático en una enorme variedad de transformaciones bioquímicas. No obstante, el PMP también tiene un importante papel catalítico en el metabolismo de aminoácidos a través de su interconversión con PLP actuando de cofactor en algunas enzimas PLP dependientes [DOLPHIN, 1986].

Por otro lado, el PMP es el cofactor del enzima CDP-6-desoxi-L-treo-D-glicero-4-hexulosa-3-deshidrasa (E₁, figura 1.2), donde actúa catalizando la reacción de desoxigenación que conduce a la síntesis de 3,6-didesoxihexosas¹. Se trata de una enzima homodimérica que contiene una molécula de PMP y un centro [2Fe-2S] por subunidad [THORSON, 1993][LIU, 1998]. La unión del PMP con la proteína es a través de enlaces no covalentes, siendo el fosfato uno de los principales grupos de anclaje [JANSONIUS, 1998][HENNIG, 1997]. El mecanismo de la reacción (esquema 1.2) se inicia por formación de una BS entre el PMP y el grupo carbonílico en posición C(4) del sustrato (*CDP-6-desoxi-4-ceto-glucosa*). Posteriormente, se extrae el protón de la posición C(4') del compuesto PMP-sustrato, lo que induce la eliminación del 3-OH generando un intermedio que se reduce por la acción simultánea de otro enzima (E₃) en asociación con el clúster metálico [HE, 2002].

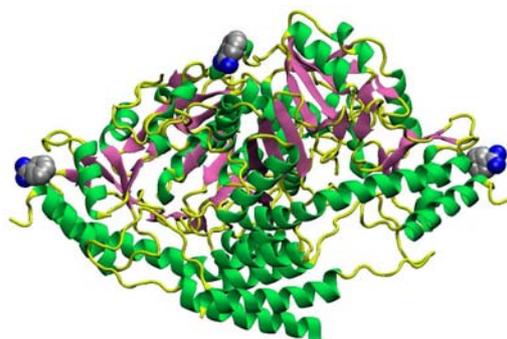
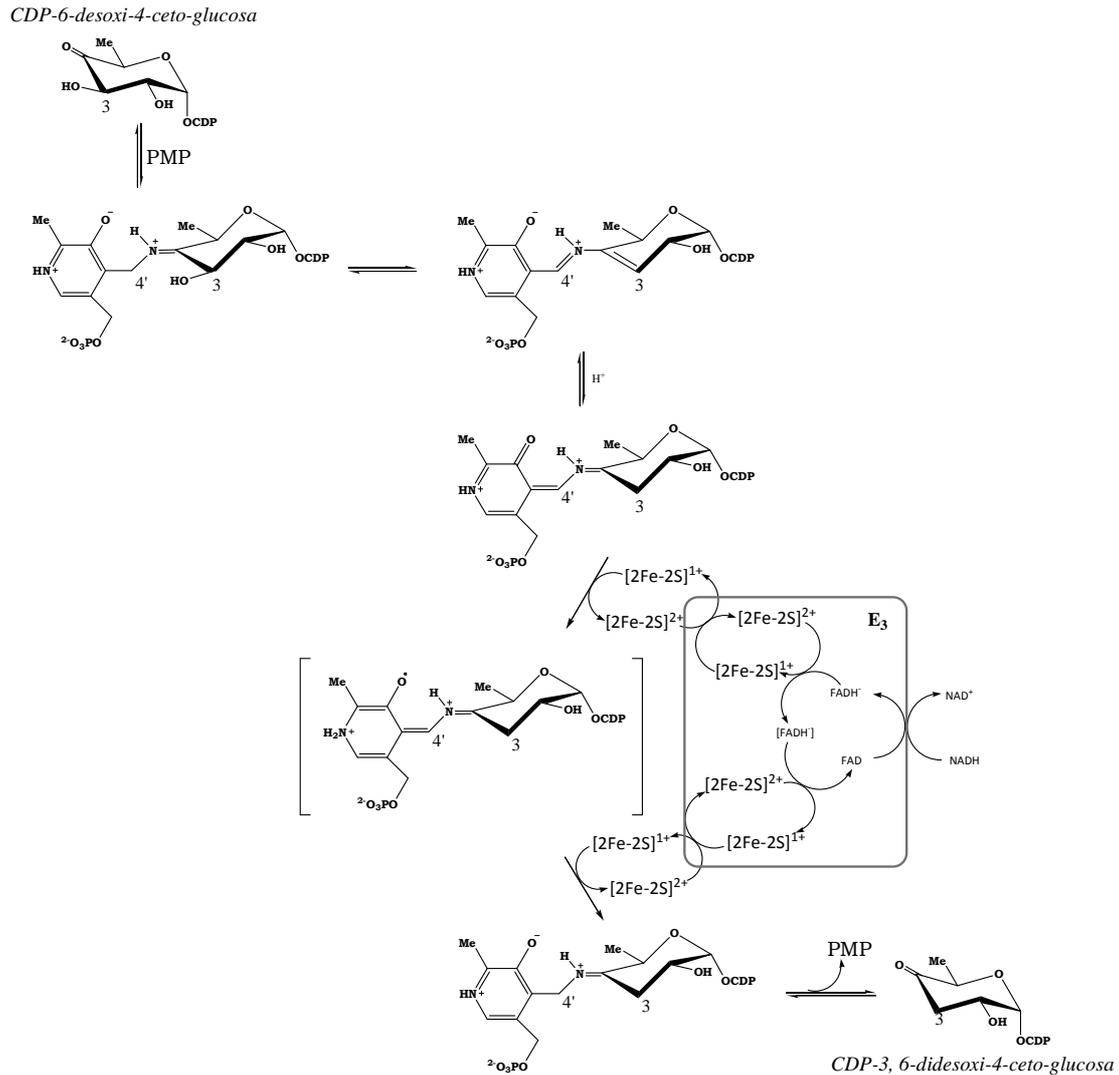


Figura 1.2. CDP-6-desoxi-L-treo-D-glicero-4-hexulosa-3-deshidrasa (E₁) (código pdb: 3bcx). El cofactor se representa con bolas (código de colores: C en gris, O en rojo, N en azul y P en naranja).

¹ Las 3,6-didesoxihexosas se encuentran formando parte de los lipopolisacáridos de algunas bacterias gram negativas y, además, suelen ser responsables de la respuesta inmune de los organismos superiores [LINDBERG, 1990].



Esquema 1.2. Mecanismo de la enzima PMP-dependiente CDP-6-desoxi-L-treo-D-glicero-4-hexulosa-3-deshidrasa (E_1).

Las enzimas PLP-dependientes presentan en el sitio activo la unión del PLP con el grupo ϵ -amino de una de sus Lys mediante la formación de una BS. El grupo fosfato del PLP también desempeña un importante papel en el anclaje, ya que forma puentes de hidrógeno e interacciones no covalentes con diferentes residuos (figura 1.3) [JANSONIUS, 1998]. Se ha sugerido que los demás sustituyentes no son necesarios para la unión con la enzima, al menos no de forma general para todos las enzimas PLP-dependientes [DOLPHIN, 1986].

Excepto en el caso de la enzima glucógeno fosforilasa que utiliza el grupo fosfato del PLP como catalizador ácido-base en la reacción fosforolítica del glucógeno [JOHNSON, 2009] y de la enzima aminomutasa que cataliza las reacciones radicalarias iniciadas en el enlace PLP-aminoácido [FREY, 2001], el proceso catalítico en el resto de las enzimas PLP dependientes se basa en la importante capacidad para estabilizar carbaniones de las BSs de PLP. En este tipo de enzimas, el proceso se inicia mediante el ataque de un aminoácido (sustrato) sobre la BS formada entre el PLP y el residuo Lys de la enzima, formando una diamina geminal (esquema

1.3) [TOBIAS, 1975][FISCHER, 1980] mediante un mecanismo cuyo paso limitante es el ataque de la amina sustrato sobre la aldimina inicial [MÄKELÄ, 1983][SALVÀ, 2004]. La liberación de la Lys forma una nueva BS con el grupo α -amino del aminoácido, conocida como aldimina externa. La función inicial del PLP es estabilizar la carga negativa generada sobre el C_{α} en el estado de transición que se forma al eliminar el protón unido al C_{α} de la aldimina externa. En el esquema 1.3 se muestra como la estabilización del anión está asistida por la deslocalización de la carga negativa a través del sistema π del PLP, generando el intermedio quinonoide [ELIOT, 2004].

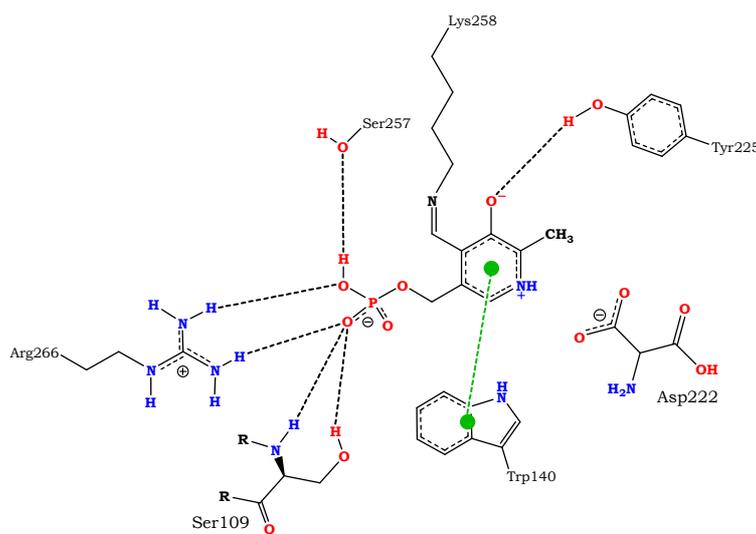
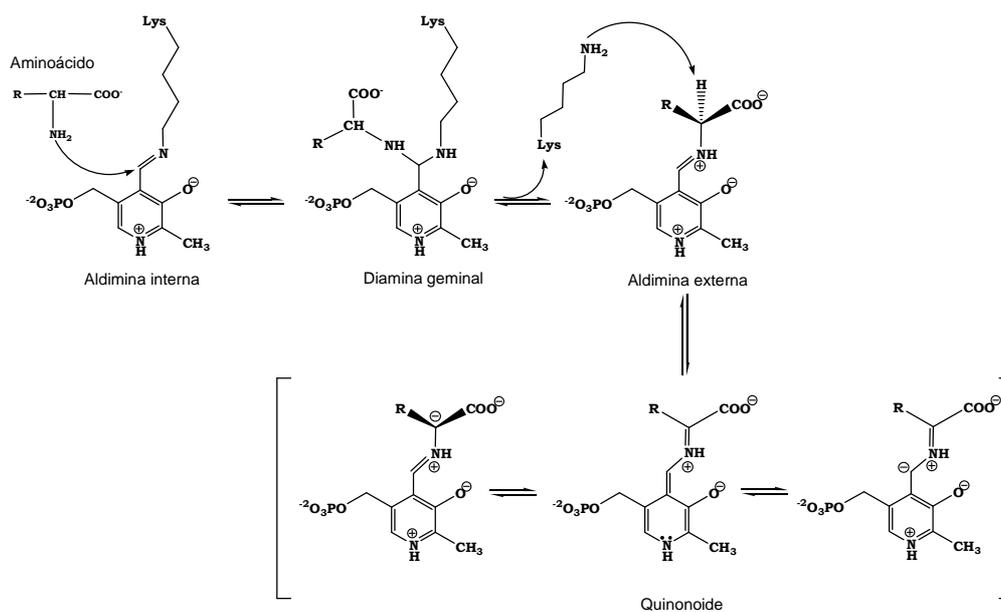


Figura 1.3. Unión del PLP a la tirosina aminotransferasa (código pdb: 3tat) formando una BS con la Lys258 y mediante anclaje de su grupo fosfato con la Ser257, la Ser109 y la Arg266. Las líneas discontinuas negras señalan los puentes de hidrógeno, mientras que las verdes son interacciones π - π . El Asp222 estabiliza la carga positiva del N piridínico en el PLP.



Esquema 1.3. La función inicial del PLP es deslocalizar, por resonancia en su sistema π , la carga negativa generada sobre el C_{α} por la pérdida del H^+ en la aldimina externa.

Las reacciones que son PLP-catalizadas se pueden clasificar según la posición del aminoácido en la que tienen lugar. Las reacciones en la posición α incluyen la transaminación, descarboxilación, racemización y eliminación con sustitución de un grupo R electrófilo, en cambio, las reacciones en la posición β o γ incluyen la eliminación o sustitución, como se describe a continuación.

- **Transaminación.** Las transaminasas (figura 1.4) catalizan la reacción de transferencia del grupo amino entre un aminoácido y un cetoácido. El mecanismo de la reacción se basa en mantener al PLP en la forma protonada mediante la interacción del N piridínico con un residuo aspartato, ya que la protonación de éste facilita la transferencia protónica del C(4') [CASASNOVAS, 2009]. La protonación (mediante catálisis ácido-base) del intermedio carbaniónico genera una cetoimina cuya hidrólisis produce, a través del intermedio carbinolamina (CA) correspondiente, un cetoácido y PMP (esquema 1.4). La transaminación se completa con el proceso inverso, en el que se forma una cetoimina entre el PMP y un nuevo cetoácido (sustrato) y se libera un nuevo aminoácido con recuperación del complejo PLP-enzima [JANSONIUS, 1998].

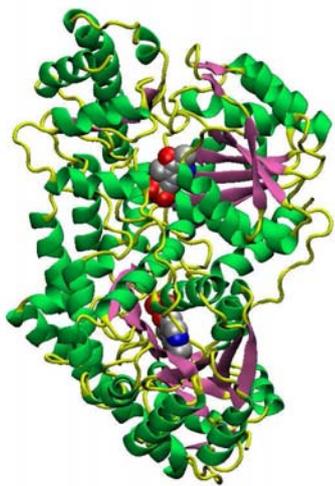
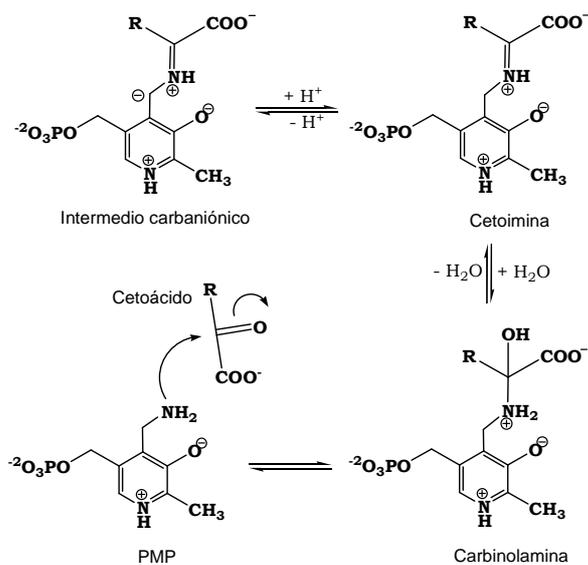


Figura 1.4. Aspartato aminotransferasa (código pdb: 1asn). El PLP se representa con bolas (código de colores: C en gris, O en rojo, N en azul y P en naranja).



Esquema 1.4. Mecanismo de la reacción de transaminación.

- **Racemización.** Esta reacción consiste en la interconversión enantiomérica de los aminoácidos, catalizada *in vivo* por las racemasas (figura 1.5). El proceso implica, igual que en las transaminasas, la abstracción del protón en α del aminoácido, aunque posteriormente se produce la reprotonación del intermedio reactivo en la misma posición, si bien por la cara opuesta (esquema 1.5). En transaminasas la posición favorecida para la protonación del intermedio es la 4'. En racemasas, el nitrógeno piridínico interacciona con un grupo NH

guanidinio de un residuo arginina [SHAW, 1997], dificultándose de esta forma la generación de un típico intermedio quinonoide.

Estudios experimentales [GRISWOLD, 2011][TONEY, 2011] y teóricos [CASASNOVAS, 2009] destacan la importancia del estado de protonación del nitrógeno piridínico a la hora de controlar las posiciones reprotonadas en los intermedios aniónicos generados.

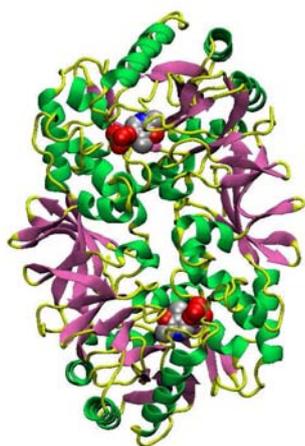
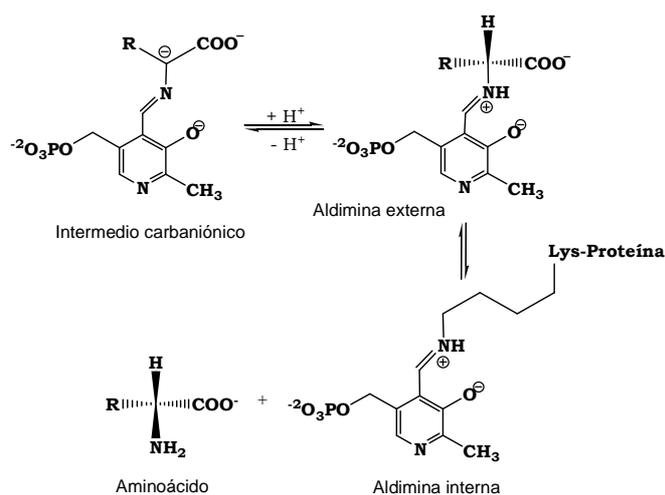


Figura 1.5. Alanina racemasa (código pdb: 1sft). El PLP se representa con bolas (código de colores: C en gris, O en rojo, N en azul y P en naranja).



Esquema 1.5. Mecanismo de racemización.

▪ **Eliminación β y sustitución β .** Las enzimas de PLP normalmente catalizan un único tipo de reacción o varias reacciones mecanísticamente relacionadas, como son la β -eliminación y la β -sustitución. Algunos de los enzimas que pueden catalizar ambas reacciones son la tirosina fenol liasa [KUMAGAI, 1970], la triptofanasa [SNELL, 1975] o la *O*-acetilserina sulfidrilasa (cisteína sintasa, figura 1.6) [COOK, 2003]. Como se muestra en el esquema 1.6, el mecanismo de ambas reacciones se inicia con la estabilización del intermedio quinonoide mediante la eliminación del grupo electronegativo en β , obteniendo así un aminoacrilato [PHILLIPS, 1965]. En la β -eliminación se procede a la adición del grupo ϵ -amino de la Lys al C(4') del aminoacrilato, lo que implica la recuperación de la aldimina interna y la formación de un aminoácido insaturado que se degrada formando amoniaco y ácido pirúvico. En la β -sustitución un grupo nucleófilo (*Y*) se adiciona sobre el C $_{\beta}$ del aminoacrilato, protonándose posteriormente para generar una aldimina externa. La reacción concluye con la hidrólisis de ésta lo que genera el aminoácido β -sustituido y la recuperación de la aldimina interna [DOLPHIN, 1986].

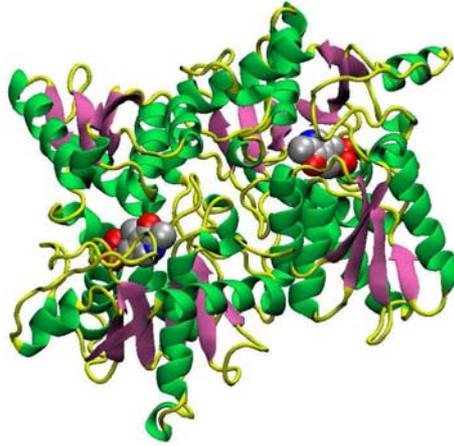
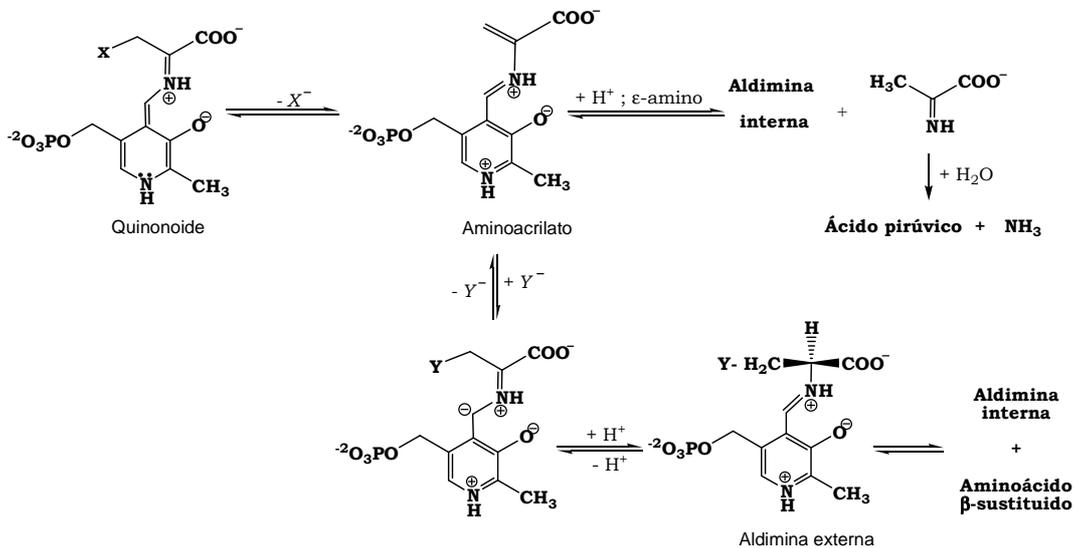


Figura 1.6. *O*-acetilserina sulfidrilasa (código pdb: 1oas). El PLP se representa con bolas (código de colores: C en gris, O en rojo, N en azul y P en naranja).



Esquema 1.6. Mecanismo de β -eliminación y β -sustitución.

▪ **Eliminación γ y sustitución γ .** Un conjunto pequeño de enzimas PLP dependientes tienen la capacidad de llevar a cabo la γ -eliminación o la γ -sustitución, como ocurre con la γ -cistationasa (figura 1.7) [DE BILLY, 1975]. Ambos procesos se inician con la eliminación del H_α de la aldimina externa seguida por la tautomerización de esta estructura obteniendo el intermedio quinonoide del esquema 1.7. Posteriormente, se elimina el H_β y el grupo saliente en γ para formar un intermedio vinílico. En la γ -eliminación se procede a la protonación e hidrólisis a partir de la cual se recupera la aldimina interna y se produce el ácido 2-oxobutírico y amoniaco. La γ -sustitución tiene lugar por la adición Michael de un nucleófilo diferente (Y) con la consiguiente transferencia de protones hasta obtener la aldimina interna y un aminoácido γ -sustituido [PALCIC, 1986].

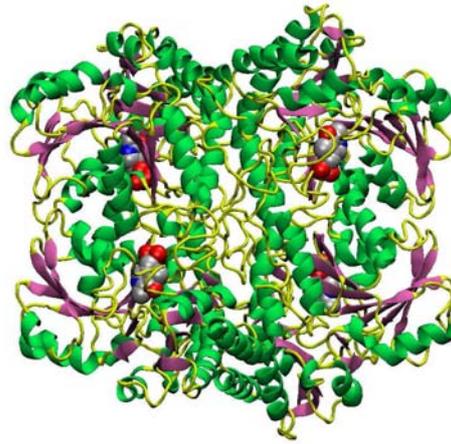
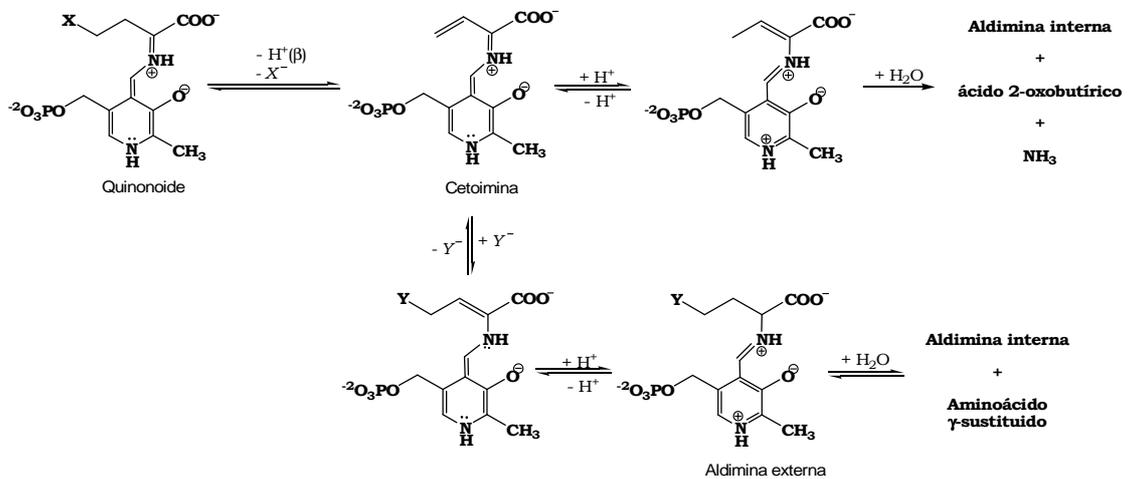


Figura 1.7. γ -cistationasa (código pdb: 1n8p). El PLP se representa con bolas (código de colores: C en gris, O en rojo, N en azul y P en naranja).



Esquema 1.7. Mecanismo de γ -eliminación y γ -sustitución.

▪ **Descarboxilación.** La descarboxilación está catalizada por descarboxilasas (p. ej: aspartato descarboxilasa, glutamato descarboxilasa o la arginina descarboxilasa mostrada en la figura 1.8, entre otras) y tiene como objetivo la transformación de los aminoácidos en aminas que se utilizaran en la neurotransmisión. La orientación perpendicular del grupo carboxílico con respecto a la imina favorece la descarboxilación, que empieza con la pérdida de un CO_2 de una aldimina externa, produciendo el intermedio quinonoide. La posterior protonación genera una nueva aldimina externa que por hidrólisis libera la amina primaria y finaliza con la recuperación del anclaje PLP-enzima (esquema 1.8) [PALCIC, 1986][MARTELL, 1989][FOGLE, 2010].

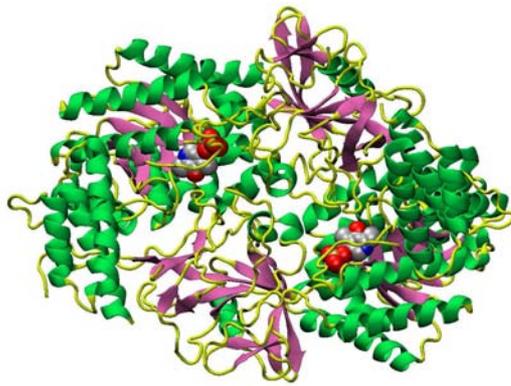
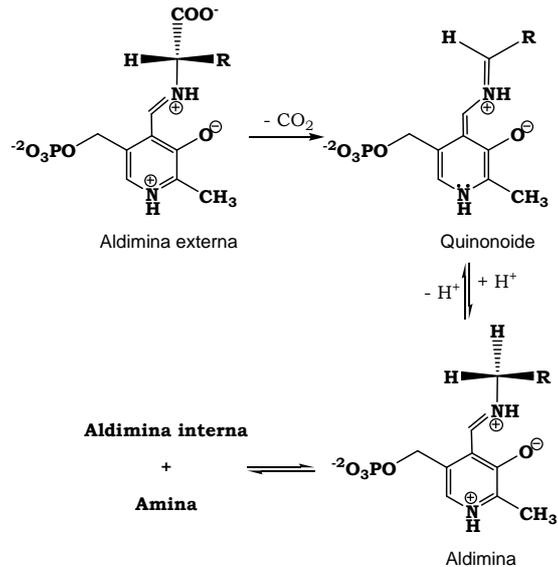


Figura 1.8. Arginina descarboxilasa (código pdb: 3nzp). El PLP se representa con bolas (código de colores: C en gris, O en rojo, N en azul y P en naranja).



Esquema 1.8. Mecanismo de descarboxilación.

▪ **α-Eliminación y sustitución.** Otras enzimas PLP-dependientes catalizan la rotura del enlace $C_{\alpha}-C_{\beta}$, lo que es una variante de la reacción retro-aldólica. De este tipo de enzimas, la enzima más estudiada es la serina hidroximetiltransferasa (figura 1.9) [RAO, 2000] que convierte reversiblemente serina en glicina. La reacción empieza con la desprotonación del grupo hidroxilo de la serina, por lo que se libera un formaldehído (FA) a la vez que se genera un intermedio quinonoide. La protonación del C_{α} de este intermedio genera la aldimina de la glicina, cuya hidrólisis da como producto final la glicina y recupera la unión PLP-enzima (esquema 1.9) [MARTELL, 1989].

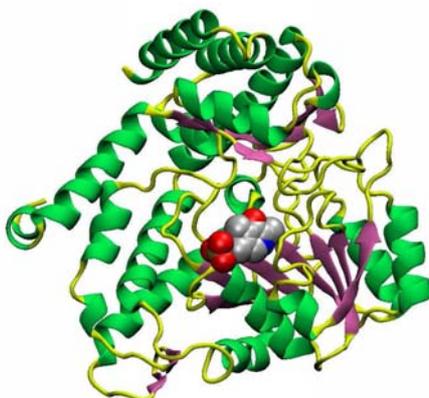
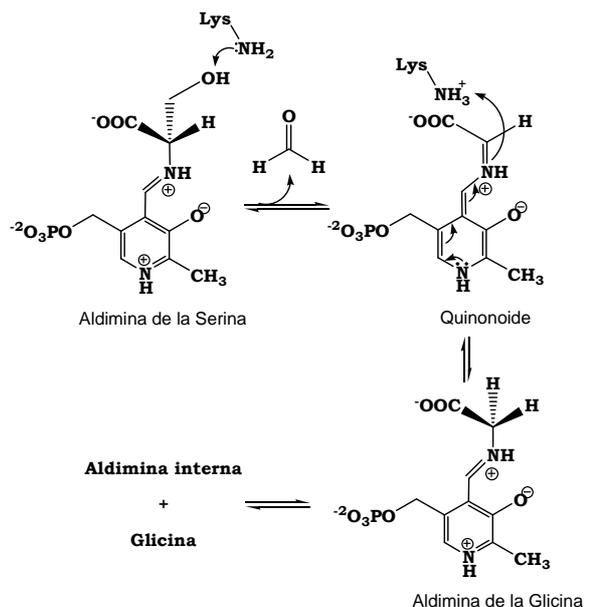


Figura 1.9. Serina hidroximetiltransferasa (código pdb: 1kkj). El PLP se representa con bolas (código de colores: C en verde, O en rojo, N en azul y P en naranja).



Esquema 1.9. Mecanismo de la α -eliminación y sustitución.

1.1.3. PATOLOGÍAS ASOCIADAS A ABSORCIONES INADECUADAS DE VITÁMINA B₆

Como se ha indicado anteriormente, una buena parte de los procesos vitales de los organismos están condicionados por la acción de los vitámeros B₆. No obstante, estudios médicos indican que, a altas concentraciones, esta vitamina es neurotóxica y causa neuropatía, ataxia, debilidad muscular, pérdida del equilibrio, daños neuronales con pérdida de mielina y degeneración de los nervios sensitivos. Por esto, las recomendaciones nutricionales dan un nivel máximo consumible diariamente durante toda la vida de 0,17 mg por kg de masa corporal, lo que equivale a 10 mg/día para una persona de 60 kg [BENDER, 2011]. En algunos casos de sujetos que presentan una baja afinidad por la coenzima, es necesario una concentración de PLP en los tejidos mucho mayor de lo habitual, para que estas enzimas presenten una actividad significativa. Sólo en estos casos se requieren suplementos de vitamina B₆ en forma de piridoxina clorhidratada en cantidades de 200 a 1000 mg/día [CLAYTON, 2006].

También se han recomendado suplementos de vitamina B₆ en el caso de algunos cuadros clínicos que se describen más abajo, en los que está implícito un mecanismo bioquímico o fisiológico para justificar su uso. De la misma manera, estos suplementos se han utilizado sin ninguna razón teórica para otras condiciones en las que los estudios demuestran que los pacientes afectados presentan niveles insuficientes de vitamina B₆. Sin embargo, en ambos casos su eficacia es poco evidente [BENDER, 2011].

- **Hipertensión.** El déficit de vitamina B₆ aumenta la respuesta de los órganos diana hacia las hormonas exógenas (como los glucocorticoides), cuya hipersecreción e incremento de sensibilidad provoca hipertensión. Un suplemento de vitamina B₆ incrementaría la cisteína en los tejidos, que es un agente secuestrador de aldehídos, previniendo el desarrollo de la hipertensión [ALLGOOD, 1992].

- **Enfermedades cardiovasculares.** La homocisteína se degrada a cisteína mediante reacciones catalizadas por enzimas PLP-dependientes, por lo que la deficiencia de vitamina B₆ genera su incremento. Elevados niveles de homocisteína son un factor de riesgo para la arterosclerosis, las apoplejías y las enfermedades coronarias [BOERS, 1997].

- **Intolerancia a la glucosa.** La intolerancia a la glucosa asociada con la ingesta de estrógenos como anticonceptivos o el embarazo causan, probablemente, alteraciones en el metabolismo del triptófano, en el cual están implicadas algunas enzimas PLP-dependientes. La baja concentración de vitamina B₆ aumenta los niveles en plasma de los metabolitos del triptófano (quinurenina y análogos, ácido xanturénico y ácido quinolínico) que inhiben el enzima clave de la gluconeogénesis y la síntesis de insulina [BENDER, 2011]. Recientemente, como se tratará más adelante, se ha demostrado que la PM es un inhibidor de las consecuencias del

pobre control glucídico en la diabetes, reduciendo la formación de los productos avanzados de glicación [VOZIYAN, 2005][HAGIWARA, 2009].

- **Cáncer.** Niveles inadecuados de vitamina B₆ pueden ser un factor de desarrollo de cáncer de pecho, de útero, de próstata y de colon. La inhibición de la proliferación celular por parte de la vitamina B₆ se puede explicar a través de dos mecanismos. Por una parte, la reacción PLP-dependiente de la serina hidroximetiltransferasa es la mayor fuente de grupos metilo para la metilación del ADN y las histonas. Por otro lado, el PLP inhibe muchos enzimas que unen sustratos fosforilados, incluyendo las polimerasas de ADN y ARN [BENDER, 2011].

- **Disminución de las funciones cognitivas.** Existen algunas evidencias de que el déficit de vitamina B₆ está asociado con la pérdida cognitiva en las personas mayores [SPINNEKER, 2007]. Suplementos moderados de PN mejoran la memoria a largo plazo [DEIJEN, 1992], y también se han usado en programas para el tratamiento del autismo desde la década de los 50 [ROSSIGNOL, 2009].

- **Depresión.** El enzima clave de la síntesis de la serotonina requiere el PLP como cofactor, por lo que, niveles bajos de vitamina B₆ pueden provocar una disminución en la concentración de serotonina, condición asociada a la depresión clínica [BENDER, 2011].

- **Enfermedad renal crónica.** La deficiencia de vitaminas es común en las personas con disfunciones renales crónicas. La falta de vitamina B₆ se asocia a la actividad renal de eliminación de la homocisteína del plasma, proceso catalizado por enzimas PLP-dependientes [BUSCH, 2010]. Este factor puede derivar en otras complicaciones como enfermedades cardiovasculares o anemia.

1.2. BASES DE SCHIFF DERIVADAS DE VITÁMEROS B₆

Como se ha indicado anteriormente, la mayoría de las reacciones catalíticas que implican la presencia de la vitamina B₆ (tanto del PLP como del PMP) pasan por la formación de una BS, lo que explica los numerosos estudios realizados sobre este tipo de reacciones.

El primer paso del mecanismo es el ataque nucleófilo del grupo amino de un aminoácido sobre el grupo carbonílico del piridoxal (PL y PLP) o de la piridoxamina (PM y PMP) sobre el carbonilo de un cetoácido, formándose rápidamente, en ambos casos, un intermedio CA. El segundo paso corresponde a la deshidratación de la CA para formar una BS, siendo el paso limitante de la reacción [SAYER, 1980][SALVÀ, 2003A]. Como se indicó anteriormente (apartado 1.1.2 de este capítulo), las BSs de los diferentes vitámeros estabilizan muy bien la generación de carbaniones, los cuales evolucionan posteriormente por diferentes caminos, dependiendo del sitio activo enzimático y del pH.

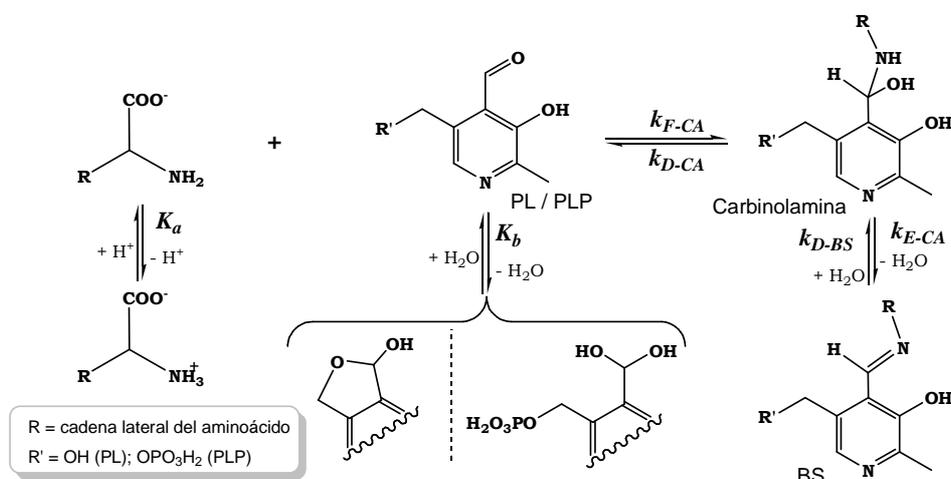
Por otro lado, hay que indicar que los vitámeros B₆ y sus BSs son capaces de actuar como agentes complejantes de iones metálicos gracias a la presencia del grupo fenolato en 3, del nitrógeno en 1, del sustituyente en 4 y del fosfato en 5' [LEUSSING, 1986]. El estudio de sus equilibrios de formación de complejos ha suscitado especial interés ya que los iones metálicos catalizan la transaminación [GANSOW, 1969], la desfosforilación [MOHAN, 1979], la desaldolación, la β-eliminación o la descarboxilación [TATSUMOTO, 1981].

1.2.1. BASES DE SCHIFF DE PIRIDOXAL Y DE 5'-FOSFATO DE PIRIDOXAL

En el esquema 1.10 se muestra el equilibrio de formación de las BSs de PL o PLP con aminoácidos. La condensación de estos reactivos conduce a la formación de una CA, que por deshidratación produce una aldimina o BS. El ataque del grupo amino es el paso limitante a pH bajos, mientras que a pH elevados el paso lento es la pérdida de la molécula de agua de la CA, que presenta catálisis ácida general [CORDES, 1963].

Las CAs son bastante inestables y difíciles de observar. Su cinética de formación fue estudiada por Hershey y Leussing en la reacción entre la alanina y el PLP [HERSHEY, 1977]. La constante de formación de la CA (k_{F-CA}) depende del estado de protonación del PLP: para las formas aniónicas el valor está en torno a $1 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{h}^{-1}$, mientras que para las formas H₃PLP ($k_{F-CA} = 8 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{h}^{-1}$) y H₄PLP⁺ ($k_{F-CA} = 2 \cdot 10^{12} \text{ M}^{-1}\text{h}^{-1}$) es mayor. En cambio, la constante de disociación de la CA ($k_{D-CA} = 3 \cdot 10^9 \text{ h}^{-1}$) no depende de la especie iónica del PLP ya que a pH bajo la estabilidad de la CA aumenta a la vez que aumenta su deshidratación debido a la presencia de un mayor número de protones. Farago y Matthews observaron que en presencia de Cu²⁺ aumenta la proporción de CA en mezclas de reacción de PLP y glutamato, aumentando entre 3 y 50 veces el valor de k_{F-CA} , según la forma iónica del PLP [FARAGO, 1969]. A su vez,

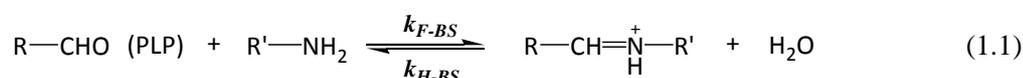
demonstraron que dichos iones inhiben su deshidratación disminuyendo el valor de k_{E-CA} entre 5 y 7 órdenes de magnitud.



Esquema 1.10. Mecanismo de formación de las BSs de PL y PLP con aminoácidos.

La constante cinética de eliminación de la molécula de agua de la CA (k_{E-CA}) para el sistema PLP-Ala es cuatro órdenes de magnitud inferior al valor de k_{F-CA} para las especies aniónicas, reduciéndose dicha diferencia a dos órdenes en condiciones ácidas [HERSHEY, 1977]. Este incremento se atribuye a un cambio en el grupo saliente que pasa de OH⁻ a H₂O gracias a la acción del protón del PLP, teniendo lugar una catálisis ácida intramolecular. Hay que señalar que los valores de k_{E-CA} para el PLP y sus análogos con un grupo fenolato en posición *orto* son mayores que los determinados para otros aldehídos, ya que la presencia de dicho grupo es capaz de estabilizar el ión iminio formado [LEUSSING, 1986]. Finalmente, la constante de hidratación de la BS para formar la CA correspondiente (k_{D-BS}) presenta un valor de $2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{h}^{-1}$ para la forma H₃PLP, el cual se incrementa con el pH [HERSHEY, 1977].

En la mayoría de los estudios cinéticos realizados, las constantes cinéticas medidas son las globales de formación (k_{F-BS}) y de hidrólisis (k_{H-BS}) de las BSs con respecto a los reactivos iniciales (ecuación 1.1), ya que la CA se forma en un rápido preequilibrio. La constante k_{F-BS} es el producto de la constante de equilibrio de formación de la CA (K_{CA}) y de k_{E-CA} (ecuación 1.2), cada una de estas constantes está influida por distintos factores. Principalmente, depende de la basicidad de la amina, pero también depende de las repulsiones electrostáticas, de los efectos estéricos y de la electrofobicidad. Se ha observado que el valor de k_{F-BS} es mayor para la especie H₂PLP⁻ respecto a las formas más básicas, lo que se interpreta como el efecto de la catálisis ácida general para la deshidratación de la CA [LEUSSING, 1986].



$$k_{F-BS} = \frac{k_{F-CA} \cdot k_{E-CA}}{k_{D-CA}} = K_{CA} \cdot k_{E-CA} \quad (1.2)$$

Debido a la importancia del PLP en el metabolismo de aminoácidos, son numerosos los estudios en los que se han determinado las constantes cinéticas de formación de las BSs entre el PLP y aminoácidos. Se ha observado que el valor de k_{F-BS} aumenta con el pH (intervalo de 3 – 11) desde valores de 60 hasta $2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{h}^{-1}$ (figura 1.10A) como resultado del aumento con el pH de la concentración de la forma amina libre reactiva. Si se define la constante cinética para cada especie iónica se observa un aumento de k_{F-BS} con la protonación ($k_{F-BS} = 5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{h}^{-1}$ para la especie PLP^{3-} y $k_{F-BS} = 2 \cdot 10^{11} \text{ M}^{-1}\text{h}^{-1}$ para la especie H_3PLP), consecuencia de la catálisis ácida intramolecular confirmada por la obtención de un ajuste lineal al realizar la representación de Brönsted ($\log k_{F-BS}^i$ vs $\log K_{a(\text{PLP})}$), obteniendo valores de α en el rango 0,71 – 0,80 [METZLER, 1980][VÁZQUEZ, 1989, 1990A, 1992A, 1992B, 1992D][ECHEVARRÍA, 2005]. Cabe mencionar que los estudios de Llor y cols. excluyeron la posible influencia de una catálisis ácida general de los tampones en esta reacción [LLOR, 1984][SÁNCHEZ-RUIZ, 1982].

Por otra parte, los valores obtenidos de las constantes de hidrólisis (k_{H-BS}) disminuyen desde pH básico a $\text{pH} \approx 9,0$, pasa por un mínimo y posteriormente aumenta hasta $\text{pH} 6,0$, tomando luego un valor constante (figura 1.10B). Los valores de k_{H-BS} se encuentran en el rango $6 - 350 \text{ h}^{-1}$. De los aminoácidos estudiados², la leucina y la isoleucina son los que presentan valores menores de k_{H-BS} , lo que sugiere que la ausencia de grupos iónicos en la cadena lateral del aminoácido estabiliza el enlace imínico [METZLER, 1980][VÁZQUEZ, 1989, 1990A, 1992A, 1992B, 1992D][ECHEVARRÍA, 2005].

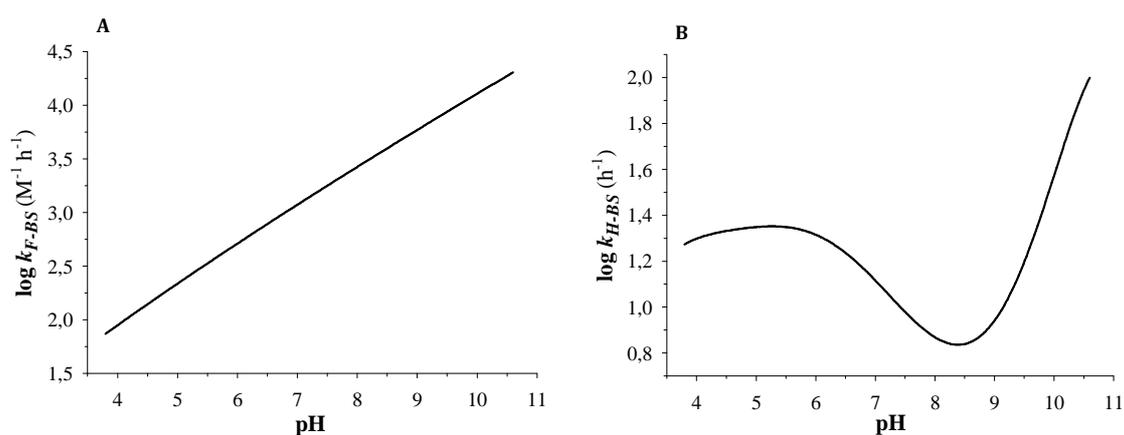


Figura 1.10. Tendencia del valor de las constantes cinéticas microscópicas de la reacción del PLP con aminoácidos en función del pH. A) Constante de formación de la BS (k_{F-BS}). B) Constante de hidrólisis de la BS (k_{H-BS}). Datos obtenidos de [VÁZQUEZ, 1990A].

² Existen datos bibliográficos de las constantes cinéticas de formación e hidrólisis de las BSs formadas entre el PLP y los aminoácidos siguientes: glicina, leucina, isoleucina, histidina, serina, triptófano, valina y ácido glutámico.

Echevarría y cols. calcularon la energía de activación (E_a) y los parámetros de activación (ΔH^\ddagger y ΔS^\ddagger) para la reacción entre el triptófano y el PLP. Los valores de E_a y ΔH^\ddagger aumentan con el incremento del número de cargas negativas del PLP, mostrando valores entre 1 y 40 kJ mol⁻¹ para ambos parámetros. Por el contrario, en el proceso de hidrólisis de la BS estos parámetros no muestran ninguna relación concluyente con el estado de protonación de la BS y presenta valores entre 15 y 65 kJ mol⁻¹. Los valores de ΔS^\ddagger son negativos en ambos casos, en concordancia con la disminución de grados de libertad en el estado de transición [ECHEVARRÍA, 2005].

En estos trabajos también se han determinado las constantes de equilibrio de formación de las BSs ($K_{BS} = k_{F-BS} / k_{H-BS}$). Los resultados muestran que las BSs incrementan su estabilidad a medida que aumenta el pH, hasta valores situados entre el pK_a de la amina del aminoácido y el mayor valor de pK_a del PLP (aproximadamente a pH = 8,5 – 9, figura 1.11). Los aminoácidos estudiados presentan valores de K_{BS} entre 0,6 y 1600 M⁻¹ [METZLER, 1980][VÁZQUEZ, 1989, 1990A, 1992A, 1992B, 1992D][ECHEVARRÍA, 2005].

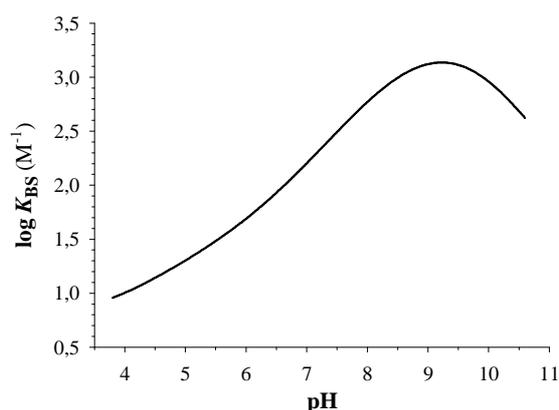


Figura 1.11. Tendencia de la variación de la constante de equilibrio (K_{BS}) de la reacción del PLP con aminoácidos en función del pH. Datos obtenidos de [VÁZQUEZ, 1990A].

La BS formada entre el PLP y diferentes aminoácidos es inestable y se descompone lentamente debido a que la activación del protón en α del residuo del aminoácido puede conducir hacia las reacciones de transaminación, β -eliminación o desaldolación (esquema 1.4, 1.6 y 1.9, respectivamente). De entre estas reacciones, la transaminación es el proceso más importante [VÁZQUEZ, 1991A][LEUSSING, 1986], formando reversiblemente en el rango de pH de 4 a 12 el cetoácido correspondiente y PMP. La reacción puede ser catalizada por el aminoácido (a pH ácido) o por el agua (a pH básico) [VÁZQUEZ, 1991A, 1992B].

Se han analizado los efectos de los sustituyentes del grupo aldehídico sobre la estabilidad de la BS. Vázquez y cols. compararon el PLP con el PL y el 5'-deoxipiridoxal (DPL), concluyendo que todos los grupos protonables del PLP están involucrados en la catálisis

ácida intramolecular [VÁZQUEZ, 1989, 1990B]. En este sentido, el estudio de Huang y cols. indicó que tanto el fosfato libre presente en la disolución tampón como el fosfato unido al PLP pueden incrementar la formación de la BS [HUANG, 2001]. Por otro lado, aunque el grupo fosfato no proporciona una estabilidad adicional a la BS, las BSs del PL están muy afectadas por la formación del hemiacetal cíclico de este compuesto por lo que presentan valores de k_{F-BS} menores [VÁZQUEZ, 1989, 1990B]. Una caracterización más rigurosa de estos efectos se ha llevado a cabo comparando la reactividad de distintos aldehídos: salicilaldehído [LEUSSING, 1968], piridina-4-aldehído [FRENCH, 1964], 3-hidroxipiridina-4-carbaldehído [METZLER, 1980], benzaldehído y 4-hidroxibenzaldehído [CRUGEIRAS, 2009]. En estos estudios se concluyó que el anión fenolato presente en el PLP es el responsable de la mayor parte de la estabilización de la BS ya que posibilita un enlace de hidrógeno intramolecular.

También se ha estudiado el sistema de reacción entre el PLP y otras aminas como el ácido ϵ -aminocaproico [VÁZQUEZ, 1990A], la n-hexilamina [GARCÍA DEL VADO, 1987], la dodecilamina [VÁZQUEZ, 1992C], polialilaminas [GARCÍA DEL VADO, 1995], polilisininas [ECHEVARRÍA, 1988], copolipéptidos [ECHEVARRÍA, 1999] y compuestos hidrazínicos [ECHEVARRÍA, 2000]. Aunque el perfil de reacción es similar al obtenido en la reacción con los aminoácidos, los valores de k_{F-BS} son mayores, sobre todo a pH ácido y neutro, debido al carácter anfifílico de estos compuestos. La CA se rodea de la parte polar de las moléculas, lo que favorece su deshidratación. A su vez, los valores de k_{H-BS} son menores porque el enlace imínico queda protegido por el entorno hidrofóbico resultando inaccesible para las moléculas de agua. De hecho, la k_{H-BS} de las BSs del PLP y las polilisininas dependen del peso molecular del polímero, decreciendo su valor cuando el peso molecular se incrementa [ECHEVARRÍA, 1988]. De igual manera, la presencia de cadenas laterales que contienen grupos aromáticos favorecen la formación de la BS [ECHEVARRÍA, 1999, 2000].

La variación de la polaridad del medio utilizando mezclas de disolventes [GARCÍA DEL VADO, 1988][PLAZA DEL PINO, 1995] o la presencia de surfactantes [VÁZQUEZ, 1992A, 1992C] aumenta la estabilidad de la BS. El descenso de la polaridad del medio se refleja en un aumento de las constantes cinéticas de formación y en la disminución de la constante de hidrólisis, como consecuencia de la pérdida de eficiencia del proceso de catálisis ácida intramolecular.

Las BSs del PLP son capaces de formar complejos con iones metálicos mediante el nitrógeno piridínico, el fenolato y el sustituyente en la posición 4 (el grupo carboxilato en las BSs de aminoácidos), tal y como se muestra en la figura 1.12. Se unen al Cu^{2+} formando complejos con índice de coordinación 1:1, con geometría cuadrada plana donde la cuarta posición de coordinación la ocupa una molécula de agua. En cambio, presentan índice de coordinación 2:1 en complejos de Ni^{2+} , Fe^{3+} [HEINERT, 1963], Mn^{2+} , Zn^{2+} [CHRISTEN, 1985] y Al^{3+} [ABBOTT, 1970], con geometría octaédrica. Recientemente, se han sintetizado y caracterizado

complejos de Zn^{2+} , Cu^{2+} y VO^{2+} de BS entre el PL y compuestos que presentan dos aminas primarias, formando así BSs con dos moléculas de PL [NASKAR, 2010, 2011][MUKHERJEE, 2011].

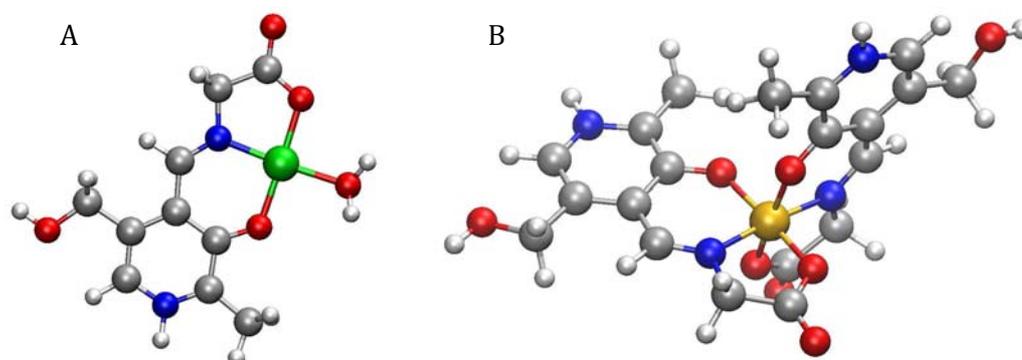


Figura 1.12. Estructura de los complejos metálicos de las BSs de PL o PLP, si se sustituye la posición 5' por un grupo fosfato. A) Índice de coordinación 1:1, con el Cu^{2+} . B) Índice de coordinación 2:1, con el Fe^{3+} .

El PL y PLP también se coordinan con iones metálicos mediante sus grupos formilo y fenolato, aunque en el caso del PLP la posición del metal en la coordinación depende de su forma iónica (en el $HPLP^{2-}$ o $HPLP^-$ se coloca entre el formilo y el fosfato, y en el PLP^{3-} se sitúa entre el formilo y el fenolato) [LEUSSING, 1986]. A pesar de esta coordinación, el metal es cinéticamente inerte, es decir, se compleja a la BS una vez formada. No obstante, la concentración de BS aumenta con la presencia de los metales en disolución [MURAKAMI, 1973], cuantificando que el valor de k_{F-BS} aumenta 10^5 veces en la reacción entre el PLP^{3-} y la alanina, siendo dicho efecto menos acusado para las formas más protonadas del PLP [WENG, 1983]. Los complejos formados con Cu^{2+} son estables en todo el rango de pH, mientras que los de Zn^{2+} sólo a pH superior a 5 y los de oxovanadato (VO^{2+}) únicamente a pH ácido [MURAKAMI, 1973]. Se han determinado las constantes de equilibrio de los complejos de estos iones con las BSs del PLP y del PL con varios aminoácidos obteniendo valores de $\log K_{eq}$ en el intervalo 5,5 – 16,5 [DAVIS, 1961][LEUSSING, 1966][FELTY, 1970][WENG, 1983][SHANBHAG, 1990].

