



**UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS
DEPARTAMENT DE QUÍMICA**

**INSTITUT UNIVERSITARI D'INVESTIGACIÓ EN CIÈNCIES
DE LA SALUT**

**ESTUDIO CINÉTICO DE LAS REACCIONES
ENTRE PIRIDOXAMINA Y COMPUESTOS
CARBONÍLICOS DE INTERÉS
BIOLÓGICO Y BIOMÉDICO**

Tesis Doctoral

Miquel Adrover Estelrich

2008

UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS
DEPARTAMENT DE QUÍMICA

INSTITUT UNIVERSITARI D'INVESTIGACIÓ EN CIÈNCIES
DE LA SALUT

ESTUDIO CINÉTICO DE LAS REACCIONES
ENTRE PIRIDOXAMINA Y COMPUESTOS
CARBONÍLICOS DE INTERÉS
BIOLÓGICO Y BIOMÉDICO

Memoria presentada para optar al grado de Doctor por la UIB en el
Programa de Doctorado de Ciencias Experimentales y Tecnologías
(Ciencia y Tecnología Química).

Palma de Mallorca, Julio de 2008

Fdo: Miquel Adrover Estelrich.

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 “**Estudio cinético de las reacciones entre piridoxamina y compuestos carbonílicos de interés biológico y biomédico**”, ha sido realizado bajo su dirección por D. Miquel Adrover Estelrich y constituye la memoria de su Tesis Doctoral.

Palma de Mallorca, 2008

Firmado

Dra. Josefa Donoso Pardo.
Catedrática de la UIB.

Firmado

Dr. Bartolomé Vilanova Canet
Profesor titular de la UIB.

Directores de este trabajo.

Als meus pares i padrins.

Agradecimientos

Esta tesis doctoral ha sido realizada en el Departamento de Química, Área de conocimiento de Química-Física, de la Facultad de Ciencias de la Universidad de las Islas Baleares.

Sin lugar a duda, este trabajo de investigación no habría sido posible sin la ayuda, asesoramiento, colaboración y apoyo de un gran número de personas. Por ello quiero agradecer muy especialmente:

A la Dra. Josefa Donoso y al Dr. Bartolomé Vilanova su magnífica dirección de esta tesis, la cual sin sus conocimientos, intuición, asesoramiento, experiencia y ayuda no habría sido posible. También quiero agradecerles de todo corazón el gran apoyo y el inmejorable trato personal que he recibido de su parte durante estos años.

Al Dr. Francisco Muñoz y al Dr. Juan Frau por su ayuda, asesoramiento y disponibilidad prestada durante estos años. También quiero agradecerles los agradables momentos que hemos pasado juntos en el ámbito personal.

A todos los miembros del grupo de investigación agradecerles el inmejorable ambiente en el que he tenido la oportunidad de trabajar.

A la Dra. Josefina Palou por su grata compañía durante estos años.

A Juan, Bernat, Fernando y Rafael, por los buenos momentos que hemos pasado juntos durante las comidas en la UIB.

A mis amigos con quienes he compartido tantos momentos agradables.

A mis padres y abuelos, así como al “tio Pau” y a “sa madrina”, por el apoyo, el cariño, la educación y por ayudarme a ser quien y como soy.

A Pilar, por formar parte de mi vida, por su compañía, comprensión y apoyo, en buenos y en malos momentos, en el ámbito profesional y personal.

MUCHAS GRACIAS A TODOS.

ÍNDICE

ÍNDICE

ABREVIATURAS	17
OBJETIVOS	21
CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES	25
1. VITAMINA B₆	27
1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS VITÁMEROS B ₆	29
1.1.1 DESCUBRIMIENTO	29
1.1.2 METABOLISMO	30
1.1.3 FUNCIÓN	32
1.1.4 PATOLOGÍAS ASOCIADAS A SU DEFICIENCIA	36
1.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE LOS VITÁMEROS B ₆	38
1.2.1 EQUILIBRIOS EN DISOLUCIÓN	38
1.2.2 PROPIEDADES ESPECTROSCÓPICAS	43
1.3 REACTIVIDAD DE LOS VITÁMEROS B ₆	46
1.3.1 FORMACIÓN DE BASES DE SCHIFF DE PIRIDOXAL (PL) Y DE 5'-FOSFATO DE PIRIDOXAL (PLP)	47
1.3.2 FORMACIÓN DE BASES DE SCHIFF DE PIRIDOXAMINA (PM) Y DE 5'-FOSFATO DE PIRIDOXAMINA (PMP)	51
1.3.3 FORMACIÓN DE COMPLEJOS CON IONES METÁLICOS	52
1.3.4 REACCIONES FOTOINDUCIDAS	53
2. GLICACIÓN PROTEICA (GP)	55
2.1 INTRODUCCIÓN	57
2.2 BASES DE SCHIFF GLÚCIDAS (<i>GLUCOSAMINAS</i>)	59
2.2.1 FORMACIÓN	59
2.2.2 DEGRADACIÓN	60
2.3 COMPUESTOS DE AMADORI (APs)	62
2.3.1 FORMACIÓN	62
2.3.2 DEGRADACIÓN	63
2.4 COMPUESTOS RESPONSABLES DE LA GLICACIÓN	65
2.4.1 LA GLUCOSA	65
2.4.2 OTROS COMPUESTOS CARBONÍLICOS	67
2.5 DIANAS DE LA GLICACIÓN	69
2.5.1 DE NATURALEZA PROTEICA	69

2.5.2 DE NATURALEZA NO PROTEICA	71
2.6 PRODUCTOS FINALES DE LA GLICACIÓN (AGEs)	72
2.7 LA PIRIDOXAMINA: INHIBIDOR DE LA GLICACIÓN PROTEICA	76
2.7.1 REACCIÓN CON COMPUESTOS CARBONÍLICOS	76
2.7.2 INHIBICIÓN DE LAS REACCIONES POST-AMADORI	78
2.7.3 NEUTRALIZACIÓN DE RADICALES LIBRES (RL)	79
2.8 OTROS INHIBIDORES DE LA GLICACIÓN	80
CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA	87
1. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	89
1.1 TÉCNICAS UTILIZADAS	91
1.1.1 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN CON DETECCIÓN UV/Vis (HPLC-UV/Vis)	91
1.1.2 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN CON DETECCIÓN POR ESPECTROSCOPIA DE MASAS (HPLC-MSD)	91
1.1.3 FLUJO DETENIDO (<i>STOPPED-FLOW</i>) CON DETECCIÓN UV/Vis (MSFS-UV/Vis)	92
1.1.4 ESPECTROSCOPIA UV/Vis	92
1.1.5 ESPECTROSCOPIA DE RMN	93
1.1.6 POTENCIOMETRÍA (pH-STAT)	93
1.2 MÉTODOS ANALÍTICOS	94
1.2.1 DETERMINACIÓN DE IÓN AMONIO	94
1.2.2 DETERMINACIÓN DE GRUPOS AMINO PRIMARIOS	94
1.3 TRATAMIENTO MATEMÁTICO DE RESULTADOS EXPERIMENTALES	94
1.3.1 RESULTADOS CINÉTICOS	94
1.3.2 RESULTADOS ESPECTROSCÓPICOS	96
1.3.3 OTROS RESULTADOS	98
2. METODOLOGÍA TEÓRICA	103
CAPÍTULO 3. RESULTADOS	107
1. ARTÍCULO I. PHOTO-INDUCED PROCESSES IN VITAMIN B₆ COMPOUNDS	109
2. ARTÍCULO II. INESPERADO EQUILIBRIO ISOMÉRICO DE LAS BASES DE SCHIFF DE PIRIDOXAMINA	129
3. ARTÍCULO III. A COMPARATIVE STUDY OF THE CHEMICAL REACTIVITY OF PYRIDOXAMINE, Ac-PHE-LYS AND Ac-CYS WITH VARIOUS GLYCATING CARBONYL COMPOUNDS	155
4. ARTÍCULO IV. KINETIC STUDY OF THE REACTION OF GLYCOLALDEHYDE WITH TWO GLYCATION TARGETS MODELS: N-AC-PHE-LYS AND N-AC-CYS	169

5. ARTÍCULO V. INHIBITION OF THE GLYCOSYLATION PROCESSES. THE REACTION BETWEEN PYRIDOXAMINE AND D-GLUCOSE	177
6. ARTÍCULO VI. PYRIDOXAMINE, A SCAVENGER AGENT OF CARBOHYDRATES	191
7. ARTÍCULO VII. THE PYRIDOXAMINE ACTION ON AMADORI COMPOUNDS: A REEXAMINATION OF ITS SCAVENGING CAPACITY AND CHELATING EFFECT	207
CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN	223
1. FOTOISOMERÍA EN LAS DISOLUCIONES ACUOSAS DE VITÁMEROS B₆	225
2. FORMACIÓN DE BASES DE SCHIFF DE PIRIDOXAMINA	227
3. IMPORTANCIA DE LA FORMACIÓN DE BASES DE SCHIFF DE PIRIDOXAMINA EN EL MECANISMO DE INHIBICIÓN DE LA GLICACIÓN PROTEICA	230
4. MECANISMO DE LA REACCIÓN DE PIRIDOXAMINA CON HEXOSAS Y PENTOSAS	234
5. EL MECANISMO DE ACCIÓN DE LA PIRIDOXAMINA SOBRE LOS COMPUESTOS DE AMADORI	241
CONCLUSIONES	245
BIBLIOGRAFÍA	249

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

➤ 1-DG	Desoxiglucosona
➤ 3-DG	3-Desoxiglucosona
➤ 4-PA	Ácido 4-piridóxico
➤ AG	Aminoguanidina
➤ AGEs	Productos finales de la glicación (<i>Advanced glycation end products</i>)
➤ AP	Compuesto de Amadori (<i>Amadori product</i>)
➤ BS	Base de Schiff
➤ CMC	S-Carboximetil-cisteína
➤ CML	N-ε-Carboximetil-lisina
➤ DAP	Difructosamina (<i>Di-Amadori product</i>)
➤ DC-Hs	Derivados imidazólicos de la ornitina
➤ DM	Diabetes mellitus
➤ Ea	Energía de activación
➤ EO	Estrés oxidativo
➤ FN3K	Fructosamina-3-fosfoquinasa
➤ GLA	Glicolaldehído
➤ GO	Glioxal
➤ GP	Glicación proteica
➤ GSH	Glutación
➤ HbA1c	Hemoglobina glicada
➤ HMF	Hidroxiacetilfurfural
➤ HNE	4-Hidroxi- <i>trans</i> -2-nonenal
➤ IsoK	Isocetales
➤ MDA	Malondialdehído
➤ MGO	Metilglioxal
➤ PDB	Banco de datos proteicos (<i>Protein Data Bank</i>)
➤ PL	Piridoxal
➤ PLP	5'-Fosfato de piridoxal
➤ PM	Piridoxamina
➤ PMP	5'-Fosfato de piridoxamina
➤ PN	Piridoxina
➤ PNG	5'-β-D-glucósido de piridoxina
➤ PNP	5'-Fosfato de piridoxina
➤ PNT	Pentosidina
➤ PTB	Bromuro de fenaciltiazol
➤ PUFAs	Ácidos grasos poliinsaturados (<i>Polyunsaturated fatty acids</i>)

- **RAGEs** Receptores transmembranales de los productos finales de la glicación
(*Receptor of Advanced Glycation End Products*)
- **RCS** Compuestos carbonílicos y dicarbonílicos altamente reactivos (*Reactive carbonyl species*)
- **RL** Radicales libres

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Los derivados naturales de la vitamina B₆ han sido ampliamente estudiados debido a su implicación en multitud de procesos biológicos, entre los que destaca su acción como cofactor enzimático de gran número de reacciones involucradas en el metabolismo de los aminoácidos. En ella, la formación de bases de Schiff (BSs) derivadas de los vitámeros B₆ es la clave de su acción catalítica [CHRISTEN, 1985][DOLPHIN, 1986][JANSONIUS, 1998][ELIOT, 2004].

Las BSs aldimínicas, formadas entre el 5'-fosfato de piridoxal (PLP) y diferentes aminoácidos, han sido extensamente estudiadas utilizando fundamentalmente técnicas espectroscópicas de absorción UV/Vis y de fluorescencia [CHRISTEN, 1985][DOLPHIN, 1986][VÁZQUEZ, 1988][VÁZQUEZ, 1989]. En cambio, las BSs de los derivados aminados de la vitamina B₆ (implicadas en los procesos de transaminación), han sido poco estudiadas debido al escaso desplazamiento de su equilibrio de formación y a la dificultad en la detección de la imina formada [CHRISTEN, 1985][YUEN, 1985].

Desde el punto de vista biomédico, la vitamina B₆ no sólo es importante por su función como cofactor enzimático, sino también por su acción en la inhibición y el control de los procesos de glicación proteica (GP) inducidos por la hiperglucemia. La piridoxamina (PM) es el vitámero con mayor capacidad inhibidora [BOOTH, 1997][KHALIFAH, 1999], siendo capaz de prevenir el desarrollo de la nefropatía y de la retinopatía diabética [TANIMOTO, 2007].

Aunque la PM puede formar complejos con iones metálicos y secuestrar radicales libres (RL) que incrementan el daño tisular, se ha apuntado que uno de sus mecanismos principales de acción es el secuestro de los compuestos carbonílicos implicados en la modificación proteica [VOZIYAN, 2005]. Tal es la importancia de este último mecanismo que otros vitámeros B₆ con capacidades acomplejantes de iones metálicos y neutralizantes de RL similares a las de la PM, como son el piridoxal (PL) o la piridoxina (PN), son menos efectivos como inhibidores del desarrollo patológico asociado a la diabetes mellitus (DM) [BOOTH, 1997].

A pesar de ello, los estudios cinéticos de la reacción entre la PM y compuestos carbonílicos implicados en la modificación proteica son escasos y se desconoce hasta la fecha, cuales son los mecanismos de reacción, la magnitud de las constantes cinéticas, o la influencia de la naturaleza concreta de los reactivos y de las condiciones de reacción.

Los compuestos de Amadori (APs) se generan como intermedios de la acción de los glúcidos sobre las cadenas laterales de las lisinas (Lys) proteicas [ULRICH, 2001]. Estos compuestos se degradan formando RL y compuestos carbonílicos de elevada reactividad [YAYLAYAN, 1994], por lo que su desactivación es clave en la inhibición del deterioro proteico. La PM es capaz de inhibir su degradación [VOZIYAN, 2003], aunque no está claro el mecanismo que conduce a ello. Se ha sugerido que su principal papel es el de formar complejos con iones metálicos que catalizan la oxidación del AP [VOZIYAN, 2003], aunque el hecho de que otros inhibidores con una capacidad acomplejante parecida (p. ej: la aminoguanidina) [PRICE, 2001] no ejerzan efecto alguno sobre los APs [KHALIFAH, 1999], hace que el mecanismo postulado no explique los datos experimentales.

Con estos antecedentes, en esta tesis doctoral se plantea un gran objetivo genérico: aportar evidencias experimentales que contribuyan a la comprensión del doble papel de la PM, como cofactor enzimático en los procesos metabólicos de los aminoácidos y cetoácidos y como inhibidor de la GP. Este objetivo genérico se concreta en cuatro objetivos parciales:

a) Estudiar las BSs formadas entre la PM y el ácido pirúvico, el propanal y el formaldehído, tomados como modelo de grupos carbonílicos en cetoácidos y aldehídos.

b) Estudiar las cinéticas de formación de BSs de la PM con compuestos carbonílicos implicados en la GP [THORNALLEY, 2005]. Comparar los resultados obtenidos con los determinados al utilizar compuestos modelo de las dianas de glicación (Ac-Cys y Ac-Phe-Lys). Evaluar, desde un punto de vista cuantitativo, la capacidad de la PM para actuar como inhibidor competitivo de la GP.

c) Realizar el estudio cinético de la reacción entre la PM y la glucosa, el promotor más importante de los procesos de modificación proteica asociados a la DM [SUJI, 2004]. Identificar los productos de reacción y determinar sus constantes cinéticas. Ampliar dicho estudio utilizando otras aldosas (algunas responsables también de la modificación proteica *in vivo*: ribosa o arabinosa [ALLEN, 1995][WELLS-KNECHT, 1995A]) con el fin de estudiar el efecto de la tipología de la cadena carbohidratada sobre la cinética y el mecanismo.

d) Elucidar el mecanismo mediante el cual la PM inhibe la degradación de los APs. Evaluar el papel que tiene en dicho proceso la reacción de la PM con los APs, utilizando para ello dos APs modelo. Estudiar la estabilidad y la relevancia de los complejos metálicos de la PM y de los APs en el mecanismo inhibidor/catalítico de las reacciones post-Amadori.

CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES

ANTECEDENTES

VITAMINA B₆

1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS VITÁMEROS B₆

1.1.1 DESCUBRIMIENTO.

Las vitaminas son compuestos esenciales para el correcto funcionamiento de los organismos vivos y su importancia radica fundamentalmente en su condición de coenzimas de multitud de sistemas enzimáticos.

La vitamina B₆ fue descubierta en 1934 por *György* [GYÖRGY, 1934], a raíz de un experimento en el que se trataban ratas con una dieta semisintética que incorporaba como únicos aditivos nutricionales vitamina B₁ y riboflavina. Este tratamiento provocó acrodinia, una dermatitis caracterizada por la aparición de edemas cutáneos. Estudios posteriores mostraron que dicha patología desaparecía al utilizar riboflavina sin purificar. El estudio de los componentes que contaminaban a la riboflavina señaló a la vitamina B₆ como el agente preventivo de la acrodinia. Más tarde, se asoció la vitamina B₆ al metabolismo de los ácidos grasos [BIRCH, 1938] y su deficiencia a la aparición de problemas epiteliales y disfunciones arteriales [GYÖRGY, 1956].

Aunque se poseían pruebas más que fiables de su existencia, tuvieron que pasar varios años para que fuera cristalizada [LEPKOVSKY, 1938] y sintetizada [HARRIS, 1939], caracterizándose como la 3-hidroxi-4,5-dihidroximetil-2-metilpiridina o piridoxina (PN) (figura 1.1).

A raíz de ensayos en los que se estudiaba el efecto de la PN sobre determinados microorganismos, se descubrió años más tarde la PM y el PL (figura 1.1) [SNELL, 1942]. Así mismo, el análisis del efecto de la fosforilación del PL mediante ATP sobre la actividad de la *tirosina descarboxilasa*, demostró la existencia de un derivado fosforilado del PL, el PLP [GUNSALUS, 1944]. Este estudio permitió descubrir también el 5'-fosfato de piridoxina (PNP) y el 5'-fosfato de piridoxamina (PMP) (figura 1.1). Paralelamente se identificó en organismos vivos el ácido 4-piridóxico (4-PA), producto del metabolismo oxidativo de la vitamina B₆ [HUFF, 1944].

Finalmente, en 1977 se descubrió que en los vegetales la PN se encontraba unida a un monosacárido formando el 5'-β-D-glucósido de piridoxina (PNG) [YASUMOTO, 1977].

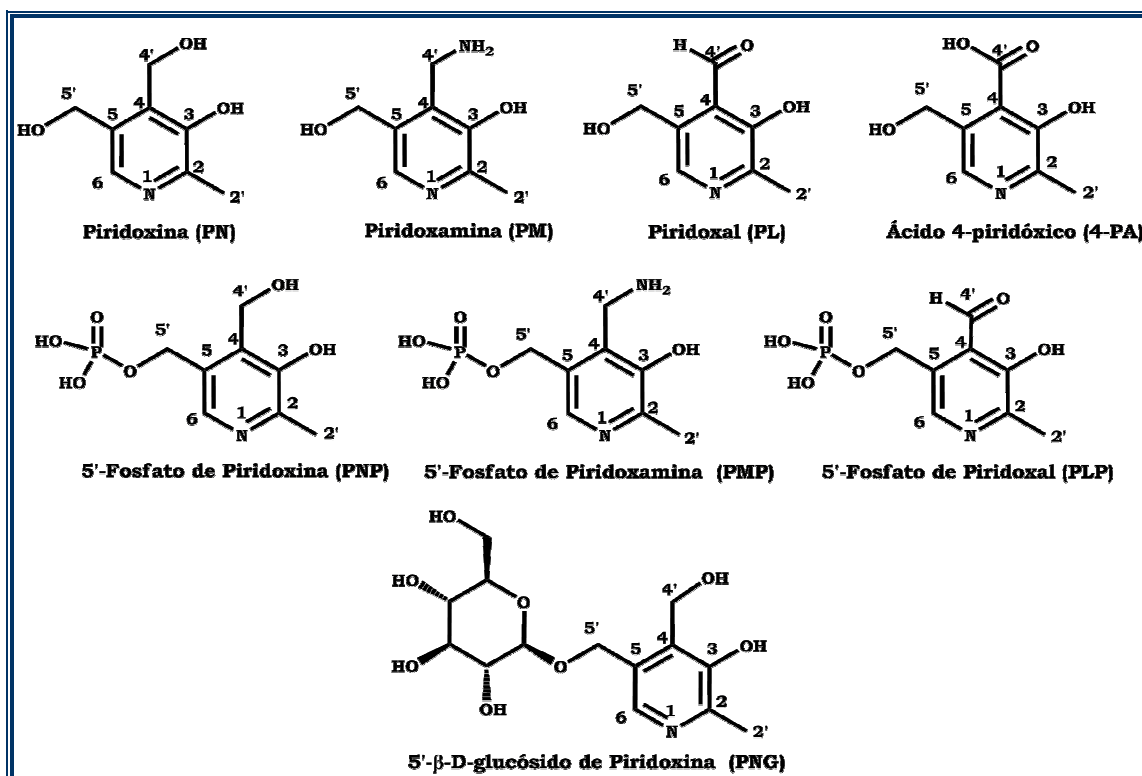


Figura 1.1. Vitámeros naturales de la vitamina B₆.

1.1.2 METABOLISMO.

Los vitámeros B₆ se encuentran distribuidos en los organismos vivos, tanto del reino animal como del vegetal. Las plantas y algunos microorganismos son capaces de sintetizarlos a partir de la glucosa u otros carbohidratos [GUPTA, 2001], mientras que los animales deben obtenerlos a partir de alimentos. La PN, el PNP y el PNG se encuentran mayoritariamente en alimentos de origen vegetal ($\approx 2 \mu\text{g}/\text{mg}$). En cambio, el PL, la PM y sus formas fosforiladas se encuentran en alimentos de origen animal ($\approx 7 \mu\text{g}/\text{mg}$) [SCHOONHOVEN, 1994][KALL, 2003].

Una de las características principales de los vitámeros B₆ es su elevada biodisponibilidad, si bien ésta varía para cada uno de ellos. Del total de PNG ingerido únicamente un 58% es absorbido por el organismo humano. En cambio, el PL, PLP, PM y PMP contenidos en alimentos, se ingieren formando BSs que son hidrolizadas en el estómago, posibilitando una absorción de aproximadamente el 100% [GREGORY III, 1997]. La biodisponibilidad de los vitámeros varía al ser ingeridos como fármacos. El PLP muestra una biodisponibilidad del 70%, la PN del 40% y el PL y la PM del 30% [SPINNEKER, 2007]. Los vitámeros B₆ también pueden ser absorbidos por vía dérmica. La PM [MORARIU, 2006] y el PLP muestran una elevada capacidad de penetración

cutánea [GUROCHKINA, 1986], mientras que la PN se absorbe en un 40% [VILLELA, 1954].

En la figura 1.2 se muestra el metabolismo de los vitámeros B₆. Inicialmente las formas fosforiladas son hidrolizadas por *fosfatasas* y posteriormente absorbidas mediante difusión pasiva a través del estómago e intestinos [SPINNEKER, 2007]. El PNG es hidrolizado por la β -glucosidasa, aunque también puede ser absorbido intacto e hidrolizarse en los tejidos [NAKANO, 1995]. Una vez absorbidos, son transportados al hígado donde pueden fosforilarse de nuevo e interconvertirse entre sí. La PN, la PM y el PL son fosforilados por la enzima *PN-quinasa*, proceso en equilibrio con su desfosforilación catalizada por las *fosfatasas*. Por otro lado, el PMP y el PNP pueden transformarse en PLP por acción de la *PNP-oxidasa*, enzima que también cataliza la oxidación de la PN y PM a PL, proceso reversible gracias a las *transaminasas* [SPINNEKER, 2007]. Las formas fosforiladas y no fosforiladas pasan al plasma sanguíneo, donde el PLP es el vitámero de mayor concentración (≈ 7 ng/ml), ya que puede anclarse a proteínas como la hemoglobina (aumentando su afinidad hacia el oxígeno) o la albúmina [INK, 1982]. Los otros vitámeros también se encuentran en el plasma y su concentración es ≈ 2 ng/ml para el PL, ≈ 0.4 ng/ml para la PN, ≈ 0.1 ng/ml para la PM, ≈ 0.1 ng/ml para el PMP y ≈ 9 ng/ml para el 4-PA [LUI, 1985].

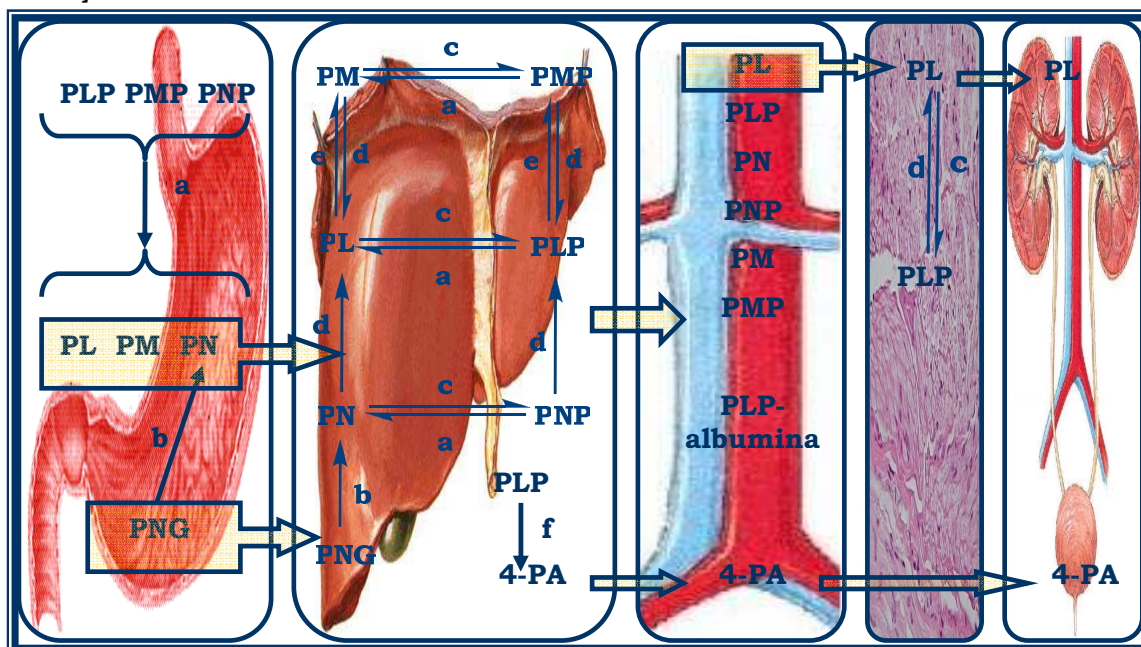


Figura 1.2. Transporte y vías metabólicas de la vitamina B₆ en el organismo. a= *fosfatasas*; b= β -glucosidasa; c= *PN-quinasa*; d= *PNP-oxidasa*; e= *transaminasas*; f= *PL-oxidasa*.

El metabolismo de la vitamina B₆ finaliza en el hígado mediante la oxidación del PLP a 4-PA. El 4-PA se elimina por el sistema urinario y su concentración es utilizada como parámetro de control del nivel de vitamina B₆ en el organismo. Se considera que la eliminación de 3 μmol/día representa un nivel adecuado [LEKLEM, 1990].

1.1.3 FUNCIÓN.

A raíz de que *Gunsalus et al.* [GUNSALUS, 1944] describieran la existencia del PLP y su papel como coenzima, se empezó a estudiar la participación de los vitámeros B₆ en los procesos enzimáticos, tanto del espacio extracelular como del intracelular. Se observó que un gran número de enzimas implicadas en el metabolismo de los aminoácidos eran dependientes del PLP [CHRISTEN, 1985][ELIOT, 2004] y que el PLP se unía a ellas formando BSs con el grupo ε-amina de una de sus Lys (figura 1.3(A)). Actualmente se sabe que su grupo fosfato también desempeña un importante papel en el anclaje, ya que forma puentes de hidrógeno e interacciones no covalentes con diferentes residuos. En el transcurso de su acción catalítica el PLP puede interconvertirse en otros vitámeros, como el PMP, que no interacciona de manera covalente con la enzima. El anclaje del PMP a la enzima se produce mediante puentes de hidrógeno e interacciones no covalentes de su grupo fosfato, del nitrógeno piridínico y del grupo metilamina (figura 1.3(B)) [JANSONIUS, 1998].

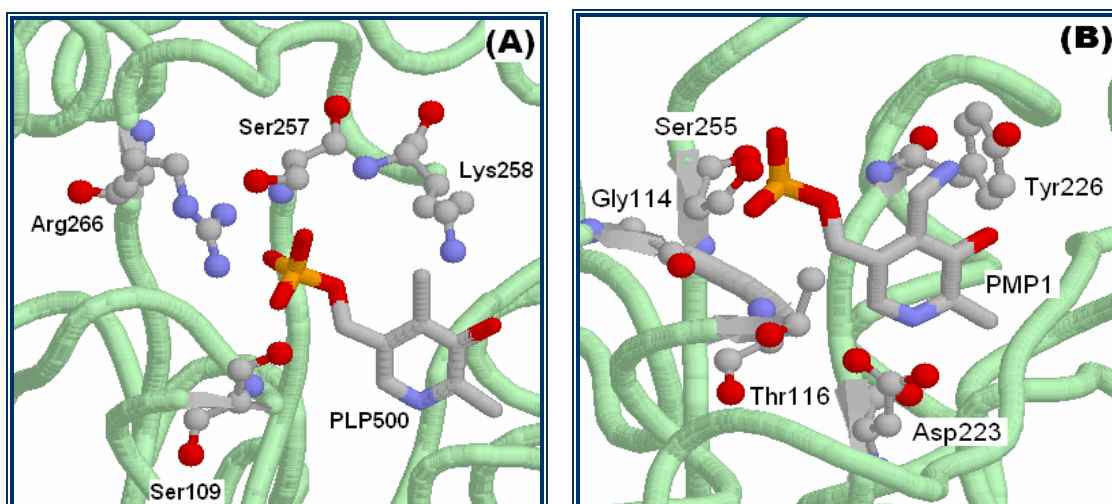


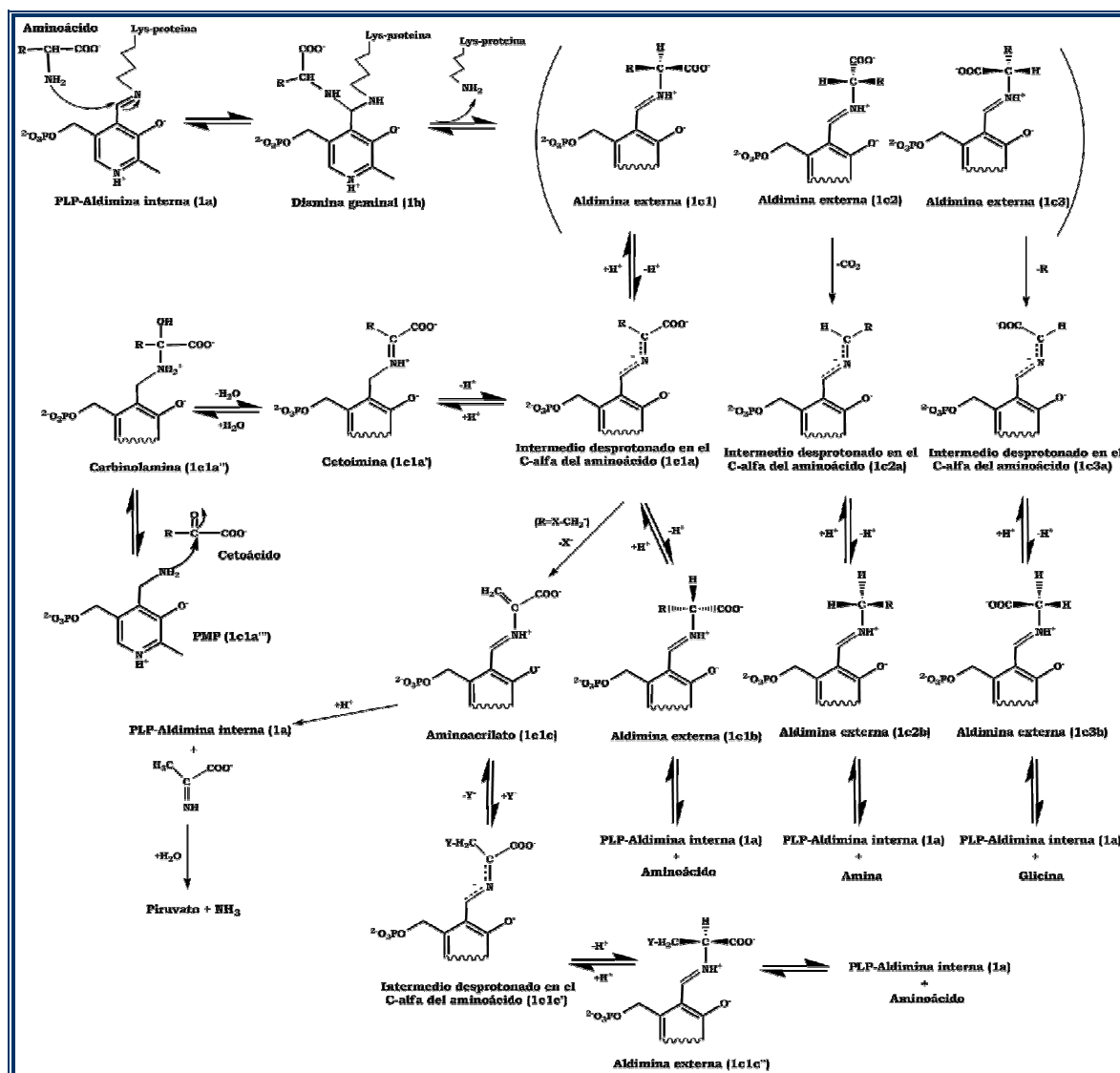
Figura 1.3. (A) Unión del PLP a la *tirosina aminotransferasa* (código pdb: 3tat) formando una BS con la Lys258 y mediante anclaje de su grupo fosfato con la Ser257 y la Arg266. (B) Unión del PMP al *aspartato aminotransferasa* (código pdb: 2aat) mediante interacción no covalente con residuos hidroxi-terminales. Los grupos prostéticos se representan mediante bastones, los grupos proteicos que interaccionan se muestran mediante bolas y bastones y la cadena principal de la enzima, en viña de color verde. Código de colores: azul, N; gris, C; rojo, O; gris, C; dorado, P.

Las reacciones catalizadas por enzimas dependientes del PLP son diversas y dependen de la propia naturaleza de la enzima. A excepción de la *glucógeno fosforilasa*, enzima que cataliza la degradación de glucógeno para formar glucosa-1-fosfato [MADSEN, 1986], todas las enzimas dependientes del PLP presentan como característica común la formación inicial de una diamina geminal (1b en el esquema 1.1) producto del ataque de un aminoácido (sustrato) sobre la BS formada entre el PLP y la enzima (1a). Ésta libera el grupo ε-amino proteico y forma una aldimina externa (1c) que presentará diferente disposición espacial de los grupos sustituyentes del C_α (1c) en función de su entorno enzimático, hecho que condicionará su posterior evolución [DUNATHAN, 1966][CHRISTEN, 1985][JOHN, 1995][HAYASHI, 1995][JANSONIUS, 1998]. Algunos de los procesos catalizados por enzimas dependientes del PLP son:

➤ **Transaminación.** Metzler et al. [METZLER, 1954] describieron en 1954 la transaminación, definiéndola como el proceso responsable de la interconversión entre aminoácidos y cetoácidos. Actualmente se sabe que este proceso está catalizado *in vivo* por las *transaminasas* (p. ej: *aspartato aminotransferasa*, *tirosina transaminasa*, *glutamina-piruvato transaminasa*... [CHRISTEN, 1985]) y es clave en la glucogénesis. El camino 1c1a del esquema 1.1 muestra el mecanismo de la transaminación. La aldimina externa (1c1) pierde el protón del C_α para formar un intermedio carbaniónico (1c1a) [MARTELL, 1984]. Su protonación (mediante catálisis ácido-base) genera una cetoimina (1c1a') cuya hidratación produce la carbinolamina correspondiente (1c1a''). La hidrólisis de la carbinolamina libera PMP y un cetoácido (1c1a'''). La transaminación concluye con el proceso inverso, en el que se forma una cetoimina (1c1a') entre el PMP y un nuevo cetoácido (sustrato) y se libera un nuevo aminoácido con recuperación del anclaje PLP-enzima (1a) [MEISTER, 1955][JANSONIUS, 1998].

➤ **Racemización.** La racemización (mostrada en el esquema 1.1 por el camino 1c1b) está catalizada *in vivo* por las *racemasas* (p. ej: *serina racemasa* o *alanina racemasa*), enzimas responsables de la interconversión enantiomérica de los aminoácidos [YOSHIMURA, 2003]. Procede mediante la protonación del intermedio carbaniónico (1c1a) en la cara opuesta de la aldimina inicial, formando así una nueva aldimina externa (1c1b). Una vez generada, la especie

1c1b hidroliza liberando el aminoácido sustrato racemizado y recuperando el anclaje PLP-enzima (1a) [DOLPHIN, 1986][JANSONIUS, 1998].



Esquema 1.1. Mecanismos de las reacciones de transaminación, racemización, eliminación α,β -, sustitución en β -, descarboxilación y desaldolación.

➤ **Eliminación α,β - e intercambio nucleofílico en β -.** Existen enzimas capaces de catalizar la eliminación de grupos electronegativos en posición β - de diversos aminoácidos, como la Ser, la fosfoserina o la β -cloroalanina. La gran mayoría de ellos también catalizan la sustitución sobre el C_β como la *tirosina fenol liasa* [KUMAGAI, 1970], la *triptofanasa* [SNELL, 1975] o la *O-acetilserina sulfidrilasa (cisteína sintasa)* [COOK, 2003]. Tanto la α,β -eliminación como la β -sustitución se inician formando una especie aminoacrilato (1c1c) (ver esquema 1.1) como resultado de la eliminación del grupo electronegativo en β - del intermedio carbaniónico 1c1a. En la α,β -eliminación la especie 1c1c se hidroliza, lo que implica la recuperación del anclaje PLP-enzima (1a) y la

formación de un aminoácido insaturado que degrada formando NH₃ y piruvato [PALCIC, 1986][MARTELL, 1989][JANSONIUS, 1998]. En la β-sustitución (ver camino 1c1c del esquema 1.1) un grupo nucleófilo se adiciona sobre el C_β de la especie 1c1c para formar un intermedio quinoide (1c1c'). Éste se protona nuevamente para generar una aldimina externa (1c1c''), cuya hidrólisis concluye con la formación del aminoácido-β-sustituido y con la recuperación del anclaje PLP-enzima (1a) [PALCIC, 1986][JANSONIUS, 1998].

➤ **Eliminación β,γ- e intercambio nucleofílico en γ-**. Algunas enzimas dependientes del PLP pueden activar la posición γ- del aminoácido, dando β,γ-eliminación y γ-sustitución, como ocurre con la *γ-cistationasa* [DE BILLY, 1975]. Ambos procesos se inician a partir del intermedio carbaniónico (1c1a) y prosiguen con la salida del grupo electronegativo presente en el C_γ, para formar finalmente un intermedio vinílico (no mostrado en el esquema 1.1). A partir de aquí, tanto la β,γ-eliminación como la γ-sustitución, siguen un mecanismo similar al descrito para la α,β-eliminación y para la β-sustitución y finalizan con la formación de productos finales equivalentes [PALCIC, 1986].

➤ **Descarboxilación.** Mandeles et al. [MANDELES, 1954] sugirieron en 1954 que la orientación perpendicular del grupo carboxílico del aminoácido con respecto a la imina favorecía la descarboxilación del sustrato. La descarboxilación está catalizada por las *descarboxilasas* (p. ej: *aspartato descarboxilasa*, *glutamato descarboxilasa*, *arginina descarboxilasa*...) y tiene como objetivo la transformación de los aminoácidos en aminas que se utilizarán en la neurotransmisión [FERENCIK, 1969][PALCIC, 1986]. La aldimina externa (1c2 en el esquema 1.1) elimina una molécula de CO₂ y forma un intermedio carbaniónico (1c2a), cuya protonación genera otra aldimina externa (1c2b). Su hidrólisis libera la amina primaria y finaliza con la recuperación del anclaje PLP-enzima (1a) [PALCIC, 1986][MARTELL, 1989].

➤ **Desaldolación.** Se produce por rotura del enlace entre C_α-C_β en β-hidroxi-aminoácidos por acción de las *aldolasas* (p. ej: *treonina aldolasa*) [HENDERSON, 1999] y se favorece cuando la aldimina externa presenta la cadena lateral del aminoácido en posición perpendicular a la imina (1c3 en el esquema 1.1). Se inicia con la desprotonación del grupo hidroxilo presente en el C_β y prosigue con la rotura del enlace C_α-C_β. Producto de ello se genera un intermedio

carbaniónico (1c3a) cuya protonación conduce a la formación de la aldimina 1c3b. La hidrólisis de ésta nueva aldimina forma glicina como producto final y recupera la unión PLP-enzima (1a) [MARTELL, 1989].

➤ **Intercambio protónico.** Otro de los procesos que catalizan las enzimas dependientes del PLP es el intercambio protónico, el cual puede darse de manera simultánea con otros procesos catalíticos. Enzimas como la *aspartato aminotransferasa*, la *triptófano sintasa* o la *serina-hidroximetiltransferasa*, también catalizan el intercambio protónico. Este proceso transcurre bien a través de las BSs del PLP o del PMP, o bien a través del grupo fosfato en posición 5' del PLP o del PMP [MARTELL, 1989][MALTHOUSE, 2003].

➤ **Oxidación de aminoácidos.** *Ikawa y Snell [IKAWA, 1954]* describieron por primera vez, en 1954, la existencia de enzimas dependientes del PLP capaces de oxidar aminoácidos a cetoácidos mediante un mecanismo distinto a la transaminación. Estas enzimas son conocidos como *oxidases* y exhiben su actividad catalítica en presencia de Cu²⁺. Inicialmente forman una BS entre el PLP y el aminoácido sustrato. La aldimina resultante no evoluciona hacia la formación de la cetoimina, sino que el nitrógeno azometino se hidroliza para formar el cetoácido correspondiente e hidroxilamina [TATSUMOTO, 1987][MARTELL, 1989].

➤ **Desfosforilación.** En 1977 *Martell y Langohr [MARTELL, 1977]* describieron la existencia de enzimas dependientes del PLP que en presencia de metales divalentes eran capaces de desfosforilar ácidos aminofosfóricos. Este proceso, de elevada importancia en el metabolismo de los ácidos fosfóricos, se inicia mediante la isomerización de la aldimina formada entre el PLP y el ácido aminofosfórico. La cetoimina formada desfosforila a través de la rotura del enlace C-P y libera ácido fosfórico [MARTELL, 1989].

1.1.4 PATOLOGÍAS ASOCIADAS A SU DEFICIENCIA.

Debido a su ubicuidad en la mayoría de los componentes de la dieta, es reducido el sector poblacional que presenta deficiencia de vitamina B₆. No obstante, ésta se manifiesta en un 23% de las personas de entre 65 y 70 años y en un 40% de las personas mayores de 85 años [HERRMANN, 2002], mediante el desarrollo de patologías asociadas a desórdenes enzimáticos. La ingesta

recomendada está entre 1.5 y 2 mg/día, apareciendo los primeros síntomas de avitaminosis-B₆ en ingestas inferiores a 0.5 mg/día, lo que provoca también hiperinsulemia [RIBAYA, 1990]. Su deficiencia puede deberse a dificultades en su absorción, factores genéticos o interacción con otros medicamentos (cicloserina, penicilamina...) y se solventa administrando dosis suplementarias de PN o mediante la ingesta de alimentos funcionales [CZEIZEL, 1998]. Algunas de las patologías inducidas por el déficit de vitamina B₆ son:

➤ **Anemia.** La anemia microcítica está causada por un defecto en la enzima *aminolevulinato sintasa* o bien por un déficit de vitamina B₆ y se caracteriza por el tamaño anormalmente pequeño de los glóbulos rojos [SPINNEKER, 2007].

➤ **Desórdenes en el sistema inmunitario.** La deficiencia de vitamina B₆ afecta al sistema linfático, disminuyendo la formación de linfocitos y de interleuquina (implicada también en la reproducción celular) [SPINNEKER, 2007].

➤ **Cáncer.** Se ha observado que el desarrollo de cáncer de colon [WEI, 2005], de páncreas [STOLZENBERG, 1999], de laringe [HARRISON, 1997] y de pulmón [HARTMAN, 2001], está inversamente relacionado con la ingesta de vitamina B₆. Además, la vitamina B₆ es considerada como factor preventivo del desarrollo de cáncer de pecho [ZHANG, 2003A]. Entre otros, existen dos procesos inducidos por el déficit de vitamina B₆ que explican tal relación: a) disminución en la actividad de la *serina-hidroximetiltransferasa*, enzima implicada en la síntesis de las purinas [JONES, 1990]; b) disminución en la actividad de la *glutathiona S-transferasa* y de la *glutathiona peroxidasa*, enzimas desintoxicantes [GUILARTE, 1993].

➤ **Enfermedades cardiovasculares.** La avitaminosis-B₆ induce un incremento de la homocisteína. La homocisteína es un producto formado durante la transformación de Met a Cys y es degradada por enzimas dependientes de la vitamina B₆. El incremento los niveles de homocisteína induce al desarrollo de enfermedades cardíacas [UELAND, 1989][SPINNEKER, 2007].

➤ **Neuropatologías.** La desmielinación nerviosa (deterioro de la mielina) es responsable del desarrollo de un gran número de patologías neuronales. La mielina es sintetizada por la *serina-palmitil-transferasa*, una enzima dependiente del PLP [SPINNEKER, 2007].

1.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE LOS VITÁMEROS B₆

1.2.1 EQUILIBRIOS EN DISOLUCIÓN.

Todos los vitámeros B₆ presentan una estructura común, la 5-(hidroximetil)-2-metilpiridin-3-ol y se diferencian entre sí por el sustituyente en posición 4 y por la fosforilación del alcohol en posición 5' (ver figura 1.1). Una de las características de esta estructura es su elevado número de grupos ionizables, cuyo estado de protonación, dependiente del pH y de la polaridad del medio, condiciona en gran medida su reactividad [DOLPHIN, 1986]. Cada especie iónica presenta diferentes formas en equilibrio entre sí, las cuales han sido estudiadas fundamentalmente mediante espectroscopia UV/Vis [METZLER, 1973][HARRIS, 1976][CORTIJO, 1988].

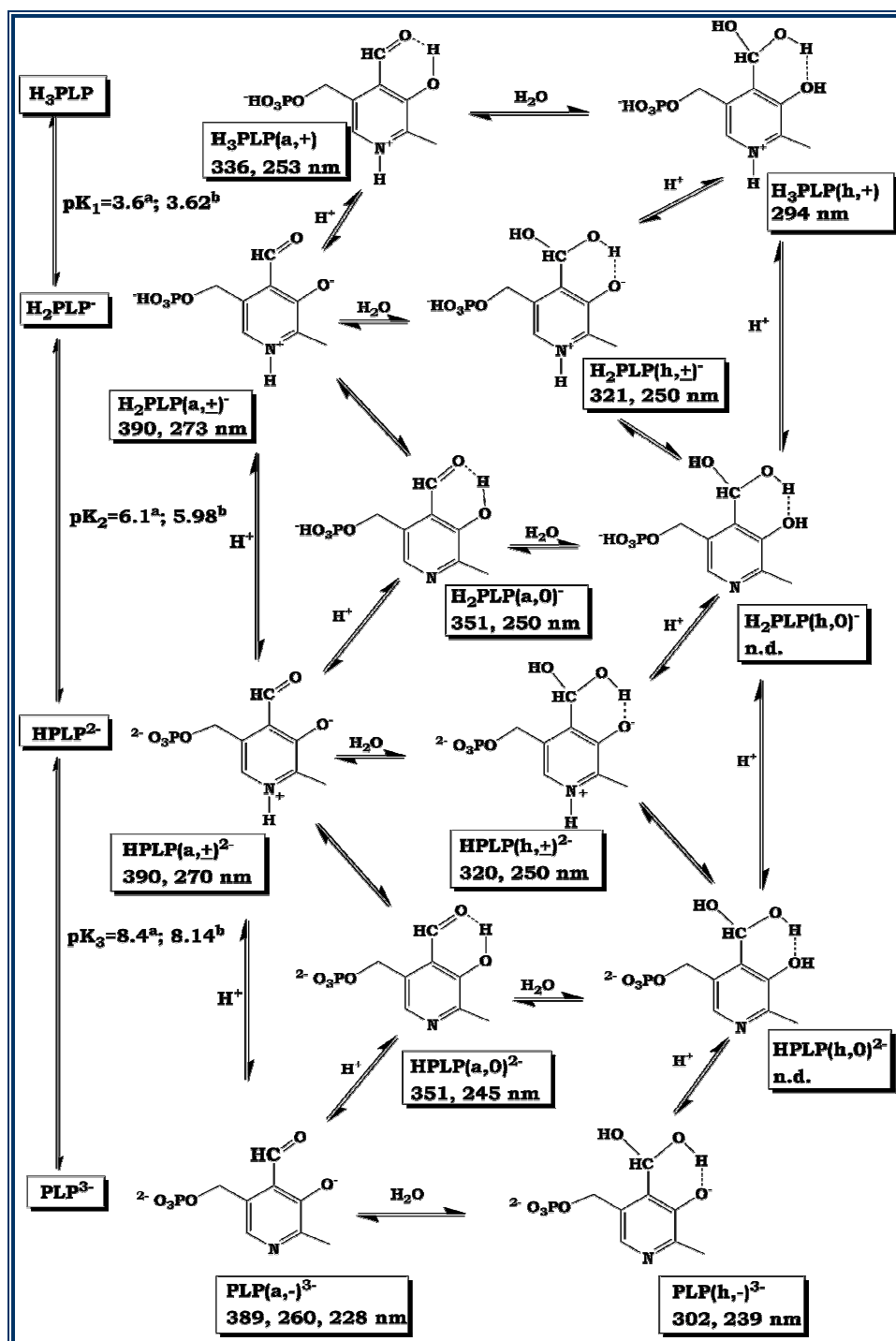
➤ **PLP.** El PLP presenta cuatro constantes de ionización macroscópicas, cuyos valores de pK_a fueron determinados por Anderson y Martell [ANDERSON, 1964]. Estos equilibrios se muestran en el esquema 1.2, excepto el primer equilibrio de ionización del grupo fosfato (pK₀= 1.64). En disolución acuosa y a pH ácido, la especie H₃PLP es la forma iónica predominante y presenta equilibrio de hidratación entre las especies H₃PLP(a,+) y H₃PLP(h,+). El equilibrio de hidratación se encuentra desplazado hacia el H₃PLP(h,+), que representa un 76% del total de la especie iónica H₃PLP.

La pérdida de un protón por parte del H₃PLP lleva a la formación del ión H₂PLP⁻, el cual presenta dos equilibrios de hidratación; uno entre las especies H₂PLP(a,±)⁻ y H₂PLP(h,±)⁻ (desplazado en un 78% hacia el H₂PLP(a,±)⁻) y otro entre las especies H₂PLP(a,0)⁻ y H₂PLP(h,0)⁻. Este sistema presenta dos equilibrios tautoméricos; uno entre las especies H₂PLP(a,±)⁻ y H₂PLP(a,0)⁻ (desplazado en un 68% hacia el H₂PLP(a,±)⁻) y otro entre las especies H₂PLP(h,±)⁻ y H₂PLP(h,0)⁻.

La ionización del H₂PLP⁻ conduce a la formación de la especie iónica HPLP²⁻ que presenta unos equilibrios de hidratación y tautoméricos análogos a los descritos para el H₂PLP⁻ (ver esquema 1.2). En este caso, el equilibrio de hidratación entre las especies HPLP(±)²⁻ está desplazado en un 81% hacia la especie HPLP(a,±)²⁻, mientras que equilibrio tautomérico entre las especies HPLP(a)²⁻ lo está en un 65% hacia el tautómero HPLP(a,±)²⁻.

Finalmente, la ionización del HPLP²⁻ forma la especie iónica PLP³⁻ cuyo equilibrio de hidratación está desplazado en un 92% hacia la especie PLP³⁻(a,-

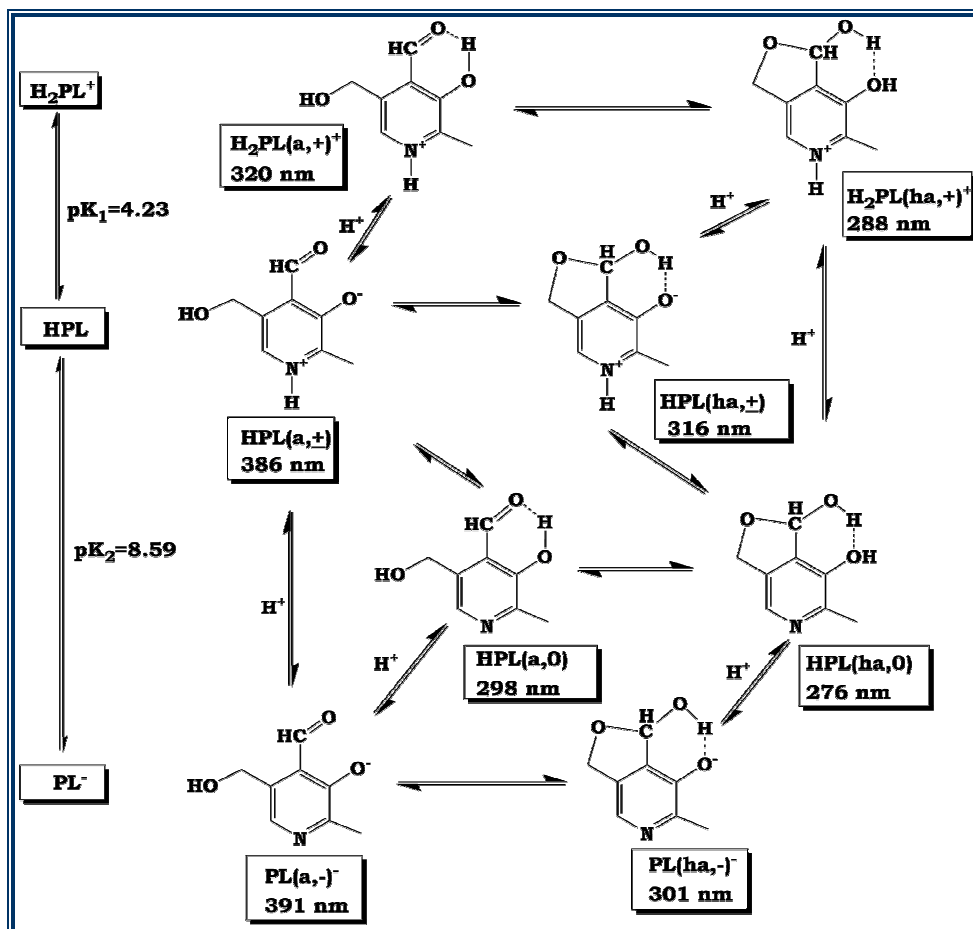
)³. Estos datos indican que en disolución acuosa, la proporción de las formas aldehídicas aumenta con el pH [HARRIS, 1976]. Llor et al. [LLOR, 1988] mostraron que tanto los equilibrios de hidratación como los tautoméricos presentan una fuerte dependencia con la hidrofilia del medio, ya que tanto las formas hidratadas como las zwitteriónicas disminuyen su proporción con el descenso de la polaridad, hecho que ha sido justificado mediante cálculos teóricos [KIRUBA, 2003].



Esquema 1.2. Especies iónicas, tautoméricas e hidratadas del PLP en disolución y longitud de onda a la que absorbe cada una de ellas ^a[HARRIS, 1976]^b[ANDERSON, 1964].

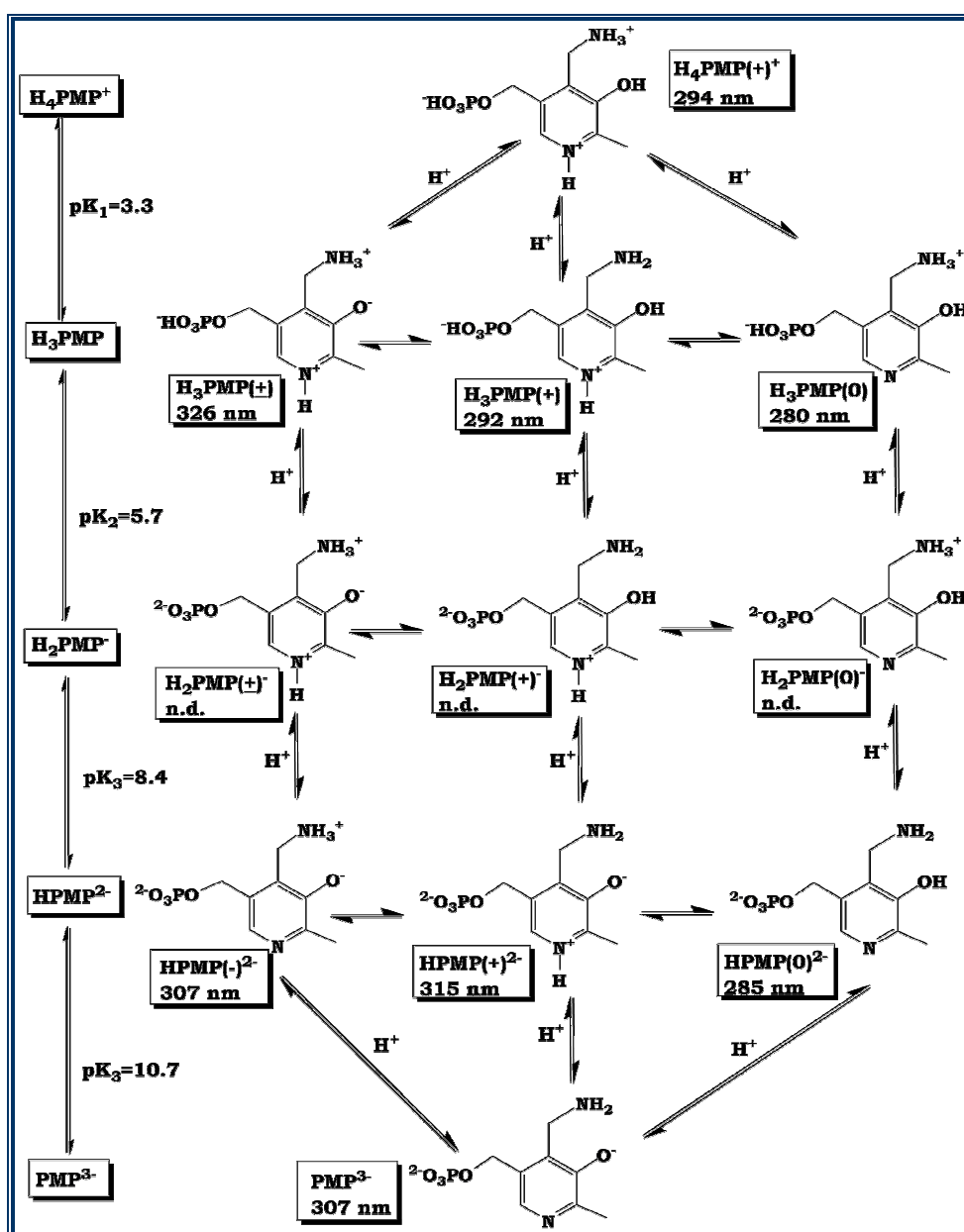
► **PL.** En el esquema 1.3 se muestran los equilibrios iónicos, tautoméricos y hemiacetálicos del PL. A pH ácido la forma H₂PL⁺ es la predominante y su ionización forma la especie HPL, la cual puede desprotonarse para generar la especie PL⁻. Las especies iónicas H₂PL⁺, HPL y PL⁻ presentan equilibrios entre sus formas aldehídicas y hemiacetálicas (debido al ataque del hidroxilo en posición 5' sobre el aldehído). Además, la forma iónica HPL también presenta equilibrios tautoméricos.

