



Universidad  
de Cartagena  
Fundada en 1827

**iii** Instituto de  
Investigaciones  
Inmunológicas



## **Trabajo de grado para optar el título de Magíster en Inmunología.**

### **Papel de los productos finales de glicación avanzada (AGEs) en la rinitis alérgica y su severidad.**



*Jhonatan Montoya Dager.*

*Javier Marrugo Cano.*

*Tutor.*

**Cartagena de Indias, Colombia**

**2022.**



**Universidad  
de Cartagena**  
Fundada en 1827

**iii** Instituto de  
Investigaciones  
Inmunológicas



UNIVERSIDAD DE CARTAGENA.

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES INMUNOLÓGICAS.

## **Papel de los productos finales de glicación avanzada (AGEs) en la rinitis alérgica y su severidad.**

**Trabajo de grado para optar el título de Magíster en Inmunología.**

Jhonatan David Montoya Dager.

Javier Avelino Marrugo Cano.  
Tutor

Cartagena de Indias, Bolívar

2022

**Nota de Aceptación:**

---

---

---

---

---

**Firma del Jurado**

---

**Firma del Jurado**

**Cartagena de Indias, Bolívar 2022**

*Si el otro ejerce sobre nosotros una influencia liberadora, que nos eleva, no significa esto que hayamos encontrado en el la réplica perfecta de lo que nosotros queremos ser, sino que obra más bien como el ser que nos anima a terminar el esbozo, el germen de personalidad que existía ya en nosotros antes de encontrarlo.*

**Ignace Leep.**

***La comunicación de las existencias.***

## **Agradecimientos.**

Agradezco a mi tutor, el Dr. Javier Marrugo, por sus enseñanzas, consejos y apoyo durante mi camino de aprendizaje también por ser una persona muy comprensiva con un nivel de sabiduría que solo los devenires de la vida otorgan. A la Dra. Sandra Coronado por enseñarme todas las técnicas de laboratorio posibles y por ser un acompañamiento indispensable en este proceso de cambio de conciencia y pensamiento. Al Dr. Luis Caraballo por ser un ejemplo de vida tanto moral y ético para mí y por abrirme las puertas del instituto de investigaciones inmunológicas. A la Dra. Josefina Zazuk por su excepcionalidad humana e intelectual y por la donación del estándar de IgE. También agradecimiento sincero a mis demás profesores por sus enseñanzas que perduraran hasta el final de mis días.

A mis compañeros de maestría, Jhonatan Ramírez, Karen Hernández y Alejandra Puerto, por su compañía y amistad durante estos dos años de formación; a mis queridos y preciados, Victoria Marrugo, Kevin Llinás, Karen Donado y Bayrón Zelaya por ser seres únicos y por su amistad que espero sea duradera. A Neftalí Manotas, Mayra Meza, Ronald Regino y Dilia Mercado, por su valioso apoyo desinteresado en el desarrollo de mis experimentos y por siempre haber estado dispuestos a ayudarme cuando lo necesité.

Agradezco al Dr. Luis Franco por su indispensable ayuda con el equipo de espectrofluorometría y donación de reactivos y utensilios que llegué a necesitar. También al Dr. Eduardo Egea de la Universidad del Norte por la donación de muestras de sueros de pacientes alérgicos al maní utilizadas como controles positivos en este estudio.

# Contenido

1. Resumen.....	11
2. Introducción. ....	13
3. Marco teórico. ....	13
3.1. Los AGEs y la dieta occidental.....	18
3.2. Receptores de AGEs y vías de señalización. ....	19
3.2.1. El complejo de receptores para AGEs.....	20
3.2.2. Familia de los receptores basurero (SR).....	21
3.2.3. Receptores basurero clase A (SR-A).....	22
3.2.4. Receptores basurero clase B (SR-B). ....	23
3.2.5. Receptores de manosa (receptor M).....	23
3.2.6. Receptor para los productos finales de la glicación avanzada.....	24
3.2.7. Vías de señalización. ....	27
3.3. AGEs y alergias. ....	28
4. Hipótesis. ....	35
5. Objetivo general.....	35
6. Objetivos específicos.....	35
7. Metodología general del estudio. ....	36
7.2. Selección de los casos de rinitis alérgica.....	36
7.3. Selección de los controles. ....	37
7.4. Criterios de inclusión.....	37
7.5. Criterios de exclusión.....	37
8. Metodología específica del estudio. ....	38
8.1. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford. ....	38
8.2. Cuantificación de AGEs por espectrofluorometría. ....	38

8.3.	Cuantificación de AGEs mediante kit de ELISA tipo sándwich.....	39
8.4.	Cuantificación de IgE anti-AGEs por ELISA. ....	40
9.	Análisis estadísticos. ....	42
10.	Consideraciones éticas. ....	43
11.	Resultados.....	44
11.1.	Características demográficas de la población estudiada. ....	44
11.2.	Análisis de AGEs medidos por espectrofluorometria en los diferentes grupos.....	46
11.3.	Análisis de AGEs medidos por ELISA en los diferentes grupos.....	47
11.4.	Análisis de la respuesta de tipo IgE anti-AGEs. ....	47
11.6.	Análisis de correlación de IgE anti-AGEs frente a AGEs medidos por ELISA y espectrofluorometria en los diferentes grupos.....	48
11.7.	Análisis de correlación de AGEs y de anticuerpos de tipo IgE anti-AGEs con variables clínicas. ....	49
11.8.	Los AGEs medidos por espectrofluorometria no se correlacionaron con los AGEs medidos por ELISA. ....	52
12.	Discusión. ....	54
13.	Conclusiones. ....	57
14.	Perspectivas futuras.....	57
15.	Posibles sesgos del estudio.....	58
16.	Referencias.....	59
17.	Financiamiento. ....	66
18.	Anexos.....	67

## Índice de tablas.

<b>Tabla 1.</b> Datos demográficos de la población de estudio.....	<b>45</b>
<b>Tabla 2.</b> Tabla de correlación entre IgE anti-AGEs contra AGEs medidos por ELISA y espectrofluorometria en los diferentes grupos de estudio.....	<b>49</b>
<b>Tabla 3.</b> Tabla de correlación entre AGEs e IgE anti-AGEs contra variables clínicas y demograficas en los diferentes grupos de estudio .....	<b>51</b>
<b>Tabla 4.</b> Tabla de analisis de regresion lineal.....	<b>53</b>

## Índice de figuras.

<b>Figura 1.</b> Diagrama de Hodge de la reacción de Maillard paso a paso.....	<b>16</b>
<b>Figura 2.</b> Principales productos finales de la glicación avanzado clasificados según peso molecular.....	<b>17</b>
<b>Figura 3.</b> Representación gráfica de los receptores para los productos finales de la glicación avanzada.....	<b>20</b>
<b>Figura 4.</b> Representación esquemática del RAGE y sus ligandos. ....	<b>26</b>
<b>Figura 5.</b> Gen <i>AGEREI</i> . ....	<b>26</b>
<b>Figura 6.</b> Resumen de los efectos de los AGEs sobre la alergenicidad al mediar respuestas innatas y adaptativas.....	<b>29</b>
<b>Figura 7.</b> Diagrama de flujo de las muestras utilizadas para el estudio de casos y controles en pacientes con rinitis alérgica.....	<b>36</b>
<b>Figura 8.</b> Diagrama de pasos para ensayo de ELISA sándwich para cuantificar AGEs.....	<b>40</b>
<b>Figura 9.</b> Diagrama de pasos para ensayo de ELISA para cuantificar IgE anti-AGEs.....	<b>42</b>
<b>Figura 10.</b> Cuantificación de AGEs por espectrofluorometría en los diferentes grupos estudiados. ....	<b>46</b>
<b>Figura 11.</b> Cuantificación de AGEs por ELISA sándwich en los diferentes grupos estudiados. ....	<b>47</b>
<b>Figura 12.</b> Cuantificación de IgE anti-AGEs por ensayo de ELISA indirecto en los diferentes grupos estudiados. A-B. expresado en OD. C-D expresado en KU/l....	<b>48</b>

**Figura 13.** Inhibición de ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA), usando un pool de sueros con IgE positiva para AGEs..... ¡Error! Marcador no definido.

**Figura 14.** Gráfica de correlación de Spearman ( $\rho$ ) entre AGEs medidos por espectrofluorometría frente a AGEs medidos por ELISA..... **52**

## Abreviaturas.

AGE-BSA:	Albumina sérica bovina glicada con productos finales de glicación avanzada.
AGEs:	Productos finales de glicación avanzada.
ANOVA:	Análisis de la varianza.
AOPP:	Productos proteicos de oxidación avanzada.
AU:	Unidades arbitrarias.
BSA:	Albumina sérica bovina.
CD:	Grupos de diferenciación.
CEL:	Carboxietil-lisina.
CML:	Carboximetil-lisina
CPA:	Célula presentadora de antígenos.
DAMP:	Patrón molecular asociado al daño.
DC:	Células dendríticas.
GOLD:	Enlaces cruzados de dimero de Glioxal-lisina.
IgE:	Inmunoglobulina E.
IL:	Interleucina.
ILC:	Células linfoides innatas.
MGO:	Metilglioxal.
MOLD:	Enlaces cruzados de dimero de Metilglioxal-lisina.
OD:	Densidad óptica.
PBS:	Buffer fosfato salino.
RA:	Rinitis alérgica.
RAGE:	Receptor de productos finales de glicación avanzada.
RM:	Reacción de Maillard.
SR:	Receptor de tipo barrendero.
sRAGE:	Receptor soluble de productos finales de glicación avanzada.
TMB:	Tetrametilbencidina.

## 1. Resumen.

Se estima que la prevalencia de rinitis alérgica (RA) oscila entre en 20 al 30% de la población mundial y genera altos costos en salud pública, los mecanismos fisiopatológicos involucrados en la etiología de esta condición aún no se han elucidado de manera precisa y debido a que afecta a gran parte de la población es de sumo interés el estudio de sus desencadenantes; además, su prevalencia ha aumentado exponencialmente en las últimas décadas, se ha postulado que los productos finales de la glicación avanzada (AGEs) podrían estar involucrados en la fisiopatología de las enfermedades alérgicas y al aumento de estas, al ejercer efectos deletéreos mediante varios mecanismos, entre ellos, el entrecruzamiento de proteínas, el favorecimiento de los estados de oxidación, la interacción con células inmunes mediante receptores de membrana y la generación de nuevos epítomos o el enmascaramiento de estos en los alérgenos. El objetivo de este trabajo fue analizar la relación entre los niveles de AGEs y de los anticuerpos de tipo IgE anti-AGEs, en muestras de suero de pacientes con RA y evaluar su relación con la severidad de esta. Para ello, se realizó un estudio de casos y controles en donde se midieron AGEs por dos métodos distintos (ELISA y espectrofluorometría), además de anticuerpos de tipo IgE anti-AGEs, en el suero de 200 individuos que incluían 60 controles, 70 pacientes con RA leve y 70 pacientes con RA moderada/severa.

Se encontró que las personas con RA tenían concentraciones mayores de AGEs medidos por espectrofluorometría y ELISA ( $409 \pm 70$  AU/g prot,  $n=140$ ;  $176 \pm 66$  ng/ml,  $n=104$ , respectivamente) frente a controles ( $370 \pm 22$  AU/g prot,  $n=60$ ;  $151 \pm 27$  ng/ml,  $n=52$ ) y se encontró significancia estadística ( $p < 0.0001$  y  $0.0031$  respectivamente), sin embargo, no se encontraron diferencias significativas según su severidad; también se encontró que los individuos con RA tenían más títulos de anticuerpos de tipo IgE anti-AGEs ( $0.5$  ( $0.01-1.8$ ) KU/l,  $n=104$ ) frente a controles ( $0.2$  ( $0.01-0.4$ ) KU/l,  $n=52$ ) pero no hubo diferencia significativa estadísticamente, tampoco al evaluar según su severidad.

Con este trabajo se considera que las personas con RA tienen mayores títulos de AGEs lo que es muestra de un mayor estado inflamatorio crónico y de mayor estrés oxidativo; estos no se relacionaron con la severidad de la RA en los diferentes grupos evaluados, además los niveles de IgE anti-AGEs son mayores en las personas con RA, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas, por lo que se requieren mayores estudios a futuro para evaluar estas relaciones. los análisis del área bajo la curva ROC a pesar de que mostraron cierta discriminación entre los diferentes grupos de casos frente a controles, estos datos no son prometedores para que los AGEs y anticuerpos de tipo IgE anti-AGEs sean usados en el algoritmo diagnóstico de la RA.

**Palabras clave:** Rinitis alérgica, productos finales de glicación avanzada, espectrofluorometría, oxidación, epítomos.

## **2. Introducción.**

Las enfermedades alérgicas entre ellas la RA han aumentado de manera dramática en las últimas décadas, datos conservadores de la OMS estiman que aproximadamente 500 millones de personas en todo el mundo padecen de RA, generando aumento en la morbilidad por enfermedades crónicas no transmisibles, aumento de los días laborales y escolares perdidos y del gasto económico; por lo que se le ha considerado un problema de salud pública mundial. Los mecanismos inflamatorios en RA son variables, involucrando un contexto genético, la exposición a alérgenos y la interacción con células como linfocitos T y B, eosinófilos, basófilos y células presentadoras de antígenos; Las hipótesis y los modelos actuales no explican adecuadamente el aumento exagerado de enfermedades alérgicas en los últimos años y se ha considerado que quizás no ha sido debido a cambios en la secuencia del material genético y tal vez este incremento pueda estar siendo influenciado por los cambios a nivel dietario y del estilo de vida que han predisuesto a la inflamación crónica y sesgado a una respuesta alérgica.

Entre los componentes de la dieta que más han llamado la atención con el desbalance a la alergia se han propuesto a los AGEs, los cuales son aductos químicos altamente heterogéneos que se forman por la interacción no enzimática entre los grupos amino de los aminoácidos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos y el grupo carboxilo de los azúcares reductores; son inductores de estrés oxidativo mediante la activación de la vía de la nicotinamida, agregan proteínas mediante la formación de enlaces cruzados y pueden generar neoepitopos en alérgenos o enmascararlos, además pueden interactuar con receptores de patrones de daño y activar vías inmunes adaptativas e innatas y sesgar las respuestas de tipo Th2; pero sus efectos en los sistemas biológicos van más allá ya que se les ha asociado a múltiples condiciones de salud; sin embargo, muy pocos estudios han sido realizados para clarificar la relación de los AGEs con RA en nuestro entorno tropical.

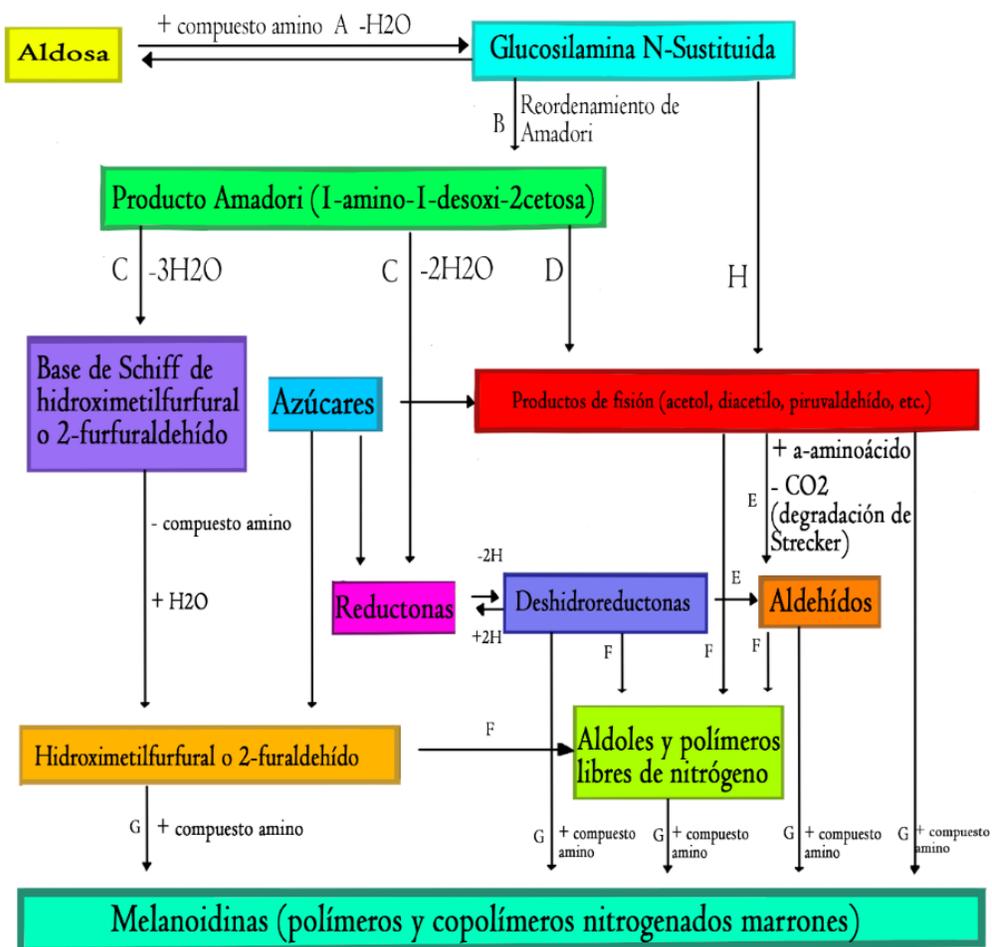
## **3. Marco teórico.**

La rinitis alérgica (RA) es un trastorno inflamatorio de las vías aéreas superiores mediado por IgE tras la exposición a alérgenos y está caracterizada por estornudos, picazón, rinorrea y congestión nasal(1), afecta a gran parte de la población mundial siendo una de las enfermedades crónicas más comunes en los países de ingresos altos, con una prevalencia de hasta el 50% en algunos países(2). En Colombia, según un estudio publicado en el 2004 por Caraballo y cols., la prevalencia de RA en la población general es del 22,6%(3) a nivel mundial según datos conservadores de la organización mundial de la salud se estima que 500 millones de personas padecen de RA, además su prevalencia y severidad ha aumentado en las últimas décadas de manera exponencial(4); el causal del aumento en la prevalencia de enfermedades alérgicas, no se conoce de manera exacta, pero se considera que los cambios en la secuencia del genoma no han sido los causales de este aumento, ya que a nivel de cambios evolutivos ha sido muy poco tiempo para que estos cambios se gesten, sin embargo, se ha considerado que la dieta y el estilo de vida actual podrían estar causando este incremento, entre los determinantes dietarios que podrían estar generando la predisposición hacia un estado alérgico y llevar al aumento de la RA, encontramos los AGEs, los cuales en estudios in vivo e in vitro en modelos de asma y alergia alimentaria han demostrado un papel en la inducción de un estado inflamatorio a través de su receptor (RAGE) que favorece la sensibilización alérgica(5–7).