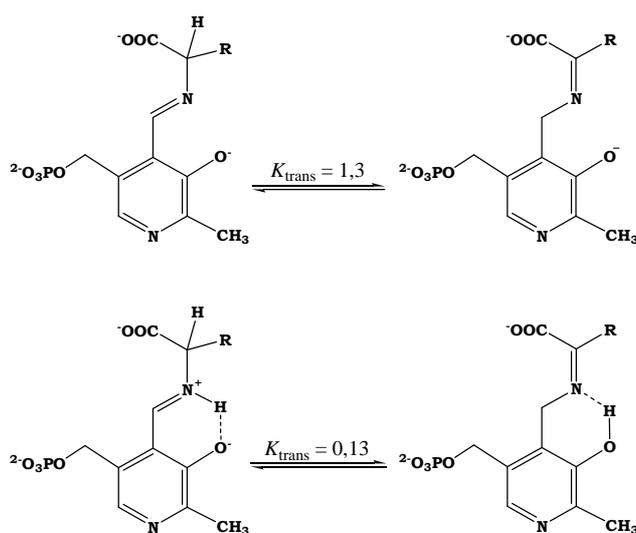
1.2.2. BASES DE SCHIFF DE PIRIDOXAMINA Y 5'-FOSFATO DE PIRIDOXAMINA

El mecanismo de la formación de las BSs de PM o PMP con grupos carbonílicos consta también de dos pasos: formación de una CA y deshidratación de ésta para formar la imina, siendo éste último el paso limitante de la reacción. Sin embargo, al contrario de lo que ocurre con el PLP, las BSs de PMP no necesitan ninguna molécula de agua que facilite la transferencia protónica, ya que el ordenamiento espacial de sus grupos funcionales aseguran que todos los intercambios de protones sean intramoleculares [ORTEGA-CASTRO, 2010]. Las BSs de PM o PMP se caracterizan porque su enlace imina queda separado del anillo piridínico por un grupo metileno que impide la deslocalización π -electrónica. Como consecuencia, el espectro electrónico se ve

muy poco alterado con respecto al de la PM o PMP, lo que ha supuesto una importante dificultad metodológica en su estudio.

Felty y Leussing [FELTY, 1974] determinaron la constante de equilibrio correspondiente a la formación de la BS entre la especie PMP^{3-} y el piruvato ($K_{BS} = 12,6 \text{ M}^{-1}$). Posteriormente, otros autores estudiaron el efecto del pH sobre las constantes de equilibrio de formación de BSs de la PM, ya que este factor condiciona la existencia de las diferentes especies iónicas de la PM o PMP en disolución, y también modifica la proporción de grupo carbonílico reactivo. En el estudio de la reacción entre la PM y el ácido 3-metil-2-oxobutanodioico se demostró que a pH inferior a 2 la formación de la BS es prácticamente inexistente debido a la completa protonación de la PM, siendo aproximadamente 9 el pH óptimo para la formación de la cetimina, obteniendo un valor de la constante de equilibrio de 7 M^{-1} [KUBALA, 1983].

En el esquema 1.11 se muestran los equilibrios de tautomerización cetimina-aldimina en las BSs de PMP [YUEN, 1985]. Si la BS se encuentra desprotonada el equilibrio se desplaza hacia la cetimina, mientras que si se presenta la forma monoprotonada el equilibrio se desplaza hacia la aldimina.



Esquema 1.11. Equilibrios de isomerización entre la aldimina y su cetimina.

Voziyan y cols. [VOZIYAN, 2002] demostraron que la PM es capaz de reaccionar con los productos de la glicación no enzimática, como el glioxal (GO), el metilglioxal (MGO) y el glicolaldehído (GLA). El mecanismo de estas reacciones se inicia mediante el ataque nucleófilo de la amina sobre el carbonilo formando una CA que se deshidrata para dar una BS. En el caso de la reacción del GO con la PM la BS evoluciona formando un compuesto hemiaminal cíclico (HE) como resultado del ataque nucleófilo del fenolato sobre el enlace imínico (estructura HE-GOPM en la figura 1.13). La condensación de dos moléculas de HE-GOPM da lugar al GOPM. En la reacción entre el GLA y la PM se forma el GLAPM como producto final. En la figura

1.13 también se muestra la estructura del MGOPM, caracterizada por Nagaraj y cols. como producto final de la reacción entre la PM y el MGO [NAGARAJ, 2002].

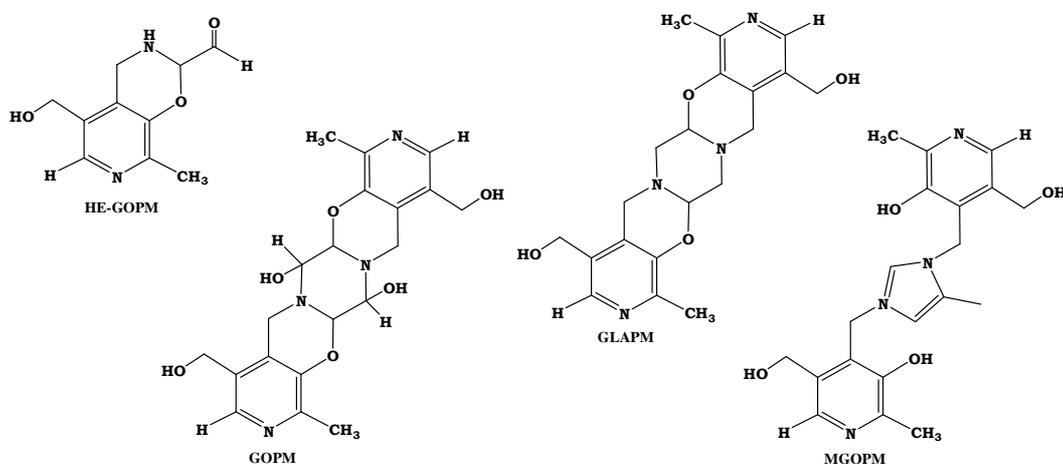


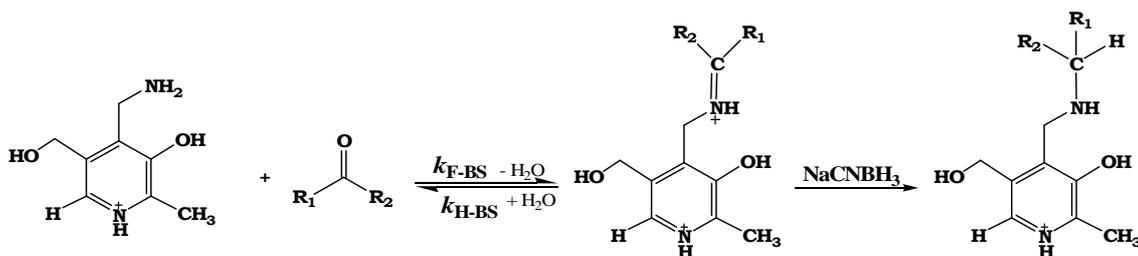
Figura 1.13. Estructura del HE-GOPM, el GOPM, el GLAPM y del MGOPM.

Recientemente, Adrover y cols. han demostrado que también se forma un compuesto HE en la reacción de la PM con el formaldehído (FA), el propanal y el ácido pirúvico, demostrando mediante cálculos teóricos que el compuesto HE es más estable que la imina. En el estudio también se determina el valor de alguna de las constantes de equilibrio entre los reactivos y la CA, la BS y el compuesto HE y se comprueba que la metilación del fenolato piridínico, asociada a la formación del HE, provoca cambios en la distribución electrónica del anillo piridínico que modifica el espectro de la PM [ADROVER, 2009B].

Las primeras constantes cinéticas de formación e hidrólisis de BSs de PM se obtuvieron en el estudio de su reacción en condiciones fisiológicas con hexosas y pentosas (compuestos carbonílicos que inician la glicación no enzimática al reaccionar con los grupos amino de biomoléculas [DYER, 1991]). Los valores de k_{F-BS} están comprendidos entre $6 \cdot 10^4$ y $1,5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ h}^{-1}$, mientras que la k_{H-BS} presenta valores entre 1 y 25 h^{-1} . Para ambas constantes se han obtenido valores del mismo orden de magnitud que para la reacción del PLP con aminoácidos. De igual manera que en los casos anteriores, la BS no es el producto final, sino que se encuentra en equilibrio con el compuesto HE, además de que ambos compuestos evolucionan dando como productos finales el PL, la PN y el PA, entre otros [ADROVER, 2005, 2007].

La dificultad experimental de detectar las BSs de PM ha hecho que se utilice NaCNBH_3 para analizar su formación. Como se ve en el esquema 1.12, el NaCNBH_3 reduce selectivamente el enlace imina a pH neutro sin afectar a los grupos carbonilo, formando irreversiblemente una amina secundaria, llamada BS reducida (redSB) [BORCH, 1971]. Las redSBs fueron los únicos compuestos detectados como producto de las reacciones de la PM con aldehídos y cetonas. Los valores de k_{F-BS} obtenidos para las cetonas ($k_{F-BS} = 5 \cdot 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ h}^{-1}$) son de 3 a 6 órdenes de

magnitud inferiores que las constantes obtenidas para los aldehídos ($k_{F-BS} = 3 \cdot 10^4 - 2 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ h}^{-1}$), como consecuencia de la menor reactividad del grupo carbonilo de las cetonas. La forma reactiva de la PM a pH neutro presenta su grupo amina desprotonado y su grupo fenolato protonado, lo que favorece la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular que reduce la densidad de carga negativa del grupo amina primario, por lo que las constantes relativas (k_{obs}) para cetonas y aldehídos varían entre 1,5 y $600 \text{ M}^{-1} \text{ h}^{-1}$ [ADROVER, 2009A].



Esquema 1.12. Mecanismo de formación de una amina secundaria mediante reducción selectiva de la BS formada entre la PM y diferentes compuestos carbonílicos, los cuales definen los sustituyentes R_1 y R_2 .

Análogamente, se obtuvieron las constantes cinéticas de la reacción de la PM con modelos de compuestos de Amadori, obteniendo valores muy inferiores a los determinados anteriormente, lo que es clara evidencia de que la PM no inhibe por esta vía las reacciones post-Amadori. El efecto inhibitor de la PM sobre los compuestos de Amadori se basa en la complejación de los iones metálicos que catalizan las reacciones de oxidación de post-Amadori [ADROVER, 2008A].

Se ha estudiado la formación de complejos entre la PM o el PMP con metales divalentes (Zn^{2+} y Cu^{2+}) con índice de coordinación 2:1, siendo el grupo fenolato en 3 y amino en 4' los sitios de coordinación [FRANKLIN, 1980A]. Se ha calculado la constante de equilibrio del complejo formado entre la PM y el Zn^{2+} , obteniendo un valor de $\log K_{eq} = 3,4$ [ADROVER, 2008A]. En el caso de la PM con Cu^{2+} se generan complejos con geometría plana cuadrada mediante la participación de dos ligandos PM (figura 1.14) [ORTEGA-CASTRO, 2009]; mientras que con Fe^{3+} se forman complejos $[\text{Fe}(\text{PM})_3]$ de geometría octaédrica distorsionada [ORTEGA-CASTRO, 2012]. Las BSs de PMP también son capaces de formar complejos con iones metálicos, con índice de coordinación 2:1 (figura 1.14). Se ha tabulado la constante de equilibrio de complejación de la BS de PMP–piruvato (especie totalmente desprotonada) con Zn^{2+} , obteniendo un valor de $\log K_{eq} = 6,6$ [FELTY, 1974]. Gunther y cols. detectaron que los complejos de $\text{Zn} \cdot \text{PM} \cdot \text{Piruvato}$ y de $\text{Cu} \cdot \text{PM} \cdot \text{Piruvato}$ evolucionan gradualmente hacia los correspondientes complejos metálicos de $\text{PL} \cdot \text{Ala}$, evidenciando por tanto su mayor estabilidad en disolución acuosa [EICHHORN, 1954].

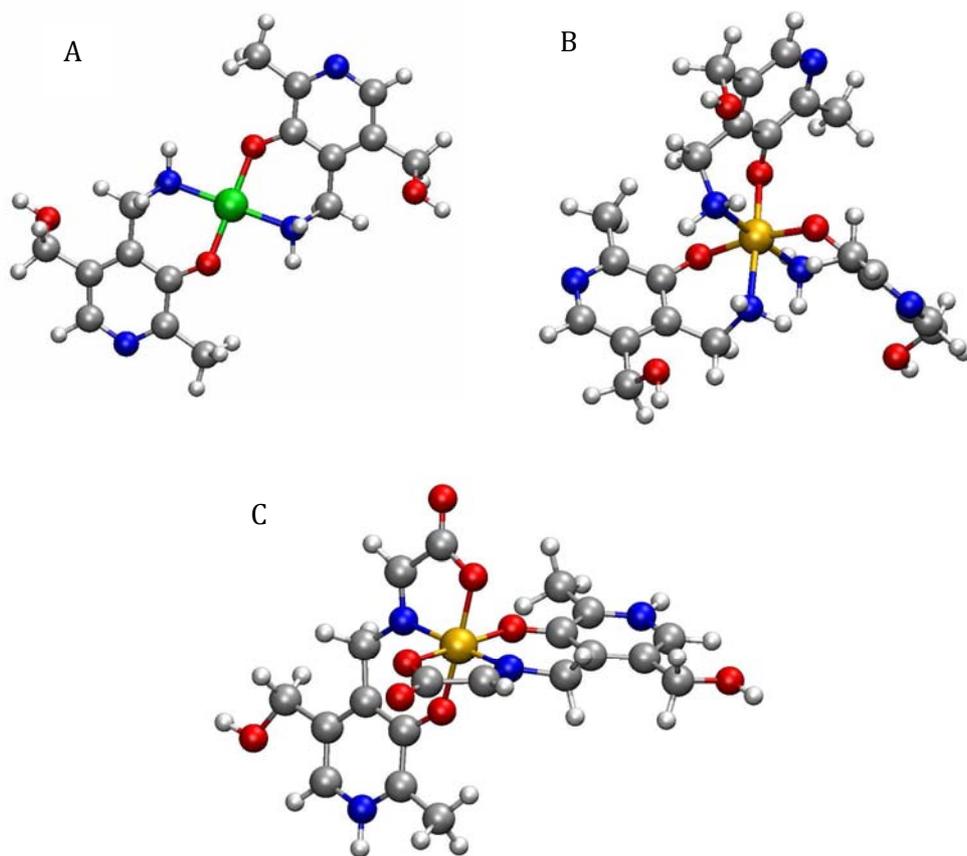


Figura 1.14. A) Complejo de la PM con Cu^{2+} (2:1) con geometría plana cuadrada. B) Complejo de la PM con Fe^{3+} (3:1) con geometría octaédrica. C) Complejo de la BS de PM–Piruvato con índice de coordinación 2:1.

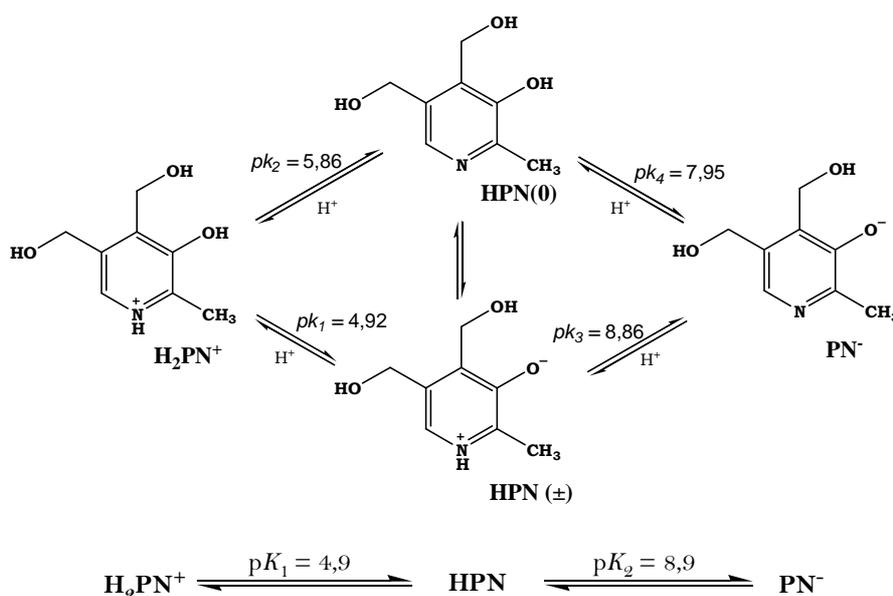
1.3. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE LA VITAMINA B₆ Y SUS BASES DE SCHIFF

1.3.1. EQUILIBRIOS DE IONIZACIÓN, TAUTOMERIZACIÓN E HIDRATACIÓN

Cada uno de los vitámeros B₆ y, a su vez, sus BSs derivadas presentan en su estructura varios grupos funcionales que pueden adoptar diferentes estados de ionización (ver figura 1.1): el grupo fosfato, el nitrógeno piridínico, el fenol, el grupo amina y el aldehído, que puede estar en forma de aldehído libre o hidratado. Por tanto, existe un amplio número de diferentes formas iónicas y tautoméricas dependientes del pH y de la polaridad del medio, lo que condiciona en gran medida su actividad biológica.

▪ **PN y PNP.** En el esquema 1.13 se muestran los equilibrios iónicos y tautoméricos de la PN. La desprotonación de la forma ácida (H₂PN⁺) conduce a la forma iónica HPN que presenta un equilibrio tautomérico entre la estructura en su forma fenólica (HPN(0)) y la estructura con el protón unido al nitrógeno piridínico (HPN(±)). La constante de tautomería tiene un valor de 8,13, por lo que la forma HPN(±) es la mayoritaria con un 90 % del total en disolución acuosa. También, se han calculado las microconstantes de ionización que se indican en el esquema con un método de valoración espectrofotométrica con múltiples longitudes de onda [TAKÁCS-NOVÁK, 2000]. En el esquema aparecen los valores de pK_a macroscópicos, siendo la especie PN⁻ la más básica.

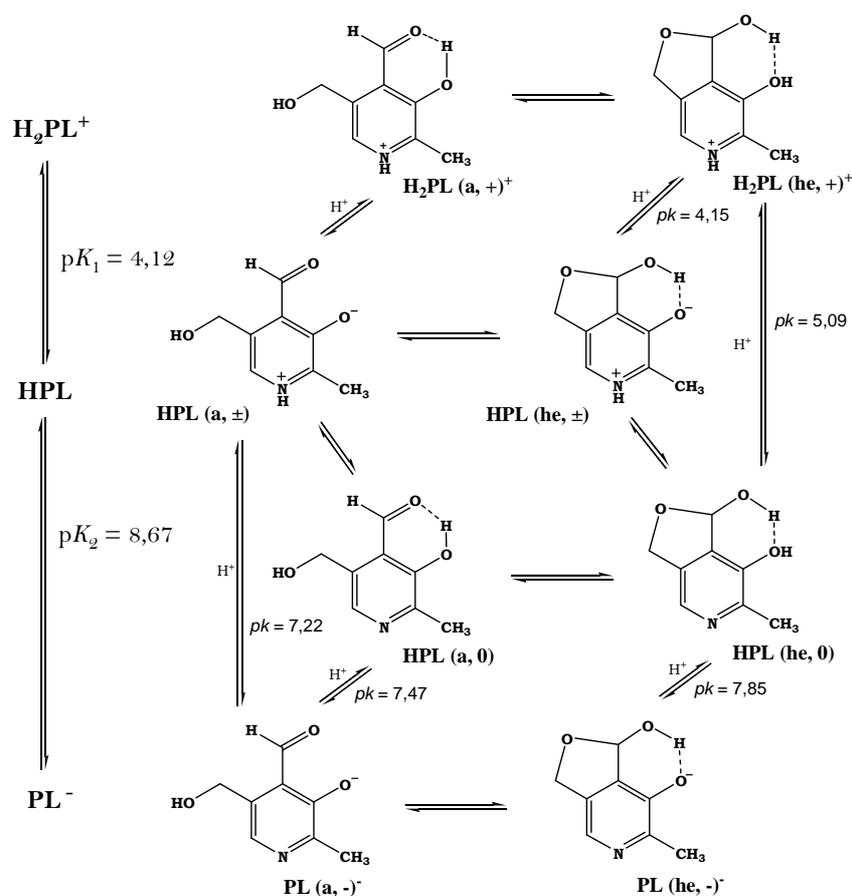
La PNP presenta las mismas especies iónicas que la PN, además de las correspondientes a la ionización de su grupo fosfato; siendo sus valores de pK_a: 1,2, 5,0, 5,8 y 9,4 [BAZHULINA, 1966].



Esquema 1.13. Especies iónicas y tautoméricas del PN en disolución [METZLER, 1973].

▪ **PL.** El grupo en la posición 4 del PL puede existir en disolución acuosa en alguna de estas tres formas diferentes: como un aldehído, como forma hidratada y como forma hemiacetal obtenida por la reacción intramolecular con el grupo hidroximetilo en 5°. Estudios de RMN han mostrado que la proporción de forma hidratada en disolución acuosa es despreciable en comparación con las formas hemiacetálicas [KORYTNYK, 1963], por lo que no se han considerado los equilibrios de hidratación en el esquema 1.14.

La especie catiónica H_2PL^+ presenta un equilibrio entre la forma hemiacetal y aldehídica; no obstante, ésta última constituye menos del 5 % del total de la forma iónica. La especie HPL se forma al desprotonarse la especie catiónica, generando además un equilibrio tautomérico entre el nitrógeno piridínico y el fenol, tanto en la forma aldehídica como en la hemiacetálica. La suma de las formas $HPL(a, \pm)$ y $HPL(a, 0)$ representan el 8% del total de la especie HPL. La pérdida del segundo protón genera la especie aniónica PL^- , en la cual la forma aldehídica constituye un 15 % del total [HARRIS, 1976]. Los trabajos de Llor y cols. [LLOR, 2000] muestran una correlación entre el porcentaje de las formas hemiacetálicas del PL y la polaridad del medio, así como la determinación de algunas constantes de ionización microscópicas que se muestran en el esquema 1.14.



Esquema 1.14. Equilibrios ácido-base, tautomerización y hemiacetalización del PL en disolución. Las constantes de ionización fueron obtenidas a 30 °C [LLOR, 2000].

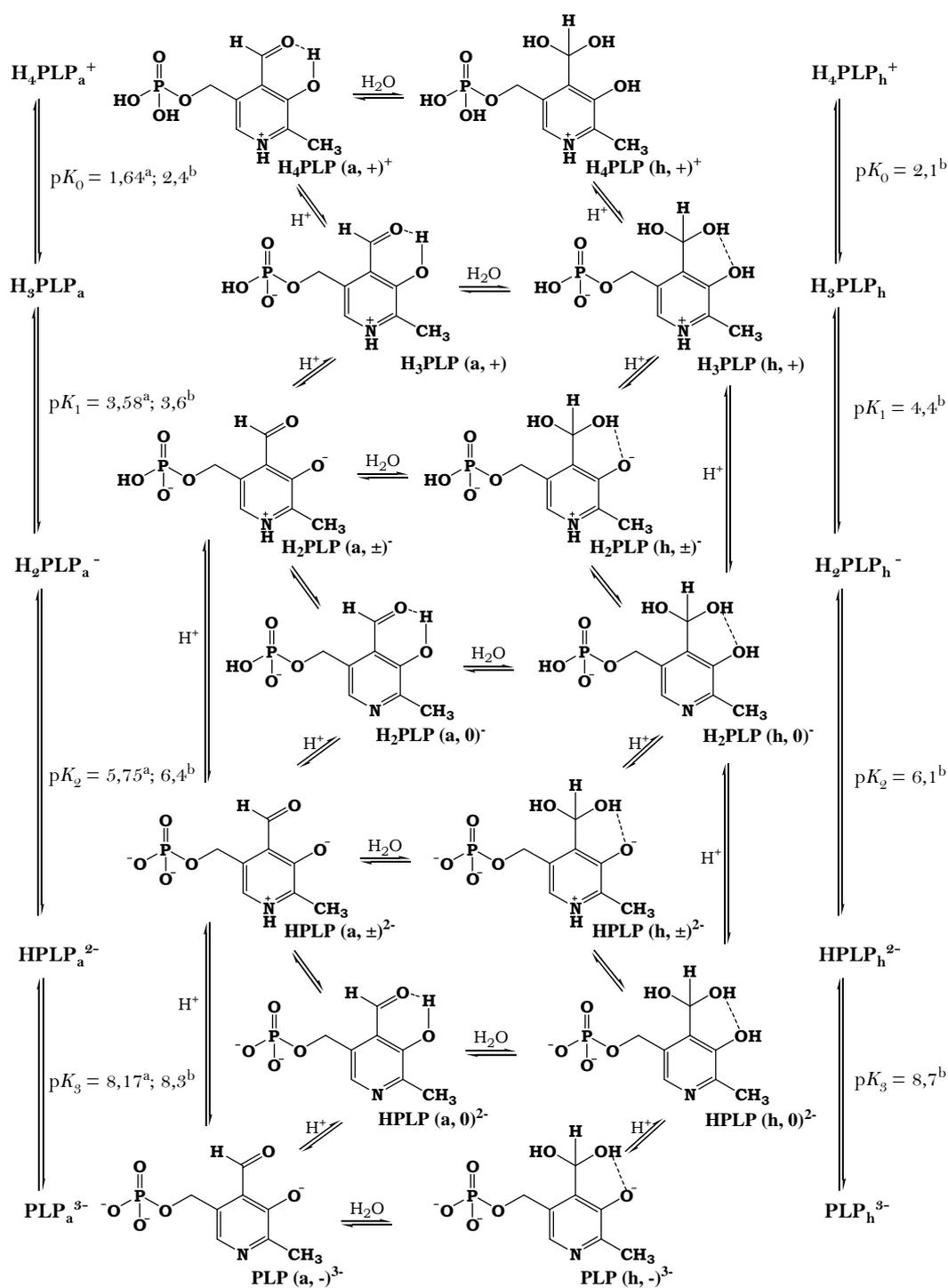
▪ **PLP.** En el esquema 1.15 se muestran los equilibrios del PLP en disolución, donde se observa que esta molécula tiene cinco estados de protonación. Los valores de pK_a han sido determinados a lo largo de los años usando diferentes técnicas: valoración potenciométrica [ANDERSON, 1964], UV-Vis [HARRIS, 1976], ^1H -RMN [KORYTNYK, 1970], ^{13}C -RMN [WITHERUP, 1975] y recientemente por ^{15}N -RMN [SHARIF, 2007].

Exceptuando la especie totalmente protonada (H_4PLP^+) y la totalmente desprotonada (PLP^{3-}), cada especie iónica presenta equilibrios tautoméricos y de hidratación del grupo aldehídico. La proporción de forma hidratada domina a pH ácidos, llegando a desplazar un 87 % el equilibrio en la especie totalmente protonada (H_4PLP^+). Este valor va disminuyendo hasta pH 4,2 donde la constante de equilibrio de hidratación ($K_h = [\text{hidratada}]/[\text{aldehídica}]$) vale uno [CHAN-HUOT, 2010A]. A partir de este pH la concentración de forma hidratada es menor que la aldehídica (a pH 7,4 hay solamente un 13 % del PLP en forma hidratada), llegando a ser despreciable a pH básico. La proporción de forma hidratada para el PL es mayor que para el PLP en todo el rango de pH, lo que indica que la presencia del grupo fosfato en 5' incrementa la concentración de forma aldehídica.

En el esquema 1.15 se indican los pK_a s macroscópicos de las formas aldehídicas (valores de la izquierda) y los de sus formas hidratadas (valores de la derecha). El primer protón que se elimina corresponde a un hidrógeno del fosfato, formando así la molécula H_3PLP . Al aumentar el pH la forma aldehídica pierde el segundo protón antes que la forma hidratada, lo que genera el ión H_2PLP^- . Este sistema presenta dos equilibrios tautoméricos entre las especies $\text{H}_2\text{PLP}(\text{a}, \pm)^-$ y $\text{H}_2\text{PLP}(\text{a}, 0)^-$, y otro entre las especies $\text{H}_2\text{PLP}(\text{h}, \pm)^-$ y $\text{H}_2\text{PLP}(\text{h}, 0)^-$. Para ambos casos, el tautómero mayoritario es el que presenta el nitrógeno piridínico protonado y el fenol desprotonado, aunque la constante de tautomería presenta un valor diferente para la forma aldehídica ($K = 0,4$) y la forma hidratada ($K = 0,06$). Esta diferencia puede entenderse en términos de fortaleza del enlace de hidrógeno intramolecular, que es mayor en la forma aldehídica por lo que presenta un mayor valor de constante de tautomería [CHAN-HUOT, 2010A].

La ionización del H_2PLP^- conduce a la formación de la especie iónica HPLP^{2-} que tiene el fosfato totalmente desprotonado y es la especie fisiológicamente más importante. Los valores de las constantes de tautomería de esta especie son iguales a los determinados para la especie H_2PLP^- , comentados anteriormente. Finalmente, la pérdida del último protón conduce a la formación de la especie más básica que contiene tres cargas negativas netas en su estructura (PLP^{3-}).

Llor y cols. [LLOR, 1988] mostraron que tanto los equilibrios de hidratación como los tautoméricos presentan una fuerte dependencia con la hidrofilia del medio, ya que tanto las formas hidratadas como las zwitteriónicas disminuyen su proporción con el descenso de la polaridad.

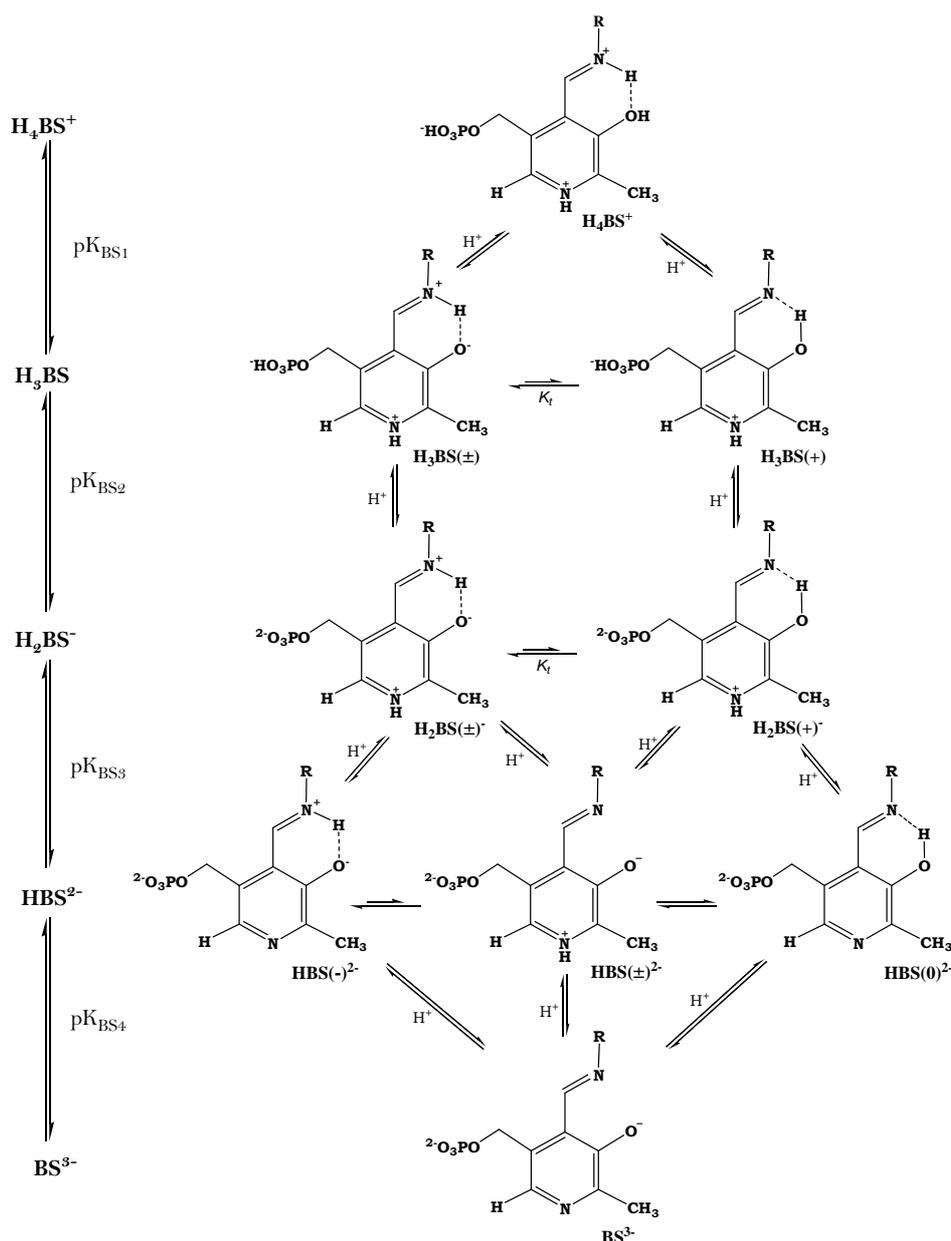


Esquema 1.15. Especies iónicas, tautoméricas e hidratadas del PLP en disolución.

^a[ANDERSON, 1964] ^b[CHAN-HUOT, 2010A].

▪ **Bases de Schiff de PL y PLP.** En el esquema 1.16 se muestran los equilibrios iónicos y tautoméricos de las BSs del PLP. Las BSs presentan tautomería cetoenólica debido a la presencia de los enlaces de hidrógeno intramoleculares OHN. En disolución acuosa se favorece la formación de la cetoenamina mientras que los disolventes no polares estabilizan la forma enolímica. Todas las constantes tautoméricas (K_t) son mayores que la unidad en disolventes

acuosos, valor que se incrementa a pH ácido debido a la protonación del N piridínico. Entre pH 4 y 10 el valor de K_t se mantiene prácticamente constante con valores entre 3 – 4 para la BS del N en α de la Lys, o valores mayores para compuestos con una basicidad mayor del átomo de nitrógeno [CHAN-HUOT, 2010B]. En el rango de pH entre 8 – 10 la BS presenta tres especies tautoméricas: $\text{HBS}(-)^{2-}$ (forma predominante), $\text{HBS}(\pm)^{2-}$ y $\text{HBS}(0)^{2-}$ [VÁZQUEZ, 1991B][VILANOVA, 2004].



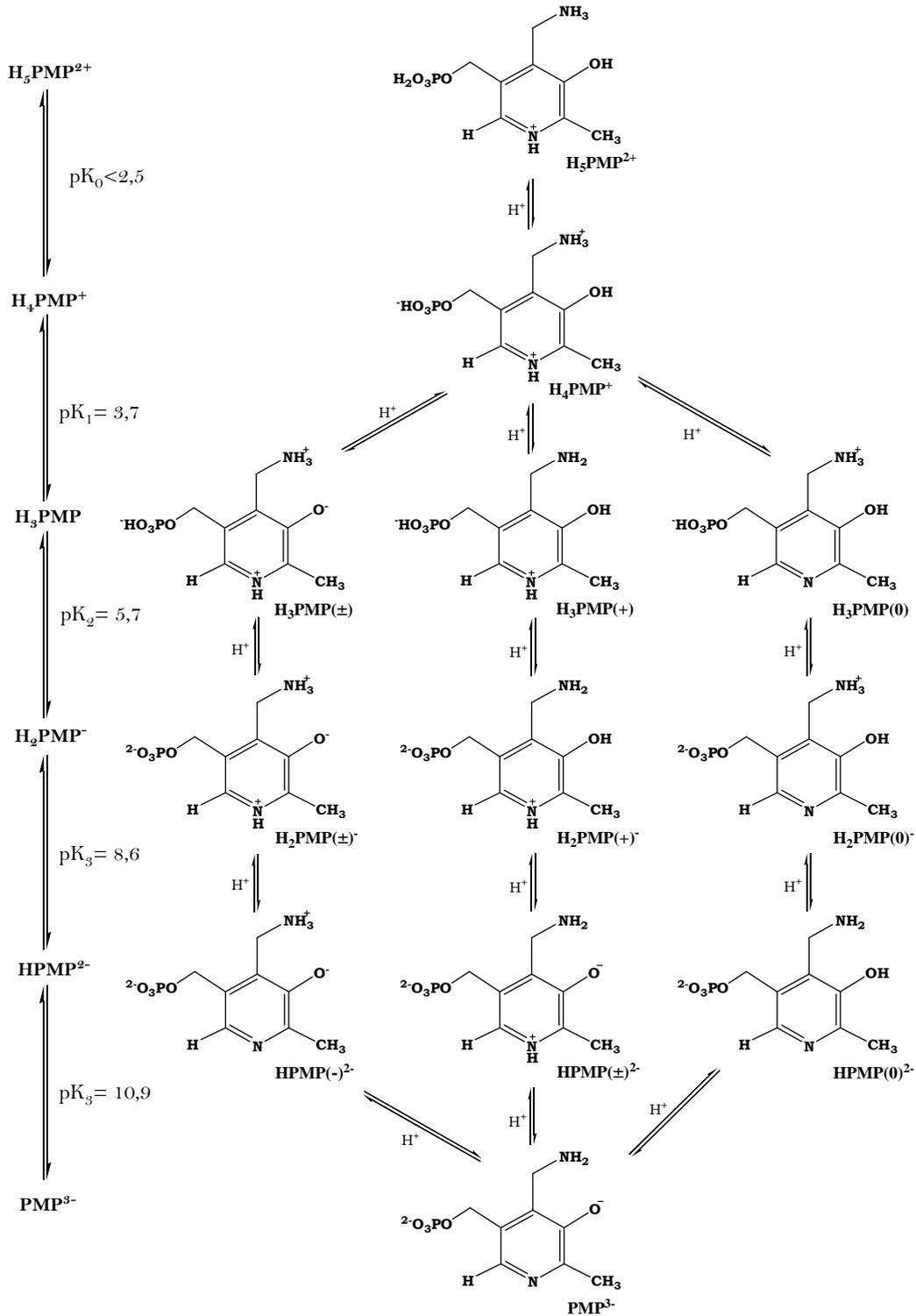
Esquema 1.16. Especies iónicas y tautoméricas de las BS formadas entre el PLP y un compuesto amínico cualquiera (R). Las flechas de equilibrio muestran la especie tautomérica mayoritaria en disolución acuosa, la forma cetoenamina.

Los valores de las constantes de ionización de las BSs derivadas del PLP con diferentes aminoácidos muestran que la cadena lateral apenas modifica su valor, obteniéndose los

siguientes valores promedio: $pK_{BS1} \approx 3$, $pK_{BS2} \approx 5,5$, $pK_{BS3} \approx 6,5$, $pK_{BS4} \approx 11,5$ [METZLER, 1980] [VÁZQUEZ, 1989, 1990A, 1992B, 1992D][ECHEVARRÍA, 2005][CHAN-HUOT, 2010A]. Para las BSs del PLP con aminas primarias que poseen cadenas laterales hidrofóbicas o para compuestos hidrazínicos se obtienen valores ligeramente diferentes: $pK_{BS1} \approx 3,5$, $pK_{BS2} \approx 6,0$, $pK_{BS3} \approx 7,5$, $pK_{BS4} \approx 11,0$ [VÁZQUEZ, 1992C][ECHEVARRÍA, 1999, 2000][SHARIF, 2007]. Finalmente, también se tienen datos de los pK_a 's de la BS entre el PLP y el ácido 2-aminofosfopropiónico: $pK_{BS1} \approx 6$, $pK_{BS2} \approx 6,7$, $pK_{BS3} \approx 8,1$, $pK_{BS4} \approx 12,6$ [SZPOGANICZ, 1984A].

Para las BSs del PL se pueden considerar prácticamente los mismos equilibrios iónicos y tautoméricos que para las BSs del PLP con la ausencia del grupo fosfato. Los valores de pK_a s de las diferentes especies iónicas de diversas BS de PL son bastante parecidos a los de las BSs de PLP. Por ejemplo, para las BSs con glicina son 3,0, 6,0 y 10,75 [VÁZQUEZ, 1989]. Recientemente, se ha determinado un pK_a de 10,5 para la BS del PL con la metilamina [SHARIF, 2007]. Para ambos casos, se observa una ligera disminución en el valor del pK_a del protón imínico respecto al determinado para las BSs del PLP.

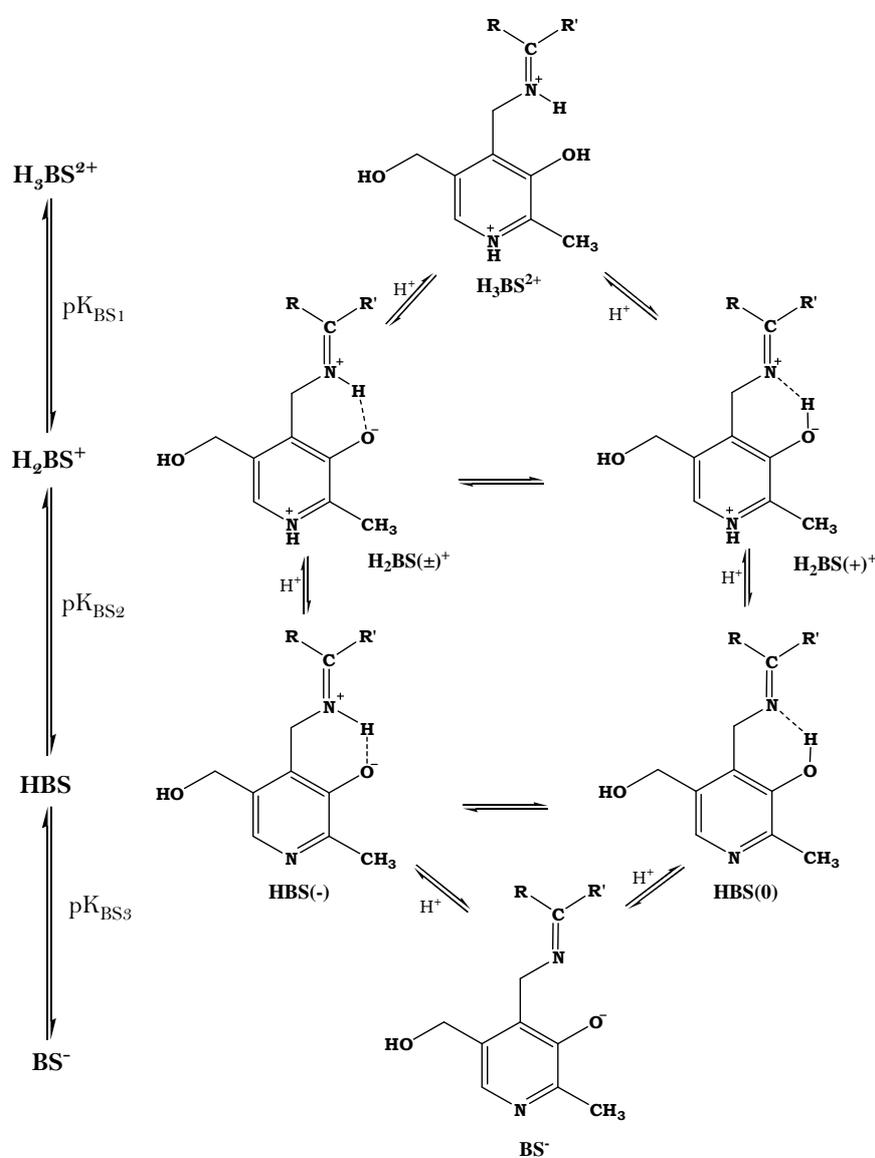
- **PM y PMP.** La presencia del grupo amina en la posición 4' confiere a la PMP el mayor número de grupos ionizables de todos los vitámeros B₆; los equilibrios iónicos y tautoméricos se muestran en el esquema 1.17. No se han realizado estudios para la determinación de las constantes de ionización de cada tautómero, por lo que los valores que se dan en el esquema hacen referencia a los pK_a s de la especie iónica total (pK_a macroscópico). La primera desprotonación corresponde a la pérdida del primer protón del grupo fosfato, cuyo pK_a se ha estimado inferior a 2,5. Entre pH 2,5 y 3,5 la especie iónica H_4PMP^+ es la mayoritaria, cuya ionización genera sucesivamente las especies H_3PMP , H_2PMP^- y $HPMP^{2-}$. La existencia de tantos tautómeros dificulta la asignación del orden de ionización. De hecho, la disociación del segundo hidrógeno del grupo fosfato puede ocurrir en una cierta extensión antes de que el fenol se ionice [METZLER, 1955]. Los zwitteriones $H_3PMP(\pm)$ y $H_2PMP(\pm)^-$ representan un 90 % del total de sus especies iónicas, mientras que la forma $HPMP(-)^{2-}$ representa el 85 % del total de su especie iónica [METZLER, 1973][CHRISTEN, 1985]. Finalmente, la especie totalmente desprotonada PMP^{3-} presenta una constante de ionización relativamente alta, lo que sugiere la existencia de un fuerte enlace de hidrógeno entre el fenolato y la amina, y/o que el anillo aromático es un buen donador de electrones [DOLPHIN, 1986]. La PM presenta básicamente los mismos equilibrios iónicos y tautoméricos que la PMP, con constantes de ionización de 3,5, 8,1 y 10,4 [METZLER, 1973]. La especie catiónica de la PM (H_3PM^{2+}) tiene un valor de pK_a casi una unidad menor que la especie catiónica del PL (H_2PL^+), lo que indica que la PM es más ácida debido a la carga positiva adicional de la amina primaria cercana al fenol.



Esquema 1.17. Especies iónicas y tautoméricas del PMP en disolución [METZLER, 1973].

▪ **Bases de Schiff de PM y PMP.** En el esquema 1.18 se presentan las diferentes especies iónicas de la BS de la PM, suponiendo un esquema similar para las BSs de PMP. La especie H_3BS^{2+} es la forma más ácida, que se desprotona generando la especie H_2BS^+ , la cual presenta un equilibrio tautomérico entre las formas $H_2BS(\pm)^+$ y $H_2BS(+)^+$. La forma $HBS(-)$ tiene el N

piridínico desprotonado, lo que implica una menor estabilización de la carga negativa del fenolato (respecto a la forma $H_2BS(\pm)^+$), induciendo de este modo una mayor fortaleza del enlace de hidrógeno entre el fenolato y el hidrógeno imínico. Se ha sugerido que este cambio en las interacciones intramoleculares puede favorecer el desplazamiento del protón desde la imina al fenolato, formando una nueva microespecie $HBS(0)$ en equilibrio tautomérico con $HBS(-)$. A pH superior a 11 la especie predominante es la BS^- , la cual es relativamente inestable y susceptible de sufrir hidrólisis por catálisis básica, lo que resulta en una disminución de la formación de la BS [KUBALA, 1983]. Banks y cols. determinaron las constantes de ionización de la BS formadas entre la PM y el ácido pirúvico, estimando los valores de $pK_{BS2} = 6,9$ y $pK_{BS3} = 10,3$ [BANKS, 1961].



Esquema 1.18. Especies iónicas de las BS de PM en disolución formadas con cetonas o con compuestos aldehídicos ($R' = H$). La forma tautomérica $HBS(0)$, aunque sea una forma minoritaria influye considerablemente en su reactividad y propiedades [KUBALA, 1983].

1.3.2. PROPIEDADES ESPECTROSCÓPICAS

La importancia química y biológica de los vitámeros B₆ y de sus derivados han impulsado importantes estudios sobre diversas propiedades espectroscópicas de estas moléculas, identificándose señales inequívocas para detectar su presencia y seguir su evolución. En los puntos siguientes se hace una pequeña revisión de las más importantes.

1.3.2.1. Espectroscopia UV-Visible de absorción

Entre las décadas de 1950 y 1990 se publicaron muchos estudios de la absorbancia de los vitámeros B₆ y de una variedad de análogos, en los cuales se estableció que sus espectros son pH-dependientes, lo que facilitó la determinación de algunas de sus constantes de ionización y de tautomería (apartado 1.3.1) [METZLER, 1955][ANDERSON, 1964][BAZHULINA, 1966][METZLER, 1973][HARRIS, 1976][METZLER, 1980][VÁZQUEZ, 1989, 1992B].

Los vitámeros B₆ presentan importantes bandas de absorción situadas en el intervalo de 200 a 400 nm. La posición e intensidad de estas bandas dependen de la naturaleza de los sustituyentes en 4 y 5' y de los estados de protonación de los grupos ionizables [FUMINORI, 1973] [MOROZOV, 1966], que dependen a su vez del pH y de la polaridad del medio. Como se ha indicado en el apartado anterior, en disolución acuosa, la vitamina B₆ se presenta mayoritariamente en sus formas zwitteriónicas. Su máximo de absorción se sitúa en torno a 320 nm a pH neutro, excepto en el PLP que lo presenta a 390 nm (tabla 1.1 y 1.2). La polaridad del medio altera los equilibrios tautoméricos, hemiacetálicos o de hidratación, modificando de manera importante la posición de los máximos de absorción. Los estudios de Metzler y cols. [METZLER, 1973] indican también que un aumento de la temperatura incrementa la anchura de las bandas espectroscópicas, aunque no influye en su posición.

Tabla 1.1. Longitud de onda de los máximos de absorción de las formas iónicas y tautoméricas del PL, PM y PN a 25 °C.

PL ^{a, b}		PM ^{a, c}		PN ^a	
Especies	λ (nm)	Especies	λ (nm)	Especies	λ (nm)
H ₂ PL (a, +) ⁺	320	H ₃ PM (+) ²⁺	292	H ₂ PN ⁺	291
H ₂ PL (he, +) ⁺	288	H ₂ PM(±) ⁺	325	HPN(±)	324, 254
HPL (a, ±)	386	H ₂ PM(+) ⁺	294	HPN(0)	292
HPL (he, ±)	316	H ₂ PM(0) ⁺	277	PN ⁻	308
HPL (a, 0)	298	HPM(-)	309		
HPL (he, 0)	276	HPM(±)	323		
PL (a, -) ⁻	391	HPM(0)	283		
PL (he, -) ⁻	301	PM(-) ⁻	308		

^a[METZLER, 1973] ^b[HARRIS, 1976] ^c[VILANOVA, 2004]

Tabla 1.2. Longitud de onda de los máximos de absorción de las formas iónicas y tautoméricas del PLP y PMP a 25 °C.

PLP ^{a, b, c}		PMP ^a	
Especies	λ (nm)	Especies	λ (nm)
H ₃ PLP(a,+)	336, 253	H ₄ PMP(+) ⁺	294
H ₃ PLP(h,+)	294	H ₃ PMP(\pm)	326
H ₂ PLP(a, \pm) ⁻	390, 273	H ₃ PMP(+)	292
H ₂ PLP(h, \pm) ⁻	321, 250	H ₃ PMP(0)	280
H ₂ PLP(a, 0) ⁻	351, 250	H ₂ PMP(\pm) ⁻	n. d.
H ₂ PLP(h, 0) ⁻	n. d.	H ₂ PMP(+) ⁻	n. d.
HPLP(a, \pm) ²⁻	390, 270	H ₂ PMP(0) ⁻	n. d.
HPLP(h, \pm) ²⁻	320, 250	HPMP(-) ²⁻	307
HPLP(a, 0) ²⁻	351, 245	HPMP(\pm) ²⁻	315
HPLP(h, 0) ²⁻	n. d.	HPMP(0) ²⁻	285
PLP(a,-) ³⁻	389, 260, 228	PMP ³⁻	307
PLP(h,-) ³⁻	302, 239		

^a[METZLER, 1973] ^b[HARRIS, 1976] ^c[VILANOVA, 2004]

Los espectros globales de absorción UV-Visible de cada especie iónica en cada vitámero B₆ representan la superposición de bandas de absorción solapadas que corresponden a diferentes tránsitos electrónicos. Metzler y cols. [METZLER, 1973] y Harris y cols. [HARRIS, 1976] comprobaron que cada banda individual se puede ajustar muy bien a una curva tipo log-normal, la cual se define con los parámetros de posición del máximo ($\bar{\nu}_0$), anchura de la banda en la mitad de la intensidad (W) y asimetría (ρ). Si coexisten diferentes tautómeros en disolución se pueden separar espectrofotométricamente, ya que el espectro de cada tautómero difiere significativamente en los valores de amplitud y asimetría. En sistemas muy complejos es necesario conocer el número de bandas posibles y una estimación aproximada de los parámetros de estas bandas, lo que se puede obtener a partir de cálculos cuánticos.

Se han utilizado diversas metodologías de Química Cuántica para el cálculo de las energías de las transiciones electrónicas en este tipo de moléculas y la descripción de sus espectros UV-Visible. Las geometrías, las energías en los estados electrónicos excitados y los espectros de UV-Visible fueron simulados inicialmente para la piridina [CAI, 2000][CAI, 2002] y fenoles sustituidos [ZHANG, 2006] aplicando diversas técnicas computacionales para cada molécula. Entre ellos, el método CASPT2 (*complete active space with second-order perturbation*), utilizado también en el estudio de los estados electrónicos excitados en bencenos monosustituidos [ANTOL, 2003], da buenos resultados en el cálculo de las energías de excitación electrónica [FINLEY, 1998][CRESPO, 2000][FANTACCI, 2004]. Mientras que una combinación del método CIS (*configuration interaction singles*) y de los cálculos Hartree-Fock (método HF-CIS) facilitan una simulación más precisa de las energías y las geometrías para los estados excitados

[ANDREU, 2001][CASH, 2005][SUN, 2006]. El método EOM-CC (*equation-of-motion coupled cluster*) ha surgido como una técnica potente para realizar este tipo de cálculos [KORONA, 2003]. Sin embargo, debido al alto coste computacional, la aplicación de estos métodos está limitada a sistemas con un número pequeño de electrones.

La teoría del funcional de la densidad dependiente del tiempo (TD-DFT) [STRATMANN, 1998] es una alternativa a los cálculos *ab initio* ya que se asemejan en precisión pero son mejores en coste computacional [SOBOLEWSKI, 2002][DEDONDER-LARDEUX, 2003][JACQUEMIN, 2007]. No obstante, los cálculos TD-DFT dependen en gran medida del potencial de correlación – intercambio utilizado en cada caso [ANDREU, 2001][PREAT, 2005]. Esta técnica se ha utilizado en la simulación de las energías de excitación para un conjunto de 4-nitropiridinas, examinando el efecto de la polaridad del disolvente en la excitación electrónica [LORENC, 2004][LORENC, 2005], y de la transferencia protónica intramolecular en el estado excitado del ácido salicílico y sus análogos [JANG, 2007].

Recientemente, se han aplicado los cálculos TD-DFT al estudio de la PM [ADROVER, 2012] y de tres modelos de los vitámeros B₆ simplificados estructuralmente: la 4-aminometilpiridina [ADROVER, 2010A], la 2-hidroxibencilamina [ADROVER, 2010B] y la 3-hidroxipiridina [ADROVER, 2012], con la finalidad de caracterizar sus especies iónicas y tautoméricas. La comparación de los resultados teóricos con los experimentales demuestra que el método TD-DFT se puede utilizar en la predicción y asignación de transiciones electrónicas. En sus resultados se ha observado que la desprotonación del fenol disminuye $\bar{\nu}_0$, mientras que la desprotonación del grupo metilamino y del nitrógeno piridínico no tienen ningún efecto sobre $\bar{\nu}_0$. Sin embargo, la presencia simultánea del N piridínico desprotonado y el fenol incrementa el valor de $\bar{\nu}_0$. Los estados de protonación de los grupos iónicos de la PM influyen en su red de enlaces de hidrógeno intramoleculares y la protonación del N piridínico afecta a su fortaleza.