Los estudios de *Harris et al.* [HARRIS, 1976] indican que en los equilibrios hemiacetálicos existe una correlación entre el porcentaje de forma aldehídica y el pH. Así, el H₂PL(a,+)⁺ constituye menos del 5% del total de la forma iónica H₂PL⁺, mientras que las especies aldehídicas representan un 8% de la forma HPL. Dicha tendencia se mantiene para el ión PL⁻, para el que la especie PL(a,-)⁻ constituye un 15% del total. Estos datos muestran que la desfosforilación del grupo hidroxilo en posición 5' del PLP disminuye la proporción de las especies aldehídicas. Los trabajos de *Llor et al.* [LLOR, 1988] muestran también para el PL una correlación entre el porcentaje de las formas hemiacetálicas y la polaridad del medio.



Esquema 1.3. Especies iónicas, tautoméricas y hemiacetálicas del PL en disolución y longitud de onda a la que absorbe cada una de ellas [HARRIS, 1976].

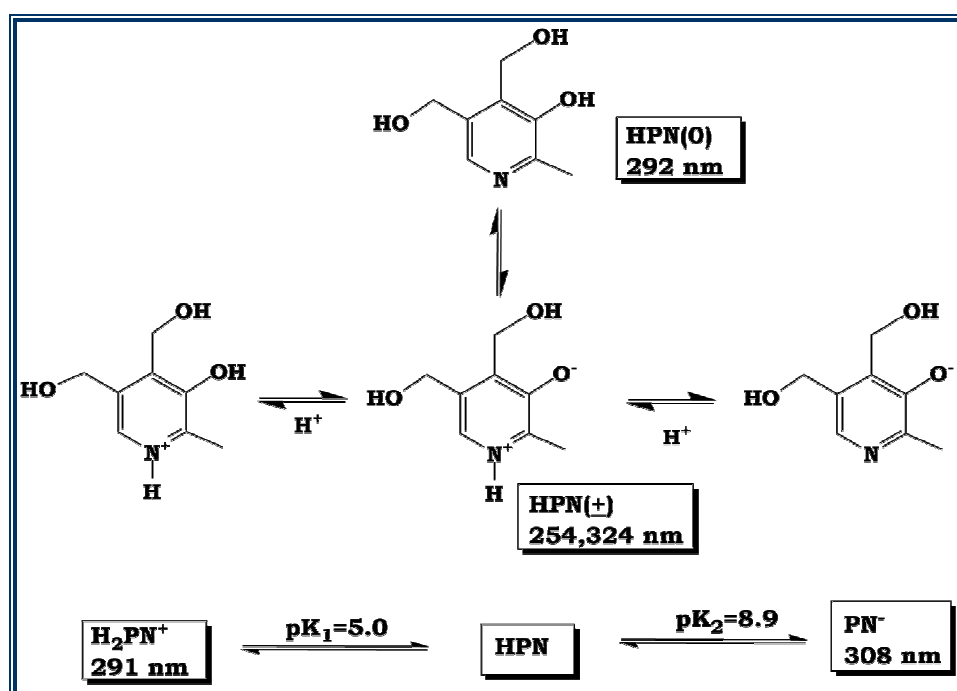
► **PM y PMP.** En el esquema 1.4 se muestran los equilibrios iónicos del PMP, excepto el primer equilibrio de ionización de su grupo fosfato ($pK_0 = 1.6$). A pH ácido presenta mayoritariamente la forma iónica H_4PMP^{+} , cuya ionización genera las especies iónicas H_3PMP , H_2PMP^{-} , $HPMP^{2-}$ y PMP^{3-} . Cada una de ellas presenta equilibrios tautoméricos. Los zwitteriones $H_3PMP(\pm)$ y $H_2PMP(\pm)^{-}$ representan un 90% del total de sus especies iónicas, mientras que el $HPMP^{(-)2-}$ está en un 85% con respecto al total de la forma iónica $HPMP^{2-}$ [METZLER, 1973][CHRISTEN, 1985]. Este hecho prueba que los tautómeros catiónicos o zwitteriónicos presentan, en disolución acuosa, una proporción mucho mayor que los tautómeros neutros [METZLER, 1973], tendencia que se invierte al disminuir la polaridad del medio [MASLOWSKA, 1994].



Esquema 1.4. Especies iónicas y tautoméricas del PMP en disolución y longitud de onda a la que absorbe cada una de ellas [METZLER, 1973][CHRISTEN, 1985][DÍAZ, 1998].

Los equilibrios tautoméricos de la PM son similares a los del PMP, aunque la PM presenta dos constantes de ionización menos ya que no tiene grupo fosfato. Sus constantes de ionización son 3.5, 8.2 y 10.7 [METZLER, 1973].

➤ **PN y PNP.** En el esquema 1.5 se muestran los equilibrios iónicos de la PN. A pH ácido la forma iónica H_2PN^+ es la predominante, mientras que a pH neutro lo es la HPN. La especie HPN presenta un equilibrio tautomérico desplazado en un 92% hacia la forma zwitteriónica $HPN(\pm)$. A pH básico la especie PN^- es la predominante [LUNN, 1952]. El PNP presenta las mismas especies iónicas que la PN, además de las correspondientes a la ionización de su grupo fosfato; siendo sus valores de pKa: 1.2, 4.99, 5.8 y 9.44 [BAZHULINA, 1966].



Esquema 1.5. Especies iónicas y tautoméricas de la PN en disolución y longitud de onda a la que absorbe cada una de ellas [LUNN, 1952].

➤ **4-PA.** En disolución acuosa y a diferentes valores de pH, el 4-PA presenta equilibrios iónicos entre sus formas catiónicas, neutras y aniónicas. A su vez, todas ellas presentan equilibrios tautoméricos y equilibrios lactónicos establecidos entre la forma carboxílica (en posición 4') y su lactona (formada debido al ataque del hidroxilo en 5' sobre el carboxilato en 4') [BAZHULINA, 1974A]. La constante de ionización para su grupo fenol es 0.4, la del ácido carboxílico es 5.5 y la del nitrógeno piridínico vale 10.8 [BRIDGES, 1966].

1.2.2 PROPIEDADES ESPECTROSCÓPICAS.

Los vitámeros B₆ presentan importantes bandas de absorción en la zona UV/Vis, situadas en el intervalo entre 400 y 200 nm. Bandas cuya posición e intensidad dependen de la naturaleza de los sustituyentes en 4 y 5' y de los estados de protonación de los grupos ionizables [FUMINORI, 1973] que dependen a su vez del pH y de la polaridad del medio. Este hecho ha motivado un extenso uso de la espectroscopia UV/Vis como metodología de estudio de los equilibrios iónicos, tautoméricos, de hidratación o de ciclación de los diferentes vitámeros B₆, así como de sus cinéticas de reacción.

Metzler *et al.* [METZLER, 1973] y Harris *et al.* [HARRIS, 1976] comprobaron que los espectros globales de absorción UV/Vis de cada especie iónica en cada vitámero B₆, podían ser deconvolucionados en curvas log-normales, atribuibles específicamente a los saltos electrónicos de cada una de las formas (tautoméricas, hidratadas, hemiacetálicas o lactónicas) en el equilibrio.

En disolución acuosa, dichos vitámeros presentan mayoritariamente 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 (esquemas 1.2, 1.3, 1.4 y 1.5). La variación del pH afecta a la posición e intensidad de las bandas. Se ha observado que la protonación del grupo fenolato desplaza los máximos de absorción hacia longitudes de onda menores, mientras que la protonación del nitrógeno piridínico los desplaza hacia longitudes de onda mayores [MOROZOV, 1986]. El cambio en la polaridad altera los equilibrios tautoméricos, hemiacetálicos o de hidratación, modificando de manera importante la posición de los máximos de absorción. Los estudios de Metzler *et al.* [METZLER, 1973] indican también que el aumento de temperatura incrementa la anchura de las bandas espectroscópicas, aunque no influye en su posición.

En cuanto al efecto de los sustituyentes, se puede apuntar que los espectros de las formas hidratadas del PLP, de las formas hemiacetálicas del PL y de los tautómeros de la PM y del PMP con el grupo 4-aminometilo desprotonado, son muy similares a sus análogos iónicos en la PN y en el PNP [MOROZOV, 1966][MOROZOV, 1986]. En cambio, los máximos de absorción de los espectros de las formas carbonílicas del PL y del PLP y de los tautómeros de la PM y del PMP con el grupo metilamino protonado, se desplazan a longitudes de onda mayores que sus análogos iónicos en la PN y en el PNP [MOROZOV, 1966][MOROZOV, 1986]. La fosforilación del hidroxilo en 5' no modifica la posición de las bandas, únicamente varía su intensidad [BAZHULINA, 1966][MOROZOV, 1966].

La espectroscopia de fluorescencia es otra de las técnicas usadas en el estudio de los vitámeros B₆, ya que dichos compuestos presentan fuertes bandas de emisión en la zona UV/Vis. La fluorescencia ha sido fundamentalmente usada en el estudio de los vitámeros B₆ en entornos enzimáticos [PHILLIPS, 1998][BENCI, 1999][ENCINAS, 2002]. Su aplicación ha permitido el estudio de la estequiometría de unión entre el PLP y enzimas y la interacción PLP-sustrato [CHEUNG, 2003][MOMANY, 2004].

Bridges et al. [BRIDGES, 1966] determinaron los máximos de excitación y de emisión para cada una de las formas iónicas de cada vitámero B₆. 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.

Además de estas técnicas electrónicas, se han utilizado para el estudio químico-físico de los vitámeros B₆ otras técnicas espectroscópicas, como por ejemplo, la espectroscopia de RMN de ¹H y de ¹³C. Los desplazamientos químicos de las señales de ¹H para los diferentes vitámeros B₆ fueron determinados a pH neutro por *Korytnyk y Singh* [KORYTNYK, 1963]. Dichas señales sufren un ligero desplazamiento en función del vitámero estudiado. Así, la señal correspondiente al H-C(2') aparece en el rango entre 2.5 y 2.6 ppm, la del H-C(5') lo hace entorno a 4.7 ppm y la del H-C(6) puede hacerlo desde 7.6 a 7.7 ppm. Estos autores aportaron también los desplazamientos de las señales de los H-C(4'). Para la PM o el PMP dicha señal aparece a 4.4 ppm, mientras que para el PL o el PLP lo hace en torno a 6.2 ppm en sus formas hemiacetálicas o hidratadas y en torno a 10.3 ppm en sus formas aldehídicas.

Los desplazamientos de ¹³C fueron descritos para cada vitámero por *Wetherup y Abbott* [WETHERUP, 1975]. El desplazamiento de la señal del C(2) se sitúa entre 124 y 150 ppm, la del C(2') lo hace entre 15 y 20 ppm, la del C(3) entre 150 y 160 ppm, la del C(4) entre 130 y 140 ppm, la del C(5) entre 130 y 140 ppm, la del C(5') en 60 ppm y entre 125 y 130 ppm la del C(6). El desplazamiento de la señal del C(4') es 196 ppm en las formas aldehídicas del PLP, 37 ppm en la PM y PMP y 58 ppm en la PN y PNP.

La espectroscopia de RMN ha sido utilizada en la determinación de los valores de pKa para los diferentes vitámero B₆, ya que el desplazamiento de los protones y carbonos vecinales a grupos ionizables se ve fuertemente

influenciado por el estado de protonación de dichos grupos [KORYTNYK, 1963][WITHERUP, 1975]. En la figura 1.4 se muestran los desplazamientos de las señales de ¹³C del PMP en función del pD. Las señales que muestran mayor variación en sus desplazamientos son las de los C(4) y C(6), especialmente susceptibles a la protonación del fenol y del N(1) [WITHERUP, 1975].

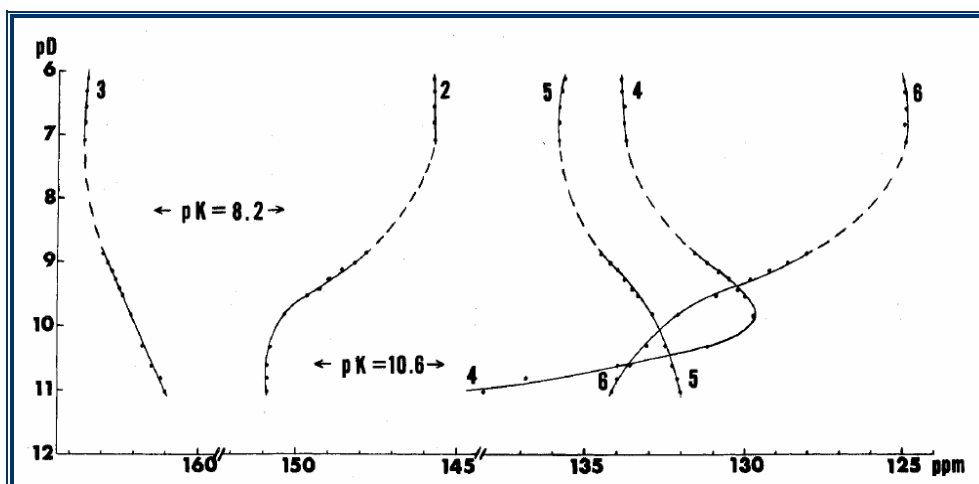


Figura 1.4. Variación en el desplazamiento químico de ¹³C (ppm) en función del pD para la PMP. Adaptado de Whitherup y Abbott [WITHERUP, 1975].

Así mismo, la espectroscopia de ³¹P-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, datos recopilados por Schnackerz [SCHNACKERZ, 1986].

La espectroscopia de absorción IR se ha utilizado con una finalidad parecida, ya que ha permitido el estudio de las especies del PLP en disolución acuosa [ANDERSON, 1964], posibilitando la determinación del estado de ionización de su grupo fosfato, tanto en su forma libre [BARTL, 1998] como en entornos enzimáticos [SÁNCHEZ-RUIZ, 1991]. La espectroscopia de absorción IR se ha utilizado también para la determinación de los valores de pKa de otros vitámeros, como los del PMP [SALVA, 2003A].

Finalmente indicar que otras técnicas como la espectroscopia de masas, la RAMAN o el dicroísmo circular, también han sido utilizadas en el estudio de los vitámeros B₆. Así, Tryfiates [TRYFIATES, 1986] recopiló los datos obtenidos en el estudio de los vitámeros B₆ y de las BSs del PLP por espectroscopia de masas. Cinta et al. [CINTA, 1999] estudiaron la PN por espectroscopia RAMAN, mientras que Benecky et al. [BENECKY, 1985] la utilizaron para analizar las BSs de PLP. El dicroísmo circular ha constituido una excelente herramienta para el estudio del PLP y de sus BSs en entornos enzimáticos [BALK, 1981][CASELLA, 1983].

1.3 REACTIVIDAD DE LOS VITÁMEROS B₆

Como se ha explicado anteriormente, los vitámeros de la vitamina B₆, especialmente el PLP y el PMP, están implicados en un gran número de procesos catalíticos, por lo que su reactividad ha sido ampliamente estudiada en modelos *in vitro*. También se ha apuntado que la mayoría de estas reacciones catalíticas pasa por la formación de una BS entre el PLP y el sustrato aminoácido, lo que justifica el gran esfuerzo invertido en el estudio de este tipo de reacciones.

Dicha reacción se inicia mediante el ataque nucleófilo del grupo amino del aminoácido sobre el grupo 4-formilo del PLP formando un intermedio carbinolamina. Su deshidratación genera la aldimina final [FRENCH, 1965], proceso que constituye el paso limitante de la reacción [SAYER, 1980][SALVA, 2003B]. Jo et al. [JO, 1977] y Hershey et al. [HERSHEY, 1977] propusieron que las carbinolaminas también se formaban en entornos enzimáticos como intermedios de la transaminación (formación de la aldimina externa a partir de la aldimina interna) representada en el esquema 1.1. Sin embargo, esta hipótesis fue desechada al demostrarse la formación de un intermedio diamina geminal (1b en el esquema 1.1) [TOBIAS, 1975][FISCHER, 1980] mediante un mecanismo cuyo paso limitante es el ataque de la amina sustrato sobre la aldimina inicial [MÄKELÄ, 1983][SALVA, 2004].

La formación de BSs sobre los vitámeros aminados de la vitamina B₆ (PM y PMP) ha sido también tema de interés debido a su importancia en las reacciones de transaminación [METZLER, 1954]. La reacción, al igual que en el caso anterior, se inicia mediante el ataque nucleófilo del grupo amino, en este caso de la PM o PMP, sobre el grupo carbonilo de un cetoácido, formando una carbinolamina que también deshidrata para dar la cetoimina final [CHRISTEN, 1985].

Por otra parte, el hecho de que la PM pueda inhibir la modificación proteica mediante el secuestro de compuestos carbonílicos [VOZIYAN, 2005], ha motivado que los procesos de formación de BSs entre la PM y estos compuestos carbonílicos haya sido objeto de especial atención.

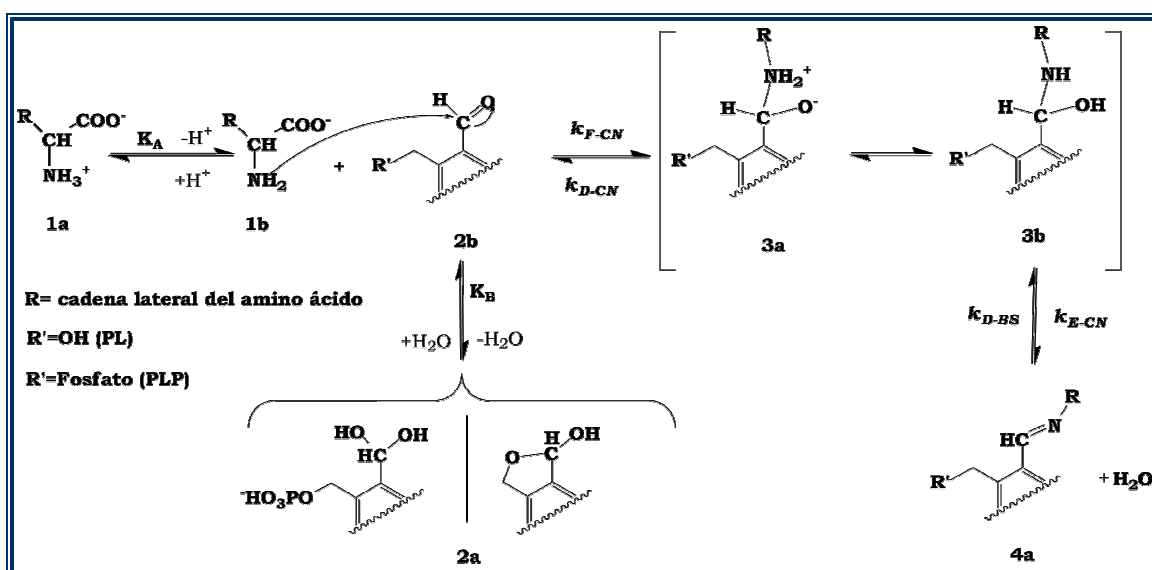
A pesar de su enorme interés, la formación de las BSs de la PM y del PMP ha sido poco estudiada, debido a dificultades experimentales y al escaso desplazamiento del equilibrio de formación [CHRISTEN, 1985][YUEN, 1985].

Por otro lado, hay que indicar que los vitámeros B₆ son capaces de actuar como agentes acomplejantes de iones metálicos gracias a la presencia del grupo fenolato en 3, del N(1), del sustituyente en 4 y del fosfato en 5' [LEUSSING, 1986]. El estudio de sus equilibrios de acomplejación ha suscitado especial interés ya que los iones metálicos catalizan la transaminación *in vitro* [GANSOW, 1969]. Por otra parte, Moorthy *et al.* [MOORTHY, 1975] y Voziyan *et al.* [VOZIYAN, 2005] demostraron que la formación de complejos con iones Fe³⁺ y Cu²⁺ es el mecanismo mediante el cual los vitámeros B₆ (PM, PLP y PN) inhiben la formación de RL y el estrés oxidativo (EO) que estos provocan.

Finalmente, debe señalarse que la enorme complejidad de los estados electrónicos de los vitámeros B₆ es la principal causa de que éstos sean fotosensibles. La absorción de radiación UV/Vis puede alterar las poblaciones electrónicas de las diferentes formas en el equilibrio, induciendo a la redistribución electrónica que concluye con fotoreacciones [MOROZOV, 1986].

1.3.1 FORMACIÓN DE BASES DE SCHIFF DE PIRIDOXAL (PL) Y DE 5'-FOSFATO DE PIRIDOXAL (PLP).

En el esquema 1.6 se muestra el equilibrio de formación de las BSs de PL o PLP con aminoácidos. La adición nucleófila del grupo amino libre (1b) sobre el grupo aldehídico del PL o del PLP (2b) conduce a la formación de una especie zwitteriónica (3a) que tautomeriza formando la carbinolamina (3b). La deshidratación de la carbinolamina conduce a la formación final de la BS aldimínica (4a) [LEUSSING, 1986].



Esquema 1.6. Mecanismo de formación de BSs de PL o de PLP con aminoácidos.

➤ **Carbinolamina.** *Hershey y Leussing [HERSHEY, 1977]* estudiaron la cinética de formación de la carbinolamina producida en la reacción entre la Ala y el PLP. La constante de formación de la carbinolamina (k_{F-CN}) es similar para todas las formas aniónicas del PLP y presenta un valor de $2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{h}^{-1}$, mientras que para la forma H₃PLP el valor se incrementa hasta $4 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{h}^{-1}$. En cambio, la constante de disociación de la carbinolamina (k_{D-CN}) no depende de la especie iónica del PLP ($2 \cdot 10^9 \text{ h}^{-1}$). *Hershey y Leussing [HERSHEY, 1977]* demostraron también que los metales divalentes como el Cu²⁺ catalizan la formación de la carbinolamina, ya que su presencia incrementa entre 3 y 50 veces el valor de k_{F-CN} . A su vez demostraron que dichos iones inhiben la deshidratación de la especie 3b, disminuyendo el valor de k_{E-CN} desde $1 \cdot 10^5 \text{ h}^{-1}$ (en ausencia de ión) hasta 3.6 h^{-1} (en presencia de ión) [HERSHEY, 1977]. Este hecho justifica los resultados de *Farrago y Matthews [FARRAGO, 1969]* que muestran un incremento notable en la concentración de carbinolamina en mezclas de reacción que incluyen iones metálicos.

➤ **Aldimina.** La deshidratación de la carbinolamina conduce a la formación final de la BS. Los estudios de *Hershey y Leussing [HERSHEY, 1977]* mostraron que el valor de k_{E-CN} es cuatro órdenes de magnitud inferior al valor de k_{D-CN} a pH neutro, reduciéndose dicha diferencia a dos órdenes en condiciones ácidas, ya que se favorece la protonación de la carbinolamina. Por otra parte, hay que señalar que los valores de k_{E-CN} para el PLP y sus análogos con un grupo fenolato en posición *o*- son mayores que los determinados para otros aldehídos, ya que la presencia de dicho grupo es capaz de estabilizar el ión iminium formado [LEUSSING, 1986]. *Hershey y Leussing [HERSHEY, 1977]* determinaron, en condiciones ácidas, que la constante de degradación de la BS (k_{D-BS}) para formar la carbinolamina correspondiente presenta un valor de 18 h^{-1} , el cual se incrementa con el pH.

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. Se ha observado que los valores de k_{F-BS} aumentan con la protonación de la forma iónica reactiva del PLP, desde valores entorno a $2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{h}^{-1}$ para el PLP³⁻ hasta valores del orden de $3 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{h}^{-1}$ para el H₃PLP [SÁNCHEZ-RUIZ, 1982][WENG, 1983][VÁZQUEZ, 1988][VÁZQUEZ, 1989][VÁZQUEZ, 1990][VÁZQUEZ, 1992A][VÁZQUEZ, 1992B][VÁZQUEZ, 1992C] [ECHEVARRÍA, 2005]. Este comportamiento también se presenta en el PL y se interpreta como el

efecto de la catálisis intramolecular ácida general para la deshidratación de la carbinolamina [AULD, 1973].

Por otra parte, los valores obtenidos de las constantes de hidrólisis no muestran una clara correlación con el estado de protonación de la BS y se presentan en el intervalo desde 36 hasta 360 h⁻¹, mostrando sus valores más pequeños a pH en el rango entre 8 y 9 [SÁNCHEZ-RUIZ, 1982][WENG, 1983][VÁZQUEZ, 1988][VÁZQUEZ, 1989][VÁZQUEZ, 1990][VÁZQUEZ, 1992A][VÁZQUEZ, 1992B][VÁZQUEZ, 1992C][ECHEVARRÍA, 2005].

En los trabajos citados anteriormente y en otros estudios, se han determinado las constantes de equilibrio de formación de dichas BSs ($K_{BS}=k_{F-Bs}/k_{H-Bs}$). Los resultados muestran que las BSs incrementan su estabilidad a medida que se aumenta el pH, hasta valores entre 8.5-9. Por encima y por debajo de dicho intervalo se favorece su hidrólisis alcalina y ácida. A pH básico K_{BS} presenta un valor del orden de $5 \cdot 10^2$ M⁻¹, mientras que en el intervalo citado, donde el HPLP²⁻ es la forma iónica predominante, K_{BS} toma un valor del orden de 10^4 M⁻¹ [METZLER, 1957][NAGANO, 1967][MURAKAMI, 1973][METZLER, 1980][SÁNCHEZ-RUIZ, 1982][WENG, 1983][CHRISTEN, 1985][VÁZQUEZ, 1988][VÁZQUEZ, 1989][VÁZQUEZ, 1990][VÁZQUEZ, 1992A][VÁZQUEZ, 1992B][VÁZQUEZ, 1992C][ECHEVARRÍA, 2005].

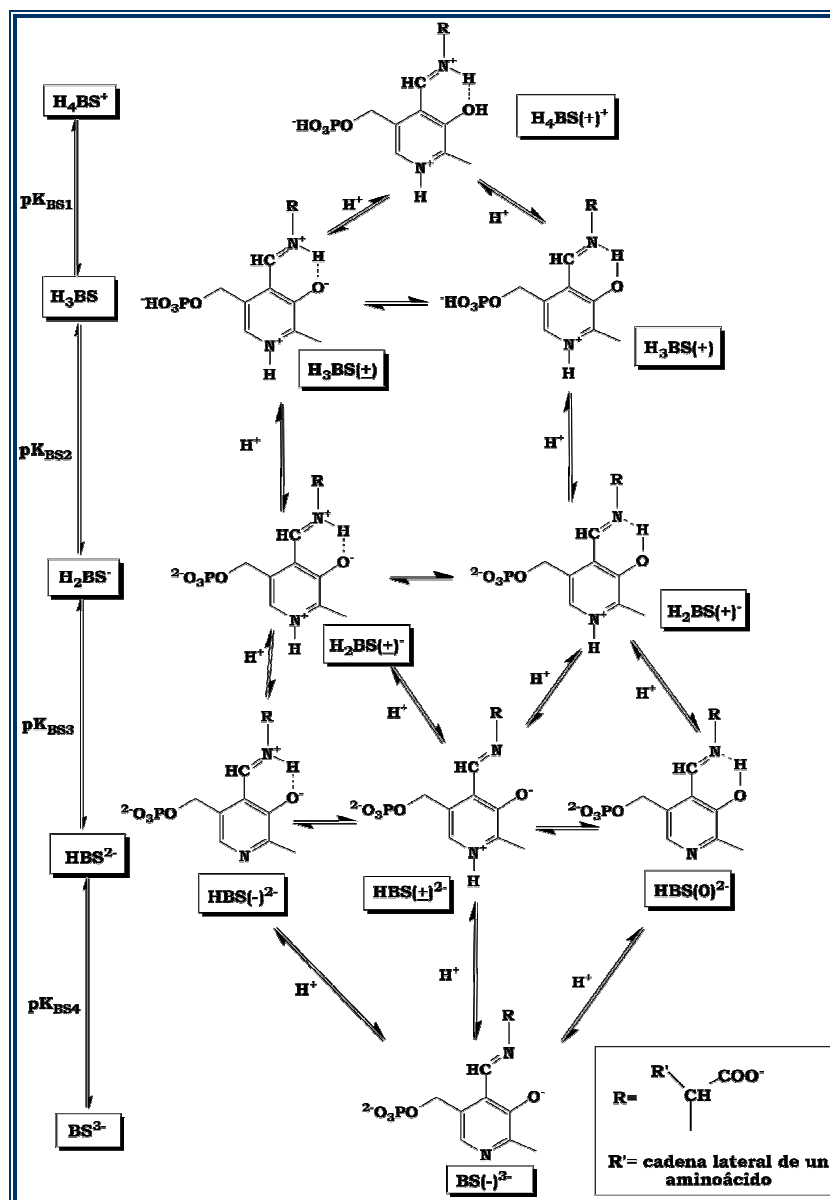
Los estudios de *García del Vado et al.* [GARCÍA DEL VADO, 1987] y de *Echevarría et al.* [ECHEVARRÍA, 2005] indican que la energía de activación (E_a) del proceso de formación de BSs (k_{F-Bs}) depende de la carga negativa neta del PLP reactivo, mostrando valores entre 1 y 13 kcal/mol. Por el contrario, la E_a del proceso de hidrólisis (k_{H-Bs}) no muestra ninguna relación concluyente con el estado de protonación de la BS y presenta valores entre 2 y 16 kcal/mol [GARCÍA DEL VADO, 1987][ECHEVARRÍA, 2005].

La variación de la polaridad del medio ha demostrado que tanto la formación como la hidrólisis de BSs está favorecida con su aumento [GARCÍA DEL VADO, 1988]. Por otro lado, *Vázquez et al.* [VÁZQUEZ, 1992D] demostraron que los grupos hidrófobos y no polares próximos a la imina previenen su hidrólisis, ya que mantienen alejadas las moléculas de agua que inducen a ella.

La adición de iones metálicos como el Zn²⁺ o el Cu²⁺ incrementa 10 y 10⁶ veces respectivamente el valor de k_{F-Bs} en la reacción entre el PLP³⁻ y la Ala, siendo dicho efecto menos acusado para otras formas iónicas, como el HPLP²⁻ o el H₂PLP⁻ [LEUSSING, 1986].

En el esquema 1.7 se muestran los equilibrios iónicos y tautoméricos de las BSs formadas entre el PLP y aminoácidos. En el caso del PL los equilibrios

son análogos. Se han determinado las constantes de ionización de las BS derivadas del PLP con diferentes aminoácidos. Los resultados obtenidos muestran que la cadena lateral no afecta al valor de las constantes de ionización. Los valores de pKa aproximados son: $pK_{BS1} \approx 3$, $pK_{BS2} \approx 5.5$, $pK_{BS3} \approx 6.5$ y $pK_{BS4} \approx 11.5$ [SÁNCHEZ-RUIZ, 1982][VÁZQUEZ, 1988][VÁZQUEZ, 1989][VÁZQUEZ, 1990][VÁZQUEZ, 1992A][VÁZQUEZ, 1992B][VÁZQUEZ, 1992C][ECHEVARRÍA, 2005].



Esquema 1.7. Especies iónicas y tautoméricas de las BS formadas entre el PLP y el grupo α -amino de un aminoácido.

Las formas tautoméricas de las BS del PLP y del PLP que presentan el grupo fenolato desprotonado están en resonancia con su cetoenamina, formada por la conjugación de la imina con el anillo piridínico. En disolución acuosa se favorece la formación de la cetoenamina mientras que los disolventes no polares estabilizan la forma enolimínica [HEINERT, 1963A].

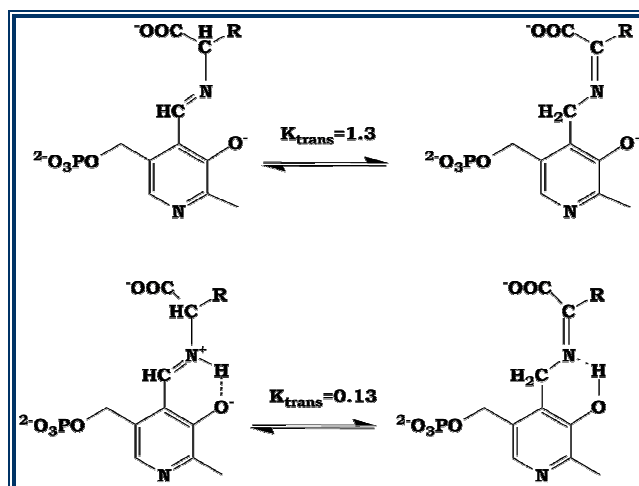
1.3.2 FORMACIÓN DE BASES DE SCHIFF DE PIRIDOXAMINA (PM) Y DE 5'-FOSFATO DE PIRIDOXAMINA (PMP).

Las BSs formadas entre el PLP y aminoácidos presentan conjugación de sus sistemas π -electrónicos imínicos y piridínicos. Este hecho proporciona una importante estabilidad a la molécula formada, a la vez que produce un considerable cambio en el espectro de absorción UV/Vis con respecto al de los reactivos. Ninguno de estos dos factores se presenta en las BSs de PMP o de PM con compuestos carbonílicos. El enlace imina queda separado del anillo piridínico por un grupo metileno que impide la deslocalización π -electrónica y en consecuencia, el espectro electrónico se ve muy poco alterado con respecto al del PMP o al de la PM. Este hecho ha supuesto una importante dificultad metodológica en el estudio de las BSs de PMP y de PM, por lo que actualmente se dispone de pocos datos al respecto [YUEN, 1985][CHRISTEN, 1985].

Los estudios de *Matsushima* y *Martell* [MATSUSHIMA, 1967] sobre la estabilidad de las BSs de PM, mostraron que los iones metálicos divalentes catalizan su formación e incrementan su estabilidad. Años más tarde, *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 (12.6 M^{-1}). Posteriormente, *Kubala* y *Martell* [KUBALA, 1983] estudiaron el efecto del pH sobre las constantes de equilibrio de formación de BSs de la PM con cetoácidos. Se observó que el pH óptimo para la formación de la cetoimina resultante está en torno a 9, donde los valores de las constantes de equilibrio varían, en función del cetoácido estudiado, entre 7 y 11 M^{-1} .

Las limitaciones del sistema no han permitido la ampliación de estos trabajos, ni la determinación de sus constantes cinéticas. Sin embargo, la adición de iones metálicos y el uso de condiciones no fisiológicas sí ha permitido la determinación de parámetros termodinámicos [MATSUSHIMA, 1967][FELTY, 1974][ZIMMERMAN, 1983][TACHIBANA, 1983].

Yuen [YUEN, 1985], en base a los resultados obtenidos por *Felty* [FELTY, 1974], propuso en su tesis doctoral que los equilibrios isoméricos entre la cetoimina formada sobre el PMP y la aldimina formada como producto de su isomerización (equilibrio mostrado en el esquema 1.8), dependían de sus estados de protonación. Si la BS se encuentra desprotonada el equilibrio se desplaza hacia la cetoimina, mientras que si presenta la forma monoprotonada el equilibrio se desplaza hacia la aldimina.



Esquema 1.8. Equilibrios de isomerización entre la aldimina y su cetoimina.

1.3.3 FORMACIÓN DE COMPLEJOS CON IONES METÁLICOS.

Los vitámeros B₆ y sus BSs son capaces de formar complejos con iones metálicos mediante el nitrógeno imínico, el fenolato, el sustituyente en posición 4 y en el caso de las BSs de PLP, mediante su carboxilato [DOLPHIN, 1986]. La formación de dichos complejos cataliza los procesos de desfosforilación [MOHAN, 1979], desaldolación, β-eliminación o descarboxilación [TATSUMOTO, 1981]. En sistemas *in vivo* su efecto acomplejante de iones Cu²⁺ o Fe³⁺, representa un sistema de protección contra el EO [MOORTHY, 1975][VOZIYAN, 2005].

Harruff *et al.* [HARRUFF, 1976] y Viswanathan *et al.* [VISWANATHAN, 1979][VISWANATHAN, 1980] demostraron que el PLP se coordina mediante sus grupos fosfato, fenolato y formilo a metales divalentes (Co²⁺ o Mn²⁺) con índice de coordinación 1:1. Leussing [LEUSSING, 1986] propuso que la posición del metal en la coordinación depende de la forma iónica del PLP. Mientras que el PLP³⁻ utiliza como ligandos sus grupos fenolato y formilo, las formas HPLP²⁻ o H₂PLP⁻ acomplejan mediante sus grupos formilo y fosfato, tal y como se muestra en la figura 1.5(A). El PL, al igual que el PLP³⁻, utiliza para la acomplejación sus grupos formilo y fenolato (figura 1.5(B)).

Los trabajos de Thompson *et al.* [THOMPSON, 1980] y Franklin *et al.* [FRANKLIN, 1980] demostraron que tanto la PM como el PMP forman complejos con metales divalentes (Zn²⁺ y Cu²⁺) con índice de coordinación 2:1, siendo sus grupos fenolato en 3 y amino en 4' los sitios de coordinación (figura 1.5(C)).

Las BSs del PLP muestran una elevada afinidad hacia los cationes de bajo poder de polarización. Se unen a iones metálicos con índice de coordinación 1:1 en complejos de Cu²⁺, tal y como se muestra en la figura

1.5(D). En cambio, presentan índice de coordinación 2:1 en complejos de Ni²⁺, Fe³⁺ [HEINERT, 1963B], Mn²⁺, Zn²⁺ [CHRISTEN, 1985] y Al³⁺ [ABBOTT, 1970].

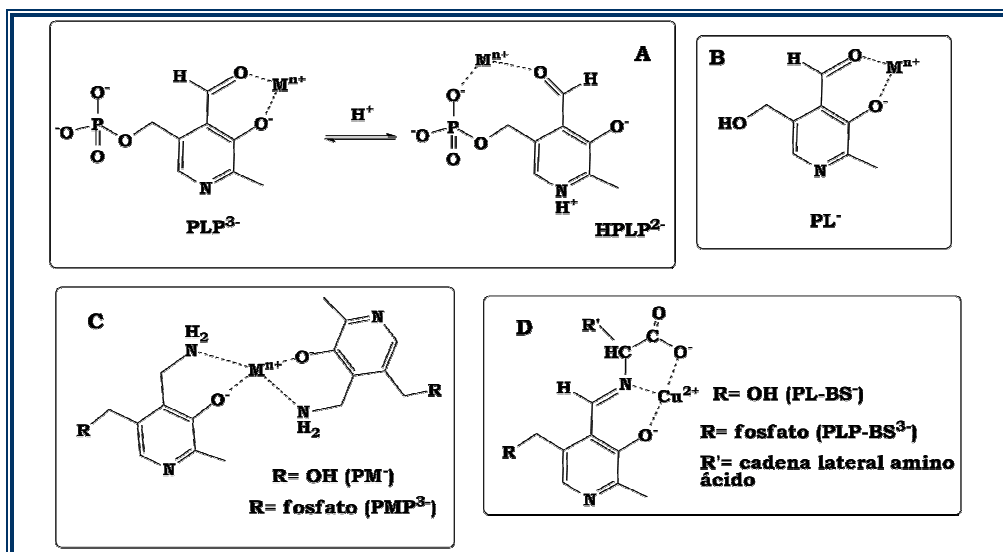


Figura 1.5. (A) Complejos metálicos del PLP; (B) Complejos metálicos del PL; (C) Complejos metálicos de la PM y PMP; (D) Complejos de las BSs del PL o PLP con Cu²⁺.

Se han determinado las constantes de equilibrio de acomplejación de diferentes formas iónicas de la PM, el PMP, el PL, el PLP y de BSs de PL y de PLP con Cu²⁺, Zn²⁺ y Ni²⁺. Los complejos de PM y PMP son los que presentan mayor estabilidad, seguidos de los de BSs de PLP y PL, mientras que los complejos de PL son los menos estables [GUSTAFSON, 1957][DAVIS, 1961][LEUSSING, 1966][FELTY, 1970][FELTY, 1974][WENG, 1983][LEUSSING, 1986].

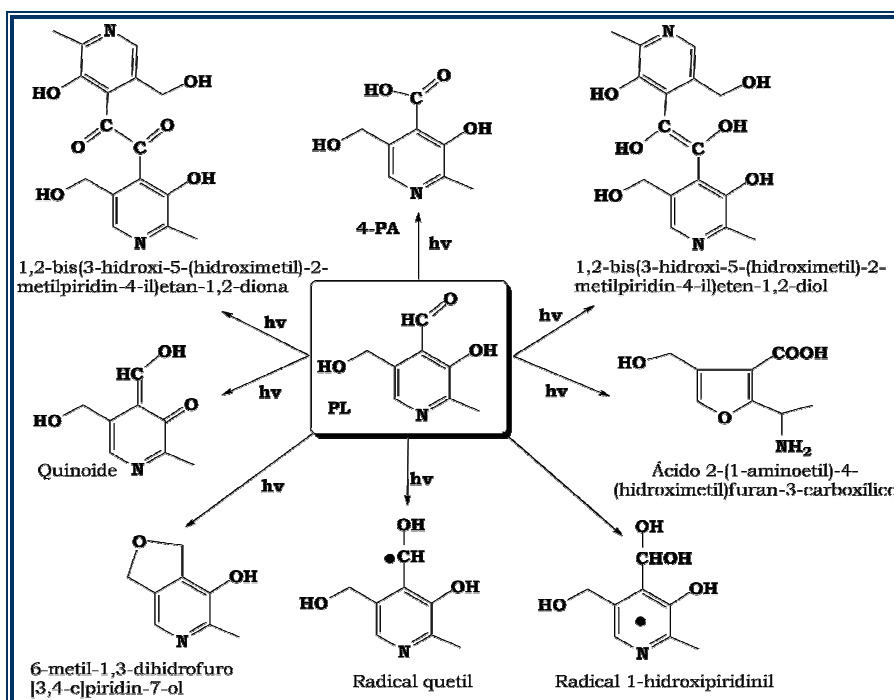
1.3.4 REACCIONES FOTOINDUCIDAS.

Numerosos trabajos demuestran que la radiación UV/Vis es capaz de provocar reacciones fotoinducidas y fototautomería sobre compuestos aromáticos y derivados piridínicos [TAKEDA, 2004][GEREGA, 2006][FRUTOS, 2007]. Sin embargo, hasta la fecha, no se ha demostrado la modificación de los equilibrios tautoméricos en vitámeros B₆ inducida por radiación, aunque si se ha comprobado que pueden sufrir fotoreacciones.

Morozov *et al.* [MOROZOV, 1982][MOROZOV, 1986] 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. Sus resultados demostraron que, en los estados excitados, el N(1) piridínico y el C(6) incrementan notablemente su densidad electrónica con respecto al estado fundamental, mientras que el grupo fenolato la disminuye. Morozov [MOROZOV, 1986] también demostró la importancia del reordenamiento electrónico sobre el

C(6) en las fotoreacciones, hasta tal punto que su metilación las inhibe completamente. *Reiber* [REIBER, 1972] mostró que otro de los factores importantes en estos procesos es la presencia de oxígeno en disolución, hasta el punto de no ser posible la detección de fotoproductos en disoluciones de vitámeros B₆ desoxigenadas [BAZHULINA, 1974B]. Las observaciones realizadas por *Morozov* explican la formación fotoinducida de dímeros y de epoxi-derivados entre el N(1) y el C(6), los cuales han sido detectados experimentalmente [PFORDTE, 1961A][PFORDTE, 1961B].

El carbono aldehídico en 4' del PL y PLP disminuye su densidad electrónica en el estado excitado, constituyendo otro centro fotoreactivo. Prueba de ello es su oxidación a 4-PA [REIBER, 1972], la formación de dímeros [MORRISON, 1958], de especies quinoides [HEINERT, 1959] y de otros productos representados en el esquema 1.9, así como de RL [LEDBETTER, 1998].



Esquema 1.9. Compuestos formados como consecuencia de las fotoreacciones del PL.

Hasta la fecha no se han descrito los productos derivados de las fotoreacciones de la PM. Sin embargo, *Bueno y Encinas* [BUENO, 2003] demostraron que en el estado excitado su grupo fenolato incrementa su acidez, mientras que el N(1) piridínico incrementa su basicidad. Por otra parte, se ha visto que la radiación UV produce isomerización de la PN y la formación de oligómeros [BROUSMICHE, 1998][HARUO, 1999]. Las fotoreacciones de las BSs del PLP son similares a las del PLP [BAZHULINA, 1974C], observándose de manera adicional fotodescarboxilación [KURAUCHI, 1983].

ANTECEDENTES

GLICACIÓN PROTEICA (GP)

2.1 INTRODUCCIÓN

La reacción entre azúcares y grupos amino proteicos fue señalada por *Ling y Malting* [LING, 1908] en 1908, como la responsable del cambio de color observado durante la cocción de alimentos. Dicha hipótesis fue confirmada en 1912, a raíz del estudio realizado por *Maillard* [MAILLARD, 1912] en el que analizó la reacción de diferentes aminoácidos con la glucosa. Posteriormente, en 1929, *Amadori* [AMADORI, 1929] demostró que la incubación de glucosa con aminas aromáticas formaba un compuesto de elevada estabilidad, que identificó como una BS. *Kuhn y Weygand* [KUHN, 1937] estudiaron dicho compuesto y observaron que su hidrólisis ácida no se correspondía a la de una BS. Su caracterización reveló que era la 1-amino-1-desoxi-2-cetosa o producto de Amadori (AP). En 1953, *Hodge* [HODGE, 1953] describió los pasos de la reacción de Maillard proponiendo que ésta se inicia mediante la formación de una BS, cuya evolución mediante la transposición de Amadori genera el AP, el cual degrada dando lugar a los productos finales de la reacción de Maillard.

En 1968, *Rahbar* [RAHBAR, 1968] descubrió una variante anormal de la hemoglobina, sobreexpresada en plasma de personas con diabetes mellitus (DM)*. Su caracterización demostró que se generaba debido a la formación de APs sobre los residuos Lys de la hemoglobina [KOENIG, 1975], conociéndose actualmente como hemoglobina glicada (HbA1c). El descubrimiento de la HbA1c llevó a considerar la posible relevancia fisiopatológica de la reacción de Maillard *in vivo*, proceso conocido en la actualidad como glicación proteica (GP).

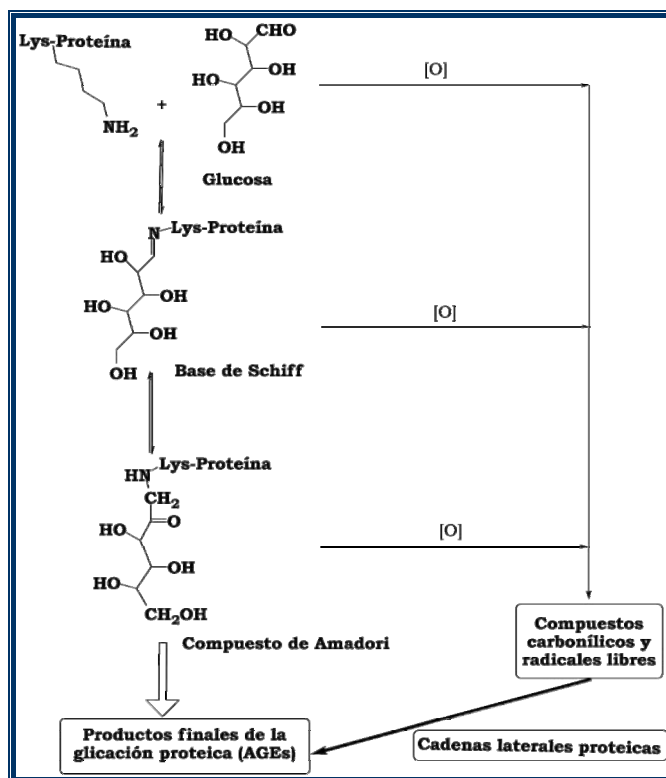
En el esquema 1.10 se muestra el mecanismo general de la GP, que se

*La DM, patología caracterizada por la acción defectuosa de la insulina, provoca el aumento de los niveles de glucosa en plasma (hiperglucemia). Existen dos tipos de DM, el tipo 1 caracterizado por la destrucción de las células- β del páncreas productoras de insulina y el tipo 2, causada por una síntesis defectuosa de insulina [ALBERTI, 1998]. En cualquier caso, ambos tipos provocan *hiperglucemia* que aumenta la absorción de Na^+ provocando *hipertensión arterial* [WEIDMANN, 1991] y modifica la composición y distribución de las partículas lipídicas induciendo la *dislipidemia diabética* [MALMSTROM, 1997]. Estos tres factores conducen al desarrollo de las patologías asociadas a la DM, entre las que destaca la *retinopatía* [PALMBERG, 1981], la *neuropatía* [CABEZAS-CERRATO, 1998] y la *nefropatía diabética* [CORDONNIER, 1993], *enfermedades cardiovasculares* [LAARSO, 1999] y *vasculares periféricas* [SCHAPER, 2000] y *enfermedades cerebrales* [LACKLAND, 1997]. La hiperglucemia es el factor causante del daño tisular y los mecanismos que inducen a ello pueden darse tanto a nivel metabólico como a nivel estructural. Altera la *vía de los polioles* provocando la sobreexpresión de la *aldosa reductasa*, que a su vez aumenta el EO y la producción de diacilglicerol [LEE, 1999A]. El incremento de diacilglicerol provoca sobreactivación de la *proteína quinasa-C* [KOYA, 1998], hecho que aumenta la actividad endotelial provocando daño vascular [KUBOKI, 2000]. La glucosa y los productos de su degradación reaccionan con las proteínas de baja velocidad de recambio, proceso conocido como GP [ULRICH, 2001], provocando deterioro estructural [SHINOHARA, 1998], rigidez tisular [DYER, 1993], activación de la producción de RL [BASTA, 2008] y disfunción en la señalización celular [BROWNLEE, 2001].

CAPÍTULO 1. GLICACIÓN PROTEICA (GP)

inicia con la condensación de la forma acíclica de la glucosa con los grupos ϵ -amina de las cadenas laterales de las Lys proteicas. Producto de dicha reacción se forma una BS de naturaleza glúcida. El grupo hidroxilo en el carbono adyacente a la imina posibilita el reordenamiento de Amadori y la formación del AP. El AP evoluciona mediante un conjunto complejo de reacciones, que concluyen con la generación de una familia heterogénea de compuestos, conocidos como los productos finales de la glicación (AGEs). Sin embargo, la verdadera importancia de la GP recae sobre las reacciones colaterales de oxidación de la glucosa y especialmente de las BSs y de los APs. Dichas oxidaciones producen RL y compuestos carbonílicos y dicarbonílicos altamente reactivos (RCS). Los RL y los RCS pueden actuar sobre las cadenas laterales de un amplio grupo de aminoácidos, contribuyendo también a la formación de AGEs y ampliando aún más el daño estructural provocado por la GP [LEDL, 1990][BRINKMANN, 1998][ULRICH, 2001][RAHBAR, 2002][MONNIER, 2003].

En 1984, Bucala et al. [BUCALA, 1984] demostraron que la acción de los RCS y de los RL generados durante la GP, no sólo se limitaba a las cadenas laterales proteicas, si no que podía darse también sobre el ADN. La descripción de las dianas biológicas de acción de los RCS y RL se amplió en 1993, cuando se demostró su acción sobre los aminofosfolípidos que forman las membranas celulares [BUCALA, 1993].

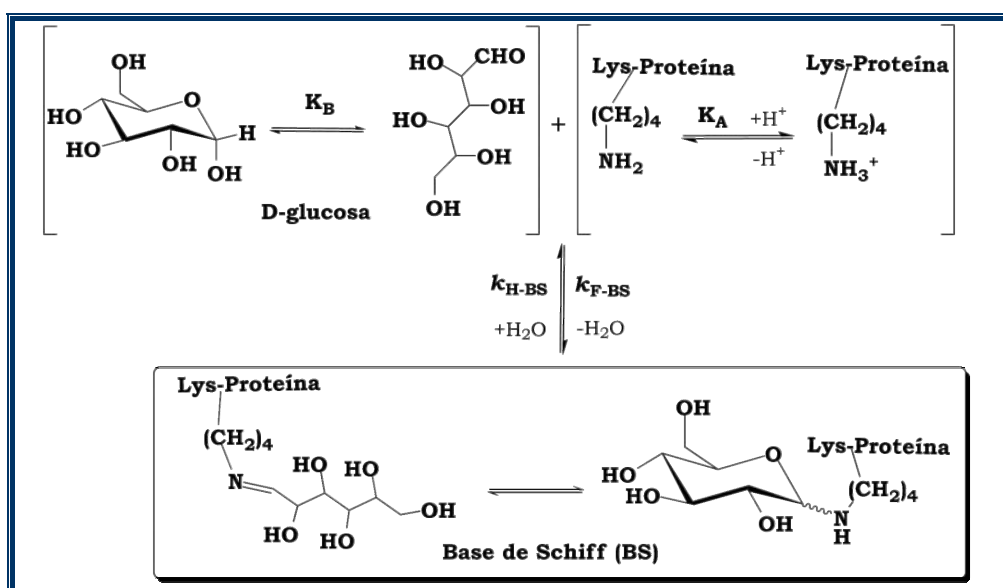


Esquema 1.10. Mecanismo general de la glicación proteica (GP).

2.2 BASES DE SCHIFF GLÚCIDAS (GLUCOSAMINAS).

2.2.1 FORMACIÓN.

La reacción del grupo ϵ -amina de las cadenas laterales de las Lys proteicas con la forma lineal de la glucosa conduce a la formación reversible de una BS. *Irvine y Earl [IRVINE, 1922]* demostraron que las BSs de naturaleza glúcida presentan equilibrio isomérico con su glucosamina, tal y como se muestra en el esquema 1.11. La glucosamina formada presenta a su vez equilibrios de mutarrotación entre sus formas α - y β -piranosa [*IRVINE, 1922*], siendo la forma α -piranosa la predominante en disolución acuosa [*SKELLEY, 2006*].



Esquema 1.11. Mecanismo de formación de una BS entre la cadena lateral de una Lys y la glucosa. Equilibrio de isomerización de la BS formada.

A pesar de que el conocimiento exacto de la cinética de reacción entre la glucosa y grupos amino proteicos ha de resultar de suma importancia para la correcta comprensión del mecanismo global de la GP [*BAISIER, 1992*], actualmente son escasos los trabajos con datos cuantitativos referentes a las constantes cinéticas de formación de las glucosaminas resultantes (k_{F-BS}).

Hasta la fecha, no se han publicado trabajos en los que se haya determinado la constante microscópica de su formación. Los valores de k_{F-BS} determinados no consideran el equilibrio iónico del grupo amino (K_A para el grupo ϵ -amina en el esquema 1.11) ni el equilibrio entre la forma lineal de la glucosa y sus formas cicladas (K_B en el esquema 1.11), por lo que muestran una importante variación en función de las condiciones de reacción.

En condiciones fisiológicas, las glucosaminas formadas sobre el grupo

α -amina de los aminoácidos presentan una constante de formación del orden de $3 \cdot 10^{-4} \text{ M}^{-1}\text{h}^{-1}$ [BAISIER, 1992][GE, 1997]. En cambio, el valor de $k_{\text{F-BS}}$ se sitúa en el orden de $3 \cdot 10^{-2} \text{ M}^{-1}\text{h}^{-1}$ cuando el nucleófilo es el grupo ϵ -amina de la Lys [SHAPIRO, 1980][BAYNES, 1984][WATKINS, 1985]. El estudio de la reacción entre el grupo ϵ -amina de la Lys con la glucosa permitió también la determinación de la constante de hidrólisis de la glucosamina, siendo $k_{\text{H-BS}} \approx 1 \cdot 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ (en condiciones fisiológicas) [SHAPIRO, 1980][BAYNES, 1984][WATKINS, 1985]. Estos resultados confirman las observaciones de Van Boekel [VAN BOEKEL, 2001], el cual demostró que los valores de $k_{\text{F-BS}}$ son tres veces superiores a los valores de $k_{\text{H-BS}}$. El conocimiento de los valores de $k_{\text{F-BS}}$ y $k_{\text{H-BS}}$ permitió el cálculo de la constante de equilibrio de formación de dichas glucosaminas ($K_{\text{BS}} = k_{\text{F-BS}}/k_{\text{H-BS}}$), la cual presenta valores entre 1.5 y 4 M^{-1} a pH neutro [SHAPIRO, 1980][BAYNES, 1984][WATKINS, 1985].

La formación de las glucosaminas ha sido estudiada también a elevada temperatura, con el fin de conocer los procesos cinéticos que se producen durante la cocción de los alimentos. En estas condiciones ($\approx 100 \text{ }^\circ\text{C}$), su constante de formación presenta valores en el intervalo entre 0.36 y 3.6 $\text{M}^{-1}\text{h}^{-1}$ [VERNIN, 1992][YAYLAYAN, 1992].

La cinética de formación de las glucosaminas está fuertemente afectada por las condiciones del medio. Watkins *et al.* [WATKINS, 1987] y Huang *et al.* [HUANG, 2001] demostraron que los aniones poliatómicos (como fosfato y/o carbonato) catalizan la formación de las glucosaminas en sistemas modelo y en proteínas. Los trabajos de Yaylayan *et al.* [YAYLAYAN, 1993] demuestran que los carbohidratos incrementan su proporción de especie lineal con el pH. Este hecho, unido al desplazamiento del equilibrio de ionización de la amina, hace que el pH sea clave en la cinética de formación de las glucosaminas. Martins y Van Boekel [MARTINS, 2005A] estudiaron la variación de $k_{\text{F-BS}}$ con el pH y encontraron la existencia de una relación lineal entre el pH y el valor de $k_{\text{F-BS}}$: $\log k_{\text{F-BS}} = (0.5 \cdot \text{pH}) - 10$. Labuza y Saltmarch [LABUZA, 1981][LABUZA, 1992] estudiaron también la variación de la temperatura sobre los valores de $k_{\text{F-BS}}$, determinando que el proceso de formación de las glucosaminas presenta una E_a entre 20 y 25 kcal/mol a pH neutro.