Los AGEs son sustancias químicas heterogéneas que se forman de manera endógena en el cuerpo humano y de manera exógena, especialmente, en los alimentos durante el procesamiento térmico; esto mediante la reacción de glicación no enzimática o reacción de Maillard (RM) la cual fue descrita en 1912 por el francés Louis Camille Maillard, esta acontece por la interacción de los azúcares no reductores con los aminoácidos libres, proteínas, lípidos y ácidos polirribonucleicos(8).

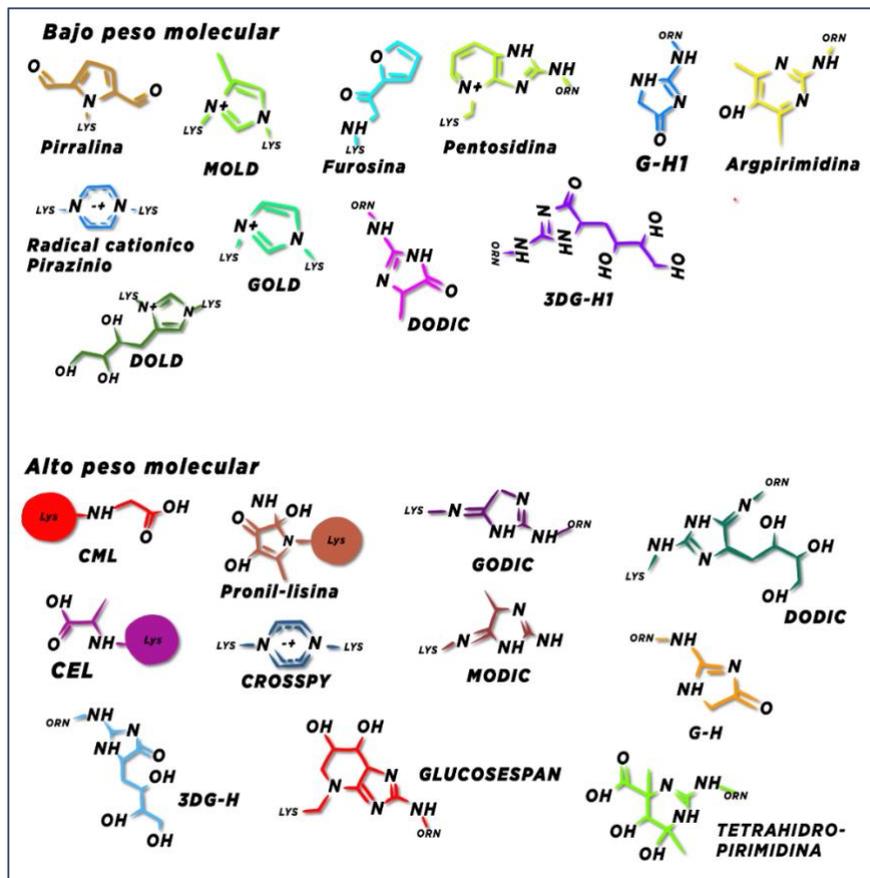
La formación de los AGEs es un proceso químico complicado que implica reacciones de varios pasos; durante la RM, los grupos carbonilo electrofílicos de glucosa u otros

azúcares reactivos reaccionan con grupos amino de aminoácidos (especialmente de residuos básicos de lisina o arginina) formando una base de Schiff no estable, un reordenamiento adicional conduce a la formación de una cetoamina más estable (productos de Amadori). Las bases de Schiff y los productos Amadori son productos de reacción reversibles. Sin embargo, pueden reaccionar de forma irreversible con residuos de aminoácidos de péptidos o proteínas para formar aductos de proteínas o enlaces cruzados de proteínas; el modelo de la RM más aceptado es el del químico estadounidense John Hodge, quien en 1953 caracterizó la reacción en 7 pasos, denominados A-G(9), En 1986, Nursten reconoció el trabajo del científico japonés Namiki en relación con la degradación por radicales libres de los intermedios de Maillard, agregando el Paso H al esquema original, este paso se conoce como la vía de Namiki e implica la formación mediada por radicales libres de productos de fisión de carbonilo a partir del azúcar reductor(10), 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) **(ver figura 1)**.



**Figura 1. Diagrama de Hodge de la reacción de Maillard paso a paso.** A) La reacción inicial entre un azúcar reductor y un grupo amino forma una base de Schiff inestable; B) La base de Schiff se reorganiza lentamente para formar el producto Amadori; C) Degradación del producto Amadori; D) Formación de compuestos reactivos de carbonilo y dicarbonilo; E) Formación de aldehídos de aminoácidos y amino cetonas; F) Condensación aldólica de furfurales, reductonas y aldehídos producidos en los Pasos C, D y E sin intervención de compuestos amino; G) Reacción de furfurales, reductonas y aldehídos producidos en los Pasos C, D y E con compuestos amino para formar melanoidinas; H) Formación mediada por radicales libres de productos de fisión de carbonilo a partir del azúcar reductor (vía Namiki). **tomado Jennifer M. Ames, Control of the Maillard**

Como alternativa, pueden sufrir más reacciones de oxidación, deshidratación, polimerización y degradación oxidativa para dar lugar a muchos otros AGEs y clasificarse según Gerdemann y cols., en melanoidinas tanto de bajo (Low Molecular Weight, LMWM, <12kDa) y alto peso molecular (High Molecular Weight, HMWM, >12kDa) en base a 12Kda (11)(Ver figura 2).



**Figura 2. Principales productos finales de la glicación avanzado clasificados según peso molecular.** Modificado de Poulsen et al. Advanced glycation end products in food and their effects on health. Food Chem Toxicol 2013; 60:10–37.

En estos años, se han identificado muchos AGEs in vivo e in vitro. Teniendo en cuenta la diversidad de estructuras químicas y la capacidad de emitir fluorescencia Perrone y cols., clasificaron los AGEs en cuatro grupos diferentes(12).

Estos son los siguientes:

- (1) Fluorescentes y reticulados (fluorescent/cross-linked).
- (2) Fluorescentes y no reticulados.
- (3) No fluorescentes y no reticulados.
- (4) No fluorescentes y reticulados.

Entre los AGEs fluorescentes reticulados encontramos la pentosidina, pentodilisina, crossline, vesperlisina A y vesperlisina C. La argpirimidina es un ejemplo típico de estructura de AGEs que pertenece a la familia de AGEs fluorescentes no reticulados; Los AGEs no fluorescentes y no reticulados importantes incluyen carboximetil-lisina (CML), carboxietil-lisina (CEL), pirralina e imidazolonas. Se han identificado otros AGEs reticulados y no fluorescentes en este grupo encontramos los enlaces cruzados de dilisina de imidazolio, también conocidos como enlaces cruzados de dímero de glioxal-lisina (GOLD) o dímero de metilglioxal-lisina (MOLD)(12,13).

### **3.1. Los AGEs y la dieta occidental.**

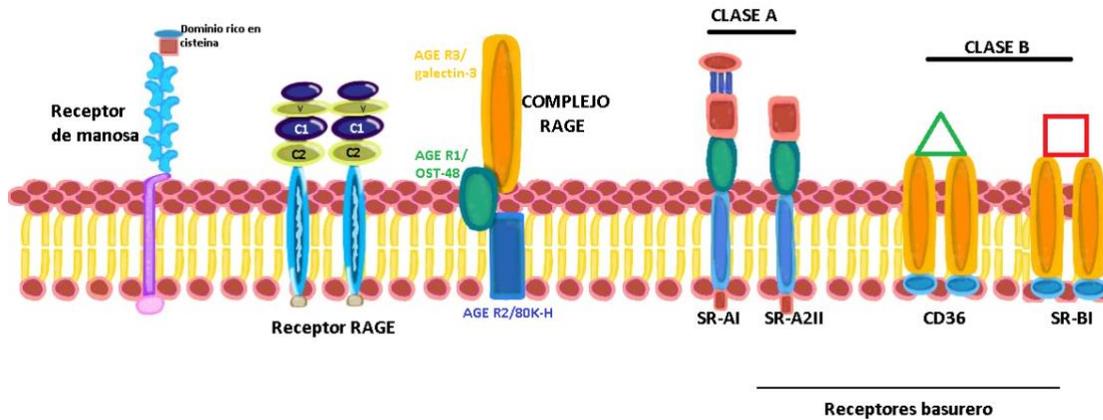
La exposición de los humanos a los productos dañinos para la salud en el último siglo ha aumentado exponencialmente y la ingesta de alimentos ultra procesados ha aumentado de un 11 a 35%, no hay duda de que los productos tóxicos ingeridos interfieren con la fisiología de los sistemas biológicos y se han asociado con la oleada de enfermedades crónicas como diabetes, cáncer y las enfermedades cardiovasculares que han desplazado a las enfermedades infecciosas como principal causa de muerte(14). En la actualidad se ha generado un fuerte cambio

en relación con la alimentación, pasando de una dieta rural rica en alimentos funcionales con un alto contenido de antioxidantes(15), polifenoles y carotenoides(16–18) a una dieta occidental rica en productos nocivos para la salud entre ellos los AGEs(19,20). La dieta occidental se caracteriza por un alto contenido de carnes rojas, productos ultraprocesados, alimentos ricos en grasas trans, poliinsaturadas e hidrogenadas(21,22), azúcares(23), colorantes, granos refinados, potenciadores del sabor etc.(24); los alimentos procesados se han vuelto muy populares hoy en día debido a su sabor, conveniencia y bajo costo, la fabricación de estos alimentos implica altas temperaturas para su procesamiento lo cual promueve la formación de AGEs. Estos pueden ingresar al organismo mediante la absorción de alimentos estando preformados sobre todo con dietas que favorecen los estados hiperglucémicos; la dieta occidental puede contribuir significativamente a la reserva de AGEs ya que es rica en estos, aproximadamente el 10% de los AGEs dietarios se absorben sistémicamente y se estima que solo un tercio se excreta(25). Los AGEs se producen en grandes cantidades, particularmente con proteínas y grasas animales que se cocinan a altas temperaturas, sobre todo cuando se fríen, asan, hornean al microondas o se almacenan por largo tiempo(26), además los tiempos de cocción inciden de manera directamente proporcional en la concentración de AGEs(27), en cambio el hervido o la cocción al baño de maría reduce el contenido de AGEs en los alimentos(28,29).

### **3.2. Receptores de AGEs y vías de señalización.**

Los AGEs generados mediante la RM aumentan el potencial inflamatorio y predisponen a la aparición de trastornos crónicos mediante tres mecanismos diferentes como el entrecruzamiento con proteínas y/o deformación estructural, por su bioacumulación en los tejidos y por la interacción con receptores y activación de vías de señalización. Entre los receptores que tienen interacción con los AGEs podemos destacar a los pertenecientes al complejo de receptores para AGEs en donde se incluyen: OST-48/AGE R-1; 80K-H/AGE R-2 y Galectin-R-3/AGE-R37; receptores de la familia basurero en donde se incluyen los clase A como SR-A1,

SR-A2 y los clase B como CD36 y SR-B1(30–33); el receptor RAGE y su versión soluble (sRAGE)(34,35) y los receptores de manosa (36)(Ver figura 3).



**Figura 3. Representación gráfica de los receptores para los productos finales de la glicación avanzada.** Modificado de Gupta RK, Gupta K, Sharma A, Das M, Ansari IA, Dwivedi PD. Maillard reaction in food allergy: Pros and cons. Crit Rev Food Sci Nutr. 2018;58(2):208–26.

### 3.2.1. El complejo de receptores para AGEs.

El complejo de receptores para AGEs tiene 3 componentes que están asociados con la absorción endocítica de proteínas modificadas con AGEs junto con la señalización relacionada a estos. El primer componente de receptores para AGEs también conocido como OST-48/AGE-R1 es una proteína integral de membrana plasmática con un solo dominio transmembrana y un dominio extracelular largo, se sabe que es activo en la unión de proteínas modificadas por AGEs en la superficie de varias células que incluyen macrófagos, linfocitos T, células endoteliales, células mesangiales, fibroblastos, músculo liso y células neuronales, el OST-48 activado previene la generación de estrés oxidativo al inhibir vías de señalización(37).

El segundo componente del complejo receptor para AGEs también está relacionado

con el tráfico intracelular de los AGEs y se denomina AGE-R2/80K-H, se encuentra en el citosol y en la membrana sin tener un dominio transmembrana, aunque su papel biológico es poco conocido se sugiere que después de activado puede inducir la señalización mediante fosforilación de tirosina quinasa C (PKC) y activación del receptor del factor de crecimiento fibroblástico (FGF), además algunos estudios lo han relacionado como un potenciador de la captación de glucosa mediada por GLUT-4(37).

El tercer componente es un miembro de la familia de lectinas ligadoras conocido como AGE-R3/Galactin.3, que generalmente se une con lactosa o galactosa, este se identificó por primera vez en macrófagos activados como marcador de superficie celular, sin embargo, estudios posteriores revelaron que también se expresa en monocitos, células asesinas naturales, eosinófilos, linfocitos T y B activados y DC, expresándose en diferentes partes de la célula como el núcleo, citoplasma, membrana celular y medio extracelular(38).

### **3.2.2.Familia de los receptores basurero (SR).**

Los SR se describen como un grupo de receptores expresados en la superficie de los macrófagos, células dendríticas y mastocitos. Los macrófagos y las células dendríticas pueden tener un papel fundamental en la alergia alimentaria, reacción en la que actúan como principales células presentadoras de antígeno, mientras que los mastocitos se consideran como células efectoras principales en la alergia alimentaria ya que secretan varias citocinas Th2 y mediadores alérgicos que participan en muchas complicaciones relacionadas con la alergia. Por lo tanto, los receptores pertenecientes a la familia SR han suscitado preocupaciones hacia la patogenia de la alergia alimentaria causada por los AGEs, una de las características principales de los SR es que son endocíticos, por lo que sus ligandos deben de ser primero ingresados a la célula y luego procesados vía lisosomal para unirse a ellos

y generar las cascadas de activación; El SR puede unirse con un amplio espectro de ligandos polianiónicos endógenos y exógenos que incluyen proteínas modificadas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos; la familia SR está categorizada como receptores clase A, B, E y H; siendo de mayor importancia para la unión a AGEs los clase A y clase B(31–33,39,40).

### **3.2.3.Receptores basurero clase A (SR-A)**

Los SR clase A son un grupo de receptores altamente conservados y se encuentran en varias especies incluidas la humana y murina; se unen a una gran variedad de ligandos polianiónicos de origen artificial, microbiano y endógeno, incluyendo polirribonucleótidos, polisacáridos junto con proteínas glicadas exógenamente, están restringidos al linaje mieloide y se expresan sólo en macrófagos de tejidos maduros y células dendríticas derivadas tanto de la médula ósea como del bazo; el SR-A se encuentra en 3 isoformas a saber: SR-AI/II/III se producen mediante el empalme alternativo de un solo gen(30).

Los SR-AI y II tienen una estructura trimérica compuesta de 3 proteínas transmembrana tipo II de 80 KDa, estas proteínas tienen un dominio intracelular N-terminal, un dominio transmembrana, una región espaciadora, un dominio helicoidal en espiral, un dominio colágeno de unión a ligando y un dominio rico en cisteína C-terminal; la capacidad de unión de estos dos receptores es similar y juegan un papel importante en la absorción de antígenos, degradación y posterior presentación por parte de las células presentadoras de antígenos (CPA)(40).

El SR-AIII no se le conoce ninguna actividad funcional y queda atrapado en el retículo endoplasmático; La afinidad vinculante de los AGEs con los SR-AI y II se confirmó en macrófagos peritoneales de ratones inactivados para estos, en donde la degradación de AGE-BSA se redujo significativamente en comparación con los macrófagos no modificados. Además, se encontró que estos receptores están involucrados en la captación de alérgenos glicosilados y presentados a través de la

vía del MHC clase II por las células dendríticas(30,31).

### **3.2.4.Receptores basurero clase B (SR-B).**

El SR-B son un grupo de dos miembros a saber: CD36 y SR-BI; ambos receptores son glicoproteínas que tienen un asa extracelular con sitios de glicosilación que pueden actuar como sitios de unión a ligando, dos dominios transmembrana y dos colas intracelulares cortas(32,33).

