

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**FACULTAD DE FARMACIA**



**TESIS DOCTORAL**

***Consumo de glicoproteínas del pan: implicaciones  
en el metabolismo fosfocálcico y óseo***

Doctorando:

**IRENE RONCERO RAMOS**

Realizada bajo la dirección de las doctoras:

**MARÍA DEL PILAR NAVARRO MARTOS**

**CRISTINA DELGADO ANDRADE**



*Estación Experimental del Zaidín  
Instituto de Nutrición Animal  
(Granada)*



*Consejo Superior de  
Investigaciones Científicas*

**GRANADA, 2013**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Irene Roncero Ramos  
D.L.: GR 218-2014  
ISBN: 978-84-9028-737-8



**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS**

ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL ZAIDÍN (EEZ)

*Instituto de Nutrición Animal (INA)*

Y

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

FACULTAD DE FARMACIA

**Consumo de glicoproteínas del pan: implicaciones  
en el metabolismo fosfocálcico y óseo**

***IRENE RONCERO RAMOS***

*GRANADA, 2013*



**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS**

**ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL ZAIDÍN (EEZ)**

*Instituto de Nutrición Animal (INA)*

Y

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**Consumo de glicoproteínas del pan: implicaciones en el  
metabolismo fosfocálcico y óseo**

Tesis Doctoral presentada por

**IRENE RONCERO RAMOS**

Realizada bajo la dirección de las doctoras

**MARÍA DEL PILAR NAVARRO MARTOS**

**CRISTINA DELGADO ANDRADE**



*Facultad de Farmacia  
Universidad de Granada*



*Estación Experimental del Zaidín  
Instituto de Nutrición Animal  
(Granada)*



*Consejo Superior de  
Investigaciones  
Científicas*



El doctorando, Irene Roncero Ramos, y los directores de la tesis, M. Pilar Navarro Martos y Cristina Delgado Andrade, garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, 28 de mayo de 2013

Director/es de la Tesis

Doctorando

Fdo.: **M. Pilar Navarro Martos**

Fdo.: **Irene Roncero Ramos**

Handwritten signature of Maria del Pilar Navarro in black ink, written in a cursive style.Handwritten signature of Irene Roncero Ramos in black ink, consisting of a stylized vertical stroke and a horizontal line.

Fdo.: **Cristina Delgado Andrade**

Handwritten signature of Cristina Delgado Andrade in blue ink, featuring a circular loop and a long horizontal stroke.



La realización de la presente tesis Doctoral se ha llevado a cabo gracias a la concesión de una beca JAEpre, propia del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). El trabajo expuesto forma parte de un proyecto concedido por el Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2006-12902/ALI): **Repercusiones del consumo de Productos de la Reacción de Maillard sobre la utilización del calcio y el metabolismo óseo.**

La dirección de esta Memoria de Tesis Doctoral la han llevado a cabo las Doctoras María del Pilar Navarro Martos y Cristina Delgado Andrade, del Instituto de Nutrición Animal, de la Estación Experimental del Zaidín (EEZ), del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Para su realización ha sido fundamental la colaboración del Grupo SIRO que suministró las muestras de pan para elaborar las dietas experimentales.

Los resultados de los ensayos que recoge esta Tesis Doctoral han sido presentados en los siguientes congresos:

**Roncero-Ramos I., Delgado-Andrade C., Tessier F.J., Niquet-Léridon C., Strauch C., Monnier V.M., Navarro M.P.** Metabolic transit of Nε-carboxymethyl-lysine after consumption of AGEs from bread crust. *11° International Symposium on the Maillard Reaction*. Nancy (Francia), 2012.

**Roncero-Ramos I.** Productos de la reacción de Maillard alimentarios sobre la biodisponibilidad del calcio y fósforo. Efectos en el metabolismo y funcionalidad del hueso. *I Congreso Científico de Investigadores en Formación en Agroalimentación (eidA3)*. Córdoba (España), 2012.

**Delgado-Andrade C., Roncero-Ramos I., Alonso-Olalla R., Navarro M.P.** Effects of dietary bread crust Maillard reaction products on phosphorus bioavailability. *11th FENS European Nutrition Conference*. Madrid (España), 2011.

**Delgado-Andrade C., Roncero-Ramos I., Haro A., Seiquer I., Morales F.J., Navarro M.P.** AGEs from bread crust: metabolic transit and effects on food intake and body weight. *11th FENS European Nutrition Conference*. Madrid (España), 2011.

**Navarro M.P., Roncero-Ramos I., Delgado-Andrade C.** ¿Pueden las glicotoxinas alimentarias afectar las características óseas? *XVI Congreso de la Sociedad*

*Española de Investigación Ósea y del Metabolismo Mineral*. La Coruña (España), 2011.

**Haro A., Jiménez J.M., Zambrano E., Roncero, I. Seiquer I., Delgado-Andrade C.** Efectos biológicos del consumo de productos de la reacción Maillard procedentes del pan y su eliminación urinaria en ratas. *XI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Nutrición*. Sitges (España), 2009.

Y, así mismo, forman parte de las siguientes publicaciones:

**Roncero-Ramos I., Delgado-Andrade C., Tessier F.J., Niquet-Léridon C., Strauch C., Monnier V.M., Navarro M.P.** Metabolic transit of Nε-carboxymethyl-lysine after consumption of AGEs from bread crust. *Food Funct*, 2013, *en prensa*.

**Delgado-Andrade C., Roncero-Ramos I., Carballo J., Rufián-Henares J.A., Seiquer I., Navarro M.P.** Composition and functionality of bone affected by dietary glycated compounds. *Food Funct*, 2013; 4:549-556.

**Roncero-Ramos I., Delgado-Andrade C., Alonso-Olalla R., Navarro MP.** Influence of bread crust-derived Maillard reaction products on phosphorus balance in rats. *Eur J Nutr*, 2012, 51: 871-879.

**Roncero-Ramos I., Delgado-Andrade C., Haro A., Ruiz-Roca B., Morales FJ., Navarro MP.** Effects of dietary bread crust Maillard reaction products on calcium and bone metabolism in rats. *Amino Acids*, 2013, 44(6): 1409-1418.

## **ÍNDICE DE CONTENIDOS**

---



<b>Capítulo 1. Introducción y objetivos</b> .....	19
<b>Capítulo 2. Revisión bibliográfica</b> .....	25
<i>Aspectos generales de calcio, fósforo y hueso</i> .....	27
1. Calcio y fósforo.....	27
2. Hueso .....	29
2.1. Estructura y composición del hueso .....	29
2.2. Metabolismo óseo.....	32
2.2.1. Marcadores bioquímicos del remodelado.....	33
a) Marcadores de formación.....	34
b) Marcadores de resorción.....	35
<i>Impacto de los tratamientos térmicos en la dieta occidental</i> .....	37
1. Reacción de Maillard.....	40
2. Desarrollo de la reacción de Maillard en el pan.....	46
3. Productos de la reacción de Maillard.....	50
3.1. Absorción y metabolismo de los PRMs.....	50
3.2. Efectos de los productos de la reacción de Maillard.....	53
3.2.1. Modificación de las características organolépticas de los alimentos.....	53
3.2.2. Aspectos nutritivos.....	54
a) Efectos sobre la ingesta y el peso.....	54
b) Efectos sobre las proteínas y aminoácidos.....	56
c) Efectos sobre las vitaminas.....	58
d) Efectos sobre el metabolismo mineral.....	60

d.1. Forma fisicoquímica: cambios en especiación.....	60
d.2. Influencia sobre la digestibilidad mineral.....	62
d.3. Consecuencias sobre el metabolismo mineral.....	65
3.2.3. Algunos aspectos fisiopatológicos.....	69
a) Efectos sobre los microorganismos.....	69
b) Efectos mutagénicos, antimutagénicos y cancerígenos.....	70
c) Efectos alergénicos y antialergénicos.....	71
d) Actividad antioxidante y prooxidante.....	72
4. Reacción de Maillard <i>in vivo</i> .....	75
4.1. AGEs circulantes. Absorción y metabolismo.....	79
4.1.1. Sinergismo entre AGEs circulantes y AGEs dietéticos.....	79
4.1.2. Tránsito metabólico de los AGEs.....	80
4.2. Efecto de los AGEs sobre la salud.....	82
<b>Capítulo 3. Diseño experimental.....</b>	<b>93</b>
<b>Capítulo 4. Metodología.....</b>	<b>97</b>
1. Preparación de las muestras: extracción de la corteza de pan y de sus fracciones....	99
2. Preparación de las dietas experimentales.....	100
3. Diseño experimental de los ensayos biológicos.....	103
4. Ensayos de balance mineral .....	104
4.1. Balance de la última semana de ensayo.....	104
4.2. Balance global.....	106
5. Determinaciones analíticas.....	107
5.1. Determinación de minerales.....	107
a) Técnicas analíticas.....	107
b) Precisión y exactitud de los análisis.....	108
5.2. Estudios metabólicos, mecánicos y densitometría del hueso.....	109
a) Determinación de parámetros físicos del fémur y composición ósea.....	109
b) Densitometría ósea.....	109
c) Análisis de las propiedades mecánicas en el hueso.....	110
d) Parámetros bioquímicos y marcadores del metabolismo óseo.....	111
e) Contenido de pentosidina en tibia.....	111

5.3. Evaluación del tránsito metabólico y destino del compuesto de Maillard	
Carboximetil-lisina.....	113
6. Tratamiento estadístico.....	115
<b>Capítulo 5. Efectos de los productos de la reacción de Maillard procedentes de la corteza de pan en el metabolismo del calcio y del hueso en ratas.....</b>	<b>119</b>
<b>Capítulo 6. Influencia de los productos de la reacción de Maillard derivados de la corteza de pan en el balance de fósforo en ratas.....</b>	<b>149</b>
<b>Capítulo 7. Efectos de los compuestos de glicación dietéticos sobre la composición y funcionalidad del hueso.....</b>	<b>175</b>
<b>Capítulo 8. Tránsito metabólico de N<sup>E</sup>-carboximetil-lisina tras el consumo de AGEs procedentes de la corteza de pan.....</b>	<b>203</b>
<b>Capítulo 9. Discusión general.....</b>	<b>229</b>
1. Ingesta y peso.....	231
2. Balance fosfocálcico y distribución tisular.....	232
3. Hueso: cambios estructurales y biomecánica.....	238
4. Carboximetil-lisina: tránsito metabólico y posibles órganos de depósito o formación.....	244
<b>Capítulo 10. Resumen y conclusiones.....</b>	<b>251</b>
<b>Capítulo 11. Summary and conclusions.....</b>	<b>259</b>
<b>Capítulo 12. Referencias bibliográficas.....</b>	<b>267</b>



### ***Abreviaturas utilizadas***

**A/I:** digestibilidad

**ABTS:** 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzotiazol-6-sulfónico)

**AGEs:** productos de glicación avanzada

**ALEs:** productos de lipoxidación avanzada

**ALP:** fosfatasa alcalina

**ATP:** trifosfato de adenosina

**BC:** corteza de pan

**BMC:** contenido mineral óseo

**BMD:** densidad mineral ósea

**CaBP:** calbindina

**CML:** carboximetil-lisina

**DEXA:** absorciometría de rayos X de energía dual

**DPD:** deoxipiridinolina

**DPPH:** 1,1-Difenil-2-picril-hidracilo

**EAA:** espectrofotometría de absorción atómica

**ECaCs:** canales de calcio epiteliales

**ELISA:** ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas

**FRAP:** poder antioxidante reductor del hierro

**GAR:** global antioxidant response

**HMF:** hidroximetilfurfural

**HMW:** alto peso molecular

**IL:** interleuquina

**IMAC:** Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography

**LDL:** lipoproteínas de baja densidad

**LMW:** bajo peso molecular

**NADP:** nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

**NaPi-IIb:** transportador de fósforo tipo IIb

**NFPA:** ácido nonafluoropentanoico

**NF-κB:** factor de transcripción nuclear kappa B

**PINP:** propéptido amino terminal del colágeno tipo I

**pQCT:** tomografía axial computerizada periférica

**PRMs:** productos de la reacción de Maillard

**PTH:** paratohormona

**PYD:** piridinolina

**R/A:** utilización metabólica

**R/I:** biodisponibilidad

**RAGE:** receptor de productos de glicación avanzada

**ROS:** especies reactivas de oxígeno

**sICAM:** molécula de adhesión intercelular soluble

**TBARS:** sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

**TNF-α:** factor de necrosis tumoral α

**VCAM:** molécula de adhesión vascular

**β-CTX:** isómero β del telopéptido carboxi-terminal



## **CAPÍTULO 1**

### *Introducción y objetivos*

---



La relación entre la alimentación y la salud ha estado latente, en mayor o menor medida, a lo largo de la historia de la humanidad. Sin embargo, no ha sido hasta el siglo pasado cuando la interconexión adquiere un carácter científico y empieza a cobrar importancia la necesidad de adecuar la dieta para mantener y mejorar la salud. En los últimos años del siglo XX numerosas evidencias, basadas en datos epidemiológicos, han ayudado a clarificar el papel de la dieta en la prevención y control de la morbilidad y mortalidad prematura de ciertas enfermedades crónicas no transmisibles. Por todo ello, actualmente la relación dieta-salud es un concepto de sumo interés, valorado y potenciado desde los organismos gubernamentales.

Así, dentro de los programas de cooperación en Investigación y Desarrollo de la Comisión Europea, en concreto, en los *Joint Programming Initiative*, destaca la propuesta “*A Healthy Diet for a Healthy Life*”, que propone como objetivo para el 2030 motivar y dar la oportunidad a la población europea de consumir una dieta saludable, con objeto de disminuir significativamente la incidencia de las enfermedades relacionadas con la nutrición.

A pesar de que la preocupación por una dieta saludable es cada vez más patente entre la población, un número importante de sectores se aleja de la dieta tradicional. Distintos factores socioculturales influyen en el cambio de hábitos alimentarios: modificaciones en la estructura familiar; la industrialización, que ha ocasionado migraciones del campo a la ciudad y el abandono de la agricultura familiar; la incorporación de la mujer al mercado laboral y la consecuente pérdida de cultura culinaria; la escasez de tiempo para cocinar y el deseo de ocio; la enorme oferta de

alimentos ya preparados; la influencia de la publicidad, etc. Actualmente, en detrimento de nuestra dieta tradicional, adquieren preponderancia los alimentos precocinados, las comidas “para llevar”, los restaurantes de comida rápida, el snaking, etc., especialmente entre los jóvenes. Muchos de estos alimentos, además de suponer un aporte calórico excesivo, suelen implicar repetidos tratamientos térmicos previos a su consumo, que conducen a un intenso desarrollo de pardeamiento.

Seguramente, desde el descubrimiento del fuego el hombre ha cocinado sus alimentos, práctica con la que conseguía mejorar sus características sensoriales y de la que hoy conocemos su beneficio para disminuir la carga microbiana, inactivar enzimas, destruir sustancias tóxicas, etc. La responsable principal de la aparición de esos sabores y aromas agradables es la reacción de Maillard o de pardeamiento no enzimático. Los productos que origina (productos de la reacción de Maillard, PRMs), también conocidos como glicoproteínas, poseen además ciertas actividades biológicas, positivas en algunos casos, como su capacidad antioxidante o antimutagénica, pero también muestran aspectos negativos: pueden deprimir el valor nutritivo de la proteína o interferir la absorción de los minerales dietéticos e, incluso, algunos llegan a ser cancerígenos.

Por tanto, con nuestra dieta habitual hemos consumido desde siempre cantidades variables de estos compuestos, sin que aparentemente hayan supuesto un perjuicio claro para la salud. No olvidemos que se han ingerido en el seno de una dieta variada, en la que, junto a los alimentos cocinados, se toman también numerosos productos frescos o poco procesados. El problema puede surgir en relación con los cambios en los hábitos alimentarios, que conducirían a dietas monótonas en las que predominen alimentos sometidos a más intensos tratamientos térmicos, cuyos contenidos de PRMs se elevan y, en consecuencia, también su ingesta diaria.

Por otra parte, la reacción de Maillard o glicación de proteínas ocurre también *in vivo*, dando lugar a los productos de glicación avanzada, conocidos como AGEs (advanced glycation end-products). Estos compuestos incrementan en el organismo durante el proceso de envejecimiento y se han asociado al progreso de diversas

patologías como la diabetes, las cataratas, la arterioesclerosis o las enfermedades osteoarticulares, entre otras.

La glicación endógena afecta fundamentalmente a las proteínas de vida media larga, modificando su estructura y su funcionalidad. Además, la interacción de los AGEs con sus receptores celulares específicos, los RAGEs, parece implicada en procesos inflamatorios y de aterogénesis. Concretamente el colágeno, constituyente fundamental de la matriz ósea y de otros muchos tejidos, es muy vulnerable a la glicación, que conlleva el entrecruzamiento de sus fibras (crosslinking no enzimático), hecho que se asocia estrechamente con alteraciones biomecánicas y pérdidas de funcionalidad del tejido. Durante el envejecimiento incrementa la formación de crosslinking no enzimático y la acumulación de otros AGEs, afectando el remodelado óseo, interfiriendo en la diferenciación osteoblástica, etc. Por todos los cambios descritos, la glicación del colágeno óseo se asocia con las complicaciones de enfermedades metabólicas o degenerativas ligadas al envejecimiento, como la osteoporosis disminución de la resistencia ósea, aumento de fracturas, osteoporosis, osteoartritis, etc.

La cantidad de glicoproteínas ingeridas depende de los alimentos que integran la dieta y de los tratamientos culinarios a los que se someten. Tras el proceso digestivo algunos PRMs son absorbidos, otros transformados a nivel gastrointestinal y/o metabólico y, parte de ellos o sus derivados, eliminados por heces u orina. La fracción absorbida contribuye a incrementar el nivel de AGEs plasmáticos y puede depositarse en ciertos órganos diana. Desde esta premisa sería procedente plantear la siguiente hipótesis:

*¿Podrían los AGEs dietéticos, unidos a los endógenos, participar en los cambios metabólicos y alteraciones descritas en el hueso, contribuyendo así al desarrollo de enfermedades óseas?*

Si esta hipótesis se confirma, el binomio dieta-salud adquiriría una nueva dimensión, relacionada con el consumo de productos pardos. El estudio de algunos de estos aspectos aportaría conocimientos sobre la importancia de modular la dieta para la prevención de ciertas enfermedades como la osteoporosis que, por su prevalencia,



morbimortalidad, consumo de recursos sanitarios, etc., suponen un problema de salud pública.

Para abordar esta problemática de forma realista es necesario buscar una fuente alimentaria idónea de PRMs, que además esté muy presente en nuestra dieta. Los productos de panadería, por sus constituyentes y su proceso de horneado, deben su apariencia y características finales a la reacción de Maillard, principal responsable de la formación de la corteza. Además, se trata de alimentos ampliamente consumidos en diferentes regiones y, aunque en nuestro país la ingesta de cereales y derivados ha disminuido en las últimas décadas, el pan sigue siendo un alimento de amplio consumo, por lo que constituye uno de los contribuyentes fundamentales a la ingesta diaria de PRMs.

Dentro de este contexto, los objetivos de esta Tesis Doctoral son:

- Conocer y profundizar en la influencia del consumo de las glicoproteínas procedentes de la corteza del pan sobre la utilización nutritiva de calcio y fósforo, intentando investigar si modifican el destino de ambos minerales en el hueso, inciden en el metabolismo óseo o alteran su composición o funcionalidad, de forma que, a largo plazo, pudieran contribuir al desarrollo de trastornos óseos.
- Aproximarnos al tránsito metabólico del producto de glicación avanzada carboximetil-lisina, analizando su ingesta y excreción e identificando tejidos u órganos de acumulación.
- Paralelamente, se trata de deslindar si los efectos producidos se relacionan con los compuestos solubles de mayor o menor peso molecular, con los insolubles o si se deben a una acción conjunta de todos los PRMs presentes en la corteza de pan.

## **CAPÍTULO 2**

### ***Revisión bibliográfica***

---



## ***Aspectos generales de calcio, fósforo y hueso***

### **1. Calcio y fósforo**

El calcio y el fósforo son los nutrientes minerales más abundantes en el cuerpo humano y se encuentran fundamentalmente formando el esqueleto. El 99 % del calcio se localiza en el hueso y el 1 % restante se encuentra disuelto en sangre, en el líquido extracelular y en el intracelular; mientras que el 85 % del fósforo presente en el organismo se deposita en el hueso.

La función cuantitativamente más importante del calcio y el fósforo es constituir los cristales de hidroxapatita que proporcionan rigidez al esqueleto. Además, ambos elementos intervienen en importantes funciones biológicas. El calcio actúa como segundo y tercer mensajero celular (Hofer y Lefkimiatis, 2007) y participa en la contracción muscular, transmisión nerviosa, secreción hormonal, coagulación sanguínea y en diversas reacciones enzimáticas, entre otras funciones (L'Abbé, 2003). El fósforo interviene en el metabolismo energético constituyendo la molécula de trifosfato de adenosina (ATP), contribuye al mantenimiento del equilibrio ácido-base, forma parte de los ácidos nucleicos y de los fosfolípidos de la membrana celular e interviene en la actividad de enzimas (cofactor del NADP) y hormonas (Navarro, 2003a).

La absorción de calcio y fósforo ocurre principalmente en el intestino delgado, en el caso del calcio principalmente en duodeno y yeyuno (L'Abbé, 2003) y en cuanto al fósforo, fundamentalmente en yeyuno e íleon (Drezner, 2008). La absorción de

ambos minerales depende de las necesidades fisiológicas, de la cantidad ingerida con la dieta y de su disponibilidad, si bien, en sujetos sanos, la absorción neta de fósforo es una función lineal de la ingesta. La eficacia de la absorción se ve incrementada cuando disminuye la ingesta o aumentan las necesidades fisiológicas (Drezner, 2008; Peacock, 2010).

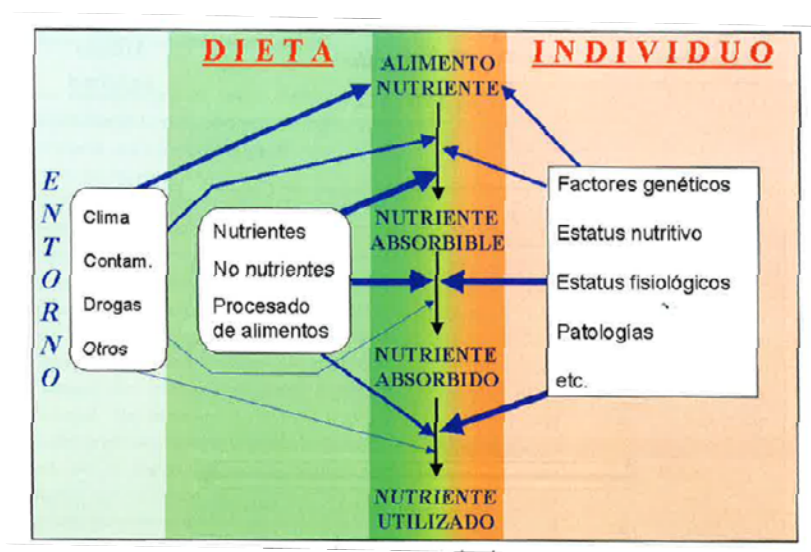
La absorción del calcio se realiza a través de dos mecanismos principalmente: un transporte activo, que se lleva a cabo mediante flujo transcelular cuando la concentración de calcio en el lumen es más baja y tiene lugar preferentemente en duodeno; y un transporte pasivo, que tiene lugar a concentraciones más elevadas de este mineral y se basa en una difusión simple y paracelular que ocurre a lo largo del intestino, pero fundamentalmente en íleon (Bronner, 2003). En condiciones normales de ingesta la mayor parte del calcio dietético se absorbe por esta vía. El transporte activo es dependiente del 1,25-dihidroxicolecalciferol, que regula los canales de calcio epiteliales (ECaCs), la proteína transportadora de calcio (calbindina, CaBP-9k) y la fosfatasa alcalina intestinal, que aumenta la absorción del mineral (Horst et al., 2005). La absorción de fósforo es similar a la del calcio, también se lleva a cabo por dos mecanismos: transporte activo, mediante flujo transcelular y pasivo, por difusión paracelular, que se emplee uno u otro depende de la concentración del elemento en el lumen intestinal. El transporte activo es dependiente de sodio y también se activa por la presencia del 1,25-dihidroxicolecalciferol (Navarro, 2003a). Recientemente, se ha descubierto que el análogo de la hormona D, el ED-71 (1 $\alpha$ ,25-dihidroxi-2 $\beta$ -(3-hidroxiopropiloxi)vitamina D<sub>3</sub>), es un inductor más potente de la absorción del fósforo intestinal y de la activación del transportador de fósforo tipo IIb (NaPi-IIb) que el propio 1,25-dihidroxicolecalciferol (Brown et al., 2012). La absorción de estos dos minerales no sólo depende de su concentración en el lumen intestinal procedente de la ingesta, sino también de la interacción con otros nutrientes en el tracto gastrointestinal, que facilitan o empeoran su disponibilidad. La eficacia con la que se utiliza un nutriente a nivel digestivo, también se conoce como digestibilidad.

Se entiende por biodisponibilidad la proporción de un nutriente, dentro del complejo sistema que constituye el alimento, que puede ser absorbida y utilizada convenientemente para las funciones vitales del organismo. La biodisponibilidad

depende de factores intrínsecos, propios del individuo, y de factores extrínsecos relacionados con el ambiente, de los cuales el más importante es la dieta.

La eliminación del fósforo ocurre principalmente por orina mientras que el calcio se excreta por heces, orina y sudor, aunque la vía mayoritaria es la fecal.

**Figura 1.** Principales condicionantes de la biodisponibilidad mineral (Navarro, 2003a).



## 2. Hueso

### 2.1. Estructura y composición del hueso

El hueso integra el esqueleto y cumple diversas funciones importantes en el organismo: estructural o mecánica, proporcionando soporte a los tejidos blandos y permitiendo el movimiento; de protección de órganos vitales, y de tampón, manteniendo la homeostasis de iones como calcio y fósforo.

El hueso es un material compuesto por minerales, colágeno, agua, proteínas óseas (osteocalcina, osteonectina y osteopontina), lípidos y células. A nivel celular, el hueso está formado por tres tipos de células: osteoblastos y osteoclastos, cuya función es la de participar en los procesos de remodelado óseo (formación y resorción de

hueso) y osteocitos, que cumplen una función regulatoria dentro de la naturaleza dinámica del hueso (Schaffler y Kennedy, 2012). Dos tercios del peso del hueso corresponden a la fase mineral, que está constituida principalmente por calcio y fósforo bajo la forma de cristales de hidroxiapatita. Además, estos iones se encuentran también formando otras sales, como carbonatos o fosfatos de calcio y como iones libres, aunque en baja proporción, de forma que puedan ser liberados cuando sus niveles plasmáticos disminuyen. En el hueso existen también pequeñas cantidades de magnesio, sodio, potasio, fluoruro y manganeso. El agua supone entre un 5 y un 10 % del peso del hueso y la fase orgánica un 30 % aproximadamente, de este porcentaje entre un 2 y un 8 % corresponde al componente graso (Boskey, 1999). La fase orgánica está formada en un 90 % por fibras de colágeno tipo I, aunque existen otros tipos de colágeno en el hueso, pero en menor proporción, como el colágeno tipo V y el tipo XI (von Der Marck, 1999). Durante la formación del hueso, los osteoblastos secretan monómeros de colágeno y la sustancia fundamental, que está formada por proteínas no colagenosas. Los monómeros se polimerizan y forman fibras de colágeno que se disponen constituyendo el tejido osteoide, el cual posteriormente se mineraliza. Los cristales de hidroxiapatita se disponen paralelamente a las fibras de colágeno, construyendo una matriz mineralizada (Garner et al., 1996). La mineralización de la matriz orgánica ocurre en dos fases: la primera consiste en la deposición de los compuestos inorgánicos sobre la matriz y la segunda se basa en el incremento del número de cristales de hidroxiapatita y de su grado de maduración (Busa et al., 2005). Durante el desarrollo del hueso, la matriz orgánica incrementa rápidamente, mientras que el aumento del componente mineral es más lento. En ratas en crecimiento este proceso ocurre entre las 4 y las 22 semanas de edad; hasta la semana 8 los cristales de hidroxiapatita sufren un rápido incremento pero a partir de esta semana el crecimiento mineral sucede más lentamente (Burnell et al., 1977).

Desde un punto de vista estructural, se pueden diferenciar principalmente dos tipos de tejido óseo: el cortical y el trabecular. El cortical o compacto está formado por láminas de colágeno mineralizado densamente agrupadas en disposición concéntrica alrededor de un canal o conducto de Havers, formando las denominadas osteonas. Proporciona rigidez y se localiza en la diáfisis de los huesos largos, en la superficie de

los planos y en la periferia de los cortos. El hueso trabecular, conocido también como esponjoso, formado por una malla rígida y mineralizada, otorga fuerza y elasticidad y se localiza principalmente en los huesos cortos como las vértebras, los huesos planos y en la epífisis de los huesos largos. El esqueleto se compone de 80 % de hueso cortical y 20 % de trabecular, aproximadamente (L'Abbé, 2003; Pérez-LLamas et al., 2005).

Para poder ejercer su función de sostén y de movimiento, las propiedades mecánicas fundamentales del hueso son la resistencia, la rigidez y la elasticidad, que pueden verse afectadas por diversos factores como el tamaño, la forma del hueso y su composición. La resistencia del hueso, tanto a la compresión como a la tracción, está influenciada por su tamaño. Cuanto mayor es el hueso, mayor es su resistencia. La resistencia del hueso a la flexión depende también de su forma y longitud. En cuanto a la composición, la fase mineral le confiere al hueso rigidez, dureza y resistencia a la compresión, mientras que la matriz orgánica es la principal responsable de las propiedades de flexibilidad, elasticidad y resistencia a la rotura. La disposición y orientación de las fibras de colágeno, así como su calidad y madurez, también están implicadas en el comportamiento mecánico del hueso (Wang et al., 2001). La estructura y la composición del hueso se modifican con la edad, afectando a la funcionalidad y a sus propiedades mecánicas. Con los años se incrementa el número de entrecruzamientos entre las fibras de colágeno, se producen modificaciones en la orientación de estas fibras que afectan al comportamiento biomecánico del hueso, y se reduce el contenido y densidad mineral, lo que conlleva huesos más frágiles y con mayor riesgo de fracturas en el envejecimiento. Dado que este proceso es normal a partir de la tercera o cuarta década de la vida, parece que la consecución del pico óptimo de masa ósea durante la adolescencia, y época inmediata posterior, se considere generalmente como la mejor forma de prevenir la osteoporosis (Weaver, 2000).

Por lo tanto, la dieta debe aportar los nutrientes adecuados para el crecimiento óseo, entre ellos la proteína y los minerales que constituyen mayoritariamente el hueso: calcio, fósforo y magnesio. Deficiencias de proteína, fósforo o magnesio no suelen producirse en nuestro entorno, ya que estos nutrientes están ampliamente distribuidos en los alimentos que forman parte de la dieta occidental. Sin embargo, los



nuevos patrones dietéticos de la población adolescente pueden conducir a una ingesta deficiente en calcio, comparada con que la idónea para esta etapa (Nicklas, 2003; Seiquer et al., 2008a). La deficiencia no sólo se debe a las altas necesidades durante este periodo de crecimiento, sino también al tipo de dietas que consumen. Los cambios en los hábitos alimentarios de los adolescentes y la tendencia a consumir más refrescos, comida preparada, snacks y productos de bollería está provocando un descenso en el consumo de leche y derivados lácteos (Guthrie et al., 2002; Libuda et al., 2008), que aportan aproximadamente el 60 % del calcio ingerido por la población española (Serra-Majem y Aranceta Bartrina, 2004). De hecho, aunque la ingesta de calcio se ha incrementado en la población infantil española en los últimos años, aún hay un alto porcentaje de niños que no alcanzan las necesidades recomendadas (13-14 % en el caso de los chicos y 29-40 % en el de las chicas) (Serra-Majem et al., 2006). El inadecuado aporte de este mineral durante el crecimiento compromete la formación de hueso y, por tanto, impide alcanzar durante la adolescencia el pico máximo de masa ósea adecuado.

El hueso actúa como reservorio de este mineral y cuando existe una carencia, se produce la cesión de calcio desde el hueso al plasma para restablecer los niveles normales (9,0-10,2 mg/dl). Si la deficiencia es continuada en el tiempo, puede dar lugar a un desequilibrio entre el calcio del medio extracelular y el del hueso, provocando una mineralización insuficiente de la matriz ósea que conlleva mayor riesgo de fracturas.

## **2.2. Metabolismo óseo**

El hueso es un tejido metabólicamente activo, sometido a un proceso de remodelado continuo gracias a su permanente formación y resorción. Las células encargadas de la formación del hueso son los osteoblastos, responsables de sintetizar la matriz proteica, en concreto el colágeno tipo I, y de su mineralización. La resorción ósea corre a cargo de los osteoclastos, que contienen componentes enzimáticos que, al secretarlos al medio, solubilizan la matriz y destruyen el tejido óseo. Los iones de calcio, magnesio, fosfato y los productos del colágeno se liberan al líquido extracelular

mediante hidrólisis proteica, provocando la desmineralización del tejido óseo. Estos dos procesos están acoplados de forma que la cantidad de hueso reabsorbida es igual a la cantidad formada en adultos. El equilibrio está regulado por la acción de varias hormonas como la PTH, la hormona D y la calcitonina. Cuando se produce un desequilibrio entre los dos procesos, y la resorción es mayor que la formación, se afecta la estructura, la masa ósea y la fuerza, pudiendo incluso dar lugar a desórdenes metabólicos en el hueso, como la osteoporosis (Seibel, 2005).

La pérdida de masa ósea se utiliza como un indicador para determinar el riesgo de fracturas y diagnosticar la osteoporosis. La masa ósea se mide por absorciometría de rayos X de energía dual (DEXA) o densitometría ósea, esta técnica permite cuantificar la densidad mineral ósea (BMD) y el contenido mineral del hueso (BMC).

Otro método utilizado para conocer la salud ósea, evaluar el riesgo de fracturas y la eficacia de los tratamientos utilizados en la osteoporosis son los marcadores bioquímicos de remodelado óseo (Civitelli et al., 2009).

### **2.2.1. Marcadores bioquímicos del remodelado óseo**

El metabolismo óseo puede estudiarse usando diversos marcadores del recambio o turnover del hueso. Estos marcadores bioquímicos son:

- enzimas o proteínas secretadas por las células involucradas en el remodelado óseo.
- productos de degradación generados en el proceso de resorción.
- subproductos formados durante la síntesis de nuevo hueso.

Se pueden determinar en orina y/o suero. Los que provienen de la actividad de los osteoblastos se denominan *marcadores de formación* y se miden en suero, proceden de enzimas propias de osteoblastos, de proteínas derivadas del colágeno tipo I y de otras proteínas no-colágenas. Los que derivan de la actividad de los osteoclastos se denominan *marcadores de resorción* y la mayoría son productos de degradación del colágeno óseo tipo I y pueden determinarse en suero u orina. Estos

marcadores son comúnmente determinados mediante ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

#### **a) Marcadores de formación**

##### *Osteocalcina*

La osteocalcina es una proteína sintetizada esencialmente por osteoblastos maduros durante la formación ósea, que en su mayor parte se incorpora a la matriz proteica y sólo el 20 % pasa a la circulación sanguínea. Entre sus funciones destaca la de participar en el proceso de mineralización ósea. Los niveles de esta proteína en suero se correlacionan con la tasa de formación de hueso: cuando la concentración de osteocalcina en suero es superior a los niveles establecidos indica un aumento en la actividad osteoblástica. A pesar de que la osteocalcina se relaciona estrechamente con la formación ósea, recientemente, Clarke (2008) publicó que este marcador deriva tanto de la destrucción de la matriz por actividad osteoclástica como de la síntesis osteoblástica, por lo que podría considerarse un marcador de turnover óseo más que exclusivamente de formación.

##### *Péptido del procolágeno tipo I*

El propéptido amino terminal del colágeno tipo I (PINP), principal proteína extracelular de la matriz ósea, se obtiene por división endoproteolítica de la molécula de colágeno. Se libera a la circulación sanguínea y se puede determinar en suero. La concentración de PINP circulante es directamente proporcional a la cantidad recién formada de colágeno tipo I. El PINP es considerado uno de los marcadores de formación ósea más fiables (Civitelli et al., 2009).

##### *Fosfatasa alcalina*

La fosfatasa alcalina (ALP) es una enzima presente en hígado, intestino y placenta, además de en la membrana de las células osteoblásticas. Su función exacta en el hueso no es bien conocida, aunque se sabe que juega un papel importante en la mineralización ósea (Seibel, 2005). La concentración sérica de ALP fue el primer

marcador bioquímico usado para la determinación de la formación ósea. Los niveles altos de ALP en suero pueden estar relacionados con la enfermedad ósea de Piaget y con la osteomalacia.

## **b) Marcadores de resorción**

### *Deoxipiridinolina*

Las moléculas piridinolina (PYD) y la deoxipiridinolina (DPD) son productos de las modificaciones post-traduccionales de la lisina y la hidroxilisina, su principal función es estabilizar las cadenas de colágeno maduras de la matriz extracelular. La primera de ellas se encuentra principalmente en el cartílago, hueso, ligamentos y vasos, mientras que la DPD es más específica de hueso y dentina (Seibel, 2005). Durante el proceso de resorción ósea, los enlaces cruzados del colágeno se rompen proteolíticamente y estas moléculas son liberadas a la circulación. La DPD se excreta en orina sin metabolizar y no se ve afectada por la dieta, lo que le hace ser un marcador específico de la resorción ósea (Colwell et al., 1993). En situaciones en las que los procesos de formación y degradación del hueso se desacoplan, la determinación de productos de degradación específicos de la matriz ósea como la DPD, proporcionan también información sobre el remodelado óseo o turnover.

### *Telopéptido carboxiloterminale de colágeno tipo I*

El isómero  $\beta$  del telopéptido carboxi-terminal ( $\beta$ -CTX) es otro producto de degradación del colágeno tipo I del hueso. Durante el remodelado óseo se destruye la matriz proteica para dar paso a la formación del nuevo colágeno. Cuando se produce la rotura del colágeno, el  $\beta$ -CTX se libera a la circulación. Niveles altos de  $\beta$ -CTX apuntan a una situación de resorción ósea elevada. Este péptido se puede medir tanto en suero como en orina. Los inmunoensayos desarrollados en los últimos años utilizando la técnica ELISA permiten la determinación de estos fragmentos en suero, evitando así la recolección de orina durante 24 horas (Seibel, 2005).



## Impacto de los tratamientos térmicos en la dieta occidental

Tradicionalmente, los tratamientos térmicos en los alimentos se han empleado para permitir su conservación y para conseguir características organolépticas adecuadas. El procesado de los alimentos se considera beneficioso debido a que, al inactivar o retrasar el crecimiento de microorganismos patógenos, destruir toxinas e inhibir enzimas, prolonga la vida útil del producto. Además, en ocasiones, puede mejorar la digestibilidad y biodisponibilidad de nutrientes y normalmente, incrementa la palatabilidad y textura (van Boekel et al., 2010).

Los tratamientos térmicos como fritura, asado, horneado, esterilización o pasteurización son frecuentemente empleados por la industria y el cocinado casero durante la elaboración de los alimentos. En dichos tratamientos térmicos tienen lugar diversas reacciones entre las que pueden destacarse las de pardeamiento no enzimático, que conducen a la formación de productos pardos, los cuales incluso se originan durante el almacenamiento. Estos compuestos suelen contribuir al aroma, sabor y color de los alimentos. En algunas ocasiones, la industria alimentaria persigue su desarrollo con objeto de dotar a ciertos productos alimentarios de las características organolépticas de un alimento acabado, como ocurre durante el horneado del pan, el tostado de granos de café o la elaboración de patatas fritas. Sin embargo, en otras ocasiones, el pardeamiento no enzimático afecta negativamente a los atributos sensoriales, como en ciertos casos en la leche o en zumos de fruta (Ames, 2003; Morr y Ha, 1991).

Dentro del pardeamiento no enzimático se pueden distinguir tres reacciones diferentes:

- *Degradación de ácido ascórbico*

El ácido ascórbico es una vitamina hidrosoluble que actúa como agente reductor y que se destruye con gran facilidad durante el procesado de los alimentos. La degradación del ácido ascórbico puede ocurrir en presencia o en ausencia de oxígeno, y conduce a la formación de intermediarios  $\alpha$ -dicarbonílicos que dan lugar a la aparición de compuestos pardos. Este tipo de pardeamiento tiene lugar frecuentemente en zumos de frutas y produce una pérdida de vitaminas esenciales y de sus características organolépticas (Smuda y Glomb, 2013).

- *Caramelización de azúcares*

La caramelización es una reacción de pardeamiento de los azúcares que ocurre cuando éstos son calentados por encima de su punto de fusión, dando lugar a la aparición de reacciones de enolización, deshidratación y fragmentación, las cuales provocan la formación de derivados furánicos y de pigmentos pardos. En este proceso no intervienen proteínas, aminoácidos ni otros compuestos con grupo amino. La caramelización puede ser conveniente o perjudicial para la calidad de un producto alimentario, y se previene evitando el procesado a alta temperatura y almacenando los alimentos a bajas temperatura (Fadel y Farouk, 2002).

- *Reacción de Maillard*

La reacción de Maillard sucede principalmente en los alimentos que contienen azúcares o lípidos oxidados y grupos amino de un aminoácido o de una proteína. Se ve favorecida en sistemas de contenido intermedio de humedad, temperaturas a partir de 50°C y pH entre 5-7; a diferencia de la caramelización, que depende directamente de la degradación de azúcares y requiere condiciones mucho más drásticas, tales como temperaturas superiores a 120°C, actividad de agua baja (próxima a 2) y pH entre 3-9 (Rufián-Henares et al., 2006a). Dada su importancia en esta memoria de tesis, la reacción de Maillard se desarrollará en el siguiente epígrafe.

Los hábitos alimentarios de nuestra población se están modificando en los últimos años, alejándose de la recomendada dieta mediterránea y optando por un mayor consumo de comida rápida y snacks, alimentos muy procesados (Bach Faig et al., 2006). La dieta occidental actual se caracteriza por un alto consumo de carnes rojas, carbohidratos con alto índice glucémico, alimentos con gran contenido en colesterol y ácidos grasos saturados y una mayor presencia de sal en la dieta (Ballabriga y Carrascosa, 2006). Como consecuencia del consumo de comida rápida, snacks y alimentos precocinados se deteriora la ingesta de frutas, hortalizas y legumbres. Los nuevos hábitos alimentarios, junto a un estilo de vida sedentario, están originando una mayor prevalencia de sobrepeso y obesidad (Aranceta Bartrina, 2006) y elevando el riesgo de padecer enfermedades crónicas como patologías cardiovasculares (Bel-Serrat et al., 2012) y diabetes (Malik et al., 2012).

Son diversos los factores socioeconómicos que están condicionando la modificación del patrón alimentario. Entre ellos se encuentran la menor disponibilidad de tiempo para comprar y cocinar, la rapidez en el servicio y consumo en los restaurantes de comida rápida, la comodidad y menor precio de los productos precocinados, su buena presentación y atractivas características, como el color, la textura o el sabor (Moliní Cabrera, 2007). En definitiva, el nuevo patrón alimentario conduce a un incremento del consumo de alimentos muy procesados, que son ricos en productos de la reacción de Maillard, por lo que el estudio de la ingesta de estos compuestos y sus implicaciones sobre la salud son cada vez de mayor interés para la comunidad científica.



## **1. Reacción de Maillard**

Esta reacción tiene lugar entre el grupo amino de un aminoácido o de una proteína y el grupo carbonilo de un azúcar reductor o de un lípido oxidado, originando los denominados productos de la reacción de Maillard (PRMs). Como se ha mencionado, la reacción de Maillard es frecuentemente buscada por la industria alimentaria debido a las propiedades organolépticas que sus productos confieren al alimento, ya que generalmente mejoran su aroma, color y sabor, haciéndolos apetecibles para el consumidor (Ames, 1998). Además de contribuir a la mejora de las propiedades organolépticas y, en definitiva, a la buena palatabilidad de los alimentos cocinados, la aparición de los PRMs se asocia a otra serie de efectos biológicos positivos como, por ejemplo, su capacidad antioxidante (Somoza, 2005). Sin embargo, esta reacción posee también algunas connotaciones negativas, entre las que cabe citar su capacidad para deteriorar el valor nutritivo de los alimentos e incidir en la biodisponibilidad y metabolismo de algunos nutrientes (Navarro, 2003b; O'Brien y Morrissey, 1989), como ampliaremos más adelante.

El desarrollo de la reacción de Maillard está condicionado por la temperatura, el tiempo de procesado, el pH, la actividad de agua y los reactantes (Rufián-Henares et al., 2009). Las altas temperaturas y el elevado pH la aceleran, así como la presencia de grupos aminos terminales en las proteínas. Así, por ejemplo, la lisina, con dos grupos aminos, es el más reactivo de los aminoácidos y, por tanto, el más sensible a los tratamientos térmicos (Delgado-Andrade et al., 2004b). A pesar de que la temperatura

favorece la reacción, también puede tener lugar a temperatura ambiente en productos almacenados e incluso ha sido observada aunque de forma minoritaria, en alimentos conservados a bajas temperaturas y en congelación.

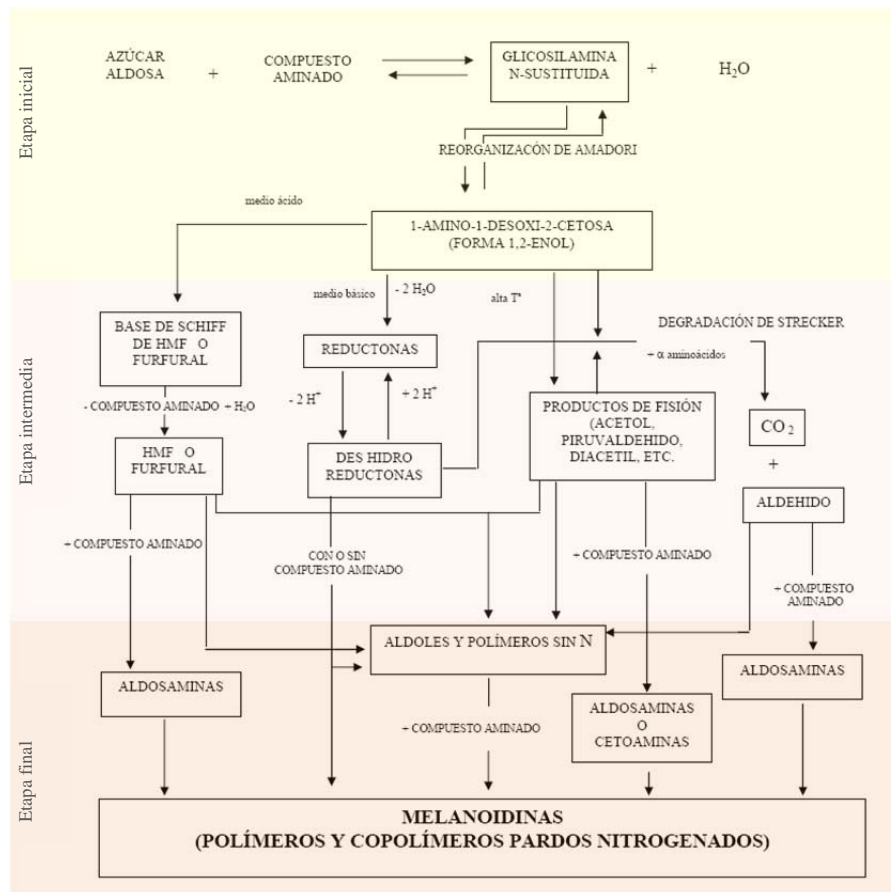
Este proceso comprende una serie de reacciones químicas muy complejas que se dividen en tres etapas. En la fase inicial, la condensación del grupo carbonilo con el grupo amino origina la base de Schiff que, tras una reorganización molecular, forma los denominados compuestos de Amadori.

En la segunda etapa o fase avanzada, tras reacciones de deshidratación, escisión, oxidación y la denominada degradación de Strecker, se originan nuevas moléculas, muchas de ellas responsables de los aromas característicos de los alimentos cocinados. Algunas de esas moléculas formadas son altamente reactivas, como los compuestos  $\alpha$ -dicarbonílicos, reductonas y aldehídos, que a su vez reaccionan con aminoácidos y otros compuestos que contienen nitrógeno originando moléculas más complejas (Finot, 1993). Los productos formados en esta etapa pueden ya ser coloreados y algunos de ellos fluorescentes.

Por último, en la etapa final, una serie de reacciones de ciclación, deshidratación, isomerización y condensación de los PRMs de bajo peso molecular dan lugar a la formación de polímeros más complejos, de alto peso molecular y de color pardo que reciben el nombre de melanoidinas (Wang et al., 2011). Estos polímeros son frecuentemente insolubles, aunque pueden existir algunas melanoidinas solubles como las formadas en el café (Fogliano y Morales, 2011).

Una característica particular de esta reacción es que es concomitante, es decir, se diversifica por múltiples vías y los productos que se van originando en sus distintas etapas pueden volver a reaccionar con los reactantes, por lo que se va retroalimentando (Lertittikul et al., 2007).

**Figura 2.** Esquema general de la Reacción de Maillard (Hodge, 1953)



El desarrollo de la reacción de Maillard en los alimentos depende de su composición, de las condiciones y métodos de preparación y del recalentamiento previo antes de su consumo (Li et al., 1994). Cualquier dieta, aunque sea variada y equilibrada, contiene una cierta porción de PRMs, sobre todo productos tempranos como los de Amadori, a pesar de que no se utilicen tratamientos culinarios severos (Koschinsky et al., 1997; Vlassara, 1996).

La formación de PRMs se ha observado en numerosos alimentos, tanto de productos iniciales de la reacción, como el compuesto de Amadori, como de los compuestos avanzados, hidroximetilfurfural (HMF) o carboximetilisina (CML), y finales como las melanoïdinas. En la Tabla 1 se recogen ejemplos de alimentos en los que se ha cuantificado PRMs tempranos, avanzados o finales. Habitualmente, la bibliografía no suele contemplar el contenido en compuestos de Amadori, sino el de furosina, que es la forma indirecta de determinar este compuesto en los alimentos. Se trata de un aminoácido de síntesis que se genera por hidrólisis ácida del compuesto de Amadori y que supone un 36 % del mismo (Erbersdobler, 1986).

**Tabla 1.** Alimentos o preparados alimenticios en los que se han cuantificado diferentes PRMs.

Alimento	PRMs
Pan y productos de panadería	HMF y furosina (RAMIREZ-JIMENEZ ET AL., 2000) CML (Henle, 2003) Melanoidinas (Fogliano y Morales, 2011)
Cereales de desayuno	Furosina (García-Baños et al., 2004) HMF (Delgado-Andrade et al., 2008c)
Galletas	HMF (Delgado-Andrade et al., 2009) Glucosilisomaltol (Rufián-Henares et al., 2008) Galactosilisomaltol (Rufián-Henares et al., 2008) Melanoidinas (Fogliano y Morales, 2011)
Leche	HMF (Ferrer et al., 2000; Morales et al., 1996) Furosina y CML (Erbersdobler y Somoza, 2007)
Café	Pirralina y pentosidina (Förster et al., 2005) Melanoidinas (Fogliano y Morales, 2011)
Cacao	Melanoidinas (Hofmann et al., 1999)
Batidos de chocolate	CML (Tessier et al., 2010)
Natillas	Pirralina y pentosidina (Förster et al., 2005)
Patatas fritas	Furosina y HMF (Delgado-Andrade et al., 2010c)
Zumos de frutas	HMF (Gökmen y Acar, 1999)
Cerveza	Melanoidinas (Morales y Jiménez-Pérez, 2004)
Queso	Furosina y CML (Spanneberg et al., 2011)
Miel	HMF (Rizelio et al., 2012) Melanoidinas (Brudzynski y Miotto, 2011)
Fórmulas enterales	Furosina (Rufian-Henares et al., 2004)
Fórmulas infantiles	Furosina (Sarriá et al., 2000) CML (Šebeková et al., 2008)
Potitos infantiles	Furano (Mesías et al., 2013)

Los diferentes tipos de cocinado influyen en la formación de PRMs, por ejemplo, un tratamiento culinario más intenso, como la fritura, origina mayor formación de PRMs que cuando los alimentos se cocinan hervidos. El uso de las mismas materias primas pero sometidas a tratamientos culinarios diferentes origina concentraciones distintas de PRMs. Delgado-Andrade y colaboradores determinaron HMF, furfural y furosina en platos típicos de la dieta mediterránea sometidos a diferentes tratamientos térmicos, concluyendo que el aporte de PRMs que podría tener una comida depende, en gran medida, de la composición de los platos y el tipo de cocinado empleado. Además, mediante el cocinado repetido del mismo plato, evidenciaron la imposibilidad de repetir exactamente una receta, llegando así a contenidos variables de PRMs para una misma preparación culinaria (Delgado-Andrade et al., 2010b; Delgado-Andrade et al., 2010c).

El impacto del tipo de procesado sobre algunas materias primas se muestra en la siguiente tabla.

**Tabla 2.** Ingesta de compuestos de Amadori, HMF y furfural por ración de los platos compuestos por los mismos ingredientes cocinados con diferente tratamiento culinario (Delgado-Andrade et al., 2010c).

Platos	Ración (g)	Porción comestible (g)	Ingesta compuestos Amadori/ración (mg)	Ingesta HMF/ración (µg)	Ingesta furfural/ración (µg)
Lomo de cerdo a la sal	160	160	(0,00-0,12)0,10	(0,0-28,4)0,0	-
Lomo de cerdo a la plancha	160	160	(0,00-0,29)0,04	(0,071,9)45,1	-
Pollo guisado	300	197	(0,00-0,35)0,00	-	-
Pollo asado	300	192	(0,00-0,05)0,00	-	-
Arroz caldoso	400	360	(0,93-6,10)2,85	(288,8-486,1)380,0	(0,0-5,6)2,4
Paella	360	300	(8,60-12,02)9,92	(2054,7-2277,9)2193,1	(27,4-57,8)42,8
Patatas hervidas	200	200	(7,58-9,93)8,70	(0,0-25,1)1,7	-
Patatas fritas	120	120	(22,71-26,84)24,84	(51,1-71,4)59,2	-
Boquerones en vinagre	65	65	(0,00-0,13)0,00	-	-
Boquerones fritos	85	79	(0,42-0,85)0,81	(16,0-38,4)32,7	(0,0-12,2)0,0

Los datos entre paréntesis corresponden a los valores mínimos y máximos obtenidos en las preparaciones diferentes del mismo plato. Después del paréntesis se indica el valor de la mediana. El guion indica ingesta despreciable del compuesto.

Existen algunos trabajos en los que se ha determinado la ingesta total de PRMs a partir de un menú diario (Birlouez-Aragon et al., 2010; Delgado-Andrade et al., 2007b). Así, se estudió comparativamente el aporte dietético de CML, un producto avanzado de la reacción de Maillard, procedente de dos tipos de menús, uno con alto contenido en alimentos más procesados y otro en el que se trató de evitar, en la medida de lo posible, los alimentos ricos en PRMs y las técnicas culinarias que favorecieran su desarrollo (Delgado-Andrade et al., 2012), viéndose que la cantidad de CML que aportaba este último era menor que la que originaba el menú que incluía los alimentos más procesados (6,62 y 15,72 mg/100g de proteína, respectivamente) (Tessier et al., 2010).

De estos estudios puede concluirse que, incluso los menús menos procesados contienen una cantidad importante de PRMs tempranos, lo que está en línea con las premisas de Vlassara (1996) acerca de que cualquier dieta, aunque sea variada y equilibrada, contiene una porción variable de PRMs, sobre todo productos tempranos, a pesar de que no se utilicen tratamientos culinarios severos. Indudablemente, el contenido total de PRMs de la dieta va a depender del contenido que exista en el alimento y del consumo del mismo dentro de la dieta. Por tanto, no todos los alimentos contribuyen de igual forma a la ingesta de PRMs. Uno de los alimentos de mayor contribución por su alto contenido y frecuente consumo es el pan y derivados, a los que Henle (2003) considera como la mayor fuente dietética de compuestos pardos.

## **2. Desarrollo de la reacción de Maillard en el pan**

El pan representa una buena matriz para el estudio de diversos aspectos de la reacción de Maillard. El contenido de proteínas y carbohidratos de la harina, la humedad de la masa y el horneado al que se ve sometida, propician el desarrollo de la reacción y la aparición de compuestos tempranos, avanzados y finales en distintas proporciones, especialmente en la corteza. La reacción es responsable de la palatabilidad y las características organolépticas del pan.

En los productos de panadería, el color y apariencia de la superficie es el atributo de calidad más apreciado por el consumidor, seguido del aroma que desprenden tras ser horneados (Abdullah, 2008). La formación de color en la corteza del pan o pardeamiento se produce durante el horneado debido a dos reacciones no enzimáticas: la caramelización y la reacción de Maillard, que tienen lugar simultáneamente (Purlis, 2010). En el horneado de la masa panaria, el contenido de agua de la corteza disminuye rápidamente entre un 5-10 % y la temperatura incrementa por encima de los 100°C, originando condiciones óptimas para la formación de PRMs y, por tanto, favoreciendo la aparición del color marrón intenso en la corteza. La temperatura del horneado dependerá del horno utilizado y del tipo, forma y tamaño del pan; los que sean más pequeños necesitan más temperatura y menor tiempo, mientras que cuanto mayor sea el tamaño del pan, la temperatura debe ser menor, pero se hornea durante más tiempo. En el interior de la masa panaria, la temperatura es más baja y la actividad de agua permanece relativamente alta, por lo

que la miga del pan muestra un contenido más bajo de PRMs (Thorvaldsson y Skjöldebrand, 1998). La caramelización ocurre en condiciones más drásticas, cuando la temperatura es muy alta y el contenido en agua es casi inexistente. A partir de esta reacción se forman aldehídos muy reactivos y otros compuestos pardos, los cuales pueden formar polímeros o reaccionar con aminoácidos, derivados furánicos e isomaltol. El aroma del pan viene determinado por los compuestos aromáticos que se producen durante la fermentación, aunque los productos formados durante las reacciones de pardeamiento no enzimático, como las melanoidinas, contribuyen también al aroma característico del pan recién horneado (Collado-Fernández, 2003).

La corteza de pan se ha utilizado en numerosos estudios como fuente de PRMs (Borrelli y Fogliano, 2005; Somoza et al., 2005a), especialmente de HMF, pronil-lisina y melanoidinas. En el pan, el HMF ha sido detectado fundamentalmente en la corteza (Capuano et al., 2008). Este compuesto es el PRM más abundante en los productos de panadería y su formación depende sobre todo de la temperatura del horneado y de la cantidad y tipo de azúcar, así como del contenido en almidón de la masa panaria, que incrementa su formación. El compuesto es responsable mayoritario del color del pan tras el horneado. Por supuesto, puede también formarse en otros derivados de cereales como por ejemplo, los cereales de desayuno (Delgado-Andrade et al., 2008c), los cereales infantiles (Guerra-Hernandez et al., 1999) y las galletas (Ramírez-Jiménez et al., 2000). Por otra parte, el pan contiene además una cantidad importante de melanoidinas, las cuales están principalmente unidas a proteínas y sólo pueden ser extraídas eficientemente después de una digestión enzimática (Borrelli y Fogliano, 2005).

El contenido de PRMs tempranos, avanzados y finales en la corteza se ha determinado en diferentes tipos de pan. En la siguiente tabla se exponen los resultados más relevantes encontrados en la bibliografía.



**Tabla 3.** Contenido de PRMs en la corteza de diferentes tipos de pan

Tipos de pan	PRMs	Contenido	Referencias
Corteza de pan blanco	HMF	21-176 mg/kg de materia seca	(Ramirez-Jimenez et al., 2000)
	Furosina	75-125 mg/100g de proteína	
	CML	15,2 mmol/mol de lisina	(Assar et al., 2009)
Corteza de pan integral (Harina integral-harina candeal 1:2)	HMF	18-73 mg/kg de materia seca	(Ramirez-Jimenez et al., 2000)
	Furosina	170-220 mg/100g de proteína	
Corteza de pan de molde	Melanoidinas	18 g/100 g de corteza de pan	(Fogliano y Morales, 2011)
Corteza de pan de baguette	Melanoidinas	14 g/100 g de corteza de pan	(Fogliano y Morales, 2011)

Lógicamente, las condiciones del horneado del pan influyen en su contenido en PRMs, como ejemplo, en la Tabla 4 se observa que la cantidad de HMF varía cuando se modifican el tiempo y la temperatura del proceso.

**Tabla 4.** Contenido de HMF en pan blanco tras diferentes tratamientos térmicos (Ramirez-Jimenez et al., 2000)

Condiciones del horneado	HMF (mg/kg materia seca)
50 min, 200°C	11,8
60 min, 200°C	40,1
30 min, 210°C	15,7
16 min, 235°C	21,8

A pesar de que el pan es uno de los alimentos más consumidos a nivel mundial y uno de los más abundantes en la dieta occidental, su ingesta ha disminuido durante

los últimos años. En la siguiente tabla puede verse la evolución del consumo de pan en la pasada década: entre los años 2000 y 2006 se produce un descenso que llega a ser hasta de un 6,3 %; sin embargo, en el año 2008 aumenta la ingesta (139 g/persona y día) respecto al 2006, aunque sigue siendo menor comparado con los datos obtenidos en el año 2000 (148 g/ persona y día). El menor consumo puede estar ligado a cambios en los patrones alimentarios y al incremento de sustitutos como cereales de desayuno (Prättälä et al., 2001; Siega-Riz et al., 2000), en los cuales el contenido de PRMs puede ser incluso mayor debido a su composición y a las altas temperaturas a las que se someten durante su elaboración (Rufián-Henares y Delgado-Andrade, 2009).

**Tabla 5.** Evolución del consumo de pan en la población española (g/persona y día) (Del Pozo et al., 2012)

	2000	2003	2006	2008
<b>Pan</b>	148	143	134	139
<b>Evolución (%)</b>		-3,4	-6,3	+3,7

### **3. Productos de la reacción de Maillard**

#### **3.1. Absorción y metabolismo de los PRMs**

Ha quedado patente que con nuestra dieta habitual consumimos cantidades variables de PRMs, estimándose que la ingesta diaria de compuestos de Amadori es de aproximadamente 1 g (Henle, 2003), mientras que la de melanoidinas puede ser de hasta 10 g diarios (Morales et al., 2012). Sin embargo, se conoce muy poco sobre su absorción y tránsito metabólico en nuestro organismo (Somoza, 2005).

Puesto que la primera etapa de la reacción de Maillard es reversible, los aminoácidos que integran las bases de Schiff's resultan disponibles prácticamente en su totalidad, al menos en los que participa la lisina, utilizándose de igual forma que cualquier otro aminoácido no modificado (Finot y Magnenat, 1981). Erbersdobler et al. (1981) demostraron que los compuestos de Amadori se absorben parcialmente en el intestino por difusión pasiva, siendo excretados en distinta proporción en orina y algunos se quedan retenidos. Así, en opinión de ciertos autores, los compuestos de Amadori como fructosil-lisina, fructosil-triptófano, fructosil-fenilalanina y fructosil-metionina son bien absorbidos por la rata (20-70 %) y excretados en orina casi sin modificación (Perkins et al., 1981). Otros apuntan que sólo entre un 5-10 % de los compuestos de Amadori consumidos se excretan sin metabolizar en orina y heces, mientras que la fracción no absorbida se metabolizaba casi completamente por microorganismos intestinales (Erbersdobler et al., 1970). Mediante el uso en ratas de

fructosil-lisina marcada radiactivamente, se observó que un 6 % se eliminaba en orina sin modificación alguna (Hultsch et al., 2005). La variabilidad de cifras se explica porque la tasa de absorción parece depender del aminoácido que participa en el compuesto, de que se trate de un compuesto de Amadori libre o unido a un péptido o a una proteína, de la especie animal en la que se realice el estudio, etc. (Finot, 2005). Mientras que para compuestos de Amadori formados con aminoácidos libres la eliminación urinaria figura entre el 20-70 %, en el caso de la fructosil-lisina unida a proteínas la cifra está entre 4,6-11,7 % de la ingerida bajo la forma de derivados de glucosa-caseína en las ratas, alrededor del 16 % en niños (incluso valores inferiores si el compuesto procede de fórmulas infantiles) y del 3 % en adultos (Finot, 2005). Parece evidente que una proporción del compuesto de Amadori absorbido no se recupera como tal en heces u orina, ni se almacena. Las diferencias en la recuperación se explican bien por la oxidación de dichos productos hasta CO<sub>2</sub> por las bacterias intestinales, establecido por primera vez por Erbersdobler et al. (1970), o bien por la deglicación enzimática mediada por la fructosamina-3-kinasa. Ambos mecanismos estarían implicados en la metabolización de los productos de Amadori (Delpierre et al., 2002), aunque también podrían participar otras vías actualmente desconocidas (Förster et al., 2005). En definitiva, se trata de productos que, en general, se someten a intensa degradación digestiva y metabólica, por lo que es difícil establecer generalidades, ya que los datos son muy dependientes del tipo de producto concreto.