2.2.2 DEGRADACIÓN.

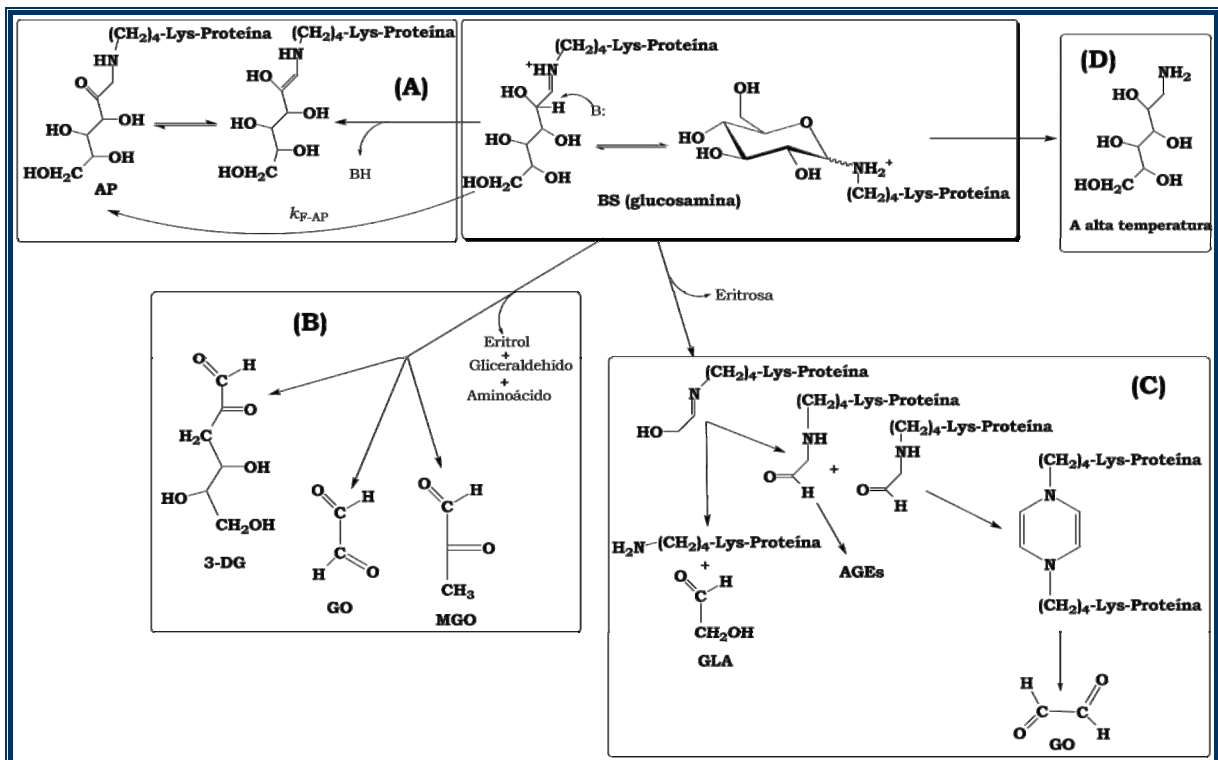
En el esquema 1.12 se muestran los diferentes mecanismos de degradación de la glucosamina formada sobre el grupo ϵ -amina de una Lys

CAPÍTULO 1. GLICACIÓN PROTEICA (GP)

proteica. La presencia de un grupo hidroxilo en el carbono adyacente al grupo imina permite su reordenamiento hacia la formación del AP (camino (A) en esquema 1.12) mediante un mecanismo que será tratado con mayor detalle en el punto 2.3.1 de este capítulo. Además, *Thornalley et al.* [THORNALLEY, 1999A] demostraron que esta BS puede oxidarse y formar glioxal (GO), metilglioxal (MGO) y 3-desoxiglucosona (3-DG) (camino (B) en esquema 1.12). Por otra parte, *Hayashi y Namiki* [HAYASHI, 1980] demostraron que las glucosaminas pueden sufrir condensación retroaldólica liberando eritrosa y generando una nueva BS entre el glicolaldehído (GLA) y el grupo ε-amina de las Lys, reacción conocida como el *camino de Namiki* (camino (C) en el esquema 1.12). Esta nueva BS puede hidrolizar liberando GLA, evolucionar dando una aminoaldosa que termina formando AGEs, o condensar con otra análoga a ella dando pirazina que oxida hacia GO [HAYASHI, 1980].

Yaylayan y Wnorowski [YAYLAYAN, 2002] demostraron que a elevada temperatura, las BSs pueden isomerizar, reemplazando el grupo metilamina del aminoácido por un carbonilo y transformando la glucosa en una aminoaldosa (camino (D) en el esquema 1.12).

Finalmente, hay que señalar que *Mullarkey et al.* [MULLARKEY, 1990] mostraron que producto de la oxidación de las glucosaminas se formaban radicales $O_2^{\cdot-}$.



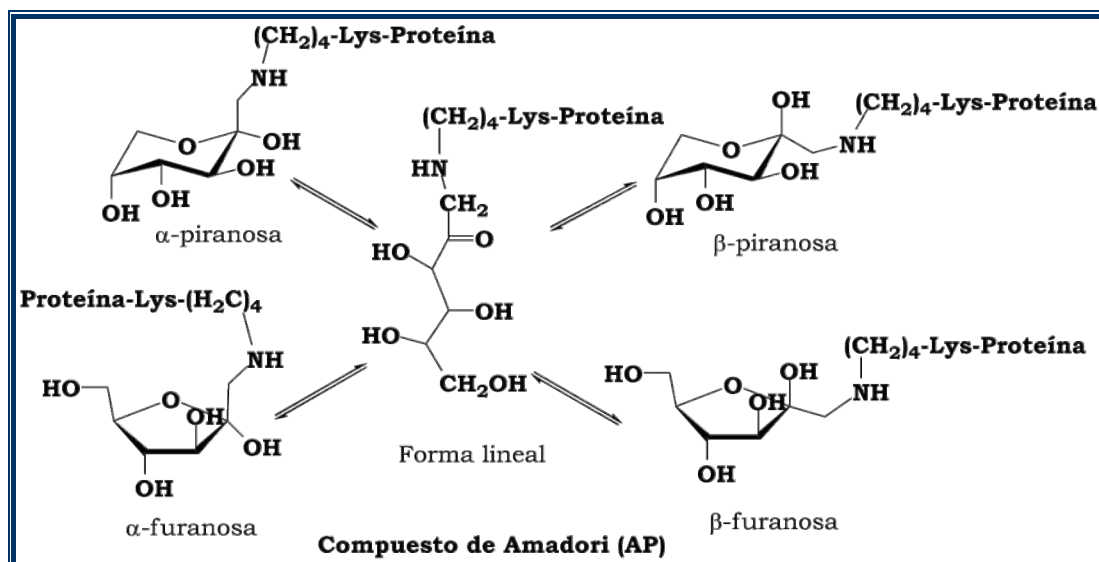
Esquema 1.12. Mecanismos de degradación de la glucosamina formada sobre la cadena lateral de una Lys.

2.3 COMPUESTOS DE AMADORI (AP).

2.3.1 FORMACIÓN.

En el esquema 1.12 (A) se muestra la formación del AP a partir de la glucosamina 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 [MUNANAI, 2007]. Una vez formado, el grupo amino de los APs puede adicionar otra aldosa formando un compuesto conocido como difructosamina (DAP) (figura 1.6), aunque éste no ha sido detectado *in vivo* [ARGIROV, 2004].

En el esquema 1.13 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, por lo que 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 1.13. Equilibrio de isomerización entre las diferentes formas de los APs.

Los DAP presentan equilibrios entre gran número de formas cíclicas, siendo la forma mayoritaria (>50 %) un compuesto espirobicíclico, mostrado en la figura 1.6 [MOSSINE, 1999].

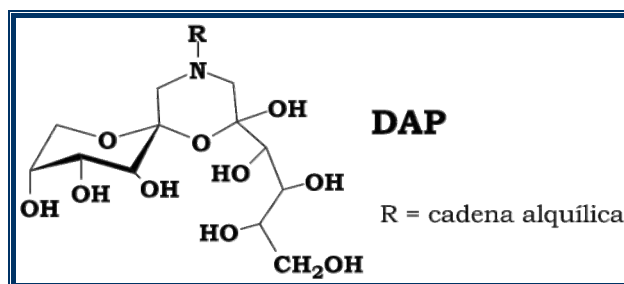


Figura 1.6. Estructura de la forma mayoritaria de los DAPs.

Smith y Thornalley [SMITH, 1992] sugirieron que el reordenamiento de Amadori es un proceso mucho más lento que el de formación de las glucosaminas y que por ello ha de ser considerado como el paso limitante de la GP, hipótesis que fue confirmada en los trabajos de Martins y Van Boekel [MARTINS, 2005B]. Se ha determinado que, en condiciones fisiológicas, la constante de formación del AP a partir de su glucosamina (k_{F-AP} en el esquema 1.12) tiene un valor del orden de 10^{-4} h^{-1} [VERNIN, 1992][GE, 1997], mientras que a 60°C los valores de k_{F-AP} están entre 0.1 y 1 h^{-1} [VERNIN, 1992]. Yaylayan y Huyghues-Despointes [YAYLAYAN, 1994] estudiaron el efecto de la temperatura sobre la cinética de reacción y determinaron que la E_a para este proceso está entre 8 y 22 kcal/mol. Los iones carboxilato [ISELL, 1958] y fosfato [RIZZI, 2004] catalizan el reordenamiento de Amadori, mientras que en un entorno proteico, los residuos Asp y Arg también catalizan esta reacción [VENKATRAMAN, 2001].

2.3.2 DEGRADACIÓN.

La concentración de APs en diabéticos ($\approx 140 \mu\text{M}$) se incrementa entre 2 y 3 veces con respecto a personas sanas [KATO, 1989], lo que se traduce en un aumento en los niveles de RCS formados como producto de su degradación.

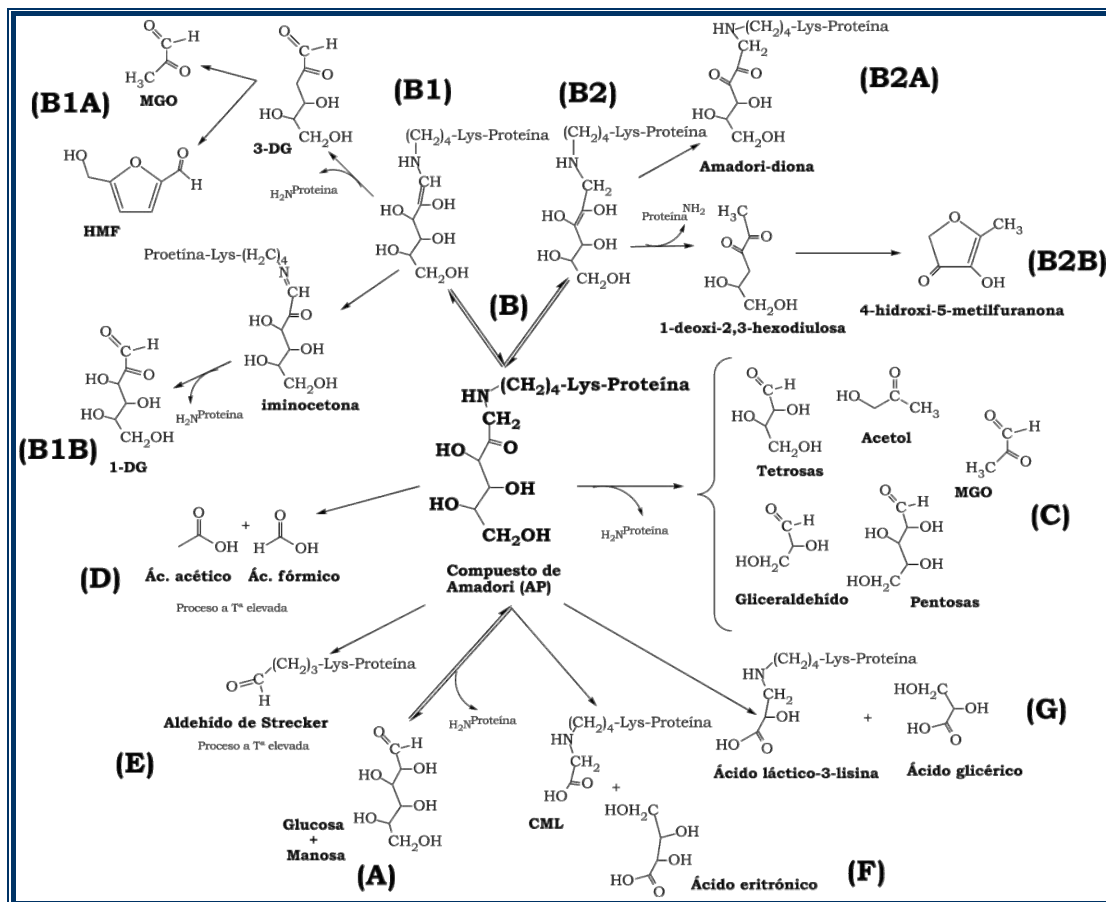
En el esquema 1.14 se muestran los mecanismos de degradación del AP. Aislado y en condiciones fisiológicas, la reacción inversa (A) con producción de glucosa, manosa (en una ratio 7:3) y el aminoácido correspondiente [DAVIDEK, 2002], es el camino principal [YAYLAYAN, 1994]. Los APs pueden sufrir reacciones de enolización y eliminación protónica (B). Si la eliminación se da entre C(1)-C(2) (B1) se forma la 3-DG, que evoluciona formando MGO o hidroximetilfurfural (HMF)(B1A), o una iminocetona que se degrada formando desoxiglucosona (1-DG)(B1B). Si la eliminación se da entre C(2)-C(3) (B2) se forma una Amadori-diona (B2A) o una 1-desoxi-2,3-hexodiulosa que evoluciona formando la 4-hidroxi-5-metilfuranona (B2B). La enolización C(1)-C(2) se favorece a pH ácidos-neutros, mientras que la C(2)-

CAPÍTULO 1. GLICACIÓN PROTEICA (GP)

C(3) se da a pH básicos [YAYLAYAN, 1994]. Los APs pueden sufrir también reacciones retroaldólicas produciendo acetol, MGO, además de gliceraldehído, pentosas y tetrosas (C) [YAYLAYAN, 1994][ZYZAK, 1995][DAVIDEK, 2002]. A elevada temperatura los APs se degradan formando los ácidos acético y fórmico (D) [DAVIDEK, 2002] además de sufrir degradación de Strecker (E) [YAYLAYAN, 2003]. Los iones metálicos catalizan la rotura oxidativa del enlace C(2)-C(3), produciendo en condiciones fisiológicas, *N*- ϵ -carboximetil-lisina (CML) y ácido eritrónico (F), mientras que a pH ácido, los ácidos láctico-3-lisina y glicérico (G) [AHMED, 1988].

Mossine et al. [MOSSINE, 1999] demostraron que la degradación de los APs y DAPs produce $O_2^{\cdot-}$, proceso que presenta una constante cinética entre $1 \cdot 10^{-3}$ y $40 \cdot 10^{-3} h^{-1}$ en condiciones fisiológicas [SMITH, 1992].

Zyzak et al. [ZYZAK, 1995] estudiaron la cinética de degradación de los APs a pH 7.4 y concluyeron que dependía de la $[HPO_4^{2-}]$ ($t_{1/2} = 12.6 + 51.19e^{-0.01[\text{fosfato (mM)]}$). También observaron que en presencia de aire, la constante de degradación de los APs aumenta unas 3 veces con respecto a atmósfera inerte [ZYZAK, 1995]. Por otro lado, Kawakishi et al. [KAWAKISHI, 1991] mostraron que los iones metálicos la incrementaban de manera lineal a su concentración, proceso favorecido por la capacidad acomplejante de los APs [TONKOVIC, 1996].

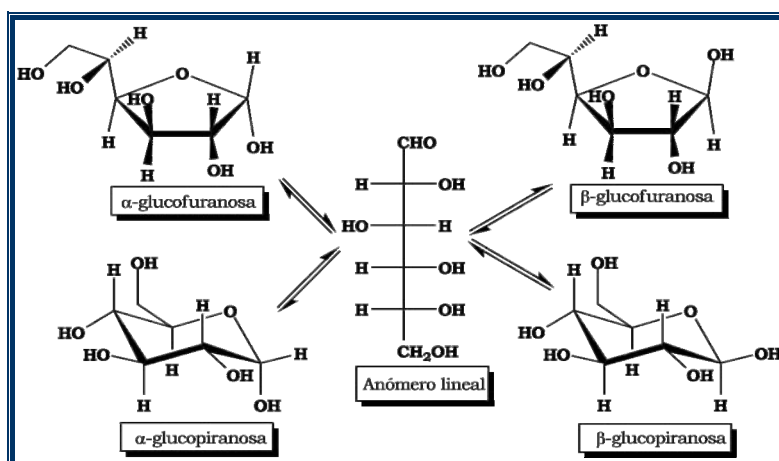


Esquema 1.14. Mecanismos de degradación de los APs.

2.4 COMPUESTOS RESPONSABLES DE LA GLICACIÓN.

2.4.1 LA GLUCOSA.

La estructura de la glucosa fue determinada por *Brown y Levy [BROWN, 1965]* mediante experimentos de difracción de neutrones. En disolución acuosa presenta equilibrio entre su forma aldehídica y sus formas cíclicas (esquema 1.15), 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,β -furanosa son despreciables [*ANGYAL, 1991*]. Se sabe que el porcentaje de la forma aldehídica es únicamente un 0.002% del total [*DWORKIN, 2000*]. La temperatura afecta al equilibrio entre dichas formas, de manera que su aumento provoca un incremento en el porcentaje de forma lineal [*COLLINS, 1995*].



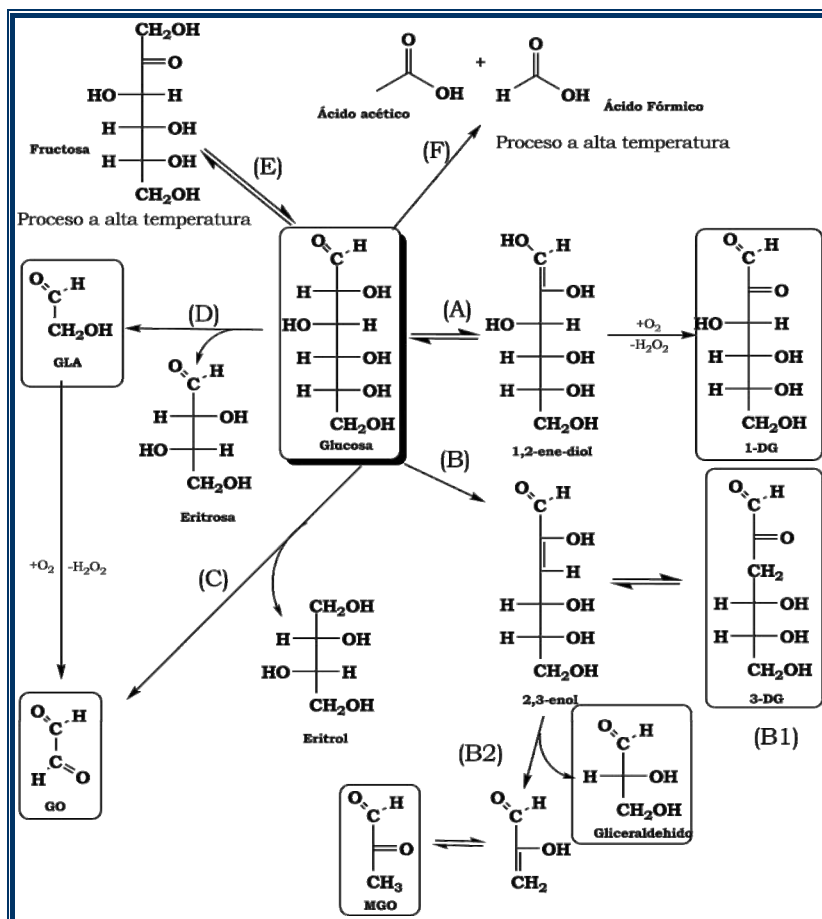
Esquema 1.15. Equilibrio entre las diferentes formas de la D-glucosa en disolución.

La glucosa es la fuente de energía de los organismos vivos. Se absorbe en el intestino mediante transporte activo, pasando posteriormente al hígado, donde se transforma en glucógeno (*glucogénesis*) o en grasas (*lipogénesis*). La glucosa en plasma es captada por las células mediante transporte activo y, si es necesario, la insulina activa un mecanismo que aumenta su captación. Una vez en el citosol se inicia su metabolismo (*glucólisis*) que finaliza con la formación de ATP [*NELSON, 2005*]. En la DM, la glucólisis disminuye drásticamente debido a la acción deficitaria de la insulina, por lo que la glucosa aumenta su concentración en plasma induciendo la GP [*Wu, 2005*].

El mecanismo de acción de la glucosa en la GP no se limita sólo a su reacción con aminoácidos para formar glucosaminas y APs, tal y como se ha

indicado en los apartados 2.2 y 2.3 de este capítulo, si no que su autooxidación genera RCS que contribuyen al deterioro proteico.

En el esquema 1.16 se muestran las principales reacciones de degradación de la glucosa, así como los RCS a los que dan lugar. *Wolff [WOLFF, 1987]* estudió por primera vez, en 1987, la autooxidación de la glucosa, detectando como productos de la misma H_2O_2 , 1-DG y RL ($HO\cdot$). Estos compuestos se forman a partir de la desprotonación del C(2) de la glucosa con la subsiguiente oxidación del 1,2-enediol formado (A) [*THORNALLEY, 1999A*]. Los estudios de estabilidad fueron ampliados por *Wells-Knecht et al. [WELLS-KNECHT, 1995A]* que mostraron que la glucosa incubada en condiciones fisiológicas presenta un $t_{1/2} \approx 950$ d. *Thornalley et al. [THORNALLEY, 1999A]* demostraron que en condiciones fisiológicas, la glucosa también se degrada formando GO ($1 \cdot 10^{-6} h^{-1}$), MGO ($7 \cdot 10^{-8} h^{-1}$) y 3-DG ($3 \cdot 10^{-7} h^{-1}$).



Esquema 1.16. Mecanismo de degradación de la glucosa.

La formación de la 3-DG se inicia mediante la desprotonación del C(2) de la glucosa, seguido de deshidratación y formación de un 2,3-enol (B), el cual reordena dando la 3-DG (B1) o bien condensa retroaldólicamente dando gliceraldehído y MGO (B2). La condensación retroaldólica puede darse también

sobre la glucosa formándose GO (C) o bien una tetrosa y GLA que se oxida dando GO, H₂O₂ y radicales HO• (D) [THORNALLEY, 1999A]. Brands y Van Boekel [BRANDS, 2001] observaron que, a elevada temperatura, la glucosa presenta equilibrio isomérico con la D-fructosa (E), además de poder degradarse produciendo ácido acético y ácido fórmico (F).

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 HPO₄²⁻ es determinante en la formación de GO [THORNALLEY, 1999A]. Los metales divalentes (Fe²⁺ y Cu²⁺) tienen un efecto similar, tal es así, que su acomplejación disminuye fuertemente la formación de GLA, GO y HO• [THORNALLEY, 1984] y ligeramente los niveles de 3-DG, sin afectar a la formación de MGO a partir de 3-DG [THORNALLEY, 1999A].

2.4.2 OTROS COMPUESTOS CARBONÍLICOS.

Los RCS formados durante la oxidación de la glucosa, glucosaminas y APs presentan una concentración en plasma de personas con DM entre 0.5 y 2 µM [ODANI, 1999]. Aunque su concentración es muy inferior a la de glucosa (>7 mM [LEDRU, 2001]), presentan una capacidad de modificación proteica 20000 veces superior [THORNALLEY, 2005]. Es por este motivo que los RCS son señalados como los responsables de la formación de gran número de AGEs y del desarrollo de las patologías asociadas a la DM [BEISSWENGER, 2003].

Los RCS incluyen un conjunto de compuestos de diferente naturaleza química, entre los que destacan: los α-oxoaldehídos MGO, 3-DG, 1-DG y GO, que reaccionan con grupos amino terminales proteicos formando BSs (precuroras de la formación final de AGEs [DEGENHARDT, 1998]), aldehídos como el GLA (un α-hidroxialdehído con alta capacidad glicante [ACHARYA, 1983]), o triosas como el gliceraldehído [TESSIER, 2003].

Las consecuencias de la glicación no se limitan a la formación de AGEs como producto de la acción de la glucosa y de los RCS. Los RL procedentes de la oxidación de la glucosa, BSs y APs (esencialmente HO• y O₂•-) actúan sobre lípidos y ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) produciendo una extensa lista de compuestos nucleófilos con elevada capacidad de modificación proteica. A la acción de dichos compuestos se le conoce como lipoxidación proteica [ESTERBAUER, 1982][ALDINI, 2007]. A continuación, se describen varios ejemplos de compuestos lipoxidantes cuya estructura se presenta en la figura 1.7.

El 4-hidroxi-trans-2-nonenal (HNE) es un aldehído α,β-insaturado, y

procede de la oxidación de PUFAs [SCHNEIDER, 2001]. Es el compuesto de mayor toxicidad procedente de la oxidación lipídica y reacciona con las Lys proteicas mediante la adición de Michael sobre su C(3) o mediante la formación de una BS sobre su C(1) [COHN, 1996]. El *malondialdehído (MDA)* también procede de la degradación de PUFAs. Su forma mayoritaria en disolución es el ión enolato estabilizado por deslocalización π -electrónica [NAIR, 1981]. El *4-oxo-trans-2-nonenal* se forma como producto de la oxidación del HNE y de PUFAs [LEE, 2000]. Este compuesto es aproximadamente 20 veces más reactivo que el HNE [LIN, 2005] y es capaz de modificar las cadenas laterales de los residuos Lys, Cys, Arg y His [ZHANG, 2003B]. Los *levuglandinos o isocetales (IsoK)*, γ -cetoaldehídos formados a partir de la acción de RL sobre PUFAs [SALOMON, 1977], exhiben una alta capacidad de modificación proteica [SALOMON, 2005]. Los IsoK reaccionan con los grupos ϵ -amina proteicos formando una carbinolamina que puede evolucionar hacia una BS, o bien reaccionar con el grupo carbonilo en posición γ - formando un anillo pirrolidina que deshidrata hacia un pirrol [IYER, 1994][DAVIES, 2004]. La *acroleína*, producto de la oxidación de PUFAs, también reacciona con cadenas laterales proteicas 100 veces mas rápido que el HNE [FURUHATA, 2003].

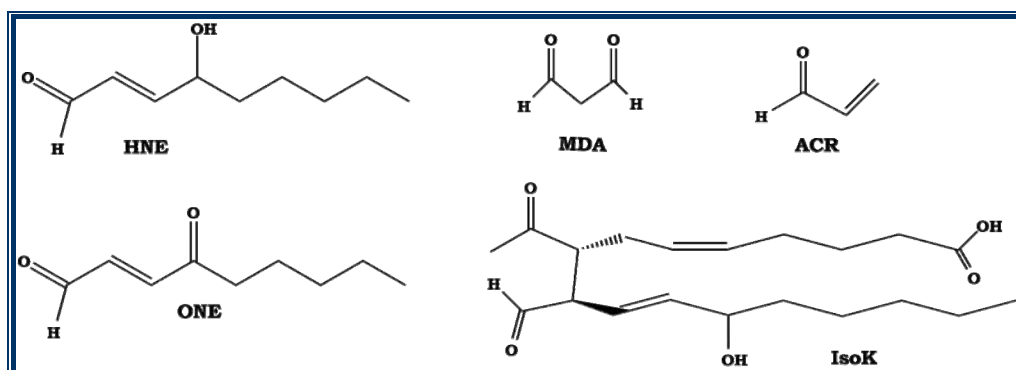


Figura 1.7. Especies carbonílicas formadas como producto de la oxidación de los PUFAs.

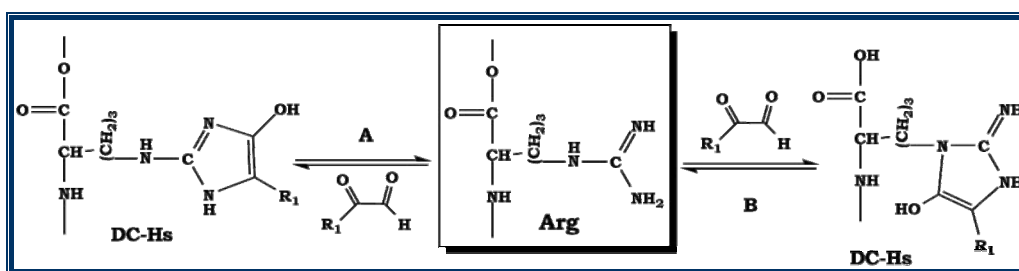
La *acetona*, que incrementa su concentración debido a la cetoacidosis diabética[†] [WHITE, 2003] (0.47-7.61 mM [REICHARD, 1986]), puede modificar componentes estructurales [KUKSIS, 2005], además de ser sustrato para la producción de MGO [KALAIPOS, 1999]. En este último proceso se produce *acetol*, formado también durante la degradación de los APs y que incrementa su concentración en la DM (0-0.48 mM) [REICHARD, 1986]. El acetol es también un agente con elevada capacidad de modificación proteica [VANDER JAGT, 1992].

[†] En la cetoacidosis diabética, el organismo utiliza las grasas como fuente principal de energía debido a la acción ineficiente de la insulina. Producto de ello se genera acetona, responsable de importantes alteraciones metabólicas [WHITE, 2003].

2.5 DIANAS DE LA GLICACIÓN.

2.5.1 DE NATURALEZA PROTEICA.

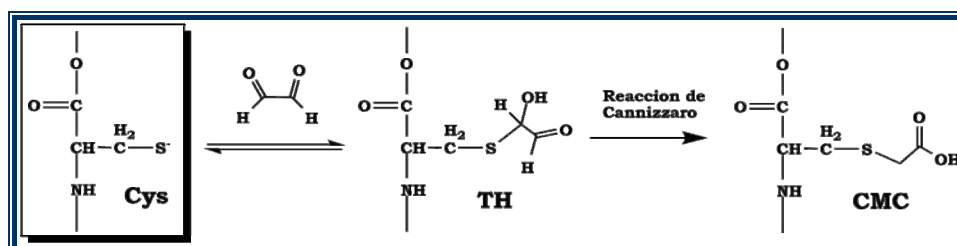
Inicialmente, Reynolds [REYNOLDS, 1965] identificó al grupo ϵ -amina de las Lys proteicas como la única diana de la glicación. Esta hipótesis se mantuvo hasta que Takahashi [TAKAHASHI, 1977] demostró que el grupo guanidino de la Arg también presentaba una elevada afinidad hacia los RCS, especialmente hacia los α -oxoaldehídos [Lo, 1994]. Su reacción se inicia mediante la formación de una carbinolamina entre uno de los N terminales del grupo guanidino en la Arg y el grupo aldehído de un RCS. Posteriormente, el otro N terminal del grupo guanidino (A en el esquema 1.17) o bien el N₆ de la Arg (B en el esquema 1.17) atacan al otro carbonilo formando una segunda carbinolamina, cuya deshidratación forma una BS que tautomeriza dando derivados imidazólicos de la ornitina (DC-Hs) [COTHAM, 2004].



Esquema 1.17. Reacción entre el grupo guanidino de la Arg y los α -oxoaldehídos.

Szent-Györgyi et al. [SZENT-GYÖRGYI, 1967] demostraron que los α -oxoaldehídos modifican enzimas intracelulares, como la creatina quinasa, la GAPDH o la acetaldehído deshidrogenasa. Estos enzimas presentan los grupos tiol de sus Cys libres, estado favorecido por el carácter reductor del medio, pudiendo así reaccionar con RCS de bajo peso molecular [THORPE, 2003]. El mecanismo de adición del tiolato sobre el GO se muestra en el esquema 1.18.

Inicialmente, se forma un tiohemiacetal (TH) que evoluciona mediante el reordenamiento de Cannizzarro para formar la S-(carboximetil-cisteína) (CMC) [ZENG, 2006]. La reacción entre la Cys y el GLA o el MGO también finaliza con la formación de la CMC, aunque no se ha descrito su mecanismo [THORPE, 2003].



Esquema 1.18. Reacción del grupo tiol de la Cys con el GO.

Wolff [WOLFF, 1993] demostró que los RL formados durante la GP actúan sobre los aminoácidos proteicos. Los RL provocan entrecruzamiento del *esqueleto proteico* o bien su rotura en los enlaces C_α-CO o C_α-N [BERLETT, 1997].

Además, pueden actuar sobre las cadenas laterales de diferentes residuos. Las cadenas laterales de la *Met* y de la *Cys* son sensibles al HO[•]. Su acción sobre el residuo Cys forma puentes disulfuro [GARRISON, 1987] y ácido sulfénico [SWALLOW, 1960], mientras que sobre la Met forma la metionina sulfona [BROT, 1983], cuya acumulación se acelera en la DM [YU, 2006].

Los RL también actúan sobre las *cadena lateral aromáticas del Trp, la Tyr, la Phe, y la His*. El Trp es el grupo proteico con mayor predisposición a la acción de los RL [SUSHIL, 2008]. Se oxida produciendo derivados *n*-hidroxilados y quineurina [WINCHESTER, 1970], cuya concentración se incrementa en la DM [STANISZEWSKA, 2005].

Las cadenas laterales de la *Arg* y la *Pro* son oxidadas por acción de los RL dando ácido semialdehído glutámico. La acción de los RL sobre la cadena lateral de la *Lys* produce ácido semialdehído aminoadípico [REQUENA, 2001], mientras que sobre la cadena lateral de la *Thr* forma ácido 2-amino-3-cetobutanóico [TABORSKY, 1973].

En un entorno proteico, la disposición de cada residuo a ser modificado por la glucosa, RCS o RL depende de factores como: puntos de anclaje del HPO₄²⁻ próximos al residuo, cadenas laterales vecinales capaces de transferir protones, interacciones *salt-bridge* cercanas y un pKa y una disposición estérica adecuada [BAYNES, 1989].

Shapiro *et al.* [SHAPIRO, 1980] demostraron que las Lys 17, 61 y 66 de la *HbA1c* eran los puntos sobre los que se habían formado sus APs característicos. A su vez, observaron también que el grupo α-amino de su extremo N-terminal presentaba una elevada predisposición a la glicación, hecho que se repite para todas las cadenas proteicas.

En la figura 1.8 se muestran las dianas de glicación de la *albúmina humana*. La Lys525 es el residuo con mayor predisposición, seguido por los residuos Lys199, Lys281 y Lys439 [IBERG, 2002]. Así mismo, la Arg114, la Arg186, la Arg218, la Arg410 y la Arg428 representan también importantes puntos de modificación proteica [AHMED, 2005A].

Además, se han estudiado las dianas de glicación en la *ribonucleasa A (RNase A)* [BROCK, 2003], en la *lisozima* [BIEMEL, 2003], las de la *alcohol deshidrogenasa* [SHILTON, 1991] y las de la *GAPDH*. El estudio de esta última

enzima ha puesto de manifiesto la importancia de los grupos Cys como dianas de la GP, siendo sus residuos Cys149 y 244 sus dianas principales [BLATNIK, 2008]. Hay que indicar que se han aislado anticuerpos glicosados [LAPOLLA, 2000], cuyas dianas han sido identificadas recientemente [GADGIL, 2007][ZHANG, 2008].

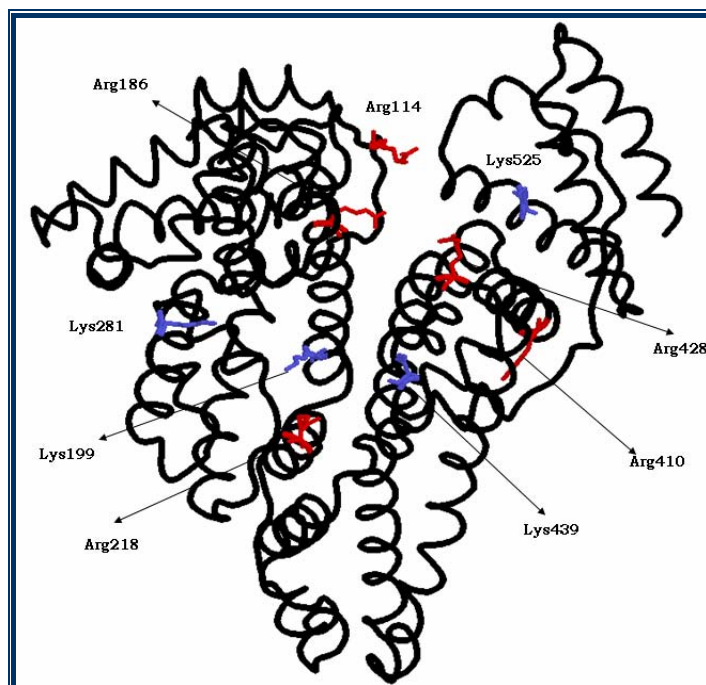


Figura 1.8. Residuos Lys (azul) y Arg (rojo) de la albúmina humana (código pdb: 1ao6) con elevada disponibilidad a la glicosilación.

2.5.2 DE NATURALEZA NO PROTEICA.

Los RCS formados durante la GP pueden también reaccionar con las bases nitrogenadas del ADN [BUCALA, 1984] induciendo las mutaciones asociadas a la DM [LEE, 1999B]. Los RCS reaccionan preferentemente sobre el grupo amino de la 2'-desoxiguanosina [KNERR, 1994] y hasta ahora se han caracterizando los productos de su reacción con la D-glucosa [OCHS, 1995], con el MGO [SCHNEIDER, 1998] y con el GO [KASAI, 1998]. Dandona et al. [DANDONA, 1996] demostraron que los RL procedentes de la GP afectan también a la 2'-desoxiguanosina.

En 1993 Bucala et al. [BUCALA, 1993] evidenciaron que la glucosa y los RCS actuaban también sobre los aminofosfolípidos. Los aminofosfolípidos son componentes esenciales de las membranas celulares y su glicosilación afecta a la integridad celular. Su glicosilación en personas sanas es < 1%, mientras que en la DM está en torno al 15% [RAVANDI, 1996]. La glicosilación de los aminofosfolípidos ha sido estudiada por Utzmann et al. [UTZMANN, 2000], los cuales demostraron que ésta procede mediante la formación de una BS que reordena hacia el AP, produciendo finalmente unos AGEs característicos [FOUNTAIN, 1999].

2.6 PRODUCTOS FINALES DE LA GLICACIÓN (AGEs).

Como se ha venido indicando en los apartados anteriores de esta sección de la memoria, la evolución de los APs, así como la acción de los RCS producidos durante la oxidación de la glucosa, glucosaminas y APs sobre las cadenas laterales proteicas, concluye con la formación final de los AGEs [ULRICH, 2001][RAHBAR, 2002][MONNIER, 2003][ALDINI, 2007].

Los AGEs se caracterizan por su elevada estabilidad y son responsables de las modificaciones estructurales y funcionales de enzimas y de proteínas que desencadenan el desarrollo patológico asociado a la DM [MONNIER, 2005]. Además de los AGEs formados *in vivo*, también se generan AGEs durante la cocción de alimentos. Numerosos estudios analizan el efecto de la ingesta de AGEs sobre el desarrollo patológico, aunque los resultados obtenidos hasta el momento son contradictorios, existiendo posturas a favor de su implicación [MONNIER, 2007] y en contra [BAYNES, 2007]. Los AGEs se clasifican en dos tipos:

➤ **AGEs NO-ENTRECruzADOS (NON-CROSSLINKING AGEs).** En la figura 1.9 se muestran algunos de los AGEs no entrecruzados. Se forman debido a la acción de la glucosa o un RCS sobre la cadena lateral de un residuo proteico. En 1980, Nakayama *et al.* [NAKAYAMA, 1980] aislaron el primer AGE, la *pirralina*, formada como producto de la reacción entre la 3-DG y el grupo ϵ -amina de la cadena lateral de las Lys proteicas. Posteriormente, Ahmed *et al.* [AHMED, 1986] descubrieron la *N- ϵ -carboximetil-lisina (CML)*, el principal AGE formado sobre los extremos N-terminales proteicos [CAI, 1999]. La CML puede formarse por varios caminos: a) oxidación [AHMED, 1986] o rotura β -carbonílica [KASPER, 2005] del AP ($86 \cdot 10^{-6} \text{ h}^{-1}$ [FERREIRA, 2003]); b) oxidación de la BS formada entre el GLA y la Lys [GLOMB, 1995]; c) oxidación de la BS formada entre el GO y el grupo ϵ -amina de la Lys [GLOMB, 1995] ($20 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ h}^{-1}$ [FERREIRA, 2003]). Yim *et al.* [YIM, 2001] y Seifert *et al.* [SEIFERT, 2004] demostraron que la CML es un buen agente acomplejante de Cu^{2+} . La formación de sus complejos genera nuevos puntos de coordinación que incrementan el deterioro estructural y catalizan la formación de HO^{\bullet} [SAXENA, 1999]. Ahmed *et al.* [AHMED, 1988] demostraron que a pH ligeramente ácido no se forma la CML, si no que se genera el *ácido láctico-3-lisina (LL)*. La reacción de las cadenas laterales de las Lys con el MGO forma la *N- ϵ -carboxietil-lisina (CEL)* [AHMED, 1997], mientras que la reacción con triosas (gliceraldehído) conduce a la formación de la *trihidrox-triosidina* y la *triosidina-*

carbaldehído [TESSIER, 2003].

La reacción de α -oxoaldehídos con el grupo guanidino de las Arg proteicas genera *imidazolininas* (DC-Hs) [THORNALLEY, 2005]. Su reacción con el MGO genera la *argipirimidina* [SHIPANOVA, 1997], aunque ésta también puede formarse por acción de otros precursores (gliceraldehído) [USUI, 2008].

Los grupos tioles de la Cys representan otro residuo diana en la acción de RCS. Hasta la fecha, se ha aislado y detectado *in vivo* la *S-2-succinil-cisteína* (2SC) [ALDERSON, 2006] y la *S-carboximetil-cisteína* (CMC) [ZENG, 2005].

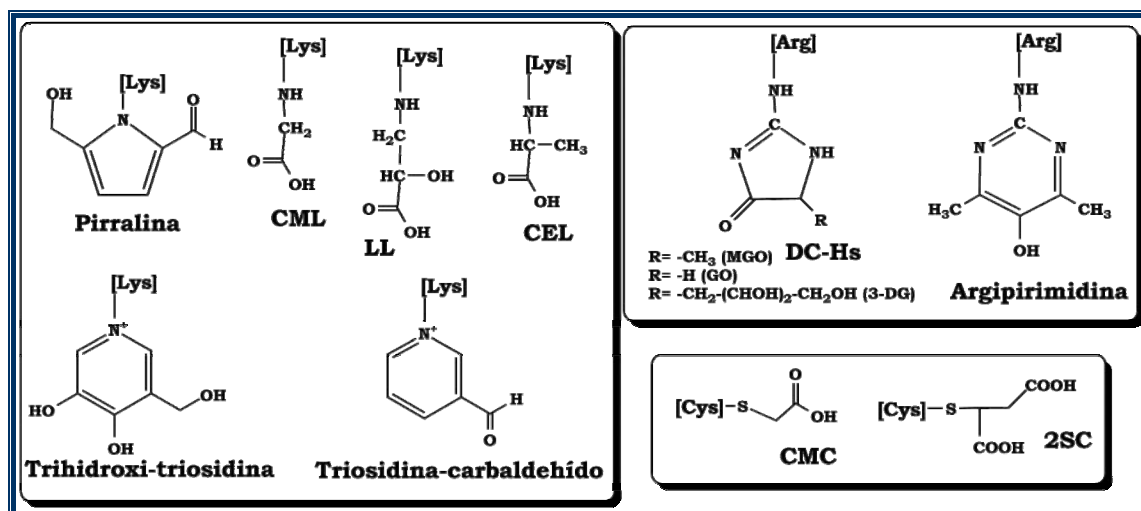


Figura 1.9. Estructuras de los AGEs no-entrecruzados.

➤ **AGES ENTRECruzADOS (CROSSLINKING AGES).** Se forman a consecuencia de la reacción de un segundo grupo nucleófilo proteico sobre un AP o un compuesto post-Amadori. La diversidad de los RCS y de las cadenas laterales proteicas hace que exista un gran número de AGEs entrecruzados. En la figura 1.10 se muestran algunos de los AGEs formados a consecuencia de la reacción de un segundo grupo ϵ -amina. Entre ellos están la *crosslina* [OBAYASHI, 1996][AOKI, 2000] y la *vesperlisina* [NAKAMURA, 1997], cuyo mecanismo de formación no se conoce, aunque sí su precursor, la 3-DG [TESSIER, 1999]. La *treosidina* se forma a partir de tetrosas [PRABHAKARAM, 1997] y la *Lys-hidroxitriosidina* procedente de las triosas [TESSIER, 2003]. El *MOLD* y el *GOLD* se forman como producto de la condensación de dos grupos ϵ -amina con dos moléculas de MGO o GO [WELLS-KNECHT, 1995B][BRINKMANN, 1995], mientras que el *GOLA* se forma a partir del GO, o bien como producto de degradación del AP [GLOMB, 2001]. Recientemente, Cheng et al. [CHENG, 2005A] han aislado un nuevo AGE en proteínas humanas, el *K2P*.

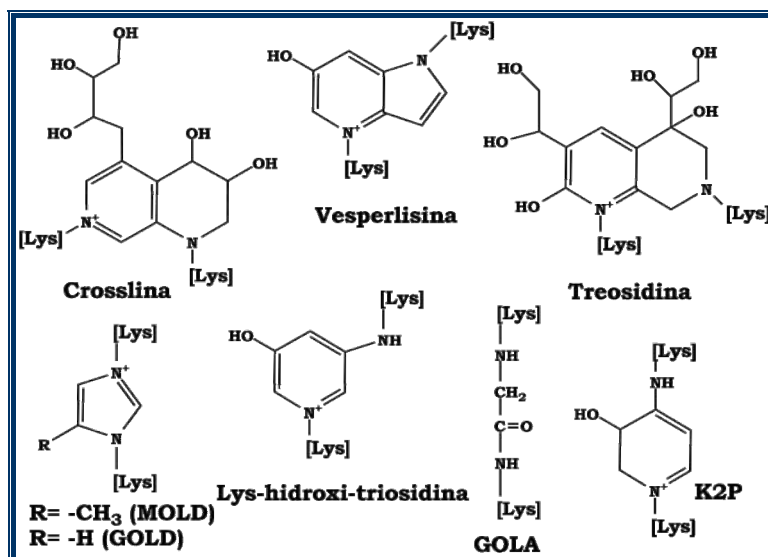


Figura 1.10. Estructuras de los AGEs no-entrecruzados.

Otro conjunto de interés es aquel formado por AGEs producidos debido al entrecruzamiento entre las cadenas laterales de las Lys y Arg proteicas (figura 1.11). *Sell et al.* [SELL, 1989] aislaron el primer AGE de estas características, la *pentosidina* (PNT). La PNT se forma como producto de la reacción del grupo guanidino de la Arg sobre un intermedio dicarbonílico procedente de la oxidación del AP [GRANDHEE, 1991], aunque también puede formarse a partir de pentosas, como la xilosa o la ribosa [DYER, 1991], o a partir del gliceraldehído [CHELLAN, 2001]. La PNT se asocia al desarrollo de las complicaciones derivadas de la DM [SELL, 1992] y se ha correlacionado también con el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer [MELI, 2002], de la osteoporosis [HEIN, 2003] y de la artritis [MASAAKI, 2006]. Además de la PNT, se ha aislado el *glucosepan* [SELL, 2005], formado por el ataque del grupo guanidina sobre la iminocetona producto de la degradación del AP [LEDERER, 1999A] o sobre la 1,4-didesoxi-5,6-glucosona, formada también durante la degradación del AP [BIEMEL, 2002]. El *GODIC* y el *MODIC* se forman por condensación del grupo guanidino de la Arg con la BS formada entre la Lys y el GO o el MGO [LEDERER, 1999B], mientras que el *DOGDIC* se forma mediante el ataque de la Arg sobre la iminocetona formada en la degradación del AP o a partir de la 3-DG [BIEMEL, 2001]. La *Arg-hidroxitriosidina* procede de la acción de las triosas [TESSIER, 2003].

Existen también otros AGEs formados por el entrecruzamiento de otros residuos, como la Cys o la His. Prueba de ello es la detección de un AGE formado a partir de las tetrasas que implica el entrecruzamiento entre una Lys y una His, la *histidina-treosina* [DAI, 2007].

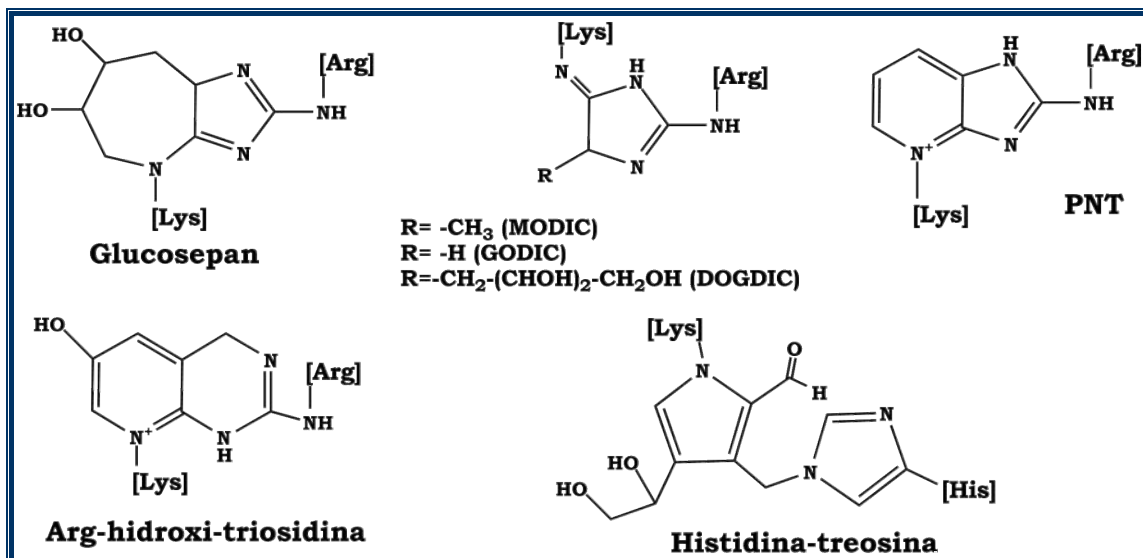


Figura 1.11. Estructuras de los AGEs entrecruzados.

En 1992, Schmidt et al. [SCHMIDT, 1992] aislaron una proteína capaz de reconocer específicamente los AGEs a la que denominaron *receptor de los AGEs* (RAGE). El reconocimiento de los AGEs mediante RAGEs provoca una cascada de procesos celulares que concluyen con la generación de RL [BIERHAUS, 1997][KOYA, 1998]. Aunque los RAGEs reconocen a todos AGEs, únicamente es su anclaje a la CML el que desencadena las reacciones de señalización [BASTA, 2008]. Los RAGEs se sitúan sobre células endoteliales y macrófagos [NEEPER, 1992] y están formados por un dominio tipo V (se une a los AGEs) seguido de dos dominios tipo C. A éstos les sigue un dominio hidrofóbico transmembranal y un dominio citoplasmático, esencial para activar la señalización celular [BASTA, 2008] (figura 1.12). Los RAGEs son los únicos receptores que inician señales de traducción celular, aunque existen otros capaces de reconocer los AGEs como las proteínas 60 y 90 [LI, 1996A], la galectina-3 [VLASSARA, 1995][STITT, 2005] y los macrófagos I y II [HORIUCHI, 1996].

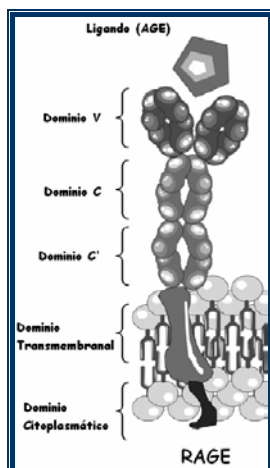


Figura 1.12. Estructura de los RAGEs.

2.7 LA PIRIDOXAMINA: INHIBIDOR DE LA GLICACIÓN PROTEICA

En 1988, *Khatami et al.* [KHATAMI, 1988] mostraron los primeros resultados que evidenciaban que los vitámeros B₆ inhibían la GP. Posteriormente, *Jain y Lim* [JAIN, 2001] demostraron que la PN, capaz de neutralizar RL [MOORTHY, 1975], disminuía ligeramente 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]. Dicha reactividad, junto a su capacidad de neutralizar RL [MOORTHY, 1975][JOSHI, 2002], les otorga ciertas propiedades inhibitoras del desarrollo patológico asociado a la DM [NAKAMURA, 2007].

Sin embargo, el vitámero B₆ con mejores propiedades inhibitoras es la piridoxamina (PM) [VOZIYAN, 2005]. La PM fue propuesta como inhibidor de la GP en 1996 por *Booth et al.* [BOOTH, 1996] y numerosos trabajos han revelado su excelente capacidad para inhibir la formación de AGEs *in vivo* [DEGENHARDT, 2002][NAGARAJ, 2002][VOZIYAN, 2005]. La PM inhibe el desarrollo de las patologías neuronales, retinales y renales asociadas a la DM [STITT, 2002][METZ, 2003A], además de reducir en un 50% la dislipidemia diabética inducida por la hiperglucemia y los RL [DEGENHARDT, 2002].

La concentración de PM en seres vivos es baja y procede de la transaminación del PL (ver apartado 1.1.2 de este capítulo). En tejidos cerebrales o renales su concentración está entre 0.1 y 15 µM, mientras que en plasma es de 0.02 µM [SAMPSON, 1989]. Si se administra de forma exógena sus niveles plasmáticos se incrementan hasta 100 µM ($t_{1/2} \approx 1.5$ h). Posteriormente es excretada (sin alterar metabólicamente) en un 95% con respecto a la cantidad absorbida [DEGENHARDT, 2002]. Esto, unido a su baja toxicidad (LD₅₀ 5000-7500 mg/kg) otorgan a la PM excelentes capacidades farmacológicas contra el desarrollo de las patologías asociadas a la DM [WILLIAMS, 2006].

Los mecanismos de inhibición de la PM han sido recopilados por *Voziyan y Hudson* [VOZIYAN, 2005] y se describen en este apartado.

2.7.1 REACCIÓN CON COMPUESTOS CARBONÍLICOS.

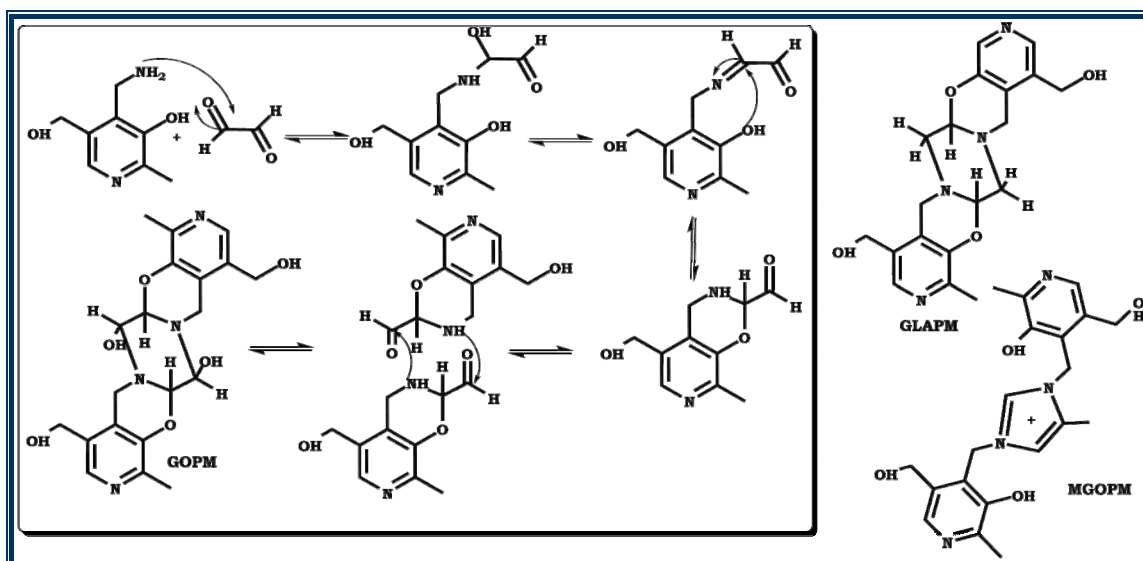
Voziyan et al. [VOZIYAN, 2002] demostraron que la PM es capaz de reaccionar con RCS, como el GO y el GLA. En el esquema 1.19 se muestra el mecanismo de la reacción entre el GO y la PM. Se inicia mediante ataque

nucleófilo de la amina sobre un carbonilo del GO formando una carbinolamina que deshidrata para dar una BS. Esta BS evoluciona mediante ataque nucleofílico del fenolato formando un anillo hemiaminal. La condensación de dos moléculas análogas da lugar al GOPM [VOZIYAN, 2002].

La reacción entre el GLA y la PM transcurre mediante un mecanismo similar, formándose el GLAPM como producto final [VOZIYAN, 2002]. En el esquema 1.19 también se muestra la estructura del MGOPM, obtenido por Nagaraj *et al.* [NAGARAJ, 2002] como producto final de la reacción entre la PM y el MGO.

Recientemente, Chetyrkin *et al.* [CHETYRKIN, 2008A] han estudiado la reacción entre la PM y otro RCS, la 3-DG. Como producto de reacción se ha detectado la formación del ácido 2-desoxirribónico, lo que indica que la PM es capaz de desactivar desoxihexosas formando ácidos polihidroxicarbonados sin capacidad glicante.

A pesar de estos trabajos, no se han realizados estudios cinéticos de estas reacciones, por lo que su importancia cuantitativa frente a la reacción del grupo ϵ -amina con los RCS no se conoce.



Esquema 1.19. Mecanismo de reacción entre la PM y el GO [VOZIYAN, 2002]. Estructura del GLAPM y del MGOPM.

Los estudios de las reacciones entre la PM y los productos procedentes de la dislipidemia diabética (inducida por la GP) son más numerosos. Amarnath *et al.* [AMARNATH, 2004] estudiaron las reacciones de la PM con compuestos 1,4-dicarbonílicos. Dichas reacciones se inician mediante la formación de una carbinolamina que no deshidrata, sino que el grupo amina ataca de nuevo sobre el otro carbonilo con la consecuente generación de un

pirrol (mediante la reacción de *Paal-Knorr*), que en el caso de los IsoK se convierte en un anillo lactámico [DAVIES, 2006]. Amarnath et al. [AMARNATH, 2004] demostraron que las reacciones de la PM con compuestos 1,4-dicarbonílicos son ≈ 2300 veces más rápidas que si es el grupo ϵ -amina de las Lys el agente nucleófilo, gracias a la acción catalítica del fenolato de la PM.

En el año 2000, Onorato et al. [ONORATO, 2000] estudiaron las reacciones de la PM con los productos de degradación de PUFAs, caracterizando los compuestos que se muestran en la figura 1.13, algunos de los cuales han sido detectados *in vivo* [METZ, 2003B]. Recientemente, Kang et al. [KANG, 2006] han estudiado la reacción entre la PM y el MDA y han caracterizado tres aductos formados en ella.

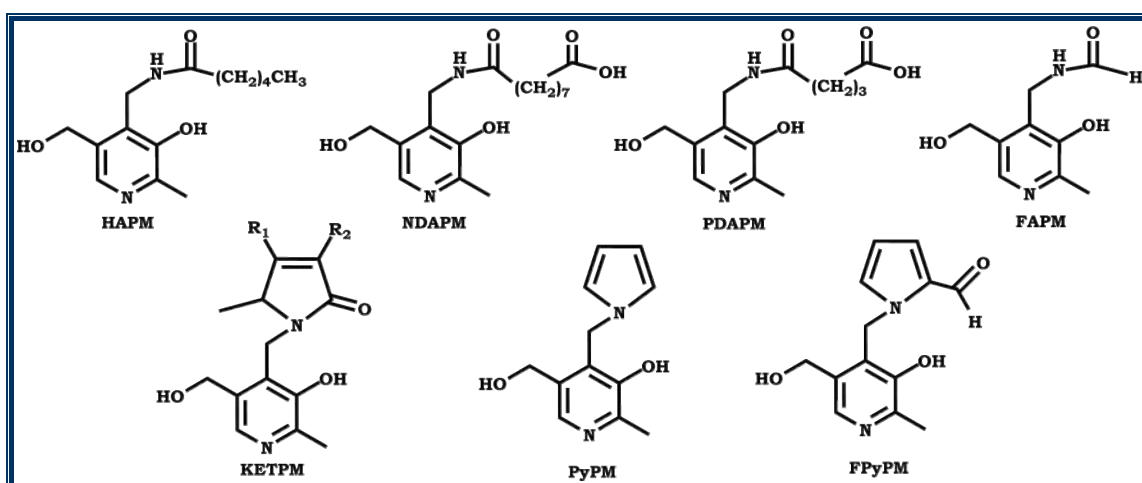


Figura 1.13. Estructura de los productos detectados durante la incubación de PM con PUFAs: HAPM, NDAPM, PDAPM, FAPM, PyPM y FPyPM [ONORATO, 2000] y producto de la reacción entre la PM y los IsoK: KETPM [DAVIES, 2006].

2.7.2 INHIBICIÓN DE LAS REACCIONES POST-AMADORI.

En 1999, Khalifah et al. [KHALIFAH, 1999] publicaron los resultados de un experimento que demostraba las propiedades inhibitorias de la PM en la formación de AGEs procedentes de los APs. En el estudio se incubó Hb1Ac en presencia y en ausencia de PM. El experimento control evidenció una clara evolución de los APs hacia la formación de AGEs, mientras que la adición de PM inhibió totalmente dicho proceso (figura 1.14A).