CD36 se encuentra en macrófagos, plaquetas, adipocitos y algunas células epiteliales, así como células endoteliales, mientras que SR-BI se expresa en monocitos, macrófagos células dendríticas y hepatocitos. Estudios han revelado que ambos miembros de la familia de receptores SR-B capturan y endocitan los AGEs en las CPA. Los AGEs antigénicos captados por las DC a través del SR-BI se presentan mediante la vía del MHC-I, mientras que los incorporados por el CD-36 están dirigidas por la vía del MHC-I y II(32,33).

### **3.2.5.Receptores de manosa (receptor M).**

Los receptores de manosa absorben los alérgenos alimentarios nativos y glucosilados por varias células inmunes, este es un receptor de lectina transmembrana de tipo C que tiene dominios muy conservados que participan en el reconocimiento de carbohidratos. El receptor de manosa se expresa en la membrana plasmática de macrófagos, células dendríticas, monocitos y células endoteliales de la piel y del hígado. el receptor de manosa está formado por un dominio intracelular, un dominio transmembrana, 8 dominios de reconocimiento de carbohidratos (CRD), un dominio de repetición de fibronectina tipo II y un dominio rico en cisteína N-terminal(36). La secuencia conservada de CRD tiene afinidad de unión por fucosa, manosa o residuos de glucosa en proteínas glicosiladas, mientras que los restos de azúcares sulfatados de glicoproteínas son reconocidos por el dominio extracelular rico en cisteína. La ovoalbúmina (OVA) nativa es rica en

manosa y se une a este receptor y el OVA modificado con AGEs también(41), se ha encontrado que el alérgeno de gato Fel d 1 se reconoce por el dominio rico en cisteína de los RM presentes en las DC y juegan un papel importante en la sensibilización alérgica (42). Por lo tanto, se requiere una consideración cuidadosa para evaluar la contribución del receptor de manosa en la patogenia relacionada con los AGEs ya que no se ha investigado completamente.

### **3.2.6. Receptor para los productos finales de la glicación avanzada (RAGE).**

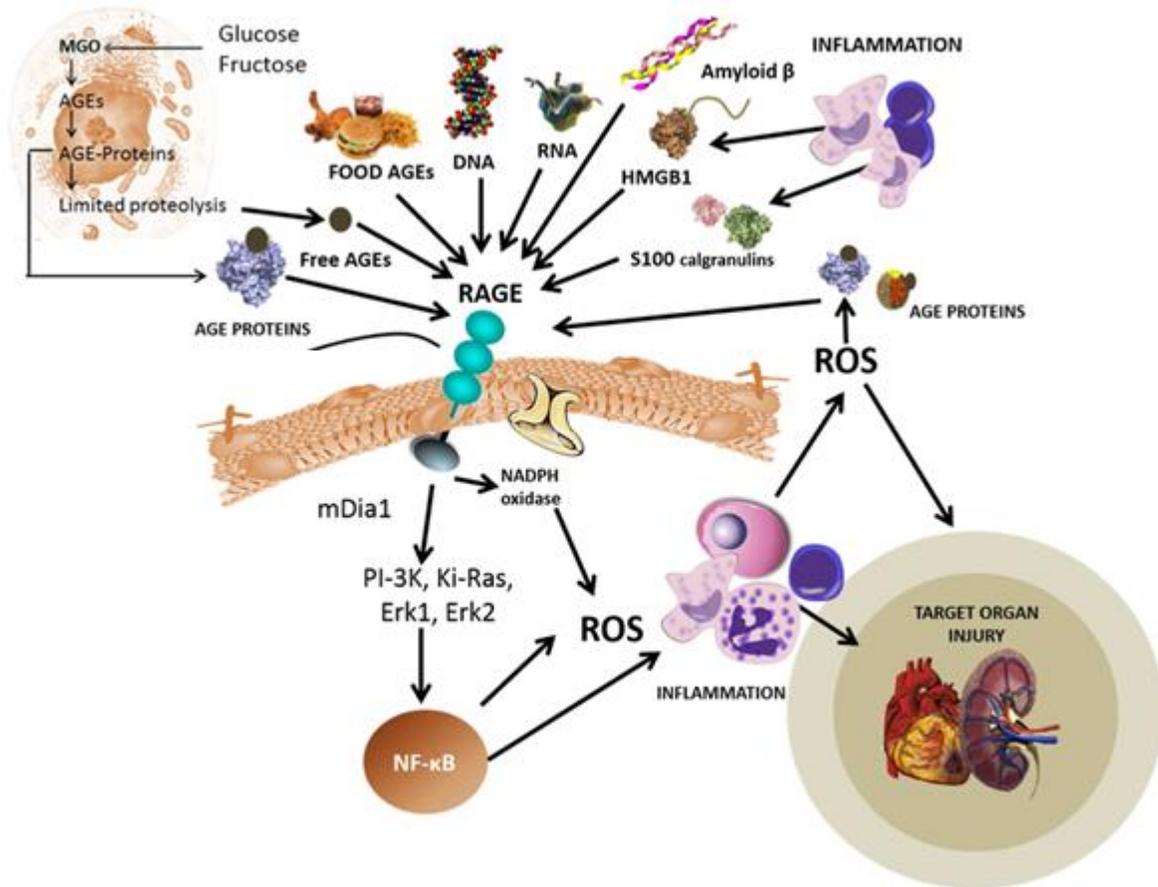
El RAGE es una proteína transmembrana de 45 KDa que pertenece a la superfamilia de inmunoglobulinas y actúa como un factor clave en la inducción de respuestas inmunológicas inducidas por los AGEs(43). El RAGE es una estructura que contiene dominios multiligando, compuestos de un dominio extracelular N-terminal que contiene una región variable y dos dominios similares a la región constante, un dominio transmembrana y un dominio C-terminal intracelular. El dominio similar a la región variable está involucrado en la unión del ligando, mientras que el C terminal participa en la transducción de señales. El RAGE pertenece a la familia de receptores de reconocimiento de patrones (PRR) y su expresión se encuentra en varios tipos de células inmunes, incluyendo mastocitos, DC, macrófagos, monocitos, linfocitos T y linfocitos B, lo que sugiere que su papel es crítico en la inducción de las respuestas inmunes causadas por los AGEs en los procesos inflamatorios(44,45). Los RAGEs pueden actuar como receptores de integrinas (presentes en los leucocitos) y ser responsables del reclutamiento de células inflamatorias, activación de diversas respuestas celulares y de la regulación positiva de factores proinflamatorios que resultan en la producción de citocinas e inflamación crónica. Estos se encuentran en dos formas principales en las células; una forma transmembrana ligada a la superficie celular y una forma secretora (sRAGE) denominada endógena(46). La forma transmembrana interactúa con la

porción glucosilada de la proteína en lugar de su forma nativa; mientras que el RAGE secretor captura su ligando para protegerlo de lesiones causadas por los AGEs y podría ser un marcador inflamatorio(47,48). Existen dos formas solubles principales de este receptor detectadas en la sangre y otros fluidos corporales, las cuales carecen de sus dominios transmembrana y citoplasmático que se generan por escisión proteolítica del RAGE unido a membrana y por empalme alternativo del gen(49), la función que desempeña sRAGE en la biología humana ha sido objeto de un debate sustancial, una opinión generalizada es que sRAGE cumple una función antiinflamatoria protectora al actuar como un receptor señuelo, uniéndose a los ligandos de RAGE y bloqueando así su interacción con el RAGE unido a la membrana, en apoyo de esta posibilidad, los experimentos en modelos animales de diabetes han demostrado que la administración de sRAGE recombinante mejora la función vascular y renal, reduce la lesión isquémica del miocardio, así como la aterosclerosis, la inflamación vascular y otras complicaciones diabéticas(50).

Investigaciones sugieren que el alérgeno alimentario modificado con AGEs puede provocar la respuesta inmune celular mediante la activación del RAGE. Este además reconoce la estructura tridimensional de las proteínas como láminas  $\beta$  y fibrillas que representan la conformación del alérgeno glicosilado (51). La afinidad vinculante del RAGE para AGEs derivados de alimentos depende de los grupos amino libres de aminoácidos participantes, sin embargo, su cinética de afinidad se encuentra fuertemente correlacionada con los azúcares participantes(52).

Líneas de evidencia respaldan la hipótesis de que las proteínas modificadas con AGEs pueden inducir una respuesta inmunogénica. Se encontró en un estudio en células Caco-2 (modelo para epitelios intestinales) en que la activación de RAGE por AGEs indujo una respuesta inflamatoria siguiendo la ruta MAP-quinasa. Otro hallazgo inmunológico ha demostrado que el RAGE expresado en DC reconoce preferentemente OVA modificado con AGE en lugar de su forma no modificada y en consecuencia, una respuesta inmune sesgada por Th2 se desplazó hacia alergia. Además, estudios realizados con el maní demostraron que al modificar sus

alergenos Ara h1 y Ara h3 con CML estos fueron reconocidos preferentemente por RAGE unido a la membrana, mientras que el alergeno Ara h2 no modificado no mostró afinidad de unión al receptor RAGE (Ver figura 4)(53).

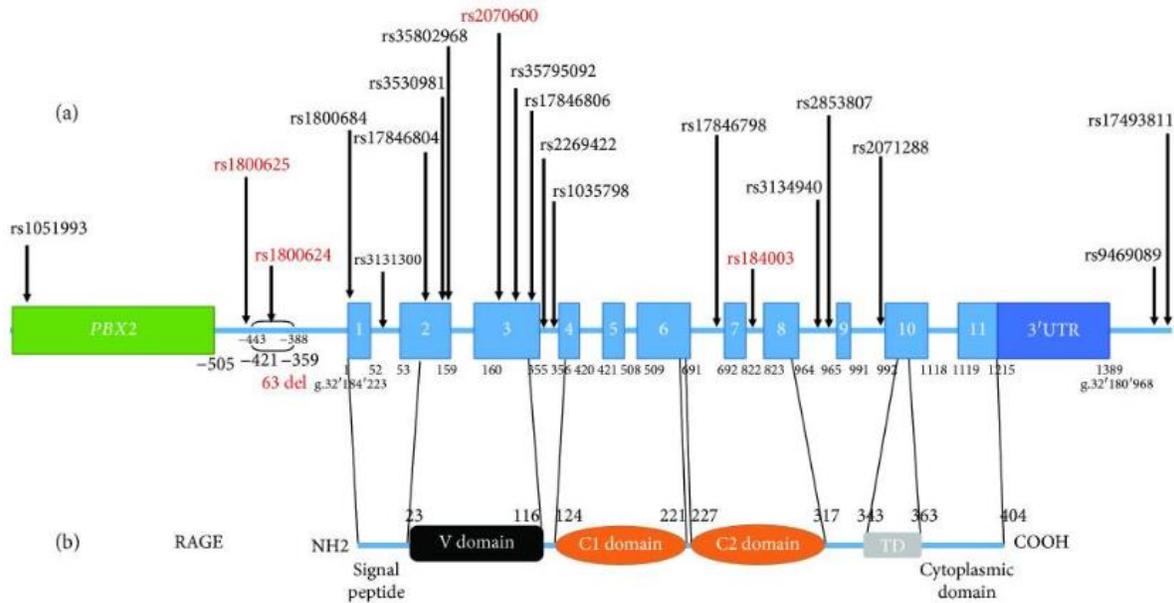


**Figura 4. Representación esquemática del RAGE y sus ligandos.**

Tomado de Chaudhuri J, Bains Y, Guha S, Kahn A, Hall D, Bose N, et al. The Role of Advanced Glycation End Products in Aging and Metabolic Diseases: Bridging Association and Causality. Vol. 28, Cell Metabolism. Cell Press; 2018 p. 337–52.

El gen *AGERE1* (que codifica las proteínas RAGE) es un gen complejo con muchas transcripciones con una regulación compleja e incomprensible. RAGE es un gen altamente polimórfico, con alrededor de diez polimorfismos predominantemente

estudiados en la literatura disponible(54) (**Ver figura 5**). Muchos de estos polimorfismos se han asociado a múltiples estados viciosos de la salud como el rs2070600 que se asocia a microangiopatía diabética, artritis reumatoide, cáncer, Alzheimer(55); el rs1800625 con cáncer y lupus(56), el rs184003 con arteriopatía coronaria, lupus y cáncer de mama(57), el rs1800624 con complicaciones de la diabetes tipo I(58).



**Figura 5. Gen *AGERE1*.** a) Representación de la transcripción RAGE predominante en humanos con los principales polimorfismos descritos para esta forma hasta la fecha; los polimorfismos en rojo son los más comunes. (b) Representación de la proteína RAGE humana correspondiente a la transcripción de RAGE. **Tomado de Serveaux-Dancer, M., et al. Pathological Implications of Receptor for Advanced Glycation End-Product (*AGER*) Gene Polymorphism. *Disease markers*, 2019, 2067353.**

### 3.2.7. Vías de señalización.

El RAGE después de la unión con su ligado, puede desencadenar varias vías de señalización, incluidas MAPK (ERK, JNK y p38), PI3K y también la ruta

JAK/STAT. Estas vías surten efecto a través de la activación de NFκB y de la transcripción / traducción de diversas citocinas inflamatorias(59).

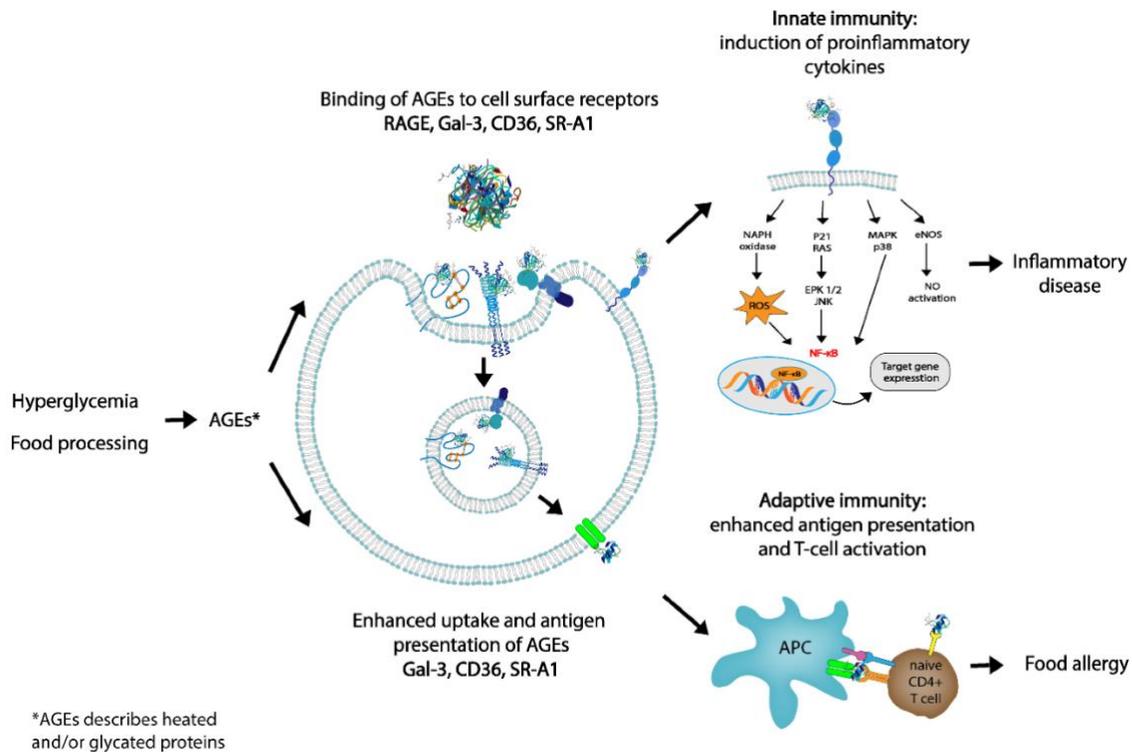
En contra del receptor RAGE, los receptores de la familia SR endocitan sus ligandos como los AGEs derivados de los alimentos y los alérgenos alimentarios en vesículas recubiertas de clatrina que conducen a la activación de PLCγ1, PI3K, PKC, MAPKs, para producción de caspasas y citocinas. SR-B puede activar Lyn, Fyn p44 / 42 MAP quinasa y estimular la regulación positiva de TNF-α(60).

Con respecto al receptor de manosa, CD206 presente en las CPA (DC y macrófagos) median la absorción de alérgenos nativos y glicosilados y en consecuencia, generan polarización inducida de células T que pueden conducir a la aparición de sensibilización alérgica. Estos eventos pueden tener lugar a través de una serie de vías de señalización, incluida la activación de MAPKs, la regulación positiva de la producción de NFκB y citocinas son eventos cruciales y comunes. Por lo tanto, se puede predecir que estos receptores de AGEs pueden actuar de manera sinérgica o cada receptor individualmente puede desencadenar la cascada de señalización después de la exposición a alérgenos glicosilados(36).

### **3.3. AGEs y alergias.**

Se ha sugerido que una dieta occidental, normalmente alta en AGEs, tiene un efecto sobre la alergenicidad a través de LT auxiliares (Th2), y sobre la producción de citocinas incluidas IL-4, IL-5 IL-13, IL-1, IL -6, IL-8, TNF-α y alarminas(61). La RM induce modificaciones conformacionales y químicas de las proteínas no solo a nivel de reconocimiento de IgG/IgE, sino también, al aumentar la interacción y el reconocimiento de estas proteínas modificadas por las células presentadoras de antígenos (CPA); esto afecta sus propiedades biológicas, incluida la digestibilidad, la biodisponibilidad, la inmunogenicidad y en última instancia, su alergenicidad. Las CPA poseen varios receptores que reconocen estructuras de glicación, que incluyen, el receptor para productos finales de glicación avanzada (RAGE),

receptores basurero (SR), galectina-3 y CD36. A través de estos receptores, las estructuras de glicación pueden influir en el reconocimiento, absorción y procesamiento de antígenos de alérgenos por células dendríticas (DC) y monocitos (**Ver figura 6**). Esto puede conducir a una mayor producción de citocinas y maduración de las CD y también puede inducir respuestas inmunitarias adaptativas a los antígenos/alérgenos como resultado de la captación, el procesamiento y la presentación de antígenos a las células T(62,63).