Los estudios sobre el tránsito metabólico de los PRMs más avanzados, las premelanoidinas y las melanoidinas, procedentes de sistema modelo azúcar-aminoácido o glucosa-caseína (Finot y Magnenat, 1981), parecen indicar que la mayor parte de los compuestos ingeridos se excretan por heces, su vía mayoritaria de eliminación (Finot y Magnenat, 1981; Homma y Fujimaki, 1981). Además, una pequeña proporción se expira como CO<sub>2</sub> y otra aparece en la orina. De acuerdo, con el trabajo de Finot y Magnenat (1981) utilizando los derivados de glucosa-caseína, el tránsito metabólico de premelanoidinas y melanoidinas muestra variaciones. Mientras que las primeras se excretan vía fecal entre el 60-70 %, las segundas están presentes en heces en valores próximos al 90 %. Por su parte, la fracción expirada como CO<sub>2</sub> y la que aparece en orina son muy inferiores en el último caso, por lo que los PRMs de menor

peso molecular se absorben en mayor proporción y/o sufren una degradación más intensa por las bacterias intestinales.

Se piensa que las melanoidinas dietéticas de alto peso molecular son degradadas a fracciones de bajo peso molecular por los microorganismos fermentadores para facilitar su absorción (Somoza, 2005). Los PRMs de bajo peso molecular, así como los productos resultantes del metabolismo intestinal de las melanoidinas se pueden absorber hasta en un 30 % según diversos autores (Erbersdobler y Faist, 2001; Foerster y Henle, 2003; Somoza, 2005), mientras que la mayoría de los productos de alto peso molecular se excretan en heces, como corrobora Delgado-Andrade (2002) al observar un color más oscuro de las heces de ratas alimentadas con PRMs más avanzados. Existen múltiples evidencias de la absorción de PRMs, sin embargo, sus mecanismos específicos de transporte intestinal son bastante desconocidos. De acuerdo con Grunwald et al. (2006), parece que no está mediatizado por transportadores de péptidos o aminoácidos y que su bajo flujo transepitelial muy probablemente ocurre por difusión simple.

Los PRMs más avanzados absorbidos pueden excretarse en cierta medida en orina, bien inalterados o con transformaciones metabólicas, resultando evidente la influencia de la dieta sobre su eliminación. El trabajo de Förster et al. (2005) en humanos, demuestran que hasta el 90 % de los compuestos de Amadori que aparecen en orina podrían ser de origen dietético, mientras que para otros productos más avanzados la influencia de la dieta es menos pronunciada.

Aunque no existen muchos trabajos sobre acumulación de PRMs en diferentes órganos, la mayoría coincide en que el riñón es el órgano diana preferente. Según Finot y Magnenat (1981), el mayor depósito de PRMs tiene lugar en el riñón, seguido por el hígado, el páncreas y las glándulas salivares. Germond et al. (1987), utilizando HMF marcado, observaron que la mayor parte de este compuesto se acumuló en el riñón y, en menor proporción, en la vejiga y en el hígado. Un trabajo más reciente que empleaba dietas que contenían fructosil-lisina marcada radiactivamente, coincidió también con los resultados expuestos anteriormente, ya que alrededor de un 30 % de

fructosil-lisina se acumuló en el riñón, menos de un 10 % en estómago, pulmones, hígado e intestino y 8 % en sangre (Hultsch et al., 2005).

## **3.2. Efectos de los productos de la reacción de Maillard**

### **3.2.1. Modificación de las características organolépticas de los alimentos**

Como ya se ha mencionado, el desarrollo de la reacción de Maillard se persigue frecuentemente en la industria alimentaria para la obtención de aromas, sabores y colores agradables para el consumidor.

El café, la carne cocinada, el pan, las galletas, las patatas fritas, entre otros alimentos, deben su particular aroma a la reacción de Maillard, identificándose más de 2000 compuestos implicados en la producción de aromas (Finot, 1990). Entre los compuestos volátiles se encuentran los ésteres, ácidos, cetonas, aldehídos, alcoholes, alcanos, derivados aromáticos, aminas, mercaptanos, etc. Su formación depende, por una parte, del tipo de reactantes involucrados en la reacción y, por otra, de la temperatura, del pH, del tiempo y del contenido en agua (Jousse et al., 2002). En cuanto a los reactantes, van Boekel (2006) establece que las reacciones azúcar-aminoácido libre son las más indicadas para la producción de aromas, ya que la interacción azúcar-proteína o azúcar-péptido en ausencia de aminoácidos libres no da lugar a la reacción de Strecker, menoscabando la formación de compuestos aromáticos. Según el tipo de aminoácido involucrado en la reacción el flavor producido es diferente, por ejemplo la cisteína, es responsable del olor a carne asada, mientras que la prolina se asocia al sabor típico del pan, del arroz y de las palomitas de maíz. El tipo de azúcar empleado en la reacción parece tener menos influencia en el flavor (van Boekel, 2006).

Se conoce que la reacción de Maillard también puede producir compuestos cuyos aromas y colores resultan desagradables para el consumidor, como en el caso de la leche (Morr y Ha, 1991; Rufián-Henares et al., 2006b) y del chocolate blanco (Vercet, 2004), en los que la aparición del color marrón, característico del pardeamiento, perjudica la aceptación del producto.

Aunque los compuestos de Amadori suelen ser incoloros, son precursores de las melanoidinas, responsables mayoritarias de proporcionar el color característico a algunos alimentos, como la corteza de pan. En las primeras etapas de la reacción de Maillard se desarrollan colores de la gama del amarillo pálido, mientras que en las etapas finales predominan los marrones oscuros, clara muestra de la aparición de melanoidinas. Los compuestos responsables del color son mayoritariamente los productos de alto peso molecular, aunque se sabe que los de bajo peso molecular pueden intervenir también en su aparición, ya que se unen a estructuras proteicas y origina entrecruzamientos que incrementan el pardeamiento (Ames, 2003).

Existen numerosos trabajos sobre la influencia de la reacción de Maillard en el color y aroma de los alimentos, pero poco se conoce sobre su efecto en la textura. Gerrard et al. (2002) indicaron que la textura de ciertos alimentos podría verse afectada por la formación de enlaces cruzados entre los compuestos dicarbonílicos y las proteínas. En otros estudios de este grupo de investigación se estableció que el crosslinking que produce la formación de los PRMs sobre las proteínas del pan (Gerrard et al., 1998) o del croissant (Gerrard et al., 2000) mejora su textura. Estudios similares también mostraron que el desarrollo de la reacción de Maillard modificaba la textura del tofu (Yasir et al., 2007).

### **3.2.2. Aspectos nutritivos**

#### **a) Efectos sobre la ingesta y el peso**

Puesto que la aparición de los PRMs en los alimentos mejora su palatabilidad y sus características organolépticas, parece lógico que su presencia pueda contribuir a un incremento en el consumo alimentario. Sin embargo, diversos autores han descrito descensos en la ingesta alimentaria y en el peso corporal como consecuencia de una dieta que contenía PRMs procedentes de sistemas modelo y de alimentos.

En esa línea, Furniss et al. (1989) describieron menores ingestas en ratas que se alimentaban con una mezcla de glucosa-caseína calentada a 60°C. Delgado-Andrade et al. (2006) también lo corroboraron, utilizando los sistemas de glucosa-lisina y glucosa-

metionina calentados durante distintos tiempos (30 y 90 min) y observando una disminución del consumo en las ratas que ingerían las mezclas calentadas durante más tiempo. En este sentido, Abu-Dweih et al. (2000) establecieron que la disminución del consumo alimentario aumenta paralelamente al incremento del pardeamiento. Delgado-Andrade et al. (2006) atribuyeron dicho efecto a una menor digestibilidad de los PRMs más avanzados coincidiendo, con lo ya descrito por Koopsman (1983) acerca de que el consumo alimentario está modulado por la sensación de saciedad consecuente a la menor digestibilidad de estos compuestos. De acuerdo con esta premisa, previamente ya otros autores habían apuntado que la sensación de saciedad estaba causada por un retraso en el vaciamiento gástrico (Kimiagar et al., 1980).

Diversos ensayos realizados en ratas, utilizando alimentos como fuente de PRMs para elaborar dietas, reflejaron también menores ingestas. Sarriá et al. (2001) detectaron un descenso del consumo al utilizar fórmulas infantiles líquidas esterilizadas que contenían mayor cantidad de PRMs frente a las consumidas en polvo, lo que podría estar motivado por el hecho de que la esterilización de la leche conduce a una gran formación de lactulosa, que modifica su olor y flavor, la cual podría también participar en la reacción de Maillard, más intensa en el sistema líquido que en polvo. En la misma línea, al emplear leche sobrecalentada y UHT, se han observado menores ingestas en las ratas que consumen la leche sobrecalentada comparadas con las que tomaban la UHT (Seiquer et al., 2010). Sin embargo, no siempre se observa depresión de la ingesta y, según indica Šebeková et al. (2005), la presencia de corteza de pan al 25 % en la dieta no altera el consumo alimentario respecto a una dieta estándar.

Estudios realizados en individuos sanos, comparando la ingesta de dietas con alto y bajo contenido en PRMs, han manifestado también resultados contradictorios, de forma que algunos autores no señalan modificaciones en el consumo (Mesías et al., 2009), mientras que otros muestran un incremento en los individuos que ingirieron la dieta rica en PRMs (Birlouez-Aragon et al., 2010).

Las dietas con alto contenido en PRMs pueden conducir a un menor peso corporal y/o tasa de crecimiento más baja, bien por inducir menor consumo de alimento o por un efecto nocivo *per se* de los PRMs. En muchas ocasiones, el descenso



en el peso corporal es consecuencia de la menor ingesta (O'Brien y Walker, 1988) y, en esta línea, se han descrito reducciones en el peso corporal tras consumir dietas adicionadas de PRMs procedentes de sistemas modelo (Andrieux y Sacquet, 1984; Furniss et al., 1989). Resultados similares mostraron Seiquer et al. (2010) tras alimentar a ratas con una dieta basada en leche sobrecalentada frente a la que incluía leche esterilizada común. Por el contrario, en el estudio que llevaron a cabo Šebeková et al. (2005) en ratas que consumían dietas con un 25 % de corteza de pan, se produjo un incremento en el peso corporal con respecto a los animales controles.

Modificaciones en el peso de órganos se han evidenciado por numerosos autores, aunque no hay unanimidad en los efectos descritos. Los primeros estudios que abordaron este tema mostraron un incremento de peso en diversos órganos (corazón, pulmón, ciego, hígado, riñón y estómago) tras alimentar a ratas con PRMs procedentes del sistema glucosa/glutamato (O'Brien y Walker, 1988) o con dietas basadas en albúmina de huevo pardeada (Lee et al., 1982). En el citado trabajo de Šebeková et al. (2005) se observó también aumento de peso del hígado y el riñón. Sin embargo, otros ensayos como los de Delgado-Andrade et al. (2006) y Seiquer et al. (2010) detallan menores pesos en hígado, riñón y fémur.

## **b) Efectos sobre las proteínas y aminoácidos**

El desarrollo de la reacción de Maillard es responsable de una pérdida de valor nutritivo de la proteína en los alimentos. El efecto puede deberse por una parte, a la menor disponibilidad de los aminoácidos esenciales tras su interacción con los azúcares en la primera etapa de la reacción y, posteriormente, a su destrucción en las etapas finales (Moughan et al., 1996). Por otra, se atribuye también a un descenso de la digestibilidad proteica como resultado de cambios estructurales en la proteína (Kato et al., 1986).

La lisina es el aminoácido más sensible al tratamiento térmico, su estructura con dos grupos aminos, la hace muy vulnerable a la reacción y su disponibilidad disminuye a medida que el tratamiento térmico es más severo. En el estudio de Hurrell

et al. (1983) sobre la pérdida de lisina, se observó que en el almacenamiento de leche en polvo a 60°C se producía un incremento del compuesto lactulosil-lisina, lo que ocasiona la menor disponibilidad de la lisina al reaccionar ésta con la lactosa, más acusada cuanto más alta era la temperatura del tratamiento. En este trabajo se estudiaron además las pérdidas de triptófano, metionina, leucina e isoleucina, viendo que en las condiciones descritas estos aminoácidos no se veían afectados; mientras que a 70°C, con el desarrollo del pardeamiento, su disponibilidad disminuía progresivamente al tiempo de almacenamiento.

Ajandouz y Puigserver (1999) estudiaron los cambios en los aminoácidos esenciales cuando reaccionaban con glucosa en soluciones calentadas a 100°C y a pH 7. Los resultados indicaron que la lisina fue el primer aminoácido en degradarse, seguido por la treonina y la fenilalanina. Sin embargo, la metionina era el aminoácido menos reactivo, y por tanto, el que menos se dañaba. Años más tarde, Singh et al. (2007) corroboraron dicha afirmación al comprobar que durante el tratamiento de extrusión, utilizando proteínas de leche y de huevo y azúcares como fructosa y galactosa, el aminoácido más afectado era la lisina, seguido de treonina, fenilalanina, triptófano y metionina.

La disponibilidad de la lisina durante los tratamientos térmicos se ha estudiado en numerosos alimentos, tales como las galletas, los cereales de desayuno, la pasta o el pan (Delgado-Andrade et al., 2007a; Finot, 1993). En concreto, el desarrollo del pardeamiento durante el horneado del pan lleva consigo pérdida y destrucción de aminoácidos esenciales y, coincidiendo con los resultados expuestos anteriormente, la lisina es el aminoácido más afectado, pero también se han detectado descensos de algunos otros como la metionina, el triptófano, etc. Además, la formación del crosslinking proteico en la corteza del pan durante el horneado origina un descenso de la digestibilidad de las proteínas que reduce su calidad (Morales et al., 2007). Efectivamente, Tsen et al. (1983) comprobaron que la disponibilidad de la lisina en la corteza era de sólo 75 %, mientras que en la miga alcanzaba el 90 %.

Otras causas de descenso de la digestibilidad proteica son: (i) inhibición de la actividad de las enzimas digestivas por parte de los PRMs (Rudloff y Lonnerdal, 1992),

se ha descrito que los PRMs de bajo peso molecular son los que más podrían afectar la actividad de enzimas proteolíticas como la carboxipeptidasa A y la aminopeptidasa N (Öste et al., 1986; Öste et al., 1987); (ii) peor ataque enzimático debido a impedimentos estéricos ocasionados por la formación de nuevos enlaces inter o intramoleculares que originan una restructuración de la proteína (Ford, 1973); o por bloqueo de los lugares de unión, que impide la accesibilidad de las enzimas a su sitio de acción, como describieron Simonato et al. (2002), al observar una disminución de la digestibilidad de la proteína en la corteza de pan porque las proteasas no podían ejercer su acción, debido a los agregados formados durante la reacción de Maillard.

Existen pocos estudios *in vivo* sobre la influencia de la reacción de Maillard en la digestibilidad y la utilización proteica en humanos. En un trabajo reciente en adolescentes utilizando una dieta rica en PRMs y otra con bajo contenido en estos compuestos, se observó una menor digestibilidad proteica en los individuos que consumían la dieta rica en PRMs (Seiquer et al., 2006). En este sentido, Moughan et al. (1996) sugirieron que los PRMs pueden disminuir la digestibilidad proteica no sólo por participación de proteínas y aminoácidos en la reacción de Maillard, sino también porque su presencia afecte la absorción y digestibilidad de la proteína y aminoácidos intactos, como mostró al evidenciar el descenso de la digestibilidad de la lisina intacta en una dieta tratada térmicamente con respecto a otra que no había sufrido tratamiento térmico.

### **c) Efectos sobre las vitaminas**

Muchas vitaminas son sensibles a la oxidación y a las altas temperaturas, como es el caso de las vitaminas C, B<sub>1</sub>, B<sub>9</sub> y B<sub>12</sub>, por tanto se verán afectadas durante los tratamientos térmicos. Además, aunque hay poca información al respecto, algunas de ellas pueden participar en la reacción de Maillard.

La leche en polvo representa una buena matriz para el estudio de la destrucción de vitaminas por participación en la reacción de Maillard. Ford et al. (1983) realizaron un estudio de leche en polvo almacenada a 70°C y comprobaron que

la formación de PRMs conduce a la destrucción de la vitamina B<sub>6</sub>, la tiamina, el ácido pantoténico y la vitamina B<sub>12</sub>. También se observó la degradación de la vitamina C y del ácido fólico, aunque los autores concluyen que pudo ser debida a la presencia de O<sub>2</sub> más que al desarrollo de la propia reacción. Más recientemente, se ha comprobado que, aplicando condiciones similares a las del procesado de alimentos en un sistema compuesto por ácido fólico y azúcares reductores, se origina su glicación y se forma el compuesto N<sub>2</sub>-1-(carboxietil)-ácido fólico (CEF), reduciéndose la disponibilidad del ácido fólico hasta en un 50 % (Schneider et al., 2002). Los trabajos de Finot y Furniss (1989) también relacionaron la formación de PRMs en el calentamiento de la leche con la destrucción y pérdida de las vitaminas B<sub>1</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> y ácido pantoténico, sin embargo, el ácido nicotínico y la biotina no se afectaron.

En la siguiente tabla se comparan las pérdidas vitamínicas que se producen en la etapa inicial de la reacción de Maillard con las que tienen lugar en una etapa más avanzada durante el almacenamiento de leche en polvo a diferentes temperaturas. Entre ambas etapas se muestra una drástica disminución en el contenido en vitaminas.

**Tabla 6.** Efectos nutricionales de la reacción de Maillard sobre las vitaminas en la leche en polvo (Finot, 2003)

Tratamientos	Porcentajes de vitaminas en la muestra				
	Vitamina B <sub>1</sub>	Ác. pantoténico	Vitamina B <sub>6</sub>	Ác. fólico	Vitamina B <sub>12</sub>
R. Maillard temprana 60°C	81	90	84	29	100
R. Maillard avanzada 70°C	5	7	18	3	31

#### **d) Efectos sobre el metabolismo mineral**

Los productos de la reacción de Maillard pueden comportarse como polímeros aniónicos capaces de interactuar con cationes metálicos, formando complejos solubles e insolubles que afectarían la disponibilidad mineral de tres formas diferentes: induciendo un cambio de estado fisicoquímico, alterando el proceso de absorción o afectando a su metabolismo (Navarro, 2003b).

##### *d.1. Forma fisicoquímica: cambios en especiación*

Freeman et al. (1975) fueron los primeros en observar una influencia negativa de los PRMs en el metabolismo mineral en humanos, tras detectar un incremento de la excreción urinaria de cinc en los voluntarios que recibieron una infusión intravenosa de suero que contenía una mezcla de proteína hidrolizada y glucosa esterilizada conjuntamente. Años más tarde, Rendleman (1987) demostró que melanoidinas procedentes de mezclas calentadas de glucosa-glicina, fructosa-glicina, glucosa-histidina y glucosa-ácido glutámico eran capaces de acomplejar calcio. En esta línea, Rendleman e Inglett (1990) describieron que las melanoidinas quelaban también al cobre y establecieron que la cantidad de mineral que se unía dependía del contenido en nitrógeno de la melanoidina. Aunque parece que las melanoidinas solubles son más reactivas que las insolubles, Wijewickreme y Kitts (1997) comprobaron que el calcio y el cobre se unen tanto a las unas como a las otras. En la misma línea, Ruiz-Roca et al. (2008), utilizando el sistema modelo glucosa-lisina calentando a 150°C durante diferentes tiempos (15, 30, 60 y 90 minutos), mostraron la alta afinidad que tenían los PRMs obtenidos por el cobre y el hierro, siendo superior la quelación de este último. La capacidad de unión al cobre era mayor para los compuestos de menor peso molecular, originados tras 15 y 30 minutos de calentamiento, mientras que los compuestos más avanzados disminuían su afinidad por el mineral. En el caso del hierro, la actividad quelante fue similar para los compuestos generados en cualquiera de los tiempos de tratamiento.

Diversos métodos se han usado para estudiar la capacidad quelante de los PRMs. O'Brien y Morrissey (1997) utilizaron la titración potenciométrica para

demostrar que los PRMs procedentes del sistema glutamato monosódico y glucosa son capaces de unir al calcio, cinc, cobre y magnesio, según la siguiente fuerza de acomplejamiento: magnesio > cobre = calcio > cinc. Mediante ensayos espectrofotométricos, Hashiba (1986) estableció que las melanoidinas del sistema glucosa-glicina acomplejan hierro. Y otros autores han propuesto una técnica denominada IMAC (del inglés, Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography), que divide las melanoidinas en fracciones homogéneas en función de su habilidad quelante de metales (Homma et al., 1986; Wijewickreme y Kitts, 1997).

Se ha observado que el pH, la temperatura y el tiempo de calentamiento de las diferentes mezclas aminoácido-azúcar pueden influir en la capacidad quelante de los PRMs obtenidos y, en consecuencia, alterar la solubilidad de algunos minerales en su presencia. Con distintos tiempos de calentamiento del sistema modelo glucosa-lisina y glucosa-metionina se mostró que los PRMs resultantes no afectan la solubilidad de calcio y magnesio y, sin embargo, los elementos traza como hierro, cinc y cobre disminuían su solubilidad cuando estaban en presencia de PRMs obtenidos tras mayor tiempo de calentamiento, llegando a insolubilizarse con los componentes más avanzados (Delgado-Andrade et al., 2004b).

Además de en sistemas modelo, la formación de complejos con minerales se ha estudiado también en alimentos pardeados, demostrándose que las melanoidinas del café se comportan igualmente como polímeros aniónicos, lo que les permite formar complejos estables con cationes metálicos como hierro, cobre y cinc (Hashiba, 1986; Homma y Murata, 2001). En otros trabajos más recientes, Morales et al. (2005) estudian la capacidad de las melanoidinas de unir el hierro, comparando los compuestos solubles de alto peso molecular procedentes de sistemas modelos con los obtenidos desde café, cerveza y vino dulce. Los resultados muestran que las melanoidinas originadas en los sistemas modelos tienen mayor afinidad por el hierro que las procedentes de alimentos y, además, si se obtienen a partir de glucosa fijan más el hierro que las procedentes de lactosa, que son menos reactivas. El efecto quelante sobre el calcio de PRMs presentes en el pan tostado con lactosa era mayor que cuando se usaba el pan sin el azúcar (Rendleman, 1986). En el caso de cereales

tostados, Whitelaw y Weaver (1988) describieron una menor disponibilidad de zinc conforme incrementaba el pardeamiento en los cereales.

#### *d.2. Influencia sobre la digestibilidad mineral*

Los PRMs tempranos, los de menor peso molecular e incluso las melanoidinas solubles pueden formar complejos solubles con los minerales en el lumen intestinal, lo que, en ocasiones, facilita la absorción de estos cationes. Por otro lado, los PRMs de mayor peso molecular que no son absorbibles, pueden formar complejos insolubles con los minerales y de esta manera reducir su digestibilidad (Navarro, 2003b).

En general, el efecto de los PRMs sobre la absorción y digestibilidad mineral es controvertido y dependiente del tipo concreto de productos que se estudien. Ensayos *in vitro* realizados en cultivos de células Caco-2, línea que se diferencia como enterocito maduro, muestran un ligero aumento del transporte de hierro en presencia de PRMs derivados del sistema modelo glucosa-lisina (Delgado-Andrade et al., 2004a). Otros ensayos con este tipo de células, llevados a cabo utilizando una dieta en polvo para la alimentación de lechones frente a la misma dieta en forma de pellet, pusieron de manifiesto una mayor solubilidad y eficiencia del transporte del cinc en la dieta que había sufrido el tratamiento térmico de granulación. Sin embargo, Navarro et al. (2000) no detectaron modificaciones en el transporte de cinc cuando realizaron ensayos con cultivos celulares empleando derivados procedentes del sistema caseína-glucosa-fructosa calentado. En la misma línea, Mesías (2007), utilizando dieta con abundante contenido en PRMs, no observó ningún cambio en los transportes de hierro o calcio, comparada con una dieta de igual composición pero elaborada con los mismos alimentos preparados con operaciones culinarias que trataban de minimizar el desarrollo de la reacción de Maillard.

En estudios *in vivo* utilizando sistemas modelo, los resultados también difieren dependiendo del tipo de PRMs estudiados. Andrieux y Sacquet (1984), incluyendo PRMs de la mezcla de glucosa-glicina calentada en la dieta de animales axénicos y holoxénicos, observaron un descenso en la absorción del calcio y magnesio en el intestino delgado de ambos tipos de ratas pero sin efectos sobre el fósforo. Sin

embargo, a nivel del colón, detectaron un incremento en la absorción de estos tres minerales en las ratas holoxénicas respecto a las ratas libres de gérmenes, lo que podía deberse a la ausencia de microflora intestinal de estas últimas, que no habría permitido la degradación del PRM, la liberación del mineral y su consiguiente absorción en este tramo del digestivo. Desde los años 80 se conoce la importancia de la microflora en la absorción de los compuestos pardos y, por tanto, su posible incidencia sobre la absorción mineral. Otros ensayos utilizando PRMs procedentes de glucosa-glutamato monosódico no mostraron modificaciones de la absorción de hierro y cobre pero sí disminuyó la de cinc (O'Brien y Morrissey, 1989). Por el contrario, Delgado-Andrade et al. (2002) describieron un incremento en la absorción y digestibilidad del cobre utilizando PRMs procedentes de mezclas de glucosa-lisina y glucosa-metionina calentadas a 150°C durante 90 minutos. Trabajos posteriores de este grupo, con las mismas dietas, no observaron modificaciones en la absorción ni en la eficiencia del proceso digestivo del hierro (Delgado-Andrade et al., 2000), aunque la dieta que contenía los derivados de glucosa-metionina sí produjo un incremento en la absorción y menor excreción fecal de magnesio (Delgado-Andrade et al., 2008b).

### **Calcio**

Como ya se ha mencionado, los PRMs tienen cierta capacidad para quelar el calcio y formar complejos solubles o insolubles dependiendo de su peso molecular, lo que puede afectar la absorción intestinal y la digestibilidad del mineral. Adrian y Boisselot-Lefebvres (1977) fueron unos de los primeros autores que llevaron a cabo estudios sobre la biodisponibilidad mineral, demostrando que la adición de PRMs de mezclas calentadas de xilosa-lisina y glucosa-glicina a una dieta estándar de rata mejoraba la digestibilidad del calcio. Sin embargo, otros autores no han observado efectos sobre estos parámetros tras el consumo de PRMs de glucosa-glutamato monosódico (O'Brien y Morrissey, 1989) o de la mezcla caseína-glucosa-fructosa (Seiquer et al., 2001). Tampoco se observaron modificaciones en la utilización digestiva de calcio tras alimentar a ratas con dietas que incluían PRMs procedentes de la mezcla glucosa-lisina calentada a 150°C durante 30 y 90 minutos (Delgado-Andrade, 2002).



Existen pocos estudios que utilicen alimentos pardeados para el estudio de la biodisponibilidad del calcio. Sarriá et al. (2001) emplearon fórmulas infantiles para la alimentación de ratas y observaron un descenso en la absorción de calcio al ingerir las fórmulas líquidas respecto a las fórmulas en polvo. Estos datos coinciden con los resultados de Seiquer et al. (2010), que evidenciaron también una disminución en la absorción del elemento en ratas que consumían leche sobrecalentada comparándolas con otras que tomaban leche UHT. En ambos estudios el efecto se vio mediatizado por la disminución de la ingesta.

Mediante ensayos *in vitro* con células Caco-2 se demostró que la presencia de PRMs procedentes de un sistema caseína-glucosa-fructosa (Seiquer et al., 2001) y de una mezcla calentada de glucosa-metionina incrementaban el transporte del calcio soluble, pero ello, como se ha visto antes, no llegaba a alterar el calcio absorbido *in vivo*. Por el contrario, mezclas de glucosa-lisina no afectaban al transporte celular de este mineral (Delgado-Andrade et al., 2006).

Por último, el único ensayo en humanos encontrado en la bibliografía que estudia los efectos de la presencia de PRMs dietéticos sobre la utilización digestiva del calcio, concluyó que, tras el consumo, de una dieta rica en PRMs respecto a otra cuyo contenido en estos productos era escaso, los adolescentes del estudio no mostraban modificaciones en la absorción ni la digestibilidad del calcio (Mesías et al., 2009).

Todo ello manifiesta que el calcio es un elemento poco sensible a los efectos de los PRMs, ya que su utilización digestiva parece no alterarse por su presencia.

## **Fósforo**

Son escasos los estudios realizados sobre la influencia de los PRMs en la biodisponibilidad del fósforo, probablemente debido a que, al contrario que el calcio, el fósforo actúa como un anión en el lumen y los fluidos biológicos. Puesto que los PRMs se han concebido tradicionalmente como polímeros aniónicos capaces de quelar cationes metálicos, han sido muy numerosos los estudios centrados en los cationes divalentes como calcio, hierro, cobre o cinc. Sin embargo, la hipótesis de quelación

caciones metálicos-PRMs no podría utilizarse en el caso del fósforo. Cabe así preguntarse por qué vía los PRMs podrían afectar la absorción y digestibilidad del fósforo.

El interés surge porque, aunque los trabajos de Andrieux y Sacquet (1984) y Andrieux et al. (1980) establecieron que la absorción de fósforo no se modificaba significativamente por el consumo de PRMs procedentes del sistema modelo glucosa-glicina, otros ensayos más modernos realizados en ratas alimentadas con una mezcla calentada de glucosa-lisina han mostrado menor absorción y digestibilidad del elemento por la presencia de PRMs en la dieta (Delgado-Andrade, 2002).

Recientemente, en chicos adolescentes que consumían las ya citadas dietas ricas y pobres en PRMs, se observó una tendencia a incrementar la excreción fecal de fósforo tras el mayor consumo de PRMs, que hizo disminuir la absorción y la digestibilidad (Delgado-Andrade et al., 2011). Ante estos resultados, los autores aportan la hipótesis de que algunos de los compuestos formados en la reacción de Maillard temprana podrían tener carga positiva y, por tanto, podrían quelar al anión fosfato y afectar así su absorción y digestibilidad. Según, Henle (2005) y Thorpe y Baynes (2003), tanto *in vivo* como en alimentos, los compuestos derivados de los residuos de arginina y lisina tienen carga positiva. Otra vía que no puede descartarse es la posible modificación de los PRMs en el tracto gastrointestinal, en donde podrían adquirir carga positiva y unirse también así a aniones fosfato en el lumen.

#### *d.3. Consecuencias sobre el metabolismo mineral*

Diversos estudios han descrito incrementos en la eliminación urinaria de cobre, magnesio, calcio, hierro y cinc tras el consumo de dietas que contenían PRMs, siendo el cinc el elemento que parece ser más afectado (Fairweather-Tait et al., 1989; Furniss et al., 1989; Hurrell, 1990; Seiquer et al., 2001). No es frecuente que la ingesta de PRMs altere la excreción urinaria de hierro, como se ha manifestado en ensayos con sistemas modelo de glucosa-glutamato (O'Brien et al., 1994) o glucosa-lisina (Delgado-Andrade et al., 2000).

Descensos en la absorción intestinal e incrementos de estos elementos en la orina pueden conducir a una menor eficacia en la retención mineral en el organismo, tal y como describieron Navarro et al. (2000) en su estudio sobre el efecto del consumo del sistema modelo caseína-glucosa-fructosa en la retención del cinc. Sin embargo, en el caso del magnesio, no se han detectado alteraciones en cuanto a su retención tras el uso de diferentes sistemas modelos en ensayos con ratas (Andrieux y Sacquet, 1984; O'Brien et al., 1994). En la misma línea, el trabajo de Delgado-Andrade (2002) tampoco mostró modificaciones en la retención y biodisponibilidad del cobre y del cinc tras el consumo de mezclas calentadas de glucosa-lisina y glucosa-metionina.

Cuando se utilizan alimentos ricos en PRMs para conocer su efecto sobre el metabolismo mineral, como fórmulas infantiles esterilizadas en forma líquida y en polvo, se han detectado valores más bajos de biodisponibilidad del hierro en las fórmulas líquidas frente a las en polvo (Sarriá y Vaquero, 2004).

Como se ha establecido, los PRMs pueden unir minerales, y comportarse como vehículos transportadores de estos elementos, que facilitan su absorción y transporte hasta diferentes tejidos diana. El riñón y el hígado se consideran órganos diana de acumulación de PRMs debido a su importante papel en el metabolismo de estos productos y, en general, de xenobióticos (Faist y Erbersdobler, 2001; Tuohy et al., 2006). Diversos autores han descrito acumulaciones de minerales tras el consumo de PRMs en estos órganos (Finot y Furniss, 1986; O'Brien y Morrissey, 1989; O'Brien y Walker, 1988), aunque otros no han observado hiperconcentraciones en riñón e hígado al alimentar a ratas con dietas que incluían productos pardos derivados de distintos sistemas modelos (Delgado-Andrade, 2002). En la misma línea, Navarro et al. (2000) demostraron que las concentraciones de hierro, cobre y cinc en el hígado y en la piel no se afectaban por el consumo de dietas adicionadas de PRMs procedentes del sistema caseína-glucosa-fructosa. Sin embargo, sí se ha detectado un incremento en la concentración de cobre en bazo y riñón de ratas que consumían PRMs de la mezcla calentada glucosa-metionina durante 90 minutos y, también en la piel cuando tomaban los derivados del sistema glucosa-lisina calentado durante 30 minutos (Delgado-Andrade et al., 2002).

## Calcio

El efecto del consumo de PRMs sobre el incremento de la eliminación urinaria de calcio ha sido señalado por varios autores, entre ellos O'Brien et al. (1989), tras alimentar a ratas con dietas que incluían el sistema modelo glucosa-glutamato y Adrian y Boisselot-Lefebvres (1977), que señalaron que los PRMs procedentes de la mezcla glucosa-lisina aumentaban la digestibilidad de calcio y el exceso de elemento se excretaba en la orina.

A pesar de la hipercalciuria detectada tras el consumo de productos pardos, la retención de este catión permanece estable, como se demostró al utilizar mezclas de caseína-glucosa-fructosa (Seiquer et al., 2001) y de glucosa-glutamato monosódico (O'Brien et al., 1994) en la alimentación de ratas. Andrieux y Sacquet (1984) no observaron modificaciones en la excreción urinaria de calcio y tampoco en su retención tras el consumo de PRMs.

De forma general, parece que la bibliografía es bastante unánime en cuanto a los escasos efectos que ejerce el consumo de los productos pardos sobre la biodisponibilidad de calcio. Este parámetro no se altera tras la ingesta de derivados de Maillard que proceden de sistemas modelo de glucosa-lisina y glucosa-metionina (Delgado-Andrade et al., 2006) o de dietas ricas en alimentos procesados ensayadas en adolescentes (Mesías et al., 2009). Sin embargo, sí se ha descrito un descenso en la biodisponibilidad del elemento cuando se alimenta a ratas con fórmulas infantiles líquidas esterilizadas respecto al consumo de fórmulas en polvo (Sarriá et al., 2001). Este efecto más profundo puede quizás estar motivado por el hecho de que en el último estudio los animales consumían una dieta en donde toda la proteína había sido dañada, mientras que en los anteriores aún quedaba proteína intacta.

En cuanto a la distribución tisular de calcio tras el consumo de PRMs, se han detectado acumulaciones en diferentes órganos. Aunque hace ya años O'Brien y Walker (1988) describieron nefrocalcinosis debida a la ingesta de altas dosis de productos pardos, tras el consumo de mezclas de glucosa-lisina y glucosa-metionina calentadas durante 90 minutos en ratas, no se produjo ningún incremento en la

concentración de calcio renal (Delgado-Andrade et al., 2006). Por otra parte, sí tuvo lugar una hiperconcentración del elemento en el hígado (Delgado-Andrade et al., 2005).

Existen muy pocos estudios sobre acúmulos de este catión en otros órganos. Sólo cabe destacar el trabajo de Seiquer et al. (2010), que mostró un elevado incremento en la concentración de calcio en el intestino delgado de ratas tras el consumo de leche sobrecalentada, que no aparecía por la ingesta de leche UHT.

Disponemos de poca información relativa al efecto de PRMs sobre el calcio óseo. Los ensayos realizados en fémur de ratas revelan descensos en el contenido y la concentración de este elemento debido al consumo de productos pardos (Delgado-Andrade et al., 2005; Yuan y Kitts, 1994), además de reducciones en la fuerza del hueso (Gregor y Emery, 1987). Por el contrario, Seiquer et al. (2010) no observaron cambios sobre el calcio femoral de ratas que consumieron dietas elaboradas con leche sometida a diferentes tratamientos térmicos.

### **Fósforo**

Poco se conoce sobre la influencia de los PRMs en el metabolismo del fósforo. En los años 80 se describía que no aparecían modificaciones en la retención del elemento cuando se añadían PRMs del sistema modelo glucosa-glicina a una dieta estándar de ratas (Andrieux et al., 1980). Más recientemente, al utilizar PRMs procedentes de la mezcla glucosa-metionina calentada a 150°C durante 30 y 90 minutos, se observó un descenso en la excreción urinaria de fósforo y un aumento de su retención y biodisponibilidad; los mismos resultados se apreciaron cuando se emplearon PRMs del sistema modelo glucosa-lisina calentado durante 30 minutos (Delgado-Andrade, 2002).

El estudio más actual relativo a PRMs y fósforo se ha llevado a cabo en adolescentes y muestra que la excreción urinaria de fósforo tiende a incrementarse tras el consumo de una dieta rica en PRMs comparada con otra pobre en estos compuestos. Aunque sin cambios significativos, la biodisponibilidad de fósforo tiende a

disminuir en los adolescentes que consumen mayor cantidad de productos pardos (Delgado-Andrade et al., 2011).

En lo que se refiere al depósito de fósforo en diferentes órganos debido al consumo de derivados de Maillard, no se ha observado ninguna acumulación anómala de este mineral en los trabajos descritos previamente.

### **3.2.3. Algunos aspectos fisiopatológicos**

#### **a) Efectos sobre los microorganismos**

Einarsson ya estableció en (1987) que los PRMs procedentes de diferentes sistemas modelo azúcar-aminoácido tienen actividad antimicrobiana dependiente de su tipo, peso molecular y concentración, así como del pH y de la temperatura del medio de cultivo. Aquellos con un peso molecular superior a 1000 Da ejercen una actividad mayor que los de menor peso molecular. Empleando sistemas modelo algo más complejos, compuestos por mezclas calentadas de lactosa-caseína, Hiramoto et al. (2004) demostraron que los productos generados inhibían a la ureasa del *Helicobacter pilory*, impidiendo que pudiera adherirse a la mucosa gástrica.

Más recientemente, Rufián-Henares y de la Cueva (2009) estudiaron la actividad antimicrobiana de las melanoidinas del café y comprobaron que, a bajas concentraciones, mostraban actividad bacteriostática, mediada por la quelación de hierro del medio de cultivo; mientras que a altas concentraciones la actividad que desarrollaban era bactericida, al secuestrar cationes de magnesio de la membrana externa, promoviendo su disrupción y permitiendo que se liberaran las moléculas intracelulares.

En la misma línea, fracciones de alto peso molecular conteniendo melanoidinas aisladas del cacao (Summa et al., 2008) y del pan (del Castillo et al., 2007), han mostrado tener también actividad antibacteriana. En el caso del pan, las fracciones se extrajeron por digestión enzimática de la corteza y se observó que inhibían el crecimiento de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Cuanto más severas eran las condiciones de horneado, más alta resultaba su actividad antibacteriana. Otro posible

mecanismo de la actividad antibacteriana es la capacidad antiadherente de las melanoidinas, según se ha mostrado con las procedentes del café de peso molecular entre 1000 y 3500 Da frente al microorganismo causante de la caries dental, *Streptococcus mutans* (Daglia et al., 2002; Gazzani et al., 2012).

Por otra parte, y desde un punto de vista de la salud gastrointestinal, los PRMs pueden tener también un efecto positivo sobre el crecimiento bacteriano. Ames et al. (1999) establecieron que las melanoidinas procedentes del sistema glucosa-lisina estimulaban el crecimiento de bacterias intestinales beneficiosas y perjudiciales. En esa línea, diversos estudios muestran que algunos PRMs poseen actividad prebiótica, al ser metabolizados por ciertos microorganismos intestinales que las usan como alimento y promueven su crecimiento. Borrelli y Fogliano (2005) describen que melanoidinas procedentes de la corteza del pan ocasionan un aumento en el crecimiento de bifidobacterias, microorganismos que mejoran la salud intestinal. El mismo efecto se ha observado también con melanoidinas de alto peso molecular obtenidas del café (Daglia et al., 2004).

#### **b) Efectos mutagénicos, antimutagénicos y cancerígenos**

Durante años el tipo de dieta se ha asociado al desarrollo de diferentes clases de cáncer en la población humana. Los PRMs pueden actuar a diferentes niveles celulares causando mutaciones genéticas, cromosómicas y genómicas (Somoza, 2005).

Los compuestos procedentes del desarrollo de la reacción de Maillard con más potencial mutagénico son las aminas heterocíclicas, que se forman en alimentos tratados térmicamente al reaccionar los aminoácidos, los monosacáridos y la creatinina. Su presencia incrementa a medida que aumenta la temperatura y el tiempo del cocinado (Ames, 2003). La mayoría de estos compuestos tienen actividad cancerígena y mutagénica y representan un factor de riesgo potencial en la etiología del cáncer en humanos (Bogen, 1994). Además de las aminas heterocíclicas, cabe destacar otros PRMs con actividad carcinogénica como el HMF, la acrilamida, el glioxal y el metilglioxal (Abraham et al., 2011; Friedman, 2005; Nagao et al., 1983).

Se han realizado numerosos estudios con diferentes sistemas modelos para comprobar la actividad mutagénica relacionada con los PRMs. Powrie et al. (1981) demostraron la genotoxicidad de los compuestos del sistema arginina-glucosa porque provocaban un aumento de las aberraciones cromosómicas en células ováricas de hámster. Brands et al. (2000) observaron que los PRMs procedentes del sistema modelo glucosa-caseína mostraban cierta actividad mutagénica sobre *Salmonella typhimurium*, la cual parece que está muy relacionada con el tipo de azúcar presente.

Por el contrario, otros estudios han puesto de manifiesto la actividad antimutagénica de los PRMs. Estos compuestos han demostrado ser potentes inhibidores del crecimiento de células tumorales humanas. Marko et al. (2003) señalaron que los PRMs pueden interferir en el desarrollo de cáncer gástrico, inhibiendo la proliferación de células carcinogénicas mediante su capacidad de suprimir la inducción de la cascada de la proteínkinasa, una de las mayores rutas de señalización en la regulación del crecimiento celular. Otro mecanismo por el que los PRMs podrían justificar su capacidad antimutagénica sería mimetizando la acción de la fibra alimentaria, inhibiendo la absorción de mutágenos y, por tanto, su activación (Powrie et al., 1986).

### **c) Efectos alergénicos y antialergénicos**

En general puede decirse que el hecho de que posean ambas vertientes se debe a que la participación de los nutrientes en la reacción de Maillard, de una parte, hace aparecer nuevos epítomos contra los que puede dispararse la respuesta inmune, y, de otra, pueden bloquearse epítomos existentes en el alimento, impidiendo así la cascada inmunológica. Diversos estudios han relacionado el desarrollo de la reacción de Maillard en cacahuete y en leche con su alergenicidad. En el primer caso, se observó que el tratamiento térmico incrementaba las propiedades alergénicas de las proteínas del cacahuete debido a la formación de nuevos sitios de unión a IgE (Maleki et al., 2000). En el segundo, el aumento de la respuesta alérgica a las proteínas de leche de vaca, especialmente a la  $\beta$ -lactoglobulina, se ha relacionado con el mayor grado de pardeamiento observado en la leche. En contraposición, otros autores han



descrito que el desarrollo de la reacción de Maillard en la leche de vaca disminuye su alergenicidad, ya que los carbohidratos bloquean el lugar de la proteína responsable del desencadenamiento de la respuesta inmune (Friedman, 1996). El efecto antialérgico de los productos pardos se ha observado además en alimentos como la soja, tras una reacción de glicosilación (Babiker et al., 1998), y en frutas como la cereza, donde las proteínas responsables de las propiedades alérgicas se unen a los carbohidratos reductores durante el tratamiento térmico, originando cambios irreversibles en su estructura terciaria (Gruber et al., 2004). Más recientemente, se ha realizado un estudio sobre mitigación de alergenicidad en el calamar, observándose que la tropomiosina, el alérgeno más importante en invertebrados marinos, disminuye su alergenicidad al reaccionar vía Maillard con la ribosa (Nakamura et al., 2006).

#### **d) Actividad antioxidante y prooxidante**

La actividad antioxidante de los PRMs es actualmente objeto de estudio de muchos investigadores, ya que su capacidad de contrarrestar la oxidación puede ser muy beneficiosa para la industria alimentaria. Se han llevado a cabo numerosos estudios sobre esta capacidad, tanto en PRMs procedentes de sistemas modelo como de alimentos, por ejemplo en café (Daglia et al., 2008), corteza de pan (Michalska et al., 2008), cerveza (Morales y Jiménez-Pérez, 2004) o cacao (Summa et al., 2008), comprobando que las melanoidinas son potentes antioxidantes y que tienen efecto sinérgico con antioxidantes fenólicos presentes o añadidos a los alimentos.

Los mecanismos por los que los PRMs actúan como antioxidantes no están claros todavía, pero se considera que las vías más importantes mediante las que promueven la inhibición de las reacciones de oxidación son: (I) el poder reductor de las estructuras de enodiol que se forman, (II) la propiedad donadora de electrones, (III) las propiedades quelantes de metales de transición de las melanoidinas producidas y (IV) la actividad captadora de especies reactivas del oxígeno de los compuestos de Amadori y melanoidinas (Billaud et al., 2004).

Las fracciones de elevado peso molecular se han asociado con una mayor capacidad antioxidante que las de bajo peso molecular (Jing y Kitts, 2004), por lo que algunos autores han establecido que aumenta paralelamente al desarrollo del pardeamiento (Benjakul et al., 2005). Sin embargo, otros responsabilizan a los PRMs de bajo peso molecular (Nienaber y Eichner, 1995). A este respecto, estudios realizados en café mostraron que los compuestos de bajo peso molecular unidos de forma no covalente al esqueleto de la melanoidina aportaban más del 50 % de su actividad antioxidante (Delgado-Andrade y Morales, 2005).

En el caso concreto de la corteza de pan, los responsables de la actividad antioxidante que se le asocia pueden ser tanto los PRMs formados durante el horneado como algunos componentes de la harina (compuestos fenólicos, tocoles o fibra) (del Castillo et al., 2002). Sin embargo, puesto que muchos de los componentes antioxidantes naturales de la harina son termolábiles, su contribución a la actividad antioxidante del pan va mermando durante el tratamiento térmico. No así la contribución de los PRMs, cuya presencia se va incrementando durante el horneado. En cuanto a los responsables de esta actividad, parece que los PRMs de peso molecular menor de 5 kDa poseen la mayor parte de la misma, como se ha establecido empleando procedimientos tradicionales de medida de la actividad antioxidante: ABTS, DPPH o FRAP (Contreras Jiménez, 2010). Posteriormente, mediante el uso del nuevo método de medida de la capacidad antioxidante (global antioxidant response, GAR), se ha demostrado también la importante actividad antioxidante de la fracción insoluble de la corteza del pan, en donde quedan atrapadas melanoidinas insolubles (Delgado-Andrade et al., 2010a). Recientemente, se ha aislado de la corteza del pan un compuesto denominado pronil-lisina cuya actividad antioxidante se basa en la capacidad de neutralizar radicales peroxilos e inducir a la glutatión-S-transferasa, previniendo el daño oxidativo (Michalska et al., 2008; Silván et al., 2006). La formación de esta melanoidina depende de la intensidad del tratamiento térmico y es responsable de la coloración oscura de la corteza de pan (Lindenmeier y Hofmann, 2004).

Los ensayos *ex-vivo* con células Caco-2 también se han utilizado para profundizar en la actividad antioxidante de los PRMs. La incubación conjunta de PRMs

procedentes del sistema modelo glucosa-lisina calentado a diferentes temperaturas y del oxidante  $H_2O_2$ , tal como están presentes en el lumen intestinal, ha mostrado que los PRMs pueden contrarrestar parcialmente el daño celular provocado por la acción oxidante del  $H_2O_2$ . Parece ser que los principales responsables de este efecto fueron los PRMs iniciales y avanzados obtenidos en dicho sistema (Ruiz-Roca et al., 2011).

*In vivo*, los estudios sobre la capacidad antioxidante de los PRMs son escasos. Somoza et al. (2005b) tras administrar a ratas dietas que contenían entre otros componentes, corteza de pan, observaron un incremento de la capacidad antioxidante total en el plasma, al medir el efecto inhibitorio de la peroxidación del ácido linoleico expresado como equivalentes de trolox, y una disminución de los niveles de TBARs plasmáticos, además de un aumento en el color de la orina de los animales, lo que indicaría que los PRMs presentes en la dieta habían sido absorbidos. Esposito et al. (2003) también comprobaron el aumento de antioxidantes plasmáticos en un grupo de voluntarios tras consumir 5 tazas de café al día, fuente importante de melanoidinas en la dieta. En otro trabajo en adolescentes sanos que consumían una dieta rica en PRMs, no hubo modificaciones en cuanto a los biomarcadores de estrés oxidativo frente a los que consumían una dieta pobre en PRMs. Sin embargo, sí se observó una protección frente al estrés oxidativo inducido (Seiquer et al., 2008b).

No obstante, a los PRMs también se les ha atribuido cierta actividad prooxidante por su capacidad de promover el daño oxidativo (Pischetsrieder et al., 1998; Wijewickreme y Kitts, 1997). A este respecto, Puscasu y Birlouez-Aragon (2002) estudiaron el efecto oxidante de los PRMs en una mezcla de triptófano y lactoalbúmina calentada a  $90^\circ C$ . Los resultados mostraron que la reacción de Maillard es la responsable de la degradación del triptófano, como consecuencia probablemente se producen radicales del oxígeno durante las etapas intermedias y avanzadas de la reacción de Maillard.

#### 4. Reacción de Maillard *in vivo*

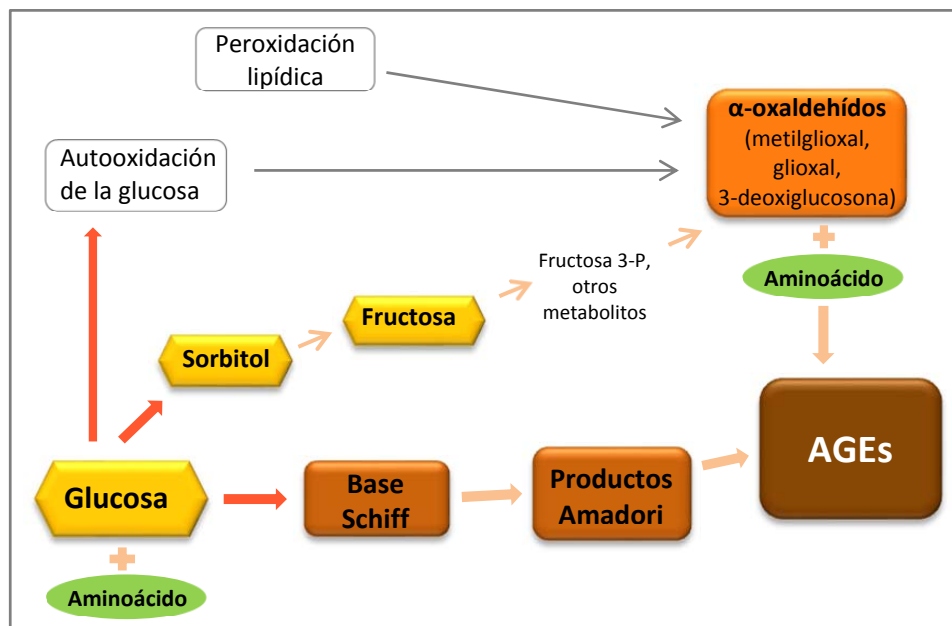
Puesto que los organismos vivos son un pool de azúcares, proteínas y lípidos que se mantienen de forma permanente a 37°C, resulta lógico que la reacción de Maillard se produzca también *in vivo*, en cuyo caso se suele conocer como glicación. Cuando las proteínas endógenas y los carbohidratos reaccionan, dan lugar a la formación *in vivo* de compuestos complejos y heterogéneos, conocidos como productos de glicación avanzada (AGEs, del inglés advanced glycation end-products). Si en lugar de carbohidratos son lípidos oxidados los que intervienen en la reacción, se denominan ALEs (advanced lipoxidation end-products). Estos productos están presentes en la circulación sistémica y pueden acumularse en tejidos, resultando cada día más evidente que desempeñan un papel fisiopatológico fundamental en el desarrollo y progreso de algunas enfermedades metabólicas y degenerativas (Tessier y Birlouez-Aragon, 2012).

La formación de los AGEs puede ocurrir en el medio extracelular y en el intracelular, siendo su concentración mayor en éste último (Thornalley et al., 2003). Existen diferentes rutas de formación de AGEs, la principal es la reacción de Maillard. Como ocurre en los alimentos, el primer paso es igualmente la formación de la base de Schiff entre un aminoácido de una proteína con un azúcar reductor o un lípido oxidado, que tiene lugar en pocas horas y depende de la concentración de los reactantes. La reorganización de la base de Schiff da lugar a los productos de Amadori, cuya formación puede conllevar varios días. Posteriormente, los productos de Amadori

sufren reacciones complejas de oxidación, reducción e hidratación originando el entrecruzamiento proteico que conduce a la aparición de los AGEs. Aunque la primera fase de este proceso puede revertir, las posteriores son irreversibles y ocurren durante semanas o meses (Luevano-Contreras y Chapman-Novakofski, 2010).

Otra vía de formación de AGEs está mediada por un aumento del estrés oxidativo, que conlleva la autooxidación de la glucosa y la producción de derivados dicarbonílicos debido a un incremento del estrés oxidativo. Estos compuestos son fundamentalmente  $\alpha$ -oxialdehídos (glicoxal, metilglicoxal y 3-deoxiglicoxosona) que, al reaccionar con aminoácidos, originan AGEs. Un mecanismo adicional de formación de AGEs transcurre también a través de compuestos  $\alpha$ -oxialdehídos, cuando éstos se originan por la vía de los polioles: la glucosa se reduce a sorbitol por la acción de la enzima aldosa reductasa y después, una segunda enzima, la sorbitol deshidrogenasa, la convierte a fructosa. Los metabolitos de la fructosa, como la fructosa 3-fosfato, se transforman en  $\alpha$ -oxialdehídos (Lorenzi, 2007), que tras la unión a aminoácidos dan lugar a la formación de AGEs.

**Figura 3.** Esquema de la formación de AGEs modificado de Luevano-Contreras y Chapman-Novakofski (2010)



Por último, la peroxidación lipídica puede también dar lugar a compuestos dicarbonílicos que, al reaccionar con aminoácidos, conducen a la formación de AGEs (Edeas et al., 2010).

Los AGEs, usualmente, se forman en condiciones anaeróbicas como es el caso de imidazolonas, pirralina y carboximetil-lisina (CML), aunque se ha observado que la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) incrementa su producción. Sin embargo, otros AGEs, como la pentosidina, y los ALEs requieren oxígeno para que se originen (Baynes y Thorpe, 2000).

La glicación y el estrés oxidativo están estrechamente ligados y a los procesos en los que ambas reacciones se ven implicadas se les asigna el término de glicoxidación. El aumento del estrés oxidativo, ya sea incrementando la formación de ROS o inactivando a las moléculas antioxidantes, puede modular la generación de AGEs. Por su parte, la formación de AGEs y ALEs endógenos es un proceso pro-oxidativo, ya que todas las etapas de la glicación y de la lipoxidación generan radicales libres de oxígeno. Además, las proteínas glicadas activan receptores de membrana en las células, que pueden estar implicados en la inducción del estrés oxidativo intracelular y ocasionar un estado pro-inflamatorio. Esto se debe a que cuando los AGEs interaccionan con sus receptores específicos modulan varias funciones celulares involucradas en el metabolismo oxidativo, induciendo respuestas inapropiadas que generen radicales libres.

Los AGEs se forman dentro y fuera de las células y pueden interferir en la función de las proteínas (Brownlee et al., 1984), como se ha apuntado previamente. Las proteínas de vida media larga que constituyen la matriz extracelular y las membranas basales vasculares son las más susceptibles a la formación y acumulación de los AGEs, puesto que se trata de un proceso lento. La glicación no enzimática de proteínas y la formación de AGEs puede afectar las funciones fisiológicas de la proteína e incluso inducir inactivación de enzimas. La alteración de la función proteica se debe a cambios en su estructura que comprometen su conformación geométrica, causando anomalías estructurales y funcionales permanentes, con la consecuente modificación de sus propiedades fisicoquímicas y bioquímicas.

Los efectos de la formación de AGEs en la estructura y funcionalidad proteica dependen de varios factores, como el tipo de reactantes implicados o el lugar de glicación de la proteína. Según el tipo de proteína involucrada en la reacción, la glicación ocasiona un cambio conformacional global o un cambio estructural localizado en el lugar donde el azúcar se une a la proteína.

Uno de los tejidos más afectados por la glicación son los formados por colágeno, proteína de vida media larga. Los entrecruzamientos propios de la glicación producen una reducción en su solubilidad y una disminución de su digestibilidad enzimática. La formación de los AGEs da lugar a la aparición de enlaces covalentes intermoleculares, ocasionando mayor fragilidad en los tejidos y órganos, como cartílagos articulares, tendones, hueso y cristalino ocular. Los enlaces intermoleculares pueden afectar las propiedades mecánicas del tejido, debido a un incremento de la rigidez o pérdida de elasticidad que lo hacen más susceptible y frágil ante fallos mecánicos (Verzija et al., 2002).

Los AGEs son reconocidos por receptores celulares con los que interaccionan y desencadenan rutas de transducción de señales, siendo los más significativos los receptores RAGE (receptores de advanced glycation end-products). Este tipo de receptores pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas de la superficie celular y se encuentran en varios tipos de células: macrófagos, linfocitos, fibroblastos, neuronas, células del músculo liso, glóbulos rojos, células mesangiales, osteoblastos, etc. (Alikhani et al., 2007; Lapolla et al., 2005). La interacción AGE-RAGE estimula la generación de especies reactivas del oxígeno y desencadena una respuesta pro-inflamatoria, activando rutas de señalización y alterando la expresión de varios mediadores pro-inflamatorios. Dicha interacción es responsable de la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, que a su vez induce la expresión de genes para citoquinas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), la interleuquina 1 (IL-1) o la interleuquina 6 (IL-6), y origina también un aumento en la expresión de la molécula de adhesión VCAM-1 (Basta, 2008; Ramasamy et al., 2011).

En resumen, los efectos perjudiciales de los AGEs en los distintos tejidos se llevan a cabo por diferentes mecanismos, que se atribuyen a sus acciones químicas, pro-oxidantes e inflamatorias (Shibao y Bastos, 2011):

- Modificación de la función proteica debido a alteraciones en su estructura y conformación.
- Cambios en los tejidos como resultado de la formación de enlaces cruzados inter e intramoleculares.
- Promoción de la formación de radicales libres.
- Inducción de la respuesta inflamatoria tras unirse a receptores específicos (RAGE) u otros receptores de membrana celular.

#### **4.1. AGEs circulantes. Absorción y metabolismo.**

##### **4.1.1. Sinergismo entre AGEs circulantes y AGEs dietéticos**

Actualmente, parece bien establecido que los PRMs consumidos con la dieta incrementan la carga de AGEs formados endógenamente. Koschinsky et al. (1997) fueron los primeros que demostraron que los PRMs o AGEs dietéticos se absorbían, contribuyendo a aumentar los AGEs endógenos circulantes. Durante los últimos años se ha generado una base de conocimiento que respalda la acción sinérgica *in vivo* de los AGEs dietéticos con los formados endógenamente. Así, se ha mostrado que el incremento de AGEs circulantes consecuente al consumo de una dieta alta en AGEs, promueve el aumento de indicadores de la inflamación (Uribarri et al., 2005). En la misma línea, Lopez-García et al. (2004) establecieron una correlación positiva entre una dieta con altos niveles de AGEs y marcadores pro-inflamatorios en el plasma, como la proteína C reactiva, la IL-6 (interleuquina-6) y la sICAM-1 (molécula de adhesión intercelular soluble).

Los AGEs totales circulantes en el organismo provienen de la suma de los AGEs formados endógenamente más los exógenos absorbidos en el intestino, así como, los que se han originado *in vivo* a partir de los compuestos  $\alpha$ -dicarbonílicos dietéticos absorbidos (Degen et al., 2012). La fracción endógena incluye los AGEs formados en las



proteínas del plasma, los que están unidos a péptidos liberados de los tejidos por proteólisis extracelular y aquellos aductos procedentes de la degradación proteolítica de proteínas intracelulares (Kaňková y Šebeková, 2005).

#### **4.1.2. Tránsito metabólico de los AGEs**

Entre un 10-30 % de los AGEs ingeridos, especialmente los de menor peso molecular, se absorben en el intestino de ratas y se detectan en la circulación (Faist y Erbersdobler, 2001). Además del peso molecular, la forma en la que estos compuestos se encuentran en el lumen también influye, siendo menor la absorción si están unidos a proteínas. Así, según estableció Förster et al. (2005), la pentosidina, un compuesto fluorescente avanzado de la reacción de Maillard, se absorbía mejor cuando procedía del café que al administrarse con productos de panadería, en los cuales se encontraba unida a proteínas.

Estudios en humanos revelan que de la proporción de AGEs absorbidos con la dieta, sólo un tercio se excreta rápidamente vía renal (Faist y Erbersdobler, 2001; Koschinsky et al., 1997). Según los datos de Faist y Erbersdobler (2001), aproximadamente un 16 % de los AGEs se eliminan por heces y 3 % de los absorbidos por orina. La ingesta elevada de AGEs incrementa la concentración de estos compuestos en el suero y paralelamente aumenta su excreción en orina (Faist et al., 2000; Peppia et al., 2003a). Como se ha observado en diversos trabajos, la excreción de pentosidina, pirralina y CML, tres de los AGEs que más atención han recibido en los estudios sobre metabolismo, está altamente influenciada por sus niveles en la dieta (Delgado-Andrade et al., 2012; Förster et al., 2005), aunque los diferentes mecanismos de absorción de cada uno de ellos no se conocen con certeza y sus rutas metabólicas son objeto de numerosas investigaciones.

En el año 2003, Foerster y Henle establecieron que la pirralina de origen dietético se recuperaba casi en su totalidad en la orina, lo que indicaba que su metabolización en el organismo es prácticamente inexistente. Dos años más tarde, Förster et al. (2005) confirmaron que la excreción urinaria de pirralina, tras el consumo

de alimentos ricos en este AGE, era casi completamente de origen dietético. Sin embargo, la pentosidina se recuperó aproximadamente en un 60 %, lo que sugiere una metabolización importante, o bien una acumulación en tejidos diana.

La mayor parte de los estudios sobre el metabolismo de AGEs se centra en CML, ya que se considera un marcador de la reacción de Maillard *in vivo*. Así, un estudio en ratas a las que se les administraba CML en su dieta (110 o 310 mg/peso corporal/día) puso de manifiesto una excreción fecal entre el 15-22 % y urinaria entre 26-29 % (Somoza et al., 2006). Debe tenerse en cuenta que la excreción de CML en las heces puede subestimarse, ya que durante el proceso digestivo la microbiota intestinal es capaz de degradarla hasta compuestos de menor peso molecular (Somoza, 2005), algunos de los cuales pueden ser absorbidos, o bien, excretados por heces, por lo que su absorción no sería tan elevada como la baja presencia en heces sugeriría.

Parece existir una correlación directa entre la ingesta de CML y su eliminación en heces y orinas. En ensayos llevados a cabo en humanos, el consumo de una dieta rica en CML incrementó en un 40 % su excreción urinaria respecto a los que tomaban una dieta pobre en AGEs y su presencia en plasma fue también más alta (7 %) (Birlouez-Aragon et al., 2010). Delgado-Andrade et al. (2012), en condiciones similares, corroboraron el incremento de la excreción fecal. Sin embargo, la urinaria se correlacionaba de forma más débil, probablemente debido a que la excreción renal podría estar saturada o limitada, excediendo la capacidad de detoxificación del riñón. La saturación del aclaramiento renal también se ha descrito en el estudio de Alamir et al. (2012) tras el consumo de una dieta adicionada de galletas extruidas frente a otra con los mismos ingredientes pero incluidos sin extruir.

El destino metabólico de la CML es incierto; a pesar de lo mencionado anteriormente sigue existiendo cierta controversia entre si una dieta rica en CML incrementa los niveles circulantes del compuesto o no. Alamir et al. (2012) no observaron una correlación entre la ingesta de CML y sus niveles plasmáticos. Sin embargo, estudios en ratones (Peppas et al., 2003b) y en humanos (Uribarri et al., 2007) sí detectaron incrementos de CML circulante al administrar dietas ricas en el compuesto.

Los datos sobre acumulación de CML en órganos son escasos, recientemente se han descrito depósitos de CML en piel (Sell y Monnier, 1989), riñón (Li et al., 2012c) y corazón (Schalkwijk et al., 2004). Ninguno de estos trabajos relacionaba el depósito/formación de CML en los tejidos con el consumo de una dieta rica en CML, por lo que son necesarios estudios que asocien directamente el consumo de este compuesto con sus posibles depósitos en órganos y tejidos.

