

**RESPUESTA INMUNE DE ANTICUERPOS IgE contra AGE-BSA EN
PACIENTES CON RINITIS ALERGICA**

**Seminario III: Trabajo de grado para optar al título de
Magister en inmunología (MSc)**

Andrés Ernesto Merlano Barón MD.
Maestría en inmunología

Javier Marrugo Cano, MD, MSc
Tutor

Línea de alergia a alimentos



INSTITUTO DE
INVESTIGACIONES
INMUNOLÓGICAS



**Instituto de Investigaciones Inmunológicas
Universidad de Cartagena
Programa de maestría en inmunología**

TABLA DE CONTENIDO

- 1. INTRODUCCIÓN**
- 2. MARCO TEORICO**
- 3. HIPOTESIS**
- 4. OBJETIVOS**
- 5. METODOLOGIA DEL ESTUDIO**
- 6. METODOLOGIA EXPERIMENTAL**
- 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**
- 8. CONCLUSIONES, LIMITACIONES DEL ESTUDIO Y PERSPECTIVAS A FUTURO**
- 9. BIBLIOGRAFIA**
- 10. ANEXOS**
- 11. AGRADECIMIENTOS**

LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS

FIGURA 1. Principales productos avanzados de glicación derivados de las reacciones de Maillard clasificados según su peso molecular. A los AGEs aquí esquematizados, se les clasifica de acuerdo a su peso molecular en AGEs de bajo peso (Low Molecular Weight, LMW-AGE) y de alto peso, (High Molecular Weight, HMW-AGE). Modificado de Poulsen et al. Advanced glycation endproducts in food and their effects on health. *Food Chem Toxicol* 2013;60:10–37.

FIGURA 2. Reacción de Maillard de acuerdo al esquema de Hodge et al. Las letras representan los diversos pasos de la reacción esquematizados en el texto. Modificado de Hodge JE. Chemistry of browning reactions in model systems. *J Agric Food Chem.* 1953;1(15):928-943.

Figura 3. Diferencias en la coloración entre una alícuota de AGE-BSA Vs BSA no glicado. El anterior experimento se realizó de acuerdo al protocolo de glicación de Ikeda y cols. 1: BSA no glicado; 2: AGE-BSA.

Figura 4. Perfil de fluorescencia de la BSA a 460nm incubada en diferentes temperaturas durante 30 días al excitarla a 355nm en un espectrofluorometro.

Figura 5. Electroforesis usando el método de SDS-PAGE con gel de apilamiento al 10% de la BSA glicada con el método anteriormente descrito luego de 30 días de incubación a 50C°. M es el marcador de peso molecular, 1 es la BSA sin glicar, 2 es la BSA glicada a 50C° por 30 días.

Figura 6. Perfil de niveles de inmunoglobulina E entre los grupos, de acuerdo al método InmunoCap®.

Figura 7. Resultados del ELISA IgE indirecto contra AGEs en ambos grupos

Tabla 1. Características generales de la población estudiada

INFLUENCIA DE LOS PRODUCTOS AVANZADOS DE GLICACIÓN (AGEs) EN LA RESPUESTA INMUNE DE ANTICUERPOS EN PACIENTES CON URTICARIA CRONICA

RESUMEN

Las enfermedades alérgicas son en la actualidad un grupo de enfermedades inflamatorias altamente prevalentes. Afectan a casi un cuarto de la población mundial y generan altos costos a los servicios de salud. En nuestro país diversos estudios muestran una tendencia similar. Una de las hipótesis que trata de explicar este fenómeno es la de la dieta. El cambio de patrones dietarios, ancestrales y rurales, caracterizados por mayor consumo de frutas y vegetales, así como un estilo de vida rodeado de mayor biodiversidad y microbios a uno más occidental, sedentario y con consumo de azúcares y pocas frutas y vegetales, ha sido responsabilizado en generar un estado proinflamatorio inductor de una respuesta alérgica. Una de las moléculas mejor estudiadas y presentes en gran cantidad en alimentos propios de la dieta occidental como papas fritas, hamburguesas, etc. son los AGEs (Productos finales de glicación avanzada), estos se generan por la cocción de los alimentos a altas temperaturas y poca humedad, actúan sobre receptores (RAGEs) presentes en las células del sistema inmune e inducen señales de activación. De otra parte, también actúan como antígenos al inducir una respuesta de anticuerpos. En el presente proyecto pretendemos establecer si la respuesta inmune de IgE podría tener algún papel en enfermedades tales como la rinitis alérgica. Para este estudio, utilizaremos muestras de pacientes ya clasificados en la seroteca del instituto; la reactividad hacia los AGEs se determinará por ELISA y el antígeno se obtendrá mediante la glicación de la albumina bovina sérica (BSA). Los datos se analizarán por diversos métodos estadísticos. Con los resultados obtenidos esperamos contribuir al conocimiento de las posibles causas de las enfermedades alérgicas, así como buscar mecanismos de ayudar a mejorar la calidad de vida de los pacientes que la padecen.

1. INTRODUCCION

Las enfermedades alérgicas son un grupo de trastornos de causa inmune que cursan hacia la cronicidad, causados por una reacción exagerada del sistema inmune hacia antígenos no patógenos. En las últimas décadas se ha reportado un aumento importante de la incidencia y prevalencia de las alergias, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo, alcanzando prevalencias cercanas al 40% de acuerdo a cifras de la World Allergy Organization (WAO), afectando no solo la calidad de vida de quienes las padecen sino que además generan importantes cifras de morbilidad y enormes costos económicos derivados de la atención en salud, que deterioran el bienestar económico de las sociedades, traduciéndose en un problema de salud pública mundial¹.

Diversos investigadores han planteado varias hipótesis que tratan de explicar el incremento a nivel mundial de las alergias y las diferencias geográficas en sus tasas de prevalencias (e.g. hipótesis de la higiene, hipótesis de la biodiversidad, etc.), entre las cuales se destaca la hipótesis de la dieta²⁻⁴, la cual plantea que ciertos patrones dietarios, como las dietas mediterránea, occidental, entre otras y algunos componentes nutricionales como los carotenoides, polifenoles y vitaminas, serían los responsables de los efectos protectores, de riesgo o de la severidad de las enfermedades alérgicas. Recientemente en un estudio realizado por un grupo colombiano y financiado por la fundación para la Promoción de la ciencia y tecnología del Banco de la República (FPIT), se pudo observar el efecto protector de la dieta rural de la población de San Basilio de Palenque, Bolívar, en el desarrollo de las alergias y que este efecto se debía al alto consumo de frutas y vegetales así como de productos lácteos no pasteurizados, reforzando lo anterior la hipótesis de la dieta y del papel de los polifenoles y carotenoides como los responsables de estos efectos protectores².

Enmarcada en la hipótesis de la dieta, encontramos la hipótesis de la falsa alarma, la cual formula que diversos componentes nutricionales, propios de la dieta occidental, promoverían por medio de interacciones con receptores de

reconocimiento de patrones de peligro (DAMPs), un perfil pro-inflamatorio que favorecería la sensibilización y el desarrollo de alergias u otras enfermedades de trasfondo inflamatorio⁵. Lo anterior se debería al elevado consumo de un grupo de compuestos derivados de reacciones de glicación, denominados productos avanzados de glicación -AGEs- (Advanced Glycation Endproducts), que favorecen la activación de receptores de la inmunidad innata, induciendo una respuesta inflamatoria a nivel sistémico. Debido al alto consumo de estos compuestos, presentes en la mayor parte de los elementos de la dieta occidental, se establece una tendencia a la cronicidad de las respuestas inducidas por estos compuestos, favoreciendo la aparición de enfermedades con gran trasfondo inflamatorio, tales como la diabetes, enfermedad renal crónica y enfermedad coronaria, entre otras⁶.

2. ESTADO DEL ARTE

2.1 Definición de AGEs

Los AGEs o productos avanzados de glicación-Advanced Glycation End products- son derivados químicos de las reacciones de glicación que ocurren entre grupos carbonilo y grupos amino de los carbohidratos y aminoácidos, respectivamente. Estas reacciones, comúnmente agrupadas en la denominada reacción de Maillard, ocurren a altas temperaturas, y tienen especial importancia en la industria alimenticia, debido a la relevancia que tiene el procesamiento térmico en la calidad de los alimentos, influenciando aspectos tales como el sabor, el color, la vida media del alimento, entre otros. Una gran variedad de compuestos con diversa composición y peso molecular pueden incluirse en el grupo de AGEs derivados de los alimentos, debido a la gran cantidad de precursores para la reacción de Maillard que pueden existir en los alimentos, entre los que encontramos azúcares reductores, aminoácidos y péptidos con grupos amino libres, así como grupos amino no unidos a proteína. Dependiendo de si los AGEs provienen de reacciones con aminoácidos libres o unidos a proteína se les denomina como de bajo peso molecular (LMW-AGEs) o de alto peso molecular (HMW-AGEs) respectivamente.

2.2 Mecanismo de formación (Reacción de Maillard)

La reacción de Maillard, es un conjunto de reacciones no enzimáticas entre grupos carbonilo, como aquellos presentes en los carbohidratos y grupos amino, presentes en los aminoácidos. Este grupo de reacciones fue descrita en 1912 por el francés Louis Maillard⁷, mientras investigaba las reacciones de decoloración de los alimentos durante la cocción. En los siguientes años, los estudios llevados a cabo para descifrar las consecuencias de esta reacción, se realizaron por motivación de la industria alimenticia, pero hoy se sabe que esta reacción interviene no solo en los alimentos, sino también en los textiles, en el papel e incluso *in vivo*, siendo la causante de la glicación de la cadena beta de la hemoglobina, dando origen a lo que se conoce en clínica como hemoglobina glicosilada o HbA1c adquiriendo los derivados de esta reacción importancia en la investigación clínica, por los efectos que podía tener en enfermedades como la diabetes ⁸.

Aunque se han generado diversos modelos teóricos de esta reacción, el más aceptado es el del químico estadounidense John Hodge, quien en 1953 caracterizó la reacción en 7 pasos, denominados A-G⁹, agregándose un octavo paso al esquema Hodge original en 1986, el paso H¹⁰, también denominada reacción de Namiki, por los descubridores(Figura 2). Estos ocho pasos son a su vez clasificados por Hodge en tres estadios, denominados inicial (Paso A, B y H), intermedio (Pasos C, D y E) y final (Pasos F y G). A aquellos compuestos participantes de los estadios inicial e intermedio se les denomina premelanoidinas por ser las precursoras del producto del estadio final. Posteriormente en el estadio final, se dan una serie de reacciones de condensación, dando origen a las denominadas melanoidinas tanto de bajo (Low Molecular Weight, LMWM) y alto peso molecular (High Molecular Weight, HMWM) entre las que destacan los AGEs, además de otros compuestos con propiedades aromáticas y colorantes. Es importante anotar que la reacción de Maillard ocurre preferencialmente entre carbohidratos y grupos amino épsilon de los aminoácidos lisina y arginina, aunque otros aminoácidos tales como la ornitina pueden reaccionar con los carbohidratos para originar AGEs. Es importante subrayar que los AGEs no son carbohidratos, sino aminoácidos modificados por el

ataque del grupo carbonilo al grupo amino, estableciéndose una diferencia con los antígenos de carbohidratos, tales como los grupos sanguíneos ¹¹. Un resumen de los pasos de la reacción de Maillard se puede observar en la **figura 2**, así como un resumen de los AGEs más comunes en la **figura 1**.

La reacción de Maillard induce diversos cambios en la estructura proteica. En la literatura aparecen numerosos ejemplos de esta, entre los que encontramos la modificación de las propiedades de unión a drogas de la albumina, el aumento de la inmunogenicidad de ciertas drogas, la glicación de lisinas y argininas en las histonas e incluso la glicación de los anticuerpos monoclonales usados en la terapéutica¹²⁻¹⁶. Lo anterior ocurre por la modificación de ciertas propiedades fisicoquímicas de las proteínas, lo cual será discutido en el siguiente apartado.