**Figura 6. Resumen de los efectos de los AGEs sobre la alergenidad al mediar respuestas innatas y adaptativas.** los AGEs pueden influir en la inmunidad innata a través de la interacción con RAGE o al unirse a los receptores de AGE que internalizan los ligandos: galectina-3 (Gal-3), CD36 y receptor depurador clase A tipo I (SR-A1). La presentación del antígeno a las células T puede facilitar la activación y el sesgo de las células T, lo que posiblemente provoque respuestas alérgicas. **Tomado de Briceno Noriega D, Zenker HE, Croes CA, Ewaz A, Ruinemans-Koerts J, Savelkoul HFJ, et al.**

***Receptor Mediated Effects of Advanced Glycation End Products (AGEs) on Innate and Adaptative Immunity: Relevance for Food Allergy. Vol. 14, Nutrients. MDPI; 2022***

La acumulación de AGEs puede aumentar el estrés oxidativo mediante la vía de la nicotinamida, que a su vez puede inducir disfunción celular y apoptosis, lo que en última instancia conduce a lesiones en tejidos u órganos, lo que acelera las condiciones fisiopatológicas. Por ello, se ha postulado que tanto los AGEs endógenos como los exógenos pueden tener un impacto negativo en la salud; sin embargo, se debe tener en cuenta que aún falta evidencia de los efectos negativos para la salud de los AGEs dietarios, ya que muchos aspectos, como la biodisponibilidad, el metabolismo, la distribución y acumulación de tejidos, así como el efecto sobre las funciones inmunitarias, no están claros para la mayoría de ellos(63).

Uno de los mecanismos inmunomoduladores bien documentados de los AGEs es su capacidad para interactuar con los receptores expresados por las células presentadoras de antígenos (CPA); La interacción de los AGE endógenos con RAGEs puede conducir a la producción de citocinas proinflamatorias y se ha relacionado con el desarrollo y la progresión de una serie de enfermedades, como la diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares, algunas formas de cáncer, enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson, enfermedades hepáticas y osteoporosis, y más recientemente al desarrollo de alergias alimentarias(64).

Otros efectos moduladores inmunológicos potenciales de los AGE incluyen la capacidad de crear nuevos epítomos que son reconocidos por IgE, la capacidad de mejorar las condiciones inflamatorias y causar una reducción en la diversidad de la flora intestinal que se asocia con una mayor susceptibilidad a las alergias(65). Además, los AGEs pueden provocar la modificación de los nucleótidos de guanina y adenina del ADN, estos nucleótidos contienen grupos amino que son susceptibles

a la glicación, lo que puede dar lugar a roturas y mutaciones de una sola hebra(66)

Como la RM también promueve la agregación de proteínas por medio de entrecruzamiento intermolecular e intramolecular entre los residuos de lisina y arginina, la glicación puede iniciar cambios estructurales en las proteínas, lo que da como resultado la formación de ligandos para los receptores que reconocen los AGEs. Además, la hidrofobicidad, la carga, la agregación y la exposición de las estructuras de la hoja  $\beta$  también se alteran debido a la RM y se ha sugerido que participan en la función inmunomoduladora de las proteínas(63). A continuación, se presentan evidencias de como los AGEs podrían estar influyendo sobre las alergias:

1. La evidencia ha intentado relacionar la alergia y los AGEs, postulándose así la teoría de la falsa alarma por Smith y cols., en donde se explica que parte del aumento de las alergias sería debido el aumento en el consumo de AGEs dietarios los cuales activarían señales de alarma similares a las inducidas por HMGB1 que sesgarían las respuestas Th2 y estimularían la aparición de alergias esto reforzado por estudios epidemiológicos que muestran un aumento de restaurantes de comidas rápidas y del consumo de las mismas en Estados Unidos y Australia y su correlación positiva con el aumento de la prevalencia de alergias, en otras palabras, los AGEs podrían imitar las alarmas innatas y sesgar hacia las respuestas alérgicas en ciertos sujetos que tienen una predisposición genética y ambiental (79).
2. De acuerdo con el trabajo de Di Lorenzo y cols., estos evaluaron los niveles AGEs y de productos proteicos de oxidación avanzada (AOPPs) (mediante espectrofluorometría y espectrometría respectivamente), en pacientes con rinitis alérgica y controles encontrando que los pacientes con rinitis alérgica tenían mayores niveles de AGEs frente a controles en cambio los niveles de AOPPs no mostraron diferencias significativas en estos grupos, además encontraron correlación negativa significativa entre los niveles de AGEs y el

conteo de eosinófilos de secreción nasal, (80). Este trabajo tiene discrepancia con los resultados del estudio de Aksoy y cols. los cuales encontraron mayores niveles significativos de AOPPs en pacientes con rinitis alérgica frente a controles aunque esto pudo estar justificado por variaciones en los cálculos de datos, ya que Aksoy y cols., expresaron sus resultados como micromoles por litro y Di Lorenzo y cols., normalizaron el contenido sérico de AOPP al contenido sérico total de proteínas, teniendo en cuenta que los niveles circulantes de proteínas específicas y no específicas de alérgenos pueden estar elevados en pacientes alérgicos(69).

3. Oczypock y cols., demostraron que la expresión de RAGEs regula la función de las células linfoides innatas tipo 2 (ILC-2) las cuales son cruciales para la producción de IL-33 la cual tiene efectos positivos sobre la inflamación de la vía aérea respiratoria; encontrando que los ratones knockout para RAGEs pulmonares tenían impedido el reclutamiento de ILC-2 y por lo tanto los síntomas alérgicos frente a alergenos estaban abolidos(70). Además, en otro estudio de este grupo de investigación encontraron que los niveles de RAGEs eran mayores en muestras de esputo de pacientes con asma severa en correlación a la severidad de esta(71).
4. Se ha demostrado que los extractos de cacahuets tostados inducen niveles más altos de IgE que los cacahuets crudos, y Mueller y cols., describieron la unión de alérgenos de maní que habían sido modificados específicamente por AGEs a RAGEs, estableciendo que RAGE interactúa con Ara h 1 recombinante modificada por AGEs, pero no con Ara h 1 recombinante no modificada(5).
5. Teodorowicz y cols., describieron que los neoalérgenos de tipo RM en la soya procesada causaron una fuerte reacción alérgica en individuos sensibilizados a esta frente a la soya cruda lo que indicaría que los AGEs estarían implicados en este tipo de alergia y estimularían reacciones más severas(72).

6. Zhang y cols., demostraron que la glicación de tropomiosina de camarón con diferentes fuentes de oligosacáridos aumentaba la alergenicidad de esta cuando se retaban ratones sensibilizados a camarón, además estas respuestas diferían de la fuente de oligosacáridos con los que se glicaba la tropomiosina, a lo que explicaron pudo ser debido a la formación de neoepitopos para IgE, además demostraron que la tropomiosina glicada con fructo-oligosacáridos tenía menor alergenicidad lo que pudo estar debido al menor tamaño de este carbohidrato los cuales podrían enmascarar epítopos por tener menor impedimento estérico(65).
  
7. Por otra parte, Los AGEs pueden ser epítopos B, de acuerdo con estudios como el del grupo de Ikeda y cols., en el cual logran generar un monoclonal y un suero policlonal que reconoce productos avanzados de glicación(73)(74). Lo anterior es complementado por otros trabajos tales como el del grupo de Yeong y cols., los cuales demuestran que los AGEs pueden inducir una respuesta de anticuerpos(75), además en otras enfermedades de origen autoinmunitario e inflamatorias crónicas se han reportado títulos de anticuerpos anti-AGEs elevados frente a controles, pero en RA no se han hecho estudios que evalúen esta respuesta de anticuerpos(104–106).
  
8. Los AGEs son patrones moleculares asociados a peligro (DAMPs) inductores de respuesta Th2. Esta hipótesis es explorada por Moghaddam y cols., quienes en 2011 por medio de un modelo de glicación y lipoxidación incubando ovoalbúmina y lisozima de huevo con diversos inductores de AGEs encuentran que las proteínas modificadas tienen mayor antigenicidad y además inducen una mayor producción de citoquinas Th2 en los modelos celulares desarrollados en este estudio, sugiriendo que las proteínas modificadas con derivados de carbonilos reactivos, inducen una polarización

hacia un perfil Th2 bastante pronunciada(79). Esta hipótesis es ampliada por el estudio de Ilchmann y cols., los cuales muestran que la glicación de alérgenos aumenta la inmunogenicidad de estos, por medio de una vía relacionada con receptores basureros en células dendríticas (DC), incrementando la activación de las células T en cocultivo con DC incubadas con proteínas glicadas, así como la captación de estos alérgenos por parte de CD. Lo anterior sugiere, que los AGEs además de inducir una respuesta de anticuerpos IgG(80) en adición podrían inducir una respuesta de IgE específica y de esa manera contribuir a la patogénesis de la RA y a su severidad, una hipótesis que a nuestro entender hasta el momento, no ha sido investigada de manera detallada aunque se tiene como precedente el trabajo de tesis de maestría en inmunología de Andrés Merlano (<https://repositorio.unicartagena.edu.co/handle/11227/7377>) en el que se buscó la respuesta de IgE anti-AGEs, aunque este estudio no conto con un antígeno ampliamente caracterizado como el que se usara para el desarrollo de este estudio.

Aún falta evidencia fuerte que relacione, los efectos de los AGEs sobre las enfermedades alérgicas y muy poca investigación se ha hecho en el campo de la RA; además, a pesar de que los efectos negativos sobre la salud humana de los AGEs son más ampliamente reconocidos, sigue siendo una pregunta si la culpa es de la ingesta dietética habitual de AGEs. El procesamiento de alimentos y ciertas formas de cocinar/hornear pueden ocultar, destruir o revelar epítomos alérgicos por cambios de conformación o en algunos casos, cambiando la digestibilidad de la proteína, por lo tanto, transmitir la importancia del procesamiento/cocción de los alimentos y su potencial para alterar las propiedades alérgicas de las proteínas debería ser de gran valor en las poblaciones en las que las alergias van en aumento(78,81).

## **4. Hipótesis.**

En base a lo expuesto se plantea la hipótesis de que los AGEs inducen respuestas de tipo IgE y están relacionados con la RA y su severidad.

## **5. Objetivo general.**

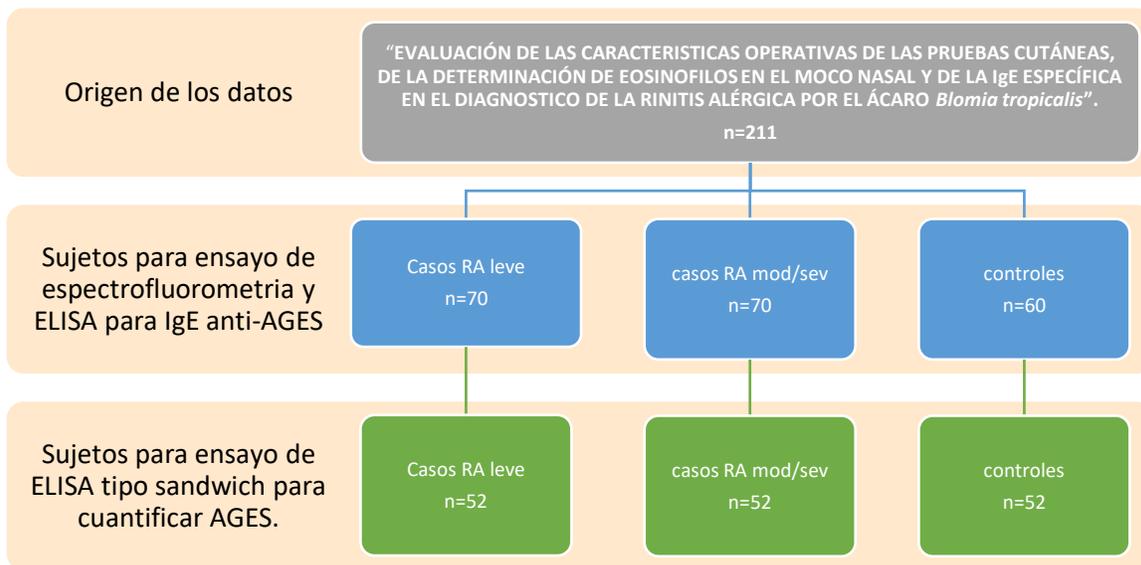
Determinar la relación de los AGEs y de los anticuerpos de tipo IgE anti-AGEs con la RA y su severidad.

## **6. Objetivos específicos.**

- Cuantificar mediante espectrofluorometría y ELISA los niveles de AGEs en sueros de pacientes con RA frente a controles y evaluar sus diferencias.
- Evaluar la correlación que existe entre los títulos de AGEs medidos por ELISA frente a espectrofluorometría.
- Estandarizar un protocolo de ELISA indirecto con un AGE caracterizado para detectar los niveles de IgE específica en pacientes con RA y controles.
- Establecer si existen diferencias entre los niveles de IgE anti-AGEs entre los distintos grupos de individuos analizados.

## 7. Metodología general del estudio.

Las muestras que se usaron en este estudio provinieron 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 ALÉRGICA POR EL ÁCARO *Blomia tropicalis*”, se contempló la realización de ensayos de ELISA y espectrofluorometría en un estudio de casos y controles con pacientes con RA clasificados de acuerdo con su severidad según guías ARIA. El cálculo del tamaño de muestra realizado sugirió que para un poder del 80% y un error alfa del 5%, se incluyeran 47 casos en cada grupo, sin embargo, en este proyecto se tomó una muestra mayor, de 70 casos de RA leve, 70 casos de RA moderada/severa y 60 controles por disponibilidad de estas (Ver figura 7).



**Figura 7. Diagrama de flujo de las muestras utilizadas para el estudio de casos y controles en pacientes con rinitis alérgica.**

### 7.2. Selección de los casos de rinitis alérgica.

Ciento cuarenta (140) casos fueron seleccionados para este estudio de los cuales

setenta (70) fueron casos de RA leve y setenta (70) fueron casos de RA moderada/severa, clasificados según guías ARIA(82). Se revisaron las historias clínicas de estos pacientes, tratando de seleccionar aquellos con mayor número de estudios inmunológicos y clínicos disponibles y sin diagnóstico de diabetes mellitus, u otra enfermedad diferente a la rinitis alérgica. Las muestras 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*, además títulos de vitamina D.

### **7.3. Selección de los controles.**

Sesenta (60) controles fueron seleccionados 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, sin diagnóstico de enfermedad alguna o evidencia de respuesta alérgica a alérgenos comunes.

### **7.4. Criterios de inclusión.**

- ❖ Individuos entre 4 y 70 años.
- ❖ Diagnóstico por médico alergólogo de rinitis alérgica.
- ❖ Prueba cutánea positiva.
- ❖ Reto nasal positivo a *Blomia* positivo y/o InmunoCap® positivo a *Blomia* o *Dermatophagoides*.

### **7.5. Criterios de exclusión.**

- ❖ Individuos menores 4 años o mayores de 70 años.
- ❖ Diagnóstico de enfermedad cutánea.
- ❖ Diagnóstico de diabetes tipo II.
- ❖ Diagnóstico de enfermedad autoinmune con tratamiento activo.
- ❖ Diagnóstico de neoplasia, en tratamiento.
- ❖ Tratamiento activo con inmunomoduladores.

## **8. Metodología específica del estudio.**

### **8.1. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.**

La cuantificación de proteínas fue necesaria para la normalización requerida para el ensayo de espectrofluorometría. Para la cuantificación de proteínas fue necesario realizar alícuotas con las muestras de suero haciendo diluciones 1:50 con buffer fosfato salino 1X (PBS 1X; pH 7,4) en tubos Eppendorf y se mezclaron en mezclador vortex por 30 segundos, de estas posteriormente se tomaron 5 microlitros en placas de ELISA de 96 pozos y se agregaron 250 microlitros del reactivo de Coomassie (Protein assay kit Thermo scientific) en cada pozo y se mezclaron por 30 segundos, luego se dejaron en reposo a temperatura ambiente por 10 minutos y luego se realizó la lectura por espectrometría en espectrómetro a 595 nm, la curva estándar se hizo con albumina sérica bovina (Protein assay kit Thermo scientific), para este ensayo cada muestra fue procesada por duplicado.