#### **4.2. Efecto de los AGEs sobre la salud**

La acumulación de AGEs en diferentes tejidos puede alterar su funcionalidad, bien por interactuar con sus receptores específicos, induciendo reacciones de glicoxidación e inflamación, o por la formación de enlaces cruzados entre proteínas de vida media larga. Por tanto, los AGEs juegan un papel muy importante en la progresión de ciertas enfermedades metabólicas y degenerativas, algunas de ellas relacionadas con el envejecimiento (Somoza, 2005).

Se han establecido asociaciones entre los AGEs y numerosas enfermedades, entre ellas: diabetes y sus complicaciones como nefropatía, retinopatía o neuropatía (Ahmed, 2005); enfermedad renal (Semba et al., 2009b); desórdenes oculares, como formación de cataratas, glaucoma y degeneración macular (Stitt, 2005); enfermedades cardiovasculares (Luevano-Contreras y Chapman-Novakofski, 2010); alteraciones pulmonares que incluyen asma, enfermedad obstructiva pulmonar crónica, fibrosis quística y fibrosis pulmonar idiopática (Nadeem et al., 2005; Rahman et al., 2006); impotencia (Cellek et al., 2013); enfermedades neurodegenerativas (Li et al., 2012a); sarcopenia (Lauretani et al., 2003); patologías óseas y articulares (Hein, 2006; Takahashi et al., 1997), entre otras. La implicación de los AGEs en el desarrollo y progreso de algunos de estos desórdenes se describe, de forma breve, a continuación.

## *Diabetes*

La hiperglicemia, asociada a la diabetes, juega un papel importante en las complicaciones vinculadas a esta enfermedad, ya que incrementa la glicación proteica y la consecuente formación de AGEs en los diferentes tejidos. Los órganos más afectados son los insulino-dependientes, que no poseen un mecanismo eficiente de restricción para la entrada de glucosa a la célula, como los glóbulos rojos, células del sistema nervioso periférico, las del cristalino ocular y células renales, por lo que se produce una alta concentración del azúcar intracelular. Además de glucosa, se acumulan en la célula otros azúcares como fructosa, fructosa-3-fosfato y compuestos dicarbonílicos tipo metilglioxal, molécula que puede ser incluso más reactiva que la propia glucosa. Todos estos pueden interactuar con grupos amino y originar glicación de proteínas. De ahí que la diabetes se relacione con la patogénesis de retinopatías, cataratas, aterosclerosis, neuropatías, nefropatías, etc. (Ahmed, 2005).

El consumo de dietas ricas en AGEs parece incrementar la progresión de la diabetes debido a un nivel más alto de AGEs circulantes. Hofmann et al. (2002) alimentaron durante 20 semanas a ratones con diabetes inducida tipo 2 con una dieta rica en AGEs y observaron un empeoramiento de la enfermedad, al detectar una mayor concentración de insulina en ayunas. La elevación de la ingesta de AGEs promueve además su acumulación renal, lo que conduce a nefropatía e hipertrofia glomerular (Zheng et al., 2002) e influye en otras complicaciones diabéticas como en la cicatrización de heridas y la aterosclerosis (Šebeková y Somoza, 2007).

## *Enfermedad renal*

La nefropatía es una enfermedad cada vez más habitual en el mundo occidental, que incrementa paralelamente a la incidencia de diabetes en la población. El riñón es un órgano diana de los AGEs, que al interactuar con sus receptores específicos, desencadena una serie de cambios estructurales asociados a la progresión de nefropatías como glomeruloesclerosis, fibrosis intersticial y atrofia tubular. Además, un descenso en la función renal conlleva una reducción del aclaramiento, que

contribuye a incrementar los AGEs circulantes y la formación endógena de estos compuestos (Bohlender et al., 2005), y esto retroalimenta la evolución de la patología.

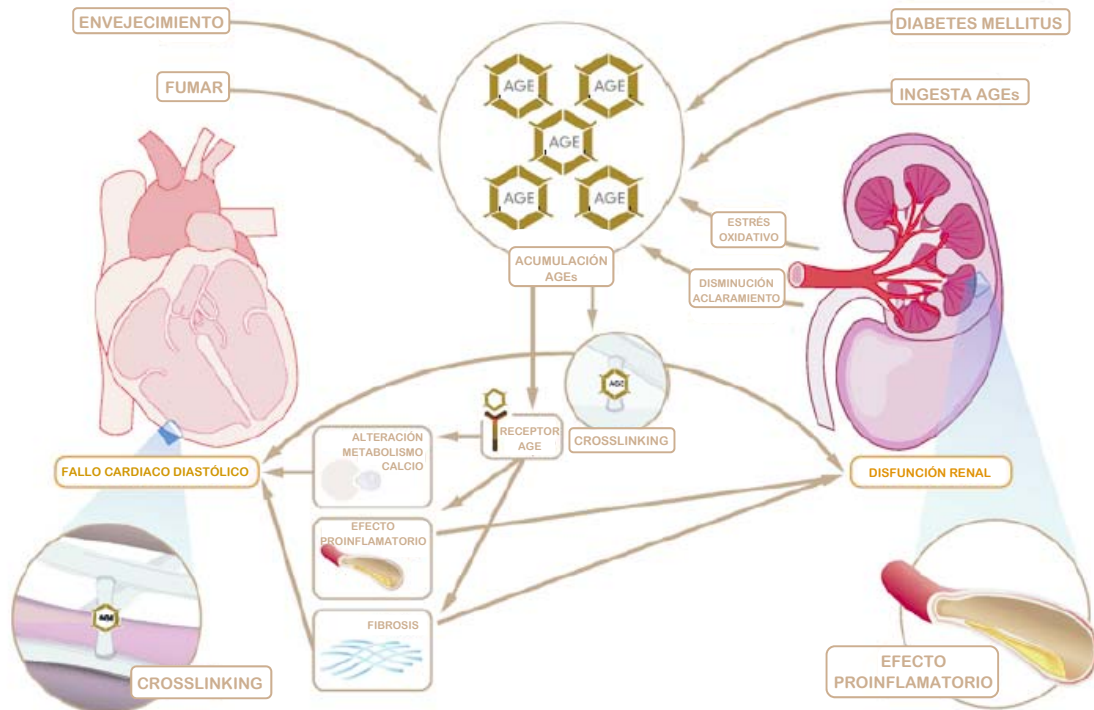
Así, varios trabajos han establecido que pacientes diabéticos, en la etapa más avanzada de la enfermedad renal, tenían una concentración de AGEs muy elevada, tanto en suero como en los tejidos (Schinzel et al., 2001). En estudios con sujetos que padecían diabetes y enfermedad renal se observó que la cantidad de AGEs acumulados en los tejidos doblaba la concentración de los pacientes diabéticos que no sufrían daño renal (Makita et al., 1991; Wagner et al., 2006). Las altas concentraciones de CML en plasma parecen correlacionarse con el daño renal, como se ha descrito en diversos trabajos en los que pacientes con alto nivel de este AGE en suero presentaron una menor tasa de filtración glomerular (Semba et al., 2009a) y una disminución de la función renal (Semba et al., 2009b).

#### *Enfermedades cardiovasculares*

Existen fuertes evidencias de que los AGEs juegan un papel importante en el desarrollo de la aterosclerosis. Esta patología se caracteriza por la formación de placas de ateroma en las paredes de las arterias, ocluyendo la luz y dificultando el flujo sanguíneo, pudiendo incluso, con el tiempo, ocasionar infarto de miocardio (Ahmed, 2005). Durante el envejecimiento, los AGEs se depositan en las paredes arteriales, especialmente en la membrana elástica y en la matriz extracelular, y forman enlaces cruzados con las proteínas de las paredes de los vasos sanguíneos, lo que reduce la elasticidad e incrementa la rigidez de las arterias. La diabetes y el consumo de una dieta rica en AGEs aceleran este fenómeno y agravan la patología (Luevano-Contreras y Chapman-Novakofski, 2010).

Otro mecanismo por el que los AGEs pueden dañar el sistema cardiovascular es disminuyendo la captación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) por las células. La LDL glicada tiene mayor capacidad para formar enlaces cruzados con el colágeno de los vasos sanguíneos, por lo que, en vez de ser introducida en las células, se acumula en la pared de las arterias. La captación por los macrófagos de esta LDL modificada conduce

a la formación de células espumosas y al desarrollo de la placa de ateroma (Bucala et al., 1994).



**Figura 4.** Representación esquemática de las vías fisiopatológicas por la que los AGEs causan insuficiencia cardíaca y disfunción renal (Willemsen et al., 2012)

Además, los AGEs disminuyen la actividad del óxido nítrico, que es un vasodilatador cuya síntesis endotelial contrarresta algunos efectos adversos de la aterosclerosis, como el engrosamiento de las paredes de las arterias. Al respecto, Xu et al. (2003) describieron que la CML puede reducir la actividad de la enzima óxido nítrico sintetasa.

En sujetos diabéticos se ha observado un aumento del nivel de AGEs en suero, comparado con sujetos sanos (Aso et al., 2000). El aumento de la concentración de AGEs circulantes, típico de la diabetes, se asocia a complicaciones microvasculares, incrementos de la rigidez arterial y deterioro de la función diastólica ventricular izquierda (Berg et al., 1999). En concreto, la acumulación de AGEs en el corazón se

relaciona con lesiones ateroscleróticas (Schleicher et al., 1997) y con una mayor rigidez del tejido cardiaco (van Heerebeek et al., 2008).

### *Enfermedades neurodegenerativas*

La patogenia de las enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer o el Parkinson se caracteriza por una pérdida progresiva y gradual del tejido nervioso y por el acúmulo de proteínas plegadas incorrectamente en el cerebro (Yamamoto y Simonsen, 2011). En el caso del Alzheimer, la enfermedad cursa con la formación de placas seniles y ovillos neurofibrilares en los que se produce acumulación de las proteínas modificadas  $\beta$ -amiloide y tau. La formación y depósito de AGEs en el cerebro contribuye al desarrollo de estas enfermedades, su presencia origina la glicación y la formación de crosslinking en las proteínas involucradas (Li et al., 2012a). Además, los AGEs pueden incrementar la producción de la  $\beta$ -amiloide, proteína implicada en esta enfermedad. Varios estudios han detectado acúmulo de AGEs en las placas seniles y en los ovillos neurofibrilares en pacientes con Alzheimer (Castellani et al., 2001; Smith et al., 1994). Li et al. (2012b) mostraron que los AGEs son capaces de inducir la hiperfosforilación de la proteína tau, afectando a la sinapsis y a la memoria.

El estrés oxidativo juega también un papel muy importante en la progresión de enfermedades neurodegenerativas. Un alto nivel de radicales libres puede promover la formación de AGEs en el cerebro y, estos productos, a su vez, son capaces de aumentar el daño oxidativo por su acción pro-oxidante anteriormente mencionada (Vicente Miranda y Outeiro, 2010). Los pacientes diabéticos tienen un riesgo elevado de padecer enfermedades neurodegenerativas debido a la alta tasa de glucosa circulante y a un mayor estrés oxidativo. Valente et al. (2010) observaron depósitos de AGEs y sobrerregulación de sus receptores específicos en el cerebro de sujetos diabéticos.

### *Sarcopenia*

La sarcopenia se caracteriza por una pérdida de masa muscular y de fuerza que dificulta la movilidad, sobre todo, en la edad adulta. La baja velocidad para caminar es uno de los marcadores utilizados para diagnosticar la enfermedad (Lauretani et al., 2003). Los AGEs pueden también intervenir en la patogenia de la sarcopenia incrementando el estrés oxidativo y la inflamación (Payne, 2006), e incluso, la glicación se ha relacionado con un descenso de la función muscular durante el envejecimiento (Haus et al., 2007). En estudios llevados a cabo en sujetos adultos mayores de 65 años, los altos niveles de CML detectados en suero se asociaron con una mayor dificultad para caminar (Sun et al., 2012) y un incremento de la debilidad muscular (Dalal et al., 2009).

### *Alteraciones óseas*

La glicación endógena afecta principalmente a las proteínas de vida media larga, entre las que se incluye el colágeno, que es el componente principal del tejido conectivo y posee un papel fundamental en las propiedades estructurales y biomecánicas de los materiales biológicos que constituye, como el hueso, el tendón o el cartílago. Cuando la glicación afecta al colágeno induce cambios en su capacidad de formar agregados supramoleculares, alteraciones en su perfil de carga, defectos en su estructura fibrilar y en su interacción con las células. En definitiva, modifica sus características bioquímicas, morfológicas y estructurales, pudiendo incluso alterar sus propiedades biomecánicas (Einhorn et al., 1988; Menzel y Reihnsner, 1991; Reiser, 1991).

El colágeno tipo I está formado por dos regiones no helicoidales, los telopéptidos aminoterminal y carboxiterminal, y una triple hélice central. Es característica la formación de enlaces entrecruzados (crosslinking) entre la zona helicoidal y no helicoidal de moléculas adyacentes, los cuales contribuyen a la fuerza y consistencia del tejido (Bailey et al., 1998). Se conocen dos mecanismos de crosslinking del colágeno que ocurren simultáneamente. Por una parte, las fibras de colágeno



recién formadas se estabilizan mediante el crosslinking enzimático, a través de enlaces divalentes entre las moléculas de colágeno mediados por las enzimas lisil-oxidasa y lisil-hidrosilasa. Se producen así derivados inmaduros que, al reaccionar entre sí, originan enlaces trivalentes y dan lugar a formas de crosslinking maduro como la piridinolina y la deoxipiridinolina. Su desarrollo en el colágeno de la matriz ósea resulta indispensable para la diferenciación osteoblástica (Turecek et al., 2008) y es beneficioso para el proceso de mineralización. Los estrógenos y el  $1,25(\text{OH})_2\text{-D}_3$  parecen ser reguladores positivos del crosslinking maduro, mientras que la actividad de la lisil-oxidasa, implicada en el inmaduro, decrece durante el envejecimiento. Por otra parte, el crosslinking no enzimático se produce por glicación o glicooxidación entre residuos de lisina e hidroxilisina presentes en la región helicoidal de la molécula con azúcares, dando lugar a AGEs crosslinking como la pentosidina o el glucosepan (Saito y Marumo, 2010). El nivel de crosslinking no enzimático incrementa con la edad, ya que los AGEs formados se van acumulando en el colágeno durante el envejecimiento y conducen a cambios de color, fluorescencia y rigidez, haciéndolo más duro y resistente a la digestión enzimática (Verzija et al., 2000). Aunque los dos tipos de crosslinking tienen lugar al mismo tiempo en el colágeno, hay que mencionar que, puesto que los contenidos de lisina, hidroxil-lisina y arginina disminuyen con la edad, el crosslinking inmaduro decrece a lo largo de la vida, mientras que el incremento de AGEs propio del envejecimiento contribuye al entrecruzamiento no enzimático, que tiene lugar preferentemente en el tejido maduro (Verzija et al., 2000).

Además del crosslinking no enzimático, formado por enlaces intermoleculares, las reacciones de glicación del colágeno pueden originar otros AGEs que no participan en el entrecruzamiento, como la CML. Su formación origina modificaciones en las cadenas laterales de los aminoácidos, que alteran el perfil de carga de la molécula de colágeno, interfieren en la regeneración tisular y deterioran la función osteoblástica, afectando a la interacción de los AGEs con receptores celulares (Bailey et al., 1998; Mercer et al., 2007).

La solubilidad del colágeno también se afecta por la glicación, para estudiar el perfil de solubilidad, Reddy (2004) aplicó diferentes tratamientos a tendones glicados (en medio neutro, ácido o con pepsina) y los comparó con los no glicados. La

proporción de colágeno soluble era más baja en tendones glicosados y, la porción insoluble tras la digestión, la parte más densamente cruzada, se incrementó. Confirmando así que la solubilidad del colágeno depende del grado de crosslinking, de forma que cuanto mayor es el grado de entrecruzamiento, menor solubilidad se observa (Schnider y Kohn, 1981).

El tejido conectivo, por su alto contenido en colágeno, es muy vulnerable a la glicación. El entrecruzamiento proteico y la acumulación de AGEs ocasionan modificaciones bioquímicas y morfológicas que alteran las propiedades estructurales del colágeno y conducen a pérdidas de funcionalidad (Reddy, 2004). Además, el crosslinking no enzimático disminuye la flexibilidad y permeabilidad de los tejidos y reduce su turnover. En este contexto, numerosos estudios han asociado los cambios producidos por la glicación no enzimática en el tejido conectivo, con alteraciones biomecánicas de tendón y hueso (Menzel y Reihnsner, 1991; Wang et al., 2001).

Las propiedades estructurales y mecánicas del **tendón** dependen de la organización de sus fibras en la red de colágeno. Con la edad, el colágeno alcanza un cierto grado de entrecruzamiento o crosslinking enzimático entre las fibras, que se considera positivo, ya que favorece sus propiedades mecánicas, pero un entrecruzamiento excesivo, como el que produce el crosslinking no enzimático, hace que el tendón sea más frágil y que pierda su elasticidad (Buehler, 2006; Haus et al., 2007). En el ya mencionado trabajo de Reddy (2004), se estableció que el incremento de resistencia y rigidez del tendón glicosado estuvo correlacionado positivamente con el colágeno insoluble y con la concentración de pentosidina y, de forma inversa, con el colágeno soluble y digestible. De ello se deduce que la glicación no enzimática introduce cambios en las características del tejido que, al aumentar su rigidez y disminuir su elasticidad, predisponen al deterioro de la funcionalidad del tendón.

La calidad del **hueso** depende de sus dos componentes mayoritarios: la fase mineral y la matriz orgánica, de forma que modificaciones en alguno de ellos afectan su comportamiento mecánico, ya que la fase mineral aporta rigidez al tejido mientras que la orgánica le confiere resistencia (Dong et al., 2010). Así, el grado de mineralización, la acumulación de microdaños y la formación de crosslinking en el

colágeno intervienen en la calidad ósea (Saito y Marumo, 2010). Vashishth et al. (2001) señalaron que la acumulación o formación de AGEs en el colágeno óseo deteriora las propiedades biológicas y mecánicas del hueso. Con la edad, la concentración de AGEs se incrementa en el hueso cortical y trabecular y se asocia con menor densidad y mineralización ósea (Odetti et al., 2005). Mientras el crosslinking enzimático del colágeno óseo se considera beneficioso porque tiene un efecto positivo en la fuerza, el crosslinking mediado por los AGEs altera las propiedades biológicas y mecánicas del hueso y conduce a disminución de la resistencia e incremento de la fragilidad ósea (Tang et al., 2007).

Por lo tanto, queda bien establecido que la funcionalidad del hueso se ve afectada por el crosslinking no enzimático. A este respecto, Vashishth et al. (2001) correlacionaron dicha acumulación con un aumento de la rigidez del colágeno óseo. En la misma línea, Wang et al. (2002) describieron que la formación de crosslinking no enzimático, medido como pentosidina, incrementaba con la edad y lo asociaron a un deterioro de la fuerza y resistencia del fémur y a un incremento de su porosidad. La pentosidina se suele emplear como marcador específico del crosslinking no enzimático en estudios de biomecánica *in vivo*, ya que se ha establecido que se acumula en el hueso durante el envejecimiento y afecta a sus propiedades mecánicas (Odetti et al., 2005).

Existen situaciones fisiopatológicas en las que la producción de AGEs puede verse exacerbada. Tal es el caso de la diabetes, en la que el incremento sostenido de glucosa plasmática favorece la glicación. Diversos autores han asociado esta patología con una reducción en la fuerza ósea y con mayor riesgo de fracturas, debido a una menor densidad mineral (Schwartz, 2003). Estudios en ratas diabéticas mostraron altos niveles de AGEs en suero y mayor acumulación de pentosidina en fémur, lo que podría estar relacionado con un progresivo deterioro de las propiedades mecánicas de sus tibias y fémures (Prisby et al., 2008; Saito et al., 2006a; Silva et al., 2009). A pesar de estos indicios, parece que los efectos de la diabetes sobre la rigidez o pérdida de elasticidad del colágeno óseo son contradictorios, ya que, aunque existen trabajos que relacionan esta enfermedad con un incremento de la rigidez (Funk et al., 2000; Reddy et al., 2001), en otros estudios no se observan modificaciones del parámetro

(Verhaeghe et al., 1994), e incluso, Einhorn et al. (1988) describieron una reducción de la rigidez ósea en ratas diabéticas.

Por otra parte, aunque aún no se conocen bien los mecanismos por los cuales estos compuestos pueden regular al comportamiento de osteoclastos y osteoblastos, parece que pueden afectar al remodelado óseo, modificando tanto la resorción como la formación del hueso. Según Sanguineti et al. (2008), los AGEs interfieren en la proliferación y la diferenciación de los osteoblastos al interactuar con sus receptores específicos RAGE y afectar la producción de proteínas de la matriz del colágeno, como la osteocalcina. Katayama et al. (1996), trabajando con ratas diabéticas, observaron que a medida que se incrementaba el nivel de AGEs en el colágeno, los marcadores óseos de formación, fosfatasa alcalina y osteocalcina, disminuían. Así como numerosos estudios relacionan la influencia negativa de los AGEs sobre la actividad osteoblástica, en el caso de los efectos sobre osteoclastos los resultados son contradictorios. Si bien Miyata et al. (1997) demostraron que los AGEs pueden inducir la actividad de los osteoclastos incrementando la resorción ósea, Valcourt et al. (2007) describieron inhibición de la resorción.

En definitiva, la formación o acúmulo de los AGEs en el hueso origina pérdidas de masa ósea y densidad mineral, menor elasticidad y resistencia a las fracturas y altera el remodelado óseo, pudiendo desacoplar los procesos de formación y resorción. Estas modificaciones contribuyen al desarrollo de la osteoporosis, enfermedad caracterizada por una fuerza ósea insuficiente y una mayor predisposición a fracturas óseas (Hein, 2006). Aunque parece bien establecido que los niveles de AGEs, CML y pentosidina, aumentan en el suero de pacientes con osteoporosis (Hein et al., 2003) y esta última se ha detectado también en tejido cortical de fémur (Odetti et al., 2005), son necesarios más estudios para establecer una correlación firme entre el acúmulo de AGEs y el desarrollo de este desorden.

Otras patologías óseas en las que los AGEs están implicados son la osteoartritis (Steenvoorden et al., 2006) y la artritis reumatoide (Hein et al., 2005). La interacción AGEs-RAGE es responsable de inducir un estado pro-oxidante y pro-inflamatorio en los tejidos, y el estrés oxidativo y los radicales libres, junto a un mayor grado de

inflamación y daño tisular, juegan un papel fundamental en la progresión de la artritis reumatoide. Takahashi et al. (1997) mostraron que los niveles de pentosidina en orina y suero eran más elevados en pacientes con dicha enfermedad activa, comparados con aquellos en los que la artritis estaba inactiva.

## **CAPÍTULO 3**

### ***Diseño experimental***

---



Estudio de la influencia del consumo de glicoproteínas del pan sobre:

**- La biodisponibilidad de calcio y fósforo**

Se analiza la influencia sobre la utilización nutritiva de calcio y fósforo mediante control de ingesta y peso, ensayos de balance mineral y distribución tisular.

**- Los parámetros físico-químicos, metabólicos y funcionales del hueso**

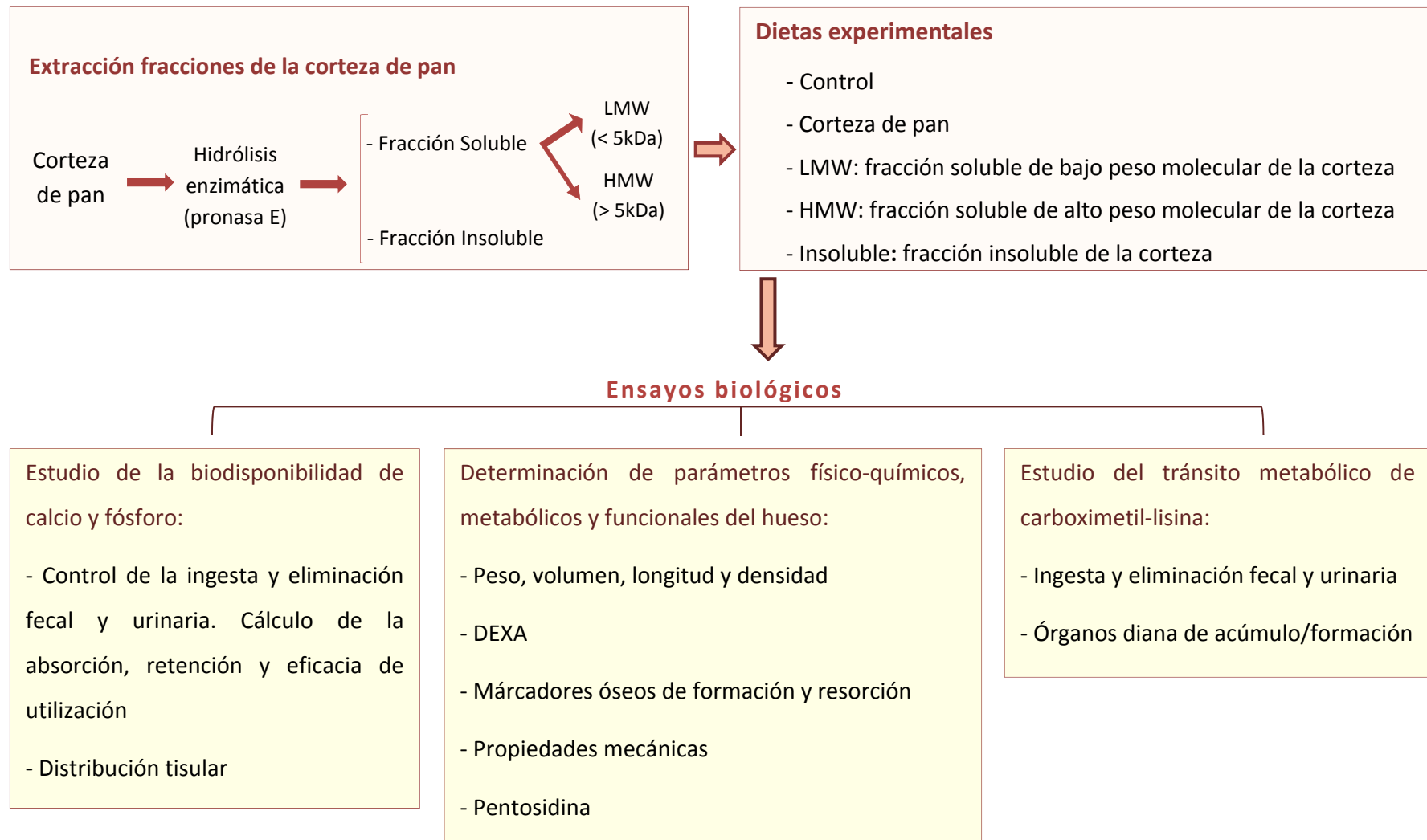
Se estudian las repercusiones sobre la composición, las propiedades físicas y mecánicas del hueso, así como, sobre algunos aspectos del metabolismo óseo.

**- El tránsito metabólico de carboximetil-lisina**

Se determina la ingesta y eliminación fecal y urinaria del compuesto, intentando dilucidar posibles órganos diana de su acumulación.



## PROCEDIMIENTO PARA ESTUDIAR LA INFLUENCIA DEL CONSUMO DE GLICOPROTEÍNAS DEL PAN



## **CAPÍTULO 4**

### ***Metodología***

---



## **1. Preparación de las muestras: extracción de la corteza de pan y de sus fracciones**

Tras el suministro del pan por la empresa GRUPO SIRO, se procedió a eliminar la miga del pan y posteriormente, la corteza se pesó, liofilizó, pulverizó y homogenizó. Una parte de la misma se almacenó a -20°C hasta el momento de la elaboración de las dietas. Otra parte se sometió a digestión enzimática con pronasa para separar las fracciones soluble e insoluble. La elección de la concentración de la enzima pronasa y del tiempo de incubación más apropiado se basó en resultados de estudios previos de nuestro grupo de investigación (Delgado-Andrade et al., 2008a). En resumen, 125 g de corteza de pan se digirieron con 750 ml de una solución de pronasa al 0,1 mg/ml (400 U/ml) en buffer fosfato 1 M pH 8,2, en un recipiente con cierre hermético a 37°C durante 72 h en baño de agua y en agitación. Tras el enfriamiento de la muestra, ésta se trató con 15 ml de una solución de ácido tricloroacético al 40 % y se centrifugó a 4500 g durante 10 min a 4°C para separar la fracción soluble de la insoluble. A continuación, la fracción insoluble se pesó, liofilizó, homogenizó y almacenó a -20°C hasta su empleo en la preparación de las dietas. Esta fracción supuso el 57,52 % del peso inicial de la corteza de pan. El procedimiento se repitió cuantas veces fue necesario para obtener suficiente muestra para la elaboración de las dietas. La fracción soluble se ultrafiltró, empleando un sistema de ultrafiltración continua semipreparativa (Pellicon, Millipore, MA, USA) para volúmenes de hasta 10 litros, con una membrana de alta capacidad de retención, con tamaño de corte de 5 kDa (Biomax polyethersulphone, 0.5 m<sup>2</sup> de superficie, 17.8 cm ancho × 21 cm largo, Millipore, MA, USA) y aplicando un flujo variable con una bomba peristáltica. La fracción constituida por compuestos con una masa molecular mayor de 5 kDa se quedó retenida en el filtro

(HMW, alto peso molecular) mientras la fracción con compuestos con una masa menor de 5 kDa se filtró (LMW, bajo peso molecular). Ambas fracciones, retentato y filtrado, se liofilizaron, pulverizaron, homogenizaron y congelaron a -20°C hasta la preparación de las dietas. La fracción soluble supuso el 42,48 % del peso de la corteza de pan inicial, de ella, 57,14 % correspondió a la fracción de alto peso molecular y 42,86 % a la de bajo peso molecular.

## 2. Preparación de las dietas experimentales

Se utilizó como dieta control la dieta AIN-93G (Dyets Inc. 110700, Pensilvania) (Reeves et al., 1993). Tomándola como base, se prepararon las dietas experimentales, por adición de la corteza de pan o sus fracciones. La composición de la dieta AIN-93G se expone en la siguiente tabla.

**Tabla 7.** Composición de la dieta estandarizada AIN-93G purificada para roedores (Dyets 110700)

Ingredientes	g/kg
Caseína	200
Almidón de maíz	397,5
Dextrosa	132
Sucrosa	100
Celulosa	50
Aceite de soja	70
t-Butilhidroxiquinona	0,014
Corrector mineral 210025	35
Corrector vitamínico 310025	10
L-cisteína	3
Colina bitartrato	2,5

Las dietas del estudio se prepararon adicionando individualmente a la dieta AIN-93G un 10 % de corteza de pan o los PRMs obtenidos de la corteza del pan, como sigue:

**Control:** dieta AIN-93G, dieta adecuada para ratas en crecimiento.

**Corteza de pan:** dieta control adicionada de 10 % de corteza de pan.

**LMW:** dieta control adicionada de la fracción soluble de bajo peso molecular en la misma proporción que estos están presentes en el 10 % de la corteza de pan.

**HMW:** dieta control adicionada de la fracción soluble de alto peso molecular en la misma proporción que estos están presentes en el 10 % de la corteza de pan.

**Insoluble:** dieta control adicionada de la fracción insoluble en la misma proporción que estos están presentes en el 10 % de la corteza de pan.

La bibliografía señala distintos porcentajes de adición de PRMs procedentes de sistemas modelo a las dietas ensayadas en animales que oscilan entre 1,5-10 % (Andrieux y Sacquet, 1984; Takeuchi et al., 1987). Hay pocos estudios que empleen PRMs aislados de un alimento, aunque Somoza et al. (2005a) y Šebeková et al. (2005) han descrito porcentajes de adición de corteza de pan entre el 5 y el 25 % a una dieta de ratas elaborada para estudiar el daño renal. En función de estos datos se eligió, en este estudio, la adicción del 10 % de corteza como valor intermedio.

La corteza de pan es una fuente importante de sodio, por lo que para mantener la concentración de este elemento en niveles similares a los de la dieta control, se mezclaron la dieta AIN-93G y AIN-93G baja en sodio en proporciones adecuadas para no sobrepasar los límites establecidos para este elemento. También se añadió carbonato cálcico, cuando fue necesario, para alcanzar los valores de la dieta AIN-93G.

Se analizaron individualmente las distintas dietas experimentales. Tras haber verificado que la concentración de los distintos nutrientes no difería entre ellas, se adoptó el valor medio de cada uno para calcular las ingestas de los balances.

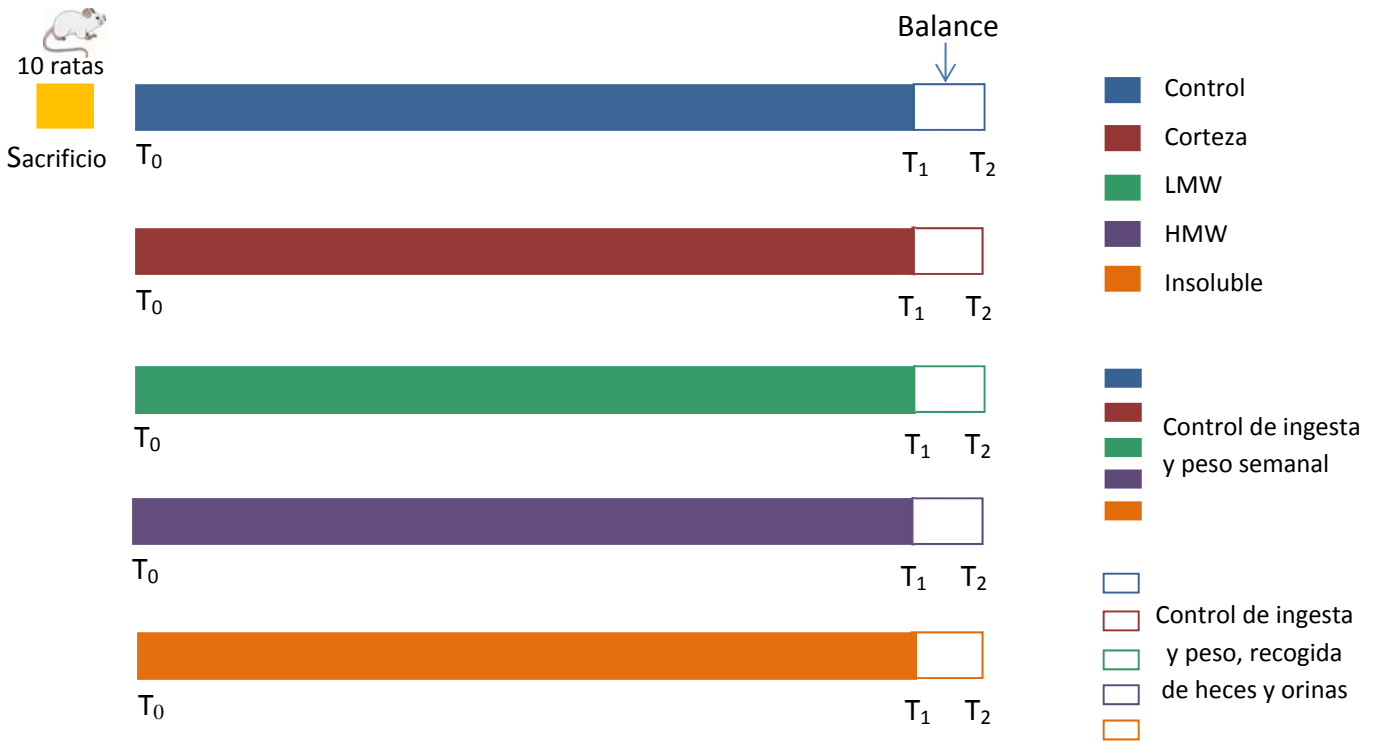
El análisis de la composición de nutrientes de las dietas ensayadas (sustancia húmeda) se especifica en la tabla siguiente.

**Tabla 8.** Composición de nutrientes de las dietas ensayadas

Dieta	Humedad	N <sub>2</sub>	Grasa	Energía	Ca	P	Na
	%	%	%	cal/g	mg/g		
Control	8,08 ± 0,23	2,79 ± 0,03	7,74 ± 0,04	4404 ± 50	4,86 ± 0,05	3,22 ± 0,08	1,30 ± 0,10
Corteza	7,90 ± 0,05	2,63 ± 0,05	7,82 ± 0,07	4293 ± 91			
LMW	8,15 ± 0,03	2,70 ± 0,06	8,03 ± 0,07	4401 ± 9			
HMW	7,97 ± 0,14	2,71 ± 0,06	7,58 ± 0,03	4371 ± 24			
Insoluble	7,23 ± 0,10	2,64 ± 0,05	7,78 ± 0,03	4400 ± 10			

Valores medios ± desviación estándar

### 3. Diseño experimental de los ensayos biológicos



**$T_0$**  10 ratas: Sacrificio inicial

**$T_1$**  Inicio del balance

**$T_2$**  {  
 6 ratas: Sacrificio para el estudio de distribución de Ca y P en diferentes órganos y demás parámetros.  
 6 ratas para evaluar el contenido mineral final total



#### **4. Ensayos de balance mineral**

Se realizó un ensayo biológico de balance de los minerales calcio y fósforo en ratas Wistar hembras recién destetadas proporcionadas por la Compañía Charles River, con un peso inicial de  $41,00 \pm 0,16$  g (media  $\pm$  error estándar). Los animales fueron distribuidos aleatoriamente en 5 grupos, de forma que no hubo diferencias significativas entre los pesos iniciales. Se alojaron en jaulas metabólicas individuales en una cámara ecológica termorregulada a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , con una humedad del 50-70 %, ventilación y fotoperíodo controlados de 12 horas.

El ensayo constó de 88 días, en los primeros 81 se llevó a cabo el control de la ingesta y la evolución ponderal de los animales; mientras que en el período final de 7 días, además de controlar estos parámetros, se realizó la recogida separada de heces y orina de cada rata para efectuar los balances de calcio y fósforo. Durante todo el tiempo de ensayo la ingesta de agua (agua Milli-Q) y alimento fue *ad libitum*.

Los balances de los minerales se estudiaron comparativamente siguiendo dos metodologías:

- Cuantificación de ingesta y recogida de heces y orina en la última semana de ensayo, denominado balance de la última semana.
- Cuantificación de ingesta total y contenido corporal inicial y final de los animales, llamado balance global o por carcasa.

##### **4.1. Balance de la última semana de ensayo**

La recogida de orina se llevó a cabo sobre ácido clorhídrico (HCl) al 0.5 %. Se filtró a través de papel Whatman núm. 40 y se enrasó convenientemente hasta un volumen final con la misma solución ácida. Las heces fueron cuidadosamente limpiadas, liofilizadas, pesadas y homogenizadas. La orina y las heces se congelaron a  $-20^\circ\text{C}$  hasta el momento de su análisis.

Tras el día 88, después de 12 h de ayuno nocturno, 6 animales de cada grupo fueron anestesiados con Nembutal (pentobarbital sódico) por vía intraperitoneal, en dosis de 5 mg/100 g de peso. Posteriormente, fueron sacrificados por exsanguinación

mediante canulación de la carótida. La sangre se centrifugó a 3000 r.p.m. para la obtención del suero. Se extrajeron hígado, bazo, riñón, intestino delgado, fémur, tibia, hueso pélvico y tendón de la cola. Todo ello se limpió convenientemente y se pesó, congelándose a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su análisis.

Todo el material utilizado para los balances minerales se lavó con una solución de  $\text{HNO}_3$  al 30 % en agua desionizada, solución en la que se mantuvo durante 12 h, tras este tiempo el material se enjuagó al menos tres veces con agua desionizada. El material quirúrgico era de acero inoxidable.

Para evitar posibles errores en el análisis de la orina, debidos a la contaminación ambiental o de los recipientes, se prepararon cápsulas blancas de recogida, que durante los períodos de balance se manipularon de la misma forma que las correspondientes a los animales y su contenido en minerales se analizó en paralelo a las muestras de los animales.

### *Índices estudiados*

Para el estudio del balance mineral se han empleado los siguientes índices:

1. Absorción aparente (A): cantidad ingerida del mineral (I) menos la cantidad eliminada en heces (F).

$$A = I - F$$

2. Utilización digestiva (A/I) o digestibilidad aparente: porcentaje absorbido del ingerido.

$$\% A/I = \frac{I-F}{I} \times 100$$

3. Retención corporal o balance aparente (R): cantidad absorbida del mineral menos cantidad eliminada en orina (O).

$$R = A - O = I - F - O$$

4. Utilización metabólica: porcentaje retenido del absorbido.

$$\% R/A = \frac{I-F-O}{A} \times 100$$

5. Utilización nutritiva global: porcentaje retenido del ingerido.

$$\% R/I = \frac{I-F-O}{I} \times 100$$

#### 4.2. Balance global

Este balance corresponde a todo el periodo experimental. Para obtener el valor del contenido inicial de minerales, al comienzo del ensayo un grupo de 10 ratas al destete se sacrificaron. A continuación se limpiaron convenientemente y se analizaron los minerales señalados. Se calculó el valor medio para cada elemento, y se utilizó como contenido corporal inicial. El contenido final de minerales se obtuvo individualmente a partir de las 6 ratas restantes de cada grupo, a las que en el sacrificio no se les extrajo ni sangre ni órganos, con objeto de conocer el contenido total de minerales. El grupo Insoluble se excluyó de este balance debido a la muerte accidental de 4 ratas, por lo que sus integrantes se emplearon todos para realizar el balance de la última semana. Con estos datos iniciales y finales se calcularon los siguientes parámetros:

1. Retención global:

$$R_{\text{global}} = \text{contenido mineral en el día 88} - \text{contenido mineral en el día 0}$$

2. Utilización nutritiva:

$$\% R_{\text{global}}/I = \frac{R_{\text{global}}}{I} \times 100$$

## 5. Determinaciones analíticas

Las determinaciones llevadas a cabo en las distintas muestras se describen a continuación y están representadas en la tabla 11.

### 5.1. Determinación de minerales

#### a) Técnicas analíticas

Al finalizar el ensayo, además del análisis de los minerales calcio y fósforo, se llevaron a cabo distintas determinaciones que se realizaron como sigue:

- Humedad por pérdida de peso en estufa a 105°C hasta peso constante (A.O.A.C., 1980).

- Cenizas por incineración en mufla a 450-500°C (A.O.A.C., 1980).

- Minerales: la determinación de calcio y fósforo se realizó previa mineralización de las muestras, bien por vía seca o por vía húmeda. En el primer caso, las cenizas se disolvieron en solución ácida HCl:HNO<sub>3</sub>:H<sub>2</sub>O 1:1:2, se filtraron con papel Whatman núm. 41 cuando fue necesario y se enrasaron hasta volumen adecuado con agua Milli-Q. La mineralización por vía húmeda se realizó disponiendo las muestras en frascos adecuados resistentes al calor, que se situaron en un baño de arena (J.R. Selecta, S.A., COMBIPLAC, núm. serie 0373930). Se las sometió a un tratamiento ácido combinado con temperatura creciente, inicialmente con HNO<sub>3</sub> durante aproximadamente 1 h a 120°C y posteriormente con mezcla HNO<sub>3</sub>:HClO<sub>4</sub> 1:4 a 210-220°C hasta conseguir la total eliminación de la materia orgánica, es decir, hasta la total transparencia de la solución. Seguidamente, se diluyeron con agua Milli-Q y se almacenaron a 4°C hasta el momento de su análisis. Las muestras biológicas de órganos y fémur se sometieron a mineralización por vía seca; mientras que dietas, heces, orinas y carcasas se digirieron mediante mineralización húmeda.

El calcio se determinó por espectrofotometría de absorción atómica (EAA) utilizando un espectrofotómetro Perkin-Elmer, Analyst 700 (Norwalk, Conn., USA). Se preparó una solución estándar de concentración 1 g/l utilizando ampollas Tritisol (Merck, Darmstadt, Alemania), a partir de la cual se obtuvo la curva patrón. Se

adicionó lantano al 0,3 % (LaCl<sub>3</sub>, Merck) en las muestras y estándares, con objeto de evitar las posibles interferencias.

La determinación del fósforo se realizó por fotocolorimetría a 820 nm (A.O.A.C., 1980) en un espectrofotómetro (Shimadzu UV-1700, modelo TCC-240A, Columbia, USA).

Las determinaciones analíticas se realizaron por triplicado en las dietas y duplicados en los materiales biológicos, en función de la cantidad de muestra disponible.

#### b) Precisión y exactitud de los análisis

Para controlar la exactitud en la determinación de minerales se empleó el siguiente patrón externo: polvo de leche (Community Bureau of Reference B.C.R., Reference Material núm. 63). El valor certificado y determinado de dicho patrón se recoge en la tabla.

**Tabla 9.** Valor certificado y determinado para el patrón externo (B.C.R.)

Mineral	Patrón	Valor certificado	Valor determinado
		mg/g	mg/g
Ca (mg/g)	Polvo en leche	13,49 ± 0,10	13,48 ± 0,04
P (mg/g)	Polvo en leche	11,04 ± 0,03	11,10 ± 0,13

La precisión de los análisis del mineral estudiado se controló también en los distintos materiales biológicos empleados en los diferentes ensayos, obteniéndose el siguiente Coeficiente de Variación interensayos (%).

**Tabla 10.** Coeficiente de Variación (C.V.) interensayo en los distintos materiales biológicos empleados (%)

Mineral	Dieta	Heces	Orina
	%	%	%
Ca	2,07	1,80	1,08
P	4,06	2,61	1,12

## 5.2. Estudios metabólicos, mecánicos y densitometría del hueso

Para conocer las diferencias en las características y metabolismo óseo tras el consumo de las dietas, se realizan las siguientes determinaciones:

### *a) Determinación de parámetros físicos del fémur y composición ósea*

Tras la extracción de diferentes huesos durante el sacrificio (fémur, tibia y hueso pélvico), se limpiaron para eliminar los restos de tejidos adheridos, se dejaron secar y se pesaron. Posteriormente, se determinaron los siguientes parámetros en el fémur:

- Peso, longitud (medida mediante un calibre de tipo Vernier), volumen y densidad (éstos dos últimos se calcularon utilizando un picnómetro de 25 cm<sup>3</sup>, Pobel, Madrid, España).

- Cenizas y matriz orgánica. Las cenizas y los minerales calcio y fósforo se determinaron tal y como se describe en el epígrafe anterior. El cálculo de la matriz orgánica se realizó por diferencia entre los pesos del fémur y de las cenizas, teniendo en cuenta un 10 % de contenido de agua en el hueso.

### *b) Densitometría ósea*

La densidad mineral ósea (BMD) y el contenido mineral óseo (BMC) se midieron por absorciometría de rayos X de energía dual (DEXA). Estas medidas se hicieron en un densitómetro Norland Stratec (Norland Corp., Fort Atkinson, WI, USA) utilizando un

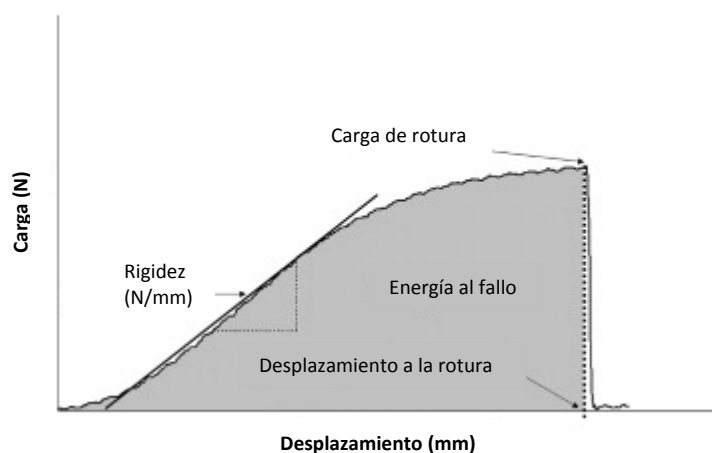
software especial para animales pequeños de laboratorio. La BMD y el BMC se midieron en el fémur y en el hueso pélvico.

### c) Análisis de las propiedades mecánicas en el hueso

Las propiedades mecánicas se calcularon mediante un ensayo de flexión a tres puntos. Para ello se utilizó un dispositivo (Warner-Bratzler) adaptado a una máquina de ensayo universal (Modelo 4501, Instron Engineering Corp., Canton, MA, USA) conectada a un ordenador Vectra ES/12 (Hewlett Packard Company, WA, USA). Las tibias se colocaron en el dispositivo, perpendiculares al módulo de carga, y se les aplicó una carga de 5 kN a una velocidad de desplazamiento de 20 mm/min, hasta provocar la rotura de cada espécimen.

Los siguientes parámetros se determinaron a partir de la curva carga-desplazamiento obtenida de los datos del ensayo de flexión: *desplazamiento a la rotura* (mm), definido como la elongación hasta la rotura; la *carga de rotura* (N), como la máxima carga soportada por el hueso en el momento del fallo, la *rigidez* (N/mm), es la pendiente de la porción lineal de la curva y la *energía al fallo* (mJ), definida como el área bajo la curva hasta la rotura.

**Figura 5.** Curva carga-desplazamiento



#### *d) Parámetros bioquímicos y marcadores del metabolismo óseo*

Para el estudio del metabolismo óseo se emplearon marcadores del turnover del hueso que pueden determinarse en suero y/o orina.

➤ Parámetros bioquímicos medidos en suero:

- Marcadores bioquímicos de formación ósea: Osteocalcina (ELISA, Rat-MIDTM Osteocalcin EIA, IDS Ltd, Boldon, UK), péptido del procolágeno tipo I (PINP) (ELISA, Rat/Mouse PINP EIA, IDS Ltd., Boldon, UK) y fosfatasa alcalina medida colorimétricamente usando para-nitrofenol fosfato como sustrato.

- Hormona PTH (Rat Intact PTH ELISA kit, Immunotopics Inc., San Clemente, CA).

- Marcadores de resorción ósea:  $\beta$ -CTX (ELISA, RatLaps™ EIA, IDS Ltd., Boldon, UK).

➤ Parámetros bioquímicos medidos en orina:

- Marcadores de resorción ósea: DPD (ELISA, Corp., San Diego, CA).

- Creatinina medida colorimétricamente.

#### *e) Contenido de pentosidina en tibia*

La pentosidina se determinó mediante el método descrito por Takahashi et al. (1995) para la hidrólisis de las muestras y el método de Scheijen et al. (2009) para la separación cromatográfica. Por la importancia y novedad de esta técnica, en la que no se incluyó proceso de desmineralización del hueso para la medida del analito se detalla con más profundidad a continuación. Se pulverizaron 150 mg de cada tibia y se sometió a hidrólisis con 3 ml de HCl 6 M en tubos pyrex herméticos con septum durante 23 h a 100°C. Previamente, antes de cerrar los tubos, la solución se burbujeó con nitrógeno puro durante dos minutos. Tras el enfriamiento de los hidrolizados, 500  $\mu$ l de la solución se evaporan a vacío y la muestra desecada se resuspendió en 200  $\mu$ l de ácido cítrico 25 mM. Finalmente, se inyectaron 50  $\mu$ l de cada muestra en un cromatógrafo (Jasco LC Pump, modelo PU-2089, Jasco Corporation, Madrid, Spain)



acoplado a un detector de fluorescencia (Jasco, model FP-2020) y a un integrador informático conectado a un PC. La pentosidina se separó en una columna ODS-B de 5  $\mu\text{m}$  (Tracer Excel 120 ODS-B 5  $\mu\text{m}$ , 250 mm x 4.0 mm i.d., Tecknokroma, Barcelona, Spain) termostaticada a 32°C. Para eluir la pentosidina se empleó el solvente A, que era ácido cítrico 25 mM, y el solvente B, compuesto por acetonitrilo-ácido cítrico 25 mM (50:50, vol/vol), comenzando con un gradiente lineal de solvente A al 99 % y a los 15 minutos se redujo al 90 %. Tras limpiar la columna con el solvente B durante 5 minutos, ésta se equilibró durante 8 minutos a la composición inicial. El flujo se estableció en 1 ml/min y el detector de fluorescencia se fijó a  $\lambda_{\text{ex}}=335$  nm y  $\lambda_{\text{em}}=385$  nm. Las muestras se analizaron por duplicado. La cuantificación de la pentosidina se realizó mediante el método del patrón externo. Para ello una solución madre que contenía 245 pmol/ml de pentosidina se usó para preparar los patrones. La calibración se elaboró con una curva patrón ( $r^2 = 0.9994$ ).

La pentosidina se expresa comúnmente en función del colágeno del tejido, el cual puede cuantificarse de forma indirecta mediante la determinación de su contenido en hidroxiprolina. La 4-hidroxiprolina se determinó en las muestras hidrolizadas mediante la técnica descrita por (Jamall et al., 1981). Se construyó una curva patrón de 7 puntos desde 0 a 1,6  $\mu\text{g}$  de hidroxiprolina en 1,2 ml de isopropanol al 50 %. A continuación, 50  $\mu\text{l}$  de una dilución 1:80 de las muestras hidrolizadas se llevaron hasta 1,2 ml con isopropanol:agua (50:50) y se añadieron 200  $\mu\text{l}$  de solución de cloramina T al 0,58 % (en buffer citrato pH 6.0). Tras 10 minutos, se adicionó 1 ml de reactivo de Ehrlich y se incubaron las muestras durante 90 minutos en un baño de agua a 50°C. Finalmente, las muestras se enfriaron en agua a temperatura ambiente durante 15 minutos y se leyeron las absorbancias a 558 nm usando el agua como referencia. El contenido de colágeno se calculó asumiendo que la cantidad de colágeno es 6 veces la masa de su contenido en hidroxiprolina (Stegemann y Stalder, 1967).

### 5.3. Evaluación del tránsito metabólico y destino del compuesto de Maillard carboximetil-lisina

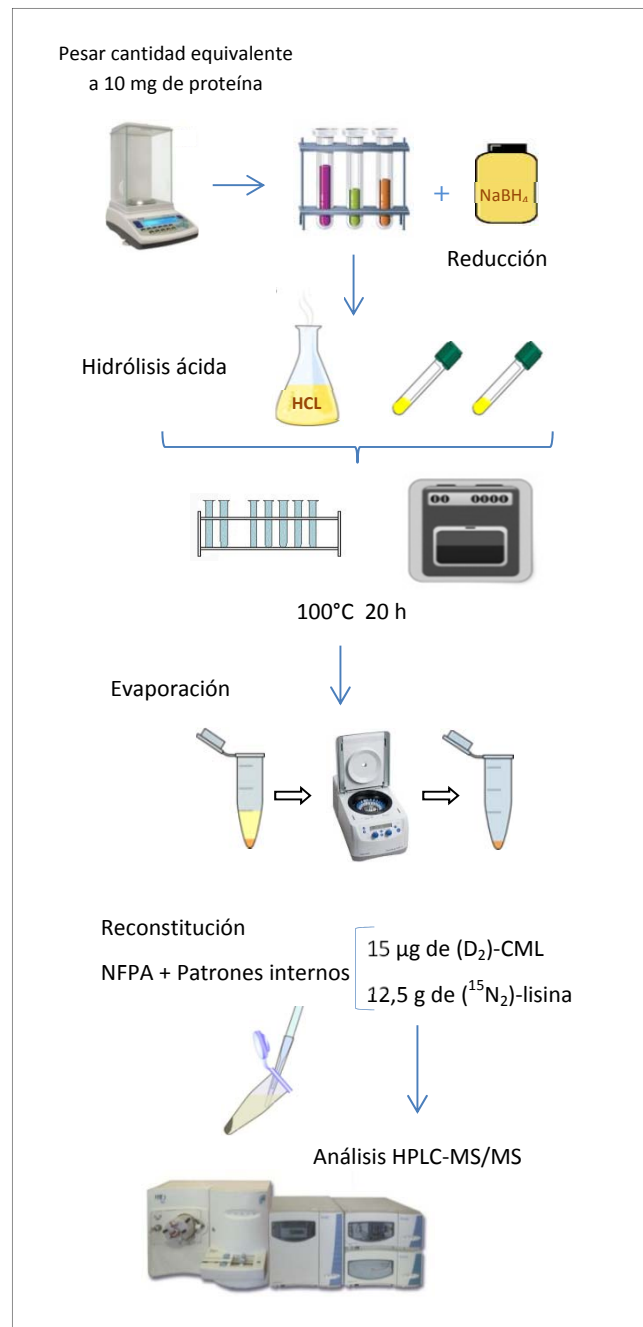
Se determinó carboximetil-lisina (CML), uno de los AGEs biológicamente más activo, en dieta, heces, orina, suero, corazón, hueso y tendón de la cola por análisis cromatográfico. Para la determinación de CML, las muestras de heces, orina y corazones se liofilizaron y pulverizaron, mientras que las dietas, suero y tendones se procesaron directamente. Los huesos se pulverizaron y homogenizaron. Para el análisis de CML, se tomó una cantidad equivalente a 10 mg de proteína de todas las muestras. El nitrógeno total en dietas, heces y orina se analizó utilizando el método Kjeldahl (Büchi Laboratoriums Technik AG, Flawil, Switzerland). En el resto de las muestras liofilizadas, el contenido de nitrógeno se midió por combustión usando un analizador LECO FP528, de acuerdo con el método Dumas. Los valores de nitrógeno se convirtieron a proteína multiplicando por el factor 6,25. Para la determinación de CML en suero, se precipitó la proteína utilizando ácido tricloroacético (TCA), como paso previo a la hidrólisis ácida.

El análisis de CML en los extractos de dietas, heces, orina, corazones y huesos, así como la CML unida a proteína del suero, se realizó en el Instituto Politécnico LaSalle Beauvais (Francia). Todas las determinaciones se hicieron por triplicado según el método desarrollado por Niquet-Léridon y Tessier (2011). Cada muestra se trató con borohidruro sódico para reducir los productos de Amadori y prevenir su conversión a CML durante la hidrólisis ácida. Una cantidad de muestra equivalente a 10 mg de proteína se disolvió en 5 ml de HCL 6 M y se incubó a 100°C durante 20 h. A continuación, 300 µl de cada hidrolizado ácido se evaporaron a vacío y se reconstituyeron con 300 µl de patrón interno que contenía 0,15 µg de (D<sub>2</sub>)-CML y 12,5 g de (<sup>15</sup>N<sub>2</sub>)-lisina disueltos en ácido nonafluoropentanoico (NFPA) 20mM antes del análisis en el HPLC-MS/MS. Estos patrones internos son isótopos de CML y lisina y siguen el mismo patrón de ionización que sus respectivos, por lo que así se incrementa la precisión y exactitud de las medidas.

Para el análisis de CML se usó cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas con una fuente de ionización de electrospray y un analizador

de masas de trampa iónica (LC-MS/MS). Se utilizaron los siguientes instrumentos y criterios: un sistema de HPLC Surveyor acoplado a un espectrómetro de masas LTQ trabajando en tándem (ThermoFisher Scientific, Courtaboeuf, France), termostatzado a 10°C. Se usó la columna Hypercarb, 100 mm × 2.1 mm, 5 µm, un volumen de inyección de 10 µl, un flujo de 0,2 ml/min y como fase móvil NFPA 20 mM en gradiente

**Figura 6.** Determinación de carboximetil-lisina



de acetonitrilo-agua de la siguiente forma: los primeros 20 min se produce un incremento lineal de acetonitrilo de 0 a 50 %; ionización por electrospray en modo positivo y monitorización de la reacción múltiple con las transiciones específicas  $m/z$  (masa/carga) 205.0/130.0 y 207.0/130.0 para CML y (D<sub>2</sub>)-CML, respectivamente, con una colisión de energía normalizada a 37 %. La lisina y su isótopo se detectaron con transiciones  $m/z$  147.0/130.0 y 149.0/131.0, respectivamente.

Por razones de desarrollo del proyecto en el que se integra esta memoria de tesis, el análisis de CML del tendón de la cola se llevó a cabo en una institución diferente, Case Western Reserve University (Cleveland, OH). La CML se determinó en las muestras sometidas a hidrólisis ácida y derivatizadas a sus trifluoroacetil-metil ésteres por cromatografía GC/MS, siguiendo el procedimiento descrito previamente por Sell et al. (2007). A pesar de que estos datos se obtuvieron por un método analítico diferente, resultan igualmente válidos al emplearse únicamente para establecer una comparación entre el contenido de CML de los tendones de los diferentes grupos de animales que consumieron las dietas experimentales, y no se compararon con los contenidos de CML en otros tejidos.

## **6. Tratamiento estadístico**















Para el estudio estadístico de los datos se utilizó el programa Statgraphics® Plus Windows® versión 5.1 (Statistical Graphics Corp., 2001).

Los resultados correspondiente a los ensayos se sometieron a un análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido del test de Duncan para comparar medias con una variación significativa ( $P < 0.05$ ).

La evaluación de las correlaciones entre las diferentes variables se realizó mediante el coeficiente de correlación de Pearson, estableciéndose la existencia de las mismas para valores de  $P < 0.05$ ; mientras que las relaciones múltiples entre variables se evaluaron por un test de regresión múltiple (correlación de Durbin-Watson), tomándose igualmente la existencia de correlación para valores de  $P < 0.05$ .

En el caso de los resultados relativos al hueso, los datos fueron también analizados mediante ANOVA de una vía considerando el peso final de los animales como covarianza. Las diferencias significativas entre los grupos ( $P < 0.05$ ) se estudiaron mediante el test de Duncan.

**Tabla 11.** Resumen de los parámetros determinados en las muestras

Análisis	Dietas	Heces	Orina	Carcasa	Suero	Riñón	Hígado	Bazo	I. Delgado	Corazón	Tendón	Fémur	Tibia	H.pélvico
														
Peso		•		•		•	•	•	•	•		•		
Volumen			•									•		
Longitud												•		
Densidad												•		
Cenizas						•	•	•	•			•		
Ca	•	•	•		•	•	•	•	•			•		
P	•	•	•		•	•	•	•	•			•		
Na	•													
Proteína	•				•					•	•	•		
DEXA												•		•
Marcadores óseos			•		•									
Parámetros bioquímicos			•		•									
Propiedades mecánicas													•	
Pentosidina													•	
CML	•	•	•		•					•	•			•



## **CAPÍTULO 5**

### ***Efectos de los productos de la reacción de Maillard procedentes de la corteza de pan en el metabolismo del calcio y del hueso en ratas***

---

Irene Roncero-Ramos, Cristina Delgado-Andrade, Ana Haro,  
Beatriz Ruiz-Roca, Francisco J. Morales, María Pilar Navarro

*Amino Acids*, 2013, 44(6): 1409-1418





## Effects of dietary bread crust Maillard reaction products on calcium and bone metabolism in rats

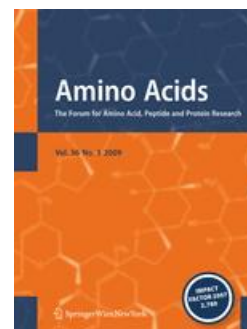
Irene Roncero-Ramos, Cristina Delgado-Andrade, Ana Haro, Beatriz Ruiz-Roca, Francisco J. Morales and María Pilar Navarro

*Amino Acids*, 2013, 44(6): 1409-1418

DOI: 10.1007/s00726-011-1160-3

Received 4th July 2011

Accepted 14th November 2011



### ABSTRACT

Maillard reaction products (MRP) consumption has been related with the development of bone degenerative disorders, probably linked to changes in calcium metabolism. We aimed to investigate the effects of MRP intake from bread crust on calcium balance and its distribution, and bone metabolism. During 88-d, rats were fed control diet or diets containing bread crust as source of MRP, or its soluble high molecular weight, soluble low molecular weight or insoluble fractions (Bread crust, HMW, LMW and Insoluble diets, respectively). In the final week, a calcium balance was performed, then animals were sacrificed and some organs removed to analyze calcium levels. A second balance was carried out throughout the experimental period to calculate global calcium retention. Biochemical parameters and bone metabolism markers were measured in serum or urine. Global calcium bioavailability was unmodified by consumption of bread crust or its isolate fractions, corroborating the previously described low affinity of MRP to bind calcium. Despite this, a higher calcium concentration was found in femur due to smaller bones having a lower relative density. The isolate consumption of the fractions altered some bone markers,

reflecting a situation of increased bone resorption or higher turnover; this did not take place in the animals fed the Bread crust diet. Thus, the bread crust intake does not affect negatively calcium bioavailability and bone metabolism.

**Keywords:** advanced glycation end-products; bone markers; calcium bioavailability; Maillard reaction products intake.

## INTRODUCTION

An adequate calcium intake is necessary for healthy bone mass, at all stages of life. Calcium plays an important role in bone mineral structure and in the prevention of age-related bone diseases. Many intervention and observational studies have demonstrated the connection between calcium intake and bone health (Heaney, 2000). Calcium is the most abundant cation in the human body and is a nutritionally essential mineral. Over 99 % of body calcium is in the skeleton, while less than 1 % is in an ionized form or bound to proteins in the extracellular fluid (Anderson and Garner, 1996). Calcium is responsible for the mechanical and structural functions of bone and teeth as well as many metabolic functions involving neuromuscular transmission, enzyme activation, muscle contraction, signal transduction, etc.