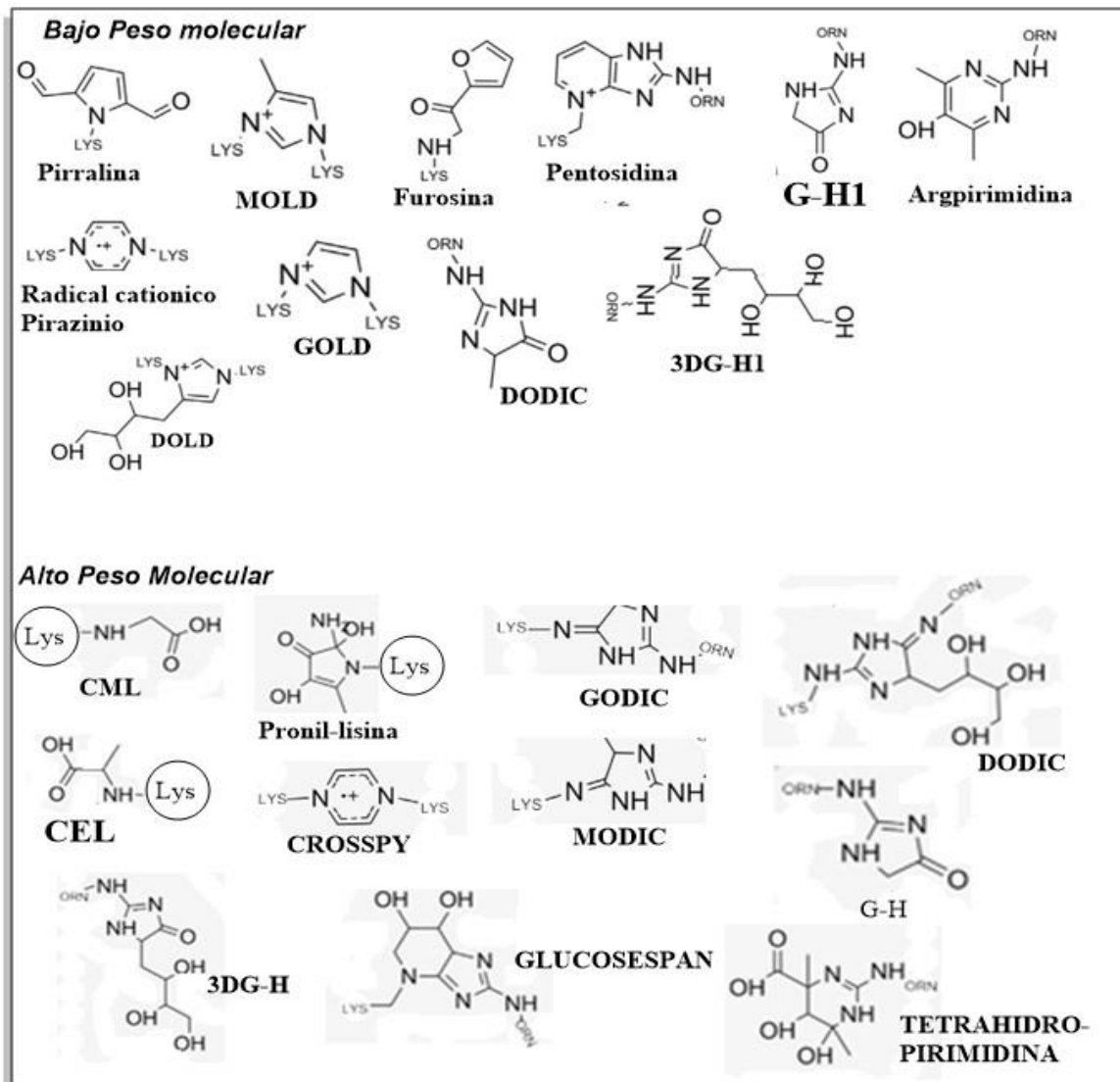


FIGURA 1. Principales productos avanzados de glicación derivados de las reacciones de Maillard clasificados según su peso molecular. A los AGEs aquí esquematizados, se les clasifica de acuerdo a su peso molecular en AGEs de bajo peso (Low Molecular Weight, LMW-AGE) y de alto peso, (High Molecular Weight, HMW-AGE). Modificado de Poulsen et al. Advanced glycation endproducts in food and their effects on health. Food Chem Toxicol 2013;60:10–37.

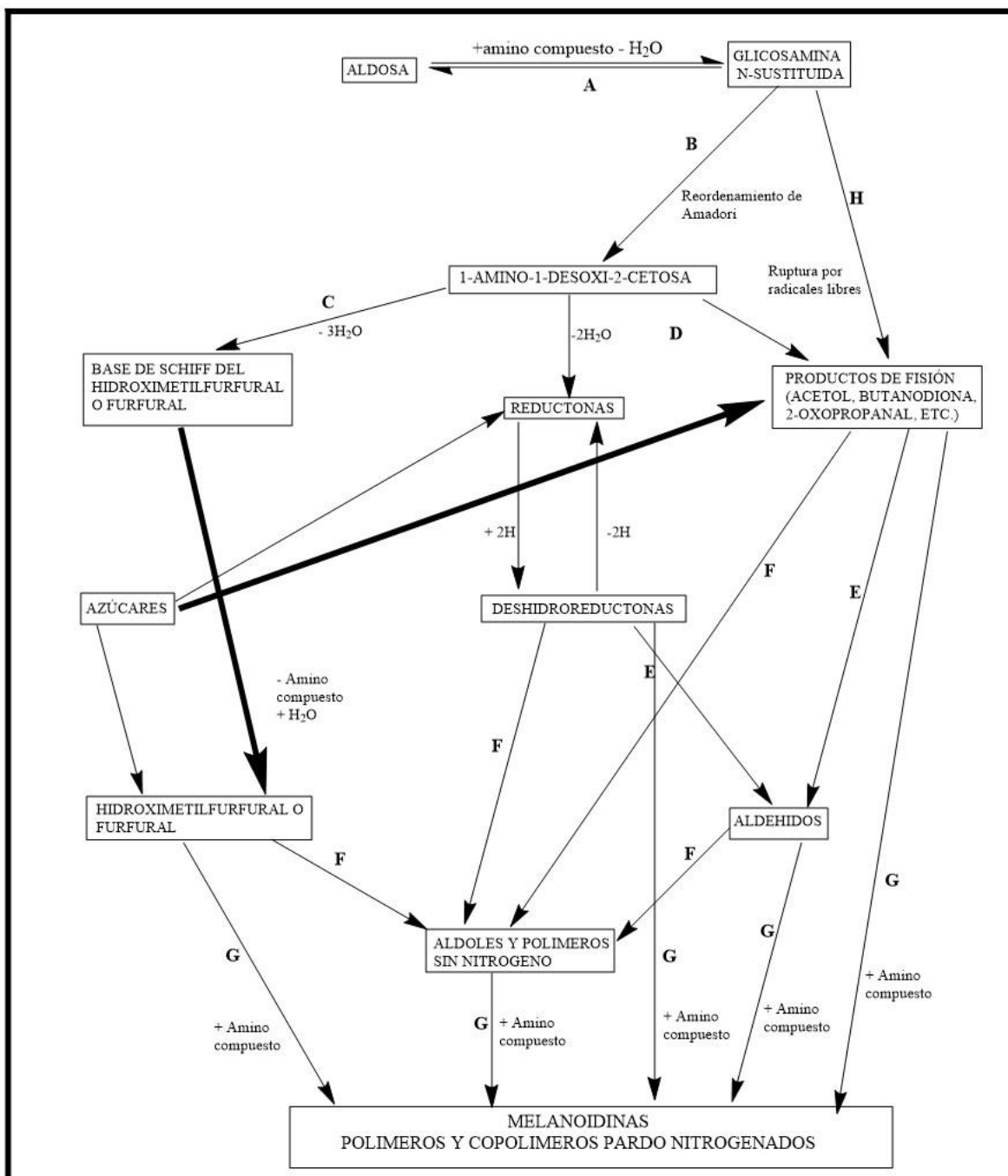


FIGURA 2. Reacción de Maillard de acuerdo al esquema de Hodge et al. Las letras representan los diversos pasos de la reacción esquematizados en el texto. Modificado de Hodge JE. Chemistry of browning reactions in model systems. *J Agric Food Chem.* 1953;1(15):928-943.

2.3 Propiedades fisicoquímicas de las proteínas glicadas

Los AGEs inducen una serie de modificaciones a las propiedades fisicoquímicas de las proteínas. Esta hipótesis es abordada en el artículo de Prasanna et al.¹⁷, los cuales realizan análisis fisicoquímicos de las proteínas glicadas usando un modelo de glicación en albumina sérica bovina (BSA). En primer lugar realizan un modelamiento de los cambios inducidos por la reacción de Maillard sobre la BSA usando un modelo tridimensional de la proteína derivado de cristalografía de rayos X disponible en protein database (pdb) en los cuales encuentran que al modelar la glicación de los residuos de arginina y lisina de la proteína, se reduce el volumen, profundidad y superficie de los bolsillos de unión a medicamentos, al igual que también se reduce el ambiente hidrofóbico, los donantes y los aceptores de hidrogeno. Posteriormente, evalúan las propiedades de absorción de la luz visible y UV de la BSA glicada con glucosa (AGE-BSA) y la BSA glicada con metilglioxal (MGO-BSA) usando un espectrofotómetro. Encuentran que la absorbancia de la proteína a 280nm se mantiene, evidenciando la no modificación de los residuos de triptófano, sin embargo, la absorbancia entre 300-400 nm incrementa de forma significativa en comparación con el patrón de absorbancia de la BSA nativa, la cual presenta un perfil similar al de las otras proteínas con un pico de absorbancia a 280nm. Lo anterior indica la formación de nuevos cromóforos que son específicos de intermediarios de Maillard. Por otro lado, los autores realizan una microscopia de transmisión de electrones a las muestras de AGE-BSA y MGO-BSA, en la cual evidencian la formación de agregados globulares en las proteínas glicadas, a diferencia de la BSA nativa, evidenciando la alteración inducida por los AGEs en la estructura proteica. En adición, los autores analizan el perfil de fluorescencia de las proteínas glicadas, en las cuales encuentran un pico de emisión de 440 nm, y al realizarle dicróismo circular a las proteínas glicadas, describen un incremento en los β -pliegues de la proteína y una disminución en las α -hélices, producto de la glicación de la proteína. Este trabajo es complementado por el estudio de Szkudlarek y cols.¹⁸, en albumina humana, en el cual, por medio de tecnicas espectroscopicas y resonancia, encuentran cambios en la fluorescencia y

absorbancia de la proteína glicada en relación a lo observado en la proteína nativa, producto de los cambios producidos por los AGEs en los parámetros fisicoquímicos de la proteína. En conclusión, estos trabajos muestran los cambios que induce la reacción de Maillard y los AGEs sobre la estructura y propiedades fisicoquímicas de las proteínas, un aspecto que ha sido estudiado también en otras proteínas como las histonas, en las cuales se ha encontrado que las modificaciones inducidas por los AGEs afectan lisinas y argininas importantes para las marcas de histonas, así como muchas otras, las cuales se encuentran en estudio. ^{12,14,18,19}.

2.4 Incremento del consumo de comidas rápidas y su relación con el aumento de las enfermedades inflamatorias

En los últimos años, paralelamente al incremento de las alergias, han aumentado también enfermedades con alto trasfondo inflamatorio tales como las autoinmunes, diabetes, enfermedad coronaria entre otras de carácter crónico. Entre las explicaciones para este incremento, encontramos la hipótesis de la dieta occidental; la cual relaciona a los alimentos de este patrón dietario, los cuales generalmente son altamente procesados, ricos en azúcares, grasas saturadas y sal; con el incremento de las patologías ya mencionadas anteriormente²⁰. Esta conjetura se sustenta en el hecho de que los componentes del patrón dietario occidental, contienen niveles elevados de AGEs, los cuales son resultado del procesamiento a altas temperaturas; y activan diversos receptores para patrones moleculares asociados a peligro -DAMPs-, accionando el sistema inmune y produciendo inflamación. A lo anterior se le conoce también como hipótesis de las falsas alarmas, formulada en 2016 en el *Journal of Allergy and Clinical Immunology* por *Smith y cols.*⁵.

2.5 Dieta occidental y AGEs

En las 3 últimas décadas, con la globalización y progresiva industrialización de muchos países en desarrollo, se hizo evidente un cambio en las tendencias demográficas, epidemiológicas y nutricionales respecto a los patrones observados en años anteriores, consistentes en cambios en la expectativa de vida (menor mortalidad en jóvenes); prevalencia de enfermedades infecciosas y crónicas (disminución de la incidencia de las infecciones y aumento de la prevalencia de las crónicas); y consumo de nutrientes (cambio de un patrón de dieta ancestral a uno occidental)²¹. En particular, la transformación nutricional ha sido muy estudiada, por estar ligada su rápida adopción en múltiples estudios al aumento de enfermedades crónicas de etiología inflamatoria, tales como la diabetes, hipertensión, obesidad, enfermedad coronaria entre otras, ligadas al consumo de AGEs además de otros compuestos que no son objetivo de esta revisión. Es por lo anterior que se vuelve imperioso el tener tipificados el contenido de los AGEs de los principales alimentos presentes en la dieta occidental, con el objetivo de establecer dietas funcionales, que reduzcan sus efectos. Es por el anterior motivo que Uribarri y cols.²² en 2010, intenta determinar el contenido promedio por cada 100 g y por porción de AGEs en 500 alimentos de la dieta de neoyorquinos, agrupados en grupos de acuerdo a su contenido nutricional. Entre sus resultados encontramos que los alimentos con mayor contenido de AGEs por gramos son las grasas, seguidas de las carnes, aunque el último grupo tendría mayor impacto en la ingesta de AGEs, por el mayor tamaño de la porción servida en promedio en comparación con la de los alimentos grasos. Categorizando entre los alimentos del grupo de las carnes cuales tienen más AGEs, destaca la carne de vaca y quesos, seguidos de las de aves de corral (e.g pollo, pavo etc.), cerdo, pescado y huevos. Es de notar que los alimentos derivados de animales, como los quesos poseían niveles elevados de AGEs aún al estar crudos, probablemente por los procesos de pasteurización que requieren elevadas temperaturas para su realización. En adición el grupo alimenticio que menores niveles de AGEs por 100g de alimento tiene es el de los alimentos derivados de vegetales, tales como las frutas, verduras, legumbres, panes entre otros, a menos que se les agregara grasas durante la cocción

observándose una tendencia similar respecto a la leche, la cual cuando era descremada (sin grasa) poseía menos AGEs que la leche entera.