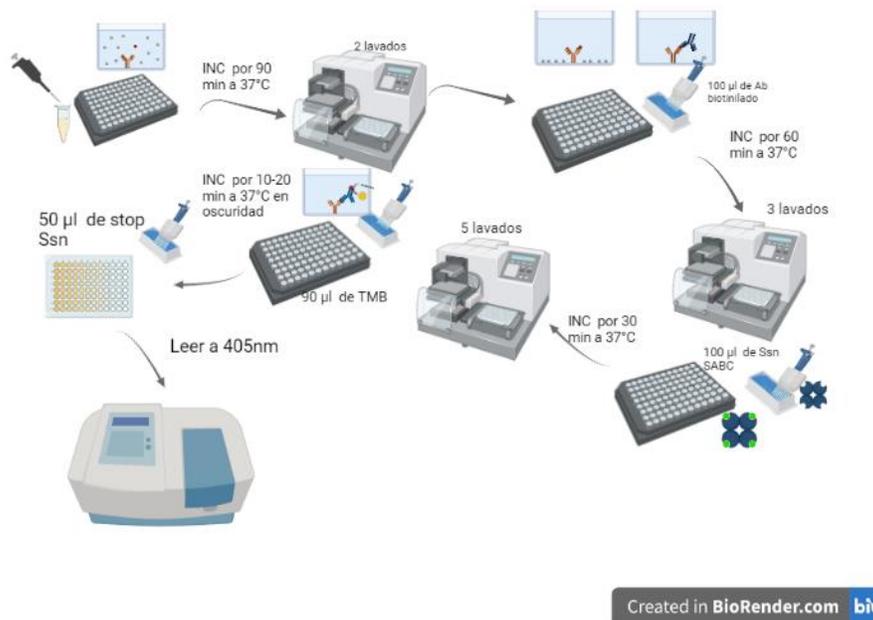
### **8.2. Cuantificación de AGEs por espectrofluorometría.**

La cuantificación de AGEs por espectrofluorometría se realizó mediante el método descrito por Di Lorenzo(68), primero se leyeron las placas de espectrofluorometría vacías en espectrofluorómetro (Thermoscientific Fluoroskan Ascent FI) y las intensidades de fluorescencia fueron leídas bajo los parámetros de emisión máxima (~440 nm) y excitación a (~ 350nm) esto con el fin de evitar lecturas erróneas por la fluorescencia de fondo de las placas; luego se hicieron alícuotas de las muestras de suero normalizadas según la concentración de proteínas obtenida del ensayo de Bradford y se diluyeron al 1:50 con PBS 1X pH 7,4 se mezclaron por 30 segundos en mezclador vortex y se agregaron 100 microlitros de cada muestra en placas de espectrofluorometría de 96 pozos por duplicado, luego se montaron las placas en espectrofluorómetro (Thermoscientific Fluoroskan Ascent FI) y las intensidades de fluorescencia fueron leídas bajo los parámetros de emisión máxima (~440 nm) y excitación a (~350nm), los resultados fueron expresados en unidades arbitrarias(AU) por gramo de proteína; el control positivo utilizado fue albumina

sérica bovina glicada con productos finales de glicación avanzada (MyBioSource MBS2097354), cada muestra fue procesada por duplicado.

### **8.3. Cuantificación de AGEs mediante kit de ELISA tipo sándwich.**

La cuantificación de AGEs por ELISA se realizó mediante el kit de ELISA tipo sándwich directo (MyBioSource MBS761611) y se realizó mediante las instrucciones del fabricante. Primero se diluyeron las muestras de suero al 1:5 y se agregaron 100 microlitros de las muestras en los pozos de la placa de ELISA recubiertos con anticuerpos primarios; luego se cubrieron las placas y se dejaron incubando por 90 minutos a 37°C, luego se retiró la cubierta y se realizaron 2 lavados automatizados con solución de lavado suministrada por el fabricante, luego se agregaron a cada pozo 100 microlitros de solución de anticuerpos marcados con biotina al fondo de cada pozo sin tocar las paredes laterales, se cubrieron las placas y se incubaron por 60 minutos a 37°C, luego se realizaron 3 lavados con solución de lavado y se dejó que la solución de lavado permaneciera en los pocillos de 1-2 minutos cada vez, luego se agregaron 100 microlitros de la solución de peroxidasa de rábano picante (HRP) conjugada con estreptavidina (SABC) en cada pozo y se cubrieron y dejaron incubando por 30 minutos a 37°C, luego se realizaron 5 lavados; luego en cada pozo se añadieron 90 microlitros de solución de tetrametilbencidina (TMB) y se cubrieron e incubaron en la oscuridad a 37°C durante 10 a 20 minutos, luego se añadirán 50 microlitros de solución de parada en cada pocillo, el color se volvió amarillo e inmediatamente se realizaron las lecturas en lector microplatos de ELISA (espectrómetro Thermoscientific Multiscan Go) con absorbancia a 450nm, para este ensayo las muestras fueron analizadas solo una vez **(Ver figura 8)**.

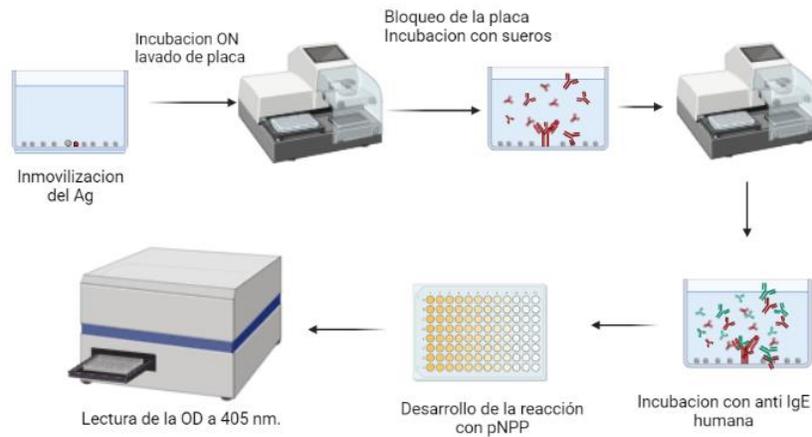


**Figura 8. Diagrama de pasos para ensayo de ELISA sándwich para cuantificar AGEs.**

#### 8.4. Cuantificación de IgE anti-AGEs por ELISA.

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, con algunas modificaciones basadas en el protocolo de ELISA utilizado en el artículo de Ikeda y cols.(7), Se desarrollo el experimento así: En primer lugar, se diluyo el antígeno (albumina sérica bovina glicada con productos finales de glicación avanzada de alta pureza MyBioSource MBS2097354) en buffer (PBS1X pH 7.4) de manera que quedaron 0,200 µg de antígeno por cada 100 µL. Luego se tomó una placa de micro titulación de 96 pozos, se agregan 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 solución de PBS 1X + Gelatina 0.5% + 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  $\mu$ L de cada suero diluido (1:5) en PBS 1X + Gelatina 0.5% + Azida de Sodio al 0.02% y se agregan a los pozos de la placa de microtitulación y se incubaron en cámara húmeda por la noche a temperatura ambiente (16 horas). Se realizan a posteriori 6 lavados con PBS 1X-Tween 20 al 0.1%. Se adiciono a continuación la Anti-IgE humana (E chain specific) marcada con fosfatasa alcalina (MyBioSource MBS674096) en una dilución 1:500 en buffer Tris pH 8.0 0.05M- MgCl<sub>2</sub> 1mM con Azida de Sodio al 0.02% y gelatina al 0,05% agregando 100  $\mu$ L por pozo y se incubaron 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 disolvieron 15 mg de p-nitrofenil fosfato en 15ml de Dietanolamina al 10% pH 9.8 (1mg/ml) conteniendo MgCl<sub>2</sub> 0.5mM, se agregaron 100  $\mu$ L a cada pozo y se incubaron las placas 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 espectrofotómetro (Thermoscientific Multiscan Go) (Ver figura 9); todos las muestras fueron procesadas por duplicado, el control positivo y curva de titulación se hizo con muestras de suero de pacientes alérgicos al maní (donadas amablemente por el Dr. Eduardo Egea de la Universidad del Norte de Barranquilla - Colombia) ya que los alergenios del maní son más reconocidos por RAGEs cuando se encuentran modificados por la RM(5) y el control negativo se hizo con muestras de pacientes sin antecedentes de alergias y negativos a todas las pruebas de alergia y sin antecedentes de enfermedades metabólicas.



**Figura 9. Diagrama de pasos para ensayo de ELISA para cuantificar IgE anti-AGEs.**

## 9. Análisis estadísticos.

Los datos fueron analizados usando el software de análisis estadístico SPSS versión 20 y Graphpad Prism versión 7. Primero para las variables cuantitativas se evaluó su distribución mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Se utilizaron medidas de tendencia central (media y mediana) y medidas de dispersión (rango, desviación estándar) para los datos continuos según su distribución, para los categóricos se usaron proporciones y porcentajes. El contraste de hipótesis en el estudio de casos y controles se realizó mediante las pruebas de U de Mann-Whitney y el análisis de varianza (ANOVA) mediante la prueba de Kruskal Wallis, para variables continuas; se realizaron pruebas de correlación de Pearson y Spearman ( $\rho$ ) entre las variables medidas y variables previamente evaluadas en los pacientes. La significancia estadística fue  $P$  con valores de:  $P < 0,05 = *$ ;  $P < 0,001 = **$ ;  $P < 0,0001 = ***$ ;  $P > 0,05 =$  no significativo (ns).

## 10. Consideraciones éticas.

Las muestras que se usaron en este estudio provinieron 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 ALÉRGICA 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. 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 con 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.

## 11. Resultados.

### 11.1. Características demográficas de la población estudiada.

Se estudiaron 200 individuos que se distribuyeron en un grupo de controles (60 individuos) y de casos (140), los que a su vez se clasificaron según sus características clínicas de severidad de rinitis alérgica (RA) según guías ARIA en rinitis leve (70 individuos) y rinitis moderada/severa (70 individuos); la edad promedio fue 32,9 (4-68) SD 16,2 años en la población general; en el grupo de casos de RA leve de 34 (4-58) SD 15,7 años; en el grupo de casos de RA moderada/severa de 34,3 (5-68) SD 17,8 años; en el grupo de controles 30,3 (5-67) SD 14,9 años.

En cuanto al género los individuos de sexo Femenino fueron 134 (67%) y del sexo Masculino 66 (33%) en la población general. Entre los casos de RA leve fueron 47 (67.2%) del sexo Femenino y 23 (32.8%) del sexo Masculino. En el grupo de RA moderada/severa fueron 51 (72,8%) del sexo Femenino y 19 (12,8%) del sexo Masculino y en el grupo Control fueron del sexo Femenino 36 (60%) y 24 (40%) del sexo Masculino **(Ver tabla 1)**.

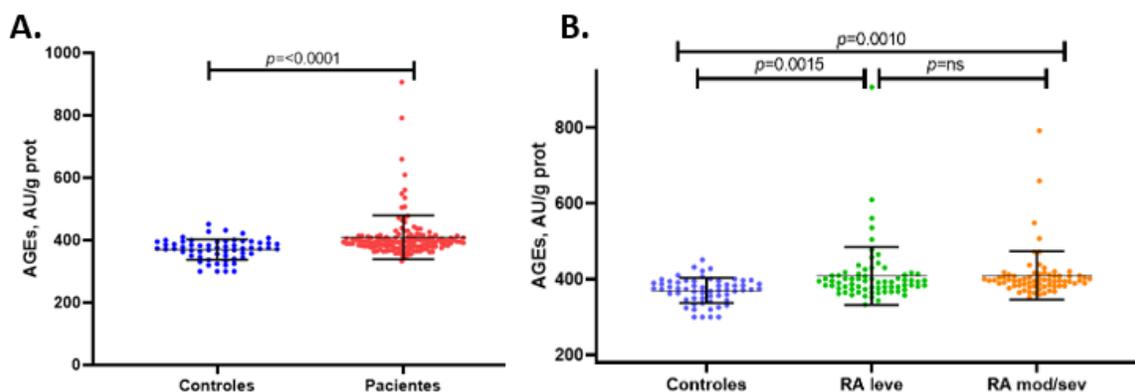
**Tabla 1. Datos descriptivos de la población de estudio.**

Variable.	RA leve (n=70)	RA moderado/severa (n=70)	Controles (n=60)	<i>P</i>
Edad (años), media ± SD.	34±15,7	34,3±17,8	30,3±14,9	<0.05
Sexo Masculino (%).	23 (32,8%)	19 (12,8%)	24 (40%)	<0.001
Sexo Femenino (%).	47 (67,2%)	51 (72,8%)	36 (60%)	<0.001
Antecedente de tabaquismo (%)	17 (24,3%)	10 (14,3%)	8 (13,3%)	<i>ns</i>
Tabaquismo pasivo (%)	14 (20%)	14 (20%)	20(33,3%)	<i>ns</i>
Antecedente de exposición al humo de leña (%)	25 (35,7%)	19 (27,1%)	22 (36,6%)	<i>ns</i>
Vitamina D.	60,38	59,9	64,9	<0.05
IgE total (KU/l) *.	234 (108,5- 445)	196 (96-513)	122,5 (48,1- 382)	<0.05
IgE B. tropicalis (KU/l) *.	0,23 (0,05- 3,79)	0,16(0,05-2,6)	0,10 (0,04- 0,52)	<0.05
IgE D. pteronysinus (KU/l) *.	0.53 (0,06- 7,9)	0,14 (0,05-7,1)	0,07 (0,03- 0,45)	<0.05

**Nota:** **n=** tamaño de la muestra; **SD:** desviación estándar, **IgE:** Inmunoglobulina E específica, El valor de **P** se refiere a la probabilidad de que la diferencia observada sea al azar. **KU/L:** kilo unidades por litro. \*Valores de IgE se expresan en mediana y rango intercuartil (IQR).

## 11.2. Análisis de AGEs medidos por espectrofluorometria en los diferentes grupos.

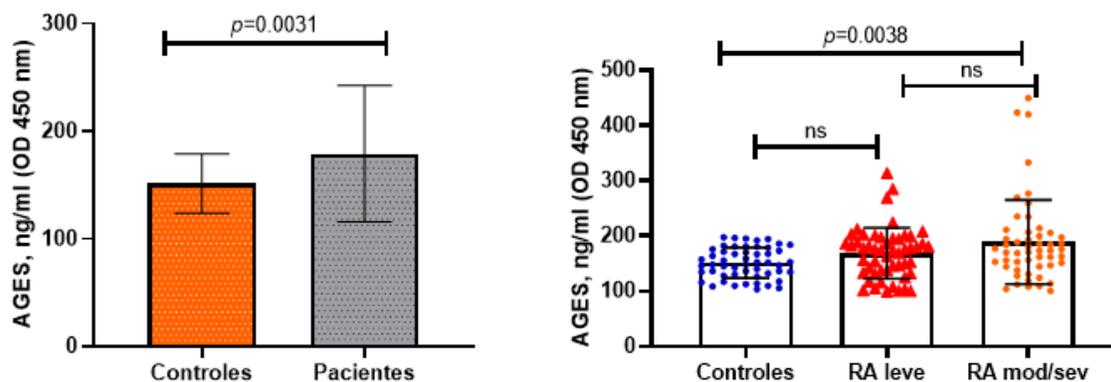
Se llevo a cabo un análisis comparativo entre la concentración de AGEs medidos por espectrofluorometria entre los diferentes grupos de estudio. Las concentraciones de AGEs se expresaron en unidades arbitrarias por gramo de proteína (AU/g prot); se encontró que los sueros controles tenían menor concentración de AGEs frente a los sueros de pacientes con RA, siendo que, los controles tenían  $370,2 \pm 33,2$  AU/g de proteína frente a  $409,2 \pm 70,2$  AU/g de proteína de los pacientes con RA y hubo significancia estadística  $P = < 0.0001$ ; al evaluar los pacientes con RA según su severidad, encontramos que, los pacientes con RA leve tenían una media de  $408,5 \pm 76,5$  AU/g de proteína y los pacientes con RA moderada a severa tenían una media de  $409,8 \pm 64$  AU/g de proteína pero no se encontró significancia estadística según su severidad (**Ver figura 10**).



**Figura 10. Cuantificación de AGEs por espectrofluorometria en los diferentes grupos estudiados.** A. controles (n=60), casos (n=140). B. Controles (n=60), RA leve (n=70), RA moderada a severa (n=70).

### 11.3. Análisis de AGEs medidos por ELISA en los diferentes grupos.

Luego se llevó a cabo un análisis comparativo entre la concentración de AGEs medidos por ensayo de ELISA en los diferentes grupos estudiados, se encontró que los pacientes con RA en general tenían una media de  $176,7 \pm 66$  ng/ml de AGEs la cual era mayor frente a  $151,2 \pm 27,53$  ng/ml de AGEs en los controles y hubo significancia estadística; pero al comparar según la severidad de la rinitis alérgica no se encontró diferencia significativa, los pacientes con RA leve tenían una media de  $168,8 \pm 46$  ng/ml de AGEs y los pacientes con RA moderada a severa tenían una media de  $184,6 \pm 81$  ng/ml de AGEs (Ver figura 11).

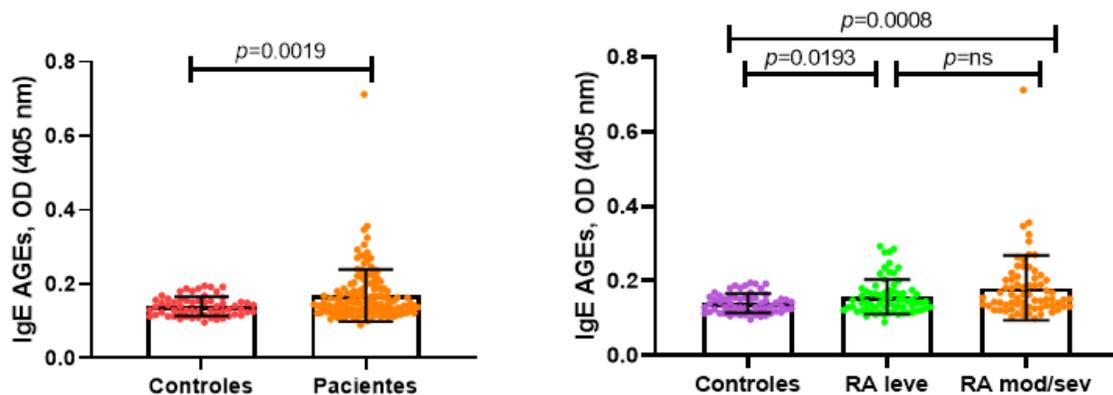


**Figura 11. Cuantificación de AGEs por ELISA sándwich en los diferentes grupos estudiados.** A. Controles (n=52), Casos (n=104). B. Controles (n=52), RA leve (n=52), RA moderada a severa (n=52).