Food consumption habits of the population are changing: the intake of processed food is increasing, while consumption of dairy products, the major source of dietary calcium, is decreasing (Seiquer et al., 2006; Fernandez San Juan, 2006), such that during childhood and adolescence calcium requirements are not completely met (Elmadfa and Weichselbaum, 2005). Thermal treatment of food during industrial and/or home processing promotes the development of the Maillard reaction, which occurs between amino acids and reducing sugars (van Boekel et al., 2010). Processes such as roasting, baking or frying rely on favourable effects of the Maillard reaction, especially colour and flavour formation. These quality attributes mainly occur on the surface of the food, e.g. in bread crust, which represents one of the major Maillard reaction products (MRP) inputs to the diet, since bread contributes a high proportion of the daily energy intake (Westerterp-Plantega, 2004). Therefore, for many people, important amounts of MRP are ingested in their normal diet (Vlassara, 1996), which promotes the increase of advanced glycation end-products (AGEs) in plasma (Somoza, 2005). Numerous studies have related AGEs accumulation with osteoporosis and aging, leading to structural and functional changes in bone, in which calcium metabolism could be involved (Hein, 2006).

In *in vitro* trials, Rendleman (1987) was one of the first to report the formation of calcium complexes with different soluble and insoluble melanoidins. Thus, the kind

of pigments formed during the toasting of bread had very little ability to bind this mineral, which was also the case with the high molecular weight soluble non-dialyzable compounds in coffee.

The very few studies made of the *in vivo* effects of MRP consumption on calcium balance, mainly carried out using model systems, describe non-significant changes in calcium absorption or retention (Navarro, 2003). Studies in rats fed a heated casein-glucose-fructose mixture have reported increased urinary calcium excretion with no modifications in calcium balance (Seiquer et al., 2001). These results are in agreement with preceding studies in rats fed diets containing MRP from glucose/glycine (Andrieux and Sacquet, 1984) and glucose/glutamate (O'Brien et al., 1986). Assays carried out in our laboratory reported an increase in calcium absorption and digestibility in rats given glucose-methionine MRP diets, although no significant changes were found in calcium balance (Delgado-Andrade et al., 2006). Nevertheless, Sarriá et al. (2001) observed a decrease in calcium bioavailability in rats that consumed liquid infant formulas including MRP.

In the above-mentioned study by Delgado-Andrade et al. (2006), a reduction in bone calcium concentration was detected in 3-week old rats consuming MRP derived from glucose-methionine and glucose-lysine mixtures heated for 30 and 90 minutes, respectively. Lower calcium content in rat bones was also described by Yuan and Kitts (1994) after the rats consumed a diet containing heat-damaged casein.

The goal of the present study was to investigate the effects of the consumption of MRP from bread crust, as one of the major sources of glycotoxins in the diet, on calcium balance and its distribution, and bone metabolism. Apart from bread crust, we also evaluated the effects of diets containing its different soluble and insoluble fractions.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Chemicals**

All chemicals used were of analytical grade and were obtained from Merck (Darmstadt, Germany), unless stated otherwise. Pronase E (4 000 000 PU/g) was also purchased from this company.

### **Extraction of bread crust and its soluble and insoluble fractions**

The bread crust was supplied by a Spanish manufacturer of cereal-derived food products. Once the attached bread crumbs had been manually removed, the sample was weighted, lyophilised, powdered and homogenised. A fraction of the bread crust was then stored at -20°C until diet formulation. In order to access the MRP and melanoproteins linked to proteins, another important fraction was isolated, via enzymatic hydrolysis with pronase E. The results obtained from previous studies by our research group indicated the most appropriate pronase E concentration and incubation time (Delgado-Andrade et al., 2008). Briefly, 125 g of bread crust were digested with 750 mL of a 0.100 mg/mL pronase E solution (400 U/mL in 1M phosphate buffer, pH 8.2) in stoppered test recipients at 37°C for 72 h in a water bath under shaking. This procedure was scale-up and repeated as many times as necessary to obtain sample enough for the diets formulation. After cooling, sample was treated with 15 mL of 40 % trichloroacetic acid solution (w/v), and centrifuged at 4500 g for 10 min at 4°C to separate soluble and insoluble fraction. Afterwards, the insoluble fraction was weighted, lyophilized, homogenized and stored at -20°C until used for diet formulation. The soluble fraction was subjected to ultrafiltration employing a Pellicon Ultrafiltrate cassette connected to a cassette-style tangential flow filtration device (Millipore, MA, USA) and a flow variable peristaltic pump. A Biomax polyethersulphone membrane (0.5 m<sup>2</sup> size, 17.8 cm with x 21 cm length, Millipore, MA, USA) with 5kDa NMWL was used. Fraction constituted by compounds with a molecular mass higher than 5 kDa were retained (retentate, high molecular weight, HMW) while fraction possessing compounds with a mass below 5 kDa were filtered (filtrate, low molecular

weight, LMW). Both fractions, retentate and filtrate, were lyophilized, properly powdered and homogenised and stored at -20°C until used for diets formulation.

### **Preparation of diets**

The AIN-93G purified diet for laboratory rodents (DyetsInc, Bethlehem, PA) was used as the control diet (Reeves et al., 1993). The bread crust was added to the AIN-93G diet to reach a final concentration of 10 %. This one was named Bread crust (BC) diet. In order to determine the compounds responsible for the possible effects observed in the trial, the LMW, HMW and Insoluble fractions were also individually added to the diet in the same proportion as they were present in the 10 % of bread crust, which was calculated based on the recovery of each fraction after pronase E digestion. These diets were named LMW, HMW and Insoluble, respectively. Bread crust is a sodium source, and so, to maintain the concentration of this element at adequate levels, these diets were prepared mixing appropriate proportions of AIN-93G and low-sodium AIN-93G diets. Calcium carbonate was added when necessary to reach the values present originally in the AIN-93G diet.

The individual analysis of the different diets revealed no modification of the overall nutrient composition, compared with the Control diet (AIN-93G). The mean  $\pm$  SD nutrient content of the diets was: moisture (%)  $7.9 \pm 0.4$ ; protein (g/kg)  $168.4 \pm 4.0$ ; fat (g/kg)  $77.9 \pm 1.6$ ; Na (g/kg)  $1.34 \pm 0.02$ ; and Ca (g/kg)  $4.86 \pm 0.05$ .

The highest MRP content in the prepared diets, with respect to the Control diet, was established by analysing the furosine and hydroxymethylfurfural (HMF) contents following the procedures described by Delgado-Andrade et al. (2010). The data obtained for furosine (mean  $\pm$  S.D.) were as follows:  $28.8 \pm 0.5$ ;  $49.5 \pm 0.3$ ;  $39.7 \pm 1.4$ ;  $39.4 \pm 1.0$  and  $34.7 \pm 0.8$  mg/kg diet for Control, Bread crust, LMW, HMW and Insoluble diets, respectively. The results for HMF (mean  $\pm$  S.D.) were as follows:  $0.44 \pm 0.06$ ;  $4.26 \pm 0.02$ ;  $0.47 \pm 0.04$ ;  $0.47 \pm 0.01$  and  $0.89 \pm 0.01$  mg/kg diet for Control, Bread crust, LMW, HMW and Insoluble diets, respectively.

## Biological assays

Seventy weanling Wistar rats weighing  $41.02 \pm 0.16$  g (mean  $\pm$  SE) were involved in the study. Sixty were randomly distributed into five groups (12 animals per group) and each group was assigned to one of the dietary treatments. The animals were individually housed in metabolic cages in an environmentally controlled room under standard conditions (temperature: 20-22°C with a 12 h light-dark cycle and 55-70 % humidity). Rats had ad libitum access to their diets and demineralised water (Milli-Q Ultrapure Water System, Millipore Corps., Bedford, MA, USA). The remaining ten animals were sacrificed by anaesthesia overdose at day 0 to analyse their initial calcium body content.

The animals were fed the different diets for 88 days. Excluding the Insoluble group, in which the accidental death of four animals limited the number of trials, two different balances were carried out during the experimental period. The calcium balance for the entire experimental period, termed the 'Global balance', was calculated from the difference between the final body weight of each animal and the initial mean calcium body content ( $375.4 \pm 2.8$  mg Ca). Calcium intake was monitored during this period. Six animals from each group were sacrificed by anaesthesia overdose on day 88 to calculate their final calcium body content. None of their organs were extracted. The animals in the Insoluble group were excluded from this global balance; in this case, the balance technique described below was applied.

In the last week of the experimental period (days 82-88) another calcium balance was performed on all the animals. This test involved a preliminary 81-day period during which solid food intake and body weight changes were weekly monitored, followed by a 7-day period in which a calcium balance was performed. In this last week, faeces and urine from each animal were collected daily and stored separately as a 1-week pool. The faeces were weighed, lyophilised and then homogenised. The urine was collected on 0.5 % HCl (vol/vol), filtered (Whatman Filter Paper No. 40, ashless, Whatman, England) and diluted to an appropriate volume. To control for possible environmental contamination during the collection of urine and faeces, empty cages were manipulated in the same way as those used for the animals.



On day 88, after an overnight fast, six animals in each group were anaesthetised with sodium pentobarbital (5 mg per 100 g of body weight) (Abbott Laboratories, Granada, Spain) and terminal exsanguination was performed by a cannulation of the carotid artery. Blood was drawn to obtain serum, and the liver, right kidney, spleen, small intestine and right femur were removed, weighed and frozen at -80°C until calcium analysis.

All management and experimental procedures carried out in this study were in strict accordance with the current European regulations (86/609 E.E.C.) regarding laboratory animals. The Bioethics Committee for Animal Experimentation at our institution (EEZ-CSIC) approved the study protocol.

### **Analytical techniques**

After sacrifice of the animals to determine the global balance, whole cadavers were weighed, lyophilised and then homogenised. The liver, spleen, kidney, small intestine and femur were dry-ashed in a muffle furnace (Selecta, Mod.366, Barcelona, Spain) at 450°C and the white ashes obtained were dissolved with HCl/HNO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O (1:1:2). Aliquots of the remaining samples (urine, faeces, diets and whole cadavers) were completely digested by the addition of concentrated HNO<sub>3</sub>, HClO<sub>4</sub> and by heating at high temperatures (210-220°C) in a sand beaker. All samples were diluted with milli-Q water to an appropriate volume for calcium measurement.

The calcium analyses in all samples were carried out by flame atomic absorption spectroscopy (AAS) in a Perkin-Elmer Analyst 700 Spectrophotometer (Norwalk, Conn., U.S.A.). Standard solutions were prepared from a stock Tritisol solution of calcium (Cl<sub>2</sub>Ca in 6.5 % HCl, 1000 mg Ca). Lanthanum chloride was added to samples and standards to reach a final concentration of 0.3 %.

Pools of faeces, urine and diet were used as an internal control to assess precision. The inter-assay coefficient of variation was 1.80 % in faeces, 1.08 % in urine and 2.07 % in the diet. Milk powder (certified reference material CRM 063; Community

Bureau of Reference, Brussels, Belgium) was used to quantify accuracy, yielding a value of  $13.48 \pm 0.04$  mg/g (mean  $\pm$  SD; certified value:  $13.49 \pm 0.10$  mg/g).

All glassware and polyethylene sample bottles were washed with 10 N nitric acid, and milli-Q water was used throughout the study.

The following indices were calculated using the data for calcium intake and faecal and urinary excretion obtained in the last week of the assay: apparent absorption (ingested Ca–faecal Ca); apparent retention or balance (apparent absorption–urinary Ca); apparent absorption efficiency or digestibility (% A/I) = apparent absorption/ingested Ca  $\times$  100; apparent retention efficiency (% R/A) = apparent retention/apparent absorption  $\times$  100; and bioavailability (% R/I) = apparent retention/ingested Ca  $\times$  100. Since all the indices were calculated in apparent form, henceforth, the term ‘apparent’ will be omitted.

The parameters calculated for the global balance were global retention (final Ca body content–initial Ca body content) and global % R/I (global retention/total Ca intake  $\times$  100).

Before being dry-ashed in the muffle furnace, the relative density of each femur (at room temperature, 23°C) was determined in triplicate, using a water picnometer (25 cm<sup>3</sup>, Pobel, Madrid, Spain). Briefly, this value was calculated gravimetrically, as the ratio between the femur weight in air and in water.

### **Biochemical parameters and bone markers**

Parathyroid hormone (PTH) was determined in serum (Rat Intact PTH ELISA kit, Immunotopics Inc., San Clemente, CA, USA). Serum alkaline phosphatase (AP) was measured enzymatically by standard techniques, using para-nitrophenyl phosphate as the substrate. Osteocalcin (OC) and procollagen type I N-terminal propeptide (PINP) were analysed in serum by using an enzyme immunoassay kit (Rat-MID™ Osteocalcin EIA, IDS Ltd, Boldon, UK; Rat/Mouse PINP EIA, IDS Ltd., Boldon, UK). C-telopeptide degradation products from type I collagen ( $\beta$ -CTX) were also measured in serum, using an enzyme immunoassay kit (RatLaps™ EIA, IDS Ltd., Boldon, UK) and

desoxypyridinoline (DPD) was analysed in urine, using an immunoassay kit (Metra DPD EIA (Quidel Corp., San Diego, CA). Urine creatinine was measured using a chemical analyser (Shimadzu UV-1700, model TCC-240A, Duisburg, Germany).

### **Statistical analysis**

All data were statistically tested by one-way analysis of the variance (ANOVA), followed by Duncan's test to compare means that showed a significant variation ( $P < 0.05$ ). Analyses were performed using Statgraphics Plus, version 5.1, 2001. Evaluation of the relationship between the different variables was carried out by computing the relevant correlation coefficient (Pearson's linear correlation) at the  $P < 0.05$  confidence level.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Food intake and body weight

Food intake over the whole experimental period was significantly lower in all groups than in the Control group, and particularly in the Insoluble group, the lowest of all (Table 1). During the balance week, the food intake only decreased significantly in the Insoluble group, which points to a possible adaptative process to different dietary treatments. The decrease could be associated with MRP consumption, as has been described by many authors. Furniss et al. (1989) detected such a decrease after feeding rats with a glucose-casein heated mixture. More recently, Sarriá et al. (2001) obtained similar results with liquid infant formulas containing Maillard derivatives. The cause of the decrease in food intake could be related to a slower digestive process; some time ago, Tanaka et al. (1975) and Kimiagar et al. (1980) described a slower rate of stomach emptying, leading to an increased sensation of satiety in rats fed diets containing MRP.

**Table 1.** Food intake in the whole experimental period and in the balance week and initial and final body weight after feeding rats the different diets

Diets	Global intake	Intake in the balance week	Initial weight	Final weight
	(g)	(g/day)	(g)	(g)
Control	1311.6 ± 35.4 <sup>A</sup>	14.2 ± 0.5 <sup>A</sup>	40.8 ± 0.3	247.6 ± 5.1 <sup>A</sup>
BC	1220.8 ± 18.2 <sup>B</sup>	14.1 ± 0.3 <sup>A</sup>	41.0 ± 0.4	235.0 ± 4.4 <sup>AB</sup>
LMW	1163.3 ± 25.1 <sup>B</sup>	13.9 ± 0.3 <sup>AB</sup>	41.1 ± 0.4	236.3 ± 7.2 <sup>AB</sup>
HMW	1159.1 ± 27.5 <sup>B</sup>	13.6 ± 0.3 <sup>AB</sup>	41.2 ± 0.4	227.5 ± 5.8 <sup>B</sup>
Insoluble	1050.1 ± 24.9 <sup>C</sup>	12.9 ± 0.4 <sup>B</sup>	41.0 ± 0.4	220.7 ± 4.0 <sup>B</sup>

Values are means ± SE,  $n = 12$  except in Insoluble group ( $n = 8$ ). Different letters within a column indicate significant differences between groups ( $P < 0.05$ )

From similar initial body weights, the final weight of all animals decreased moderately with respect to the controls, but this was only statistically significant in the HMW and Insoluble groups (Table 1). In the same line, O'Brien and Walker (1988)

observed a weight decrease in the rats that consumed MRP from model systems; this was subsequently confirmed by Seiquer et al. (2010), who compared the intake of diets based on overheated or UHT milk in rats. Nevertheless, Šebeková et al. (2005) described a weight gain in rats fed a diet containing 25 % bread crust, the same food used in the diet formulation in our assay.

The lower weights recorded in the present study appear to be derived from a reduction in food intake, as demonstrated by the statistically significant correlation between these two parameters ( $r= 0.61$ ;  $P < 0.001$ ). However, the reduction in body weight was not as severe as that in food intake, and in fact it was only significant in the animals fed the HMW and insoluble fractions, where the indigestible compounds would be more abundant. Larger and more indigestible particles are known to be retained in the stomach for longer periods (Kutchai, 1998) and this situation could equally apply to the presence of MRP, as they are less digestible (Rérat et al., 2002), especially those with higher molecular weight.

### **Calcium balance**

Calcium intake in the balance week followed the same behaviour as that of food consumption, since daily calcium ingested decreased significantly in the Insoluble group with respect to the Control and BC groups, while in the HMW and LMW groups only tended to decline. Faecal calcium excretion decreased in rats fed the HMW and Insoluble diets (Table 2). Thus, calcium absorption was unmodified and its digestibility even improved in the above-mentioned groups. It is well-known that MRP can form metal complexes, although it seems that the ability to bind calcium is weaker than with respect to other cations (Rendleman, 1987; Delgado-Andrade et al., 2004). In our experimental conditions, MRP from the bread included in the diets might not have chelated calcium or formed soluble and absorbable chelates, since calcium absorption did not vary. Rendleman (1987) showed that other high molecular weight soluble compounds derived from coffee or from toasted bread have a very low affinity to bind calcium. Even if a MRP-calcium insoluble complex was formed, intestinal microflora would play an important fermentative role on MRP, improving mineral absorption

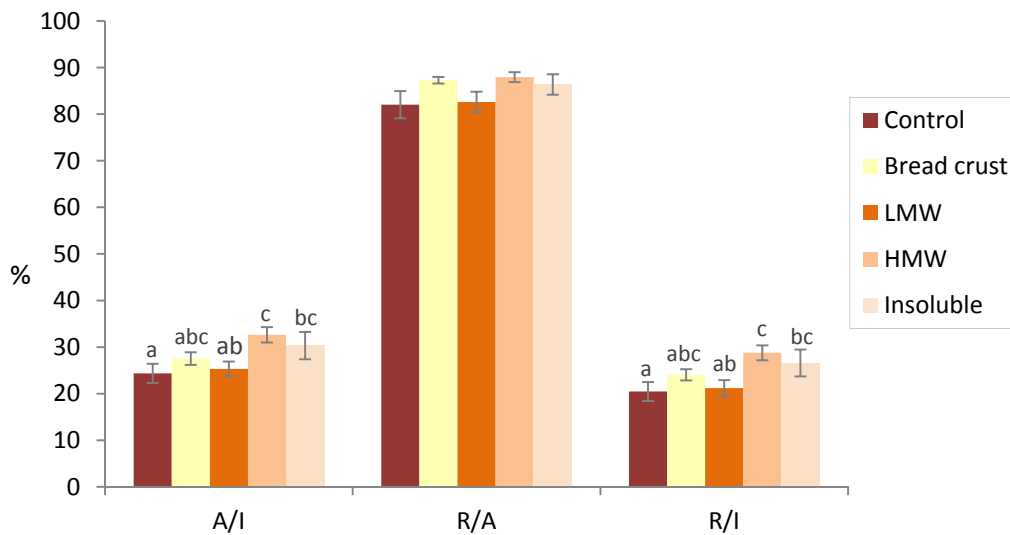
**Table 2.** Calcium final week balance in rats fed the different diets

Diets	Intake	Faeces	Urine	Absorption	Retention	Ca × P urine	Ca/creatinine urine
	(mg/day)						
Control	69.1 ± 2.2 <sup>A</sup>	52.1 ± 1.7 <sup>A</sup>	2.7 ± 0.2	17.0 ± 1.6	14.4 ± 1.6 <sup>A</sup>	18.1 ± 2.4 <sup>A</sup>	0.38 ± 0.02
BC	69.7 ± 1.2 <sup>A</sup>	50.4 ± 0.7 <sup>A</sup>	2.5 ± 0.2	19.3 ± 1.2	16.9 ± 1.1 <sup>AB</sup>	10.9 ± 1.7 <sup>B</sup>	0.36 ± 0.03
LMW	67.1 ± 1.6 <sup>AB</sup>	50.1 ± 1.4 <sup>A</sup>	2.7 ± 0.2	17.1 ± 1.2	14.3 ± 1.2 <sup>A</sup>	15.9 ± 1.5 <sup>AB</sup>	0.39 ± 0.03
HMW	66.0 ± 1.6 <sup>AB</sup>	44.4 ± 1.5 <sup>B</sup>	2.6 ± 0.2	21.6 ± 1.3	19.0 ± 1.2 <sup>B</sup>	15.3 ± 2.1 <sup>AB</sup>	0.37 ± 0.03
Insoluble	62.2 ± 2.1 <sup>B</sup>	43.2 ± 1.9 <sup>B</sup>	2.3 ± 0.2	19.0 ± 2.1	16.7 ± 2.0 <sup>AB</sup>	11.4 ± 2.0 <sup>B</sup>	0.35 ± 0.03

Values are means ± SE,  $n = 12$  except in Insoluble group ( $n = 8$ ). Different letters within a column indicate significant differences between groups  $P < 0.05$ )

(Andrieux and Sacquet, 1984). Melanoidins, the final and high molecular weight compounds of the Maillard reaction, may be degraded by microbial action in the intestine (Dell'Aquila, 2003).

**Figure 1.** Calcium biological indices in rats fed the different diets



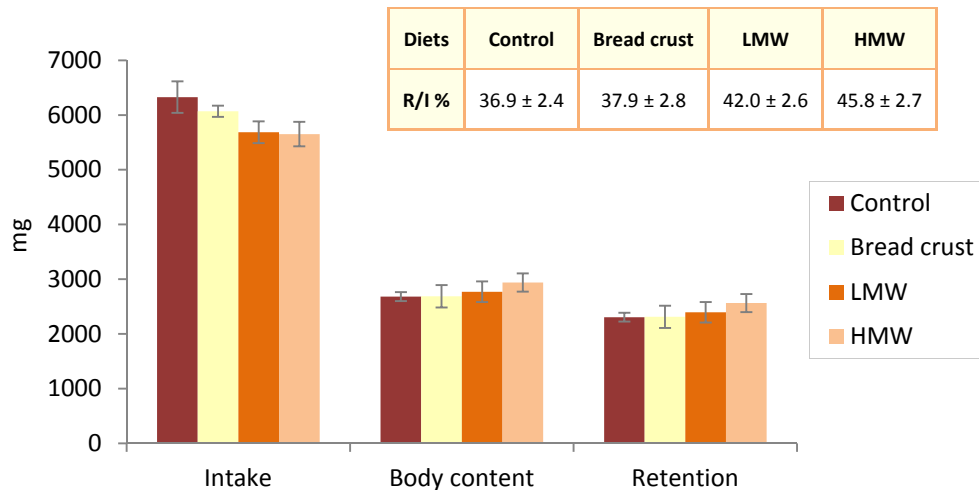
Values are mean  $\pm$  SE,  $n = 12$ , except in the Insoluble group,  $n = 8$ . Different letters within an index indicate significant differences between groups ( $P < 0.05$ )

*In vitro* and *in vivo* studies revealed no changes in calcium absorption efficiency associated with MRP consumption. Assays by our research group using the Caco-2 cell line have shown no effects on the percentage of calcium transported in the presence of MRP from the glucose-lysine model system heated for 30 min at 150°C (Delgado-Andrade et al., 2006). However, when the MRP come from a more complex system, casein-glucose-fructose heated for 60 min at 150°C, the amount of transported calcium increased (Seiquer et al., 2001), which is in accordance with the higher calcium digestibility observed in the HMW and Insoluble groups (Fig. 1). The older *in vivo* studies performed by Adrian and Boisselot-Lefebvres (1977) reported an increase in calcium digestibility when products obtained from xylose-lysine and glucose-glycine systems were added to the normal diet of rats, but recent works have indicated no changes in rats fed a glucose-lysine heated mixture (Delgado-Andrade et al., 2006).

Studies of MRP have shown decreases in calcium absorption and increases in calcium digestibility in rats consuming in-bottle-sterilized infant formulas compared with powder formulas (Sarriá et al., 2001), but no effects on calcium digestibility after feeding rats a diet with overheated milk compared with a UHT milk diet (Seiquer et al., 2010). In the same line, in a study of male adolescents, intake of a MRP-rich diet was not found to modify calcium absorption or its digestibility (Mesías et al., 2009).

Although other studies have reported an increased urinary elimination of minerals, especially trace elements, after MRP consumption (Furniss et al., 1989; Fairweather-Tait et al., 1989; O’Brien et al., 1994; Seiquer et al., 2001), in the present assay, urinary calcium remained unchanged during the last week balance (Table 2), even when expressed as a creatinine function (Table 2); this finding is in agreement with the non-modification of calcium excretion in urine observed by Delgado-Andrade et al. (2006).

**Figure 2.** Calcium global balance in rats fed the different diets



Values are mean ± SE,  $n = 6$ . No significant differences were found between groups ( $P < 0.05$ )

Calcium retention in the last week balance was higher in the HMW group (Table 2), but over the whole experimental period, this retention did not vary (Fig. 2), although it was observed to be a trend toward increased body content and retention,



in all groups with respect to the controls. Taking into account the animals' body weight, the retention (mean  $\pm$  S. E.; mg Ca/g body weight) was as follows:  $9.37 \pm 0.25$ ;  $9.82 \pm 0.69$ ;  $9.97 \pm 0.57$  and  $10.65 \pm 0.56$  for Control, BC, LMW and HMW groups, respectively; with a *P-value* = 0.06 in the latter group *versus* the Control one.

As the retention efficiency (% R/A) remained unchanged in the last week of the assay (Fig. 1), the higher calcium bioavailability in animals fed the HMW and Insoluble diets could be a direct consequence of improved calcium digestibility (Fig. 1), probably as an adaptive response to a lower food intake. But this increase does not seem particularly significant since it is not reflected in the global balance (Fig. 2), although once again the highest value was found in the HMW group.

The bioavailability values obtained in the two kinds of balance should be evaluated in relation to the different periods considered. In the last week balance, the rats are adult, have reached maturity and their calcium needs are stable. Considering the whole experimental period, in the first weeks calcium necessities would be higher, for growth and bone mass accumulation. These weeks of increased requirements decisively influence the greater calcium bioavailability values found during the three months. Accordingly, experiments carried out feeding rats the AIN-93G diet for three weeks after weanling have reported a bioavailability value of around 65 % (Delgado-Andrade et al., 2006).

Different studies have reported decreases (Sarriá et al., 2001) as well as no changes (Seiquer et al., 2001; Delgado-Andrade et al., 2006) in calcium bioavailability in rats consuming diets supplemented with different MRP, as was the case in our own experiment in rats fed the BC diet. Human assays using MRP-rich or poor diets also report stability in this respect (Mesías et al., 2009).

### **Calcium content in different organs**

The weights of the liver, spleen and small intestine did not differ with respect to the Control group (Table 3). Nevertheless, a general reduction, statistically significant in the BC group, was observed in kidney, and femur weight in all the animals

**Table 3.** Calcium content and concentration in organs of rats fed different diets

Sample	Control	BC	LMW	HMW	Insoluble
<b>Liver</b>					
weight (g)	6.15 ± 0.29	6.05 ± 0.23	6.30 ± 0.27	6.00 ± 0.21	5.81 ± 0.17
Ca (µg)	331.8 ± 22.7 <sup>AB</sup>	389.4 ± 43.8 <sup>B</sup>	251.7 ± 16.5 <sup>C</sup>	286.5 ± 9.7 <sup>AC</sup>	270.9 ± 10.2 <sup>AC</sup>
Ca (µg/g)	54.5 ± 4.1 <sup>A</sup>	64.1 ± 6.0 <sup>B</sup>	40.3 ± 2.2 <sup>C</sup>	47.8 ± 1.0 <sup>AC</sup>	46.6 ± 1.4 <sup>AC</sup>
<b>Kidney</b>					
weight (g)	0.77 ± 0.03 <sup>A</sup>	0.68 ± 0.01 <sup>B</sup>	0.71 ± 0.03 <sup>AB</sup>	0.71 ± 0.03 <sup>AB</sup>	0.69 ± 0.03 <sup>AB</sup>
Ca (µg)	77.3 ± 4.2	72.7 ± 4.8	81.3 ± 6.3	81.8 ± 5.0	69.2 ± 4.5
Ca (µg/g)	100.2 ± 3.3 <sup>A</sup>	107.0 ± 5.8 <sup>AB</sup>	113.9 ± 4.1 <sup>B</sup>	114.3 ± 3.6 <sup>B</sup>	99.5 ± 3.0 <sup>A</sup>
<b>Spleen</b>					
weight (g)	0.50 ± 0.02	0.49 ± 0.02	0.48 ± 0.03	0.49 ± 0.03	0.46 ± 0.03
Ca (µg)	15.2 ± 0.8 <sup>A</sup>	17.4 ± 1.2 <sup>A</sup>	27.5 ± 2.1 <sup>B</sup>	30.9 ± 1.5 <sup>B</sup>	26.8 ± 1.5 <sup>B</sup>
Ca (µg/g)	30.3 ± 1.7 <sup>A</sup>	35.8 ± 2.1 <sup>A</sup>	58.7 ± 7.1 <sup>B</sup>	64.5 ± 5.6 <sup>B</sup>	59.6 ± 4.4 <sup>B</sup>
<b>Small intestine</b>					
weight (g)	4.72 ± 0.21	4.58 ± 0.19	4.95 ± 0.30	4.37 ± 0.19	4.60 ± 0.11
Ca (µg)	550.5 ± 42.8	636.3 ± 85.7	462.4 ± 49.9	472.5 ± 82.3	534.6 ± 70.7
Ca (µg/g)	116.8 ± 7.3 <sup>AB</sup>	139.6 ± 19.8 <sup>A</sup>	93.0 ± 8.0 <sup>B</sup>	106.8 ± 16.1 <sup>AB</sup>	114.8 ± 13.9 <sup>AB</sup>
<b>Femur</b>					
weight (g)	0.59 ± 0.05 <sup>A</sup>	0.51 ± 0.02 <sup>B</sup>	0.51 ± 0.02 <sup>B</sup>	0.51 ± 0.02 <sup>B</sup>	0.49 ± 0.01 <sup>B</sup>
relative density	1.50 ± 0.03 <sup>A</sup>	1.44 ± 0.04 <sup>AB</sup>	1.37 ± 0.03 <sup>B</sup>	1.37 ± 0.04 <sup>B</sup>	1.38 ± 0.02 <sup>B</sup>
Ca (mg)	119.9 ± 6.8	115.6 ± 3.9	116.8 ± 6.0	115.1 ± 3.9	112.0 ± 1.7
Ca (mg/g)	207.2 ± 5.2 <sup>A</sup>	227.4 ± 3.4 <sup>B</sup>	230.2 ± 2.2 <sup>B</sup>	225.2 ± 2.9 <sup>B</sup>	229.8 ± 1.3 <sup>B</sup>
Ca/P ratio	2.13 ± 0.03 <sup>A</sup>	2.23 ± 0.02 <sup>B</sup>	2.21 ± 0.04 <sup>AB</sup>	2.17 ± 0.01 <sup>AB</sup>	2.14 ± 0.03 <sup>A</sup>

Values are means ± SE, *n* = 6 except in Insoluble group (*n* = 8). Different letters within a row indicate significant differences between groups (*P* < 0.05)

fed diets containing BC or its fractions. Similarly, reductions have been documented in kidney, liver and femur weights after the consumption of different MRP (Delgado-Andrade et al. 2006; Seiquer et al., 2010); on the other hand, there are also many reports of increased weights of rats' liver and kidney (Lee et al., 1982; O'Brien and Walker, 1988). Šebeková et al. (2005), also working with a rat diet added 25 % of bread crust reported a significant increase in both liver and kidney weights.

The results for calcium content and concentration in the organs varied considerably (Table 3). Consumption of bread crust increased hepatic calcium concentration, mainly due to higher levels of calcium deposit in the organ. This is in agreement with results reported by Delgado-Andrade et al. (2005), and those of others, for whom the liver is an important organ in the metabolism of MRP and a target for their accumulation (Homma and Fujimaki, 1981; O'Brien and Morrissey, 1989). However, when bread crust fractions were consumed separately, the effect was opposite and more prominent in the LMW group. Therefore, the increase in hepatic calcium concentration must be a joint action of all the bread crust components.

Renal calcium concentration was higher after consumption of the LMW and HMW diets, but not in the case of the BC diet. Therefore, in some way, the compounds incorporated in the LMW and HMW diets increased the amount of calcium in the kidney, another preferential target organ for MRP (Tuohy et al., 2006). The Ca × P product in urine (Table 2) was significantly lower or tended to decrease in all groups respect to the controls, as a result of decreased urinary phosphorus excretion (data not shown). Similar results were observed in the study by Delgado-Andrade (2002).

Splenic calcium content and concentration were significantly higher after consumption of the bread crust fractions, but this hyperconcentration was not present in the animals fed the BC diet, in which all the fractions were present. Therefore, in a realistic situation, the consumption of bread crust must not affect splenic calcium deposit. No previous data have been found in the literature regarding the effect of MRP on calcium concentration in the spleen.

In the small intestine, the calcium concentration was lower in the LMW group than in the BC group. The effects of MRP on calcium concentration in the small

intestine have been very little studied; to the best of our knowledge, the only reports available are from Seiquer et al. (2010), who, in disagreement with our data, described a marked rise in intestinal calcium after feeding rats a diet based on overheated milk.

### **Bone effects**

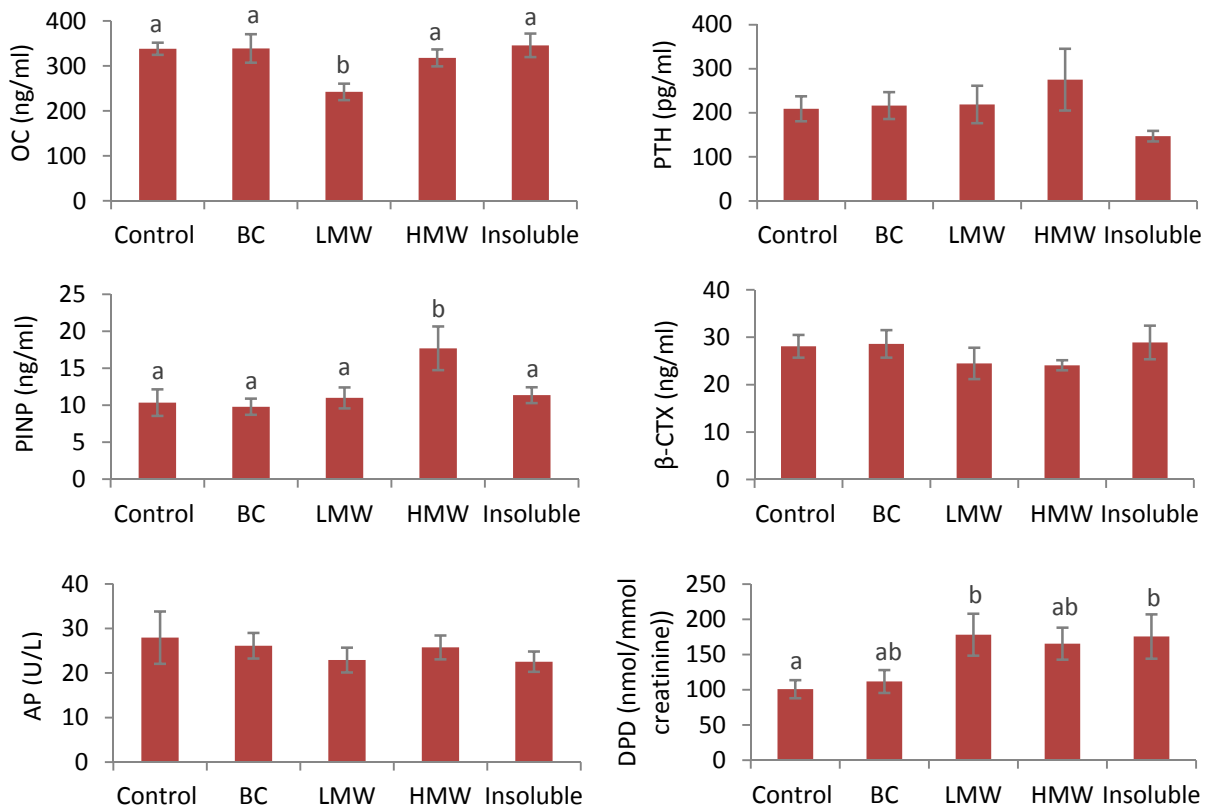
The most interesting results were observed in the femur. The lower femur weight was strongly correlated with the final body weight of the animals ( $r = 0.65$ ;  $P = 0.0001$ ). In this respect, the literature describes reductions in bone strength and a decreased ash content in animals consuming diets including MRP, but these authors report simultaneous decreases in calcium content (Gregor and Emery, 1987; Yuan and Kitts, 1994). However, in the present study total femur calcium was unchanged and the concentration significantly enhanced in all the groups respect to the Control one. But the higher calcium concentration should form part of the normal bone structure, since the Ca/P ratio remained stable, except in the case of the BC group, in which it increased slightly. Previous research by our team revealed diminished Ca/P ratios when different MRP from model systems or from milk were included in rats' diets (Delgado-Andrade et al., 2006; Seiquer et al., 2010), but these assays were developed in shorter experimental times (21 and 28 days, respectively) in weaning rats.

The data obtained lead us to believe that the consumption of bread crust or its isolate fractions does not seriously affect bioavailability or the bone deposit of calcium, since mineralization appeared to be adequate. Nevertheless, the relative density decrease in all bones compared with controls, pointing to a possible effect by MRP on the organic matrix, and suggests the beginning of changes in the constitution of the bone framework. The relation between MRP, usually named AGEs *in vivo*, and the development and progress of degenerative bone disorders is well described (Hein, 2006; Saito, 2009).

The accumulation of AGEs in bone has been linked with bone adynamia, since the presence of these products, both *in vivo* and *in vitro*, causes inhibition or depression in the production of bone procollagen and osteocalcin (Yamamoto et al.,

2001). In diabetes-induced rats, as well as in *in vitro* tests on primary cultures of bone, AP and osteocalcin decrease as AGEs level increase in collagen (Katayama et al., 1996). In the same line, Sanguineti et al. (2008) reported that pentosidine, a fluorescent AGE, exerted a negative effect on bone AP expression, although without modifications in the expression of osteocalcin.

**Figure 3.** Biochemical parameters and bone metabolism markers in urine or serum in rats fed different diets



Values are mean ± SE,  $n = 6$ , except in the Insoluble group,  $n = 8$ . Different letters within a parameter indicate significant differences between groups ( $P < 0.05$ )

In view of our results, a situation of bone adynamia, as described by Franke et al. (2007), cannot be supported, since AP and PINP, a bone formation marker, did not decrease, even the last one increased in the HMW group. This fact together with a

trend to increase the DPD value could indicate a situation of higher turnover. On the other hand, osteocalcin levels, also marker of formation, only decreased in the LMW group (Fig. 3), where DPD was also greater. Both facts would indicate the predominance of the bone resorption. Accordingly, the relative density measured in the femurs of the animals given the LMW diet was among the lowest values, and a statistically significant positive correlation was found between osteocalcin and relative density ( $r = 0.42$ ;  $P = 0.0288$ ), suggesting a lower bone matrix in this group.

Pyridinoline and DPD are enzymatic mature cross-linking markers in bone. The enzymatic and non-enzymatic cross-linking seems to occur simultaneously and competitively, such that AGEs deposit in bone is the result of a mechanism of competitive inhibition with the enzymatic cross-linking formation (Saito et al., 2006). Accordingly, these authors report lower levels of pyridinoline and DPD in fractured bones compared with healthy bones, with a parallel increase in the accumulation of pentosidine and higher urinary excretion of DPD.

As described, the groups that consumed the bread crust fractions presented urinary DPD levels that were about 50 % higher than the controls (Fig. 3). Since DPD comes almost exclusively from bone, a urinary increase suggests a situation of increased bone resorption or perhaps higher turnover. In the contrary, in animals consuming the whole bread crust, the only realistic diet of those tested, this effect did not appear, despite the fact that bread crust consumption supposes the intake of the HMW, LMW and insoluble fractions. However, fractions naturally present in the bread crust can be different from those artificially obtained after pronase digestion. It is possible that the action of pronase and subsequent gastrointestinal digestion generates products with a more negative effect than those resulting from the normal digestion of the bread crust *in vivo*. In this normal digestion a variety of products that modulate each other are originated and the isolate effect of each fraction is counteracted.

The bone resorption marker (Fig. 3),  $\beta$ -CTX, which together with  $\alpha$ -CTX indicate isomerisation phenomena, and reflect maturation and aging in the collagen (Viguet-Carrin et al., 2006; Forwood and Vashishth, 2009), did not present any modifications in

our assay. This fact seems logical, since in the scientific literature focused on collagen glycation this marker is not among those most commonly studied to assess the effects of AGEs on bone health.

Finally, PTH, the main regulator of calcium metabolism, did not vary among the groups (Fig. 3), which is in accordance with the stability observed in serum calcium levels.

## **Conclusion**

In our study MRP from bread, consumed as bread crust or its different fractions, did not modify calcium bioavailability in the diet considering the whole experimental period. This fact supports the well-established idea that MRP have a low affinity for calcium compared with other divalent cations. Despite none effect was found in calcium bioavailability, a higher calcium concentration was shown in femur of all animals due to lighter bones having a lower relative density. The isolate consumption of bread crust fractions slightly altered some bone markers, suggesting a situation of increased bone resorption or higher turnover. In the contrary, whole bread crust consumption did not modify bone features. Therefore, the results obtained using a food submitted to a physiological digestive process are not similar to the intake of its fractions isolated in the laboratory. These findings lead us to believe that studies carried out in model systems should always be completed with real-food systems, in the same way that they are usually processed and consumed, in order to derive realistic data that really help us understand the *in vivo* effects of AGEs.

## **Acknowledgments**

This work was supported by a project of the Spanish Ministry of Science and Innovation. The authors thank Grupo Siro, a Spanish manufacturer of cereal-derived food products, for supplying the bread crust samples. Authors declare no conflict of interest.

## REFERENCES

- ADRIAN J, BOISSELOT-LEFEBVRES J (1977). Interrelations entre les produits de la réaction de Maillard et le métabolisme calcique. *Cahiers Nutr Diet*, 12, 233-234.
- ANDERSON JJB, GARNER SC (1996). Dietary issues of calcium and phosphorus. In: *Calcium and Phosphorus in health and disease*. Eds: JB John. Florida, CRC Press.
- ANDRIEUX C, SAQUET E (1984). Effects of Maillard's reaction products on apparent mineral absorption in different parts of the digestive tract. The role of microflora. *Reprod Nutr Develop*, 23, 379-386.
- DELGADO-ANDRADE C (2002). Reacción de Maillard: Influencia sobre la biodisponibilidad mineral (Doctoral thesis). Granada, Spain.
- DELGADO-ANDRADE C, SEIQUER I, NIETO R, NAVARRO MP (2004). Effects of heated glucose-lysine and glucose-methionine model systems on mineral solubility. *Food Chem*, 87, 329-337.
- DELGADO-ANDRADE C, SEIQUER I, NAVARRO MP (2005). Comparative effects of glucose-lysine versus glucose-methionine Maillard reaction products consumption: *in vitro* and *in vivo* calcium availability. *Mol Nutr Food Res*, 49, 679-684.
- DELGADO-ANDRADE C, SEIQUER I, NAVARRO MP (2006). Changes in calcium absorption and subsequent tissue distribution induced by Maillard reaction products: *in vitro* and *in vivo* assays. *J Sci Food Agric*, 86, 271-278.
- DELGADO-ANDRADE C, RUFÍAN-HENARES JA, MORALES FJ (2008). Optimised procedure to analyse Maillard reaction-related fluorescence in cereal-based products. *Czech J Food Sci*, 26, 339-346.
- DELGADO-ANDRADE C, SEIQUER I, HARO A, CASTELLANO R, NAVARRO MP (2010). Development of the Maillard reaction in foods cooked by different techniques. Intake of Maillard-derived compounds. *Food Chem*, 122, 145-153.
- DELL'AQUILA C (2003). Microbial degradation of heated gluten-glucose systems. Implications for gut health. In: *Melanoidins in Food and Health*. Eds: Vegarud G,



- Morales F. Office for Official Publications of the European Communities. Luxemburgo, 177-179.
- ELMADFA I, WEICHELBAUM E (2005). Energy and nutrient intake in the European Union. European Nutrition and Health Report 2004. *Forum Nutr*, 58, 19-46.
- FAIRWEATHER-TAIT SJ, PORTWOOD DE, SYMSS LL, EAGLE SJ, MINSKI MJ (1989). Iron and zinc absorption in human subjects from a mixed meal of extruded and nonextruded wheat bran and flour. *Am J Clin Nutr*, 49(1), 151-155.
- FERNÁNDEZ SAN JUAN PM (2006). Dietary habits and nutritional status of school aged children in Spain. *Nutr Hosp*, 21(3), 374-378.
- FORWOOD MR, VASHISHTH D (2009). Translational aspects of bone quality—vertebral fractures, cortical shell, microdamage and glycation: a tribute to Pierre D. Delmas. *Osteoporos Int*, 20(3), 247-253.
- FRANKE S, SIGGELKOW H, WOLF G, HEIN G (2007). Advanced glycation end products influence the mRNA expression of RAGE, RANKL and various osteoblastic genes in human osteoblasts. *Arch Physiol Biochem*, 113(3), 154-161.
- FURNISS DE, VUICHOUD J, FINOT PA, HURRELL RF (1989). The effect of Maillard reaction products on zinc metabolism in the rat. *Brit J Nutr*, 62, 739-749.
- GREGOR JL, EMERY SM (1987). Mineral metabolism and bone strength of rats fed coffee and decaffeinated coffee. *J Agric Food Chem*, 35, 551-556.
- HEANEY RP (2000). Calcium, dairy products and osteoporosis. *J Am Coll Nutr*, 19(2), 83-99.
- HEIN GE (2006). Glycation end products in osteoporosis - Is there a pathophysiologic importance? *Clin Chim Acta*, 371, 32-36.
- HOMMA S, FUJIMAKI M (1981). Growth response of rats fed a diet containing nondialyzable melanoidins. *Prog Food Nutr Sci*, 5, 209.

- KATAYAMA Y, AKATSU T, YAMAMOTO M, KUGAI N, NAGATA N (1996). Role of nonenzymatic glycosylation of type I collagen in diabetic osteopenia. *J Bone Miner Res*, 11(7), 931-937.
- KUTCHAI HC (1998). Gastrointestinal secretion. In: *Physiology* (4ed). Eds: Berne RM, Levy MN, Koeppen BM, Stanton BA. Mosby Inc, St. Louis, 617-646.
- KIMIAGAR M, LEE TC, CHICHESTER CO (1980). Long-term feeding effects of browned egg albumin to rats. *J Agric Food Chem*, 28, 150-155.
- LEE TC, PINTAURO SJ, CHICHESTER CO (1982). Nutritional and toxicological effects of nonenzymatic Maillard browning. *Diabetes*, 31, 37-46.
- MESÍAS M, SEIQUER I, NAVARRO MP (2009). Influence of diets rich in Maillard reaction products on calcium bioavailability. Assays in male adolescents and in Caco-2 cells. *J Agric Food Chem*, 57, 9532-9538.
- NAVARRO MP (2003). Impact of Maillard reaction products on mineral bioavailability. In: *Bioavailability of micronutrients and minor dietary compounds. Metabolic and Technological Aspects*. Eds: Vaquero MP, García-Arias T, Carbajal A, Sánchez-Muniz FJ. Research Signpost, Kerala, India, 133-145.
- O'BRIEN J, MORRISSEY PA, FLYNN A (1986). The effect of Maillard reaction products on mineral homeostasis in the rat. In: *Proceedings of EURO-FOOD TOX II*. Institute of Toxicology, Swiss Federal Institute of Technology. Zurich, Switzerland, 214.
- O'BRIEN J, WALKER R (1988). Toxicological effects of dietary Maillard reaction products in the rat. *Food Chem Toxicol*, 26, 9, 775-783.
- O'BRIEN J, MORRISSEY PA (1989). Nutritional and toxicological aspects of Maillard browning reaction in foods. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 28, 211-248.
- O'BRIEN J, MORRISSEY PA, FLYNN A (1994). Alterations of mineral metabolism and secondary pathology in rats fed Maillard reaction products. In: *Maillard Reactions in Chemistry, Food and Health*. Eds: Labuza TP, Reineccius GA, Monnier VM, O'Brien J, Baynes JW. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 393-401.

- REEVES PG, NIELSEN FH, FAHEY GC (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*, 123, 1939-1951.
- RENDLEMAN JA (1987). Complexation of calcium by the melanoidin and its role in determining bioavailability. *J Food Sci*, 52, 1699-1705.
- RÉRAT A, CALMES R, VAISSADE P, FINOT PA (2002). Nutritional and metabolic consequences of the early Maillard reaction of heat treated milk in the pig, significance for man. *Eur J Nutr*, 41, 1-11
- SAITO M (2009). Biochemical markers of bone turnover. New aspect. Bone collagen metabolism: new biological markers for estimation of bone quality. *Clin Calcium*, 19(8), 1110-1117.
- SAITO M, FUJII K, SOSHI S, TANAKA T (2006). Reductions in degree of mineralization and enzymatic collagen cross-links and increases in glycation-induced pentosidine in the femoral neck cortex in cases of femoral neck fracture. *Osteoporos Int*, 17, 986-995.
- SANGUINETI R, STORACE D, MONACELLI F, FEDERICI A, ODETTI P (2008). Pentosidine effects on human osteoblasts in vitro. In: *Maillard reaction: recent advances in food and biomedical sciences*. Eds: Schleicher E, Somoza V, Shieberle P. *Ann NY Acad Sci*, 1126, 166-172.
- SARRIÁ B, LÓPEZ-FANDINO R, VAQUERO MP (2001). Does processing of a powder or in-bottle-sterilized liquid infant formula affect calcium bioavailability? *Nutrition*, 17, 326-331.
- ŠEBEKOVÁ K, HOFMANN T, BOOR P, ŠEBEKOVÁKJR, ULICNÁ O, ERBERSDOBLER HF, BAYNES JW, THORPE SR, HEIDLAND A, SOMOZA V (2005). Renal effects of oral Maillard reaction product load in the form of bread crusts in healthy and subtotally nephrectomized rats. *Ann NY Acad Sci*, 1043, 482-491.

- SEIQUER I, ASPE T, VAQUERO P, NAVARRO MP (2001). Effects of heat treatment of casein in the presence of reducing sugars on calcium bioavailability: *in vitro* and *in vivo* assays. *J Agric Food Chem*, 49, 1049-1055.
- SEIQUER I, LÓPEZ-FRÍAS M, MUÑOZ-HOYOS A, GALDÓ G, DELGADO-ANDRADE C, MESÍAS M, NAVARRO MP (2006). Dietary calcium utilization among a group of Spanish boys aged 11-14 years on their usual diets. *J Physiol Biochem*, 62(1), 9-16.
- SEIQUER I, DELGADO-ANDRADE C, HARO A, NAVARRO MP (2010). Assessing the effects of severe heat treatment of milk on calcium bioavailability: *In vitro* and *in vivo* studies. *J Dairy Sci*, 93, 5635-5643.
- SOMOZA V (2005). Five years of research on health risks and benefits of Maillard reaction products: An update. *Mol Nutr Food Res*, 49, 663-672.
- TANAKA M, LEE TC, CHICHESTER CO (1975). Nutritional consequences of the Maillard reaction. The absorption of fructose-l-tryptophan in the large intestine of the rat. *J Nutr*, 105, 989.
- TUOHY KM, HINTON DJS, DAVIES SJ, CRABBE JC, GIBSON GR, AMES JM (2006). Metabolism of Maillard reaction products by the human gut microbiota—implications for health. *Mol Nutr Food Res*, 50, 847-857.
- VAN BOEKEL M, FOGLIANO V, PELLEGRINI N, STANTON C, SCHOLZ G, LALLIE S, SOMOZA V, KNORR D, JASTI PR, EISENBRAND G (2010). A review on the beneficial aspects of food processing. *Mol Nutr Food Res*, 54, 1215-1247.
- VIGUET-CARRIN S, ROUX JP, ARLOT ME, MERABET Z, LEEMING DJ, BYRJALSEN I, DELMAS PD, BOUXSEIN ML (2006). Contribution of the advanced glycation end product pentosidine and of maturation of type I collagen to compressive biomechanical properties of human lumbar vertebrae. *Bone*, 39, 1073-1079.
- VLISSARA H (1996). Advanced glycosylation in nephropathy of diabetes and aging. *Adv Nephrol*, 25, 303-307.
- WESTERTERP-PLANTEGA MS (2004). Effects of energy, density of daily food intake on long term energy intake. *Physiol Behav*, 81, 765-771.

YAMAMOTO T, OZONO K, MIYAUCHI A, KASAYAMA S, KOJIMA Y, SHIMA M, OKADA S (2001). Role of advanced glycation end products in adynamic bone disease in patients with diabetic nephropathy. *Am J Kidney Dis*, 38(4), 161-164.

YUAN YV, KITTS DD (1994). Calcium absorption and bone utilization in spontaneously hypertensive rats fed on native and heat-damaged casein and soya-bean protein. *Br J Nutr*, 71, 583-603.

## **CAPÍTULO 6**

### ***Influencia de los productos de la reacción de Maillard derivados de la corteza de pan en el balance de fósforo en ratas***

---

Irene Roncero-Ramos, Cristina Delgado-Andrade,  
Rebeca Alonso-Olalla, María Pilar Navarro

*European Journal of Nutrition*, 2012, 51(7): 871-879



## Influence of bread crust-derived Maillard reaction products on phosphorus balance in rats

Irene Roncero-Ramos, Cristina Delgado-Andrade, Rebeca Alonso-Olalla and María Pilar Navarro

*Eur J Nutr*, 2012, 51(7), 871-879

DOI: 10.1007/s00394-011-0267-3

Received 11th August 2011

Accepted 17th October 2011



### ABSTRACT

Maillard reaction products (MRP) improve food palatability and are linked to some positive biological actions. However, diverse negative consequences, some related to protein damage and mineral availability, have been established. We investigated the effects of MRP, from a bread crust diet, on phosphorus bioavailability and tissue distribution in rats to determine whether these effects are related to the molecular weight of browning products. During a study period of 88 days, rats were fed either a control diet or one of the following: with bread crust as a source of MRP, or one with its soluble high molecular weight, soluble low molecular weight or insoluble fraction (Bread crust, HMW, LMW and Insoluble diets, respectively). In the final week, a phosphorus balance was performed, after which the animals were sacrificed and some organs removed to analyse phosphorus content. A second balance was carried out throughout the experimental period to calculate phosphorus retention. Phosphorus balance in the last week was unchanged. However, considering the whole experimental period, a trend toward improved bioavailability, significant in the HMW group, was observed. Higher phosphorus concentrations were measured in



the small intestine and bone. The consumption of MRP derived from bread did not alter phosphorus retention, due to increased bioavailability, especially concerning HMW compounds. The overall phosphorus body content remained unchanged and there were no changes in the bone, its principal metabolic destination. However, MRP consumption markedly raised phosphorus levels at the digestive level, especially when consumed as isolate fractions. The slower rate of stomach emptying is assumed to be related to this effect.

**Keywords:** Maillard reaction products; phosphorus bioavailability; tissue distribution; bone.

## INTRODUCTION

The processing of foods rich in protein and carbohydrates or fat promotes the development of the Maillard reaction and the formation of the browning compounds known as Maillard reaction products (MRP), which are often responsible for improvements in food palatability (Ames, 1998). The Maillard reaction, therefore, is employed by the food industry to achieve attractive aromas, colours and flavours. High cooking temperatures and longer heating times are the most significant processing factors influencing MRP formation, and browned compounds frequently appear during heat treatments such as frying, roasting, grilling and baking (Jaeger et al., 2010).

Bread is still one of the most widely consumed foods worldwide, although its consumption has decreased in recent years due to changes in eating patterns and the rising number of more highly processed substitutes such as breakfast cereals (Prättälä et al., 2001; Siega-Riz et al., 2000). The application of high temperature during the baking process, together with an appropriate flour composition, facilitates the development of the Maillard reaction and the appearance of its early, advanced and end products in different proportions, especially in the bread crust.

Consumption of MRP is associated with certain positive biological actions (Somoza, 2005a) such as antioxidant activity, the inhibition of tumour growth and antimutagenic effects (Delgado-Andrade and Morales, 2005; Marko et al., 2003; Wagner et al., 2007), but these compounds may also provoke undesirable nutritional effects, some of which are related to protein damage (Seiquer et al., 2006) and mineral availability (Navarro, 2003), since MRP behave as anionic polymers, forming stable complexes with metal cations. Ca, Mg, Fe, Cu and Zn are capable of binding to soluble and insoluble melanoidins derived from different amino acid-sugar model systems or from a real food (Rendleman, 1987; O'Brien and Morrissey, 1997; Delgado-Andrade et al., 2004; Morales et al., 2005). The effects of MRP consumption on the absorption and bioavailability of phosphorus are not well understood, as few studies have explored the issue, in example the works of Andrieux and Sacquet (1984). Moreover, phosphorus acts as an anion, not a cation, in the biological fluids, and thus, the metal-

MRP chelation hypothesis employed to explain the effects on other mineral nutrients is not valid in this case.

Phosphorus is an essential nutrient for the organism; it plays an important role in cellular physiology and skeletal mineralization as well as in energetic molecule production and maintenance of the acid-base balance (Knochel, 1999). Phosphorus deficiency is uncommon since it is sufficiently abundant in natural foods, and its rate of intestinal absorption is quite high (Drezner, 2008). However, with increasing consumption of MRP due to changes in dietary habits, it would be very useful to study the effect of MRP consumption on phosphorus absorption and its metabolic destination. In this respect, a previous assay carried out in male adolescents fed a diet rich or poor in MRP over a period of two weeks showed that the fractional absorption of phosphorus is negatively affected by the presence of MRP (Delgado-Andrade et al., 2011). This interesting result in humans suggests we should explore the potential long-term effects, both at digestive and organic level, for which animal experimentation is required.

The aim of this study was to investigate the effects of the consumption of MRP derived from bread crust on phosphorus bioavailability and tissue distribution, and to determine whether these effects are related to the molecular weight of browning products.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Chemicals**

All chemicals used were of analytical grade and were obtained from Merck (Darmstadt, Germany), unless stated otherwise. Pronase E (4 000 000 PU/g) was also purchased from this company.

### **Extraction of bread crust and its soluble and insoluble fractions**

The bread crust was supplied by a Spanish manufacturer of cereal-derived food products. Once the attached bread crumbs had been manually removed, the sample was weighed, lyophilised, powdered and homogenised. A fraction of the bread crust was then stored at -20°C until diet formulation. Since our aim was to study the effects of the MRP as a function of their molecular size, in order to access the MRP and melanoproteins linked to proteins, another important fraction was subjected to enzymatic hydrolysis with pronase E, an enzyme commonly applied for this purpose. The results obtained from previous studies by our research group indicated the most appropriate pronase E concentration and incubation time (Delgado-Andrade et al, 2008). Briefly, 125 g of bread crust were digested with 750 mL of a 0.100 mg/mL pronase E solution (400 U/mL in 1M phosphate buffer, pH 8.2) in stoppered test recipients at 37°C for 72 h in a water bath under shaking. This procedure was repeated as many times as necessary to obtain enough sample for the diet formulation. After cooling, the sample was treated with 15 mL of 40 % trichloroacetic acid solution (w/v), and centrifuged at 4500 g for 10 min at 4°C to separate the soluble and insoluble fractions. The insoluble fraction was then weighed, lyophilized, homogenized and stored at -20°C until used for diet formulation. The soluble fraction was subjected to ultrafiltration employing a Pellicon Ultrafiltrate cassette connected to a cassette-style tangential flow filtration device (Millipore, MA, USA) and a flow variable peristaltic pump. A Biomax polyethersulphone membrane (0.5 m<sup>2</sup> size, 17.8 cm with x 21 cm length, Millipore, MA, USA) with 5kDa NMWL was used. Fractions constituted of compounds with a molecular mass higher than 5 kDa were retained (retentate, high

molecular weight, HMW) and those with a lower molecular mass were filtered (filtrate, low molecular weight, LMW). Both the retentate and the filtrate were lyophilised, powdered and homogenised, and stored at -20°C until used for diet formulation.

### **Preparation of diets**

The AIN-93G purified diet for laboratory rodents (DyetsInc, Bethlehem, PA) was used as the control diet (Reeves et al., 1993). The bread crust was added to the AIN-93G diet to reach a final concentration of 10 %. This diet was named Bread crust. In order to determine the factors responsible for the effects observed in the trial, the LMW, HMW and Insoluble fractions were also individually added to the diet in the same proportion as they were present in the 10 % of bread crust, calculated from the recovery of each fraction after pronase E digestion. These diets were named LMW, HMW and Insoluble, respectively. Bread crust is a sodium source, and so, to maintain the concentration of this element at adequate levels, these diets were prepared mixing appropriate proportions of AIN-93G and low-sodium AIN-93G diets, respectively. Calcium carbonate was added when necessary to reach the values originally present in the AIN-93G diet.

The individual analysis of the different diets revealed no significant modification of the overall nutrient composition, compared with the Control diet (AIN-93G). The mean  $\pm$  SD nutrient content of the diets was: moisture (%)  $7.9 \pm 0.4$ ; protein (g/kg)  $168.4 \pm 4.0$ ; fat (g/kg)  $77.9 \pm 1.6$ ; Na (g/kg)  $1.34 \pm 0.02$  and P (g/kg)  $3.22 \pm 0.08$ . Moisture, protein and P content were analysed as described in AOAC (1980), while Na was measured by flame atomic absorption spectroscopy using lithium chloride to avoid interferences.

The highest MRP content in the prepared diets, with respect to the Control diet, was established by analysing the furosine and hydroxymethylfurfural (HMF) contents following the procedures described by Delgado-Andrade et al. (2010). The data obtained for furosine (mean  $\pm$  S.D.) were as follows:  $28.8 \pm 0.5$ ;  $49.5 \pm 0.3$ ;  $39.7 \pm 1.4$ ;  $39.4 \pm 1.0$  and  $34.7 \pm 0.8$  mg/kg diet for Control, Bread crust, LMW, HMW and

Insoluble diets, respectively. The results for HMF (mean  $\pm$  S.D.) were as follows:  $0.44 \pm 0.06$ ;  $4.26 \pm 0.02$ ;  $0.47 \pm 0.04$ ;  $0.47 \pm 0.01$  and  $0.89 \pm 0.01$  mg/kg diet for Control, Bread crust, LMW, HMW and Insoluble diets, respectively.

### **Biological assays**

Seventy weanling Wistar rats weighing  $41.02 \pm 0.16$  g (mean  $\pm$  SE) supplied by Charles River Laboratories Spain S.A. were used in the study. Sixty rats were randomly distributed into five groups (12 animals per group) and each group was assigned to one of the dietary treatments. The animals were individually housed in metabolic cages in an environmentally controlled room under standard conditions (temperature: 20-22°C with a 12 h light-dark cycle and 55-70 % humidity). The rats had ad libitum access to their diets and demineralised water (Milli-Q Ultrapure Water System, Millipore Corps., Bedford, MA, USA). The remaining ten animals were sacrificed by anaesthesia overdose at day 0 and their initial phosphorus body content was analysed.

The animals were fed the different diets for 88 days. Excluding the Insoluble group, in which the accidental death of four animals limited the number of trials, two different balances were carried out during the experimental period. The phosphorus balance for the entire experimental period, termed the 'Global balance', was calculated from the difference between the final phosphorus body contents of each animal and the average initial content of the element ( $102.0 \pm 2.5$  mg P). Phosphorus intake was monitored during this period. Six animals from each group were sacrificed by anaesthesia overdose on day 88 to calculate their final phosphorus body content. None of their organs were extracted. The animals in the Insoluble group were excluded from this global balance.

In the last week of the experimental period (days 82-88) another phosphorus balance was performed on all the animals. This test involved a preliminary 81-day period during which solid food intake and body weight changes were monitored weekly, followed by a 7-day period in which a phosphorus balance was performed. In this last week, faeces and urine from each animal were collected daily and stored

separately as a 1-week pool. The faeces were weighed, lyophilised and homogenised. The urine was collected on 0.5 % HCl (v/v), filtered (Whatman Filter Paper No. 40, ashless, Whatman, England) and diluted to an appropriate volume. To control for possible environmental contamination during the collection of urine and faeces, empty cages were manipulated in the same way as those used for the animals. On day 88, after an overnight fast, the remaining six animals in each group were anaesthetised with sodium pentobarbital (5 mg per 100 g of body weight) (Abbott Laboratories, Granada, Spain) and terminal exsanguination was performed by a cannulation of the carotid artery. Blood was drawn to obtain serum, and the liver, right kidney, spleen, small intestine and right femur were removed, weighed and frozen at -80°C until phosphorus analysis.