Los autores del anterior trabajo también evalúan la correlación entre la forma de preparación de los alimentos y el contenido final de AGEs. Encuentran que aquellos alimentos cocinados a altas temperaturas y/o bajos niveles de humedad tenían un mayor contenido de AGEs en comparación a aquellos cocinados a bajas temperaturas y/o alta humedad estableciendo que el freír, asar en sartén o a la parrilla y tostar produce más AGEs en comparación con el hervir, guisar, escalfar y cocer al vapor. Paralelamente, si antes de cocinar uno la carne, con anterioridad la adoba con vinagre o con zumo de limón, al momento de la cocción se producen menos AGEs comparado a las carnes preparadas sin el anterior procedimiento. En conclusión, este trabajo nos arroja varias conclusiones. Una de ellas es que la cocción a altas temperaturas con escasa humedad, típica de la preparación de comidas rápidas, elemento fundamental de la dieta occidental, produce más AGEs que aquella a bajas temperaturas y mayor humedad, acompañada de adobes, típica de recetas de dietas tradicionales tales como la mediterránea y asiática, explicando en parte la relación entre el consumo de alimentos pertenecientes a aquellas dietas y una baja prevalencia de enfermedad alérgica.

2.6 Respuesta de anticuerpos contra AGEs

Los AGEs evocan una respuesta de anticuerpos, tal como muestra el estudio de Ikeda y cols.²³ en 1996, en el cual glican diversos compuestos, tales como la albumina bovina y humana; así como la hemoglobina, y analizan la respuesta de anticuerpos a estas proteínas modificadas. Encuentran que los AGEs inducen una respuesta policlonal de anticuerpos al inmunizar conejos con las proteínas glicadas, y que al inmunizar ratones BALB/c con AGE-BSA, se logra generar un monoclonal denominado 6D12 que reconoce a las proteínas glicadas. Por medio de ensayos de ELISA directo y de inhibición, describen que tanto el suero monoclonal como el policlonal reconocen a las proteínas glicadas, basándose en ensayos de inhibición,

y cuando examinan la especificidad de los sueros hacia cada AGE en particular, encuentran que el 6D12 reconoce en especial proteínas con alto porcentaje de Carboxi-metil-lisina (CML), mientras que el suero policlonal reconoce además de la CML, compuestos con otros AGEs en su estructura. Algo que cabe mencionar es que los autores describen que ambos anticuerpos reconocen AGEs sobre la superficie de proteínas, péptidos, derivados de lisina y ácidos monoamino carboxílicos, lo cual habla de que los anticuerpos son específicos de AGEs. El anterior estudio se complementa con el estudio de Reddy y cols.²⁴ en el cual describen a la CML como uno de los AGEs más importantes formados durante la reacción de Maillard, y que los anticuerpos policlonales contra AGEs reconocen en su mayoría proteínas con alto porcentaje de este compuesto. Posteriormente en 1998, Ikeda y cols. caracterizan la respuesta policlonal de anticuerpos hacia AGEs usando 13 sueros policlonales contra proteínas glicadas, en las cuales tratan de determinar los epítopes más relevantes. Los autores caracterizan en este estudio los anticuerpos anti-AGEs en 3 clases: Clase I, los cuales reconocen CML; Clase II, los cuales reconocen en general intermediarios de Maillard; y la clase III que reconoce AGEs no derivados o relacionados con la CML, aunque es de notar que existe algo de reactividad cruzada entre las 3 clases de anticuerpos anti-AGEs descritos en este estudio.

Por otra parte, en estudios posteriores, se logró demostrar la existencia de una respuesta de anticuerpos contra AGEs en el contexto de diversas patologías en humanos. Tal como es el caso de la diabetes, enfermedad en el cual se encuentran AGEs circulantes en el suero de los pacientes²⁵, en el cual se logró demostrar la existencia de anticuerpos IgG contra la CML en el año 2000 en el estudio de casos y controles del grupo de Vay y cols.²⁶, en el cual por medio de ELISA directo, describen la respuesta IgG contra AGEs mayor en los casos versus los controles aunque sin significancia clínica de acuerdo a lo comentado por los autores. En adición, Turk y cols.²⁷, en un estudio de casos y controles, replican los hallazgos del estudio anteriormente mencionado, aunque encuentran un menor nivel de anticuerpos IgG Anti-AGEs en los casos, pero al analizar los sueros de los

participantes por medio de una técnica de ELISA “Sándwich” modificada, encuentran que en pacientes con diabetes, la mayoría de los anticuerpos contra AGEs están presentes en forma de inmunocomplejos, los cuales son más altos en los casos vs controles de forma significativa. Lo anterior podría tener explicación en el hecho de que los anticuerpos como tales, se pueden glicar, y como vimos en el apartado de la fisicoquímica de los AGEs, estos compuestos pueden inducir la agregación de las proteínas, lo cual probablemente esté relacionado con el hallazgo del estudio. Mas aun, esta respuesta de anticuerpos contra AGEs en diabéticos, está dirigida contra proteínas propias, tal como muestra el trabajo de Virella y cols.²⁸, en el cual encuentran que en pacientes con diabetes tipo 1, existe una respuesta de anticuerpos IgG contra LDL glicada, la cual es de alta avidéz y constituida por las subclases 1 y 3 de la IgG, los cuales probablemente estimulan la aterogénesis vascular en los pacientes con diabetes.

De las conclusiones del anterior estudio se extrae la hipótesis de la auto reactividad de los anticuerpos Anti-AGEs contra proteínas glicadas endógenas, la cual en estudios contemporáneos en otras enfermedades tales como las autoinmunes se ha descrito. Ese es el caso del estudio de Ligier y cols.²⁹, los cuales usando sueros de pacientes con artritis reumatoidea severa con vasculitis asociada y factor reumatoide positivo, encuentran por medio de un ELISA indirecto la existencia de una respuesta de anticuerpos IgM contra IgG glicada (AGE-IgG). Esta AGE-IgG presenta modificaciones en las cadenas ligeras y pesada. Los anteriores hallazgos los replican en un grupo de pacientes con lupus, esclerosis sistémica y diabetes, en los cuales encuentran en al menos un 10% o más de los pacientes, anticuerpos IgM contra AGE-IgG. En el anterior estudio no se encontró correlación entre el factor reumatoideo y la AGE-IgG. Estos hallazgos encuentran sustento en artículos como el de Goetze y cols.³⁰, en el cual, usando técnicas de cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas, describen que in vivo, al menos un 13% de los anticuerpos IgG presentan modificaciones mediadas por glicación, modificaciones que son observadas incluso en los anticuerpos monoclonales utilizados en la terapéutica, en los cuales han salido revisiones sobre los potenciales efectos deletéreos de estas modificaciones de los anticuerpos¹⁵.

Por otro lado, en el estudio de Newkirk y cols.³¹, los cuales estudian por medio de un diseño de cohorte, los efectos de los anticuerpos contra AGE-IgG, en pacientes con sinovitis temprana en cualquier articulación asociada a artritis reumatoidea, espondiloartropatía y artritis asimétrica u indiferenciada, en los cuales encuentran de forma significativa mayores niveles de AGE-IgG en los pacientes con artritis reumatoidea en comparación con los otros grupos, además de detectarse la presencia de anticuerpos IgM Anti- AGE-IgG, los cuales en las diversas patologías estudiadas se asociaban de forma muy significativa con la presencia de factor reumatoideo ($P < 0.0001$). En adición, la presencia de AGE-IgG se asociaba de forma significativa con los marcadores de fase aguda examinados en el estudio, tales como la proteína C reactiva y la eritrosedimentación globular. Un hallazgo interesante del estudio es que la presencia de AGE-IgG no se correlacionaba con la hiperglicemia, sugiriendo que la AGE-IgG se asocia más con inflamación que con la hiperglicemia.

Por otra parte, en el contexto de la respuesta inmune de anticuerpos contra alérgenos, aunque no se ha encontrado evidencia de la existencia de anticuerpos IgE específicos contra AGEs, si existen ciertos estudios que sugieren la existencia de estos. Este es el caso del artículo de *Mueller y cols.*³² en 2013, en el cual describen la unión del Ara h 1 y el Ara h 3 glicosados al receptor RAGE en un modelo de RAGE unido a resina, así como el reconocimiento por parte de anticuerpos IgE de pacientes sensibilizados al maní, de estos alérgenos glicosados, lo cual indicaría la existencia de anticuerpos IgE e IgG anti-AGEs, hipótesis que debe ser investigada a profundidad.

En adición, en el estudio de *Moghaddam y cols.*³³ en el cual usaron un modelo murino de sensibilización a maní por vía cutánea o gástrica, encuentran que a los ratones a los cuales se les suministró maní tostado de forma seca, presentan mayores niveles de IgG contra maní tanto tostado como crudo, así como mayores respuestas de tipo celular y humoral contra maní a nivel gastrointestinal y sérico, efectos que fueron dependientes de la unión de los alérgenos glicosados a los

receptores de AGEs presentes en células dendríticas, indicando la predisposición de los antígenos con AGEs a inducir un mayor grado de sensibilización.

En 2009, Aristo Vojdani ³⁴ realizó un estudio de casos y controles de alergia a alimentos, en el cual midió los títulos de anticuerpos contra múltiples alimentos tanto en su forma cruda como en la procesada, en los cuales encuentra, en pacientes alérgicos a alimentos como en algunos controles mayores títulos de anticuerpos IgE, IgA y IgG, contra alimentos en su forma procesada en comparación con los títulos de anticuerpos contra alimentos en su forma cruda. Cuando se analiza en el grupo de pacientes sensibilizados a un mayor número de alimentos los títulos de anticuerpos contra AGEs, se encuentra títulos elevados de estos anticuerpos en comparación a los controles, sugiriendo una correlación entre estos anticuerpos anti-AGEs y aquellos que reconocen alimentos procesados, aunque es de notar que no se realizaron en este estudio ensayos de inhibición para descartar la posible reactividad cruzada de estos anticuerpos. La anterior hipótesis encuentra sustento en el hecho de que al glicar diversos componentes proteicos de los alimentos estos aumentan su inmunogenicidad, tal como muestran los estudios del grupo de Ilchmann ³⁵ y Mueller³².

Es por lo expuesto anteriormente que realizamos la hipótesis que será estudiada en este trabajo.

3. HIPOTESIS

En pacientes con rinitis alérgica, se genera una respuesta inmune de anticuerpos IgE contra productos avanzados de glicación que podría tener influencia en la fisiopatología de la enfermedad.

4. OBJETIVOS

4.1. General

- Establecer la seroprevalencia de anticuerpos IgE contra productos finales de glicación avanzada (AGEs) en una muestra de pacientes con rinitis alérgica y controles no alérgicos.

4.2. Especifico

- Obtener una proteína glicada (BSA) con el fin de ser utilizada con antígeno en los ELISA indirectos.
- Caracterizar y establecer la glicación de la albumina sérica bovina BSA.
- Determinar mediante ELISA indirecto los niveles de IgE Anti-AGEs en pacientes con rinitis alérgica y controles no alérgicos.
- Establecer las diferencias en los niveles de IgE anti-AGEs entre los pacientes con rinitis alérgica y controles no alérgicos.
- Establecer si existe una correlación entre los niveles de IgE a AGEs y la severidad de la rinitis alérgica.

5. METODOLOGIA

5.1 Diseño de estudio

Estudio observacional con diseño tipo casos y controles.

5.2 Población de estudio

Los individuos de la población de estudio, serán 102 participantes provenientes de la ciudad de Cartagena, Bolívar, con diagnóstico ya establecido por parte de médico alergólogo de rinitis alérgica y controles no alérgicos.

5.3 Determinación de los casos de rinitis alérgica

Cincuenta y seis (56) casos se seleccionaron en este estudio. Los casos fueron seleccionados de la lista de contribuyentes a la seroteca del instituto de investigaciones inmunológicas, y que en la actualidad posean existencias de

muestra biológica. Se revisó la historia clínica de estos pacientes, tratando de seleccionar aquellos con mayor número de estudios inmunológicos y clínicos disponibles, y sin diagnóstico actual de diabetes mellitus, u otra enfermedad diferente a la rinitis alérgica. Las muestras provienen de la seroteca de participantes del proyecto titulado **“EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS OPERATIVAS DE LAS PRUEBAS CUTÁNEAS, DE LA DETERMINACIÓN DE EOSINOFILOS EN EL MOCO NASAL Y DE LA IgE ESPECÍFICA EN EL DIAGNÓSTICO DE LA RINITIS ALÉRGICA POR EL ÁCARO *Blomia tropicalis*”**, los cuales tienen diagnóstico de rinitis alérgica por médico alergólogo, así como prueba cutánea positiva a mínimo un alérgeno y/o InmunoCap® o reto nasal positivo a los ácaros *Blomia tropicalis* y *Dermatophagoides pteronyssinus*.