### 11.4. Análisis de la respuesta de tipo IgE anti-AGEs.

Realizamos un análisis comparativo entre los títulos de IgE específica anti-AGEs, se encontró que la población con RA tenía títulos mayores de esta IgE; al expresar

en OD encontramos que la diferencia con la población Control (0,13 (0,11-0,15) OD) vs pacientes (0,14 (0,12-0,18) OD), fue significativa  $p=0.0019$ , sin embargo, al evaluar según la severidad, RA leve (0,14 (0,12-0,17) OD) vs RA mod/sev (0,15 (0,13-0) OD) no se encontraron diferencias significativas (**Ver figura 12**).



**Figura 12. Cuantificación de IgE anti-AGEs por ensayo de ELISA indirecto en los diferentes grupos estudiados.** A. IgE anti-AGEs en OD, controles (n=60), casos (n=140). B. IgE anti-AGEs en OD, controles (n=60), RA leve (n=70), RA mod/sev (n=70).

### 11.6. Análisis de correlación de IgE anti-AGEs frente a AGEs medidos por ELISA y espectrofluorometría en los diferentes grupos.

Se llevo a cabo un análisis de correlación de Spearman entre los títulos de IgE anti-AGEs frente a las concentraciones de AGEs medidas por espectrofluorometría y ELISA en los diferentes grupos de estudio, como dato significativo ( $p<0.05$ ) se encontró que hubo correlación positiva débil entre los títulos de IgE anti-AGEs frente a los AGEs medidos por espectrofluorometría en el grupo de sueros control (**Ver tabla 2**).

**Tabla 2.** Correlación entre IgE anti AGEs frente a AGEs medidos por espectrofluorometria y ELISA en los diferentes grupos estudiados.

Tabla de correlacion		
<b>Correlación de la población total.</b>		
	<b>AGEs (AU/g)</b>	<b>AGEs (ng/ml)</b>
IgE AGEs(KU/l)	0,035	0,118
<b>Correlación del grupo de control.</b>		
IgE AGEs(KU/l)	0,254*	-0,016
<b>Correlación del grupo de Rinitis alergica.</b>		
IgE AGEs(KU/l)	-0,111	0,125
<b>Correlación del grupo de Rinitis alergica leve.</b>		
IgE AGEs(KU/l)	-0,158	0,056
<b>Correlación del grupo de RA moderada/severa.</b>		
IgE AGEs(KU/l)	-0,069	0,162

Color.	Rho de Spearman.	Nivel de correlación.
	0.61 a 1	Correlación fuerte.
	0.31 a 0.60	Correlación moderada.
	0.1 a 0.30	Correlación débil.
	0.09 a -0.09	Correlación nula.
	-0.1 a 0.30	Correlación débil.
	-0.31 a 0.60	Correlación moderada.
	-0.61 a 1	Correlación fuerte.

\*Significancia estadística <0,05; \*\* Significancia estadística <0,01; \*\*\*Significancia estadística <0,0001.

## 11.7. Análisis de correlación de AGEs y de anticuerpos de tipo IgE anti-AGEs con variables clínicas.

Se llevo a cabo un análisis de correlación entre los niveles de AGEs medidos por espectrofluorometria y ELISA y de los niveles de anticuerpos de tipo IgE contra AGEs frente a variables clínicas y demográficas previamente evaluadas en el proyecto matriz; como datos relevantes de este análisis de correlación se encontró que los AGEs medidos por fluorescencia se correlacionaron positivamente con los títulos de IgE total y especifica contra B. tropicales y D. pteronyssinus en el grupo de control y en la población total evaluada (aunque la correlación no fue fuerte); los niveles de AGEs medidos por espectrofluorometria se correlacionaron positivamente con los niveles de proteínas séricas totales en todos los grupos

evaluados, sin embargo, en el grupo de RA moderada/severa esta correlación fue mayor; por otro lado, los AGEs medidos por ELISA se correlacionaron positivamente con los títulos de IgE contra *Blomia tropicalis* en todos los grupos evaluados; los niveles de IgE específica contra AGEs mostraron correlación negativa débil con la edad en los grupos evaluados; los niveles de IgE anti-AGEs se correlacionaron con los de IgE contra *B. tropicalis* y *D. pteronyssinus* en la población total evaluada, y con los niveles de IgE contra *B. tropicalis* en el grupo de RA leve. La vitamina D mostro una cierta tendencia a correlacionarse negativamente con los niveles de AGEs, aunque esto no tuvo relevancia estadística (**Ver tabla 3**).

**Tabla 3.** Correlación entre IgE anti AGEs, AGEs medidos por espectrofluorometria y ELISA frente a variables de edad y títulos de biomarcadores previamente medidos en los diferentes grupos.

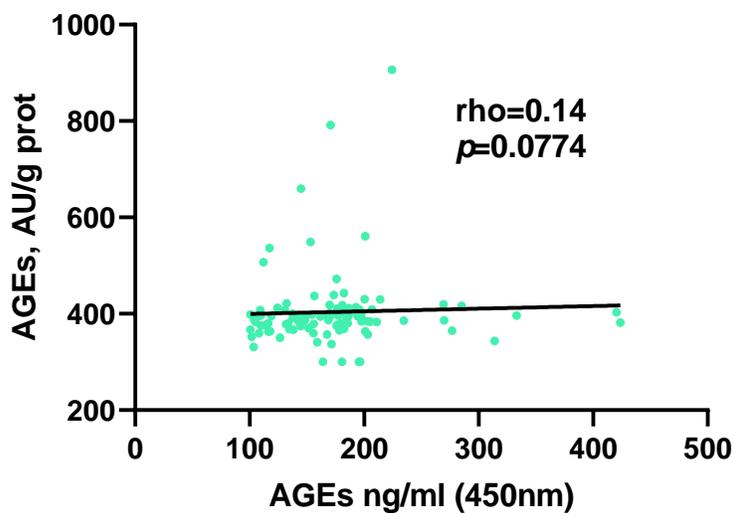
Tabla de correlación.			
Correlación de la población total.			
	AGEs (AU/g)	AGEs (ng/ml)	IgE anti AGEs
Edad	0,125	0,018	-0,004
Vitamina D	-0,049	0,016	-0,093
IgE total (KU/l)	,172*	0,09	0,004
IgE Dp (KU/l)	,140*	,220**	0,048
IgE Bt (KU/l)	,172*	,281**	0,062
Proteínas (mg/dL)	,352**	0,099	0,009
Correlación del grupo de control.			
Edad	0,072	-0,138	-0,022
Vitamina D	0,046	0,234	0,164
IgE total (KU/l)	,354**	0,004	-0,06
IgE Dp (KU/l)	0,138	0,146	-0,149
IgE Bt (KU/l)	,279*	0,21	0,139
Proteínas (mg/dL)	0,236	,279*	-,279*
Correlación del grupo de Rinitis alergica.			
Edad	0,109	0,044	-0,03
Vitamina D	-0,02	-0,021	-0,139
IgE total (KU/l)	0,063	0,035	-0,009
IgE Dp (KU/l)	0,024	0,151	0,015
IgE Bt (KU/l)	0,047	,238*	-0,013
Proteínas (mg/dL)	,302**	-0,034	0,065
Correlación del grupo de Rinitis alergica leve.			
Edad	0,047	0,097	,236*
Vitamina D	0,021	0,102	-0,244
IgE total (KU/l)	0,023	0,011	-0,071
IgE Dp (KU/l)	0,033	0,235	-0,156
IgE Bt (KU/l)	0,023	0,234	-0,02
Proteínas (mg/dL)	0,134	0,131	0,127
Correlación del grupo de RA moderada/severa.			
Edad	0,18	0,003	-,263*
Vitamina D	-0,029	-0,124	-0,006
IgE total (KU/l)	0,192	0,045	0,037
IgE Dp (KU/l)	0,033	0,148	0,159
IgE Bt (KU/l)	0,13	,244*	-0,007
Proteínas (mg/dL)	,531**	0,047	0,053

Color.	Rho de Spearman.	Nivel de correlación.
	0.61 a 1	Correlación fuerte.
	0.31 a 0.60	Correlación moderada.
	0.1 a 0.30	Correlación débil.
	0.09 a -0.09	Correlación nula.
	-0.1 a 0.30	Correlación débil.
	-0.31 a 0.60	Correlación moderada.
	-0.61 a 1	Correlación fuerte.

\*Significancia estadística <0,05; \*\* Significancia estadística <0,01; \*\*\*Significancia estadística <0,0001.

### 11.8. Los AGEs medidos por espectrofluorometria no se correlacionaron con los AGEs medidos por ELISA.

Se hizo un análisis de correlación de Spearman entre los títulos de AGEs medidos por espectrofluorometria frente a los medidos por ensayo de ELISA, a pesar de que, se encontró correlación positiva esta fue muy débil y no hubo significancia estadística (**Ver figura 14**).



**Figura 14. Grafica de correlación de Spearman ( $\rho$ ) entre AGEs medidos por espectrofluorometria frente a AGEs medidos por ELISA.**

## 11.9. Análisis de regresión lineal.

Los AGEs medidos por espectrofluorometría mostraron asociación con los AGEs medidos por ELISA, pero no fue significativa después de la corrección por edad y género y tampoco con la presencia de RA, los AGEs medidos por ELISA mostraron asociación con la IgE anti-AGEs, pero no se encontró asociación cuando se corrigió por edad y género ni con la presencia de RA.

**Tabla 4. Análisis de regresión lineal entre los AGEs e IgE anti-AGEs.**

<b>Variable predictora.</b>	Variable predicha Beta, P valor crudo.	Variable predicha Beta, P valor corregido por edad y género.	Asociación con la enfermedad después de corregir por edad y género.
<b>AGEs (AU/g prot).</b>	<b>AGEs (ng/ml).</b> $\beta=0.340, P=0.031$ <b>IgE anti-AGEs.</b> $\beta=0.140, P=0.3$	<b>AGEs (ng/ml).</b> $\beta=0.310, P=0.2$ <b>IgE anti-AGEs.</b> $\beta=0.140, P=0.3$	$\beta=0.118, P=0.61$
<b>AGEs (ng/ml).</b>	<b>AGEs (AU/g prot).</b> $\beta=0.340, P=0.031$ <b>IgE anti-AGEs.</b> $\beta=0.220, P=0.014$	<b>AGEs (AU/g prot).</b> $\beta=0.310, P=0.2$ <b>IgE anti-AGEs.</b> $\beta=0.210, P=0.2$	$\beta=0.113, P=0.7$

## 12. Discusión.

En las últimas décadas los AGEs, que constituyen un grupo heterogéneo, químicamente diverso y complejo de compuestos formados de forma exógena o endógena, han ganado el interés de la comunidad científica debido a la creciente evidencia de su participación en muchos estados fisiopatológicos y enfermedades. En este estudio se investigaron las relaciones de la RA con los niveles de AGEs medidos por dos métodos distintos (ELISA y espectrofluorometría) y de anticuerpos de tipo IgE anti-AGEs en muestras de suero de pacientes de una población tropical del caribe norte colombiano, los cuales se encontraban clasificados en controles y pacientes con RA (que a su vez se encontraban distribuidos según su severidad).

En este trabajo se analizó si los títulos de AGEs medidos por ambos métodos mostraban diferencias significativas entre estos grupos de pacientes y además se evaluó si esto se asociaba con la severidad de la enfermedad. Los resultados mostraron que los niveles de AGEs medidos por ambos métodos eran mayores en la población con RA frente a los controles, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas al evaluar según la severidad de la presentación clínica, por lo que se infiere de estos resultados que los AGEs tal vez no se asocien con la severidad de la RA y por lo tanto este trabajo no logra rechazar la hipótesis nula de que los AGEs se asocian con la severidad de la RA, sin embargo, el hallazgo aquí encontrado de que los pacientes con RA tengan mayores títulos de estos aductos químicos son muestra de un mayor estado inflamatorio crónico y de mayor estrés oxidativo que pueda estar participando en los episodios y recurrencias de la RA(84), por lo que se infiere que los pacientes con RA se puedan beneficiar de modificaciones del estilo de vida y dietarias que permitan tener un menor nivel de AGEs. Dado que la complejidad de su participación va mucho más allá de los simples estudios de sus titulaciones, la investigación adicional debería tener como objetivo ampliar el conocimiento sobre la formación

de AGEs, los receptores y la competencia con sus ligandos.

Con respecto a las mediciones de IgE específicas contra AGEs, se encontró que la población con RA tenía mayor concentración de este marcador en suero, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas al evaluar según su severidad, por lo que se supone que se está generando una respuesta de tipo IgE contra AGEs la cual puede estar sumando al desbalance del proceso alérgico y pueda estar predisponiendo a la aparición de RA.

Uno de los objetivos de este proyecto era evaluar si los AGEs medidos por espectrofluorometría y por ELISA se correlacionaban entre sí, ya que ambos métodos miden AGEs distintos, con el método basado en espectrofluorometría ( $\lambda_{ex} = 370 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 440 \text{ nm}$ ) se miden AGEs como pentosidina (85) y por el método de ELISA (Kit utilizado MyBioSource MBS674096) se miden AGEs no fluorescentes, como carboximetil-lisina y carboxietil-lisina. El análisis de correlación de Spearman entre las mediciones obtenidas por ambos métodos mostro que estos títulos no tenían una correlación ni fuerte ni significativa, lo que indica que las tasas de producción de los distintos tipos de AGEs (fluorescentes y no fluorescentes) son diferentes, además el método basado en espectrofluorometría mostro resultados más relevantes, por lo que para estudios futuros se sugiere como una opción favorable y económica a seguir.

El análisis de correlación realizado nos muestra que la IgE anti-AGEs conserva la tendencia de la IgE de disminuir con la edad, además la correlación encontrada entre los niveles de IgE contra *B. tropicales* y *D. pteronyssinus* frente a los niveles de AGEs es un hallazgo prometedor de que tal vez los alérgenos de estos ácaros puedan tener ajustes de su inmunogenicidad y alérgenicidad al estar modificados con AGEs.

La amplia heterogeneidad de los AGEs y los escasos estudios aun no permiten establecer los procesos exactos existentes entre los AGEs y la RA. Estudios recientes han demostrado el papel de estos sobre la inflamación pulmonar

(86)por lo que el estudio de estos marcadores en personas con asma será clave en investigaciones futuras. Otro campo de investigación son las formas de prevenir los niveles elevados de AGEs, la reducción de la ingesta excesiva de AGEs al evitar ciertos alimentos procesados (hervir o cocinar al vapor en lugar de asarlos a la parrilla o freírlos), evitar una dieta alta en azúcar o aumentar el consumo de fitoquímicos naturales y compuestos fenólicos son las principales ideas para la inhibición de la acción adversa de los AGEs. No es sorprendente que estas estrategias estén de acuerdo con las pautas para una dieta moderna y saludable y potencialmente se podrían refinar más explícitamente al establecer el papel del consumo excesivo de AGEs para la salud humana y las enfermedades alérgicas. A la luz de la creciente evidencia del enredo de AGEs en muchos procesos celulares, este complejo tema sin duda seguirá siendo intrigante para el instituto de investigaciones inmunológicas y la comunidad científica y encontrándonos ubicados en un país y en una región con un gastronomía tan diversa y autóctona los estudios como el de Uribarri (78)deberían de ser replicados para evaluar los títulos de AGEs en nuestros alimentos típicos y así enfocar una dieta más sana dirigida a la población colombiana.

### **13. Conclusiones.**

- Los pacientes con RA tienen mayores niveles de AGEs tanto fluorescentes como no fluorescentes frente a los controles.
- Los AGEs no se asociaron con la severidad de la RA.
- Se produce una respuesta de tipo IgE contra AGEs, pero esta no mostro diferencias significativas en los diferentes grupos evaluados.
- Los AGEs medidos por espectrofluorometria no se correlacionaron de manera fuerte ni significativa con los AGEs medidos por ELISA.

### **14. Perspectivas futuras.**

- Estudiar la relación de los AGEs con otras enfermedades de tipo alérgico como el asma.
- Realizar ensayos de glicación de alergenios para evaluar los efectos sobre la alergenidad de los mismos.
- Evaluar la respuesta de activación de basófilos frente a distintos tipos de AGEs y alergenios glicados.
- Evaluar en modelos animales las respuestas alérgicas y de perfil de producción de citocinas frente a AGEs aislados y a distintos alergenios glicados.

## **15. Posibles sesgos del estudio.**

- Las muestras estudiadas llevaban 10 años en congelamiento por lo que durante este tiempo pudo aumentar el nivel de AGEs en las muestras.
- Las proteínas se pudieron haber desnaturalizado durante este tiempo.
- Estos factores pudieron haber afectado los resultados de este estudio por lo que se requieren futuras evaluaciones con muestras frescas.
- Las muestras usadas para el ensayo de ELISA para cuantificar AGEs no fueron procesadas por duplicado.