All management and experimental procedures carried out in this study were in strict accordance with current European regulations (86/609 E.E.C.) regarding laboratory animals. The Bioethics Committee for Animal Experimentation at our institution (EEZ-CSIC) approved the study protocol.

### **Analytical techniques**

To determine the global balance, the whole cadavers were weighed, lyophilised and homogenised. The liver, spleen, kidney, small intestine and femur of the other six animals were dry-ashed in a muffle furnace (Selecta, Mod. 366, Barcelona, Spain) at 450°C, and the white ashes obtained were dissolved with HCl/HNO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O (1:1:2). Aliquots of the remaining samples (urine, faeces, diets and whole cadavers) were completely digested by the addition of concentrated HNO<sub>3</sub>, HClO<sub>4</sub> and by heating at high temperatures (210-220°C) in a sand beaker. All samples were diluted with Milli-Q water to an appropriate volume for phosphorus measurement. Total phosphorus was determined colorimetrically at 820 nm in a spectrophotometer (Shimadzu UV-1700, Model TCC-240A, Columbia, USA) by the vanadomolibdate procedure (AOAC, 1980).

Pools of faeces, urine and diet were used as an internal control to assess precision. The inter-assay coefficient of variation was 1.80 % in faeces, 1.08 % in urine

and 2.07 % in the diet. Milk powder (certified reference material CRM 063; Community Bureau of Reference, Brussels, Belgium) was used to quantify accuracy, yielding a value of  $11.04 \pm 0.03$  mg/g (mean  $\pm$  SD; certified value:  $11.10 \pm 0.13$  mg/g) for phosphorus.

All glassware and polyethylene sample bottles were washed with 10 N nitric acid, and milli-Q water was used throughout the study.

The following indices were calculated using the data for phosphorus intake and faecal and urinary excretion obtained in the last week of the assay: apparent absorption (ingested P–faecal P); apparent retention or balance (apparent absorption–urinary P); apparent absorption efficiency or fractional absorption (% A/I) = apparent absorption/ingested P  $\times$  100; apparent retention efficiency (% R/A) = apparent retention/apparent absorption  $\times$  100; and bioavailability (% R/I) = apparent retention/ingested P  $\times$  100. Since all the indices were calculated in apparent form, henceforth, the term ‘apparent’ will be omitted.

The parameters calculated for the global balance were global retention (final P body content–initial P body content) and global % R/I (global retention/total P intake  $\times$  100).

### **Statistical analysis**

All data were statistically tested by one-way analysis of the variance (ANOVA), followed by Duncan’s test to compare means that showed a significant variation ( $P < 0.05$ ). Analyses were performed using Statgraphics Plus, version 5.1, 2001. The relationship between the different variables was evaluated by computing the relevant correlation coefficient (Pearson’s linear correlation) at the  $P < 0.05$  confidence level.



## RESULTS

The phosphorus balance data for the last week of the assay are presented in Table 1. Phosphorus intake during the balance week decreased significantly (13 %) in the group fed the insoluble diet, and a downward trend was also observed in the HMW group.

**Table 1.** Phosphorus last week balance in rats fed the different diets

Diets	Intake	Faeces	Urine	Absorption	Retention
	(mg/day)				
Control	46.3 ± 1.5 <sup>A</sup>	26.5 ± 0.9 <sup>A</sup>	6.41 ± 0.45 <sup>A</sup>	19.8 ± 1.1	13.4 ± 1.2
Bread crust	45.7 ± 0.8 <sup>A</sup>	26.1 ± 0.7 <sup>A</sup>	4.23 ± 0.31 <sup>B</sup>	19.6 ± 0.9	15.4 ± 0.8
LMW	46.3 ± 1.1 <sup>A</sup>	25.7 ± 0.8 <sup>A</sup>	5.69 ± 0.18 <sup>AC</sup>	20.7 ± 0.7	15.0 ± 0.8
HMW	42.8 ± 1.0 <sup>AB</sup>	22.1 ± 0.8 <sup>B</sup>	5.69 ± 0.40 <sup>AC</sup>	20.7 ± 0.9	15.0 ± 0.9
Insoluble	40.5 ± 1.4 <sup>B</sup>	22.7 ± 0.9 <sup>B</sup>	4.74 ± 0.50 <sup>BC</sup>	17.9 ± 1.3	13.1 ± 1.1

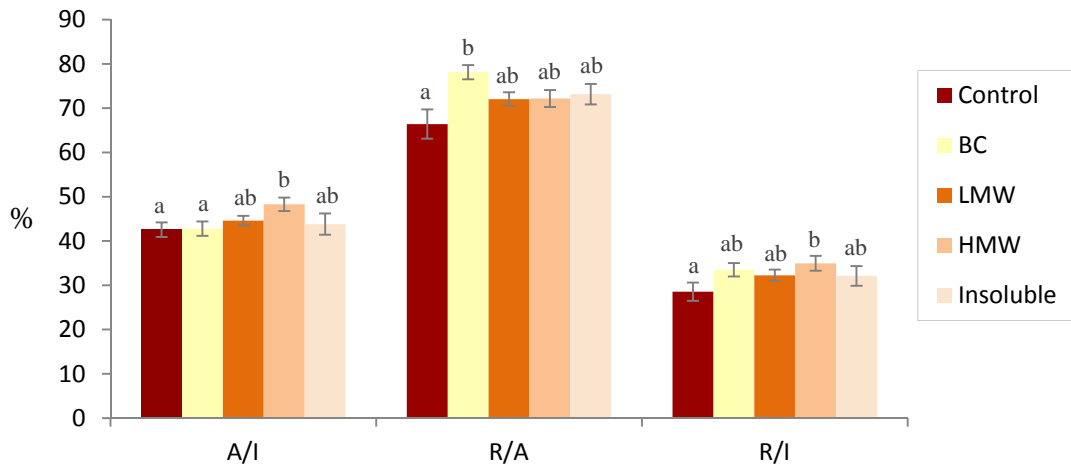
Values are means ± SE,  $n = 12$  except in Insoluble group ( $n = 8$ ). Different letters within a column indicate significant differences between groups ( $P < 0.05$ )

The total faecal excretion of phosphorus was significantly lower in the HMW ( $P = 0.0015$ ) and Insoluble ( $P = 0.0129$ ) groups, whereas in the other experimental groups, this value was similar to that presented by the Control group. The absorption remained unchanged among the five groups fed the experimental diets, ranging from 20.7 mg/d (HMW group) to 17.9 mg/d (Insoluble group), without reaching significant differences. Urinary phosphorus tended to decrease in all groups with respect to the Control group but was only significant in the Bread crust ( $P = 0.0006$ ) and Insoluble ( $P = 0.0252$ ) groups. No significant differences were found in phosphorus retention among any of the animals given the bread crust diet or its fractions (Table 1).

Consumption of diets containing bread crust led to higher values of phosphorus fractional absorption (A/I %) and bioavailability (R/I %) with respect to the Controls, although they were only statistically significant in the HMW group (Fig. 1). Similarly, phosphorus retention efficiency (R/A %) tended to improve after the ingestion of all

MRP diets, with increases ranging from 8.5 % to 17.6 %; the values for the Bread crust group were significantly higher than those of the Controls (Fig. 1).

**Figure 1.** Phosphorus biological indices in rats fed the different diets

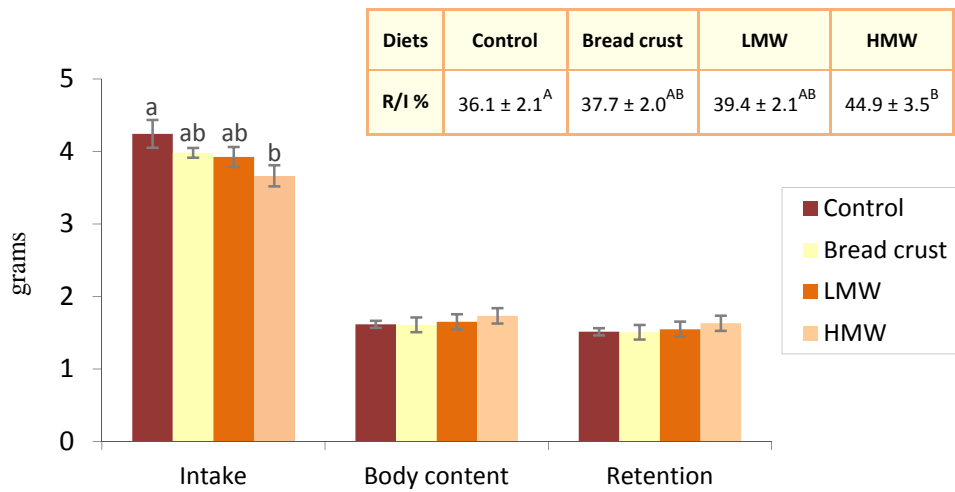


Values are means  $\pm$  SE,  $n = 12$  except in Insoluble group ( $n = 8$ ). Different letters within an index indicate significant differences between groups ( $P < 0.05$ )

The global balance reflected a profile similar to that of the balance for the final week (Fig. 2), with phosphorus intake over the whole experimental period tending to be lower in the animals given MRP diets, but with only the HMW group presenting statistically significant differences ( $P = 0.0375$ ). Body phosphorus content and overall retention remained unchanged among the groups, but phosphorus bioavailability was significantly higher in the HMW group than in the Control group.

Data corresponding to the final body weight of animals, phosphorus content and concentration in the organs are shown in Table 2. Regarding the weight of the organs, no significant differences were found in the liver, spleen and small intestine. In the weight of the kidney, a general reduction of around 10 % was observed in all the experimental groups fed bread derivatives, but this was only statistically significant in the Bread crust group (12 %). Femur weight decreased in all the animals fed diets containing bread crust or its fractions.

**Figure 2.** Phosphorus global balance in rats fed the different diets



Values are means ± SE,  $n = 12$  except in Insoluble group ( $n = 8$ ). Different letters within an index indicate significant differences between groups ( $P < 0.05$ )

After consumption of MRP, phosphorus content and concentration in the liver and kidney did not differ in any group studied. The amount of phosphorus deposited in the spleen was significantly lower in the Bread crust group than in the Control group and a downward trend was observed in the groups that consumed fractions derived from bread. The splenic phosphorus concentration in the Bread crust group was also lower than in all other groups except the LMW group, which showed a tendency to decrease.

Phosphorus content in the small intestine increased greatly in all animals, compared with the controls, ranging from 4.29 mg P in the Control group to 12.98 mg P in the LMW group, which presented the highest values. Intestinal phosphorus concentration had a similar behaviour pattern, with the LMW group showing the most pronounced increase (296 % compared with the Control group).

Finally, phosphorus content in the femur did not change in any of the groups, although the mineral concentration increased in all animals fed diets containing bread crust or its fractions, due to the lower weight of the bones.

**Table 2.** Body weight and phosphorus content and concentration in organs of rats fed the different diets

Sample	Control	Bread crust	LMW	HMW	Insoluble
<b>Body weight (g)</b>	247.6 ± 5.1 <sup>A</sup>	234.7 ± 4.4 <sup>AB</sup>	236.3 ± 7.2 <sup>AB</sup>	227.5 ± 5.8 <sup>B</sup>	220.7 ± 4.0 <sup>B</sup>
<b>Liver</b>					
weight (g)	6.15 ± 0.29	6.05 ± 0.23	6.30 ± 0.27	6.00 ± 0.21	5.81 ± 0.17
P (mg)	11.04 ± 0.87	10.20 ± 1.18	9.56 ± 0.95	10.45 ± 0.34	9.15 ± 0.45
P (mg/g)	1.82 ± 0.17	1.69 ± 0.18	1.54 ± 0.18	1.75 ± 0.09	1.58 ± 0.07
<b>Kidney</b>					
weight (g)	0.77 ± 0.03 <sup>A</sup>	0.68 ± 0.01 <sup>B</sup>	0.71 ± 0.03 <sup>AB</sup>	0.71 ± 0.03 <sup>AB</sup>	0.69 ± 0.03 <sup>AB</sup>
P (mg)	1.32 ± 0.07	1.14 ± 0.02	1.24 ± 0.05	1.25 ± 0.05	1.24 ± 0.07
P (mg/g)	1.72 ± 0.05	1.69 ± 0.04	1.74 ± 0.04	1.75 ± 0.03	1.78 ± 0.05
<b>Spleen</b>					
weight (g)	0.50 ± 0.02	0.49 ± 0.02	0.48 ± 0.03	0.49 ± 0.03	0.46 ± 0.03
P (mg)	0.86 ± 0.06 <sup>A</sup>	0.65 ± 0.07 <sup>B</sup>	0.74 ± 0.04 <sup>AB</sup>	0.79 ± 0.04 <sup>AB</sup>	0.76 ± 0.05 <sup>AB</sup>
P (mg/g)	1.72 ± 0.09 <sup>A</sup>	1.33 ± 0.13 <sup>B</sup>	1.55 ± 0.10 <sup>AB</sup>	1.62 ± 0.10 <sup>A</sup>	1.66 ± 0.05 <sup>A</sup>
<b>Small intestine</b>					
weight (g)	4.72 ± 0.21	4.58 ± 0.19	4.95 ± 0.30	4.37 ± 0.19	4.60 ± 0.11
P (mg)	4.29 ± 0.58 <sup>A</sup>	7.23 ± 0.26 <sup>B</sup>	12.98 ± 0.56 <sup>C</sup>	10.17 ± 0.73 <sup>D</sup>	11.35 ± 0.37 <sup>D</sup>
P (mg/g)	0.90 ± 0.10 <sup>A</sup>	1.59 ± 0.07 <sup>B</sup>	2.66 ± 0.15 <sup>C</sup>	2.32 ± 0.08 <sup>D</sup>	2.47 ± 0.08 <sup>CD</sup>
<b>Femur</b>					
weight (g)	0.59 ± 0.04 <sup>A</sup>	0.51 ± 0.02 <sup>B</sup>	0.51 ± 0.02 <sup>B</sup>	0.51 ± 0.02 <sup>B</sup>	0.49 ± 0.01 <sup>B</sup>
P (mg)	54.0 ± 2.8	51.7 ± 1.7	53.1 ± 3.0	53.1 ± 1.8	52.5 ± 1.2
P (mg/g)	92.7 ± 4.5 <sup>A</sup>	101.9 ± 1.9 <sup>B</sup>	104.3 ± 1.7 <sup>B</sup>	104.1 ± 1.4 <sup>B</sup>	107.1 ± 1.3 <sup>B</sup>

Values are means ± SE,  $n = 6$  except in Insoluble group ( $n = 8$ ). Different letters within a row indicate significant differences between groups ( $P < 0.05$ ).

## Discussion

Browning products are known to affect mineral availability in different ways, and several studies have been conducted of metal cations (Rendleman, 1987; O'Brien and Morrissey, 1997; Seiquer et al., 2001; Delgado-Andrade et al., 2002a; Mesías et al., 2009). Nevertheless, few investigations have focused on phosphorus, and so, this study was intended to enhance our understanding of the effects of MRP on phosphorus bioavailability.

MRP from bread crust included in the diets led to decreased food intake over the whole experimental period, especially in the HMW and Insoluble groups ( $1311.6 \pm 35.4$  g for the Control group versus  $1159.1 \pm 27.5$  g and  $1050.1 \pm 24.9$  g for the HMW and the Insoluble groups, respectively). This decreased level of food intake was responsible for the reduction in ingested phosphorus during the entire assay (Table 1) and in the last week of balance (Fig. 2). Many authors have described changes in food intake after the consumption of MRP. Furniss et al. (1989) detected reductions when rats were fed a glucose/casein mixture heated to 60°C. Sarriá et al. (2001) obtained similar results with liquid infant formulas containing Maillard derivatives. The findings of Delgado-Andrade (2002b) comparing the effects of the consumption of glucose/lysine heated mixtures for 30 and 90 minutes suggested that the most advanced MRP, browner and more insoluble, were responsible for the most pronounced decline in food intake. Abu-Dweih et al. (2000) consider that the influence of MRP on intake depends on the degree of toasting, and that decreases in food consumption are related to increased browning. The results observed in the present assay would be in line with this suggestion, since the phosphorus ingested by the HMW group in both balances decreased by around 8 % with respect to the Control group (Fig. 2), and a 14 % decline was observed in the Insoluble group during the last week of balance (Table 1). The diets of both groups are those that contained isolated compounds of higher molecular weight, and therefore, they are the most browning diets. As a result of the low intake of phosphorus in the HMW and Insoluble groups, faecal excretion decreased significantly in these groups, to maintain the absorption. In fact, ingested and faecal phosphorus were positively correlated ( $r = 0.6635$ ;  $P = 0.000$ ). Few studies have been made of the influence of MRP on the digestive process of phosphorus, and

they have been mainly developed in model systems. Thus, Delgado-Andrade (2002b) observed the same effect using MRP obtained from a glucose/methionine mixture heated to 150°C for 30 and 90 minutes and a glucose/lysine mixture heated to the same temperature for 30 minutes. Although views on this question are not unanimous, the fractional absorption of phosphorus does not seem to be affected by the presence of browned products. These results are to be expected, since the chelation effect of MRP on metal cations does not occur with this element.

In the same line, the fractional absorption of phosphorus did not decrease following the consumption of MRP from bread crust or its fractions; on the contrary, it tended to rise or even increase significantly in the HMW group with respect to the Control and Bread crust groups (Fig. 1). Although the possibility of an adaptive response associated with the lowest intake cannot be discarded completely, it should be remembered that the fractions with different molecular weights were obtained by the digestion of bread crust with pronase and that these fractions were then digested again in the gastrointestinal tract with the diet. New compounds could have been released by the action of enzymes, gastric juices and bacterial fermentation after the two digestions. If some of these soluble and high molecular weight compounds included phosphorus in their structures, this could provide a vehicle facilitating the absorption of the element. These compounds could also be present in bread crust, but perhaps not appearing in the same form as remained after digestion with pronase. In addition, these compounds are not alone in the bread crust, but are accompanied by LMW compounds and other food components that had not undergone any previous digestion. Accordingly, the fractional absorption of phosphorus could be modulated by the conjoint presence of different components in a different form from that found when the HMW compounds are isolated.

The kidney is the main organ involved in regulating the metabolism of phosphorus, and the presence of MRP appeared to decrease urinary phosphorus (Table 1). The insoluble compounds may be the main factors responsible for this, since the animals which eliminated less phosphorus in the urine were those that consumed the Bread crust and Insoluble diets in which these compounds were present. This decrease might be associated with lower non-significant values of absorption in both

groups. As was to be expected, urinary phosphorus was positively correlated with the absorption ( $r = 0.2669$ ,  $P = 0.0468$ ). Delgado-Andrade (2002b) also described a decrease in urinary excretion in rats fed diets containing MRP from glucose/lysine and glucose/methionine model systems. Results from the same research group have shown a trend toward decreased urinary excretion of phosphorus in male adolescents who consume a diet rich in MRP (Delgado-Andrade et al., 2011).

Despite changes in the urinary excretion of phosphorus, or perhaps because of them, the retention of this element remained unaltered during the final week of the trial and throughout the experimental period, and so, body phosphorus content was maintained (Figs. 1 and 2). Other authors, too, have reported unchanged phosphorus retention after feeding rats with MPR from a glucose-glycine model system (Andrieux et al., 1980).

Therefore, the animals consuming diets containing MPR from bread, by adjusting the efficiency of digestive (A/I %) and metabolic (R/A %) processes, were able to maintain body phosphorus content. The improvement in these two efficiencies was reflected in a tendency towards increased bioavailability over the whole assay, although this was only significant in the HMW group. In trials performed with MRP from glucose-lysine and glucose-methionine model systems, an increase in phosphorus bioavailability has also been observed (Delgado-Andrade, 2002b).

Reductions in body weight have been associated with the consumption of MRP from model systems or food (Navarro et al., 2002; Finot, 2003), as occurred in the rats in the present assay, although the effect in the latter was less pronounced. The organs with lower weight losses correspond to the smaller animals. Thus, the weights of the kidney and femur were lower and correlated with the weight of the rats at the end of the experimental period, while liver, spleen and small intestine weights remained unchanged (Table 2). Thus, the hypertrophy described in organs such as the kidney, spleen and liver (Finot, 2003; Friedman, 1996) and related to the intake of MRP does not seem to have occurred in the present assay. This could be expected since the MRP used in this study were derived from bread and were not added in large amounts.

The content and concentration of phosphorus in the kidney and liver did not vary among the different groups, as reported by Delgado-Andrade (2002b) with respect to the consumption of MRP developed in a glucose-lysine heated model system, although these organs have been identified as an MRP target in the organism. However, Somoza et al. (2005b) did not observe any accumulation of advanced glycation end-products (AGEs) in these organs after feeding rats a diet including 5 % bread crust.

Even though a general downward trend was observed in the content and concentration of phosphorus in the spleen, lower values of this mineral in the Bread crust group are believed to be associated with a specific MRP effect, such as a conjoint action of all compounds, of both high and low molecular weight. Therefore, this outcome is most apparent in animals consuming the Bread crust diet, in which all components are present.

The most surprising findings in this assay are related to the high amount and concentration of phosphorus present in the small intestine in some of the animals, reaching a value three times higher than in the controls. No data in this respect have been published previously, but it could be explained by a slower digestive process arising from MRP consumption, which would increase the concentration of nutrient in the intestine waiting to be absorbed. Larger and more indigestible particles are known to be retained in the stomach for longer periods (Kutchai, 1998), and this situation could equally apply to the presence of MRP, as they are less digestible (Rérat et al., 2002), especially those with higher molecular weight. Thus, Kimiagar et al. (1980) described a slower rate of stomach emptying in rats fed with Maillard browned egg albumin. Rérat et al. (2002) showed that the presence of fructoselysine, an early MRP, in pig diets delayed digestive processes and so, the compound did not appear in portal blood until almost 4 h after the food intake, while free lysine appeared after just 1 h. On the other hand, Somoza et al. (2005c) reported that bread crust consumption in rats increased the appearance of non- or less-digestible compounds in faeces. In consequence, the high phosphorus concentration may be due to the element forming part of the non-absorbable compounds still present in the small intestine. The physiological consequences of these phosphorus levels are unknown and require



further study, especially concerning the effects on gut microbiota, since it has been reported that high amounts of calcium phosphate in the diet have a trophic action on the intestinal microflora (Bovee-Oudehoven et al., 1990).

In recent years, AGEs, considered to be MRP-endogenous, have been related with several pathologies, some associated with the bone, such as osteoporosis (Hein, 2006), lower osteoblastic activity (Alikhani et al., 2007) modifications in bone density (Kawashima et al., 2009) etc. Therefore, changes in bone mineral that might affect the phosphorus content could be expected. Nevertheless, after the ingestion of 10 % bread crust, femoral phosphorus was not modified and the increase in its concentration was due to the lower weight of the bones. Calcium content in the femur, and phosphorus content, remained unchanged and so, it seems that the bone mineral is not affected by the consumption of MRP from bread crust or from its fractions, but rather these compounds might exert a specific influence in the organic phase of bone.

In summary, the presence of MRP from bread in a balanced diet, although it decreases food intake and hence phosphorus consumption, does not alter its retention, due to improved bioavailability, especially when animals consume compounds that are of higher molecular weight and insoluble. Nevertheless, it is unknown how the organism could respond to such a deficit through improved bioavailability if the diet is not optimal. The global content of phosphorus remained unchanged in all animals and there were no changes in its major metabolic destination: the bone. Thus, MRP from bread crust, independently of their molecular weights, do not quantitatively modify bone mineralisation, and since calcium was not impaired, the relation between AGEs and osteoporosis (Hein, 2006) may not be mediated by changes in the mineral phase of bone.

## **Acknowledgments**

This work was supported by a project of the Spanish Ministry of Science and Innovation. The authors thank Grupo Siro, a Spanish manufacturer of cereal-derived

food products, for supplying the bread crust samples. The authors declare there is no conflict of interest.

## References

- ABU-DWEIH BM, TUKAN SK, TAKRURI HR (2000). The effect of browning intensity on the protein quality of qurshallah. *Int J Food Sci Nutr*, 6, 483-488.
- ALIKHANI M, ALIKHANI Z, BOYD C, MACLELLAN CM, RAPTIS M, LIU R, PISCHON N, TRACKMAN PC, GERSTENFELD L, GRAVES DT (2007). Advanced glycation end products stimulate osteoblast apoptosis via the MAP kinase and cytosolic apoptotic pathways. *Bone*, 40, 345-353.
- AMES JM (1998). Applications of the Maillard reaction in the food industry. *Food Chem*, 62, 431-439.
- ANDRIEUX E, SACQUET E, GUÉGUEN L (1980). Interactions between Maillard Reaction's Products, the microflora of the digestive tract and mineral metabolism. *Reprod Nutr Develop*, 20(4), 1061-1069.
- ANDRIEUX C, SACQUET E (1984). Effects of Maillard's reaction products on apparent mineral absorption in different parts of the digestive tract. The role of microflora. *Reprod Nutr Develop*, 23, 379-386.
- AOAC (1980). Official Methods of Analysis (13ed). Association of Official Analytical Chemists. Ed. Horwitz, Washington DC.
- BOVEE-OUDEHOVEN IM, WISSINK ML, WOUTERS JT, VAN DER MEER R (1999). Dietary calcium phosphate stimulates intestinal Lactobacilli and decreases the severity of a Salmonella infection in rats. *J Nutr*, 129, 607-612.
- DELGADO-ANDRADE C, SEIQUER I, NAVARRO MP (2002a). Copper metabolism in rats fed diets containing Maillard reaction products. *J Food Sci*, 67, 855-860.
- DELGADO-ANDRADE C (2002b). Reacción de Maillard: Influencia sobre la biodisponibilidad mineral (Doctoral thesis). Granada, Spain.
- DELGADO-ANDRADE C, SEIQUER I, NIETO R, NAVARRO MP (2004). Effects of heated glucose-lysine and glucose-methionine model systems on mineral solubility. *Food Chem*, 87, 329-337.

- DELGADO-ANDRADE C, MORALES FJ (2005). Unravelling the contribution of melanoidins to the antioxidant activity of coffee brews. *J Agric Food Chem*, 53, 1403-1407.
- DELGADO-ANDRADE C, RUFÍAN-HENARES JA, MORALES FJ (2008). Optimised procedure to analyse Maillard reaction-related fluorescence in cereal-based products. *Czech J Food Sci*, 26, 339-346.
- DELGADO-ANDRADE C, SEIQUER I, HARO A, CASTELLANO R, NAVARRO MP (2010). Development of the Maillard reaction in foods cooked by different techniques. Intake of Maillard-derived compounds. *Food Chem*, 122, 145-153.
- DELGADO-ANDRADE C, SEIQUER I, MESÍAS GARCÍA M, GALDÓ G, NAVARRO MP (2011). Increased intake of Maillard reaction products reduces phosphorus digestibility in male adolescents. *Nutrition*, 27, 86-91.
- DREZNER MK (2008). Phosphorus homeostasis and related disorders. In: *Principles of Bone Biology* (3ed), 465-486.
- FINOT PA (2003). Toxicology of nonenzymatic browning. In: *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 673-678.
- FRIEDMAN M (1996). Food browning and its prevention: An overview. *J Agric Food Chem*, 44, 631-653.
- FURNISS DE, VUICHOUD J, FINOT PA, HURRELL RF (1989). The effect of Maillard reaction products on zinc metabolism in the rat. *Brit J Nutr*, 62, 739-749.
- HEIN GE (2006). Glycation end products in osteoporosis - Is there a pathophysiologic importance? *Clin Chim Acta*, 371, 32-36.
- JAEGER H, JANOSITZ A, KNORR D (2010). The Maillard reaction and its control during food processing. The potential of emerging technologies. *Pathol Biol*, 58, 207-213.
- KAWASHIMA Y, FRITTON JC, YAKAR S, EPSTEIN S, SCHAFFLER MB, JEPSEN KJ, LEROITH D (2009). Type 2 diabetic mice demonstrate slender long bones with increased fragility secondary to increased osteoclastogenesis. *Bone*, 44, 648-665.

- KIMIAGAR M, LEE TC, CHICHESTER CO (1980). Long-term feeding effects of browned egg albumin to rats. *J Agric Food Chem*, 28, 150-155.
- KNOCHER JP (1999). Phosphorus. In: *Modern Nutrition in Health and Disease* (9ed). Eds.: Shils ME, Olson JA, Shike M, Catharine Ross A. Lippincott Williams & Wilkins, Pennsylvania, 157-167.
- KUTCHAI HC (1998). Gastrointestinal secretion. In: *Physiology* (4ed). Eds: Berne RM, Levy MN, Koeppen BM, Stanton BA. Mosby Inc., St. Louis, 617-646.
- MARKO D, HABERMEYER, M, KEMÉNY M, WEYAND U, NIEDERBERGER E, FRANK O, HOFMANN T (2003). Maillard reaction products modulating the growth of human tumor cells *in vitro*. *Chem Res Toxicol*, 16, 48-55.
- MESÍAS M, SEIQUER I, DELGADO-ANDRADE C, GALDÓ G, NAVARRO MP (2009). Intake of Maillard reaction products reduces iron bioavailability in male adolescents. *Mol Nutr Food Res*, 53, 1-10.
- MORALES FJ, FERNÁNDEZ-FRAGUAS C, JIMÉNEZ-PÉREZ S (2005). Iron-binding ability of melanoidins from food and model systems. *Food Chem*, 90, 821-827.
- NAVARRO MP (2003). Bioavailability of micronutrients and minor dietary compounds. In: *Metabolic and Technological Aspects*. Eds: Vaquero MP, García-Arias T, Carbajal A, Sánchez-Múniz FJ. Research Signpost, Kerala, 133-145.
- NAVARRO MP, ASPE T, SEIQUER I (2002). Zinc transport in Caco-2 cells and zinc balance in rats: Influence of the heat Treatment of a casein-glucose-fructose mixture. *J Agric Food Chem*, 48, 3589-3596.
- O'BRIEN J, MORRISSEY PA (1997). Metal ion complexation by products of the Maillard Reaction. *Food Chem*, 58, 17-27.
- PRÄTTÄLÄ RH, HELASOJA V, MYKKÄNEN H (2001). The consumption of rye bread and white bread as dimensions of health lifestyles in Finland. *Public Health Nutr*, 4, 7.

- REEVES PG, NIELSEN FH, FAHEY GC (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*, 123, 1939-1951.
- RENDLEMAN JA (1987). Complexation of calcium by the melanoidin and its role in determining bioavailability. *J Food Sci*, 52, 1699-1705.
- RÉRAT A, CALMES R, VAISSADE P, FINOT PA (2002). Nutritional and metabolic consequences of the early Maillard reaction of heat treated milk in the pig, significance for man. *Eur J Nutr*, 41, 1-11.
- SARRIÁ B, LÓPEZ-FANDINO R, VAQUERO P (2001). Does processing of a powder or in-bottle-sterilized liquid infant formula affect calcium bioavailability? *Nutrition*, 17, 326-331.
- SEIQUER I, ASPE T, VAQUERO P, NAVARRO MP (2001) Effects of heat treatment of casein in the presence of reducing sugars on calcium bioavailability: *in vitro* and *in vivo* assays. *J Agric Food Chem*, 49, 1049-1055.
- SEIQUER I, DÍAZ-ALGUACIL J, DELGADO-ANDRADE C, LÓPEZ-FRÍAS M, MUÑOZ HOYOS A, GALDÓ G, NAVARRO MP (2006). Diets rich in Maillard reaction products affect protein digestibility in adolescent males aged 11–14 y. *Am J Clin Nutr*, 83, 1082-1088.
- SIEGA-RIZ AM, POPLIN BM, CARSON T (2000). Differences in food patterns at breakfast by socio demographic characteristics among a nationally representative sample of adults in the United States. *Prev Med*, 30, 415-424.
- SOMOZA V (2005a). Five years of research on health risks and benefits of Maillard reaction products: An update. *Mol Nutr Food Res*, 49, 663-672.
- SOMOZA V, LINDENMEIER M, HOFMANN T, FRANK O, ERBERSDOBLER HF, BAYNES JW, THORPE SR, HEIDLAND A, ZILL H, BEK S, HUBER J, WEIGLE T, SCHEIDLER S, BUSCH AE, ŠEBEKOVÁ K (2005b). Dietary bread crust advanced glycation end products bind to the receptor for AGEs in HEK-293 kidney cells but are rapidly excreted after oral administration to healthy and subtotaly nephrectomized rats. *Ann NY Acad Sci*, 1043, 492-500.

SOMOZA V, WENZEL E, LINDENMEIER M, GROTHE D, ERBERSDOBLER HF, HOFMAN T, THORPE SR, HEIDLAND A, ZILL H, BEK S, HUBER J, WEIGLE T, SCHEIDLER S, BUSCH AE, ŠEBEKOVÁ K (2005c). Influence of feeding malt, bread crust, and a pronylated protein on the activity of chemopreventive enzymes and antioxidative defense parameters *in vivo*. *J Agric Food Chem*, 53, 8176-8182.

WAGNER KH, REICHHOLD S, KOSCHUTNIG K, CHÉRIOT S, BILLAUD C (2007). The potential antimutagenic and antioxidant effects of Maillard reaction products used as “natural antibrowning” agents. *Mol Nutr Food Res*, 51, 496-504.

## **CAPÍTULO 7**

### ***Efectos de los compuestos de glicación dietéticos sobre la composición y funcionalidad del hueso***

---

Cristina Delgado-Andrade, Irene Roncero-Ramos, José Carballo,  
José Ángel Rufián-Henares, Isabel Seiquer and María Pilar Navarro

*Food & Function*, 2013, 4(4): 549-556





## Composition and functionality of bone affected by dietary glycated compounds

Cristina Delgado-Andrade, Irene Roncero-Ramos, José Carballo, José Ángel Rufián-Henares, Isabel Seiquer and María Pilar Navarro

*Food Func*, 2013, 4(4): 549-556

DOI: 10.1039/c2fo30187c

Received 31st July 2012

Accepted 18th December 2012



### ABSTRACT

Our aim was to investigate the effects of Maillard reaction products (MRPs) from bread crust (BC) on bone composition and its mechanical properties, determining whether any such effects are related to the molecular weight of different MRPs. For 88 days after weaning rats were fed Control diet or diets containing BC, or its soluble low molecular weight (LMW), soluble high molecular weight (HMW) or insoluble fractions. Animals' food consumption and body weights were monitored. After sacrifice, femur, pelvic bone and tibia were removed for composition, physical and biomechanical properties analysis. It was found that body and femur weights, density, volume and organic matrix decreased, whereas pentosidine increased after consumption of experimental diets, especially in the HMW and Insoluble groups (104.7 and 102.9 mmol/mol collagen) vs. the Control group (41.7 mmol/mol collagen). Bone stiffness fell by 50 % in the LMW, HMW and Insoluble groups and failure load and energy to failure tended to decrease in the same animals after MRPs intake. Consumption of diets containing assayed MRPs during growth leads to lower bone size and introduces some

changes on its mechanical behavior which appear to be related to an increase in the pentosidine level of bone.

**Keywords:** Advanced glycation end-products; bone functionality; DEXA; Pentosidine; Physical features.

## INTRODUCTION

The ability of bone to resist fracturing depends on its quantity, architecture and turnover, but also on the intrinsic properties of its constituent material (Viguet-Carrin et al., 2006). Bone is a sophisticated composite material consisting of a mineral phase (mainly hydroxyapatite), an organic phase and water with complex relationships among them, influencing bone strength. An imbalance between the two major constituents or an alteration in their quality modifies the mechanical behaviour (Moro et al., 2000). The mineral phase, comprising approximately 60 % (w/w) of the bone, essentially contributes its stiffness and strength; while the organic phase, consisting mainly of collagen type I, is primarily responsible for providing toughness and ductility (Olszta et al., 2007; Viguet-Carrin et al., 2006; Wang et al., 2002). Also, collagen content and its cross-links could affect the mechanical properties (Burr, 2002).

Specifically, non-enzymatic collagen cross-links, those formed by the generation of advanced glycation end products (AGEs) by the reaction of sugars within the extracellular space with amino groups of protein collagen, have been associated with adverse effects on the mechanical and biological functions of bone (Katayama et al., 1996; Wang et al., 2002). It has been reported that the formation of AGEs in ribosylated human bones provokes a decrease in the specific mechanical properties relating to post-yield behaviour (Tang et al., 2007); moreover, the accumulation of collagen non-enzymatic cross-links in bones has been correlated with an increase in collagen stiffness (Vashishth et al., 2001).

Pentosidine, a fluorescent AGE, is used as a specific biomarker of non-enzymatic cross-links in mechanical studies *in vivo* since it has been reported to accumulate in bones with aging (Odetti et al., 2005). Wang et al. (2002) reported that the age-related increase in pentosidine was associated with a decrease in human femur toughness and post-yield properties. Saito et al. (2006) demonstrated a decrease in bone strength in diabetic rats associated with an increase in non-enzymatic cross-links measured as pentosidine.

The formation of AGEs can take place in the organism but may also occur exogenously during food processing. These compounds used to be called Maillard

reaction products (MRPs) (Delgado-Andrade et al., 2010; Friedman, 1996). It has been demonstrated that dietary MRPs can be absorbed and therefore contribute to the AGEs formed *in vivo* (Šebeková and Somoza, 2007), which accumulate in some tissues, playing a physiopathological role in the development and progression of diseases such as diabetes, osteoporosis and other age-related diseases (Somoza et al., 2006). In this process dicarbonyl compounds ingested seem to be implicated, since they are highly reactive for reactions with proteins, leading to the formation of peptide-bound amino acid derivatives in the final stages of the Maillard reaction (Henle, 2005).

The aim of the present study was to investigate the effects of the consumption of MRPs from bread crust, as one of the major sources of AGEs in the diet (Henle, 2003), on the composition and the physical and biomechanical properties of bone, and also to determine whether these possible effects are related to the molecular weight of different MRPs present in the bread crust.

## MATERIALS AND METHODS

### Preparation of diets

The AIN-93G purified diet for laboratory rodents (Dyets Inc, Bethlehem, PA) was used as the Control diet (Reeves et al., 1993). The bread crust (BC) was supplied by a Spanish manufacturer of cereal-derived food products. The process by which the BC was removed is described in a previous work by Roncero-Ramos et al. (2012a). Briefly, the BC was submitted to a pronase E digestion, obtaining soluble and insoluble fractions. The soluble part was subjected to ultrafiltration using a Biomax polyethersulphone membrane (0.5 m<sup>2</sup> size, 17,8 cm with x 21 cm length, Millipore, MA, USA) with 5kDa NMWL. The fraction containing compounds with a molecular weight higher than 5 kDa were retained (retentate, high molecular weight, HMW) whilst the fraction containing compounds with a weight below 5 kDa were filtered (filtrate, low molecular weight, LMW). BC and all the fractions obtained were lyophilized, powdered, homogenized and used for the formulation of diets. BC was added to the AIN-93G diet to reach a final concentration of 10 % (w/w). This diet was termed BC. Since MRPs absorption can be affected by molecular weight (Somoza, 2005), the soluble LMW, soluble HMW and Insoluble fractions were used to prepare other diets aimed to determine the possible responsible of the observed effects. Fractions were individually added to the AIN-93G diet in the same proportion as they were present in the 10 % of BC, being calculated from the recovery of each fraction after pronase E digestion and the ultrafiltration process. These diets were termed LMW, HMW and Insoluble, respectively.

The individual analysis of the different diets revealed no modification of the overall nutrient composition, compared with the Control diet (AIN-93G). The mean  $\pm$  SD nutrient content of the diets was: moisture (%)  $7.9 \pm 0.4$ ; protein (g/kg)  $168.4 \pm 4.0$ ; fat (g/kg)  $77.9 \pm 1.6$ ; Ca (g/kg)  $4.86 \pm 0.05$  and P (g/kg)  $3.22 \pm 0.08$ .

The higher MRPs content in the diets prepared, with respect to the Control diet, was established by analysing the furosine and hydroxymethylfurfural (HMF) contents as described in the study by Roncero-Ramos et al. (2012a).

## **Biological assays**

Thirty weanling (21-day old) Wistar female rats weighing  $40.15 \pm 0.16$  g (mean  $\pm$  SE) were used in the study. They were randomly distributed into five groups (6 animals per group) and each group was assigned to one of the dietary treatments. The animals were individually housed in metabolic cages in an environmentally controlled room under standard conditions (temperature: 20-22°C with a 12 h light-dark cycle and 55-70 % humidity). The rats had *ad libitum* access to their diets and demineralised water (Milli-Q Ultrapure Water System, Millipore Corps., Bedford, MA, USA).

On day 88, after being starved overnight, the animals were anaesthetised with sodium pentobarbital (5 mg per 100 g of body weight) (Abbott Laboratories, Granada, Spain) and terminal exsanguination was performed by a cannulation of the carotid artery. The right femur, tibia and pelvic bone were removed, weighed and frozen at -80°C until analysis.

All management and experimental procedures carried out in this study were in strict accordance with the current European regulations (86/609 E.E.C.) regarding laboratory animals. The Bioethics Committee for Animal Experimentation at our institution (EEZ-CSIC) approved the study protocol.

## **Analytical techniques**

### *Analysis of the physical parameters of the femurs*

Whole femurs were removed from the animals breaking the joints that bound them to adjacent bones and preserving their epiphysis and diaphysis. Before composition and mechanical testing, the bone specimens were cleared of external soft-tissue adhered to the surface and then weighed. To determine their water content avoiding the possible promotion of the Maillard reaction in the tissue by applying high temperatures, bones were also weighed after an overnight drying at room temperature.

The femur length was measured using an analog Vernier caliper and the density of each femur was determined in triplicate, using a water picnometer (25 cm<sup>3</sup>, Pobel, Madrid, Spain). Briefly, this value was calculated gravimetrically, as the ratio between the femur weight in air and in water. The femur volume was estimated by dividing the bone weight by its density.

#### *Bone densitometry determination*

Bone mineral density (BMD) and bone mineral content (BMC) were measured by dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA). BMD and BMC measurements were performed with a bone densitometer Norland Stratec (Norland Corp., Fort Atkinson, WI, USA) using special software for small animals, providing data as a function of the area considered and yielding comparable data between animals. The BMD and BMC were measured in the entire right femur and pelvic bone.

#### *Determination of the main constituents of the femur*

The water content was determined as described above. The femurs were then dry-ashed in a muffle furnace (Selecta, Mod.366, Barcelona, Spain) at 450°C after which the white ashes obtained were weighed; the weight of the organic phase was calculated as the difference between the weights of the ashes and the bones. The white ashes were dissolved with HCl/HNO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O (1:1:2). The calcium analyses in all samples were carried out by flame atomic absorption spectroscopy (AAS) in a PerkinElmer Analyst 700 Spectrophotometer (Norwalk, Conn., USA). Standard solutions were prepared from a stock Tritisol solution of calcium (Cl<sub>2</sub>Ca in 6.5 % HCl, 1000 mg Ca). Lanthanum chloride was added to the samples and standards to reach a final concentration of 0.3 %. Phosphorus was determined colorimetrically at 820 nm in a spectrophotometer (Shimadzu UV-1700, Model TCC-240A, Columbia, USA) by the vanadomolybdate procedure (AOAC, 1990).



### *Analysis of the biomechanical properties of the bones*

Tibias were cleaned in the same way as described for femurs once removed from the animals and fat inside was not extracted for the tests. Mechanical properties of the whole tibia were determined using a three-point bending test. The bones were loaded perpendicularly to their long axis with a Warner-Bratzler device adapted to a universal testing machine (Model 4501, Instron Engineering Corp., Canton, MA, USA) connected to a Vectra ES/12 computer (Hewlett Packard Company, WA, USA). Load-displacement curves were derived applying a cell of 5 kN of total load capacity at a crosshead speed of 20 mm/min to the bone diaphysis.

The following parameters were determined from the load-displacement curve: displacement to failure (mm) as the elongation to the failure load; the failure load (N) as the maximum load sustained by the specimen at breaking; the bending stiffness (N/mm) as the slope of the linear portion of the curve; the energy to failure (mJ) as the area under the curve to failure load.

### *Pentosidine content in tibia*

Pentosidine was determined following the method described by Takahashi et al. (1995) for sample hydrolysis and the method of Scheijen et al. (2009) for the chromatographic separation. Briefly, 150 mg of powdered rat tibia was hydrolysed with 3 ml 6.0 M HCl at 110°C for 23 h in a Pyrex screw-cap vial with PTFE-faced septa. High-purity N<sub>2</sub> gas was bubbled through the solution for 2 min. A 500 µl portion of the hydrolysate was evaporated under vacuum and the dried sample dissolved in 200 µL of 25 mM citric acid. Finally, 50 µL of sample was injected into a liquid chromatograph (Jasco LC Pump, model PU-2089, Jasco Corporation, Madrid, Spain) coupled to a fluorescence detector (Jasco, model FP-2020) and a computing integrator connected to a PC. Pentosidine was separated on a ODS-B 5 µm column (Tracer Excel 120 ODS-B 5 µm, 250 mm x 4.0 mm i.d., Tecknokroma, Barcelona, Spain) thermostatted at 32°C. Solvent A was 25 mM citric acid and solvent B was (50/50, v/v) ACN/25 mM citric acid. A linear gradient was started at 99 % solvent A which was changed after 15 minutes to

90 % solvent A. After cleaning the column with 100 % solvent B for 5 minutes the column was equilibrated for 8 min at the initial composition. The flow rate was 1 mL/min and the fluorescence detector was set at  $\lambda_{\text{ex}} = 335$  nm and  $\lambda_{\text{em}} = 385$  nm. Duplicate samples were analysed. The external standard method was used for the quantification. A standard stock solution containing 245 pmol/mL of pentosidine was used to prepare the working standard solution. The calibration was performed with a pentosidine standard curve ( $r^2 = 0.9994$ ).

Collagen determination was performed by quantitation of the released 4-hydroxyproline in hydrolysates of samples using the technique described by Jamall et al. (1981). Briefly, a 7 point curve of standard hydroxyproline was constructed ranging from 0 to 1.6  $\mu\text{g}$  of hydroxyproline in 1.2 mL of 50 % isopropanol. 50  $\mu\text{L}$  of a 1:80 hydrolysate sample dilution was added to each point. The final volume was adjusted to 1.2 mL with isopropanol:water (50:50) and then 200  $\mu\text{L}$  of 0.58 % chloramine T solution (in citrate buffer pH 6.0) was added. After 10 minutes, 1 ml of Ehrlich reagent was added and the sample was then incubated for 90 minutes at 50°C in a water bath. Finally, the samples were cooled in water at room temperature for 15 minutes and their absorbances at 558 nm were read using water as a reference. The collagen content was calculated assuming that collagen mass was 6.0 times the hydroxyproline mass, as determined from the composition of rat dentin collagen (Stegemann and Stalder, 1967).

### **Statistical analysis**

All data were statistically tested by one-way analysis of the variance (ANOVA), followed by Duncan's test to compare means that showed a significant variation ( $P < 0.05$ ). Analyses were performed using Statgraphics Plus, version 5.1, 2001. Evaluation of the relationship between the different variables was carried out by computing the relevant correlation coefficient (Pearson's linear correlation), whereas the multiple relationship among variables was evaluated by a multiple regression test (Durbin-Watson's correlation), both at the  $P < 0.05$  confidence level. All data were also analysed by one-way analysis of the variance (ANOVA) considering the final body

weights of animals as covariate. When differences among the treatments were significant ( $P < 0.05$ ) as determined by the F test in the ANOVA, means were separated using the Duncan's test.

## RESULTS

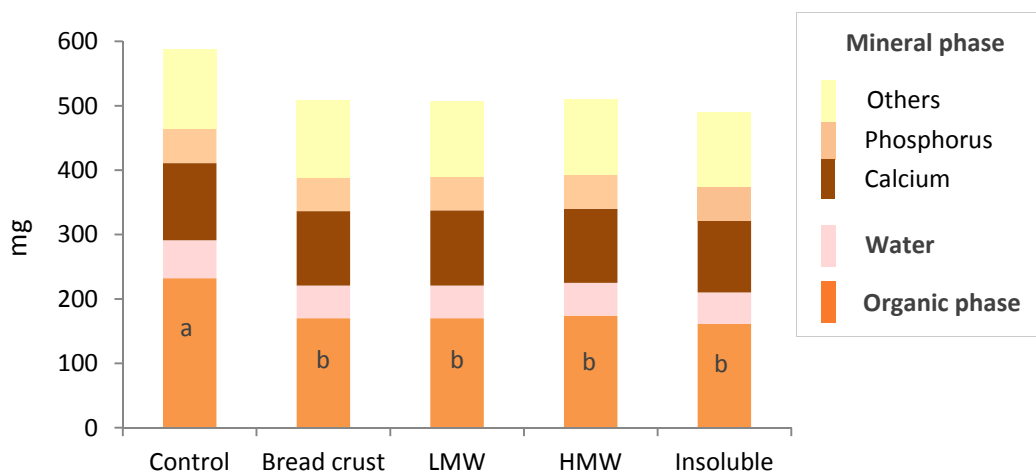
Physical properties of the femurs are shown in Table 1. The femur weight was significantly less in all animals fed the BC diet and its fractions with respect to the Control diet. Bone density also fell in all animals fed the experimental diets, although only slightly within the BC group. The femur length remained unchanged in all groups, but the volume decreased significantly.

**Table 1.** Physical parameters of femur after feeding rats the different diets

Group	Weight (g)	Length (cm)	Density (g/cm <sup>3</sup> )	Volume (cm <sup>3</sup> )
Control	0.59 ± 0.05 <sup>A</sup>	3.39 ± 0.05	1.49 ± 0.03 <sup>A</sup>	0.44 ± 0.02 <sup>A</sup>
BC	0.51 ± 0.02 <sup>B</sup>	3.26 ± 0.08	1.43 ± 0.04 <sup>A<sup>B</sup></sup>	0.38 ± 0.01 <sup>B</sup>
LMW	0.51 ± 0.02 <sup>B</sup>	3.30 ± 0.04	1.36 ± 0.03 <sup>B</sup>	0.39 ± 0.02 <sup>B</sup>
HMW	0.51 ± 0.02 <sup>B</sup>	3.31 ± 0.04	1.37 ± 0.04 <sup>B</sup>	0.39 ± 0.01 <sup>B</sup>
Insoluble	0.49 ± 0.01 <sup>B</sup>	3.28 ± 0.04	1.38 ± 0.02 <sup>B</sup>	0.37 ± 0.01 <sup>B</sup>

Values are means ± SE, *n* = 6. Different letters within a column indicate significant differences between groups (*P* < 0.05)

**Figure 1.** Major constituents of femur in rats fed the different diets

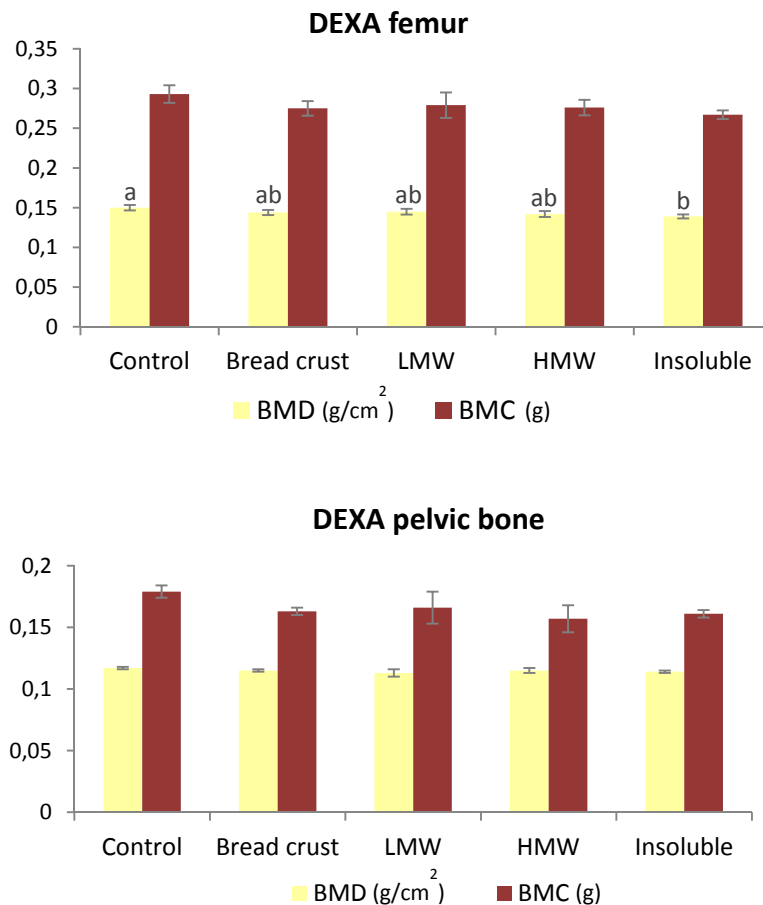


Values are means ± SE, *n* = 6. Different letters within a parameter indicate significant differences between groups (*P* < 0.05)

Regarding bone composition (Fig. 1), the mineral phase content in the femurs did not vary and no significant differences were detected in calcium and phosphorus contents. Nevertheless, the organic phase was significantly lower in the animals fed diets containing BC derivatives (Fig. 1).

The femur BMD tended to decrease in all experimental groups, compared with the Control one, but the difference was only significant in the Insoluble group, with a reduction of 7.3 % (Fig. 2). The BMC of this bone did not experience any significant change, and neither did the BMD and BMC in the pelvic bone (Fig. 2).

**Figure 2.** Bone mineral density (BMD) and bone mineral content (BMC) measured by dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA) in femur and pelvic bone



Values are means  $\pm$  SE,  $n = 6$ . Different letters within a parameter indicate significant differences between groups ( $P < 0.05$ )

**Table 2.** Mechanical properties of tibia determined by three-point bending test

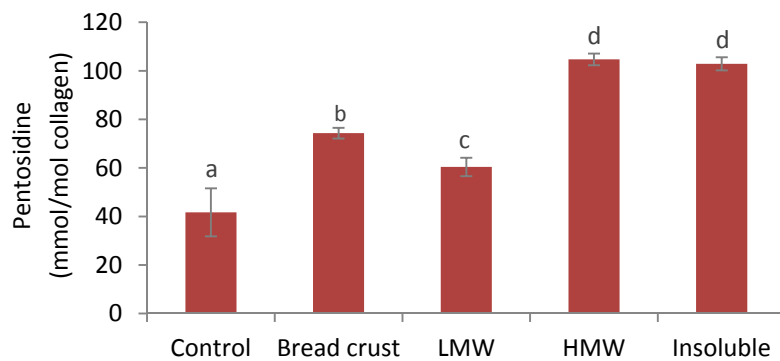
	<b>Control</b>	<b>BC</b>	<b>LMW</b>	<b>HMW</b>	<b>Insoluble</b>
<b>Displacement to failure(mm)</b>	0.94 ± 0.16	0.87 ± 0.09	0.87 ± 0.10	1.10 ± 0.13	0.98 ± 0.03
<b>Diameter (mm)</b>	2.68 ± 0.27 <sup>A</sup>	2.27 ± 0.10 <sup>B</sup>	2.30 ± 0.08 <sup>AB</sup>	2.15 ± 0.08 <sup>B</sup>	2.18 ± 0.06 <sup>B</sup>
<b>Bending stiffness (N/mm)</b>	218.87 ± 21.62 <sup>A</sup>	238.73 ± 18.88 <sup>A</sup>	152.23 ± 18.50 <sup>B</sup>	139.90 ± 18.29 <sup>B</sup>	109.25 ± 10.50 <sup>B</sup>
<b>Failure load (N)</b>	114.95 ± 21.11	102.97 ± 6.38	90.77 ± 10.01	82.68 ± 3.60	85.23 ± 11.57
<b>Energy to failure (mJ)</b>	38.77 ± 12.77	21.95 ± 1.99	26.25 ± 4.22	26.05 ± 2.85	26.74 ± 3.13

Values are means ± SE, *n* = 6. Different letters within a row indicate significant differences between groups (*P* < 0.05)

Data corresponding to mechanical properties of the tibia are shown in Table 2. No modification was observed in bone displacement to failure, but there was a general reduction in bone diameter after consumption of BC and its derivatives. Bone bending stiffness significantly decreased, by almost 50 % in the tibias from the LMW, HMW and Insoluble groups compared with the Control and the BC groups. There were no changes in the failure load or the energy to failure in any of the experimental groups, but there was a marked decline in the latter two parameters in the BC group.

The pentosidine concentration in the tibia increased significantly in all the animals fed the experimental diets (Fig. 3), with respect to the Control group. The highest values were observed in the HMW and Insoluble groups (104.7 and 102.9 mmol/mol collagen, respectively vs. 41.7 mmol/mol collagen in the Control animals).

**Figure 3.** Pentosidine content in tibia of rats fed the different diets



Values are means  $\pm$  SE,  $n = 6$ . Different letters indicate significant differences between groups ( $P < 0.05$ )

## DISCUSSION

### Composition and physical properties

During growth, a maturation process takes place in the bones, involving changes in the matrix composition and in the physical and chemical characteristics of the bone mineral (Burnell et al., 1977). Burnell et al. (1977) described an initially rapid increase in bone matrix (organic phase) in a normal maturation process, during which the mineral phase follows a progressive but diminishing increase. The most intense period of bone maturation in rats takes place between 4 and 22 weeks, when the mineral density increases slowly up to 22 weeks, whilst at the same time there is a faster organic growth phase that slows down from 8 weeks. Since animals of the present study took part in other metabolic assays (Roncero-Ramos et al., 2012a; Roncero-Ramos et al., 2012b) they began the trial at weaning (weighing  $40.15 \pm 0.16$  g; mean  $\pm$  SE). At the end they reached the age of 15 weeks and so these normal physiological changes should be taken into account when interpreting the data. In previous works we have already reported that global food intake of our experimental animals was lower than in the Control ones, as were body weights ( $247.6 \pm 5.1$ ;  $235.0 \pm 4.4$ ;  $236.3 \pm 7.2$ ;  $227.5 \pm 5.8$  and  $220.7 \pm 4.0$  g for Control, BC, LMW, HMW and Insoluble groups respectively) (Roncero-Ramos et al., 2012a), leading to smaller bones, probably in the earlier stages of growth.

The physical characteristics of the femurs of the control rats were normal in terms of size, density and weight (Cunha et al., 2010; Prisby et al., 2008; Rosen et al., 1995) (Table 1), whereas the femurs of the experimental rats were significantly smaller in weight and volume, but similar in length. A significant correlation between the femur weight and the final body weight of the animals ( $r = 0.650$ ;  $P < 0.001$ ) was found (Roncero-Ramos et al., 2012a) which is in line with the observations of Fukuda and Iida (2004) who reported that the growth period is the only stage during which body weight and BMD are closely correlated. Bone density significantly decreased in all groups fed diets containing MRPs, although the BC group showed only a tendency in this direction. Since total bone density includes both organic and mineral mass (Rath et al., 2000), and the latter did not vary (Fig. 1), the significant decrease of the organic



matrix, which correlated with the femur density ( $r = 0.490$ ;  $P = 0.007$ ), was responsible for the bone mass loss. In the study by Burnell et al. (1977) performed on rats with lower food intakes and consequently lower body weight gains after 12 weeks (around 30 %), a decrease in femur densities was also observed. Those bones contained lower amounts of mineral and hydroxyproline, but with a more pronounced reduction in hydroxyproline. In our assay, the decline in bone organic matrix could have been caused by a delay in the bone growth related to the lower body weight. However this circumstance was not the only responsible but also MRPs intake through the diets, since a parallel statistical treatment considering final animal weights as covariate demonstrated that bone organic matrix of animals fed MRPs diets was always significantly lower than those fed the Control diet ( $P = 0.004$ ). In this sense, it has been established that dicarbonyl compounds ingested coming from the Maillard reaction could be implicated in the formation of peptide-bound amino acid derivatives (Henle, 2003). Thus, non-enzymatic glycation of bone collagen could be facilitated due to the existence of these highly reactive species, since the presence of mineral in bone does not prevent collagen glycation (Vashishth et al., 2001).

The non-enzymatic cross-links which contribute to deteriorating biological and mechanical bone properties (Wang et al., 2002) increase with aging (Sell and Monnier, 1989) and are exacerbated in diabetes-related pathologies (Mikulíková et al., 2008).

Pentosidine is one of the most commonly studied AGEs, due to its participation in non-enzymatic cross-links. Values of pentosidine found in literature vary widely both intra and inter-species. In this respect, very few studies have been performed with rats, and results are substantially different, ranging from 0.1-1 mmol/mol collagen for Wistar rats (Saito et al., 2006) to 40-92 mmol/mol collagen for F344 rats (Silva et al., 2009), a similar interval to our results (Fig. 3). Pentosidine significantly increased in all groups compared to the Control one. The consumption of BC and especially of isolated HMW and insoluble fractions increased pentosidine concentrations (104.7 and 102.9 mmol/mol collagen, respectively), reaching the values reported by Silva et al. (2009) for diabetic rats. Therefore, our data reveal that more advanced and higher molecular weight compounds could be the main factors responsible for the effect, although the LMW fraction also exerted a residual influence. It must be underlined that the effects

do not seem to be additive, but rather are modulated when the compounds are consumed as a real food, BC, subjected to a normal digestive process. The covariate analysis establishing final body weight as correction factors demonstrated that pentosidine increased as a consequence of MRPs intake, independently of the growth rate reached ( $P < 0.001$ ).

Although according to Kaňková and Šebeková (2005) ingested AGEs are absorbed in the small intestine and contribute to increasing endogenously formed AGEs, to date no studies have established the accumulation of dietary AGEs in the tissues, especially in bone. To the best of our knowledge, only the assay by Mikulíková et al. (2008) using a diet with a high content of fructose, expected to increase plasma AGEs, has demonstrated a dietary-provoked increase in pentosidine levels in collagen-rich tissues.

The BMD values measured in our assay animals were in line with those reported in other studies for this stage of growth (Gala Paniagua et al., 1998). Consistent with the lack of changes in ash, calcium and phosphorus content, BMC in the femur and pelvic bone did not vary significantly (Fig. 2). BMD in the pelvic bone was also unchanged, but BMD in the femur did tend to decrease slightly, although only significant in the rats fed the Insoluble diets, and these animals were also those who had the lowest food intake and body weight (Roncero-Ramos et al., 2012a).

The scientific literature relating BMD data measured by DEXA and AGEs accumulation is not available. In an earlier study by our research group with rats fed MRPs from a glucose-lysine model system, the pentosidine content was much higher than in the rats in the present assay. No change was found in BMC of the pelvic bone and femur, whereas a slight decrease was observed in BMD in the pelvic bone (Navarro et al., 2011). In assays performed in diabetic rats with the same age, BMD measured by pQCT decreased in several long bones, affecting trabecular rather than cortical bones (Prisby et al., 2008; Silva et al., 2009).

## Biomechanical properties

In the load-displacement curve, no differences were observed among the displacement to failure, in the groups assayed (Table 2). Similarly, *in vitro* glycation assays on rat bones did not reveal changes in displacement of tibia or femur using the same kind of test (Reddy, 2003). The diabetic pathology is a disorder whose advance and development is tightly linked with the *in vivo* levels of AGEs due to their involvement in the biochemical pathways related to this illness. Experiments with diabetic rats have shown no significant modifications in the displacement of tibia or femur, even at advanced stages of the disease (Prisby et al., 2008). Thus, although AGEs accumulation in bone has been related to the loss of elasticity, this was not observed in our assay.

Bone bending stiffness significantly decreased in animals fed LMW, HMW and Insoluble diets respect to Control and BC diets. Stiffness mainly depends on bone mineral, which was unchanged in the present assay. Stiffness was positively correlated with density ( $r = 0.558$ ,  $P = 0.002$ ) and the amount of organic matrix ( $r = 0.424$ ,  $P = 0.022$ ), and negatively with the pentosidine content ( $r = -0.520$ ,  $P = 0.004$ ). This result appears to conflict with other findings describing increased stiffness due to AGEs accumulation in bones (Ruppel et al., 2008; Vashishth et al., 2001). The *in vitro* assays by Vashishth et al. (2001) working with demineralised bones subjected to glycation by ribose incubation, demonstrated that this treatment enhances stiffness, although the effects were slighter with mineralised specimens. In spite of the higher pentosidine values found in our experiment, bone bending stiffness decreased, and so there should be other countered factors conditioning this effect. In fact, the multiple regression analysis (Durbin-Watson's correlation) performed indicated that 92 % of the changes in bone stiffness were accounted for by the factors density and pentosidine content, in accordance with the following equation:

$$[\text{Stiffness (N/mm)} = -1.07 \text{ Pentosidine (mmol/mol collagen)} + 179.7 \text{ Density (g/cm}^3\text{)}]$$

in which bone density is the main factor responsible, and the participation of pentosidine is inversely effective, and to a minor degree. Prisby et al. (2008) reported

that advancing diabetes, which is associated with high AGEs levels in serum (Kaňková and Šebeková, 2005), leads to smaller bones, with lower weights and less stiffness, which is in line with our results for the LMW, HMW and Insoluble diets, but not the BC group. According to the above-mentioned authors, the growth delay and the reduction in the cross-sectional dimensions of the large bones could be responsible for this outcome. This conclusion is consistent with our results, since the tibia diameters of the animals fed BC and its fractions were smaller than those of the Control animals. Not only was the delayed growth the cause of the observed effect, but also the MRPs consumption, as established the statistical covariate analysis. When the final animal weights were used as correction factor, the stiffness data showed the same statistical significance as described in Table 2 ( $P < 0.001$ ).