1.3.2.2. Espectroscopia UV-Visible de emisión. Fluorescencia

En 1966 Bridges y cols. [BRIDGES, 1966] determinaron las características fluorescentes de los derivados de la vitamina B₆ (tabla 1.3). La PM y el PA son los cromóforos más eficientes, con el mayor rendimiento cuántico y tiempo de vida de fluorescencia. En general, la forma iónica menos fluorescente es la catiónica, y la más fluorescente es la aniónica, excepto para la PN en la que la forma zwitteriónica es la más fluorescente. Los máximos de excitación están en torno a 300 nm para las formas catiónicas y neutras, mientras que para las formas zwitteriónicas y aniónicas se desplazan hasta unos 330 nm. Los máximos de emisión se sitúan sobre los 350 nm para las especies catiónicas y neutras, y en torno a 400 nm para las zwitteriónicas y las aniónicas.

Tabla 1.3. Longitudes de onda de los máximos de absorción, excitación y emisión de algunos vitámeros B₆ a 25 °C.

Compuesto	Especie Molecular	$\lambda_{\text{máx. absorción}}$ (nm)	$\lambda_{\text{máx. excitación}}$ (nm)	$\lambda_{\text{máx. emisión}}$ (nm)
PN	H ₂ PN ⁺	291	302	345
	HPN(±)	324	332	400
	HPN(0)	286	296	335
	PN ⁻	310	320	380
PM	H ₃ PM (+) ²⁺	292	306	350
	H ₂ PM(±) ⁺	326	337	400
	HPM(±)	-	-	Ninguna
	HPM(0)	287	309	361
	PM(-) ⁻	310	320	370
PL	H ₂ PL (he, +) ⁺	288	300	350
	HPL (he, ±)	317	330	382
	HPL (he, 0)	280	291	330
	PL (he, -) ⁻	302	310	365
PLP	H ₄ PLP(h,+) ⁺	291	302	385
	H ₃ PLP(h,+)	291	302	400
	H ₂ PLP(h, ±) ⁻	324	330	410
	HPLP(h, ±) ²⁻	324	330	400
	PLP(h,-) ³⁻	305	315	370

Estas propiedades fotofísicas hacen que estos compuestos sean muy adecuados como sondas fluorescentes biocompatibles. Fraikin y cols. encontraron que la excitación en el UV cercano (337 nm) aumenta la actividad catalítica en la 5'-hidroxitriptofano carboxilasa, una enzima PLP dependiente [FRAIKIN, 1989]. Estudios complementarios de Cornish y Ledbetter demostraron que la excitación a 500 nm del PLP en la aspartato aminotransferasa generaba el intermedio quinonoide [CORNISH, 1984]. Ambas observaciones ilustran el potencial de la utilización de las técnicas espectroscópicas ópticas para caracterizar las dinámicas de proteínas, que se centran en el mecanismo de la reacción de los complejos enzima-sustrato. Recientemente, su aplicación ha permitido el estudio de la interacción PLP-sustrato y de la estequiometría de unión entre el PLP y algunas enzimas [CHEUNG, 2003][MOMANY, 2004].

Mediante esta técnica se ha realizado un estudio en la escala de femtosegundos de las dinámicas de los estados excitados del PLP y de la BS PLP-valina en disolución, comprobando que no existe dependencia con la longitud de onda de excitación, lo que sugiere una rápida tautomerización (< 250 fs) entre la forma enolimina y la cetoenamina [HILL, 2008]. También, se ha estudiado por fluorescencia el proceso de transferencia electrónica entre la vitamina B₆ y las bases de ADN o aminoácidos [BUENO, 2010].

1.3.2.3. Procesos fotoinducidos

Numerosos estudios demuestran que la radiación UV-Visible es capaz de provocar diversas reacciones fotoinducidas, especialmente de fototautomería sobre compuestos aromáticos y derivados piridínicos [TAKEDA, 2004][GEREGA, 2006][FRUTOS, 2007]. Vilanova y cols. demostraron que la radiación electromagnética en el rango entre 200 y 220 nm (UV) producida por una lámpara de Xe (75 W) altera los equilibrios de hidratación y tautoméricos de la PM y el PLP. No obstante, la irradiación de estas disoluciones con luz de longitud de onda superior a 220 nm producida por una lámpara de D₂ (30 W), de Xe (75 W) o de wolframio (50 W) no afecta a estos equilibrios [VILANOVA, 2004].

Morozov y cols. estudiaron mediante cálculos teóricos la distribución de la carga π -electrónica en los estados fundamentales y excitados de la 3-hidroxipiridina y de BSs del PLP [MOROZOV, 1986]. Sus resultados demostraron que, en los estados excitados, el N piridínico y el C(6) incrementan notablemente su densidad electrónica con respecto al estado fundamental, mientras que el grupo fenolato la disminuye. Además, el reordenamiento electrónico sobre el C(6) es importante en las fotoreacciones, hasta el punto que su metilación las inhibe completamente. Estas observaciones explican la formación fotoinducida de dímeros y de epoxi-derivados entre el N(1) y el C(6), compuestos que han sido detectados experimentalmente [PFORDTE, 1961A, 1961B].

El C(4') disminuye su densidad electrónica en el estado excitado, constituyendo otro centro fotoreactivo que forma dímeros [MORRISON, 1958], especies quinonoides [HEINERT, 1959] y radicales libres (RL) [LEDBETTER, 1998], y se oxida a ácido piridóxico [REIBER, 1972]. Las fotoreacciones de las BSs del PLP son similares a las del PLP [BAZHULINA, 1974], observándose de manera adicional fotodescarboxilación [KURAUCHI, 1983].

Por otra parte, se ha comprobado que la radiación UV produce isomerización de la PN y la formación de oligómeros [BROUSMICHE, 1998][HARUO, 1999]. Bueno y Encinas demostraron que en el estado excitado el grupo fenolato de la PM incrementa su acidez, mientras que el N(1) incrementa su basicidad [BUENO, 2003].

1.3.2.4. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN)

La espectroscopia de RMN de ¹H y de ¹³C también se ha utilizado ampliamente para el estudio del comportamiento químico y biológico de los vitámeros B₆. Los desplazamientos químicos de las señales de ¹H para los diferentes vitámeros B₆ (tabla 1.4) fueron determinados a pH neutro por Korytnyk y Singh [KORYTNYK, 1963]. Según el vitámero estudiado, las señales presentan ligeras variaciones de posición. La señal correspondiente al H-C(2') aparece en el rango entre 2,4 y 2,5 ppm, la del H-C(5') lo hace en torno a 4,7 ppm y la del H-C(6) está sobre 7,6 – 7,7 ppm. Estos autores aportaron también los desplazamientos de las señales de los H-

C(4'). Para la PM o PMP dicha señal aparece a 4,3 ppm, mientras que para el PL o PLP lo hace en torno a 6,5 ppm en sus formas hemiacetálicas o hidratadas, y en torno a 10,4 ppm en sus formas aldehídicas.

Tabla 1.4. Desplazamientos de ¹H-RMN de los vitámeros B₆.

Compuesto	pD	H-C(2')	H-C(4')	H-C(5')	H-C(6)
PL(he) ^{a, c}	7,0	2,42	6,53	5,10	7,62
PLP(a) ^{a, c}	7,0	2,40	10,40	5,00	7,72
PM ^b	7,4	2,48	4,31	4,73	7,64
PMP ^a	7,0	2,41	4,27	4,87	7,60
PN ^a	7,0	2,38	4,76	4,65	7,60

^a[KORYTNYK, 1963] ^b[ADROVER, 2009B], datos obtenidos a 37 °C. ^cSe considera únicamente la forma hemiacetálica del PL y la forma aldehídica del PLP.

Los desplazamientos de ¹³C (tabla 1.5) fueron descritos para cada vitámero por Witherup y Abbott [WITHERUP, 1975]. El desplazamiento de la señal del C(2) se sitúa entre 135 y 155 ppm, la del C(2') lo hace entre 15 y 20 ppm, la del C(3) entre 150 y 170 ppm, la del C(4) entre 125 y 140 ppm, la del C(5) entre 130 y 150 ppm, la del C(5') en 60 ppm y entre 120 – 131 ppm la del C(6). El desplazamiento de la señal del C(4') es 196 ppm en las formas aldehídicas del PLP, 38 ppm en la PM y PMP y 58 ppm en la PN.

Tabla 1.5. Desplazamientos de ¹³C-RMN de los vitámeros B₆.

Compuesto	PL(he) ^{a, c}	PLP(a) ^{a, c}	PM ^b	PMP ^a	PN ^a
pD	2,0	6,8	7,4	7,1	9,9
C(2)	144,9	152,5	135,2	145,6	148,8
C(3)	149,9	165,6	165,5	163,6	161,2
C(4)	140,8	126,7	138,5	133,6	135,5
C(5)	139,2	137,2	147,5	135,6	134,1
C(6)	127,0	123,4	126,1	124,7	130,6
C(2')	15,8	17,1	17,8	16,6	18,6
C(4')	99,6	196,9	38,9	37,6	58,0
C(5')	71,2	62,8	61,7	63,0	60,3

^a[WITHERUP, 1975], datos obtenidos a 40 °C. ^b[ADROVER, 2009B], datos obtenidos a 37 °C. ^cSe considera únicamente la forma hemiacetálica del PL y la forma aldehídica del PLP.

La espectroscopia de RMN ha sido utilizada en la determinación de los valores de pK_a para los diferentes vitámeros B₆ [KORYTNYK, 1963][WITHERUP, 1975]. Recientemente, se ha usado una combinación de ¹³C y ¹⁵N – RMN para establecer el estado de protonación del PLP isotópicamente enriquecido en las posiciones C(4') y C(5'), por lo que se han podido medir los

espectros a pH inferior a 1 [SHARIF, 2007][CHAN-HUOT, 2010A]. También, se han estudiado con el método computacional GIAO (“*gauche including*” *atomic orbital*) [CHEESEMAN, 1996] los equilibrios tautoméricos de la PM. Los desplazamientos químicos calculados para cada forma de la PM dependen fuertemente de su estado de protonación y de los enlaces de hidrógeno intramoleculares presentes en la estructura [ADROVER, 2012].

La espectroscopia de ^{31}P -RMN ha sido utilizada para el estudio de las interacciones del grupo fosfato de las formas fosforiladas con enzimas [MARTÍNEZ-CARRIÓN, 1975][LACHMANN, 1984] y para la determinación de sus constantes de ionización [SCHNACKERZ, 1986].

1.3.2.5. Espectroscopia de absorción infrarroja (FTIR)

En la tabla 1.6 se dan los valores de las frecuencias de las bandas más características de los vitámeros B_6 [ANDERSON, 1964]. La espectroscopia FTIR se ha utilizado para la determinación del estado de ionización del grupo fosfato del PLP tanto en su forma libre [BARTL, 1998] como en entornos enzimáticos [SÁNCHEZ-RUIZ, 1991][MARTÍNEZ-LIARTE, 1992] y los valores de pK_a del PMP [SALVÀ, 2003B].

La técnica ha sido comúnmente utilizada en la caracterización de los complejos metálicos de vitámeros B_6 [FRANKLIN, 1980B][COLONNA, 1993][KNEZEVIC, 2003][MAURYA, 2006][ESHTEIAGH-HOSSEINI, 2011]. Recientemente, también se ha utilizado el FTIR en la determinación de la estructura tridimensional de la enzima PLP-dependiente D-Serina deshidratasa [BALDASSARRE, 2011, 2012].

Tabla 1.6. Posiciones de las bandas de FTIR en cm^{-1} de vitámeros B_6 [ANDERSON, 1964].

Compuesto	Fase	$\nu(\text{C}=\text{O})$	Anillo	Anillo	$\delta(\text{N}^+-\text{D})$	Anillo	$\nu(\text{C}-\text{O}^-)$	$\delta(\text{O}-\text{D})$
PL	KBr	1637	1554	-	1500	1450	-	1390
PL (pD 4,2)	D_2O	-	1585	-	1497	1470	-	1390
PLP	KBr	1645	1555	-	1505	-	1408	-
PLP (pD 7,7)	D_2O	1662	-	-	1492	1457	-	1390
PM	Nujol	-	1593	1548	1510	-	-	-

1.3.2.6. Otras propiedades espectroscópicas

Otras técnicas como la espectroscopia de masas, Raman o el dicroísmo circular también han sido utilizadas con éxito en el estudio del comportamiento químico y biológico de los vitámeros B_6 . Así, Cinta y cols. [CINTA, 1999] estudiaron la PN por espectroscopia Raman asignando sus bandas vibracionales; mientras que Benecky y cols. [BENECKY, 1985A] describieron los espectros de las BSs de PLP y de las enzimas PLP-dependientes [BENECKY, 1985B]. El dicroísmo circular ha constituido una excelente herramienta para el estudio del PLP y de sus

BSs en entornos enzimáticos [BALK, 1981][CASELLA, 1983][MOORE, 1995][JHEE, 2000][SINGH, 2007] [SAHA, 2009][LENDRIHAS, 2010].

Tryfiates recopiló los datos obtenidos en el estudio de los vitámeros B₆ y de las BSs del PLP por espectroscopia de masas [TRYFIATES, 1986]. Además, esta técnica ha resultado muy útil en la cuantificación de los vitámeros B₆ en muestras biológicas [HACHEY, 1985][JIANG, 2008][VAN DER HAM, 2012], y recientemente, en la determinación de los sitios de unión del PLP en enzimas [SIMON, 2009].

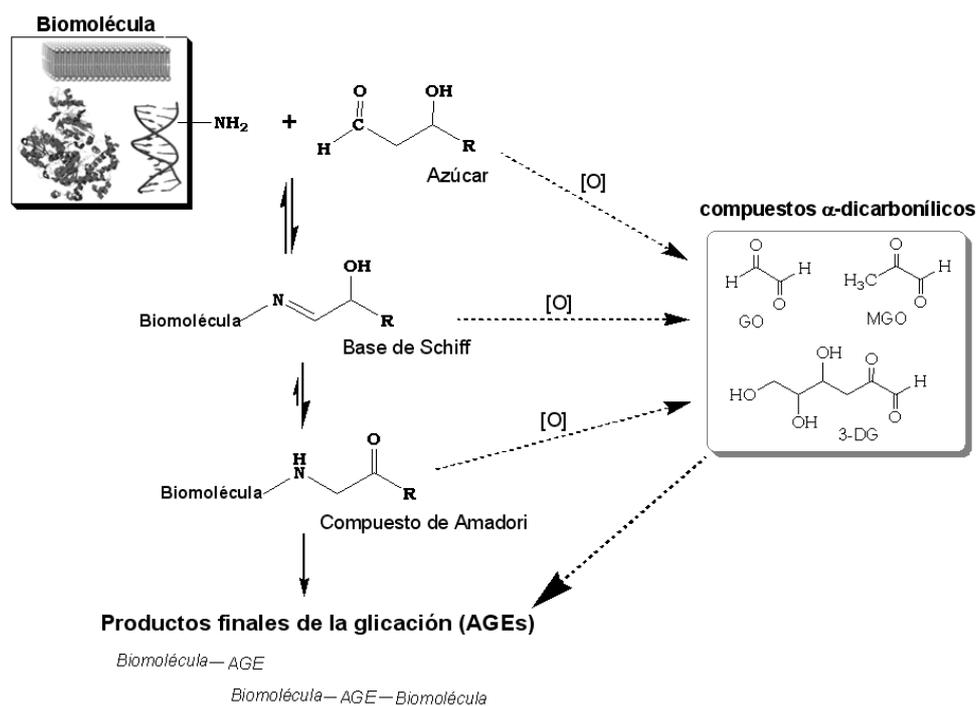
1.4. GLICACIÓN NO ENZIMÁTICA DE BIOMOLÉCULAS

La reacción entre grupos amina de biomoléculas y carbonilo de azúcares que tiene lugar en condiciones fisiológicas y sin control enzimático causa modificaciones estructurales y funcionales de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Este proceso químico se conoce como glicación no enzimática o reacción de Maillard, como reconocimiento a su descubridor [MAILLARD, 1912]. En los primeros años de investigación los esfuerzos se centraron en el estudio de esta reacción sobre los alimentos, observando que los productos mayoritarios son moléculas cíclicas y policíclicas que aportan sabor y aroma, aunque también pueden ser potencialmente cancerígenas [SKOG, 1998]. La importancia de la glicación en la salud humana cobró relevancia cuando en 1971 se evidenció que este tipo de reacciones también ocurren *in vivo* [TRIVELLI, 1971] y no sólo en los alimentos elaborados.

La glicación de biomoléculas es un factor clave en muchas patologías asociadas a la diabetes (nefropatía, retinopatía, enfermedades cardiovasculares, etc.), así como en el envejecimiento y otras enfermedades neurodegenerativas [THORPE, 1996][BROWNLEE, 2001]. En individuos diabéticos no controlados, la falta o los niveles bajos de insulina aumentan considerablemente los niveles de glucosa en sangre, lo que afecta irreversiblemente a la integridad de las proteínas de larga vida [FAN, 2009][MAILLARD-LEFEBVRE, 2009][ZHANG, 2011]. Las enfermedades neurodegenerativas, tales como el Alzheimer [MIMNA, 2007] o el Parkinson [XU, 2011], se relacionan con el plegamiento erróneo de proteínas y con los procesos de agregación y deposición de fibrillas de tipo amiloide, lo que podría ser consecuencia de la glicación no enzimática de las proteínas implicadas.

En el esquema 1.19 se muestra el mecanismo de la reacción de glicación que se inicia mediante una adición nucleófila de un grupo amino primario de una biomolécula sobre un grupo carbonílico de un azúcar reductor formando reversiblemente una BS. La formación de la BS ocurre en un período de horas, y posteriormente, se reordena para dar una cetoamina más estable o compuesto de Amadori (AP). Esta reacción sucede en un período de días y es un proceso prácticamente irreversible. A través de reacciones de oxidación y deshidratación, el AP se degrada formando una variedad de productos dicarbonílicos (GO, MGO y 3-desoxiglucosona, 3-DG) y los productos finales de la glicación avanzada (AGEs). Los compuestos dicarbonílicos actúan como propagadores de la reacción, siendo mucho más reactivos que los azúcares de los cuáles son derivados y volviendo a reaccionar con las biomoléculas generando más AGEs. Los AGEs tienen coloración amarillento-marronosa y son frecuentemente fluorescentes e insolubles. Se ha determinado la estructura de diversos AGEs, como la N-ε-(carboximetil)-lisina (CML), algunos hidroimidazoles y una variedad de estructuras entrecruzadas que involucran los residuos Lys-Lys o Lys-Arg [BAYNES, 2003].

La autooxidación de los productos de la glicación no enzimática conduce a la formación de especies oxigenadas reactivas, que causan la peroxidación de los ácidos grasos insaturados. De esta manera, se inician reacciones radicalarias que generan aldehídos y especies dicarbonílicas, como por ejemplo FA, hidroxialquenos, malondialdehído y GO, que también reaccionan con proteínas formando los productos finales de la oxidación lipídica (ALEs). Por tanto, la peroxidación lipídica también está involucrada en las patologías mencionadas anteriormente [NEGRE-SALVAYRE, 2008].



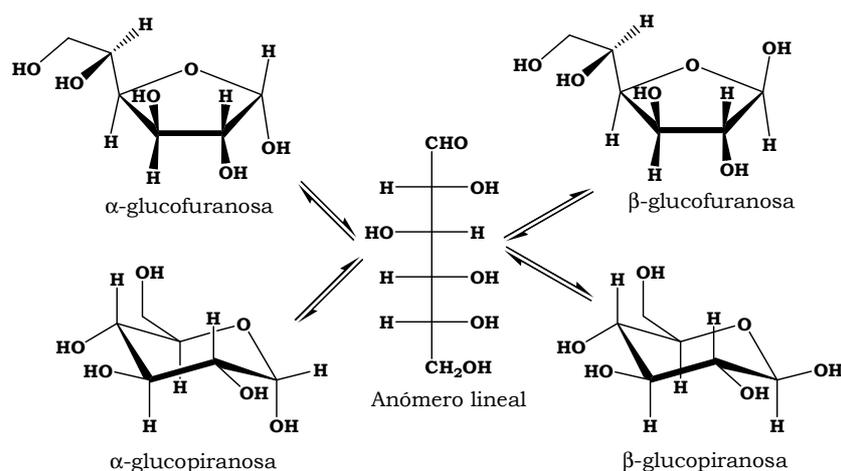
Esquema 1.19. Mecanismo de la glicación no enzimática de biomoléculas.

La glicación de proteínas ha sido y todavía es un tema muy estudiado; sin embargo, el conocimiento sobre la modificación lipídica debido a este tipo de reacciones es mucho menor. Este trabajo de tesis pretende contribuir a las investigaciones sobre la glicación de aminofosfolípidos realizadas desde 1993, año en que Bucala y cols. evidenciaron por primera vez la reacción *in vivo* entre la PE (fosfatidiletanolamina) y la glucosa [BUCALA, 1993].

1.4.1. COMPUESTOS RESPONSABLES DE LA GLICACIÓN

La glucosa es la fuente de energía de los organismos vivos, por lo que a través de la sangre llega a todas las células donde se metaboliza para formar ATP (glicólisis). En disolución acuosa, la glucosa presenta equilibrio entre su forma aldehídica y sus formas cíclicas (esquema 1.20), las cuales, a su vez, presentan equilibrios de mutarrotación entre sus formas α,β -piranosa y α,β -furanosa [PERLIN, 1966]. Dichos equilibrios se encuentran desplazados hacia las formas

cíclicas, representando la forma β -piranosa aproximadamente un 62% del total, la forma α -piranosa un 38%, mientras que los porcentajes correspondientes a las formas α - y β -furanosa son despreciables [ANGYAL, 1991]. El porcentaje de la forma aldehídica es únicamente un 0,002% del total [DWORKIN, 2000], siendo ésta la forma que reacciona con los grupos amina de las biomoléculas mediante glicación no enzimática. No obstante, la autooxidación de la glucosa genera nuevos compuestos que también están implicados en reacciones posteriores, por lo que se puede distinguir entre compuestos formados por glicación y otros por glicooxidación.

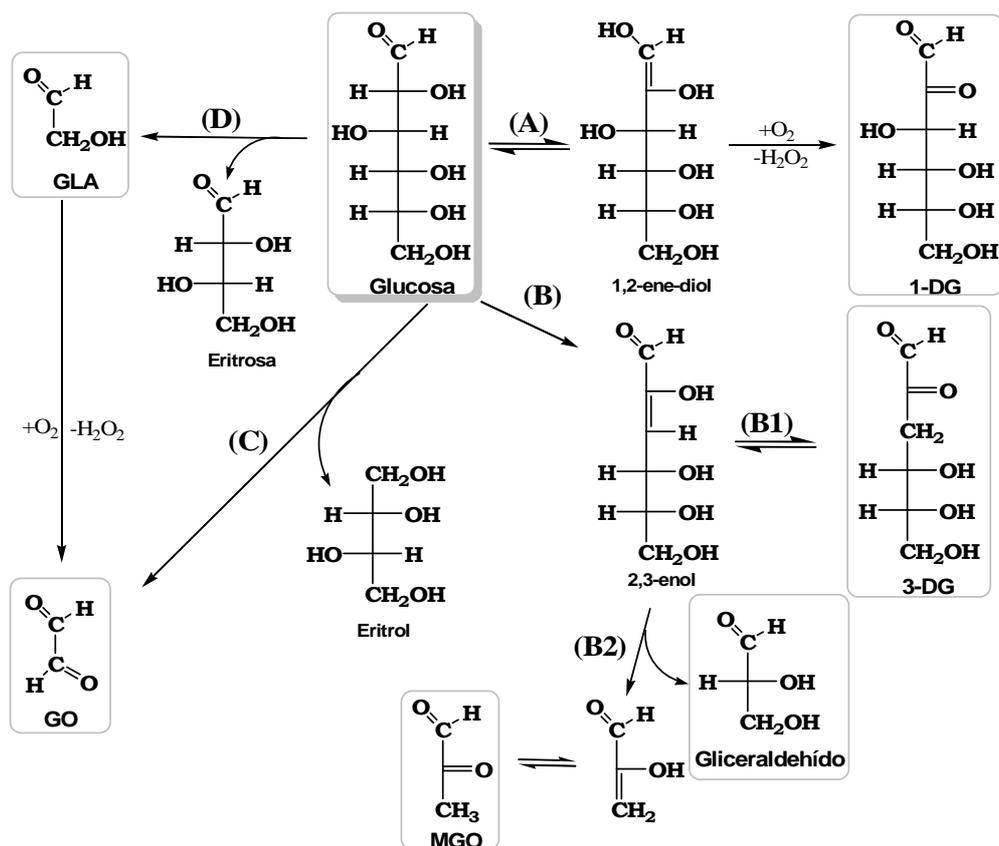


Esquema 1.20. Equilibrio entre las diferentes formas de la D-glucosa en disolución.

En condiciones fisiológicas, la glucosa presenta un $t_{1/2} \approx 950$ días, debido a las reacciones de degradación que se muestran en el esquema 1.21 [WELLS-KNECHT, 1995]. A partir de la desprotonación del C(2) de la glucosa con la subsiguiente oxidación del 1,2-enediol formado (reacción A) se obtiene la desoxiglucosona (1-DG). La formación de la 3-DG ($3 \cdot 10^{-7} \text{ h}^{-1}$) se inicia también mediante la desprotonación del C(2) de la glucosa, seguido de deshidratación y formación de un 2,3-enol (reacción B), el cual se reordena dando la 3-DG (B1) o bien condensa retroaldólicamente dando gliceraldehído y MGO (B2) [THORNALLEY, 1999A].

La condensación retroaldólica puede darse también sobre la glucosa, formándose GO (reacción C) o bien una tetrosa y GLA que se oxida dando GO, H_2O_2 y radicales HO^\bullet (D) [THORNALLEY, 1999A].

Se ha observado que la oxidación de la glucosa está afectada por la presencia del dianión fosfato, ya que éste cataliza la desprotonación del C(2). La concentración de HPO_4^{2-} es determinante en la formación de GO [THORNALLEY, 1999A]. Los metales divalentes (Fe^{2+} y Cu^{2+}) tienen un efecto similar, tal es así, que su complejación disminuye fuertemente la formación de GLA, GO y HO^\bullet [THORNALLEY, 1984] y ligeramente los niveles de 3-DG, sin afectar a la formación de MGO a partir de 3-DG [THORNALLEY, 1999A].



Esquema 1.21. Mecanismo de degradación de la glucosa.

Por otro lado, el GO, MGO, 3-DG y GLA se forman, además, a partir de la BS y del AP, productos iniciales de la glicación [THORNALLEY, 1999A]. El GO también se forma por peroxidación lipídica y a partir de la treonina, mientras que el GLA puede provenir de la oxidación de la L-serina [GRILLO, 2008].

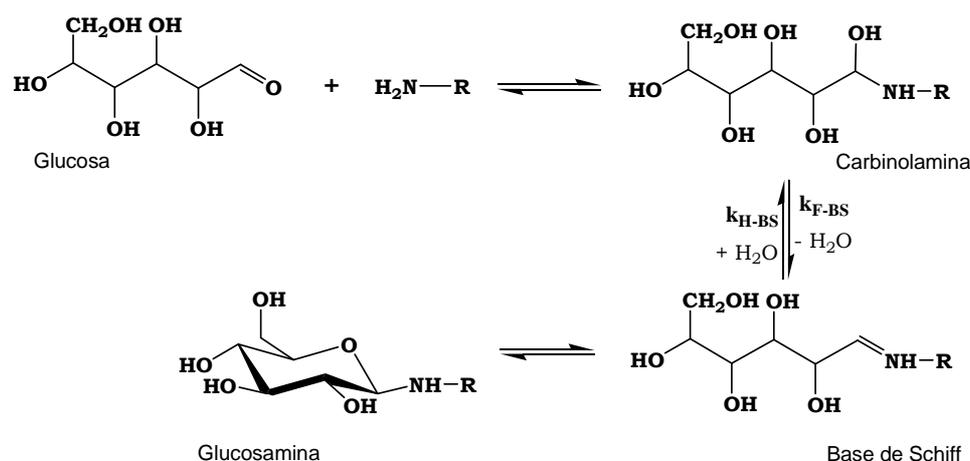
Los compuestos carbonílicos y dicarbonílicos altamente reactivos (RCS) presentan una concentración entre 0,5 y 2 μM en el plasma de individuos diabéticos [ODANI, 1999]. Aunque su concentración es muy inferior a la de glucosa ($> 7 \text{ mM}$ [LEDRU, 2001]), poseen una capacidad de modificación proteica 20.000 veces superior [THORNALLEY, 2005]. Es por este motivo que los RCS son señalados como los responsables de la formación de un gran número de AGEs y del desarrollo de las patologías asociadas a la diabetes [BEISSWENGER, 2003].

1.4.2. BASES DE SCHIFF DERIVADAS DE COMPUESTOS CARBONÍlicos CON CAPACIDAD GLICANTE

La primera etapa de la glicación no enzimática de biomoléculas es la unión covalente de azúcares reductores, como la glucosa, con grupos amina para formar una CA que se deshidrata espontáneamente dando una BS, como se indica en el esquema 1.22. Generalmente, la formación de las BSs derivadas de carbonilos de compuestos con capacidad glicante es un

proceso reversible y las cinéticas de las reacciones de adición y eliminación son máximas a un pH ligeramente ácido. En el caso de azúcares reductores, el intermedio de la BS puede evolucionar rápidamente hacia un compuesto ciclado para formar la glicosilamina N-sustituida [CHO, 2007]. Para el caso concreto de la glucosa, la glucosamina formada presenta equilibrios de mutarrotación entre sus formas α - y β -piranosa, siendo la forma α -piranosa la predominante en disolución acuosa [SKELLEY, 2006].

La determinación de las constantes cinéticas de la formación de la BS (k_{F-BS} , en el esquema 1.22) constituye el paso inicial del conocimiento de la glicación. Sin embargo, son escasos los trabajos publicados en este campo y ninguno ofrece información cuantitativa sobre las BSs de aminofosfolípidos. La cinética de esta reacción depende de numerosos factores; la temperatura, el pH, el tampón, el tipo de azúcar y la actividad del agua. La temperatura afecta a la actividad de los reactivos y a la constante de mutarrotación; mientras que la concentración de la forma lineal del azúcar aumenta con la temperatura y depende del pH. Obviamente, el estado de protonación del grupo amina también depende del pH, siendo además un parámetro importante en este tipo de reacciones porque presentan catálisis ácido-base [VAN BOEKEL, 2001].



Esquema 1.22. Formación de la BS glúcida.

En condiciones fisiológicas, las BSs formadas entre el grupo α -amina de los aminoácidos (concretamente: lisina, histidina, arginina, triptófano y cisteína) y la glucosa presentan un valor de constante cinética de formación (k_{F-BS}) del orden de $10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ h}^{-1}$ [BAISIER, 1992][GE, 1997]. En cambio, la k_{F-BS} para la reacción con el grupo ϵ -amina de la Lys es $5 \cdot 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ h}^{-1}$ [ADROVER, 2009A]. Para proteínas ricas en residuos Lys, como la hemoglobina, se obtiene un valor de $k_{F-BS} = 0,3 \text{ M}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (valor obtenido por mol de proteína y no por mol de grupos Lys reaccionantes) [HIGGINS, 1981].

Como se ha señalado anteriormente, la glucosa también puede reaccionar con los grupos amino de los lípidos. Bucala y cols. fueron los primeros en demostrar que la PE reacciona con la

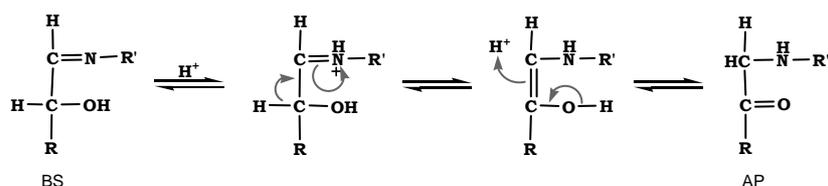
glucosa para formar AGEs [BUCALA, 1993]. No obstante, son escasos los trabajos referentes a la formación de las BSs de aminofosfolípidos; sólo Breitling-Utzmann y cols. han identificado y cuantificado los compuestos BS-PE y Amadori-PE derivados de glucosa en eritrocitos humanos [BREITLING-UTZMANN, 2001]. La determinación de las constantes cinéticas de la formación de la BS resultaría de suma importancia para la correcta comprensión del mecanismo global de la glicación de aminofosfolípidos. Hasta la fecha, no se han publicado trabajos en los que se haya determinado la constante microscópica de su formación.

Paralelamente, se ha demostrado que se forma una BS en la reacción de la PE con 2-(9-formil)nonaoxicarbonil glicerol (compuesto formado en la oxidación de los 2-monoacilgliceroles presentes en los alimentos) en medio apolar y temperatura ambiente, obteniéndose un rendimiento del 60 % después de la adición de cianoborohidruro de sodio (NaCNBH₃) [KURIVEN, 1999]. También, se ha detectado la formación de una BS en la reacción entre el p-hidroxifenilacetaldehído (producto mayoritario de la oxidación de la tirosina por una enzima peroxidasa) y modelos sintéticos de aminofosfolípidos en presencia de NaCNBH₃ [HAZEN, 1999].

Mediante estudios de mecánica y dinámica molecular se ha establecido el mecanismo de formación de la BS entre el grupo polar de la PE y el acetaldehído en un sistema periódico que mimetiza la bicapa lipídica. Los resultados señalan el papel catalítico del entorno de la superficie en todas las etapas de la reacción, especialmente en la deshidratación de la CA [SOLÍS-CALERO, 2010].

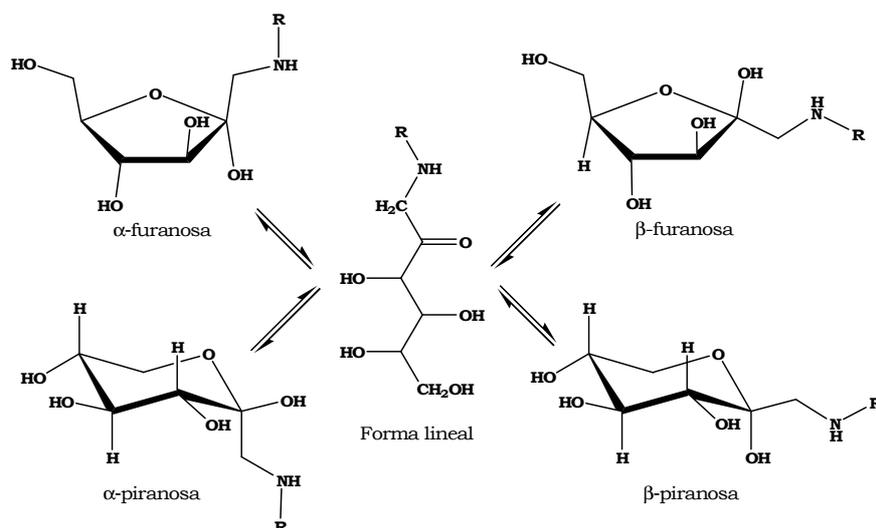
1.4.3. COMPUESTOS DE AMADORI DERIVADOS DE AZÚCARES

En el esquema 1.23 se muestra la formación del AP a partir de la BS correspondiente. Este mecanismo se inicia mediante la protonación del nitrógeno imínico de la BS, lo que provoca un descenso en la densidad electrónica del C_α y el debilitamiento de su enlace C–H. La eliminación de dicho protón mediante catálisis ácido-base general, genera una 1,2-enolamina que tautomeriza hacia la formación del AP [ISBELL, 1958]. La presencia de un grupo hidroxilo en el carbono adyacente al carbono imínico es crucial para la formación del AP, ya que éste no se produce a partir de BSs formadas sobre 2-desoxialdosas [MUNANAIRI, 2007].



Esquema 1.23. Reordenamiento de Amadori.

En el esquema 1.24 se muestra el equilibrio entre la forma lineal del AP y sus isómeros cíclicos (furanosa o piranosa), en equilibrio estos últimos con sus anómeros α y β . La proporción de cada especie en disolución no depende del sustituyente amínico y en el equilibrio presentan un 61% de forma β -piranosa, un 16% de forma α -furanosa, un 15% de forma β -furanosa, un 6% de forma α -piranosa y un 2% de forma lineal [YAYLAYAN, 1994].



Esquema 1.24. Equilibrio de isomerización entre las diferentes formas de los APs.

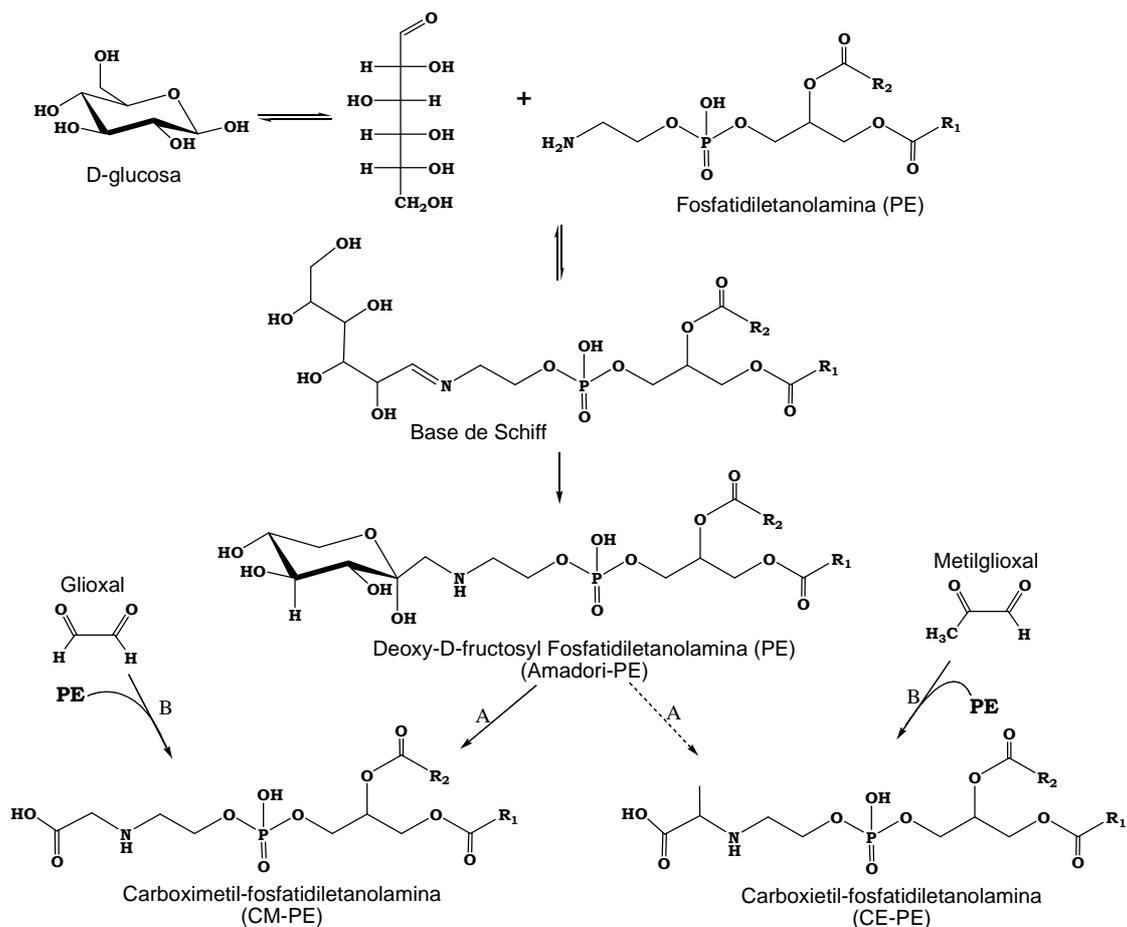
Smith y Thornalley [SMITH, 1992] sugirieron que el reordenamiento de Amadori es un proceso mucho más lento que el de formación de las BSs y que por ello ha de ser considerado como el paso limitante de la glicación, hipótesis que fue confirmada en los trabajos de Martins y Van Boekel [MARTINS, 2005]. Actualmente, los estudios de glicación proteica se centran en la identificación de los sitios de unión del AP en proteínas plasmáticas, como la albúmina [JALEEL, 2005][ZHANG, 2008][SCHALKWIJK, 2012].

En cuanto a la glicación de aminofosfolípidos, Lertsiri y cols. identificaron el compuesto Amadori-PE (deoxi-D-fructosil fosfatidiletanolamina) como el producto de la reacción entre la glucosa y la PE de la yema de huevo en medio metanólico, evidenciando además su presencia en glóbulos rojos humanos [LERTSIRI, 1998]. Posteriormente, se han desarrollado diversos métodos para cuantificar su formación en muestras biológicas, como son la cromatografía líquida con detector UV [OAK, 2002], la cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas convencional (LC-MS) [RAVANDI, 1995][UTZMANN, 2000] y el sistema combinado de analizador de iones cuadrupolar con trampa lineal (QTRAP LC-MS/MS) [HOJOU, 2004]. Con éste último método se corroboró que la concentración de Amadori-PE es mayor en el plasma y en los eritrocitos de pacientes diabéticos que en individuos sanos, pudiendo además cuantificar los diferentes tipos de Amadori-PE según las cadenas de ácido graso que contienen los aminofosfolípidos [NAKAGAWA, 2005A][MIYAZAWA, 2005][SHOJI, 2010].

Recientemente, se ha observado que la formación de Amadori-PE no es proporcional al contenido de PE en sangre o tejidos, sino que es más probable que se genere en los órganos involucrados en la enfermedad de la diabetes (hígado, páncreas y riñones) estando además influenciada por la estructura de los ácidos grasos del PE [SOOKWONG, 2011]. Por otra parte, también se han investigado los efectos de este compuesto indicando que tiene un papel importante en el desarrollo de la microangiopatía diabética ya que estimula el engrosamiento de la pared del vaso sanguíneo [OAK, 2003][NAKAGAWA, 2005B].

1.4.4. PRODUCTOS FINALES DE LA GLICACIÓN AVANZADA (AGES)

Los AGEs son un conjunto complejo y heterogéneo de compuestos estables [IKEDA, 1996] que se forman fundamentalmente por dos vías, tal y como se muestra en el esquema 1.25. Una vía es la deshidratación y reordenamiento del AP, tanto en condiciones oxidativas como en no oxidativas (mecanismo A). Una segunda vía es por reacción de RCS con grupos funcionales amino, tiol y guanidinio (mecanismo B).



Esquema 1.25. Mecanismo de glicación de la PE. La glucosa reacciona con el grupo amino de la PE para formar una BS, que se reordena para formar el Amadori-PE. Posteriormente, se obtienen los AGEs por evolución del Amadori-PE (A) o por reacción del PE con los RCS (B).

Los RCS se pueden generar por fragmentación oxidativa de la BS (mecanismo de Namiki) [FU, 1996], por autooxidación de la glucosa mediante catálisis metálica (mecanismo de Wolff) y por peroxidación lipídica [WOLFF, 1987, 1991]. El incremento en la concentración de RCS provenientes de reacciones oxidativas y no oxidativas, y de productos de glicoxidación y lipoxidación implica un aumento en la modificación de biomoléculas y provoca estrés oxidativo³ [BAYNES, 1999][MIYATA, 2002]. La modificación de las proteínas por AGEs desencadena una respuesta inflamatoria que deteriora los tejidos [GASSER, 2008].

Hasta el momento, la información disponible sobre las propiedades químicas y biológicas de la mayoría de los AGEs es relativamente limitada. Son bastante escasos los trabajos referentes a los AGEs derivados de aminofosfolípidos. Se ha identificado la formación del AGE pirlalina en modelos de reacción de glucosa y 3-DG con PE [LEDERER, 2000]. Y recientemente, se ha detectado la presencia de carboximetil-PE (CM-PE) y carboxietil-PE (CE-PE) (esquema 1.25) en muestras biológicas humanas, observándose que su concentración en la sangre de pacientes diabéticos es menor que la detectada para el Amadori-PE [SHOJI, 2010].

Los AGEs se agrupan en dos amplias clases: los AGEs de no-entrecruzamiento (*non-crosslinking AGEs*) los cuales se forman mediante la reacción de la glucosa o de un grupo carbonílico o dicarbonílico con grupos de la cadena lateral de un residuo proteico (figura 1.15) y los AGEs de entrecruzamiento (*crosslinking AGEs*) que se forman como consecuencia de la reacción de un segundo grupo nucleófilo proteico sobre un AP o post-Amadori. La diversidad de los grupos carbonílicos y de las cadenas laterales proteicas hace que exista un gran número de AGEs de entrecruzamiento.

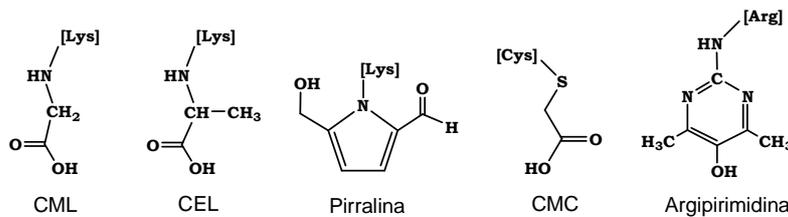


Figura 1.15. Estructura de algunos AGEs de no-entrecruzamiento.

Algunos AGEs de entrecruzamiento son fluorescentes, por lo que se detectan usando la espectroscopia de fluorescencia, excitando a 370 nm y midiendo la intensidad de emisión a 440 nm. En la figura 1.16 se muestran las estructuras de los más habituales, los cuales se han

³ El estrés oxidativo es causado por un desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno (peróxidos y radicales libres) y la capacidad de los sistemas biológicos de desintoxicar rápidamente los reactivos intermedios o reparar el daño resultante. La alteración del entorno reductor de las células puede dañar a todos los componentes de la célula, incluyendo las proteínas, los lípidos y el ADN. El estrés oxidativo está involucrado en muchas enfermedades relacionadas con las complicaciones de la diabetes, como la arteriosclerosis, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer, y también puede ser importante en el envejecimiento [BETTERIDGE, 2000].

encontrado asociados a proteínas [AMANO, 2001][FURUYA, 2005]. Sin embargo, la mayor parte de las estructuras de los AGEs responsables del entrecruzamiento proteína-proteína *in vivo* no son fluorescentes (99 % del total). En la figura 1.17 se muestran algunos de estos compuestos, como el GOLD y el MOLD que se forman mediante la reacción de GO y MGO con los residuos de lisina, respectivamente [AHMED, 2002], o el glucosepan, que se forma por el ataque del grupo guanidina sobre productos de la degradación del AP [LEDERER, 1999], siendo el AGE que más se acumula en el colágeno humano [SELL, 2005].

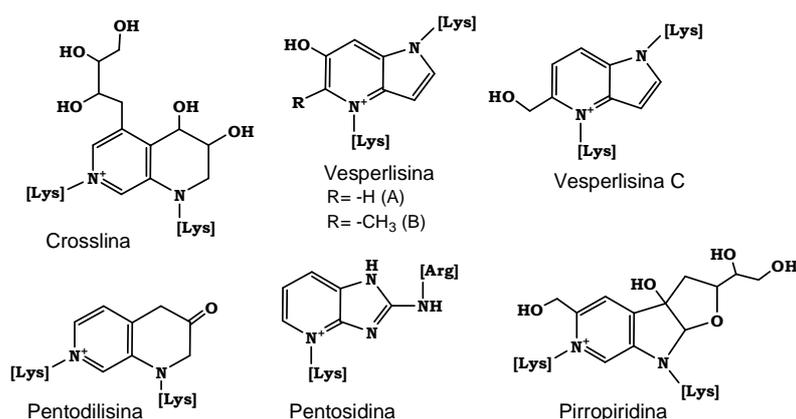


Figura 1.16. Estructura de algunos AGEs de entrecruzamiento fluorescentes.

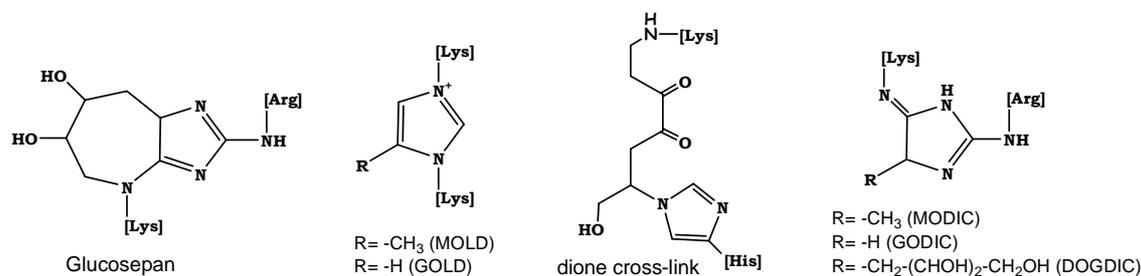
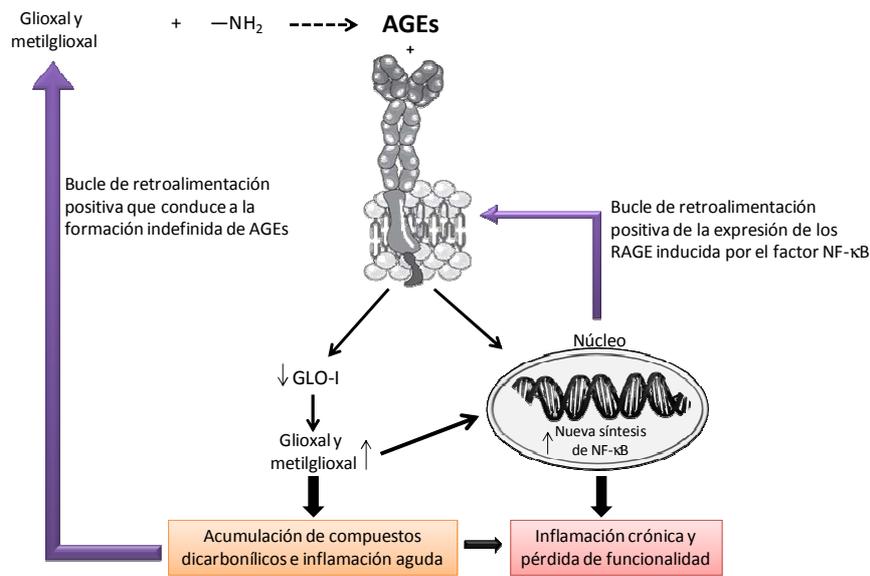


Figura 1.17. Estructura de algunos AGEs de entrecruzamiento no fluorescentes.

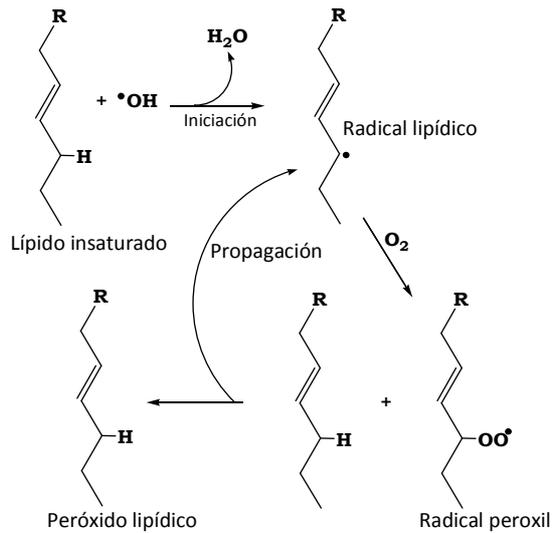
Los AGEs pueden interactuar con una proteína de la superficie celular específica, denominada receptor de los AGEs (RAGE) [SCHMIDT, 1992]. El RAGE es un multiligando perteneciente a la familia de las inmunoglobulinas, que reconoce estructuras tridimensionales en lugar de secuencias oligoméricas. Como se ve en el esquema 1.26, la unión de los AGEs inicia la transcripción del factor pro-inflamatorio (NF-κB) con la consiguiente respuesta inflamatoria. Adicionalmente, se generan especies oxigenadas radicalarias (ROS) que disminuyen la actividad de la enzima glioxalasa-I (GLO-I), interfiriendo de esta manera en el sistema natural de eliminación de los precursores de los AGEs. Esta situación implica el aumento de la concentración de GO y MGO, con el consecuente incremento de la concentración de AGEs y de la activación de los RAGEs perpetuando la respuesta inflamatoria [FLEMING, 2011][RAMASAMY, 2012].



Esquema 1.26. Mecanismo de la activación celular a través de RAGEs durante el envejecimiento.

1.4.5. PRODUCTOS FINALES DE LA LIPOXIDACIÓN AVANZADA (ALES)

Las membranas lipídicas son susceptibles de ser oxidadas debido a sus propiedades físico-químicas y a la reactividad de los ácidos grasos que componen la membrana [HULBERT, 2007]. Por un lado, se tiene el hecho de la gran disponibilidad de oxígeno y de RL presentes en la membrana lipídica [PAMPLONA, 2008], ya que éstos son más solubles en medios hidrófobos, por lo que los lípidos son las primeras dianas del deterioro oxidativo. Por otro lado, los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) son muy sensibles a la oxidación, debido a la presencia del grupo metileno entre dos dobles enlaces. La tendencia a ser oxidados aumenta exponencialmente con el número de dobles enlaces por molécula de ácido graso [HOLMAN, 1954][HULBERT, 2007]. Los RL pueden extraer átomos de hidrógeno (H[•]) de las cadenas hidrocarbonadas generando radicales C[•], que posteriormente suelen combinarse con el oxígeno disuelto en la membrana (ver esquema 1.27). El radical peroxil resultante es muy reactivo, por lo que ataca a las proteínas de membrana y oxida los PUFAs adyacentes, formando así hidroxiperóxidos lipídicos [HALLIWELL, 1999]. Estos compuestos son más hidrofílicos que los ácidos grasos, por lo que migran hacia la superficie de la membrana, perturbando la estructura de la bicapa y su fluidez, entre otras propiedades.



Esquema 1.27. Oxidación lipídica.

Los peróxidos lipídicos se fragmentan produciendo una extensa lista de RCS (figura 1.18), entre los que se encuentran los aldehídos α,β -insaturados como el 4-hidroxi-*trans*-2-nonenal (HNE) y la acroleína; di-aldehídos (malondialdehído –MDA– y GO); cetoaldehídos (4-oxo-*trans*-2-nonenal –ONE– e isocetales –IsoK–) [ESTERBAUER, 1991] y algunos aldehídos de cadena corta. Estos compuestos tienen un tiempo de vida medio de minutos a horas, mientras que las ROS están en la escala de micro a nanosegundos. Si además se tiene en cuenta que son estructuras sin carga que pueden desplazarse a través de las membranas y del citosol, se entiende que los RCS sean mucho más destructivos y con un alcance mayor que las ROS [PAMPLONA, 2011].

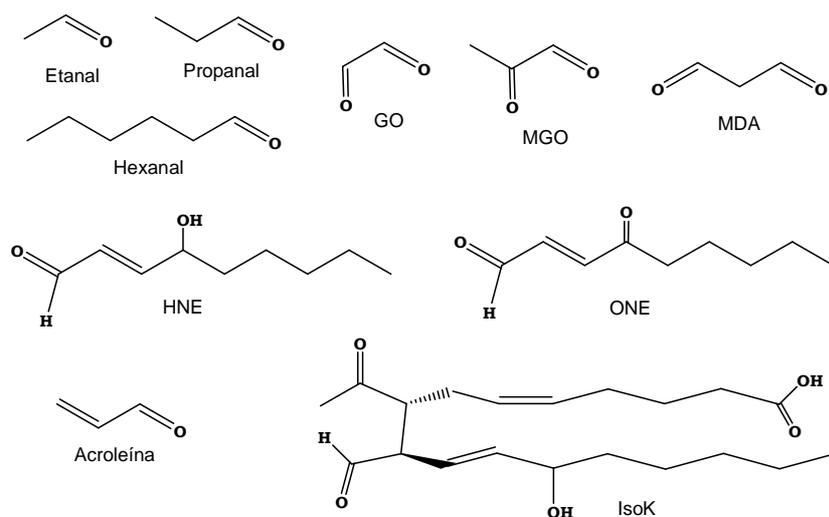


Figura 1.18. Estructura química de los aldehídos derivados de la oxidación lipídica, que también son precursores de los ALEs.