5.4 Selección de los controles

Cuarenta y cinco (45) controles se seleccionaron a partir de los sujetos sanos registrados en la lista de contribuyentes a la seroteca del instituto de investigaciones inmunológicas, sin diagnóstico o antecedente alguno de enfermedad alérgica, cutánea, autoinmune, o diabetes mellitus. Las muestras provienen de la seroteca de participantes del proyecto titulado **“EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS OPERATIVAS DE LAS PRUEBAS CUTÁNEAS, DE LA DETERMINACIÓN DE EOSINOFILOS EN EL MOCO NASAL Y DE LA IgE ESPECÍFICA EN EL DIAGNÓSTICO DE LA RINITIS ALÉRGICA POR EL ÁCARO *Blomia tropicalis*”**, sin diagnóstico de enfermedad alguna o evidencia de respuesta alérgica a alérgenos comunes.

5.5 Criterios de inclusión

- Individuos entre 18 y 59 años
- Diagnóstico por médico alergólogo de rinitis alérgica en los casos, o pacientes sanos en el caso de los controles
- Prueba cutánea positiva para los casos y negativa para los controles
- Reto nasal positivo a *Blomia* positivo y/o InmunoCap® positivo a *Blomia* o *Dermatophagoides*. Para los controles se incluyeron los pacientes con reto nasal negativo y/o InmunoCap® positivo a *Blomia* o *Dermatophagoides*.

5.6 Criterios de exclusión

- Individuos menores de edad o mayores de 59 años
- Diagnóstico de enfermedad cutánea
- Diagnóstico de diabetes tipo II de larga data > 5 años
- Diagnóstico de enfermedad autoinmune con tratamiento activo
- Diagnóstico de neoplasia, en tratamiento
- Tratamiento activo con inmunomoduladores

5.7 Aspectos éticos

Las muestras que se utilizaron en este estudio provienen del proyecto titulado **“EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS OPERATIVAS DE LAS PRUEBAS CUTÁNEAS, DE LA DETERMINACIÓN DE EOSINOFILOS EN EL MOCO NASAL Y DE LA IgE ESPECÍFICA EN EL DIAGNOSTICO DE LA RINITIS ALERGICA POR EL ÁCARO *Blomia tropicalis*”**, el cual contó con el aval ético del comité de ética de la Universidad Nacional, así como del comité de ética del Hospital Universitario del Caribe (Anexo 1). Todos los participantes del estudio anteriormente mencionado, cuentan con consentimiento informado, en el cual aprueban el uso de sus fluidos biológicos con objetivos de estudio. Este estudio se clasifica como investigación sin riesgo, de acuerdo a las categorías establecidas en el artículo 11 de la resolución 8430 de 1993, razón por la cual no se necesita obtener un nuevo consentimiento informado. En adición los investigadores se someten a las guías existentes de buenas prácticas en investigación, así como a la resolución 8430 de 1993 del ministerio de salud, el reglamento de ética de la Universidad de Cartagena y a la normativa internacional sobre el tema.

5.8 Análisis estadístico.

Los datos fueron analizados usando el software de análisis estadístico R (the Development Core Team). Se utilizaron medidas de tendencia central (promedio y mediana) y medidas de dispersión (rango, desviación estándar) para los datos continuos, para los categóricos se usaron proporciones y porcentajes. Se evaluó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk, así como la homocedasticidad de estos mediante la prueba de Fisher. El contraste de hipótesis en el estudio de casos y controles, se realizó mediante las pruebas de U de Mann-

Whitney para variables continuas; χ^2 (chi cuadrado) para variables categóricas. El código del análisis estadístico realizado está disponible en los anexos, para escrutinio.

6. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

6.1 Generación de productos avanzados de glicación (AGEs) sobre albumina sérica bovina (BSA) para utilización en ensayos serológicos (Dot-Blot, ELISA, etc.).

La siguiente metodología está basada en la usada por Ikeda y cols.²³ con ciertas modificaciones. En primer lugar, se tomaron 1.6 gramos de BSA y 3.0 gramos de glucosa y se disolvieron en 10 ml de buffer fosfato de sodio 50mM pH 7.4 conteniendo azida de sodio al 0.01%. Previamente cada solución se esterilizó por ultrafiltración con filtro de 0.45 μ m. Cada solución se incubó en baño de maría a una temperatura de 50°C por 30 días y se dializó posteriormente contra PBS usando una membrana de diálisis de 6-8 kDa con un número de recambios de 4, teniendo de antemano en consideración el peso molecular de la BSA (66.65 kDa). Posteriormente se almacenaron las alícuotas a -20°C para su utilización posterior en pruebas serológicas. Paralelamente, una alícuota con BSA incubada en las condiciones anteriormente mencionadas, se incubó durante 30 días a una temperatura de 4°C, así como también una alícuota control de BSA disuelta en buffer fosfato pero incubada durante 30 días a -20°C.

6.2 Perfil electroforético de la BSA glicada usando SDS-PAGE

Para la anterior metodología se utilizó la metodología propuesta por Laemmli en 1970³⁶ para la realización de electroforesis en gel de poliacrilamida con sodio dodecil sulfato. En primer lugar, se tomaron alícuotas de 0.02 mL de AGE-BSA a una concentración de 0.5 mg/mL y se incubaron con 0.08 mL de la solución de carga o solución de Laemmli a 95°C por 10 min. Luego se dejó enfriar y se mantuvo a temperatura ambiente hasta cargar en la cámara. Paralelamente una muestra de BSA no glicada se sometió al anterior procedimiento para servir de control. Al mismo tiempo se preparó el gel de separación al 10%, se vertió en la cámara de electroforesis dejando un espacio en la parte superior para el gel de apilamiento el cual será llenado con etanol o isopropanol. Se dejó reposar por 30 minutos, tiempo

en el cual el gel debía polimerizar. Posteriormente se retiró el isopropanol u etanol con agua destilada, secando con toalla absorbente sin perturbar el gel separador. Se preparó el gel de apilamiento al 4% y se vertió sobre el extremo superior de la cámara de electroforesis. Se agregaron peines para dejar los espacios para los pozos. Se dejó reposar por 30 min. Se fijó la cámara y se agregó el buffer de corrida. Se cargaron las muestras y los marcadores de peso molecular para comenzar la electroforesis fijando los voltajes óptimos de acuerdo al diámetro del gel, siendo los mejores para nuestro caso 60 y 100 V corriendo a 40 y 60 min respectivamente. Luego de la electroforesis se incubó el gel con azul de coomassie por al menos una hora y se lavó para revelar con una solución de decoloración compuesta de metanol y ácido acético en agua destilada y desionizada para revelar el gel. Posteriormente se compararon los pozos del AGE-BSA y el BSA control en búsqueda de evidencias de cambios en la movilidad electroforética y las bandas, producto de cambios en la proteína por la reacción de Maillard.

6.3 Determinación cualitativa del grado de glicación avanzada de la albumina sérica bovina (BSA) por medio de espectrofluorimetría

Las proteínas glicadas, tal como fue mencionado en la sección Estado del Arte, poseen un espectro de emisión característico a 440nm cuando son excitados con un haz de luz con longitud de onda de 370nm. Para el anterior experimento, se utilizó un espectrofluorometro ThermoScientific® Fluoroskan Ascent FI, propiedad del grupo de evaluación de sustancias biológicas dirigido por el profesor Luis Franco, quien amablemente nos permitió su uso. Para el siguiente experimento se utilizaron placas de 96 pozos marca Nunc® con paredes oscuras y numero de catalogo M33089, las cuales son placas especiales para lectura en espectrofluorometro y ademas son de baja adsorbancia. Se tomaron 100uL de las aliquotas de proteínas incubadas con glucosa a diferentes temperaturas, así como del control, y se leyó cada muestra por triplicado usando un filtro de emisión/excitación de 355nm/460nm respectivamente, arrojando los resultados en unidades relativas de fluorescencia (RFU).

6.4 Determinación de reactividad IgE Anti-AGEs en suero humano usando ELISA indirecto (Protocolo del instituto de investigaciones inmunológicas)

Este protocolo está basado en aquellos estandarizados en el Instituto de Investigaciones Inmunológicas, para la detección de Inmunoglobulina E (IgE) específica en muestras de suero humanas^{37,38}, con algunas modificaciones basadas en el protocolo de ELISA utilizado en el artículo de Ikeda et al²³. Se utiliza este protocolo debido a su buen rendimiento con múltiples compuestos probados y que están basados en la experiencia del instituto en el estudio de la IgE, así como en las recomendaciones existentes en la literatura sobre el uso de estándares de oro imperfectos³⁹. Este estudio no pretende ser un estudio diagnóstico y sus deficiencias se desarrollarán en el apartado de limitaciones. Se desarrolló el experimento así:

En primer lugar, se diluyó el antígeno en buffer PBS pH 7.4 de manera que queden 10 µg de antígeno por cada 100 µL. Luego se tomó una placa de micro titulación de 96 pozos, se agregaron 100 µL de antígeno diluido por pozo y se incubaron por la noche (16 horas) a 4C° en cámara húmeda. Posteriormente se realizaron 5 lavados con PBS 1X-Tween 20 al 0.1%. Luego se bloqueó con PBS 1X-Gelatina 0.5% con Azida de Sodio al 0.02%, 200 µL por pozo durante 3 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda. Después, se realizaron 4 lavados con PBS 1X-Tween 20 al 0.1% A continuación, se tomaron 100 µL de cada suero diluido (1:5) en PBS 1X-Gelatina 0.5% con Azida de Sodio al 0.02% y se agregaron a los pozos de la placa de micro-titulación, y se incubaron en cámara húmeda por la noche a temperatura ambiente (16 horas). Se realizaron a posteriori 6 lavados con PBS 1X-Tween 20 al 0.1%. Se adicionó a continuación la Anti-IgE humana (E chain specific) marcada con fosfatasa alcalina (Sigma Chemical co. St Louis, USA), la cual fue donada amablemente por el instituto de investigaciones inmunológicas, en una dilución 1:500 en buffer Tris pH 8.0 0.05M- Gelatina 0.5%-MgCl₂ 1mM con Azida de Sodio al 0.02% agregando 100 µL por pozo y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego, se realizaron 5 lavados con PBS 1X-Tween 20 al 0.1%. Para el desarrollo del color, se disolvió 15 mg de p-nitrofenil fosfato en 15ml de dietanoamina al 10% pH 9.8 (1mg/ml) conteniendo MgCl₂ 0.5mM, se agregó 100

µL a cada pozo y se incubó la placa en oscuridad durante 30 minutos. Se detuvo el desarrollo del color agregando 100ul de NaOH 3N por Pozo. Finalmente se leyó la absorbancia a 405nm en un espectrofotómetro.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Características de la población de estudio

De los participantes seleccionados (102), 32 eran hombres (30%) y 70 eran mujeres (70%). La edad media fue de 35.11 años (Desviación estándar media 16.73). Todos los casos fueron diagnosticados con rinitis alérgica, de acuerdo a los criterios diagnósticos descritos en la guía ARIA (Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma) para rinitis alérgica por médico alergólogo, a excepción de los dos controles utilizados en el estudio, cuya muestra era de suero de cordón umbilical sin evidencia de ELISA IgE positivo. Tal como puede observarse en la **Tabla 1**, 33 casos (68%) padecían de rinitis con síntomas intermitentes, así como que 21 casos (42%) padecían de síntomas persistentes. En adición, 26 casos (48.2%) padecían de rinitis con severidad leve, mientras que 28 casos (51.9%) padecían de rinitis con severidad moderada-severa. El 100 % de los casos eran positivos al menos a 1 prueba cutánea, mientras que ningún control era positivo a extractos en prick test. Por otro lado, al menos 40 casos (75%) eran positivos al extracto de *Blomia* spp. en el prick test, mientras que 14 casos (15%) no resultaron positivos a esta prueba. En adición, 9 casos (16.7%) resultaron positivos al menos a uno de los extractos de alimentos usados en el prick test (leche, mani, huevo, camarón), mientras que 45 casos (83.3%) no resultaron positivos. Entre los controles no hubo ningún integrante positivo a extracto de alimentos en el prick test.