Several studies have shown that bone strength is determined by bone mass and that its stiffness is mainly dependent on mineral content (Viguet-Carrin et al., 2006). In our work, in the tibias of animals fed BC derived fractions, the failure load tended to decrease, especially in groups consuming the higher molecular weight compounds (HMW and Insoluble groups). This decline, although without statistical significance, was more than 25 %, which is in agreement with the reduction rates described by Silva et al. (2009) in diabetic rats. Non-enzymatic cross-links introduce structural changes which are a determinant of bone strength. Moreover, their presence may reduce strength by modifying osteoblastic and osteoclastic activity (Saito and Marumo, 2010), an effect that has been shown after *in vitro* treatment with sugars (Garnero et al., 2006) or during aging (Nyman et al., 2007). Thus, rats fed the isolated fractions from BC had higher deoxypyridinoline values in urine (Roncero-Ramos et al., 2012a) suggesting a situation of increased bone resorption or greater turnover. Only the study by Garnero et al. (2006) has reported that a small accumulation of AGEs, measured as pentosidine, has a positive effect on bone strength.

Bones in the control rats tolerated higher energies to failure, although the difference was not statistically significant. This parameter correlated positively with the organic matrix ( $r = 0.549$ ,  $P = 0.002$ ) and it is known that the organic phase is an important contributor of bone resistance (Zioupou, 2001) and that bone resistance decreases with collagen deterioration (Currey, 2003). As mentioned above, AGEs are

inversely correlated with bone resistance (Ruppel et al., 2008) and products such as pentosidine would partially explain this fact, since their accumulation reduces the post-yield energy dissipation of bone tissue prior to fracture (Tang et al., 2009). Nevertheless, and consistent with our own data, diabetic disease has usually not been found to produce severe effects on the energy at the point of failure (Silva et al., 2009). In the cases where some effects have been detected, the changes take place after 5 (Prisby et al., 2008) or 8 months (Saito et al., 2006) of induced diabetes.

In general, consumption of the assayed diets, and especially in the case of the isolate fractions, led to smaller animals and bones, which modified certain mechanical properties, producing less stiff bones with a lower ability to withstand force and absorb energy to failure. Thus, although the covariate analysis showed a direct effect of the consumption of MRPs derived from BC on bone stiffness, differences in bone size and maturation appeared to account for almost all changes observed in the mechanical properties.

To sum up, our data suggest that the consumption of diets containing bread-derived products, especially those containing its isolate fractions, leads to a reduction in food intake, which seems to delay bone development at a crucial stage of growth, affecting bone characteristics.

Despite our results not being completely conclusive, we guess there is a more direct effect of the consumption of bread-derived MRPs on bone, specially related to the presence of the higher molecular weight compounds. However the manifestations were weaker when the compounds are consumed as a whole food, BC.

Although further study in this field is needed, our study suggests that dietary AGEs may influence bone health in healthy individuals, hence the importance of diet in preventing degenerative diseases.

## **Acknowledgements**

This work was supported by a project of the Spanish Ministry of Science and Innovation. The authors thank Dr. María Luisa Jiménez from Abbott Laboratories for

her kindly technical support in DEXA analysis and Prof. Begoña Calvo from the Mechanical Engineering Department of the University of Zaragoza for her assistance in the interpretation of the mechanical tests. The authors declare there is no conflict of interest.

## REFERENCES

- BURNELL JM, TEUBNER E, KORN D, MILLER A (1977). Role of calcium in bone maturation arrest after thyroparathyroidectomy in the rat. *Am J Physiol*, 232, 33-41.
- BURR DB (2002). The contribution of the organic matrix to bone's material properties. *Bone*, 31, 8-11.
- CUNHA MR, SANTOS JR AR, PETINARI L, GOISSIS G, NONAKA KO, WANG CC, GENARI SC (2010). Characterization of the physical and mechanical properties of femoral bone defects filled with polyanionic collagen scaffolds in ovariectomized rats. *Mater Res*, 13, 239-244.
- CURREY JD (2002). Role of collagen and other organics in the mechanical properties of bone. *Osteoporos Int*, 14, 29-36.
- DELGADO-ANDRADE C, SEIQUER I, HARO A, CASTELLANO R, NAVARRO MP (2010). Development of the Maillard reaction in foods cooked by different techniques. Intake of Maillard-derived compounds. *Food Chem*, 122, 145-153.
- FRIEDMAN M (2003). Food Browning and Its Prevention: An Overview. *J Agric Food Chem*, 44, 631-653.
- FUKUDA S, IIDA H (2004). Age-related changes in bone mineral density, cross-sectional area and the strength of long bones in the hind limbs and first lumbar vertebra in female Wistar rats. *J Vet Med Sci*, 66, 755-760.
- GALA PANIAGUA J, DÍAZ-CURIEL M, DE LA PIEDRA GORDO C, CASTILLA REPARAZ C, TORRALBO GARCÍA M (1998). Bone mass assessment in rats by dual energy X-ray absorptiometry. *Br J Radiol*, 71, 754-758.
- GARNERO P, BOREL O, GINEYTS E, DUBOEUF F, SOLBERG H, BOUXSEIN ML, CHRISTIANSEN C, DELMAS PD (2006). Extracellular post-translational modifications of collagen are major determinants of biomechanical properties of fetal bovine cortical bone. *Bone*, 38, 300-309.

- HENLE T (2003). AGEs in foods: Do they play a role in uremia? *Kidney Int*, 63, 145-147.
- HENLE T (2005). Protein-bound advanced glycation endproducts (AGEs) as bioactive amino acid derivatives in foods. *Amino acids*, 29, 313-322.
- JAMALL IS, FINELLI VN, QUEHEE SS (1981). A simple method to determine nanogram levels of 4-hydroxyproline in biological tissues. *Anal Biochem*, 112, 70-75.
- KAŇKOVÁ K, ŠEBEKOVÁ K (2005). Genetic variability in the RAGE gene: Possible implications for nutrigenetics, nutrigenomics, and understanding the susceptibility to diabetic complications. *Mol Nutr Food Res*, 49, 700-709.
- KATAYAMA Y, AKATSU T, YAMAMOTO M, KUGAI N, NAGATA N (1996). Role of nonenzymatic glycosylation of type I collagen in diabetic osteopenia. *J Bone Miner Res*, 11, 931-937.
- MIKULÍKOVÁ K, ECKHARDT A, KUNES J, ZICHA J, MIKSIK I (2008). Advanced glycation end-product pentosidine accumulates in various tissues of rats with high fructose intake. *Physiol Res*, 57, 89-94.
- MORO L, ROMANELLO M, FAVIA A, LAMANNA MP, LOZUPONE E (2000). Posttranslational modifications of bone collagen type I are related to the function of rat femoral regions. *Calcif Tissue Int*, 66, 151-156.
- NAVARRO MP, DELGADO-ANDRADE C, RUFÍÁN-HENARES JA, CARBALLO J, RUIZ-ROCA B, SEIQUER I, RONCERO-RAMOS I (2011). Efecto del consumo de glicotoxinas alimentarias en los marcadores óseos y propiedades biomecánicas. *Rev Osteoporos Metab Miner*, 3(3), 24-40.
- NYMAN JS, ROY A, TYLER JH, ACUNA RL, GAYLE HJ, WANG X (2007). Age-related factors affecting the postyield energy dissipation of human cortical bone. *J Orthop. Res*, 25, 646-655.
- ODETTI P, ROSSI S, MONACELLI F, POGGI A, CIRNIGLIARO M, FEDERICI M, FEDERICI A (2005). Advanced glycation end products and bone loss during aging. *Ann NY Acad Sci*, 1043, 710-717.



- OLSZTA MJ, CHENG X, JEE SS, KUMAR R, KIM Y-Y, KAUFMAN MJ, DOUGLAS EP, GOWER LB (2007). Bone structure and formation: A new perspective. *Mater Sci Eng R*, 58, 77-116.
- PRISBY RD, SWIFT JM, BLOOMFIELD SA, HOGAN HA, DELP MD (2008). Altered bone mass, geometry and mechanical properties during the development and progression of type 2 diabetes in the Zucker diabetic fatty rat. *J Endocrinol*, 199, 379-388.
- RATH N, HUFF G, HUFF W, BALOG J (2000). Factors regulating bone maturity and strength in poultry. *Poultry Sci*, 79, 1024-1232.
- REDDY GK (1993). Glucose-mediated in vitro glycation modulates biomechanical integrity of the soft tissues but not hard tissues. *J Orthop Res*, 21, 738-743.
- REEVES PG, NIELSEN FH, FAHEY GC (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*, 123, 1939-1951.
- RONCERO-RAMOS I, DELGADO-ANDRADE C, HARO A, RUIZ-ROCA B, MORALES F, NAVARRO MP (2012a). Effects of dietary bread crust Maillard reaction products on calcium and bone metabolism in rats. *Amino Acids*, doi: 10.1007/s00726-011-1160-1163.
- RONCERO-RAMOS I, DELGADO-ANDRADE C, ALONSO-OLALLA R, NAVARRO MP (2012b). Influence of bread crust-derived Maillard reaction products on phosphorus balance in rats. *Eur J Nutr*, 51(7), 871-879.
- ROSEN HN, CHEN V, CITTADINI A, GREENSPAN SL, DOUGLAS PS, MOSES AC, BEAMER WG (1995). Treatment with growth hormone and IGF-I in growing rats increases bone mineral content but not bone mineral density. *J Bone Miner Res*, 10, 1352-1358.
- RUPPEL ME, MILLER LM, BURR DB (2008). The effect of the microscopic and nanoscale structure on bone fragility. *Osteoporos Int*, 19, 1251-1265.
- SAITO M, MARUMO K (2010). Collagen cross-links as a determinant of bone quality: a possible explanation for bone fragility in aging, osteoporosis, and diabetes mellitus. *Osteoporos Int*, 21, 195-214.

- SAITO M, FUJII K, MORI Y, MARUMO K (2006). Role of collagen enzymatic and glycation induced cross-links as a determinant of bone quality in spontaneously diabetic WBN/Kob rats. *Osteoporos Int*, 17, 1514-1523.
- SCHEIJEN JLJM, VAN DE WAARENBURG, MPH, STEHOUWER CDA, SCHALKWIJK CG (2009). Measurement of pentosidine in human plasma protein by a single-column high-performance liquid chromatography method with fluorescence detection. *J Chrom B*, 877, 610-614.
- ŠEBEKOVÁ K, SOMOZA V (2007). Dietary advanced glycation endproducts (AGEs) and their health effects – PRO. *Mol Nutr Food Res*, 51, 1079-1084.
- SELL DR, MONNIER VM (1989). Isolation, purification and partial characterization of novel fluorophores from aging human insoluble collagen-rich tissue. *Connect Tissue Res*, 19, 77-92.
- SILVA MJ, BRODT MD, LYNCH MA, MCKENZIE JA, TANOUYE KM, NYMAN JS, WANG X (2009). Type 1 diabetes in young rats leads to progressive trabecular bone loss, cessation of cortical bone growth, and diminished whole bone strength and fatigue life. *J Bone Miner Res*, 24, 1618-1627.
- SOMOZA V (2005). Five years of research on health risks and benefits of Maillard reaction products. *Mol Nutr Food Res*, 49, 663-672.
- SOMOZA V, WENZEL E, WEISS C, CLAWIN-RADECKER I, GRUBEL N, ERBERSDOBLER HF (2006). Dose-dependent utilisation of casein-linked lysinoalanine, N(epsilon)-fructoselysine and N(epsilon)-carboxymethyllysine in rats. *Mol Nutr Food Res*, 50, 833-841.
- STEGEMANN H, STALDER K (1967). Determination of hydroxyproline. *Clin Chim Acta*, 18, 267-273.
- TAKAHASHI M, HOSHINO H, KUSHIDA K, INOUE T (1995). Direct measurement of crosslinks, pyridinoline, deoxypyridinoline, and pentosidine, in the hydrolysate of tissues using high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem*, 232, 158-162.
- TANG SY, ZEENATH U, VASHISHTH D (2007). Effects of non-enzymatic glycation on cancellous bone fragility. *Bone*, 40, 1144-1151.

- TANG SY, ALLEN MR, PHIPPS R, BURR DB, VASHISHTH D (2009). Changes in non-enzymatic glycation and its association with altered mechanical properties following 1-year treatment with risedronate or alendronate. *Osteoporos Int*, 20, 887-894.
- VASHISHTH D, GIBSON GJ, KHOURY JI, SCHAFFLER MB, KIMURA J, FYHRIE DP (2001). Influence of nonenzymatic glycation on biomechanical properties of cortical bone. *Bone*, 28, 195-201.
- VIGUET-CARRIN S, GARNERO P, DELMAS PD (2006). The role of collagen in bone strength. *Osteoporos Int*, 17, 319-336.
- WANG X, SHEN X, LI X, MAULI AGRAWAL C (2002). Age-related changes in the collagen network and toughness of bone. *Bone*, 31, 1-7.
- ZIOUPOS P (2001). Ageing human bone: factors affecting its biomechanical properties and the role of collagen. *J Biomater Appl*, 15, 187-229.

## **CAPÍTULO 8**

### ***Tránsito metabólico de N<sup>ε</sup>-carboximetil-lisina tras el consumo de AGEs procedentes de la corteza de pan***

---

Irene Roncero-Ramos, Cristina Delgado-Andrade, Frédéric J. Tessier,  
Céline Niquet-Léridon, Christopher Strauch, Vincent M. Monnier,  
María Pilar Navarro

*Food & Function, 2013, en prensa*



## Metabolic transit of N<sup>ε</sup>-carboxymethyl-lysine after consumption of AGEs from bread crust

Irene Roncero-Ramos, Cristina Delgado-Andrade, Frédéric J. Tessier, Céline Niquet-Léridon, Christopher Strauch, Vincent M. Monnier and María Pilar Navarro

*Food Func*, 2013, in press

DOI: 10.1039/c3fo30351a

Received 30th November 2012

Accepted 3rd February 2013



### ABSTRACT

Our aim was to investigate carboxymethyl-lysine (CML) intake and excretion after feeding rats diets containing advanced glycation end-products (AGEs) from bread crust (BC) or its soluble or insoluble fractions, and to identify the factors responsible for the effects observed. CML in serum and different tissues was measured to detect possible accumulations. For 88 days, weanling rats were fed either a control diet or one containing BC, or its soluble low molecular weight (LMW), soluble high molecular weight (HMW) or insoluble fractions. In the last week of the assay, faeces and urine were collected daily and stored as a 1-week pool. After sacrifice, blood was drawn to obtain serum and some organs were removed. CML analysis was performed by HPLC/MS/MS in diets, faeces, urines, serum and tissues. Faecal excretion of CML was strongly influenced by dietary CML levels and represents the major route of excretion (i.e. 33.2 %). However, the urinary elimination of CML was probably limited or saturated, especially when more complex compounds were present in the diet. BC consumption increased CML in the cardiac tissue ( $170 \pm 18$  vs.  $97 \pm 3$   $\mu\text{mol/mol}$  lysine for BC and Control groups), which correlated with the CML intake. The levels of this

AGE in bone were unaffected by the dietary treatment, but in tail tendons CML was greatly increased in the animals that consumed the BC diet ( $102 \pm 13$  vs.  $51 \pm 8$   $\mu\text{mol/mol}$  lysine for BC and Control groups,  $P = 0.006$ ), which was associated with the intake of soluble LMW compounds present in BC. Despite the CML accumulation detected in different tissues, serum levels of protein-bound CML were unchanged, indicating the importance of measuring the free CML in this fluid as a real index of dietary CML.

**Keywords:** bread crust; advanced glycation end-products; carboxymethyl-lysine excretion; serum; tissues.

## INTRODUCTION

The Maillard reaction is one of the most important chemical reactions taking place during thermal processing of food by frying, roasting or baking. The compounds generated in this reaction, called Maillard reaction products (MRPs), are largely responsible for the characteristic sensory attributes of thermally processed food (Ames, 1990).

The Maillard reaction, also referred to as “glycation”, occurs in biological systems by the nonenzymatic reaction of reducing sugar and other  $\alpha$ -carbonylic compounds with proteins. Advanced glycation end-products (AGEs) are a heterogeneous group of compounds which have been associated with pro-oxidative and pro-inflammatory effects and with the progression of diseases such as atherosclerosis, diabetes and chronic renal insufficiency (Šebeková and Somoza, 2007).

Although nutrient composition and the method and conditions of food preparation dramatically affect the final MRPs (Uribarri et al., 2010), it is well-established that MRPs are widely consumed as part of the human diet (Goldberg et al., 2004; Koschinsky et al., 1997), and particularly the earlier compounds, such as Amadori products (Delgado-Andrade et al., 2010). Several studies have shown that dietary MRPs, or AGEs, can be partially absorbed, increasing their circulating level and contributing to the endogenous load of AGEs (Vlassara et al., 2002). According to Faist and Erbersdobler (2001) and Koschinsky et al. (1997) approximately 10-30 % of ingested MRPs are absorbed and transported to the bloodstream and only one-third of the absorbed AGEs are eliminated in the urine.

Carboxymethyl-lysine (CML) was the first AGE identified in foods and it is often used as a marker of both dietary AGEs and their *in vivo* level (Ames, 2008). The absorption, distribution and clearance of dietary CML from different food matrices are still unclear, despite several studies carried out in recent years to better understand its bioavailability and metabolic transit (Delgado-Andrade et al., 2012; Somoza et al., 2006; Tessier and Birlouez-Aragon, 2012). Different food groups have been analysed to estimate their contribution to dietary CML intake (Assar et al., 2009; Tessier and Birlouez-Aragon, 2012) and it has been reported that bakery products are among the



major sources of dietary CML (Henle, 2003). In the study by Somoza et al. (2005) with rats fed diets containing 25 % bread crust, the daily intake of CML was calculated to be at 11 mg/kg body weight/day and urinary excretion of CML was greater than in the group fed the low-AGE diet. In another study by the same authors, CML elimination of 15-22 % in faeces and 26-29 % in urine was recorded after the administration to rats of dietary CML at doses of 110 or 310 mg/kg body weight (Somoza et al., 2006). A direct relationship between CML dietary intake and its urinary and faecal excretion has been established in various studies. Thus, Delgado-Andrade et al. (2012) in their trial using low and high MRP diets consumed by healthy adolescents stated that CML elimination was greater in the adolescents who consumed the high MRP diet. The total CML excretion was around 47 %, and so an important dietary fraction could be absorbed and accumulated in different tissues or metabolized by the intestinal microbiota. However, this study did not further examine plasma or tissue CML levels.

In fact, little is known about dietary CML and its accumulation in different tissues and plasma, where most of the studies did not describe if free or protein-bound CML was measured. In the above-mentioned study by Somoza et al. (2006) higher levels of CML in plasma and kidney were found in rats that consumed a diet with 25 % bread crust. Uribarri et al. (2007) also reported a high correlation of dietary AGE intake with serum CML in healthy adults. Serum CML seems to be dependent on the intake, although it is unclear whether the compound comes from direct absorption or is formed *in vivo* from the dietary intake of highly reactive carbonyl compounds (Tessier and Birlouez-Aragon, 2012).

The purpose of the present study is to investigate CML intake and excretion after long-term feeding of rats with diets containing commonly consumed AGEs obtained from bread crust. Special attention was paid to the soluble and insoluble fractions from bread crust, differing in their molecular weights. They were isolated and studied separately to identify the factors responsible for possible effects. Protein-bound CML in serum and in different tissues was measured to detect the target organs of accumulation.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Extraction of bread crust and its soluble and insoluble fractions**

The bread crust (BC) was supplied by a Spanish manufacturer of cereal-derived food products. The attached bread crumbs were removed manually and the sample was then weighed, lyophilised, powdered and homogenised. A fraction of the BC was then stored at -20°C until diet formulation. In order to access the MRPs and melanoproteins, another considerable fraction was isolated, via enzymatic hydrolysis with pronase E. The results obtained from previous studies by our research group indicated the most appropriate pronase E concentration and incubation time (Delgado-Andrade et al., 2008). Briefly, 125 g of bread crust were digested with 750 mL of a 0.100 mg/mL pronase E solution (400 U/mL in 1M phosphate buffer, pH 8.2) in stoppered test recipients at 37°C for 72 h in a water bath under shaking. The digestion process was more extensively described in a study by Roncero-Ramos et al. (2012). The insoluble fraction obtained was then weighed, lyophilized, homogenised and stored at -20°C until used for diet formulation. It supposed the 57.52 % w/w from the initial bread crust. The soluble fraction (the remainder 42.48 % w/w) was subjected to ultrafiltration as described in the above-mentioned study. The fraction constituted of compounds with a molecular mass higher than 5 kDa was retained (57.14 % w/w, the retentate, high molecular weight, HMW) and the fraction containing compounds with a mass of less than 5 kDa was filtered (42.86 % w/w, the filtrate, low molecular weight, LMW). Both fractions (retentate and filtrate) were lyophilized, powdered and homogenised, and stored at -20°C until used for diet formulation.

### **Preparation of diets**

The AIN-93G purified diet for laboratory rodents (Dyets Inc, Bethlehem, PA) was used as the control diet (Reeves et al., 1993). The bread crust was added to the AIN-93G diet to reach a final concentration of 10 % w/w. This diet was named Bread crust (BC). In order to determine the factors responsible for the effects observed in the trial, the LMW, HMW and Insoluble fractions were also individually added to the diet in

the same proportion as they were present in the 10 % of bread crust, which was calculated based on the recovery of each fraction after pronase E digestion. These diets were named LMW, HMW and Insoluble, respectively. Bread crust is a sodium source, and so, to maintain the concentration of this element at adequate levels, these diets were prepared mixing appropriate proportions of AIN-93G and low-sodium AIN-93G diets, respectively. Calcium carbonate was added when necessary to reach the values present originally in the AIN-93G diet.

The individual analysis of the different diets revealed no modification of the overall nutrient composition, compared with the Control diet (AIN-93G). The mean  $\pm$  SD content of main nutrient of the diets was: moisture (%)  $7.9 \pm 0.4$ ; protein (g/kg)  $168.4 \pm 4.0$ ; fat (g/kg)  $77.9 \pm 1.6$  and sodium (g/kg)  $1.3 \pm 0.1$ .

### **Biological assays**

Thirty weanling Wistar rats weighing  $40.16 \pm 0.90$  g (mean  $\pm$  SE) were randomly distributed into five groups (n = 6) and each group was assigned to one of the dietary treatments. The animals were individually housed in metabolic cages in an environmentally controlled room under standard conditions (temperature: 20-22°C with a 12 h light-dark cycle and 55-70 % humidity). The rats had ad libitum access to their diets and demineralised water (Milli-Q Ultrapure Water System, Millipore Corps., Bedford, MA, USA).

The duration of the experiment was selected aimed to reach the adult age of the rats, when major effects would start to happen due to the chronic consumption of test diets. This prolonged consumption ensured the excretion and deposit of CML in different tissues. The experiment involved a preliminary 81-day period during which solid food intake and body weight changes were monitored weekly, followed by a 7-day period in which faeces and urine from each animal were collected daily and stored separately as a 1-week pool. The faeces were weighed, lyophilised, powdered and then homogenised. The urine was collected in 0.5 % HCl (vol/vol), filtered (Whatman Filter Paper No. 40, ashless, Whatman, England) and diluted to an appropriate volume. On

day 88, after an overnight fast, the animals were anaesthetised with sodium pentobarbital (5 mg per 100 g of body weight) (Abbott Laboratories, Granada, Spain) and terminal exsanguination was performed by a cannulation of the carotid artery. Blood was drawn to obtain serum, and the hearts, the right pelvic bones and the tail tendons were removed, weighed and frozen at -80°C until CML analysis.

All management and experimental procedures carried out in this study were in strict accordance with the current European regulations (86/609 E.E.C.) regarding laboratory animals. The Bioethics Committee for Animal Experimentation at our institution (EEZ-CSIC) approved the study protocol.

### **Sample preparation for CML analysis**

For CML determination, faeces, urines and hearts were lyophilised and powdered, while diets, serum and tail tendons were directly processed. Bones were powdered and homogenised. In all samples, an equivalent to 10 mg proteins was weighted to perform the analytical CML determination. Total nitrogen in diets, urine and faeces was analysed by using a Kjeldahl procedure with demineralization (Block Digestor Selecta S-509; J.P. Selecta, Barcelona, Spain), distillation units (Büchi Laboratoriums Technik AG, Flawil, Switzerland), and titration units (MetromAG, Herisau, Switzerland). In the rest of the lyophilized samples, the nitrogen content was measured by combustion using a LECO FP528 nitrogen analyzer according to the Dumas method. The nitrogen values were converted to protein by multiplication by a factor of 6.25.

For CML determination in serum, a step prior to the acid hydrolysis was carried out for protein precipitation using trichloroacetic acid (TCA).

### **Analytical techniques**

The CML analysis in extracts of diets, faeces, urine, hearts and bones, as well as protein-bound CML in serum, was performed at the Institut Polytechnique LaSalle

Beauvais. All the determinations were done in triplicate, when possible using the method recently developed by Niquet-Léridon and Tessier (2011). Each sample was treated with sodium borohydride to stabilize the Amadori products and to prevent their conversion to CML during the acid hydrolysis. A quantity of reduced sample, equivalent to 10 mg protein, was dissolved in 5 mL of 6 M HCl and incubated at 110°C for 20 h. Three hundred microlitres of each acid hydrolysate was dried under vacuum and reconstituted in 300 µL of internal standard containing 0.15 µg of (D<sub>2</sub>)-CML and 12.5 µg of (<sup>15</sup>N<sub>2</sub>)-lysine (dissolved in 20 mM nonafluoropentanoic acid (NFPA)) prior to analysis by LC–MS/MS. Since these internal standards are isotopes of CML and lysine they follow the same ionization as CML and lysine, which increases the precision and accuracy of the measurements compared with previous studies (Birlouez-Aragon et al., 2010). Liquid chromatography coupled to linear ion trap tandem mass spectrometry was used for the analysis of CML. The following instrumentation and criteria were used: Surveyor HPLC system coupled to an LTQ mass spectrometer working in its tandem operation mode (ThermoFisher Scientific, Courtaboeuf, France); thermostat, 10°C; column Hypercarb, 100 mm × 2.1 mm, 5 µm with a guard column Hypercarb, 10 mm × 2.1 mm, 5 µm; injection volume, 10 µL; flow rate, 0.2 mL/min; mobile phase, 20 mM NFPA in a water–acetonitrile gradient as follows: linear increase of acetonitrile from 0 to 50 % over 20 min; ion source: electrospray ionization in positive mode; multiple reaction monitoring with the specific transitions *m/z* 205.0/130.0 and *m/z* 207.0/130.0 for CML and (D<sub>2</sub>)-CML, respectively, with a normalized collision energy of 37 %. Lysine and its isotope were detected with the specific transitions *m/z* 147.0/130.0 and *m/z* 149.0/131.0, respectively.

For reasons of project development, the CML analysis for tail tendons was carried out at Case Western Reserve University (Cleveland, OH). CML was determined in acid hydrolysates of processed collagen tendon samples and derivatised as its trifluoroacetyl methyl esters by selected ion monitoring gas chromatography GC/MS as previously described by Sell et al. (2007). Despite these data were obtained by a different analytical technique they are valid since they were only used to compare total CML content in tail tendons between groups after consumption of different diets.

## **Statistical analysis**

All data were statistically tested by one-way analysis of the variance (ANOVA), followed by Duncan's test to compare means that showed a significant variation ( $P < 0.05$ ). Analyses were performed using Statgraphics Plus, version 5.1, 2001. Evaluation of the relationship between the different variables was carried out by computing the relevant correlation coefficient (Pearson's linear correlation) at the  $P < 0.05$  confidence level.

## RESULTS AND DISCUSSION

### CML intake and excretion

The total CML content (mean  $\pm$  S.D.) in the different diets was as follows:  $2.18 \pm 0.03$ ;  $3.99 \pm 0.06$ ;  $2.63 \pm 0.03$ ;  $2.65 \pm 0.06$  and  $3.96 \pm 0.04$   $\mu\text{g/g}$  diet for the Control, BC, LMW, HMW and Insoluble diets, respectively. As expected, the Control diet (AIN-93G) had a certain basal level of CML, as previously documented (Tang and Vashishth, 2010). All the experimental diets had a significantly higher CML content than the Control diet ( $P < 0.05$ ), especially the BC and Insoluble diets, which moreover had a higher content than did the diets containing the soluble fractions of BC ( $P < 0.05$ ).

The food consumption during the last week balance was  $14.2 \pm 0.5$ ,  $14.1 \pm 0.3$ ,  $13.9 \pm 0.3$ ,  $13.6 \pm 0.3$  and  $12.9 \pm 0.4$  g/day for the Control, BC, LMW, HMW and Insoluble groups, respectively (Roncero-Ramos et al., 2012). Although the food consumption was similar in the BC, LMW and HMW groups and significantly lower in the Insoluble group, compared with the Control group, the abundance of CML in the BC-derived diets led to a higher CML daily intake in these animals (Table 1). Šebeková et al. (2012) feeding 8-week old rats a diet containing 25 % bread crust aroma MRPs, observed that food consumption increased when CML content was higher than in the standard diet. In our study, the highest values of CML consumption were recorded for the BC and Insoluble groups, suggesting that the insoluble form of protein-bound CML was probably the main form present in these diets.

As a consequence of the total CML intake, the faecal excretion was also higher in the BC and Insoluble groups, especially the BC group, where the percentage of faecal CML from the intake was significantly greater than in the Control group (Table 1). Several authors have pointed out the strong correlation between CML intake and its faecal excretion (Liardon et al., 1987; Tessier et al., 2010), a fact also established in the present study ( $r = 0.876$ ,  $P < 0.001$ ) (Fig. 1a). Although faecal total CML excretion was highest in the BC group, the possible absorption could also be important, also in base to the urinary excretion as it will be described later. On the other hand, the presence of CML in faeces could be underestimated to some extent because, during the digestive process, the CML can be degraded by colonic microbiota, and so some

**Table 1.** CML daily intake and excretion after consumption of the different diets. Percentage of faecal, urinary and total CML excreted from the intake

Groups	Intake	Faeces	Urine	CML excretion rate (%)		
				Faeces	Urines	Total
		µg/day				
Control	30.16 ± 1.56 <sup>A</sup>	9.96 ± 0.63 <sup>A</sup>	6.41 ± 0.61 <sup>A</sup>	33.20 ± 1.88 <sup>A</sup>	21.37 ± 1.85 <sup>A</sup>	54.57 ± 2.21 <sup>A</sup>
BC	57.14 ± 1.43 <sup>B</sup>	23.20 ± 1.32 <sup>B</sup>	8.47 ± 0.88 <sup>B</sup>	40.54 ± 1.82 <sup>B</sup>	14.91 ± 1.65 <sup>BC</sup>	55.45 ± 2.58 <sup>A</sup>
LMW	35.96 ± 1.18 <sup>C</sup>	10.07 ± 0.62 <sup>A</sup>	6.50 ± 0.50 <sup>A</sup>	27.89 ± 1.09 <sup>A</sup>	18.31 ± 1.74 <sup>AB</sup>	46.20 ± 1.65 <sup>B</sup>
HMW	36.82 ± 1.12 <sup>C</sup>	11.95 ± 1.23 <sup>A</sup>	4.54 ± 0.41 <sup>C</sup>	32.51 ± 3.36 <sup>A</sup>	12.27 ± 1.00 <sup>C</sup>	44.78 ± 4.04 <sup>B</sup>
Insoluble	52.03 ± 1.77 <sup>D</sup>	16.54 ± 1.01 <sup>C</sup>	3.91 ± 0.24 <sup>C</sup>	31.88 ± 1.89 <sup>A</sup>	7.49 ± 0.29 <sup>D</sup>	39.37 ± 1.62 <sup>B</sup>

Values are means ± SE, (*n* = 6). Different letters within a column indicate significant differences between groups (*P* < 0.05)

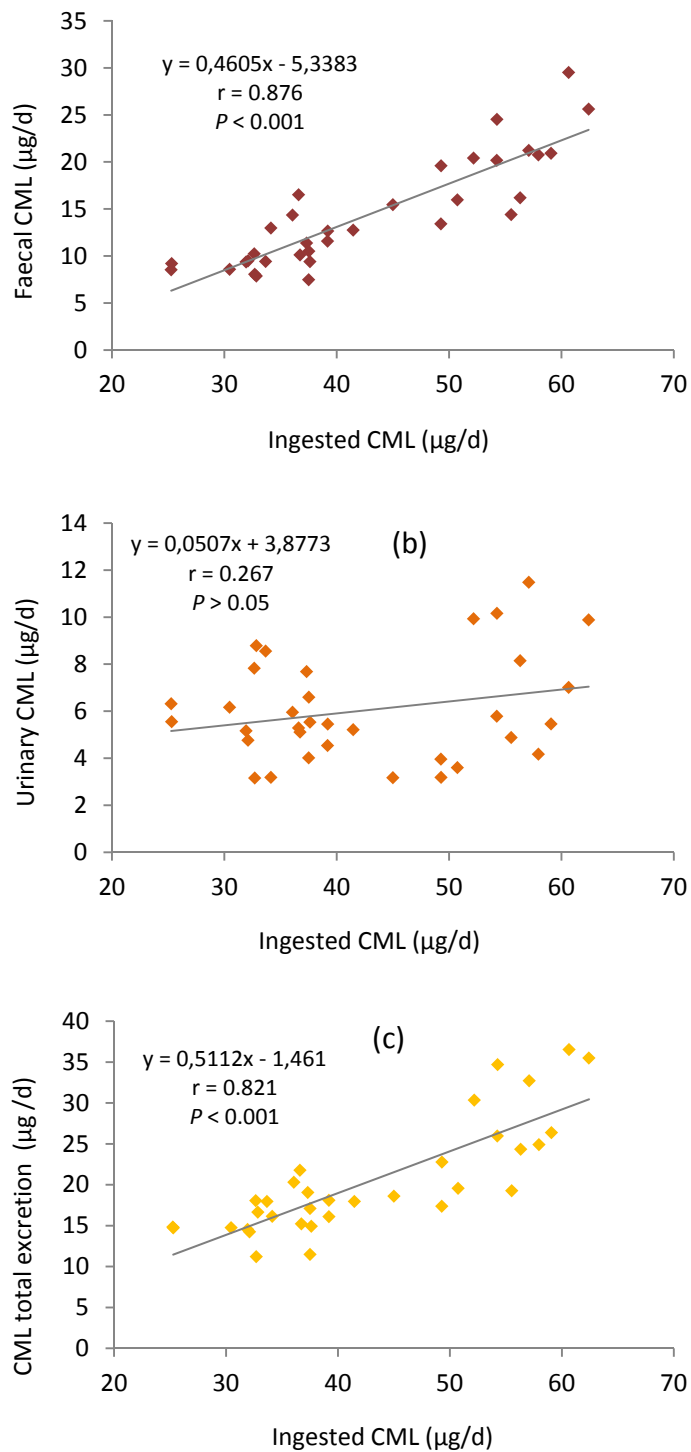


derivatives could be absorbed and others excreted in faeces. It is well-known that the intestinal microbiota can degrade the most advanced MRPs into low molecular weight compounds (Somoza, 2005). The metabolic transit of absorbed CML and its derivatives remains unclear but it has been established that plasma CML concentrations and tissue levels can be increased by high dietary consumption of CML (Somoza et al., 2006) or by the presence of diabetes (Vlassara et al., 2002).

Some of the absorbed CML is eliminated intact by urine. Significantly more urinary total CML was excreted by the BC group than by the Control group (Table 1). However, levels were lower in the groups fed the most complex and insoluble compounds, i.e., the HMW and Insoluble groups. This finding seems logical, considering that the compounds with higher molecular weight present in the HMW and Insoluble fractions could contain a majority proportion of insoluble protein-bound CML resistant to digestion and thus to absorption. Despite the positive correlation between ingested CML and its urinary excretion, reported in other studies (Birlouez-Aragon et al., 2010; Liardon et al., 1987), we did not find the elimination of CML to be significantly correlated with the intake of this compound ( $r = 0.267$ ;  $P > 0.05$ ) (Fig. 1b). This disagreement could be the product of using different fractions from the BC where CML was present in different forms, more or less complex. Some of the fractions containing CML could be easily absorbed, but others, carried by more insoluble polymers (proteins or melanoidins) could be difficult to digest. This is probably the reason why a good correlation between dietary CML and urinary excretion is not found.

The rate of urinary CML elimination was always lower after consumption of BC and derivatives. The lowest value was recorded by the Insoluble group (7 %) followed by HMW (12 %) and BC (15 %), while the LMW group eliminated the highest proportion of the ingested CML. The study by Somoza et al. (2006) in which rats were given doses of 110 or 310 mg per kg body weight of CML-fortified casein for 10 days, described CML urinary elimination rates of 26 % and 29 %, respectively, which is close to the rates we measured.

**Figure 1.** Relationship between CML intake (mg/day) and either faecal CML (a), urinary CML (b) or total excretion (c)



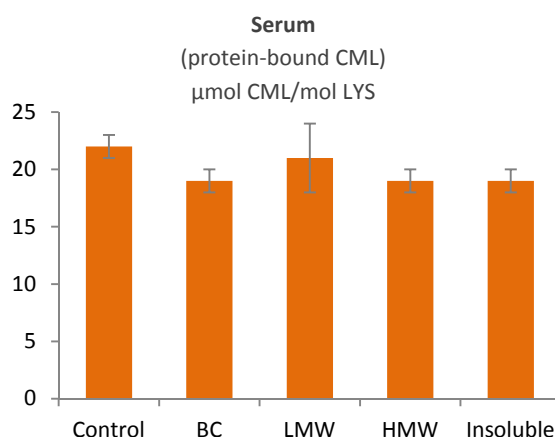
Values are means  $\pm$  SE, ( $n = 6$ ).  $P < 0.05$  indicates the existence of a significant correlation

Considering the total percentage of CML excreted, only the BC group recorded the same elimination rate as the Control group, while the remaining groups presented lower values (Table 1). In view of the high CML intake by the BC group, a higher recovery rate could be expected. After the consumption of diets containing CML, different factors could be responsible for the incomplete retrieval: (i) digestive degradation of ingested CML; (ii) biotransformation of the compound within the internal media; or (iii) exceeding the detoxification capacity of the organism, leading to an accumulation of CML in the target tissues. Similar recoveries, of 45-50 %, were obtained by Delgado-Andrade et al. (2012) in human volunteers; and Alamir et al. (2012) documented that 60 % of the ingested CML from a diet based on extruded protein was eliminated in the faeces and urine of rats. Moreover, in the above-mentioned study by Somoza et al. (2006), 50 % of the ingested CML was not eliminated in its original chemical form. In the present trial, 60 % of the CML intake in the Insoluble group was not recovered, and could have been eliminated as unidentified metabolites or accumulated into tissues. A significant, strong correlation was found between the total CML excreted and its intake ( $r = 0.821$ ;  $P < 0.001$ ), which reflects the importance of faecal excretion as the main route of CML elimination.

### **Plasma and tissue CML levels**

Much of the CML ingested has an unknown destination in the body. Several studies have reported a CML increase in plasma. Birlouez-Aragon et al. (2010) measured around 7 % more protein-bound CML in plasma in subjects consuming a diet rich in MRPs compared with those ingested the low MRP diet. The recent studies of Šebeková et al. (2012) and Alamir et al. (2012) either describe modifications in protein-bound CML in plasma. In the present assay, no differences in serum protein-bound CML were found among the groups (Fig. 2). It should be emphasised that only protein-bound-CML, the fraction which is assumed to be least affected by dietary CML intake, was measured in this assay, since it better represents the endogenous portion. For this reason, there is growing interest in determining the free CML levels in plasma as possible a real index of the CML obtained from the diet (Delgado-Andrade et al., 2012).

**Figure 2.** Protein-bound CML in serum expressed as  $\mu\text{mol}/\text{mol}$  lysine



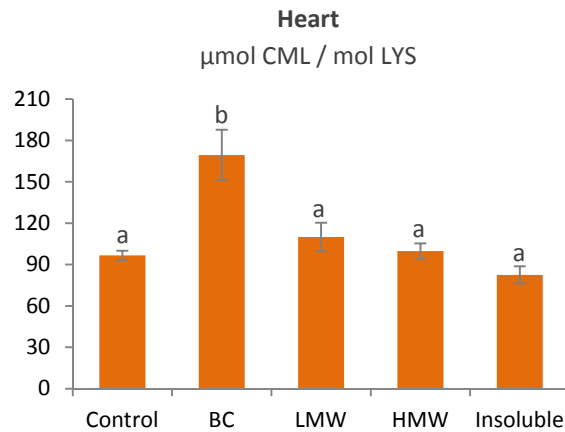
Values are means  $\pm$  SE, ( $n = 6$ ). No significant differences were found between the groups ( $P > 0.05$ )

It has recently been established that consumption by rats of a diet based on crushed extruded biscuits did not affect the level of protein bound CML in plasma; however, the free fraction increased in response to the dietary exposure (Niquet-Léridon et al., 2012). Unfortunately, methodological difficulties made this determination impossible in our facilities.

As previously mentioned, the source of CML in the body could be the absorbed compound present in foods or alternatively the highly reactive carbonyl intermediates present in the diet and acting as seeds for *in vivo* CML formation (Henle, 2003). These dicarbonyl compounds could increase the CML level in plasma or lead to an accumulation of CML in tissues. High concentrations of CML have been detected in plasma (Uribarri et al., 2007) and several tissues such as the skin (Sell and Monnier, 1989), the kidneys (Li et al., 2012) or the heart (Schalkwijk et al., 2004). Little has been published regarding CML accumulation in the heart after the intake of MRPs, although increased CML deposits have been detected in diabetic subjects (Schalkwijk et al., 2004), and diabetes is characterised by increased plasma CML (Jara et al., 2012). In our study, consumption of the BC diet raised total CML concentration in the heart compared with the other groups (Fig. 3), and this finding is corroborated by the existence of a slight but significant correlation between CML daily intake and the accumulation in the heart ( $r = 0.414$ ;  $P = 0.021$ ). A limitation of this study is the fact that the remaining blood was not completely removed from the heart prior to the CML

analysis. For this reason, free CML from the blood could contribute to the final total CML content in the heart. In any case, since we did not observe any modifications in the protein-bound CML in plasma, this would indicate that the CML accumulation in heart could have a dietary origin.

**Figure 3.** CML in heart expressed as  $\mu\text{mol}/\text{mol}$  lysine

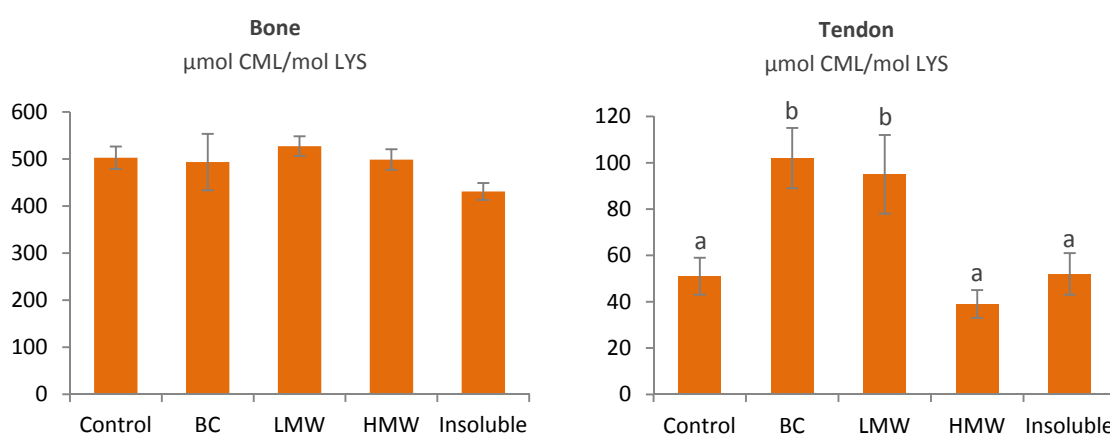


Values are means  $\pm$  SE, ( $n = 6$ ). Different letters indicate significant differences between the groups ( $P < 0.05$ )

Regarding the total CML detected in the bones, no modifications were observed (Fig. 4a). Nevertheless, the total CML in the tail tendons was significantly increased in the BC and LMW groups (Fig. 4b), which suggests that the low molecular weight compounds of the BC group were possibly responsible for the effect, since in the HMW and Insoluble groups no changes were detected. Moreover, reactive carbonyls, expected to be present in the BC and LMW fractions, could act as promoters for the *in vivo* formation of CML. It has been established that tendon collagen is more susceptible to be glycated than is bone collagen (Reddy, 2003), possibly because the mineral phase provides some protection against glycation (Vashishth et al., 2001). Moreover, collagen type I turnover is faster in bone than in other connective tissues such as cartilage or ligaments (Eastell et al., 1997), and hence the greater CML accumulation in tendons could also be explained by its slower turnover. The deposition or formation of AGEs in bones has been described (Silva et al., 2009), as well as in tendons (Sell and Monnier, 1997), usually after *in vitro* glycation, during the advance of diabetes or even as an age-related accumulation (Verziji et al., 2000). However, to the

best of our knowledge CML deposition in tendons related to simple dietary exposure has not been described previously. The only comparable study is that carried out by Mikulíková et al. (2008), using a diet with a high fructose content, which demonstrated a dietary-provoked increase in pentosidine levels, another important AGE, in collagen-rich tissues. The origin of CML in bone and tendons is probably different. In the case of tendons, there is the possibility of the direct deposition of the ingested CML, but this is not the case with bone, where its special constitution and physiology would prevent dietary CML deposition, and so its *in situ* formation in a dicarbonyl compound environment would be more plausible.

**Figure 4.** CML in bone and in tail tendon ( $\mu\text{mol/mol}$  lysine)



Values are means  $\pm$  SE, ( $n = 6$ ). Different letters indicate significant differences between the groups ( $P < 0.05$ )

In summary, it can be concluded that the faecal excretion of BC-derived CML is highly influenced by the dietary level and represents the major route of excretion. However, the elimination rate in urine is probably saturated, with stronger effects when more complex compounds are present. In our study, surprisingly, BC consumption induced an increase in total CML in the cardiac tissue, a fact that could be related to CML intake. Levels of this AGE in bone were unaffected by dietary factors, but in tail tendons total CML was greatly increased after BC consumption, probably caused by the soluble LMW compounds. In spite of the total CML accumulation

detected in different tissues, protein-bound CML levels in serum were unchanged, indicating the importance of measuring the free CML in this fluid as a possible real index of the CML of dietary origin. Likely the most significant result of the present study is the demonstration that the continuous consumption of common dietary AGEs leads to accumulations of CML in the target tissues of healthy individuals, with special relevance in the case of the heart tissue which represent the major originality. The functional effects of this fact need to be considered in depth in future studies.

### **Acknowledgments**

This work was supported by a project of the Spanish Ministry of Science and Innovation. The authors thank Grupo Siro, a Spanish manufacturer of cereal-derived food products, for supplying the bread crust samples. The authors declare there is no conflict of interest.

## REFERENCES

- ALAMIR I, NIQUET-LÉRIDON C, JACOLOT P, RODRIGUEZ C, OROSCO M, ANTON PM, TESSIER FJ (2012). Digestibility of extruded proteins and metabolic transit of N(epsilon)-carboxymethyllysine in rats. *Amino acids*, 16, 16.
- AMES JM (1990). Control of the Maillard reaction in food systems. *Trends Food Sci. Technol*, 1, 150-154.
- AMES JM (2008). Determination of Nε-(carboxymethyl)lysine in foods and related systems. *Ann NY Acad Sci*. 1126, 20-24.
- ASSAR S, MOLONEY C, LIMA M, MAGEE R, AMES J (2009). Determination of Nε-(carboxymethyl)lysine in food systems by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Amino acids*, 36, 317-326.
- BIRLOUEZ-ARAGON I, SAAVEDRA G, TESSIER FJ, GALINIER A, AIT-AMEUR L, LACOSTE F, NIAMBA C-N, ALT N, SOMOZA V, LECERF J-M (2010). A diet based on high-heat-treated foods promotes risk factors for diabetes mellitus and cardiovascular diseases. *Am J Clin Nutr*, 91, 1220-1226.
- DELGADO-ANDRADE C, RUFÍAN-HENARES JA, MORALES FJ (2008). Procedure to analyse Maillard reaction-associated fluorescence in cereal-based products. *Czech J Food Sci*, 26, 339-346.
- DELGADO-ANDRADE C, SEIQUER I, HARO A, CASTELLANO R, NAVARRO MP (2010). Development of the Maillard reaction in foods cooked by different techniques. Intake of Maillard-derived compounds. *Food Chem*, 122, 145-153.
- DELGADO-ANDRADE C, TESSIER FJ, NIQUET-LÉRIDON C, SEIQUER I, NAVARRO MP (2012). Study of the urinary and faecal excretion of Nε-carboxymethyllysine in young human volunteers. *Amino acids*, 43, 595-602.
- EASTELL R, COLWELL A, HAMPTON L, REEVE J (1997). Biochemical markers of bone resorption compared with estimates of bone resorption from radiotracer kinetic studies in osteoporosis. *J Bone Miner Res*, 12, 59-65.



- FAIST V, ERBERSDOBLER HF (2001). Metabolic transit and in vivo effects of melanoidins and precursor compounds deriving from the Maillard reaction. *Ann Nutr Metab*, 45, 1-12.
- GOLDBERG T, CAI W, PEPPA M, DARDAINE V, BALIGA BS, URIBARRI J, VLASSARA H (2004). Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods. *J Am Diet*, 104, 1287-1291.
- HENLE T (2003). AGEs in foods: Do they play a role in uremia? *Kidney Int*, 63, 145-147.
- JARA N, LEAL MJ, BUNOUT D, HIRSCH S, BARRERA G, LEIVA L, DE LA MAZA MP (2012). Dietary intake increases serum levels of carboxymethyl-lysine (CML) in diabetic patients. *Nutr Hosp*, 27, 1272-1278.
- KOSCHINSKY T, HE C-J, MITSUHASHI T, BUCALA R, LIU C, BUENTING C, HEITMANN K, VLASSARA H (1997). Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): An environmental risk factor in diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94, 6474-6479.
- LI Y-C, TSAI S-H, CHEN S-M, CHANG Y-M, HUANG T-C, HUANG Y-P, CHANG C-T, LEE J-A (2012). Aristolochic acid-induced accumulation of methylglyoxal and N $\epsilon$ -(carboxymethyl)lysine: An important and novel pathway in the pathogenic mechanism for aristolochic acid nephropathy. *Biochem Biophys Res Commun*, 423, 832-837.
- LIARDON R, DE WECK-GAUDARD D, PHILIPPOSIAN G, FINOT PA (1987). Identification of N.epsilon.-carboxymethyllysine: a new Maillard reaction product in rat urine. *J Agric Food Chem*, 35, 427-431.
- MIKULÍKOVÁ K, ECKHARDT A, KUNES J, ZICHA J, MIKSIK I. (2008). Advanced glycation end-product pentosidine accumulates in various tissues of rats with high fructose intake. *Physiol Res*, 57, 89-94.
- NIQUET-LÉRIDON C, ALAMIR I, OROSCO M, ANTON PM, TESSIER FJ (2012). Digestibility of caseins and N $\epsilon$ -carboxymethyl-lysine from extruded biscuits in rats. Book of abstracts of the 11<sup>th</sup> International Symposium on the Maillard reaction, 66.

- NIQUET-LÉRIDON C, TESSIER FJ (2011). Quantification of N(epsilon)-carboxymethyl-lysine in selected chocolate-flavoured drink mixes using high-performance liquid chromatography-linear ion trap tandem mass spectrometry. *Food Chem*, 126, 655-663.
- REDDY GK (2003). Glucose-mediated in vitro glycation modulates biomechanical integrity of the soft tissues but not hard tissues. *J Orthop Res*, 21, 738-743.
- REEVES PG, NIELSEN FH, FAHEY GC (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*, 123, 1939-1951.
- RONCERO-RAMOS I, DELGADO-ANDRADE C, HARO A, RUIZ-ROCA B, MORALES F, NAVARRO, M.P (2012). Effects of dietary bread crust Maillard reaction products on calcium and bone metabolism in rats. *Amino Acids*, doi: 10.1007/s00726-011-1160-3.
- SCHALKWIJK CG, BAIDOSHVILI A, STEHOUWER CDA, VAN HINSBERGH VWM, NIESSEN, HWM (2004). Increased accumulation of the glycoxidation product Nε-(carboxymethyl)lysine in hearts of diabetic patients: generation and characterisation of a monoclonal anti-CML antibody. *Biochim Biophys Acta*, 1636, 82-89.
- ŠEBEKOVÁ K, KLENOVICS KS, BOOR P, CELEC P, BEHULIAK M, SCHIEBERLE P, HEIDLAND A, PALKOVITS M, SOMOZA V (2012). Behaviour and hormonal status in healthy rats on a diet rich in Maillard reaction products with or without solvent extractable aroma compounds. *Physiol Behav*, 105, 693-701.
- ŠEBEKOVÁ K, SOMOZA V (2007). Dietary advanced glycation endproducts (AGEs) and their health effects – PRO. *Mol Nutr Food Res*, 51, 1079-1084.
- SELL DR, MONNIER VM (1989). Isolation, purification and partial characterization of novel fluorophores from aging human insoluble collagen-rich tissue. *Connect Tissue Res*, 19, 77-92.
- SELL DR, MONNIER VM (1997). Age-related association of tail tendon break time with tissue pentosidine in DBA/2 vs C57BL/6 mice: the effect of dietary restriction. *J Gerontol Ser A*, 52, 277-284.

- SELL DR, STRAUCH CM, SHEN W, MONNIER VM (2007). 2-Amino adipic acid is a marker of protein carbonyl oxidation in the aging human skin: effects of diabetes, renal failure and sepsis. *Biochem J*, 404, 269-277.
- SILVA MJ, BRODT MD, LYNCH MA, MCKENZIE JA, TANOUYE KM, NYMAN JS, WANG X (2009). Type 1 diabetes in young rats leads to progressive trabecular bone loss, cessation of cortical bone growth, and diminished whole bone strength and fatigue life. *J Bone Miner Res*, 24, 1618-1627.
- SOMOZA V (2005). Five years of research on health risks and benefits of Maillard reaction products. *Mol Nutr Food Res*, 49, 663-672.
- SOMOZA V, LINDENMEIER M, HOFMANN T, FRANK O, ERBERSDOBLER HF, BAYNES JW, THORPE SR, HEIDLAND A, ZILL H, BEK S, HUBER J, WEIGLE T, SCHEIDLER S, BUSCH AE, ŠEBEKOVÁ K (2005). Dietary bread crust advanced glycation end products bind to the receptor for AGEs in HEK-293 kidney cells but are rapidly excreted after oral administration to healthy and subtotaly nephrectomized *rats*. *Ann NY Acad Sci*, 1043, 492-500.
- SOMOZA V, WENZEL E, WEISS C, CLAWIN-RADECKER I, GRUBEL N, ERBERSDOBLER HF (2006). Dose-dependent utilisation of casein-linked lysinoalanine, N(epsilon)-fructoselysine and N(epsilon)-carboxymethyllysine in rats. *Mol Nutr Food Res*, 50, 833-841.
- TANG SY, VASHISHTH D (2010). Non-enzymatic glycation alters microdamage formation in human cancellous bone. *Bone*, 46, 148-154.
- TESSIER F, BIRLOUEZ-ARAGON I (2012). Health effects of dietary Maillard reaction products: the results of ICARE and other studies. *Amino acids*, 42, 1119-1131.
- TESSIER FJ, NIQUET C, RHAZ L, HEDHILI K, SEIQUER I, NAVARRO MP, DELGADO-ANDRADE C (2010). N<sup>ε</sup>-carboxymethyllysine: its origin in selected foods and its urinary and faecal excretion in healthy humans. In: *Maillard Reaction Interface between Aging, Nutrition and Metabolism*. Eds: Thomas MC, Forbes JM. RSC Publishing, Cambridge, 332, 144-150.

- URIBARRI J, CAI W, PEPPA M, GOODMAN S, FERRUCCI L, STRIKER G, VLASSARA H (2007). Circulating glycotoxins and dietary advanced glycation endproducts: two links to inflammatory response, oxidative stress, and aging. *J Gerontol Ser A*, 72, 427-433.
- URIBARRI J, WOODRUFF S, GOODMAN S, CAI W, CHEN X, PYZIK R, YONG A, STRIKER GE, VLASSARA H (2010). Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet. *J Am Diet Assoc*, 110, 911-916.
- VASHISHTH D, GIBSON GJ, KHOURY JI, SCHAFFLER MB, KIMURA J, FYHRIE DP (2001). Influence of nonenzymatic glycation on biomechanical properties of cortical bone. *Bone*, 28, 195-201.
- VERZIIL N, DEGROOT J, OLDEHINKEL E, BANK RA, THORPE SR, BAYNES JW, BAYLISS MT, BIJLSMA JW, LAFEVER FP, TEKOPPELE JM (2000). Age-related accumulation of Maillard reaction products in human articular cartilage collagen. *Biochem J*, 2, 381-387.
- VLASSARA H, CAI W, CRANDALL J, GOLDBERG T, OBERSTEIN R, DARDAINE V, PEPPA M, RAYFIELD EJ (2002). Inflammatory mediators are induced by dietary glycotoxins, a major risk factor for diabetic angiopathy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99, 15596-15601.



## **CAPÍTULO 9**

### ***Discusión general***

---



## 1. Ingesta y peso

Los aromas y sabores agradables que genera el desarrollo de la reacción de Maillard en los alimentos, los hacen apetecibles para el consumidor y pueden favorecer su consumo. No obstante, la regulación de la ingesta calórica debe prevalecer y aunque existen resultados de estimulación de ingesta (Birlouez-Aragon et al., 2010) no siempre se traduce en incrementos del consumo dietético como se ha descrito, por ejemplo en individuos que ingieren dietas similares pero en las que se ha incrementado o deprimido la presencia de PRMs (Seiquer et al., 2008a). Los resultados en animales que se alimentan de dietas mezcladas con los PRMs, situaciones monótonas porque no pueden elegir otros alimentos, son variados, pero con frecuencia describen estabilidad (Hofmann et al., 2002) o descensos del consumo alimentario cuando se ingieren PRMs procedentes de sistemas modelo (Delgado-Andrade et al., 2006) o de alimentos (Sarriá et al., 2001).

En estos ensayos, la cantidad de alimento ingerido durante todo el periodo experimental disminuyó en los animales que consumieron las dietas con la corteza de pan y sus fracciones respecto a los que tomaban la dieta Control. La reducción de la ingesta podría explicarse por la sensación de “estómago lleno” producida por estos compuestos y relacionada con un retraso en el vaciamiento gástrico que provocaría sensación de saciedad. Tanaka et al. (1975) y Kimiagar et al. (1980) han relacionado la ingesta de diferentes PRMs en ratas con un proceso digestivo más lento, provocado por un retraso del vaciamiento gástrico. A este respecto, Rérat et al. (2002) mostraron que la fructosil-lisina no se detectaba en sangre portal de cerdos hasta 4 horas después



de la ingesta, mientras que la lisina libre aparecía tras 1 hora de digestión, signo evidente de un retraso en su digestión y absorción.

Se sabe que los sólidos se vacían más lentamente que los líquidos, y que las partículas menos digestibles o de mayor tamaño permanecen más tiempo en el estómago (Kutchai, 1998). De acuerdo con esta premisa observamos que el descenso del consumo alimentario fue más acusado y duradero a lo largo del periodo experimental en los animales que ingirieron los compuestos de mayor peso molecular e insolubles. De hecho, la ingesta del grupo HMW se redujo en torno a un 12 %, comparada con el Control, y hasta un 20 % la de aquellos que se alimentaban con la fracción insoluble. Algunos autores han relacionado el consumo de dietas con PRMs más avanzados con menor digestibilidad. Delgado-Andrade (2002) describió que las mezclas de glucosa-lisina y glucosa-metionina calentadas durante 90 minutos, cuyos PRMs debían ser más complejos, mostraban menor digestibilidad proteica que las mezclas que se calentaban sólo durante 30 minutos. Al respecto, se conoce que la tasa de absorción de los compuestos más polimerizados, como las melanoidinas, es menor que la de las fracciones de más bajo peso molecular (Faist y Erbersdobler, 2001). Concretamente para el pan, Somoza et al. (2005b) señalaron que tras el consumo de dietas, que incluían corteza de pan, incrementaba la presencia en heces de compuestos no digeridos. Por tanto, las melanoidinas se digieren escasamente en el intestino proximal y, en consecuencia, como parte del alimento no digestible, llegan al intestino grueso, donde pueden ser fermentados por la microflora (Dell'Aquila et al., 2003) de forma similar a la fibra, componente alimentario que también retrasa el vaciamiento gástrico (Benini et al., 1995). En esta línea, Borrelli y Fogliano (2005) señalan un efecto prebiótico de las melanoidinas de la corteza del pan sobre las bifidobacterias, signo evidente de que estos compuestos llegan al colón, lo que podría incidir en la ingesta, ya que según Koopsman (1983) el volumen de alimento no digestible que alcanza la última porción del intestino delgado podría regular el consumo alimentario. Acorde con esto, Abu-Dweih et al. (2000) indicaron que el descenso del consumo se hace más pronunciado paralelamente al incremento del pardeamiento.

En concordancia con la disminución de la ingesta de alimento se redujo el peso corporal de las ratas. Los animales que consumieron las dietas HMW e Insoluble alcanzaron pesos menores que las que se alimentaron de dieta Control, reflejando la menor ingesta global, que parece ser el verdadero responsable de la merma ponderal, ya que todas las dietas se utilizaron con una eficacia similar (Delgado-Andrade et al., 2013) y, por ello, sólo se deterioró el peso en los que ingirieron menos alimento. Otros estudios han descrito también descensos en el peso corporal y en el crecimiento, asociados a la ingesta de PRMs que proceden tanto de sistemas modelo (Finot, 2003; O'Brien y Walker, 1988) como de alimentos (Seiquer et al., 2010).

## **2. Balance fosfocálcico y distribución tisular**

Como consecuencia del descenso del consumo alimentario, más acusado en los grupos que ingerían las fracciones de mayor peso molecular, la ingesta de calcio y fósforo tendió a decrecer durante todo el periodo experimental. Además, en la última semana, este parámetro alcanzó los menores valores en los grupos HMW e Insoluble, reflejando las cifras más bajas de consumo (descensos del 8 % y 15 % respectivamente comparados con el Control).

Como resultado de las menores ingestas, actuaron los mecanismos homeostáticos que regulan los balances de calcio y fósforo, disminuyendo la excreción fecal de ambos minerales en los grupos HMW e Insoluble, para tratar de mantener sus respectivas absorciones. De hecho, la ingesta y la excreción fecal de cada uno de ellos estuvieron positivamente correlacionadas ( $r = 0,664$  y  $r = 0,645$  para calcio y fósforo respectivamente;  $P = 0,000$ ). Estos cambios originaron una tendencia al incremento de la digestibilidad, significativa en los animales que consumieron los compuestos más avanzados de alto peso molecular e insolubles en el caso del fósforo. Así, se demuestra que la presencia de los derivados de la corteza del pan en la dieta no ha sido capaz de menoscabar la efectividad del proceso digestivo. Más aun, en los casos en que la ingesta disminuye, la eficacia del proceso aumenta. La capacidad de los PRMs para deteriorar la digestión y absorción de los nutrientes minerales se atribuye a su poder quelante (O'Brien y Morrissey, 1997); la formación de complejos insolubles con el

micronutriente dificultaría o impediría su absorción. Sin embargo, este mecanismo no sucedería en el fósforo por su comportamiento como anión y ha de señalarse que, debido a la baja afinidad de los PRMs por el calcio (Rendleman, 1987), posiblemente su quelación fue minoritaria. Incluso considerando que parte del calcio hubiera sido acomplejado de forma insoluble, la ya mencionada acción de la microflora intestinal podría metabolizar los PRMs, destruyendo el complejo y favoreciendo la absorción mineral en el colón, como ya describieron Andrieux y Sacquet (1984) en su ensayo con ratas axénicas y haloxénicas.

En esta línea, las diferentes investigaciones realizadas muestran frecuentemente el escaso efecto del consumo de PRMs sobre la absorción y digestibilidad de calcio. Así, su estabilidad es el resultado que más prevalece en la bibliografía, como describió Delgado-Andrade (2002) trabajando con PRMs del sistema modelo glucosa-lisina. De igual modo, en ensayos con alimentos que han sufrido pardeamiento, Seiquer et al. (2010), al alimentar a ratas con una dieta que incluía leche sobrecalentada como única fuente proteica, tampoco detectaron efecto alguno sobre la digestibilidad del calcio, comparada con el consumo de otra basada en leche UHT. La ausencia de cambios se mantiene también en estudios en humanos que, tras tomar una dieta rica en PRMs, no manifestaron modificaciones en la absorción y digestibilidad del calcio respecto al consumo de la dieta con menores contenidos en estos compuestos (Mesías et al., 2009).