La velocidad de oxidación y formación de los RCS es baja en condiciones fisiológicas, pero se incrementa con la edad y con la disminución de la concentración de antioxidantes⁴ [MCEWEN, 2005][VOSS, 2006]. Recientemente, se ha demostrado que la oxidación de la PE glicada es más rápida que en la no glicada, posiblemente debido a que la cabeza polar glicada presenta más sitios de oxidación [SIMOES, 2010].

Los RCS generados reaccionan con los grupos nucleófilos de las biomoléculas, como las proteínas, el ADN y los aminofosfolípidos, produciendo su modificación química y la formación irreversible de una variedad de sustancias y compuestos entrecruzados conocidos como ALEs [THORPE, 2003]. La reacción con los grupos nucleofílicos de las proteínas (residuos Cys, Lys, Arg y His) genera: MDA-Lys, HNE-Lys, CML y GOLD, entre otros ALEs. El grupo amina de los aminofosfolípidos reacciona con los RCS formando MDA-PE y CM-PE [PAMPLONA, 2008]. Finalmente, la guanina es la base de ADN más modificada por los RCS debido a su gran nucleofilia [KNERR, 1994].

1.4.6. INHIBIDORES DE LA GLICACIÓN NO ENZIMÁTICA

En general, los procesos de inhibición de la glicación pueden actuar en alguno de los procesos que se detallan a continuación [WU, 2011A]:

- I. Secuestro de los RL para aliviar el estrés oxidativo y reducir la generación de nuevos grupos carbonílicos o RCS.
- II. Interceptación de los grupos carbonílicos o RCS.
- III. Fomento de la quelación de metales de transición, que están relacionados con el proceso de formación de AGEs.
- IV. Inhibición de la formación de AGEs.
- V. Ruptura de las estructuras de los AGEs de entrecruzamiento.
- VI. Bloqueo de los RAGEs, lo que puede reprimir el estrés oxidativo y la inflamación de los sistemas biológicos.

En base a estos requisitos, se han ensayado algunos inhibidores potenciales [RAHBAR, 2000A, 2000B, 2003] que han superado, en algunos casos, la fase de estudios clínicos [WILLIAMS, 2004][GIANNOUKAKIS, 2005]. En principio, la mayoría de inhibidores de la formación de AGEs son también potencialmente útiles como inhibidores de la formación de ALEs [BAYNES, 2000].

⁴ Los principales antioxidantes que atrapan los radicales en el medio lipofílico de las células son los tocoferoles, los carotenoides y la coenzima Q [HULBERT, 2007].

1.4.6.1. La vitamina B₆ como inhibidor de la glicación no enzimática

En 1988, Khatami y cols. [KHATAMI, 1988] mostraron los primeros resultados que evidenciaban que los vitámeros B₆ inhibían la glicación proteica. En general, la vitamina B₆ presenta propiedades de antioxidante ya que participa en la síntesis del GSH (Glu-Cys-Gly), que es el mayor antioxidante e inhibidor natural de los precursores de ALEs. También actúa como cofactor en la síntesis de Cys (el reactivo limitante de la biosíntesis de GSH) [GRIMBLE, 1997]. La deficiencia o niveles bajos de vitamina B₆ se traduce en un incremento de homocisteína y del estrés oxidativo, lo que se asocia con la aceleración de la arterosclerosis en ratas deficientes de esta vitamina⁵ [ENDO, 2006]. Recientemente, se ha demostrado que la vitamina B₆ es un inhibidor de la oxidación de la dopamina, inducida por la enfermedad del Alzheimer, con valores de la constante de inhibición (K_i , mM) de 1,4 (PM), 8,3 (PN), 1,2 (PL) y 0,2 (PLP) [HASHIM, 2011].

Jain y Lim [JAIN, 2001] demostraron que la PN es capaz de neutralizar RL [MOORTHY, 1975] y disminuir la formación de AGEs *in vitro*. También, se demostró que el PL y el PLP eran capaces de inhibir la glicación mediante la formación de una BS protectora con grupos amino de proteínas [KHALIFAH, 1999] y de aminofosfolípidos [HIGUCHI, 2006], mientras que la PM forma una BS con los grupos carbonílicos, evitando así su reacción con los grupos amino de las biomoléculas [VOZIYAN, 2002].

El PLP puede condensar con la PE, detectándose el aducto PE-PLP en glóbulos rojos humanos (12 pmol/ml) [NAKAGAWA, 2008][MIYAZAWA, 2012]. Por otra parte, también se ha comprobado que los niveles de Amadori-PE se reducen aproximadamente en un 40 % con un suplemento dietético de PLP en ratas con diabetes inducida. De esta manera, se señala al PLP como un compuesto terapéutico para la prevención de patologías derivadas de la diabetes y la arterosclerosis [TOKITA, 2005][ASAI, 2009].

Sin embargo, el vitámero B₆ con mejores propiedades inhibitoras es la PM [VOZIYAN, 2005], propuesta como inhibidor de la glicación en 1996 por Booth y cols. [BOOTH, 1996]. El grupo amino de la PM reacciona con los grupos carbonílicos (GO, GLA) [VOZIYAN, 2002], con compuestos 1,4-dicarbonílicos [AMARNATH, 2004][DAVIES, 2006], con la 3-DG [CHETYRKIN, 2008A] y con el MDA [KANG, 2006]. La PM también reacciona con el AP; no obstante, su efecto inhibitorio se debe fundamentalmente al secuestro de los cationes oxidantes que catalizan la evolución de estos compuestos (reacciones post-Amadori) [ADROVER, 2008A].

Voziiyan y Hudson [VOZIYAN, 2005] demostraron que la PM puede neutralizar radicales HO[•] mediante donación del protón fenólico en posición 3. Jain y Lim [JAIN, 2001] propusieron que mediante este mismo mecanismo, la PM también inhibe la producción del radical O₂^{•-}, aunque no lo neutraliza [CHETYRKIN, 2008B]. La elucidación de este mecanismo de acción permitió

⁵ En el apartado 1.1.3 se detallan las patologías asociadas a la deficiencia de vitamina B₆.

a Chetyrkin y cols. [CHETYRKIN, 2008B] comprobar que la PM inhibe la modificación de los Trp proteicos inducida por RL.

La PM previene la formación de AGEs como la CML e inhibe la modificación de la Lys por 4-HNE y MDA, compuestos generados durante la oxidación de LDL por cobre [ONORATO, 2000]. Es un potente secuestrador de MDA, lo que también bloquea la acumulación de lipofuscin (pigmento fluorescente relacionado con el MDA) [KANG, 2006]. En definitiva, la PM protege frente al desarrollo de nefropatías, neuropatías y vasculopatías [VOZIYAN, 2005][WU, 2011B][CHUANG, 2012].

Se ha comprobado experimental [RAHBAR, 2003] y teóricamente [ORTEGA-CASTRO, 2012] que diversos derivados de la vitamina B₆ forman complejos con iones metálicos, hecho que les otorga la capacidad de inhibir las reacciones oxidativas implicadas en la glicación (ver figura 1.19). El BST-4997, compuesto análogo a la vitamina B₆ con un grupo imidazol en posición 4, forma complejos con el Cu²⁺ tres órdenes de magnitud más estables que la PM y presenta una elevada capacidad de inhibición de las reacciones post-Amadori [BROCK, 2003]. El TM2002 acompleja iones metálicos con un IC₅₀ = 84 μM frente a la oxidación del ácido ascórbico y ha mostrado efectos beneficiosos contra la diabetes [IZUHARA, 2008]. El PIH (*pyridoxal isonicotinoyl hydrazone*) es un agente quelatante de hierro, por lo que bloquea el estrés oxidativo y la peroxidación lipídica inducida por hierro, en particular en la formación de MDA. Su uso está indicado para las enfermedades degenerativas y en los desórdenes causados por la presencia excesiva de hierro [WHITNALL, 2006].

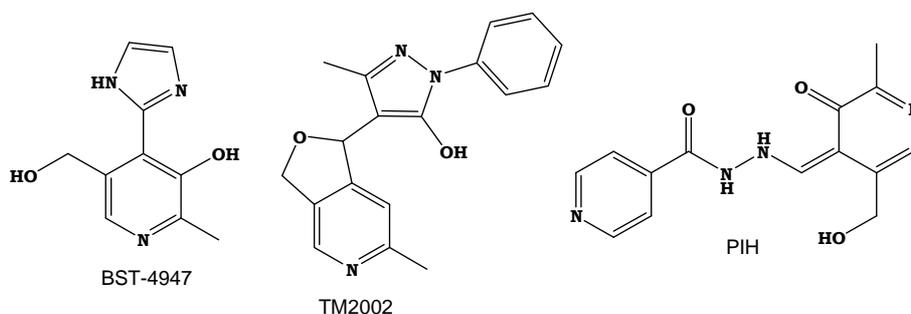


Figura 1.19. Estructura química de inhibidores de la glicación derivados de la vitamina B₆.

1.4.6.2. Otros inhibidores

Los compuestos antioxidantes parecen ser buenos agentes de prevención de la formación de AGEs, ya que disminuyen el estrés oxidativo. Por este motivo, en los últimos años se han estudiado las actividades inhibitoras de algunos extractos de plantas y de compuestos fenólicos [PENG, 2011][WU, 2011A]. En este sentido, se ha señalado que varios polifenoles del té (figura 1.20) pueden atrapar ciertos RCS en condiciones fisiológicas [Lo, 2006], bloqueando así

la formación de AGEs. Estos resultados sugieren que no sólo las propiedades antioxidantes de los compuestos fenólicos son la razón de su capacidad inhibitoria.

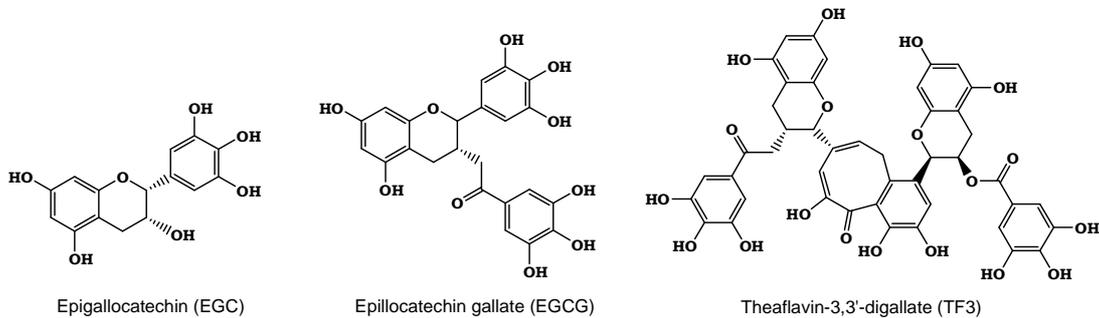


Figura 1.20. Estructura de algunos polifenoles del té capaces de secuestrar grupos carbonílicos.

Se ha estudiado también un grupo numeroso de flavonoides naturales, demostrándose una buena correlación entre los efectos inhibitorios y el secuestro de RL [Wu, 2005]. La disminución de la glicación por los flavonoides se asoció, además, a un incremento de los compuestos antioxidantes en plasma [MANUEL, 1999]. El estudio *in vitro* de la relación entre estructura y actividad de los flavonoides de la figura 1.21 demostró que la sustitución por hidroxilos en las posiciones 3'-, 4'-, 5- y 7, además de la metilación o glicosilación de éstos grupos hidroxilo en ciertas posiciones (por ejemplo, 3-OH) aumentaba su actividad inhibitoria [LOU, 2001][MATSUDA, 2003][YOKOZAWA, 2003][WU, 2005].

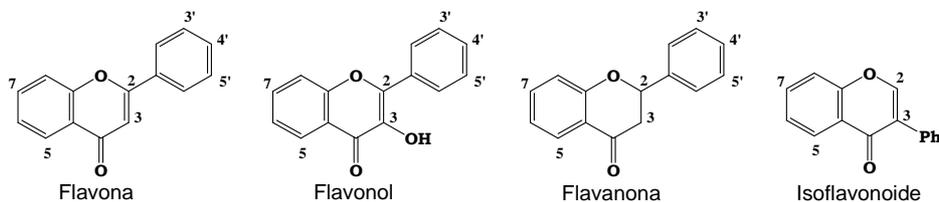


Figura 1.21. Estructura de algunos flavonoides típicos.

Por otro lado, se han ensayado una gran variedad de compuestos sintéticos con propiedades inhibitorias de la formación de AGEs o con capacidad para romper los compuestos de entrecruzamiento generados durante la glicación. No obstante, en algunos casos se ha comprobado que pueden producir efectos secundarios severos, como es el caso de la aminoguanidina (AG) [FREEDMAN, 1999][THORNALLEY, 2003][WILLIAMS, 2004].

Sólo unos pocos inhibidores son eficaces en las primeras fases de la glicación (ver figura 1.22), interfiriendo en la formación de la BS. El ácido acetilsalicílico (aspirina) bloquea los grupos amina libres de proteínas mediante su acetilación [MALIK, 1994][CABALLERO, 2000][SHASTRI, 1998], el diclofenac interacciona de forma no covalente con las proteínas evitando la unión con

los azúcares [VAN BOEKEL, 1992], mientras que el inositol atrapa las moléculas de glucosa [RAMAKRISHNAN, 1999].

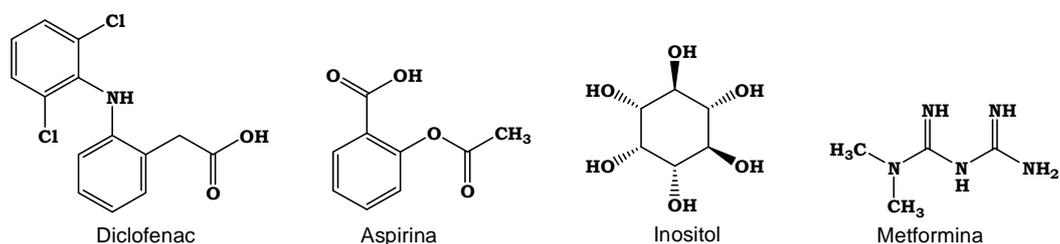
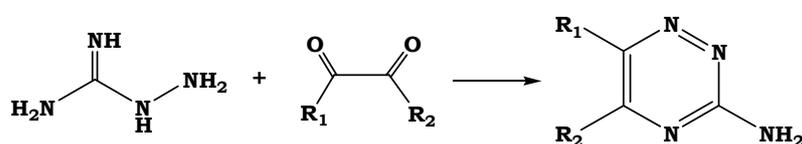


Figura 1.22. Estructura de algunos inhibidores efectivos en las etapas iniciales de la glicación.

La mayoría de inhibidores sintéticos previenen la formación de AGEs secuestrando RCS o bloqueando la formación de intermediarios. Entre ellos, destaca la AG, compuesto que presenta dos centros de reacción, un grupo hidracina ($pK_a = 0,7$) y un grupo guanidino ($pK_a = 11,5$) [KOSKINEN, 1997]. Se ha observado que la AG reacciona con los α -oxoaldehídos GO y MGO (esquema 1.28) [THORNALLEY, 2000], con los precursores de ALEs (MDA) [THORNALLEY, 2000], con la glucosa [HIRSCH, 1995], con aldehídos α,β -insaturados [AL-ABED, 1997] y con el PLP⁶ [CHEN, 2004]. Los resultados obtenidos por Voziyan y Hudson [VOZIYAN, 2005] muestran que la AG reacciona con los RCS de manera más efectiva que la PM.



Esquema 1.28. Mecanismo de reacción entre la AG y α -oxoaldehídos, formando derivados del 3-amino-1,2,4-triacina.

La AG también presenta una capacidad complejante de iones metálicos similar a la PM [PRICE, 2001] (sección 1.2.2) e inhibe la formación de HO[•] [GIARDINO, 1998] y de la actividad de la enzima amino oxidasa, la cual contribuye a la generación de MGO y FA [YU, 1997]. Se ha comprobado que la AG es capaz de inhibir la formación de AGEs y la modificación de lipoproteínas [ALDINI, 2007], reduciendo la aparición de ciertas complicaciones patológicas de la diabetes [THORNALLEY, 2003][NEMOTO, 2012]. Sin embargo, Khalifah y cols. [KHALIFAH, 1999] demostraron que la capacidad inhibidora de la AG es muy inferior a la mostrada por la PM.

Otros compuestos que actúan mediante el secuestro de RCS son la metformina (figura 1.22) [TANAKA, 1997][RUGGIERO-LÓPEZ, 1999]; el OPB-9195 que reacciona con los RCS mediante un mecanismo similar al descrito para la AG [MIYATA, 2000, 2003], aunque presenta efectos

⁶ La reacción de la AG con el PLP forma el aducto AG-PLP que mantiene la capacidad inhibidora de la AG, pero disminuye la disponibilidad de la vitamina B₆ [CHEN, 2004].

secundarios [PEYROUX, 2006]; la D-penicilamina [WONDRAK, 2002] y la hidralazina [VINDIS, 2006], que también es un potente antioxidante que inhibe la activación de la oxidasa NADH con la consecuente generación de ROS [MUNZEL, 1996].

En la figura 1.23 se muestran algunos derivados de aminoácidos que presentan propiedades inhibitorias como la N-acetyl-Cys [NEELY, 2000], la S-Adenosilmetionina [VALENTOVIC, 2004], el GSH (Glu-Cys-Gly) [PETERSEN, 2004] y la histidil hidrazida [TANG, 2007], los cuales inhiben la formación de 4-HNE. Por otro lado, la carnosina es un dipéptido que posee habilidades de antioxidante, de secuestrador de carbonilos, de bloqueador de la formación de MDA y de MGO [HIPKINS, 1997], y de protector del entrecruzamiento entre proteínas y ADN [GUIOTTO, 2005]. Trabajos recientes se han centrado en el estudio de derivados de carnosina que mantienen o mejoran la reactividad con los RCS [VISTOLI, 2012].

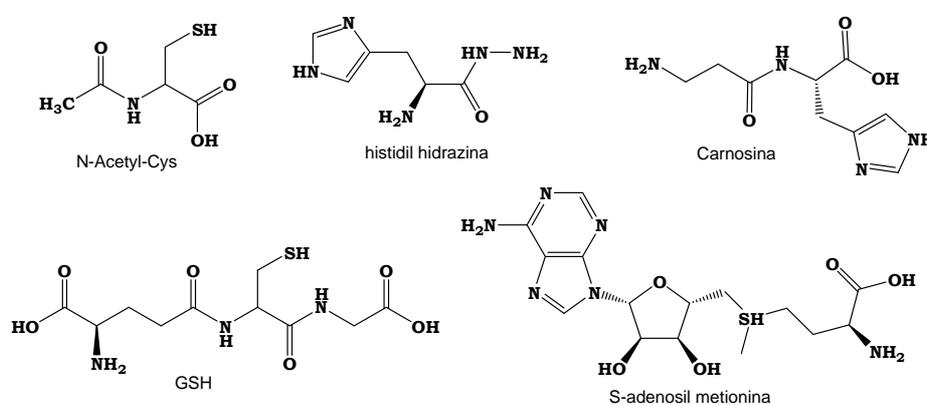


Figura 1.23. Estructura de algunos inhibidores derivados de aminoácidos.

Finalmente, en la figura 1.24 se representa la estructura de una serie de compuestos que rompen los AGEs de entrecruzamiento [WOLFFENBUTTEL, 1998][PRICE, 2001]. Vasan y cols. [VASAN, 1996] demostraron que el bromuro de fenaciltiazol (PTB) era capaz de escindir los enlaces covalentes en AGEs de entrecruzamiento, aunque no llegó a utilizarse como fármaco ya que reduce los enlaces disulfuro proteicos [THORNALLEY, 1999B]. En cambio, el alagebrium (ALT-711) es capaz de inhibir el entrecruzamiento proteico y la formación de AGEs en un 95% [VASAN, 2003].

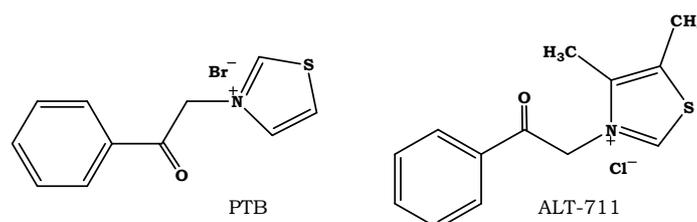
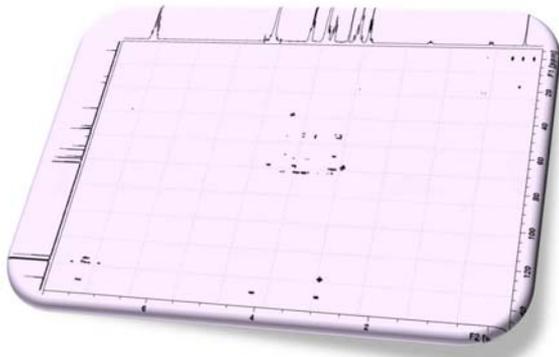


Figura 1.24. Estructura de algunos rompedores de AGEs entrecruzados.



Capítulo 2.

MATERIALES Y MÉTODOS

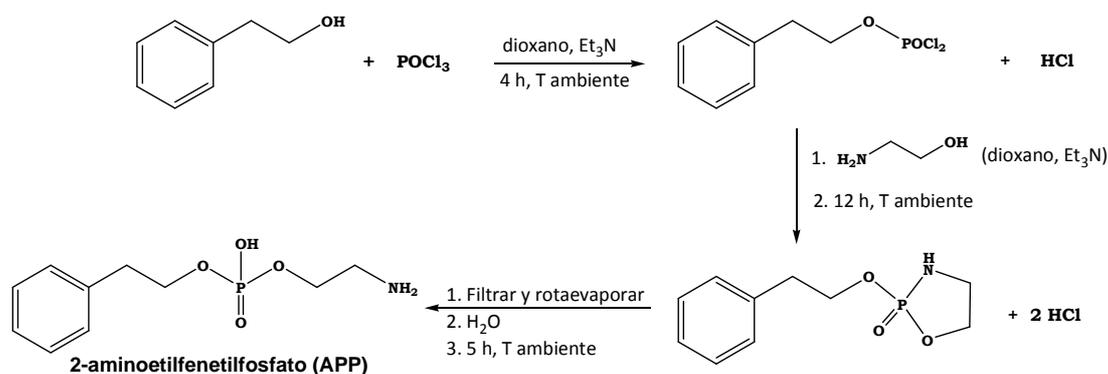
2.1. MATERIALES

Los reactivos utilizados en la investigación realizada en este trabajo se adquirieron de las empresas comerciales que se detallan a continuación:

- *Sigma–Aldrich*: D-glucosa, D-arabinosa, D₂O (99,9 % D), *O*-fosforiletanolamina, *O*-fosfo-DL-serina, piridoxamina, 4-aminometilpiridina, 5'-fosfato de piridoxal hidratado, hidrógenopirofosfato de sodio, dihidrógenoarsenato de potasio, deuteróxido potásico, ácido 3-(trimetilsilil)-1-propanosulfónico (DSS), fenetilalcohol, trietilamina, 2-aminoetanol, dioxano y formaldehído (37 % en agua, con un 10 % de metanol como estabilizante, para prevenir la oxidación y la polimerización).
- *Acros Organics*: cianoborohidruro sódico, dihidrógenofosfato de potasio, hidrógenocarbonato de potasio, cloruro de potasio, acetato de sodio, ácido bórico, hidrógenofosfato de potasio y la disolución estandarizada de hidróxido sódico 0,1M.
- *Fluka*: el acetol.
- *Avanti Polar Lipids*: 1,2-dihexanoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina y 1,2-dihexanoil-*sn*-glicero-3-fosfo-L-serina.

2.1.1. SÍNTESIS DEL COMPUESTO 2-AMINOETILFENETILFOSFATO

El esquema 2.1 detalla la síntesis del 2-aminoetilfenetilfosfato (APP) que se realizó modificando ligeramente el procedimiento descrito por Argirov y cols. [ARGIROV, 1998]. Una disolución formada por 20 mmoles de feniletalcohol, 20 mmoles de trietilamina y 10 ml de dioxano se añade gota a gota sobre una disolución de 20 mmoles de POCl₃ en 10 ml de dioxano. La adición se realiza manteniendo la segunda disolución con agitación constante y a una temperatura de 4 °C. Posteriormente, se deja 4 h a temperatura ambiente con agitación suave. A la disolución obtenida se añade lentamente una disolución de 20 mmoles de 2-aminoetanol, 40 mmoles de trietilamina y 15 ml de dioxano, dejando la mezcla a temperatura ambiente durante toda la noche.



Esquema 2.1. Mecanismo de la síntesis del 2-aminoetilfenetilfosfato (APP).

Al día siguiente, la mezcla de reacción se filtra al vacío y se lava con 20 ml de dioxano. El filtrado se concentra con un rotavapor y, posteriormente, se añade 1 ml de agua y se agita durante 5 horas, obteniendo así el producto deseado. El producto se aísla mediante decantación con benceno, extrayendo así todos los compuestos solubles en agua. La fase acuosa se liofiliza y se redissuelve en la mínima cantidad de agua para proceder a su purificación por HPLC. Finalmente, la fracción recogida es liofilizada. El compuesto APP se obtuvo con un rendimiento del 5% y un punto de fusión de 220-223 °C. El producto obtenido se caracterizó por RMN (^1H , ^{13}C y DEPT-135), por análisis elemental y por espectroscopia de masas.

2.2. TÉCNICAS EXPERIMENTALES

2.2.1. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN CON DETECCIÓN UV-VISIBLE

Los estudios cinéticos del compuesto APP se siguieron utilizando un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), de la marca *Shimadzu*, equipado con dos bombas modelo LC-10AD, un inyector manual *Rheodyne* modelo 7725i y detector UV-Visible *Shimadzu* model SPD-10AV. En todos los estudios cinéticos, se utilizó una columna *Tracer Excel 120 ODSB* (25 x 0,46 cm, 5 μm) de la marca *Teknokroma*, especialmente adecuada para la separación de compuestos hidrofílicos y con una larga vida útil en disolventes acuosos. Este mismo equipo de HPLC pero con una columna semipreparativa *Kromasil 100 C18* (25 x 1,00 cm, 5 μm) de la marca *Teknokroma* se utilizó para aislar y posteriormente caracterizar algunos productos de reacción de este trabajo.

La elución de los compuestos se realizó mediante diversos gradientes de la mezcla binaria MeOH/agua-20 mM fosfato potásico a pH 6,5 o MeOH/agua con detección a 254 nm.

2.2.2. ESPECTROSCOPIA UV-VISIBLE

La espectroscopia UV-Visible fue utilizada para estudiar la variación de la absorbancia en una longitud de onda fija en las reacciones del PLP con aminas primarias. Los espectros UV-Visible fueron adquiridos mediante un espectrofotómetro de doble haz *UV-2401 PC Shimadzu* utilizando las disoluciones tampón como referencia. Se utilizaron celdas de cuarzo de un centímetro de paso óptico, que fueron termostalizadas utilizando un termostato eléctrico *Shimadzu* modelo *TCC-240A* a una temperatura de 25 ó 37 °C. El sistema presenta como fuentes de irradiación una lámpara de D_2 (30 W) y una de wolframio (50 W) y es capaz de irradiar las muestras desde 200 a 800 nm.

2.2.3. ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

La espectroscopia de RMN fue utilizada para la caracterización de compuestos de reacción, para el análisis de mezclas de reacción y para el estudio cinético de algunas reacciones. Se han realizado experimentos monodimensionales de ^1H , ^{13}C y de transferencia de polarización DEPT-135. También se han obtenido espectros bidimensionales de tipo ^1H , ^{13}C -HMQC y ^1H , ^{15}N -HMBC. Los espectros de RMN fueron adquiridos a 25 ó 37 °C mediante un espectrómetro de la marca *Bruker*, modelo *AMX-300* equipado con un imán de 7,04 T (300 MHz en resonancia de ^1H). En ocasiones, se ha utilizado también un equipo *Bruker Avance 600 MHz*, con mayor poder de resolución. Se usaron tubos de vidrio de 5 mm de diámetro y como referencia interna el ácido 3-(trimetilsilil)-1-propanosulfónico (DSS). Los espectros de ^1H se adquirieron en D_2O utilizando diversas disoluciones tampón según el pH. Los espectros de ^{13}C se adquirieron en las mismas disoluciones deuteradas de tampón o bien en la proporción 80:20 H_2O -tampón/ D_2O .

La medida y el ajuste del pH en las disoluciones tampón de D_2O se realizó siguiendo el protocolo descrito por Salomaa y cols. [SALOMAA, 1964] para electrodos de vidrio, usando un pHmetro digital *Crison* modelo *GLP21+* equipado con un electrodo de vidrio *Crison* modelo *52 09* de 6 mm de diámetro, con un sistema de referencia *Ag/AgCl* encapsulado y una membrana cerámica. Una vez calibrado con las disoluciones tampón acuosas (pH = 4,01 ± 0,02; pH = 7,00 ± 0,02 y pH = 9,21 ± 0,02), el electrodo se sumergió en varios mililitros de D_2O con el objetivo de hidratar la membrana con este disolvente. Para realizar las medidas de pH debe considerarse el efecto isotópico sobre la respuesta del electrodo. En mezclas de H_2O y D_2O , la lectura del electrodo de vidrio se relaciona con el pH según la ecuación (2.1) [PENTZ, 1967]

$$pD = pH + 0,3139\alpha + 0,0854\alpha^2 \quad (2.1)$$

donde α es la fracción atómica de deuterio que se expresa según la ecuación (2.2)

$$\alpha = \frac{[D]}{[D] + [H]} \quad (2.2)$$

Para proporciones de agua deuterada superiores al 99,0 % se ha utilizado la ecuación experimental (2.3). Se ha comprobado que el electrodo de vidrio da una lectura en D_2O inferior a 0,4 unidades cuando la proporción de deuterio es superior al 99,0 %, obteniendo así la ecuación (2.3)

$$pD = pH + 0,4 \quad (2.3)$$

2.2.4. POTENCIOMETRÍA (pH-Stat)

Las constantes de ionización de los compuestos *O*-fosforiletanolamina (PEA), *O*-fosfo-DL-serina (PSer), APP, 1,2-dihexanoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (DHPE) y 1,2-dihexanoil-*sn*-glicero-3-fosfo-L-serina (DHPS) fueron determinadas por valoración potenciométrica utilizando un equipo *Metrohm Titrino 718 pH-Stat*.

Las disoluciones acuosas de PEA, PSer y APP, de concentración inicial 10 mM, se valoraron por duplicado a 25 °C y/o 37 °C. Se utilizó como valorante una disolución estandarizada de NaOH 0,1 M. La fuerza iónica de las disoluciones se mantuvo a 0,1 M, utilizando KCl.

Una disolución acuosa 2 mM del compuesto DHPS se valoró por duplicado a 37 °C con una disolución estandarizada de NaOH 10 mM, ajustando todas las disoluciones a una fuerza iónica total de 0,1 M con KCl.

En el caso concreto de la valoración de la DHPE se partió de su disolución ácida, ajustada a pH 3,4 con HCl. Se utilizaron disoluciones 2 mM de DHPE y una disolución estandarizada de NaOH 10 mM, como valorante. La valoración se realizó a 37 °C y todas las disoluciones se ajustaron a una fuerza iónica de 0,1 M con KCl.

2.3. TRATAMIENTO MATEMÁTICO DE LOS RESULTADOS

EXPERIMENTALES

2.3.1. DETERMINACIÓN DE CONSTANTES CINÉTICAS Y DE EQUILIBRIO.

PROGRAMA DYNAFIT

La variación de la concentración de reactivos y productos determinada en el análisis de las diferentes mezclas de reacción se ajustó a su respectivo esquema cinético utilizando el programa DynaFit [KUZMIC, 1996] con la finalidad de determinar las constantes de equilibrio.

El programa DynaFit se distribuye gratuitamente con licencia académica y presenta ciertas ventajas respecto a otros programas de ajuste de datos cinéticos, KINSIM [BARSHOP, 1983] y FITSIM [ZIMMERLE, 1989], como son la simulación de equilibrios previos de isomerización o la consideración de concentraciones, señal analítica o absortividad molar como parámetros ajustables.

Para realizar un ajuste, el programa carga dos archivos de entrada. El primer archivo contiene los datos experimentales y el otro contiene la codificación simbólica de las ecuaciones químicas que forman el mecanismo de la reacción, así como, la estimación inicial de las constantes cinéticas y las rutas de localización de todos los ficheros de lectura y de presentación de resultados.

Theoretical Model			
Reaction Mechanism			
	PM + FA	\rightleftharpoons CA	K_1
	CA	\rightleftharpoons HE	K_2
	FA + HE	\rightleftharpoons CHE	K_3
Formula Matrix			
	CA	HE	CHE
PM	1	1	1
FA	1	1	2
Stability constant matrix B			
	CA	HE	CHE
K_1	1	1	1
K_2	0	1	1
K_3	0	0	1

Figura 2.1. Ejemplo del sistema matricial obtenido a partir del esquema de reacción de la PM con el FA.

El programa carga el esquema cinético y traduce el simbolismo químico en un sistema matricial [SMITH, 1982] (figura 2.1). Seguidamente, se integran numéricamente las ecuaciones diferenciales ordinarias no lineales de primer orden mediante una modificación del método multidimensional de Newton–Raphson [TING-PO, 1972]. La regresión no lineal se realiza mediante la variación de Reich del algoritmo de ajuste por mínimos cuadrados de Levenberg–Marquardt [REICH, 1992]. Los criterios de convergencia son múltiples [PRESS, 1992][BEVINGTON, 1969][RAWLINGS, 1988][RAYNER, 1989][DRAPER, 1981]. Los errores estándar de los parámetros individuales se calculan a partir de la raíz cuadrada de los elementos diagonales de la matriz varianza – covarianza final (figura 2.2). Finalmente, el programa muestra las matrices a partir de las cuales se calcula el error estándar y hasta cinco pruebas gráficas de la precisión del ajuste basadas en la posible no aleatoriedad de los residuales (figura 2.3) [HAMAKER, 1978][MANNERVIK, 1981][D’AGOSTINO, 1986].

Covariance matrix				Eigenvalues and eigenvectors				
K_1	1	1		Eigenvalues	0.16	0.56	2.28	
K_2	2	-77	2	$\log_{10}C$	1.14	0.61	0.00	
K_3	3	-11	-27	Set	No.	1	2	3
				K_1	1	68	-40	60
				K_2	2	-72	-31	61
				K_3	3	6	85	50

Figura 2.2. Matrices de covarianza y de valores propios y vectores propios a partir de las cuales se calcula el error estándar de los parámetros individuales.

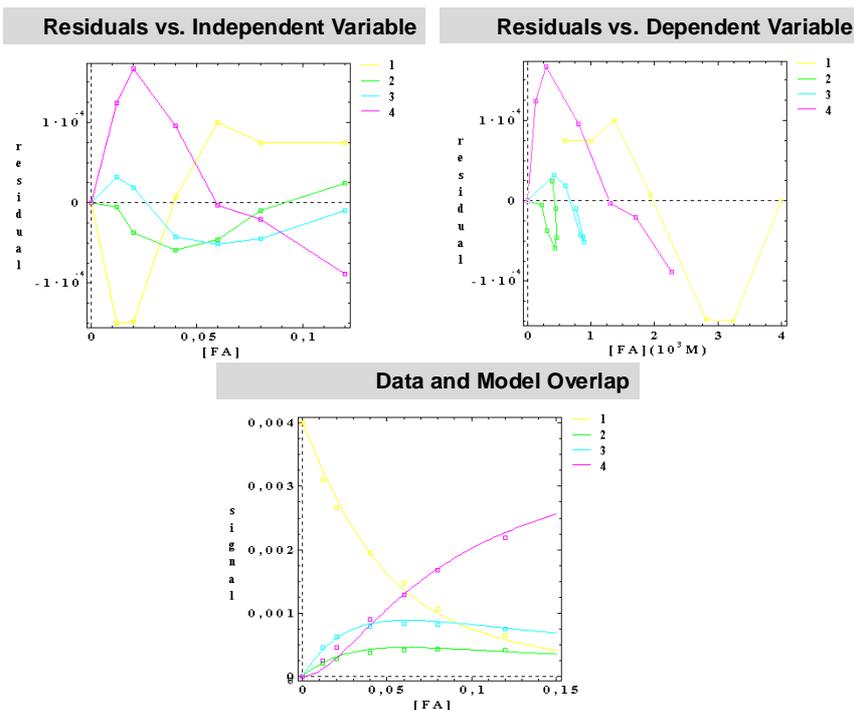


Figura 2.3. Algunas pruebas gráficas de la precisión del ajuste.

2.3.2. DETERMINACIÓN DE CONSTANTES CINÉTICAS Y DE EQUILIBRIO.

PROGRAMA SIGMAPLOT

El programa *Sigmaplot* v. 10,0 [SIGMAPLOT, 2005] fue utilizado para realizar representaciones gráficas y para el tratamiento de algunos de los datos experimentales obtenidos en este trabajo. El programa *Sigmaplot* utiliza el algoritmo de Marquardt-Levenberg [MARQUARDT, 1963] para encontrar los parámetros que aporten el mejor ajuste entre la ecuación teórica y los datos experimentales. El programa posee alrededor de cien ecuaciones de ajuste, a la vez que posibilita la edición de nuevas ecuaciones. En ambos casos, se deben especificar los parámetros iniciales (hasta un máximo de 25 y de 10 variables independientes de la ecuación) y fijar el intervalo del valor de estos parámetros. El ajuste se realiza optimizando el valor de los parámetros que minimiza el valor de la suma del cuadrado de la diferencia entre el valor observado y el predicho para las variables dependientes. Este proceso es iterativo y se repite hasta que el error relativo es inferior al valor de tolerancia establecido, es decir, hasta que se consigue la convergencia. En este sentido, el programa permite cambiar los valores de tolerancia y el número de iteraciones preestablecidos. Finalmente, el programa proporciona una representación de los valores obtenidos que se ajustan a la ecuación, así como un informe con el valor de los parámetros y un análisis estadístico completo.

El análisis estadístico de los datos realizado por el *SigmaPlot* incluye el coeficiente de correlación de los datos experimentales a la ecuación teórica con su correspondiente error estándar. De cada parámetro se da el error estándar, la distribución t de Student y el factor de

inflación de la varianza. Se detalla también un análisis completo de la varianza (ANOVA) y se incluyen los tests estadísticos de PRESS (residual predicho de la suma de cuadrados), Durbin-Watson (autocorrelación de los residuales) y test de normalidad.

A continuación se indican los estudios realizados con este programa, especificando en cada caso la ecuación utilizada para el ajuste de los datos experimentales.

▪ **Determinación de las constantes de ionización de la 4-aminometilpiridina y la PM por valoración de ¹H-RMN**

Los desplazamientos químicos de un compuesto con propiedades ácido/base dependen del pH de la disolución, de tal manera que el p*K_a* se puede determinar utilizando señales de ¹H-RMN o de cualquier otro núcleo RMN activo (¹³C, ¹⁵N, ³¹P, ¹⁹F,...). Por tanto, la determinación de las constantes de ionización en D₂O para la PM y la 4-aminometilpiridina (PAM) se realizaron examinando la variación en el desplazamiento químico de las señales de protón en el rango de pD de 6,0 – 13,0, lo que permite determinar la constante de ionización del grupo amino para ambos compuestos y del N piridínico de la PM.

La disociación de un protón en un compuesto ácido HA (ecuación 2.4) cambia la densidad electrónica de la molécula, por lo que las especies HA y A⁻ presentan diferentes desplazamientos químicos denominados como δ_{HA} y δ_{A⁻}. La mayoría de ácidos en disolución acuosa se caracterizan por una rápida transferencia de protones en la escala temporal de RMN. Así, el desplazamiento químico observado (δ_{obs}) para cualquier núcleo adyacente representa la concentración media ponderada de los desplazamientos químicos de cada especie en el equilibrio (ecuación 2.5).



$$\delta_{obs} = \frac{\delta_{HA}[\text{HA}] + \delta_{A^-}[\text{A}^-]}{[\text{HA}]_T} \quad (2.5)$$

Siendo [HA]_T la concentración total del compuesto, que se define como la suma de las concentraciones de las especies HA y A⁻. Este balance de materia y la ecuación que define la constante de equilibrio de la reacción 2.4 se sustituyen en la ecuación 2.5 obteniendo finalmente la siguiente ecuación:

$$\delta_{obs} = \frac{\delta_{HA}[\text{D}_3\text{O}^+] + \delta_{A^-}K_a}{K_a + [\text{D}_3\text{O}^+]} \quad (2.6)$$

La representación de δ_{obs} vs pD y el posterior tratamiento de esta ecuación no lineal proporciona el valor de tres constantes (K_a , δ_{HA} y δ_{A^-}), aunque los valores preliminares de δ_{HA} y δ_{A^-} pueden ser supuestos directamente de los datos experimentales. El valor de las constantes obtenidas se especifica en el artículo IV.

▪ **Determinación de las constantes de equilibrio de formación de la carbinolamina entre el FA y las especies iónicas de la PM y la PAM**

A partir de las constantes de ionización de la PM en D₂O se puede estimar una constante de equilibrio de formación de la CA para cada especie iónica. Teniendo en cuenta que los valores obtenidos experimentalmente están en el intervalo de pD 6–13, no se considera la especie H₃PM²⁺ ni el valor de K_7 . Los equilibrios de disociación de las restantes especies iónicas son:

$$K_2 = \frac{[HPM][H_3O^+]}{[H_2PM^+]} \quad (2.7)$$

$$K_3 = \frac{[PM^-][H_3O^+]}{[HPM]} \quad (2.8)$$

El balance de materia en este intervalo de pD es:

$$[PM]_T = [H_2PM^+] + [HPM] + [PM^-] \quad (2.9)$$

Por lo que se puede deducir:

$$K_{CA} = K_{CA}^A \frac{\frac{[H_3O^+]^2}{K_2 K_3}}{1 + \frac{[H_3O^+]^2}{K_2 K_3} + \frac{[H_3O^+]}{K_3}} + K_{CA}^B \frac{\frac{[H_3O^+]}{K_3}}{1 + \frac{[H_3O^+]^2}{K_2 K_3} + \frac{[H_3O^+]}{K_3}} + K_{CA}^C \frac{1}{1 + \frac{[H_3O^+]^2}{K_2 K_3} + \frac{[H_3O^+]}{K_3}} \quad (2.10)$$

Donde K_{CA}^A es la constante de equilibrio de formación del compuesto CA entre la especie iónica H₂PM⁺ y el FA, K_{CA}^B es la constante de formación entre la especie HPM y FA, y K_{CA}^C es la constante de formación entre la especie PM⁻ y FA. El valor de las constantes obtenidas se especifica en el artículo IV.

▪ **Determinación de las constantes de velocidad correspondientes a reacciones de pseudo-primer orden**

Se estudiaron algunas reacciones de segundo orden en condiciones de pseudo-primer orden. En presencia de un gran exceso de B con respecto a A, la concentración de B no cambiará significativamente durante la reacción, por lo que la ecuación diferencial de este

proceso se escribe según la ecuación 2.11. De este modo, la constante de velocidad k' incluye la concentración de B y la verdadera constante de velocidad (k) (ecuación 2.12). La integración de la ecuación 2.11 y su posterior linealización resulta en la ecuación 2.13, a la cual se ajustan los datos experimentales (concentración, área, absorbancia,...) obtenidos en los artículos I y II.

$$\frac{d[A]}{dt} = -k'[A] \quad (2.11)$$

$$k' = k[B] \quad (2.12)$$

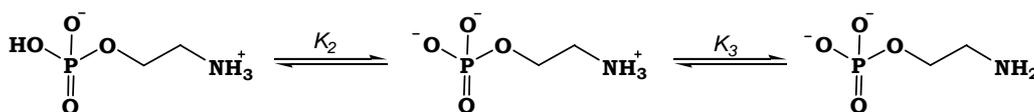
$$\ln[A] = \ln[A]_0 - k't \quad (2.13)$$

▪ **Determinación de las constantes de ionización mediante valoración potenciométrica**

La determinación de las constantes de ionización de los compuestos PEA, PSer, APP, DHPE y DHPS se realizó por valoración potenciométrica utilizando un pH-Stat según se detalla en el apartado 2.2.4 de este trabajo. El número de grupos ionizables de cada compuesto define el número de constantes de ionización a determinar. La ecuación de ajuste de los datos experimentales se obtiene considerando las ecuaciones del balance de materia y de la condición de electroneutralidad para cada sistema.

A continuación se detallan los equilibrios de ionización estudiados para cada compuesto y la ecuación de ajuste que se utilizó para determinar las constantes de ionización de cada compuesto. Para todas las ecuaciones K_w es el producto iónico del agua a la temperatura a la cual se realiza la valoración, K_i son las constantes de ionización, C_0 es la concentración inicial del compuesto a valorar, V_0 es el volumen inicial de la disolución a valorar, C_{Cl^-} es la concentración de HCl y C_{Na^+} es la concentración de NaOH.

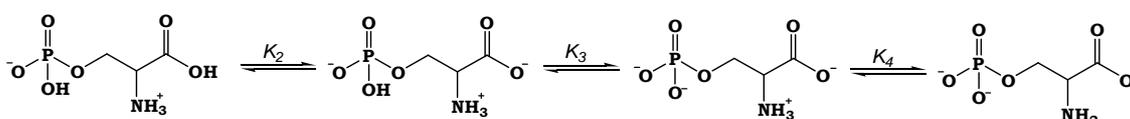
- ♦ Valoración del PEA. El esquema 2.2 muestra los equilibrios de ionización del PEA. Los datos experimentales de variación del volumen en función del pH se ajustaron a la ecuación 2.14. El valor de las constantes obtenidas se especifica en los artículos I y III.



Esquema 2.2. Equilibrios iónicos correspondientes al PEA.

$$V = \frac{C_0 V_0 \left(\frac{K_2}{[H_3O^+]} + \frac{2K_2K_3}{[H_3O^+]^2} - \frac{[H_3O^+]}{C_0} + \frac{K_w}{[H_3O^+]C_0} \right)}{[H_3O^+] - \frac{K_w}{[H_3O^+]} + C_{Na^+}} \quad (2.14)$$

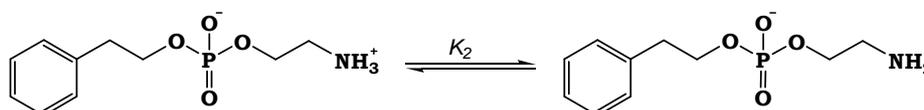
- ♦ Valoración de la PSer. El esquema 2.3 muestra los tres equilibrios de ionización de la PSer que se observaron en su valoración. El ajuste de los datos experimentales se realizó a la ecuación 2.15. El valor de las constantes obtenidas se especifica en los artículos I y III.



Esquema 2.3. Equilibrios iónicos correspondientes a la PSer.

$$V = \frac{C_0 V_0 \left(\frac{1 + \frac{2K_2}{[H_3O^+]} + \frac{3K_2K_3}{[H_3O^+]^2}}{1 + \frac{K_2}{[H_3O^+]} + \frac{K_2K_3}{[H_3O^+]^2} + \frac{[H_3O^+]}{K_4}} - \frac{[H_3O^+]}{C_0} + \frac{K_w}{[H_3O^+]C_0} \right)}{[H_3O^+] - \frac{K_w}{[H_3O^+]} + C_{Na^+}} \quad (2.15)$$

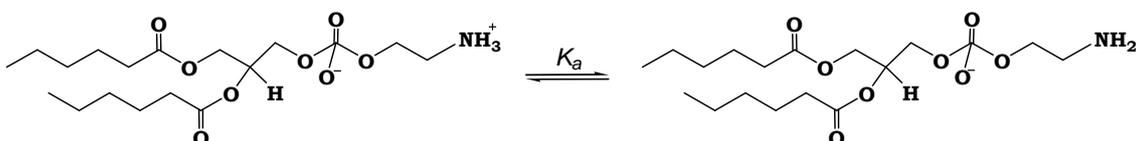
- ♦ Valoración del APP. El esquema 2.4 muestra el equilibrio de ionización del APP que se observó en su valoración. Los datos experimentales de variación del volumen en función del pH se ajustaron a la ecuación 2.16. El valor de las constantes obtenidas se especifica en el artículo I.



Esquema 2.4. Equilibrios iónicos correspondientes al APP.

$$V = \frac{C_0 V_0 \left(\frac{\frac{K_2}{[H_3O^+]}}{1 + \frac{K_2}{[H_3O^+]}} - \frac{[H_3O^+]}{C_0} + \frac{K_w}{[H_3O^+]C_0} \right)}{[H_3O^+] - \frac{K_w}{[H_3O^+]} + C_{Na^+}} \quad (2.16)$$

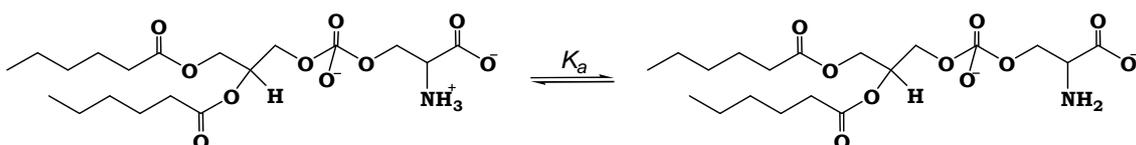
- ♦ Valoración de la DHPE. El esquema 2.5 muestra el equilibrio de ionización de la DHPE que se observó en su valoración. Para obtener una buena curva de valoración se añadió a la disolución a valorar HCl. La concentración inicial de éste compuesto ($C_{Cl^-} = 5 \cdot 10^{-4}$ M) se considera en la ecuación 2.17. El valor de las constantes obtenidas se especifica en el artículo II.



Esquema 2.5. Equilibrios iónicos correspondientes a la DHPE.

$$V = \frac{C_0 V_0 \left(\frac{K_a}{[H_3O^+]} - \frac{[H_3O^+]^2}{C_0} + \frac{K_w}{C_0} + \frac{C_{Cl^-} [H_3O^+]}{C_0} \right)}{[H_3O^+]^2 - K_w + C_{Na^+} [H_3O^+]} \quad (2.17)$$

- ♦ Valoración de la DHPS. El esquema 2.6 muestra el equilibrio de ionización de la DHPS que se observó en su valoración. Comercialmente, se adquiere la sal sódica de la DHPS, por lo que al hacer el balance de cargas debe tenerse en cuenta la concentración de esta sal. De esta manera se obtiene la ecuación 2.18 para ajustar los datos experimentales. El valor de las constantes obtenidas se especifica en el artículo II.



Esquema 2.6. Equilibrios iónicos correspondientes a la DHPS.

$$V = \frac{C_0 V_0 \left(1 + \frac{2K_a}{[H_3O^+]} - \frac{[H_3O^+]}{C_0} + \frac{K_w}{[H_3O^+] C_0} - 1 \right)}{[H_3O^+] - \frac{K_w}{[H_3O^+]} + C_{Na^+}} \quad (2.18)$$

▪ **Determinación de los coeficientes de absorción molar de las BSs derivadas del PLP**

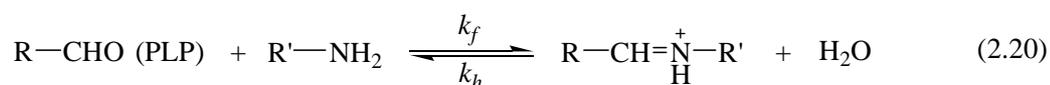
Los coeficientes de absorción molar de las BSs formadas entre el PLP y la DHPE y la DHPS se determinaron a 420 nm a partir de la ecuación 2.19 propuesta por Auld y Bruice [AULD, 1967]. Para la realización del ajuste se consideró que a 420 nm el coeficiente de absorción molar de los nucleófilos es despreciable y el del PLP vale $\epsilon_{PLP} = 2850 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

$$\frac{A_0}{A_\infty - A_0} = \frac{\epsilon_{PLP}}{\epsilon_{BS} - \epsilon_{PLP}} + \frac{\epsilon_{PLP}}{(\epsilon_{BS} - \epsilon_{PLP})K_{eq}[a \text{ min } a]_{eq}} \quad (2.19)$$

donde A_0 y A_∞ son las absorbancias a tiempo cero e infinito, ϵ_{PLP} y ϵ_{BS} son, respectivamente, los coeficientes de extinción molar del PLP y de la BS, y K_{eq} es la constante de equilibrio. Los valores de ϵ_{BS} se obtuvieron mediante un proceso iterativo en el que se comenzó introduciendo los valores de concentración de amina inicial en la ecuación (2.19), lo que proporciona un primer valor de ϵ_{BS} y de K_{eq} . El valor de K_{eq} obtenido se utiliza para calcular la concentración de amina en el equilibrio, y así sucesivamente, hasta que los valores de ϵ_{BS} obtenidos diferían menos del 0,1 %. Los valores obtenidos se especifican en el artículo II.

▪ **Determinación de las constantes cinéticas para la reacción con el PLP**

La ecuación 2.20 corresponde a la reacción de los grupos amino con el PLP. El tratamiento matemático para obtener las constantes cinéticas fue descrito anteriormente en detalle [GARCÍA DEL VADO, 1987]. Brevemente, a partir de la integración de las ecuaciones cinéticas para dicho mecanismo y aplicando la ley de Lambert-Beer, en una longitud de onda en la que el aminofosfato no absorba, se obtiene la ecuación 2.21. En esta ecuación A_0 , A y A_∞ son las absorbancias a tiempo 0, t y en el equilibrio; los parámetros a y b son las concentraciones iniciales de PLP y compuesto amínico, respectivamente; x y x_e son las concentraciones de la BS a tiempo t y en el equilibrio, respectivamente. Los valores de k_{ap} se obtienen de la pendiente de la representación de $\ln(A_\infty - A_t)$ vs tiempo, siempre que $ab \gg xx_e$ (figura 2.4). Manteniendo constante la concentración de PLP y variando la concentración de grupo amino en un amplio rango se obtienen diversos valores de k_{ap} que se ajustan a la ecuación 2.22 (figura 2.5), donde k_f y k_h son las constantes cinéticas para la formación y la hidrólisis, respectivamente, de la BS. Esta metodología se ha utilizado en los artículos I y III.



$$\ln \frac{A_\infty - A_0}{A_\infty - A} = -\ln \frac{ab - xx_e}{x_e^2} + k_{ap}t \quad (2.21)$$

$$k_{ap} = \left\{ [k_h + k_f(a+b)]^2 - 4abk_f^2 \right\}^{1/2} \quad (2.22)$$

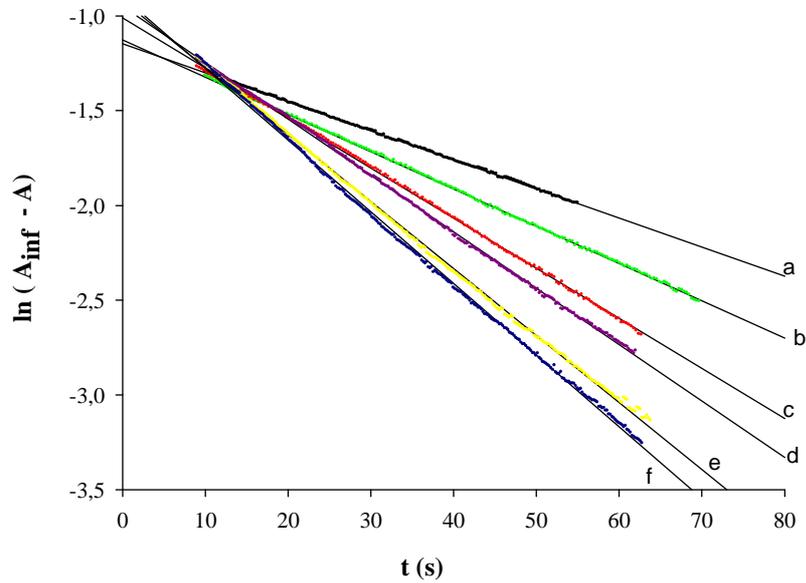


Figura 2.4. Ejemplo de la representación del $\ln(A_{\infty}-A)$ frente al tiempo a 420 nm correspondiente a la mezcla de reacción entre el PLP (0,16 mM) y diversas concentraciones de PEA a pH 9,0 y 25°C. Concentraciones de PEA: a) 7 mM, b) 10,6 mM, c) 14 mM, d) 17,7 mM, e) 20 mM, f) 25 mM.