## 16. Referencias.

1. Bousquet J, Anto JM, Bachert C, Baiardini I, Bosnic-Anticevich S, Walter Canonica G, et al. Allergic rhinitis. *Nature Reviews Disease Primers*. 2020 Dec 1;6(1).
2. Bousquet PJ, Leynaert B, Neukirch F, Sunyer J, Janson CM, Anto J, et al. Geographical distribution of atopic rhinitis in the European Community Respiratory Health Survey I. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2008 Oct;63(10):1301–9.
3. Dennis R, Caraballo L, García E, Caballero A, Aristizabal G, Córdoba H, et al. Asthma and other allergic conditions in Colombia: A study in 6 cities. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*. 2004;93(6):568–74.
4. Bousquet J, Anto JM, Bachert C, Baiardini I, Bosnic-Anticevich S, Walter Canonica G, et al. Allergic rhinitis. *Nature Reviews Disease Primers*. 2020 Dec 1;6(1).
5. Mueller GA, Maleki SJ, Johnson K, Hurlburt BK, Cheng H, Ruan S, et al. Identification of Maillard reaction products on peanut allergens that influence binding to the receptor for advanced glycation end products. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2013 Dec;68(12):1546–54.
6. Milutinovic PS, Alcorn JF, Englert JM, Crum LT, Oury TD. The receptor for advanced glycation end products is a central mediator of asthma pathogenesis. *American Journal of Pathology*. 2012 Oct;181(4):1215–25.
7. Ikeda K, Higashi T, Sano H, Jinnouchi Y, Yoshida M, Araki T, et al. N-(Carboxymethyl)lysine Protein Adduct Is a Major Immunological Epitope in Proteins Modified with Advanced Glycation End Products of the Maillard Reaction †. Vol. 266, *J. Biol. Chem*. 1991.
8. MAILLARD, LC. Action of amino acids on sugars. Formation of melanoidins in a methodical way. *Compte-Rendu de l'Academie des Sciences*. 1912;154:66–8.
9. Hodge JE. Browning reactions in model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1953;1:928–43.
10. Namiki M, Hayashi T, Kawakishi S. Free radicals developed in the amino-carbonyl reaction of sugars with amino acids. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1973;37(12):2935–6.
11. Gerdemann A, Lemke HD, Nothdurft A, Heidland A, Münch G, Bahner U, Schinzel R. Low-molecular but not high-molecular advanced glycation end products (AGEs) are removed by high-flux dialysis. *Clin Nephrol*. 2000 Oct;54(4):276-83. PMID: 11076103.
12. Perrone A, Giovino A, Benny J, Martinelli F. Advanced Glycation End Products (AGEs): Biochemistry, Signaling, Analytical Methods, and Epigenetic Effects. Vol. 2020, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Hindawi Limited; 2020.
13. Oliveira MIA, de Souza EM, Pedrosa FDO, Réa RR, Alves ADSC, Geraldo Picheth, et al. RAGE receptor and its soluble isoforms in diabetes mellitus complications: O receptor RAGE e suas isoformas solúveis nas complicações do diabetes mellitus. Vol. 49, *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2013. p. 97–108.

14. Afshin A, Sur PJ, Fay KA, Cornaby L, Ferrara G, Salama JS, et al. Health effects of dietary risks in 195 countries, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet*. 2019;393(10184):1958–72.
15. Marrugo J, Zarate E, Meza C, Ocampo Y, Franco L, Martinez B, et al. SUN-P142: Bixin Inhibit the Expression of Th2 Cytokines Repressing NF-KB Transcription Factor. *Clinical Nutrition*. 2017;36(September):S107.
16. Gómez-gracia E, Ph D, Ruiz-gutiérrez V, Ph D, Fiol M, Ph D. Primary prevention of cardiovascular disease with a mediterranean diet. *Zeitschrift fur Gefassmedizin*. 2013;10(2):28.
17. Fang-Mercado LC, Urrego-Álvarez JR, Merlano-Barón AE, Meza-Torres C, Hernández-Bonfante L, López-Kleine L, et al. Influence of lifestyle, diet and Vitamin D on atopy in a population of Afro-descendant Colombian children. *Revista Alergia Mexico*. 2017;64(3):277–90.
18. Merlano-Barón AE, Villanueva-Pájaro DJ, Marrugo-Cano JA. Modulación de la respuesta alérgica por los carotenoides de la dieta TT - Modulation of the allergic response by dietary carotenoids. *Revista de la Facultad de Medicina*. 2016;64(1):123–35.
19. Takeuchi M, Takino JI, Furuno S, Shirai H, Kawakami M, Muramatsu M, et al. Assessment of the concentrations of various advanced glycation end-products in beverages and foods that are commonly consumed in Japan. *PLoS ONE*. 2015;10(3):5–15.
20. Fuhrman J. The Hidden Dangers of Fast and Processed Food\*. *American Journal of Lifestyle Medicine*. 2018;12(5):375–81.
21. Khan MU, Hassan MF, Rauf A. Determination of trans fat in selected fast food products and hydrogenated fats of India using attenuated total reflection fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy. *Journal of Oleo Science*. 2017;66(3):251–7.
22. Stender S. Industrially produced trans fat in popular foods in 15 countries of the former Soviet Union from 2015 to 2016: A market basket investigation. *BMJ Open*. 2019;9(2).
23. Scapin T, Fernandes AC, Dos Anjos A, Proença RPDC. Use of added sugars in packaged foods sold in Brazil. *Public Health Nutrition*. 2018;21(18):3328–34.
24. Evaluation of certain food additives. World Health Organization technical report series. *World Health Organ Tech Rep Ser*; 2017. p. 1–162.
25. Uribarri J, Cai W, Sandu O, Peppia M, Goldberg T, Vlassara H. Diet-derived advanced glycation end products are major contributors to the body's AGE pool and induce inflammation in healthy subjects. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1043:461–6.
26. Tamanna N, Mahmood N. Food processing and maillard reaction products: Effect on human health and nutrition. *International Journal of Food Science*. 2015;2015.
27. Uribarri J, Woodruff S, Goodman S, Cai W, Chen XUE, Pyzik R, et al. AGE's in Foods and practical ways to reduce them. *J Am Diet Assoc*. 2010;110(6):911–6.
28. Delgado-Andrade C, Seiquer I, Haro A, Castellano R, Navarro MP.

- Development of the Maillard reaction in foods cooked by different techniques. Intake of Maillard-derived compounds. *Food Chemistry*. 2010;122(1):145–53.
29. Wei Q, Liu T, Sun DW. Advanced glycation end-products (AGEs) in foods and their detecting techniques and methods: A review. *Trends in Food Science and Technology*. 2018;82(June):32–45.
  30. Suzuki H, Kurihara Y, Takeya M, Kamada N, Kataoka M, Jishage K, et al. A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. Vol. 386, *Nature*. 1997. p. 292–6.
  31. Araki N, Higashi T, Mori T, Shibayama R, Kawabe Y, Kodama T, et al. Macrophage Scavenger Receptor Mediates the Endocytic Uptake and Degradation of Advanced Glycation End Products of the Maillard Reaction. *European Journal of Biochemistry*. 1995;230(2):408–15.
  32. Ohgami N, Nagai R, Miyazaki A, Ikemoto M, Arai H, Horiuchi S, et al. Scavenger Receptor Class B Type I-mediated Reverse Cholesterol Transport Is Inhibited by Advanced Glycation End Products. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(16):13348–55.
  33. Ohgami N, Nagai R, Ikemoto M, Arai H, Kuniyasu A, Horiuchi S, et al. CD36, a Member of the Class B Scavenger Receptor Family, as a Receptor for Advanced Glycation End Products. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(5):3195–202.
  34. Schmidt AM, Vianna M, Gerlach M, Brett J, Ryan J, Kao J, et al. Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. *Journal of Biological Chemistry*. 1992;267(21):14987–97.
  35. Neeper M, Schmidt AM, Brett J, Shi Du Yan, Wang F, Pan YCE, et al. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 1992;267(21):14998–5004.
  36. Alan R, Ezekowitz B, Sastry K, Bailly P, Warner A. Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: Demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in cos-1 cells. *Journal of Experimental Medicine*. 1990;172(6):1785–94.
  37. Li YM, Mitsuhashi T, Wojciechowicz D, Shimizu N, Li J, Stitt A, et al. Molecular identity and cellular distribution of advanced glycation endproduct receptors: Relationship of p60 to OST-48 and p90 to 80K-H membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(20):11047–52.
  38. Vlassara H, Li YM, Imani F, Wojciechowicz D, Yang Z, Liu FT, et al. Identification of galectin-3 as a high-affinity binding protein for advanced glycation end products (AGE): a new member of the AGE-receptor complex. *Mol Med*. 1995;1(6):634–46.
  39. Suzuki H, Kurihara Y, Takeya M, Kamada N, Kataoka M, Jishage K, et al. A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. Vol. 386, *Nature*. 1997. p. 292–6.
  40. Ilchmann A, Burgdorf S, Scheurer S, Waibler Z, Nagai R, Wellner A, 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. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2010;125(1–3).

41. Burgdorf S, Lukacs-Kornek V, Kurts C. The Mannose Receptor Mediates Uptake of Soluble but Not of Cell-Associated Antigen for Cross-Presentation. *The Journal of Immunology*. 2006;176(11):6770–6.
42. Emara M, Royer PJ, Abbas Z, Sewell HF, Gebriel Mohamed G, Singh S, et al. Recognition of the major cat allergen fel d 1 through the cysteine-rich domain of the mannose receptor determines its allergenicity. *Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(15):13033–40.
43. Miyata T, Hori O, Zhang J, Yan S, L. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a central mediator of the interaction of AGE-beta2microglobulin with human mononuclear phagocytes via. *Journal of Clinical*. 1996;98(5):1088–94.
44. Cataldegirmen G, Zeng S, Feirt N, Ippagunta N, Dun H, Qu W, et al. RAGE limits regeneration after massive liver injury by coordinated suppression of TNF- $\alpha$  and NF- $\kappa$ B. *Journal of Experimental Medicine*. 2005;201(3):473–84.
45. Bucciarelli LG, Ananthakrishnan R, Hwang YC, Kaneko M, Song F, Sell DR, et al. RAGE and modulation of ischemic injury in the diabetic myocardium. *Diabetes*. 2008;57(7):1941–51.
46. Chen YS, Yan W, Geczy CL, Brown MA, Thomas R. Serum levels of soluble receptor for advanced glycation end products and of S100 proteins are associated with inflammatory, autoantibody, and classical risk markers of joint and vascular damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research and Therapy*. 2009;11(2):1–11.
47. Yalcin Kehribar D, Cihangiroglu M, Sehmen E, Avci B, Capraz A, Yildirim Bilgin A, et al. The receptor for advanced glycation end product (RAGE) pathway in COVID-19. *Biomarkers*. 2020;0(0):1–5.
48. Norata GD, Garlaschelli K, Grigore L, Tibolla G, Raselli S, Redaelli L, et al. Circulating soluble receptor for advanced glycation end products is inversely associated with body mass index and waist/hip ratio in the general population. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2009;19(2):129–34.
49. Erusalimsky J. D. (2021). The use of the soluble receptor for advanced glycation-end products (sRAGE) as a potential biomarker of disease risk and adverse outcomes. *Redox biology*, 42, 101958. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.101958>.
50. Hudson BI, Lippman ME. Targeting RAGE Signaling in Inflammatory Disease. *Annu Rev Med*. 2018 Jan 29;69:349-364. doi: 10.1146/annurev-med-041316-085215. Epub 2017 Nov 6. PMID: 29106804.
51. Indurthi VSK, Leclerc E, Vetter SW. Interaction between glycated serum albumin and AGE-receptors depends on structural changes and the glycation reagent. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2012;528(2):185–96.
52. Valencia J V., Weldon SC, Quinn D, Kiers GH, DeGroot J, TeKoppele JM, et al. Advanced glycation end product ligands for the receptor for advanced glycation end products: Biochemical characterization and formation kinetics. *Analytical Biochemistry*. 2004;324(1):68–78.
53. Mueller GA, Maleki SJ, Johnson K, Hurlburt BK, Cheng H, Ruan S, et al. Identification of Maillard reaction products on peanut allergens that influence binding to the receptor for advanced glycation end products. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2013 Dec;68(12):1546–54.

54. Serveaux-Dancer M, Jabaudon M, Creveaux I, Belville C, Blondonnet R, Gross C, et al. Pathological implications of receptor for advanced glycation end-product (AGER) gene polymorphism. Vol. 2019, Disease Markers. Hindawi Limited; 2019.
55. Kanková K, Vasků A, Hájek D, Záhejský J, Vasků V. Association of G82S polymorphism in the RAGE gene with skin complications in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 1999 Oct;22(10):1745. doi: 10.2337/diacare.22.10.1745b. PMID: 10526746.
56. Chocholatý M, Jáchymová M, Schmidt M, Havlová K, Křepelová A, Zima T, Babjuk M, Kalousová M. Polymorphisms of the receptor for advanced glycation end-products and glyoxalase I in patients with renal cancer. *Tumour Biol*. 2015 Mar;36(3):2121-6. doi: 10.1007/s13277-014-2821-0. Epub 2014 Nov 19. PMID: 25407489.
57. Yu, X., Liu, J., Zhu, H., Xia, Y., Gao, L., Li, Z., Jia, N., Shen, W., Yang, Y. y Niu, W. (2013). Una asociación interactiva del gen del receptor del producto final de la glicación avanzada cuatro polimorfismos comunes con la enfermedad de las arterias coronarias en el noreste de China Han. *PloS uno* , 8 (10), e76966. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076966>.
58. Forbes JM, Söderlund J, Yap FY, Knip M, Andrikopoulos S, Ilonen J, Simell O, Veijola R, Sourris KC, Coughlan MT, Forsblom C, Slattery R, Grey ST, Wessman M, Yamamoto H, Bierhaus A, Cooper ME, Groop PH. Receptor for advanced glycation end-products (RAGE) provides a link between genetic susceptibility and environmental factors in type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2011 May;54(5):1032-42. doi: 10.1007/s00125-011-2058-z. Epub 2011 Feb 6. Erratum in: *Diabetologia*. 2011 Jun;54(6):1586-7. PMID: 21298413.
59. Ramasamy R, Yan SF, Schmidt AM. Receptor for AGE (RAGE): Signaling mechanisms in the pathogenesis of diabetes and its complications. *Ann N Y Acad Sci*. 2011;1243(1):88–102.
60. Hsu HY, Chiu SL, Wen MH, Chen KY, Hua KF. Ligands of Macrophage Scavenger Receptor Induce Cytokine Expression via Differential Modulation of Protein Kinase Signaling Pathways. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(31):28719–30.
61. Van Beijnum, J.R.; Buurman, W.A.; Griffioen, A.W. Convergence and amplification of toll-like receptor (TLR) and receptor for advanced glycation end products (RAGE) signaling pathways via high mobility group B1 (HMGB1). *Angiogenesis* 2008, 11, 91–99.
62. Gupta RK, Gupta K, Sharma A, Das M, Ansari IA, Dwivedi PD. Maillard reaction in food allergy: Pros and cons. Vol. 58, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Taylor and Francis Inc.; 2018. p. 208–26.
63. Briceno Noriega D, Zenker HE, Croes CA, Ewaz A, Ruinemans-Koerts J, Savelkoul HFJ, et al. Receptor Mediated Effects of Advanced Glycation End Products (AGEs) on Innate and Adaptative Immunity: Relevance for Food Allergy. Vol. 14, *Nutrients*. MDPI; 2022.
64. Rungratanawanich W, Qu Y, Wang X, Essa MM, Song BJ. Advanced glycation end products (AGEs) and other adducts in aging-related diseases and alcohol-mediated tissue injury. Vol. 53, *Experimental and Molecular Medicine*. Springer Nature; 2021. p. 168–88.