Característica	Casos	Controles	p-valor
Tamaño	54	48	NS
Edad promedio+SD	35.87	34.21	NS
Sexo			
Hombres	15 (28%)	34 (71%)	NS
Mujeres	39 (72%)	14 (29%)	
Diagnostico rinitis			
Si	54 (100%)	0	NP

No	0	48(100%)	
Prueba cutanea positiva a un alergeno			
0	0	48(100%)	NP
1 o mas de 1	54(100%)	0	NP
Prueba cutanea positiva a extracto de Blomia spp.			
Si	40 (75%)	0	NP
No	14 (15%)	48(100%)	NP
Prueba cutanea positiva a 1 alimento			
Si	9 (16.7%)	0	NP
No	45 (83.3%)	48(100%)	NP
Intensidad sintomas de la Rinitis alérgica			
Intermitente	34 (63%)	0	NP
Persistente	20 (37%)	0	NP
Severidad de la rinitis alérgica			
Leve	26 (48.2%)	0	NP
Moderada-severa	28 (51.9%)	0	NP

Tabla 1. Características generales de la población estudiada. NS: No significativo, NP: No pertinente.

7.2 Obtención de la AGE-BSA y estimación cualitativa del grado de glicación

En este estudio, para la obtención de la proteína glicada utilizada como modelo, la albumina serica bovina glicada (AGE-BSA), se utilizó el protocolo de Ikeda y cols.²³, el cual ha sido replicado, con diversas modificaciones, en posteriores artículos de la respuesta inmune de anticuerpos contra AGEs. La proteína se incubó durante 30 días en medios esteriles, y fue dializada contra una membrana de 8kDa para posteriormente ser utilizada en los ensayos posteriores. Antes de utilizarse en los ensayos, se buscó por medio de un medio cualitativo estimar la glicación de la proteína de acuerdo a los metodos descritos en la revision de Ashraf y cols.⁴⁰ Las proteínas glicadas exhiben un incremento en la fluorescencia a 440nm posterior a

la excitación con un haz de luz con longitud de onda de 370nm. Este incremento en la fluorescencia no induce un incremento en la absorbancia a 280nm, estableciéndose este perfil de fluorescencia como una característica propia de los AGEs⁴⁰. Teniendo esto en cuenta, se tomó una muestra de la AGE-BSA glicada usando el protocolo anteriormente mencionado, y se examinó su perfil de fluorescencia a 460 nm usando un espectrofluorometro Thermoscientific® Fluoroskan Ascent FI, cortesía del grupo de evaluación de sustancias biológicas de la Universidad de Cartagena, usando un filtro de excitación a 355nm y un filtro de emisión a 460nm, los cuales eran los únicos disponibles en el equipo con longitudes de onda cercanas a las usadas de forma óptima para examinar el perfil de fluorescencia de los AGEs. En la **figura 3** podemos observar a manera de comparación, el aspecto de las dos alícuotas de BSA incubadas con glucosa posterior a los 30 días de incubación. En la **Figura 4**. se muestran las medias de unidades relativas de fluorescencia de 3 alícuotas de proteínas incubadas en 30 días: una alícuota sin glucosa, disuelta en buffer fosfato 50mM, el cual fue almacenado a 4C° y no contenía glucosa, una alícuota de BSA más glucosa, disuelta en buffer fosfato 50mM y almacenada a 4C°, y por último una alícuota de BSA más glucosa disuelta en buffer fosfato 50mM y almacenada en baño de maría a 50C°. Como podemos observar en la figura, la alícuota de proteína almacenada a -20C° sin glucosa disuelta, no emite fluorescencia en la longitud de onda examinada, pero aquellas alícuotas de proteína incubadas en presencia de glucosa, sí fluorescen a la longitud de onda de emisión, indicando que probablemente algo cambió en la proteína al incubarlo con la glucosa, probablemente a consecuencia de la reacción de Maillard.

En la **figura 5**. podemos observar el resultado de la electroforesis de la proteína glicada, usando un gel de apilamiento al 10%.



Figura 3. Diferencias en la coloración entre una alícuota de AGE-BSA Vs BSA no glicado. El anterior experimento se realizó de acuerdo al protocolo de glicación de Ikeda y cols. 1: BSA no glicado; 2: AGE-BSA.

Es importante mencionar una limitación del método utilizado para estimar el grado de glicación de la proteína. En primer lugar, el método que podría considerarse como el gold-standard para determinar la presencia de AGEs sobre la BSA, es utilizando espectrometría de masa en tándem (MS/MS), o usando el anticuerpo comercial para AGEs, comercializado bajo el código 6D12, el cual fue patentado a partir del estudio de Ikeda y cols. en 1996 así como otros trabajos^{23,41}. Sin embargo es de notar, que para el caso de la espectrometría, se requeriría de un método de inmunoenriquecimiento con el anticuerpos 6D12, a través de una cromatografía por afinidad usando el 6D12 y posteriormente examinar por MS/MS para así seleccionar las proteínas glicadas y examinar que tanto modifica el método de Ikeda a las proteínas utilizadas en este trabajo.

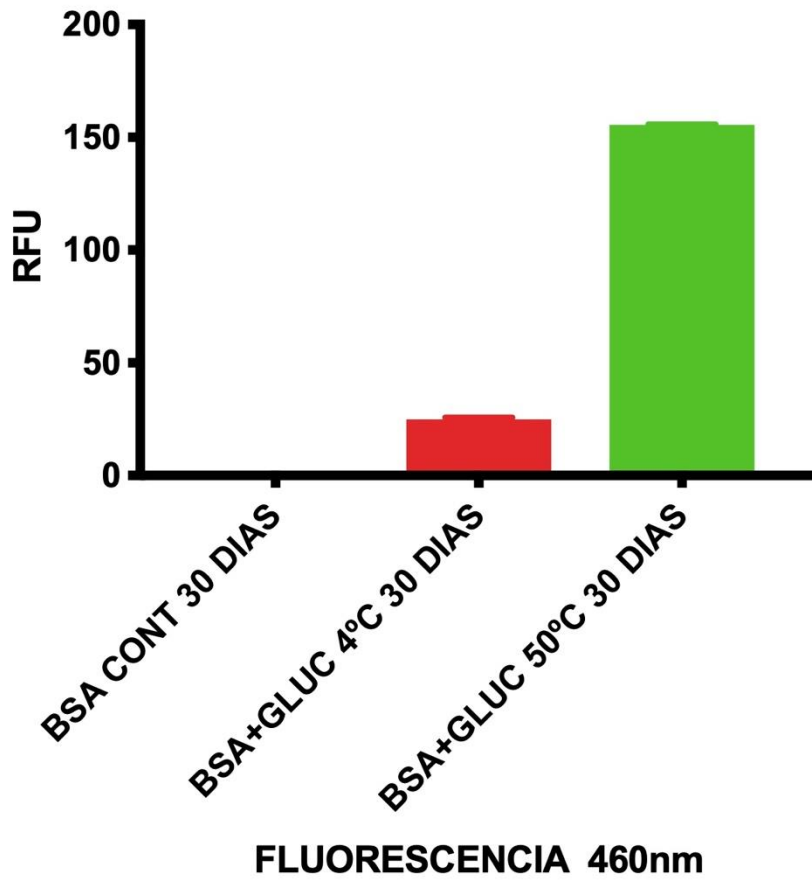


Figura 4. Perfil de fluorescencia de la BSA a 460nm incubada en diferentes temperaturas durante 30 días al excitarla a 355nm en un espectrofluorometro.

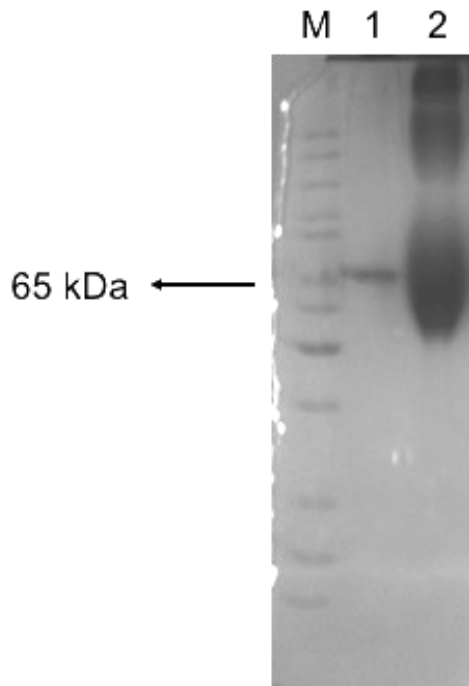


Figura 5. Electroforesis usando el método de SDS-PAGE con gel de apilamiento al 10% de la BSA glicada con el método anteriormente descrito luego de 30 días de incubación a 50C°. M es el marcador de peso molecular, 1 es la BSA sin glicar, 2 es la BSA glicada a 50C° por 30 días.

7.3 Respuesta inmune de anticuerpos IgE total y a AGE-BSA en la muestra estudiada

Para obtener los datos que sustentan este apartado de este trabajo, se utilizó el protocolo estandarizado por el instituto de investigaciones inmunológicas de la Universidad de Cartagena, el cual ha sido utilizado en múltiples proteínas y ha sustentado los resultados de varias publicaciones en revistas de alto impacto^{37,42-44}. Debido a que hasta el momento, no existe nada en la literatura que sustente la existencia de una respuesta IgE contra AGEs, a diferencia de la respuesta IgG e IgM (ver marco teórico), no existe evidencia de un método estandarizado para examinar la respuesta inmune IgE contra AGEs o de pacientes sensibilizados contra estos compuestos. El libro de referencia para los protocolos de ELISA, The ELISA guidebook⁴⁵, menciona que para el caso de los protocolos de estandarización, se requiere una curva de diluciones crecientes del suero y del anticuerpos,

requiriéndose un suero control positivo y un suero control negativo. En este caso, debido a que no existe referencia a la existencia de pacientes positivos al ELISA IgE para AGEs, tiene que realizarse un test preliminar tipo Gold standard imperfecto³⁹, que en este caso se puede considerar el protocolo de ELISA IgE para alérgenos del instituto de investigaciones inmunológicas. Este trabajo no pretende ser un estudio de prueba diagnóstica, sino un estudio preliminar que permita disertar sobre la existencia o no de una respuesta IgE a AGEs.

En primer lugar, en la **Figura 6**. podemos observar los resultados de los inmunocap[®] para cuantificar la IgE total entre los dos grupos analizados. Tal como se observa, el nivel de IgE total es mayor entre los casos respecto a los casos, de forma significativa (U Mann-Whitney 2022 $p < 0.0001$ IC95% 121.5-276.9)

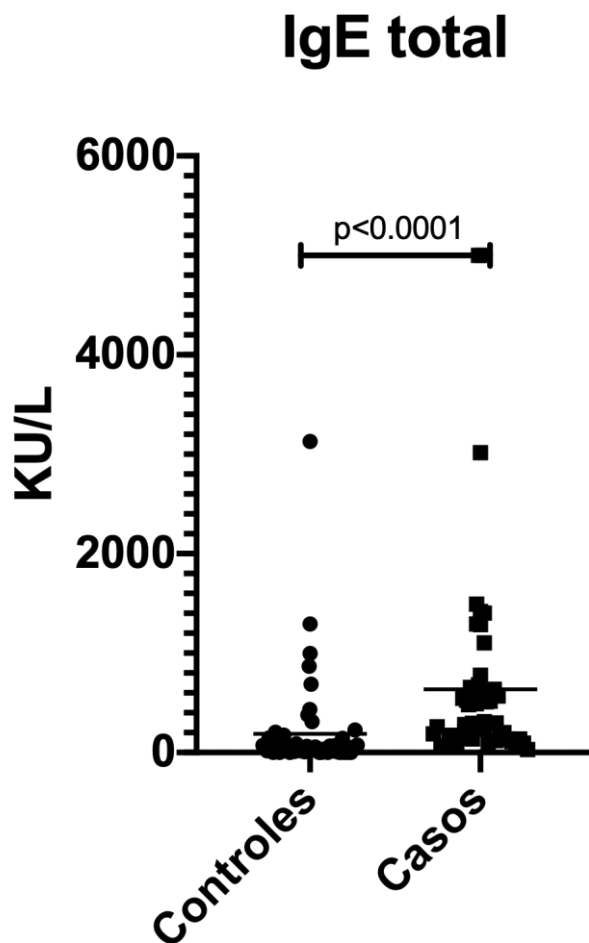


Figura 6. Perfil de niveles de inmunoglobulina E entre los grupos, de acuerdo al método InmunoCap®.