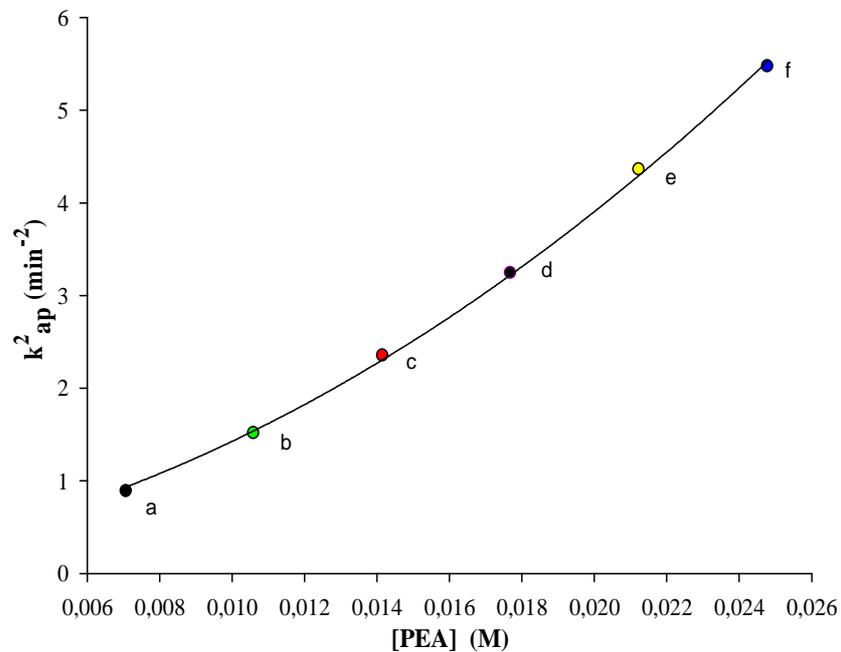
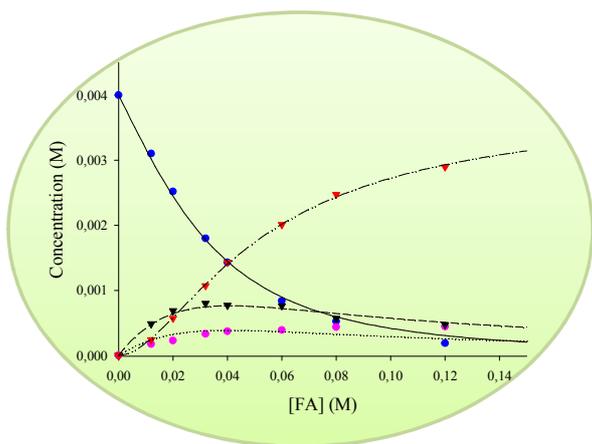


Figura 2.5. Variación de la k_{ap}^2 correspondiente a la mezcla de reacción entre el PLP (0,16 mM) y diversas concentraciones de PEA a pH 9,0 y 25°C. Los valores experimentales se representan como puntos, mientras que en trazo continuo se representa el mejor ajuste de los datos experimentales a la ecuación 2.21. Concentraciones de PEA a) 7 mM, b) 10,6 mM, c) 14 mM, d) 17,7 mM, e) 20 mM, f) 25 mM.



Capítulo 3.

RESULTADOS

***ARTÍCULO I. UNDERSTANDING NON-ENZYMATIC
AMINOPHOSPHOLIPID GLYCATION AND ITS
INHIBITION. POLAR HEAD FEATURES AFFECT
THE KINETICS OF SCHIFF BASE FORMATION***

Caldés, C.; Vilanova, B.; Adrover, M.; Muñoz, F.; Donoso, J.
Understanding non-enzymatic aminophospholipid glycation
and its inhibition. Polar head features affect the kinetics of
Schiff base formation. *Biorg. Med. Chem.*, **2011**, *19*, 4536.

***ARTÍCULO II. EL SUSTITUYENTE HIDROFÓBICO AFECTA A
LA CINÉTICA DE FORMACIÓN DE LAS BASES
DE SCHIFF DE AMINOFOSFOLÍPIDOS***

El sustituyente hidrofóbico afecta a la cinética de formación de las bases de Schiff de aminofosfolípidos

Catalina Caldés, Bartolomé Vilanova, Josefa Donoso, Francisco Muñoz.

Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut (IUNICS). Departament de Química. Universitat de les Illes Balears. Cra. Valldemossa km 7.5, Ed. Mateu Orfila i Rotger, E-07122, Palma de Mallorca, España.

RESUMEN

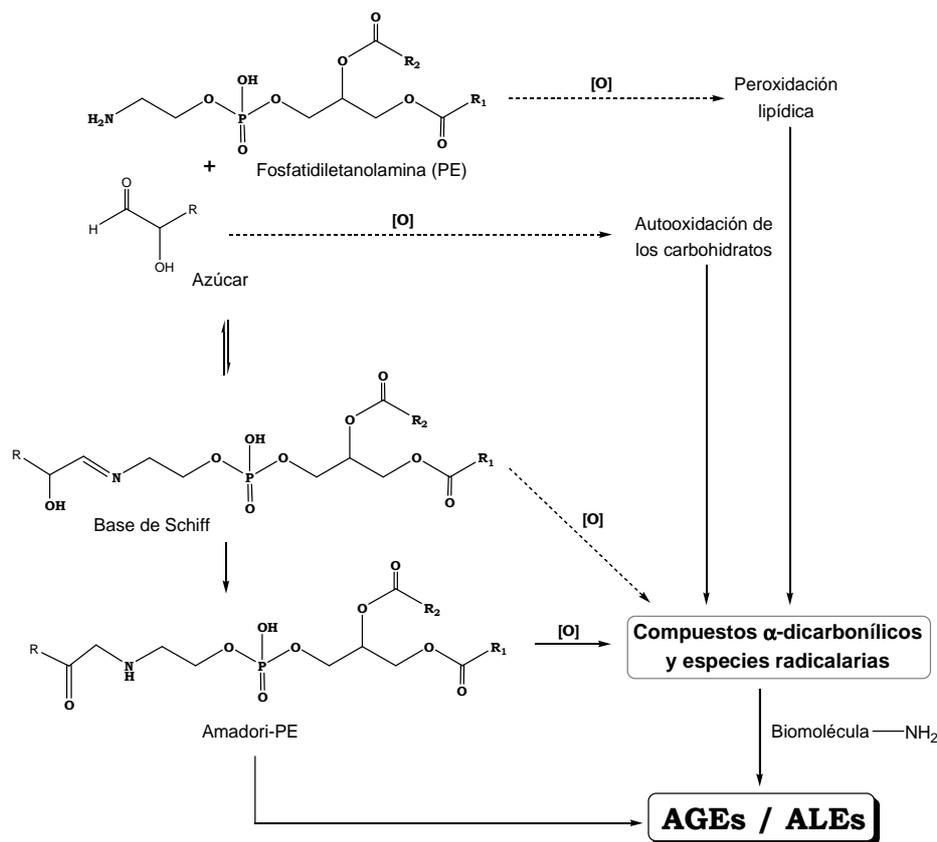
La glicación no enzimática de los aminofosfolípidos hace referencia a su reacción con azúcares reductores y está relacionada con algunas patologías asociadas a la diabetes y al envejecimiento. Los estudios cinéticos sobre esta reacción son escasos, aunque necesarios para profundizar en el conocimiento de la modificación química de las cabezas polares de los aminofosfolípidos, cuyo paso inicial es la formación de una base de Schiff (BS). En este trabajo, se estudia, en condiciones fisiológicas de pH y temperatura, la reacción de formación de las BSs entre la 1,2-dihexanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DHPE) y la 1,2-dihexanoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina (DHPS) con varios compuestos con capacidad glicante y con un buen inhibidor de las reacciones de glicación de biomoléculas, el 5'-fosfato de piridoxal (PLP). Los resultados muestran que los sustituyentes hidrofóbicos de los aminofosfolípidos disminuyen la constante microscópica de formación de las BSs con los compuestos glicantes, k_f , respecto a los aminofosfatos correspondientes (*O*-fosforiletanolamina y *O*-fosfo-DL-serina). Por otra parte, la disminución del pK_a del grupo amino, inducida por el sustituyente hidrófobo, provoca una mayor proporción de BS formada a pH 7,4 respecto a los aminofosfatos. Además, el entorno polar en la BS favorece su hidrólisis, como así lo demuestran los valores de las constantes de hidrólisis determinadas para las BSs de PLP-aminofosfolípido.

1. INTRODUCCIÓN

La glicación de biomoléculas está relacionada con diversas patologías y complicaciones clínicas asociadas al envejecimiento, a la *diabetes mellitus*, al cáncer y a la enfermedad de Alzheimer [VAN HEIJST, 2005][TAKEUCHI, 2008]. Como se ve en el esquema 1, la glicación se inicia por la reacción de los grupos amina libre de las biomoléculas con los grupos carbonílicos de azúcares reductores y/o compuestos derivados para formar inicialmente una base de Schiff (BS), la cual puede reordenarse formando el compuesto de Amadori. La evolución de éste a través de un conjunto heterogéneo de reacciones deriva en los productos finales de la glicación avanzada (AGEs), que son capaces de provocar modificaciones estructurales y funcionales de proteínas, ácidos nucleicos y lípidos.

Se ha comprobado que la glicación lipídica cambia el orden lipídico y la constante dieléctrica de la membrana, lo que altera las interacciones lípido-lípido y lípido-proteína provocando la inhibición de las enzimas de membrana (por ejemplo, la Na^+, K^+ -ATPasa y la Ca^{2+} -ATPasa) [OBSIL, 1999][LEVI, 2008]. Además, se incrementa la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), especialmente en las lipoproteínas de baja densidad (LDL) [OAK, 2000][RAVANDI, 2000]. La oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) resulta en la generación de especies oxigenadas radicalarias (ROS), como el PCOOH (hidroperóxido de fosfatidilcolina) [MIYAZAWA, 2008] y de especies carbonílicas y dicarbonílicas altamente reactivas (RCS) [PAMPLONA, 2011] (esquema 1). Estos compuestos derivados de la oxidación lipídica también pueden reaccionar con las biomoléculas formando los productos finales de la lipoxidación avanzada (ALEs), aumentando así los efectos negativos de la glicación de las biomoléculas [THORPE, 2003].

Las implicaciones biológicas comentadas anteriormente explican los esfuerzos realizados en los últimos años en el estudio de la reacción entre lípidos y grupos carbonílicos. Hasta el momento, se ha detectado en sistemas *in vivo* la formación de la BS a partir de la reacción entre diversos grupos carbonílicos y dos aminofosfolípidos naturales: la fosfatidiletanolamina (PE) y la fosfatidilserina (PS) [HAZEN, 1999][BREITLING-UTZMANN, 2001][SOLÍS-CALERO, 2010]. También se ha identificado y cuantificado el producto Amadori-PE y algunos AGEs, como la carboximetil-PE y la carboxietil-PE, en plasma y en eritrocitos de pacientes diabéticos [FOUNTAIN, 1999][NAKAGAWA, 2005][SHOJI, 2010][SOOKWONG, 2011]. Por otro lado, se ha demostrado que el PLP puede condensar fácilmente con la PE [HIGUCHI, 2006], detectándose el compuesto PE-PLP en glóbulos rojos humanos [NAKAGAWA, 2008][MIYAZAWA, 2012]. Adicionalmente, se ha evidenciado que los niveles de Amadori-PE se reducen al administrar un suplemento dietético de PLP en ratas con diabetes inducida [TOKITA, 2005][ASAI, 2009].



Esquema 1

En un estudio reciente, hemos analizado la influencia de la cabeza polar de los aminofosfolípidos sobre la cinética de formación de la BS. En particular, se ha estudiado la reactividad entre los compuestos *O*-fosforiletanolamina (PEA) y *O*-fosfo-DL-serina (PSer) con azúcares reductores y el PLP. En dicho estudio, se observó que la constante de equilibrio de la reacción del PEA y la PSer con el PLP es menor respecto al valor determinado para la reacción del PLP con la glicina y la serina, como consecuencia de la existencia del grupo fosfato en los aminofosfatos. Además, la presencia de un grupo carboxílico en posición α respecto a la amina en la PSer disminuye la constante de formación de la BS respecto al PEA. Por otro lado, las constantes cinéticas de formación de la BS de los aminofosfatos con el PLP son cuatro órdenes de magnitud mayores que las determinadas para los azúcares reductores, lo que confirma el potencial del PLP como inhibidor competitivo de la glicación de los aminofosfatos [CALDÉS, 2011].

Los aminofosfolípidos de interés biológico presentan en su estructura un grupo fosfato sustituido por una molécula de glicerol en la que se han esterificado dos ácidos grasos. Por tanto, sería de interés examinar la glicación en modelos más similares estructuralmente a los aminofosfolípidos, que los utilizados en el estudio anterior. En este trabajo, se ha estudiado la reactividad de la 1,2-dihexanoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (DHPE) y la 1,2-dihexanoil-*sn*-glicero-3-fosfo-L-serina (DHPS) (figura 1) con azúcares reductores (la glucosa, la arabinosa y el

acetol) y con el PLP (un vitámero B₆ que actúa como inhibidor de la glicación de biomoléculas [HIGUCHI, 2006][MIYAZAWA, 2012]). Los compuestos seleccionados son dos aminofosfolípidos de bajo peso molecular, ya que sus cadenas de ácido graso son más cortas que las de los lípidos naturales constituyentes de las membranas celulares, lo que hace que sean más solubles y se pueda trabajar en concentraciones inferiores a su CMC.

En estudios anteriores ya se usaron la DHPE y la DHPS como modelos de aminofosfolípidos en distintos sistemas biológicos. Koppaka y cols. utilizaron la DHPS en el estudio de la activación de la protrombina iniciada por el factor X_a [KOPPAKA, 1996]. Por otro lado, la DHPE se ha utilizado como sonda fluorescente para el reconocimiento molecular de vesículas [KOFUNE, 2000], como sustrato para el estudio de los movimientos transmembranales de la PE [MACHAIDZE, 2002, 2003] y como ligando de la proteína de unión de la PE (PEBP) para analizar las propiedades de su centro de unión [SHEMON, 2010].

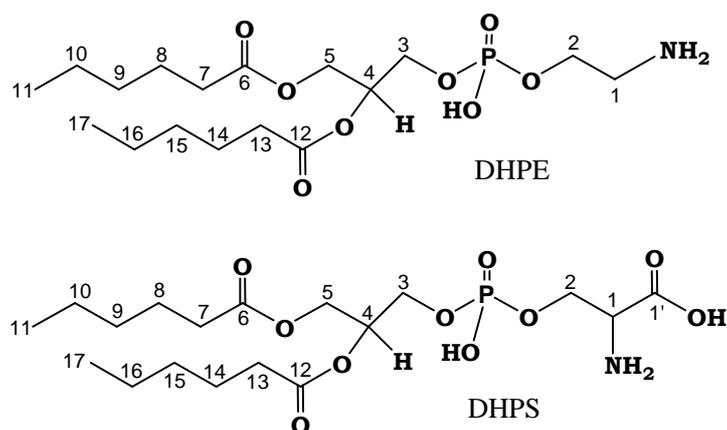


Figura 1. Estructura química de la 1,2-dihexanoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (DHPE) y la 1,2-dihexanoil-*sn*-glicero-3-fosfo-L-serina (DHPS).

2. EXPERIMENTAL

♦ Material

D-glucosa, D-arabinosa, D₂O (99,9 % D), *O*-fosforiletanolamina (PEA) y 5'-fosfato de piridoxal hidratado (PLP) fueron adquiridos de Sigma–Aldrich; el cianoborohidruro sódico (NaCNBH₃), el dihidrógeno fosfato de potasio y el hidróxido sódico fueron obtenidos de Acros Organics; el acetol fue obtenido de Fluka; la 1,2-dihexanoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (DHPE) y la 1,2-dihexanoil-*sn*-glicero-3-fosfo-L-serina (DHPS) fueron adquiridos de Avanti Polar Lipids. Todos los reactivos se usaron sin ningún tratamiento adicional.

♦ Espectroscopia UV-Visible

Los espectros de absorción fueron adquiridos en un espectrofotómetro de doble haz de la marca Shimadzu UV-2401 PC. Se utilizaron celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico y la disolución

tampón como referencia. La temperatura de las celdas se ajustó a $37 \pm 0,1$ °C mediante un termostato *Shimadzu modelo TCC-240A*. Se registró la absorbancia a 420 nm en función del tiempo de distintas mezclas de reacción entre la DHPE y la DHPS con el PLP (cuya concentración exacta se determinó a 388 nm, $\epsilon = 6600 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ en NaOH 0,1 M [DONOSO, 1986]). La concentración de DHPE y DHPS fue entre 15 y 45 veces superior a la concentración de PLP e inferior a su CMC ($\text{CMC}_{\text{DHPE}} = 7 \text{ mM}$ y $\text{CMC}_{\text{DHPS}} = 12,5 \text{ mM}$ [HERGENROTHER, 1997]). Las disoluciones de todos los compuestos se prepararon en tampón fosfato 0,5 M a pH 7,4, y se confirmó en cada experimento que la diferencia entre el pH inicial y final de la mezcla de reacción nunca fue superior a $\pm 0,04$ unidades. Las medidas de pH se realizaron con un pHmetro *Crison GLP21+* equipado con un electrodo de vidrio modelo 52 09 de 6 mm de diámetro, previamente calibrado con disoluciones tampón acuosas a 37 °C.

♦ Espectroscopia de RMN

Los espectros de RMN se registraron en un equipo Bruker AMX-300, utilizando tubos de 5 mm de diámetro y el ácido 3-(trimetilsilil)-1-propanosulfónico (DSS) como referencia interna. Se realizaron experimentos bidimensionales (^1H , ^{13}C -HMQC) de las reacciones de DHPE y DHPS con glucosa y arabinosa a 37 °C, y experimentos monodimensionales de ^1H para las reacciones de DHPE con acetol y de PEA con arabinosa. Todas las disoluciones estudiadas fueron preparadas en D_2O , utilizando para ello tampón fosfato 0,5 M a pD 7,4 ($\text{pD} = -\log[\text{D}^+]$), y un 13,3 % de MeOD para obtener disoluciones no micelares (esta proporción de MeOD no altera el valor del pH [CASTELLS, 2003]). Las concentraciones de reactivos utilizadas fueron 15 mM de DHPS y DHPE (en el caso de la reacción con acetol seguida monodimensionalmente se utilizó una concentración 10 mM de DHPE), 0,3 M de arabinosa y glucosa, 0,1 M de NaCNBH_3 , 0,2 M de acetol y 10 mM de PEA. Con la excepción de que la reacción de la DHPS con la glucosa se hizo a concentraciones de 12 mM y 0,24 M, respectivamente. La presencia de NaCNBH_3 permite la reducción selectiva de los grupos imina a pH neutro, lo que facilita la detección de las BSs [BORCH, 1971].

♦ Potenciometría

Las constantes de ionización del DHPE y DHPS fueron determinadas por valoración potenciométrica utilizando un equipo *Metrohm Titrino 718 pH-Stat*. Se valoraron por duplicado disoluciones acuosas de concentración 2 mM de estos compuestos con una disolución estandarizada de NaOH 0,01 M, ajustando todas las disoluciones a una fuerza iónica de 0,1 M utilizando KCl. El tratamiento matemático de los datos experimentales se hizo con el programa SigmaPlot v. 10,0 [SIGMAPLOT, 2005].

♦ **Análisis matemático de los datos cinéticos experimentales**

- Determinación de las constantes cinéticas de formación de las BSs derivadas de los grupos carbonílicos con capacidad glicante

El esquema 2 presenta el mecanismo cinético para la formación de la BS de los aminofosfolípidos con los grupos carbonílicos y la posterior reducción por la adición del NaCNBH₃. La velocidad de desaparición del aminofosfolípido corresponde a la ecuación siguiente:

$$\frac{-d[R-NH_2]}{dt} = k_1[R-NH_2][R_1-CO-R_2] - k_{-1}[SB] \quad (1)$$

Aplicando la aproximación del estado estacionario a la BS y asumiendo que $k_2 \gg k_{-1}$, se obtiene:

$$\frac{-d[R-NH_2]}{dt} = k_1[R-NH_2][R_1-CO-R_2] \quad (2)$$

Debe tenerse en cuenta que cada uno de los reactivos presenta además otras reacciones paralelas. Los compuestos carbonílicos pueden estar en disolución en dos formas diferentes: la reactiva (R_1-CO-R_2) y la no reactiva ($R_1-C(OH)(OR')-R_2$). Esta última forma puede estar hidratada ($R' = H$) en el acetol o en la forma cíclica ($R' =$ cadena hidrocarbonada) en la glucosa y la arabinosa. Por tanto, la constante de equilibrio (K_3 , tabla 1) viene dada por:

$$K_3 = \frac{[R_1-CO-R_2]}{[R_1-C(OH)(OR')-R_2]} \quad (3)$$

El equilibrio de protonación de los aminofosfolípidos viene expresada por:

$$K_4 = \frac{[R-NH_2][H_3O^+]}{[R-NH_3^+]} \quad (4)$$

Aplicando para ambos reactivos el balance de masas correspondiente y sustituyendo en la ecuación (2) se obtiene la siguiente expresión:

$$\frac{-d[R-NH_2]}{dt} = \frac{k_1 K_3 K_4 [R_1-CO-R_2]_T [R-NH_2]_T}{[H_3O^+] + K_4 + [H_3O^+] K_3 + K_3 K_4} \quad (5)$$

Se pueden agrupar algunos de los términos constantes, siendo la expresión resultante:

$$\frac{-d[R-NH_2]}{dt} = k_{obs} [R_1-CO-R_2]_T [R-NH_2]_T \quad (6)$$

Donde la constante observada viene dada por:

$$k_{obs} = \frac{k_1 K_3 K_4}{[H_3O^+] + K_4 + [H_3O^+] K_3 + K_3 K_4} \quad (7)$$

Trabajando en condiciones de pseudo-primer orden ($[R_1 - CO - R_2]_T \gg [R - NH_2]$) la ecuación (6) se puede integrar obteniendo:

$$\ln \frac{[R - NH_2]_t}{[R - NH_2]_0} = -k_{obs} [R_1 - CO - R_2]_T t \quad (8)$$

Ajustando los valores experimentales de la concentración del aminofosfolípido en función del tiempo a la ecuación (8) y teniendo en cuenta la concentración inicial del compuesto carbonílico se obtiene el valor de la constante observada (k_{obs}).

- Determinación de las constantes cinéticas de formación e hidrólisis de las BSs de PLP

La formación de la BS entre el PLP y la DHPE y la DHPS se siguió monitorizando la variación de la absorbancia de la mezcla de reacción a 420 nm. Los datos experimentales obtenidos se ajustaron al esquema 3 utilizando el programa DynaFit (BioKin, Pullman, WA) [KUZMIC, 1996], que proporciona los valores de las constantes de velocidad directas (k_f) e inversas (k_i) a pH 7,4 y a 37 °C.

Para la realización del ajuste se consideró que a 420 nm el coeficiente de absorción molar de los nucleófilos es despreciable y el del PLP vale $\epsilon_{PLP} = 2850 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. El coeficiente de absorción molar de las BSs a 420 nm fue calculado mediante la ecuación propuesta por Auld y Bruice [AULD, 1967]:

$$\frac{A_0}{A_\infty - A_0} = \frac{\epsilon_{PLP}}{\epsilon_{BS} - \epsilon_{PLP}} + \frac{\epsilon_{PLP}}{(\epsilon_{BS} - \epsilon_{PLP}) K_{eq} [a \text{ min } a]_{eq}} \quad (9)$$

donde A_0 y A_∞ son las absorbancias a tiempo cero e infinito, ϵ_{PLP} y ϵ_{BS} son, respectivamente, los coeficientes de extinción molar del PLP y de la BS, mientras que, K_{eq} es la constante de equilibrio a pH 7,4. Los valores de ϵ_{BS} se obtuvieron mediante un proceso iterativo en el que se comenzó introduciendo los valores de concentración de amina inicial en la ecuación (9), lo que proporciona un primer valor de ϵ_{BS} y de K_{eq} . El valor de K_{eq} obtenido se utiliza para calcular la concentración de amina en el equilibrio, y así sucesivamente, hasta que los valores de ϵ_{BS} obtenidos difieran menos del 0,1 %. Se estimó que $\epsilon_{BS} = 5200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para la BS de la DHPE y que $\epsilon_{BS} = 5245 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para la BS de la DHPS.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

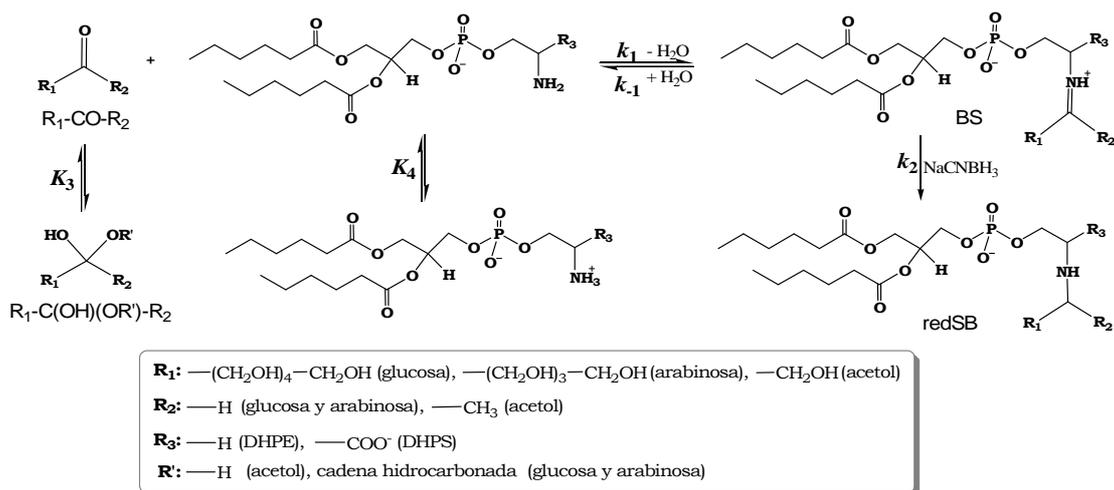
Las propiedades químico-físicas de las membranas lipídicas y sus características de superficie dependen del estado de ionización de las cabezas polares de los lípidos constituyentes. Egorova y cols. determinaron el pK_a intrínseco verdadero (proceso de desprotonación del grupo iónico libre en una disolución acuosa) para el grupo fosfato en el fosfatidilglicerol (pK_a (PO_4^-) = 1,40) y el grupo carboxílico de la PS (pK_a (COO^-) = 2,65) [EGOROVA, 1998], aunque no el del grupo amina.

En este trabajo, se han determinado únicamente las constantes de ionización del grupo amino de los aminofosfolípidos, ya que los demás grupos se encuentran completamente desprotonados a pH fisiológico. Los valores de pK_a obtenidos a 37 °C fueron de $8,8 \pm 0,1$ para la DHPE y $8,6 \pm 0,1$ para la DHPS. En la bibliografía, se demuestra que el pK_a de la cabeza polar amínica de los lípidos disminuye su valor en más de una unidad respecto al grupo amino solo, debido al aumento de la hidrofobicidad [ZHANG, 2011]. Esto concuerda con el hecho de que los datos aquí obtenidos son aproximadamente 1,5 unidades inferiores al valor de pK_a determinado en un trabajo anterior para los aminofosfatos (PEA y PSer) [CALDÉS, 2011].

Zhang y cols. también comprobaron que al variar el número de dobles enlaces (ácido linoleico o ácido oleico) y/o el número de grupos metilo (octil, hexil o butil) en las cadenas laterales de los aminolípidos no se modifica apreciablemente el valor del pK_a del grupo amino, con variaciones de pK_a de $\pm 0,4$ unidades [ZHANG, 2011]. Esto implica que los datos aquí obtenidos sirven de estimación del valor de pK_a intrínseco del grupo amina de los aminofosfolípidos, además de utilizarse en este estudio para el análisis de la reactividad de la DHPE y la DHPS.

3.1. DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES CINÉTICAS DE FORMACIÓN DE LA BS DE LA DHPE Y LA DHPS CON AZÚCARES REDUCTORES

La modificación de la cabeza polar de los aminofosfolípidos por azúcares reductores es biológicamente significativa, ya que estos compuestos forman parte de las lipoproteínas circulantes, como el LDL, y de las membranas celulares, donde tienen un papel importante en el reconocimiento y en la interacción molecular [TERPSTRA, 1998]. El esquema 2 muestra el mecanismo cinético propuesto para la reacción de los aminofosfolípidos de cadena corta con la glucosa, la arabinosa y el acetol, en presencia de reductor. El ataque nucleófilo del grupo amina sobre el grupo carbonílico genera reversiblemente una BS. El NaCNBH_3 reduce selectivamente el enlace imínico de la BS a pH neutro [BORCH, 1971], formando irreversiblemente una amina secundaria (base de Schiff reducida, redSB), lo que facilita la determinación de la constante cinética de formación de la BS.



Esquema 2

La figura 2 muestra los espectros de 2D- 1H , ^{13}C -HMQC para la reacción entre la glucosa y la DHPE, en presencia de reductor. El espectro a $t = 1,3$ h se muestra en negro, mientras que en rojo se observa el espectro adquirido después de 68 h de reacción. Las variaciones más importantes en el espectro son: la señal del $H_2C(1)-C(1)$ del DHPE (1H : 3,26 ppm; ^{13}C : 42,60 ppm) disminuye su intensidad con el tiempo a medida que aparece una nueva señal correspondiente a la redSB (1H : 3,37 ppm; ^{13}C : 50,62 ppm); la señal $H_2C(2)-C(2)$ del DHPE también cambia de posición al formar la redSB, como se aprecia en la figura 2 y paralelamente, aparecen dos nuevas señales a 65 ppm correspondientes al H_2C-C del sustituyente glucídico (R_1) de la redSB.

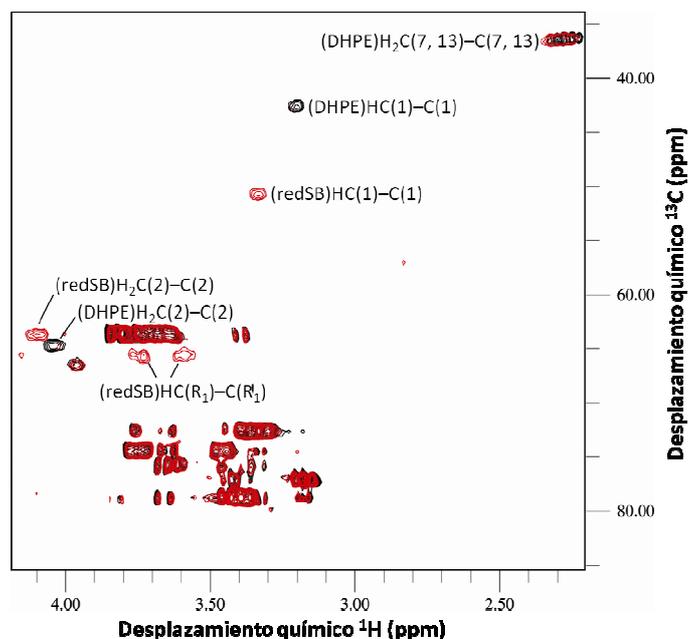


Figura 2. Espectro 2D- 1H , ^{13}C -HMQC para la reacción de la DHPE (15 mM) con glucosa (0,3 M), en presencia de $NaCNBH_3$ (0,1 M) a pD 7,4 y 37 °C. En negro se representa el espectro de la mezcla de reacción a $t = 1,3$ h y en rojo el espectro a $t = 68$ h. Las señales que aparecen entre 70 y 80 ppm corresponden al exceso de glucosa.

En la figura 3 aparece en negro el espectro a $t = 1,07$ h de la reacción de la arabinosa y la DHPS, donde se aprecia que la señal del HC(1)–C(1) de la DHPS está situada a 3,96 ppm (^1H) y 57,68 ppm (^{13}C). A medida que aumenta el tiempo de reacción esta señal va desapareciendo simultáneamente a la aparición de una nueva señal (^1H : 3,31 ppm; ^{13}C : 52,34 ppm) correspondiente a la señal del HC(1)–C(1) de la redSB (espectro en rojo de la figura 3). La señal $\text{H}_2\text{C}(2)$ –C(2) de la DHPS también cambia de posición al formar la redSB, mientras que la señal $\text{H}_a\text{C}(3)$ –C(3) se ve solapada al aparecer una señal del sustituyente R_1 de la redSB formada. Paralelamente, también aparecen otras señales del grupo R_1 de la redSB, observándose algunas de ellas a 73 ppm en la figura 3.

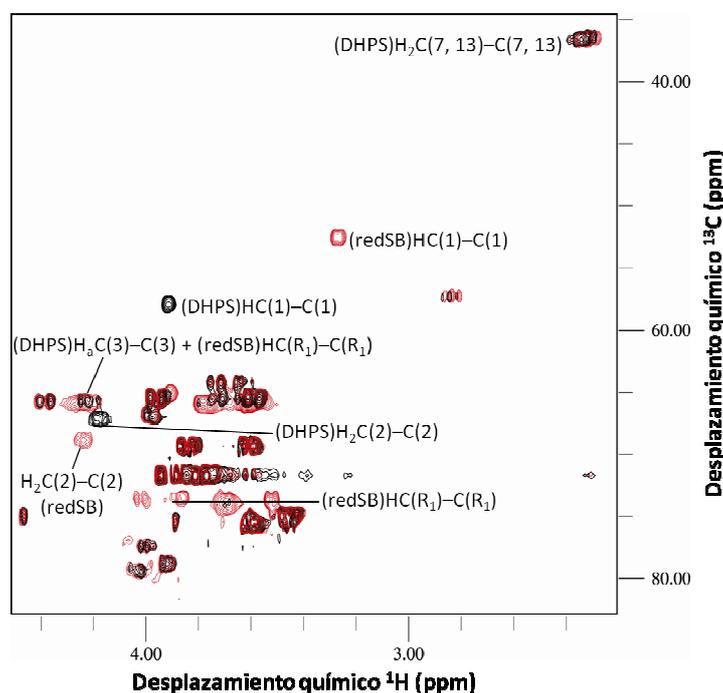


Figura 3. Espectro 2D- ^1H , ^{13}C -HMQC para la reacción de la DHPS (15 mM) con arabinosa (0,3 M), en presencia de NaCNBH_3 (0,1 M) a pD 7,4 y 37 °C. En negro se muestra el espectro de la mezcla de reacción a $t = 1,07$ h y en rojo el espectro a $t = 26$ h.

A partir de la intensidad de las señales de HC(1)–C(1) de 1D y 2D-RMN de los reactivos se ha determinado la variación temporal de la concentración de aminofosfolípido para cada reacción estudiada. Ajustando dicha variación a la ecuación (8) se ha obtenido el valor de las constantes observadas (k_{obs}), el cual está afectado por el efecto del disolvente D_2O –MeOD (6,5:1). Anteriormente, se cuantificó el efecto isotópico cinético del D_2O en la reacción de los aminofosforos con grupos carbonílicos obteniendo que $k^H/k^D = 1,3$ [CALDÉS, 2011]. En este trabajo, se utilizó un 13,3 % de metanol para solubilizar los aminofosfolípidos, por lo que se determinó el efecto cinético del MeOD utilizando como modelo de estudio la reacción de formación de la BS del PEA con arabinosa por ^1H -RMN. En presencia de MeOD, el valor de la constante (k_{obs}) es $0,075 \text{ M}^{-1}\text{h}^{-1}$, mientras que en 100 % de D_2O se obtuvo que $k_{obs} = 0,066 \text{ M}^{-1}\text{h}^{-1}$. Para comparar

los resultados con otros datos obtenidos en H₂O se combinan los dos efectos, obteniendo que el factor corrector de las constantes cinéticas corresponde a $k^H/k^{D-MeOD} = 1,14$.

En la Tabla 1 se muestran los valores de k_{obs} corregidos para la DHPE y la DHPS, donde aparecen también los compuestos PEA y PSer para facilitar su comparación. Los valores de las constantes cinéticas microscópicas de formación de las BS (k_1) mostradas en la Tabla 1 se calcularon mediante la ecuación (7) a partir de los valores de k_{obs} .

Como en estudios previos, la reactividad de los compuestos glicantes muestra una clara relación entre el aumento de su reactividad (k_1) y el aumento de la electrofilia [ADROVER, 2007, 2009][CALDÉS, 2011]. Así, puede observarse que el orden creciente de electrofilia, acetol < arabinosa < glucosa, coincide con el valor creciente de k_1 obtenido para la reacción de estos grupos carbonílicos y los aminofosfolípidos. En la tabla 1, se observa que el valor de k_1 para la DHPS es menor que el del DHPE, esta disminución también se observa en la comparación del PEA con la PSer. La constante k_1 pone de manifiesto que la reactividad intrínseca de los compuestos con grupos carboxílicos en posición α respecto a la amina es menor que aquellos nucleófilos que no presentan este grupo. Por otro lado, los valores de k_1 para la DHPE y la DHPS son de 3 a 7 veces inferiores a los determinados para los compuestos PEA y PSer, lo que indica que la eliminación de una carga negativa y la adición de un grupo hidrofóbico en la estructura del aminofosfato disminuye la reactividad de estos compuestos frente a los grupos carbonílicos con capacidad glicante.

Tabla 1. Constantes cinéticas para las reacciones a pH 7,4 a 37 °C.

Compuesto		DHPE	DHPS	PEA ^d	PSer ^d
Acetol (^a $K_3 = 4,9 \cdot 10^1$)	k_{obs} (M ⁻¹ h ⁻¹)	$9,6 \cdot 10^{-1c}$	–	$1,8 \cdot 10^{-1}$	–
	k_1 (M ⁻¹ h ⁻¹)	$2,6 \cdot 10^1$	–	$1,3 \cdot 10^2$	–
Arabinosa (^b $K_3 = 3,0 \cdot 10^{-4}$)	k_{obs} (M ⁻¹ h ⁻¹)	$7,0 \cdot 10^{-1c}$	$4,0 \cdot 10^{-1c}$	$8,7 \cdot 10^{-2}$	$7,8 \cdot 10^{-2}$
	k_1 (M ⁻¹ h ⁻¹)	$6,1 \cdot 10^4$	$2,2 \cdot 10^4$	$2,0 \cdot 10^5$	$1,3 \cdot 10^5$
Glucosa (^b $K_3 = 2,0 \cdot 10^{-5}$)	k_{obs} (M ⁻¹ h ⁻¹)	$7,9 \cdot 10^{-2c}$	$3,7 \cdot 10^{-2c}$	$1,7 \cdot 10^{-2}$	$9,2 \cdot 10^{-3}$
	k_1 (M ⁻¹ h ⁻¹)	$1,0 \cdot 10^5$	$3,1 \cdot 10^4$	$5,9 \cdot 10^5$	$2,3 \cdot 10^5$

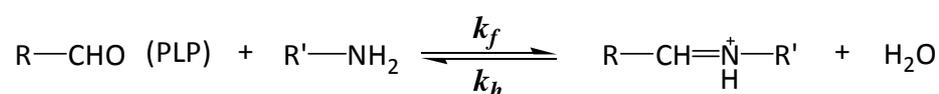
^a[GLUSHONOK, 2003] ^b[DWORKIN, 2000] ^c Estos valores están corregidos por el efecto cinético de la mezcla de disolventes D₂O–MeOD. ^d[CALDÉS, 2011].

La constante observada, k_{obs} , aporta información de la eficiencia de la reacción en condiciones fisiológicas. Los valores de k_{obs} para los compuestos DHPE y DHPS son entre 4 y 8 veces mayores que para los aminofosfos, debido a su mayor proporción de grupos amino libre a pH = 7,4 (3,8 % para la DHPE y 5,9 % para la DHPS frente al 0,14 % para el PEA y 0,20 % para la PSer). Como se ha comentado anteriormente, el valor del pK_a está directamente relacionado con el aumento de la hidrofobicidad [ZHANG, 2011], generada por las cadenas hidrocarbonadas de los aminofosfolípidos.

Actualmente, la información sobre la glicación no enzimática de los aminofosfolípidos en la bibliografía es contradictoria. En una recopilación reciente se afirma que la PE, pero no la PS, es susceptible de glicarse en condiciones hiperglucémicas formando el Amadori-PE [MIYAZAWA, 2012], basándose en que en algunos estudios no se detectaron compuestos de PS glicados en el plasma y glóbulos rojos de pacientes diabéticos y pacientes control [RAVANDI, 1996][NAKAGAWA, 2005]. Sin embargo, se ha observado que la PE y la PS reaccionan para formar los AGEs correspondientes (N-carboximetil-PE y N-carboximetil-PS) tanto *in vivo* como *in vitro*, aunque el producto mayoritario depende del sistema estudiado [FOUNTAIN, 1999]. Por otro lado, en los resultados de Hazen y cols. se aprecia claramente que tiene lugar la reacción del p-hidroxifenilacetaldehído en condiciones reductoras en glóbulos rojos y en DPPE (16:0) y DMPS (14:0), como lípidos estándar, obteniendo que la PE forma una cantidad mayor de redSB que la que se forma a partir de la PS [HAZEN, 1999]. Nuestros resultados, mostrados en la tabla 1, indican que tanto la eficiencia como la reactividad de la DHPE son superiores a la de la DHPS en la primera etapa de la glicación. Un factor determinante de la eficiencia en la formación de la BS es el valor de pK_a de los posibles nucleófilos, el cual está fuertemente influenciado por las condiciones del entorno [FERNÁNDEZ, 1977]. De este modo, el contacto entre los lípidos en la membrana y su diferente composición modifica el valor del pK_a [CVEC, 1990][RAJASEKARAN, 1994], lo que también modificaría la reactividad de los aminofosfolípidos frente a los grupos carbonílicos. Aunque, la formación de una BS es la etapa inicial en el proceso de la glicación, existen otros factores que condicionan la formación posterior del compuesto de Amadori y de los AGEs [WILLIAMS, 2011].

3.2. EFECTO INHIBIDOR DEL PLP

Se ha investigado el efecto inhibidor de varios compuestos, como la aminoguanidina, la carnosina, el α -tocoferol y los vitámeros B₆, en la glicación de aminofosfolípidos [HIGUCHI, 2006]. De entre todos, el PLP fue señalado como el inhibidor más potente de la glicación de aminofosfolípidos [HIGUCHI, 2006], detectándose el compuesto PE-PLP en glóbulos rojos humanos [NAKAGAWA, 2008]. El mecanismo de inhibición consiste en la condensación del PLP con el grupo amino del aminofosfolípido para formar una BS estable (esquema 3). En un trabajo anterior de nuestro grupo, se realizó un estudio cinético de la formación e hidrólisis de las BSs de PLP-aminofosfato. En este trabajo, ampliamos el estudio analizando la reactividad del PLP con la DHPE y la DHPS.



Esquema 3

El proceso de formación de la BS es reversible, y se ha estudiado siguiendo el incremento de la absorbancia con el tiempo a 420 nm. La figura 4 muestra las variaciones observadas para la reacción entre el PLP y diversas concentraciones de DHPE (para la DHPS también se observó el mismo comportamiento). La variación de la absorbancia con respecto al tiempo se ajustó al esquema 3 con el método de regresión no lineal Dynafit [KUZMIC, 1996], obteniendo los valores de las constantes cinéticas de formación (k_f) y de hidrólisis (k_h), y por tanto, su constante de equilibrio (K_{eq}) a pH 7,4 y a 37 °C, las cuales se recogen en la tabla 2. A su vez, se han tabulado los valores de K_{eq} obtenidos a partir de la ecuación (9), observando que el error entre los dos métodos es inferior al 8 %.

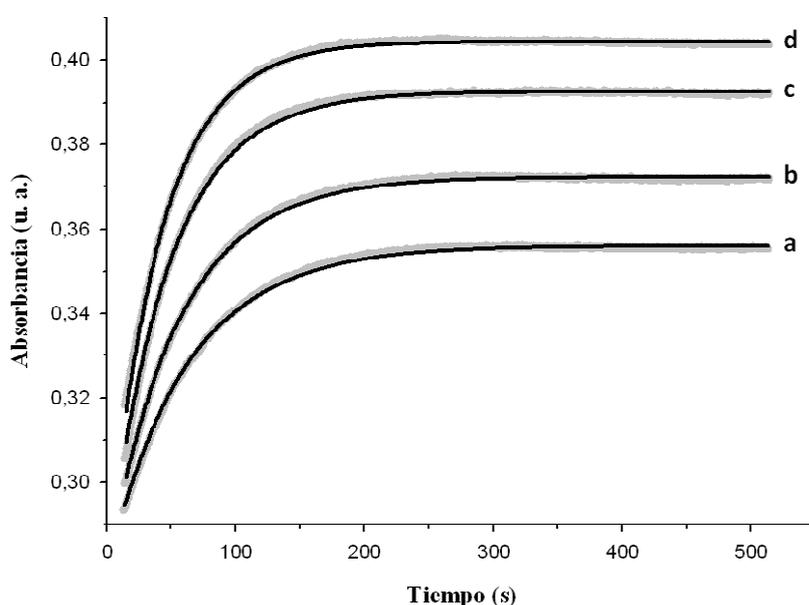


Figura 4. Variación temporal de la absorbancia a 420 nm de la reacción entre el PLP (0,98 mM) y diversas concentraciones de DHPE a pH 7,4 y 37 °C. La línea negra continua es el ajuste obtenido con el programa Dynafit [KUZMIC, 1996], mientras que los valores experimentales se muestran como puntos en gris. Concentraciones de DHPE: 1,5 mM (a), 2 mM (b), 3 mM (c), 3,5 mM (d).

El valor de k_f es menor para la DHPS que para la DHPE, como se ha observado anteriormente en sus reacciones con los azúcares reductores. Es decir, la presencia del grupo carboxilato dificulta la formación de la BS, lo que también se observa en las reacciones del PLP con PEA/PSer o con aminas primarias/aminoácidos [VÁZQUEZ, 1990]. También se determinaron las constantes de hidrólisis de la BS, k_h , observando que los compuestos que contienen el grupo carboxílico presentan los mayores valores para esta constante.

Por otro lado, el valor de k_f es casi tres veces superior para los aminofosfolípidos que para los aminofosfatos, comparando las parejas DHPE/PEA y DHPS/PSer. Esta diferencia se atribuye a la presencia de sustituyentes apolares, los cuales claramente favorecen la formación de la BS. Sin embargo, los valores de k_h se reducen a la mitad, lo que sugiere que la presencia

de cargas favorece la hidrólisis de la BS. La combinación de estos efectos explica que la K_{eq} para la DHPE y la DHPS sea un orden de magnitud mayor que para los aminofosfatos–PLP.

Tabla 2. Constantes cinéticas para las reacciones del PLP a pH 7,4 a 37 °C obtenidas con el programa Dynafit [KUZMIC, 1996].

Compuesto	DHPE	DHPS	PEA ^a	PSer ^a
k_f (M ⁻¹ h ⁻¹)	$1,3 \cdot 10^4$	$9,5 \cdot 10^3$	$4,5 \cdot 10^3$	$3,4 \cdot 10^3$
k_h (h ⁻¹)	$3,8 \cdot 10^1$	$6,3 \cdot 10^1$	$8,2 \cdot 10^1$	$1,1 \cdot 10^2$
K_{eq} (M ⁻¹) ^b	$3,4 \cdot 10^2$ ($3,3 \cdot 10^2$)	$1,5 \cdot 10^2$ ($1,4 \cdot 10^1$)	$5,5 \cdot 10^1$	$3,0 \cdot 10^1$

^a [CALDÉS, 2011] ^b Los valores en paréntesis indican la K_{eq} obtenida con la ecuación (9), descrita en la sección experimental.

Cabe destacar que los valores de las k_f obtenidos para los aminofosfolípidos son del mismo orden que los valores obtenidos para compuestos anfifílicos como la dodecilamina ($k_f = 7,5 \cdot 10^3$ M⁻¹ h⁻¹ a 25 °C, [VÁZQUEZ, 1992]), el triptófano ($k_f = 12 \cdot 10^3$ M⁻¹ h⁻¹ a 37 °C, [ECHEVARRÍA, 2005]) o el 2-aminoetilfenilfosfato ($k_f = 14 \cdot 10^3$ M⁻¹ h⁻¹ a 37 °C, [CALDÉS, 2011]), aunque menores que los obtenidos para estructuras más grandes como la poli-L-Lys ($k_f = 4,2 \cdot 10^4$ M⁻¹ h⁻¹ a 25 °C, [ECHEVARRÍA, 1999]). Por otra parte, los valores de k_h para los aminofosfolípidos son más parecidos a los obtenidos para aminoácidos como el triptófano ($k_h = 30$ h⁻¹ a 37 °C, [ECHEVARRÍA, 2005]) o la Ac-Phe-Lys ($k_h = 32$ h⁻¹ a 37 °C, dato no publicado) que con la dodecilamina ($k_h = 0,36$ h⁻¹ a 25 °C, [VÁZQUEZ, 1992]). Por tanto, los sustituyentes hidrófobos en la molécula de nucleófilo facilitan la formación de la BS, mientras que la presencia de cargas favorece su hidrólisis.

Los valores de K_{eq} obtenidos para la DHPE y la DHPS son similares a los obtenidos anteriormente para la n-hexilamina ($K_{eq} = 200$ M⁻¹, a 25 °C) y el ácido ε-aminocaproico ($K_{eq} = 220$ M⁻¹, a 25 °C) [VÁZQUEZ, 1990], compuestos que también presentan el carácter anfifílico como los aminofosfolípidos.

La comparación de los datos de k_{obs} de la tabla 1 con la k_f de la tabla 2 confirma que el PLP es un inhibidor competitivo de la glicación de aminofosfolípidos en condiciones fisiológicas, ya que la constante de formación de la BS para el PLP es entre 4 y 5 órdenes de magnitud mayor que para la reacción con cualquiera de los grupos carbonílicos aquí estudiados.

CONCLUSIÓN

En este trabajo, se ha estudiado la primera etapa del proceso de glicación no enzimática de los aminofosfolípidos DHPE y DHPS, centrandó la atención en el efecto de los sustituyentes hidrofóbicos sobre la formación de la BS. Siguiendo la reacción con compuestos carbonílicos de capacidad glicante se ha observado que la reactividad intrínseca (k_I) disminuye respecto a los aminofosfatos si los nucleófilos contienen sustituyentes apolares. Del mismo modo, el valor del pK_a del grupo amino de los aminofosfolípidos es menor al aumentar la hidrofobicidad de las

moléculas. Esto explica que en condiciones fisiológicas la cantidad de BS formada sea mucho mayor que en moléculas totalmente polares (PEA y P_{Ser}). Esto sugiere que en los sistemas biológicos el valor del pK_a , condicionado en gran medida por el entorno, determinará la proporción de compuesto glicado en forma de BS, pudiendo ser mayor para la PS.

Finalmente, se ha determinado una diferencia de 3 a 4 órdenes de magnitud entre las constantes de la reacción de los aminofosfolípidos con el PLP y de éstos con los grupos carbonílicos. Así se demuestra de una forma cuantitativa la capacidad del PLP como inhibidor competitivo de las reacciones de glicación, ya que puede formar BSs reversibles con los aminofosfolípidos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación obtenida del Gobierno Español (Project CTQ-2008-02207/BQU). Catalina Caldés agradece la concesión de una beca predoctoral al Govern de les Illes Balears (Conselleria d'Educació, Cultura i Universitats), programa operativo cofinanciado por el Fondo Social Europeo.

REFERENCIAS

- [ADROVER, 2007] Adrover, M.; Vilanova, B.; Donoso, J.; Muñoz, F. *Int. J. Chem. Kinet.*, **2007**, 39, 154.
- [ADROVER, 2009] Adrover, M.; Vilanova, B.; Frau, J.; Muñoz, F.; Donoso, J. *Amino acids*, **2009**, 36, 437.
- [ASAI, 2009] Asai, A.; Okajima, F.; Nakagawa, K.; Ibusuki, D.; Tanimura, K.; Nakajima, Y.; Nagao, M.; Sudo, M.; Harada, T.; Miyazawa, T.; Oikawa, S. *J. Lipid Res.*, **2009**, 50, 957.
- [AULD, 1967] Auld, D. S.; Bruice, T. C. *J. Am. Chem. Soc.*, **1967**, 89, 2083.
- [BORCH, 1971] Borch, R. F.; Bernstein, M. D.; Durst, H. D. *J. Am. Chem. Soc.*, **1971**, 93, 2897.
- [BREITLING-UTZMANN, 2001] Breitling-Utzmann, C. M.; Unger, A.; Friedl, D. A.; Lederer, M. O. *Arch. Biochem. Biophys.*, **2001**, 391, 245.
- [CALDÉS, 2011] Caldés, C.; Vilanova, B.; Adrover, M.; Muñoz, F.; Donoso, J. *Biorg. Med. Chem.*, **2011**, 19, 4536.
- [CASTELLS, 2003] Castells, C. B.; Ràfols, C.; Rosés, M.; Bosch, E. J. *Chromatogr. A*, **2003**, 1002, 41.
- [CVEC, 1990] Cevc, G. *Biochim. Biophys. Acta*, **1990**, 1031, 311.
- [DONOSO, 1986] Donoso, J. Muñoz, F.; García del Vado, A.; Echevarría, G.; García Blanco, F. *Biochem. J.*, **1986**, 238, 137.
- [DWORKIN, 2000] Dworkin, J. P.; Miller, S. L. *Carbohydr. Res.*, **2000**, 329, 359.
- [ECHEVARRÍA, 1999] Echevarría, G. R.; Martín Perez, M. P.; Santos, J. G.; García Blanco, F. *Helv. Chim. Acta*, **1999**, 82, 769.
- [ECHEVARRÍA, 2005] Echevarría, G. R.; Santos, J. G.; Basagoitia, A.; García Blanco, F. *J. Org. Phys. Chem.*, **2005**, 18, 546.
- [EGOROVA, 1998] Egorova, E. M. *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, **1998**, 131, 7.
- [FERNÁNDEZ, 1977] Fernández, M. S.; Fromherz, P. *J. Phys. Chem.*, **1977**, 81, 1755.
- [FOUNTAIN, 1999] Fountain, W. C.; Requena, J. R.; Jenkins, A. J.; Lyons, T. J.; Smyth, B.; Baynes, J. W.; Thorpe, S. R. *Anal. Biochem.*, **1999**, 272, 48.
- [GLUSHONOK, 2003] Glushonok, G. K.; Glushonok, T. G.; Maslovskaya, L. A.; Shadyro, O. I. *Russ. J. Gen. Chem.*, **2003**, 73, 1027.
- [HAZEN, 1999] Hazen, S. L.; Heller, J.; Hsu, F.; d'Avignon, A.; Heinecke, J. W. *Chem. Res. Toxicol.*, **1999**, 12, 19.
- [HERGENROTHER, 1997] Hergenrother, P. J.; Martin, S. F. *Anal. Biochem.*, **1997**, 251, 45.
- [HIGUCHI, 2006] Higuchi, O.; Nakagawa, K.; Tsuzuki, T.; Suzuki, T.; Oikawa, S.; Miyazawa, T. *J. Lipid Res.*, **2006**, 47, 964.
- [KOFUNE, 2000] Kofune, H.; Hara, M.; Maekawa, M.; Nohmi, T.; Kinoshita, T.; Higuchi, A. *Polymer Preprints* (American Chemical Society, Division of Polymer Chemistry), **2000**, 41, 1701.