Los estudios relativos a la influencia de los PRMs en el proceso digestivo del fósforo son escasos y muestran menor digestibilidad del elemento tras el consumo de PRMs procedentes tanto de sistemas modelo (Delgado-Andrade, 2002) como de una dieta con alto contenido en estos compuestos (Delgado-Andrade et al., 2011). En el presente trabajo, el fósforo absorbido no se modificó en ningún grupo y tampoco la eficacia del proceso, salvo en los animales que ingirieron la dieta HMW, en los que incrementó respecto al grupo Control y al BC, cuyas ingestas fueron superiores. Para explicar estos resultados, además del proceso adaptativo ya comentado, debemos mencionar que las fracciones extraídas de la cortezas de pan se obtuvieron mediante una digestión *in vitro* con la enzima pronasa y, posteriormente, se incluyeron en las dietas y volvieron a digerirse en el tracto gastrointestinal de las ratas. La acción de las

enzimas digestivas y otros componentes de los jugos gastrointestinales sobre unos compuestos previamente digeridos por la pronasa, pudo hacer que se liberaran nuevos productos, tal vez más pequeños o distintos de los presentes en los digeridos de la corteza completa, que si contenían fósforo, pudieron liberarlo y facilitar su absorción, mejorando así su digestibilidad para compensar la menor ingesta.

La mayor excreción urinaria de diferentes cationes, especialmente elementos traza, tras el consumo de dietas que contienen PRMs, ha sido señalada por varios autores (Fairweather-Tait et al., 1989; Furniss et al., 1989; O'Brien et al., 1994). No obstante, la excreción de calcio parece no afectarse por la ingesta de compuestos pardos, como se observa en el presente ensayo y coincide con la estabilidad de la calciuria establecida por Delgado-Andrade et al. (2006), tras alimentar a ratas con diferentes sistemas modelos aminoácido-azúcar calentados durante 30 y 90 minutos.

Sin embargo, la presencia de PRMs de la corteza de pan en la dieta originó una disminución de la excreción urinaria de fósforo, que pareció relacionarse con sus compuestos insolubles, ya que también se produjo tras el consumo de la dieta Insoluble. Precisamente estos fueron los animales que presentaron un valor más bajo de absorción de fósforo, parámetro que se correlacionó positivamente con su eliminación urinaria. Por tanto, los mecanismos homeostáticos funcionan también para este nutriente a través del papel destacado que juega el riñón en la regulación del fósforo. Sin modificaciones a nivel de ingesta y absorción, Delgado-Andrade (2002) también describió menor excreción urinaria del elemento tras alimentar a ratas con mezclas calentadas de glucosa-lisina y glucosa-metionina. Así mismo, la hipofosfaturia se ha constatado en los adolescentes que tomaban la dieta más rica en PRMs (Delgado-Andrade et al., 2011).

Se observaron ciertas variaciones al alza en la retención de estos minerales durante la última semana del ensayo, significativa en el caso del calcio para los animales que consumieron los compuestos de alto peso molecular, que no se mantuvieron durante todo el periodo experimental, por lo que pudo ser sólo un resultado puntual. Lo más relevante es que los animales ajustaron las eficacias de los procesos digestivo y metabólico durante la última semana, consiguiendo cierta mejora

de la biodisponibilidad en las dietas que contenían la corteza o sus fracciones, significativa sólo en los que consumían los compuestos de mayor peso molecular, así como en el grupo Insoluble en el caso del calcio. Durante el periodo global, el efecto positivo sobre la biodisponibilidad únicamente fue significativo en el fósforo del grupo HMW. En definitiva, los cambios adaptativos consiguieron compensar las menores ingestas de algunos grupos, estabilizando las retenciones totales y contenidos corporales de calcio y fósforo al final del ensayo en todos los animales. Por todo ello, parece lógico que tampoco variase la cantidad de ambos elementos en su destino metabólico fundamental, el hueso, como describiremos más adelante.

Los resultados de la mayor parte de los estudios sobre los efectos de la ingesta de PRMs en la utilización del calcio empleando tanto sistemas modelo más o menos complejos (Andrieux et al., 1980; Delgado-Andrade et al., 2006; Seiquer et al., 2001), como dietas completas en humanos (Mesías et al., 2009), manifiestan que la retención y la biodisponibilidad del calcio se mantienen bastante estables tras el consumo de compuestos pardos. Solamente Sarriá et al. (2001), con fórmulas infantiles líquidas o en polvo, describieron un descenso en la biodisponibilidad del calcio en las primeras, resultado probablemente influenciado por las condiciones más extremas del ensayo, ya que toda la proteína suministrada a los animales había sufrido pardeamiento, y se encontraban en un estadio muy temprano del desarrollo.

En consonancia con la mejora de la biodisponibilidad que se describe en el caso del fósforo, en el mencionado estudio de Delgado-Andrade (2002), la ingesta de PRMs procedentes de las mezclas calentadas de glucosa-lisina y glucosa-metionina también incrementó la biodisponibilidad del elemento.

El 99 % del calcio corporal y el 85 % del fósforo se depositan en el hueso, por lo que cualquier alteración importante del metabolismo de estos elementos se reflejaría inmediatamente en él. Los resultados muestran que la cantidad de ambos minerales no se afecta por el consumo de corteza de pan o sus fracciones. Hallazgos de diversos autores han descrito reducciones en la fuerza ósea y en el contenido de cenizas y calcio femoral tras la ingesta de dietas que incluían PRMs (Delgado-Andrade et al.,

2006; Gregor y Emery, 1987; Yuan y Kitts, 1994), que no coinciden con los datos de la presente memoria.

Como hemos mencionado anteriormente, el hígado y el riñón están involucrados en el metabolismo de los PRMs y se consideran órganos diana para su acumulación (Homma y Fujimaki, 1981; O'Brien y Morrissey, 1989). A pesar de ello, autores como Somoza et al. (2005a) no detectaron acúmulos de AGEs en dichos órganos tras alimentar a ratas con dietas que contenían corteza de pan al 5 %. De ahí que estos compuestos no pudieran ser utilizados como transportadores de los minerales hacía dichos órganos, lo que respaldaría la ausencia de modificaciones importantes en la concentración de calcio o fósforo en hígado y riñón de los animales del ensayo.

Se visualizaron ciertas variaciones en el contenido y/o concentración de ambos minerales en alguno de los órganos estudiados, dependiendo de las dietas consumidas. Esos cambios sugieren que el efecto producido por la corteza, un alimento real, es diferente del que se observa en las fracciones aisladas. No debe olvidarse que éstas fueron obtenidas mediante digestión *in vitro* en condiciones de laboratorio, situación ciertamente distinta de la que ocurre *in vivo*. Por tanto, se hace patente la importancia de realizar ensayos con alimentos reales, que complementen los diseñados con sistemas modelo, para que aporten resultados más realistas.

Los efectos que merecen mayor atención son los ocurridos a nivel intestinal, donde el contenido y concentración de fósforo de los animales que consumieron los compuestos de mayor peso molecular duplicó o incluso triplicó los valores del grupo Control. Un proceso digestivo más lento y un consiguiente retraso en el vaciamiento gástrico, que incremente la concentración de los compuestos en el intestino esperando a ser absorbidos, podría explicarla, tal como han descrito algunos autores tras el consumo de PRMs (Kimiagar et al., 1980; Rérat et al., 2002). Se sabe que las partículas más grandes y, por tanto, menos digestibles se retienen durante más tiempo en el lumen intestinal (Kutchai, 1998), situación probable en el caso de los PRMs más avanzados. De hecho, Somoza et al. (2005b) demostraron que el consumo de corteza de pan en ratas incrementaba la aparición de compuestos no digeridos en heces.

En resumen, se observa que la presencia de PRMs derivados de la corteza del pan en el seno de una dieta equilibrada, no modifica sustancialmente los balances de calcio o de fósforo ni sus contenidos corporales, seguramente gracias al funcionamiento de mecanismos homeostáticos. En consecuencia, los PRMs procedentes del pan, independientemente de su peso molecular, no afectan el depósito óseo de calcio y fósforo. Por tanto, la relación sugerida en la bibliografía entre AGEs y osteoporosis (Hein, 2006) podría cursar a través de modificaciones en otros constituyentes óseos más que en el componente inorgánico.

### **3. Hueso: cambios estructurales y biomecánica**

En concordancia con la estabilidad del balance fosfocálcico, el contenido óseo de ambos minerales no se modificó. Sin embargo, al disminuir el peso del hueso, correlacionado con el peso corporal final ( $r = 0,650$ ;  $P < 0,001$ ), incrementó la concentración de calcio y fósforo en los huesos de los animales que consumieron la corteza de pan y sus fracciones. Se trata de huesos de igual longitud pero menor volumen y densidad respecto a los del Control. Como se ha comentado previamente, el descenso de la ingesta de alimento condujo a pesos corporales menores en los animales y, por tanto, a huesos más pequeños. Probablemente, estos huesos no hayan alcanzado la misma madurez que los de los controles, permaneciendo en una etapa de crecimiento y maduración anterior. El proceso de maduración del hueso involucra cambios en la composición de la matriz y en las características físicas y químicas de la fase mineral. Según Burnell et al. (1977) durante el desarrollo y crecimiento del hueso en ratas se produce inicialmente un rápido incremento de la matriz orgánica, mientras que la fase mineral crece más lenta y progresivamente. La maduración del hueso en ratas ocurre entre las 4 y 22 semanas de edad, periodo en el que el mineral se deposita lentamente hasta la semana 22, mientras que la matriz orgánica sufre un rápido crecimiento que decae a partir de la octava semana. Las ratas de este estudio comenzaron el ensayo tras su destete, a las 3 semanas de edad, y llegaron hasta la semana 15 de vida, por lo que los cambios fisiológicos naturales durante la maduración

ósea deben tenerse en cuenta para la interpretación de los resultados del experimento.

La densidad ósea comprende tanto la fase orgánica como la mineral (Rath et al., 2000), dado que esta última no varió en el fémur, el descenso en el peso de la matriz orgánica que se produjo en los grupos experimentales respecto al Control estuvo correlacionado con la densidad ( $r = 0,490$ ;  $P = 0,007$ ), que parece ser el responsable de la pérdida de masa ósea. En el estudio de Burnell et al. (1977), llevado a cabo con ratas de la misma edad que las que integraron este trabajo, se corrobora que las más bajas ingestas y los consecuentes menores pesos corporales originan también un descenso en la densidad del fémur, con una reducción más pronunciada en la cantidad de hidroxiprolina, componente principal de la materia orgánica. Aunque en nuestro ensayo la menor cantidad de materia orgánica se puede deber principalmente a un retraso en el crecimiento y maduración de los huesos tras consumir las dietas BC y sus fracciones, los PRMs *per se* también ejercieron un efecto sobre este órgano. Pudimos comprobar, mediante un tratamiento estadístico paralelo que incluía como covarianza el peso final de los animales, que el descenso de matriz orgánica prevalecía cuando se igualaban los pesos de los grupos experimentales con el del Control. En este sentido y como ya se ha referido, los compuestos dicarbonílicos procedentes de la dieta podrían facilitar la glicación no enzimática del colágeno óseo (Henle, 2003), ya que la fase mineral podría dificultar pero no impedir su glicación (Vashishth et al., 2001), induciendo cambios en su constitución y funcionalidad.

El crosslinking no enzimático aumenta con la edad (Sell y Monnier, 1989) y se incrementa en patologías relacionadas con la diabetes (Silva et al., 2009), contribuyendo al deterioro de las propiedades mecánicas del hueso (Wang et al., 2002). Uno de los mayores representantes de este tipo de crosslinking es la pentosidina, por lo que se ha utilizado en numerosos estudios como indicador, aunque su concentración varía mucho intra e interespecie (Saito et al., 2006a; Silva et al., 2009). El consumo de la corteza de pan y sus fracciones incrementó la concentración de este AGE en las tibias de todos los animales que tomaban las dietas experimentales frente a los que ingieren la dieta Control. El aumento fue más notorio en los grupos HMW e Insoluble, cuyas concentraciones de pentosidina ósea llegaron hasta los



valores descritos para ratas diabéticas (Silva et al., 2009). Por lo tanto, nuestros datos revelan que los compuestos de mayor responsabilidad en el incremento fueron los más avanzados y de mayor peso molecular, aunque el efecto no fue aditivo, ya que el grupo BC, que contenía todas las fracciones, no mostró valores sumatorios, por lo que parece estar modulado por todos los compuestos presentes en la corteza. De nuevo debemos mencionar que los AGEs de cada dieta y/o sus compuestos dicarbonílicos debieron tener un papel importante en este resultado, actuando los últimos como semillas para la generación de pentosidina *in vivo*. De acuerdo con esto, Kaňková y Šebeková (2005) describieron que los AGEs absorbidos en el intestino delgado pueden contribuir a incrementar la tasa de AGEs endógenos. Pero, hasta la fecha, no existen estudios que demuestren que los AGEs dietéticos se puedan acumular en tejidos, especialmente en huesos. Sólo en el ensayo de Mikulíková et al. (2008), trabajando con dietas ricas en fructosa, se incrementó la pentosidina en tejidos ricos en colágeno, como el tendón.

Sin embargo, los niveles de CML ósea, el otro AGE estudiado en el mismo tejido, no se modificaron en los grupos experimentales respecto al Control. Debemos recordar que la CML no es un AGE crosslinking, es decir, no forma enlaces cruzados entre las fibras de colágeno, aunque, por otras vías, su presencia podría también alterar la funcionalidad del hueso.

No conocemos datos en la bibliografía que relacionen el BMC o BMD, medido por DEXA, con la acumulación de AGEs en el hueso. En estos ensayos el BMC no se modificó en ninguno de los huesos estudiados, mientras que la BMD tendió a decrecer en el fémur de los animales que consumieron los derivados del pan, alcanzando significación estadística sólo en el grupo Insoluble. En estudios realizados en ratas diabéticas de la misma edad se describen descensos de BMD, medida por pQCT, en varios huesos largos, que afectan más al hueso trabecular que al cortical (Prisby et al., 2008; Silva et al., 2009).

La formación o acumulación de AGEs en el hueso se asocia con cambios estructurales y funcionales. Las modificaciones originadas en los constituyentes del hueso, en concreto en la materia orgánica, pueden reflejarse en los marcadores del

metabolismo óseo. Así, los marcadores de formación y resorción se utilizan para medir el remodelado óseo y determinar su calidad, ya que anomalías en este proceso pueden conducir a modificaciones en la masa ósea (Seibel, 2005). Muchos de estos marcadores proceden de compuestos derivados de la matriz, de hecho observamos que el descenso de la densidad relativa del fémur en el grupo LMW se correlacionó con los niveles más bajos de osteocalcina sérica ( $r = 0,420$ ;  $P = 0,029$ ), marcador de formación ósea, sugiriendo menor matriz orgánica.

La acumulación de AGEs en el hueso se ha relacionado con adinamia (Franke et al., 2007), debido a que estos compuestos pueden inhibir la producción de procolágeno y osteocalcina (Yamamoto et al., 2001). El descenso de fosfatasa alcalina y osteocalcina se ha detectado en varios ensayos tras un incremento en el nivel de AGEs, tanto en ratas con diabetes inducida como en cultivos primarios de células óseas (Katayama et al., 1996). Sanguineti et al. (2008) también describieron que la pentosidina ejercía un efecto negativo sobre la expresión de la fosfatasa alcalina ósea, pero no sobre la osteocalcina. En nuestro ensayo, a pesar de los altos niveles de pentosidina, no parece observarse adinamia ósea, aunque sí se detectaron pequeñas variaciones en los marcadores de formación, PINP y osteocalcina en algunos grupos que ingirieron las fracciones.

Los resultados de los marcadores de resorción ósea indican que estaríamos frente a una situación de mayor turnover o de alta resorción, ya que el DPD se incrementó en los grupos que consumieron las dietas con las fracciones de la corteza de pan. En algunos casos sus valores fueron hasta 50 % más altos que los de los controles. Estudios *in vivo* manifiestan que los AGEs óseos incrementan en situaciones de bajo y alto turnover óseo (Saito y Marumo, 2010). En paralelo, Saito et al. (2006b) también describen una alta presencia de DPD en orina, simultánea al incremento de pentosidina en el hueso. Sorprendentemente, en el grupo BC, que contenía todas las fracciones, no se modificó el DPD ni ningún otro marcador de formación o resorción. Por tanto, el efecto de un alimento real, la corteza de pan, es distinto al de sus componentes aislados obtenidos mediante digestión artificial con pronasa, y digeridos posteriormente *in vivo*, generándose productos que podrían tener una repercusión más perjudicial que los originados por la digestión natural de la corteza de pan.

Sin embargo, no se observaron modificaciones en el otro marcador de resorción, el  $\beta$ -CTX, aunque este hecho parece lógico ya que en la bibliografía relativa a la glicación del colágeno este marcador no suele emplearse para estudiar los efectos de los AGEs en la salud ósea.

El crosslinking no enzimático, originado en el colágeno óseo, provoca alteración de la funcionalidad del hueso y las propiedades mecánicas pueden verse afectadas por la acumulación de AGEs. Varios autores han asociado el incremento de glicación con un aumento en la rigidez del hueso (Ruppel et al., 2008; Vashishth et al., 2001). Sin embargo, los resultados del presente ensayo muestran un descenso significativo en la rigidez de las tibias de los animales de los grupos LMW, HMW e Insoluble, parámetro que depende fundamentalmente de la fase mineral, la cual no se modificó. A este respecto, Vashishth et al. (2001) demostraron que los huesos desmineralizados, sometidos a glicación, experimentaban mayor aumento de rigidez que aquellos que estaban mineralizados. En este ensayo, la rigidez se correlacionó positivamente con la densidad ( $r = 0,558$ ;  $P = 0,002$ ) y con el contenido de materia orgánica ( $r = 0,424$ ;  $P = 0,022$ ) y negativamente con la pentosidina ( $r = -0,520$ ;  $P = 0,004$ ); de este modo, a pesar de los altos valores de pentosidina, la rigidez del hueso disminuyó. Para tratar de conocer las variables implicadas en el descenso de este parámetro, se realizó un análisis de regresión múltiple, una correlación de Durbin-Watson, que indicó que el 92 % de los cambios en la rigidez se debían a las modificaciones de la densidad y a su contenido en pentosidina, siendo la primera la responsable mayoritaria. Prisby et al. (2008) señalaron que los huesos de ratas diabéticas eran más pequeños y de menor peso que los de las controles, y su rigidez aparecía disminuida, en línea con nuestros resultados en los grupos que consumían las fracciones del pan, pero no con lo observado en el grupo BC. De acuerdo con esto, el retraso en el desarrollo y la reducción de peso observados en los animales de este estudio, pudieron estar muy involucrados en la menor rigidez de las tibias, sin olvidar que los PRMs administrados tuvieron además un efecto minoritario y directo, como se puso de manifiesto al corregir en función de las diferencias en el peso final de los animales ( $P < 0,001$ ).

Lógicamente, la fuerza ósea, que depende fundamentalmente de la masa del hueso, puede verse afectada también por la glicación no enzimática del colágeno y por

los cambios estructurales que introduce. En las pruebas mecánicas realizadas en los animales de nuestro estudio, se evidenció una disminución de la carga de rotura, aunque no significativa, en los que tomaban los compuestos de mayor peso molecular. El descenso fue de un 25 %, comparado con el grupo Control, coincidiendo con los porcentajes presentados por Silva et al. (2009) en su estudio con ratas diabéticas. Se conoce, además, que la glicación puede afectar este parámetro por una vía alternativa, la modificación de la actividad osteoblástica y osteoclástica (Saito y Marumo, 2010). Como prueba de la alteración de dicha actividad, recordemos que se observaron valores más altos de DPD en orina en las ratas que consumían las fracciones del pan, indicando una situación de mayor turnover o de más intensa resorción ósea, que podría alterar la masa del hueso y, de esta forma, afectar su fuerza.

Los huesos del grupo Control, aunque sin diferencias significativas, toleraron mayores energías a la rotura que los de los grupos que consumieron los derivados del pan. La matriz orgánica que, como ya se ha mencionado, contribuye a la resistencia ósea, estuvo correlacionada positivamente con la energía a la rotura ( $r = 0,549$ ;  $P = 0,002$ ). Se ha descrito que la resistencia ósea disminuye con el deterioro del colágeno (Currey, 2003), así como con el incremento de AGEs (Ruppel et al., 2008). Según la bibliografía, la acumulación de AGEs, como la pentosidina, reduce la disipación de la energía ante una fractura (Tang et al., 2009). Sin embargo, coincidiendo con los resultados de este ensayo, no se han detectado efectos en la energía a la rotura en animales diabéticos (Silva et al., 2009) y, si los hay, éstos tienen lugar tras 5 (Prisby et al., 2008) u 8 (Saito et al., 2006a) meses de diabetes inducida.

En resumen, el consumo de las dietas que incluyen corteza de pan y, especialmente, sus fracciones aisladas, mediante la reducción de la ingesta alimentaria, conduce a un retraso en el desarrollo del hueso en un estadio crucial del crecimiento, afectando así a las características óseas. Además, los compuestos consumidos, especialmente los de alto peso molecular, tuvieron un efecto más directo sobre el hueso, induciendo acúmulos de pentosidina y alteraciones de las propiedades mecánicas, como la disminución de la rigidez ósea y la capacidad para soportar fuerza y absorber energía a la rotura. Nuestros resultados sugieren que los AGEs dietéticos,

por una vía indirecta o, incluso directa, son capaces de influenciar las características óseas e incidir en su funcionalidad.

#### **4. Carboximetil-lisina: tránsito metabólico y posibles órganos de depósito o formación**

Tras el hallazgo de que, al contrario de la pentosidina, un AGE crosslinking, los niveles de CML óseos no se afectaron por el consumo de las dietas experimentales, parecía indicado tratar de hacer un seguimiento metabólico de este compuesto para investigar otros tejidos de depósito o formación.

El contenido de CML en las dietas que incluían la corteza de pan y sus fracciones fue mayor que en la dieta Control, aunque ésta también presentaba cierto nivel del compuesto, hecho que ya ha sido documentado (Tan et al., 2010). A causa de la elevada presencia de CML en las dietas y a pesar de que el consumo alimentario disminuyó en los grupos que consumían las fracciones del pan durante la semana de balance, especialmente en BC e Insoluble, la ingesta de CML en ese periodo se incrementó en todos los animales comparados con los controles. Los grupos BC e Insoluble tuvieron niveles de ingesta significativamente más altos que los que tomaron las dietas que incluían las fracciones solubles de la corteza, probablemente porque la CML se presentaba mayoritariamente unida a proteínas insolubles en la corteza de pan.

Como consecuencia del incremento de la ingesta de CML en los grupos BC e Insoluble, su excreción fecal aumentó significativamente, especialmente en los animales que consumieron la dieta BC, donde el porcentaje de excreción respecto a la CML ingerida fue más elevado que en los controles. Varios autores han descrito la estrecha correlación existente entre la ingesta del compuesto y su excreción fecal (Liardon et al., 1987; Tessier et al., 2010), coincidiendo con lo observado en este trabajo ( $r = 0,876$ ;  $P < 0,001$ ). A pesar de los altos valores de excreción fecal del grupo BC, la absorción de CML tuvo que ser también importante, como indica el hecho de que se detectara en cantidad significativa en orina. Por otro parte, la presencia de CML

en heces pudo estar subestimada, ya que durante el proceso digestivo el AGE podría haber sido degradado por la microbiota intestinal, siendo algunos de sus derivados excretados en heces y otros absorbidos. Como ya se ha descrito en esta memoria de tesis, la microflora juega un papel importante en la degradación de los PRMs a otros productos de menor peso molecular (Somoza, 2005). Una vez absorbida la CML y sus derivados, su tránsito metabólico no se conoce con profundidad, pero se ha observado que las concentraciones del compuesto se incrementan en el plasma y en diferentes tejidos tras un alto consumo de CML (Somoza et al., 2006) o, incluso, en sujetos diabéticos (Vlassara et al., 2002).

Los niveles de excreción urinaria de CML fueron más elevados en los animales del grupo BC que en ningún otro. Por el contrario, los grupos HMW e Insoluble eliminaron las menores cantidades de CML por orina, lo que podría asociarse a que estas dietas contenían los compuestos de mayor peso molecular e insolubles, donde podría haber mayor proporción de CML unida a proteínas insolubles resistentes a la digestión, y al no liberarse, no podrían llegar a absorberse. No se detectó correlación entre la ingesta y la excreción de CML en orina, en contra de las observaciones de otros autores (Birlouez-Aragon et al., 2010; Liardon et al., 1987), desacuerdo que pudo deberse a las diferentes formas en las que estaría presente la CML en las fracciones de la corteza de pan, más o menos complejas. Algunas de las fracciones que contenían CML pudieron absorberse fácilmente, pero otras, aquellas que contuvieran polímeros más insolubles, como melanoidinas, podrían ver su digestión dificultada y, por tanto, su absorción. Diferentes tasas de absorción de la CML ingerida justificarían distintas eliminaciones urinarias y la falta de una correlación firme entre el consumo del compuesto y su excreción por esta vía.

La tasa de eliminación urinaria de CML fue siempre más baja tras el consumo de corteza de pan y sus derivados que cuando se tomaba la dieta Control. Se mantuvo en cifras similares a las mostradas por Somoza et al. (2006) con porcentajes de eliminación urinaria entre 26 y 29 %, utilizando dietas con caseína modificada térmicamente para la alimentación de ratas que suponían dosis de 110 o 310 mg de CML/kg de peso corporal.

Considerando el porcentaje total de CML excretado, sólo el grupo BC llegó a eliminar una tasa igual a la del Control, mientras que los animales que ingirieron las fracciones de la corteza de pan presentaron menores ratios de excreción total. Sin embargo, teniendo en cuenta la alta ingesta de CML por parte del grupo BC, cabría esperar un mayor porcentaje de recuperación. Los factores que podrían intervenir en que el compuesto no se recuperara en su totalidad son (i) la degradación digestiva de la CML ingerida, (ii) la biotransformación del compuesto en el medio interno o (iii) que se exceda la capacidad de detoxificación del organismo, conduciendo a la acumulación de CML en tejidos diana. Valores de recuperación similares se han detectado en otros estudios, como el llevado a cabo por Delgado-Andrade et al. (2012), evidenciando una recuperación de CML en torno al 45-50 % en humanos; y el realizado por Alamir et al. (2012), quienes mostraron que el 60 % de la CML ingerida, procedente de una dieta que incluía galletas extruidas, se eliminaba en las heces y la orina de ratas. En el mismo sentido, Somoza et al. (2006) detectaron que el 50 % de la CML ingerida no se eliminaba en su forma química original. En nuestro estudio, el grupo en el que se mostró peor recuperación fue en el alimentado con la dieta basada en la fracción insoluble, donde más del 60 % del compuesto pudo ser eliminado como metabolitos sin identificar o, quizás, acumularse en tejidos diana. La fuerte correlación establecida entre la CML ingerida y la excretada en heces refleja que la eliminación fecal es la vía principal de excreción de este compuesto.

Gran parte de la CML absorbida tiene un destino desconocido en el organismo. Parece claro que el consumo de dietas ricas en CML incrementa sus niveles plasmáticos, como establecieron Birlouez-Aragon et al. (2010) en sujetos que consumían una dieta rica en PRMs, en los que se elevaba un 7 % la CML unida a proteínas plasmáticas respecto a aquellos cuya dieta era menos abundante en el AGE, o Šebeková et al. (2012) en ratas. En el presente estudio, también se determinó la CML unida a proteínas, como la fracción más representativa de la CML generada endógenamente, y no se observaron modificaciones tras el consumo de las dietas elaboradas con corteza de pan y sus fracciones. Puesto que se ha establecido que tras alimentar a ratas con dietas que incluían galletas extruidas el nivel plasmático de CML unida a proteínas no se modificaba, pero si lo hacía la fracción libre (Niquet-Léridon et

al., 2012), indicador real de la CML dietética (Delgado-Andrade et al., 2012), hubiera sido de gran interés llevar a cabo esta determinación, pero desafortunadamente dificultades metodológicas hicieron imposible su medida.

Como se ha mencionado anteriormente, las fuentes exógenas de CML en el organismo pueden ser alimentos ricos en el compuesto o bien en especies carbonílicas altamente reactivas, que actúan como semillas para la formación *in vivo* de CML (Henle, 2003). Estos compuestos dicarbonílicos podrían incrementar el nivel plasmático de CML o provocar acumulaciones de la misma en diferentes tejidos. Concentraciones elevadas se han detectado en piel (Sell y Monnier, 1989), riñón (Li et al., 2012c) o corazón (Schalkwijk et al., 2004). No existen estudios que relacionen directamente dietas ricas en AGEs con el incremento de CML en el corazón u otros órganos o tejidos, aunque sí se han descrito aumentos en el tejido cardiaco de sujetos diabéticos (Schalkwijk et al., 2004). En nuestro ensayo experimental se evidenció que el consumo de una dieta basada en corteza de pan condujo a un depósito y/o formación significativo de CML en el corazón de ratas, y la existencia de una correlación entre la ingesta de CML y su acumulación en el corazón apuntaba a que se trataba de AGEs de origen dietético ( $r = 0,414$ ;  $P = 0,021$ ). Es necesario mencionar que la sangre remanente en el corazón no pudo eliminarse completamente por lo que la CML libre sanguínea podría contribuir a la cantidad total del compuesto en el tejido cardiaco. En cualquier caso, puesto que no se detectaron modificaciones en los niveles de CML unida a proteínas en el plasma, su acumulación en el corazón sugiere que podría tener un origen dietético.

A pesar del marcado incremento de pentosidina, observado en las tibias de los animales que consumieron las dietas experimentales respecto al Control, los niveles de CML en el hueso no se modificaron, pero sí se elevó el compuesto en el tendón de la cola del grupo BC. El incremento paralelo en el tendón de los animales que ingirieron la dieta LMW, sugiere que los principales responsables del efecto estarían entre los compuestos de bajo peso molecular aislados de la corteza. En ellos, junto a la CML pudieron también existir determinados compuestos dicarbonílicos que actuaran como intermediarios para la formación de CML *in vivo*. A priori, podría parecer extraña la falta de concordancia entre los resultados del contenido de CML en el hueso y en el



tendón, pero lo cierto es que se ha establecido que este último es más susceptible a la glicación que el hueso (Reddy, 2003), ya que la fase mineral podría proteger de la acumulación de AGEs según Vashishth et al. (2001). Además, el turnover del colágeno tipo I es más rápido en el hueso que en otros tejidos como cartílago o ligamentos (Eastell et al., 1997), por lo que la mayor acumulación de CML en el tendón podría también deberse a su más lento recambio. Por otra parte, probablemente el origen de la CML en hueso y tendón sería diferente: en el caso del tendón, la CML podría depositarse directamente, no así en el hueso, cuya constitución y fisiología seguramente evitarían el depósito del AGE, haciendo más plausible que su presencia allí se deba a su formación *in situ* por un ambiente rico en compuestos dicarbonílicos. Acumulaciones o formación de AGEs se han descrito tanto en hueso (Silva et al., 2009) como en tendón (Sell y Monnier, 1997) en ensayos de glicaciones *in vitro*, en sujetos diabéticos y en personas de edad avanzada (Verzijl et al., 2000); pero no existen estudios que relacionen de forma directa el consumo de dietas ricas en AGEs con los niveles tisulares de CML. Sólo el mencionado estudio de Mikulíková et al. (2008) describe un incremento de pentosidina en tejidos ricos en colágeno como la piel o el tendón de la cola de ratas que consumieron una dieta alta en fructosa.

En definitiva, la excreción fecal de la CML, derivada de la corteza del pan, está altamente influenciada por los niveles dietéticos y representa la mayor ruta de eliminación del compuesto. Sin embargo, la tasa urinaria de eliminación probablemente alcanza la saturación, de forma más marcada, cuando se ingieren los compuestos más complejos. Sorprendentemente, el consumo de corteza de pan conduce a un incremento de la CML en el corazón, hecho que podría vincularse con su ingesta. Este novedoso hallazgo resulta especialmente interesante si tenemos en cuenta la implicación del AGE en el desarrollo y progreso de la enfermedad cardiovascular (Schleicher et al., 1997). Los niveles de CML ósea no se modifican por la inclusión de los derivados del pan en la dieta, sin embargo, el tendón sí resulta afectado, y muestra un aumento tras el consumo de la BC completa, probablemente causado por los compuestos solubles de bajo peso molecular. La acumulación de CML total en diferentes tejidos sugiere un probable aumento de los niveles plasmáticos del compuesto, sin embargo, si éste se produjo debió tener lugar en la fracción libre, ya

que la unida a proteínas no varió. Este hecho destaca la importancia de la medida de CML libre como indicador de la procedencia dietética del AGE. Sin duda, lo más significativo del estudio ha sido poner de manifiesto que el consumo continuado de dietas ricas en AGEs conduce a la acumulación de CML en tejidos diana de individuos sanos, con especial importancia en el caso del corazón y el tendón, que podría relacionarse con la patogenia de enfermedades degenerativas a largo plazo.



## **CAPÍTULO 10**

### *Resumen y conclusiones*

---



Los hábitos alimentarios de la población están cambiando, y frente a nuestra dieta tradicional, cada día adquieren más preponderancia los alimentos precocinados, comidas rápidas, snacks, etc., que implican un intenso procesado. Los tratamientos térmicos empleados a nivel industrial y doméstico favorecen el desarrollo de la reacción de Maillard y la formación de compuestos pardos (PRMs). Estos productos mejoran la palatabilidad de los alimentos y se les atribuye características biológicas positivas, tales como la actividad antioxidante y la antimutagénica, entre otras. Pero también se relacionan con efectos negativos en la biodisponibilidad de nutrientes, por ejemplo sobre los minerales, por su poder quelante de cationes. La capacidad de los PRMs de formar complejos con los minerales puede alterar la absorción y biodisponibilidad de estos micronutrientes.

Por otra parte, en los últimos años se está prestando especial atención al desarrollo de la reacción de Maillard *in vivo*, proceso que cursa mediante la glicación de proteínas de vida media larga, y origina los productos de glicación avanzada (AGEs). Parece bien establecido que los PRMs consumidos con la dieta incrementan la carga de AGEs formados endógenamente. Estos productos, presentes en la circulación sistémica, pueden acumularse en tejidos, desempeñando un papel fisiopatológico fundamental en el desarrollo y progreso de algunas enfermedades metabólicas y degenerativas.

Sobre esta base de conocimiento, en la presente memoria de Tesis Doctoral se pretende estudiar si el consumo de productos de la reacción de Maillard procedentes de la corteza del pan, elegida como fuente frecuente de PRMs en la dieta, podría

afectar a la biodisponibilidad y distribución tisular de calcio y fósforo, con especial atención a su destino metabólico, el hueso, profundizando en los efectos sobre su composición, estructura, funcionalidad y acumulación de AGEs. Además, para conocer el tránsito metabólico de algunos de estos compuestos, se investiga la ingesta y excreción del producto de glicación avanzada carboximetil-lisina (CML) y sus posibles órganos de depósito o formación. Paralelamente se trata de analizar si los posibles efectos producidos por los PRMs de la corteza de pan se relacionan con los compuestos solubles de menor o mayor peso molecular, con los insolubles o si se debe a una acción conjunta de los distintos PRMs presentes en el alimento.

Para realizar el trabajo se comienza con la extracción de las distintas fracciones de la corteza de pan. Para ello, dicho alimento se ha sometido a digestión enzimática con pronasa, con objeto de separar las fracciones soluble e insoluble. A partir de la soluble se obtienen por ultrafiltración los compuestos de bajo peso molecular (LMW), inferiores a 5kDa, y los de alto peso molecular (HMW), superiores a 5 kDa.

A partir de la corteza de pan y las fracciones obtenidas se elaboran dietas para la alimentación de ratas, por adición de estos componentes a una dieta estándar, la AIN-93G, que se usa además como Control. La corteza de pan (BC) se adiciona al 10 % y las fracciones en la misma proporción en que éstas están presentes en el 10% de la corteza de pan, resultando las siguientes dietas: Control, BC, LMW, HMW e Insoluble.

El ensayo se prolonga durante un período de tres meses, empleándose 70 ratas Wistar al destete que se dividen aleatoriamente en 6 grupos, uno de los cuales se sacrifica al inicio para obtener los parámetros basales de los animales, mientras que a los 5 restantes se les asigna uno de los tratamientos dietéticos diseñados.

Para estudiar los efectos de los PRMs sobre la utilización de calcio y fósforo se realizan dos tipos de balance: uno global o por carcasa, que comprende todo el período experimental, y otro que se lleva a cabo durante la última semana del ensayo, controlando la ingesta y por recogida de heces y orina. Al final de la semana de balance se sacrifican, previa anestesia con nembutal (5mg/100g peso), la mitad de las ratas de cada grupo para la obtención de sangre, hígado, riñón, bazo, huesos, corazón, intestino delgado y tendón de la cola, donde se determinan calcio y fósforo y otros analitos de

interés. Las ratas restantes de cada grupo se sacrifican sin extracción de sangre ni órganos, para analizar los contenidos corporales totales de ambos minerales y completar así el balance global.

Con el objeto de conocer las repercusiones del consumo de glicoproteínas en la composición y funcionalidad del hueso, se han determinado diferentes parámetros óseos que engloban: propiedades físicas, análisis de sus constituyentes principales, densitometría, propiedades mecánicas y algunos aspectos del metabolismo óseo mediante la medida de marcadores de formación y resorción. Además, como AGE indicativo del crosslinking, se ha analizado la concentración de pentosidina en el hueso, evaluándose su relación con los efectos observados, así como otro AGE no crosslinking, la CML.

Puesto que el depósito/formación de ambos AGEs en el colágeno del hueso no ha seguido el mismo patrón, se ha estimado oportuno estudiar el tránsito metabólico de la CML, utilizada comúnmente como marcador de los productos avanzados de glicación *in vivo*. Para ello se ha determinado la ingesta del compuesto a partir de las dietas experimentales y su eliminación fecal y urinaria, intentando dilucidar posibles órganos diana de acumulación.

Una vez analizados estadísticamente los datos experimentales, se obtienen los siguientes resultados:

La ingesta alimentaria disminuye en los grupos que consumen la corteza de pan y sus fracciones y se correlaciona con los menores pesos observados en esos mismos animales. La retención de calcio y fósforo y sus contenidos corporales no se modifican al final del ensayo, a pesar de mostrar una tendencia a la mejora de la biodisponibilidad, surgida posiblemente para compensar la menor ingesta de ambos micronutrientes, especialmente en los grupos que consumían las fracciones de alto peso molecular. Como es lógico, tampoco se afecta el destino metabólico fundamental de estos minerales, el hueso. Por lo que la ingesta de corteza de pan y sus fracciones parece no afectar los balances de calcio y fosforo.



En lo relativo al hueso, se ha observado un descenso significativo en el peso, volumen y densidad de los mismos, así como, menores valores de materia orgánica en los animales que consumen la corteza de pan y sus fracciones. El contenido de pentosidina en el hueso incrementa en todos los grupos experimentales, especialmente en los que toman las dietas HMW e Insoluble (104,7 y 102,9 mmol/mol de colágeno, respectivamente, vs. 41,7 mmol/mol de colágeno para el grupo Control). Este aumento, sumado a un retraso en el estadio de maduración ósea, podrían ser responsables del deterioro de algunas propiedades mecánicas, como la rigidez, que disminuye casi en un 50 % en los animales que consumen las dietas LMW, HMW e Insoluble, en los que se muestra, además, una tendencia al descenso en su capacidad para soportar la carga y en la energía aplicada para la rotura. En cuanto a los marcadores óseos, se han detectado pequeñas variaciones que reflejarían una situación de mayor resorción ósea o un más alto turnover tras el consumo de las dietas que incluyen las fracciones de la corteza de pan.

Respecto al tránsito metabólico de la CML, su ingesta se incrementa en todos los grupos experimentales frente al Control y está positivamente correlacionada con su excreción fecal, representando la mayor vía de eliminación del compuesto. Sin embargo, su excreción urinaria parece limitada o saturada, especialmente cuando la dieta incluye los productos de mayor peso molecular. A pesar de que se ha descrito en la bibliografía que una mayor ingesta de AGEs puede incrementar sus niveles plasmáticos, en nuestro estudio no se han observado modificaciones séricas de CML unida a proteínas en ninguno de los grupos experimentales. El hallazgo más importante es el aumento del AGE en el tejido cardíaco, algo hasta el momento no descrito como consecuencia directa de una ingesta dietética elevada de CML. Los niveles del compuesto en hueso no se han afectado por el consumo de las dietas diseñadas, pero en el tendón de la cola este AGE se incrementa significativamente en el grupo BC, hecho que puede asociarse a la ingesta de los compuestos de menor peso molecular presentes en la corteza de pan, puesto que también ocurre en los animales del grupo LMW.

Los resultados obtenidos en esta memoria de Tesis Doctoral nos permiten establecer las siguientes conclusiones:

1. Los PRMs de la corteza de pan, consumidos como un alimento o como fracciones aisladas, no alteran la retención corporal de calcio y fósforo ni modifican los contenidos óseos, a pesar de disminuir la ingesta. El balance se mantiene porque estos compuestos no interfieren en los mecanismos adaptativos, que incrementan la eficacia de los procesos digestivo o metabólico, conduciendo a ciertas mejoras de la biodisponibilidad de ambos elementos.
2. La reducción de la ingesta debida al consumo de los derivados de la corteza del pan, propicia animales de menor peso, cuyos huesos parecen hallarse en un estadio retrasado de maduración, con volumen, densidad y peso inferiores causados por la pérdida de sustancia orgánica, sin que la cantidad de mineral se modifique. A ello ha contribuido también un efecto *per se* de los productos de glicación, reflejado en el incremento de pentosidina, que se produce especialmente en los animales que consumen los compuestos más complejos. En línea con el descenso de la materia orgánica, los marcadores óseos sugieren cierto aumento de la resorción o mayor turnover. Estos cambios estructurales inducen modificaciones en la biomecánica ósea, que tienden a disminuir la resistencia a la rotura y afectan claramente a la rigidez. El efecto puede explicarse, sobre todo, por la pérdida de densidad, el máximo responsable, y, en mucho menor grado, por el acúmulo de la pentosidina.
3. La corteza de pan incrementa la CML de la dieta en base, fundamentalmente, a la fracción insoluble. Su eliminación total se relaciona con la ingesta, apoyado en la estrecha correlación entre su consumo y contenido en heces, vía mayoritaria de excreción. Además, la recuperación del compuesto es mayor cuando los AGEs se consumen como alimento real, que al ser ingeridos desde las fracciones obtenidas en condiciones de laboratorio. Los derivados del pan no alteran la concentración de CML en hueso, sin embargo, conducen a incrementos del AGE en el tendón, diferencias que podrían deberse al distinto recambio del colágeno en ambos tejidos y a la protección que ofrece la fase mineral en el hueso. Por primera vez, se muestra el tejido cardíaco como diana de acumulación de CML dietética.

### *Conclusión general*

Por una vía indirecta, o incluso directa, el consumo de la corteza de pan o sus fracciones, sin alterar la utilización del calcio o del fósforo, ni su destino óseo, produce cambios puntuales en la matriz del hueso, compatibles con descensos del crosslinking enzimático y aumento del no enzimático, que podrían llegar a incidir en la funcionalidad del hueso. Este resultado, unido a la acumulación de CML en algunos órganos vitales, se inscribe en el contexto de la participación de los AGEs en el desarrollo de enfermedades degenerativas.

## **CAPÍTULO 11**

### *Summary and conclusions*

---



Food consumption habits of the population are changing and our traditional diet is modifying by the inclusion of precooked and fast food as well as snacks, which are submitted to high processing conditions. The thermal treatments applied during industrial and home preparation of food promote the development of the Maillard reaction and the generation of browned compounds (Maillard reaction products - MRPs). These improve food palatability and are associated with certain positive biological actions, such as antioxidant and antimutagenic activity. However, MRPs may also provoke undesirable nutritional effects, some of which are related to mineral availability, since they can form stable complexes with metal cations, affecting their absorption and bioavailability.

In recent decades, considerable research attention has been paid to the *in vivo* production of the Maillard reaction, consisting of the glycation of proteins, leading to the formation of advanced glycation end-products (AGEs). It is well established that dietary MRPs contribute to the endogenous load of AGEs. These glycation products are present in the systemic circulation and may accumulate in different tissues, playing a fundamental physiopathological role in the development and progress of metabolic and aging disorders.

The aim of this doctoral thesis is to study the effects of the consumption of browned products derived from bread crust, as the source of MRPs, on calcium and phosphorus bioavailability and their tissue distribution, with special attention to their metabolic fate, the bone, in order to determine the modifications taking place in its

composition, structure, functionality and AGEs accumulation. In addition, the intake and excretion of the AGE carboxymethyl-lysine (CML) and its potential target organs are analysed to investigate the metabolic transit of this compound. In parallel, we study whether the effects produced by bread crust MRPs are related to the high and/or low molecular weight soluble compounds, or to the insoluble ones or whether there exists a conjoint action of all the MRPs present in the food.

At the start of the experiment, the bread crust was submitted to enzymatic hydrolysis with pronase E to obtain the soluble and insoluble fractions. The soluble fraction was then subjected to ultrafiltration to separate the low molecular weight compounds (LMW) below 5kDa and the high molecular weight ones (HMW) above 5kDa.

The AIN-93G diet, a standard diet for laboratory rodents, was used as the control diet. Bread crust (BC) was added to the control diet to reach a final concentration of 10 % w/w. The fractions obtained were also individually added to the diet in the same proportion as was present in 10 % of the bread crust. Thus, there were five diets: Control, BC, LMW, HMW and Insoluble.

In the experimental assay, which duration was three months, 70 weanling rats were randomly distributed into six groups. In one of them, the animals were sacrificed at the beginning of the experimental period in order to obtain baseline parameters, and the other five groups were assigned to one of the five dietary treatments.

To study the effects of MRPs on calcium and phosphorus utilisation, two different balances were determined: the overall one, for the entire experimental period, was calculated from the difference between the final and initial content of mineral in the body; the other balance was performed in the last week of the assay, during which food intake and faecal and urinary excretion were monitored. At the end of the experiment, half of the rats in each group were sacrificed by anaesthesia overdose. The blood, liver, kidney, spleen, bones, heart, small intestine and tail tendon were extracted in order to determine calcium, phosphorus and other parameters of interest. The remaining animals in each group were also sacrificed, but without

removing organs, and the total body content of each mineral was calculated, in order to obtain the overall balance.

To determine the consequences of glycoprotein consumption on bone composition and functionality, the following bone parameters were analysed: physical properties, main constituents, densitometry, mechanical properties and aspects of bone metabolism revealed by measuring formation and resorption markers. Moreover, the concentration of bone pentosidine was measured as a non-enzymatic crosslinking marker. A non-crosslinking AGE, CML, was also determined.

Since pentosidine and CML formation/deposit in bone collagen present different patterns, we considered it interesting to study the metabolic transit of CML, which is an *in vivo* marker of AGEs. The intake of this compound and its faecal and urinary excretion were measured, seeking to detect the target organs of accumulation.

The following results were obtained from statistical analysis of the experimental data:

Food intake decreased in the animals fed BC and its fractions, which correlated with the lower body weights recorded. Calcium and phosphorus retention and their body contents were unmodified at the end of the experimental period, although bioavailability tended to increase, probably as a pathway to compensate for the lower intake, especially in the animals that consumed the more complex compounds. As was to be expected, the major metabolic destination of these elements, the bone, was also unaffected. Therefore, the intake of BC and its fractions did not alter calcium or phosphorus balances.

A significant decrease in the weight, volume and density of bone was observed, as well as lower values of organic matrix in the animals fed BC and its fractions. The pentosidine content in bone increased in all the experimental groups, especially in those consuming the HMW and Insoluble diets (104.7 and 102.9 mmol/mol collagen, respectively, vs. 41.7 mmol/mol collagen for the Control group). This increase, together with a delay in bone maturation, could be responsible for the reduction in some mechanical properties, such as stiffness, which fell by up to 50 % in the animals



fed the LMW, HMW and Insoluble diets. The bones of these animals also presented a lower capacity to withstand force and absorb energy until failure. Regarding bone markers, minor variations were detected with the intake of diets including BC fractions, which would reflect a situation of increased bone resorption or higher turnover.

With respect to the metabolic transit of CML, its intake was higher in all the experimental groups compared with the controls and was positively correlated with its faecal excretion, which represents the major route of elimination. However, the urinary excretion of CML could be limited or saturated, with stronger effects when more complex compounds are present. Although it has been widely reported that a high AGE intake provokes increased plasma levels of these compounds, we observed no modifications in plasma protein-bound CML. The most surprising finding was the CML accumulation in the heart, described here for the first time as a direct consequence of dietary CML intake. In the animals given the experimental diets, CML levels in bone remained unchanged, but there was a significant increase in this AGE in the tail tendon of the animals in the BC group. This could be associated with the consumption of the LMW compounds present in the BC, since a similar result was observed in the LMW group.

From the results obtained in this doctoral thesis the following conclusions are drawn:

1. The MRPs from bread crust, consumed as a whole food or its isolated fractions, do not modify calcium or phosphorus retention or their bone contents, although intake decreases. The balance remains unchanged due to adaptive mechanisms that are not affected by MRPs, and which increase the efficiency of the digestive or metabolic processes, leading to certain improvements in calcium and phosphorus bioavailability.
2. As a result of the reduced food intake by consumption of BC derivatives, the animals present lower body weights; the bones are in a delayed stage of maturation, with lower density, volume and weight, caused by the loss of organic matrix, without modifications in the mineral content. The direct contribution of MRPs cannot be

discounted in these effects, as manifested by the increase in bone pentosidine, especially when the animals consume more complex compounds. In accordance with the decreased organic matrix, bone markers point to a situation of higher resorption or bone turnover. These structural changes, as a whole, induce certain modifications in biomechanical properties, tending to decrease the resistance of bone to failure and definitively affecting stiffness. The main factor responsible for this outcome is the reduced density, followed at a considerable distance by the accumulation of pentosidine.

3. Bread crust increases the dietary CML content, mainly due to its high concentration in the insoluble fraction. Its total elimination is related to CML intake, which is corroborated by the strong correlation between CML consumption and its presence in faeces, the major route of excretion. Moreover, CML recovery is greater when consumed from a real food than when it is consumed from fractions obtained under laboratory conditions. Bread derivatives do not affect CML concentration in the bone, although it does increase in the tail tendon. The fact could be due to the different collagen turnover in both tissues as well as to the protection offered by the mineral phase in the case of bone. For the first time, cardiac tissue is shown to be a target for dietary CML accumulation.

#### *General conclusion*

Indirectly, or even directly, the consumption of bread crust or its fractions, without altering the utilisation of calcium or phosphorus, or affecting their bone fate, produces specific changes in the bone matrix, consistent with decreases in enzymatic crosslinking and increases in non-enzymatic crosslinking that could affect the functionality of the bone. This result, together with the accumulation of CML in some vital organs, should be considered in the context of the involvement of AGEs in the development of degenerative diseases.



## **CAPÍTULO 12**

### ***Referencias bibliográficas***

---



- A.O.A.C. (1980). Official Methods of Analysis. En: *Association of Official Analytical Chemists*. Eds. Horwitz, Washington, D.C.
- ABDULLAH MZ (2008). Quality evaluation of bakery products. En: *Computer vision technology for food quality evaluation*. Eds. Da-Wen S. Academic Press, Amsterdam, 481-522.
- ABRAHAM K, GURTNER R, BERG K, HEINEMEYER G, LAMPEN A, APPEL KE (2011). Toxicology and risk assessment of 5-Hydroxymethylfurfural in food. *Mol Nutr Food Res*, 55(5), 667-678.
- ABU-DWEIH BM, TUKAN S, K., TAKRURI HR (2000). The effect of browning intensity on the protein quality of qurshallah. *Int J Food Sci Nutr*, 51(6), 483-488.
- ADRIAN J, BOISSELOT-LEFEBVRES J (1977). Interrelations entre les produits de la réaction de Maillard et le métabolisme calcique. *Cahiers de Nutrition et Diététique*, 12, 233-234.
- AHMED N (2005). Advanced glycation endproducts—role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pr*, 67(1), 3-21.
- AJANDOUZ EH, PUIGSERVER A (1999). Nonenzymatic browning reaction of essential amino acids: effect of pH on caramelization and Maillard reaction kinetics. *J Agric Food Chem*, 47(5), 1786-1793.
- ALAMIR I, NIQUET-LÉRIDON C, JACOLOT P, RODRIGUEZ C, OROSCO M, ANTON PM, TESSIER FJ (2012). Digestibility of extruded proteins and metabolic transit of N(epsilon)-carboxymethyllysine in rats. *Amino acids*, 16, 16.
- ALIKHANI M, ALIKHANI Z, BOYD C, MACLELLAN CM, RAPTIS M, LIU R, PISCHON N, TRACKMAN PC, GERSTENFELD L, GRAVES DT (2007). Advanced glycation end products stimulate osteoblast apoptosis via the MAP kinase and cytosolic apoptotic pathways. *Bone*, 40(2), 345-353.
- AMES JM (1998). Applications of the Maillard reaction in the food industry. *Food Chem*, 62(4), 431-439.

- AMES JM, WYNNE A, HOFMANN A, PLOS S, GIBSON GR (1999). The effect of a model melanoidin mixture on faecal bacterial populations in vitro. *Br J Nutr*, 82(6), 489-495.
- AMES JM (2003). Nonenzymatic. Browning. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 665-672.
- ANDRIEUX C, SACQUET E, GUEGUEN L (1980). Interactions between Maillard's reaction-products, the microflora of the digestive-tract and mineral metabolism. *Reprod Nutr Develop*, 20(4A), 1061-1069.
- ANDRIEUX C, SACQUET E (1984). Effects of Maillard reaction-products on apparent mineral absorption in different parts of the digestive-tract. The role of microflora. *Reprod Nutr Develop*, 24(4), 379-386.
- ARANCETA BARTRINA J (2006). Prevención del sobrepeso y de la obesidad desde una perspectiva de Salud Pública. *Public Health Nutr*, 9, 13.
- ASO Y, INUKAI T, TAYAMA K, TAKEMURA Y (2000). Serum concentrations of advanced glycation endproducts are associated with the development of atherosclerosis as well as diabetic microangiopathy in patients with type 2 diabetes. *Acta Diabetol*, 37(2), 87-92.
- ASSAR S, MOLONEY C, LIMA M, MAGEE R, AMES J (2009). Determination of Nε-(carboxymethyl)lysine in food systems by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Amino acids*, 36(2), 317-326.
- BABIKER EF, MATSUDOMI N, KATO A (1998). Masking of antigen structure of soybean protein by conjugation with polysaccharide and cross-linkage with microbial transglutaminase (short communication). *Nahrung*, 42(3-4), 158-159.
- BACH FAIG A, ROMAN B, CARRASCO JL, BERTOMEU I, SERRA-MAJEM L (2006). Adhesión a la dieta Mediterránea en España. Evolución en los últimos 20 años. *Public Health Nutr*, 9, 133.
- BAILEY AJ, PAUL RG, KNOTT L (1998). Mechanisms of maturation and ageing of collagen. *Mech Ageing Dev*, 106(1-2), 1-56.

- BALLABRIGA A, CARRASCOSA A (2006). Nutrición en la adolescencia. En: *Nutrición en la infancia y adolescencia*. Eds. Ballabriga A, Carrascosa A. Ergon, Madrid, 1.
- BASTA G (2008). Receptor for advanced glycation endproducts and atherosclerosis: From basic mechanisms to clinical implications. *Atherosclerosis*, 196(1), 9-21.
- BAYNES JW, THORPE SR (2000). Glycooxidation and lipoxidation in atherogenesis. *Free Radic Biol Med*, 28(12), 1708-1716.
- BEL-SERRAT S, MOURATIDOU T, BORNHORST C, PEPLIES J, DE HENAUW S, MARILD S, MOLNAR D, SIANI A, TORNARITIS M, VEIDEBAUM T, KROGH V, MORENO LA (2012). Food consumption and cardiovascular risk factors in European children: the IDEFICS study. *Pediatr Obes*, 6(10), 2047-6310.
- BENINI L, CASTELLANI G, BRIGHENTI F, HEATON KW, BRENTGANI MT, CASIRAGHI MC, SEMBENINI C, PELLEGRINI N, FIORETTA A, MINNITI G (1995). Gastric emptying of a solid meal is accelerated by the removal of dietary fibre naturally present in food. *Gut*, 36(6), 825-830.
- BENJAKUL S, LERTITTIKUL W, BAUER F (2005). Antioxidant activity of Maillard reaction products from a porcine plasma protein–sugar model system. *Food Chem*, 93(2), 189-196.
- BERG TJ, SNORGAARD O, FABER J, TORJESEN PA, HILDEBRANDT P, MEHLSSEN J, HANSSSEN KF (1999). Serum levels of advanced glycation end products are associated with left ventricular diastolic function in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care*, 22(7), 1186-1190.
- BILLAUD C, BRUN-MÉRIMÉE S, LOUARME LC, NICOLAS J (2004). Effect of glutathione and Maillard reaction products prepared from glucose or fructose with glutathione on polyphenoloxidase from apple—I: Enzymatic browning and enzyme activity inhibition. *Food Chem*, 84(2), 223-233.
- BIRLOUEZ-ARAGON I, SAAVEDRA G, TESSIER FJ, GALINIER A, AIT-AMEUR L, LACOSTE F, NIAMBA C-N, ALT N, SOMOZA V, LECERF J-M (2010). A diet based on high-heat-treated foods



- promotes risk factors for diabetes mellitus and cardiovascular diseases. *Am J Clin Nutr*, 91(5), 1220-1226.
- BOGEN KT (1994). Cancer potencies of heterocyclic amines found in cooked foods. *Food Chem Toxicol*, 32(6), 505-515.
- BOHLENDER JM, FRANKE S, STEIN G, WOLF G (2005). Advanced glycation end products and the kidney. *Am J Physiol-Renal*, 289(4), 645-659.
- BORRELLI RC, FOGLIANO V (2005). Bread crust melanoidins as potential prebiotic ingredients. *Mol Nutr Food Res*, 49(7), 673-678.
- BOSKEY AL (1999). Mineralization, structure and function of bone. En: *Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism*. Eds. Seibel M, Robins S, Bilezikian J. Academic Press, San Diego, California (USA), 153-164.
- BRANDS CMJ, ALINK GM, VAN BOEKEL MAJS, JONGEN WMF (2000). Mutagenicity of heated sugar-casein systems: Effect of the Maillard reaction. *J Agric Food Chem*, 48(6), 2271-2275.
- BRONNER F (2003). Mechanisms of intestinal calcium absorption. *J Cell Biochem*, 88(2), 387-393.
- BROWN AJ, ZHANG F, RITTER CS (2012). The vitamin D analog ED-71 is a potent regulator of intestinal phosphate absorption and NaPi-IIb. *Endocrinology*, 153(11), 5150-5156.
- BRUDZYNSKI K, MIOTTO D (2011). Honey melanoidins: Analysis of the compositions of the high molecular weight melanoidins exhibiting radical-scavenging activity. *Food Chem*, 127(3), 1023-1030.
- BUCALA R, MAKITA Z, VEGA G, GRUNDY S, KOSCHINSKY T, CERAMI A, VLASSARA H (1994). Modification of low density lipoprotein by advanced glycation end products contributes to the dyslipidemia of diabetes and renal insufficiency. *Proc Nat Acad Sci USA*, 91(20), 9441-9445.

- BUEHLER MJ (2006). Nature designs tough collagen: Explaining the nanostructure of collagen fibrils. *Proc Nat Acad Sci*, 103(33), 12285-12290.
- BURNELL JM, TEUBNER E, KORN D, MILLER A (1977). Role of calcium in bone maturation arrest after thyroparathyroidectomy in the rat. *Am J Physiol*, 232(1), 33-41.
- BUSA B, MILLER LM, RUBIN CT, QIN YX, JUDEX S (2005). Rapid establishment of chemical and mechanical properties during lamellar bone formation. *Calcif Tissue Int*, 77(6), 386-394.
- CAPUANO E, FERRIGNO A, ACAMPA I, AIT-AMEUR L, FOGLIANO V (2008). Characterization of the Maillard reaction in bread crisps. *Eur Food Res Technol*, 228(2), 311-319.
- CASTELLANI RJ, HARRIS PL, SAYRE LM, FUJII J, TANIGUCHI N, VITEK MP, FOUNDS H, ATWOOD CS, PERRY G, SMITH MA (2001). Active glycation in neurofibrillary pathology of Alzheimer disease: N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine and hexitol-lysine. *Free Radic Biol Med*, 31(2), 175-180.
- CELLEK S, CAMERON NE, COTTER MA, MUNEEER A (2013). Pathophysiology of diabetic erectile dysfunction: potential contribution of vasa nervorum and advanced glycation endproducts. *Int J Impot Res*, 25(1), 1-6.
- CIVITELLI R, ARMAMENTO-VILLAREAL R, NAPOLI N (2009). Bone turnover markers: understanding their value in clinical trials and clinical practice. *Osteoporos Int*, 20(6), 843-851.
- CLARKE B (2008). Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol*, 3(3), 04151206.
- COLWELL A, RUSSELL RG, EASTELL R (1993). Factors affecting the assay of urinary 3-hydroxy pyridinium crosslinks of collagen as markers of bone resorption. *Eur J Clin Invest*, 23(6), 341-349.
- COLLADO-FERNÁNDEZ M (2003). BREAD | Chemistry of baking. En: *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (2ed)*. Eds. Benjamin C. Academic Press, Oxford, 634-638.

- CONTRERAS JIMÉNEZ A (2010). Efecto de la inclusión de PRMs de la corteza de pan en la actividad antioxidante de la dieta. Estudio metodológico comparativo. Universidad de Granada, España.
- CURREY JD (2003). Role of collagen and other organics in the mechanical properties of bone. *Osteoporos Int*, 14, S29-S36.
- DAGLIA M, TARSİ R, PAPETTI A, GRISOLI P, DACARRO C, PRUZZO C, GAZZANI G (2002). Antiadhesive effect of green and roasted coffee on *Streptococcus mutans*' adhesive properties on saliva-coated hydroxyapatite beads. *J Agric Food Chem*, 50(5), 1225-1229.
- DAGLIA M, RACCHI M, PAPETTI A, LANNI C, GOVONI S, GAZZANI G (2004). In vitro and ex vivo antihydroxyl radical activity of green and roasted coffee. *J Agric Food Chem*, 52(6), 1700-1704.
- DAGLIA M, PAPETTI A, ACETI C, SORDELLI B, GREGOTTI C, GAZZANI G (2008). Isolation of high molecular weight components and contribution to the protective activity of coffee against lipid peroxidation in a rat liver microsomal system. *J Agric Food Chem*, 56(24), 11653-11660.
- DALAL M, FERRUCCI L, SUN K, BECK J, FRIED LP, SEMBA RD (2009). Elevated serum advanced glycation end products and poor grip strength in older community-dwelling women. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 64(1), 132-137.
- DEGEN J, HELLWIG M, HENLE T (2012). 1,2-Dicarbonyl compounds in commonly consumed foods. *J Agric Food Chem* 60(28), 7071-7079.
- DEL CASTILLO MD, AMES JM, GORDON MH (2002). Effect of roasting on the antioxidant activity of coffee brews. *J Agric Food Chem*, 50(13), 3698-3703.
- DEL CASTILLO MD, FERRIGNO A, ACAMPA I, BORRELLI RC, OLANO A, MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ A, FOGLIANO V (2007). In vitro release of angiotensin-converting enzyme inhibitors, peroxyl-radical scavengers and antibacterial compounds by enzymatic hydrolysis of glycated gluten. *J Cereal Sci*, 45(3), 327-334.

- DEL POZO S, GARCÍA V, CUADRADO C, RUIZ E, VALERO T, ÁVILA J, VARELA-MOREIRAS G (2012). Valoración nutricional de la dieta española de acuerdo al panel de consumo alimentario. Fundación Española de la Nutrición (FEN).
- DELGADO-ANDRADE C, SEIQUER I, VALVERDE A, NAVARRO MP (2000). Iron metabolism in rats fed diets containing heated glucose-lysine. *Proc Nutr Soc*, 59, 133.
- DELGADO-ANDRADE C (2002). Reacción de Maillard: Influencia sobre la disponibilidad mineral. Universidad de Granada, España.
- DELGADO-ANDRADE C, SEIQUER I, NAVARRO MP (2002). Copper metabolism in rats fed diets containing Maillard reaction products. *J Food Sci*, 67(2), 855-860.
- DELGADO-ANDRADE C, SEIQUER I, NAVARRO MP (2004a). Bioavailability of iron from a heat treated glucose-lysine model food system: assays in rats and in Caco-2 cells. *J Sci Food Agric*, 84, 1507-1513.
- DELGADO-ANDRADE C, SEIQUER I, NIETO R, NAVARRO MP (2004b). Effects of heated glucose-lysine and glucose-methionine model-systems on mineral solubility. *Food Chem*, 87(3), 329-337.
- DELGADO-ANDRADE C, MORALES FJ (2005). Unraveling the contribution of melanoidins to the antioxidant activity of coffee brews. *J Agric Food Chem*, 53(5), 1403-1407.
- DELGADO-ANDRADE C, SEIQUER I, NAVARRO MP (2005). Comparative effects of glucose-lysine versus glucose-methionine Maillard reaction products consumption: in vitro and in vivo calcium availability. *Mol Nutr Food Res*, 49(7), 679-684.
- DELGADO-ANDRADE C, SEIQUER I, NAVARRO MP (2006). Changes in calcium absorption and subsequent tissue distribution induced by Maillard reaction products: in vitro and in vivo assays. *J Sci Food Agric*, 86(2), 271-278.
- DELGADO-ANDRADE C, RUFÍAN-HENARES JA, MORALES FJ (2007a). Lysine availability in commercial fibre-enriched breakfast cereals. *Food Chem*, 100, 725-731.