Tomando la premisa del gold-standard imperfecto, se buscaría definir un control negativo de acuerdo a la literatura existente. Tal como observamos en la sección del marco teórico, existen unos grupos de pacientes cuyas características predicen la presencia de anticuerpos anti-AGEs, entre los que encontramos los diabéticos en mayor medida^{27,46-49}, seguidos de los pacientes con enfermedades autoinmunes tales como la artritis reumatoide, sinovitis temprana y enfermedad renal y cardiovascular^{6,27,31,50,51}. En vista de lo anterior, se corrió una placa con los controles de la muestra, los cuales cumplían con la condición de no tener las enfermedades anteriormente mencionadas, y en adición por cortesía de la Dra. Nathalie Acevedo y el Dr. Luis Caraballo se pudo obtener unas muestras de suero de cordón umbilical sin evidencia de positividad para IgE total, denominadas CU024 y CU077, las cuales fueron utilizadas como controles negativos. Usando los controles se definió un punto de corte+ 3 desviaciones estándar de 0.103 OD, a partir del cual se definía que un paciente era positivo al ELISA IgE AGEs. Al analizar los resultados observados entre los dos grupos se observa que los casos presentan una mayor OD en promedio en el ELISA en comparación a lo observado en los controles. Esta diferencia es pequeña pero significativa (U Mann-Whitney 1648 p-valor <0.05 IC95% 0.007-0.034) indicando una probable diferencia existente entre los casos y controles que habrá que confirmar en estudios posteriores. En adición, se analizó si existía una relación estadísticamente significativa entre la positividad al ELISA IgE contra AGEs y las demás variables, pero no se encontró ninguna relación estadísticamente significativa al analizar por medio de la prueba de chi-cuadrado la positividad de la prueba y el grado de severidad, intensidad de síntomas, positividad a prueba cutánea, sexo y edad (datos no mostrados). Por otro lado, se analizó si existía alguna correlación entre la positividad a la prueba ELISA IgE contra AGEs y alguna de las variables clínicas examinadas en el estudio, y no se encontró una relación estadísticamente significativa. En la **figura 6.** podemos observar los resultados del análisis del ELISA IgE AGEs entre los dos grupos estudiados.

IgE AGEs

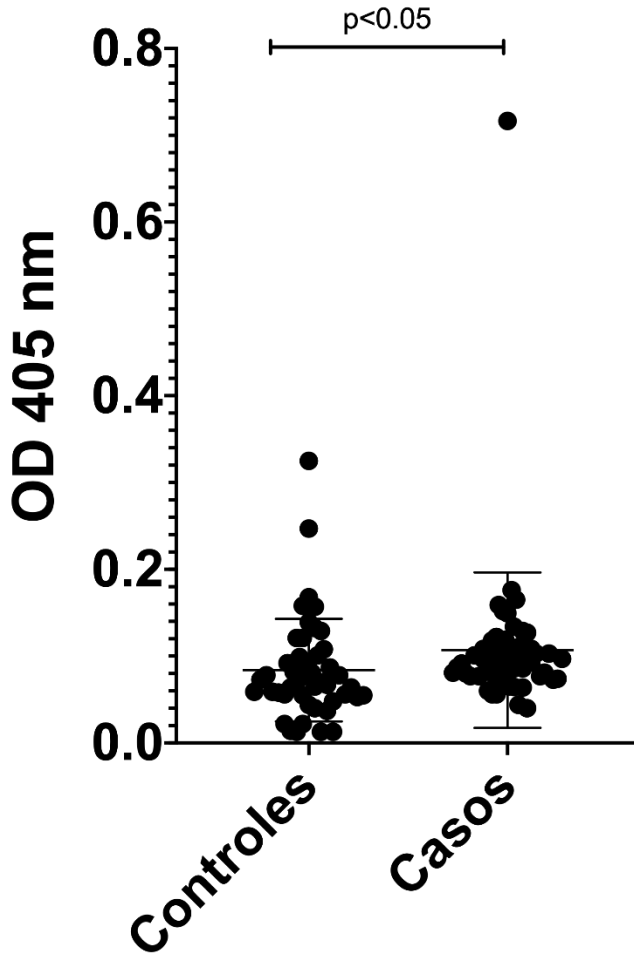


Figura 7. Resultados del ELISA IgE indirecto contra AGEs en ambos grupos

8. CONCLUSIONES, LIMITACIONES DEL ESTUDIO Y PERSPECTIVAS A FUTURO

Como parte del proceso de búsqueda de conocimiento nuevo a través del método científico, es prudente realizar una autocrítica y reconocer las debilidades y limitaciones del estudio. En primer lugar, se logró obtener una proteína glicada, a la cual se le realizó una metodología para determinar el grado de glicación avanzada de la proteína a partir de un procedimiento que arrojaba resultados cualitativos y puede tener factores de confusión. El espectro de fluorescencia que es observado

en las proteínas que son glicadas también es observado en compuestos tales como el dinucleótido de nicotinamina y adenina reducido, lo cual en muestras biológicas puede suponer un factor de confusión. Sin embargo hay que resaltar que la proteína utilizada era una proteína purificada comercial, la cual tiene una pureza del 99%, así que no es de esperar que el aumento de la fluorescencia en las proteínas incubadas por glucosa sea de otro origen, sin embargo hay que tenerlo en cuenta. Más aun, el método óptimo para la determinación del grado de glicación avanzada de una proteína es la espectrometría de masas en tándem (MS/MS)⁴⁰, aunque para el caso de las proteínas glicadas, requiere que antes de correr la muestra a través del espectrómetro, se concentre el número de proteínas glicadas en la muestra usando una cromatografía de afinidad, con una columna que tenga adherido el anticuerpo 6D12, el cual reconoce proteínas glicadas.

Por otra parte, no se estandarizó el protocolo de ELISA IgE contra AGEs. Es de anotar que para el procedimiento de estandarización, se requiere tener un suero positivo y un suero negativo, condiciones que a priori no se cumplían en la población de estudio, por varias razones: la primera era que no existe evidencia de la existencia de anticuerpos IgE contra AGEs, por lo tanto solo podemos suponer la probabilidad de que existen en pacientes tales como los alérgicos al maní en donde existen pruebas de la unión no específica de la IgE a los AGEs³² así como suponer también unos probables controles, lo cual nos obligó a utilizar un estándar validado en múltiples proteínas para evaluar la reactividad IgE, como lo es el protocolo del Instituto de investigaciones inmunológicas. Sin embargo este es un apartado a considerar en el futuro y que debe ser realizado de forma pronta.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Pawankar R, Stephen H, Lockey RF, Canonica GW, Michael B, eds. *World Allergy Organization (WAO), White Book on Allergy, an Update 2013*. World Allergy Organization; 2013.
2. Fang-Mercado LC, Urrego-Álvarez JR, Merlano-Barón AE, et al. Influencia del estilo de vida, la dieta y la vitamina D en la atopía en niños colombianos afrodescendientes. *Rev Alerg México*. 2017;64(3):277. doi:10.29262/ram.v64i3.275
3. Meza C, Marrugo-Can J. El papel de la vitamina D en la respuesta inmune y en las enfermedades alérgicas. *Rev.cienc.biomed*. 2015;6(2):319-332. <http://revistas.unicartagena.edu.co/index.php/cienciasbiomedicas/article/view/1298/1208>.
4. Merlano-Barón AE, Villanueva-Pájaro DJ, Marrugo Cano JA. Modulación de la respuesta alérgica por los carotenoides de la dieta. *Rev la Fac Med*. 2016;64(1):123-135. doi:10.15446/revfacmed.v64n1.51567
5. Smith PK, Masilamani M, Li XM, Sampson HA. The false alarm hypothesis: Food allergy is associated with high dietary advanced glycation end-products and proglycating dietary sugars that mimic alarmins. *Journal of Allergy*

- and *Clinical Immunology*. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091674916306182>. Published 2015. Accessed March 27, 2017.
6. Fukami K, Yamagishi S, Okuda S. Role of AGEs-RAGE system in cardiovascular disease. *Curr Pharm Des*. 2014;20(14):2395-2402. doi:10.2174/13816128113199990475
 7. Maillard LC. Action of Amino acids on sugars. Formation of melanoidins in a methodical way. *Compt Rend*. 1912;(154):66-68.
 8. World Health Organization. *WHO | Use of Glycated Haemoglobin (HbA1c) in the Diagnosis of Diabetes Mellitus.*; 2011. doi:WHO/NMH/CHP/CPM/11.1
 9. Hodge JE. Chemistry of browning reactions in model systems. *J Agric Food Chem*. 1953;1(15):928-943.
 10. Nursten H. Maillard browning reaction in dried food. In: MacCarthy D, ed. *Concentration and Drying of Foods*. London: Elsevier Applied Science; 1986:53-68.
 11. Nursten H. The chemistry of Non-enzymic Browning. In: Nursten H, ed. *The Maillard Reaction: Chemistry, Biochemistry and Implications*. Cambridge: Royal Society of Chemistry; 2005:5-26.
 12. Awasthi S, Murugan NA, Saraswathi NT. Advanced Glycation End Products Modulate Structure and Drug Binding Properties of Albumin. *Mol Pharm*. 2015;12(9):3312-3322. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.5b00318
 13. Bozhinov A, Handzhiyski Y, Genov K, et al. Advanced glycation end products contribute to the immunogenicity of IFN- β pharmaceuticals. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129(3):855-858.e6. doi:10.1016/j.jaci.2011.10.035
 14. Galligan JJ, Wepy JA, Streeter MD, et al. Methylglyoxal-derived posttranslational arginine modifications are abundant histone marks. *Proc Natl Acad Sci*. 2018;201802901. doi:10.1073/pnas.1802901115
 15. Wei B, Berning K, Quan C, Zhang YT. Glycation of antibodies: Modification, methods and potential effects on biological functions. *MAbs*. 2017;9(4):586-594. doi:10.1080/19420862.2017.1300214
 16. Kennedy DM, Skillen a W, Self CH. Glycation of monoclonal antibodies impairs their ability to bind antigen. *Clin Exp Immunol*. 1994;98(2):245-251. doi:10.1111/j.1365-2249.1994.tb06133.x
 17. Prasanna G, Jing P. Spectroscopic and molecular modelling studies on glycation modified bovine serum albumin with cyanidin-3-O-glucoside. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc*. 2018;204:708-716. doi:10.1016/j.saa.2018.06.103
 18. Szkudlarek A, Sułkowska A, Maślązek-Jurczyk M, Chudzik M, Równicka-Zubik J. Effects of non-enzymatic glycation in human serum albumin. Spectroscopic analysis. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc*. 2016;152:645-653. doi:10.1016/j.saa.2015.01.120
 19. Ashraf JM, Ahmad S, Rabbani G, et al. Physicochemical analysis of structural alteration and advanced glycation end products generation during glycation of H2A histone by 3-deoxyglucosone. *IUBMB Life*. 2014;66(10):686-693. doi:10.1002/iub.1318
 20. Cordain L, Eaton SB, Sebastian A, et al. Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. *Am J Clin Nutr*. 2005;81(2):341-354. <http://ajcn.nutrition.org/content/81/2/341.abstract>.
 21. Amuna P, Zotor FB. Epidemiological and nutrition transition in developing countries: impact on human health and development. *Proc Nutr Soc*. 2008;67(01):82-90. doi:10.1017/S0029665108006058
 22. Uribarri J, Woodruff S, Goodman S, et al. Advanced Glycation End Products in Foods and a Practical Guide to Their Reduction in the Diet. *J Am Diet Assoc*. 2010;110(6):911-16.e12. doi:10.1016/j.jada.2010.03.018
 23. Ikeda K, Higashi T, Sano H, et al. N $^{\epsilon}$ -(Carboxymethyl)lysine Protein Adduct Is a Major Immunological Epitope in Proteins Modified with Advanced Glycation End Products of the Maillard Reaction † . *Biochemistry*. 1996;35(24):8075-8083. doi:10.1021/bi9530550
 24. Reddy S, Bichler J, Wells-Knecht KJ, Thorpe SR, Baynes JW. N $^{\epsilon}$ -(Carboxymethyl)lysine Is a Dominant Advanced Glycation End Product (AGE) Antigen in Tissue Proteins. *Biochemistry*. 1995;34(34):10872-10878. doi:10.1021/bi00034a021
 25. Takeuchi M, Makita Z, Yanagisawa K, Kameda Y, Koike T. Detection of noncarboxymethyllysine and carboxymethyllysine advanced glycation end products (AGE) in serum of diabetic patients. *Mol Med*. 1999;5(6):393-405. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10415164>. Accessed September 10, 2018.
 26. Vay D, Vidalí M, Allochis G, et al. Antibodies against advanced glycation end product Nepsilon-(carboxymethyl)lysine in healthy controls and diabetic patients. *Diabetologia*. 2000;43(11):1385-1388. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11126407>. Accessed August 17, 2018.
 27. Turk Z, Ljubic S, Turk N, Benko B. Detection of autoantibodies against advanced glycation endproducts and AGE-immune complexes in serum of patients with diabetes mellitus. *Clin Chim Acta*. 2001;303(1-2):105-115. doi:10.1016/S0009-8981(00)00389-2
 28. Virella G, Thorpe SR, Alderson NL, et al. Autoimmune response to advanced glycosylation end-products of human LDL. *J Lipid Res*. 2003;44(3):487-493. doi:10.1194/jlr.M200370-JLR200
 29. Ligier S, Fortin PR, Newkirk MM. A new antibody in rheumatoid arthritis targeting glycated IgG: IgM anti-IgG-AGE. *Br J Rheumatol*. 1998;37(12):1307-1314. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9973155>. Accessed August 28, 2017.
 30. Goetze AM, Liu YD, Arroll T, Chu L, Flynn GC. Rates and impact of human antibody glycation in vivo. *Glycobiology*. 2012;22(2):221-234. doi:10.1093/glycob/cwr141
 31. Newkirk MM, Goldbach-Mansky R, Lee J, et al. Advanced glycation end-product (AGE)-damaged IgG and IgM autoantibodies to IgG-AGE in patients with early synovitis. *Arthritis Res Ther*. 2003;5(2):R82-90. doi:10.1186/ar622
 32. Mueller GA. Identification of Maillard reaction product on peanut allergens that influence binding to the receptor for advanced glycation end products. *Allergy*. 2013;141(4):520-529. doi:10.1016/j.surg.2006.10.010
 33. Moghaddam AE, Hillson WR, Noti M, et al. Dry roasting enhances peanut-induced allergic sensitization across mucosal and cutaneous routes in mice. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;134(6):1453-1456. doi:10.1016/j.jaci.2014.07.032
 34. Vojdani A. Detection of IgE, IgG, IgA and IgM antibodies against raw and processed food antigens. *Nutr Metab*. 2009;6:22. doi:10.1186/1743-7075-6-22
 35. Ilchmann A, Burgdorf S, Scheurer S, et al. Glycation of a food allergen by the Maillard reaction enhances its T-cell