65. Zhang Z, Li XM, Xiao H, Nowak-Wegrzyn A, Zhou P. Insight into the allergenicity of shrimp tropomyosin glycated by functional oligosaccharides containing advanced glycation end products. *Food Chemistry*. 2020 Jan 1;302.
66. Snelson M, Coughlan MT. Dietary advanced glycation end products: Digestion, metabolism and modulation of gut microbial ecology. Vol. 11, *Nutrients*. MDPI AG; 2019.
67. 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*. 2017 Feb 1;139(2):429–37.
68. Lorenzo G di, Minciullo PL, Leto-Barone MS, Piana S la, Porta G la, Saija A, et al. Oxidative Stress in Allergic Rhinitis Differences in the Behavior of Advanced Glycation End Products and Advanced Oxidation Protein Products in Patients With Allergic Rhinitis. Vol. 23, *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2013.
69. Aksoy F, Demirhan H, Veyseller B, Yıldırım YS, Özturan O, Basınoğlu F. Advanced oxidation protein products as an oxidative stress marker in allergic rhinitis Alerjik rinitte oksidatif stres göstergesi olarak ileri oksidasyon protein ürünleri. Vol. 19, *Kulak Burun Bogaz Ihtis Derg*. 2009.
70. Oczypok, E.A.; Milutinovic, P.S.; Alcorn, J.F.; Khare, A.; Crum, L.T.; Manini, M.L.; Epperly, M.W.; Pawluk, A.M.; Ray, A.; Oury, T.D. Pulmonary receptor for advanced glycation end-products promotes pathogenesis through IL-33 and accumulation of group 2 innate lymphoid cells. *J. Allergy Clin. Immunol*. 2015, 136, 747–756.
71. Oczypok, E.A.; Perkins, T.N.; Oury, T.D. All the “RAGE” in lung disease: The receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is a major mediator of pulmonary inflammatory responses. *Paediatr. Respir. Rev*. 2017, 23, 40–49.
72. Teodorowicz, M.; Jansen, A.P.H.; Roovers, M.H.W.M.; Ruinemans-Koerts, J.; Wichers, H.J.; Savelkoul, H.F.J. Maillard-type neoallergens present in processed soy extract may cause an allergic reaction in soy allergic patients. *Clin. Transl. Allergy* 2015, 5, 25.
73. Ikeda K, Higashi T, Sano H, Jinnouchi Y, Yoshida M, Araki T, et al. N-(Carboxymethyl)lysine Protein Adduct Is a Major Immunological Epitope in Proteins Modified with Advanced Glycation End Products of the Maillard Reaction †. Vol. 266, *J. Biol. Chem*. 1991.
74. Ikeda K, Higashi T, Sano H, Jinnouchi Y, Yoshida M, Araki T, et al. N<sup>ε</sup>-(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):8075–83.
75. Choi YG, Lim S. Characterization of anti-advanced glycation end product antibodies to nonenzymatically lysine-derived and arginine-derived glycated products. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*. 2009 Sep;30(4):386–99.
76. Newkirk MM, Goldbach-Mansky R, Lee J, Hoxworth J, McCoy A, Yarboro C, 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).
77. Chikazawa M, Otaki N, Shibata T, Miyashita H, Kawai Y, Maruyama S, et al. Multispecificity of immunoglobulin M antibodies raised against advanced glycation end products: Involvement of electronegative potential of antigens. *Journal of Biological Chemistry*. 2013 May 10;288(19):13204–14.
  78. Uribarri J, del Castillo MD, de la Maza MP, Filip R, Gugliucci A, Luevano-Contreras C, et al. Dietary advanced glycation end products and their role in health and disease. Vol. 6, *Advances in Nutrition*. American Society for Nutrition; 2015. p. 461–73.
  79. Moghaddam AE, Hillson WR, Noti M, Gartlan KH, Johnson S, Thomas B, et al. Dryroasting enhances peanut-induced allergic sensitization across mucosal and cutaneous routes in mice. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;134(6):1453–6. .
  80. Ilchmann A, Burgdorf S, Scheurer S, Waibler Z, Nagai R, Wellner A, 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*. Mosby; 2010 Jan;125(1–3):175–183.e11. .
  81. Li, Z.; Luo, Y.; Feng, L.; Liao, P. Effect of Maillard reaction conditions on antigenicity of B-lactoglobulin and the properties of glycated whey protein during simulated gastric digestion. *Food Agric. Immunol*. 2013, 24, 433–443.
  82. Bousquet J, Khaltaev N, Cruz AA, Denburg J, Fokkens WJ, Togias A, et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008\* \*in collaboration with the World Health Organization, GA 2 LEN\*\* and AllerGen\*\*\*. \*\*Global Allergy and Asthma European Network (GA 2 LEN). *Allergy*. 2008.
  83. Acevedo N, Erler A, Briza P, Puccio F, Ferreira F, Caraballo L. Allergenicity of *Ascaris lumbricoides* tropomyosin and IgE sensitization among asthmatic patients in a tropical environment. *International Archives of Allergy and Immunology*. 2011 Feb;154(3):195–206.
  84. Wautier MP, Chappey O, Corda S, Stern DM, Schmidt AM, Wautier JL. Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE [Internet]. 2001. Available from: <http://www.ajpendo.org>
  85. Perrone A, Giovino A, Benny J, Martinelli F. Advanced Glycation End Products (AGEs): Biochemistry, Signaling, Analytical Methods, and Epigenetic Effects. Vol. 2020, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Hindawi Limited; 2020.
  86. Lim A, Radujkovic A, Weigand MA, Merle U. Soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) as a biomarker of COVID-19 disease severity and indicator of the need for mechanical ventilation, ARDS and mortality. *Annals of Intensive Care*. 2021 Dec 1;11(1).

## **17. Financiamiento.**

Este proyecto fue financiado por recursos internos de la vicerrectoría de investigaciones científicas de la Universidad de Cartagena mediante el contrato 085-2019.

También con la beca para estudiantes pertenecientes a proyectos de investigaciones otorgada por la universidad de Cartagena mediante el acta 12-2021 del día 15 de julio del 2021.

## **18. Anexos.**

Avaes éticos y consentimiento informado del proyecto “**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 ALÉRGICA POR EL ÁCARO *Blomia tropicalis***”.

# Anexo 1. AVAL ÉTICO DE LA E.S.E. HOSPITAL UNIVERSITARIO DEL CARIBE.



**E.S.E. HOSPITAL UNIVERSITARIO DEL CARIBE**

Cartagena de Indias, D. T. y C, Marzo 14 de 2011

Doctor  
**JAVIER MARRUGO CANO**  
Profesor  
Instituto Investigaciones Inmunológicas  
Universidad de Cartagena  
Ciudad

Cordial saludo

Por medio de la presente le informo que luego de evaluar el Proyecto de Investigación titulado "EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS OPERATIVAS DE LAS PRUEBAS CUTÁNEAS, DE LA DETERMINACIÓN DE EOSINÓFILOS EN EL MOCO NASAL Y DE LA IgE ESPECÍFICA EN EL DIAGNÓSTICO DE LA RINITIS ALÉRGICA POR EL ÁCARO *Blomia tropicalis*", éste fue aprobado por evaluadores del Comité de Ética del Hospital Universitario del Caribe, ya que en términos generales la investigación cumple con los requisitos establecidos para la realización de este tipo de proyectos en el hospital.

Le solicitamos el favor de informar por escrito a esta Subgerencia Científica la fecha de iniciación de las actividades del proyecto, de igual manera, debe presentar el informe parcial de los resultados obtenidos cuando se haya cumplido aproximadamente el 50 % del proyecto y un informe final después de culminar el mismo.

Es una obligación para los investigadores del proyecto que al momento de presentar sus resultados como ponencia oral o escrita en los diferentes eventos académicos de carácter local, regional, nacional e internacional ó al momento de hacer publicaciones en revistas indexadas se solicite el respectivo visto bueno del Hospital Universitario del Caribe, y de ser avalados por este, se le den los créditos en los agradecimientos y en el ítem correspondiente a las instituciones ejecutoras del proyecto.

Atentamente,

**FREDYC DÍAZ CASTILLO, Q.F., M.Sc./Ph.D.**  
Subgerente Científico de Investigación y Proyección Social  
Hospital Universitario del Caribe

**Prof. FREDYC DIAZ CASTILLO, Q.F; M.Sc; Ph.D.**  
Subgerente Científico de Investigación y Proyección Social.  
Hospital Universitario del Caribe.

C.C ARCHIVO SCIPS

## Anexo 2. AVAL ÉTICO DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
SEDE BOGOTÁ  
FACULTAD DE MEDICINA  
COMITÉ DE ÉTICA

### ACTA DE APROBACION

**CE – 116**

**ACTA DE APROBACION:** No. 13

**Fecha:** 11 de agosto de 2011

**Nombre completo del proyecto:** "EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS OPERATIVAS DE LAS PRUEBAS CUTÁNEAS DE LA DETERMINACIÓN DE EOSINÓFOS EN EL MOCO NASAL Y DE LA IGE ESPECÍFICA EN EL DIAGNÓSTICO DE LA RINITIS ALÉRGICA POR EL ÁCARO BIOMIA TROPICALIS".

**Versión número:** 01 revisada:

**Sometido por:** Luz del Carmen Hernández Bonfante.

**Departamento:** Maestría en Epidemiología Clínica

**Fecha en que fue sometido a consideración del comité:** 02 08 de 2011.

El COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACION DE LA FACULTAD DE MEDICINA. Se constituyó mediante la Resolución 152, (Acta No. 43 del 5 de diciembre de 1996 actualizado mediante resolución 008 (acta 03 de 27 de enero de 2011), de Consejo de Facultad el Comité de Ética de investigación, el cual está regido por la Resolución 008430 del 4 de octubre de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia que estableció las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud; los principios de la Asamblea Médica Mundial expuestos en su Declaración de Helsinki de 1964, última revisión del año 2000; y el código de regulaciones federales, título 45, parte 46, para la protección de los sujetos humanos, del departamento de salud y servicios humanos de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos (Junio 18 de 1991),

**El Comité de Ética de la facultad de Medicina certifica que:**

**1. Sus miembros revisaron los siguientes documentos del presente proyecto:**

- a.  Resumen del proyecto
- b.  Protocolo de investigación
- c.  Formato de consentimiento informado
- d.  Formato de recolección de datos
- e.  Folleto del investigador (si aplica)
- f.  Resultados de evaluación por otros comités (si aplica)

ciencia y tecnología para el país

Carrera 30 No. 45 03 FACULTAD DE MEDICINA, Edificio 471  
Teléfono: Conmutador 57 (1) 3165000 Ext. 15167  
Bogotá, Colombia, Sur América

**2. El presente proyecto fue evaluado y aprobado por los siguientes miembros del Comité:**

Óscar García	Departamento de Ciencias Fisiológicas
Manuel José Jiménez	Miembro Externo de La Comunidad Científica
Tania Castañeda	Asesora Jurídica
Carlos Guerrero	Ciencias Fisiológicas
Clara Arteaga	Departamento de Obstetricia Y Ginecologia (Vacaciones)

**6. El Comité consideró que el presente estudio:**

- a. Es válido desde el punto vista ético. La investigación involucra un riesgo igual al promedio para los sujetos que participan en ella. La investigación se ajusta a los estándares de la buena práctica clínica.
- b. El Comité considera que las medidas que están siendo tomadas para proteger a los sujetos humanos son adecuadas.

**7. El Comité informará inmediatamente a las directivas institucionales:**

- a. Todo desacato de los Investigadores a las solicitudes del Comité.
- b. Cualquier suspensión o terminación de la aprobación por parte del Comité.

**8. El Comité informará inmediatamente a las directivas, toda información que reciba acerca de:**

- a. Lesiones o daños a sujetos humanos con motivo de su participación en la investigación Problemas imprevistos que involucren riesgos para los sujetos u otras personas.
- b. Cualquier cambio o modificación a este proyecto que haya sido revisado y aprobado por este comité

**6. Cuando el proyecto sea aprobado, será por un periodo de un (1) año a partir de la fecha de aprobación.**

**7. El Investigador principal deberá:**

- a. Informar de cualquier cambio que se proponga introducir en el proyecto. Estos cambios no podrán ejecutarse sin la aprobación previa del COMITÉ DE ÉTICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA, excepto cuando sean necesarios para minimizar o suprimir un peligro inminente o un riesgo grave para los sujetos que participan en la investigación.
- b. Avisar de cualquier situación imprevista que se considere implica algún signo de riesgo para los sujetos o la comunidad o el medio en el cual se lleva a cabo el estudio.
- c. Informar de cualquier evento adverso serio de algún paciente, comunicando la situación al secretario y al presidente del Comité de Ética, de acuerdo con la normatividad que el INVIMA a generado a este respecto.
- d. Poner en conocimiento del comité toda información nueva importante respecto al estudio, que pueda afectar la relación riesgo/beneficio de los sujetos participantes.
- e. Comunicar cualquier decisión tomada por otros comités con respecto a la investigación que se lleva a cabo.
- f. Informar de la terminación prematura o suspensión del proyecto explicando las causas o razones.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
SEDE BOGOTÁ  
FACULTAD DE MEDICINA  
COMITÉ DE ÉTICA

- g. Presentar a este comité un informe cuando haya transcurrido un año, contado a partir de la aprobación del proyecto. Los proyectos con duración mayor a un año, serán reevaluados a partir del informe de avance entregado.
- h. Todos los proyectos deben entregar al finalizar un informe final de cierre del estudio, este cierre puede ser el informe final en formato completo o en formato de resumen de cierre de estudio, firmado por el investigador responsable del estudio.

**8. Observaciones:**

El comité considera que el proyecto de investigación no presenta dilemas éticos por lo tanto emite **Concepto Aprobatorio**.

**Nombre:** OSCAR A. GARCÍA VEGA  
**Título:** Md; MSc, PhD  
**Cargo:** Presidente COMITÉ DE ÉTICA

## Anexo 3. CONSENTIMIENTO INFORMADO.

### “EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS OPERATIVAS DE LAS PRUEBAS CUTÁNEAS, DE LA DETERMINACIÓN DE EOSINÓFILOS EN EL MOCO NASAL Y DE LA IgE ESPECÍFICA EN EL DIAGNOSTICO DE LA RINITIS ALERGICA POR EL ÁCARO *Blomia tropicalis*”

#### CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO:

##### Introducción

Las enfermedades alérgicas desencadenadas por los ácaros constituyen un problema de salud mundial. En Cartagena, al igual que en muchas ciudades del trópico el ácaro *Blomia tropicalis* se encontró como el principal agente etiológico de la rinitis alérgica (RA) y el Asma La RA, el asma y la dermatitis atópica constituyen las principales enfermedades alérgicas mediadas por IgE y se diagnostican con frecuencia en las consultas médicas de atención primaria (ARIA 2008). Lo cual supone un reto mayor a los facultativos de atención primaria, ya que son estos quienes atienden en primera instancia a los pacientes, establecen el diagnóstico, inician el tratamiento y hacen el seguimiento de la mayoría de los pacientes. En algunos países son los médicos de atención primaria quienes hacen las pruebas diagnósticas. Por lo anterior se hace necesario contar con la información apropiada que permita establecer cuál o cuáles son las pruebas de mayor sensibilidad y especificidad similares al patrón de oro y que sean pruebas de fácil manejo por parte del médico de atención primaria.

##### Procedimientos

Usted es elegible para participar en este estudio, porque asiste como paciente o acompañante al servicio de Otorrinolaringología del Hospital Universitario del

Caribe y tiene características que hacen más probable que pueda presentar Rinitis Alérgica o cumple con las características como individuo control.

Queremos solicitarle comedidamente nos autorice a realizar las siguientes pruebas, que serán llevadas a cabo por personas debidamente entrenadas para este fin.

1. Realización de una Historia Clínica enfocada a detectar antecedentes asociados a la RA. Se realizará por los docentes o residentes de Otorrinolaringología.
2. Se realizará la prueba de reto nasal, por parte de los docentes o residentes de Otorrinolaringología distinto al que realice la historia clínica,
3. Al mismo tiempo se le tomará muestra de la secreción de cada fosa nasal para la prueba Determinación de eosinófilos en moco nasal y serán leídos por la Bacterióloga
4. Se le tomará los datos para la historia clínica de alergología y se le realizarán las Pruebas cutáneas. Esta parte la realizará el Inmunólogo.
5. También se les tomará a todos los participantes muestra de sangre entre 7 a 10 mL para la determinación de IgE específica para *Blomia tropicalis*. Estas pruebas serán realizadas por el profesional Universitario.
6. Finalmente el médico Inmunólogo le dará al final del estudio a cada una de las personas evaluadas una nota por escrito sobre las recomendaciones y tratamiento necesario según el caso.

Es pertinente recalcar que todos estos pasos serán realizados de manera independiente entre los evaluadores y estos no les informaran bajo ninguna circunstancia a los participantes el resultado de la evaluación. Y todos los resultados serán entregados en sobres opacos sellados al investigador principal para su análisis

##### Riesgos y Beneficios

Si usted decide participar, deberá tener presente la siguiente información y aceptar los siguientes puntos:

- a) Manifiesto que he sido informado claramente sobre los riesgos que se pueden presentar, durante la realización de la prueba de Reto Nasal y Pruebas Cutáneas siendo estos: Reacciones locales, caracterizadas por prurito, ronchas hasta generalizadas como la anafilaxis que se puede presentar en un 0.008 %, y que el Médico responsable me ha manifestado que está preparado ya que cuenta con todos los elementos disponibles para manejar cualquier tipo de complicación
- b) La evaluación para la realización de la historia clínica no tiene ningún tipo de riesgo.
- c) La Determinación de Eosinófilos en moco nasal hace parte de los exámenes que normalmente realiza el otorrino en la consulta.
- d) Autorizo al investigador a tomar muestras de sangre en un volumen entre 7 a 10 ml con el fin de que se adelanten algunos ensayos de investigación.
- e) El principal beneficio que Usted obtendría de esta evaluación es la posibilidad de detectarle o diagnosticar su enfermedad, en caso de ser paciente y en caso de ser control Además obtendrá gratuitamente un examen por otorrinología y alergología.

##### Derechos

Si usted decide participar, tiene los siguientes derechos:

- a) Los registros que lo puedan identificar serán mantenidos confidencialmente de acuerdo con las leyes colombianas y a las Buenas Prácticas Clínicas en investigación.
- b) Su participación en esta investigación es completamente voluntaria y puede retirarse en cualquier momento.
- c) Cualquier pregunta o duda por favor comuníquese con la Dra Luz Hernández al Teléfono 3145591212 ó 3174419306 y/o con el Dr Javier Marrugo al Teléfono 3165222770.

Con su firma Usted certifica que ha leído o alguien le ha leído el presente formato de consentimiento informado; que le han sido resueltas todas sus preguntas satisfactoriamente y que acepta voluntariamente participar en el estudio.

\_\_\_\_\_  
Firma Investigador principal

\_\_\_\_\_  
Lugar y fecha

\_\_\_\_\_  
Nombre

\_\_\_\_\_  
Nombre del testigo I

\_\_\_\_\_  
Nombre del testigo II

\_\_\_\_\_  
Firma Médico responsable

\_\_\_\_\_  
Firma

\_\_\_\_\_  
Firma

\_\_\_\_\_  
Firma

**Esta tesis es dedicada:**

A mis padres Shirley Dager y Timoleón Montoya. A mis hermanos Bryan, Andrea y Kevin y al ser que me ha acompañado en los caminos buenos y malos de la vida  
Ángel Puello Álvarez.