Posteriormente, Voziyan et al. [VOZIYAN, 2003] estudiaron el mecanismo de acción de la PM sobre los APs, incubando APs formados sobre la RNAsa-A [KHALIFAH, 1996] con PM. Los resultados obtenidos indicaron que la PM no reacciona con el AP y que la acción inhibitoria de la PM sobre la evolución de los APs se debe a su acción acomplejante de los iones metálicos que la catalizan. Sin embargo, el hecho de que la aminoguanidina (AG), otro

inhibidor de la GP con una capacidad acomplejante similar a la de la PM [PRICE, 2001], no inhiba la formación de AGEs a partir de la Hb1Ac (figura 1.14B), llevó a Voziyan et al. [VOZIYAN, 2003] a concluir que necesariamente han de existir otros factores desconocidos que expliquen la capacidad de la PM para inhibir la formación de AGEs a partir de los APs.

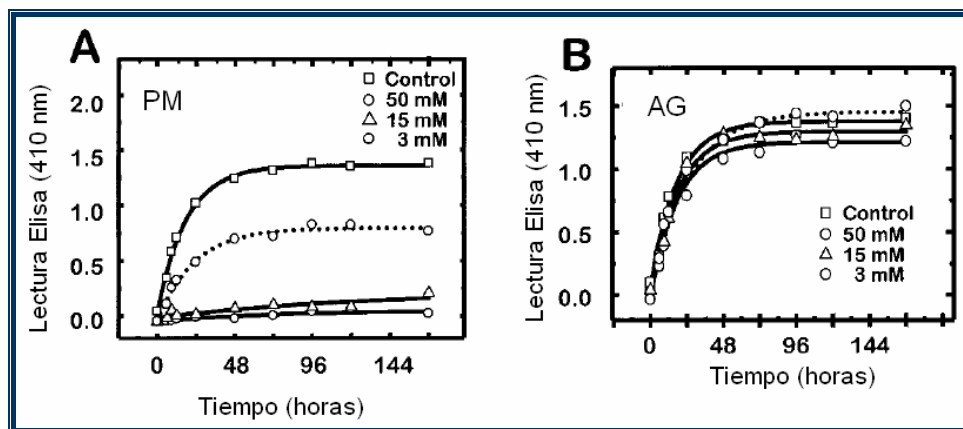


Figura 1.14. Lectura ELISA de los AGEs procedentes del AP formado sobre la RNAsa-A en ausencia o en presencia de diferentes concentraciones de PM (A) o AG (B) en tampón fosfato 0.2 M a pH 7.5 y a 37°C. Figura adaptada de los trabajos de Khalifah et al. [KHALIFAH, 1999].

2.7.3 NEUTRALIZACIÓN DE RADICALES LIBRES (RL).

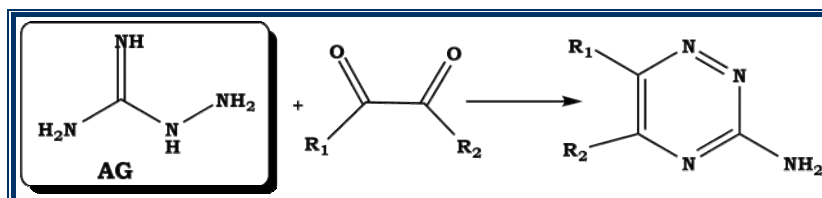
Tal y como se ha descrito anteriormente, los RL formados durante la autoxidación de carbohidratos, glucosaminas y APs (esencialmente $O_2^{\cdot-}$, HO^{\cdot}) inducen cambios en proteínas y ADN. Prueba de ello es que los productos formados debido a su acción se incrementan en pacientes con DM [AHMED, 2005B], dato ya indicado en el apartado 2.5.1 de este capítulo.

Voziyan y Hudson [VOZIYAN, 2005] demostraron que la PM puede neutralizar radicales HO^{\cdot} mediante donación del protón fenólico en posición 3. Además, demostraron que también puede inhibir su formación gracias al efecto acomplejante que ejerce sobre los iones metálicos que la catalizan. Jain y Lim [JAIN, 2001] propusieron que mediante este mismo mecanismo, la PM también inhibe la producción del radical $O_2^{\cdot-}$, aunque no lo neutraliza [CHETYRKIN, 2008B]. La elucidación de este mecanismo de acción permitió a Chetyrkin et al. [CHETYRKIN, 2008B] comprobar que la PM inhibe la modificación de los Trp proteicos inducida por RL.

2.8 OTROS INHIBIDORES DE LA GLICACIÓN

Dada la heterogeneidad de los mecanismos implicados en el proceso de GP y en la formación de AGEs, se ha propuesto, además de la PM y los otros derivados de la vitamina B₆ (PL, PLP y PN), un amplio conjunto de compuestos con propiedades inhibitoras de la GP, entre los que pueden destacarse:

➤ **SECUESTRANTES DE RCS.** Conjunto formado por aquellos compuestos capaces de actuar como inhibidores competitivos de la glicación sobre los grupos nucleófilos presentes en biomoléculas. Entre ellos, destaca la *aminoguanidina* (AG), compuesto que presenta dos centros de reacción, un grupo hidracina (pKa= 0.7) y un grupo guanidino (pKa= 11.5) [KOSKINEN, 1997]. Bharatam et al. [BHARATAM, 2004] estudiaron teóricamente su distribución electrónica, responsable de su elevada reactividad y de su acomplejación con biometales. Thornalley et al. [THORNALLEY, 2000] demostraron que presenta elevada afinidad hacia los α-oxoaldehídos, con los que reacciona formando derivados del 3-amino-1,2,4-triacina (esquema 1.20). Se ha observado que también puede reaccionar con la glucosa, dando un derivado β-glucopiranosilo [HIRSCH, 1995] y con aldehídos α,β-insaturados [AL-ABED, 1997].



Esquema 1.20. Mecanismo de reacción entre la AG y α-oxoaldehídos.

Los resultados obtenidos por Voziiyan y Hudson [VOZIYAN, 2005], reproducidos en la figura 1.15 (A,B), muestran que la AG reacciona con los RCS de manera más efectiva que la PM. Se ha observado que también inhibe la formación de HO• [GIARDINO, 1998] y que presenta una capacidad acomplejante de iones metálicos similar a la de PM [PRICE, 2001]. Khalifah et al. [KHALIFAH, 1999] demostraron que, a pesar de lo anteriormente expuesto, su capacidad de inhibir la formación de AGEs era muy inferior a la mostrada por la PM (figura 1.15 (C)).

La AG es capaz de inhibir la formación de AGEs en arterias, retina y riñones, así como la modificación de lipoproteínas [ALDINI, 2007], reduciendo la hipertensión, las cardiopatías, las neuropatías, la disfunción arterial, etc. [THORNALLEY, 2003A]. A pesar de sus excelentes características, se ha desestimado

su uso farmacológico ya que provoca efectos adversos como la producción de hidracina (debido a su hidrólisis), la formación de RL (debido a la oxidación de la hidracina) y la reducción de los niveles de PLP hepáticos [CHEN, 2003].

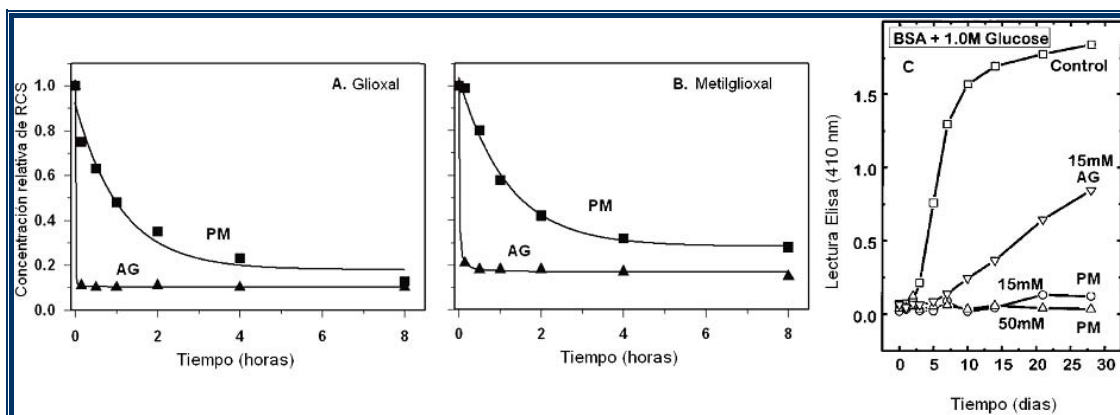


Figura 1.15. Disoluciones de GO (A) o MGO (B) incubadas con PM y AG en tampón fosfato 0.2 M a pH 7.5 y a 37 °C. Figura adaptada de *Voziyan y Hudson [VOZIYAN, 2005]*. (C) Lectura ELISA de los AGEs formados a raíz de la incubación de albúmina bovina con glucosa en ausencia o en presencia de diferentes concentraciones de PM o AG en tampón fosfato 0.2 M a pH 7.5 y a 37°C. Figura adaptada de *Khalifah et al. [KHALIFAH, 1999]*.

Además de la AG, se han estudiado otros compuestos que basan sus propiedades inhibitoras en el secuestro de RCS (figura 1.16). Entre ellos cabe destacar a la *metformina* (dimetilbiguanida) [TANAKA, 1997], usada desde 1957 como antihiper glucémico [STUMVOLL, 1995], la cual forma derivados de la triazepinona al reaccionar con RCS [RUGGIERO-LÓPEZ, 1999]; el *OPB-9195* que incrementa la sensibilidad de la insulina e inhibe la GP secuestrando RCS [MIYATA, 2003] mediante un mecanismo similar al descrito para la AG [MIYATA, 2000]; los compuestos tiolados *N-acetyl-Cys* [NEELY, 2000], *D-penicilamina* [WONDRAK, 2002] y los derivados de plantas *Allium* (*s-etil-Cys*, *s-metil-Cys*, *s-propil-Cys*,...), que reducen el desarrollo de patologías asociadas a la DM [ZENG, 2006] mediante el secuestro de RCS y de aldehídos α,β -insaturados; y la *hidralazina* (HY), capaz de secuestrar efectivamente GO y MGO formando hidrazonas [KAMINSKAS, 2004].

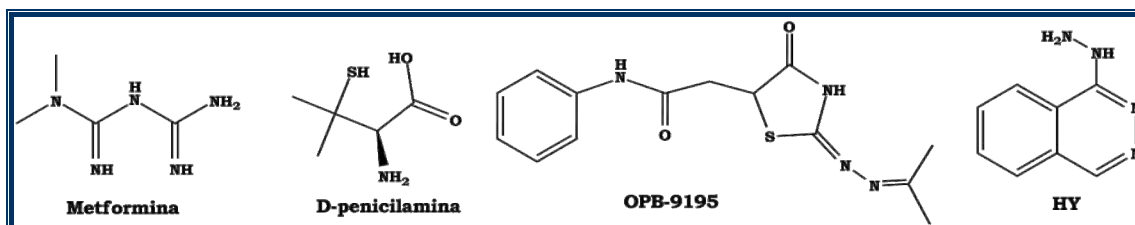


Figura 1.16. Inhibidores de la GP que basan su actividad en el secuestro de RCS.

➤ **ACOMPLEJANTES DE IONES METÁLICOS.** *Thornalley et al. [THORNALLEY, 1999A]* y *Cussimano et al. [CUSSIMANO, 2003]* demostraron que la presencia de compuestos

con elevada capacidad acomplejante, inhibía la formación de RCS y prevenía la modificación proteica. A raíz de estas observaciones, se empezaron a estudiar inhibidores de la GP que centraban su efecto en la acomplejación de iones metálicos. *Rahbar y Figarola [RAHBAR, 2003]* propusieron al *inositol* y al *probucol* como inhibidores de la GP, mientras que *Miyata et al. [MIYATA, 2003]* propusieron a los inhibidores de la *angiotensina II* (enzima que sobreexpresa en la DM y que estrecha los vasos sanguíneos), el *losartan*, *captopril*, *candesartan* o el *termisartan* con la misma finalidad. *Lalezari y Rahbar [RAHBAR, 2003]* diseñaron una serie de compuestos aromáticos (figura 1.17) capaces de inhibir la formación de AGEs a partir de los APs, los cuales centran su acción inhibidora en la acomplejación de iones Cu^{2+} .

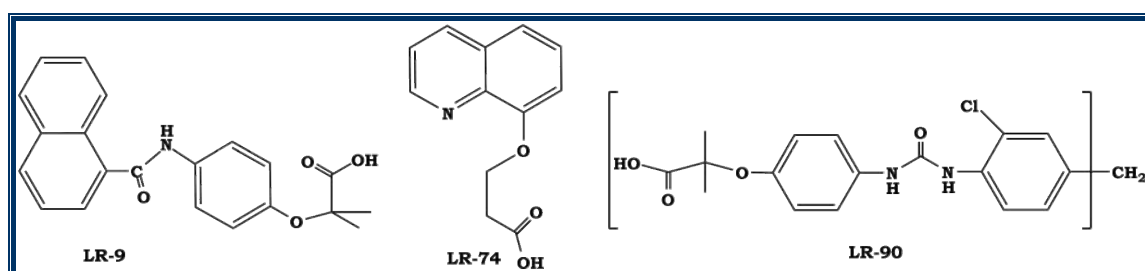


Figura 1.17. Estructura química del LR-9, del LR-74 y del LR-90 [RAHBAR, 2003].

Se ha sugerido que diversos derivados de la vitamina B₆, mostrados en la figura 1.18, presentan elevada capacidad acomplejante de iones metálicos, hecho que les otorga la capacidad de inhibir las reacciones oxidativas implicadas en la GP. El *BST-4997* un compuesto análogo a la vitamina B₆ con un grupo imidazol en posición 4, forma complejos con el Cu^{2+} tres órdenes de magnitud más estables que la PM y presenta una elevada capacidad de inhibición de las reacciones post-Amadori [BROCK, 2003]. La BS formada entre el PL y la AG (PL-AG) [LEOVAC, 2007] forma complejos de elevada estabilidad con iones metálicos y su administración no presenta los efectos adversos asociados a la AG [CHEN, 2003]. El *TM2002* acompleja iones metálicos con un $\text{IC}_{50}=84 \mu\text{M}$ frente a la oxidación del ácido ascórbico y ha mostrado efectos beneficiosos contra la DM [IZUHARA, 2008].

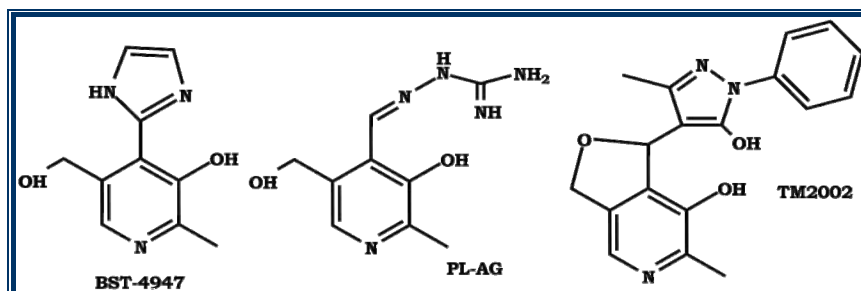


Figura 1.18. Estructuras químicas del BST-4947, de la PL-AG y del TM2002.

➤ **NEUTRALIZANTES DE RL.** Los compuestos capaces de neutralizar RL (inhibidores del EO) son considerados también como buenos inhibidores de la GP. *Li et al.* [LI, 1996B] demostraron que el *tocopherol* era capaz de neutralizar RL mediante donación del protón fenólico e inhibir así la modificación proteica, mientras que *Varma et al.* [VARMA, 1997] propusieron que los *cetoácidos* también podían actuar mediante ese mismo mecanismo. *Matsuda et al.* [MATSUDA, 2003] demostraron que las *flavonas*, representadas en la figura 1.19, son capaces de inhibir la GP, mediante neutralización del radical $O_2^{\cdot-}$, mostrando especial afinidad hacia dicho radical la *gliciteína* [KANG, 2007], el *vitexin* y el *isovitexin* [PENG, 2008].

También se ha estudiado la capacidad neutralizante de RL de compuestos derivados de los vitámeros B₆. *Cheng et al.* [CHEN, 2003] demostraron que la *PL-AG* puede neutralizar radicales HO^{\cdot} y $O_2^{\cdot-}$ con una eficacia superior a la de la PM o a la del PL. Por otra parte, *Culbertson et al.* [CULBERTSON, 2003A] sintetizaron la *dmaPM*, un derivado de la PM que incorpora el grupo dimetilamino en posición 6, hecho que incrementa su capacidad de neutralizar RL con respecto a la PM. La *dmaPM*, representada en la figura 1.19, presenta la misma capacidad secuestrante de RCS y acomplejante de iones metálicos que la PM, hecho que se traduce en una mayor efectividad como inhibidor de la formación de AGEs [CULBERTSON, 2003B].

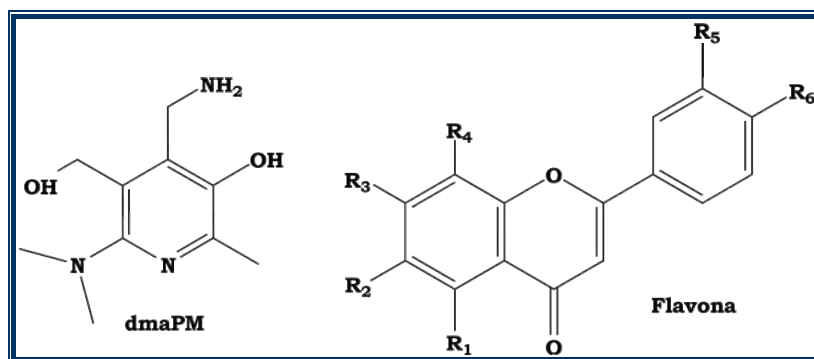
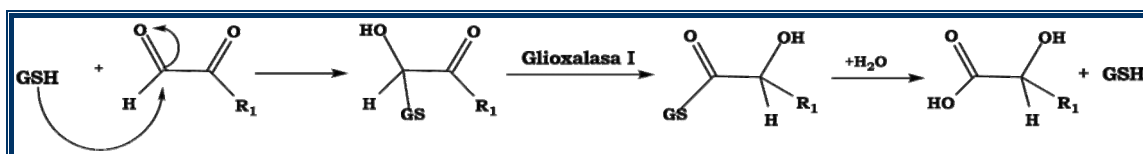


Figura 1.19. Estructura química de las flavonas y de la *dmaPM*.

➤ **ROMPEDORES DE AGEs.** Estos compuestos actúan degradando AGEs, aunque para ninguno de ellos se conoce su mecanismo de acción. *Vasan et al.* [VASAN, 1996] demostraron que el *bromuro de fenaciltiazol* (PTB) era capaz de degradar AGEs, 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]. *Cheng et al.* [CHENG, 2005B][CHENG, 2007] mostraron que el *C16* y el *C36*, derivados del PTB, son también buenos rompedores de AGEs.

➤ **ENZIMAS QUE DEGRADAN RCS.** La *glioxilasa I*, enzima dependiente del glutatión (GSH), transforma los α -oxoaldehídos en α -hidroxiácidos, tal y como se indica en el esquema 1.21 [THORNALLEY, 1988][THORNALLEY, 1990]. El sustrato por el que muestra mayor afinidad es el MGO ($k_{cat}=(4-10)\cdot 10^6\text{ h}^{-1}$; $K_m=71-130\ \mu\text{M}$), aunque también actúa frente a otros α -oxoaldehídos. Se ha constatado que su administración exógena previene la formación de AGEs [THORNALLEY, 2003C]. Otras enzimas como la *alcohol deshidrogenasa*, la *aldehído deshidrogenasa*, las *aldo-ceto reductasas* y la *aldosa reductasa* pueden actuar también contra los RCS [VANDER JAGT, 2001][ELLIS, 2007].



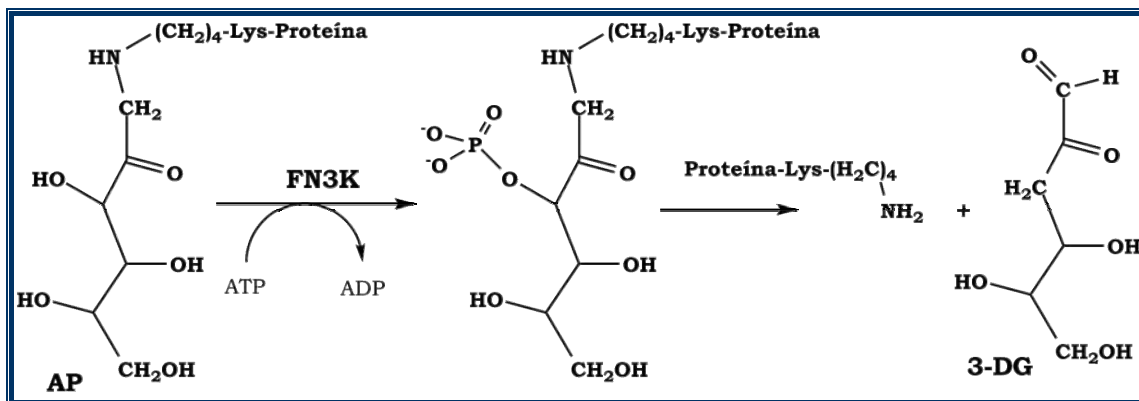
Esquema 1.21. Mecanismo de acción de la *glioxilasa I*.

El *GSH*, además de actuar como coenzima de la *glioxilasa I*, puede reaccionar mediante su grupo tiol con RCS (formando tiohemiacetales) y con aldehídos α,β -insaturados (formando aductos de Michael) [BERHANE, 1994][ALDINI, 2007]. Tal es así, que su administración exógena previene el desarrollo de complicaciones renales y neuronales asociadas a la DM [UENO, 2002]. Por otra parte, *Szwergold et al.* [SZWERGOLD, 2005] demostraron que el GSH lleva a cabo la *transglucación*. En ella, el GSH reacciona sobre las glucosaminas proteicas provocando la transferencia de la glucosa desde la BS hacia el tiol, lo que implica la liberación del residuo proteico y la formación de tiazolidinas.

➤ **ENZIMAS DESGLICANTES.** Los organismos vivos presentan dos tipos de enzimas capaces de desglicar biomoléculas mediante reconocimiento específico de APs [THORNALLEY, 2003B]. *Horiuchi y Kurokawa* [HORIUCHI, 1991] demostraron en 1991, la existencia de enzimas que descomponían selectivamente los APs, formando 1-DG, H_2O_2 y liberando la amina. Estos enzimas, conocidos como las *fructosil-amino-oxidasas*, reconocen específicamente las formas β -piranosa de los APs [WU, 2001]. Únicamente actúan sobre péptidos de bajo peso molecular (4 residuos) y su valor de K_m aumenta acorde a la longitud de la cadena del sustrato, sin llegar a mostrar efecto alguno sobre APs proteicos debido a la dificultad en la conexión entre el sustrato y el centro activo [MENNELLA, 2005].

Las *fructosaminas quinasas (FN3K)* fueron descubiertas por *Szwergold et al.* [SZWERGOLD, 1995] al observar la presencia de fructosa-3-fosfato sobre

proteínas lenticulares de ratas con DM. En el esquema 1.22 se muestra su mecanismo de acción, descrito por Wu y Monnier [Wu, 2003]. Inicialmente, se produce fosforilación del AP hacia la fructosamina 3-fosfato, que descompone liberando la amina y formando fosfato inorgánico y 3-DG. Estos enzimas presentan elevada afinidad hacia los APs formados sobre las Lys ($K_m \approx 8 \mu\text{M}$) con respecto a los APs formados sobre otros residuos [DELPIERRE, 2000].



Esquema 1.22. Mecanismo de acción de las FN3K.

La acción de las FN3K lleva implícita la generación de 3-DG, un potente RCS, por lo que se han estudiado inhibidores de dichos enzimas con el fin de disminuir la generación de 3-DG asociada a su acción. Szwegold *et al.* [SZWEGOLD, 2003] observaron que la *1-desoxi-1-morfolinofructosa* inhibía las FN3K ($K_m = 100 \mu\text{M}$), aunque su uso se desestimó ya que también producía 3-DG. Posteriormente, Kappler *et al.* [KAPPLER, 2001] observaron que un análogo al AP, el *Dyn-12*, también las inhibía, disminuyendo la formación de 3-DG. La lista de inhibidores se ha incrementado con el *D-400540*, el cual presenta una efectividad superior al *Dyn-12* [TSAI, 2006].

CAPÍTULO 2

METODOLOGÍA

METODOLOGÍA

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

1.1 TÉCNICAS UTILIZADAS

1.1.1 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN CON DETECCIÓN UV/VIS (HPLC-UV/VIS).

La mayoría de estudios cinéticos del presente trabajo se realizaron analizando las mezclas de reacción mediante un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), de la marca *Shimadzu*, equipado con dos bombas del modelo *LC-10ATvp*. Como sistema de detección se utilizó un sistema de fotodiodos (UV/Vis) de la marca *Shimadzu*, modelo *SPD-M20A*, que incorporaba como fuentes de irradiación una lámpara de D₂ y otra de wolframio, permitiendo la detección desde 800 a 200 nm. Las muestras fueron inyectadas con un inyector manual *Rheodyne*, modelo *7725i*.

En todos los estudios se utilizó una columna del tipo *Tracel Exel 120 ODSB* de la marca *Teknokroma*, de dimensiones 25 x 0.46 cm y con un tamaño de partícula de 5 µm. Esta columna presenta un relleno del tipo C₁₈-ODSB, caracterizado por permitir la separación en fase reversa mediante el uso de eluyentes 100% acuosos.

En función de la mezcla de reacción a estudiar, se utilizaron diferentes métodos de elución, isocráticos o en gradiente, tanto de caudal como de composición de fase orgánica. Para ello se utilizaron mezclas binarias H₂O/MeCN o H₂O-50mM-fosfato potásico (pH 6.0)/MeCN.

1.1.2 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN CON DETECCIÓN POR ESPECTROSCOPIA DE MASAS (HPLC-MSD).

Los pesos moleculares de los productos de reacción fueron determinados analizando la mezcla de reacción, o los productos aislados a partir de ella, mediante espectroscopia de masas acoplada a un sistema de cromatografía líquida de alta resolución. El sistema utilizado fue el modelo *1100* de la marca *Agilent*. El sistema incorporaba un inyector automático (*Agilent*, modelo *1100*).

El sistema de cromatografía se compone de dos bombas, lo que permitió realizar un análisis en gradiente. A su vez, también incorpora una válvula de selección que permitió: a) el análisis por inyección en flujo (FIA), sin separación cromatográfica de la muestra y b) la separación cromatográfica de la muestra, previo a su análisis de masas.

Antes de su detección, las muestras se nebulizaron mediante una corriente de N₂ (13 ml/min) a 350 °C y con una presión de 415.6 kPa. Posteriormente, fueron ionizadas por impacto electrónico (EI), aplicando un voltaje de fragmentación en el rango entre 60 y 100 V (en función de la muestra). La detección de los fragmentos iónicos se realizó utilizando un cuadrupolo que permitió la determinación de iones tanto positivos como negativos. La detección se llevó a cabo en modo SCAN, lo que permitió obtener la intensidad de cada fragmento iónico en el rango m/z entre 100 y 800.

Para el análisis del tipo FIA se utilizó una fase móvil H₂O-5mM-acetato amónico (pH 6.0) con un flujo de 0.3 ml/min. El acetato amónico se usó como iniciador de la ionización. En el análisis por columna se incorporó al sistema una columna del tipo *Tracel Exel 120 ODSB* y se utilizaron para la elución métodos isocráticos o en gradiente, utilizando en ambos casos mezclas H₂O-5mM-acetato amónico (pH 6.0)/MeCN.

1.1.3 FLUJO DETENIDO (*STOPPED-FLOW*) CON DETECCIÓN UV/Vis (*MSFS-UV/Vis*).

El estudio de las cinéticas rápidas se realizó mediante la técnica de flujo detenido (*stopped-flow*). Las disoluciones estudiadas fueron introducidas en la cámara de mezcla de manera automática, utilizando para ello un mezclador termostatzado de la marca *Biologic*, modelo *SFM-20*. Las mezclas de reacción fueron analizadas en una celda de cuarzo modelo *FC-15* de paso óptico 1.5 mm, o bien en otra modelo *TC-100/10T* de paso óptico 10 mm. Se usó una velocidad de inyección de 10 ml/s, para la cual el mezclador presentó un tiempo muerto de entre 3 y 3.7 ms y un volumen muerto de entre 30.2 y 36.6 μ l.

El sistema de detección utilizado fue un espectrofotómetro de fotodiodos de la marca *J&M Tidas16*, modelo *256*, el cual produce radiación electromagnética entre 200 y 700 nm gracias a una lámpara de Xe de 75 W. Las muestras a estudiar fueron irradiadas con luz policromada desde 200 a 700 nm, o bien con radiación monocromada, cuya energía se seleccionó incorporando un monocromador entre la fuente y la muestra.

1.1.4 ESPECTROSCOPIA UV/Vis.

Los espectros de UV/Vis fueron adquiridos mediante un espectrofotómetro de doble rayo de la marca *Shimadzu*, modelo *UV-2401PC*, a

25 ó a 37 °C. El sistema presentaba como fuentes de irradiación una lámpara de D₂ (30 W) y una de wolframio (50 W) y es capaz de irradiar las muestras desde 200 a 800 nm. Para el análisis de las muestras se utilizaron celdas de cuarzo de 10 mm de paso óptico o celdas de cuarzo de doble cuerpo de 8.75 mm de paso óptico.

La espectroscopia UV/Vis se utilizó para caracterizar los productos de reacción, adquiriendo sus espectros desde 400 a 220 nm. También fue utilizada para la realización de estudios cinéticos evaluando la variación de los espectros UV/Vis con el tiempo, o bien la variación de la absorbancia con el tiempo a una longitud de onda fija.

1.1.5 ESPECTROSCOPIA DE RMN.

Los espectros de RMN fueron adquiridos a 25°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). Se usaron tubos de vidrio de 250 mm de largo y 5 mm de diámetro y el ácido 3-(trimetilsilil)-1-propansulfónico (DSS) como referencia interna. Los espectros de ¹H se adquirieron en D₂O, utilizando disoluciones tampón fosfato 0.5M a pD[‡] 7.4. Los espectros de ¹³C se adquirieron en el mismo tampón o bien en tampón citrato (20% D₂O) 0.5 M a pH 7.0.

Se han realizado experimentos monodimensionales de ¹H y de ¹³C; y experimentos bidimensionales ¹H,¹H-COSY, ¹H,¹³C-COSY y ¹H,¹³C-HMBC. También se ha utilizado la técnica de transferencia de polarización DEPT-135 [*HESSE, 1995*].

1.1.6 POTENCIOMETRÍA (pH-STAT).

Las constantes de equilibrio de ionización para el grupo ε-amina de la Ac-Phe-Lys y para el grupo tiol de la Ac-Cys, fueron determinadas valorando disoluciones (12 mM) en H₂O a pH <1.6, ajustado previamente con HCl. Las valoraciones fueron realizadas a 37 °C utilizando una disolución 0.12 M de NaOH, estandarizada con hidrógeno-ftalato potásico. Para ello, se utilizó un pH-Stat de la marca *Metrohm*, modelo *Titrimo 718*, el cual se compone de: una

[‡] La medida de pH de las disoluciones en D₂O se realizó mediante el protocolo descrito por *Salomaa et al.* para los electrodos de vidrio [*SALOMAA, 1964*]. Una vez calibrado, se sumergió el electrodo en varios mililitros de D₂O con el fin de que la membrana se hidratara con D₂O. Seguidamente, se procedió a la preparación de las disoluciones tampón o bien a la medida de pD. El efecto isotópico afecta a la respuesta del electrodo, por lo que el valor del pD se obtiene mediante la aplicación de la ecuación, pD=pH + 0.4.

bureta automática *Metrohm* modelo 806, una sonda de temperatura, un electrodo de pH, un termostatizador y un agitador magnético. Las adiciones de valorante se realizaron a una velocidad que osciló entre 0.1-10 $\mu\text{l/s}$.

1.2 MÉTODOS ANALÍTICOS

1.2.1 DETERMINACIÓN DE IÓN AMONIO.

Se determinó cuantitativamente el ión amonio formado durante la degradación de la PM. Para ello, se utilizó el método de *Berthelot* modificado por *Patton y Crouch* [PATTON, 1977]. Se adicionaron 100 μl de la mezcla de reacción a 1 ml de una disolución que simultáneamente era 10 mM de NaClO y 200 mM de NaOH. A la disolución resultante se le adicionó 1 ml de otra disolución que simultáneamente era 100 mM de fenol y 5 mM de nitroprusiato sódico. La mezcla final se guardó 5 min en la oscuridad y, posteriormente, se determinó su absorbancia a 620 nm. El cálculo de la concentración de ión amonio para cada muestra se realizó a partir de una calibración con disoluciones patrón de cloruro de amonio.

1.2.2 DETERMINACIÓN DE GRUPOS AMINO PRIMARIOS.

La determinación de grupos amino primarios se realizó mediante el método descrito por *Satake et al.* [SATAKE, 1960]. Se tomaron 100 μl de la mezcla de reacción a analizar y se le adicionó 1 ml de tampón fosfato 200 mM a pH 7.9 y 1 ml de una disolución acuosa al 0.2% (v/v) de ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico. La mezcla se guardó en la oscuridad durante 35 min y posteriormente se midió su absorbancia a 420 nm. El cálculo de la concentración de grupos amino libres se realizó a partir de una recta de calibrado construida mediante disoluciones patrón de Ac-Lys.

1.3 TRATAMIENTO MATEMÁTICO DE RESULTADOS EXPERIMENTALES

1.3.1 RESULTADOS CINÉTICOS.

La variación temporal de la concentración de reactivos y productos determinada en el análisis cinético de las diferentes mezclas de reacción se ajustó a su respectivo esquema cinético. El ajuste se realizó mediante el método *GEAR*, un método multipaso de integración implícita de ecuaciones

diferenciales [GEAR, 1971], calificado por Farrow y Edelson [FARROW, 1974] como un método totalmente válido para la resolución de ecuaciones cinéticas.

El método GEAR considera un conjunto de reacciones elementales representadas por la expresión:

$$\sum_{i=1}^{ns} v_{i,j} [X_i] = 0 \quad j=1, \dots, nr \quad (1)$$

donde X_i representa cada una de las ns especies implicadas en el conjunto nr de reacciones químicas y $v_{i,j}$ los coeficientes estequiométricos (positivos para los productos y negativos para los reactivos).

A partir de ellas el método construye las derivadas de las concentraciones de cada especie en función del tiempo, que se definen en la ecuación 2.

$$\frac{d[X_i]}{dt} = \sum_{j=1}^{nr} v_{i,j} \left(k_j \prod_{l=1}^{ns} [X_l]^{-v_{l,j}} \right) \quad (2)$$

donde $[X_l]$ representa la concentración de las especies reactivas de cada reacción y $v_{l,j}$ sus coeficientes estequiométricos, a su vez que k_j representa la constante cinética de cada reacción química.

La integración de la ecuación 2 la realiza mediante la aplicación de la subrutina *DIFSUB*, implementada en el mismo método GEAR [GEAR, 1971]. Los parámetros cinéticos de las ecuaciones que forman la expresión 2 se determinan a partir de la matriz Jacobiana construida con las expresiones integradas. La resolución de dicha matriz se realiza aplicando el algoritmo 407, implícito en el método utilizado [STABLER, 1978].

La aplicación del método GEAR fue realizado utilizando el programa GIT [STABLER, 1978][WEIGERT, 1987]. Para el ajuste se suministró al programa el esquema cinético y la variación temporal de las concentraciones de las diferentes especies implicadas en la reacción.

El método GEAR, y por extensión el programa GIT, únicamente son capaces de ajustar la variación temporal de la concentración de ns especies que forman un conjunto de nr reacciones al esquema cinético correspondiente. Sin embargo, para el estudio cinético de algunas de las reacciones detalladas en esta memoria ha sido imprescindible el ajuste de la variación temporal de la absorbancia total de la mezcla de reacción a un esquema cinético. Dicho proceso ha sido realizado mediante la aplicación del método de Livermore modificado, el LSODE [RADHAKRISHNAN, 1993]. Este método, a diferencia del GEAR,

introduce un factor de corrección en el ajuste que permite relacionar la variación de la absorbancia total con la concentración de cada una de las especies implicadas en la reacción. Después de cada ajuste, los valores de los residuales fueron evaluados mediante la aplicación del algoritmo de *Marquardt-Levenberg* modificado por *Reich* [REICH, 1992].

La aplicación del método descrito se realizó mediante el programa DynaFit [Kuzmrc, 1996]. Los datos para el ajuste se suministran en dos archivos previos, uno en donde se incluyen los datos de absorbancia frente al tiempo y otro en el que se detallan los parámetros de ajuste, el mecanismo de reacción, el valor inicial de las constantes, las concentraciones iniciales de reactivos y productos y la magnitud molar para cada especie (en nuestro caso absorptividad molar) (mostrado en la figura 2.1).

```
;DYNAFIT script file ./Miquel/cysteine
;-----
[task]
data = progress
task = fit
model= tio1
[mechanism]
SH <=> S : k1 k2
GLH <=> GL : k3 k4
S + GL <=> TH : k5 k6
[constants]
k1= 25, k2 = 19230, k3 = 0.114, k4 = 7.788, k5 = 0.662e7 ?, k6 = 0.47 ?
[concentrations]
SH = 0.002996
S = 3.89e-6
GLH = 0.0098
GL = 0.00019
TH = 0
[responses]
SH = 0, S = 1.22, GLH = 13.03, GL = 0, TH = 210 ?
[progress]
file ./Miquel/cysteine/data/cys.txt
[end]
```

Figura 2.1. Fichero de entrada utilizado en el ajuste realizado mediante el DynaFit.

1.3.2 RESULTADOS ESPECTROSCÓPICOS.

Siano y Metzler [SIANO, 1969] demostraron que las curvas de distribución log-normales se ajustan perfectamente a la forma de los espectros de absorción UV/Vis de los vitámeros B₆. En la figura 2.2 se muestra como ejemplo, el espectro UV/Vis del PLP en la zona de $(20 \text{ a } 40) \cdot 10^3 \text{ cm}^{-1}$ y su deconvolución en tres curvas de distribución log-normal, cada una de ellas asignable a un tránsito electrónico.

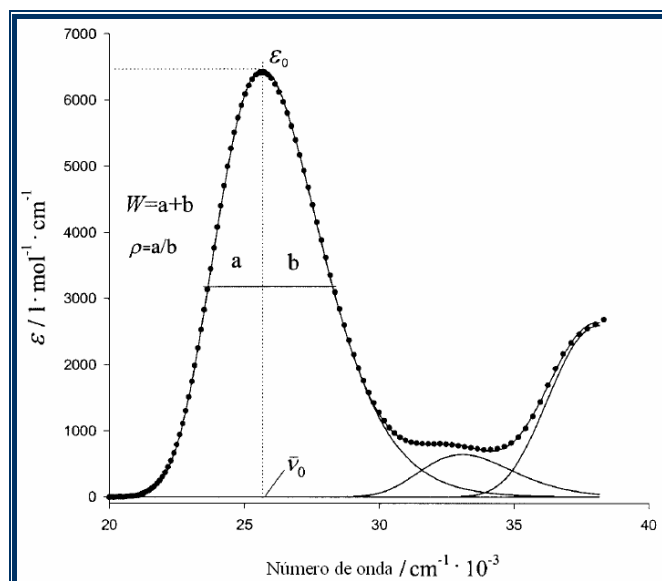


Figura 2.2. Espectro de absorción del PLP a pH 10.0. El espectro de absorción (puntos) se ajusta a tres bandas correspondientes a curvas log-normales. El ajuste de las curvas log-normales al espectro se representa en forma de línea.

La función que define las curvas de distribución log-normales proviene de la modificación logarítmica de las funciones gaussianas (o normales) y tiene la siguiente expresión:

$$\varepsilon(\bar{\nu}) = \varepsilon_0 \exp \left[- \left\{ \frac{\ln 2}{(\ln \rho)^2} \left[\ln \left(\frac{(\bar{\nu} - \bar{\nu}_0)(\rho^2 - 1)}{W\rho} + 1 \right) \right]^2 \right\} \right] \quad (3) \quad \text{si } \bar{\nu} > \bar{\nu}_0 - \frac{W\rho}{\rho^2 - 1}$$

$$\text{o } \varepsilon(\bar{\nu}) = 0 \quad (4) \quad \text{si } \bar{\nu} < \bar{\nu}_0 - \frac{W\rho}{\rho^2 - 1}$$

donde $\varepsilon(\bar{\nu})$ es el coeficiente de absorción molar para cada número de onda ($M^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), $\bar{\nu}_0$ es la posición del máximo de absorción (cm^{-1}), ε_0 es el coeficiente de absorción molar en el máximo de la banda ($M^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), W es la anchura de banda (cm^{-1}) medida a $\varepsilon_0/2$ y ρ la asimetría de banda. El valor de ρ es > 1 para las funciones log-normales, mientras que para las funciones gaussianas vale 1 [SIANO, 1972].

Para realizar la deconvolución de los espectros UV/Vis de cada una de las formas iónicas de cada vitámero B_6 se utilizó el programa PeakFit v4.0 [PEAKFIT, 1995]. El número de bandas del ajuste, así como sus parámetros de posición, área, asimetría y altura, se optimizaron para obtener el mejor ajuste teórico al espectro experimental (ver figura 2.3). La deconvolución de los espectros permitió asociar cada curva log-normal obtenida a una especie de hidratación y/o de tautomería.

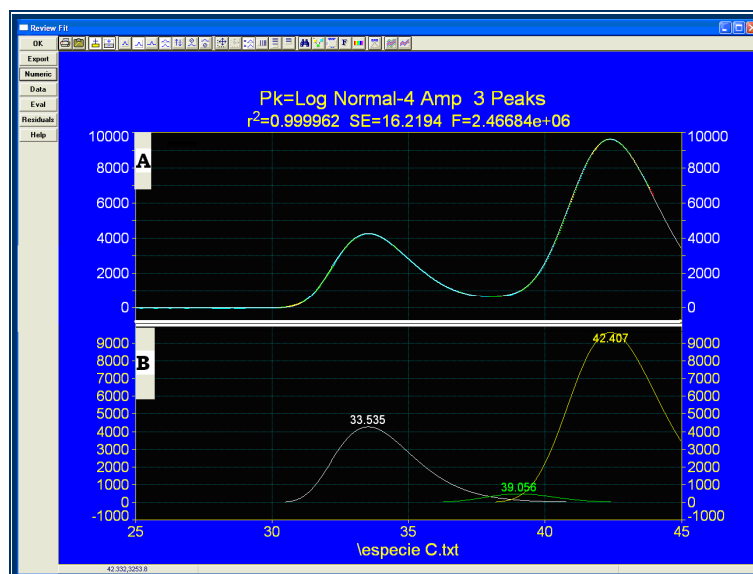


Figura 2.3. (A) Ajuste de los datos experimentales obtenidos en el estudio UV/Vis de la PM a curvas log-normales. (B) Curvas log-normales utilizadas en el ajuste.

El ajuste de los espectros de absorción a una combinación de n curvas log-normales se realizó mediante el algoritmo de *Marquardt-Levenberg*, implementado en el software utilizado [MARQUARDT, 1963]. La deconvolución se consideró satisfactoria cuando los ajustes mostraron una desviación $< 2\%$ entre los resultados teóricos y experimentales.

A partir del ajuste teórico de los espectros UV/Vis se calculó el área de la banda de absorción para cada tautómero ($M^{-1}\cdot cm^{-2}$) y se determinaron sus fracciones molares. La fracción molar $x(i)$ para cada tautómero se definió como el cociente entre el área de banda $a(i)$ y la correspondiente área molar $a^0(i)$, cumpliéndose a cada pH que:

$$\sum \frac{a(i)}{a^0(i)} = \sum x(i) = 1 \quad (5)$$

1.3.4 OTROS RESULTADOS.

El tratamiento matemático y estadístico de los datos experimentales obtenidos en este trabajo se realizó utilizando el programa SigmaPlot v.9.00 [SIGMAPLOT, 1997]. Este programa también utiliza el algoritmo de *Marquardt-Levenberg* [MARQUARDT, 1963] para el ajuste. El SigmaPlot v.9.00 se utilizó en los siguientes procesos:

➤ **Determinación de las constantes de proporcionalidad entre las áreas de las señales cromatográficas y las concentraciones de los compuestos estudiados.**

Para compuestos comerciales, el coeficiente de proporcionalidad entre el área cromatográfica y su concentración se determinó mediante la construcción de rectas de calibrado a partir de disoluciones patrón. En el caso de los compuestos no comerciales, los coeficientes de proporcionalidad, c_{Xi} , se determinaron a partir del ajuste de los datos de variación temporal del área de las señales cromatográficas a la ecuación 6.

$$\sum_{i=1}^{i=n} [X_i]_t = \sum_{i=1}^{i=n} c_{Xi} (Area_{Xi})_t \quad (6)$$

en donde $[X_i]_t$ es la concentración de cada especie implicada en la reacción a cada tiempo, $(Area_{Xi})_t$ es el área cromatográfica de cada especie implicada en la reacción a cada tiempo y c_{Xi} es el coeficiente de proporcionalidad entre el área cromatográfica y la concentración.

➤ **Determinación de las constantes de velocidad correspondientes a reacciones de primer orden o de pseudo-primer orden.**

Las constantes de velocidad correspondientes a reacciones de primer orden (degradación de reactivos) o bien de pseudo-primer orden, fueron determinadas mediante el ajuste de los datos experimentales a la ecuación diferencial integrada 7.

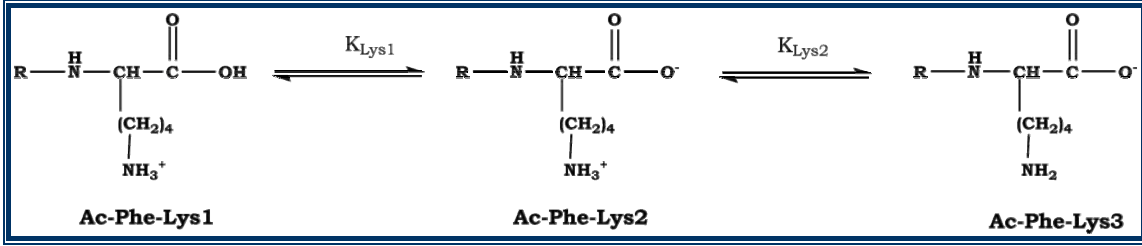
$$-\frac{dP}{dt} = kP \xrightarrow{\text{integrando}} P = P_0 e^{-kt} \rightarrow \ln P = \ln P_0 - kt \quad (7)$$

donde P representa la magnitud observada (concentración, área, absorbancia,...) y k la constante cinética.

➤ **Determinación de las constantes de ionización mediante valoración potenciométrica.**

La determinación de las constantes de ionización de la Ac-Phe-Lys y de la Ac-Cys fueron realizadas mediante valoración potenciométrica utilizando un pH-Stat de la marca *Metrohm*, modelo *Titrimo 718*, tal y como se ha descrito en el apartado 1.1.6 de este capítulo.

Las ecuaciones 8 y 9 definen el valor de las constantes de ionización para el dipéptido Ac-Phe-Lys, representadas en el esquema 2.1.



Esquema 2.1. Equilibrios iónicos correspondientes a la Ac-Phe-Lys.

$$K_{\text{Lys1}} = \frac{[\text{Ac - Phe - Lys2}][\text{H}^+]}{[\text{Ac - Phe - Lys1}]} \quad (8)$$

$$K_{\text{Lys2}} = \frac{[\text{Ac - Phe - Lys3}][\text{H}^+]}{[\text{Ac - Phe - Lys2}]} \quad (9)$$

Por otra parte, la concentración total de dipéptido durante la titración ($[\text{Ac-Phe-Lys}]_T$) viene dada por la ecuación 10, en la que $[\text{Ac-Phe-Lys}]_{T0}$ es la concentración total de dipéptido antes de adicionar valorante, V_0 el volumen inicial y V_{add} el volumen de valorante adicionado.

$$[\text{Ac - Phe - Lys}]_T = [\text{Ac - Phe - Lys1}] + [\text{Ac - Phe - Lys2}] + [\text{Ac - Phe - Lys3}] = \frac{[\text{Ac - Phe - Lys}]_{T0} V_0}{V_0 + V_{\text{add}}} \quad (10)$$

La sustitución de las ecuaciones 8 y 9 en la ecuación 10 y su posterior reordenación produce la siguiente ecuación:

$$\frac{[\text{Ac - Phe - Lys}]_{T0} V_0}{V_0 + V_{\text{add}}} = [\text{Ac - Phe - Lys1}] \left(1 + \frac{K_{\text{Lys1}}}{[\text{H}^+]} + \frac{K_{\text{Lys1}} \cdot K_{\text{Lys2}}}{[\text{H}^+]^2} \right) \quad (11)$$

La condición de electroneutralidad del sistema viene dada por la ecuación 12

$$[\text{Ac - Phe - Lys1}] + [\text{H}^+] + [\text{Na}^+] = [\text{Ac - Phe - Lys3}] + [\text{OH}^-] + [\text{Cl}^-] \quad (12)$$

La combinación de las ecuaciones 11 y 12 produce finalmente la ecuación 13.

$$V_{\text{add}} = [\text{Ac - Phe - Lys}]_{T0} V_0 \cdot \frac{1 - \frac{K_{\text{Lys1}} \cdot K_{\text{Lys2}}}{[\text{H}^+]^2}}{1 - \frac{K_{\text{Lys1}}}{[\text{H}^+]} + 1 - \frac{K_{\text{Lys1}} \cdot K_{\text{Lys2}}}{[\text{H}^+]^2}} - \frac{[\text{HCl}]}{[\text{Ac - Phe - Lys}]_{T0}} + \frac{[\text{H}^+]}{[\text{Ac - Phe - Lys}]_{T0}} - \frac{K_w}{[\text{H}^+] [\text{Ac - Phe - Lys}]_{T0}} \quad (13)$$

$$[\text{HCl}] - [\text{H}^+] + \frac{K_w}{[\text{H}^+]} - [\text{NaOH}]$$

Las constantes de equilibrio de ionización K_{Lys1} y K_{Lys2} fueron determinadas ajustando la variación del volumen de valorante en función del pH a la ecuación 13. En la figura 2.4 se muestra también el resultado del mejor ajuste obtenido.

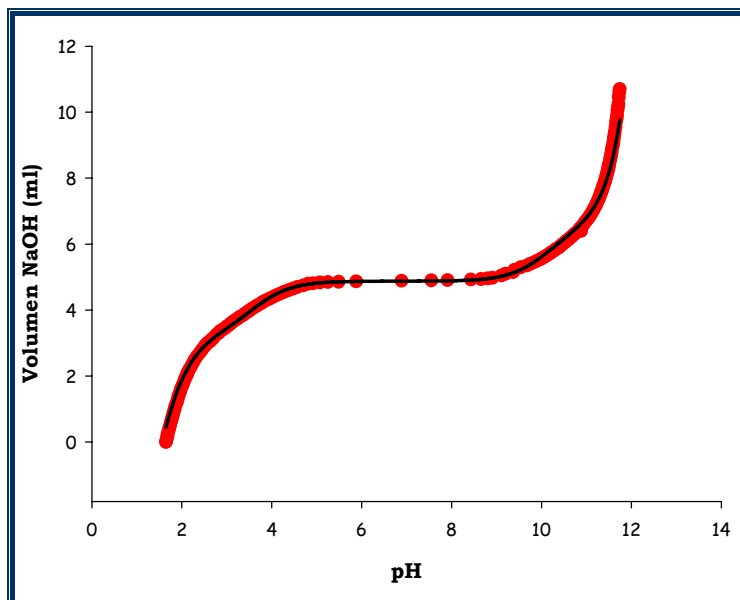


Figura 2.4. Valoración ácido-base de una disolución de Ac-Phe-Lys. Los valores experimentales se representan como puntos rojos, mientras que su ajuste a la ecuación 13 se representa en forma de línea.

METODOLOGÍA

METODOLOGÍA TEÓRICA

Las conformaciones más estables de las formas lineales de las hexosas y las pentosas fueron determinadas mediante la técnica de simulación de Monte Carlo. Para ello se utilizó el campo de fuerza AMBER* y el método del continuo GB/SA [STILL, 1990] (con el fin de simular la solvatación) implementados en el programa Macro-Model v.6.0 [MOHAMADI, 1990].

La geometría de la estructura que presentaba el mínimo energético y las que diferían de ella en 15 kcal/mol, se optimizaron mediante metodología semiempírica utilizando el hamiltoniano AM1 [DEWAR, 1985]. También se optimizaron mediante la misma metodología las estructuras de diferentes aminas como la PM, la 4-aminometilpiridina y la Ac-Phe-Lys, utilizando en este caso el hamiltoniano PM3 [STEWART, 1989]. Todas las minimizaciones semiempíricas se realizaron utilizando el programa AMPAC v. 8.0 [AMPAC, 2004] e incluyendo el efecto del disolvente acuoso mediante la aplicación del método del continuo COSMO [KLAMT, 1995]. Las cargas atómicas fueron calculadas utilizando los métodos de Mulliken [MULLIKEN, 1955] y el del potencial electrostático (EPS) de Kollman [BESLER, 1990].

Las estructuras de mínima energía obtenidas para las aldosas fueron optimizados de nuevo mediante metodología DFT, utilizando para ello el programa Gaussian98 [FRISCH, 1998]. Para la optimización se utilizó el funcional de la densidad B3LYP [LEE, 1988] y las bases 6-31+G*. El efecto de la solvatación se incluyó en la optimización utilizando el método del continuo PCM [MIERTUS, 1981]. Las cargas atómicas se calcularon mediante NBO (*natural bond orbitals*) [REED, 1988].

La estructura de la forma monocatiónica de la BS formada entre la PM y el formaldehído, así como la de su isómero hemiaminal (ambas mostradas en el esquema 4.1 del capítulo 4), fue optimizada mediante metodología MP2 [FRISCH, 1990] utilizando las bases 6-311++G**. El efecto de la solvatación se incluyó en la optimización utilizando el método del continuo PCM [MIERTUS, 1981]. El espectro UV/Vis de las estructuras optimizadas se calculó mediante la teoría del funcional de la densidad dependiente del tiempo (TD-DFT) [STRATMANN, 1998]. El TD-DFT representa un método eficiente en el cálculo de energías de excitación y utiliza para ello un campo eléctrico variable con el tiempo. Los cálculos TD-DFT fueron realizados utilizando el método del continuo (PCM) y el funcional hcth [HAMPRECHT, 1998], todo ello en conjunción con la base de Dunning aug-cc-PVDZ (*augmented correlation-consistent polarized valence double-zeta basis set*) [DUNNING, 1989].

CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA TEÓRICA

Todos los cálculos se realizaron mediante un ordenador Silicon Graphics Origin 200 R-10000, un PC y mediante el ordenador HP CP4000 del Centro de Supercomputación de Cataluña (CESCA).

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

RESULTADOS

ARTÍCULO I. Photo-induced processes in vitamin B₆ compounds.

B. Vilanova, M. Adrover, F. Muñoz, J. Donoso,
Photo-Induced Processes in Vitamin B6
Compounds, **Chem. Biodivers.**, **1**, **2004**, **1073-**
1090

RESULTADOS

ARTÍCULO II. Inesperado equilibrio isomérico de las bases de Schiff de piridoxamina.

**INESPERADO EQUILIBRIO ISOMÉRICO DE LAS BASES DE
SCHIFF DE PIRIDOXAMINA.**

MIQUEL ADROVER, BARTOLOMÉ VILANOVA, FRANCISCO MUÑOZ, JOSEFA DONOSO.

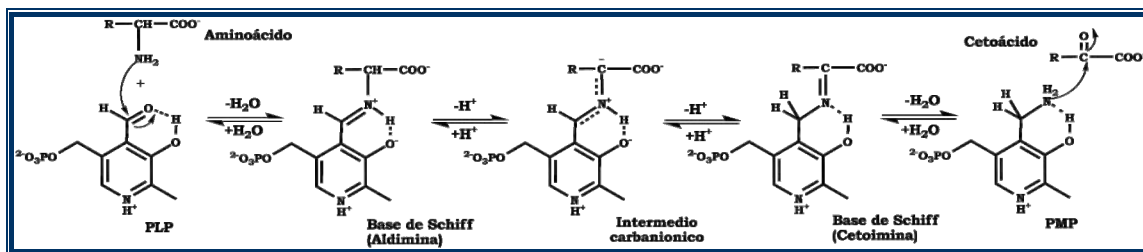
Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut (IUNICS). Departament de Química.
Universitat de les Illes Balears. Cra. Valldemossa km 7.5, Ed. Mateu Orfila i Rotger, E-07122,
Palma de Mallorca, Spain.

RESUMEN

Las reacciones de la piridoxamina y de la 4-aminometilpiridina con diferentes compuestos carbonílicos (propanal, formaldehído y ácido pirúvico) han sido estudiadas a pH 7.4 mediante espectroscopia UV/Vis y de RMN. Los resultados obtenidos demuestran que la 4-aminometilpiridina forma una base de Schiff como producto final de su reacción con el propanal y con el ácido pirúvico, mientras que su reacción con el formaldehído concluye con la formación de una carbinolamina. Las reacciones de la piridoxamina finalizan con la formación de una base de Schiff que presenta equilibrio isomérico con su forma hemiaminal, producida debido al ataque del fenolato piridínico sobre el carbono imínico. La elucidación del mecanismo de reacción ha posibilitado el estudio cinético y termodinámico de las reacciones de la piridoxamina.

INTRODUCCIÓN

El 5'-fosfato de piridoxamina (PMP) y el 5'-fosfato de piridoxal (PLP), vitámeros de la vitamina B₆, están implicados en multitud de procesos catalíticos, ya que actúan como cofactores enzimáticos. La mayoría de enzimas que catalizan las reacciones implicadas en el metabolismo de los aminoácidos, como la transaminación, la desaldolación, la β-eliminación, etc., dependen del PLP. En ellas, el PLP forma inicialmente una base de Schiff con el grupo amino del aminoácido, que posteriormente evoluciona hacia los productos finales [CHRISTEN, 1985][JANSONIUS, 1998]. Hay que indicar que el PMP es también cofactor de enzimas como la *CDP-6-desoxi-L-treo-D-glicero-4-hexulosa-3-deshidrasa*, la cual cataliza la reacción de desoxigenación implicada en la biosíntesis de 3,6-didesoxihexosas [THORSON, 1993].



Esquema 1. Mecanismo general de la transaminación.

En la transaminación, cuyo mecanismo se representa en el esquema 1, la base de Schiff del PLP sufre desprotonación de su C_α y genera un intermedio carbaniónico estabilizado por resonancia [MARTELL, 1984]. La protonación de este intermedio forma una cetoinmina que hidroliza hacia el PMP y el cetooácido correspondiente. La transaminación concluye con la entrada de otro cetooácido que condensa con el PMP dando una carbinolamina, que deshidrata formando una nueva base de Schiff (cetoinmina). La evolución de esta nueva base de Schiff finaliza con la liberación de un nuevo aminoácido y la recuperación del PLP [CHRISTEN, 1985].

Las bases de Schiff del PLP están estabilizadas por resonancia gracias a la conjugación entre el grupo imina y el anillo piridina [METZLER, 1988]. Este hecho afecta a sus características espectroscópicas, tanto UV/Vis [SHALTIEL, 1970] como de RMN [HARRUFF, 1976][DALLING, 1976] y ha posibilitado su estudio cinético y termodinámico [SÁNCHEZ-RUIZ, 1982][VÁZQUEZ, 1992A]. Además, en diversos trabajos se ha estudiado la influencia de parámetros como la temperatura [WIESINGER, 1984][GARCÍA DEL VADO, 1987][ECHEVARRÍA, 2005], la polaridad

ARTÍCULO II. INESPERADO EQUILIBRIO ISOMÉRICO DE LAS BASES DE SCHIFF DE PIRIDOXAMINA

del medio [VÁZQUEZ, 1992B][GARCÍA DEL VADO, 1988][ECHEVARRÍA, 2003], etc., sobre su estabilidad.