- immunogenicity: Role of macrophage scavenger receptor class A type I and II. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(1-3):175-183.e11. doi:10.1016/j.jaci.2009.08.013
36. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-685. doi:10.1038/227680a0
 37. Acevedo N, Bornacelly A, Mercado D, et al. Genetic variants in chia and chi311 are associated with the ige response to the ascaris resistance marker aba-1 and the birch pollen allergen bet v 1. Shankar EM, ed. *PLoS One.* 2016;11(12):e0167453. doi:10.1371/journal.pone.0167453
 38. Acevedo N, Mercado D, Vergara C, et al. Association between total immunoglobulin e and antibody responses to naturally acquired *Ascaris lumbricoides* infection and polymorphisms of immune system-related LIG4, TNFSF13B and IRS2 genes. *Clin Exp Immunol.* 2009;157(2):282-290. doi:10.1111/j.1365-2249.2009.03948.x
 39. Rutjes A, Reitsma J, Coomarasamy A, Bossuyt K, Khan PMM. Evaluation of diagnostic tests when there is no gold standard. Health Technology Assessment NHS R&D HTA Programme. <https://njl-admin.nihr.ac.uk/document/download/2001504>. Published 2007.
 40. Ashraf JM, Ahmad S, Choi I, et al. Recent advances in detection of AGEs: Immunochemical, bioanalytical and biochemical approaches. *IUBMB Life.* 2015;67(12):897-913. doi:10.1002/iub.1450
 41. Nagai R, Fujiwara Y, Mera K, et al. Usefulness of antibodies for evaluating the biological significance of AGEs. In: *Annals of the New York Academy of Sciences.* Vol 1126. ; 2008:38-41. doi:10.1196/annals.1433.001
 42. Caraballo L, Martínez B, Jimenez S, Puerta L. HLA-DR3 is Associated with the IgE Immune Responsiveness to a Recombinant Allergen from *Blomia tropicalis* (BT). In: *New Horizons in Allergy Immunotherapy.* Vol 409. ; 1996:81-83. <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-0030438228&origin=resultslist&sort=plf-f&src=s&sid=B5360C4263D14981B3DF2DD04AC8FCA9.wsnAw8kcdt7IPYLO0V48gA%3A1050&ot=autdocs&sd=autdocs&sl=18&s=AU-ID%2855842354700%29&relpos=80&citeCnt=3&searchTerm=>. Accessed July 25, 2017.
 43. Martínez B, Barrios K, Vergara C, et al. A NOS1 gene polymorphism associated with asthma and specific immunoglobulin E response to mite allergens in a Colombian population. *Int Arch Allergy Immunol.* 2007;144(2):105-113. doi:10.1159/000103221
 44. Fang L, Martínez B, Marrugo J. Distribución de tres polimorfismos del gen TSLP en población afrodescendiente de San Basilio de Palenque, Colombia. *Biomédica.* 2012;33(2):251-258. doi:10.7705/biomedica.v33i2.655
 45. Crowther JR. *The ELISA Guidebook Second Edition.* 2nd ed. (Humana Press, ed.). New York: Humana Press; 2009. doi:10.1007/978-1-60327-254-4
 46. Raghav A, Ahmad J, Alam K. Nonenzymatic glycosylation of human serum albumin and its effect on antibodies profile in patients with diabetes mellitus. Chamani J, ed. *PLoS One.* 2017;12(5):e0176970. doi:10.1371/journal.pone.0176970
 47. Chande AT, Rowell J, Rishishwar L, et al. Influence of genetic ancestry and socioeconomic status on type 2 diabetes in the diverse Colombian populations of Chocó and Antioquia. *Sci Rep.* 2017;7(1):17127. doi:10.1038/s41598-017-17380-4
 48. Vlassara H, Uribarri J. Advanced Glycation End Products (AGE) and Diabetes: Cause, Effect, or Both? *Curr Diab Rep.* 2014;14(1):453. doi:10.1007/s11892-013-0453-1
 49. Kaneshige H. Nonenzymatic Glycosylation of Serum IgG and Its Effect on Antibody Activity in Patients With Diabetes Mellitus. *Diabetes.* 1987;36(7). <http://diabetes.diabetesjournals.org/content/36/7/822.long>. Accessed August 28, 2017.
 50. Newkirk MM, Goldbach-Mansky R, Lee J, et al. Advanced glycation end-product (AGE)-damaged IgG and IgM autoantibodies to IgG-AGE in patients with early synovitis. *Arthritis Res Ther.* 2003;5(2):R82-90. doi:10.1186/ar622
 51. Ahmad S, Habib S, Moinuddin, Ali A. Preferential recognition of epitopes on AGE-IgG by the autoantibodies in rheumatoid arthritis patients. *Hum Immunol.* 2013;74(1):23-27. doi:10.1016/j.humimm.2012.10.008

12. ANEXOS

ANEXO 1

Datos completos de los participantes del estudio

Codigo	Edad	Sexo	Reto nasal + Blomia	Prick test positivo a 1 alergeno	Numero de prick test +	Prick test positivo a Blomia	Numero de prick test + a alimento s	Diagnostico Rinitis Alergica	Sintomas	Severidad	IgE total KU/L	IgE btd201 KU/L	Resultado Ige btd201	Resultado Ige ddp1 KU/L	Resultado Ige dp	OD IgE AGEs	Resultado Ige AGEs
Casos	44	Mujer	Negativo	Positivo	3	Si	0	Si	Persistente	Leve	1104	5.61	Positivo	3.57	1	0.044	0
Casos	39	Mujer	Positivo	Positivo	3	Si	0	Si	Persistente	Moderada-severa	1294	100	Positivo	43.6	1	0.056	0
Casos	44	Mujer	Positivo	Positivo	1	Si	0	Si	Persistente	Leve	202	0.08	Negativo	0.08	0	0.077	0
Casos	8	Mujer	Positivo	Positivo	1	Si	0	Si	Intermitente	Moderada-severa	3016	7.42	Positivo	100	1	0.081	0
Casos	37	Mujer	Negativo	Positivo	5	Si	1	Si	Persistente	Leve	242	10.2	Positivo	24.9	1	0.056	0
Casos	46	Mujer	Positivo	Negativo	0	No	0	Si	Intermitente	Moderada-severa	96	0.05	Negativo	0.01	0	0.064	0
Casos	43	Mujer	Negativo	Positivo	1	Si	0	Si	Persistente	Leve	153	8.42	Positivo	0.15	0	0.064	0
Casos	58	Mujer	Negativo	Negativo	0	No	0	Si	Intermitente	Leve	525	0.5	Positivo	0.08	0	0.04	0
Casos	42	Mujer	Positivo	Negativo	0	No	0	Si	Intermitente	Leve	481	0.17	Negativo	43.5	1	0.152	1
Casos	30	Mujer	Negativo	Positivo	4	Si	0	Si	Persistente	Moderada-severa	295	0.07	Negativo	0.14	0	0.122	1
Casos	50	Mujer	Positivo	Negativo	0	No	0	Si	Intermitente	Leve	80.8	0.05	Negativo	0.01	0	0.0835	0
Casos	54	Mujer	Negativo	Positivo	2	No	0	Si	Persistente	Moderada-severa	138	0.39	Positivo	0.02	0	0.165	1
Casos	32	Hombre	Negativo	Negativo	0	No	0	Si	Intermitente	Leve	173	0.59	Positivo	0.06	0	0.0915	0
Casos	37	Mujer	Positivo	Positivo	3	Si	0	Si	Persistente	Leve	1494	4.44	Positivo	67	1	0.098	0
Casos	18	Hombre	Positivo	Positivo	5	Si	1	Si	Intermitente	Leve	273	11.9	Positivo	2.32	1	0.0825	0
Casos	54	Hombre	Negativo	Positivo	1	Si	0	Si	Persistente	Moderada-severa	190	0.33	Negativo	0.1	0	0.159	1
Casos	12	Mujer	Positivo	Positivo	2	Si	0	Si	Intermitente	Leve	310	1.26	Positivo	20.5	1	0.092	0
Casos	64	Mujer	Positivo	Positivo	3	Si	0	Si	Persistente	Moderada-severa	516	0.61	Positivo	3.77	1	0.1105	1
Casos	51	Mujer	Positivo	Positivo	2	Si	0	Si	Intermitente	Leve	294	1.26	Positivo	24.5	1	0.134	1
Casos	27	Mujer	Positivo	Negativo	0	No	0	Si	Intermitente	Moderada-severa	70.2	0.03	Negativo	0.02	0	0.102	0
Casos	51	Mujer	Positivo	Negativo	0	No	0	Si	Intermitente	Leve	112	0.05	Negativo	0.03	0	0.097	0
Casos	56	Hombre	Negativo	Positivo	2	Si	0	Si	Persistente	Leve	511	0.32	Negativo	0.12	0	0.0965	1
Casos	35	Hombre	Positivo	Positivo	2	Si	0	Si	Intermitente	Moderada-severa	60.6	0.03	Negativo	0.01	0	0.101	0
Casos	14	Hombre	Positivo	Negativo	0	No	0	Si	Persistente	Moderada-severa	62.6	0.11	Negativo	0.08	0	0.106	1
Casos	18	Hombre	Negativo	Positivo	3	Si	0	Si	Intermitente	Leve	654	43.2	Positivo	76	1	0.109	1
Casos	51	Mujer	Positivo	Positivo	1	Si	0	Si	Intermitente	Leve	215	2.88	Positivo	15.6	1	0.1085	1
Casos	13	Mujer	Positivo	Positivo	1	Si	0	Si	Intermitente	Leve	144	0.09	Negativo	16.2	1	0.103	1
Casos	17	Mujer	Positivo	Positivo	1	Si	0	Si	Persistente	Moderada-severa	258	0.85	Positivo	1.13	1	0.118	1
Casos	12	Hombre	Positivo	Positivo	3	Si	0	Si	Persistente	Moderada-severa	636	100	Positivo	71.7	1	0.109	1
Casos	53	Mujer	Positivo	Positivo	2	No	1	Si	Persistente	Moderada-severa	492	0.43	Positivo	0.44	1	0.119	1
Casos	67	Mujer	Positivo	Positivo	1	Si	0	Si	Persistente	Moderada-severa	137	0.05	Negativo	0.02	0	0.087	0
Casos	58	Mujer	Positivo	Positivo	5	Si	0	Si	Intermitente	Moderada-severa	1286	100	Positivo	66.7	1	0.129	1
Casos	56	Mujer	Positivo	Positivo	5	Si	1	Si	Persistente	Leve	570	4.72	Positivo	7.18	1	0.1495	1
Casos	39	Mujer	Positivo	Positivo	3	Si	0	Si	Persistente	Moderada-severa	246	25.6	Positivo	1.01	1	0.103	1
Casos	37	Mujer	Positivo	Positivo	3	Si	0	Si	Intermitente	Moderada-severa	137	0.04	Negativo	0.11	0	0.0645	0
Casos	43	Hombre	Positivo	Positivo	3	Si	0	Si	Intermitente	Moderada-severa	545	0.1	Negativo	0.25	0	0.1085	1
Casos	9	Mujer	Negativo	Positivo	3	Si	0	Si	Intermitente	Leve	120	0.03	Negativo	0.93	1	0.7165	1
Casos	10	Mujer	Positivo	Positivo	2	No	0	Si	Intermitente	Leve	777	1.09	Positivo	5	1	0.071	0
Casos	7	Hombre	Negativo	Positivo	2	No	0	Si	Intermitente	Moderada-severa	232	0.03	Negativo	0.08	0	0.08	0
Casos	12	Mujer	Positivo	Positivo	7	Si	1	Si	Intermitente	Moderada-severa	5000	28.9	Positivo	93.3	1	0.176	1
Casos	22	Mujer	Positivo	Positivo	3	Si	0	Si	Intermitente	Leve	618	100	Positivo	18	1	0.077	0
Casos	64	Hombre	Positivo	Positivo	2	Si	0	Si	Intermitente	Leve	282	0.07	Negativo	0.72	1	0.06	0
Casos	17	Hombre	Negativo	Positivo	4	Si	0	Si	Intermitente	Moderada-severa	5000	73.5	Positivo	100	1	0.081	0
Casos	39	Mujer	Positivo	Positivo	7	Si	1	Si	Intermitente	Moderada-severa	236.8	0.55	Positivo	10.6	1	0.091	0
Casos	26	Mujer	Positivo	Positivo	2	Si	0	Si	Persistente	Moderada-severa	291.8	0.3	Negativo	56.2	1	0.074	0
Casos	42	Mujer	Positivo	Positivo	3	Si	0	Si	Intermitente	Moderada-severa	125.7	0.82	Positivo	7.19	1	0.086	0
Casos	47	Mujer	Negativo	Positivo	1	Si	0	Si	Intermitente	Leve	681	24.5	Positivo	0.43	1	0.087	0
Casos	32	Mujer	Positivo	Positivo	3	Si	0	Si	Intermitente	Leve	173	0.06	Negativo	22.3	1	0.127	0
Casos	29	Mujer	Positivo	Positivo	5	Si	2	Si	Intermitente	Leve	297.4	0.64	Positivo	65	1	0.093	0
Casos	36	Hombre	Negativo	Positivo	3	Si	0	Si	Intermitente	Moderada-severa	1402	58.8	Positivo	2.02	1	0.086	0
Casos	12	Mujer	Positivo	Negativo	0	No	0	Si	Intermitente	Moderada-severa	625	0.07	Negativo	0.23	0	0.073	0
Casos	54	Mujer	Positivo	Positivo	1	Si	0	Si	Intermitente	Moderada-severa	32.2	0.16	Negativo	1.39	1	0.073	0
Casos	48	Hombre	Positivo	Negativo	0	No	0	Si	Intermitente	Leve	60.1	0.05	Negativo	0.01	0	0.065	0
Casos	21	Hombre	Positivo	Positivo	7	Si	1	Si	Intermitente	Moderada-severa	1419.6	74.2	Positivo	56	1	0.077	0
Controles	18	Hombre	Negativo	Negativo	0	No	0	No	0	0	147	0.09	Negativo	0.08	0	0.1325	1
Controles	21	Hombre	Negativo	Negativo	0	No	0	No	0	0	869	0.44	Positivo	0.33	0	0.121	1
Controles	13	Hombre	Negativo	Negativo	0	No	0	No	0	0	434	0.18	Negativo	0.08	0	0.108	1
Controles	31	Mujer	Negativo	Negativo	0	No	0	No	0	0	10.2	0.04	Negativo	0	0	0.091	0
Controles	2	Hombre	Negativo	Negativo	0	No	0	No	0	0	142	0.33	Negativo	0.14	0	0.158	1
Controles	37	Mujer	Negativo	Negativo	0	No	0	No	0	0	115	0.18	Negativo	0.05	0	0.325	1
Controles	58	Mujer	Negativo	Negativo	0	No	0	No	0	0	204	0.24	Negativo	0.06	0	0.055	0
Controles	50	Mujer	Negativo	Negativo	0	No	0	No	0	0	66.9	0.01	Negativo	0.05	0	0.055	0
Controles	55	Mujer	Negativo	Negativo	0	No	0	No	0	0	76.4	0.01	Negativo	0.04	0	0.07	0
Controles	41	Mujer	Negativo	Negativo	0	No	0	No	0	0	33	0.03	Negativo	0.04	0	0.073	0