- [KOPPAKA, 1996] Koppaka, V.; Wang, J.; Banerjee, M.; Lentz, B. *Biochemistry*, **1996**, *35*, 7482.
- [KUZMIC, 1996] Kuzmic, P. *Anal. Biochem.*, **1996**, *237*, 260.
- [LEVI, 2008] Levi, V.; Villamil Giraldo, A. M.; Castello, P. R.; Rossi, J. P. F. C.; Gonzalez Flecha, F. L. *Biochem. J.*, **2008**, *416*, 145.
- [MACHAIDZE, 2002] Madchaidze, G.; Ziegler, A.; Seelig, J. *Biochemistry*, **2002**, *41*, 1965.
- [MACHAIDZE, 2003] Madchaidze, G.; Seelig, J. *Biochemistry*, **2003**, *42*, 12570.
- [MIYAZAWA, 2008] Miyazawa, T.; Ibusuki, D.; Yamashita, S.; Nakagawa, K.; *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **2008**, *1126*, 291.
- [MIYAZAWA, 2012] Miyazawa, T.; Nakagawa, K.; Shimasaki, S.; Nagai, R. *Amino Acids*, **2012**, *42*, 1163.
- [NAKAGAWA, 2005] Nakagawa, K.; Oak, J. H.; Higuchi, O.; Tsuzuki, T.; Oikawa, S.; Otani, H.; Mune, M.; Cai, H.; Miyazawa, T. *J. Lipid Res.*, **2005**, *46*, 2514.
- [NAKAGAWA, 2008] Nakagawa, K.; Ibusuki, D.; Yamashita, S.; Miyazawa, T. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **2008**, *1126*, 288.
- [OAK, 2000] Oak, J.; Nakagawa, K.; Miyazawa, T. *FEBS Lett*, **2000**, *481*, 26.
- [OBSIL, 1999] Obsil, T.; Amler, E.; Obšilová, V.; Pavlíček, Z. *Biophys. Chem.*, **1999**, *80*, 165.
- [PAMPLONA, 2011] Pamplona, R. *Chem.-Biol. Interact.*, **2011**, *192*, 14.
- [RAJASEKARAN, 1994] Rajasedaran, E.; Jayaram, B.; Honig, B. *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, *116*, 8238.
- [RAVANDI, 1996] Ravandi, A.; Kuksis, A.; Marai, L.; Myher, J. J.; Steiner, G.; Lewisa, G.; Kamido, H. *FEBS Lett.*, **1996**, *381*, 77.
- [RAVANDI, 2000] Ravandi, A.; Kuksis, A.; Shaikh, N. A. *Arterioscl. Throm. Vas.*, **2000**, *20*, 467.
- [SHEMON, 2010] Shemon, A. N.; Heil, G. L.; Granovsky, A. E.; Clark, M. M.; McElheny, D.; Chimon, A.; Rosner, M. R.; Koide, S. *Plos one*, **2010**, *5*, e10479.
- [SHOJI, 2010] Shoji, N.; Nakagawa, K.; Asai, A.; Fujita, I.; Hashiura, A.; Nakajima, Y.; Oikawa, S.; Miyazawa, T. *J. Lipid Res.*, **2010**, *51*, 2445.
- [SIGMAPLOT, 2005] SigmaPlot Version 10.0. SPSS, Chicago, Illinois, USA, **2005**.
- [SOLÍS-CALERO, 2010] Solís-Calero, C.; Ortega-Castro, J.; Muñoz, F. *J. Phys. Chem. B*, **2010**, *114*, 15879.
- [SOOKWONG, 2011] Sookwong, P.; Nakagawa, K.; Fujita, I.; Shoji, N.; Miyazawa, T. *Lipids*, **2011**, *46*, 943.
- [TAKEUCHI, 2008] Takeuchi, M.; Yamagixhi, S.-I. *Curr. Pharm. Design*, **2008**, *14*, 973.
- [TERPSTRA, 1998] Terpstra, V.; Bird, D. A.; Steinberg, D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**, *95*, 1806.
- [THORPE, 2003] Thorpe, S. R.; Baynes, J. W. *Amino Acids*, **2003**, *25*, 275.

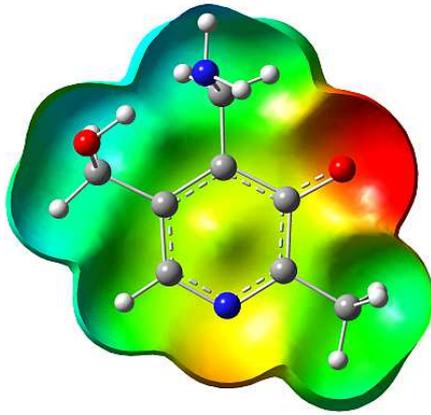
- [TOKITA, 2005] Tokita, Y.; Hirayama, Y.; Sekikawa, A.; Kotake, H.; Toyota, T.; Miyazawa, T.; Sawai, T.; Oikawa, S. *J. Atheroscler. Thromb.*, **2005**, *12*, 260.
- [VAN HEIJST, 2005] van Heijst, J. W. J.; Niessen, H. M. W.; Hoekeman, K.; Schalkwijk, C. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **2005**, *1043*, 725.
- [VÁZQUEZ, 1990] Vázquez, M. A.; Muñoz, F.; Donoso, J.; García Blanco, F. *Int. J. Chem. Kinet.*, **1990**, *22*, 905.
- [VÁZQUEZ, 1992] Vázquez, M. A.; Muñoz, F.; Donoso, J.; García Blanco, F. *Int. J. Chem. Kinet.*, **1992**, *24*, 67.
- [WILLIAMS, 2011] Williams, W. M.; Winberg, A.; Smith, M. A. *J. Amino Acids*, **2011**, Article ID 461216, 1.
- [ZHANG, 2011] Zhang, J.; Fan, H.; Levorse, D. A.; Crocker, L. S. *Langmuir*, **2011**, *27*, 1907.

***ARTÍCULO III. FORMATION OF SCHIFF BASES OF O-
PHOSPHORYLETHANOLAMINE AND O-PHOSPHO-
DL-SERINE WITH PYRIDOXAL 5'-PHOSPHATE.
EXPERIMENTAL AND THEORETICAL STUDIES***

Vilanova, B.; Gallardo, J. M.; Caldés, C.; Adrover, M.; Ortega–Castro, J.; Muñoz, F.; Donoso, J. Formation of Schiff bases of *O*-phosphorylethanolamine and *O*-phospho-DL-serine with pyridoxal 5'-phosphate. Experimental and theoretical studies. *J. Phys. Chem. A*, **2012**, *116*, 1897.

***ARTÍCULO IV. PHENOL GROUP IN PYRIDOXAMINE ACTS
AS A STABILIZING ELEMENT FOR ITS
CARBINOLAMINES AND SCHIFF BASES***

Caldés, C.; Vilanova, B.; Adrover, M.; Muñoz, F.; Donoso, J. Phenol group in pyridoxamine acts as a stabilizing element for its carbinolamines and Schiff bases. *Chem. Biodivers.*, **2011**, *18*, 1318.



Capítulo 4.

DISCUSIÓN

En esta tesis doctoral se han abordado diferentes aspectos de la glicación no enzimática de aminofosfolípidos, todos ellos de potencial interés en biomedicina. Se ha examinado el comportamiento de varios compuestos modelo de aminofosfolípidos frente a diferentes compuestos con capacidad glicante y se ha analizado el papel de los vitámeros B₆ como inhibidores eficientes de la primera etapa de la reacción de glicación. Los resultados de estos estudios se han publicado en diversos artículos (capítulo 3). En este capítulo, se hace una breve discusión de los aspectos más representativos de la investigación realizada.

4.1. FORMACIÓN DE BASES DE SCHIFF DE ANÁLOGOS DE AMINOFOSFOLÍPIDOS CON COMPUESTOS GLICANTES

En 1993 Bucala y cols. propusieron como nueva diana de la glicación no enzimática a los aminofosfolípidos [BUCALA, 1993]. Desde entonces, se ha detectado *in vivo* e *in vitro* la formación de la BS [HAZEN, 1999][BRIETLING-UTZMANN, 2001], del AP y de algunos AGEs [FOUNTAIN, 1999][NAKAGAWA, 2005A], y se han analizado las consecuencias biológicas de la modificación de las cabezas polares de los aminofosfolípidos [TERPSTRA, 1998][RAVANDI, 2000][THORPE, 2003][LEVI, 2008]. Sin embargo y hasta la fecha, los estudios cuantitativos del proceso inicial de la glicación en los aminofosfolípidos son escasos. Además, los distintos trabajos existentes presentan controversias en cuanto a la reactividad de los dos aminofosfolípidos naturales susceptibles de ser glicados, ya que en algunos estudios se obtiene una mayor proporción de PS glicada que de PE [FOUNTAIN, 1999], mientras que otros autores sólo detectan la PE glicada [RAVANDI, 1996][NAKAGAWA, 2005A].

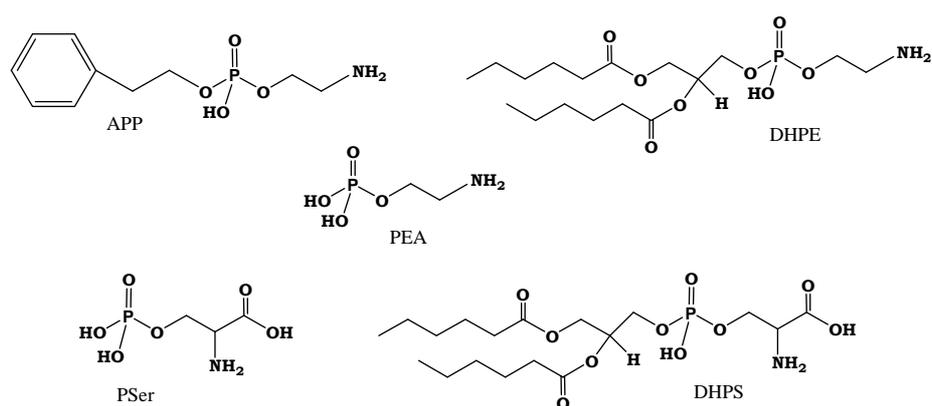


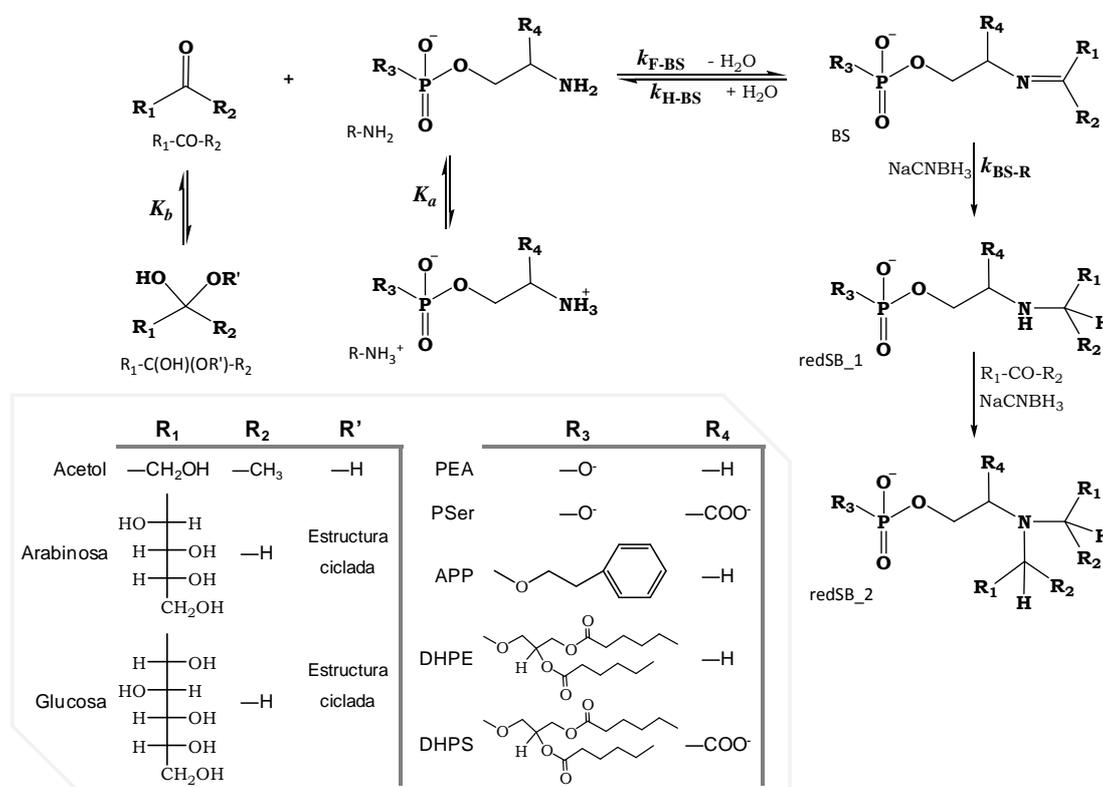
Figura 4.1. Estructura de los compuestos análogos a los aminofosfolípidos.

En el trabajo de esta tesis doctoral se ha estudiado en condiciones fisiológicas de pH y temperatura la cinética de formación de BSs de distintos modelos de aminofosfolípidos con tres grupos carbonílicos implicados en los procesos de glicación. Los nucleófilos seleccionados se

muestran en la figura 4.1, cuya estructura contiene las mismas cabezas polares que los aminofosfolípidos naturales susceptibles de ser glicosados (PE y PS) y distintos sustituyentes en el grupo fosfato.

Se ha realizado la reacción con una α -hidroxicetona (el acetol) y dos α -hidroxialdehídos (la glucosa y la arabinosa). La presencia de NaCNBH₃ (compuesto que a pH neutro reduce selectivamente el enlace imina sin afectar a los grupos carbonilo [BORCH, 1971]) posibilitó el secuestro de las BSs y la determinación de las constantes cinéticas de su formación.

El mecanismo de este tipo de reacciones (esquema 4.1) se inicia con el ataque nucleófilo del grupo amina sobre el grupo carbonílico, formando reversiblemente una BS. Sin embargo, por la reacción con el cianoborohidruro de sodio, se obtiene una amina secundaria [BORCH, 1971][BUNN, 1981][ADROVER, 2009A], correspondiente a la BS reducida (redSB_1).



Esquema 4.1. Mecanismo de formación de una amina secundaria (redSB_1) mediante la reducción selectiva de la BS formada entre diferentes aminofosfolípidos y grupos carbonílicos. Posteriormente, la amina secundaria puede adicionar una segunda molécula carbonílica formando por reducción una amina terciaria (redSB_2).

Tal y como se observa en la figura 4.2 para el caso concreto de la reacción entre el APP y la glucosa, las BSs reducidas fueron los compuestos detectados, aunque en algún caso, también se detectó la formación de una nueva señal correspondiente a una segunda BS reducida (redSB_2) resultado de la reacción de la amina secundaria (redSB_1) con una nueva molécula carbonílica. La formación de este tipo de aminas terciarias se corresponde con la condensación

de un segundo compuesto carbonílico con CAs, demostrada por Verardo y cols. [VERARDO, 1995]. La redSB_2 se detectó únicamente en las reacciones de PEA con arabinosa y del APP con glucosa (se aisló y caracterizó mediante espectroscopia de RMN y masas). Posiblemente esta redSB_2 se produciría y se podría detectar en el resto de los sistemas, si se aumentara convenientemente el tiempo de seguimiento de la reacción.

El ajuste de la variación temporal de la concentración de nucleófilo al esquema cinético 4.1 proporciona el valor de las pseudo constantes de primer orden (k_{obs}). La consideración de los equilibrios iónicos de los nucleófilos (K_a) y los equilibrios de ciclación para las aldosas o de hidratación para el acetol (K_b) permite obtener las constantes microscópicas de formación de las BSs (k_{F-BS}). Los resultados obtenidos se han publicado en los artículos I y II, a partir de los cuales se extraen los datos de la tabla 4.1.

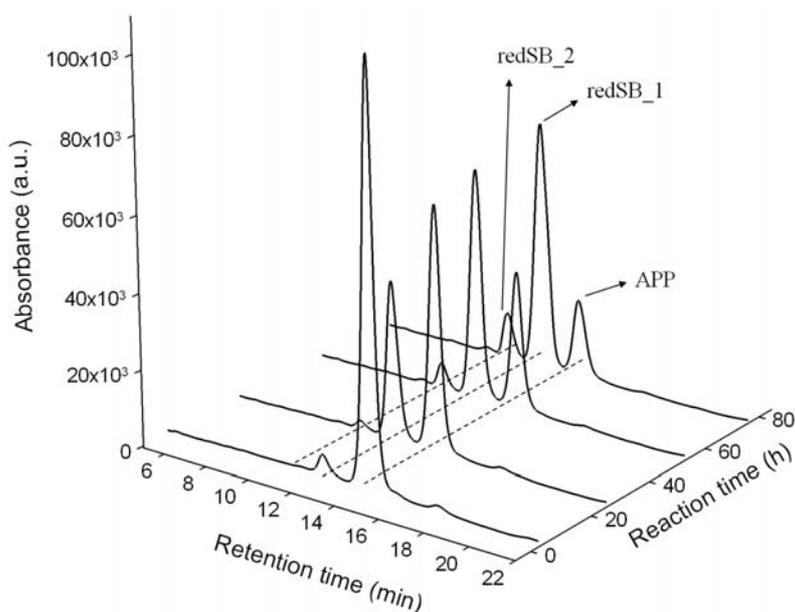


Figura 4.2. Cromatogramas a distintos tiempos de reacción para la mezcla de 10 mM de APP con 400 mM de glucosa y en presencia de 100 mM de NaCNBH₃ en tampón fosfato a pH 7,4 y a 37 °C, obtenidos por HPLC con detección UV-Visible a 254 nm.

Los resultados revelan que:

a) Los sustituyentes hidrofóbicos afectan a la reactividad del nucleófilo, ya que los valores de k_{F-BS} para los análogos de los aminofosfolípidos que poseen una parte apolar en su estructura (APP, DHPE y DHPS) son entre 3 y 7 veces menos reactivos que sus respectivos compuestos totalmente polares (PEA y PSer).

b) Los valores de k_{F-BS} obtenidos para la glucosa y la arabinosa son entre 3 y 4 órdenes de magnitud mayores que los obtenidos para el acetol, tal y como es de esperar dada la reactividad química de los grupos aldehídicos y cetónicos. Por otra parte, se ha encontrado que

la glucosa es el aldehído más reactivo, lo que está de acuerdo con estudios previos, donde se demostró que la existencia de una amplia red de enlaces de hidrógeno intramoleculares causa un incremento de su electrofilia [ADROVER, 2007].

c) El valor de la k_{F-BS} de los compuestos modelo de la PS (PSer y DHPS) es entre 2 y 3 veces inferior que el valor para la misma constante con los compuestos análogos de la PE. Lo que pone de manifiesto que *in vitro* ambos aminofosfolípidos reaccionan con grupos carbonílicos de capacidad glicante para formar una BS, siendo la PE el compuesto más reactivo. Cabe esperar que los aminofosfolípidos naturales presenten esta misma tendencia en cuanto a reactividad con grupos carbonílicos.

d) Los valores de la constante observada (k_{obs}) no mantienen la misma relación que los de la k_{F-BS} porque está afectada por la disponibilidad del nucleófilo en forma reactiva, es decir, por el valor del pK_a del grupo amina y en consecuencia las condiciones del entorno deben modificar los valores de las pseudo constantes de reacción.

e) Los valores de las constantes obtenidas para el APP, la DHPE y la DHPS indican que la esterificación del grupo fosfato con un grupo apolar reduce la reactividad intrínseca del nucleófilo con respecto al aminofosfato y aumenta el valor de k_{obs} por variación de su pK_a .

Tabla 4.1. Constantes cinéticas para las reacciones estudiadas a pH 7,4 y a 37 °C.

		PEA	PSer	APP	DHPE	DHPS
Acetol	k_{obs} ($M^{-1} h^{-1}$)	$1,8 \cdot 10^{-1}{}^a$	–	$9,3 \cdot 10^{-1}$	$9,6 \cdot 10^{-1}{}^b$	–
	k_{F-BS} ($M^{-1} h^{-1}$)	$1,3 \cdot 10^2$	–	$3,9 \cdot 10^1$	$2,6 \cdot 10^1$	–
Arabinosa	k_{obs} ($M^{-1} h^{-1}$)	$8,7 \cdot 10^{-2}{}^a$	$7,8 \cdot 10^{-2}{}^a$	$4,7 \cdot 10^{-1}$	$7,0 \cdot 10^{-1}{}^b$	$4,0 \cdot 10^{-1}{}^b$
	k_{F-BS} ($M^{-1} h^{-1}$)	$2,0 \cdot 10^5$	$1,3 \cdot 10^5$	$6,4 \cdot 10^4$	$6,1 \cdot 10^4$	$2,2 \cdot 10^4$
Glucosa	k_{obs} ($M^{-1} h^{-1}$)	$1,7 \cdot 10^{-2}{}^a$	$9,2 \cdot 10^{-3}{}^a$	$5,3 \cdot 10^{-2}$	$7,9 \cdot 10^{-2}{}^b$	$3,7 \cdot 10^{-2}{}^b$
	k_{F-BS} ($M^{-1} h^{-1}$)	$5,9 \cdot 10^5$	$2,3 \cdot 10^5$	$1,1 \cdot 10^5$	$1,0 \cdot 10^5$	$3,1 \cdot 10^4$

^a Valores corregidos por el efecto isotópico del disolvente (D_2O), calculado como $k^H/k^D = 1,3$.

^b Valores corregidos por el efecto cinético de la mezcla de disolventes (D_2O -MeOD), calculado como $k^H/k^{D-MeOD} = 1,14$.

f) Los valores de las constantes observadas en condiciones fisiológicas de los modelos de los aminofosfolípidos utilizados en este trabajo son del mismo orden de magnitud que los obtenidos previamente con un modelo peptídico [ADROVER, 2009A], lo que indica que estos aminofosfolípidos son tan buenas dianas como los péptidos en los procesos de glicación.

g) Los valores de k_{obs} obtenidos para todos los modelos de los aminofosfolípidos son inferiores (entre 3 y 40 veces menores) que los correspondientes a la reacción de la PM con los mismos compuestos carbonílicos [ADROVER, 2009A]. Nuestros resultados experimentales

corroboran las hipótesis previas en las cuales se señalaba a la PM como inhibidor de los procesos de glicación no enzimática de biomoléculas [VOZIYAN, 2002][DAVIES, 2006][ADROVER, 2008].

El estudio cuantitativo realizado demuestra que la reactividad intrínseca de la PS es inferior a la de la PE, principalmente a causa de la presencia del grupo carboxílico en posición α respecto a la amina. Sin embargo, se ha de tener en cuenta que en condiciones fisiológicas, tal y como ocurre en las proteínas [WILLIAMS, 2011], los factores determinantes de la formación de la BS para los aminofosfolípidos son su accesibilidad frente a los compuestos glicantes, el valor del pK_a de su grupo amino y de las condiciones de su entorno.

4.2. EFECTO COMPETITIVO DE VITÁMEROS B₆ EN LA GLICACIÓN NO ENZIMÁTICA DE BIOMOLÉCULAS

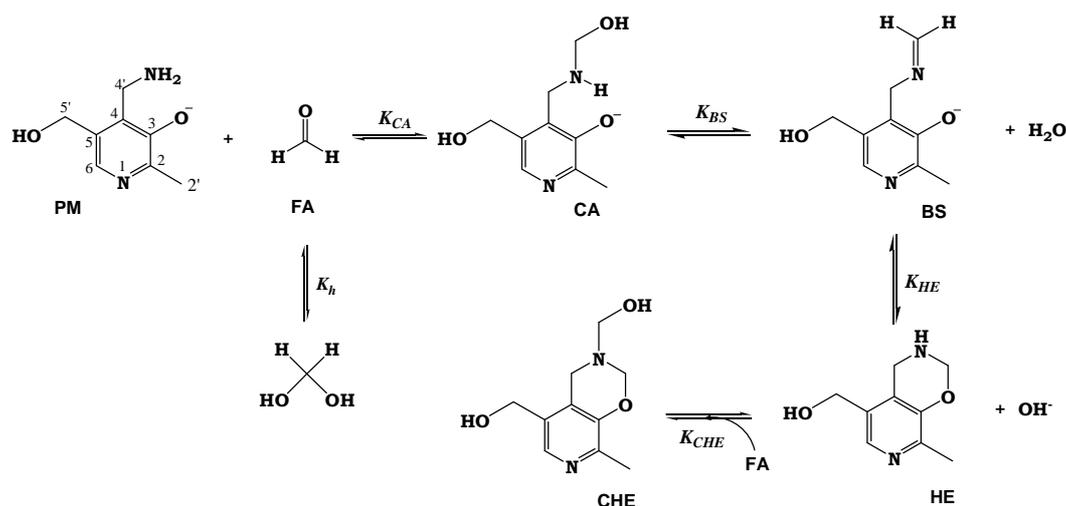
La acumulación de AGEs y ALEs se ha relacionado con diversas patologías, lo que evidencia la necesidad de buscar inhibidores de los procesos de glicación de las biomoléculas. De los compuestos estudiados, los derivados naturales de la vitamina B₆ están entre los inhibidores más eficaces. Sus propiedades inhibitorias se basan en los siguientes mecanismos de acción: la neutralización de especies radicalarias [MOORTHY, 1975][VOZIYAN, 2005][CHETYRKIN, 2008B], la quelación de metales con capacidad catalítica oxidativa [RAHBAR, 2003][ADROVER, 2008A][ORTEGA-CASTRO, 2012], el secuestro de grupos carbonílicos con capacidad glicante [VOZIYAN, 2002][AMARNATH, 2004][DAVIES, 2006][KANG, 2006][ADROVER, 2008][CHETYRKIN, 2008A] o el bloqueo de los grupos amina reactivos [HIGUCHI, 2006][NAKAGAWA, 2008].

En este trabajo de tesis, se han analizado dos de estos mecanismos de inhibición que involucran la formación de BSs. Por una parte, la reacción del grupo amina de la PM con los grupos carbonílicos, impidiendo que éstos condensen con las biomoléculas, y por otra parte, la reacción del grupo carbonílico del PLP con los aminofosfolípidos, evitando así la evolución hacia el AP.

4.2.1. PAPEL INHIBIDOR DE LA PIRIDOXAMINA

En el esquema 4.2 se muestra el mecanismo de reacción entre la PM y el FA, aldehído seleccionado como modelo para el estudio. Como es sabido, el ataque nucleófilo del grupo amina sobre el carbono carbonílico genera una CA que se deshidrata formando una BS. Algunos de los estudios realizados sobre el mecanismo de esta reacción señalan que esta BS evoluciona hacia la formación de un compuesto hemiaminal cíclico de seis miembros (HE). Concretamente, Voziyan y cols. formularon un compuesto HE como producto de la reacción de la PM con GO y GLA [VOZIYAN, 2002]. Posteriormente, se ha sugerido que en la reacción de la PM con el ácido

pirúvico, el propanal y el FA también se forma como producto final un compuesto HE, responsable de los cambios observados por espectroscopía UV-Visible [ADROVER, 2009B]. En ambos casos, se demuestra que el grupo fenol de la PM posibilita la formación de un anillo de seis miembros. Por este motivo, se planteó la necesidad de estudiar los equilibrios involucrados en estas reacciones en un amplio rango de pD en el cual tiene lugar la reacción (pD 6,0 – 13,0) para analizar la influencia de los diversos grupos funcionales en la reactividad de la PM.



Esquema 4.2. Mecanismo de reacción entre la PM y el FA.

El estudio de la reacción se realizó mediante la técnica de ^1H -RMN. La caracterización de las señales de los espectros obtenidos (figura 4.3) indican la formación de los compuestos CA y HE, descritos anteriormente. En las condiciones experimentales utilizadas, la BS no se detecta, aunque su presencia en la mezcla de reacción es incuestionable debido a la formación del compuesto HE. Además, a medida que aumenta la concentración de FA aparece una nueva señal muy cercana a la asignada para el compuesto HE. El análisis de la mezcla de reacción por ^1H - ^{15}N -HMBC evidencia la presencia de una amina terciaria (CHE). La detección de esta especie indica que la molécula de HE también puede incorporar una molécula de FA, resultado consistente con el observado en otras aminas primarias [KALLEN, 1966] y aromáticas [ABRAMS, 1976].

Paralelamente, se amplió el estudio con la PAM, un análogo estructural de la PM que carece del grupo OH en la posición 3, estudiando su reacción con el FA en el rango de pD en el cual tiene lugar la reacción. En este caso, el producto mayoritario formado es la CA, que se encuentra en equilibrio con una pequeña concentración de BS. Además, en el espectro ^1H -RMN de la mezcla de reacción también se detectó un compuesto con dos moléculas de FA, llamado doble-carbinolamina, DCA, formado por la adición de un FA sobre la CA. A partir de la PAM no se forma el compuesto cíclico HE.

El ajuste de las concentraciones de los reactivos y productos, calculadas a partir del área de las señales correspondientes, a su esquema de reacción proporcionó el valor de las constantes de equilibrio de formación de la CA (K_{CA}), una constante global para la formación del compuesto HE ($K_{SE} = K_{BS}K_{HE}$), la constante de formación para la CHE (K_{CHE}) y la constante de formación para la DCA (K_{DCA}). Para la obtención de estas constantes se considera el equilibrio de hidratación del FA (K_h). Los resultados obtenidos se detallan en el artículo IV y se recogen en la tabla 4.2 y 4.3.

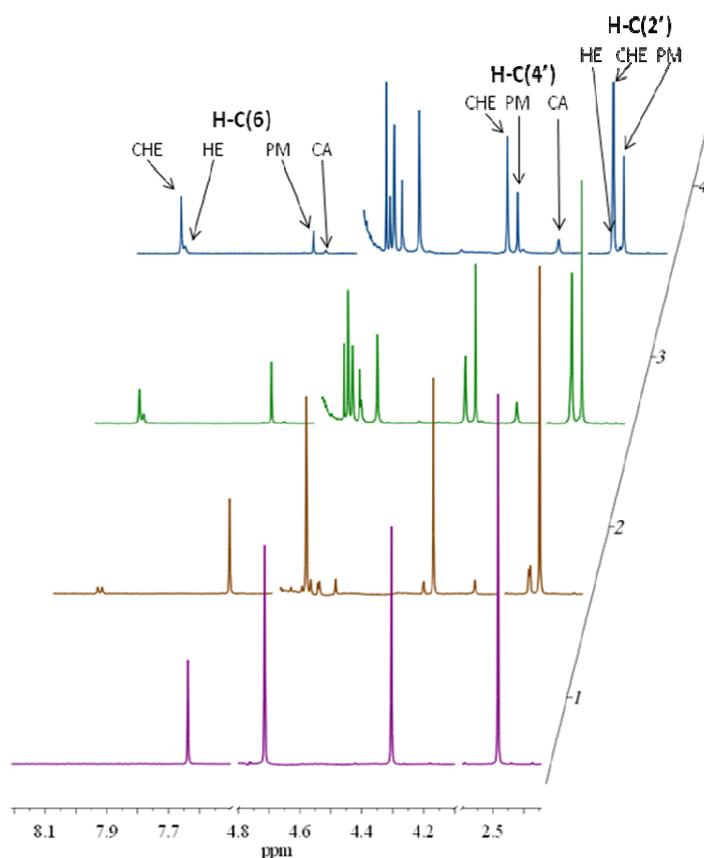


Figura 4.3. Espectro ^1H -RMN de la mezcla de reacción entre la PM y el FA a pD 6,0 y 25 °C. 1) 4 mM PM, 2) 4 mM PM + 20 mM FA, 3) 4 mM PM + 60 mM FA, 4) 4 mM PM + 120 mM FA. Abreviaturas: piridoxamina (PM), carbinolamina (CA), hemiaminal (HE) y carbinolamina-hemiaminal (CHE).

Como se puede ver en la tabla 4.2, el valor de K_{CA} se incrementa notablemente con el aumento del pD como consecuencia del diferente grado de protonación de los grupos ionizables de la PM en el rango de pD estudiado. A partir de las constantes de ionización de la PM y la PAM en D_2O se pueden estimar las constantes para las distintas especies iónicas recogidas en la tabla 4.3. El valor de K_{CA}^i para la especie básica de la PM (PM^-) es un orden de magnitud mayor que el valor de la misma constante para la especie básica de la PAM. Estos datos sugieren que el grupo fenolato de la PM debe estabilizar la CA formada.

El grupo OH en la posición 3 de la PM se encuentra desprotonado a pD superior a 5, y como consecuencia se deslocaliza la carga electrónica desde el átomo de nitrógeno en 4' de la CA hacia el anillo piridínico, reduciendo su nucleofilia, lo que podría explicar que no se haya detectado la adición de otra molécula de FA en la CA de la PM. En cambio, la CA de la PAM si reacciona con una nueva molécula de FA formando la DCA. La constante de equilibrio de formación de esta especie (K_{DCA}) presenta su máximo valor a pD 7. Para valores de pD superiores, el valor de K_{DCA} es menor que el de K_{CA} , tal y como ocurre para otras aminas [KALLEN, 1966].

Tabla 4.2. Constantes de equilibrio para la formación de los productos de reacción entre la PM y la PAM con el FA a 25 °C.

pD	Reacción PM y FA			Reacción PAM y FA	
	K_{CA} (M^{-1})	K_{SE} (M)	K_{CHE} (M^{-1})	K_{CA} (M^{-1})	K_{DCA} (M^{-1})
6,0	$(12 \pm 1) \cdot 10^3$	$2,0 \pm 0,1$	$(52 \pm 2) \cdot 10^3$		
7,0	$(15 \pm 1) \cdot 10^3$	$2,0 \pm 0,1$	$(10 \pm 1) \cdot 10^4$	$(56 \pm 4) \cdot 10^2$	$(74 \pm 10) \cdot 10^2$
8,0	$(72 \pm 6) \cdot 10^3$	$2,1 \pm 0,2$	$(80 \pm 4) \cdot 10^3$	$(36 \pm 2) \cdot 10^3$	$(52 \pm 6) \cdot 10^2$
9,0	$(12 \pm 1) \cdot 10^4$	$1,7 \pm 0,2$	$(70 \pm 4) \cdot 10^3$	$(25 \pm 2) \cdot 10^4$	$(22 \pm 4) \cdot 10^2$
10,0	$(49 \pm 7) \cdot 10^4$	$0,8 \pm 0,1$	$(54 \pm 6) \cdot 10^3$		
11,0	$(22 \pm 3) \cdot 10^5$	$0,2 \pm 0,02$	$(24 \pm 2) \cdot 10^3$		
12,0	$(60 \pm 3) \cdot 10^5$	-	-		
13,0	$(41 \pm 3) \cdot 10^5$	-	-		

Tabla 4.3. Constantes de equilibrio para la formación de la CA en función de las distintas especies iónicas de nucleófilo a 25 °C.

Compuesto	Especie	K_{CA}^i (M^{-1})
PM	H_2PM^+	$(12 \pm 3) \cdot 10^3$
	HPM	$(24 \pm 6) \cdot 10^4$
	PM	$(52 \pm 9) \cdot 10^5$
PAM	HPAM ⁺	$(1,0 \pm 0,2) \cdot 10^3$
	PAM	$(4,2 \pm 0,7) \cdot 10^5$

La constante de equilibrio K_{SE} presenta un valor constante hasta pD 9, punto en el que empieza a decrecer debido al aumento de la concentración de OH^- , siendo la CA la especie mayoritaria a pD superior a 10. Kubala y Martell observaron que la constante de formación de la BS en la reacción entre la PM y el ácido 2-oxalopropiónico depende del pH, presentando el valor máximo en torno a pH 9 [KUBALA, 1983]. Resultados similares se habían obtenido anteriormente para la reacción de la PM con el ácido pirúvico [GANSOW, 1969][FELTY, 1974]. Estas variaciones comentadas son consistentes con el comportamiento de la K_{SE} .

La adición de una segunda molécula de FA en el compuesto HE está fuertemente condicionada por el pD, presentando el máximo valor de la constante de equilibrio a pD 7.

Concluyendo, la presencia del grupo hidroxilo en la posición 3 es la clave para entender la reactividad de la PM ya que posibilita la formación de un enlace de hidrógeno en la CA, y por tanto, aumenta notablemente su estabilidad frente a la CA formada en la reacción de la PAM con el FA. Por otro lado, el OH también posibilita la evolución de la BS hacia la forma HE, que es muy estable. Cabe destacar, que la formación de estos compuestos, HE y CHE, como productos mayoritarios a pH fisiológico de la reacción entre la PM y grupos carbonílicos glicantes difieren de los que se forman con las lisinas proteicas.

4.2.2. PAPEL INHIBIDOR DEL 5'-FOSFATO DE PIRIDOXAL

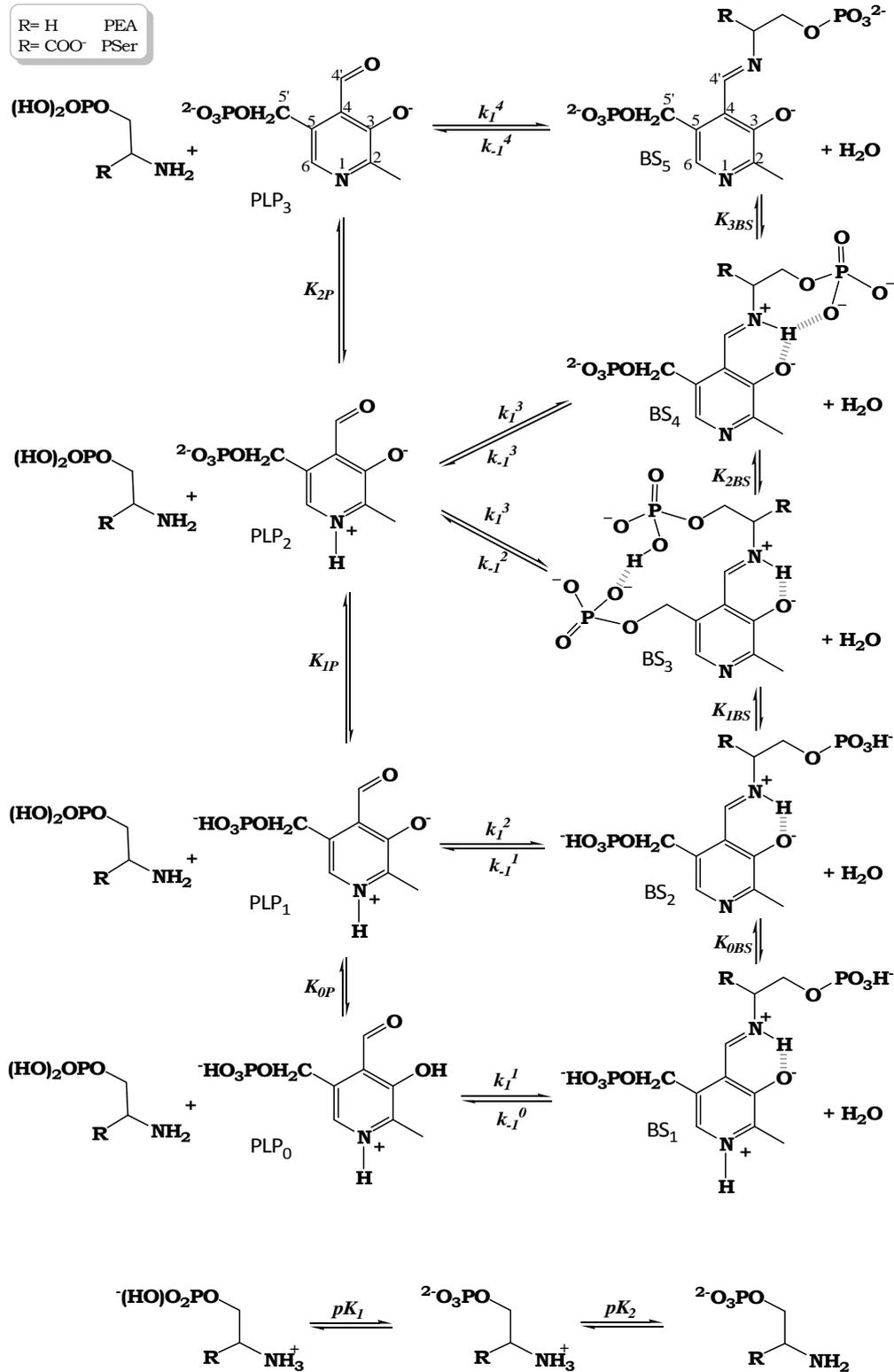
Se ha descrito que el PLP es un inhibidor eficiente de la glicación de aminofosfolípidos, sin efectos secundarios. Se ha puesto de manifiesto que los niveles de Amadori-PE se reducen al administrar un suplemento dietético de PLP en ratas con diabetes inducida [TOKITA, 2005][ASAI, 2009], y se ha observado que el PLP puede condensar fácilmente con la PE [HIGUCHI, 2006], detectándose el compuesto PE-PLP en glóbulos rojos humanos [NAKAGAWA, 2008][MIYAZAWA, 2012]. Sin embargo, no hay en la bibliografía estudios cuantitativos en los que se pondere la capacidad del PLP para reaccionar con los aminofosfolípidos. Por ello, es de interés ampliar el conocimiento sobre el papel inhibidor del PLP en condiciones fisiológicas para los aminofosfolípidos y conocer si las peculiaridades estructurales de los aminofosfolípidos tienen alguna repercusión relevante en la estabilidad de las BSs formadas.

La reacción entre el PLP y los aminofosfolípidos se produce por el ataque nucleófilo de la amina sobre el grupo carbonílico, tal y como sucede con los aminoácidos [METZLER, 1980] y con los ácidos aminofosfónicos [SZPOGANICZ, 1984A]. La formación de las BSs de PLP alteran considerablemente el espectro UV-Visible del PLP, lo que permitió el estudio cinético de su reacción con los aminofosfolípidos modelo utilizados en este trabajo.

Inicialmente, se realizó un análisis de la estabilidad de las BSs formadas en un amplio rango de pH utilizando los aminofosfatos PEA y P_{Ser} como modelos de las cabezas polares de los componentes de las membranas celulares que pueden ser glicados, la PE y la PS. Los resultados obtenidos se muestran en el artículo III, así como un estudio teórico realizado con DFT sobre el mecanismo de la formación de las BSs de PLP con metilamina, alanina y PEA que sustentan las discusiones que se derivan de los resultados experimentales.

Las constantes de formación (k_f) e hidrólisis (k_r) obtenidas a cada pH estudiado se relacionan con las constantes microscópicas (k_f^i y k_r^i) para cada especie iónica descritas en el esquema 4.3. A su vez, en el esquema se muestran las especies iónicas de los aminofosfatos, del PLP y de las correspondientes BSs presentes en el rango de pH 5,0 – 11,0, y se definen las constantes de ionización de cada uno de estos compuestos. El número de grupos ionizables de los reactivos y los valores de pK_a obtenidos revelaron que a partir de la especie PLP₂ se forman

dos BSs que presentan diferente estado de protonación en el grupo fosfato del amino compuesto. Por tanto, se asumió que la k_I debe ser idéntica para ambas BSs (k_I^3), mientras que la k_{-I} depende de la BS de partida (k_{-I}^2 y k_{-I}^3).



Esquema 4.3. Mecanismo de reacción entre el PLP y los aminofosfatos en función de las diferentes especies iónicas presentes entre pH 5,0 y 11,0.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4.4 e indican que:

a) El valor de k_I se incrementa desde pH básico a ácido, como resultado de la catálisis ácida intramolecular del proceso de deshidratación de la CA para formar la BS (paso limitante de la reacción). Este hecho se confirma por la obtención de un ajuste lineal al realizar la representación de Brönsted, cuyo valor de α se encuentra en el rango de 0,93 – 1,00 para los dos aminofosfatos.

b) Los valores de k_I^4 y k_I^3 para las BSs del PLP con el PEA y la PSer indican que la presencia del grupo carboxílico en α respecto al grupo amina disminuye la constante de formación de la BS en un orden de magnitud, aproximadamente. Los cálculos teóricos realizados en este sentido indican que los nucleófilos que contienen el grupo COO^- disminuyen la distancia entre el grupo fenol en 3 y el hidroxilo en 4' de la CA porque se establecen dos puentes de hidrógeno sucesivos (fenol–hidroxilo–carboxílico). Consecuentemente, aumenta la energía de activación del proceso de deshidratación de la CA, disminuyendo el valor de k_I .

Tabla 4.4. Valores de las constantes cinéticas y las constantes de ionización del esquema 4.3.

Constantes	PLP–PEA	PLP–PSer
$\log k_I^4$	$2,74 \pm 0,04$	$1,63 \pm 0,08$
$\log k_I^3$	$3,65 \pm 0,09$	$2,90 \pm 0,26$
$\log k_I^2$	$5,60 \pm 0,09$	$5,35 \pm 0,22$
$\log k_I^1$	$8,30 \pm 0,15$	$8,40 \pm 0,30$
$\text{p}K_{2P}$	$8,33^a$	$8,33^a$
$\text{p}K_{1P}$	$5,90^a$	$5,90^a$
$\text{p}K_{0P}$	$3,60^a$	$3,60^a$
$\log k_{-1}^4$	$1,20 \pm 0,05$	$0,80 \pm 0,05$
$\log k_{-1}^3$	$-0,60 \pm 0,10$	$-0,60 \pm 0,09$
$\log k_{-1}^2$	$0,90 \pm 0,10$	$0,77 \pm 0,15$
$\log k_{-1}^1$	$-0,02 \pm 0,03$	$0,40 \pm 0,20$
$\log k_{-1}^0$	$-0,06 \pm 0,03$	$0,30 \pm 0,20$
$\text{p}K_{3BS}$	$11,1 \pm 0,3$	$11,1 \pm 0,3$
$\text{p}K_{2BS}$	$6,9 \pm 0,2$	$7,5 \pm 0,1$
$\text{p}K_{1BS}$	$6,0 \pm 0,20$	$5,9 \pm 0,2$
$\text{p}K_{0BS}$	$5,4 \pm 0,20$	$5,5 \pm 0,2$
$\log K_M$	$1,5 \pm 0,2$	$0,60 \pm 0,2$
$\text{p}K_2$	$10,2 \pm 0,2$	$10,2 \pm 0,2$
$\text{p}K_1$	$5,6 \pm 0,2$	$5,7 \pm 0,2$

^aEstos valores fueron fijados.

c) Los valores de $\log k_I^4$ y $\log k_I^3$ para las BSs del PLP con los aminofosfatos son menores que para aminas primarias (ácido ϵ -amino caproico: $\log k_I^4 = 3,16$ y $\log k_I^3 = 4,15$ [VÁZQUEZ, 1990A]) y aminoácidos (serina: $\log k_I^4 = 2,37$ y $\log k_I^3 = 3,20$ [VÁZQUEZ, 1991A]), lo que sugiere que el grupo fosfato o un incremento del número de cargas negativas en el nucleófilo reduce las constantes de formación de las BSs. Los cálculos teóricos indican que la barrera

energética del proceso de deshidratación es mayor para el nucleófilo que contiene el grupo fosfato, lo que explica la disminución del valor de k_1 .

d) La presencia del grupo fosfato añade una constante de ionización más para la BS (pK_{2BS}) en el rango de pH estudiado, cuyo valor es consistente con el determinado para ácidos aminofosfónicos [SZPOGANICZ, 1984A, 1984B]. Su presencia disminuye el valor del pK_{aBS} del grupo fosfato en 5' en 0,5 unidades, aproximadamente, respecto al valor obtenido para las BSs de PLP con aminoácidos y aminas primarias [VÁZQUEZ, 1990A, 1991A], mientras que los otros valores de pK_{aBS} no se ven alterados.

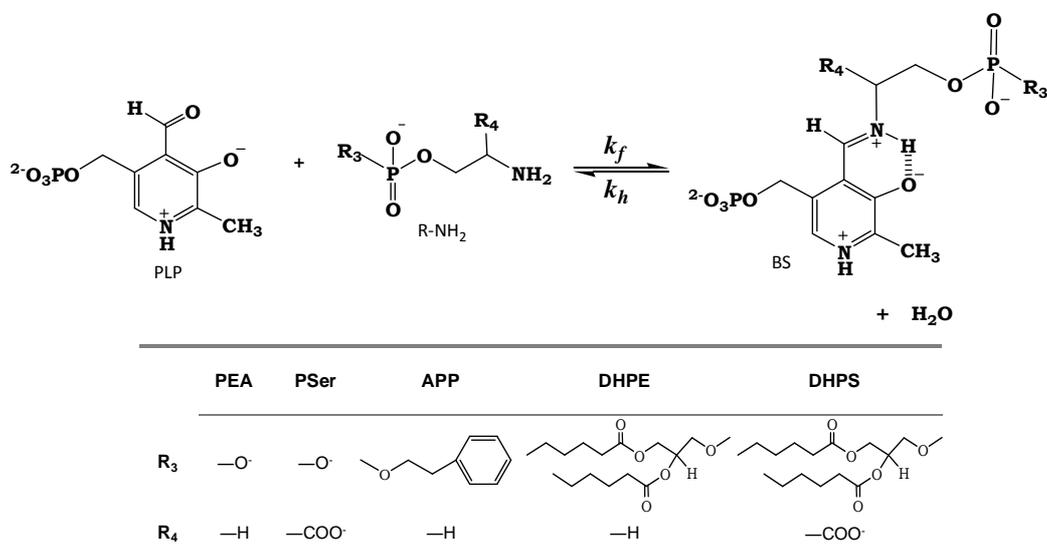
e) Los valores de la constante de hidrólisis de las BSs no presentan una tendencia clara con el pH, ya que la protonación de los diferentes grupos iónicos presentes en la molécula causan diferentes efectos en las constantes cinéticas. La incorporación del primer protón en la BS₅ resulta en la disminución del valor de k_1 como consecuencia de la formación de dos enlaces de hidrógeno en la especie BS₄ (ver esquema 4.3). Sin embargo, la protonación del grupo fosfato del nucleófilo inestabiliza la BS, posiblemente debido a la pérdida de los enlaces de H simultáneos entre el fenol, la imina y el fosfato del aminofosfato y a la formación del enlace de H entre los dos grupos fosfatos de la BS₃ (ver esquema 4.3). La protonación del grupo fosfato en 5' vuelve a estabilizar la BS₂ ($k_1^2 > k_1^1$), mientras que la protonación del N piridínico no tiene ningún efecto (BS₁).

f) La máxima estabilidad de la BS, determinada por K_{pH} (calculada como la ratio k_1/k_{-1} de los valores obtenidos a cada pH) se alcanza a pH 9,0, valor que se encuentra entre el pK_a del grupo amina y el último pK_a del PLP.

g) El valor de K_M (constante de equilibrio a pH básico) es ocho veces superior para el PLP-PEA que para la PLP-PSer, lo que demuestra que el PEA forma BSs más estables que la PSer, compuesto que posee un grupo carboxílico en α respecto a la amina. Debido a la presencia del grupo fosfato, el valor de K_M para el PEA y la PSer son menores que los determinados para aminas y aminoácidos, respectivamente (n-hexilamina: $\log K_M = 2,6$ [GARCÍA DEL VADO, 1987] y serina: $\log K_M = 1,3$ [VÁZQUEZ, 1991A]).

Para establecer el potencial inhibitor del PLP se ha estudiado su reacción en condiciones fisiológicas de pH y temperatura con un conjunto de análogos de los aminofosfolípidos: PEA, PSer, APP, DHPE y DHPS, cuya estructura se muestra en el esquema 4.4. A partir de los valores de pK_a obtenidos en el estudio de la estabilidad de las BSs de los aminofosfatos se sabe que las especies iónicas mayoritarias en condiciones fisiológicas, mostradas en el esquema 4.4, corresponden a la especie PLP₂ y BS₄ del esquema 4.3. Los datos experimentales obtenidos por espectroscopia UV-Visible se ajustaron al esquema de reacción, y proporcionaron los valores de las constantes cinéticas de formación (k_f) y de hidrólisis (k_h), y

por tanto, su constante de equilibrio (K_{eq}) en condiciones fisiológicas, resultados que aparecen en los artículos I y II, y se han recogido en la tabla 4.5.



Esquema 4.4. Mecanismo de formación e hidrólisis de las BSs del PLP con los modelos de aminofosfolípidos.

Los resultados obtenidos indican que la naturaleza de los grupos sustituyentes de los aminofosfolípidos influye sobre su reactividad frente al PLP. La presencia de grupos apolares favorece la formación de la BS, obteniendo para el APP, la DHPE y la DHPS valores de k_f aproximadamente tres veces superiores al PEA y la PSer. De esta manera, la reducción de la reactividad debida al grupo fosfato, efecto determinado anteriormente (punto 4.2.2 apartado c), por comparación con aminas primarias y aminoácidos, queda enmascarado por la mayor repercusión de los sustituyentes no polares.

Tabla 4.5. Constantes cinéticas para las reacciones del PLP a pH 7,4 y a 37 °C.

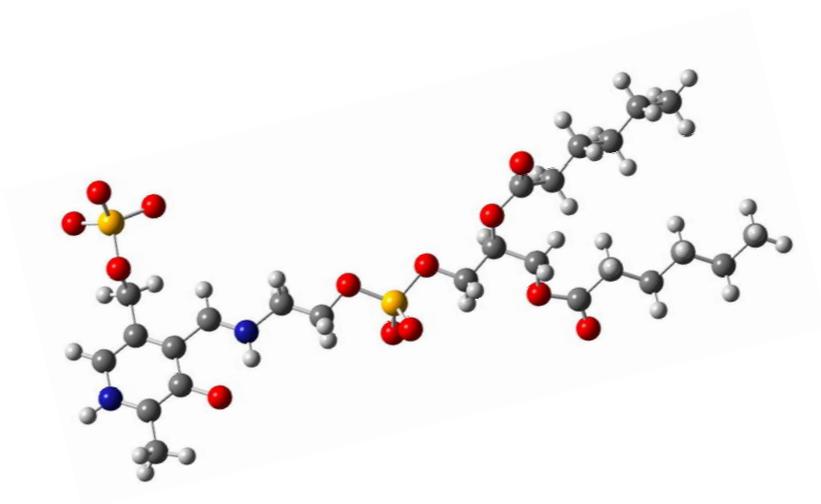
Compuesto	PEA	PSer	APP	DHPE	DHPS
k_f ($M^{-1} h^{-1}$)	$4,5 \cdot 10^3$	$3,4 \cdot 10^3$	$1,4 \cdot 10^4$	$1,3 \cdot 10^4$	$9,5 \cdot 10^3$
k_h (h^{-1})	$8,2 \cdot 10^1$	$1,1 \cdot 10^2$	$5,9 \cdot 10^1$	$3,8 \cdot 10^1$	$6,3 \cdot 10^1$
K_{eq} (M^{-1})	$5,5 \cdot 10^1$	$3,0 \cdot 10^1$	$2,3 \cdot 10^2$	$3,4 \cdot 10^2$	$1,5 \cdot 10^2$

Por otro lado, los valores de k_h para los compuestos totalmente polares (PEA y PSer) son prácticamente el doble que los obtenidos para el APP, la DHPE y la DHPS, lo que sugiere que las partes hidrofóbicas de las moléculas actúan como escudo protector frente al ataque de las moléculas de agua que hidrolizan la BS. Estos resultados coinciden con estudios anteriores de la reacción del PLP con grupos amina primarios y aminoácidos [VÁZQUEZ, 1990A, 1992C]. Análogamente, los datos para la DHPE y la DHPS concuerdan con las deducciones

mencionadas anteriormente (punto 4.2.2 apartado b) sobre el hecho de que el grupo carboxilato dificulta la formación de la BS, aunque facilita su hidrólisis.