A pesar de su importancia en los procesos biológicos, las bases de Schiff formadas entre cetoácidos y el PMP (o con su análogo no fosforilado: la piridoxamina (PM)) han sido poco estudiadas. La ausencia de conjugación imina-piridina hace que su equilibrio imínico esté poco desplazado y que los cambios espectroscópicos asociados a su formación sean mínimos [YUEN, 1985]. Kubala y Martell [KUBALA, 1983] determinaron las constantes de equilibrio de formación de bases de Schiff entre la PM y diferentes cetoácidos. Los restantes trabajos realizados en este sentido incorporan iones metálicos al medio de reacción (Zn^{2+} , Al^{3+} o Cu^{2+}) que desplazan el equilibrio hacia la imina y facilitan su detección espectroscópica [ZIMMERMAN, 1983][MATSUSHIMA, 1967].

Por otra parte, Booth *et al.* [BOOTH, 1999] demostraron que la PM es capaz de inhibir los procesos patológicos de glicación y lipoxidación proteica asociados a la diabetes mellitus [ULRICH, 2001][RAHBAR, 2002]. Uno de sus mecanismos de actuación es el secuestro de compuestos carbonílicos capaces de modificar las proteínas. La PM reacciona con ellos formando una base de Schiff [VOZIYAN, 2005], por lo que la comprensión de la cinética y mecanismo de formación de las bases de Schiff de PM es un tema de gran importancia en la elucidación de su mecanismo de acción farmacológica. Los estudios cinéticos realizados en este sentido son escasos, aunque recientemente, nuestro grupo ha determinado, en condiciones reductoras, las constantes cinéticas de formación de bases de Schiff de PM con compuestos implicados en la glicación [ADROVER, 2008A].

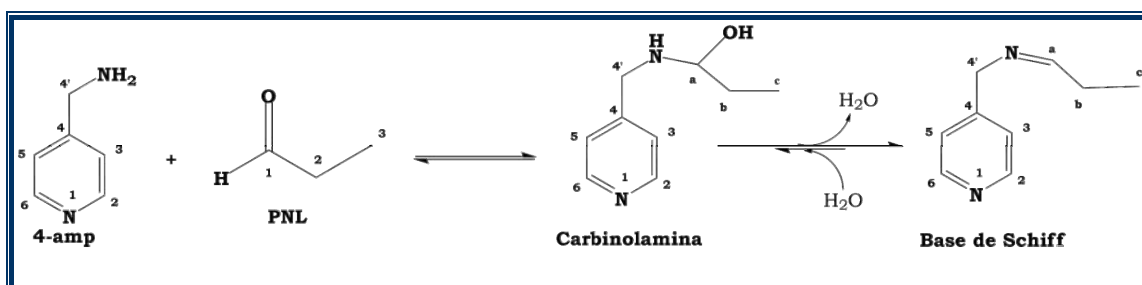
En este trabajo se ha estudiado la reacción de la PM y de la 4-aminometilpiridina (4-amp) con el ácido pirúvico (PVR), el propanal (PNL) y el formaldehído (FA) en tampón fosfato 0.5 M a pH 7.4. Experimentos de RMN y UV/Vis han revelado que la reacción de la 4-amp con el PVR y el PNL concluye formando una imina, mientras que su reacción con el FA genera una carbinolamina. Los resultados obtenidos revelan por primera vez que las bases de Schiff de PM presentan equilibrio isomérico con un compuesto hemiaminal, producto del ataque del fenolato sobre el carbono imínico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

► Reacción de la 4-aminometilpiridina (4-amp) con el PVR, el PNL y el FA.

La 4-amp, representada en el esquema 2, es un compuesto análogo a la PM, cuyo grupo amino es mucho más reactivo que el de la PM [CRUGEIRAS, 2005][ADROVER, 2008B]. Conocida la reactividad entre grupos amino de cadenas alifáticas y grupos carbonílicos, es de esperar que el producto de la reacción entre la 4-amp y compuestos carbonílicos sea una base de Schiff.

La reacción de la 4-amp con el PVR, el PNL y el FA se estudió mediante espectroscopia UV/Vis. Los resultados obtenidos no revelaron variación espectral a medida que se incrementó la concentración del compuesto carbonílico con respecto a la concentración de 4-amp.



Esquema 2. Mecanismo de reacción entre la 4-amp y el PNL.

En el esquema 2 se muestra el mecanismo de reacción entre la 4-amp y el PNL. El espectro de ^1H -RMN correspondiente a la mezcla de reacción, mostrado en la figura 1, evidenció la aparición de una nueva señal singlete a 9.30 ppm que no fue detectada en los espectros de ^1H -RMN de cada uno de los reactivos. Esta señal se atribuyó al H-C(a) de la base de Schiff formada, ya que su valor está en el rango de desplazamiento descrito para los protones imínicos [HESSE, 1995][EVANS, 1988][MATSUSHIMA, 1968]. No se observó el desdoblamiento de dicha señal a consecuencia de su acoplamiento con los protones del C(b) vecinal, al igual que lo ocurrido con la señal correspondiente al H-C(1) del PNL. Este hecho se debe al escaso valor de las constantes de acoplamiento entre los protones imínicos y aldehídicos con los protones vecinos unidos a un carbono saturado [HESSE, 1995]. Por otra parte no se detectaron señales asignables a la carbinolamina. El análisis de la mezcla de reacción por LC-MSD reveló que la señal mayoritaria del espectro era la que presentaba una relación $m/z = 149.3$, acorde con el valor $[\text{M}+\text{H}]^+$ de la base de Schiff formada. Los resultados experimentales demuestran claramente que la

ARTÍCULO II. INESPERADO EQUILIBRIO ISOMÉRICO DE LAS BASES DE SCHIFF DE PIRIDOXAMINA

base de Schiff es el producto mayoritario de la reacción entre la 4-amp y el PNL.

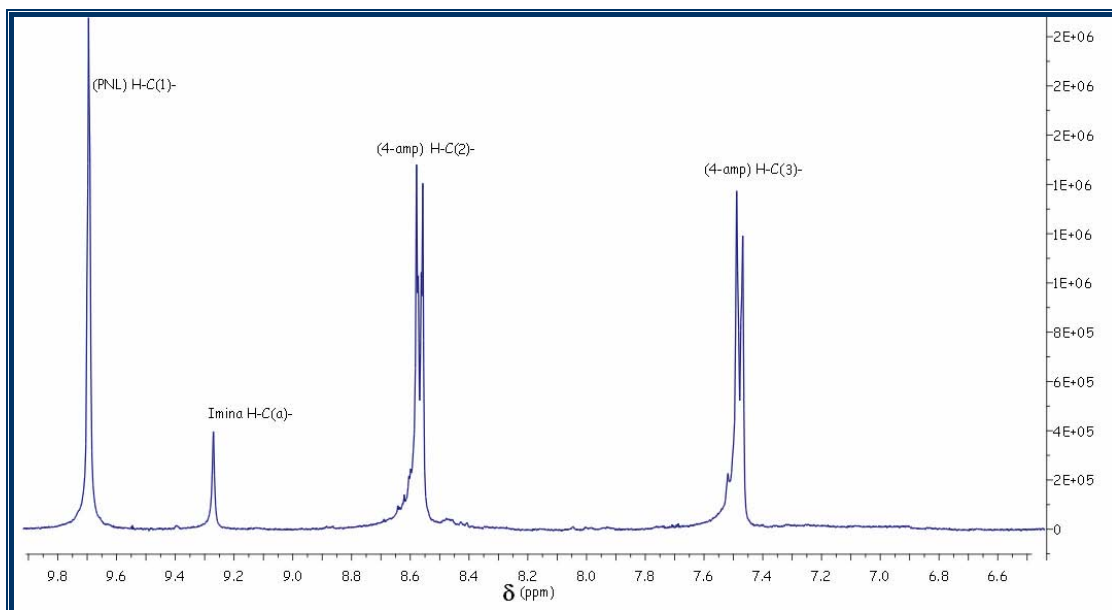
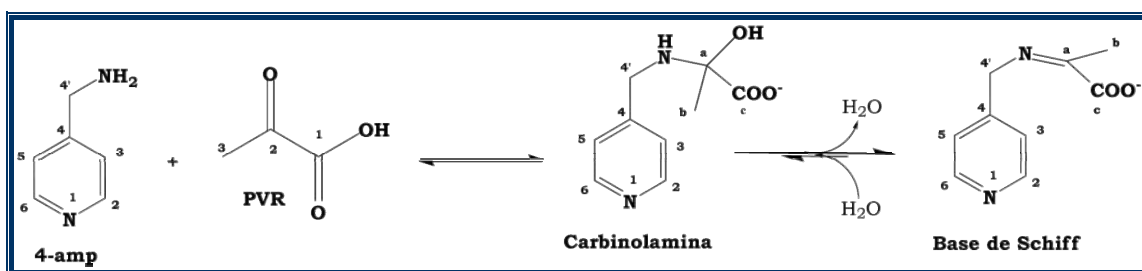


Figura 1. Espectro de ^1H -RMN de la mezcla de reacción entre la 4-amp y el PNL a pH 7.4.

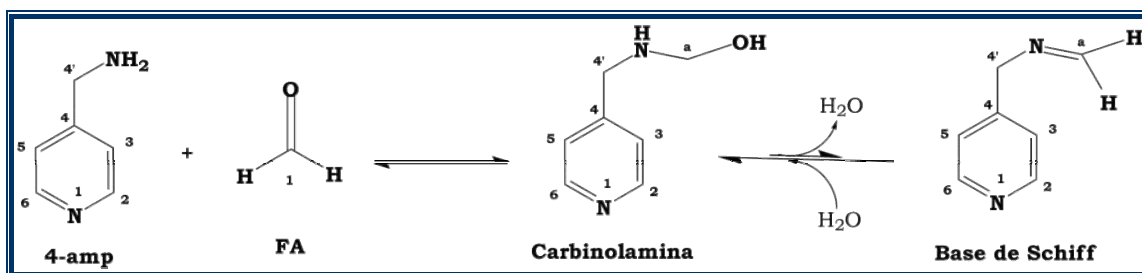


Esquema 3. Mecanismo de reacción entre la 4-amp y el PVR.

La reacción entre la 4-amp y el PVR, cuyo mecanismo se representa en el esquema 3, se estudió también por RMN. Su espectro de ^1H -RMN no mostró variación destacable en sus señales con respecto al espectro de cada uno de los reactivos. En cambio, su espectro de ^{13}C evidenció la aparición de una pequeña señal a 171 ppm correspondiente a un carbono cuaternario. Este valor está dentro del intervalo de desplazamiento descrito para protones imínicos disustituidos [HESSE, 1995][FRASER, 1981], lo que es clara evidencia de la formación de una base de Schiff como producto de su reacción.

Así mismo también se estudió por RMN la reacción entre la 4-amp y el FA, cuyo mecanismo se representa en el esquema 4.

**ARTÍCULO II. INESPERADO EQUILIBRIO ISOMÉRICO DE LAS BASES DE SCHIFF DE
PIRIDOXAMINA**



Esquema 4. Mecanismo de reacción entre la 4-amp y el FA.

En la Tabla 1 se muestran los valores de ^1H - y ^{13}C -RMN de la 4-amp y de su mezcla de reacción con el FA. La comparación entre ambos muestra un ligero desplazamiento de los picos correspondientes a los protones aromáticos con respecto a su valor en la 4-amp. Sin embargo, la señal correspondiente a los protones del C(4') se desplazó 0.5 ppm hacia campo alto. El análisis de la mezcla de reacción por ^{13}C -RMN reveló un desplazamiento hacia campo bajo (de 13 ppm) de la señal correspondiente al C(4') y la aparición de una nueva señal a 74.7 ppm, que se asignó a un $-\text{CH}_2$ (determinado mediante la técnica de DEPT-135). Los experimentos de RMN no revelaron la presencia de ninguna señal asignable a los protones imínicos, lo que demuestra que la reacción entre la 4-amp y el FA está desplazada hacia la formación de la carbinolamina. Este hecho se confirmó analizando la mezcla de reacción mediante LC-MSD. El espectro obtenido mostró una señal mayoritaria con una relación $m/z=121.0$, acorde al valor $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ de la carbinolamina formada.

Tabla 1. Datos de ^1H - y ^{13}C -RMN de la 4-amp del FA y de su producto de reacción.

Datos espectroscópicos de RMN (ppm)	
4-amp	^1H: 8.58 (d, 1H, $^3J_{\text{H}_2-\text{H}_3}=6.2$ Hz, H-C(2)); 7.51 (d, 1H, H-C(3)); 4.26 (s, 2H, H-C(4')).
	^{13}C: 151.9 C(2); 146.2 C(4); 126.2 C(3); 44.4 C(4').
FA	^1H: 4.82(s, 2H, H-C(1)) -forma hidratada-.
	^{13}C: 84.4 C(1) -forma hidratada-.
4-amp + FA	^1H: 8.42 (d, 1H, $^3J_{\text{H}_2-\text{H}_3}=6.0$ Hz, H-C(2)); 7.37 (d, 1H, H-C(3)); 3.74 (s, 2H, H-C(4')); nd* (s, 2H, H-C(a)).
	^{13}C: 151.0 C(2); 146.1 C(4); 127.3 C(3); 74.7 C(a); 57.4 C(4').
* No pudo ser determinada, ya que experimentos bidimensionales demostraron que se encontraba bajo la señal de D_2O .	

Los resultados obtenidos concuerdan con los propuestos por *Kallen* y colaboradores [*KALLEN, 1966*]/[*ABRAMS, 1976*], los cuales demuestran que debido a su elevada estabilidad, la carbinolamina formada entre grupos amino y el FA

está poco desplaza hacia su base de Schiff. A pesar de ello, existen pruebas que confirman su formación, ya que la adición de NaCNBH_3 (compuesto que a pH neutro reduce selectivamente los grupos imina sin afectar a los grupos carbonilos [BORCH, 1971]) a las mezclas de reacción genera compuestos *N*-metilados [GIDLEY, 1982][MEANS, 1995]. Además, se ha observado que en presencia de reductor y en función de las condiciones de reacción, la carbinolamina puede adicionar una segunda molécula de FA dando el *N*-dihidroximetil derivado [VERARDO, 1995].

➤ **Reacción de la piridoxamina (PM) con el PVR, el PNL y el FA.**

Conocida la reactividad química de la 4-amp frente a los electrófilos estudiados, es de esperar que la reacción de la PM con dichos compuestos transcurra mediante la formación inicial de una carbinolamina, de elevada estabilidad para el FA y que en el caso del PNL y del PVR deshidrate para formar la base de Schiff final.

A diferencia de lo observado en la reacción entre la 4-amp y el PNL, el estudio UV/Vis de la reacción de la PM con el PNL reveló la existencia de cambios espectroscópicos asociados al incremento de la concentración de PNL con respecto a la de PM. Tal y como se representa en la figura 2, se observó un descenso en la intensidad de las bandas centradas a 321 y a 249 nm (características del tautómero mayoritario de la PM a pH neutro [GANSOW, 1968B]) y de manera simultánea, un incremento en la intensidad de una nueva banda centrada a 280 nm.

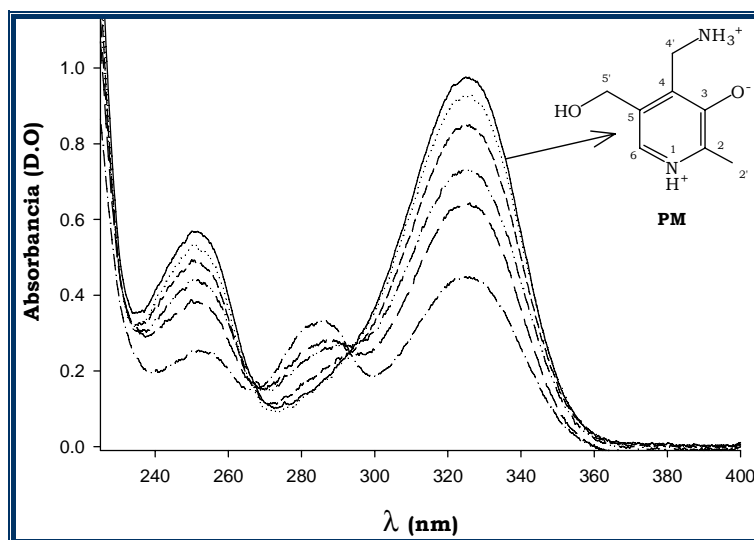


Figura 2. Variación del espectro UV/Vis de la PM (0.1 mM) a medida que se incrementa la concentración de PNL. [PNL]= 0 mM (—); 5 mM (·····); 25 mM (- - -); 50 mM (·-·-·); 100 mM (— —); 250 mM (·-·-·).

El espectro de ^1H -RMN de la mezcla de reacción entre la PM y el PNL (figura 3) mostró la disminución de las área de los picos asociados al H-C(2'), al H-C(4') y al H-C(6) de la PM. De manera simultánea, reveló la aparición de nuevas señales a 9.30 ppm, a 7.95 ppm, a 4.13 ppm y a 2.43 ppm. *Gansow y Holm [GANSOW, 1969]* estudiaron por ^1H -RMN las bases de Schiff de PM. En su trabajo concluyeron que el pico correspondiente al H-C(6) de la base de Schiff era la señal que sufría mayor variación con respecto a su homóloga en la PM (0.3 ppm hacia campo bajo), mientras que en presencia de iones metálicos esta señal únicamente se desplazaba 0.1 ppm.

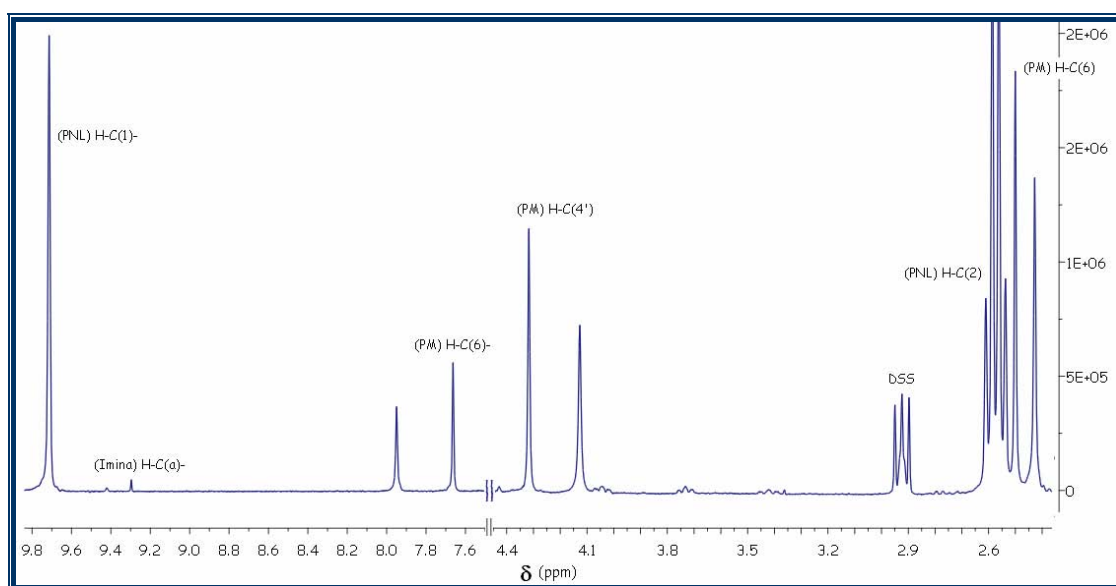


Figura 3. Espectro ^1H -RMN de la mezcla de reacción entre la PM y el PNL a pH 7.4.

Los resultados de ^1H -RMN obtenidos en el estudio de la reacción entre la 4-amp y el PNL demuestran que la señal a 9.30 ppm (figura 3) corresponde al protón imínico de la base de Schiff formada. El área de este pico es mucho menor que el área del pico que aparece a 7.95 ppm y que *Gansow y Holm [GANSOW, 1969]* atribuyeron al H-C(6) de las bases de Schiff de PM. Este hecho demuestra claramente que la señal aparecida a 7.95 ppm no puede asociarse a una base de Schiff. El análisis de la mezcla de reacción mediante LC-MSD muestra que la señal mayoritaria, la de relación $m/z= 209.1$, se corresponde a la señal $[\text{M}+\text{H}]^+$ de un compuesto de idéntico peso molecular al de la base de Schiff esperada.

En la figura 4 se muestra el estudio UV/Vis de la reacción entre la PM y el FA. Al incrementar la concentración de FA con respecto a la de PM se observaron los mismos cambios espectroscópicos descritos para la reacción

entre la PM y el PNL, aunque de manera más acusada. La total desaparición de las bandas centradas a 321 y a 249 nm (características de la PM a pH 7.4) en el espectro de la mezcla de reacción que era 0.1 mM de PM y 200mM de FA demuestra, que en dichas condiciones, la reacción se encuentra totalmente desplazada hacia los productos finales.

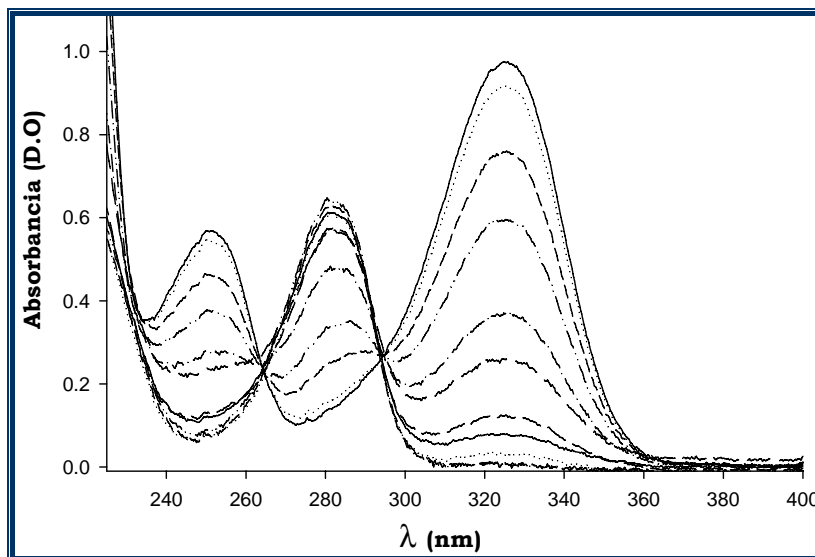


Figura 4. Variación del espectro UV/Vis de la PM (0.1 mM) a medida que se incrementa la concentración de FA. [FA]= 0 mM (—); 1 mM (·····); 5 mM (- - -); 10 mM (·-·-·); 20 mM (-·-·-); 30 mM (- - -); 50 mM (— — —); 70 mM (—); 100 mM (·····); 200 mM (- - - -).

El espectro de ^1H -RMN de la mezcla de reacción entre la PM (20 mM) y el FA (200 mM) mostró un descenso notable de las señales correspondientes a la PM, además de la aparición de nuevas señales. Tal y como se observa en la figura 5, la señal del H-C(6) de la PM disminuyó notablemente, acorde con la aparición de una señal intensa a 7.95 ppm. Además, se observó la aparición de dos señales débiles a 8.45 ppm y a 7.53 ppm. La señal aparecida a 7.53 ppm se asignó al H-C(6) de la carbinolamina y la de 8.45 ppm se atribuyó al H-C(a) de la base de Schiff formada (ver esquema 5) por analogía con los resultados obtenidos en el estudio por ^1H -RMN de la mezcla de reacción entre la isopropilamina y el FA.

En la figura 6 se muestra el espectro de ^{13}C de la PM (A) y de la mezcla de reacción entre la PM y el FA (B). La asignación de las señales a cada carbono se realizó mediante experimentos de $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -COSY, de $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HMBC y de DEPT-135. Los valores de desplazamiento químico de ^{13}C de la PM y de la mezcla de reacción, así como el de los protones con los que se acoplan, se detallan en la tabla 2.

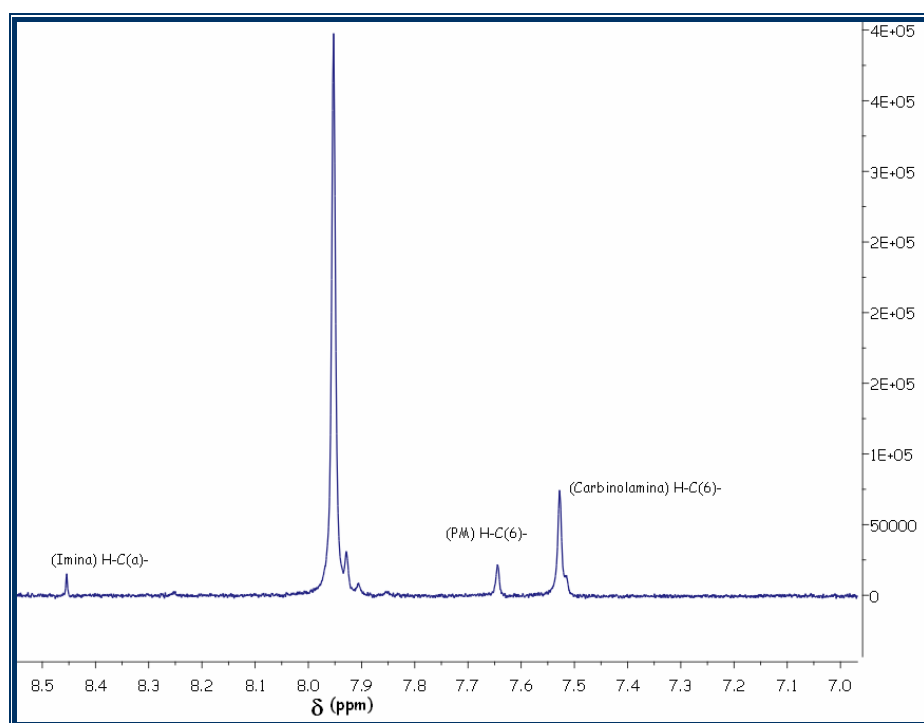
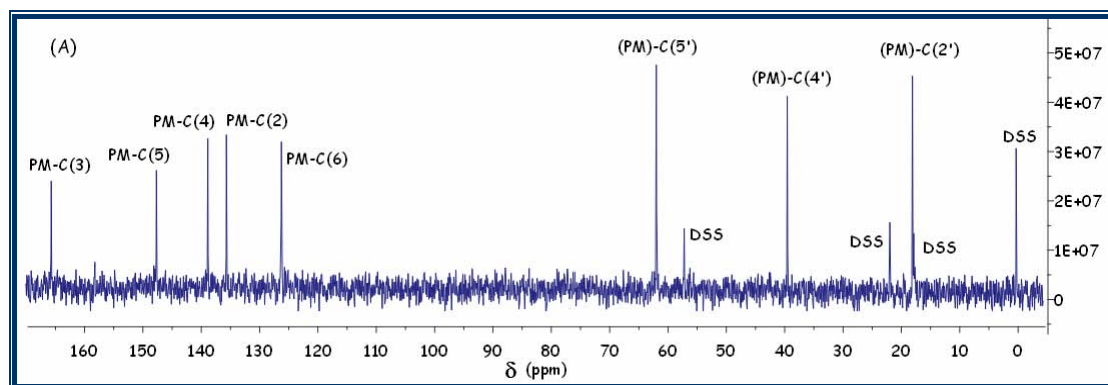


Figura 5. Espectro ^1H -RMN de la mezcla de reacción entre la PM y el FA a pH 7.4.

En el espectro de ^{13}C -RMN de la mezcla de reacción se observa un claro desplazamiento de las señales de los carbonos piridínicos con respecto a las de la PM. También se observa un desplazamiento notable de la señal del C(4') con respecto al de la PM y la aparición de tres señales correspondientes a grupos $-\text{CH}_2$. La señal aparecida a 88.4 ppm fue asignada al oxidimetanol, formado debido a la polimerización del FA [HAHNENSTEIN, 1994]. La señal observada a 83.3 ppm se correlacionó con las señales detectadas a 152.0 y a 46.5 ppm, mientras que la observada a 80.0 ppm (únicamente detectada cuando $[\text{FA}] > 0.15 \text{ M}$) se correlacionó con las señales aparecidas a 83.3 ppm y a 46.5 ppm.



**ARTÍCULO II. INESPERADO EQUILIBRIO ISOMÉRICO DE LAS BASES DE SCHIFF DE
PIRIDOXAMINA**

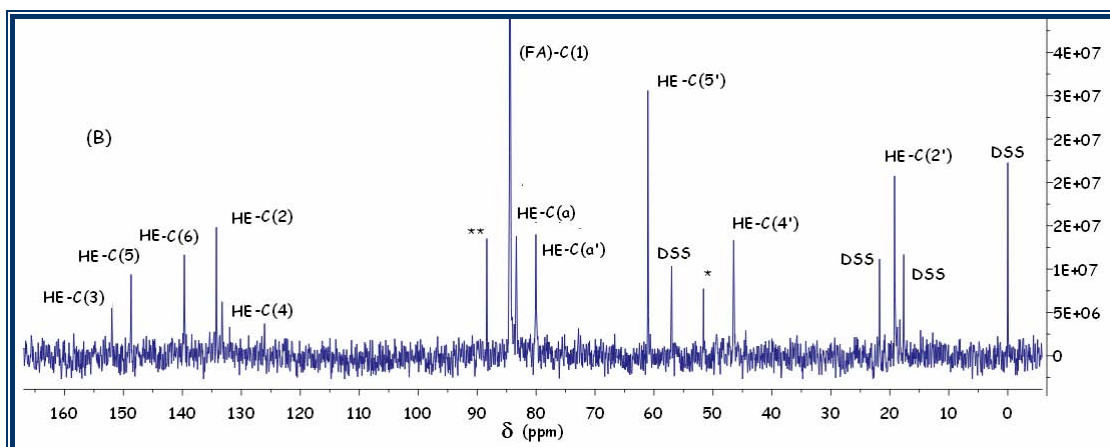


Figura 6. A) Espectro ^{13}C -RMN de la PM a pH 7.4. B) Espectro ^{13}C -RMN de la mezcla de reacción entre la PM y el FA a pH 7.4. (*)metanol, introducido como estabilizante; (**) oxidimetanol.

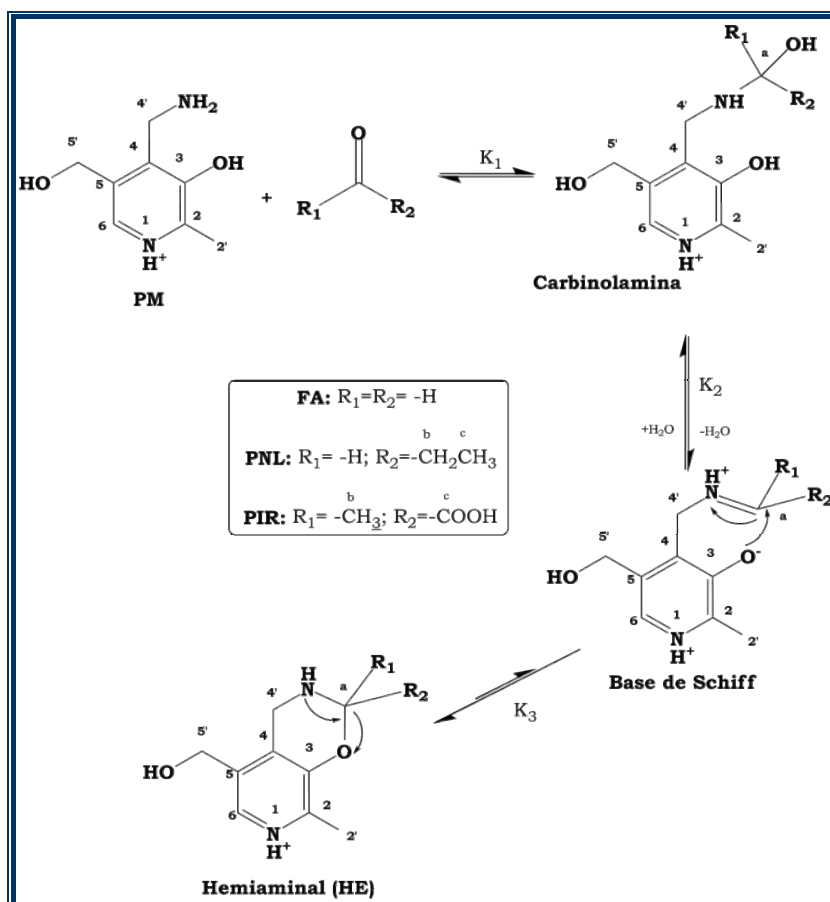
Tabla 2. Datos de ^1H - y ^{13}C -RMN de la PM, del FA y de su mezcla de reacción

Datos espectroscópicos de RMN (ppm)	
PM	^1H: 7.64 (s, 1H, H-C(6)); 4.73 (s, 2H, H-C(5')); 4.31 (s, 2H, H-C(4')); 2.48 (s, 3H, H-C(2')).
	^{13}C: 165.5 C(3); 147.5 C(5); 138.5 C(4); 135.2 C(2); 126.1 C(6); 61.7 C(5'); 38.9 C(4'); 17.8 C(2').
FA	^1H: 4.82(s, 2H, H-C(1)) -forma hidratada-.
	^{13}C: 84.4 C(1) -forma hidratada-.
PM + FA	^1H: 7.95 (s, 1H, H-C(6)); 5.08 (s, 2H, H-C(a)); 4.62 (s, 2H, H-C(5')); 4.59 (s, 2H, H-C(a'))*; 4.25 (s, 2H, H-C(4')); 2.40 (s, 3H, H-C(2')).
	^{13}C: 152.0 C(3); 148.7 C(5); 139.6 C(6); 134.2 C(2); 133.2 C(4); 83.3 C(a); 80.0 C(a')*; 61.0 C(5'); 46.5 C(4'); 19.2 C(2').
* Únicamente apareció al utilizar [FA] >0.15 M	

Los resultados de RMN revelan que como producto final de la reacción entre la PM y el FA procede la formación de un anillo hemiaminal condensado al anillo piridínico, cuyo mecanismo de formación se muestra en el esquema 5. El ataque nucleófilo del grupo amina de la PM sobre el grupo carbonilo del FA forma una carbinolamina. A pesar de su elevada estabilidad, las carbinolaminas del FA están en equilibrio con sus bases de Schiff [VERARDO, 1995], hecho que posibilita el ataque del fenolato sobre el carbono imínico para formar su isómero hemiaminal (HE). La formación del HE como producto mayoritario fue confirmado por espectroscopia de masas, ya que la señal mayoritaria del espectro era la que presentaba una relación $m/z=181.1$,

ARTÍCULO II. INESPERADO EQUILIBRIO ISOMÉRICO DE LAS BASES DE SCHIFF DE PIRIDOXAMINA

acorde con el valor $[M+H]^+$ del HE. Los resultados de RMN han demostrado también que si el FA presenta una concentración en la mezcla de reacción > 0.15 M, se produce el ataque del grupo amino sobre otra molécula de FA, formándose una amina terciaria. Dicha adición finaliza con la formación de una nueva carbinolamina (HE-C(a') en figura 6B y en tabla 2).



Esquema 5. Esquema de la reacción de la PM con el FA, con el PNL y con el PVR.

El ataque del fenolato sobre el carbono imínico y su metilación, induce modificación en la distribución electrónica del anillo piridínico. Este hecho explica las fuertes variaciones espectroscópicas (tanto de RMN como de UV/Vis) observadas en el estudio de la reacción de la PM con el PNL y con el FA. La ausencia del grupo fenolato en el anillo piridínico de la 4-amp explica la ausencia de cambios espectroscópicos observados en durante el estudio de sus reacciones.

La formación del HE como responsable de los cambios UV/Vis ha sido corroborada teóricamente. Para ello, se optimizó el HE representado en el esquema 3 para el FA, mediante el método MP2 utilizando las bases del tipo 6-311++G**. El efecto de la solvatación se simuló incluyendo el método en

continuo PCM en la optimización. Posteriormente, se calculó su espectro UV/Vis mediante la metodología TD-DFT en conjunción con el funcional hcth y la base aug-cc-PVDZ (ver experimental). Los resultados obtenidos muestran que entre 220 y 450 presenta una única transición electrónica, centrada en 280 nm y con un coeficiente de absorción molar de $6500 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, resultados que muestran gran concordancia con los datos experimentales ($\lambda_{\text{max}} = 280 \text{ nm}$; $6300 \pm 250 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

La adición de NaCNBH_3 (compuesto que a pH neutro reduce selectivamente los grupos imina [BORCH, 1971]) y Ni^{2+} (con el fin de evitar la formación de cianometil-derivados [GIDLEY, 1982]) a las mezclas de reacción de la PM con el PNL y con el FA, demostró la existencia del equilibrio isomérico. La adición del reductor produjo la recuperación de un espectro similar al de la PM, asignado a la base de Schiff reducida. El estudio de las mezclas de reacción de la PM con el FA y con el PNL en presencia del reductor se extendió a espectroscopia de RMN y de masas, revelando la formación del derivado de la PM *N*-dimetilado (en su reacción con el FA) y del derivado *N*-propilado (en su reacción con el PNL).

El estudio por espectroscopia UV/Vis de la reacción entre la PM y el PVR mostró, al incrementar la concentración de PVR con respecto a la de PM, los mismos cambios espectroscópicos descritos para la reacción de la PM con el PNL y con el FA, aunque en mucha menor extensión. Estas variaciones concuerdan con las descritas por Kubala y Martell [KUBALA, 1983] en el estudio de las constantes de equilibrio de formación de cetoiminas entre la PM y diferentes cetoácidos. El estudio de la mezcla de reacción por ^1H -RMN muestra claramente la aparición del singlete a 7.95 ppm, característico del isómero hemiaminal de la base de Schiff. En base a ello, las bases de Schiff de PM con cetoácidos han de presentar también equilibrio isomérico con su forma HE, tal y como se muestra en el esquema 5.

El ataque del fenolato sobre el carbono imínico de la base de Schiff ya fue propuesto con anterioridad. En 2002, Voziyan et al. [VOZIYAN, 2002] aislaron los productos finales de la reacción de la PM con el glioxal y con glicolaldehído, formados mediante un mecanismo que implicaba el ataque del fenolato sobre el carbono imínico. En un trabajo previo de nuestro grupo se propuso que la base de Schiff formada entre la PM y la glucosa podía evolucionar mediante la formación de una glucosamina (ciclación de las bases de Schiff de naturaleza

glúcida [IRVINE, 1922][SKELLEY, 2006]) o bien mediante ataque del fenolato sobre el carbono imínico. El espectro UV/Vis obtenido a 70 s de su aislamiento muestra la presencia de la banda a 280 nm que desaparece a medida que se incrementa la centrada a 321 nm [ADROVER, 2005]. Este hecho prueba que la isomerización de las bases de Schiff de PM se da mediante un equilibrio más rápido que el que establecen las bases de Schiff de naturaleza glúcida con sus formas cicladas.

➤ **Estudio termodinámico de la reacción entre la piridoxamina (PM) con el PVR, el PNL y el FA. Estudio cinético de su reacción con el PVR.**

La integración de las señales aparecidas a 8.45, 7.95, 7.64 y 7.53 ppm obtenidas en el estudio por ^1H -RMN de la reacción entre la PM y el FA (figura 5) permitió la determinación de las constantes de equilibrio descritas en el esquema 5. A pH 7.4 y a 25 °C, $K_1=(26.5\pm 3) \text{ M}^{-1}$, $K_2= 0.063\pm 0.005$ y $K_3= 77.9\pm 4$.

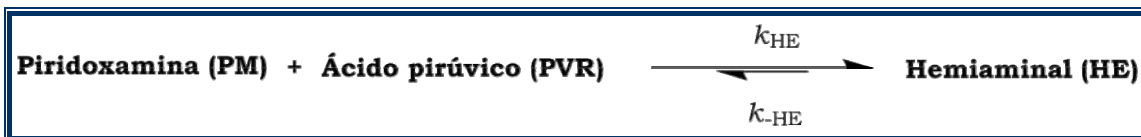
La integración de los picos obtenidos por ^1H -RMN en el estudio de la reacción entre la PM y el PNL (figura 3), permitió determinar que el valor de la constante de isomería entre la imina y el HE (K_3 en esquema 5) vale 16.7 ± 2 a pH 7.4 y a 25 °C. A su vez, la integración de la señal correspondiente al H-C(6) de la PM residual, permitió calcular que la constante de equilibrio de formación de la base de Schiff ($K_{\text{BS}}=K_1\cdot K_2$) formada a partir de la PM y del PNL vale $(0.26\pm 0.03) \text{ M}^{-1}$.

El estudio por ^1H -RMN de la reacción entre la PM y el PVR permitió determinar que la constante de equilibrio entre los reactivos y el HE ($K_{\text{HE}}=K_1\cdot K_2\cdot K_3$) vale $(0.32\pm 0.05) \text{ M}^{-1}$, a pH 7.4 y a 25 °C.

La mayor estabilidad del hemiaminal frente al isómero imina, demostrado mediante medidas termodinámicas, se demostró también con cálculos teóricos. Se optimizaron ambas estructuras para el FA (representadas en el esquema 5) mediante el método MP2 utilizando las bases del tipo 6-311++G**. El efecto de la solvatación se simuló incluyendo el método en continuo PCM en la optimización. Los resultados demuestran que el isómero hemiaminal es 8.3 kcal/mol más estable que la imina.

La cinética de la reacción entre la PM y el PVR se estudió a pH 7.4 y a 37 °C. La variación en la absorbancia a 321 nm en función del tiempo de

reacción se ajustó al esquema 6 mediante el programa DynaFit (ver parte experimental), tal y como se muestra en la figura 7.



Esquema 6. Esquema correspondiente a la formación del HE a partir de la reacción entre la PM y el PVR.

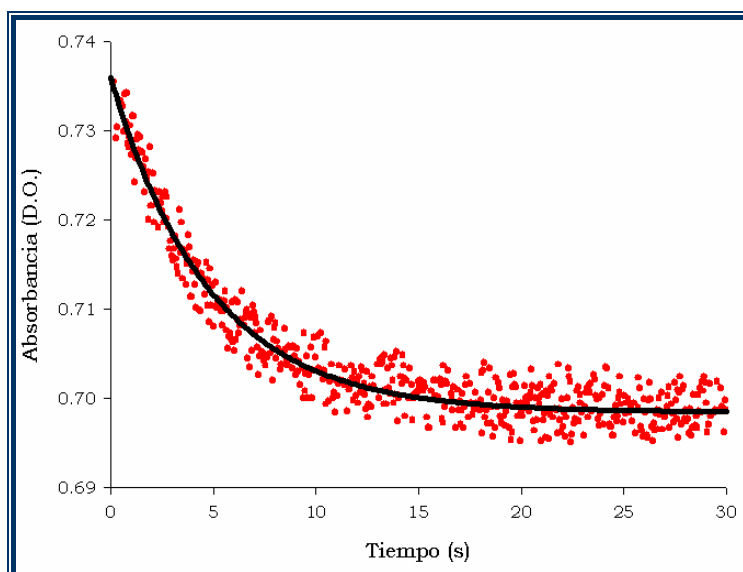


Figura 7. Variación de la absorbancia a 321 nm para la reacción entre la PM (0.3 mM) y el PVR (120 mM) en tampón fosfato a pH 7.4 y a 37 °C.

Para la realización del ajuste se incluyeron los coeficientes de absorción molar para cada especie a pH 7.4 (ver parte experimental). El ajuste permitió determinar que k_{HE} presenta un valor de $(6.3 \pm 0.7) \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, mientras que el valor de k_{-HE} es de $(6.4 \pm 0.5) \cdot 10^2 \text{ h}^{-1}$ a pH 7.4 y a 37 °C. La obtención de dichos valores posibilitó el cálculo de la constante de equilibrio (K_{HE}) cuyo valor es de $(0.98 \pm 0.10) \text{ M}^{-1}$. Este valor es ligeramente superior al determinado por $^1\text{H-RMN}$ (0.32 M^{-1}) y dicha diferencia se atribuye a la diferencia de temperatura. El valor de K_{HE} determinado por medidas espectroscópicas concuerda con el descrito por Kubala y Martell [KUBALA, 1983] en el estudio de la reacción entre la PM y el PVR, atribuido a la formación de una base de Schiff.

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran claramente que la reacción entre la 4-amp y el FA finaliza con la formación mayoritaria de una carbinolamina. En cambio, en sus reacciones con el PNL y el PVR, la carbinolamina formada deshidrata favoreciendo la formación final de una base de Schiff. El estudio de la reacción de la PM con los compuestos carbonílicos analizados revela la formación final de un hemiaminal condensado al anillo piridínico. Este compuesto se forma debido al ataque del fenolato en posición 3 del anillo piridina de la PM sobre el grupo imina de la base de Schiff. La formación del HE está favorecida con respecto a la formación de la base de Schiff, por lo que este equilibrio isomérico ha de ser considerado en el estudio de las reacciones biológicas en los que estén implicados los derivados aminados de la vitamina B₆. La importancia de la formación del HE en sistemas biológicos viene respaldada por los resultados obtenidos por *Metzler et al.* [METZLER, 1954] que demostraron que la metilación del fenolato en vitámeros B₆ inhibe completamente la transaminación.

EXPERIMENTAL

➤ **REACTIVOS**

La piridoxamina (PM), la 4-aminometilpiridina (4-amp), el formaldehído (FA) (30% en H₂O), el propanal (PNL), el ácido pirúvico (PVR), el dihidrógenofosfato potásico, el cianoborhidruro sódico (NaCNBH₃), el citrato sódico, la isobutilamina, el NiCl₂ y la D₂O (99.9% D) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. Las disoluciones utilizadas fueron preparadas en agua mili-Q.

➤ **ESPECTROSCOPIA UV/VIS**

Los espectros de absorción UV/Vis fueron adquiridos en el rango entre 400 y 220 nm a 37 °C utilizando un espectrofotómetro de doble rayo de la marca *Shimadzu*, modelo *UV-2401*. Se utilizaron celdas de cuarzo de doble cuerpo y de 8.75 mm de paso óptico. Se adquirió el espectro UV/Vis de distintas mezclas de reacción entre la 4-amp (0.7 mM) o la PM (0.1 mM) con el PVR, el PNL o el FA. Las mezclas de reacción se prepararon en tampón fosfato 0.5 M a pH 7.4 y se mantuvo la concentración de nucleófilo fija variando la concentración de electrófilo progresivamente desde 0 mM a 300 mM.

➤ **ESPECTROSCOPIA DE RMN**

Las mezclas de reacción entre la PM y la 4-amp con el PVR, el PNL y el FA fueron analizadas mediante técnicas de RMN utilizando para ello un espectrómetro *Bruker AMX-300*. Los espectros fueron adquiridos en tubos de 5 mm de diámetro y utilizando ácido 3-(trimetilsilil)-1-propansulfónico (DSS) como referencia interna. Se prepararon mezclas de reacción que eran 20 mM en nucleófilo (PM, 4-amp o isobutilamina) y 200 mM en electrófilo (PVR, PNL o FA). Todas las disoluciones estudiadas fueron preparadas en D₂O, utilizando para ello tampón fosfato 0.5 M a pD 7.4 (pD=-log [D⁺]), excepto aquellas en las que se adición NaCNBH₃ (20 mM) y Ni²⁺ (15 mM), preparadas en tampón citrato 0.5 M pD 7.4. Se realizaron experimentos monodimensionales: ¹H-NMR y ¹³C-NMR; experimentos de transferencia de polarización: DETP-135 y experimentos bidimensionales: ¹H,¹³C-COSY y ¹H,¹³C-HMBC [HESSE, 1995].

➤ **ESPECTROSCOPIA DE MASAS: HPLC-MSD.**

El análisis de masas fue realizado mediante un HPLC de la marca *Agilent 1110 Series*, que presentaba acoplado como detector un espectrómetro de masas también de la marca *Agilent 1110 Series*. La masa de los productos finales de cada reacción fue determinada inyectando las mezclas de reacción mediante la técnica de inyección en flujo, sin la presencia de columna cromatográfica. Las mezclas de reacción eran simultáneamente 3 mM en nucleófilo (PM o 4-amp) y 150 mM en carbonilo (PNL o FA) y fueron preparadas en tampón fosfato 0.1 M (pH 7.4). Para la detección de masas la muestra fue nebulizada e ionizada mediante la técnica de electroesprai, utilizando para ello una corriente de N₂ a 350 °C a un flujo de 13 ml/min con una presión de 415.6 kPa y un voltaje de fragmentación de 100 V. Posteriormente, fue analizada mediante un sistema de cuadrupolos, el cual contó los iones positivos en un rango m/z desde 140 a 800. La fase móvil utilizada fue H₂O-tampón NH₄OAc 5mM pH 6.0, usado como iniciador de la ionización. El flujo de análisis utilizado fue de 0.3 ml/min.

➤ **ANÁLISIS POR FLUJO DETENIDO CON DETECCIÓN UV/VIS (MSFS)**

Para el estudio cinético de la reacción de la PM con el PVR se prepararon en tampón fosfato 0.5 M a pH 7.4, una disolución 1.5 mM de PM (a) y otra 150 mM de PVR (b). La disolución (a) se mezcló en diferentes proporciones con la disolución (b) ($V_{(a)}:V_{(b)}$: 1:1, 1:2, 1:4, 1:10, 2:1, 4:1) mediante un mezclador automático *Biologic SFM-20* que incorporaba una celda de cuarzo *FC-15* de paso óptico 1.5 mm termostatzada a 37 °C. La velocidad de inyección fue de 10 ml/s, para la cual la cámara de mezcla presenta un tiempo muerto de 3.7 ms. Este equipo presenta acoplado como sistema de detección un espectrómetro del tipo *J&M Tidas16 256*, equipado con una lámpara de Xe de 75-W, que permite la adquisición del espectro UV/Vis (200-700 nm) a cada tiempo de reacción. Al sistema de irradiación se le acopló un monocromador con el fin de evitar los procesos fotoinducidos derivados de la irradiación sobre la PM [VILANOVA, 2004], lo que posibilitó el análisis de la variación de la absorbancia en función del tiempo a 321 nm.

➤ **ANÁLISIS CINÉTICO DE LOS DATOS EXPERIMENTALES.**

La variación de la absorbancia a 321 nm obtenida en el estudio de la reacción entre la PM y el PVR se ajustó al esquema 6 utilizando el programa DynaFit (BioKin, Pullman, WA) [Kuzmic, 1996]. Para la realización del ajuste se consideró que $\epsilon_{321}=7890 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ para la PM y que $\epsilon_{321}=22.7 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ para el PVR. Los resultados obtenidos en el estudio de la reacción entre la PM y el FA, llevaron a considerar que el coeficiente de absorción molar del HE es despreciable a 321 nm. Mediante el ajuste se obtuvieron las constantes de velocidad directas (k_{HE}) e inversas ($k_{-\text{HE}}$) correspondientes a la formación del HE a partir de los reactivos iniciales a pH 7.4 y a 37 °C.

➤ **METODOLOGÍA TEÓRICA.**

Las estructuras de la base de Schiff formada entre la PM y el FA y de su isómero hemiaminal, representadas en el esquema 5, fueron optimizadas utilizando metodología MP2 [FRISCH, 1990] utilizando las bases 6-311++G** doble difusa y doble polarizada. El efecto de la solvatación se incluyó en la optimización utilizando el método del continuo (PCM) [MIERTUS, 1981]. El espectro UV/Vis de las estructuras optimizadas se calculó mediante la utilización de la teoría del funcional de la densidad dependiente del tiempo (TD-DFT). El TD-DFT representa un eficiente sistema en el cálculo de energías de excitación, usando para ello un campo eléctrico variable con el tiempo [STRATMANN, 1998]. Los cálculos TD-DFT fueron realizados utilizando el método del continuo (PCM) y el funcional hcth [HAMPRECHT, 1998], todo ello en conjunción con la base de Dunning aug-cc-PVDZ (*augmented correlation-consistent polarized valence double-zeta basis set*) [DUNNING, 1989].

Los cálculos fueron realizados utilizando el programa Gaussian98 [FRISCH, 1998] mediante un PC y mediante el ordenador HP CP4000 del Centro de Supercomputación de Cataluña (CESCA).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación obtenida del Gobierno Español (DGICYT CTQ 2005-00250) y del Gobierno Balear (PROGECIB-28A).

REFERENCIAS

- [ABRAMS, 1976] W. R. Abrams, R. G. Kallen. Equilibria and kinetics 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] M. Adrover, B. Vilanova, F. Muñoz, J. Donoso. Inhibition of glycosylation processes: the reaction between pyridoxamine and glucose. *Chem. Biodivers.* (2005), 2, 964.
- [ADROVER, 2008A] M. Adrover, B. Vilanova, J. Frau, F. Muñoz, J. Donoso. A comparative study of the chemical reactivity of pyridoxamine, Ac-Phe-Lys and Ac-Cys with various glycation carbonyl compounds. *Amino Acids* (2008) doi: 10.1007/s00726-008-0098-6.
- [ADROVER, 2008B] M. Adrover, B. Vilanova, J. Frau, F. Muñoz, J. Donoso. The pyridoxamine action on amadori compounds: a reexamination of its scavenging capacity and chelating effect. *Bioorg. Med. Chem.* (2008), 16, 5557.
- [BOOTH, 1996] A. A. Booth, R. G. Khalifah, B. G. Hudson. Thiamine pyrophosphate and pyridoxamine inhibit the formation of antigenic advanced glycation end-products: comparison with aminoguanidine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1996), 220, 113.
- [BORCH, 1971] R. F. Borch, M. D. Bernstein, H. D. Durst. The cyanohydridoborate anion as a selective reducing agent. *J. Am. Chem. Soc.* (1971), 93, 2897.
- [CHRISTEN, 1985] P. Christen, D. E. Metzler. *Transaminases*. Wiley-Interscience: New York (1985).
- [CRUGEIRAS, 2005] J. Crugeiras, A. Rios, T. L. Amyes, J. P. Richard. Carbon acidity of the α -pyridinium carbon of a pyridoxamine analog. *Org. Biomol. Chem.* (2005), 3, 2145.
- [DALLING, 1976] D. K. Dalling, D. M. Grant, W. J. Horton. Carbon 13 NMR study of nonenzymatic reactions of pyridoxal 5'-phosphate with selected amino acids and of related reactions. *J. Biol. Chem.* (1976), 251, 7661.
- [DUNNING, 1989] T. H. Dunning Jr. Gaussian basis sets for use in correlated molecular calculations. I. The atoms boron through neon and hydrogen. *J. Chem. Phys.* (1989), 90, 1007.
- [ECHEVARRÍA, 2003] G. R. Echevarría, J. G. Santos, A. Basagoitia, M. Castillo, F. García Blanco. Influence of the polarity of the medium on the catalysis of formation, pyridoxal 5'-phosphate with L-tryptophan. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* (2003), 76, 335.
- [ECHEVARRÍA, 2005] G. R. Echevarría, J. G. Santos, A. Basagoitia, F. García Blanco. Kinetic and thermodynamic study of the reaction of pyridoxal 5'-phosphate with L-tryptophan. *J. Org. Phys. Chem.* (2005), 18, 546.
- [EVANS, 1988] D. F. Evans, D. A. Jakubovic. Water-soluble hexadentate Schiff-base ligands as sequestration agents for iron (III) and gallium (III). *J. Chem. Soc. Dalton. Trans.* (1988), 2927.
- [FASELLA, 1962] P. Fasella, G. G. Hammes. Concerning the role of metals in enzymic transamination. *Biochim. Biophys. Acta* (1962), 65, 142.
- [FRASER, 1981] R. H. Fraser, N. Chuaqui-Offermans. ¹³C lithiation shifts in aldimines and ketimines. Evidence on configuration of lithiated *N*-tert-butylimines. *Can. J. Chem.* (1981), 59, 3007.
- [FRISCH, 1990] M. J. Frisch, M. Head-Gordon, J. A. Pople. A direct MP2 gradient method. *Chem. Phys. Lett.* (1990), 166, 275.

ARTÍCULO II. INESPERADO EQUILIBRIO ISOMÉRICO DE LAS BASES DE SCHIFF DE PIRIDOXAMINA

- [FRISCH, 1998] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, P. M. W. Gill, B. G. Johnson, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, T. Keith, G. A. Petersson, J. A. Montgomery, K. Raghavachari, M. A. Al-Laham, V. G. Zakrewski, J. V. Ortiz, J. B. Foresman, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, A. Nanayakkara, M. Challacombe, C. Y. Peng, P. Y. Ayala, W. Chen, M. W. Wong, J. L. Andres, E. S. Replogle, R. Gomperts, R. L. Martin, D. J. Fox, J. S. Binkley, D. J. Defrees, J. Baker, J. P. Stewart, M. HeadGordon, C. Gonzalez, J. A. Pople. Gaussian98; Gaussian, Inc.: Pittsburgh, PA, **1998**.
- [GANSOW, 1968A] O. A. Gansow, R. H. Holm. Detection and identification of intermediates and products of a nonenzymatic transamination reaction by proton resonance. *J. Am. Chem. Soc.* (**1968**), 90, 5629.
- [GANSOW, 1968B] O. A. Gansow, R. H. Holm. Aqueous solution equilibria of pyridoxamine, pyridoxal, 3-hydroxypyridine,-4-aldehyde, and 3-hydroxypyridine-2-aldehyde as studied by proton resonance. *Tetrahedron* (**1968**), 24, 4477.
- [GANSOW, 1969] O. A. Gansow, R. H. Holm. A proton resonance investigation of equilibria, solute structures, and transamination in the aqueous systems pyridoxamine-pyruvate-zinc (II) and aluminum (III). *J. Am. Chem. Soc.* (**1969**), 91, 5984.
- [GIDLEY, 1982] M. J. Gidley, J. K. M. Sanders. Reductive methylation of proteins with sodium cyanoborohydride. *Biochem. J.* (**1982**), 203, 331.
- [GARCÍA DEL VADO, 1987] M. A. García del Vado, J. Donoso, F. Muñoz, G. Echevarría, F. García Blanco. 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] M. A. García del Vado, G. Echevarría, A. García-Espantaleón, J. Donoso, F. Muñoz, F. García Blanco. 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. Cat.* (**1988**), 44, 313.
- [HAHNENSTEIN, 1994] I. Hahnenstein, H. Hasse, C. G. Kreiter, G. Maurer. ¹H- and ¹³C-NMR spectroscopic study of chemical equilibria in solutions of formaldehyde in water, deuterium oxide, and methanol. *Ind. Eng. Chem. Res.* (**1994**), 33, 1022.
- [HAMPRECHT, 1998] F. A. Hamprecht, A. J. Cohen, D. J. Tozer, N. C. Handy. Development and assessment of new exchange-correlation functionals. *J. Chem. Phys.* (**1998**), 109, 6264.
- [HARRUFF, 1976] R. C. Harruff, W. T. Jenkins. A ¹³C n.m.r. study of the B₆ vitamins and of their aldimine derivatives. *Org. Magn. Reson.* (**1976**), 8, 548.
- [HESSE, 1995] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh. Métodos espectroscópicos en química orgánica. Ed. Síntesis, Madrid, Capt. 1, pp. 9, (**1995**).
- [IRVINE, 1922] J. C. Irvine, J. C. Earl. Mutarotation and pseudo-mutarotation of glucosamine and its derivatives. *J. Chem. Soc. Trans.* (**1922**), 121, 2370.
- [JANSONIUS, 1998] J. N. Jansonius. Structure, evolution and action of vitamin B₆-dependent enzymes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* (**1998**), 8, 759.
- [KALLEN, 1966] R. G. Kallen, W. P. Jencks. Equilibria for the reaction of amines with formaldehyde and protons in aqueous solution. *J. Biol. Chem.* (**1966**), 241, 5864.
- [KUBALA, 1983] G. Kubala, A. E. Martell. 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.