Codigo	Edad	Sexo	Reto nasal + Blomia	Prick test positivo a 1 alergeno	Numero de prick test +	Prick test positivo a Blomia	Numero de prick test + a alimento s	Diagnostico Rinitis Alergica	Sintomas	Severidad	IgE total KU/L	IgE btd201 KU/L	Resultado Ige btd201	Resultado Ige ddp1 KU/L	Resultado Ige dp	OD IgE AGEs	Resultado Ige AGEs
--------	------	------	------------------------	---	------------------------------	--	---	------------------------------------	----------	-----------	-------------------	-----------------------	-------------------------	-------------------------------	---------------------	----------------	-----------------------

Controles	9	Hombre	Negativo	Negativo	0	No	0	No	0	0	311	0.54	Positivo	0.06	0	0.065	0
Controles	41	Mujer	Negativo	Negativo	0	No	0	No	0	0	17.4	0.03	Negativo	0	0	0.058	0
Controles	57	Mujer	Negativo	Negativo	0	No	0	No	0	0	379	0.03	Negativo	0.08	0	0.07	0
Controles	24	Hombre	Negativo	Negativo	0	No	0	No	0	0	226	0.06	Negativo	0.05	0	0.101	0
Controles	28	Hombre	Negativo	Negativo	0	No	0	No	0	0	3129	0.21	Negativo	0.16	0	0.022	0
Controles	52	Hombre	Negativo	Negativo	0	No	0	No	0	0	10.2	0.01	Negativo	0.04	0	0.022	0
Controles	30	Mujer	Negativo	Negativo	0	No	0	No	0	0	3.46	0.04	Negativo	0	0	0.013	0
Controles	29	Mujer	Negativo	Negativo	0	No	0	No	0	0	74	0.05	Negativo	0.01	0	0.037	0
Controles	46	Hombre	Negativo	Negativo	0	No	0	No	0	0	88	0.09	Negativo	0.01	0	0.014	0
Controles	34	Mujer	Negativo	Negativo	0	No	0	No	0	0	686	0.05	Negativo	0.02	0	0.099	0
Controles	32	Hombre	Negativo	Negativo	0	No	0	No	0	0	174	0.06	Negativo	0.01	0	0.087	0
Controles	49	Hombre	Negativo	Negativo	0	No	0	No	0	0	57.6	0.22	Negativo	0.01	0	0.157	1
Controles	27	Hombre	Negativo	Negativo	0	No	0	No	0	0	13.2	0.04	Negativo	0.01	0	0.013	0
Controles	21	Hombre	Negativo	Negativo	0	No	0	No	0	0	72.4	0.04	Negativo	0.01	0	0.092	0
Controles	46	Hombre	Negativo	Negativo	0	No	0	No	0	0	38.6	0.02	Negativo	0.05	0	0.067	0
Controles	50	Hombre	Negativo	Negativo	0	No	0	No	0	0	18.2	0.04	Negativo	0.03	0	0.168	1
Controles	46	Hombre	Negativo	Negativo	0	No	0	No	0	0	63.3	0.03	Negativo	0	0	0.082	0
Controles	47	Hombre	Negativo	Negativo	0	No	0	No	0	0	50.8	0.01	Negativo	0.04	0	0.053	0
Controles	6	Hombre	Negativo	Negativo	0	No	0	No	0	0	997	1.07	Positivo	0.13	0	0.129	1
Controles	30	Hombre	Negativo	Negativo	0	No	0	No	0	0	16.5	0.08	Negativo	0.01	0	0.059	0
Controles	30	Hombre	Negativo	Negativo	0	No	0	No	0	0	23.6	0.08	Negativo	0	0	0.078	0
Controles	26	Hombre	Negativo	Negativo	0	No	0	No	0	0	33.2	0.08	Negativo	0.06	0	0.048	0
Controles	19	Hombre	Negativo	Negativo	0	No	0	No	0	0	18.6	0.05	Negativo	0.01	0	0.044	0
Controles	35	Hombre	Negativo	Negativo	0	No	0	No	0	0	7.88	0.11	Negativo	0.25	0	0.056	0
Controles	40	Hombre	Negativo	Negativo	0	No	0	No	0	0	1292	0.11	Negativo	0.08	0	0.077	0
Controles	27	Hombre	Negativo	Negativo	0	No	0	No	0	0	18.1	0.02	Negativo	0	0	0.081	0
Controles	65	Hombre	Negativo	Negativo	0	No	0	No	0	0	23.4	2.24	Negativo	0	0	0.056	0
Controles	47	Hombre	Negativo	Negativo	0	No	0	No	0	0	32.5	0.03	Negativo	0	0	0.064	0
Controles	48	Hombre	Negativo	Negativo	0	No	0	No	0	0	53.6	0.07	Negativo	0.05	0	0.064	0
Controles	54	Hombre	Negativo	Negativo	0	No	0	No	0	0	72	0.26	Negativo	0.19	0	0.04	0
Controles	32	Hombre	Negativo	Negativo	0	No	0	No	0	0	25.1	0.03	Negativo	0.01	0	0.121	1
Controles	22	Hombre	Negativo	Negativo	0	No	0	No	0	0	22.9	0.04	Negativo	0.01	0	0.139	1
Controles	52	Hombre	Negativo	Negativo	0	No	0	No	0	0	30	0.04	Negativo	0	0	0.013	0
Controles	47	Hombre	Negativo	Negativo	0	No	0	No	0	0	59.8	0.11	Negativo	0.04	0	0.247	1
Controles	0	Hombre	Negativo	Negativo	0	No	0	No	0	0	0	0	Negativo	0	0	0.059	0
Controles	0	Hombre	Negativo	Negativo	0	No	0	No	0	0	0	0	Negativo	0	0	0.078	0

Anexo 2

Scripts de calculos estadisticos en R

Con este script, se realizarón los analisis estadisticos, simplemente modificando las variables de interes en las operaciones a realizar

```
setwd("~/Dropbox/maestria en inmuno/tesis inmuno")
ages<-read.table(file = 'ages.txt', sep = '\t', header = TRUE)
attach(ages)
ages$EdadCat<-as.factor(EdadCat)
ages$codigo<-as.factor(codigo)
ages$sexo<-as.factor(sexo)
ages$retonasalposblomia<-as.factor(retonasalposblomia)
ages$dxrinitis<-as.factor(dxrinitis)
ages$sintomas<-as.factor(sintomas)
ages$severidad<-as.factor(severidad)
ages$pcpositiva1alergeno<-as.factor(pcpositiva1alergeno)
ages$resultadoigebt<-as.factor(resultadoigebt)
ages$resultadolgedp<-as.factor(resultadolgedp)
ages$resultadoigeages<-as.factor(resultadoigeages)
ages$pcposblomia<-as.factor(pcposblomia)
ages$pcposalimentos<-as.factor(pcposalimentos)
summary(ages)
ages<-na.omit(ages)
by(igettotal,codigo,shapiro.test)
by(igebtd201,codigo,shapiro.test)
by(igedpd1,codigo,shapiro.test)
wilcox.test(ages$igeagesod[dxrinitis=="1"],ages$igeagesod[dxrinitis=="0"],
alternative = "two.sided", mu = 0, paired = FALSE, conf.int = 0.95)
tabla1<-table(resultadoigeages,pcpositiva1alergeno)
> chisq.test(tabla1)
wilcox.test(ages$igeagesod[severidad=="1"],ages$igeagesod[severidad=="2"],
alternative = "two.sided", mu = 0, paired = FALSE, conf.int = 0.95)
tabla1<-table(resultadoigeages,dxrinitis)
> chisq.test(tabla1)
wilcox.test(ages$igeagesod[sexo=="1"],ages$igeagesod[sexo=="0"])
tabla1<-table(pcposalimentos,resultadoigeages)
> chisq.test(tabla1)
var.test(igeagesod~codigo,alternative='two.sided', conf.level=.95, data=ages)
```

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a cada uno de los profesores del instituto, a la Dra. Nathalie Acevedo, la Dra. Josefina Zakzuk, la Dra. Beatriz Martínez, el Dr. Leonardo Puerta, por cada una de sus enseñanzas. El mejor regalo que me llevo es la capacidad de pensamiento y lectura crítica, y el siempre ver más allá de lo que es visible a simple vista. En adición por las correcciones que me hicieron, porque me enseñaron que antes de criticar debo autoanalizarme. Mil gracias.

Al Dr. Luis Caraballo, por impulsar en cada uno de nosotros la habilidad de pensar y leer de forma crítica, una forma diferente de ver las cosas y el siempre dar más. Siempre recordaré sus aportes, y las clases de genética. En adición por la ayuda que tuve con los anticuerpos que me donó para mis experimentos.

Para la Dra. Josefina, por su forma de enseñar, por los reactivos que me donó y sobre todo su experiencia, algo que valoraré siempre.

A cada uno de los miembros del instituto, por sus enseñanzas y experiencia, y todo lo que me enseñaron durante estos dos años.

A mi tutor, el profesor Javier Marrugo, por sus enseñanzas, por compartir conmigo su conocimiento tanto básico como clínico, y sobre todo por ser como un padre intelectual para mí, cuyas enseñanzas las tendré en cuenta para todo el resto de mi carrera profesional.

Finalmente a mi mamá y mi familia, por su apoyo, y por siempre creer en mí a pesar de las dificultades. Gracias.