Los valores obtenidos son resultado de la doble polaridad presente en la estructura de estos compuestos, la cual no se había analizado previamente. Respecto a los aminoácidos [VÁZQUEZ, 1990A], los compuestos de este estudio tienen valores mayores de k_f y similares de k_i , mientras que respecto a compuestos anfífilicos, como la dodecilamina [VÁZQUEZ, 1992C], presentan valores similares de k_f y mayores de k_i . Esto se traduce en que los valores de K_{eq} son claramente superiores para los aminofosfolípidos que para los aminoácidos (leucina: $K_{eq} = 85$ y glicina: $K_{eq} = 100$ [VÁZQUEZ, 1990A]).

Los valores de k_f de la tabla 4.5 son entre 4 y 5 órdenes de magnitud mayores que los valores de k_{obs} obtenidos con los grupos carbonílicos de capacidad glicante en condiciones fisiológicas, recogidos en la tabla 4.1. La mayor actividad biológica del PLP se atribuye al hecho de que éste presenta una mayor proporción de forma carbonílica a pH 7,4, así como un aumento en la estabilidad de sus BSs debido al enlace de hidrógeno intramolecular que se forma entre el grupo fenolato y la imina protonada, lo que no ocurre en ninguna otra BS. Estos datos confirman el efecto inhibitor del PLP, ya que reacciona con mayor rapidez con los grupos amina de los aminofosfolípidos, formando una BS reversible que no evoluciona hacia la formación del AP, previniendo así la formación de AGEs.



CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

❖ Los aminofosfolípidos son menos reactivos que los aminoácidos en su reacción de formación de una BS con compuestos carbonílicos. Esta disminución en la reactividad intrínseca de los aminofosfolípidos se debe a la presencia del grupo fosfato y de grupos hidrofóbicos en su estructura química.

❖ En condiciones fisiológicas, la presencia de grupos hidrofóbicos en los compuestos estudiados incrementa significativamente la eficiencia de la reacción de formación de una BS. Esto se debe a que los sustituyentes apolares disminuyen el valor del pK_a del grupo amina, aumentando la proporción de nucleófilo en forma reactiva. Además, los sustituyentes hidrofóbicos dificultan la hidrólisis de la BS.

❖ De manera análoga a lo observado en la formación de las BSs de los aminoácidos, un factor determinante de la formación de las BSs de los aminofosfolípidos es el valor de pK_a de su grupo amina. En este trabajo, se ha estimado que el valor de pK_a intrínseco *in vitro* para estos compuestos vale 8,5. No obstante, *in vivo* la composición de las membranas lipídicas podría influir en el valor del pK_a superficial, lo que modificaría la eficiencia de esta reacción en condiciones fisiológicas.

❖ La comparación de los resultados obtenidos para los modelos estructuralmente simplificados de la PE y para los de la PS revela que la presencia del grupo carboxílico en posición α respecto al grupo amina disminuye notablemente la reactividad intrínseca del nucleófilo (k_I) y su eficiencia (determinada en condiciones fisiológicas para la reacción con compuestos carbonílicos glicantes (k_{obs}) y con el inhibidor PLP (k_f)). Esto sugiere que de los dos lípidos naturales que pueden ser glicados, la PE sería el aminofosfolípido más reactivo.

❖ La constante de formación de la BS de los análogos de los aminofosfolípidos con el PLP es entre 4 y 5 órdenes de magnitud mayor que la constante de reacción con los compuestos carbonílicos de capacidad glicante. La mayor actividad biológica del PLP se atribuye al hecho de que éste presenta una mayor proporción de forma carbonílica en condiciones fisiológicas, así como un aumento en la estabilidad de sus BSs debido al enlace de hidrógeno intramolecular que se forma entre el grupo fenolato, la imina protonada y el fosfato de los aminofosfolípidos, lo que no ocurre en ninguna otra BS.

❖ La PM ha sido descrita como un inhibidor de la glicación no enzimática de proteínas, demostrando que reacciona más rápido con compuestos carbonílicos con capacidad glicante de lo que lo hace el grupo ϵ -amina de la cadena lateral de un modelo proteico [ADROVER, 2009A]. Los valores de k_{obs} obtenidos para los compuestos análogos de los aminofosfolípidos y los grupos carbonilos estudiados también son inferiores (entre 3 y 40 veces menores) que el valor de esta constante obtenida para la reacción entre la PM y los mismos grupos carbonílicos, en las mismas condiciones experimentales. Esto justifica que la PM podría ser un inhibidor competitivo de la glicación de aminofosfolípidos, evitando la modificación de sus cabezas polares.

❖ El grupo hidroxilo en la posición 3 de la PM es el responsable de la estabilidad del producto carbinolamina formado por su reacción con los grupos carbonilos. Además, este hidroxilo también es el responsable de la formación de un compuesto hemiaminal cíclico muy estable, ya que se ha comprobado que este producto no se forma con nucleófilos que carecen del grupo hidroxilo en la posición 3 (4-aminometilpiridina).



BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

A

- [ABBOTT, 1970] Abbott, E. H.; Martell, A. E. Mechanism of formation, structure, stereochemistry, and racemization of bis[pyridoxylidene(aminoacidato)] aluminum (III) complexes. *J. Am. Chem. Soc.*, **1970**, *92*, 5845.
- [ABRAMS, 1976] Abrams, W. R.; Kallen, R. G. Equilibriums and kinetic of N-hydroxymethylamine formation from aromatic exocyclic amines and formaldehyde. Effects of nucleophilicity and catalyst strength upon mechanisms of catalysis of carbinolamine formation. *J. Am. Chem. Soc.*, **1976**, *98*, 7777.
- [ADROVER, 2005] Adrover, M.; Vilanova, B.; Muñoz, F.; Donoso, J. Inhibition of glycosylation processes: the reaction between pyridoxamine and glucose. *Chem. Biodivers.*, **2005**, *2*, 964.
- [ADROVER, 2007] Adrover, M.; Vilanova, B.; Muñoz, F.; Donoso, J. Pyridoxamine, a scavenger agent of carbohydrates. *Int. J. Chem. Kinet.*, **2007**, *39*, 154.
- [ADROVER, 2008A] Adrover, M.; Vilanova, B.; Frau, J.; Muñoz, F.; Donoso, J. The pyridoxamine action on Amadori compounds: a reexamination of its scavenging capacity and chelating effect. *Bioorg. Med. Chem.*, **2008**, *16*, 5557.
- [ADROVER, 2008B] Adrover, M.; Vilanova, B.; Muñoz, F.; Donoso, J. Kinetic study of the reaction of glycolaldehyde with two glycation target models. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **2008**, *1126*, 235.
- [ADROVER, 2009A] Adrover, M.; Vilanova, B.; Frau, J.; Muñoz, F.; Donoso, J. A comparative study of the chemical reactivity of pyridoxamine, Ac-Phe-Lys and Ac-Cys with various glycating carbonyl compounds. *Amino Acids*, **2009**, *36*, 437.
- [ADROVER, 2009B] Adrover, M.; Vilanova, B.; Muñoz, F.; Donoso, J. Unexpected isomeric equilibrium in pyridoxamine Schiff bases. *Bioorg. Chem.*, **2009**, *37*, 26.
- [ADROVER, 2010A] Adrover, M.; Frau, J.; Caldés, C.; Vilanova, B.; Donoso, J.; Muñoz, F. Theoretical and experimental study of the vertical excitation energies in the ionic and tautomeric forms of 4-aminomethylpyridine. *J. Photoch. Photobio. A*, **2010**, *209*, 19.
- [ADROVER, 2010B] Adrover, M.; Frau, J.; Caldés, C.; Vilanova, B.; Donoso, J.; Muñoz, F. Impact of the ionic forms on the UV-Vis spectra 2-hydroxybenzylamine. A TD-DFT study. *Int. J. Quantum Chem.*, **2010**, *110*, 2179.
- [ADROVER, 2012] Adrover, M.; Caldés, C.; Vilanova, B.; Frau, J.; Donoso, J.; Muñoz, F. Towards a detailed description of pyridoxamine tautomeric species. *New J. Chem.*, **2012**, doi:10.1039/C2NJ40230K
- [AGUILAR-HERNÁNDEZ, 2007] Aguilar-Hernández, M.; Méndez, J. D. *In vitro* glycation of brain aminophospholipids by acetoacetate and its inhibition by urea. *Biomed. Pharmacother.*, **2007**, *61*, 693.
- [AHMED, 2002] Ahmed, N.; Argirov, O. K.; Minhas H. S.; Cordeiro, C. A.; Thornalley, P. J. Assay of advanced glycation end-products (AGEs): surveying AGEs by chromatographic assay with derivatization by 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate and application to N ϵ -carboxymethyl-lysine and N ϵ -(1-carboxyethyl)lysine-modified albumin. *Biochem. J.*, **2002**, *364*, 1.

- [AHMED, 2005] Ahmed, N.; Thornalley, P. J. Peptide mapping of human serum albumin modified minimally by methylglyoxal *in vitro* and *in vivo*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **2005**, 1043, 260.
- [AL-ABED, 1997] Al-Abet, Y.; R. Bucala, R. Efficient scavenging of fatty acid oxidation products by aminoguanidine. *Chem. Res. Toxicol.*, **1997**, 10, 875.
- [ALDINI, 2007] Aldini, G.; Dalle-donne, I.; Facino, R. M.; Milzani, A.; Carini, M. Intervention strategies to inhibit protein carbonylation by lipoxidation-derived reactive carbonyls. *Med. Res. Rev.*, **2007**, 27, 817.
- [ALLGOOD, 1992] Allgood, V. E.; Cidlowski, J. A. Vitamin B₆ modulates transcriptional activation by multiple members of the steroid hormone receptor superfamily. *J. Biol. Chem.*, **1992**, 267, 3819.
- [AMANO, 2001] Amano, S.; Kaji, Y.; Oshika, T.; Oka T.; Machinami, R.; Nagai, R.; Horiuchi S. Advanced glycation end products in human optic nerve head. *Br. J. Ophthalmol.*, **2001**, 85, 52.
- [AMARNATH, 2004] Amarnath, V.; Amarnath, K.; Amarnath, K.; Davies, S.; Roberts, L. J. Pyridoxamine: an extremely potent scavenger of 1,4-dicarbonyls. *Chem. Res. Toxicol.*, **2004**, 173, 410.
- [ANDERSON, 1964] Anderson, F. J. ; Martell, A. E. Pyridoxal phosphate: molecular species in solution. *J. Am. Chem. Soc.*, **1964**, 86, 715.
- [ANDREU, 2001] Andreu, R.; Garín, J.; Orduna, J. Electronic absorption spectra of closed and open-shell tetrathiafulvalenes: the first time-dependent density-functional study. *Tetrahedron*, **2001**, 57, 7883.
- [ANGYAL, 1991] Angyal, S. The composition of reducing sugars in solution: current aspects. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **1991**, 49, 19.
- [ANSARI, 2011] Ansari, N. A.; Moinuddin; Ali, R. Glycated lysine residues: a marker protein glycation in age-related diseases. *Dis. Markers*, **2011**, 30, 317.
- [ANTOL, 2003] Antol, I.; Eckert-Maksic, M.; Klessinger, M. Ab initio study of excited state protonation of monosubstituted benzenes. *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* **2003**, 664-665, 309.
- [ARGIROV, 1998] Arginov, O. K.; Kerina, I. I.; Uzunova, J. I.; Argirova, M. D. Modeling of protein and aminophospholipid glycation using low molecular weight analogs. A comparative study. *From Special Publication – Royal Society of Chemistry*, **1998**, 223 (*The Maillard Reaction in Foods and Medicine*), 245.
- [ASAI, 2009] Asai, A.; Okajima, F.; Nakagawa, K.; Ibusuki, D.; Tanimura, K.; Nakajima, Y.; Nagao, M.; Sudo, M.; Harada, T.; Miyazawa, T.; Oikawa, S. Phosphatidylcholine hydroperoxide-induced THP-1 cell adhesion to intracellular adhesion molecule-1. *J. Lipid Res.*, **2009**, 50, 957.
- [AULD, 1967] Auld, D. S.; Bruice, T. C. Catalytic reactions involving azomethines. VII. Rates of equilibria of aldimine formation with 3-hydroxypyridine-4-carboxaldehyde and alanine. *J. Am. Chem. Soc.*, **1967**, 89, 2083.
- B**
- [BAISIER, 1992] Baisier, W. M.; Labuza, T. P. Maillard browning kinetics in a liquid model system. *J. Agric. Food Chem.*, **1992**, 40, 707.
- [BALDASSARRE, 2011] Baldassarre, M.; Scirè, A.; Fiume, I.; Tanfani, F. Insights into the structural properties of D-serine dehydratase from *Saccharomyces cerevisiae*: an FT-IR spectroscopic and *in silico* approach. *Biochimie*, **2011**, 93, 542.

- [BALDASSARRE, 2012] Baldassarre, M.; Scirè, A.; Fiume, I.; Tanfani, F. Turning pyridoxal 5'-phosphate-dependent enzymes into thermostable binding proteins: D-serine dehydratase from baker's yeast as a case study. *Biochimie*, **2012**, *94*, 479.
- [BALK, 1981] Balk, H.; Merkl, I.; Bartholomes, P. Circular dichroism studies on the interaction of tryptophan synthase with pyridoxal 5'-phosphate. *Biochemistry*, **1981**, *20*, 6391.
- [BANKS, 1961] Banks, B. E.; Diamantis, A. A.; Vernon, C. A. Transamination. Part II. The non-enzymic reactions between pyridoxamine and pyruvic acid and between pyridoxal and alanine. *J. Chem. Soc.*, **1961**, 4235.
- [BARSHOP, 1983] Barshop, B. A.; Wrenn, R. W.; Frieden, C. Analysis of numerical methods for computer simulation of kinetic processes: development of KINSIM – a flexible, portable system. *Anal Biochem.*, **1983**, *130*, 134.
- [BARTL, 1998] Bartl, F.; Urjasz, H.; Brzezinski, B. FT-IR study of pyridoxal phosphate. *J. Mol. Struct.*, **1998**, *441*, 77.
- [BAYNES, 1999] Baynes, J. W.; Thorpe, S. R. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes*, **1999**, *48*, 1.
- [BAYNES, 2000] Baynes, J. W.; Thorpe, S. R. Glycooxidation and lipoxidation in atherogenesis. *Free Radic. Biol. Med.*, **2000**, *28*, 1708.
- [BAYNES, 2003] Baynes, J. W. Chemical modification of proteins by lipids in diabetes. *Clin. Chem. Lab. Med.*, **2003**, *41*, 1159.
- [BAZHULINA, 1966] Bazhulina, N. P.; Morozov, Y. V.; Karpeisky, M. Ya.; Ivanov, V. I.; Kuklin, A. I. The optical and luminescent properties of vitamin B₆ and its derivatives. II. Pyridoxine and pyridoxine 5'-phosphate. *Biofizika*, **1966**, *11*, 42.
- [BAZHULINA, 1974] Bazhulina, N. P.; Kirpichnikov, M. P.; Morozov, Yu. V.; Savin, F. A.; Sinyavina, L. B.; Florentiev, V. L. Absorption-luminescent properties and electronic structure of 4-pyridoxic acid and its lactone. *Molec. Photochem.*, **1974**, *6*, 337.
- [BEISSWENGER, 2003] Beisswenger, P. J.; Howell, S. K.; Nelson, R. G.; Mauer, M.; Szergold, B. S. A-oxoaldehyde metabolism and diabetic complications. *Biochem. Soc. Trans.*, **2003**, *31*, 1358.
- [BENDER, 2011] Bender, D. A. Vitamin B₆: beyond adequacy. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, **2011**, *16*, 29.
- [BENECKY, 1985A] Benecky, M. J.; Copeland, R. A.; Hays, T. R.; Lobenstine, E. W.; Rava, R. P. Resonance raman spectroscopy of pyridoxal Schiff bases. *J. Biol. Chem.*, **1985**, *260*, 11663.
- [BENECKY, 1985B] Benecky, M. J.; Copeland, R. A.; Rava, R. P.; Feldhaus, R.; Scott, R. D.; Metzler, C.; Metzler, D. E.; Spiro, T. G. Resonance raman spectra of the pyridoxal coenzyme in aspartate aminotransferase. Evidence for pyridine protonation and a novel photochemical hydrogen/deuterium exchange at the imine carbon atom. *J. Biol. Chem.*, **1985**, *260*, 11671.
- [BETTERIDGE, 2000] Betteridge, D. J. What is oxidative stress? *Metabolism*, **2000**, *49*, 3.
- [BEVINGTON, 1969] Bevington, P. R. *Data reduction and Error Analysis in Physical Sciences*, Ed. McGraw-Hill, New York, **1969**.
- [BOERS, 1997] Boers, G. H. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for arterial and venous disease. A review of evidence and relevance. *J. Thromb. Haemost.*, **1997**, *78*, 520.
- [BOOTH, 1996] Booth, A. A.; Khalifah, R. G.; Hudson, B. G. Thiamine pyrophosphate and pyridoxamine inhibit the formation of antigenic advanced glycation

- end-products: comparison with aminoguanidine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1996**, *220*, 113.
- [BOOTH, 1997] Booth, A. A.; Khalifah, R. G.; Todd, P.; Hudson, B. G. *In vivo* kinetic studies of formation of antigenic advanced glycation end products (AGEs). *J. Biol. Chem.*, **1997**, *272*, 5430.
- [BORCH, 1971] Borch, R. F.; Bernstein, M. D.; Durst, H. D. The cyanohydrinborate anion as a selective reducing agent. *J. Am. Chem. Soc.*, **1971**, *93*, 2897.
- [BREITLING-UTZMANN, 2001] Breitling-Utzmann, C. M.; Unger, A.; Friedl, D. A.; Lederer, M. O. Identification and quantification of phosphatidylethanolamine and aminoketoses from human erythrocytes – Influence of glycation products on lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.*, **2001**, *391*, 245.
- [BRIDGES, 1966] Bridges, J. W. ; Davies, D. S.; Williams, R. T. Fluorescence studies on some hydroxypyridines including compounds of the Vitamin B₆ group. *Biochem. J.*, **1966**, *98*, 451.
- [BROCK, 2003] Brock, J. W.; Hinton, D. J.; Cotham, W. E.; Metz, T. O.; Thorpe, S. R.; Baynes, J. W.; Ames, J. M. Proteomic analysis of the site specificity of glycation and carboxymethylation of ribonuclease. *J. Proteome Res.*, **2003**, *2*, 506.
- [BROUSMICHE, 1998] Brousmiche, D.; Wan, P. Photogeneration of an *o*-quinone methide from pyridoxine (vitamin B₆) in aqueous solution. *Chem. Commun.*, **1998**, *4*, 491.
- [BROWNLEE, 2001] Brownlee, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, **2001**, *414*, 813.
- [BUCALA, 1984] Bucala, R.; Model, P.; Cerami, A. Modification of DNA by reducing sugars: a possible mechanism for nucleic acid aging and age-related dysfunction in gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1984**, *81*, 105.
- [BUCALA, 1993] Bucala, R.; Makita, A.; Koschinsky, T.; Cerami, A.; Vlassara, H. Lipid advanced glycosylation: pathway for lipid oxidation *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1993**, *90*, 6434.
- [BUENO, 2003] Bueno, C.; Encinas, M. V. Photophysical and photochemical studies on pyridoxamine. *Helv. Chim. Acta*, **2003**, *86*, 3363.
- [BUENO, 2010] Bueno, C.; Pavez, P.; Salazar, R.; Encinas, V. Photophysics and photochemical studies of the Vitamin B₆ group and related derivatives. *Photochem. Photobiol.*, **2010**, *86*, 39.
- [BUNN, 1981] Bunn, H. F.; Higgins, P. J. Reaction of monosaccharides with proteins: possible evolutionary significance. *Science*, **1981**, *213*, 222.
- [BUSCH, 2010] Busch, M.; Göbert, A.; Franke, S.; Ott, U.; Gerth, J.; Müller, A.; Stein, G.; Bitsch, R.; Wolf, G. Vitamin B₆ metabolism in chronic kidney disease – relation to transsulfuration, advanced glycation and cardiovascular disease. *Nephron. Clin. Pract.*, **2010**, *114*, c38.

C

- [CABALLERO, 2000] Caballero, F.; Gerez, E.; Batlle, A.; Vazquez, E. Preventive aspirin treatment of streptozotocin induced diabetes: blockage of oxidative status and reversion of heme enzymes inhibition. *Chem.-Biol. Interact.*, **2000**, *126*, 215.
- [CAI, 2000] Cai, Z.-L.; Reimers, J. R. The low-lying excited states of pyridine. *J. Phys. Chem. A*, **2000**, *104*, 8389.

- [CAI, 2002] Cai, Z.-L.; Reimers, J. R. The first singlet (n, π) and (π, π) excited states of the hydrogen-bonded complex between water and pyridine. *J. Phys. Chem. A*, **2002**, *106*, 8769.
- [CASASNOVAS, 2009] Casasnovas, R.; Salvà, A.; Frau, J.; Donoso, J.; Muñoz, F. Theoretical study on the distribution of atomic charges in the Schiff bases of 3-hydroxypyridine-4-aldehyde and alanine. The effect of the protonation state of the pyridine and imine nitrogen atoms. *Chem. Phys.*, **2009**, *355*, 149.
- [CASELLA, 1983] Casella, L.; Gullotti, M. Conformations of pyridoxal Schiff bases of amino acids. *J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, *105*, 803.
- [CASH, 2005] Cash, M. T.; Schreiner, P. R.; Phillips, R. S. Excited state tautomerization of azaindole. *Org. Biomol. Chem.*, **2005**, *3*, 3701.
- [CHAN-HUOT, 2010A] Chan-Huot, M.; Niether, C.; Sharif, S.; Tolstoy, P. M.; Toney, M. D.; Limbach, H. -H. NMR studies of the protonation states of pyridoxal-5'-phosphate in water. *J. Mol. Struct.*, **2010**, *976*, 282.
- [CHAN-HUOT, 2010B] Chan-Huot, M.; Sharif, S.; Tolstoy, P. M.; Toney, M. D.; Limbach, H. H. NMR studies of the stability, protonation states, and tautomerism of ^{13}C - and ^{15}N -labeled aldimines of the coenzyme pyridoxal 5'-phosphate in water. *Biochemistry*, **2010**, *49*, 10818.
- [CHEESEMAN, 1996] Cheeseman, J. R.; Trucks, G. W.; Keith, T. A.; Frisch, M. J. A comparison of models for calculating nuclear magnetic resonance shielding tensors. *J. Chem. Phys.*, **1996**, *104*, 5497.
- [CHEN, 2004] Chen, A.S.; Taquchi, T.; Sugiura, M.; Wakasugi, Y.; Kamei, A.; Wang, M. W.; Miwa, I. Pyridoxal-aminoguanidine adduct is more effective than aminoguanidine in preventing neuropathy and cataract in diabetic rats. *Horm. Metab. Res.*, **2004**, *36*, 183.
- [CHETYRKIN, 2008A] Chetyrkin, S.; Zhang, W.; Hudson, B. G.; Serianni, A. S.; Voziyan, P. V. Pyridoxamine protects protein from functional damage by 3-deoxyglucosone: mechanism of action for pyridoxamine. *Biochemistry*, **2008**, *47*, 997.
- [CHETYRKIN, 2008B] Chetyrkin, S.; Mathis, M. E.; Ham, A.-J.; Hachey, D. L.; Hudson, B. G.; Voziyan, P. V. Propagation of protein glycation damage involves modification of tryptophan residues via reactive oxygen species: inhibition by pyridoxamine. *Free Radic. Biol. Med.*, **2008**, *44*, 1276.
- [CHEUNG, 2003] Cheung, P. Y.; Fong, C. C.; Ng, K. T.; Lam, W. C.; Leung, Y. C.; Tsang, C. W.; Yang, M.; Wong, M. S. Interaction between pyridoxal kinase and pyridoxal 5'-phosphate-dependent enzymes. *J. Biochem.*, **2003**, *134*, 731.
- [CHO, 2007] Cho, S. J.; Roman, G.; Yeboah, F.; Konishi, Y. The road to advanced glycation end products: a mechanistic perspective. *Curr. Med. Chem.*, **2007**, *14*, 1653.
- [CHRISTEN, 1985] Christen, P.; Metzler, D. E. In: *Transaminases*. Ed. Wiley-Interscience, New York, **1985**.
- [CHUANG, 2012] Chuang, Y.-C.; Wu, M.-S.; Wu, T.-H.; Su, Y.-K.; Lee, Y.-M. Pyridoxamine ameliorates the effects of advanced glycation end products on subtotal nephrectomy induced chronic renal failure rats. *J. Funct. Foods*, **2012**, *4*, 679.
- [CINTA, 1999] Cinta, S.; Morari, C.; Vogel, E.; Maniu, D.; Aluas, M.; Iliescu, T.; Cozar, O.; Kiefer, W. Vibrational studies of B₆ vitamin. *Vib. Spectrosc.*, **1999**, *19*, 329.
- [CLAYTON, 2006] Clayton, P. T. B₆-responsive disorders: a model of vitamin dependency. *J. Inherit. Metab. Dis.*, **2006**, *29*, 317.

- [COLONNA, 1993] Colonna, C.; Cosse-Barbi, A.; Massat, A.; Doucet, J. P. IR studies of iron complexes with pyridoxal isonicotinoyl hydrazone and three other similar chelating agents. *Spectrosc. Lett.*, **1993**, *26*, 1065.
- [COOK, 2003] Cook, P. Alpha,beta-elimination reaction of *O*-acetylserine sulfhydrylase. Is the pyridine ring required? *Biochem. Biophys. Acta*, **2003**, *1647*, 66.
- [CORDES, 1963] Cordes, E. H.; Jencks, W. P. The mechanism of hydrolysis of Schiff bases derived from aliphatic amines. *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, *85*, 2843.
- [CORNISH, 1984] Cornish, T. J.; Ledbetter, J. W. Laser-induced enzyme reactions in transamination. *IEEE J. Quantum Electron.*, **1984**, *20*, 1375.
- [CRESPINO, 2000] Crespo, R.; Merchán, M.; Michl, J. Electronic excitation in saturated chain: an MS-CASPT2 treatment of the anti conformer of n-tetrasilane. *J. Phys. Chem. A*, **2000**, *104*, 8593.
- [CRUGEIRAS, 2009] Crugeiras, J.; Rios, A.; Riveiros, E.; Richard, J. P. Substituent effects on the thermodynamic stability of imines formed from glycine and aromatic aldehydes: implications for the catalytic activity of pyridoxal 5'-phosphate. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 15815.
- D**
- [D'AGOSTINO, 1986] D'Agostino, R. B. *Goodness-of-Fit Techniques*, Ed. Dekker, New York, **1986**, 7.
- [DAVIES, 2006] Davies, S. S.; Brantley, E. J.; Voziyan, P. A.; Amarnath, V.; Zagol-Ikapitte, I.; Boutaud, O.; Hudson, B. G.; Oates, J. A.; Roberts 2nd, L. J. Pyridoxamine analogues scavenge lipid-derived γ -ketoaldehydes and protect against H₂O₂-mediated cytotoxicity. *Biochemistry*, **2006**, *45*, 15756.
- [DAVIS, 1961] Davis, L.; Roddy, F.; Metzler, D. E. Metal chelates of imines derived from pyridoxal and amino acids. *J. Am. Chem. Soc.*, **1961**, *83*, 127.
- [DE BILLY, 1975] de Billy, G.; Nuller, P.; Chatagner, F. New insights into the active center of rat liver cystathionase. *Biochim. Biophys. Acta*, **1975**, *397*, 231.
- [DEDONDER-LARDEUX, 2003] Dedonder-Lardeux, C.; Jouvét, C.; Perun, S.; Sobolewski, A. External electric field effect on the lowest excited states of indole: ab initio and molecular dynamics study. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2003**, *5*, 5118.
- [DEIJEN, 1992] Deijen, J. B.; van der Beek, E. J.; Orlebeke, J. F.; van den Berg, H. Vitamin B₆ supplementation in elderly men: effects on mood, memory, performance and mental effort. *Psychopharmacology*, **1992**, *109*, 489.
- [DI SALVO, 2011] di Salvo, M. L.; Contestabile, R.; Safo, M. K. Vitamin B₆ salvage enzymes: mechanism, structure and regulation. *Biochim. Biophys. Acta*, **2011**, *1814*, 1597.
- [DOLPHIN, 1986] Dolphin, D.; Poulson, R.; Avramovic, O. In: *Vitamin B₆ pyridoxal phosphate, chemical, biochemical, and medicinal aspects*. Part A and B. Ed. Wiley-Interscience, New York, **1986**.
- [DRAPER, 1981] Draper, N.; Smith, H. *Applied Regression Analysis*, Ed. Wiley, New York, **1981**.
- [DWORKIN, 2000] Dworkin, J. P.; Miller, S. L. A kinetic estimate of the free aldehyde content of aldoses. *Carbohydr. Res.*, **2000**, *329*, 359.
- [DYER, 1991] Dyer, D. G.; Blackledge, J. A.; Thorpe, S. R.; Baynes, J. W. Formation of pentosidine during nonenzymatic browning of proteins by glucose. *J. Biol. Chem.*, **1991**, *266*, 11654.

E

- [ECHEVARRÍA, 1988] Echevarría, G.; Santos, J. G.; García, M. A.; García Blanco, F. *Proceedings of the 22th meeting of R.S.E.Q.*, Murcia, Spain, 1988, p. 41.
- [ECHEVARRÍA, 1999] Echevarría, G. R.; Martín Perez, M. P.; Santos, J. G.; García Blanco, F. Determination of the rates of formation and hydrolysis of the Schiff bases formed by pyridoxal 5'-phosphate with copolypeptides containing L-lysine and aromatic L-amino acids. *Helv. Chim. Acta*, **1999**, *82*, 769.
- [ECHEVARRÍA, 2000] Echevarría, G. R.; Basagoitia, A.; Santos, J. G.; García Blanco, F. Determination of the rates of formation and hydrolysis of the Schiff bases formed by pyridoxal 5'-phosphate and hydrazinic compounds. *J. Mol. Catal. A-Chem.*, **2000**, *160*, 209.
- [ECHEVARRÍA, 2005] Echevarría, G. R.; Santos, J. G.; Basagoitia, A.; García Blanco, F. Kinetic and thermodynamic study of the reaction of pyridoxal 5'-phosphate with L-tryptophan. *J. Org. Phys. Chem.*, **2005**, *18*, 546.
- [EICHORN, 1954] Eichhorn, G. L.; Dawes, J. W. The metal complexes of vitamin B₆ and Schiff's base derivatives. *J. Am. Chem. Soc.*, **1954**, *76*, 5663.
- [ELIOT, 2004] Eliot, A. C.; Kirsch, J. F. Pyridoxal phosphate enzymes: mechanistic, structural, and evolutionary considerations. *Annu. Rev. Biochem.*, **2004**, *73*, 383.
- [ENDO, 2006] Endo, N.; Nishiyama, K.; Otsuka, A.; Kanouchi, H.; Taga, M.; Oka, T. Antioxidant activity of vitamin B₆ delays homocysteine-induced atherosclerosis in rats. *Br. J. Nutr.*, **2006**, *95*, 1088.
- [ESHTIAGH-HOSSEINI, 2011] Eshtiagh-Hosseini, H.; Housaindokht, M. R.; Beyramabadi, S. A.; Tabatabaei, S. H. M.; Esmaeili, A. A.; Khoshkholgh, M. J. Synthesis, experimental and theoretical characterization of N,N'-dipyridoxyl(1,4-butanediamine) Schiff-base ligand and its Cu(II) complex. *Spectrochim. Acta A*, **2011**, *78A(3)*, 1046.
- [ESTERBAUER, 1991] Esterbauer, H.; Schaur, R.J.; Zollner, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.*, **1991**, *11*, 81.

F

- [FAN, 2009] Fan, X.; Zhang, J.; Theves, M.; Strauch, C.; Nemet, I.; Liu, S.; Qian, J.; Giblin, F. J.; Monnier, V. M. Protein synthesis, post-translational modification, and degradation. *J. Biol. Chem.*, **2009**, *284*, 34618.
- [FANTACCI, 2004] Fantacci, S.; Migani, A.; Olivucci, M. CASPT2//CASSCF and TDDFT//CASSCF Mapping of the excited state isomerization path of a minimal model of the retinal chromophore. *J. Phys. Chem. A*, **2004**, *108*, 1208.
- [FARAGO, 1969] Farago, M. E.; Matthew, T. Reactions involving pyridoxal phosphate or pyridoxamine phosphate in the presence of metal ions. I. Reaction between pyridoxal phosphate and glutamate in the presence of cupric ions. *J. Chem. Soc. A*, **1969**, 609.
- [FELTY, 1970] Felty, W.; Eckstrom, C. G.; Leussing, D. L. Equilibrium studies involving Schiff base complexes. The zinc(II)-pyridoxal phosphate-glycine and - α -alanine systems. *J. Am. Chem. Soc.*, **1970**, *92*, 3006.
- [FELTY, 1974] Felty, W. A.; Leussing, D. L. Equilibrium and kinetic studies involving Schiff base complexes: the zinc(II)-pyruvate-pyridoxamine phosphate system and the mechanism of Zn catalyzed transamination. *J. Inorg. Nuc. Chem.*, **1974**, *36*, 617.

- [FINLEY, 1998] Finley, J.; Malmqvist, P.-A.; Roos, B. O.; Serrano-Andrés, L. The multi-state CASPT2 method. *Chem. Phys. Lett.*, **1998**, 288, 299.
- [FISCHER, 1980] Fischer, H.; DeCandis, F. X.; Ogden, S. D.; Jencks, W. P. Catalysis of transamination by rate-limiting proton transfer to buffer bases. *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, 102, 1340.
- [FLEMING, 2011] Fleming, T. H.; Humpert, P. M.; Nawroth, P. P.; Bierhaus, A. Reactive metabolites and AGE/RAGE-mediated cellular dysfunction affect the aging process – A mini-review. *Gerontology*, **2011**, 57, 435.
- [FOGLE, 2010] Fogle, E. J.; Toney, M. D. Mutational analysis of substrate interactions with the active site of dialkylglycine decarboxylase. *Biochemistry*, **2010**, 49, 6485.
- [FOUNTAIN, 1999] Fountain, W. C.; Requena, J. R.; Jenkins, A. J.; Lyons, T. J.; Smyth, B.; Baynes, J. W.; Thorpe, S. R. Quantification of N-(glucitol)ethanolamine and N-(carboxymethyl)serine: two products of nonenzymatic modification of aminophospholipids formed *in vivo*. *Anal. Biochem.*, **1999**, 272, 48.
- [FRAIKIN, 1989] Fraikin, G. Ya.; Strakhovskaya, M. G.; Ivanova, E. V.; Rubin, A. B. Near-UV activation of enzymic conversion of 5-hydroxytryptophan. *Photochem. Photobiol.*, **1989**, 49, 475.
- [FRANKLIN, 1980A] Franklin, K.; Richardson, M. F. Reactions of metal ions with vitamins. 2. Crystal structures of copper complexes with anionic and with neutral pyridoxamine. *Inorg. Chem.*, **1980**, 19, 2107.
- [FRANKLIN, 1980B] Franklin, T. A.; Richardson, M. F. Reactions of metal ions with vitamins. III. Synthesis and infrared spectra of metal complexes with pyridoxamine and pyridoxine. *Inorg. Chim. Acta*, **1980**, 46, 191.
- [FREEDMAN, 1999] Freedman, B. I.; Wuerth, J. P.; Cartwright, C.; Bain, R. P.; Dippe, S.; Hershon, K.; Mooradian A. D.; Spinowitz, B. S. Design and baseline characteristics for the aminoguanidine clinical trial in overt type 2 diabetic nephropathy (Action II). *Controlled Clin. Trials*, **1999**, 20, 493.
- [FRENCH, 1964] French, T. C.; Bruice, T. C. Catalytic reactions involving azomethines. IV. Rates and equilibria of imine formation with pyridine 4-aldehyde and various amino acids. *Biochemistry*, **1964**, 3, 1589.
- [FREY, 2001] Frey, P. A. Radical mechanisms of enzymatic catalysis. *Annu. Rev. Biochem.*, **2001**, 70, 121.
- [FRUTOS, 2007] Frutos, L. M.; Markmann, A.; Sobolewski, A. L.; Domcke, W. Photoinduced electron and proton transfer in the hydrogen-bonded pyridine-pyrrole system. *J. Phys. Chem. B*, **2007**, 111, 6110.
- [FU, 1996] Fu, M. X.; Requena, J. R.; Jenkins, A. J.; Lyons, T. J.; Baynes, J. W.; Thorpe, S. R. The advanced glycation end product, N ϵ -(carboxymethyl)lysine, is a product of both lipid peroxidation and glycoxidation reactions. *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271, 9982.
- [FUMINORI, 1973] Fuminori, M. Relations of electronic spectra of vitamin B₆-dependent enzymes to their structures. *Bitamin.*, **1973**, 47, 73.
- [FURUYA, 2005] Furuya, R.; Kumagai, H.; Takahashi, M.; Sano, K.; Hishida, A. Ultrapure dialysate reduces plasma levels of β 2-microglobulin and pentosidine in hemodialysis patients. *Blood purification*, **2005**, 23, 311.

G

- [GANSOW, 1969] Gansow, O. A.; Holm, R. H. A proton resonance investigation equilibria, solute structures, and transamination in the aqueous systems

- pyridoxamine-pyruvate-zinc(II) and -aluminum (III). *J. Am. Chem. Soc.*, **1969**, *91*, 5984.
- [GARCÍA DEL VADO, 1987] García del Vado, M. A.; Donoso, J.; Muñoz, F.; Echevarría, G. R.; García Blanco, F. Kinetic and thermodynamic parameters for Schiff's base formation between pyridoxal 5'-phosphate and n-hexylamine. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, **1987**, 445.
- [GARCÍA DEL VADO, 1988] García del Vado, M. A.; Echevarría, G. R.; García-Espantaleon, A.; Donoso, J.; Muñoz, F.; García Blanco, F. Influence of polarity of the medium on the catalysis of formation and stability of the Schiff base from pyridoxal 5'-phosphate and n-hexylamine. *J. Mol. Catal.*, **1988**, *44*, 313.
- [GARCÍA DEL VADO, 1995] García del Vado, M. A.; Rodríguez Cardona, A. F.; Echevarría, G. R.; González Martínez, M. C.; Santos Blanco, J. G.; García Blanco, F. Determination of the rates of formation and hydrolysis of the Schiff bases of pyridoxal with polyallylamine. *J. Mol. Catal. A-Chem.*, **1995**, *101*, 137.
- [GASSER, 2008] Gasser, A.; Forbes, J. M. Advanced glycation: implications in tissue damage and disease. *Protein Pept. Lett.*, **2008**, *15*, 385.
- [GE, 1997] Ge, S. J.; Lee, T. -C. Kinetic significance of the Schiff base reversion in the early-stage Maillard reaction of a phenylalanine-glucose aqueous model system. *J. Agric. Food Chem.*, **1997**, *45*, 1619.
- [GEREDA, 2006] Gerega, A.; Lapinski, L.; Reva, I.; Rostkowska, H.; Nowak, M. J. UV-induced generation of rare tautomers of allopurinol and 9-methylhypoxanthine –a matrix isolation FTIR study. *Biophys. Chem.*, **2006**, *122*, 123.
- [GIANNOUKAKIS, 2005] Giannoukakis, N. Pyridoxamine BioStratum. *Curr. Opin. Investig. Drugs*, **2005**, *6*, 410.
- [GIARDINO, 1998] Giardino, I.; Fard, A. K.; Hatchell, D. L.; Brownlee, M. Aminoguanidine inhibits reactive oxygen species formation, lipid peroxidation and oxidant-induced apoptosis. *Diabetes*, **1998**, *47*, 1114.
- [GRILLO, 2008] Grillo, M. A.; Colombatto, S. Advanced glycation end-products (AGEs): involvement in aging and in neurodegenerative diseases. *Amino Acids*, **2008**, *35*, 29.
- [GRIMBLE, 1997] Grimble, R. F. Effect of antioxidative vitamins on immune function with clinical applications. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, **1997**, *67*, 312.
- [GRISWOLD, 2011] Griswold, W. R.; Toney, M. D. Role of the pyridine nitrogen in pyridoxal 5'-phosphate catalysis: activity of three classes of PLP enzymes reconstituted with deazapyridoxal 5'-phosphate. *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*, 14823.
- [GUIOTTO, 2005] Guiotto, A.; Calderan, A.; Ruzza, P.; Borin, G. Carnosine and carnosine-related antioxidants: a review. *Curr. Med. Chem.*, **2005**, *12*, 2293.
- [GUNSALUS, 1944] Gunsalus, I. C.; Bellamy, W. D.; Umbreit, W. W. A phosphorylated derivative of pyridoxal as the coenzyme of tyrosine decarboxylase. *J. Biol. Chem.*, **1944**, *155*, 685.
- [GYÖRGY, 1934] György, P. Vitamin B₂ and the pellagra-like dermatitis in rats. *Nature*, **1934**, *133*, 498.
- ## H
- [HACHEY, 1985] Hachey, D. L.; Coburn, S. P.; Brown, L. T.; Erbeiding, W. F.; DeMark, B.; Klein, P. D. Quantification of vitamin B₆ in biological samples by isotope dilution mass spectrometry. *Anal. Biochem.*, **1985**, *151*, 159.

- [HAGIWARA, 2009] Hagiwara, S.; Gohda, T.; Tanimoto, M.; Takamichi, I.; Murakoshi, M.; Ohara, I.; Yamazaki, T.; Matsumoto, M.; Horikoshi, S.; Funabiki, K.; Tomino, Y. Effects of pyridoxamine (K-163) on glucose intolerance and obesity in high-fat diet C57BL/6J mice. *Metabolism.*, **2009**, *58*, 934.
- [HALLIWELL, 1999] Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, **1999**.
- [HAMAKER, 1978] Hamaker, H. C. Approximating the cumulative normal distribution and its inverse. *Appl. Stat.*, **1978**, *27*, 76.
- [HARRIS, 1939] Harris, S. A.; Folkers, K. Synthesis of vitamin B₆. *J. Am. Chem. Soc.*, **1939**, *61*, 1245.
- [HARRIS, 1976] Harris, C. M.; Johnson, R. J.; Metzler, D. E. Band-shape analysis and resolution of electronic spectra of pyridoxal phosphate and other 3-hydroxypyridine-4-aldehydes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1976**, *421*, 118.
- [HARUO, 1999] Haruo, S.; Akira, M.; Jun, K.; Ryujiro, N. Analysis of photo- and heat-reaction products of vitamin B₆. *Bitamin.*, **1999**, *73*, 599.
- [HASHIM, 2011] Hashim, A.; Wang, L.; Juneja, K.; Ye, Y.; Zhao, Y.; Ming, L.-J. Vitamin B₆s inhibit oxidative stress causes by Alzheimer's disease-related CuII- β -amyloid complexes-cooperative action of phosphor-moiety. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2011**, *21*, 6430.
- [HAZEN, 1999] Hazen, S. L.; Heller, J.; Hsu, F.; d'Avignon, A.; Heinecke, J. W. Synthesis, isolation, and characterization of the adduct formed in the reaction of p-hydroxyphenyl-acetaldehyde with the amino headgroup of phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine. *Chem. Res. Toxicol.*, **1999**, *12*, 19.
- [HE, 2002] He, X.; Liu, H.-W. Mechanisms of enzymatic C–O bond cleavages in deoxyhexose biosynthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2002**, *6*, 590.
- [HEINERT, 1959] Heinert, D.; Martell, A. E. Pyridoxine and pyridoxal analogs. II. Infrared spectra and hydrogen bonding. *J. Am. Chem. Soc.*, **1959**, *77*, 2431.
- [HEINERT, 1963] Heinert, D.; Martell, A. E. Pyridoxine and pyridoxal analogs. VIII. Synthesis and infrared spectra of metal quelates. *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, *85*, 1334.
- [HENNIG, 1997] Hennig, M.; Grim, B.; Condestabile, R.; John, R. A.; Jansonius, J. N. Crystal structure of glutamate-1-semialdehyde aminomutase: an α 2-dimeric vitamin B₆-dependent enzyme with asymmetry in structure and active site reactivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1997**, *94*, 4866.
- [HERSHEY, 1977] Hershey, S. A.; Leussing, D. L. Rate of carbinolamine formation between pyridoxal 5'-phosphate and alanine. *J. Am. Chem. Soc.*, **1977**, *99*, 1992.
- [HIGGINS, 1981] Higgins, P. J.; Bunn, H. F. Kinetic analysis of the nonenzymic glycosylation of hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, **1981**, *256*, 5204.
- [HIGUCHI, 2006] Higuchi, O.; Nakagawa, K.; Tsuzuki, T.; Suzuki, T.; Oikawa, S.; Miyazawa, T. Aminophospholipid glycation and its inhibitor screening system: a new role of pyridoxal 5'-phosphate as the inhibitor. *J. Lipid Res.*, **2006**, *47*, 964.
- [HILL, 2008] Hill, M. P.; Carroll, E. C.; Toney, M. D.; Larsen, D. S. Rapid photodynamics of Vitamin B₆ coenzyme pyridoxal 5'-phosphate and its Schiff bases in solution. *J. Phys. Chem. B*, **2008**, *112*, 5867.
- [HIPKISS, 1997] Hipkiss, A. R.; Preston, J. E.; Himsworth, D. T.; Worthington, V. C.; Abbot, N. J. Protective effects of carnosine against malondialdehyde-induced toxicity towards cultured rat brain endothelial cells. *Neurosci. Lett.*, **1997**, *238*, 135.

- [HIRSCH, 1995] Hirsch, J.; Petrakova, E.; Feather, M. S.; Barnes, C. L. The reaction of D-glucose with aminoguanidine. *Carbohydr. Res.*, **1995**, 267, 17.
- [HOLMAN, 1954] Holman, R. T.; *Autoxidation of fats and related substances*, In: Progress in Chemistry of Fats and Other Lipids, Pergamon Press, London, **1954**, 2, 51 (Holman, R. T.; Lundberg, W.O.; Malkin, T., eds.).
- [HOIJOU, 2004] Houjou, T.; Yamatani, K.; Nakanishi, H.; Imagawa, M.; Shimizu, T.; Taguchi, R. Rapid and selective identification of molecular species in phosphatidylcholine and sphingomyelin by conditional neutral loss scanning and MS3. *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.*, **2004**, 18, 3123.
- [HUANG, 2001] Huang, T. C.; Chen, M. H.; Ho, C. T. Effect of phosphate on stability of pyridoxal in the presence of lysine. *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, 49, 1559.
- [HUFF, 1944] Huff, J. W.; Perlzweig, W. A. A product of oxidative metabolism of pyridoxine, 2-methyl-3-hydroxy-4-carboxy-5-hydroxy-methylpyridine (4-pyridoxic acid) *J. Biol. Chem.*, **1944**, 155, 345.
- [HULBERT, 2007] Hulbert, A. J.; Pamplona, R.; Buffenstein, R.; Buttemer, W. A. Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals. *Physiol. Rev.*, **2007**, 87, 1175.

I

- [IKEDA, 1996] Ikeda, K.; Higashi, T.; Sano, H.; Jinnouchi, Y.; Yoshida, M.; Araki, T.; Ueda, S.; Horiuchi, S. N ϵ -(Carboxymethyl)lysine protein adduct is a major immunological epitope in proteins modified with advanced glycation end products of the Maillard reaction. *Biochemistry*, **1996**, 35, 8075.
- [ISBELL, 1958] Isbell, H. S.; Frush, H. L. Mutarotation, hydrolysis, and rearrangement reactions of glycosylamines. *J. Org. Chem.*, **1958**, 23, 1309.
- [IZUHARA, 2008] Izuhara, Y.; Nangaku, M.; Takizawa, S.; Takahashi, S.; Shao, J.; Oishi, H.; Kobayashi, H.; van Ypersele de Strihou, C.; Miyata, T. A novel class of advanced glycation inhibitors ameliorates renal and cardiovascular damage in experimental rat models. *Nephrol. Dial. Transplant.*, **2008**, 23, 497.

J

- [JACQUEMIN, 2007] Jacquemin, D.; Perpète, E. A.; Assfeld, X.; Scalmani, G.; Frisch, M. J.; Adamo, C. Fluorescence of 1,8-naphthalimide: A PCM-TD-DFT investigation. *Chem. Phys. Lett.*, **2007**, 438, 208.
- [JAIN, 2001] Jain, S. K.; Lim, G. Pyridoxine and pyridoxamine inhibits superoxide radicals and prevents lipid peroxidation, protein glycosylation, and (Na⁺+K⁺)-ATPase activity reduction in high glucose-treated human erythrocytes. *Free Rad. Biol. Med.*, **2001**, 30, 232.
- [JALEEL, 2005] Jaleel, A.; Halvatsiotis, P.; Williamson, B.; Juhasz, P.; Martin, S.; Nair, K. S. Identification of Amadori-modified plasma proteins in type 2 diabetes and the effect of short-term intensive insulin treatment. *Diabetes Care*, **2005**, 28, 645.
- [JANG, 2007] Jang, S.; Jin, S. I.; Ryang Park, C. TDDFT potential energy functions for excited state intramolecular proton transfer of salicylic acid, 3-aminosalicylic acid, 5-aminosalicylic acid, and 5-methoxysalicylic acid. *Bull. Korean Chem. Soc.*, **2007**, 28, 2343.
- [JANSONIUS, 1998] Jansonius, J. N. Structure, evolution and action of vitamin B6-dependent enzymes. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **1998**, 8, 759.

- [JHEE, 2000] Jhee, K. H.; McPhie, P.; Miles, E. W. Yeast cystathionine beta-synthase is a pyridoxal phosphate enzyme but, unlike the human enzyme, is not a heme protein. *J. Biol. Chem.*, **2000**, *275*, 11541.
- [JIANG, 2008] Jiang, Q.; Chan, S.; Reitz, R. E. LC-MS method for measuring vitamin B₆ in body fluid. *PCT Int. Appl.*, **2008**, WO 2008157188 A1 20081224.
- [JOHNSON, 2009] Johnson, L. N. The regulation of protein phosphorylation. *Biochem. Soc. Trans.*, **2009**, *37*, 627.
- ## K
- [KALLEN, 1966] Kallen, R. G.; Jencks, W. P. Equilibria for the reaction of amines with formaldehyde and protons in aqueous solution. A re-examination of the formol titration. *J. Biol. Chem.*, **1966**, *241*, 5864.
- [KANG, 2006] Kang, Z.; Li, H.; Yin, D. Reaction of pyridoxamine with malondialdehyde: mechanism of inhibition of formation of advanced lipoxidation end-products. *Amino Acids*, **2006**, *30*, 55.
- [KHALIFAH, 1999] Khalifah, R. G.; Baynes, J. W.; Hudson, B. G. Amadorins: Novel post-Amadori inhibitors of advanced glycation reactions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1999**, *257*, 251.
- [KHATAMI, 1988] Khatami, M.; Suldan, Z.; David, I.; Li, W.; Rocky, J. H. Inhibitory effects of pyridoxal phosphate, ascorbate and aminoguanidine on nonenzymatic glycosylation. *Life Sci.*, **1988**, *43*, 1725.
- [KNERR, 1994] Knerr, T.; Ochs, S.; Severin, T. Reaction of guanosine, 2'-deoxyguanosine and guanosine-5'-monophosphate with glucose. *Carbohydr. Res.*, **1994**, *256*, 177.
- [KNEZEVIC, 2003] Knezevic, N. Z.; Leovac, V. M.; Jevtovic, V. S.; Grguric-Sipka, S.; Sabo, T. J. Platinum(IV) complex with pyridoxal semicarbazone. *Inorg. Chem. Comm.*, **2003**, *6*, 561.
- [KORONA, 2003] Korona, T.; Werner, H.-J. Local treatment of electron excitations in the EOM-CCSD method. *J. Chem. Phys.*, **2003**, *118*, 3006.
- [KORYTNYK, 1963] Korytnik, W.; Singh, R. P. Proton Magnetic Resonance spectra of Compounds in the Vitamin B₆ Group. *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, *85*, 2813.
- [KORYTNYK, 1970] Korytnik, W.; Ahrens, H. Nuclear magnetic resonance spectroscopy of vitamin B₆. *Methods Enzymol.*, **1970**, *18*, 475.
- [KOSKINEN, 1997] Koskinen, M.; Mutikainen, I.; Tilus, T.; Pelttari, E.; Korvela, M.; Elo, H. Structure of aminoguanidine hemioxalate. Implications for the synthesis of amidinohydrazones. *Monatsh. Chem.*, **1997**, *128*, 767.
- [KUBALA, 1983] Kubala, G.; Martell, A. E. Pyridoxamine and 2-oxalopropionic acid in aqueous systems: conditional imine formation constants and rate constants of vitamin B₆ catalyzed decarboxylation. *J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, *105*, 449.
- [KUMAGAI, 1970] Kumagai, H.; Yamada, H.; Matsui, H.; Ohkishi, H.; Ogata, K. Tyrosine phenol lyase. I. Purification, crystallization, and properties. *J. Biol. Chem.*, **1970**, *245*, 1767.
- [KURAUCHI, 1983] Kurauchi, Y.; Ohga, K.; Morita, S. Photodecarboxylation of pyridoxal- α -amino acid Schiff bases. Intermediate species induced by flash excitation. *Chem. Lett.*, **1983**, *3*, 349.
- [KURIVEN, 1999] Kuriven, J. P.; Kuksis, A.; Ravandi, A.; Sjövall, O.; Kallio, H. Rapid complexing of oxoacylglycerols with amino acids, peptides and aminophospholipids. *Lipids*, **1999**, *34*, 299.

- [KUZMIC, 1996] Kuzmic, P. Program Dynafit for the analysis of enzyme kinetic data: application to HIV proteinase. *Anal. Biochem.*, **1996**, 237, 260.
- L**
- [LACHMANN, 1984] Lachmann, H.; Schnackerz, K. D. ³¹P nuclear magnetic resonance titrations: simultaneous evaluation of all pH-dependent resonance signals. *Org. Mag. Reson.*, **1984**, 22, 101.
- [LEDBETTER, 1998] Ledbetter, J. W.; Schaertel, S. Pyridinyl and ketyl radicals of pyridoxal-5'-phosphate on micellar and liposomal surfaces. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.*, **1998**, 47, 12.
- [LEDERER, 1999] Lederer, M. O.; Bühler, H. P. Cross-linking of proteins by Maillard processes-characterization and detection of a lysine-arginine cross-link derived from D-glucose. *Bioorg. Med. Chem.*, **1999**, 7, 1081.
- [LEDERER, 2000] Lederer, M. O.; Baumann, M. Formation of a phospholipid-linked pyrrolecarbaldehyde from model reactions of D-glucose and 3-deoxyglucosone with phosphatidylethanolamine. *Bioorg. Med. Chem.*, **2000**, 8, 115.
- [LEDRU, 2001] Ledru, F.; Ducimetiere, P.; Battaglia, S.; Courbon, D.; Beverelli, F.; Guize, L.; Guernonprez, J.-L.; Diebold, B. New diagnostic criteria for diabetes and coronary artery disease: insights from an angiographic study. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **2001**, 37, 1543.
- [LEKLEM, 1990] Leklem, J. E. Vitamin B₆: a status report. *J. Nutr.*, **1990**, 120, 1503.
- [LENDRIHAS, 2010] Lendrihas, T.; Hunter, G. A.; Ferreira, G. C. Serine 254 enhances an induced fit mechanism in murine 5-aminolevulinate synthase. *J. Biol. Chem.*, **2010**, 285, 3351.
- [LEPKOVSKY, 1938] Lepkovsky, S. Crystalline factor I. *Science*, **1938**, 87, 169.
- [LERTSIRI, 1998] Lertsiri, S.; Shiraiishi, M.; Miyazawa, T. Identification of deoxy-D-fructosyl phosphatidylethanolamine and its occurrence in human blood plasma and red blood cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **1998**, 62, 893.
- [LEUSSING, 1966] Leussing, D. L.; Huq, N. Pyridoxal-glycinate complexes with some divalent metal ions. *Anal. Chem.*, **1966**, 38, 1388.
- [LEUSSING, 1968] Leussing, D. L.; Bai, K. S. N-Salicylindeneglycinato complexes. Comparison with pyridoxal. *Anal. Chem.*, **1968**, 40, 575.
- [LEUSSING, 1986] Leussing, D. L. Model reactions. In: *Vitamin B₆ pyridoxal phosphate, chemical, biochemical, and medicinal aspects. Part A*. Ed. Wiley-Interscience, New York, **1986**.
- [LEVI, 2008] Levi, V.; Villamil Giraldo, A. M.; Castello, P. R.; Rossi, J. P. F. C.; Gonzalez Flecha, F. L. Effects of phosphatidylethanolamine glycation on lipid-protein interactions and membrane protein thermal stability. *Biochem. J.*, **2008**, 416, 145.
- [LINDBERG, 1990] Lindberg, B. Components of bacterial polysaccharides. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **1990**, 48, 279.
- [LIU, 1998] Liu, H. W. Coenzyme B₆ dependent novel bond cleavage reactions. *Pure Appl. Chem.*, **1998**, 70, 9.
- [LLOR, 1984] Llor, J.; Sánchez-Ruiz, J. M.; Cortijo, M.; Clares, B. Análisis de los espectros ultravioleta-visible de sustancias del grupo de la vitamina B₆, en medios parcialmente no acuosos. I. 5'-deoxipiridoxal en mezclas agua-dioxano. *Anales de Química*, **1984**, 80, 701.