ARTÍCULO II. INESPERADO EQUILIBRIO ISOMÉRICO DE LAS BASES DE SCHIFF DE PIRIDOXAMINA

- [KUZMIC, 1996] P. Kuzmic. Program Dynafit for the analysis of enzyme kinetic data: application to HIV proteinase. *Anal. Biochem.* (1996), 260.
- [MARTELL, 1984] A. E. Martell, P. Taylor. NMR evidence for the delocalized α , α' carbanion of pyridoxal and pyridoxamine Schiff bases as the intermediate in vitamin B₆ catalyzed transamination. *Inorg. Chem.* (1984), 23, 2734.
- [MATSUSHIMA, 1967] Y. Matsushima, A. E. Martell. Pyridoxal analogs. X. Zinc (II)-Chelate catalysis of transamination in methanol solution. *J. Am. Chem. Soc.* (1967), 89, 1331.
- [MATSUSHIMA, 1968] Y. Matsushima, T. Hino. Nuclear magnetic resonance studies on Schiff base and related compounds derived from pyridoxal. *Chem. Pharm. Bull.* (1968), 16, 2277.
- [METZLER, 1954] D. E. Metzler, M. Ikawa, E. E. Snell. A general mechanism for vitamin B₆-catalyzed reactions. *J. Am. Chem. Soc.* (1954), 76, 648.
- [METZLER, 1988] C. M. Metzler, A. G. Harris, D. E. Metzler. Spectroscopic studies of quinoid species from pyridoxal 5'-phosphate. *Biochemistry* (1988), 27, 4923.
- [MEANS, 1995] G. E. Means, R. E. Feeney. Reductive alkylation of proteins. *Anal. Biochem.* (1995), 224, 1.
- [MIERTUS, 1981] S. Miertus, E. Scrocco, J. Tomasi. Electrostatic interaction of a solute with a continuum. A direct utilization of AB initio molecular potentials for the prevision of solvent effects. *Chem. Phys.* (1981), 55, 117.
- [RAHBAR, 2002] S. Rahbar, J. L. Figarola. Inhibitors and breakers of advanced glycation endproducts (AGEs): a review. *Curr. Med. Chem. Immun. Endocrinol. Metab. Agents* (2002), 2, 135.
- [SÁNCHEZ-RUIZ, 1982] J. M. Sánchez-Ruiz, J. M. Rodríguez-Pulido, J. Llor, M. Cortijo. Rates and equilibria of aldimine formation between pyridoxal 5'-phosphate and *N*-hexylamine. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* (1982), 1425.
- [SHALTIEL, 1970] S. Shaltiel, M. Cortijo. The mode of binding of pyridoxal 5'-phosphate in glycogen phosphorylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1970), 41, 594.
- [SKELLEY, 2006] A. M. Skelley, R. A. Mathies. Rapid on-column analysis of glucosamine and its mutarotation by microchip capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* (2006), 1132, 304.
- [STRATMANN, 1998] R. E. Stratmann, G. E. Scuseria, M. J. Frisch. An efficient implementation of time-dependent density-functional theory for the calculation of excitation energies of large molecules. *J. Chem. Phys.* (1998), 109, 8218.
- [THORSON, 1993] J. S. Thorson, H.-W. Liu. 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.
- [ULRICH, 2001] P. Ulrich, A. Cerami. Protein Glycation, Diabetes, and Aging. *Recent Prog. Horm. Res.* (2001), 56, 1.
- [VÁZQUEZ, 1992A] M. A. Vázquez, F. Muñoz, J. Donoso, F. García Blanco. Stability of Schiff bases of amino acids and pyridoxal-5'-phosphate. *Amino Acids* (1992), 3, 81.
- [VÁZQUEZ, 1992B] M. A. Vázquez, F. Muñoz, J. Donoso, F. García Blanco. Kinetic study on stability of Schiff base of pyridoxal 5'-phosphate and leucine in water media with cationic surfactants. *Helv. Chim. Acta* (1992), 75, 1029.
- [VERARDO, 1995] G. Verardo, F. Gorassini, A. G. Giumanini, T. Scubla, M. Tolazzi, P. Strazzolini. Heteroaromatic primary amines and formaldehyde: The

ARTÍCULO II. INESPERADO EQUILIBRIO ISOMÉRICO DE LAS BASES DE SCHIFF DE PIRIDOXAMINA

- formation of N-hydroxymethyl derivatives. *Tetrahedron* (**1995**), 51, 8311.
- [VILANOVA, 2004] B. Vilanova, M. Adrover, F. Muñoz, J. Donoso. Photo-induced processes in vitamin B₆ compounds. *Chem. Biodiver.* (**2004**), 1, 1073.
- [VOZIYAN, 2002] P. A. Voziyan, T. O. Metz, J. W. Baynes, B. G. Hudson. 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] P. A. Voziyan, B. G. Hudson. Pyridoxamine as a multifunctional pharmaceutical: targeting pathogenic glycation and oxidative damage. *Cell. Mol. Life Sci.* (**2005**), 62, 1671.
- [WIESINGER, 1984] H. Wiesinger, H.-J. Hinz. Kinetic and thermodynamic parameters for Schiff base formation of vitamin B₆ derivatives with amino acids. *Arch. Biochem. Biophys.* (**1984**), 235, 34.
- [YUEN, 1985] L. D. Yuen. PhD Thesis. Part I. Studies involving the formation of pyridoxamine of pyridoxamine-5'-phosphate Schiff bases and their zinc (II) complexes. Part II. Activity of partly metallated polymers in the decarboxylation of oxalacetic acid. Thesis, Ohio State University, Ohio. (**1985**).
- [ZIMMERMAN, 1983] S. C. Zimmerman, A. W. Czarnik, R. Breslow. Intramolecular general base-acid catalysis in transaminations catalyzed by pyridoxamine enzyme analogues. *J. Am. Chem. Soc.* (**1983**), 105, 1694.

RESULTADOS

ARTÍCULO III. A comparative study of the chemical reactivity of pyridoxamine, Ac-Phe-Lys and Ac-Cys with various glycating carbonyl compounds.

M. Adrover, B. Vilanova, F. Frau, F. Muñoz, J. Donoso, *A comparative study of the chemical reactivity of pyridoxamine, Ac-Phe-Lys and Ac-Cys with various glycating carbonyl compounds*, **Amino Acids**, doi: 10.1007/s00726-008-0098-6

RESULTADOS

ARTÍCULO IV. Kinetic study of the reaction of glycolaldehyde with two glycation target models.

M. Adrover, B. Vilanova, F. Muñoz, J. Donoso,
*Kinetic Study of the Reaction of Glycolaldehyde
with Two Glycation Target Models, **Ann. N.Y.
Acad. Sci., 1126, 2008, 235-240***

RESULTADOS

ARTÍCULO V. Inhibition of glycosylation processes: the reaction between pyridoxamine and glucose.

M. Adrover, B. Vilanova, F. Muñoz, J. Donoso,
*Inhibition of Glycosylation Processes: the
Reaction between Pyridoxamine and Glucose,*
Chem. Biodivers., 2, 2005, 964-975

RESULTADOS

ARTÍCULO VI. Pyridoxamine, a scavenger agent of carbohydrates.

M. Adrover, B. Vilanova, F. Muñoz, J. Donoso,
Pyridoxamine, A Scavenger Agent of
*Carbohydrates, **Int. J. Chem. Kinet.**, 39,*
2007, 154-167

RESULTADOS

ARTÍCULO VII. The pyridoxamine action on Amadori compounds: a reexamination of its scavenging capacity and chelating effect.

M. Adrover, B. Vilanova, J. Frau, F. Muñoz, J. Donoso, *The Pyridoxamine action on Amadori compounds: A reexamination of its scavenging capacity and chelating effect*, **Bioorg. Med. Chem.**, **16**, **2008**, **5557-5569**

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

En esta memoria de tesis doctoral, los resultados experimentales se presentan en forma de artículos científicos publicados ya, o bien enviados para su publicación en revistas especializadas (capítulo 3). En consecuencia, la discusión de estos resultados y su relación con los trabajos publicados por otros autores queda dispersa en un total de siete artículos específicos, lo cual dificulta la apreciación global de los temas tratados. Con el fin de paliar este inconveniente, en este capítulo 4 se ofrece una discusión general de los resultados obtenidos, estructurados en cinco subapartados correspondientes a cada uno de los cinco aspectos más relevantes del trabajo realizado: fotoisomería de las disoluciones acuosas de vitámeros B₆, isomería de las BSs de la PM, cinética de formación de BSs de la PM con RCS, estudio cinético de las reacciones de la PM con aldosas y mecanismo de inhibición de la PM sobre la evolución de los APs.

Puesto que las reacciones entre la PM y las aldosas estudiadas son extremadamente lentas, se estudió en un trabajo previo la estabilidad de las disoluciones de PM. Se determinó que a pH 7.4 la PM presenta un $t_{1/2}$ de $1 \cdot 10^4$ h a 37 °C y de $6 \cdot 10^2$ h a 60 °C ($E_a = 24$ kcal/mol). Los resultados obtenidos concuerdan con los propuestos por *Saidi y Warthesen*, los cuales demostraron que la PM (pH 7.0) a 40°C presenta un $t_{1/2}$ de $1 \cdot 10^4$ h, mientras que a 60°C éste se reduce hasta $1 \cdot 10^3$ h [*SAIDI, 1983*]. Como producto de la degradación oxidativa de la PM se detectó la formación de PL (proceso ya descrito por *Gregory III y Hiner* [*GREGORY III, 1983*]) y de ión amonio.

1. FOTOISOMERÍA EN LAS DISOLUCIONES ACUOSAS DE VITÁMEROS B₆.

Tal y como se ha indicado en el apartado 1.3.4 del capítulo 1, la radiación UV/Vis induce fotoreacciones sobre los vitámeros B₆ [*PFORDTE, 1961A*][*PFORDTE, 1961B*][*REIBER, 1972*][*BAZHULINA, 1974B*]. Además, se sabe que esta radiación provoca también fototautomería en compuestos piridínicos sustituidos [*TAKEDA, 2004*][*GEREGA, 2006*], aunque este proceso no haya sido aún observado para los derivados naturales de la vitamina B₆.

Por estos motivos y dado que las técnicas espectroscópicas UV/Vis serán claves en el estudio de la reactividad de la PM y en la formación de sus BSs, los estudios de estabilidad de las disoluciones de vitámeros B₆ se

ampliaron evaluando el efecto de la radiación UV/Vis sobre las mismas. Los resultados obtenidos se detallan en el **artículo I** y pueden resumirse en los siguientes puntos:

a) La irradiación de disoluciones acuosas de PM y/o PLP en la zona de pH entre 4 y 10, con radiación UV/Vis en el rango de longitudes de onda entre 220 y 700 nm, no provoca cambios en el espectro de absorción del sistema en ese rango de la zona espectral. Las fuentes luminosas utilizadas para la realización de estos experimentos han sido: una lámpara de Xe (75W), una lámpara de D₂ (30 W) y una lámpara de wolframio (50W).

b) La irradiación de disoluciones de PLP en la zona de pH entre 4 y 10 con luz UV/Vis en el rango de longitudes de onda entre 200 y 700 nm, producida con una lámpara de Xe de 75 W, genera una variación temporal del espectro de absorción de la muestra en ese rango de la zona espectral. Es necesario un tiempo de irradiación aproximadamente de 60 s para que el sistema alcance el equilibrio. Unos 60 s después del cese de la perturbación el sistema recupera su espectro de absorción inicial, lo que demuestra la ausencia de fotoreacciones. La deconvolución de los espectros de absorción obtenidos a cada tiempo de irradiación en curvas log-normales, reveló que la radiación altera los equilibrios de hidratación del PLP, incrementando la proporción de las formas hidratadas a costa de las aldehídicas.

c) La irradiación de disoluciones de PM en la zona de pH entre 4 y 10 (pH 6.3 en la figura 4.1) con luz UV/Vis en el rango de longitudes de onda entre 200 y 700 nm, producida con una lámpara de Xe de 75 W, genera una variación temporal del espectro de absorción de la muestra en esa zona espectral. Es necesario un tiempo de irradiación aproximadamente de 60 s para que el sistema alcance el equilibrio, recuperándose su espectro de absorción inicial una vez transcurridos 60 s desde el cese de la irradiación. Este hecho prueba la ausencia de fotoreacciones. La deconvolución de los espectros obtenidos a cada tiempo reveló que, independientemente del pH, la radiación altera los equilibrios tautoméricos de la PM, incrementando la proporción de los tautómeros neutros a costa de los zwitteriónicos.

d) Los espectros de absorción UV/Vis de disoluciones de BSs de PLP no varían al ser irradiadas con luz UV/Vis producida en el rango entre 200 y 700 nm por una lámpara de Xe (75 W), al igual que tampoco lo hace el de enzimas dependientes del PLP. En dichas enzimas el PLP se encuentra formado una BS con la cadena lateral de una Lys. Por tanto, las BSs del PLP no sufren

fotoreacciones ni fototautomería al ser irradiadas bajo las condiciones experimentales detalladas.

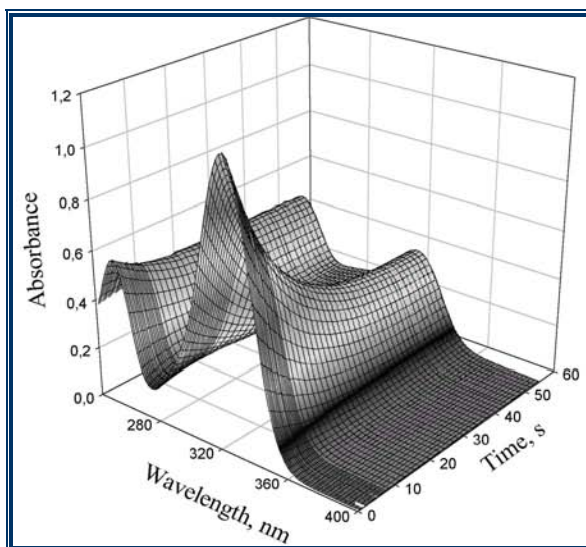


Figura 4.1. Variación del espectro UV-Vis en función del tiempo, de una disolución 1mM de PM en tampón fosfato a pH 6.5 y a 25°C.

Los resultados obtenidos demuestran que la irradiación de disoluciones de vitámeros B₆ con radiación inferior a 220 nm puede inducir fotoprocesos que han de ser considerados al utilizar dicha técnica como instrumento de análisis, tanto en el estudio de los vitámeros B₆, como en el estudio de reacciones en las que participan enzimas dependientes de la vitamina B₆, ya que su mecanismo de acción implica la existencia de los vitámeros en su forma libre.

2. FORMACIÓN DE BASES DE SCHIFF DE PIRIDOXAMINA.

En 1983, *Kubala y Martell* [**KUBALA, 1983**] mostraron que el espectro de absorción UV/Vis de las mezclas de reacción de la PM con cetoácidos se modificaba ligeramente con respecto al de PM. Se observó una leve disminución de la absorbancia entre 300 y 360 nm y un incremento de la comprendida entre 270 y 290 nm, que se atribuyó a la formación de BSs. El hecho de que un enlace imina localizado presente a pH neutro un máximo de absorción a 279 nm con un $\epsilon_{279} = 15 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ [**HESSE, 1995**] y que a 279 nm la PM presente un $\epsilon_{279} \approx 1144 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, sugiere que la formación de la imina no puede ser la causa de esta variación espectroscópica.

Esta idea se confirmó en nuestros trabajos, ya que la formación de las BSs de la 4-aminometilpiridina, un compuesto análogo a la PM, no provocó cambios espectroscópicos (UV/Vis) en las mezclas de reacción. Con el fin de

explicar la variación espectroscópica observada en las reacciones de la PM con cetoácidos, se estudió la reacción entre la PM y el ácido pirúvico. Este trabajo se amplió con el estudio de la reacción entre la PM y dos aldehídos de elevada reactividad, el propanal y el formaldehído. Los resultados obtenidos, así como los descritos para las reacciones en las que la 4-aminometilpiridina actuó como nucleófilo, se detallan en el **artículo II** y se discuten a continuación.

El estudio UV/Vis de la mezcla de reacción entre la PM y el ácido pirúvico mostró los mismos cambios espectroscópicos descritos por *Kubala* y *Martell* [*KUBALA, 1983*]. Dichos cambios se incrementaron notablemente en el mismo sentido al ser el propanal o el formaldehído (figura 4.2) los electrófilos.

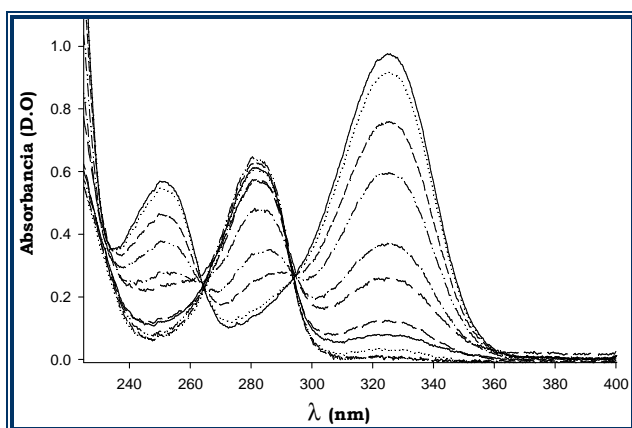


Figura 4.2. Variación del espectro UV/Vis de la PM (0.1 mM) a medida que se incrementa la concentración de FA (pH 7.4). [FA]= 0 mM (—); 1 mM (·····); 5 mM (- - -); 10 mM (·-·-·); 20 mM (-·-·-); 30 mM (- - -); 50 mM (— — —); 70 mM (—); 100 mM (·····); 200 mM (-----).

El espectro de ^1H -RMN de la mezcla de reacción de la PM con el propanal, mostrado en la figura 4.3, evidenció la presencia de una señal a 9.30 ppm atribuida al protón imínico. Sin embargo, el área de esta señal fue inferior al área del pico aparecido a 7.95 ppm y que *Gansow* y *Holm* [*GANSOW, 1969*] asignaron al protón piridínico de las BSs de PM. Ese resultado muestra claramente que la imina no es el producto principal de la reacción entre la PM y compuestos carbonílicos.

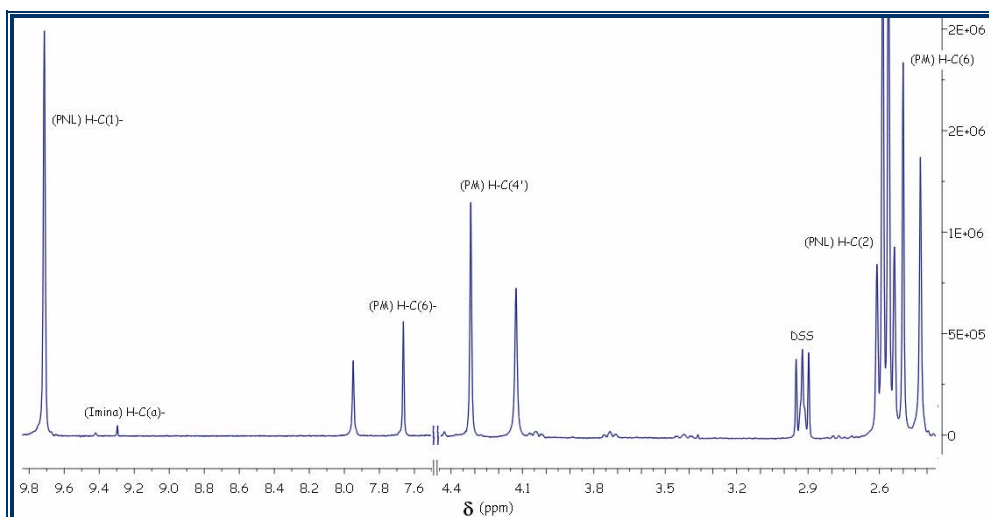
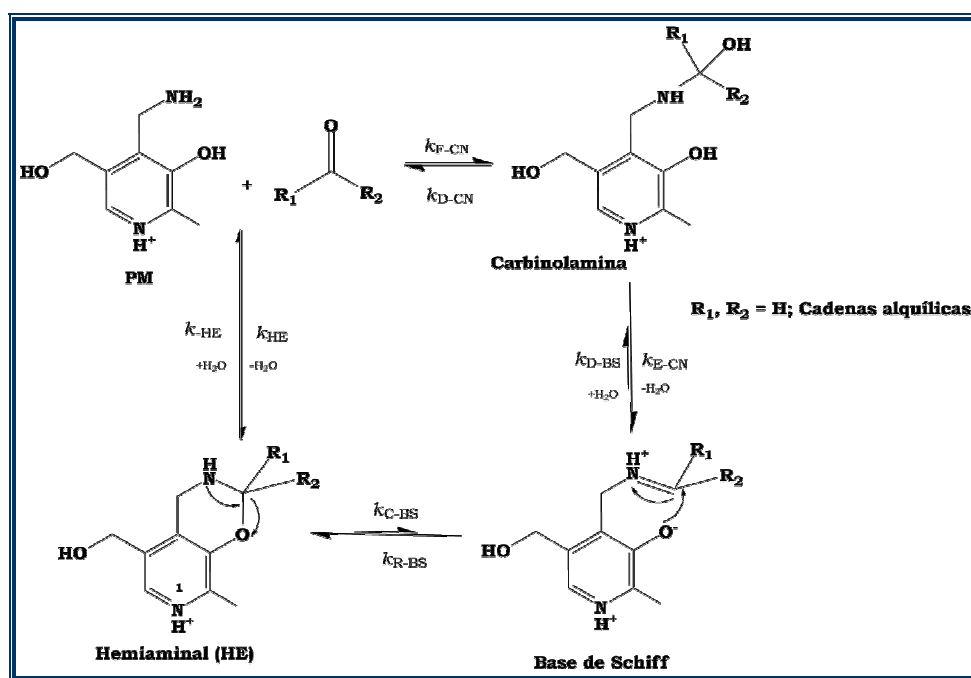


Figura 4.3. Espectro ^1H -RMN de la mezcla de reacción entre la PM y el PNL a pH 7.4

Los resultados obtenidos mediante experimentos monodimensionales y bidimensionales de RMN y mediante espectroscopia de masas demuestran que el producto mayoritario de la reacción entre la PM y compuestos carbonílicos es un compuesto hemiaminal. Este compuesto es isómero de las BSs y se encuentra en equilibrio con ellas. Así, y tal como se muestra en el esquema 4.1, la reacción de la PM con compuestos carbonílicos procede mediante la formación inicial de una carbinolamina que deshidrata para formar una BS. Esta BS establece un equilibrio isomérico con su forma hemiaminal debido al ataque del fenolato piridínico sobre el carbono imínico.

Los resultados experimentales y teóricos demuestran que el isómero hemiaminal es más estable que la imína. A su vez, se ha demostrado que la metilación del fenolato piridínico, asociada a la formación del hemiaminal, es la responsable de los cambios en la distribución electrónica del anillo piridínico que desencadenan la modificación espectroscópica (UV/Vis) observada.



Esquema 4.1. Mecanismo general de formación de BSs de la PM.

El equilibrio isomérico planteado, hasta el momento no descrito, representa una importante contribución a la comprensión de la reactividad química de la PM. Este mecanismo debe ser considerado en la interpretación de los procesos químicos en los cuales esté involucrada la PM, así como en el estudio de los mecanismos de transaminación. La importancia del isómero hemiaminal en las reacciones de transaminación viene reforzada por las

observaciones de *Metzler et al.* [METZLER, 1954] que demostraron que la metilación del fenolato las inhibe totalmente.

3. IMPORTANCIA DE LA FORMACIÓN DE BASES DE SCHIFF DE PIRIDOXAMINA EN EL MECANISMO DE INHIBICIÓN DE LA GLICACIÓN PROTEICA.

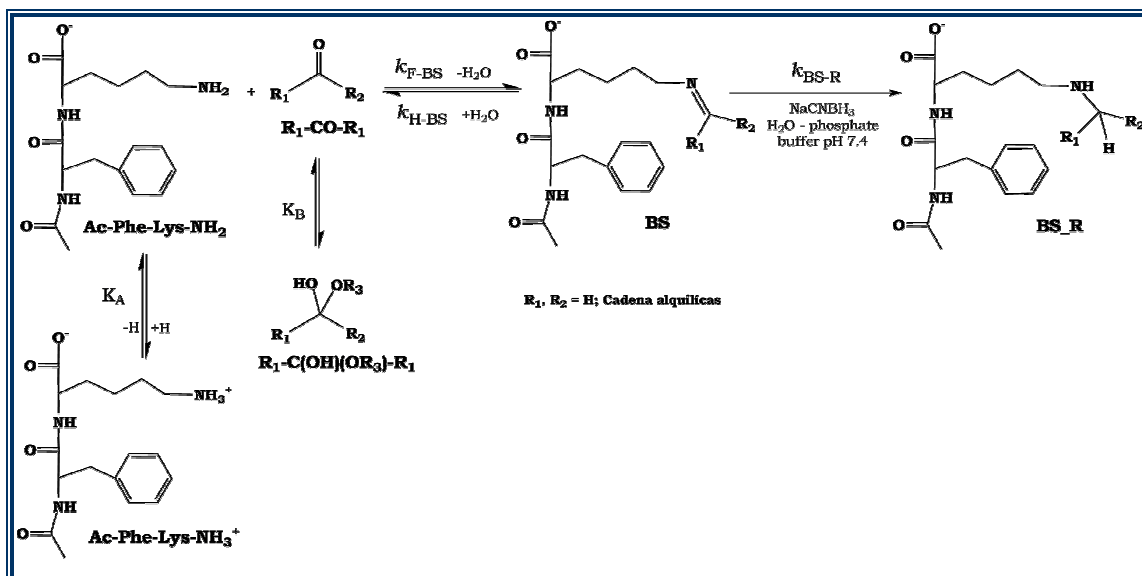
Además de por su implicación biológica, las BSs de la PM son de elevada importancia desde un punto de vista biomédico. *Voziyan y Hudson* [VOZIYAN, 2005] recopilaron los mecanismos mediante los cuales la PM es capaz de inhibir la GP. Entre ellos y basándose en sus resultados previos en los que se aislaron los productos de la reacción de la PM con el GO y con el GLA [VOZIYAN, 2002] propusieron que la PM sería capaz de secuestrar compuestos carbonílicos con capacidad glicante, mediante la formación inicial de una BS. Sin embargo y hasta la fecha, los estudios cuantitativos de dichos procesos no se han realizado.

Por este motivo, se ha estudiado en condiciones fisiológicas de pH y temperatura la cinética de formación de BSs de PM con diferentes compuestos carbonílicos implicados en la GP. Se ha estudiado la reacción de la PM con cetonas (acetona y acetol), con el acetaldehído, con α -hidroxialdehídos (GLA, glucosa, ribosa y arabinosa) y con α -oxoaldehídos (GO y MGO). Los resultados obtenidos han sido comparados con los determinados para el grupo ϵ -amina de un modelo proteico en su reacción con los mismos electrófilos. Estos estudios fueron realizados en presencia de NaCNBH₃ (compuesto que a pH neutro reduce selectivamente el enlace imina sin afectar a los grupos carbonilo [BORCH, 1971]), lo que posibilitó el secuestro de las BSs (caracterizadas mediante espectroscopia de RMN y masas), la determinación de sus constantes cinéticas de formación y la inhibición de su evolución. El estudio comparativo se amplió analizando la reacción de la Ac-Cys con el GLA, el GO y el MGO a pH 7.4 y a 37 °C. Los resultados obtenidos se muestran en los **artículos III y IV** y se discuten a continuación.

Las BSs reducidas fueron los únicos compuestos detectados como producto de las reacciones de la PM o de la Ac-Phe-Lys con los compuestos carbonílicos (esquemas 4.2 y 4.3). En cambio, producto de las reacciones entre la Ac-Cys y los RCS se generó un tiohemiacetal (TH), tal y como se muestra en el esquema 4.4. El seguimiento de la variación de la concentración de nucleófilo con el tiempo y el ajuste de dichos resultados al esquema cinético,

proporcionó el valor de las pseudo constantes de reacción correspondientes a la variación de la concentración de nucleófilo con el tiempo (k_{obs}). A su vez permitió también la determinación de las constantes microscópicas de formación de las BSs ($k_{\text{F-BS}}$) y de los TH (k_{TH}). Para el cálculo de $k_{\text{F-BS}}$ y k_{TH} se consideraron los equilibrios iónicos (en el caso de la Ac-Phe-Lys y de la Ac-Cys, K_A) o tautoméricos (para la PM, K_A') de los nucleófilos y los equilibrios de ciclación (para las aldosas) o de hidratación de los aldehídos y cetonas (K_B). Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 4.1 y 4.2 y revelan que:

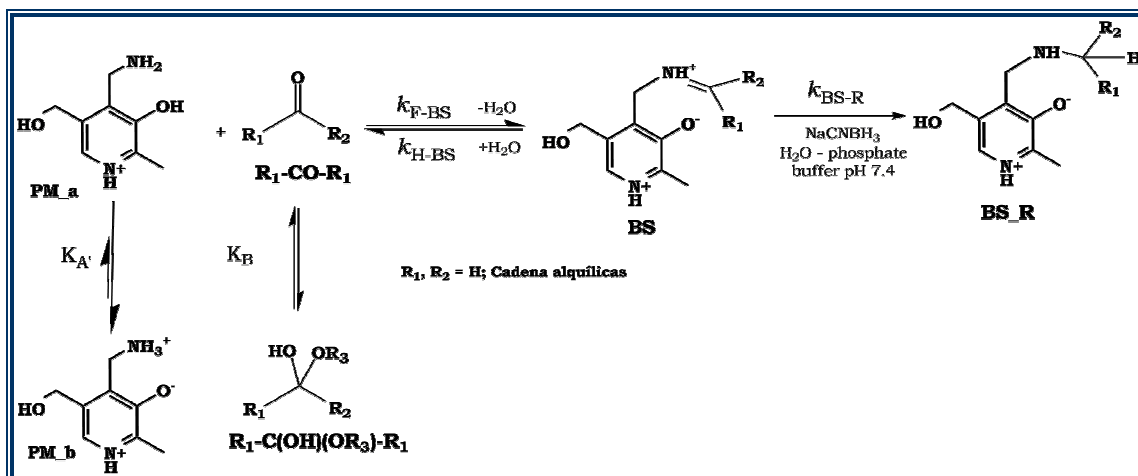
a) Los valores de $k_{\text{F-BS}}$ correspondientes a la reacción del grupo amina libre de la PM con el grupo carbonilo de los RCS estudiados, son entre 2 y 5 veces inferiores a los determinados para el grupo ϵ -amina de la Ac-Phe-Lys. Los cálculos teóricos indican que dicha diferencia es consecuencia de la densidad electrónica. 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 puente de hidrógeno intramolecular que reduce la densidad de carga negativa del grupo amina primario, lo cual no ocurre en el grupo ϵ -amina del modelo proteico.



Esquema 4.2. Mecanismo de formación de una amina secundaria mediante la reducción selectiva de la BS formada entre la Ac-Phe-Lys y diferentes compuestos carbonílicos.

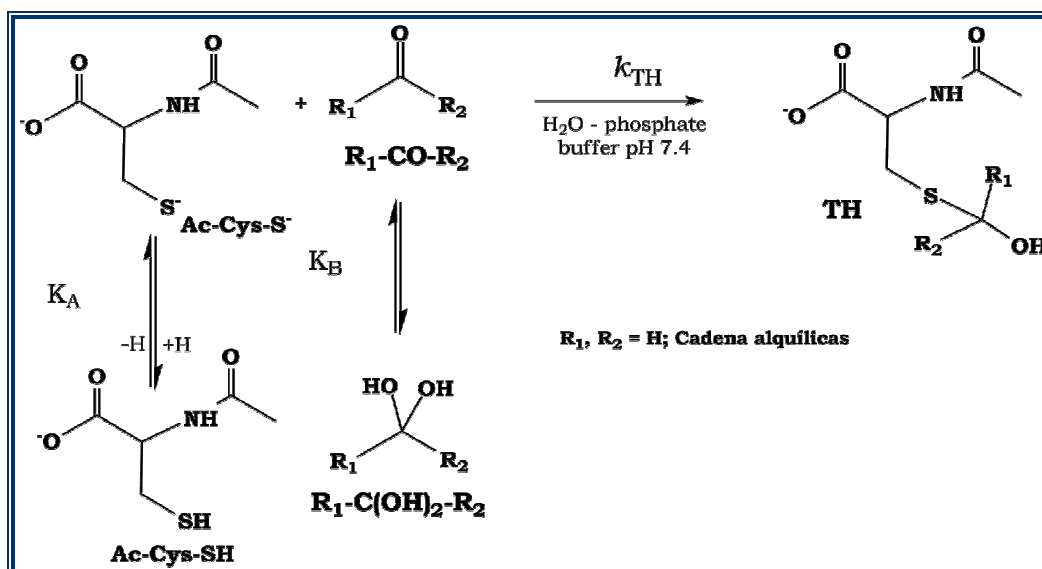
b) Los α -oxoaldehídos son los grupos carbonílicos de mayor reactividad. El valor de $k_{\text{F-BS}}$ para el GO fue un orden de magnitud superior al valor del MGO. El valor de los α -hidroxialdehídos fue un orden de magnitud superior al del acetaldehído, lo que sugiere que la presencia de un hidroxilo en posición α -al aldehído incrementa su reactividad. Los valores de $k_{\text{F-BS}}$ determinados para las cetonas fueron entre 3 y 4 órdenes de magnitud inferiores a los de los

aldehídos, tal y como es de esperar dada la reactividad química de los grupos carbonílicos cetónicos y aldehídicos.



Esquema 4.3. Mecanismo de formación de una amina secundaria mediante reducción selectiva de la BS formada entre la PM y diferentes compuestos carbonílicos.

c) Los valores relativos de k_{obs} indican que la PM es, a pH fisiológico, entre 4 y 6 veces más reactiva que la Ac-Phe-Lys. Esta diferencia no es consecuencia de su diferente carácter nucleófilo, sino de la mayor proporción de especie desprotonada de PM con respecto a la de Ac-Phe-Lys, por lo que puede concluirse que la PM es capaz de inhibir de manera competitiva y efectiva la glicación sobre los grupos ϵ -amina presentes en las cadenas laterales de las Lys *in vitro*.



Esquema 4.4. Mecanismo de formación del tiohemiacetal (TH) a partir de la reacción de la Ac-Cys con compuestos carbonílicos.

Tabla 4.1. Constantes cinéticas para la reacción de la PM y la Ac-Phe-Lys con compuestos carbonílicos (pH 7.4 y a 37 °C).

Compuesto	PM			Ac-Phe-Lys	
	K_B	$k_{obs} (M^{-1} h^{-1})$	$k_{F-BS} (M^{-1} h^{-1})$	$k_{obs} (M^{-1} h^{-1})$	$k_{F-BS} (M^{-1} h^{-1})$
Acetona	$9.9 \cdot 10^1$ (a)	1.4	$3.9 \cdot 10^1$	0.36	$1.8 \cdot 10^2$
Acetol	$4.9 \cdot 10^1$ (b)	2.9	$8.5 \cdot 10^1$	0.86	$4.3 \cdot 10^2$
Acetaldehído	$8.0 \cdot 10^{-1}$ (c)	470	$3.0 \cdot 10^4$	54	$6.0 \cdot 10^4$
GLA	$8.6 \cdot 10^{-2}$ (d)	600	$2.2 \cdot 10^5$	110	$7.0 \cdot 10^5$
Glucosa	$2.0 \cdot 10^{-5}$ (e)	0.29	$3.7 \cdot 10^5$	0.046	$1.0 \cdot 10^6$
Ribosa	$4.0 \cdot 10^{-4}$ (e)	5.4	$3.9 \cdot 10^5$	0.86	$1.2 \cdot 10^6$
Arabinosa	$3.0 \cdot 10^{-4}$ (e)	3.4	$2.9 \cdot 10^5$	0.54	$8.7 \cdot 10^5$
GO	$1.8 \cdot 10^{-5}$ (f)	6.5	$1.8 \cdot 10^7$	1.1	$3.0 \cdot 10^7$
MGO	$1.7 \cdot 10^{-3}$ (g)	66	$1.1 \cdot 10^6$	11	$3.1 \cdot 10^6$

^a[GREENZAI, 1967]; ^b[GLUSHONOK, 2003]; ^c[SCHUCHMANN, 1988]; ^d[BEEBY, 1987]; ^e[DWORKIN, 2000]; ^f[SCHWEITZER, 1998]; ^g[CREIGHTON, 1988].

Tabla 4.2. Constantes cinéticas para la reacción de la Ac-Cys con compuestos carbonílicos (pH 7.4 y a 37 °C).

Reacción	$k_{TH} (M^{-1} h^{-1})$	$k_{obs} (M^{-1} h^{-1})$
Ac-Cys + MGO	$(4.2 \pm 0.7) \cdot 10^{10}$	$(1.7 \pm 0.4) \cdot 10^6$
Ac-Cys + GLA	$(4.6 \pm 0.3) \cdot 10^9$	$(6.7 \pm 1.1) \cdot 10^6$
Ac-Cys + GO	$(2.2 \pm 0.4) \cdot 10^{11}$	$(4.2 \pm 0.8) \cdot 10^4$

d) Los valores de k_{TH} para la reacción del grupo tiol de la Ac-Cys con el grupo carbonilo del GO son uno y dos órdenes de magnitud superiores a los determinados para el MGO y el GLA respectivamente. A su vez los valores de k_{TH} son cuatro órdenes de magnitud superiores a los valores de k_{F-BS} referentes a la PM con los mismos RCS, lo que se atribuye al mayor carácter nucleófilo del tiolato con respecto al grupo amino.

e) Los valores de k_{obs} determinados para el TH son también cuatro órdenes de magnitud superiores a los valores de k_{obs} determinados para la PM. Puesto que ambos nucleófilos presentan el mismo porcentaje de grupo reactivo a pH neutro, su diferente reactividad se debe exclusivamente a la diferente nucleofilia de sus grupos reactivos. Los datos obtenidos demuestran claramente que la PM no inhibe competitivamente la glicación de las cadenas laterales de las Cys *in vitro*.

4. MECANISMO DE LA REACCIÓN DE PIRIDOXAMINA CON HEXOSAS Y PENTOSAS.

En términos biomédicos, la D-glucosa es el compuesto carbonílico más importante, ya que su reacción con las cadenas ϵ -amina proteicas representa el punto de inicio de todos los procesos de modificación proteica asociados a la DM [SUL, 2004]. Aún así, el hecho de que numerosos AGEs se formen a partir de pentosas (PNT, vesperlisina, etc.) indica que otras aldosas pueden participar también en la GP.

Por ello, se ha estudiado el mecanismo de reacción de la PM con un conjunto de pentosas y hexosas, se han aislado y caracterizado los productos de reacción, se ha propuesto un mecanismo de reacción y se han determinado sus constantes cinéticas a pH 7.4 y a 37 °C. Se ha estudiado la influencia de la longitud de la cadena hidrocarbonada en el mecanismo de reacción y el efecto de la quiralidad de los carbonos hidroxilados sobre su cinética. Los resultados obtenidos se muestran en los **artículos V y VI** y se discuten a continuación.

En el esquema 4.5 se muestra el mecanismo general de la reacción de la PM con hexosas y pentosas. La reacción entre la PM y hexosas se inicia con el ataque del grupo amino libre de la PM (PM_a) sobre el grupo carbonilo de la forma reducida de la hexosa (aldosa_a). Producto de dicha condensación se forma una BS de naturaleza glúcida. La BS formada entre la PM y la D-glucosa fue aislada y su evolución se siguió por espectroscopia UV/Vis. Su

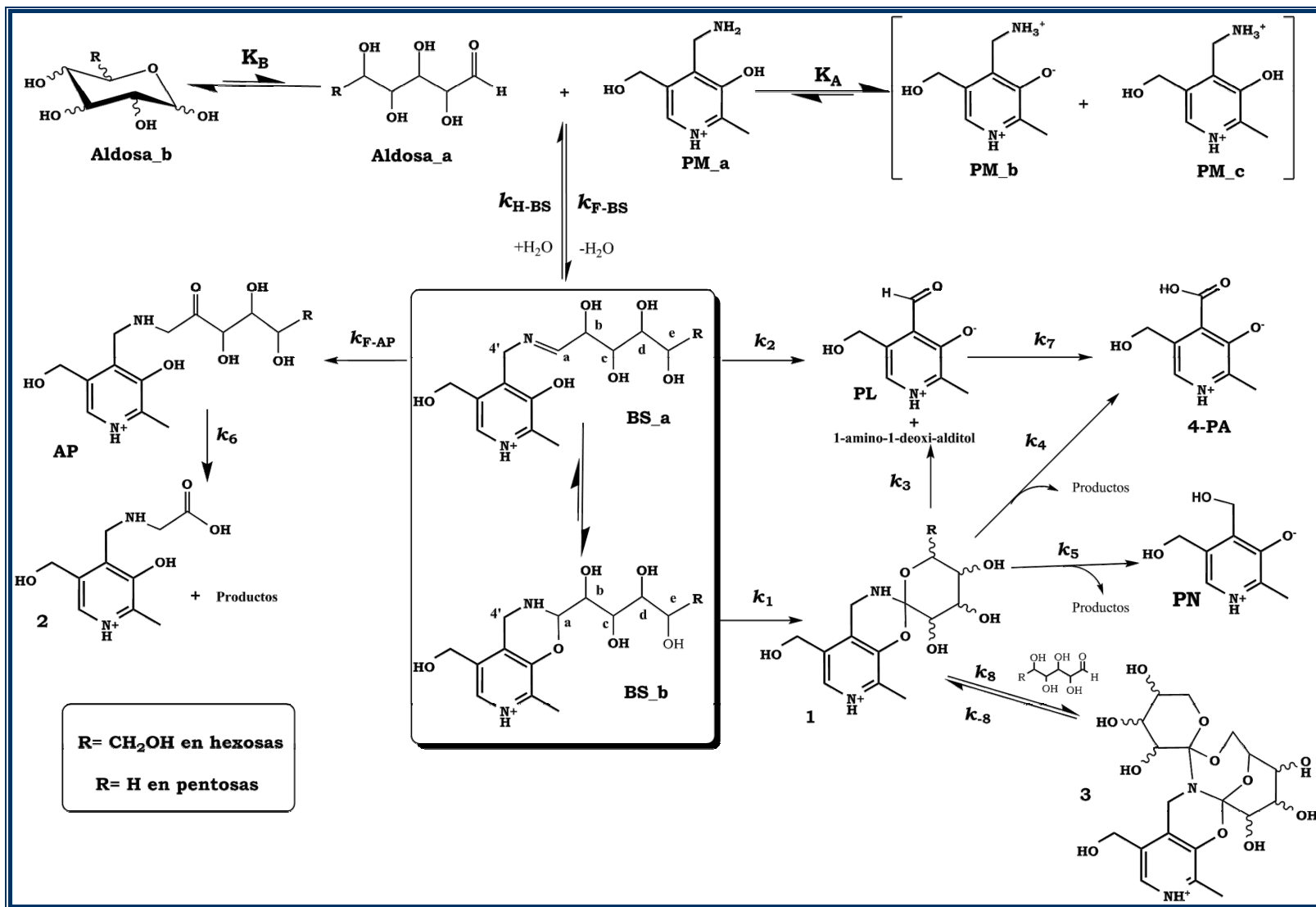
espectro inicial presentó la misma forma que la del espectro característico del isómero hemiaminal de las BSs. Este hecho demuestra que a diferencia de otras BSs de naturaleza glúcida que evolucionan hacia la formación de su glucosamina (ver esquema 1.11) [IRVINE, 1922], las BSs de PM con hexosas presentan mayoritariamente equilibrio isomérico entre la imina (BS_a) y su forma hemiaminal (BS_b).

Se detectó también el PL como uno de los productos iniciales de la reacción. Este hecho sugiere que la BS_a puede sufrir isomerización de su enlace imina, liberando los productos típicos de la reacción de transaminación.

El compuesto **1** fue también detectado como producto de la reacción entre la PM y las hexosas. Su formación puede explicarse a partir del isómero hemiaminal de la BS (BS_b). La eliminación del H-C(a) mediante un mecanismo similar al descrito en la degradación del AP (ver esquema 1.14, camino B) conduce a la formación de una nueva imina. El ataque intramolecular del hidroxilo unido al C(e) sobre dicha imina provoca la ciclación glúcida y la formación del compuesto **1**.

Los compuestos detectados como productos finales de reacción fueron el PL, la PN y el 4-AP. El estudio de la degradación del compuesto **1**, una vez aislado, demostró que dichos vitámeros proceden de su evolución. Debe indicarse que el 4-PA también puede proceder de la oxidación del PL, tal y como describieron *Gregory y Kirk* [GREGORY, 1978]. El valor de k_7 , determinado en un estudio previo, se utilizó en el ajuste de los datos experimentales al esquema 4.5 ($k_7 = 2.6 \cdot 10^{-4} \text{ h}^{-1}$).

Es importante indicar que se observaron diferencias en el mecanismo de reacción en función de la naturaleza de la hexosa. En todas las reacciones de la PM con las hexosas se detectó la formación del compuesto **2**, a excepción de la reacción entre la PM y la D-glucosa. Su formación se explica a raíz de la evolución de la BS_a hacia el AP, seguida de oxidación [AHMED, 1986] o rotura β -carbonílica [KASPER, 2005]. La tendencia a la formación del compuesto **2** es inversamente proporcional a la tendencia a la ciclación de la hexosa estudiada, siendo las reacciones de la PM con la D-altrosa y la D-galactosa las que evidenciaron una mayor formación del compuesto **2**.



Esquema 4.5. Mecanismo general de la reacción de la PM con hexosas y pentosas.

Tabla 4.3. Constantes cinéticas a 37 °C obtenidas para la reacción entre la PM y aldosas en tampón fosfato 0.5 M a pH 7.4.

<i>Aldosa</i>	$K_B \cdot 10^5$ ^a	$k_{F-BS} (M^{-1} \cdot h^{-1}) \cdot 10^{-4}$	$k_{H-BS} (h^{-1})$	$k_{F-AP} (h^{-1}) \cdot 10^2$	$k_1 (h^{-1}) \cdot 10^2$	$k_2 (h^{-1})$	$k_6 (h^{-1}) \cdot 10^{-3}$	$k_3 (M^{-1} \cdot h^{-1}) \cdot 10^{-2}$	$k_{-3} (h^{-1}) \cdot 10^2$	^b $k_d (h^{-1}) \cdot 10^4$
Altrosa	36	5.9	3.4	2.1	7.2	--	0.87	--	--	98
Arabinosa	33	5.5	25	51	--	0.34	1.4	--	--	--
Galactosa	17	5.7	3.0	0.96	9.1	--	1.0	--	--	96
Allosa	11	9.6	1.5	1.9	5.2	0.036	1.7	--	--	123
Glucosa	2.2	9.2	16	--	110	--	--	--	--	27
Lixosa	25	9.7	17	57	--	0.43	1.4	--	--	--
Manosa	5.3	9.0	13	4.2	83	--	2.1	--	--	37
Xilosa	16	9.9	13	49	--	0.32	2.5	--	--	--
Gulosa	19	13	20	3.5	133	--	1.8	5.7	4.5	9.6
Ribosa	47	14	8.9	30	--	0.44	1.7	--	--	--
Talosa	33	13	8.3	1.9	110	--	1.4	6.1	6.9	17

^a Los valores de K_B para cada aldosa fueron obtenidos del trabajo publicado por Miller y Dworkin [DWORKIN, 2000].

^b $k_d = k_3 + k_4 + k_5$.

Se observaron también diferencias en la concentración máxima de compuesto **1** en función de la hexosa estudiada. Las reacciones de la PM con hexosas con elevada tendencia a la ciclación (D-glucosa y D-manosa) fueron las que mostraron una mayor concentración de compuesto **1**, de manera que es un hecho que las hexosas con mayor tendencia a ciclar evolucionan preferentemente hacia la formación del compuesto **1**, mientras que las que presentan una baja tendencia a ciclar lo hacen hacia el compuesto **2**.

Finalmente, debe señalarse que en las reacciones de la PM con la D-gulosa y la D-talosa se observó la formación del compuesto **3**, producto de la condensación de una segunda molécula de hexosa con el grupo amina secundario del compuesto **1**. Este mecanismo fue confirmado mediante el estudio de la degradación del compuesto **3** una vez aislado, detectándose la formación del compuesto **1** como principal producto de la misma.

En el esquema 4.5 se muestra también el mecanismo general de la reacción de la PM con pentosas. Análogamente a lo descrito para las hexosas, la reacción se inicia mediante la formación de una BS (BS_a) que evoluciona hacia la formación de PL. Debido al elevado valor de K_B para las pentosas en comparación con las hexosas, no se detectó en ningún caso la formación de los compuestos **1** ni **3**. Sí se detectó la aparición de 4-PA procedente de la oxidación del PL. El compuesto **2** fue el producto mayoritario de la reacción de la PM con pentosas. No se observaron diferencias en el mecanismo de reacción en función de la naturaleza de la pentosa estudiada.

La variación en la concentración de los reactivos y productos para cada reacción se ajustó a su esquema cinético, lo que proporcionó el valor de las constantes de velocidad mostradas en la tabla 4.3. Los valores de k_{F-BS} de las reacciones de PM con glucosa, ribosa y arabinosa son del mismo orden de magnitud que los determinados para dichas reacciones en presencia de NaCNBH_3 (ver tabla 4.1). A su vez, estos valores son del mismo orden de magnitud que los de k_{F-BS} correspondientes a la reacción entre el grupo aldehídico del PLP con el grupo amino de un aminoácido, tal y como se ha descrito en el apartado 1.3.1 del capítulo 1.

Los valores de k_{F-BS} para la D-altrosa, la D-arabinosa y la D-galactosa son similares entre ellos, e inferiores a los determinados para la D-alosa, la D-glucosa, la D-manosa la D-lixosa y la D-xilosa. A su vez, los valores de k_{F-BS} determinados para la D-ribosa, la D-gulosa y la D-talosa son mayores que los de las restantes aldosas.

La diferente reactividad de cada aldosa se explicó mediante cálculos teóricos. En la figura 4.4 se representa el valor de k_{F-BS} determinado para cada aldosa en su reacción con la PM, frente a la carga NBO (*natural bond orbital*) de su carbono carbonílico. Los resultados obtenidos muestran una correlación entre los valores de k_{F-BS} y la carga neta del carbono carbonílico. La D-gulosa y la D-talosa son las hexosas con mayor carga neta NBO, lo que explica su habilidad para formar el compuesto **3**. Este compuesto no fue detectado en la reacción de la D-ribosa con la PM debido a que las pentosas no forman el compuesto **1**.

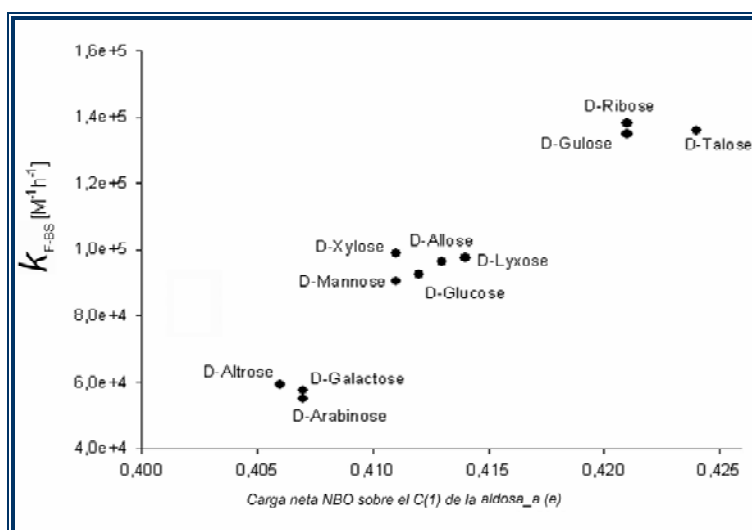


Figura 4.4. Relación entre el valor de k_{F-BS} para la reacción de la PM con diferentes aldosas con los valores de las cargas NBO correspondientes al grupo carbonilo de la forma reducida de dichas aldosas.

La diferente densidad electrónica del carbono carbonílico de cada aldosa se debe a la formación de una red intramolecular de puentes de hidrógeno. En la figura 4.5 se muestran tres estructuras de mínima energía representativas de cada grupo de valores de k_{F-BS} . En la estructura A, correspondiente a la D-gulosa, el oxígeno del grupo carbonilo forma un puente de hidrógeno con el hidroxilo del C(b), el cual establece una red de cuatro puentes de hidrógeno con los otros hidroxilos de la aldosa, reduciendo la densidad electrónica del carbono carbonílico. En la estructura B, correspondiente a la D-manosa, el grupo carbonilo también forma un puente de hidrógeno con el hidroxilo del C(b), aunque la red que éste establece es únicamente de dos puentes de hidrógeno. En la estructura C se muestra el mínimo energético de la D-galactosa, para la que su oxígeno carbonílico no establece ningún puente de hidrógeno intramolecular.

La reacción entre la PM y la glucosa fue estudiada también a 60°C, hecho que permitió la estimación del valor de la E_a para la k_{F-BS} . Se obtuvo un valor en torno a 24 kcal/mol, acorde al valor de la E_a determinado por *Labuza et al.* [LABUZA, 1981][LABUZA, 1992] para la formación de BSs entre la glucosa y aminoácidos (20-25 kcal/mol).

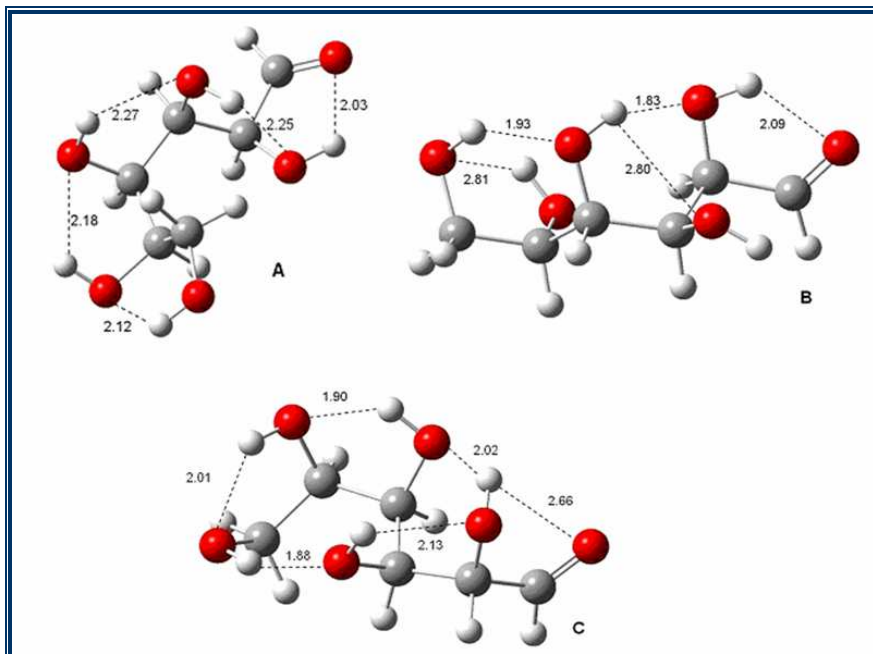


Figura 4.5. Estructuras de la D-glucosa (A), D-manosa (B) y D-galactosa (C). Las distancias O-H se dan en angstroms.

Los valores obtenidos de k_{H-BS} presentan el mismo orden de magnitud que los determinados para las BSs formadas entre el PLP y aminoácidos (ver apartado 1.3.1). A su vez, los valores de k_{H-BS} (mostrados en la tabla 4.3) son mayores que los valores de k_{F-AP} , lo que concuerda con la observación experimental de que la BS formada entre la glucosa y la PM evoluciona, una vez aislada, hacia la formación de los reactivos iniciales.

Los valores de k_{F-AP} correspondientes a la evolución de las BSs hacia los APs y los de k_2 correspondientes a las constantes de isomerización de las BSs, son mayores para las pentosas que para las hexosas. Este hecho responde a la poca disponibilidad de las BSs de pentosas para evolucionar hacia el compuesto **1**, degradándose mayoritariamente mediante esas dos vías.

La constante de degradación del AP hacia el compuesto **2** (k_6) es mayor que el valor de la constante para el mismo proceso a partir del AP formado sobre aminoácidos ($86 \cdot 10^{-6} \text{ h}^{-1}$ [FERREIRA, 2003]).

Los resultados demuestran que la reacción de la PM con la glucosa, producida bajo administración farmacológica de PM en la DM, no evoluciona

mediante el mecanismo general de la reacción de Maillard. La formación del compuesto **1** inhibe la formación del AP correspondiente y consecuentemente la formación de los RCS producidos durante su degradación (ver apartado 2.3.2 del capítulo 1). Por otra parte, hay que indicar que la PM es capaz de secuestrar pentosas de elevada capacidad glicante (ribosa o arabinosa). En dicha reacción, la BS formada evoluciona preferentemente mediante dos mecanismos: a) isomerización de la BS formada para liberar PL; b) reordenamiento de la BS para dar el AP, el cual degrada rápidamente hacia el compuesto **2**, inhibiendo así otras vías de degradación y la formación de otros RCS.

5. EL MECANISMO DE ACCIÓN DE LA PIRIDOXAMINA SOBRE LOS COMPUESTOS DE AMADORI.

Los APs formados sobre residuos ϵ -amina proteicos han sido señalados como compuestos clave en la formación final de AGEs [ULRICH, 2001], de hecho, su concentración se incrementa entre 2 y 3 veces en personas diabéticas con respecto a individuos sanos [KATO, 1989]; por ello, el bloqueo de su evolución es crucial en la prevención del desarrollo patológico asociado a la formación de AGEs.

Khalifah *et al.* [KHALIFAH, 1999] demostraron que la PM puede inhibir la formación de AGEs a partir de la evolución de los APs. A raíz de sus experimentos, se ha asumido que la PM es incapaz de reaccionar con el grupo carbonilo de los APs y que su principal mecanismo de acción es la acomplejación de iones metálicos (esencialmente Cu^{2+} y Fe^{2+}) que catalizan la oxidación del AP [VOZIYAN, 2003][KHALIFAH, 2005]. Sin embargo, conocida la reactividad química de grupos amina frente a grupos carbonilos, es de esperar que la PM y el AP condensen para formar una BS. Además, el hecho de que la aminoguanidina (AG) presente una capacidad inhibidora de la oxidación del ácido ascórbico catalizada por Cu^{2+} similar a la de la PM [PRICE, 2001] y que sea incapaz de inhibir las reacciones post-Amadori [KHALIFAH, 1999], supone una notable evidencia de que la PM ha de presentar otros mecanismos no conocidos hasta la fecha que posibiliten su acción inhibidora sobre la degradación de los APs.

Con el fin de elucidar el mecanismo de acción de la PM sobre los APs se estudió: a) la reacción de dos APs modelo (el *N*-(1-desoxi-D-fructos-1-il)-L-triptófano y el 1-desoxi-1-morfolino-D-fructosa) con la PM y con la 4-

aminometilpiridina (compuesto análogo a la PM aunque sin capacidad inhibidora de las reacciones post-Amadori [VOZIYAN, 2003]) (figura 4.6); b) la estabilidad de los complejos metálicos de Zn^{2+} (cuyos complejos presentan gran analogía con los de Cu^{2+}) con el ácido ascórbico, la PM, la AG y el *N*-(1-desoxi-D-fructos-1-il)-L-triptófano. Los resultados obtenidos se detallan en el **artículo VII** y se discuten a continuación.