- DELGADO-ANDRADE C, SEIQUER I, NAVARRO MP, MORALES FJ (2007b). Maillard reaction indicators in diets usually consumed by adolescent population. *Mol Nutr Food Res*, 51(3), 341-351.
- DELGADO-ANDRADE C, RUFÍAN-HENARES JA, MORALES FJ (2008a). Optimised procedure to analyse Maillard reaction-associated fluorescence in cereal-based products. *Czech J Food Sci*, 26(5), 339-346.
- DELGADO-ANDRADE C, SEIQUER I, NAVARRO MP (2008b). Maillard reaction products consumption: Magnesium bioavailability and bone mineralization in rats. *Food Chem*, 107(2), 631-639.
- DELGADO-ANDRADE C, SEIQUER I, NAVARRO MP, MORALES FJ (2008c). Estimation of hydroxymethylfurfural availability in breakfast cereals. Studies in Caco-2 cells. *Food Chem Toxicol*, 46(5), 1600-1607.
- DELGADO-ANDRADE C, RUFÍAN-HENARES JA, MORALES FJ (2009). Hydroxymethylfurfural in commercial biscuits marketed in Spain. *J Food Nutr Res*, 48, 14-19.
- DELGADO-ANDRADE C, CONDE-AGUILERA JA, HARO A, DE LA CUEVA SP, RUFÍAN-HENARES JA (2010a). A combined procedure to evaluate the global antioxidant response of bread. *J Cereal Sci*, 52(2), 239-246.
- DELGADO-ANDRADE C, MORALES FJ, SEIQUER I, PILAR NAVARRO M (2010b). Maillard reaction products profile and intake from Spanish typical dishes. *Food Res Int*, 43(5), 1304-1311.
- DELGADO-ANDRADE C, SEIQUER I, HARO A, CASTELLANO R, NAVARRO MP (2010c). Development of the Maillard reaction in foods cooked by different techniques. Intake of Maillard-derived compounds. *Food Chem*, 122(1), 145-153.
- DELGADO-ANDRADE C, SEIQUER I, GARCIA MM, GALDO G, NAVARRO MP (2011). Increased Maillard reaction products intake reduces phosphorus digestibility in male adolescents. *Nutrition*, 27(1), 86-91.

- DELGADO-ANDRADE C, TESSIER FJ, NIQUET-LÉRIDON C, SEIQUER I, NAVARRO MP (2012). Study of the urinary and faecal excretion of N<sup>ε</sup>-carboxymethyllysine in young human volunteers. *Amino acids*, 43, 595-602.
- DELGADO-ANDRADE C, RONCERO-RAMOS I, HARO A, MORALES FJ, SEIQUER I, NAVARRO MP (2013). Effects of diets supplemented with MRPs from bread crust on the food intake and body weights in rats. *Food Funct*, 7, 7.
- DELPIERRE G, COLLARD F, FORTPIED J, VAN SCHAFTINGEN E (2002). Fructosamine 3-kinase is involved in an intracellular deglycation pathway in human erythrocytes. *Biochem J*, 365(Pt 3), 801-808.
- DELL'AQUILA C, AMES JM, GIBSON GR, WYNNE AG (2003). Microbial degradation of heated gluten-glucose systems. Implications for gut health. En: *Melanoidins in Food and Health*. Eds. Vegarud GE, Morales F. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg, 177-179
- DONG XN, ZOGHI M, RAN Q, WANG X (2010). Collagen mutation causes changes of the microdamage morphology in bone of an OI mouse model. *Bone*, 47(6), 1071-1075.
- DREZNER M (2008). Phosphorus homeostasis and related disorders. En: *Principles of Bone Biology*. Eds. Bilezikian J, Raisz L, Rodan G. Academic Press, 22, 321-328.
- EASTELL R, COLWELL A, HAMPTON L, REEVE J (1997). Biochemical markers of bone resorption compared with estimates of bone resorption from radiotracer kinetic studies in osteoporosis. *J Bone Miner Res*, 12, 59-65.
- EDEAS M, ATTAF D, MAILFERT AS, NASU M, JOUBET R (2010). Maillard Reaction, mitochondria and oxidative stress: Potential role of antioxidants. *Pathol Biol*, 58(3), 220-225.
- EINARSSON H (1987). The effect of time, temperature, pH and reactants on the formation of antibacterial compounds in the Maillard reaction. *Lebensm Wiss Technol*, 20, 56-58.

- EINHORN TA, BOSKEY AL, GUNDBERG CM, VIGORITA VJ, DEVLIN VJ, BEYER MM (1988). The mineral and mechanical properties of bone in chronic experimental diabetes. *J Orthop Res*, 6(3), 317-323.
- ERBERSDOBLER H, GUNSSER I, WEBER G (1970). Degradation of fructoselysine by the intestinal flora. *Zentralbl Veterinarmed A*, 17(6), 573-575.
- ERBERSDOBLER HF, BRANDT A, SCHARRER E, VON WANGENHEIM B (1981). Transport and metabolism studies with fructose amino acids. *Prog Food Nutr Sci*, 5(1-6), 257-263.
- ERBERSDOBLER HF (1986). Twenty years of furosine-better knowledge about the biological significance of Maillard reaction in food and nutrition. En: *Amino-carbonyl reactions in food and biological systems*. Eds. Fujimaki M, Namiki M, Kato MH. Elsevier, Amsterdam, 481-491.
- ERBERSDOBLER HF, FAIST V (2001). Metabolic transit of Amadori products. *Food/Nahrung*, 45(3), 177-181.
- ERBERSDOBLER HF, SOMOZA V (2007). Forty years of furosine – Forty years of using Maillard reaction products as indicators of the nutritional quality of foods. *Mol Nutr Food Res*, 51(4), 423-430.
- ESPOSITO F, MORISCO F, VERDE V, RITIENI A, ALEZIO A, CAPORASO N, FOGLIANO V (2003). Moderate coffee consumption increases plasma glutathione but not homocysteine in healthy subjects. *Aliment Pharmacol Ther*, 17(4), 595-601.
- FADEL HHM, FAROUK A (2002). Caramelization of maltose solution in presence of alanine. *Amino acids*, 22(2), 199-213.
- FAIRWEATHER-TAIT SJ, PORTWOOD DE, SYMSS LL, EAGLES J, MINSKI MJ (1989). Iron and zinc absorption in human subjects from a mixed meal of extruded and nonextruded wheat bran and flour. *Am J Clin Nutr*, 49(1), 151-155.
- FAIST V, WENZEL E, RANDEL G, LOEWER C, EBERSDOBLER HF (2000). In vitro and in vivo studies on the metabolic transit on Nepsilon-carboxymethyllysine. *Czech J Food Sci*, 18, 116-119.

- FAIST V, ERBERSDOBLER HF (2001). Metabolic transit and in vivo effects of melanoidins and precursor compounds deriving from the Maillard reaction. *Ann Nutr Metab*, 45(1), 1-12.
- FERRER E, ALEGRÍA A, COURTOIS G, FARRÉ R (2000). High-performance liquid chromatographic determination of Maillard compounds in store-brand and name-brand ultra-high-temperature-treated cows' milk. *J Chromatogr A*, 881(1-2), 599-606.
- FINOT PA, MAGNENAT E (1981). Metabolic transit of early and advanced Maillard products. *Prog Food Nutr Sci*, 5(1-6), 193-207.
- FINOT PA, FURNISS DE (1986). Nephrocytomegaly in rats induced by Maillard reaction products the involvement of metal ion. En: *Amino-carbonyl reaction in food and biological systems*. Eds. Fujimaki M, Namiki MY, Kato H. Elsevier, Amsterdam, 493-502.
- FINOT PA, FURNISS DE (1989). Metabolic transit and toxicity of Maillard reaction products. *Prog Clin Biol Res*, 304, 343-358.
- FINOT PA (1990). Metabolism and physiological effects of Maillard reaction products (MRP). En: *The Maillard Reaction in food processing, human nutrition and physiology*. Eds. Finot PA, Aeschbacher HV, Hurrell RF, Liardon R. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland, 259-272.
- FINOT PA (1993). Toxicology of non enzymatic browning. En: *Encyclopedia of Food Science, Food Technology and Nutrition*. Eds. Macrae R. Academic Press London, 1, 510-515.
- FINOT PA (2003). BROWNING|Toxicology of nonenzymatic browning. En: *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (2nd)*. Eds. Benjamin C. Academic Press, Oxford, 673-678.
- FINOT PA (2005). The absorption and metabolism of modified amino acids in processed foods. *J AOAC Int*, 88(3), 894-903.



- FOERSTER A, HENLE T (2003). Glycation in food and metabolic transit of dietary AGEs (advanced glycation end-products): studies on the urinary excretion of pyrraline. *Biochem Soc Trans*, 31(Pt 6), 1383-1385.
- FOGLIANO V, MORALES FJ (2011). Estimation of dietary intake of melanoidins from coffee and bread. *Food Funct*, 2(2), 117-123.
- FORD JE (1973). En: *Proteins in human nutrition*. Eds. Porter WJG, Rolls BA. Academic Press, London, 515.
- FORD JE, HURRELL RF, FINOT PA (1983). Storage of milk powders under adverse conditions. 2. Influence on the content of water-soluble vitamins. *Brit J Nutr*, 49, 355-364.
- FÖRSTER A, KÜHNNE Y, HENLE T (2005). Studies on absorption and elimination of dietary Maillard reaction products. *Ann NY Acad Sci*, 1043(1), 474-481.
- FRANKE S, SIGGELKOW H, WOLF G, HEIN G (2007). Advanced glycation endproducts influence the mRNA expression of RAGE, RANKL and various osteoblastic genes in human osteoblasts. *Arch Physiol Biochem*, 113(3), 154-161.
- FREEMAN JB, STEGINK LD, MEYER PD, FRY LK, DENBESTEN L (1975). Excessive urinary zinc losses during parenteral alimentation. *J Surg Res*, 18(5), 463-469.
- FRIEDMAN M (1996). Food browning and its prevention: An overview. *J Agricul Food Chem*, 44(3), 631-653.
- FRIEDMAN M (2005). Biological effects of Maillard browning products that may affect acrylamide safety in food. En: *Chemistry and Safety of Acrylamide in Food*. Eds. Friedman M, Mottram D. Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer US, 561, 135-156.
- FUNK JR, HALE JE, CARMINES D, GOOCH HL, HURWITZ SR (2000). Biomechanical evaluation of early fracture healing in normal and diabetic rats. *J Orthop Res*, 18(1), 126-132.
- FURNISS DE, VUICHOUD J, FINOT PA, HURRELL RF (1989). The effect of Maillard reaction products on zinc metabolism in the rat. *Br J Nutr*, 62, 739-749

- GARCÍA-BAÑOS JL, VILLAMIEL M, OLANO AN, RADA-MENDOZA M (2004). Study on nonenzymatic browning in cookies, crackers and breakfast cereals by maltulose and furosine determination. *J Cereal Sci*, 39(2), 167-173.
- GARNER S, ANDERSON J, AMBROSE W (1996). Skeletal tissues and mineralization. En: *Calcium and phosphorus in health and disease*. Eds. Anderson J, Garner S. CRC Press, Florida, 97-117.
- GAZZANI G, DAGLIA M, PAPETTI A (2012). Food components with anticaries activity. *Curr Opin Biotechnol*, 23(2), 153-159.
- GERMOND JE, PHILIPPOSIAN G, RICHLI U, BRACCO I, ARNAUD MJ (1987). Rapid and complete urinary elimination of [14C]-5-hydroxymethyl-2-furaldehyde administered orally or intravenously to rats. *J Toxicol Environ Health*, 22(1), 79-89.
- GERRARD JA, FAYLE SE, WILSON AJ, NEWBERRY MP, ROSS M, KAVALE S (1998). Dough properties and crumb strength of white pan bread as affected by microbial transglutaminase. *J Food Sci*, 63(3), 472-475.
- GERRARD JA, NEWBERRY MP, ROSS M, WILSON AJ, FAYLE SE, KAVALE S (2000). Pastry lift and croissant volume as affected by microbial transglutaminase. *J Food Sci*, 65(2), 312-314.
- GERRARD JA, BROWN PK, FAYLE SE (2002). Maillard crosslinking of food proteins I: the reaction of glutaraldehyde, formaldehyde and glyceraldehyde with ribonuclease. *Food Chem*, 79(3), 343-349.
- GÖKMEN V, ACAR J (1999). Simultaneous determination of 5-hydroxymethylfurfural and patulin in apple juice by reversed-phase liquid chromatography. *J Chromatogr A*, 847(1-2), 69-74.
- GREGOR JL, EMERY SM (1987). Mineral metabolism and bone strength of rats fed coffee and decaffeinated coffee. *J Agric Food Chem*, 35, 551-556.
- GRUBER P, VIETHS S, WANGORSCH A, NERKAMP J, HOFMANN T (2004). Maillard reaction and enzymatic browning affect the allergenicity of Pru av 1, the major allergen from cherry (*Prunus avium*). *J Agric Food Chem*, 52(12), 4002-4007.

- GRUNWALD S, KRAUSE R, BRUCH M, HENLE T, BRANDSCH M (2006). Transepithelial flux of early and advanced glycation compounds across Caco-2 cell monolayers and their interaction with intestinal amino acid and peptide transport systems. *Br J Nutr*, 95(6), 1221-1228.
- GUERRA-HERNANDEZ E, CORZO N, GARCIA-VILLANOVA B (1999). Maillard reaction evaluation by furosine determination during infant cereal processing. *J Cereal Sci*, 29(2), 171-176.
- GUTHRIE JF, LIN B-H, FRAZAO E (2002). Role of food prepared away from home in the American diet, 1977-78 versus 1994-96: Changes and consequences. *J Nutr Educ Behav*, 34(3), 140-150.
- HASHIBA H (1986). Oxidative browning of Amadori compounds-color formation by iron with Maillard reaction products. En: *Amino-carbonyl Reactions in Food and Biological Systems*. Eds. Fujimaki M, Namiki M, Kato H. Elsevier Science, Amsterdam 155-164.
- HAUS JM, CARRITHERS JA, TRAPPE SW, TRAPPE TA (2007). Collagen, cross-linking, and advanced glycation end products in aging human skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 103(6), 2068-2076.
- HEIN G, WIEGAND R, LEHMANN G, STEIN G, FRANKE S (2003). Advanced glycation end-products pentosidine and Nepsilon-carboxymethyllysine are elevated in serum of patients with osteoporosis. *Rheumatology*, 42, 1242-1246.
- HEIN GE, KÖHLER M, OELZNER P, STEIN G, FRANKE S (2005). The advanced glycation end product pentosidine correlates to IL-6 and other relevant inflammatory markers in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*, 26, 137-141.
- HEIN GE (2006). Glycation endproducts in osteoporosis - Is there a pathophysiologic importance? *Clin Chim Acta*, 371(1-2), 32-36.
- HENLE T (2003). AGEs in foods: Do they play a role in uremia? *Kidney Int*, 63(S84), S145-S147.

- HENLE T (2005). Protein-bound advanced glycation endproducts (AGEs) as bioactive amino acid derivatives in foods. *Amino acids*, 29(4), 313-322.
- HIRAMOTO S, ITOH K, SHIZUUCHI S, KAWACHI Y, MORISHITA Y, NAGASE M, SUZUKI Y, NOBUTA Y, SUDOU Y, NAKAMURA O, KAGAYA I, GOSHIMA H, KODAMA Y, ICATRO FC, KOIZUMI W, SAIGENJI K, MIURA S, SUGIYAMA T, KIMURA N (2004). Melanoidin, a food protein-derived advanced Maillard reaction product, suppresses *Helicobacter pylori* *in vitro* and *in vivo*. *Helicobacter*, 9(5), 429-435.
- HODGE JE (1953). Dehydrated foods, chemistry of browning reactions in model systems. *J Agric Food Chem*, 1(15), 928-943.
- HOFER AM, LEFKIMMIATIS K (2007). Extracellular calcium and cAMP: second messengers as "third messengers"? *Physiology*, 22, 320-327.
- HOFMANN SM, DONG HJ, LI Z, CAI W, ALTOMONTE J, THUNG SN, ZENG F, FISHER EA, VLASSARA H (2002). Improved insulin sensitivity is associated with restricted intake of dietary glycoxidation products in the db/db mouse. *Diabetes*, 51(7), 2082-2089.
- HOFMANN T, BORS W, STETTMAIER K (1999). Radical-assisted melanoidin formation during thermal processing of foods as well as under physiological conditions. *J Agric Food Chem*, 47(2), 391-396.
- HOMMA S, FUJIMAKI M (1981). Growth response of rats fed a diet containing nondialyzable melanoidin. *Prog Food Nutr Sci*, 5, 209-216.
- HOMMA S, AIDA K, FUJIMAKI M (1986). Chelation of metal with brown pigments in coffee. En: *Amino-carbonyl Reactions in Food and Biological Systems*. Eds. Fujimaki M, Nakmiki M, Kato H. Elsevier Science, Amsterdam, 165-172.
- HOMMA S, MURATA M (2001). Metal chelating compounds in instant coffee. *Ann Nutr Metab*, 45, 394.
- HORST R, GOFF J, REINHARDT T (2005). Adapting to the transition between gestation and lactation: Differences between rat, human and dairy cow. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 10(2), 141-156.

- HULTSCH C, BERGMANN R, PAWELKE B, PIETZSCH J, WUEST F, JOHANSEN B, HENLE T (2005). Biodistribution and catabolism of 18F-labelled isopeptide N $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)-L-lysine. *Amino acids*, 29(4), 405-413.
- HURRELL RF, FINOT PA, FORD JE (1983). Storage of milk powders under adverse conditions. I. Losses of lysine and of other essential amino acids as determined by chemical and microbiological methods. *Br J Nutr*, 49(3), 343-354.
- HURRELL RF (1990). Influence of the Maillard reaction in food processing. En: *The Maillard reaction in Food Processing Human Nutrition and Physiology*. Eds. Finot PA, Aesbacher HU, Hurrell RF, Liardon R. Birkhauser, Basel Switzerland, 245-258.
- JAMALL IS, FINELLI VN, QUE HEE SS (1981). A simple method to determine nanogram levels of 4-hydroxyproline in biological tissues. *Anal Biochem*, 112(1), 70-75.
- JING H, KITTS DD (2004). Antioxidant activity of sugar-lysine Maillard reaction products in cell free and cell culture systems. *Arch Biochem Biophys*, 429(2), 154-163.
- JOUSSE F, JONGEN W, AGTEROF W, RUSSELL S, BRAAT P (2002). Simplified kinetic scheme of flavour formation by the Maillard reaction. *J Food Sci*, 67, 2534- 2542.
- KAŇKOVÁ K, ŠEBEKOVÁ K (2005). Genetic variability in the RAGE gene: Possible implications for nutrigenetics, nutrigenomics, and understanding the susceptibility to diabetic complications. *Mol Nutr Food Res*, 49(7), 700-709.
- KATAYAMA Y, AKATSU T, YAMAMOTO M, KUGAI N, NAGATA N (1996). Role of nonenzymatic glycosylation of type I collagen in diabetic osteopenia. *J Bone Miner Res*, 11(7), 931-937.
- KATO Y, MATSUDA T, KATO N, WATANABE K, NAKAMURA R (1986). Browning and insolubilization of ovalbumin by the Maillard reaction with some aldohexoses. *J Agric Food Chem*, 34(2), 351-355.
- KIMIAGAR M, LEE TC, CHICHESTER CO (1980). Long-term feeding effects of browned egg albumin to rats. *J Agric Food Chem*, 28(1), 150-155.

- KOOPSMAN HA (1983). An integrated organismic response to lower gut stimulation. *Scand J Gastroenterol*, 82, 143-153.
- KOSCHINSKY T, HE C-J, MITSUHASHI T, BUCALA R, LIU C, BUENTING C, HEITMANN K, VLASSARA H (1997). Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): An environmental risk factor in diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci*, 94(12), 6474-6479.
- KUTCHAI HC (1998). Gastrointestinal motility. En: *Physiology*. Eds. Berne MR, Levy MN, Koepfen BM, Stanton BA. Mosby Inc., St. Louis, 589-616.
- L'ABBÉ M (2003). Calcium/physiology. En: *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*. Eds. Caballero B, Trugo LC, Finglas PM. Academic Press, Oxford, 2, 771-778.
- LAPOLLA A, TRALDI P, FEDELE D (2005). Importance of measuring products of non-enzymatic glycation of proteins. *Clin Biochem*, 38(2), 103-115.
- LAURETANI F, RUSSO CR, BANDINELLI S, BARTALI B, CAVAZZINI C, DI IORIO A, CORSI AM, RANTANEN T, GURALNIK JM, FERRUCCI L (2003). Age-associated changes in skeletal muscles and their effect on mobility: An operational diagnosis of sarcopenia. *J Appl Physiol*, 95(5), 1851-1860.
- LEE TC, PINTAURO SJ, CHICHESTER CO (1982). Nutritional and toxicologic effects of nonenzymatic Maillard browning. *Diabetes*, 31, 37-46.
- LERTITIKUL W, BENJAKUL S, TANAKA M (2007). Characteristics and antioxidative activity of Maillard reaction products from a porcine plasma protein–glucose model system as influenced by pH. *Food Chem*, 100(2), 669-677.
- LI HC, RISCH SJ, REINNECIUS GA (1994). Flavor formation during frying and subsequent losses during storage and microwave reheating in pancakes. En: *Thermally Generated Flavours: Maillard, Microwave and Extrusion Process*. Eds. Parliament TH, Morello, M. J., McGorin, R. J. ACS Symposium Series. American Chemical Society, Washington, DC, 467–475.

- LI J, LIU D, SUN L, LU Y, ZHANG Z (2012a). Advanced glycation end products and neurodegenerative diseases: mechanisms and perspective. *J Neurol Sci*, 317(1-2), 1-5.
- LI X-H, LV B-L, XIE J-Z, LIU J, ZHOU X-W, WANG J-Z (2012b). AGEs induce Alzheimer-like tau pathology and memory deficit via RAGE-mediated GSK-3 activation. *Neurobiol Aging*, 33(7), 1400-1410.
- LI Y-C, TSAI S-H, CHEN S-M, CHANG Y-M, HUANG T-C, HUANG Y-P, CHANG C-T, LEE J-A (2012c). Aristolochic acid-induced accumulation of methylglyoxal and N $\epsilon$ -(carboxymethyl)lysine: An important and novel pathway in the pathogenic mechanism for aristolochic acid nephropathy. *Biochem Biophys Res Commun*, 423(4), 832-837.
- LIARDON R, DE WECK-GAUDARD D, PHILIPPOSIAN G, FINOT PA (1987). Identification of N.epsilon.-carboxymethyllysine: a new Maillard reaction product in rat urine. *J Agric Food Chem*, 35(3), 427-431.
- LIBUDA L, ALEXU U, REMER T, STEHLE P, SCHOENAU E, KERSTING M (2008). Association between long-term consumption of soft drinks and variables of bone modeling and remodeling in a sample of healthy German children and adolescents. *Am J Clin Nutr*, 88(6), 1670-1677.
- LINDENMEIER M, HOFMANN T (2004). Influence of baking conditions and precursor supplementation on the amounts of the antioxidant pronyl-L-lysine in bakery products. *J Agric Food Chem*, 52(2), 350-354.
- LOPEZ-GARCÍA E, SCHULZE MB, FUNG TT, MEIGS JB, RIFAI N, MANSON JE, HU FB (2004). Major dietary patterns are related to plasma concentrations of markers of inflammation and endothelial dysfunction. *Am J Clin Nutr*, 80(4), 1029-1035.
- LORENZI M (2007). The polyol pathway as a mechanism for diabetic retinopathy: attractive, elusive, and resilient. *Exp Diabetes Res*, 61038(10).
- LUEVANO-CONTRERAS C, CHAPMAN-NOVAKOFSKI K (2010). Dietary advanced glycation end products and aging. *Nutrients*, 2(12), 1247-1265.

- MAKITA Z, RADOFF S, RAYFIELD EJ, YANG Z, SKOLNIK E, DELANEY V, FRIEDMAN EA, CERAMI A, VLASSARA H (1991). Advanced glycosylation end products in patients with diabetic nephropathy. *N Engl J Med*, 325(12), 836-842.
- MALEKI SJ, CHUNG SY, CHAMPAGNE ET, RAUFMAN JP (2000). The effects of roasting on the allergenic properties of peanut proteins. *J Allergy Clin Immunol*, 106(4), 763-768.
- MALIK VS, FUNG TT, VAN DAM RM, RIMM EB, ROSNER B, HU FB (2012). Dietary patterns during adolescence and risk of type 2 diabetes in middle-aged women. *Diabetes Care*, 35(1), 12-18.
- MARKO D, HABERMEYER M, KEMENY M, WEYAND U, NIEDERBERGER E, FRANK O, HOFMANN T (2003). Maillard reaction products modulating the growth of human tumor cells in vitro. *Chem Res Toxicol*, 16(1), 48-55.
- MENZEL EJ, REIHSNER R (1991). Alterations of biochemical and biomechanical properties of rat tail tendons caused by non-enzymatic glycation and their inhibition by dibasic amino acids arginine and lysine. *Diabetologia*, 34(1), 12-16.
- MERCER N, AHMED H, ETCHEVERRY SB, VASTA GR, CORTIZO AM (2007). Regulation of advanced glycation end product (AGE) receptors and apoptosis by AGEs in osteoblast-like cells. *Mol Cell Biochem*, 306(1-2), 87-94.
- MESÍAS M (2007). Importancia de la dieta en la digestibilidad y metabolismo de hierro y calcio en la adolescencia. Influencia del consumo de productos de la reacción de Maillard. Universidad de Granada, España
- MESÍAS M, SEIQUER I, NAVARRO M (2009). Influence of diets rich in Maillard reaction products on calcium bioavailability. Assays in male adolescents and in Caco-2 cells. *J Agric Food Chem*, 57(20), 9532-9538.
- MESÍAS M, GUERRA H, E., GARCÍA-VILLANOVA B (2013). Furan content in Spanish baby foods and its relation with potential precursors. *CyTA - J Food*, 11(1), 1-6.



- MICHALSKA A, AMIGO-BENAVENT M, ZIELINSKI H, DEL CASTILLO MD (2008). Effect of bread making on formation of Maillard reaction products contributing to the overall antioxidant activity of rye bread. *J Cereal Sci*, 48(1), 123-132.
- MIKULÍKOVÁ K, ECKHARDT A, KUNES J, ZICHA J, MIKSIK I (2008). Advanced glycation end-product pentosidine accumulates in various tissues of rats with high fructose intake. *Physiol Res*, 57(1), 89-94.
- MIYATA T, NOTOYA K, YOSHIDA K, HORIE K, MAEDA K, KUROKAWA K, TAKETOMI S (1997). Advanced glycation end products enhance osteoclast-induced bone resorption in cultured mouse unfractionated bone cells and in rats implanted subcutaneously with devitalized bone particles. *J Am Soc Nephrol*, 8, 260-270.
- MOLINÍ CABRERA D (2007). Repercusiones de la comida rápida en la sociedad. *Trastornos de la conducta alimentaria*, 6, 635-659.
- MORALES F-J, ROMERO C, JIMENEZ-PEREZ S (1996). Evaluation of heat-induced changes in Spanish commercial milk: hydroxymethylfurfural and available lysine content. *Int J Food Sci Tech*, 31(5), 411-418.
- MORALES F, JIMÉNEZ-PÉREZ S (2004). Peroxyl radical scavenging activity of melanoidins in aqueous systems. *Eur Food Res Tech*, 218(6), 515-520.
- MORALES F, SOMOZA V, FOGLIANO V (2012). Physiological relevance of dietary melanoidins. *Amino acids*, 42(4), 1097-1109.
- MORALES FJ, FERNÁNDEZ-FRAGUAS C, JIMÉNEZ-PÉREZ S (2005). Iron-binding ability of melanoidins from food and model systems. *Food Chem*, 90(4), 821-827.
- MORALES FJ, ACAR OC, SERPEN A, ARRIBAS-LORENZO G, GOKMEN V (2007). Degradation of free tryptophan in a cookie model system and its application in commercial samples. *J Agric Food Chem*, 55(16), 6793-6797.
- MORR CV, HA EYW (1991). Off-flavors of whey protein concentrates: A literature review. *Int Dairy J*, 1(1), 1-11.

- MOUGHAN PJ, GALL MPJ, RUTHERFURD SM (1996). Absorption of lysine and deoxyketosyllysine in an early-Maillard browned casein by the growing pig. *J Agric Food Chem*, 44(6), 1520-1525.
- NADEEM A, RAJ HG, CHHABRA SK (2005). Increased oxidative stress and altered levels of antioxidants in chronic obstructive pulmonary disease. *Inflammation*, 29, 23-32.
- NAGAO M, SATO S, SUGIMURA T (1983). Mutagens produced by heating foods. En: *The Maillard Reaction in Foods and Nutrition*. Eds. ACS Symposium Series. American Chemical Society, 521-536.
- NAKAMURA A, SASAKI F, WATANABE K, OJIMA T, AHN DH, SAEKI H (2006). Changes in allergenicity and digestibility of squid tropomyosin during the Maillard reaction with ribose. *J Agric Food Chem*, 54(25), 9529-9534.
- NAVARRO M (2003a). Elementos minerales mayoritarios calcio, fósforo y magnesio. En: *Nutrición y Dietética*. Eds. García Arias M, García Fernández M. Universidad de León, 165-177.
- NAVARRO MP, ASPE T, SEIQUER I (2000). Zinc transport in Caco-2 cells and zinc balance in rats: influence of the heat treatment of a casein–glucose–fructose mixture. *J Agric Food Chem*, 48(8), 3589-3596.
- NAVARRO MP (2003b). Impact of Maillard reaction products on mineral bioavailability. En: *Bioavailability of Micronutrients and Minor Dietary Compounds. Metabolic and Technological Aspects*. Eds. Vaquero MP, García-Arias T, Carbajal A, Sánchez-Muniz FJ. Research Signpost, Kerala, India, 133-145.
- NICKLAS TA (2003). Calcium Intake trends and health consequences from childhood through adulthood. *J Am Coll Nutr*, 22(5), 340-356.
- NIENABER U, EICHNER K (1995). Die antioxidative Wirkung von Produkten der Maillard-Reaktion in Modellsystemen und gerösteten Haselnüssen. *Lipid/Fett*, 97(12), 435-444.
- NIQUET-LÉRIDON C, TESSIER FJ (2011). Quantification of N(epsilon)-carboxymethyl-lysine in selected chocolate-flavoured drink mixes using high-performance liquid

chromatography-linear ion trap tandem mass spectrometry. *Food Chem*, 126, 655-663.

NIQUET-LÉRIDON C, ALAMIR I, OROSCO M, ANTON PM, TESSIER FJ (2012). Digestibility of caseins and N<sup>ε</sup>-carboxymethyl-lysine from extruded biscuits in rats. *Book of abstracts of the 11<sup>th</sup> International Symposium on the Maillard reaction*, 66.

O'BRIEN J, WALKER R (1988). Toxicological effects of dietary Maillard reaction products in the rat. *Food Chem Toxicol*, 26(9), 775-783.

O'BRIEN J, MORRISSEY PA (1989). Nutritional and toxicological aspects of the Maillard browning reaction in foods. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 28(3), 211-248.

O'BRIEN J, MORRISSEY PA (1997). Metal ion complexation by products of the Maillard reaction. *Food Chem*, 58(1), 17-27.

O'BRIEN J, MORRISSEY PA, FLYNN A (1994). Alterations of Maillard metabolism and secondary pathology in rats fed Maillard reaction products. En: *Maillard Reaction in Chemistry Food and Health*. Eds. Labuza TP, Reineccius GA, Monnier V, O'Brien J, Baynes J. The Royal Society of Chemistry Cambridge, U.K., 397-401.

O'BRIEN JM, MORRISSEY PA, FLYNN A (1989). Mineral balance study of rats fed Maillard reaction products. En: *Trace Elements in Man and Animals*. Eds. Hurley L, Keen C, Lönnnerdal B, Rucker R. Springer US, 563-564.

ODETTI P, ROSSI S, MONACELLI F, POGGI A, CIRNIGLIARO M, FEDERICI M, FEDERICI A (2005). Advanced glycation end products and bone loss during aging. *Ann NY Acad Sci*, 1043, 710-717.

ÖSTE RE, DAHLQVIST A, SJOSTROM H, NAREN O, MILLER R (1986). Effect of Maillard reaction products on protein digestion. In vivo studies. *J Agric Food Chem*, 34, 355-358.

ÖSTE RE, MILLER R, SJOESTROEM H, NOREN O (1987). Effect of Maillard reaction products on protein digestion. Studies on pure compounds. *J Agric Food Chem*, 35(6), 938-942.

- PAYNE GW (2006). Effect of inflammation on the aging microcirculation: impact on skeletal muscle blood flow control. *Microcirculation*, 13(4), 343-352.
- PEACOCK M (2010). Calcium metabolism in health and disease. *Clin J Am Soc Nephrol*, 5(1), 05910809.
- PEPPA M, BREM H, EHRLICH P, ZHANG JG, CAI W, LI Z, CROITORU A, THUNG S, VLASSARA H (2003a). Adverse effects of dietary glycotoxins on wound healing in genetically diabetic mice. *Diabetes*, 52(11), 2805-2813.
- PEPPA M, HE C, HATTORI M, MCEVOY R, ZHENG F, VLASSARA H (2003b). Fetal or neonatal low-glycotxin environment prevents autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes*, 52(6), 1441-1448.
- PÉREZ-LLAMAS F, GARAULET-AZA M, GIL-HERNÁNDEZ A, ZAMORA-NAVARRO S (2005). Calcio, fósforo, magnesio y flúor. Metabolismo óseo y su regulación. En: *Tratado de nutrición. Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición*. Eds. Hernández ÁG. Acción Médica, Madrid, España., 1, 899-925.
- PERKINS EG, BAKER DH, JOHNSON GH, MAKOWSKI E (1981). The metabolism of fructose-phenylalanine in the rat. *Prog Food Nutr Sci*, 5, 229-242.
- PISCHETSRIEDER M, RINALDI F, GROSS U, SEVERIN T (1998). Assessment of the antioxidative and prooxidative activities of two aminoreductones formed during the Maillard reaction: Effects on the oxidation of  $\beta$ -carotene, N $\alpha$ -acetylhistidine, and cis-alkenes. *J Agric Food Chem*, 46(8), 2945-2950.
- POWRIE WD, WU CH, ROSIN MP, STICH HF (1981). Clastogenic and mutagenic activities of Maillard reaction model systems. *J Food Sci*, 46(5), 1433-1445.
- POWRIE WD, WU CH, MOLUND VP (1986). Browning reaction systems as sources of mutagens and antimutagens. *Environ Health Perspect*, 67, 47-54.
- PRÄTTÄLÄ RH, HELASOJA V, MYKKÄNEN H (2001). The consumption of rye bread and white bread as dimensions of health lifestyles in Finland. *Public Health Nutr*, 4, 813-819.

- PRISBY RD, SWIFT JM, BLOOMFIELD SA, HOGAN HA, DELP MD (2008). Altered bone mass, geometry and mechanical properties during the development and progression of type 2 diabetes in the Zucker diabetic fatty rat. *J Endocrinol*, 199(3), 379-388.
- PURLIS E (2010). Browning development in bakery products – A review. *J Food Eng*, 99(3), 239-249.
- PUSCASU C, BIRLOUEZ-ARAGON I (2002). Intermediary and/or advanced Maillard products exhibit prooxidant activity on Trp: *In vitro* study on  $\alpha$ -lactalbumin. *Food Chem*, 78(4), 399-406.
- RAHMAN I, BISWAS SK, KODE A (2006). Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *Eur J Pharmacol*, 533, 222-239.
- RAMASAMY R, YAN SF, SCHMIDT AM (2011). Receptor for AGE (RAGE): signaling mechanisms in the pathogenesis of diabetes and its complications. *Ann NY Acad Sci*, 1243(1), 88-102.
- RAMIREZ-JIMENEZ A, GUERRA-HERNANDEZ E, GARCIA-VILLANOVA B (2000). Browning indicators in bread. *J Agric Food Chem*, 48(9), 4176-4181.
- RAMÍREZ-JIMÉNEZ A, GARCÍA-VILLANOVA B, GUERRA-HERNÁNDEZ E (2000). Hydroxymethylfurfural and methylfurfural content of selected bakery products. *Food Res Int*, 33(10), 833-838.
- RATH N, HUFF G, HUFF W, BALOG J (2000). Factors regulating bone maturity and strength in poultry. *Poult Sci*, 79(7), 1024-1032.
- REDDY GK, STEHNO-BITTEL L, HAMADE S, ENWEMEKA CS (2001). The biomechanical integrity of bone in experimental diabetes. *Diabetes Res Clin Pr*, 54(1), 1-8.
- REDDY GK (2003). Glucose-mediated in vitro glycation modulates biomechanical integrity of the soft tissues but not hard tissues. *J Orthop Res*, 21(4), 738-743.
- REDDY GK (2004). Cross-linking in collagen by nonenzymatic glycation increases the matrix stiffness in rabbit achilles tendon. *Exp Diabesity Res*, 5, 143-153.

- REEVES PG, NIELSEN FH, FAHEY GC (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*, 123(11), 1939-1951.
- REISER KM (1991). Nonenzymatic glycation of collagen in aging and diabetes. *Proc Soc Exp Biol Med*, 196(1), 17-29.
- RENDLEMAN JA (1986). Carbohydrate-mineral complexes in foods. En: *Interactions of foods components*. Eds. Birch GG, Lindley MG. Elsevier, London, 63-83.
- RENDLEMAN JA (1987). Complexation of calcium by melanoidin and its role in determining bioavailability. *J Food Sci*, 52(6), 1699-1705.
- RENDLEMAN JA, INGLETT GE (1990). The influence of  $\text{Cu}^{2+}$  in the Maillard reaction. *Carbohydr Res*, 201(2), 311-326.
- RÉRAT A, CALMES R, VAISSADE P, FINOT P-A (2002). Nutritional and metabolic consequences of the early Maillard reaction of heat treated milk in the pig. *Eur J Nutr*, 41(1), 1-11.
- RIZELIO VM, GONZAGA LV, DA SILVA CAMPELO BORGES G, MICKE GA, FETT R, COSTA ACO (2012). Development of a fast MECK method for determination of 5-HMF in honey samples. *Food Chem*, 133(4), 1640-1645.
- RUDLOFF S, LONNERDAL B (1992). Solubility and digestibility of milk proteins in infant formulas exposed to different heat treatments. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 15(1), 25-33.
- RUFÍAN-HENARES J, DELGADO-ANDRADE C, MORALES F (2008). Relevance of glucosylisomaltol and galactosylisomaltol in commercial biscuits. *Eur Food Res Tech*, 227(5), 1447-1453.
- RUFIAN-HENARES JA, GARCIA-VILLANOVA B, GUERRA-HERNANDEZ E (2004). Generation of furosine and color in infant/enteral formula-resembling systems. *J Agric Food Chem*, 52(17), 5354-5358.

- RUIFIÁN-HENARES JA, DELGADO-ANDRADE C, MORALES FJ (2006a). Application of a fast high-performance liquid chromatography method for simultaneous determination of furanic compounds and glucosylisomaltol in breakfast cereals. *J AOAC Int*, 89(1), 161-165.
- RUIFIÁN-HENARES JA, DELGADO-ANDRADE C (2009). Effect of digestive process on Maillard reaction indexes and antioxidant properties of breakfast cereals. *Food Res Int*, 42(3), 394-400.
- RUIFIÁN-HENARES JA, DELGADO-ANDRADE C, MORALES FJ (2009). Assessing the Maillard reaction development during the toasting process of common flours employed by the cereal products industry. *Food Chem*, 114(1), 93-99.
- RUIFIÁN-HENARES JA, DE LA CUEVA SP (2009). Antimicrobial activity of coffee melanoidins-A study of their metal-chelating properties. *J Agric Food Chem*, 57(2), 432-438.
- RUIFIÁN-HENARES JÁ, GUERRA-HERNANDEZ E, GARCÍA-VILLANOVA B (2006b). Colour measurement as indicator for controlling the manufacture and storage of enteral formulas. *Food Control*, 17(6), 489-493.
- RUIZ-ROCA B, NAVARRO MAP, SEIQUER I (2008). Antioxidant properties and metal chelating activity of glucose-lysine heated mixtures: Relationships with mineral absorption across Caco-2 cell monolayers. *J Agric Food Chem*, 56(19), 9056-9063.
- RUIZ-ROCA B, DELGADO-ANDRADE C, NAVARRO MP, SEIQUER I (2011). Effects of Maillard reaction products from glucose-lysine model systems on oxidative stress markers and against oxidative induction by hydrogen peroxide in Caco-2 cells *J Food Nutr Res*, 50(4), 237-248.
- RUPPEL ME, MILLER LM, BURR DB (2008). The effect of the microscopic and nanoscale structure on bone fragility. *Osteoporos Int*, 19(9), 1251-1265.
- SAITO M, FUJII K, MORI Y, MARUMO K (2006a). Role of collagen enzymatic and glycation induced cross-links as a determinant of bone quality in spontaneously diabetic WBN/Kob rats. *Osteoporos Int*, 17(10), 1514-1523.

- SAITO M, FUJII K, SOSHI S, TANAKA T (2006b). Reductions in degree of mineralization and enzymatic collagen cross-links and increases in glycation-induced pentosidine in the femoral neck cortex in cases of femoral neck fracture. *Osteoporos Int*, 17(7), 986-995.
- SAITO M, MARUMO K (2010). Collagen cross-links as a determinant of bone quality: a possible explanation for bone fragility in aging, osteoporosis, and diabetes mellitus. *Osteoporos Int*, 21(2), 195-214.
- SANGUINETI R, STORACE D, MONACELLI F, FEDERICI A, ODETTI P (2008). Pentosidine effects on human osteoblasts *in vitro*. *Ann NY Acad Sci*, 044.
- SARRIÁ B, LÓPEZ-FANDIÑO R, VAQUERO MP (2000). Protein nutritive utilization in rats fed powder and liquid infant formulas / Utilización nutritiva de la proteína en ratas alimentadas con formulas infantiles en polvo y líquidas. *Food Sci Technol Int*, 6(1), 9-16.
- SARRIÁ B, LÓPEZ-FANDIÑO R, VAQUERO P (2001). Does processing of a powder or in-bottle-sterilized liquid infant formula affect calcium bioavailability? *Nutrition*, 17(4), 326-331.
- SARRIÁ B, VAQUERO MP (2004). Iron bioavailability from powdered and in-bottle-sterilized infant formulas in suckling and weanling rats. *Nutrition*, 20(9), 788-793.
- SCHAFFLER MB, KENNEDY OD (2012). Osteocyte signaling in bone. *Curr Osteoporos Rep*, 10(2), 118-125.
- SCHALKWIJK CG, BAIDOSHVILI A, STEHOUWER CDA, VAN HINSBERGH VWM, NIESSEN HWM (2004). Increased accumulation of the glycoxidation product Nε-(carboxymethyl)lysine in hearts of diabetic patients: generation and characterisation of a monoclonal anti-CML antibody. *BBA-Mol Cell Biol L*, 1636(2-3), 82-89.
- SCHEIJEN JLJM, VAN DE WAARENBURG MPH, STEHOUWER CDA, SCHALKWIJK CG (2009). Measurement of pentosidine in human plasma protein by a single-column high-



- performance liquid chromatography method with fluorescence detection. *J Chrom B*, 877(7), 610-614.
- SCHINZEL R, MUNCH G, HEIDLAND A, SEBEKOVA K (2001). Advanced glycation end products in end-stage renal disease and their removal. *Nephron*, 87(4), 295-303.
- SCHLEICHER ED, WAGNER E, NERLICH AG (1997). Increased accumulation of the glycoxidation product N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in human tissues in diabetes and aging. *J Clin Invest*, 99(3), 457-468.
- SCHNEIDER M, KLOTZSCHE M, WERZINGER C, HEGELE J, WAIBEL R, PISCHETSRIEDER M (2002). Reaction of folic acid with reducing sugars and sugar degradation products. *J Agric Food Chem*, 50(6), 1647-1651.
- SCHNIDER SL, KOHN RR (1981). Effects of age and diabetes mellitus on the solubility and nonenzymatic glucosylation of human skin collagen. *J Clin Invest*, 67(6), 1630-1635.
- SCHWARTZ AV (2003). Diabetes mellitus: Does it affect bone? *Calcif Tissue Int*, 73(6), 515-519.
- ŠEBEKOVÁ K, HOFMANN T, BOOR P, ULICNÁ O, ERBERSDOBLER HF, BAYNES JW, THORPE SR, HEIDLAND A, SOMOZA V (2005). Renal effects of oral Maillard reaction product load in the form of bread crusts in healthy and subtotaly nephrectomized rats. *Ann NY Acad Sci*, 1043(1), 482-491.
- ŠEBEKOVÁ K, SOMOZA V (2007). Dietary advanced glycation endproducts (AGEs) and their health effects – PRO. *Mol Nutr Food Res*, 51(9), 1079-1084.
- ŠEBEKOVÁ K, SAAVEDRA G, ZUMPE C, SOMOZA V, KLENOVICSOVÁ K, BIRLOUEZ-ARAGON I (2008). Plasma concentration and urinary excretion of Nε-(carboxymethyl)lysine in breast milk– and formula-fed infants. *Ann NY Acad Sci*, 1126(1), 177-180.
- ŠEBEKOVÁ K, KLENOVICS KS, BOOR P, CELEC P, BEHULIAK M, SCHIEBERLE P, HEIDLAND A, PALKOVITS M, SOMOZA V (2012). Behaviour and hormonal status in healthy rats on a diet rich in Maillard reaction products with or without solvent extractable aroma compounds. *Physiol Behav*, 105(3), 693-701.

- SEIBEL MJ (2005). Biochemical markers of bone turnover: part I: biochemistry and variability. *Clin Biochem Rev*, 26(4), 97-122.
- SEIQUER I, ASPE T, VAQUERO P, NAVARRO MP (2001). Effects of heat treatment of casein in the presence of reducing sugars on calcium bioavailability: *in vitro* and *in vivo* assays. *J Agric Food Chem*, 49(2), 1049-1055.
- SEIQUER I, DÍAZ-ALGUACIL J, DELGADO-ANDRADE C, LÓPEZ-FRÍAS M, MUÑOZ HOYOS A, GALDÓ G, NAVARRO MP (2006). Diets rich in Maillard reaction products affect protein digestibility in adolescent males aged 11–14 y. *Am J Clin Nutr*, 83(5), 1082-1088.
- SEIQUER I, MESÍAS M, HOYOS AM, GALDO G, NAVARRO MP (2008a). A Mediterranean dietary style improves calcium utilization in healthy male adolescents. *J Am Coll Nutr*, 27(4), 454-462.
- SEIQUER I, RUIZ-ROCA B, MESÍAS M, MUÑOZ-HOYOS A, GALDÓ G, OCHOA JJ, NAVARRO MP (2008b). The antioxidant effect of a diet rich in Maillard reaction products is attenuated after consumption by healthy male adolescents. *In vitro* and *in vivo* comparative study. *J Sci Food Agric*, 88(7), 1245-1252.
- SEIQUER I, DELGADO-ANDRADE C, HARO A, NAVARRO MP (2010). Assessing the effects of severe heat treatment of milk on calcium bioavailability: *in vitro* and *in vivo* studies. *J Dairy Sci*, 93(12), 5635-5643.
- SELL DR, MONNIER VM (1989). Isolation, purification and partial characterization of novel fluorophores from aging human insoluble collagen-rich tissue. *Connect Tissue Res*, 19(1), 77-92.
- SELL DR, MONNIER VM (1997). Age-related association of tail tendon break time with tissue pentosidine in DBA/2 vs C57BL/6 mice: the effect of dietary restriction. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 52(5), B277-284.
- SELL DR, STRAUCH CM, SHEN W, MONNIER VM (2007). 2-Amino adipic acid is a marker of protein carbonyl oxidation in the aging human skin: effects of diabetes, renal failure and sepsis. *Biochem J*, 404(2), 269-277.

- SEMBA RD, FERRUCCI L, SUN K, BECK J, DALAL M, VARADHAN R, WALSTON J, GURALNIK JM, FRIED LP (2009a). Advanced glycation end products and their circulating receptors predict cardiovascular disease mortality in older community-dwelling women. *Aging Clin Exp Res*, 21(2), 182-190.
- SEMBA RD, FINK JC, SUN K, BANDINELLI S, GURALNIK JM, FERRUCCI L (2009b). Carboxymethyl-lysine, an advanced glycation end product, and decline of renal function in older community-dwelling adults. *Eur J Nutr*, 48(1), 38-44.
- SERRA-MAJEM L, ARANCETA BARTRINA J (2004). Nutrición infantil y juvenil: estudio enKid. En. Eds. Masson.
- SERRA-MAJEM L, RIBAS-BARBA L, PEREZ-RODRIGO C, BARTRINA JA (2006). Nutrient adequacy in Spanish children and adolescents. *Br J Nutr*, 96(1), 549-57.
- SHIBAO J, BASTOS DHM (2011). Produtos da reação de Maillard em alimentos: implicações para a saúde. *Revista de Nutrição*, 24, 895-904.
- SIEGA-RIZ AM, POPKIN BM, CARSON T (2000). Differences in food patterns at breakfast by sociodemographic characteristics among a nationally representative sample of adults in the United States. *Prev Med*, 30(5), 415-424.
- SILVA MJ, BRODT MD, LYNCH MA, MCKENZIE JA, TANOUYE KM, NYMAN JS, WANG X (2009). Type 1 Diabetes in young rats leads to progressive trabecular bone loss, cessation of cortical bone growth, and diminished whole bone strength and fatigue life. *J Bone Miner Res*, 24(9), 1618-1627.
- SILVÁN JM, VAN DE LAGEMAAT J, OLANO A, DEL CASTILLO MD (2006). Analysis and biological properties of amino acid derivatives formed by Maillard reaction in foods. *J Pharm Biomed Anal*, 41(5), 1543-1551.
- SIMONATO B, PASINI G, GIORATO M, SPETTOLI P, CURIONI A (2002). Effect of cooking on in vitro protein digestibility of bread dough. *Tecnica-Molitoria*, 53, 1118-1126.
- SINGH S, WAKELING L, GAMLATH S (2007). Retention of essential amino acids during extrusion of protein and reducing sugars. *J Agric Food Chem*, 55(21), 8779-8786.

- SMITH MA, TANEDA S, RICHEY PL, MIYATA S, YAN SD, STERN D, SAYRE LM, MONNIER VM, PERRY G (1994). Advanced Maillard reaction end products are associated with Alzheimer disease pathology. *Proc Nat Acad Sci USA*, 91(12), 5710-5714.
- SMUDA M, GLOMB MA (2013). Maillard degradation pathways of vitamin C. *Angewandte Chemie International Edition*, 52, 4887–4891.
- SOMOZA V (2005). Five years of research on health risks and benefits of Maillard reaction products: An update. *Mol Nutr Food Res*, 49(7), 663-672.
- SOMOZA V, LINDENMEIER M, HOFMANN T, FRANK O, ERBERSDOBLER HF, BAYNES JW, THORPE SR, HEIDLAND A, ZILL H, BEK S, HUBER J, WEIGLE T, SCHEIDLER S, BUSCH AE, ŠEBEKOVÁ K (2005a). Dietary bread crust advanced glycation end products bind to the receptor for AGEs in HEK-293 kidney cells but are rapidly excreted after oral administration to healthy and subtotally nephrectomized rats. *Ann NY Acad Sci*, 1043(1), 492-500.
- SOMOZA V, WENZEL E, LINDENMEIER M, GROTHE D, ERBERSDOBLER HF, HOFMANN T (2005b). Influence of feeding malt, bread crust, and a pronylated protein on the activity of chemopreventive enzymes and antioxidative defense parameters in vivo. *J Agric Food Chem*, 53(21), 8176-8182.
- SOMOZA V, WENZEL E, WEISS C, CLAWIN-RADECKER I, GRUBEL N, ERBERSDOBLER HF (2006). Dose-dependent utilisation of casein-linked lysinoalanine, N(epsilon)-fructoselysine and N(epsilon)-carboxymethyllysine in rats. *Mol Nutr Food Res*, 50(9), 833-841.
- SPANNEBERG R, SALZWEDEL G, GLOMB MA (2011). Formation of early and advanced Maillard reaction products correlates to the ripening of cheese. *J Agric Food Chem*, 60(2), 600-607.
- STEENVOORDEN MM, HUIZINGA TW, VERZIIL N, BANK RA, RONDAY HK, LUNING HA, LAFEVER FP, TOES RE, DEGROOT J (2006). Activation of receptor for advanced glycation end products in osteoarthritis leads to increased stimulation of chondrocytes and synoviocytes. *Arthritis Rheum*, 54, 253-263.

- STEGEMANN H, STALDER K (1967). Determination of hydroxyproline. *Clin Chim Acta*, 18(2), 267-273.
- STITT AW (2005). The Maillard reaction in eye diseases. *Ann NY Acad Sci*, 582-597.
- SUMMA C, McCOURT J, CÄMMERER B, FIALA A, PROBST M, KUN S, ANKLAM E, WAGNER K-H (2008). Radical scavenging activity, anti-bacterial and mutagenic effects of Cocoa bean Maillard Reaction products with degree of roasting. *Mol Nutr Food Res*, 52(3), 342-351.
- SUN K, SEMBA RD, FRIED LP, SCHAUMBERG DA, FERRUCCI L, VARADHAN R (2012). Elevated serum carboxymethyl-Lysine, an advanced glycation end product, predicts severe walking disability in older women: The Women's Health and Aging Study I. *J Aging Res*, 586385(10), 29.
- TAKAHASHI M, HOSHINO H, KUSHIDA K, INOUE T (1995). Direct measurement of crosslinks, pyridinoline, deoxypyridinoline, and pentosidine, in the hydrolysate of tissues using high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem*, 232(2), 158-162.
- TAKAHASHI M, SUZUKI M, KUSHIDA K, MIYAMOTO S, INOUE T (1997). Relationship between pentosidine levels in serum and urine and activity in rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, 36(6), 637-642.
- TAKEUCHI H, NISHIOKA Y, FUJISHIRO M, MURAMATSU K (1987). Physiological effects of nondialyzable melanoidin in rats. *Agric Biol Chem*, 51(4), 969-976.
- TAN ALY, SOURRIS KC, HARCOURT BE, THALLAS-BONKE V, PENFOLD S, ANDRIKOPOULOS S, THOMAS MC, O'BRIEN RC, BIERHAUS A, COOPER ME, FORBES JM, COUGHLAN MT (2010). Disparate effects on renal and oxidative parameters following RAGE deletion, AGE accumulation inhibition, or dietary AGE control in experimental diabetic nephropathy. *Am J Physiol-Renal*, 298(3), F763-F770.
- TANAKA M, LEE T-C, CHICHESTER CO (1975). Nutritional consequences of the Maillard reaction. The Absorption of fructose-l-tryptophan in the large Intestine of the rat. *J Nutr*, 105(8), 989-994.

- TANG SY, ZEENATH U, VASHISHTH D (2007). Effects of non-enzymatic glycation on cancellous bone fragility. *Bone*, 40(4), 1144-1151.
- TANG SY, ALLEN MR, PHIPPS R, BURR DB, VASHISHTH D (2009). Changes in non-enzymatic glycation and its association with altered mechanical properties following 1-year treatment with risedronate or alendronate. *Osteoporos Int*, 20(6), 887-894.
- TESSIER F, BIRLOUEZ-ARAGON I (2012). Health effects of dietary Maillard reaction products: the results of ICARE and other studies. *Amino acids*, 42(4), 1119-1131.
- TESSIER FJ, C. N, RHAZ L, HEDHILI K, SEIQUER I, NAVARRO MP, DELGADO-ANDRADE C (2010). N-Carboxymethyllysine: its origin in selected foods and its urinary and faecal excretions in healthy humans. En: *Maillard Reaction Interface between Aging, Nutrition and Metabolism*. Eds. Thomas MC, Forbes JM. RSC Publishing, Cambridge, 332, 144-150.
- THORNALLEY PJ, BATTAH S, AHMED N, KARACHALIAS N, AGALOU S, BABAEI-JADIDI R, DAWNAY A (2003). Quantitative screening of advanced glycation endproducts in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry. *Biochem J*, 375(3), 581-592.
- THORPE SR, BAYNES JW (2003). Maillard reaction products in tissue proteins: new products and new perspectives. *Amino acids*, 25(3-4), 275-281.
- THORVASLDSSON K, SKJÖLDEBRAND C (1998). Water diffusion in bread during baking. *Lebensm Wiss Technol*, 31 (7-8), 658-663.
- TSEN CC, REDDY PRK, EL-SAMAHY SK, GEHRKE CW (1983). Effect of the Maillard browning reaction on the nutritive value of breads and pizza crusts. En: *The Maillard Reaction in Foods and Nutrition*. Eds. ACS Symposium Series, vol 215. American Chemical Society, 215, 379-394.
- TUOHY KM, HINTON DJS, DAVIES SJ, CRABBE JC, GIBSON GR, AMES JM (2006). Metabolism of Maillard reaction products by the human gut microbiota-implications for health. *Mol Nutr Food Res*, 50, 847-857.

- TURECEK C, FRATZL-ZELMAN N, RUMPLER M, BUCHINGER B, SPITZER S, ZOEHRER R, DURCHSCHLAG E, KLAUSHOFER K, PASCHALIS EP, VARGA F (2008). Collagen cross-linking influences osteoblastic differentiation. *Calcif Tissue Int*, 82(5), 392-400.
- URIBARRI J, CAI W, SANDU O, PEPPA M, GOLDBERG T, VLASSARA H (2005). Diet-derived advanced glycation end products are major contributors to the body's AGE pool and induce inflammation in healthy subjects. *Ann NY Acad Sci*, 461-466.
- URIBARRI J, CAI W, PEPPA M, GOODMAN S, FERRUCCI L, STRIKER G, VLASSARA H (2007). Circulating glycotoxins and dietary advanced glycation endproducts: two links to inflammatory response, oxidative stress, and aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sc*, 72, 427-433.
- VALCOURT U, MERLE B, GINEYTS E, VIGUET-CARRIN S, DELMAS PD, GARNERO P (2007). Non-enzymatic glycation of bone collagen modifies osteoclastic activity and differentiation. *J Biol Chem*, 282(8), 5691-5703.
- VALENTE T, GELLA A, FERNANDEZ-BUSQUETS X, UNZETA M, DURANY N (2010). Immunohistochemical analysis of human brain suggests pathological synergism of Alzheimer's disease and diabetes mellitus. *Neurobiol Dis*, 37(1), 67-76.
- VAN BOEKEL M, FOGLIANO V, PELLEGRINI N, STANTON C, SCHOLZ G, LALLIE S, SOMOZA V, KNORR D, JASTI PR, EISENBRAND G (2010). A review on the beneficial aspects of food processing. *Mol Nutr Food Res*, 54(9), 1215-1247.
- VAN BOEKEL MA (2006). Formation of flavour compounds in the Maillard reaction. *Biotechnol Adv*, 24(2), 230-233.
- VAN HEEREBEEK L, HAMDANI N, HANDOKO ML, FALCAO-PIRES I, MUSTERS RJ, KUPREISHVILI K, IJSSELMUIDEN AJ, SCHALKWIJK CG, BRONZWAER JG, DIAMANT M, BORBELY A, VAN DER VELDEN J, STIENEN GJ, LAARMAN GJ, NIESSEN HW, PAULUS WJ (2008). Diastolic stiffness of the failing diabetic heart: importance of fibrosis, advanced glycation end products, and myocyte resting tension. *Circulation*, 117(1), 43-51.

- VASHISHTH D, GIBSON GJ, KHOURY JI, SCHAFFLER MB, KIMURA J, FYHRIE DP (2001). Influence of nonenzymatic glycation on biomechanical properties of cortical bone. *Bone*, 28(2), 195-201.
- VERCET A (2004). Browning of white chocolate during storage. *Food Chem*, 81, 371-377.
- VERHAEGHE J, SUIKER AM, EINHORN TA, GEUSENS P, VISSER WJ, VAN HERCK E, VAN BREE R, MAGITSKY S, BOUILLON R (1994). Brittle bones in spontaneously diabetic female rats cannot be predicted by bone mineral measurements: studies in diabetic and ovariectomized rats. *J Bone Miner Res*, 9(10), 1657-1667.
- VERZIIL N, DEGROOT J, OLDEHINKEL E, BANK RA, THORPE SR, BAYNES JW, BAYLISS MT, BIJLSMA JW, LAFEBER FP, TEKOPPELE JM (2000). Age-related accumulation of Maillard reaction products in human articular cartilage collagen. *Biochem J*, 2, 381-387.
- VERZIIL N, DEGROOT J, BEN ZC, BRAU-BENJAMIN O, MAROUDAS A, BANK RA, MIZRAHI J, SCHALKWIJK CG, THORPE SR, BAYNES JW, BIJLSMA JW, LAFEBER FP, TEKOPPELE JM (2002). Crosslinking by advanced glycation end products increases the stiffness of the collagen network in human articular cartilage: a possible mechanism through which age is a risk factor for osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 46(1), 114-123.
- VICENTE MIRANDA H, OUTEIRO TF (2010). The sour side of neurodegenerative disorders: the effects of protein glycation. *J Pathol*, 221(1), 13-25.
- VLISSARA H (1996). Advanced glycosylation in nephropathy of diabetes and aging. *Adv Nephrol*, 25, 303-307.
- VLISSARA H, CAI W, CRANDALL J, GOLDBERG T, OBERSTEIN R, DARDAINE V, PEPPA M, RAYFIELD EJ (2002). Inflammatory mediators are induced by dietary glycotoxins, a major risk factor for diabetic angiopathy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(24), 15596-15601.
- VON DER MARCK K (1999). Structure and biosynthesis of collagens. En: *Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism*. Eds. Seibel M, Robins S, Bilezikian J. Academic Press, San Diego, California (USA), 3-30.



- WAGNER Z, MOLNAR M, MOLNAR GA, TAMASKO M, LACZY B, WAGNER L, CSIKY B, HEIDLAND A, NAGY J, WITTMANN I (2006). Serum carboxymethyllysine predicts mortality in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis*, 47(2), 294-300.
- WANG H-Y, QIAN H, YAO W-R (2011). Melanoidins produced by the Maillard reaction: Structure and biological activity. *Food Chem*, 128(3), 573-584.
- WANG X, BANK RA, TEKOPPELE JM, AGRAWAL CM (2001). The role of collagen in determining bone mechanical properties. *J Orthop Res*, 19(6), 1021-1026.
- WANG X, SHEN X, LI X, MAULI AGRAWAL C (2002). Age-related changes in the collagen network and toughness of bone. *Bone*, 31(1), 1-7.
- WEAVER CM (2000). The growing years and prevention of osteoporosis in later life. *Proc Nutr Soc*, 59(2), 303-306.
- WHITELAW ML, WEAVER CM (1988). Maillard browning effects on *in vitro* availability of zinc. *J Food Sci*, 53(5), 1508-1510.
- WIJEWICKREME AN, KITTS DD (1997). Influence of reaction conditions on the oxidative behavior of model Maillard reaction products. *J Agric Food Chem*, 45(12), 4571-4576.
- WILLEMSEN S, HARTOG JW, HEINER-FOKKEMA MR, VAN VELDHUISEN DJ, VOORS AA (2012). Advanced glycation end-products, a pathophysiological pathway in the cardiorenal syndrome. *Heart Fail Rev*, 17(2), 221-228.
- XU B, CHIBBER R, RUGGIERO D, KOHNER E, RITTER J, FERRO A (2003). Impairment of vascular endothelial nitric oxide synthase activity by advanced glycation end products. *FASEB J*, 17(10), 1289-1291.
- YAMAMOTO A, SIMONSEN A (2011). The elimination of accumulated and aggregated proteins: a role for autophagy in neurodegeneration. *Neurobiol Dis*, 43(1), 17-28.

- YAMAMOTO T, OZONO K, MIYAUCHI A, KASAYAMA S, KOJIMA Y, SHIMA M, OKADA S (2001). Role of advanced glycation end products in adynamic bone disease in patients with diabetic nephropathy. *Am J Kidney Dis*, 38(4, Supplement), S161-S164.
- YASIR SBM, SUTTON KH, NEWBERRY MP, ANDREWS NR, GERRARD JA (2007). The impact of Maillard cross-linking on soy proteins and tofu texture. *Food Chem*, 104(4), 1502-1508.
- YUAN YV, KITTS DD (1994). Calcium absorption and bone utilization in spontaneously hypertensive rats fed on native and heat-damaged casein and soya-bean protein. *Br J Nutr* 71, 583-603.
- ZHENG F, HE C, CAI W, HATTORI M, STEFFES M, VLASSARA H (2002). Prevention of diabetic nephropathy in mice by a diet low in glycoxidation products. *Diabetes Metab Res Rev*, 18(3), 224-237.