- [LLOR, 1988] Llor, J.; Sánchez-Ruiz, J. M.; Cortijo, M. Thermodynamic equilibrium constants for pyridoxal and pyridoxal 5'-phosphate in dioxane-water mixtures. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, **1988**, 6, 951.
- [LLOR, 2000] Llor, J.; Ros, M. P.; Asensio, S. B. Complete resolution and thermodynamic parameters of the ionization equilibria of pyridoxal in water-dioxane mixtures. *J. Solution Chem.*, **2000**, 29, 1123.
- [LO, 2006] Lo, C. Y.; Li, S.; Tan, D.; Pan, M. H.; Sang, S.; Ho, C. T. Trapping reactions of reactive carbonyl species with tea polyphenols in simulated physiological conditions. *Mol. Nutr. Food Res.*, **2006**, 50, 1118.
- [LORENC, 2004] Lorenc, J.; Kucharska, E.; Hanuza, J.; Chojnacki, H. Excited electronic states of 2-ethylamino-(3 or 5)-methyl-4-nitropyridine and 2-methylamino-(3 or 5)-methyl-4-nitropyridine. *J. Mol. Struct.*, **2004**, 707, 47.
- [LORENC, 2005] Lorenc, J. Solvent effect and quantum chemical calculations of the electron energy levels for nitro derivatives of 2-(N-methylamino)-picolines. *J. Mol. Struct.*, **2005**, 748, 91.
- [LOU, 2001] Lou, H.; Yuan, H.; Yamazaki, Y.; Sasaki, T.; Oka, S. Alkaloids and flavonoids from peanut skins. *Planta Med.*, **2001**, 67, 345.
- M**
- [MAILLARD, 1912] Maillard, L. C. Action des acides amines sur les sucres: formation des melanoidines per voie methodique. *C. R. Acad. Sci. Ser. 2*, **1912**, 154, 66.
- [MAILLARD-LEFEBVRE, 2009] Maillard-Lefebvre, H.; Boulanger, E.; Daroux, M.; Gaxatte, C.; Hudson, B. I.; Lambert, M. Soluble receptor for advanced glycation end-products: a new biomarker in diagnosis and prognosis of chronic inflammatory diseases. *Rheumatology*, **2009**, 48, 1190.
- [MÄKELÄ, 1983] Mäkelä, M. J.; Korpela, T. K. Chemical models of enzymic transamination. *Chem. Soc. Rev.*, **1983**, 12, 309.
- [MALIK, 1994] Malik, N. S.; Meek, K. M. The inhibition of sugar-induced structural alterations in collagen by aspirin and other compounds. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1994**, 199, 683.
- [MANNERVIK, 1981] Mannervik, B. *Kinetic Data Analysis-Design and Analysis of Enzyme and Pharmacokinetic Experiments*, Ed. Academic Press, New York, **1981**, 235.
- [MANUEL, 1999] Manuel, Y.; Keenoy, B.; Vertommen, J.; De Leeuw, I. The effect of flavonoid treatment on the glycation and antioxidant status in type 1 diabetic patients. *Diabetes Nutr. Metab.*, **1999**, 12, 256.
- [MARQUARDT, 1963] Marquardt, D. W. An algorithm for least-squares estimation of non-linear parameters. *J. Soc. Indust. Appl. Math.*, **1963**, 11, 431.
- [MARTELL, 1989] Martell, A. E. Vitamin B₆ catalyzed reaction of α -amino and α -keto acids: model systems. *Acc. Chem. Res.*, **1989**, 22, 115.
- [MARTÍNEZ-CARRIÓN, 1975] Martínez-Carrión, M. 31P nuclear-magnetic-resonance studies of pyridoxal and pyridoxamine phosphates. *Eur. J. Biochem.*, **1975**, 54, 39.
- [MARTÍNEZ-LIARTE, 1992] Martínez-Liarte, J. H.; Iriarte, A.; Martínez-Carrion, M. Inorganic phosphate binding end electrostatic effects in the active center of aspartate aminotransferase apoenzyme. *Biochemistry*, **1992**, 31, 2712.
- [MARTINS, 2005] Martins, S. I. F. S.; van Boekel, M. A. J. S. A kinetic model for glucose/glycine Maillard reaction pathways. *Food Chem.*, **2005**, 90, 257.

- [MATSUDA, 2003] Matsuda, H.; Wang, T.; Managi, H. Yoshikawa, M. Structural requirements of flavonoids for inhibition or protein glycation and radical scavenging activities. *Bioorg. Med. Chem.*, **2003**, *11*, 5317.
- [MAURYA, 2006] Maurya, Mannar R.; Kumar, A.; Abid, M.; Azam, A. Dioxovanadium (V) and μ -oxo bis[oxovanadium(V)] complexes containing thiosemicarbazone based ONS donor set and their antiamoebic activity. *Inorg. Chim. Acta*, **2006**, *359*, 2439.
- [MCEWEN, 2005] McEwen, J. E.; Zimniak, P.; Metha, J. L.; Reis, R. J. Molecular pathology of aging and its implications for senescent coronary atherosclerosis. *Curr. Opin. Cardiol.*, **2005**, *20*, 399.
- [METZLER, 1955] Metzler, D. E.; Snell, E. E. Spectra and ionization constants of the vitamin B₆ group and related 3-hydroxypyridine derivatives. *J. Am. Chem. Soc.*, **1955**, *77*, 2431.
- [METZLER, 1973] Metzler, D. E.; Harris, C. M.; Johnson, R. J.; Siano, D. B.; Thomson, J. A. Spectra of 3-hydroxypyridines. Band-shape analysis and evaluation of tautomeric equilibria. *Biochemistry*, **1973**, *12*, 5377.
- [METZLER, 1980] Metzler, C. M.; Cahill, A.; Metzler, D. E. Equilibria and absorption spectra of Schiff bases. *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, *102*, 6075.
- [MIMNA, 2007] Mimna, R.; Camus, M. S.; Schmid, A.; Tuchscherer, G.; Lashuel, H. A.; Mutter, M. Disruption of amyloid-derived peptide assemblies through the controlled induction of a β -sheet to α -helix transformation: application of the switch concept. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, *46*, 2681.
- [MIYATA, 2000] Miyata, T.; Ueda, Y.; Asahi, K. K.; Izuhara, Y.; Inagi, R.; Saito, A.; van Ypersele de Strihou, C.; Kurokawa, K. Advanced glycation and lipoxidation end products: role of reactive carbonyl compounds generated during carbohydrate and lipid metabolism. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **2000**, *11*, 1719.
- [MIYATA, 2002] Miyata, T. Alterations of non-enzymatic biochemistry in uremia, diabetes, and atherosclerosis ("carbonyl stress"). *Bull. Mem. Acad. R. Med. Belg.*, **2002**, *157*, 189.
- [MIYATA, 2003] Miyata, T.; van Ypersele de Strihou, C. Angiotensin II receptor blockers an angiotensin converting enzyme inhibitors: implication of radical scavenging and transition metal chelation in inhibition of advanced glycation end product formation. *Arch. Biochem. Biophys.*, **2003**, *419*, 50.
- [MIYAZAWA, 2005] Miyazawa, T.; Oak, J.; Nakagawa, K. A convenient method for preparation of high-purity, Amadori-glycated phosphatidylethanolamine and its prooxidant effect. *Ann. N. Y. Sci.*, **2005**, *1043*, 280.
- [MIYAZAWA, 2008] Miyazawa, T.; Ibusuki, D.; Yamashita, S.; Nakagawa, K. Analysis of Amadori-glycated phosphatidylethanolamine in the plasma of healthy subjects and diabetic patients by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **2008**, *1126*, 291.
- [MIYAZAWA, 2012] Miyazawa, T.; Nakagawa, K.; Shimasaki, S.; Nagai, R. Lipid glycation and protein glycation in diabetes and atherosclerosis. *Amino Acids*, **2012**, *42*, 1163.
- [MOHAN, 1979] Mohan, M. S.; Seigal, R.; Abbott, E. H. Mixed metal ion catalysis of the elimination of phosphate ion from phosphoserine – pyridoxal Schiff bases. *Indian J. Chem.*, **1979**, *19A*, 363.
- [MOMANY, 2004] Momany, C.; Levnikov, V.; Blagova, L.; Lima, S.; Phillips, R. S. Three-dimensional structure of kynureninase from *pseudomonas fluorescens*. *Biochemistry*, **2004**, *43*, 1193.

- [MOORE, 1995] Moore, P. S.; Dominici, P.; Voltattorni, C. B. Transaldimination induces coenzyme reorientation in pig kidney dopa decarboxylase. *Biochimie*, **1995**, *77*, 724.
- [MOORTHY, 1975] Moorthy, P. N.; Hayon, E. One-electron redox reactions of water-soluble vitamins. III. Pyridoxine and pyridoxal phosphate (vitamin B₆). *J. Am. Chem. Soc.*, **1975**, *97*, 2048.
- [MOROZOV, 1966] Morozov, Y. V.; Bazhulina, N. P.; Karpeisky, M. Y.; Ivanov, V. I.; Kuklin, A. I. Optical and luminescent properties of vitamin B₆ and its derivatives. III. Pyridoxamine and pyridoxamine-5'-phosphate. *Biofizika (USSR)*, **1966**, *11*, 228.
- [MOROZOV, 1986] Morozov, Y. V. Spectroscopic properties, electronic structure, and photochemical behaviour of vitamin B₆ and analogs. In: *Vitamin B₆ pyridoxal phosphate, chemical, biochemical, and medicinal aspects. Part A*. Ed. Wiley-Interscience, New York, **1986**.
- [MORRISON, 1958] Morrison, A. L.; Long, R. F. The photolysis of pyridoxal phosphate. *J. Chem. Soc.*, **1958**, 211.
- [MUKHERJEE, 2011] Mukherjee, T.; Costa Pessoa, J.; Kumar, A.; Sarkar, A. R. Oxidovanadium (IV) Schiff base complex derived from vitamin B₆: synthesis, characterization, and insulin enhancing properties. *Inorg. Chem.*, **2011**, *50*, 4349.
- [MUNANAIRI, 2007] Munanairi, A.; O'Banion, S. K.; Gamble, R.; Breuer, E.; Harris, A. W.; Sandwick, R. K. The multiple Maillard reactions of ribose and deoxyribose sugars and sugar phosphates. *Carbohydr. Res.*, **2007**, *342*, 2575.
- [MÜNCH, 2012] Münch, G.; Westcott, B.; Menini, T.; Gugliucci, A. Advanced glycation endproducts and their pathogenic roles in neurological disorders. *Amino Acids*, **2012**, *42*, 1221.
- [MUNZEL, 1996] Munzel, T.; Kurz, S.; Rajagopalan, S.; Thoenes, M.; Berrington, W. R.; Thompson, J. A.; Freeman, B. Harrison, D. G. Hydralazine prevents nitroglycerin tolerance by inhibiting activation of a membrane-bound NADH oxidase. A new action for an old drug. *J. Clin. Invest.*, **1994**, *98*, 1465.
- [MURAKAMI, 1973] Murakami, Y.; Kondo, H.; Martell, A. E. Catalysis of the β -elimination of *O*-phosphothreonine by pyridoxal and metal ions. *J. Am. Chem. Soc.*, **1973**, *95*, 7138.

N

- [NAGARAJ, 2002] Nagaraj, R. H.; Sarkar, P.; Mally, A.; Biemel, K. M.; Lederer, M. O.; Padayatti, P. S. Effect of pyridoxamine on chemical modification of proteins by carbonyls in diabetic rats: characterization of a major product from the reaction of pyridoxamine and methylglyoxal. *Arch. Biochem. Biophys.*, **2002**, *402*, 110.
- [NAKAGAWA, 2005A] Nakagawa, K.; Oak, J. H.; Higuchi, O.; Tsuzuki, T.; Oikawa, S.; Otani, H.; Mune, M.; Cai, H.; Miyazawa, T. Ion-trap tandem mass spectrometric analysis of Amadori-glycated phosphatidylethanolamine in human plasma with or without diabetes. *J. Lipid Res.*, **2005**, *46*, 2514.
- [NAKAGAWA, 2005B] Nakagawa, K.; Oak, J. H.; Miyazawa, T. Angiogenic potency of Amadori-glycated phosphatidylethanolamine. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **2005**, *1043*, 413.

- [NAKAGAWA, 2008] Nakagawa, K.; Ibusuki, D.; Yamashita, S.; Miyazawa, T. Glycation of plasma lipoprotein lipid membrane and screening for lipid glycation inhibitor. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **2008**, *1126*, 288.
- [NASKAR, 2010] Naskar, S.; Naskar, S.; Mayer-Figge, H.; Sheldrick, W.; Chattopadhyay, S. K. Synthesis, crystal structures and spectroscopic properties of two Zn(II) Schiff base complexes of pyridoxal. *Polyhedron*, **2010**, *29*, 493.
- [NASKAR, 2011] Naskar, S.; Naskar, S.; Mayer-Figge, H.; Sheldrick, W.; Chattopadhyay, S. K. Synthesis, X-ray crystal structures, spectroscopic and cyclic voltammetric studies of Cu(II) Schiff bases complexes of pyridoxal. *Polyhedron*, **2011**, *30*, 529.
- [NEELY, 2000] Neely, M. D.; Zimmerman, L.; Picklo, M. J.; Ou, J. J.; Morales, C. R.; Montine, K. S.; Amaranth, V.; Montine, T. J. Congeners of *N(alpha)*-acetyl-L-cysteine but not aminoguanidine act as neuroprotectants from the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal. *Free Radic. Biol. Med.*, **2000**, *29*, 1028.
- [NEGRE-SALVAYRE, 2008] Negre-Salvayre, A.; Coatrieux, C.; Ingueneau, C.; Salvayre, R. Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. *Br. J. Pharmacol.*, **2008**, *153*, 6.
- [NEMOTO, 2012] Nemoto, S.; Taguchi, K.; Matsumoto, T.; Kamata, K.; Kobayashi, T. Aminoguanidine normalizes ET-1-induced aortic contraction in type 2 diabetic Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats by suppressing Jab 1-mediated increase in ET_A-receptor expression. *Peptides*, **2012**, *33*, 109.
- O**
- [OAK, 2002] Oak, J. H.; Nakagawa, K.; Miyazawa, T. UV analysis of Amadori-glycated phosphatidylethanolamine in foods and biological samples. *J. Lipid Res.*, **2002**, *43*, 523.
- [OAK, 2003] Oak, J. H.; Nakagawa, K.; Oikawa, S.; Miyazawa, T. Amadori-glycated phosphatidylethanolamine induces angiogenic differentiations in cultured human umbilical vein endothelial cells. *FEBS*, **2003**, *555*, 419.
- [OBSIL, 1999] Obšil, T.; Amler, E.; Obšilová, V.; Pavlíček, Z. Effect of aminophospholipid glycation on order parameter and hydration of phospholipid bilayer. *Biophys. Chem.*, **1999**, *80*, 165.
- [ODANI, 1999] Odani, H.; Shinzato, T.; Matsumoto, Y.; Usami, J.; Maeda, K. Increase in the three dicarbonyl compounds levels in human uremic plasma: specific *in vivo* determination of intermediates in advanced Maillard reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1999**, *256*, 89.
- [ONORATO, 2000] Onorato, J. M.; Jenkins, A. J.; Thorpe, S. R.; Baynes, J. W. Pyridoxamine, an inhibitor of advanced glycation reactions, also inhibits advanced lipoxidation reactions. *J. Biol. Chem.*, **2000**, *275*, 21177.
- [ORTEGA-CASTRO, 2009] Ortega-Castro, J.; Adrover, M.; Frau, J.; Donoso, J.; Muñoz, F. Cu²⁺ complexes of some AGEs inhibitors. *Chem. Phys. Lett.*, **2009**, *475*, 277.
- [ORTEGA-CASTRO, 2010] Ortega-Castro, J.; Adrover, M.; Frau, J.; Salvà, A.; Donoso, J.; Muñoz, F. DFT studies on Schiff base formation of vitamin B₆ analogues. Reaction between a pyridoxamine-analogue and carbonyl compounds. *J. Phys. Chem. A*, **2010**, *114*, 4634.
- [ORTEGA-CASTRO, 2012] Ortega-Castro, J.; Frau, J.; Casanovas, R.; Fernández, D.; Donoso, J.; Muñoz, F. High- and low-spin Fe(III) complexes of various AGE inhibitors. *J. Phys. Chem. A*, **2012**, *116*, 2961.

P

- [PALCIC, 1986] Palcic, M. M.; Floss, H. G. Conformation and stereochemistry of free and bound pyridoxal phosphate and its derivatives. In: *Vitamin B₆ pyridoxal phosphate, chemical, biochemical, and medicinal aspects. Part A*. Ed. Wiley-Interscience, New York, **1986**.
- [PAMPLONA, 2008] Pamplona, R. Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular integrity: a causal role in aging and longevity. *Biochim. Biophys.*, **2008**, 1777, 1247.
- [PAMPLONA, 2011] Pamplona, R. Advanced lipoxidation end-products. *Chem.-Biol. Interact.*, **2011**, 192, 14.
- [PENG, 2011] Peng, X.; Ma, J.; Chen, F.; Wang, M. Naturally occurring inhibitors against the formation of advanced glycation end-products. *Food Funct.*, **2011**, 2, 289.
- [PENTZ, 1967] Pentz, L.; Thornton, E. R. Isotope effects on the basicity of 2-nitrophenoxide, 2,4-dinitrophenoxide, hydroxide, and imidazole in protium oxide-deuterium oxide mixtures. *J. Am. Chem. Soc.*, **1967**, 89, 6931.
- [PERLIN, 1966] Perlin, A. S. Hydroxyl proton magnetic resonance in relation to ring size, substituent groups, and mutarotation of carbohydrates. *Can. J. Chem.*, **1966**, 44, 540.
- [PETERSEN, 2004] Petersen, D. R.; Doorn, J. A. Reactions of 4-hydroxynonenal with proteins and cellular targets. *Free Radic. Biol. Med.*, **2004**, 37, 937.
- [PEYROUX, 2006] Peyroux, J.; Sternberg, M. Advanced glycation endproducts (AGEs): pharmacological inhibition in diabetes. *Pathol. Biol.*, **2006**, 54, 405.
- [PFORDTE, 1961A] Pfordte, K.; Leuschner, G. Intermolecular dehydrogenation with ultraviolet light. VI. Photoreactions of various aliphatic amines. *Liebigs Ann. Chem.*, **1961**, 646, 25.
- [PFORDTE, 1961B] Pfordte, K.; Leuschner, G. Intermolecular dehydrogenation with ultraviolet light. VII. Photoreactions of certain N-heterocycles. *Liebigs Ann. Chem.*, **1961**, 646, 30.
- [PHILLIPS, 1965] Phillips, A. T.; Wood, W. S. The mechanism of action of 5'-adenylic acid-activated threonine dehydrase. *J. Biol. Chem.*, **1965**, 240, 4703.
- [PLAZA DEL PINO, 1995] Plaza del Pino, I. M.; Sánchez-Ruiz, J. M. A potentiometric study into the stability of the Schiff's base formed between pyridoxal 5'-phosphate and hexylamine in water-dioxane mixtures. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, **1993**, 573.
- [PREAT, 2005] Preat, J.; Jacquemin, D.; Perpète, E. A. Theoretical investigation of the UV spectra of coumarin derivatives. *Chem. Phys. Lett.*, **2005**, 415, 20.
- [PRESS, 1992] Press, W. H., Teukolsky, S. A.; Vetterling, W. T.; Flannery, B. P. *Numerical Recipes in C*, Ed. Cambridge Univ. Press, Cambridge, **1992**.
- [PRICE, 2001] Price, D. L.; Rhett, P. M.; Thorpe, S. R.; Baynes, J. V. Chelating activity of advanced glycation end-product inhibitors. *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276, 48967.

R

- [RABBANI, 2012] Rabbani, N.; Thornalley, P. J. Glycation research in amino acids: a place to call home. *Amino Acids*, **2012**, 42, 1087.

- [RAHBAR, 2000A] Rahbar, S.; Natarajan, R.; Yerneni, K.; Scott, S.; Gonzales, N.; Nadler, J. L. Evidence that pioglitazone, metformin and pentoxifylline are inhibitors of glycation. *Clin. Chim. Acta*, **2000**, *301*, 65.
- [RAHBAR, 2000B] Rahbar, S.; Yerneni, K.K.; Scott, S.; Gonzales, N.; Lalezari, I. Novel inhibitors of advanced glycation endproducts (Part II). *Mol. Cell Biol. Res. Commun.*, **2000**, *3*, 360.
- [RAHBAR, 2003] Rahbar, S.; Figarola, J. L. Novel inhibitors of advanced glycation endproducts. *Arch. Biochem. Biophys.*, **2003**, *419*, 63.
- [RAMAKRISHNAN, 1999] Ramakrishnan, S.; Sulochana, K. N.; Punitham, R. Two new functions of inositol in the eye lens: antioxidation and antiglycation and possible mechanisms. *Indian J. Biochem. Biophys.*, **1999**, *36*, 129.
- [RAMASAMY, 2012] Ramasamy, R.; Yan, S. F.; Schmidt, A. M. Advanced glycation end products and RAGE: a common thread in aging, diabetes, neurodegeneration, and inflammation. *Amino Acids*, **2012**, *42*, 1151.
- [RAO, 2000] Rao, N. A.; Talwar, R.; Savithri, H. S. Molecular organization, catalytic mechanism and function of serine hydroxymethyltransferase – a potential target for cancer chemotherapy. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, **2000**, *32*, 405.
- [RAVANDI, 1995] Ravandi, A.; Kuksis, A.; Marai, L.; Myher, J. J. Preparation and characterization of glucosylated aminoglycerophospholipids. *Lipids*, **1995**, *30*, 885.
- [RAVANDI, 1996] Ravandi, A.; Kuksis, A.; Marai, L.; Myher, J. J.; Steiner, G.; Lewisa, G.; Kamido, H. Isolation and identification of glycated aminophospholipids from red cells and plasma of diabetic blood. *FEBS Lett.*, **1996**, *381*, 77.
- [RAVANDI, 2000] Ravandi, A.; Kuksis, A.; Shaikh, N. A. Glucosylated glycerophosphoethanolamine are the major LDL glycation products and increase LDL susceptibility to oxidation: evidence of their presence in atherosclerotic lesions. *Arterioscl. Throm. Vas.*, **2000**, *20*, 467.
- [RAWLINGS, 1988] Rawlings, J. O. *Applied Regression Analysis-A research Tool*, Belmont, **1988**.
- [RAYNER, 1989] Rayner, J. C. W.; Best, D. J. *Smooth Tests of Goodness of Fit*, Ed. Oxford Univ. Press, New York, **1989**.
- [REIBER, 1972] Reiber, H. Photochemical reactions of vitamin B6 compounds, isolation, and properties of products. *Biochem. Biophys. Acta*, **1972**, *279*, 310.
- [REICH, 1992] Reich, J. G. *Curve Fitting and Modeling for Scientists and Engineers*, Ed. McGraw-Hill, New York, **1992**.
- [REYNOLDS, 1965] Reynolds, T. M. Chemistry of nonenzymatic browning. II. *Adv. Food Res.*, **1965**, *14*, 167.
- [ROSSIGNOL, 2009] Rossignol, D. A. Novel and emerging treatments for autism spectrum disorders: a systematic review. *Ann. Clin. Psychiatry.*, **2009**, *21*, 213.
- [RUGGIERO-LÓPEZ, 1999] Ruggiero-López, D.; Lecomte, M.; Moinet, G.; Patereau, G.; Lagarde, M.; Wiernsperger, N. Reaction of metformin with dicarbonyl compounds. Possible implication in the inhibition of advanced glycation end product formation. *Biochem. Pharmacol.*, **1999**, *58*, 1765.
- S**
- [SAHA, 2009] Saha, B.; Mukherjee, S.; Das, A. K. Molecular characterization of Mycobacterium tuberculosis cystathionine gamma synthase-Apo and holoforms. *Int. J. Bio. Macromol.*, **2009**, *44*, 385.

- [SAID, 2008] Said, Z. M.; Subramanian, V. S.; Vaziri, N. D.; Said, H. M. Pyridoxine uptake by colonocytes: a specific and regulated carrier-mediated process. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, **2008**, *294*, C1192.
- [SALOMAA, 1964] Salomaa, P.; Schaleger, L. L.; Long, F. A. Solvent deuterium isotope effects on acid-base equilibria. *J. Am. Chem. Soc.*, **1964**, *86*, 1.
- [SALVÀ, 2003A] Salvà, A.; Donoso, J.; Frau, J.; Muñoz, F. DFT studies on Schiff base formation of vitamin B₆ analogues. *J. Phys. Chem. A*, **2003**, *107*, 9409.
- [SALVÀ, 2003B] Salvà, A.; Frau, J.; Muñoz, F.; Vilanova, B.; Donoso, J. FT-IR study of pyridoxamine 5'-phosphate. *Biochim. Biophys. Acta*, **2003**, *1647*, 83.
- [SALVÀ, 2004] Salvà, A.; Donoso, J.; Frau, J.; Muñoz, F. Density Functional Theory studies on transimination of Vitamin B₆ analogues through geminal diamine formation. *J. Phys. Chem. A*, **2004**, *108*, 11709.
- [SÁNCHEZ-RUIZ, 1982] Sánchez-Ruiz, J. M.; Rodríguez-Pulido, J. M.; Llor, J.; Cortijo, M. Rates and equilibria of aldimine formation between pyridoxal 5'-phosphate and N-hexylamine. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, **1982**, 1425.
- [SÁNCHEZ-RUIZ, 1991] Sánchez-Ruiz, J. M.; Iriarte, A.; Martínez-Carrión, M. The ionization states of the 5'-phosphate group in the various coenzyme forms bound to mitochondrial aspartate aminotransferase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1991**, *286*, 38.
- [SAYER, 1980] Sayer, J. M.; Conlon, P. The timing of the proton-transfer process in carbonyl additions and related reactions. General-acid-catalyzed hydrolysis of imines and N-acylimines of benzophenone. *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, *102*, 3592.
- [SCHALKWIJK, 2012] Schalkwijk, C. G.; Miyata, T. Early- and advanced non-enzymatic glycation in diabetic vascular complications: the search for therapeutics. *Amino Acids*, **2012**, *42*, 1193.
- [SCHMIDT, 1992] Schmidt, A-M.; Vianna, M.; Gerlach, M.; Brett, J.; Ryan, J.; Kao, J.; Esposito, C.; Hegarty, H.; Hurley, W.; Clauss, M.; Wang, F.; Pang, Y.E.; Tsang, T. E.; Stern, D. Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation endproducts from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. *J. Biol. Chem.*, **1992**, *267*, 14987.
- [SCHNACKERZ, 1986] Schnackerz, K. D. ³¹P-NMR spectroscopy of vitamin B₆ and derivatives. In: *Vitamin B₆ pyridoxal phosphate, chemical, biochemical, and medicinal aspects. Part A*. Ed. Wiley-Interscience, New York (**1986**).
- [SELL, 2005] Sell, D. R.; Biemel, K. M.; Reihl, O.; Lederer, M. O.; Strauch, C. M.; Monnier, V. M. Glucosepane is a major protein cross-link of the senescent human extracellular matrix. *J. Biol. Chem.*, **2005**, *280*, 12310.
- [SHANBHAG, 1990] Shanbhag, V.; Martell, A. E. Schiff bases of pyridoxal 5'-phosphate and 5'-deoxypyridoxal with phenylglycine derivatives and their methal complexes. *Inorg. Chem.*, **1990**, *29*, 1023.
- [SHAPIRO, 1980] Shapiro, R.; MacManus, M. J.; Zalut, C.; Bunn, H. F. Sites of nonenzymatic glycosylation of human haemoglobin A. *J. Biol. Chem.*, **1980**, *255*, 3120.
- [SHARIF, 2007] Sharif, S.; Chan-Huot, M.; Tolstoy, P. M.; Toney, M. D.; Jonsson, K. H. M.; Limbach, H. H. ¹⁵N Nuclear magnetic resonance studies of acid-base properties of pyridoxal-5'-phosphate aldimines in aqueous solution. *J. Phys. Chem. B*, **2007**, *111*, 3869.
- [SHASTRI, 1998] Shastri, G. V.; Thomas, M.; Victoria, A. J.; Selvakumar, R.; Kanagasabapathy, A. S.; Thomas, K. Effect of aspirin and sodium salicylate on cataract development in diabetic rats. *Indian J. Exp. Biol.*, **1998**, *36*, 651.

- [SHAW, 1997] Shaw, J. P.; Petsko, G. A.; Ringe, D. Determination of the structure of alanine racemase from *Bacillus stearothermophilus* at 1.9-Å resolution. *Biochemistry*, **1997**, *36*, 1329.
- [SHIBATA, 1995] Shibata, K.; Mushiage, M.; Kondo, T.; Hayakawa, T.; Tsuge, H. Effects of vitamin B₆ deficiency on the conversion ratio of tryptophan to niacin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **1995**, *59*, 2060.
- [SHOJI, 2010] Shoji, N.; Nakagawa, K.; Asai, A.; Fujita, I.; Hashiura, A.; Nakajima, Y.; Oikawa, S.; Miyazawa, T. LC-MS/MS analysis of carboxymethylated and carboxyethylated phosphatidylethanolamine in human erythrocytes and blood plasma. *J. Lipid Res.*, **2010**, *51*, 2445.
- [SIGMAPLOT, 2005] SigmaPlot Version 10.0. SPSS, Chicago, Illinois, USA, **2005**.
- [SIMOES, 2010] Simoes, C.; Simoes, V.; Reis, A.; Domingues, P.; Domingues, M. R. M. Oxidation of glycated phosphatidylethanolamines: evidence of oxidation in glycated polar head identified by LC-MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2010**, *397*, 2417.
- [SIMON, 2009] Simon, E. S.; Allison, J. Determination of pyridoxal-5'-phosphate (PLP)-bonding sites in proteins: a peptide mass fingerprinting approach based on diagnostic tandem mass spectral features of PLP-modified peptides. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2009**, *23*, 3401.
- [SINGH, 2007] Singh, S.; Madzellan, P.; Banerjee, R. Properties of an unusual heme cofactor in PLP-dependent cystathionine β-synthase. *Nat. Prod. Rep.*, **2007**, *24*, 631.
- [SKELLEY, 2006] Skelley, A. M.; Mathies, R. A. Rapid on-column analysis of glucosamine and its mutarotation by microchip capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, **2006**, *1132*, 304.
- [SKOG, 1998] Skog, K. I.; Johansson, M. A.; Jägerstad, M. I. Carcinogenic heterocyclic amines in model systems and cooked foods: a review on formation, occurrence and intake. *Food Chem. Toxicol.*, **1998**, *36*, 879.
- [SMITH, 1982] Smith, W. R.; Missen, R. W. *Chemical Reaction Equilibrium Analysis*, Ed. Wiley, New York, **1982**.
- [SMITH, 1992] Smith, P. R.; Thornalley, P. J. Mechanism of the degradation of non-enzymatically glycated proteins under physiological conditions. Studies with the model fructosamine, N-(1-deoxy-D-fructos-1-yl)huppuryl-lysine. *Eur. J. Biochem.*, **1992**, *210*, 729.
- [SNELL, 1942] Snell, E. E. Effect of heat sterilization on growth promoting activity of pyridoxine for streptococcus lactis R. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, **1942**, *51*, 356.
- [SNELL, 1975] Snell, E. E. Tryptophanase: structure, catalytic activities, and mechanism of action. *Advan. Enzymol.*, **1975**, *42*, 287.
- [SOBOLEWSKI, 2002] Sobolewski, A. L.; Domcke, W.; Dedonder-Lardeux, C.; Jouvét, C. Excited-state hydrogen detachment and hydrogen transfer driven by repulsive $1\pi\sigma^*$ states: a new paradigm for nonradiative decay in aromatic biomolecules. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2002**, *4*, 1093.
- [SOLÍS-CALERO, 2010] Solís-Calero, C.; Ortega-Castro, J.; Muñoz, F. Reactivity of a phospholipid monolayer model under periodic boundary conditions: a density functional theory study of the Schiff base formation between phosphatidylethanolamine and acetaldehyde. *J. Phys. Chem. B*, **2010**, *114*, 15879.
- [SOLÍS-CALERO, 2011] Solís-Calero, C.; Ortega-Castro, J.; Muñoz, F. DFT study on amino-phospholipids surface-mediated decomposition of hydrogen peroxide. *J. Phys. Chem. C*, **2011**, *115*, 22945.

- [SOOKWONG, 2011] Sookwong, P.; Nakagawa, K.; Fujita, I.; Shoji, N.; Miyazawa, T. Amadori-glycated phosphatidylethanolamine, a potential marker for hyperglycemia, in Streptozotocin-induced diabetic rats. *Lipids*, **2011**, *46*, 943.
- [SPINNEKER, 2007] Spinneker, A.; Sola, R.; Lemmen, V.; Castillo, M. J.; Pietrzik, K.; González-Gross, M. Vitamin B₆ status, deficiency and its consequences – an overview. *Nutr. Hosp.*, **2007**, *22*, 7.
- [STRATMANN, 1998] Stratmann, R. E.; Scuseria, G. E. An efficient implementation of time-dependent density-functional theory for the calculation of excitation energies of large molecules. *J. Chem. Phys.*, **1998**, *109*, 8218.
- [SUN, 2006] Sun, M. Excited state properties of novel p- and n-type organic semiconductors with an anthracene unit. *Chem. Phys.*, **2006**, *320*, 155.
- [SZPOGANICZ, 1984A] Szpoganicz, B.; Martell, A. E. Thermodynamic and microscopic equilibrium constants of molecular species formed from pyridoxal 5'-phosphate and 2-amino-3-phosphopropionic acid in aqueous and D₂O solution. *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, *106*, 5513.
- [SZPOGANICZ, 1984B] Szpoganicz, B.; Martell, A. E. Thermodynamic equilibria in the system zinc(II)-pyridoxal 5'-phosphate-2-amino-3-phosphopropionic acid in aqueous solution. *Inorg. Chem.*, **1984**, *23*, 4442.
- T**
- [TAKÁCS-NOVÁK, 2000] Takács-Novák, K.; Tam, K. Y. Multiwavelength spectrophotometric determination of acid dissociation constants. Part V: microconstants and tautomeric ratios of diprotic amphoteric drugs. *J. Pharmaceut. Biomed.*, **2000**, *21*, 1171.
- [TAKAHASHI, 1977] Takahashi, K. Further studies on the reaction of phenylglyoxal and related reagents with proteins. *Biochem. J.*, **1977**, *81*, 403.
- [TAKEDA, 2004] Takeda, J.; Nashiro, A.; Kurita, S. Photoinduced intramolecular proton transfer in 2- and 4-(2,4-dinitrobenzyl)pyridine. *J. Lumin.*, **2004**, *108*, 245.
- [TANAKA, 1997] Tanaka, Y.; Iwamoto, H.; Onuma, T.; Kawamori, R. Inhibitory effect of metformin on formation of advanced glycation end products. *Curr. Ther. Res.* **1997**, *58*, 693.
- [TANIMOTO, 2007] Tanimoto, M.; Gohda, T.; Kaneko, S.; Hagiwara, S.; Murakoshi, M.; Auki, T.; Yamada, K.; Ito, T.; Matsumoto, M.; Horikoshi, S.; Tomino, Y. Effect of pyridoxamine (K-163), an inhibitor of advanced glycation end products, on type 2 diabetic nephropathy in KK-A^y/Ta mice. *Metab. Clin. Exp.*, **2007**, *56*, 160.
- [TANG, 2007] Tang, S. C.; Arumugam, T. V.; Cutler, R. G.; Jo, D. G.; Magnus, T.; Chan, S. L.; Mughal, M. R.; Telljohann, R. S.; Nassar, M.; Ouyang, X.; Calderan, A.; Ruzza, P.; Guiotto, A.; Mattson, M. P. Neuroprotective actions of a histidine analogue in models of ischemic stroke. *J. Neurochem.*, **2007**, *101*, 729.
- [TATSUMOTO, 1981] Tatsumoto, K.; Martell, A. E. Pyridoxal- and metal-catalyzed beta-elimination, decarboxylation, and dealdolation reactions of beta-hydroxyglutamic acid. *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, *103*, 6203.
- [TERPSTRA, 1998] Terpstra, V.; Bird, D. A.; Steinberg, D. Evidence that the lipid moiety of oxidized low density lipoprotein plays a role in its interaction with macrophage receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**, *95*, 1806.
- [THORNALLEY, 1984] Thornalley, P. J.; Wolff, S. P.; Crabbe, J.; Stern, A. The autoxidation of glyceraldehydes and other monosaccharides under physiological

- conditions catalysed by buffer ions. *Biochim. Biophys. Acta*, **1984**, 797, 276.
- [THORNALLEY, 1999A] Thornalley, P. J.; Langborg, A.; Minhas, H. S. Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem. J.*, **1999**, 344, 109.
- [THORNALLEY, 1999B] Thornalley, P. J.; Minhas, H. S. Rapid hydrolysis and slow α,β -dicarbonyl cleavage of an agent proposed to cleave glucose-derived protein cross-links. *Biochem. Pharmacol.*, **1999**, 57, 303.
- [THORNALLEY, 2000] Thornalley, P. J.; Yurek-George, A.; Argirov, O. K. Kinetics and mechanism of the reaction of aminoguanidine with the alpha-oxoaldehydes glyoxal, methylglyoxal, and 3-deoxyglucosone under physiological conditions. *Biochem. Pharmacol.*, **2000**, 60, 55.
- [THORNALLEY, 2003] Thornalley, P. J. Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. *Arch. Biochem. Biophys.*, **2003**, 419, 31.
- [THORNALLEY, 2005] Thornalley, P. J. Dicarbonyl intermediates in the Maillard reaction. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **2005**, 1043, 111.
- [THORPE, 1996] Thorpe, S. R.; Baynes, J. W. Role of the Maillard reaction in diabetes mellitus and diseases of aging. *Drugs Aging*, **1996**, 9, 69.
- [THORPE, 2003] Thorpe, S. R.; Baynes, J. W. Maillard reaction products in tissue proteins: new products and new perspectives. *Amino Acids*, **2003**, 25, 275.
- [THORSON, 1993] Thorson, H. S.; Liu, H. W. Characterization of the first PMP-dependent iron-sulfur-containing enzyme which is essential for the biosynthesis of 3,6-dideoxyhexoses. *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 7539.
- [TING-PO, 1972] Ting-Po, I.; Nancollas, G. H. EQUIL. General computational method for the calculation of solution equilibria. *Anal. Chem.*, **1972**, 44, 1940.
- [TOBIAS, 1975] Tobias, P.; Kallen, R. G. Kinetics and equilibria of the reaction of pyridoxal 5'-phosphate with ethylenediamine to form Schiff bases and cyclic geminal diamines. Evidence for kinetically competent geminal diamine intermediates in transamination sequences. *J. Am. Chem. Soc.*, **1975**, 97, 6530.
- [TOKITA, 2005] Tokita, Y.; Hirayama, Y.; Sekikawa, A.; Kotake, H.; Toyota, T.; Miyazawa, T.; Sawai, T.; Oikawa, S. Fructose ingestion enhances atherosclerosis and deposition of advanced glycated end-products in cholesterol-fed rabbits. *J. Atheroscler. Thromb.*, **2005**, 12, 260.
- [TONEY, 2011] Toney, M. D. Controlling reaction specificity in pyridoxal phosphate enzymes. *Biochim. Biophys. Acta*, **2011**, 1814, 1407.
- [TRIVELLI, 1971] Trivelli, L. A.; Ranney, H. M.; Lai, H. T. hemoglobin components in patients with diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.*, **1971**, 284, 353.
- [TRYFIATES, 1986] Tryfiates, G. P.; Smith, R. R. Mass spectra of pyridoxal and pyridoxamine phosphates. In: *Vitamin B₆ pyridoxal phosphate, chemical, biochemical, and medicinal aspects. Part A*. Ed. Wiley-Interscience, New York (1986).

U

- [UTZMANN, 2000] Utzmann, C. M.; Lederer, M. O. Independent synthesis of aminophospholipid-linked Maillard products. *Carbohydr. Res.*, **2000**, 325, 157.

V

- [VALENTOVIC, 2004] Valentovic, M.; Terneus, M.; Harmon, R. C.; Carpenter, A. B. S-Adenosylmethionine (SAME) attenuates acetaminophen hepatotoxicity in C57BL/6 mice. *Toxicol. Lett.*, **2004**, *154*, 165.
- [VAN BOEKEL, 1992] van Boekel, M. A.; van den Bergh, P. J.; Hoenders, H. J. Glycation of human serum albumin: inhibition by Diclofenac. *Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct. Mol. Enzymol.*, **1992**, *1120*, 201.
- [VAN BOEKEL, 2001] van Boekel, M. A. J. S. Kinetic aspects of the Maillard reaction: a critical review. *Nahrung-Food*, **2001**, *45*, 150.
- [VAN DER HAM, 2012] van der Ham, M.; Albersen, M.; de Koning, T. J.; Visser, G.; Middendorp, A.; Bosma, M.; Verhoeven-Duif, N. M.; de Sain-van der Velden, M. G. M. Quantification of vitamin B₆ vitamers in human cerebrospinal fluid by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, **2012**, *712*, 108.
- [VASAN, 1996] Vasan, S.; Zhang, X.; Kapurniotu, A.; Bernhagen, J.; Teichberg, S.; Basgen, J.; Wagle, D.; Shih, D.; Terlecky, I.; Bucala, R.; Cerami, A.; Egan, J.; Ulrich, P. An agent clearing glucose-derived protein crosslinks *in vitro* and *in vivo*. *Nature*, **1996**, *382*, 275.
- [VASAN, 2003] Vasan, S.; Foiles, P.; Founds, H. Therapeutic potential of breaker of advanced glycation end product-protein crosslinks. *Arch. Biochem. Biophys.*, **2003**, *419*, 89.
- [VÁZQUEZ, 1989] Vázquez, M. A.; Echevarría, G.; Muñoz, F.; Donoso, J.; García Blanco, F. Kinetic study of the Schiff base formation between glycine and pyridoxal 5'-phosphate (PLP), pyridoxal (PL), and 5'-deoxypyridoxal (DPL) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, **1989**, 1617.
- [VÁZQUEZ, 1990A] Vázquez, M. A.; Muñoz, F.; Donoso, J.; García Blanco, F. Influence of the side chain on the stability of Schiff bases formed between pyridoxal 5'-phosphate and amino acids. *Int. J. Chem. Kinet.*, **1990**, *22*, 905.
- [VÁZQUEZ, 1990B] Vázquez, M. A.; Donoso, J.; Muñoz, F.; García Blanco, F.; García del Vado, M. A.; Echevarría, G. Kinetic and thermodynamic parameters for Schiff base formation between 5'-deoxypyridoxal and hexylamine. *Helv. Chim. Acta*, **1990**, *73*, 1991.
- [VÁZQUEZ, 1991A] Vázquez, M. A.; Muñoz, F.; Donoso, J.; García Blanco, F. Amino acid catalytic effect on the transamination reaction between pyridoxal 5'-phosphate and L-serine. *J. Mol. Catal.*, **1991**, *68*, 105.
- [VÁZQUEZ, 1991B] Vázquez, M. A.; Muñoz, F.; Donoso, J.; García Blanco, F. Spectroscopic study of the Schiff bases of dodecylamine with pyridoxal 5'-phosphate and 5'-deoxypyridoxal. *Biochem. J.*, **1991**, *279*, 759.
- [VÁZQUEZ, 1992A] Vázquez, M. A.; Muñoz, F.; Donoso, J.; García Blanco, F. Kinetic study on the stability of Schiff base of pyridoxal 5'-phosphate and leucine in water media with cationic surfactants. *Helv. Chim. Acta*, **1992**, *75*, 1029.
- [VÁZQUEZ, 1992B] Vázquez, M. A.; Muñoz, F.; Donoso, J.; García Blanco, F. Stability of Schiff bases of amino acids and pyridoxal 5'-phosphate. *Amino Acids*, **1992**, *3*, 81.
- [VÁZQUEZ, 1992C] Vázquez, M. A.; Muñoz, F.; Donoso, J.; García Blanco, F. Schiff bases between pyridoxal 5'-phosphate and dodecylamine. Kinetic study. *Int. J. Chem. Kinet.*, **1992**, *24*, 67.
- [VÁZQUEZ, 1992D] Vázquez, M. A.; Muñoz, F.; Donoso, J.; García Blanco, F. Transamination reaction between pyridoxal 5'-phosphate Schiff bases with dodecylamine and amino acids. *J. Phys. Org. Chem.*, **1992**, *5*, 142.

- [VERARDO, 1995] Verardo, G.; Gorassini, F.; Giumanini, A. G.; Scubla, T.; Tolazzi, M.; Strazzolini, P. Heteroaromatic primary amines and formaldehyde: The formation of N-hydroxymethyl derivatives. *Tetrahedron*, **1995**, *51*, 8311.
- [VILANOVA, 2004] Vilanova, B.; Adrover, M.; Muñoz, F.; Donoso, J. Photo-induced processes in vitamin B₆ compounds. *Chem. Biodivers.*, **2004**, *1*, 1073.
- [VINDIS, 2006] Vindis, C.; Escargueil-Blanc, I.; Elbaz, M.; Marcheix, B.; Grazide, M. H.; Uchida, K.; Salvayre, R.; Negre-Salvayre, A. Desensitization of platelet-derived growth factor receptor- β by oxidized lipid in vascular cells and atherosclerotic lesions: prevention by aldehyde scavengers. *Circ. Res.*, **2006**, *98*, 785.
- [VISTOLI, 2012] Vistoli, G.; Carini, M.; Aldini, G. Transforming dietary peptides in promising lead compounds: the case of bioavailable carnosine analogs. *Amino Acids*, **2012**, *43*, 111.
- [VOSS, 2006] Voss, P.; Siems, W. Clinical oxidation parameters of aging. *Free Radic. Res.*, **2006**, *40*, 1339.
- [VOZIYAN, 2002] Voziyan, P. A.; Metz, T. O.; Baynes, J. W.; Hudson, B. G. A post-Amadori inhibitor pyridoxamine also inhibits chemical modification of proteins by scavenging carbonyl intermediates of carbohydrate and lipid degradation. *J. Biol. Chem.*, **2002**, *277*, 3397.
- [VOZIYAN, 2005] Voziyan, P. A.; Hudson, B. G. Pyridoxamine as a multifunctional pharmaceutical: targeting pathogenic glycation and oxidative damage. *Cell. Mol. Life Sci.*, **2005**, *62*, 1671.
- ## W
- [WELLS-KNECHT, 1995] Wells-Knecht, K. J.; Zyzak, D. V.; Litchfield, J. E.; Thorpe, S. R.; Baynes, J. W. Mechanism of autoxidative glycosylation: identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autoxidative modification of proteins by glucose. *Biochemistry*, **1995**, *34*, 3702.
- [WENG, 1983] Weng, S-H.; Leussing, D. L. Transimination kinetics of pyridoxal 5'-phosphate Schiff bases. *J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, *105*, 4082.
- [WHITNALL, 2006] Whitnall, M.; Richardson, D. R. Iron: a new target for pharmacological intervention in neurodegenerative diseases. *Semin. Pediatr. Neurol.*, **2006**, *13*, 186.
- [WILLIAMS, 2004] Williams, M. E. Clinical studies of advanced glycation end product inhibitors and diabetic kidney disease. *Curr. Diabetes Rep.*, **2004**, *4*, 441.
- [WILLIAMS, 2011] Williams, W. M.; Winberg, A.; Smith, M. A. Protein modification by dicarbonyl molecular species in neurodegenerative diseases. *J. Amino Acids*, **2011**, Article ID 461216, 1.
- [WITHERUP, 1975] Witherup, T. H.; Abbott, E. H. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of the vitamin B₆ group. *J. Org. Chem.*, **1975**, *40*, 2229.
- [WOLFF, 1987] Wolff, S. P.; Dean, R. T. Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes. *Biochem. J.*, **1987**, *245*, 243.
- [WOLFF, 1991] Wolff, S. P.; Jiang, Z. Y.; Hunt, J. V. Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and ageing. *Free Radical Biol. Med.*, **1991**, *10*, 339.
- [WOLFFENBUTTEL, 1998] Wolffenbuttel, B. H.; Boulanger, C. M.; Crijns, F. R.; Huijberts, M. S.; Poitevin, P.; Swennen, G. N.; Vasan, S.; Egan, J. J.; Ulrich, P.; Cerami, A.; Levy, B. I. Breakers of advanced glycation end products restore large

- artery properties in experimental diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1998**, *95*, 4630.
- [WONDRAK, 2002] Wondrak, T. G.; Cervantes-Laurean, D.; Roberts, M. J.; Qasem, J. G.; Kim, M.; Jacobson, E. L.; Jacobson, M. K. Identification of α -dicarbonyl scavengers for cellular protection against carbonyl stress. *Biochem. Pharmacol.*, **2002**, *63*, 361.
- [WU, 2005] Wu, C. H.; Yen, G. C. Inhibitory effect of naturally occurring flavonoids on the formation of advanced glycation endproducts. *Agric. Food Chem.*, **2005**, *53*, 3167.
- [WU, 2011A] Wu, C.-H.; Huang, S.-M.; Lin, J.-A.; Yen, G.-C. Inhibition of advanced glycation endproduct formation by foodstuffs. *Food Funct.*, **2011**, *2*, 224.
- [WU, 2011B] Wu, E.-T.; Liang, J.-T.; Wu, M.-S.; Chang, K.-C. Pyridoxamine prevents age-related aortic stiffening and vascular resistance in association with reduced collagen glycation. *Exp. Gerontol.*, **2011**, *46*, 482.
- X**
- [XU, 2011] Xu, Q.; Park, Y.; Huang, X.; Hollenbeck, A.; Blair, A.; Schatzkin, A.; Chen, H. Diabetes and risk of Parkinson's disease. *Diabetes Care*, **2011**, *34*, 910.
- Y**
- [YAYLAYAN, 1994] Yaylayan, V. A.; Huyghues-Despointes, A. Chemistry of Amadori rearrangement products: analysis, synthesis, kinetics, reactions, and spectroscopic properties. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **1994**, *34*, 321.
- [YOKOZAWA, 2003] Yokozawa, T.; Kim, H. Y.; Cho, E. J.; Yamabi, N.; Choi, J. S. Protective effects of mustard leaf (*Brassica juncea*) against diabetic oxidative stress. *J. Nutr. Sci. Vitaminol Tokyo*, **2003**, *49*, 87.
- [YU, 1997] Yu, P. H.; Zuo, D. M. Aminoguanidine inhibits semicarbazide-sensitive amine oxidase activity. Implications for advanced glycation and diabetic complications. *Diabetologia*, **1997**, *40*, 1243.
- [YUEN, 1985] Yuen, L. C. Studies involving the formation of pyridoxamine 5'-phosphate Schiff bases and their zinc (II) complexes. *PhD Thesis*, **1985**.
- Z**
- [ZHANG, 2006] Zhang, L.; Peslherbe, G. H.; Muchall, J. M. Ultraviolet absorption spectra of substituted phenols: a computational study. *Photochem. Photobiol.*, **2006**, *82*, 324.
- [ZHANG, 2008] Zhang, Q.; Tang, N.; Schepmoes, A. A.; Phillips, L. S.; Smith, R. D.; Metz, T. O. Proteomic profiling of nonenzymatically glycosylated proteins in human plasma and erythrocyte membranes. *J. Proteome Res.*, **2008**, *7*, 2025.
- [ZHANG, 2011] Zhang, Q.; Monroe, M. E.; Schepmoes, A. A.; Clauss, T. R. W.; Gritsenko, M. A.; Meng, D.; Petyuk, V. A.; Smith, R. D.; Metz, T. O. Comprehensive identification of glycosylated peptides and their glycation motifs in plasma and erythrocytes of control diabetic subjects. *J. Proteome Res.*, **2011**, *10*, 3076.
- [ZIMMERLE, 1989] Zimmerle, C. T.; Frieden, C. Analysis of progress curves by simulations generated by numerical integration. *Biochem. J.*, **1989**, *258*, 381.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

- **3-DG** 3-desoxiglucosona
- **AG** Aminoguanidina
- **AGE** Productos finales de la glicación avanzada (*Advanced Glycation End products*)
- **ALE** Productos finales de la lipoxidación avanzada (*Advanced Lipoxidation End products*)
- **AP** Compuesto de Amadori
- **APP** 2-aminoetilfenetilfosfato
- **BS** Base de Schiff
- **CA** Carbinolamina
- **CE-PE** Carboxietil-fosfatidiletanolamina
- **CHE** Carbinolamina-hemiaminal
- **CML** N-ε-carboximetil-lisina
- **CM-PE** Carboximetil-fosfatidiletanolamina
- **DCA** Doble carbinolamina
- **DHPE** 1,2-dihexanoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina
- **DHPS** 1,2-dihexanoil-*sn*-glicero-3-fosfo-L-serina
- E_a Energía de activación
- **FA** Formaldehído
- **GLA** Glicolaldehído
- **GO** Glioxal
- **HE** Hemiaminal
- **HNE** 4-hidroxi-*trans*-2-nonenal
- **LDL** Lipoproteína de baja densidad
- **MDA** Malondialdehído
- **MGO** Metilglioxal
- **PA** Ácido 4-piridóxico

-
- **PAM** 4-aminometilpiridina
 - **PDB** Banco de datos proteicos (*Protein Data Bank*)
 - **PE** Fosfatidiletanolamina
 - **PEA** *O*-fosforiletanolamina
 - **PL** Piridoxal
 - **PLP** 5'-fosfato de piridoxal
 - **PM** Piridoxamina
 - **PMP** 5'-fosfato de piridoxamina
 - **PN** Piridoxina
 - **PNP** 5'-fosfato de piridoxina
 - **PS** Fosfatidilserina
 - **PSer** *O*-fosfo-DL-serina
 - **PUFA** Ácido graso poliinsaturado
 - **RAGE** Receptores transmembranales de los AGEs
 - **redSB** Base de Schiff reducida
 - **RCS** Compuestos carbonílicos y dicarbonílicos altamente reactivos
 - **RL** Radicales libres
 - **ROS** Especie oxigenada radicalaria