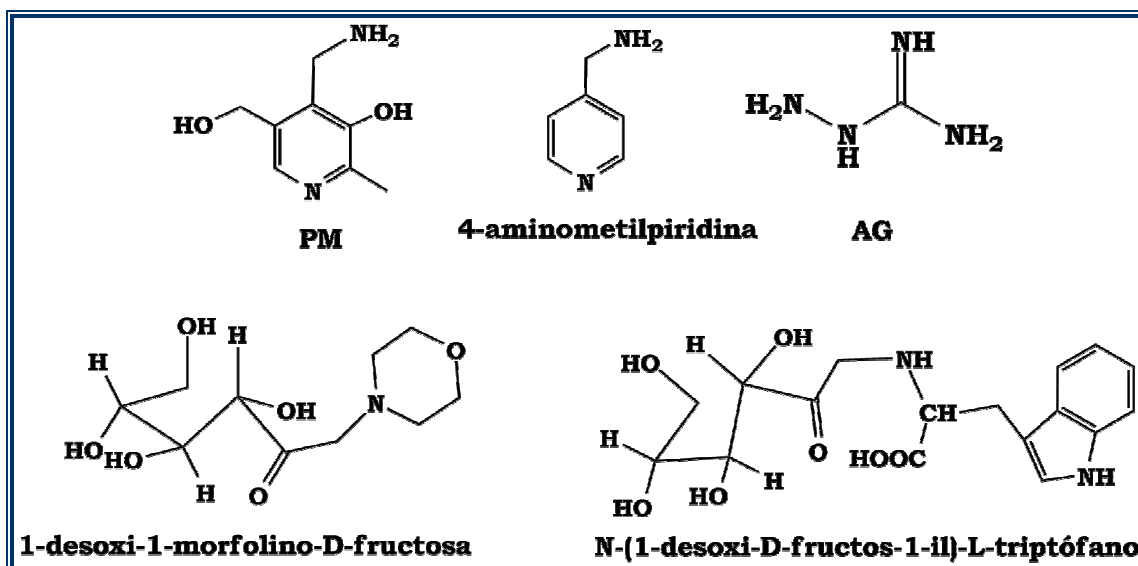


Figura 4.6. Estructuras de la PM, la 4-aminometilpiridina, la AG y los dos AP modelo, el *N*-(1-desoxi-D-fructos-1-il)-L-triptófano y el 1-desoxi-1-morfolino-D-fructosa

Se estudiaron, en presencia de $NaCNBH_3$, las reacciones de la PM con los dos APs modelos mostrados en la figura 4.6. Producto de su reacción, se detectó la formación de las correspondientes BSs reducidas con un mecanismo de formación como el mostrado en el esquema 4.3. Estos resultados demuestran que la PM es capaz de reaccionar con los grupos carbonilos de los APs, contrariamente a lo descrito hasta la fecha. A partir de la variación de la concentración de PM con el tiempo, se determinó el valor de las pseudo constantes cinéticas (k_{obs}) y microscópicas (k_{F-BS}) de formación de las BSs correspondientes. Los valores de las constantes y las determinadas para la reacción de la 4-aminometilpiridina con dichos APs se muestran en la tabla 4.4.

Tabla 4.4. Constantes cinéticas a 37 °C obtenidas para la reacción entre la PM y la 4-aminometilpiridina con dos APs modelo a pH 7.4.

Reacciones estudiadas	k_{obs} (h ⁻¹)	k_{F-BS} (M ⁻¹ h ⁻¹)
PM + <i>N</i> -(1-desoxi-D-fructos-1-il)-L-triptófano	(27 ± 0.6)·10 ⁻³	83 ± 16
PM + 1-desoxi-1-morfolino-D-fructosa	(27 ± 0.3)·10 ⁻³	83 ± 14
4-aminometilpiridina + <i>N</i> -(1-desoxi-D-fructos-1-il)-L-triptófano	(72 ± 1.6)·10 ⁻³	194 ± 40
4-aminometilpiridina + 1-desoxi-1-morfolino-D-fructosa	(71 ± 7.6)·10 ⁻³	190 ± 30

Los resultados obtenidos indican que los valores de k_{F-BS} para la PM son aproximadamente la mitad de los valores de k_{F-BS} para la 4-aminometilpiridina, lo que es un reflejo de la diferente densidad de carga que presentan sus respectivos grupos amina primarios, diferencia que responde a la formación de un puente de hidrógeno intramolecular en la PM. Los valores de k_{obs} obtenidos para la 4-aminometilpiridina en su reacción con los AP, son también el doble que los valores de k_{obs} obtenidos para la PM, diferencia que se debe exclusivamente a su distinto carácter nucleófilo, ya que ambos compuestos presentan una proporción similar de especie reactiva a pH neutro ($\approx 3.5\%$).

Voziyan et al. [VOZIYAN, 2003] demostraron que, a diferencia de la PM, la 4-aminometilpiridina es incapaz de inhibir la formación de AGEs a partir del AP. No obstante, se ha demostrado que presenta una reactividad mayor que la PM frente a los AP, lo que es clara evidencia de que la reacción de la PM con los AP no tiene un significado destacable en el mecanismo de inhibición de las reacciones post-Amadori.

Se estudió también la estabilidad de los complejos de PM, AG y *N*-(1-desoxi-D-fructos-1-il)-L-triptófano con el Zn²⁺ mediante ¹³C-RMN. En la figura 4.7 se representa la variación en la concentración de ligando con respecto a la concentración de Zn²⁺. Los resultados obtenidos muestran que la PM presenta la mayor capacidad acomplejante, seguido del AP estudiado, mientras que la AG es la que presenta una menor capacidad acomplejante.

Los resultados obtenidos están en concordancia con los determinados por *Price et al. [PRICE, 2001]* los cuales muestran que tanto la PM como la AG son capaces de inhibir la oxidación del ácido ascórbico catalizada por iones metálicos. Además, los resultados obtenidos justifican el hecho de que la PM, a diferencia de la AG, sea un buen inhibidor de las reacciones post-Amadori. La acomplejación metálica preferente con la PM evitará que los iones se

acomplejen con los APs, inhibiendo por tanto los mecanismos de autoxidación que ello desencadena. En cambio, la AG no presenta competición efectiva con el AP frente a la acomplejación de iones metálicos, lo cual explica que la AG no presente ningún efecto sobre dichos procesos.

Los resultados obtenidos demuestran claramente que la acomplejación de iones metálicos representa el mecanismo más importante mediante el cual la PM es capaz de inhibir las reacciones post-Amadori.

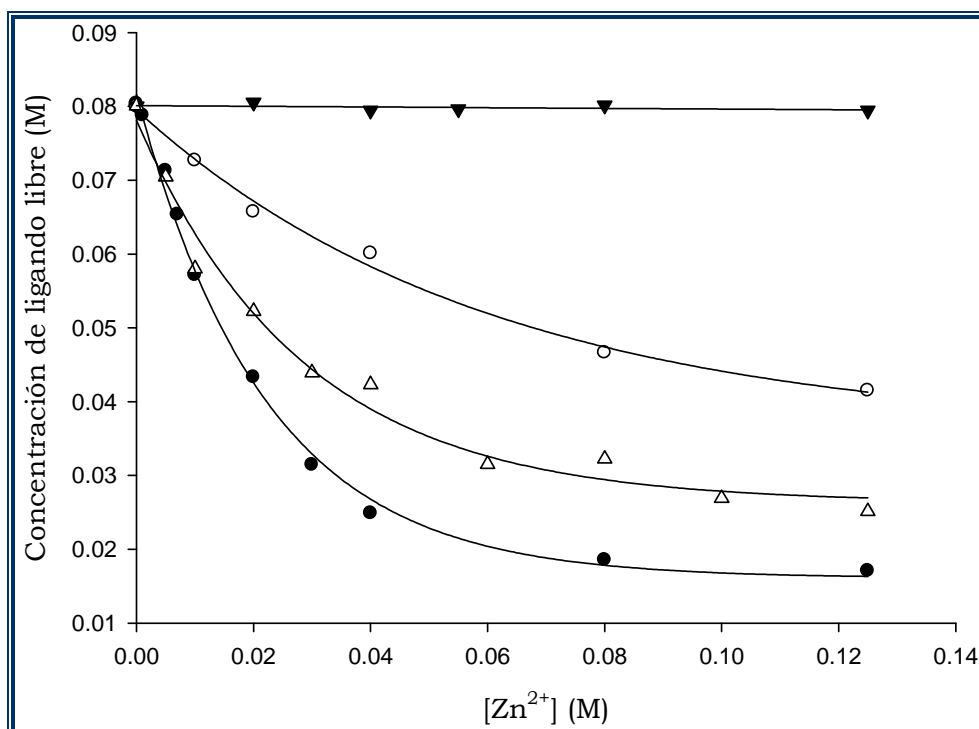


Figura 4.7. Representación de la concentración de ligando libre frente a la concentración total de Zn^{2+} presente en la mezcla de reacción. Se utilizaron como ligandos la PM (●), el *N*-(1-desoxi-D-fructos-1-il)-L-triptófano (Δ), la AG (○) y el ácido ascórbico (▼).

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- La irradiación de disoluciones de PM y PLP con 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 los vitámeros B₆, lo cual debe tenerse en cuenta en los estudios de reactividad química y enzimática de los vitámeros B₆ que utilizan esta técnica químico-física para la detección de reactivos, intermedios y productos. La irradiación de las disoluciones de vitámeros B₆ con luz (UV/Vis) de longitud de onda superior a 220 nm producida por una lámpara de D₂ (30 W), de Xe (75 W) o de wolframio (50W) no afecta a los equilibrios de hidratación ni a los tautoméricos de los vitámeros B₆.
- La reacción entre la PM y grupos carbonilos procede mediante la formación inicial de una carbinolamina que deshidrata para formar una BS, acorde al mecanismo general descrito para la reactividad entre grupos amina y grupos carbonilo. Atípicamente, las BSs de PM presentan un equilibrio isomérico altamente desplazado hacia su forma hemiaminal. El isómero hemiaminal se forma por el ataque del fenolato piridínico sobre el carbono imínico.
- La formación de BSs desempeña un papel muy importante en el mecanismo global de inhibición de la GP por la PM. En condiciones fisiológicas, la PM reacciona con RCS entre 4 y 6 veces más rápido de lo que lo hace el grupo ε-amina de la cadena lateral de un modelo proteico, lo que prueba que la PM puede actuar de manera efectiva como inhibidor competitivo de la reacción de los RCS con las cadenas laterales de las Lys (*in vitro*).
- La formación de los THs como producto de la reacción entre la Ac-Cys y RCS es 10⁴ veces más rápida que la formación de las BSs entre la PM y los RCS, lo que descarta a la PM como inhibidor efectivo de la modificación de las cadenas laterales de las Cys (*in vitro*).
- La reacción entre la PM y la D-glucosa (agente glicante más importante, ya que es promotor de todos los procesos de GP) u otras hexosas, procede mediante la formación inicial de una BS, cuya evolución escapa al mecanismo

general descrito para las reacciones entre la glucosa y grupos amino, conocido como reacción de Maillard. De manera atípica al comportamiento descrito para las glucosaminas, las BSs formadas con la PM no presentan equilibrio con su forma piranosa, sino que presentan equilibrio isomérico con su forma hemiaminal. La formación de dicho hemiaminal es la clave que permite la formación de un compuesto espirobicíclico, representado en el esquema 4.5 como compuesto **1**. Este compuesto se degrada generando PN, PL, 4-PA y una aminoaldosa, inhibiendo así la producción de RCS formados en la reacción entre grupos amino y la glucosa.

➤ La reacción entre la PM y pentosas (algunas implicadas en la GP) procede mediante un mecanismo distinto al descrito para la reacción entre la PM y las hexosas, lo que prueba que la longitud de la cadena hidrocarbonada afecta al mecanismo de reacción de la aldosa con la PM. Como producto de su condensación inicial se forma una BS, que evoluciona esencialmente formando PL mediante transaminación y el compuesto **2** del esquema 4.5 debido a la oxidación del AP.

➤ La quiralidad de los carbonos característicos de cada aldosa afecta a su reactividad. La disposición de los hidroxilos de la cadena hidrocarbonada condiciona la formación de una red de puentes de hidrógeno con el oxígeno del carbonilo modificando su electrofilia.

➤ La PM reacciona con el grupo carbonílico presente en los APs. A pesar de ello, esta reacción no es de relevancia en el mecanismo global de la PM como inhibidor de las reacciones post-Amadori. Es la capacidad de la PM para acomplejar metales divalentes lo que le confiere sus grandes propiedades inhibitorias de la formación de AGEs a partir de los APs. La PM tiene mayor afinidad que los AP por los metales oxidantes, por lo que su secuestro impide el progreso de los procesos subsiguientes de oxidación de los APs.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- [ABBOTT, 1970] E. H. Abbott, A. E. Martell. Mechanism of formation, structure, stereochemistry, and racemization of bis[pyridoxylidene(amino acidato)]aluminum(III) complexes. *J. Am. Chem. Soc.* (1970), 92, 5845.
- [ACHARYA, 1983] A. S. Acharya, J. M. Manning. Reaction of glycolaldehyde with proteins: latent crosslinking potential of α -hidroxialdehydes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1983), 80, 3590.
- [AHMED, 1986] M. U. Ahmed, S. R. Thorpe, J. W. Baynes. Identification of *N*-carboxymethyl-lysine as a degradation product of fructoselysine in glycated protein. *J. Biol. Chem.* (1986), 261, 4889.
- [AHMED, 1988] M. U. Ahmed, J. A. Dunn, M. D. Walla, S. R. Thorpe, J. W. Baynes. Oxidative degradation of glucose adducts to protein. Formation of 3-(*N*-lysino)-lactic acid from model compounds and glycated proteins. *J. Biol. Chem.* (1988), 263, 8816.
- [AHMED, 1997] M. U. Ahmed, E. B. Frye, T. P. Degenhardt, S. R. Thorpe, J. W. Baynes. *N*-(carboxyethyl)lysine, a product of the chemical modification of proteins by methylglyoxal, increases with age in human lens proteins. *Biochem. J.* (1997), 324, 565.
- [AHMED, 2005A] N. Ahmed, P. J. Thornalley. Peptide mapping of human serum albumin modified minimally by methylglyoxal *in vitro* and *in vivo*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* (2005), 1043, 260.
- [AHMED, 2005B] N. Ahmed, R. Babaei-Jadidi, S. K. Howell, P. J. Beisswenger, P. J. Thornalley. Degradation products of proteins damaged by glycation, oxidation and nitration in clinical type 1 diabetes. *Diabetologia* (2005), 48, 1590.
- [AL-ABED, 1997] Y. Al-Abet, R. Bucala. Efficient scavenging of fatty acid oxidation products by aminoguanidine. *Chem. Res. Toxicol.* (1997), 10, 875.
- [ALBERTI, 1998] K. G. M. Albertini, P. Z. Zimmet. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet. Med.* (1998), 15, 539.
- [ALDERSON, 2006] N. L. Alderson, Y. Wang, M. Blatnik, N. Frizzell, M. D. Walla, T. L. Lyons, N. Alt, J. A. Carson, R. Nagai, S. R. Thorpe, J. W. Baynes. *S*-(2-Succinyl)cysteine: a novel chemical modification of tissue proteins by a Krebs cycle intermediate. *Arch. Biochem. Biophys.* (2006), 450, 1.
- [ALDINI, 2005] G. Aldini, R. M. Facino, G. Beretta, M. Carini. Carnosine and related dipeptides as quencher of reactive carbonyl species: from structural studies to therapeutic intervention. *Biofactors* (2005), 24, 77.
- [ALDINI, 2007] G. Aldini, I. Dalle-donne, R. M. Facino, A. Milzani, M. Carini. Intervention strategies to inhibit protein carbonylation by lipoxidation-derived reactive carbonyls. *Med. Res. Rew.* (2007), 27, 817.
- [ALLEN, 1995] B. J. Allen, T. J. Sims, N. C. Avery, P. E. Halligan. Non-enzymic glycation of fibrous collagen: reaction products of glucose and ribose. *Biochem. J.* (1995), 305, 385.
- [AMADORI, 1929] M. Amadori. The product of the condensation of glucose and *p*-phenetidine. *Atti. Reale Accad. Nazl. Lincei.* (1929), 9, 68.
- [AMARNATH, 2004] V. Amarnath, K. Amarnath, K. Amarnath, S. Davies, L. J. Roberts. 2nd. Pyridoxamine: an extremely potent scavenger of 1,4-dicarbonyls. *Chem. Res. Toxicol.* (2004), 173, 410.
- [AMPAC, 2004] AMPAC v. 8.0; Semichem, Inc., PO Box 1649, Shawnee, KS 66222.

BIBLIOGRAFÍA

- [ANDERSON, 1964] F. J. Anderson, A. E. Martell. Pyridoxal phosphate: molecular species in solution. *J. Am. Chem. Soc.* (1964), 86, 715.
- [ANGYAL, 1991] S. Angyal. The composition of reducing sugars in solution: current aspects. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* (1991), 49, 19.
- [AOKI, 2000] S. Aoki, G. Hasegawa, H. Shigeta, H. Obayashi, M. Fujii, G. Kimura, A. Moriwaki, N. Nakamura, K. Ienaga, K. Nakamura, M. Kondo. Crossline levels in serum and erythrocyte membrane proteins from patients with diabetic nephropathy. *Diab. Res. Clin. Pract.* (2000), 48, 119.
- [ARGIROV, 2004] O. K. Argirov, B. Lin, B. J. Ortwerth. 2-ammonio-6-(3-oxidopyridinium-1-yl)hexanoate (OP-lysine) Is a newly identified advanced glycation end product in cataractous and aged human lenses. *J. Biol. Chem.* (2004), 279, 6487.
- [AULD, 1973] D. S. Auld, T. C. Bruice. Kinetics of the formation of imines from acetone and primary amines. Evidence for internal acid-catalyzed dehydration of certain intermediate carbinolamines. *J. Am. Chem. Soc.* (1973), 95, 4270.
- [BAISIER, 1992] W. M. Baisier, T. P. Labuza. Maillard browning kinetics in a liquid model system. *J. Agric. Food Chem.* (1992), 40, 707.
- [BALK, 1981] H. Balk, I. Merkl, P. Bartholmes. Circular dichroism studies on the interaction of tryptophan synthase with pyridoxal 5'-phosphate. *Biochemistry* (1981), 20, 6391.
- [BARTL, 1998] F. Bartl, H. Urjasz, B. Brzezinski. FT-IR study of pyridoxal phosphate. *J. Mol. Struct.* (1998), 441, 77.
- [BASTA, 2008] G. Basta. Receptor for advanced glycation endproducts and atherosclerosis: from basic mechanisms to clinical implications. *Atherosclerosis* (2008), 196, 9.
- [BAYNES, 1984] J. W. Baynes, S. R. Thorpe, M. H. Murtiashaw. Nonenzymatic glucosylation of lysine residues in albumin. *Methods Enzymol.* (1984), 106, 88.
- [BAYNES, 1989] J. W. Baynes, N. G. Watkins, C. Fisher, C. J. Hull, J. S. Patrick, M. U. Ahmed, J. A. Dunn, S. R. Thorpe. In: *The Maillard reaction in aging, diabetes, and nutrition*. Ed. Alan R. Liss, New York (1989), pp 43-67.
- [BAYNES, 2007] J. W. Baynes. Dietary ALEs are a risk to human health – NOT!. *Mol. Nutr. Food Res.* (2007), 51, 1102.
- [BAZHULINA, 1966] N. P. Bazhulina, Yu. V. Morozov, M. Ya. Karpeisky, V. I. Ivanov, A. I. Kuklin. The optical and luminescent properties of vitamin B6 and its derivatives. II. Pyridoxine and pyridoxine-5'-phosphate. *Biofizika* (1966), 11, 42.
- [BAZHULINA, 1974A] N. P. Bazhulina, M. P. Kirpichnikov, Yu. V. Morozov, F. A. Savin, R. M. Khomutov. Absorption-luminescent properties and electronic structure of 4-pyridoxic acid and its lactone. *Molec. Photochem.* (1974), 6, 337.
- [BAZHULINA, 1974B] N. P. Bazhulina, M. P. Kirpichnikov, Yu. V. Morozov, F. A. Savin. Electronic-structure, luminescence, and photochemistry of pyridoxal and pyridoxal-5'-phosphate oximes. *Molec. Photochem.* (1974), 6, 43.
- [BAZHULINA, 1974C] N. P. Bazhulina, M. P. Kirpichnikov, Yu. V. Morozov, F. A. Savin, L. B. Sinyavina, V. L. Florentiev. Photochemistry of aldehyde forms of pyridoxal, pyridoxal-5'-phosphate, and their derivatives. *Molec. Photochem.* (1974), 6, 367.
- [BEEBY, 1987] A. Beeby, D. B. H. Mohamed, J. R. Sodeau. Photochemistry and photophysics of glycolaldehyde in solution. *J. Am. Chem. Soc.* (1987), 109, 857.

- [BEISSWENGER, 2003] P. J. Beisswenger, S. K. Howell, R. G. Nelson, M. Mauer, B. S. Szergold. A-oxoaldehyde metabolism and diabetic complications. *Biochem. Soc. Trans.* (2003), 31, 1358.
- [BENCI, 1999] S. Benci, S. Vaccari, A. Mozzarelli, P. F. Cook. Time-resolved fluorescence of *O*-acetylserine sulphydrylase. *Biochem. Biophys. Acta* (1999), 1429, 317.
- [BENECKY, 1985] M. J. Benecky, R. A. Copeland, T. R. Hays, E. W. Lobenstine, R. P. Rava. Resonance raman spectroscopy of pyridoxal Schiff bases. *J. Biol. Chem.* (1985), 260, 11663.
- [BERHANE, 1994] K. Berhane, M. Widersten, A. Engström, J. W. Kozarich, B. Mannervik. Detoxication of base propenals and other α,β -unsaturated aldehyde products of radical reactions and lipid peroxidation by human glutathione transferases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1994), 91, 1480.
- [BERLETT, 1997] B. S. Berlett, E. A. Stadtman. Protein oxidation in aging disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* (1997), 272, 20313.
- [BESLER, 1990] B. H. Besler, K. M. Mertz, P. A. Kollman. Atomic charges derived from semiempirical methods. *J. Comput. Chem.* (1990), 11, 431.
- [BHARATAM, 2004] P. V. Bharatam, P. Iqbal, A. Malde, R. Tiwari. Electron delocalization in aminoguanidine: a computational study. *J. Phys. Chem. A* (2004), 108, 10509.
- [BIEMEL, 2001] K. M. Biemel, O. Reihl, J. Conrad, M. O. Lederer. Formation pathways for lysine-arginine cross-links derived from hexose and pentoses by Maillard processes. *J. Biol. Chem.* (2001), 276, 23405.
- [BIEMEL, 2002] K. M. Biemel, J. Conrad, M. O. Lederer. Unexpected carbonyl mobility in aminoketoses: the key to major maillard crosslinks. *Angew. Chem. Int. Ed.* (2002), 41, 801.
- [BIEMEL, 2003] K. M. Biemel, M. O. Lederer. Site-specific quantitative evaluation of the protein glycation product *N*-(2,3-dihydroxy-5,6,-dioxohexyl)-L-lysinate by LC-(ESI)MS peptide mapping: evidence for its key role in AGE formation. *Bioconjugate Chem.* (2003), 14, 619.
- [BIERHAUS, 1997] A. Bierhaus, S. Chevion, M. Chevion, M. Hofmann, P. Quehenberger, T. Illmer, T. Luther, E. Berentshtein, H. Tritschler, M. Muller, P. Wahl, R. Ziegler, P. P. Nawroth. Advanced glycation end product-induced activation of NF-kappaB is suppressed by alpha-lipoic acid in cultured endothelial cells. *Diabetes* (1997), 46, 1481.
- [BIRCH, 1938] T. W. Birch. The relation between vitamin B₆ and the unsaturated fatty acid factor. *J. Biol. Chem.* (1938), 124, 775.
- [BLATNIK, 2008] M. Blatnik, N. Frizzell, S. R. Thorpe, J. W. Baynes. Inactivation of glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase by fumarate in diabetes: formation of S-(2-succinyl)cysteine, a novel chemical modification of protein and possible biomarker of mitochondrial stress. *Diabetes* (2008), 57, 41.
- [BOOTH, 1996] A. A. Booth, R. G. Khalifah, B. G. Hudson. 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] A. A. Booth, R. G. Khalifah, P. Todd, B. G. Hudson. *In vitro* kinetic studies of formation of antigenic advanced glycation end products (AGEs). *J. Biol. Chem.* (1997), 272, 5430.
- [BORCH, 1971] R. F. Borch, M. D. Bernstein, H. D. Durst. The cyanohydridoborate anion as a selective reducing agent. *J. Am. Chem. Soc.* (1971), 93, 2897.
- [BRANDS, 2001] C. M. J. Brands, M. A. J. S. Van Boekel. Reactions of monosaccharides during heating of sugar-casein systems: building a reaction network model. *J. Agric. Food Chem.* (2001), 49, 4667.

BIBLIOGRAFÍA

- [BRIDGES, 1966] J. W. Bridges, D. S. Davies, R. T. Williams. Fluorescence studies on some hydroxypyridines including compounds of the vitamin B₆ group. *Biochem. J.* (1966), 98, 451.
- [BRINKMANN, 1995] E. Brinkmann, K. J. Wells-Knecht, S. R. Thorpe, J. W. Baynes. Characterization of an imidazolium compound formed by reaction of methylglyoxal and *N*-hippuryllysine. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* (1995), 2817.
- [BRINKMANN, 1998] E. Brinkmann, T. P. Degenhardt, S. R. Thorpe, J. W. Baynes. Role of the Maillard reaction in aging of tissue proteins. *J. Biol. Chem.* (1998), 273, 18714.
- [BROCK, 2003] J. W. Brock, D. J. Hinton, W. E. Cotham, T. O. Metz, S. R. Thorpe, J. W. Baynes, J. M. Ames. Proteomic analysis of the site specificity of glycation and carboxymethylation of ribonuclease. *J. Proteome Res.* (2003), 2, 506.
- [BROT, 1983] N. Brot, H. Weissbach. Biochemistry and physiological role of methionine sulfoxide residues in proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* (1983), 223, 271.
- [BROUSMICHE, 1998] D. Brousmiche, P. Wan. Photogeneration of an *o*-quinone methide from pyridoxine (vitamin B₆) in aqueous solution. *Chem. Commun.* (1998), 491.
- [BROWN, 1965] G. M. Brown, H. A. Levy. A-D-glucose: precise determination of crystal and molecular structure by neutron-diffraction analysis. *Science* (1965), 147, 1038.
- [BROWNLIE, 2001] M. Brownlee. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* (2001), 414, 813.
- [BUCALA, 1984] R. Bucala, P. Model, A. Cerami. 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] R. Bucala, Z. Makita, T. Koschinsky, A. Cerami, H. Vlassara. Lipid advanced glycosylation: pathway for lipid oxidation *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1993), 90, 6434.
- [BUENO, 2003] C. Bueno, M. V. Encinas. Photophysical and photochemical studies of pyridoxamine. *Helv. Chim. Acta* (2003), 86, 3363.
- [CABEZAS-CERRATO, 1998] J. Cabezas-Cerrato. The prevalence of clinical diabetic polyneuropathy in Spain: a study in primary care and hospital clinic groups. *Diabetologia* (1998), 41, 1263.
- [CAI, 1999] J. Cai, H. E. Hurst. Identification and quantification of *N*-(carboxymethyl)valine adduct in hemoglobin by gas chromatography/mass spectrometry. *J. Mass Spectrom* (1999), 34, 537.
- [CASELLA, 1983] L. Casella, M. Gullotti. Conformations of pyridoxal schiff bases of amino acids. A circular dichroism study. *J. Am. Chem. Soc.* (1983), 105, 803.
- [CHELLAN, 2001] P. Chellan, R. H. Nagaraj. Early glycation products produce pentosidine cross-links on native proteins. *J. Biol. Chem.* (2001), 276, 3895.
- [CHEN, 2003] A-S. Chen, T. Taguchi, S. Aoyama, M. Sugiura, M. Haruna, M-W. Wang, I. Miwa. Antioxidant activity of a Schiff base of pyridoxal and aminoguanidine. *Free Radic. Biol. Med.* (2003), 35, 1392.
- [CHENG, 2005A] R. Cheng, Q. Feng, O. K. Argirov, B. J. Ortwerth. K2P a novel cross-link from human lens protein. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* (2005), 1043, 184.
- [CHENG, 2005B] G. Cheng, L.-L. Wang, W. Qu, L. Long, H. Cui, H. Liu, Y. Cao, S. Li. C16, a novel advanced glycation endproduct breaker, restores cardiovascular dysfunction in experimental diabetic rats. *Acta Pharmacol. Sinic.* (2005), 26, 1460.

- [CHENG, 2007] G. Cheng, L.-L. Wang, L. Long, H. Liu, H. Cui, W. Qu, S. Li. Beneficial effects of C36, a novel breaker of advanced glycation endproducts cross-links, on the cardiovascular system of diabetic rats. *Br. J. Pharmacol.* (2007), 152, 1196.
- [CHETYRKIN, 2008A] S. Chetyrkin, W. Zhang, B. G. Hudson, A. S. Serianni, P. V. Voziyan. Pyridoxamine protects protein from functional damage by 3-deoxyglucosone: Mechanism of action for pyridoxamine. *Biochemistry* (2008), 47, 997.
- [CHETYRKIN, 2008B] S. Chetyrkin, M. E. Mathis, A.-J. L. Ham, D. L. Hachey, B. G. Hudson, P. V. Voziyan. 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] P.-Y. Cheung, C.-C. Fong, K.-T. Ng, W.-C. Lam, Y.-C. Leung, C.-W. Tsang, M. Yang, M.-S. Wong. Interaction between pyridoxal kinase and pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes. *J. Biochem.* (2003), 134, 731.
- [CHRISTEN, 1985] P. Christen, D. E. Metzler. In: *Transaminases*. Ed. Wiley-Interscience, New York (1985).
- [CINTA, 1999] S. Cinta, C. Morari, E. Vogel, D. Maniu, M. Aluas, T. Iliescu, O. Cozar, W. Kiefer. Vibrational studies of B₆ vitamin. *Vib. Spectrosc.* (1999), 19, 329.
- [COHN, 1996] J. A. Cohn, L. Tsai, B. Friguet, L. I. Szweda. Chemical characterization of a protein-4-hydroxy-2-nonenal cross-link: immunochemical detection in mitochondria exposed to oxidative stress. *Arch. Biochem. Biophys.* (1996), 328, 158.
- [COLLINS, 1995] P. Collins, R. Ferrier. In: *Monosaccharides*. Ed. John Wiley & Sons Ltd., Chichester (1995).
- [COOK, 2003] P. Cook. α,β -Elimination reaction of *O*-acetylserine sulfhydrylase. Is the pyridine ring required? *Biochem. Biophys. Acta* (2003), 1647, 66.
- [CORDONNIER, 1993] D. Cordonnier, F. Bayle, P. Y. Benhamou, R. Milongo, P. Zaoui, C. Maynard, S. Halimi. Future trends of management of renal failure in diabetics. *Kidney Int. Suppl.* (1993), 41, S8.
- [CORTIJO, 1988] M. Cortijo, J. Llor, J. M. Sanchez-Ruiz. Thermodynamic constants for tautomerism, hydration, and ionization of vitamin B₆ compounds in water/dioxane. *J. Biol. Chem.* (1988), 263, 17960.
- [COTHAM, 2004] W. E. Cotham, T. O. Metz, P. L. Ferguson, J. W. C. Brock, D. J. S. Hinton, S. R. Thorpe, J. W. Baynes, J. M. Ames. Proteomic analysis of arginine adducts on glyoxal-modified ribonuclease. *Mol. Cell. Proteomics* (2004), 3, 1145.
- [CREIGHTON, 1988] D. J. Creighton, M. Migliorini, T. Pourmotabbed, M. K. Guha. Optimization of efficiency in glyoxalase pathway. *Biochemistry* (1988), 27, 7376.
- [CULBERTSON, 2003A] S. M. Culbertson, G. D. Enright, K. U. Ingold. Synthesis of a novel radical trapping and carbonyl group trapping anti-AGE agent: a pyridoxamine analogue for inhibiting advanced glycation (AGE) and lipoxidation (ALE) end products. *Org. Lett.* (2003), 5, 2659.
- [CULBERTSON, 2003B] S. M. Culbertson, E. I. Vassilenko, L. D. Morrison, K. U. Ingold. Paradoxical impact of antioxidants on post-Amadori glycoxidation. *J. Biol. Chem.* (2003), 278, 38384.
- [CUSSIMANIO, 2003] B. L. Cussimano, A. A. Booth, P. Tood, B. G. Hudson, R. G. Khalifah. Unusual susceptibility of heme proteins to damage by glucose during non-enzymatic glycation. *Biophys. Chem.* (2003), 105, 743.
- [CZEIZEL, 1998] A. E. Czeizel, Z. Merhala. Bread fortification with folic acid, vitamin B₁₂, and vitamin B₆ in Hungary. *Lancet* (1998), 352, 1225.
- [DAI, 2007] Z. Dai, I. Nemet, W. Shen, V. M. Monnier. Isolation, purification and characterization of histidino-threosidine, a novel Maillard reaction

- protein crosslink from threose, lysine and histidine. *Arch. Biochem. Biophys.* (2007), 463, 78.
- [DANDONA, 1996] P. Dandona, K. Thusu, S. Cook, B. Snyder, J. Makowski, D. Armstrong, T. Nicotera. Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. *Lancet* (1996), 347, 444.
- [DAVIDEK, 2002] T. Davidek, N. Clety, S. Aubin, I. Blank. Degradation of the Amadori compound *N*-(1-deoxy-D-fructos-1-yl)glycine in aqueous model system. *J. Agric. Food Chem.* (2002), 50, 5472.
- [DAVIES, 2004] S. S. Davies, V. Amarnath, L. J. Roberts 2nd. Isoketals: highly reactive gamma-ketoaldehydes formed from the H₂-isoprostane pathway. *Chem. Phys. Lipids* (2004), 128, 85.
- [DAVIES, 2006] S. S. Davies, E. J. Brantley, P. A. Voziyan, V. Amarnath, I. Zagolkapitte, O. Boutaud, B. G. Hudson, J. A. Oates, L. J. Roberts 2nd. Pyridoxamine analogues scavenge lipid-derived γ -ketoaldehydes and protect against H₂O₂-mediated cytotoxicity. *Biochemistry* (2006), 45, 15756.
- [DAVIS, 1961] L. Davis, F. Roddy, D. E. Metzler. Metal chelates of imines derived from pyridoxal and amino acids. *J. Am. Chem. Soc.* (1961), 83, 127.
- [DE BILLY, 1975] G. De Billy, P. Nuller, F. Chatagner. New insights into the active center of rat liver cystathionase. *Biochim. Biophys. Acta* (1975), 397, 231.
- [DEGENHARDT, 1998] T. P. Degenhardt, S. R. Thorpe, J. W. Baynes. Chemical modification of proteins by methylglyoxal. *Cell Mol. Biol.* (1998), 44, 1139.
- [DEGENHARDT, 2002] T. P. Degenhardt, N. L. Alderson, D. D. Arrington, R. J. Beattie, J. M. Basgen, M. W. Steffes, S. R. Thorpe, J. W. Baynes. Pyridoxamine inhibits early renal disease and dyslipidemia in the streptozotocin-diabetic rat. *Kidney Int.* (2002), 61, 939.
- [DELPPIERRE, 2000] G. Delpierre, M. H. Rider, F. Collard, V. Stroobant, F. Vanstapel, H. Santos, E. Van Schaftingen. Identification, cloning, and heterologous expression of a mammalian fructosamine-3-kinase. *Diabetes* (2000), 49, 1627.
- [DEWAR, 1985] M. J. S. Dewar, E. G. Zoebisch, E. F. Healy, J. J. P. Stewart. Development and use quantum mechanical molecular models. 76. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model. *J. Am. Chem. Soc.* (1985), 107, 3902.
- [DÍAZ, 1998] I. Díaz, L. A. Montero, F. Muñoz, J. Donoso. Theoretical pattern of the selective hydration and tautomerization effects on pyridoxal and pyridoxamine 5'-phosphate UV-visible spectra: a tool to band assignment. *J. Mol. Struct-Theochem.* (1998), 433, 279.
- [DOLPHIN, 1986] D. Dolphin, R. Poulson, O. Avramovic. In: *Vitamin B₆ pyridoxal phosphate, chemical, biochemical, and medicinal aspects. Part A and B*. Ed. Wiley-Interscience, New York (1986).
- [DUNATHAN, 1966] H. C. Dunathan. Conformation and reaction specificity in pyridoxal phosphate enzymes. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (1966), 55, 712.
- [DUNNING, 1989] T. H. Dunning Jr. Gaussian basis sets for use in correlated molecular calculations. I. The atoms boron through neon and hydrogen. *J. Chem. Phys.* (1989), 90, 1007.
- [DWORKIN, 2000] J. P. Dworkin, S. L. Miller. A kinetic estimate of the free aldehyde content of aldoses. *Carbohydr. Chem.* (2000), 329, 359.
- [DYER, 1991] D. G. Dyer, J. A. Blackledge, S. R. Thorpe, J. W. Baynes. Formation of pentosidine during nonenzymatic browning of proteins by glucose. *J. Biol. Chem.* (1991), 266, 11654.
- [DYER, 1993] D. G. Dyer, J. A. Dunn, S. R. Thorpe, K. E. Bailie, T. J. Lyons, D. R. McCance, J. W. Baynes. Accumulation of Maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging. *J. Clin. Invest.* (1993), 91, 2463.

BIBLIOGRAFÍA

- [ECHEVARRÍA, 2005] G. R. Echevarría, J. G. Santos, A. Basagoitia, F. García Blanco. Kinetic and thermodynamic study of the reaction of pyridoxal 5'-phosphate with L-tryptophan. *J. Org. Phys. Chem.* (2005), 18, 546.
- [ELIOT, 2004] A. C. Eliot, J. F. Kirsch. Pyridoxal phosphate enzymes: mechanistic, structural, and evolutionary considerations. *Annu. Rev. Biochem.* (2004), 73, 383.
- [ELLIS, 2007] E. M. Ellis. Reactive carbonyls and oxidative stress: Potential for therapeutic intervention. *Pharmacol. Ther.* (2007), 115, 13.
- [ENCINAS, 2002] M. V. Encinas, F. D. González-Nilo, H. Goldie, E. Cardemil. Ligand interactions and protein conformational changes of phosphopyridoxyl-labeled *Echerichia coli* phosphoenolpyruvate carboxykinase determined by fluorescence spectroscopy. *Eur. J. Biochem.* (2002), 269, 49460.
- [ESTERBAUER, 1982] H. Esterbauer, K. H. Cheeseman, M. U. Dianzani, G. Poli, T. F. Slater. Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by ADP-Fe²⁺ in rat liver microsomes. *Biochem. J.* (1982), 208, 129.
- [FARRAGO, 1969] M. E. Farrago, T. Matthews. Reactions involving pyridoxal phosphate or pyridoxamine phosphate in the presence of metal ions. Part I. The reaction between pyridoxal phosphate and glutamate in the presence of cupric ions. *J. Chem. Soc. A* (1969), 609.
- [FARROW, 1974] L. A. Farrow, D. Edelson. The steady-state approximation: fact of fiction? (1974), 6, 787.
- [FELTY, 1970] W. A. Felty, C. G. Eckstrom, D. L. Leussing. 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] W. A. Felty, D. L. Leussing. Equilibrium and kinetics studies involving Schiff-base complexes -Zinc (II) pyruvate pyridoxamine phosphate system and mechanism of Zn catalyzed transamination. *J. Inorg. Nuc. Chem.* (1974), 36, 617.
- [FERENCIK, 1969] M. Ferencik. Amino acid decarboxylases (carboxyleases E.C.4.1.1). *Chem. Listy* (1969), 63, 807.
- [FERREIRA, 2003] A. E. N. Ferreira, A. M. Ponces-Freire, E. O. Voit. A quantitative model of the generation of *N*-(carboxymethyl)lysine in the Maillard reaction between collagen and glucose. *Biochem. J.* (2003), 376, 109.
- [FISCHER, 1980] H. Fischer, F. X. DeCandis, S. D. Ogden, W. P. Jencks. Catalysis of transamination by rate-limiting proton transfer to buffer bases. *J. Am. Chem. Soc.* (1980), 102, 1340.
- [FOUNTAIN, 1999] W. C. Fountain, J. S. Requena, A. J. Jenkins, T. L. Lyons, B. Smyth, J. W. Baynes, S. R. Thorpe. Quantification of *N*-(glucitol)ethanolamine and *N*-(carboxymethyl)serine: two products of nonenzymatic modification of aminophospholipids formed *in vivo*. *Anal. Biochem.* (1999), 272, 48.
- [FRANKLIN, 1980] K. J. Franklin, M. F. Richardson. Reactions of metal ions with vitamins. 2. Crystal structures of copper complexes with anionic and with neutral pyridoxamine. *Inorg. Chem.* (1980), 19, 2107.
- [FRENCH, 1965] T. C. French, D. S. Auld, T. C. Bruice. Catalytic reactions involving azomethines. V. Rates and equilibria of imine formation with 3-hydroxypyridine-4-aldehyde and amino acids. *Biochemistry* (1965), 4, 77.
- [FRISCH, 1990] M. J. Frisch, M. Head-Gordon, J. A. Pople. A direct MP2 gradient method. *Chem. Phys. Lett.* (1990), 166, 275.
- [FRISCH, 1998] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, P. M. W. Gill, B. G. Johnson, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, T. Keith, G. A. Petersson, J. A. Montgomery, K. Raghavachari, M. A. Al-Laham, V. G. Zakrewski, J. V. Ortiz, J. B. Foresman, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, A.

- Nanayakkara, M. Challacombe, C. Y. Peng, P. Y. Ayala, W. Chen, M. W. Wong, J. L. Andres, E. S. Reploge, R. Gomperts, R. L. Martin, D. J. Fox, J. S. Binkley, D. J. Defrees, J. Baker, J. P. Stewart, M. HeadGordon, C. Gonzalez, J. A. Pople. Gaussian98; Gaussian, Inc.: Pittsburgh, PA, **1998**.
- [FRUTOS, 2007]** L. M. Frutos, A. Markmann, A. L. Sobolewski, W. Domcke. Photoinduced electron and proton transfer in the hydrogen-bonded pyridine-pyrrole system. *J. Phys. Chem. B* (**2007**), 111, 6110.
- [FUMINORI, 1973]** M. Fuminori. Relations of electronic spectra of vitamin B₆-dependent enzymes to their structures. *Bitamin* (**1973**), 47, 73.
- [FURUHATA, 2003]** A. Furuhashi, T. Ishii, S. Kumazawa, T. Yamada, T. Nakayama, K. Uchida. N-(3-methylpyridinium)lysine, a major antigenic adduct generated in crolein-modified protein. *J. Biol. Chem.* (**2003**), 278, 48658.
- [GADGIL, 2007]** H. S. Gadgil, P. V. Bondarenko, G. Pipes, D. Rehder, A. McAuley, N. Perico, T. Dillon, M. Ricci, M. Treuheit. The LC/MS analysis of glycation of IgG molecules in sucrose containing formulations. *J. Pharm. Sci.* (**2007**), 2607.
- [GANSOW, 1969]** O. A. Gansow, R. H. Holm. A proton resonant investigation of 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]** M. A. García del Vado, J. Donoso, F. Muñoz, G. Echevarría, F. García Blanco. 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]** M. A. García del Vado, G. Echevarría, A. García-Espantaleón, J. Donoso, F. Muñoz, F. García Blanco. 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. Cat.* (**1988**), 44, 313.
- [GARRISON, 1987]** W. M. Garrison. Reaction mechanisms in the radiolysis of peptides, polypeptides, and proteins. *Chem. Rev.* (**1987**), 87, 381.
- [GE, 1997]** S.-J. Ge, T.-C. Lee. 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.
- [GEAR, 1971]** C. W. Gear. Algorithm 407. DIFSUB for solution of ordinary differential equations [D2]. *Commun. ACM.* (**1971**), 14, 185.
- [GEREGA, 2006]** A. Gerega, L. Lapinski, I. Reva, H. Rostkowska, M. J. Nowak. UV-induced generation of rare tautomers of allopurinol and 9-methylhypoxanthine -a matrix isolation FTIR study. *Biophys. Chem.* (**2006**), 122, 123.
- [GIARDINO, 1998]** I. Giardino, A. K. Fard, D. L. Hatchell, M. Brownlee. Aminoguanidine inhibits reactive oxygen species formation, lipid peroxidation and oxidant-induced apoptosis. *Diabetes* (**1998**), 47, 1114.
- [GLOMB, 1995]** M. Glomb, V. M. Monnier. Mechanism of protein modification by glyoxal and glycolaldehyde, reactive intermediates of the Maillard reaction. *J. Biol. Chem.* (**1995**), 270, 10017.
- [GLOMB, 2001]** M. Glomb, C. Pfahler. Amides are novel protein modification formed by physiological sugars. *J. Biol. Chem.* (**2001**), 276, 41638.
- [GLUSHONOK, 2003]** G. K. Glushonok, T. G. Glushonok, L. A. Maslovskaya, O. I. Shadyro. A ¹H and ¹³C and UV study of the state of hydroxyacetone in aqueous solutions. *Russ. J. Gen. Chem.* (**2003**), 73, 1027.
- [GRANDHEE, 1991]** S. K. Grandhee, V. M. Monnier. Mechanism of formation of the Maillard protein cross-link pentosidine. *J. Biol. Chem.* (**1991**), 266, 11649.

BIBLIOGRAFÍA

- [GREENZAIID, 1967] P. Greenzaid, Z. Luz, D. Samuel. A nuclear magnetic resonance study of the reversible hydration of aliphatic aldehydes and ketones. I. Oxygen-17 and proton spectra and equilibrium constants. *J. Am. Chem. Soc.* (1967), 89, 749.
- [GREGORY, 1978] J. F. Gregory III, J. R. Kirk. Assessment of storage effects on vitamin B₆ stability and bioavailability in dehydrated food systems. *J. Food Sci.* (1978), 43, 1801.
- [GREGORY III, 1983] J. F. Gregory III, M. E. Hiner. Thermal stability of vitamin B₆ compounds in liquid model food systems. *J. Food Sci.* (1983), 48, 1323.
- [GREGORY III, 1997] J. F. Gregory III. Bioavailability of vitamin B-6. *Eur. J. Clin. Nutr.* (1997), 51, S43.
- [GUILARTE, 1993] T. R. Guilarte. Vitamin B₆ and cognitive development: recent research findings from human and animal studies. *Nutr. Rev.* (1993), 51, 193.
- [GUNSALUS, 1944] I. C. Gunsalus, W. D. Bellamy, W. W. Umbreit. A phosphorylated derivative of pyridoxal as the coenzyme of tyrosine decarboxylase. *J. Biol. Chem.* (1944), 155, 685.
- [GUPTA, 2001] R. N. Gupta, T. Hemscheidt, B. G. Sayer, I. D. Spenser. Biosynthesis of vitamin B₆ in yeast: Incorporation pattern of glucose. *J. Am. Chem. Soc.* (2001), 123, 11353.
- [GUROCHKINA, 1986] L. P. Gurochkina, M. N. Kosmetol. Study of pyridoxal phosphate safety and the possibility of its penetration across the skin barrier during epicutaneous application. *Farmakol. Toksikol.* (1986), 49, 62.
- [GUSTAFSON, 1957] R. L. Gustafson, A. E. Martell. Stabilities of metal chelates of pyridoxamine. *Arch. Biochem. Biophys.* (1957), 68, 485.
- [GYÖRGY, 1934] P. György. Vitamin B₂ and the pellagra-like dermatitis in rats. *Nature* (1934), 133, 498.
- [GYÖRGY, 1956] P. György. The history of vitamin B₆. *Am. J. Clin. Nutr.* (1956), 4, 313.
- [HAMPRECHT, 1998] F. A. Hamprecht, A. J. Cohen, D. J. Tozer, N. C. Handy. Development and assessment of new exchange-correlation functionals. *J. Chem. Phys.* (1998), 109, 6264.
- [HARRIS, 1939] S. A. Harris, K. Folkers. Synthesis of vitamin B₆. *J. Am. Chem. Soc.* (1939), 61, 1245.
- [HARRIS, 1976] C. M. Harris, R. J. Johnson, D. E. Metzler. Band-shape analysis and resolution of electronic spectra of pyridoxal phosphate and other 3-hydroxypyridine-4-aldehydes. *Biochim. Biophys. Acta.* (1939), 421, 181.
- [HARRISON, 1997] L. E. Harrison, Z. F. Zhang, M. S. Karpeh, M. Sun, R. C. Kurtz. The role of dietary factors in the intestinal and diffuse histologic subtypes of gastric adenocarcinoma: a case-control study in the US. *Cancer* (1997), 80, 1021.
- [HARRUFF, 1976] R. C. Harruff, W. T. Jenkins. A ¹³C nmr study of the B₆ vitamins and of their aldimine derivatives. *Org. Mag. Res.* (1976), 8, 548.
- [HARTMAN, 2001] T. J. Hartman, K. Woodson, R. Stolzenberg, J. Virtamo, J. Selhub, M. J. Barrett, D. Albanes. Association of the B-vitamins pyridoxal 5'-phosphate (B₆), B₁₂, and folate with lung cancer risk in older men. *Am. J. Epidemiol.* (2001), 153, 688.
- [HARUO, 1999] S. Haruo, M. Akira, K. Jun, N. Ryujiro. Analysis of photo- and heat-reaction products of vitamin B₆. *Bitamin* (1999), 73, 599.
- [HAYASHI, 1980] T. Hayashi, M. Namiki. Formation of two-carbon sugar fragments at an early stage of the browning reaction of sugar and amine. *Agric. Biol. Chem.* (1980), 44, 2575.
- [HAYASHI, 1995] H. Hayashi. Pyridoxal enzymes: mechanistic diversity and uniformity. *J. Biochem.* (1995), 118, 463.

BIBLIOGRAFÍA

- [HEIN, 2003] G. Hein, R. Wiegand, G. Lehmann, G. Stein, S. Franke. Advanced glycation end-products pentosidine and N-carboxymethyllysine are elevated in serum of patients with osteoporosis. *Rheumatology* (2003), 42, 1242.
- [HEINERT, 1959] D. Heinert, A. E. Martell. Pyridoxine and Pyridoxal Analogs. II. Infrared Spectra and Hydrogen Bonding. *J. Am. Chem. Soc.* (1959), 77, 2431.
- [HEINERT, 1963A] D. Heinert, A. E. Martell. Pyridoxine and pyridoxal analogs. VII. Acid-base equilibria of Schiff bases. *J. Am. Chem. Soc.* (1963), 85, 188.
- [HEINERT, 1963B] D. Heinert, A. E. Martell. Pyridoxine and pyridoxal analogs. VIII. Synthesis and infrared spectra of metal chelates. *J. Am. Chem. Soc.* (1963), 85, 1334.
- [HENDERSON, 1999] D. P. Henderson, E. J. Toone. In: *Aldolases. Comprehensive Natural Products Chemistry*. Ed. Elsevier, Oxford (1999).
- [HERRMANN, 2002] W. Herrmann, J. P. Knapp. Hyperhomocysteinemia: a new risk factor for degenerative diseases. *Clin. Lab.* (2002), 48, 471.
- [HERSHEY, 1977] S. A. Hershey, D. L. Leussing. Rate of carbinolamine formation between pyridoxal 5'-phosphate and alanine. *J. Am. Chem. Soc.* (1977), 99, 1992.
- [HESSE, 1995] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh. In: *Métodos espectroscópicos en química orgánica*. Ed. Síntesis, Madrid (1995).
- [HIGUCHI, 2006] O. Higuchi, K. Nakagawa, T. Suzuki, S. Oikawa, T. Miyazawa. Aminophospholipid glycation and its inhibitor screening system: a new role of pyridoxal 5'-phosphate as the inhibitor. *J. Lip. Res.* (2006), 47, 964.
- [HIRSCH, 1995] J. Hirsch, E. Petrakova, M. S. Feather, C. L. Barnes. The reaction of D-glucose with aminoguanidine. *Carbohydr. Res.* (1995), 267, 17.
- [HODGE, 1953] J. E. Hodge. Dehydrated foods: chemistry of browning reactions in model systems. *J. Agric. Food Chem.* (1953), 1, 928.
- [HORIUCHI, 1991] T. Horiuchi, T. Kurokawa. Purification and properties of fructosylamine oxidase from *Aspergillus* sp. 1005. *Agric. Biol. Chem.* (1991), 55, 333.
- [HORIUCHI, 1996] S. Horiuchi, T. Higashi, K. Ikeda, T. Saishoji, Y. Jinnouchi, H. Sano, R. Shibayama, T. Sakamoto, N. Araki. Advanced glycation end products and their recognition by macrophage and macrophage-derived cells. *Diabetes* (1996), 45, S73.
- [HUANG, 2001] T.-C. Huang, M.-H. Chen, C.-Y. Ho. Effect of phosphate on stability of pyridoxal in the presence of lysine. *J. Agric. Food Chem.* (2001), 49, 1559.
- [HUFF, 1944] J. W. Huff, W. A. Perlzweig. 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.
- [IBERG, 2002] N. Iberg, R. Fluckiger. Nonenzymatic glycosylation of albumin in vivo. Identification of multiple glycosylation sites. *J. Biol. Chem.* (2002), 261, 13542.
- [IKAWA, 1954] M. Ikawa, E. E. Snell. Oxidative deamination of amino acids by pyridoxal and metal salts. *J. Am. Chem. Soc.* (1954), 76, 4900.
- [INK, 1982] S. L. Ink, H. Mehansho, L. V. M. Henderson. The binding of pyridoxal to haemoglobin. *J. Biol. Chem.* (1982), 257, 4753.
- [IRVINE, 1922] J. C. Irvine, J. C. Earl. Mutarotation and pseudo-mutarotation of glucosamine and its derivatives. *J. Chem. Soc. Trans.* (1922), 121, 2370.
- [ISELL, 1958] H. S. Isbell, H. L. Frush. Mutarotation, hydrolysis, and rearrangement reactions of glycosylamines. *J. Org. Chem.* (1958), 23, 1309.

- [IYER, 1994] R. S. Iyer, M. E. Kobierski, R. G. Salomon. Generation of pyrroles in the reaction of levuglandin E2 with proteins. *J. Org. Chem.* (1994), 59, 6038.
- [IZUHARA, 2008] Y. Izuhara, M. Nangaku, S. Takizawa, S. Takahashi, J. Shao, H. Oishi, H. Kobayashi, C. van Ypersele de Strihou, T. Miyata. A novel class of advanced glycation inhibitors ameliorates renal and cardiovascular damage in experimental rat models. *Nephrol. Dial. Transplant.* (2008), 23, 497.
- [JAIN, 2001] S. K. Jain, G. Lim. 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.
- [JANSONIUS, 1998] J. N. Jansonius. Structure, evolution and action of vitamin B₆-dependent enzymes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* (1998), 8, 759.
- [Jo, 1977] H. B. Jo, V. Nair, L. Davis. Carbon-13 nuclear magnetic resonance studies of vitamina B₆ Schiff base and carbinolamine formation in aqueous solution. 1. The adduct of pyridoxal 5'-phosphate and DL-Alanine. *J. Am. Chem. Soc.* (1977), 99, 4497.
- [JOHN, 1995] R. A. John. Pyridoxal phosphate-dependent enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* (1995), 1248, 81.
- [JONES, 1990] P. A. Jones, J. D. Buckley. The role of DNA methylation in cancer. *Adv. Cancer Res.* (1990), 54, 1.
- [JOSHI, 2002] R. J. Joshi, S. Kapoor, T. Mukherjee. Free radical reactions or pyridoxal (vitamin B₆): a pulse radiolysis study. *Res. Chem. Intermed.* (2002), 28, 505.
- [KALAPOS, 1999] M. P. Kalapos. Possible physiological roles of acetone metabolism in humans. *Med. Hypotheses* (1999), 53, 236.
- [KALL, 2003] M. A. Kall. Determination of total vitamin B₆ in foods by isocratic HPLC: a comparison with microbiological analysis. *Food Chem.* (2003), 82, 315.
- [KAMINSKAS, 2004] L. M. Kaminskas, S. M. Pyke, P. C. Burcham. Reactivity of hydrazinophthalazine drugs with the lipid peroxidation products acrolein and crotonaldehyde. *Org. Biomol. Chem.* (2004), 2, 2578.
- [KANG, 2006] Z. Kang, H. Li, D. Yin. Reaction of pyridoxamine with malondialdehyde: Mechanism of inhibition of formation of advanced lipoxidation-end products. *Amino Acids* (2006), 30, 55.
- [KANG, 2007] K. A. Kang, R. Zhang, M. J. Piao, K. H. Lee, B. J. Kim, S. Y. Kim, H. S. Kim, D. Y. Kim, H. J. You, J. W. Hyun. Inhibitory effects of glycitein on hydrogen peroxide induced cell damage by scavenging reactive oxygen species and inhibiting c-Jun N-terminal kinase. *Free Radical Res.* (2007), 41, 720.
- [KAPPLER, 2001] F. Kappler, M. L. Schwartz, B. Su, A. M. Tobia, T. Brown. DYN-12, a small molecule inhibitor of the enzyme amadorase, lowers plasma 3-deoxyglucosone levels in diabetic rats. *Diabetes Technol. Ther.* (2001), 3, 609.
- [KASAI, 1998] H. Kasai, N. Iwamoto-Tanaka, S. Fukada. DNA modifications by the mutagen glyoxal: adduction to G and C, deamination of C and GC and GA cross-linking. *Carcinogenesis* (1998), 19, 1459.
- [KASPER, 2005] M. Kasper, P. Schieberle. Labeling studies on the formation pathway of N-carboxymethyllysine in Maillard-type reactions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* (2005), 1043, 59.
- [KATO, 1989] M. Kato, H. Nakayama, Z. Makita, S. Aoki, Y. Kuroda, K. Yanagisawa, S. Nakagawa. Radioimmunoassay for non-enzymically glycated serum proteins. *Horm. Metab. Res.* (1989), 21, 245.

BIBLIOGRAFÍA

- [KAWAKISHI, 1991] S. Kawakishi, J. Tsunehiro, K. Uchida. Oxidative degradation of Amadori compounds in the presence of copper ion. *Carbohydr. Res.* (1991), 211, 167.
- [KHALIFAH, 1996] R. G. Khalifah, P. Tood, A. A. Booth, S. X. Yang, J. D. Mott, B. G. Hudson. Kinetics of nonenzymatic glycation of ribonuclease A leading to advanced glycation end products. Paradoxical inhibition by ribose leads to facile isolation of protein intermediate for rapid post-Amadori studies. *Biochemistry* (1996), 35, 4645.
- [KHALIFAH, 1999] R. G. Khalifah, J. W. Baynes, B. G. Hudson. Amadorins: Novel post-Amadori inhibitors of advanced glycation reactions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1999), 257, 251.
- [KHALIFAH, 2005] R. G. Khalifah, Y. Chen, J. J. Wassenberg. Post-Amadori AGE inhibition as a therapeutic target for diabetic complications. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* (2005), 1043, 793.
- [KHATAMI, 1988] M. Khatami, Z. Suldan, I. David, W. Li, J. H. Rocky. Inhibitory effects of pyridoxal phosphate, ascorbate and aminoguanidine on nonenzymatic glycosylation. *Life Sci.* (1988), 43, 1725.
- [KIRUBA, 2003] G. S. M. Kiruba, M. W. Wong. Tautomeric equilibria of pyridoxal-5'-phosphate (vitamin B₆) and 3-hydroxypyridine derivatives: a theoretical study of solvation effects. *J. Org. Chem.* (2003), 68, 2874.
- [KLAMT, 1995] A. Klamt. Conductor-like screening model for real solvents: a new approach to the quantitative calculation of solvation phenomena. *J. Phys. Chem.* (1995), 99, 2224.
- [KNERR, 1994] T. Knerr, S. Ochs, T. Severin. Reaction of guanosine, 2'-deoxyguanosine and guanosine-5'-monophosphate with glucose. *Carbohydr. Res.* (1994), 256, 177.
- [KOENIG, 1975] R. J. Koenig, A. Cerami. Synthesis of haemoglobin A1c in normal and diabetic mic: potential model of basement membrane thickening. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1975), 72, 3687.
- [KORYTNYK, 1963] W. Korytnyk, R. P. Singh. Proton magnetic resonance spectra of compounds in the vitamin B₆ group. *J. Am. Chem. Soc.* (1963), 85, 2813.
- [KOSKINEN, 1997] M. Koskinen, I. Mutikainen, P. Tilus, E. Pelttari, M. Korvela, H. Elo. Structure of aminoguanidine hemioxalate. Implications for the synthesis of amidinohydrazones. *Monatsh. Chem.* (1997), 128, 767.
- [KOYA, 1998] D. Koya, G. L. King. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes* (1998), 47, 859.
- [KUBALA, 1983] G. Kubala, A. E. Martell. 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.
- [KUBOKI, 2000] K. Kuboki, Z. Y. Jiang, N. Takahara, S. W. Ha, M. Igarashi, T. Yamauchi, E. P. Feener, T. P. Herbert, C. J. Rhodes, G. L. King. Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo a specific vascular action of insulin. *Circulation* (2000), 101, 676.
- [KUHN, 1937] R. Kuhn, F. Weygand. The Amadori rearrangement. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* (1937), 70B, 769.
- [KUKSIS, 2005] A. Kuksis, A. Ravandi, M. Schneider. Covalent binding of acetone to aminophospholipids *in vitro* and *in vivo*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* (2005), 1043, 417.
- [KUMAGAI, 1970] H. Kumagai, H. Yamada, H. Matsui, H. Ohkishi, K. Ogata. Tyrosine phenol lyase. I. Purification, crystallization, and properties. *J. Biol. Chem.* (1970), 245, 1767.

BIBLIOGRAFÍA

- [KURAUCHI, 1983] Y. Kurauchi, K. Ohga, S. Morita. Photodecarboxylation of pyridoxal- α -amino acid Schiff bases. Intermediate species induced by flash excitation. *Chem. Lett.* (1985), 349.
- [KUZMIC, 1996] P. Kuzmic. Program Dynafit for the analysis of enzyme kinetic data: application to HIV proteinase. *Anal. Biochem.* (1996), 237, 260.
- [LAAKSO, 1999] M. Laakso. Hyperglycemia and cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Diabetes* (1999), 48, 937.
- [LABUZA, 1981] T. B. Labuza, M. Saltmarch. Kinetics of browning and protein quality loss whey powders during steady state and nonsteady state storage conditions. *J. Food Sci.* (1981), 47, 92.
- [LABUZA, 1992] T. B. Labuza, W. M. Baisier. The kinetics of nonenzymatic browning. In H. G. Schwartzberg & R. W. Hartel (Eds.) *Physical chemistry of foods* (1992), Ed. Marcel Dekker, New York, pp. 595.
- [LACHMANN, 1984] H. Lachmann, K. D. Schnackerz. ³¹P nuclear magnetic resonance titrations: simultaneous evaluation of all pH-dependent resonance signals. *Org. Mag. Reson.* (1984), 22, 101.
- [LACKLAND, 1997] D. T. Lackland, M. A. Moore. Hypertension-related mortality and morbidity in the southeast. *South. Med. J.* (1997), 90, 191.
- [LAPOLLA, 2000] A. Lapolla, D. Fedele, M. Garboglio, L. Martano. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, enzymatic digestion, and molecular modeling in the study of nonenzymatic glycation of IgG. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* (2000), 11, 153.
- [LEDBETTER, 1998] J. W. Ledbetter, S. Schaertel. Pyridinyl and ketyl radicals of pyridoxal-5'-phosphate on micellar and liposomal surfaces. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* (1998), 47, 12.
- [LEDERER, 1999A] M. O. Lederer, H. P. Bühler. 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, 1999B] M. O. Lederer, R. G. Klaiber. Cross-linking of proteins by Maillard processes: characterization and detection of a lysine-arginine cross-links derived from glyoxal and methylglyoxal. *Bioorg. Med. Chem.* (1999), 7, 2499.
- [LEDL, 1990] F. Ledl, E. Schleicher. New aspects of the Maillard reaction in foods and in the human body. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* (1990), 29, 565.
- [LEDRU, 2001] F. Ledru, P. Ducimetiere, S. Battaglia, D. Courbon, F. Beverelli, L. Guize, J.-L. Guernonprez, B. Diebold. New diagnostic criteria for diabetes and coronary artery disease: insights from an angiographic study. *J. Am. Coll. Cardiol.* (2001), 37, 1543.
- [LEE, 1988] C. Lee, W. Yang, R. G. Parr. Development of the colle-salveti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B* (1988), 13, 23.
- [LEE, 1999A] A. Y. Lee, S. S. Chung. Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *FASEB J.* (1999), 13, 23.
- [LEE, 1999B] A. T. Lee, D. Reis, U. J. Eriksson. Hyperglycemia-induced embryonic dysmorphogenesis correlatos with genomic DNA mutation frequency in vitro and in vivo. *Diabetes* (1999), 48, 371.
- [LEE, 2000] S. H. Lee, I. A. Blair. Characterization of 4-oxo-2-nonenal as novel product of lipid peroxidation. *Chem. Res. Toxicol.* (2000), 13, 698.
- [LEKLEM, 1990] J. E. Leklem. Vitamin B₆: a status report. *J. Nutr.* (1990), 120, 1503.
- [LEOVAC, 2007] V. M. Leovac, M. D. Joksovic, V. Divjakovic, L. S. Jovanovic, Z. Saranovic, A. Pevec. Synthesis, spectroscopic and X-ray characterization of a copper (II) complex with the Schiff base derived from pyridoxal and aminoguanidine: NMR spectral studies of the ligand. *J. Inorg. Biochem.* (2007), 101, 1094.
- [LEPKOVSKY, 1938] S. Lepkovsky. Crystalline Factor 1. *Science* (1938), 87, 169.

BIBLIOGRAFÍA

- [LEUSSING, 1966] D. L. Leussing, N. Huq. Pyridoxal-glycinate complexes with some divalent metal ions. *Anal. Chem.* (1966), 38, 1388.
- [LEUSSING, 1986] D. L. Leussing. Model reactions. In: *Vitamin B₆ pyridoxal phosphate, chemical, biochemical, and medicinal aspects. Part A.* Ed. Wiley-Interscience, New York (1986).
- [LI, 1996A] Y. M. Li, T. Mitsuhashi, D. Wojciechowicz, N. Shimiizu, J. Li, A. Stitt, C. He, D. Banerjee, H. Vlassara. Molecular identity and cellular distribution of advanced glycation enproduct receptors: relationship of p60 to OST-48 and p90 to 80K-H membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1996), 93, 11047.
- [LI, 1996B] D. Li, S. Devaraj, C. Fuller, R. Bucala, I. Jialal. Effect of α -tocopherol on LDL oxidation and glycation: in vitro and in vivo studies. *J. Lipid Res.* (1996), 37, 1978.
- [LIN, 2005] D. Lin, H. Lee, Q. Liu, G. Perry, M. A. Smith, L. M. Sayre. 4-oxo-nonenal is both more neurotoxic and more protein reactive than 4-hydroxy-nonenal. *Chem. Res. Toxicol.* (2005), 18, 1219.
- [LING, 1908] A. R. Ling, J. J. Malting. *J. Inst. Brew.* (1908), 14, 494.
- [LLOR, 1988] J. Llor, J. M. Sanchez-Ruiz, M. Cortijo. Thermodynamic equilibrium constants for pyridoxal and pyridoxal 5'-phosphate in dioxane-water mixtures. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* (1988), 951.
- [LO, 1994] T. W. C. Lo, M. E. Westwood, A. C. McLellan, T. Selwood, P. J. Thornalley. Binding and modification of proteins by methylglyoxal under physiological conditions. A kinetic and mechanistic study with N-acetylarginine, N-acetylcysteine, N-acetyl-lysine, and bovine serum albumin. *J. Biol. Chem.* (1994), 269, 322299.
- [LUI, 1985] A. Lui, L. Lumeng, T.-K. Li. The measurement of plasma vitamin B₆ compounds: comparison of a cation-exchange HPLC method with the open-column chromatographic method and the L-tyrosine apodecarboxylase assay. *Am. J. Clin. Nutr.* (1985), 41, 1236.
- [LUNN, 1952] A. K. Lunn, R. A. Morton. Ultra-violet absorption spectra of pyridoxine and related compounds. *Analyst.* (1952), 77, 718.
- [MADSEN, 1986] N. B. Madsen, S. G. Withers. Glycogen phosphorylase. In: *Vitamin B₆ pyridoxal phosphate, chemical, biochemical, and medicinal aspects. Part B.* Ed. Wiley-Interscience, New York (1986).
- [MAILLARD, 1912] L. C. Maillard. Action des acides amines sur les sucres: formation des melanoidines per voie methodique. *C. R. Acad. Sci. Ser. 2* (1912), 154, 66.
- [MÄKELÄ, 1983] M. J. Mäkelä, T. K. Korpela. Chemical models of enzymic transamination. *Chem. Soc. Rev.* (1983), 12, 309.
- [MALMSTROM, 1997] R. Malmstrom, C. J. Packard, M. Caslake, D. Bedford, P. Stewart, H. Yki-Jarvinen, J. Shepherd, M. R. Taskinen. Defective regulation of triglyceride metabolism by insulin in the liver in NIDDM. *Diabetologia* (1997), 40, 454.
- [MALTHOUSE, 2003] J. P. G. Malthouse. Stereospecificity of α -proton exchange reactions catalysed by pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* (2003), 1647, 138.
- [MANDELES, 1954] S. Mandeles, R. Koppelman, M. E. Hanke. Deuterium studies on the mechanism of enzymatic amino acid decarboxylation. *J. Biol. Chem.* (1954), 209, 327.
- [MARQUARDT, 1963] D. W. Marquardt. An algorithm for least-squares estimation of non-linear parameters. *J. Soc. Indust. Appl. Math.* (1963), 11, 431.
- [MARTELL, 1977] A. E. Martell, M. F. Langohr. Metal ion- and pyridoxal-catalysed transamination and dephosphonylation of 2-amino-3-phosphonopropionic acid. A new phosphonate model. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1977), 342.

BIBLIOGRAFÍA

- [MARTELL, 1984] A. E. Martell, P. Taylor. NMR evidence for the delocalized α , α' carbanion of pyridoxal and pyridoxamine Schiff bases as the intermediate in vitamin B₆ catalyzed transamination. *Inorg. Chem.* (1984), 23, 2734.
- [MARTELL, 1989] A. E. Martell. Vitamin B₆ catalyzed reaction of α -amino and α -keto acids: model systems. *Acc. Chem. Res.* (1989), 22, 115.
- [MARTÍNEZ-CARRIÓN, 1975] M. Martínez-Carrión. ³¹P nuclear-magnetic-resonance studies of pyridoxal and pyridoxamine phosphates. *Eur. J. Biochem.* (1975), 54, 39.
- [MARTINS, 2005A] S. I. F. S. Martins, M. A. J. S. Van Boekel. Kinetics of the glucose/glycine Maillard reaction pathways: influences of pH and reactant initial concentrations. *Food Chem.* (2005), 92, 437.
- [MARTINS, 2005B] S. I. F. S. Martins, M. A. J. S. Van Boekel. A kinetic model for glucose/glycine Maillard reaction pathways. *Food Chem.* (2005), 90, 257.
- [MASAAKI, 2006] T. Masaaki. Pentosidine, an advanced glycation endproduct, and arthritis. *Curr. Rheumatol. Rev.* (2006), 2, 319.
- [MASŁOWSKA, 1994] J. Masłowska, U. Kijanowicz. Spectrophotometric studies on protolytic equilibria of three forms of vitamin B₆ in aqueous and aqueous-organic solutions. *Pol. J. Chem.* (1994), 68, 601.
- [MATSUDA, 2003] H. Matsuda, T. Wang, H. Managi, M. Yoshikawa. Structural requirements of flavonoids for inhibition of protein glycation and radical scavenging activities. *Bioorg. Med. Chem.* (2003), 11, 5317.
- [MATSUSHIMA, 1967] Y. Matsushima, A. E. Martell. Pyridoxal analogs. X. Zinc (II)-chelate catalysis of transamination in methanol solution. *J. Am. Chem. Soc.* (1967), 89, 1331.
- [MEISTER, 1955] A. Meister. Transamination. *Adv. Enzymol. Relat. Area Mol. Biol.* (1955), 16, 185.
- [MELI, 2002] M. Meli, C. Perder, C. Ferron, F. Parssegny, C. Denis, R. Gonthier, B. Laurent, E. Reynaud, J. Frey, A. Chamson. Serum pentosidine as an indicator of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* (2002), 4, 93.
- [MENNELLA, 2005] C. Mennella, R. C. Borrelli, F. Vinale, M. Ruocco, V. Fogliano. Substrate specificity of amadoriase I from *aspergillus fumigatus*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* (2005), 1043, 837.
- [METZ, 2003A] T. O. Metz, N. L. Alderson, S. R. Thorpe, J. W. Baynes. Pyridoxamine, an inhibitor of advanced glycation and lipoxidation reactions: A novel therapy for treatment of diabetic complications. *Arch. Biochem. Biophys.* (2003), 419, 41.
- [METZ, 2003B] T. O. Metz, N. L. Alderson, M. E. Chachich, S. R. Thorpe, J. W. Baynes. Pyridoxamine traps intermediates in lipid peroxidation reactions *in vivo*. *J. Biol. Chem.* (2003), 278, 42012.
- [METZLER, 1954] D. E. Metzler, M. Ikawa, E. E. Snell. A general mechanism for vitamin B₆-catalyzed reactions. *J. Am. Chem. Soc.* (1954), 76, 648.
- [METZLER, 1957] D. E. Metzler. Equilibria between pyridoxal and amino acids and their imines. *J. Am. Chem. Soc.* (1957), 79, 485.
- [METZLER, 1973] D. E. Metzler, C. M. Harris, R. J. Johnson, D. B. Siano, J. A. Thomson. Spectra of 3-hydroxypyridines. Band-shape analysis and evaluation of tautomeric equilibria. *Biochemistry* (1973), 12, 5377.
- [METZLER, 1980] C. M. Metzler, A. Cahill, D. E. Metzler. Equilibriums and absorption spectra of Schiff bases. *J. Am. Chem. Soc.* (1980), 102, 6075.
- [MIERTUS, 1981] S. Miertus, E. Scrocco, J. Tomasi. Electrostatic interaction of a solute with a continuum. A direct utilization of AB initio molecular potentials for the prevision of solvent effects. *Chem. Phys.* (1981), 55, 117.

- [MIYATA, 2000] T. Miyata, Y. Ueda, K. K. Asahi, Y. Izuhara, R. Inagi, A. Saito, C. van Ypersele de Strihou, K. Kurokawa. Mechanism of the inhibitory effect of OPB-9195 [(6)-2-Isopropylidenehydrazono-4-oxo-thiazolidin-5-ylacetanilide] on advanced glycation end product and advanced lipoxidation end product formation. *J. Am. Soc. Nephrol.* (2000), 11, 1719.
- [MIYATA, 2003] T. Miyata, C. van Ypersele de Strihou. 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.
- [MOHAMADI, 1990] F. Mohamadi, N. G. J. Richards, W. C. Guida, R. Liskamp, C. Caufield, G. Chang, T. Hendrickson, W. C. Still. Macromodel –an integrated software system for modeling organic and bioorganic molecules using molecular mechanics. *J. Comput. Chem.* (1990), 11, 440.
- [MOHAN, 1979] M. S. Mohan, R. Seigal, E. H. Abbott. Mixed metal ion catalysis of the elimination of phosphate ion from phosphoserine – pyridoxal Schiff bases. *Indian J. Chem.* (1979), 19A, 363.
- [MOMANY, 2004] C. Momany, V. Levdkov, L. Blagova, S. Lima, R. S. Phillips. Three-dimensional structure of kynureninase from *pseudomonas fluorescens*. *Biochemistry* (2004), 43, 1193.
- [MONNIER, 2003] V. M. Monnier. Intervention against the Maillard reaction in vivo. *Arch. Biochem. Biophys.* (2003), 419, 1.
- [MONNIER, 2005] V. M. Monnier, G. T. Mustata, K. L. Biemel, O. Reih, M. O. Lederer, D. Zhenyu, D. R. Sell. Cross-Linking of the extracellular matrix by the Maillard reaction in aging and diabetes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* (2005), 1043, 533.
- [MONNIER, 2007] V. M. Monnier. Dietary advanced lipoxidation products as risk factors for human health- a call for data. *Mol. Nutr. Food Res.* (2007), 51, 1091.
- [MOORTHY, 1975] P. N. Moorthy, E. Hayon. One-electron redox reactions of water-soluble vitamins. III. Pyridoxine and pyridoxal phosphate (vitamin B₆). *J. Am. Chem. Soc.* (1975), 97, 2048.
- [MORARIU, 2006] M. Morariu. Topical compositions comprising benfotiamine and pyridoxamine. U. S. Pat. Appl. Publ. (2006), US2006045896 A1 20060302.
- [MOROZOV, 1966] Yu. V. Morozov, N. P. Bazhulina, M. Ya. Karpeisky, V. I. Ivanov, A. I. Kuklin. Optical and luminescent properties of vitamin B₆ and its derivatives. III. Pyridoxamine and pyridoxamine-5'-phosphate. *Biofizika (USSR)* (1966), 11, 228.
- [MOROZOV, 1982] Yu. V. Morozov, V. P. Almazov, F. A. Savin, N. P. Bazhulina. Electron structure and spectra of Schiff bases of pyridoxal-5'-phosphate and several of their analogs. *Bioorg. Khim.* (1982), 8, 1119.
- [MOROZOV, 1986] Y. V. Morozov. 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] A. L. Morrison, R. F. Long. The photolysis of pyridoxal phosphate. *J. Chem. Soc.* (1958), 211.
- [MOSSINE, 1999] V. V. Mossine, M. Linetsky, G. V. Glinsky, B. J. Ortwerth, M. S. Feather. Superoxide free radical generation by Amadori compounds; the role of acyclic forms and metal ions. *Chem. Res. Toxicol.* (1999), 12, 230.
- [MULLARKEY, 1990] C. J. Mullarkey, D. Edelstein, M. Brownlee. Free radical generation by early glycation products: a mechanism for accelerated atherogenesis in diabetes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1990), 173, 932.

BIBLIOGRAFÍA

- [MULLIKEN, 1955] R. S. Mulliken. Electronic population analysis on LCAO-MO molecular wave functions I. *J. Chem. Phys.* (1955), 23, 1833.
- [MUNANAIRI, 2007] A. Munanairi, S. K. O'Banion, R. Gamble, E. Breuer, A. W. Harris, R. K. Sandwick. The multiple Maillard reactions of ribose and deoxyribose sugars and sugar phosphates. *Carbohydr. Res.* (2007), 342, 2575.
- [MURAKAMI, 1973] Y. Murakami, H. Kondo, A. E. Martell. Catalysis of the beta-elimination of O-phosphothreonine by pyridoxal and metal ions. *J. Am. Chem. Soc.* (1973), 95, 7138.
- [NAGARAJ, 2002] R. H. Nagaraj, P. Sarkar, A. Mally, K. M. Biemel, M. O. Lederer, P. S. Padayatti. 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.
- [NAGANO, 1967] K. Nagano, D. E. Metzler. Machina computation of equilibrium constants and plotting of spectra of individual ionic species in the pyridoxalalanine system. *J. Am. Chem. Soc.* (1967), 89, 2891.
- [NAIR, 1981] V. Nair, D. E. Vietti, C. S. Cooper. Degenerative chemistry of malondialdehyde. Structure, stereochemistry, and kinetics of formation of enaminals from reaction with amino acids. *J. Am. Chem. Soc.* (1981), 103, 3030.
- [NAKAMURA, 1997] K. Nakamura, Y. Nakazawa, K. Ienaga. Acid-stable fluorescent advanced glycation end products: vesperlysines A, B, and C are formed as crosslinked products in the Maillard reaction between lysine or proteins with glucose. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1997), 232, 227.
- [NAKAMURA, 2007] S. Nakamura, H. Li, A. Adijiang, M. Pischetsrieder, T. Niwa. Pyridoxal phosphate prevents progression of diabetic nephropathy. *Nephrol. Dial. Transplant.* (2007), 22, 2165.
- [NAKANO, 1995] H. Nakano, J. F. Gregory, III. Pyridoxine and pyridoxine-5'- β -D-glucoside exert different effects on tissue B-6 vitamins but similar effects of β -glucosidase activity in rats. *J. Nutr.* (1995), 125, 2751.
- [NAKAYAMA, 1980] T. Nakayama, F. Hayase, H. Kato. Formation of N-(2-formyl-5-hydroxy-methyl-pyrrol-1-yl)-L-norleucine in the Maillard reaction between D-glucose and L-Lysine. *Agric. Biol. Chem.* (1980), 44, 1201.
- [NEELY, 2000] M. D. Neely, L. Zimmerman, M. J. Picklo, J. J. Ou, C. R. Morales, K. S. Montine, V. Amaranth, T. J. Montine. Congeners of N(α)-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.
- [NEEPER, 1992] M. Neeper, A. M. Schmidt, J. Brett, S. D. Yan, F. Wang, Y. C. Pan, K. Elliston, D. Stern, A. Shaw. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J. Biol. Chem.* (1992), 267, 14998.
- [NELSON, 2005] D. L. Nelson, M. M. Cox. In: *Lehninger's Principles of Biochemistry*. Ed. Freeman Press, New York (2005).
- [OBAYASHI, 1996] H. Obayashi, K. Nakano, H. Shigeta, M. Yamaguchi, K. Yoshimori, M. Fukui, M. Fujii, Y. Kitagawa, N. Nakamura, K. Nakamura, Y. Nakazawa, K. Ienaga, M. Ohta, M. Nishimura, I. Fukui, M. Kondo. Formation of crossline as a fluorescent advanced glycation end product *in vitro* and *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1996), 226, 37.
- [OCHS, 1995] S. Ochs, T. Severin. Reaction of 2'-deoxyguanosine with glucose. *Carbohydr. Res.* (1995), 266, 87.
- [ODANI, 1999] H. Odani, T. Shinzato, Y. Matsumoto, J. Usami, K. Maeda. Increase in three dicarbonyl compounds levels in human urmic plasma:

- specific *in vivo* determination of intermediates in advanced Maillard reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1999), 256, 89.
- [ONORATO, 2000]** J. M. Onorato, A. J. Jenkins, S. R. Thorpe, J. W. Baynes. Pyridoxamine, an inhibitor of advanced glycation reactions, also inhibits advanced lipoxidation reactions. *J. Biol. Chem.* (2000), 275, 21177.
- [PALCIC, 1986]** M. M. Palcic, H. G. Floss. 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).
- [PALMBERG, 1981]** P. Palmberg, M. Smith, S. Waltman, T. Krupin, P. Singer, D. Burgess, T. Wendtlandt, J. Achtenberg, P. Cryer, J. Santiago, N. White, C. Kilo, W. Daughaday. The natural history of retinopathy in insulin-dependent juvenile-onset diabetes. *Ophthalmology* (1981), 88, 613.
- [PATTON, 1977]** C. J. Patton, S. R. Crouch. Spectrophotometric and kinetics investigation of the Berthelot reaction for the determination of ammonia. *Anal. Chem.* (1977), 49, 464.
- [PEAKFIT, 1995]** PeakFit v. 4.0; AISN Software, Erkrath, Germany, 1995.
- [PENG, 2008]** X. Peng, Z. Zheng, K.-W. Cheng, F. Shan, G.-X. Ren, F. Chen, M. Wang. Inhibitory effect of mung bean extract and its constituents vitexin and isovitexin on the formation of advanced glycation endproducts. *Food Chem.* (2008), 106, 475.
- [PERLIN, 1966]** A. S. Perlin. Hydroxyl proton magnetic resonance in relation to ring size, substituent groups, and mutarotation of carbohydrates. *Can. J. Chem.* (1966), 44, 540.
- [PFORDTE, 1961A]** K. Pfordte, G. Leuschner. Intermolecular dehydrogenation with ultraviolet light. VI. Photoreactions of various aliphatic amines. *Liebigs Ann. Chem.* (1961), 646, 25.
- [PFORDTE, 1961B]** K. Pfordte, G. Leuschner. Intermolecular dehydrogenation with ultraviolet light. VII. Photoreactions of certain N-heterocycles. *Liebigs Ann. Chem.* (1961), 646, 30.
- [PHILLIPS, 1998]** R. S. Phillips, B. Sundararaju, S. V. Koushik. The catalytic mechanism of kynureninase from *pseudomonas fluorescens*: evidence for transient quinonoid and ketimine intermediates from rapid-scanning stopped-flow spectrophotometry. *Biochemistry* (1998), 37, 8783.
- [PRABHAKARAM, 1997]** M. Prabhakaram, Q. Cheng, M. S. Feather, B. J. Ortweh. Structural elucidation of a novel lysine-lysine crosslink generated in a glycation reaction with L-threose. *Amino Acids* (1997), 12, 225.
- [PRICE, 2001]** D. L. Price, P. M. Rhett, S. R. Thorpe, J. W. Baynes. Chelating activity of advanced glycation end-product inhibitors. *J. Biol. Chem.* (2001), 276, 48967.
- [RADHAKRISHNAN, 1993]** K. Radhakrishnan, A. C. Hindmarsh. Description and use of LSODE, the Livermore solver for ordinary differential equations. Livermore National Laboratory Report (UCRL-ID-113855). NASA, 1327 (1993).
- [RAHBAR, 1968]** S. Rahbar. An abnormal haemoglobin in red cells of diabetics. *Clin. Chim. Acta* (1968), 22, 296.
- [RAHBAR, 2002]** S. Rahbar, J. L. Figarola. Inhibitors and breakers of advanced glycation endproducts (AGEs): a review. *Curr. Med. Chem. Immun. Endocrinol. Metab. Agents* (2002), 2, 135.
- [RAHBAR, 2003]** S. Rahbar, J. L. Figarola. Novel inhibitors of advanced glycation endproducts. *Arch. Biochem. Biophys.* (2003), 419, 63.
- [RAVANDI, 1996]** A. Ravandi, A. Kukisis, L. Marai, J. J. Myher, G. Steiner, G. Lewisa, H. Kamido. Isolation and identification of glycated aminophospholipids from red cells and plasma of diabetic blood. *FEBS Lett.* (1996), 381, 77.

BIBLIOGRAFÍA

- [REED, 1988] A. E. Reed, L. A. Curtiss, F. Weinhold. Intermolecular interactions from a natural bond orbital, donor-acceptor viewpoint. *Chem. Rev.* (1988), 88, 899.
- [REIBER, 1972] H. Reiber. Photochemical reactions of vitamin B₆ compounds, isolation, and properties of products. *Biochem. Biophys. Acta* (1972), 279, 310.
- [REICH, 1992] J. G. Reich. In: *Curve fitting and modelling for scientists and engineers*. Ed. McGraw-Hill, New York (1992).
- [REICHARD, 1986] G. A. Reichard, C. L. Skutches, R. D. Hoeldtke, O. E. Owen. Acetone metabolism in humans during diabetic ketoacidosis. *Diabetes* (1986), 35, 668.
- [REQUENA, 2001] J. R. Requena, C.-C. Chao, R. L. Levine, E. R. Stadtman. Glutamic and amino adipic semialdehydes are the main carbonyl products of metal-catalyzed oxidation of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (2001), 98, 69.
- [REYNOLDS, 1965] T. M. Reynolds. Chemistry of nonenzymatic browning II. *Adv. Food Res.* (1965), 14, 167.
- [RIBAYA, 1990] J. D. Ribaya-Mercado, R. M. Russell, F. D. Morrow, N. Sahyoun, S. N. Gershoff. Vitamin B₆ deficiency elevates serum insulin in elderly subjects. *Ann. NY. Acad. Sci.* (1990), 585, 531.
- [RIZZI, 2004] G. P. Rizzi. Role of phosphate and carboxylate ions in Maillard browning. *J. Agric. Food Chem.* (2004), 52, 953.
- [RUGGIERO-LÓPEZ, 1999] D. Ruggiero-López, M. Lecomte, G. Moinet, G. Patereau, M. Lagarde, N. Wiernsperger. Reaction of metformin with dicarbonyl compounds. Possible implication in the inhibition of advanced glycation end product formation. *Biochem. Pharmacol.* (1999), 58, 1765.
- [SAIDI, 1983] B. Saidi, J. J. Warthesen. Influence of pH and light on the kinetics of vitamin B₆ degradation. *J. Agric. Food Chem.* (1983), 31, 876.
- [SALOMAA, 1964] P. Salomaa, L. L. Schaleger, F. A. Long. Solvent deuterium isotoped effects on acid-base equilibria. *J. Am. Chem. Soc.* (1964), 86, 1.
- [SALOMON, 1977] R. G. Salomon, M. F. Salomon. 2,3-Dioxabicyclo[2.2.1]heptane. The strained bicyclic peroxide nucleus of prostaglandin endoperoxides. *J. Am. Chem. Soc.* (1977), 99, 3501.
- [SALOMON, 2005] R. G. Salomon. Isolevuglandins, oxidatively truncated phospholipids, and atherosclerosis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* (2005), 1043, 327.
- [SALVÀ, 2003A] A. Salvà, J. Frau, F. Muñoz, J. Donoso. FT-IR study of pyridoxamine 5'-phosphate. *Biochim. Biophys. Acta* (2003), 1647, 83.
- [SALVÀ, 2003B] A. Salvà, J. Donoso, J. Frau, F. Muñoz. DFT studies on Schiff base formation of vitamin B₆ analogues. *J. Phys. Chem. A* (2003), 107, 9409.
- [SALVÀ, 2004] A. Salvà, J. Donoso, J. Frau, F. Muñoz. Density functional theory studies on transamination of vitamin B₆ analogues through geminal diamine formation. *J. Phys. Chem. A* (2004), 108, 11709.
- [SAMPSON, 1989] D. A. Sampson, D. K. O'Connor. Analysis of B-6 vitamers and pyridoxic acid in plasma, tissues and urine using high performance liquid chromatography. *Nutr. Res.* (1989), 9, 259.
- [SÁNCHEZ-RUIZ, 1982] J. M. Sánchez-Ruiz, J. M. Rodríguez-Pulido, J. Llor, M. Cortijo. Rates and equilibria of aldimine formation between pyridoxal 5'-phosphate and *N*-hexylamine. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* (1982), 1425.
- [SÁNCHEZ-RUIZ, 1991] J. M. Sánchez-Ruiz, A. Iriarte, M. Martínez-Carrión. The ionization states of the 5'-phosphate group in the various coenzyme forms bound to mitochondrial aspartate aminotransferase. *Arch. Biochem. Biophys.* (1991), 286, 38.
- [SATAKE, 1960] K. Satake, T. Okuyama, M. Ohashi, T. Shinoda. The spectrophotometric determination of amine, amino acid and peptide

- with 2,4,6-trinitrobenzene 1-sulfonic acid. *J. Biochem.* (1960), 47, 654.
- [SAXENA, 1999] A. K. Saxena, P. Saxena, X. Wu, M. Obrenovich, M. F. Weiss, V. M. Monnier. Protein aging by carboxymethylation of lysines generates sites for divalent metal and redox active copper binding; relevance to diseases of glycosidative stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1999), 260, 332.
- [SAYER, 1980] J. M. Sayer, P. Conlon. 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.
- [SCHAPER, 2000] N. C. Schaper, M. H. Nabuurs-Franssen, M. S. Huijberts. Peripheral vascular disease and type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab. Res. Rev.* (2000), 16, S11.
- [SCHMIDT, 1992] A-M. Schmidt, M. Vianna, M. Gerlach, J. Brett, J. Ryan, J. Kao, C. Esposito, H. Hegarty, W. Hurley, M. Clauss, F. Wang, Y. E. Pang, T. E. Tsang, D. Stern. 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] K. D. Schnackerz. 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).
- [SCHNEIDER, 1998] M. Schneider, G. B. Quistad, J. E. Casida. N, 7-bis(1-hydroxy-2-oxopropyl)-2'-deoxyguanosine: identical noncyclic adducts with 1,3-dichloropropene epoxides and methylglyoxal. *Chem. Res. Toxicol.* (1998), 11, 1536.
- [SCHNEIDER, 2001] C. Schneider, K. A. Tallman, N. A. Porter, A. R. Brash. Two distinct pathways of formation of 4-hydroxynonenal. Mechanisms of nonenzymatic transformation of the 9- and 13-hydroperoxides of linoleic acid to 4-hydroxyalkenals. *J. Biol. Chem.* (2001), 276, 20831.
- [SCHOONHOVEN, 1994] J. Schoonhoven, J. Schrijver, H. Berg, G. R. M. M. Haenen. Reliable and sensitive high-performance liquid chromatographic method with fluorometric detection for the analysis of vitamin B₆ in foods and feeds. *J. Agric. Food Chem.* (1994), 42, 1475.
- [SCHUCHMANN, 1988] M. N. Schuchmann, C. Von Sonntag. The rapid hydration of the acetyl radical. A pulse radiolysis study of acetaldehyde in aqueous solution. *J. Am. Chem. Soc.* (1988), 110, 5698.
- [SCHWEITZER, 1998] F. Schweitzer, L. Magi, P. Mirabel, C. George. Uptake rate measurements of methanesulfonic acid and glyoxal by aqueous droplets. *J. Phys. Chem. A* (1998), 102, 593.
- [SEIFERT, 2004] S. T. Seifert, R. Krause, K. Gloe, T. Henle. Metal complexation by the peptide-bound Maillard reaction products N-fructoselysine and N-carboxymethyllysine. *J. Agric. Food Chem.* (2004), 52, 2347.
- [SELL, 1989] D. R. Sell, V. M. Monnier. Structure elucidation of a senescence crosslink from human extracellular matrix. Implication of pentoses in the aging process. *J. Biol. Chem.* (1989), 264, 21597.
- [SELL, 1992] D. R. Sell, A. Lapolla, P. Odetti, J. Fogarty, V. M. Monnier. Pentosidine formation in skin correlates with severity of complication in individuals with long-standing IDDM. *Diabetes* (1992), 41, 1286.
- [SELL, 2005] D. R. Sell, K. M. Biemel, O. R. Markus, C. M. Strauch, V. M. Monnier. Glucosepane is a major protein cross-link of the senescent human extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* (2005), 280, 12310.
- [SHAPIRO, 1980] R. Shapiro, M. J. MacManus, C. Zalut, H. F. Bunn. Sites of nonenzymatic glycosylation of human haemoglobin A. *J. Biol. Chem.* (1980), 255, 3120.

BIBLIOGRAFÍA

- [SHILTON, 1991] B. H. Shilton, D. J. Walton. Sites of glycation of human and horse liver alcohol dehydrogenase in vivo. *J. Biol. Chem.* (1991), 266, 5587.
- [SHINOHARA, 1998] M. Shinohara, P. J. Thornalley, I. Giardino, P. Beisswenger, S. R. Thorpe, J. Onorato, M. Brownlee. Overexpression of glyoxalase-I in bovine endothelial cells inhibits intracellular advanced glycation endproduct formation and prevents hyperglycemia-induced increases in macromolecular endocytosis. *J. Clin. Invest.* (1998), 101, 1142.
- [SHIPANOVA, 1997] I. N. Shipanova, M. A. Glomb, R. H. Nagaraj. Protein modification by methylglyoxal: chemical nature and synthetic mechanism of a major fluorescent adduct. *Arch. Biochem. Biophys.* (1997), 344, 29.
- [SIANO, 1969] D. B. Siano, D. E. Metzler. Band shapes of the electronic spectra of complex molecules. *J. Chem. Phys.* (1969), 51, 1856.
- [SIANO, 1972] D. B. Siano. The log-normal distribution function. *J. Chem. Ed.* (1972), 49, 755.
- [SIGMAPLOT, 2004] SigmaPlot v. 9.00; SPSS Inc., Erkrath, Germany, 2004.
- [SKELLEY, 2006] A. M. Skelley, R. A. Mathies. Rapid on-column analysis of glucosamine and its mutarotation by microchip capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* (2006), 1132, 304.
- [SMITH, 1992] P. R. Smith, P. J. Thornalley. 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] E. E. Snell. Effect of heat sterilization on growth promoting activity of pyridoxine for streptococcus lactis R. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* (1942), 51, 356.
- [SNELL, 1975] E. E. Snell. Tryptophanase: structure, catalytic activities, and mechanism of action. *Advan. Enzymol.* (1975), 42, 287.
- [SPINNEKER, 2007] A. Spinneker, R. Sola, V. Lemmen, M. J. Castillo, K. Pietrzik, M. González-Gross. Vitamin B₆ status, deficiency and its consequences-an overview. *Nutr. Hosp.* (2007), 22, 7.
- [STABLER, 1978] R. N. Stabler, J. P. Chesick. A program system for computer integration of multistep reaction rate equations using the gear integration method. *Int. J. Chem. Kinet.* (1978), 10, 461.
- [STANISZEWSKA, 2005] M. M. Staniszewska, R. H. Nagaraj. 3-hydroxykynurenine-mediated modification of human lens proteins: structure determination of a major modification using a monoclonal antibody. *J. Biol. Chem.* (2005), 280, 22154.
- [STEWART, 1989] J. J. P. Stewart. Optimization of parameters for semiempirical methods I. Method. *J. Comput. Chem.* (1989), 10, 209.
- [STILL, 1990] W. C. Still, A. Tempczyk, R. C. Hawley, T. Hendrickson. Semianalytical treatment of salvation for molecular mechanics and dynamics. *J. Am. Chem. Soc.* (1990), 112, 6127.
- [STITT, 2002] A. Stitt, T. A. Gardiner, N. L. Alderson, P. Canning, N. Frizzell, N. Duffy, C. Boyle, A. S. Januszewski, M. Chachich, J. W. Baynes, S. R. Thorpe, N. L. Anderson. The AGE inhibitor pyridoxamine inhibits development of retinopathy in experimental diabetes. *Diabetes* (2002), 51, 2826.
- [STITT, 2005] A. W. Stitt, C. McGoldrick, A. Rice-McCaldin, D. R. McCance, J. V. Glenn, D. K. Hsu, F-T. Liu, S. R. Thorpe, T. A. Gardiner. Impaired retinal angiogenesis in diabetes: role of advanced glycation end products and galectin-3. *Diabetes* (2005), 54, 785.
- [STOLZENBERG, 1999] R. Z. Stolzenberg, D. Albanes, F. J. Nieto, T. J. Hartman, J. A. Tangrea, M. Rautalahti, J. Sehlub, J. Virtamo, P. R. Taylor. Pancreatic cancer risk and nutrition-related methyl-group availability indicators in male smokers. *J. Natl. Cancer Inst.* (1999), 91, 535.

- [STRATMANN, 1998] R. E. Stratmann, G. E. Scuseria, M. J. Frisch. An efficient implementation of time-dependent density-functional theory for the calculation of excitation energies of large molecules. *J. Chem. Phys.* (1998), 109, 8218.
- [STUMVOLL, 1995] M. Stumvoll, N. Nurjahan, G. Perriello, G. Dailey, J. E. Gerich. Metabolic effects of metformin in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* (1995), 333, 550.
- [SUJI, 2004] G. Suji, S. Sivakami. Glucose, glycation and aging. *Biogerontology* (2004), 5, 365.
- [SUSHIL, 2003] K. N. Sulochana, S. Ramprasad, K. Coral, S. Lakshmi, R. Punitham, A. Narayanasamy, S. Ramakrishnan. Glycation and glycooxidation studies in vitro on isolated human vitreous collagen. *Med. Sci. Monit.* (2003), 9, BR220.
- [SUSHIL, 2008] K. J. Sushil. Can tryptohan oxidation lead to lower tryptophan level in diabetes: a commentary on propagation of protein glycation damage involves modification of tryptophan residues via reactive oxygen species: inhibition by pyridoxamine. *Free Radic. Biol. Med.* (2008), 44, 1273.
- [SWALLOW, 1960] A. J. Swallow. In: *Radiation chemistry of organic compounds*. Ed. John Wiley & Sons, New York (1960).
- [SZENT-GYÖRGYI, 1967] A. Szent-Györgyi, L. G. Együd, J. A. McLaughlin. Keto-aldehydes and cell division: glyoxal derivatives may be regulators of cell division and open a new approach to cancer. *Science* (1967), 155, 539.
- [SZWERGOLD, 1995] B. S. Szwegold, K. Taylor, S. Lal, B. Su, F. Kappler, T. R. Brown. ³¹P-nuclear magnetic resonance evidence of an activated hexose-monophosphate shunt in hyperglycaemic rat lenses in vivo. *Diabetes* (1995), 44, 810.
- [SZWERGOLD, 2003] B. S. Szwegold, P. J. Beisswenger. Enzymatic deglycation – a new paradigm or an epiphenomenon? *Biochem. Soc. Trans.* (2003), 31, 1428.
- [SZWERGOLD, 2005] B. S. Szwegold, S. K. Howell, P. J. Beisswenger. Transglycation- A potential new mechanism for deglcation of Schiff's bases. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* (2005), 1043, 845.
- [TABORSKY, 1973] G. Taborsky. Oxidative modification of proteins in the presence of ferrous iron and air. *Biochemistry* (1973), 12, 1341.
- [TACHIBANA, 1983] Y. Tachibana, M. Ando, H. Kuzuhara. A kinetic study of a Zn²⁺-catalyzed transamination reaction between pyridoxamine analogs with a pyridonaphane structure and α -keto acids. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* (1983), 56, 2263.
- [TAKAHASHI, 1977] K. Takahashi. Further studies on the reactions of phenylglyoxal and related reagents with proteins. *Biochem. J.* (1977), 81, 403.
- [TAKEDA, 2004] J. Takeda, A. Nashiro, S. Kurita. Photoinduced intramolecular proton transfer in 2- and 4-(2,4-dinitrobenzyl)pyridine. *J. Lumin.* (2004), 108, 245.
- [TANAKA, 1997] Y. Tanaka, H. Iwamoto, T. Onuma, R. Kawamori. Inhibitory effect of metformin on formation of advanced glycation end products. *Curr. Ther. Res.* (1997), 58, 693.
- [TANIMOTO, 2007] M. Tanimoto, T. Gohda, S. Kaneko, S. Hagiwara, M. Murakoshi, T. Auki, K. Yamada, T. Ito, M. Matsumoto, S. Horikoshi, Y. Tomino. Effect of pyridoxamine (K-163), an inhibitor of advanced glycation end products, on type 2 diabetic nephropathy in KK-Ay/Ta mice. *Metab., Clin. Exp.* (2007), 56, 160.
- [TATSUMOTO, 1981] K. Tatsumoto, A. E. Martell. Pyridoxal- and metal –catalyzed beta – elimination, decarboxylation, and dealdolation reactios of beta – hydroxyglutamic acid. *J. Am. Chem. Soc.* (1981), 103, 6203.

- [TATSUMOTO, 1987] K. Tatsumoto, M. Haruta, A. E. Martell. Pyridoxal- and metal ion-catalyzed oxidative deamination of alpha amino acids. *Inorg. Chim. Acta* (1987), 138, 231.
- [TESSIER, 1999] F. J. Tessier, M. Obrenovich, V. M. Monnier. Structure and Mechanism of formation of human lens fluorophore LM-1. *J. Biol. Chem.* (1999), 274, 20769.
- [TESSIER, 2003] F. J. Tessier, V. M. Monnier, L. S. Sayre, J. A. Kornfield. Triosidines: novel Maillard reaction products and cross-links from the reaction of triose sugars with lysine and arginine residues. *Biochem. J.* (2003), 369, 705.
- [THOMPSON, 1980] D. M. Thompson, W. Balenovich, L. H. M. Hornich, M. F. Richardson. Reactions of metal ions with vitamins. IV. The crystal structure of a zinc complex of pyridoxamine (vitamin B₆). *Inorg. Chim. Acta* (1980), 46, 199.
- [THORNALLEY, 1984] P. J. Thornalley, S. P. Wolff, J. Crabbe, A. Stern. The autoxidation of glyceraldehyde and other monosaccharides under physiological conditions catalysed by buffer ions. *Biochim. Biophys. Acta* (1984), 797, 276.
- [THORNALLEY, 1988] P. J. Thornalley. Modification of the glyoxalase system in human red blood cells by glucose *in vitro*. *Biochem. J.* (1988), 254, 751.
- [THORNALLEY, 1990] P. J. Thornalley. The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. *Biochem. J.* (1990), 269, 1.
- [THORNALLEY, 1999A] P. J. Thornalley, A. Langborg, H. S. Minhas. Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem. J.* (1999), 344, 109.
- [THORNALLEY, 1999B] P. J. Thornalley, H. S. Minhas. 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] P. J. Thornalley, A. Yurek-George, O. K. Argirov. 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, 2003A] P. J. Thornalley. Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. *Arch. Biochem. Biophys.* (2003), 419, 31.
- [THORNALLEY, 2003B] P. J. Thornalley. The enzymatic defence against glycation in health, disease and therapeutics: a symposium to examine the concept. *Biochem. Soc. Trans.* (2003), 31, 1341.
- [THORNALLEY, 2003C] P. J. Thornalley. Glyoxalase I- structure, function and a critical role in the enzymatic defence against glycation. *Biochem. Soc. Trans.* (2003), 31, 1343.
- [THORNALLEY, 2005] P. J. Thornalley. Dicarbonyl intermediates in the Maillard reaction. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* (2005), 1043, 111.
- [THORPE, 2003] S. R. Thorpe, J. W. Baynes. Maillard reaction products in tissue proteins: New products and new perspectives. *Amino Acids* (2003), 25, 275.
- [TOBIAS, 1975] P. Tobias, R. G. Kallen. Kinetics and equilibriums 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 trasimination sequences. *J. Am. Chem. Soc.* (1975), 97, 6530.
- [TONKOVIC, 1996] M. Tonkovic, A. Jakas, S. Horvat. Preparation and properties of an Fe(III)-complex with an Amadori compound derived from L-tyrosine. *Biomaterials* (1996), 10, 55.

- [TRYFIATES, 1986] G. P. Tryfiates, R. R. Smith. 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).
- [TSAI, 2006] H. J. Tsai, S.-Y. Chou, F. Kappler, M. L. Schwartz, A. M. Tobia. A new inhibitor for fructosamine 3-kinase (Amadorase). *Drug Dev. Res.* (2006), 67, 448.
- [UELAND, 1989] P. M. Ueland, H. Refsum. Plasma homocysteine, a risk factor for vascular disease: plasma levels in health, disease, and drug therapy. *J. Lab. Clin. Med.* (1989), 114, 473.
- [UENO, 2002] Y. Ueno, M. Kizaki, R. Nakagiri, T. Kamiya, H. Sumi, T. Osawa. Dietary glutathione protects rats from diabetic nephropathy and neuropathy. *J. Nutr.* (2002), 132, 897.
- [ULRICH, 2001] P. Ulrich, A. Cerami. Protein glycation, diabetes, and aging. *Recent Prog. Horm. Res.* (2001), 56, 1.
- [USUI, 2008] T. Usui, M. Ohguchi, H. Watanabe, F. Hayase. The formation of argpyrimidine in glyceraldehyde-related glycation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (2008), 72, 568.
- [UTZMANN, 2000] C. M. Utzmann, M. O. Lederer. Identification and quantification of aminophospholipid-linked maillard compounds in model systems and egg yolk products. *J. Agric. Food Chem.* (2000), 48, 1000.
- [VAN BOEKEL, 2001] M. A. J. S. Van Boekel. Kinetic aspects of the Maillard reaction: a critical review. *Nahrung-Food* (2001), 45, 150.
- [VANDER JAGT, 1992] D. L. Vander Jagt, B. Robinson, K. K. Taylor, L. A. Hunsaker. Reduction of trioses by NADPH-dependent aldo-keto reductases. Aldose reductase, methylglyoxal, and diabetic complications. *J. Biol. Chem.* (1992), 267, 4364.
- [VANDER JAGT, 2001] D. L. Vander Jagt, R. K. Hassebrook, L. A. Hunsaker, W. M. Brown, R. E. Royer. Metabolism of the 2-oxoaldehyde methylglyoxal by aldose reductase and by glyoxalase-I: roles for glutathione in both enzymes and implications for diabetic complications. *Chem. Biol. Interact.* (2001), 130-132, 549.
- [VARMA, 1997] S. D. Varma, P. S. Devamanoharan, A. H. Ali. Formation of advanced glycation end (AGE) products in diabetes: prevention by pyruvate and α -keto glutarate. *Mol. Cell. Biochem.* (1997), 171, 23.
- [VASAN, 1996] S. Vasan, X. Zhang, A. Kapurniotu, J. Bernhagen, S. Teichberg, J. Basgen, D. Wagle, D. Shih, I. Terlecky, R. Bucala, A. Cerami, J. Egan, P. Ulrich. An agent clearing glucosa-derived protein crosslinks *in vitro* and *in vivo*. *Nature* (1996), 382, 275.
- [VASAN, 2003] S. Vasan, P. Foiles, H. Founds. Therapeutic potential of breaker of advanced glycation end product-protein crosslinks. *Arch. Biochem. Biophys.* (2003), 419, 89.
- [VÁZQUEZ, 1988] M. A. Vázquez, J. Donoso, F. Muñoz, F. García Blanco, M. A. García del Vado, G. Echevarría. Kinetic study of the reaction between some compounds of the vitamin B-6 group and *n*-hexylamine. *Bull. Soc. Chim. France* (1988), 361.
- [VÁZQUEZ, 1989] M. A. Vázquez, G. Echevarría, F. Muñoz, J. Donoso, F. García Blanco. 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, 1990] M. A. Vázquez, J. Donoso, F. Muñoz, F. García Blanco, M. A. García del Vado, G. Echevarría. Kinetic and thermodynamic parameters for Schiff-base formation between 5'-deoxypyridoxal and hexylamine. *Helv. Chim. Acta* (1990), 73, 1991.
- [VÁZQUEZ, 1992A] M. A. Vázquez, F. Muñoz, J. Donoso, F. García Blanco. 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] M. A. Vázquez, F. Muñoz, J. Donoso, F. García Blanco. Stability of Schiff bases of amino acids and pyridoxal-5'-phosphate. *Amino Acids* (1992), 3, 81.
- [VÁZQUEZ, 1992C] M. A. Vázquez, F. Muñoz, J. Donoso, F. García Blanco. Schiff bases between pyridoxal 5'-phosphate and dodecylamine. Kinetic study. *Int. J. Chem. Kin.* (1992), 24, 67.
- [VÁZQUEZ, 1992D] M. A. Vázquez, F. Muñoz, J. Donoso, F. García Blanco. Kinetic study on stability of Schiff base of pyridoxal 5'-phosphate and leucine in water media with cationic surfactants. *Helv. Chim. Acta* (1992), 75, 1029.
- [VENKATRAMAN, 2001] J. Venkatraman, K. Aggarwal, P. Balaram. Helical peptide models for protein glycation : proximity effects in catalysis of the Amadori rearrangement. *Chem. Biol.* (2001), 8, 611.
- [VERNIN, 1992] G. Vernin, L. Debrauwer, G. M. F. Vernin, R-M. Zamkotsian, J. Metzger, J. L. Larice, C. Parkanyi. In: *Off-Flavors in foods and beverages*, Ed. Elsevier, Amsterdam (1992).
- [VILLELA, 1954] G. G. Villela. Cutaneous absorption of pyridoxine. *Rev. Brasil. Biol.* (1954), 14, 443.
- [VISWANATHAN, 1979] T. S. Viswanathan, T. J. Swift. A nuclear magnetic resonance study of pyridoxal phosphate- metal ion interactions. II. Binding of manganese (II). *Can. J. Chem.* (1979), 57, 1050.
- [VISWANATHAN, 1980] T. S. Viswanathan, T. J. Swift. Interaction of divalent metal ions with pyridoxal phosphate. I. Nuclear magnetic resonance studies of cobalt (II) binding. *Can. J. Chem.* (1980), 58, 1118.
- [VLASSARA, 1995] H. Vlassara, Y. M. Li, F. Imani, D. Wojciechowicz, Z. Yang, F. T. Liu, A. Cerami. Identification of galectin-3 as a high-affinity binding protein for advanced glycation end products (AGEs): a new member of the AGE-receptor complex. *Mol. Med.* (1995), 1, 634.
- [VOZIYAN, 2002] P. A. Voziyan, T. O. Metz, J. W. Baynes, B. G. Hudson. 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, 2003] P. A. Voziyan, R. G. Khalifah, C. Thibaudeau, A. Yildiz, J. Jacob, A. S. Serianni, B. G. Hudson. Modification of proteins *in vivo* by physiological levels of glucose. *J. Biol. Chem.* (2003), 278, 46616.
- [VOZIYAN, 2005] P. A. Voziyan, B. G. Hudson. Pyridoxamine as a multifunctional pharmaceutical: targeting pathogenic glycation and oxidative damage. *Cell. Mol. Life Sci.* (2005), 62, 1671.
- [WATKINS, 1985] N. G. Watkins, S. R. Thorpe, J. W. Baynes. Glycation of amino groups in protein. Studies on the specificity of modification of RNase by glucose. *J. Biol. Chem.* (1985), 260, 10629.
- [WATKINS, 1987] N. G. Watkins, C. I. Neglia-Fisher, D. G. Dyer, S. R. Thorpe, J. W. Baynes. Effect of phosphate on the kinetics and specificity of glycation of protein. *J. Biol. Chem.* (1987), 262, 7207.
- [WEI, 2005] E. K. Wei, E. Giovannucci, J. Selhub, C. S. Fuchs, S. E. Hankinson, J. Ma. Plasma vitamin B₆ and the risk of colorectal cancer and adenoma in women. *J. Natl. Cancer Inst.* (2005), 97, 684.
- [WEIDMANN, 1991] P. Weidmann, P. Ferrari. Central role of sodium in hypertension in diabetic subjects. *Diabetes Care* (1991), 14, 220.
- [WEIGERT, 1987] F. J. Weigert. A gear iterator. *Comp. and Chem.* (1987), 11, 273.
- [WELLS-KNECHT, 1995A] K. J. Wells-Knecht, D. V. Zyzak, J. E. Litchfield, S. R. Thorpe, J. W. Baynes. Mechanism of autoxidative glycosylation: identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autoxidative modification of proteins by glucose. *Biochemistry* (1995), 34, 3702.

BIBLIOGRAFÍA

- [WELLS-KNECHT, 1995B] K. J. Wells-Knecht, E. Brinkmann, J. W. Baynes. Characterization of an imidazolium salt formed from glyoxal and *N*-hippuryllysine: a model for Maillard reaction crosslinks in proteins. *J. Org. Chem.* (1995), 60, 6246.
- [WENG, 1983] S-H. Weng, D. L. Leussing. Transamination kinetics of pyridoxal 5'-phosphate Schiff bases. *J. Am. Chem. Soc.* (1983), 105, 4082.
- [WHITE, 2003] N. H. White. Management of diabetic ketoacidosis. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* (2003), 4, 343.
- [WILLIAMS, 2006] M. E. Williams. New potential agents in treating diabetic kidney disease. The fourth act. *Drugs* (2006), 66, 2287.
- [WINCHESTER, 1970] R. V. Winchester, K. R. Lynn. X- and γ -radiolysis of some tryptophan dipeptides. *Int. Radiat. Biol.* (1970), 17, 541.
- [WITHERUP, 1975] T. H. Witherup, E. H. Abbott. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of the vitamin B-6 group. *J. Org. Chem.* (1975), 40, 2229.
- [WOLFF, 1987] S. P. Wolff, R. T. Dean. Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes. *Biochem. J.* (1987), 245, 243.
- [WOLFF, 1993] S. P. Wolff. Diabetes mellitus and free radicals. *Br. Med. Bull.* (1993), 49, 642.
- [WONDRAK, 2002] T. G. Wondrak, D. Cervantes-Laurean, M. J. Roberts, J. G. Qasem, M. Kim, E. L. Jacobson, M. K. Jacobson. Identification of α -dicarbonyl scavengers for cellular protection against carbonyl stress. *Biochem. Pharmacol.* (2002), 63, 361.
- [WU, 2001] X. Wu, B. A. Palfey, V. V. Mossine, V. M. Monnier. Kinetic studies, mechanism, and substrate specificity of amadoriase I from *aspergillus sp.* *Biochemistry* (2001), 40, 12886.
- [WU, 2003] X. Wu, V. M. Monnier. Enzymatic deglycation of proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* (2003), 419, 16.
- [WU, 2005] C. Wu, S. A. Khan, A. J. Lange. Regulation of glycolysis-role of insulin. *Exp. Gerontol.* (2005), 40, 894.
- [YASUMOTO, 1977] K. Yasumoto, H. Tsuji, K. Iwami, H. Mitsuda. Isolation from rice bran of a bound form of vitamin B₆ and its identification as 5'-O-(β -D-glucopyranosyl) pyridoxine. *Agr. Biol. Chem.* (1977), 41, 1061.
- [YAYLAYAN, 1992] V. A. Yaylayan, N. G. Forage. A kinetic model for the reaction of tryptophan with glucosa and mannose – the role of diglycation in the Maillard reaction. *Food Chem.* (1992), 44, 201.
- [YAYLAYAN, 1993] V. A. Yaylayan, A. A. Ismail, S. Mandeville. Quantitative determination of the effect of pH and temperature on the keto form of D-fructose by FT IR spectroscopy. *Carbohydr. Res.* (1993), 248, 355.
- [YAYLAYAN, 1994] V. A. Yaylayan, A. Huyghues-Despointes. Chemistry of Amadori rearrangement products: analysis, synthesis, kinetics, reactions, and spectroscopic properties. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* (1994), 34, 321.
- [YAYLAYAN, 2002] V. A. Yaylayan, A. Wnorowski. The role of β -hydroxyamino acids in the Maillard reaction- transamination route to Amadori products. *International Congress Series* (2002), 1245, 195.
- [YAYLAYAN, 2003] V. A. Yaylayan. Recent advances in the chemistry of Strecker degradation and Amadori rearrangement: implications to aroma and color formation. *Food Sci. Technol. Res.* (2003), 9, 1.
- [YIM, 2001] M. B. Yim, H. S. Yim, C. Lee, S. O. Kang, P. B. Chock. Protein glycation: creation of catalytic sites for free radical generation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* (2001), 928, 48.
- [YOSHIMURA, 2003] T. Yoshimura, N. Esaki. Amino acid racemases: functions and mechanisms. *J. Biosci. Bioeng.* (2003), 96, 103.

BIBLIOGRAFÍA

- [YU, 2006] Y. Yu, S. R. Thorpe, A. J. Jenkins, J. N. Shaw, M. A. Sochaski, D. McGee, C. E. Aston, T. J. Orchard, N. Silvers, Y. G. Peng, J. A. McKnight, J. W. Baynes, T. J. Lyons. Advanced glycation end-products and methionine sulphoxide in skin collagen of patients with type 1 diabetes. *Diabetologia* (2006), 49, 2488.
- [YUEN, 1985] L.-C. Yuen. Studies involving the formation of pyridoxamine-5'-phosphate Schiff bases and their zinc (II) complexes. PhD Thesis (1985).
- [ZENG, 2005] J. Zeng, M. J. Davies. Evidence for the formation of adducts and S-(carboxymethyl)cysteine of reaction of α -dicarbonyl compounds with thiol groups on amino acids, peptides and proteins. *Chem. Res. Toxicol.* (2005), 18, 1232.
- [ZENG, 2006] J. Zeng, M. J. Davies. Protein and low molecular mass thiols as targets and inhibitors of glycation reactions. *Chem. Res. Toxicol.* (2006), 19, 1668.
- [ZHANG, 2003A] S. M. Zhang, W. C. Willett, J. Selhub, D. J. Hunter, E. L. Giovannucci, M. D. Holmes, G. A. Colditz, S. E. Hankinson. Plasma folate, vitamin B₆, vitamin B₁₂, homocysteine, and risk of breast cancer. *J. Natl. Cancer. Inst.* (2003), 95, 373.
- [ZHANG, 2003B] W. H. Zhang, J. Liu, G. Xu, Q. Yuan, L. M. Sayre. Model studies on protein side chain modification by 4-oxo-2-nonenal. *Chem. Res. Toxicol.* (2003), 16, 512.
- [ZHANG, 2008] B. Zhang, Y. Yang, I. Yuk, R. Pai, P. McKay, C. Eigenbrot, M. Dennis, V. Katta, K. C. Francissen. Unveiling a glycation hot spot in a recombinant humanized monoclonal antibody. *Anal. Chem.* (2008), 80, 2379.
- [ZIMMERMAN, 1983] S. C. Zimmerman, A. W. Czarnik, R. Breslow. Intramolecular general base-acid catalysis in transaminations catalyzed by pyridoxamine enzyme analogues. *J. Am. Chem. Soc.* (1983), 105, 1694.
- [ZYZAK, 1995] D. V. Zyzak, J. M. Richardson, S. R. Thorpe, J. W. Baynes. Formation of reactive intermediates from Amadori compounds under physiological conditions. *Arch. Biochem. Biophys.* (1995), 316, 547.