



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

CAMPO 1

***Metabólica en Alergias Alimentarias causadas por
Proteínas de Transferencia Lipídica (LTP)***

TESIS

Que para obtener el título de
LICENCIADA EN QUÍMICA

P R E S E N T A

Andrea Araiza Saldaña

ASESORAS

Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez
Dra. Alma Cristina Villaseñor Solís

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*A mis papás por apoyarme siempre a cumplir mis metas y mis sueños, sin
ustedes nada de esto hubiera sido posible.*

A mi familia por siempre buscar mi bienestar.

Los amo muchísimo a todos.

*The sun'll come out
Nothing good ever comes easy
I know times are rough
But winners don't quit
So don't you give up*

After the storm - Kali Uchis

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por brindarme el espacio y los recursos para mi desarrollo personal y profesional. A mis profesores de la Facultad por tantos conocimientos transmitidos y a mis compañeros por hacernos entre todos el camino más llevadero en muchos aspectos, muchas gracias a todos.

A la Dra. Alma Revilla por creer en mí, gracias por su apoyo a nivel profesional y personal, por escucharme, aconsejarme y enseñarme. Es un gran ejemplo a seguir, una excelente profesora con una gran vocación, la admiro y aprecio muchísimo.

A la Dra. Alma Villaseñor por la gran oportunidad de aprendizaje, por incorporarme a su equipo de trabajo y llevar mi formación profesional a otro nivel. No tengo como pagarte el que me hayas recibido con los brazos abiertos, gracias infinitas.

A la Dra. Coral Barbas y los colaboradores del CEMBIO por la oportunidad y el espacio para mi desarrollo profesional, fue un placer conocerlos a todos y poder trabajar en un lugar de excelencia. En especial agradezco a la Maestra Andrea Macías por todo el conocimiento y paciencia, gracias por permitirme trabajar a tu lado y aprender tanto.

A Naomi y Denef por acompañarme en la vida, por estar para mi y ser mi apoyo, los amo mucho.

A mis close friends por ser mi red de apoyo durante mi estancia en el extranjero, ¡gracias por acompañarme en esta aventura!

Y, por último, pero más importante, a mi mamá, gracias por apoyarme y acompañarme siempre, por dejarme ser y aceptarme tal y como soy, gracias por convertirme en lo que soy hoy en día, nunca me va a alcanzar la vida para pagarte todo lo que has hecho y sacrificado por mí.

Índice

Resumen	09
Capítulo 1	10
1. Antecedentes	10
1.1. Alergia alimentaria	10
1.1.1. Alérgenos y reactividad cruzada	11
1.1.2. Respuesta inmunológica	13
1.1.3. Factores asociados en el desarrollo de la alergia alimentaria	14
1.1.4. Prevalencia de alergia alimentaria	16
1.1.5. Diagnóstico, tratamiento e impacto de la alergia alimentaria	17
1.2. Proteínas de transferencia lipídica	18
1.3. Pectinas y su papel terapéutico en alergias alimentarias	21
1.4. Metabolómica	23
1.5. Metabolitos de interés	27
1.6. Técnicas analíticas aplicadas al análisis metabolómico	28
1.6.1. Espectrometría de masas	29
1.6.1.1. Métodos de ionización	29
1.6.1.2. Analizadores	32
1.6.2. Cromatografía de líquidos (LC)	33
1.6.3. Resonancia magnética nuclear	35
Capítulo 2	37
2.1. Justificación	37
2.2. Hipótesis	38
2.3. Objetivos	38

2.3.1. Objetivo general	38
2.3.2. Objetivos particulares	38
2.4. Materiales y métodos	39
2.4.1. Diseño experimental	39
2.4.1.1. Elección de pacientes alérgicos a nsLTP y controles	39
2.4.1.2. Tratamiento administrado y toma de muestra	39
2.4.2. Método dirigido para ácidos grasos de cadena corta (SCFA)	41
2.4.2.1. Patrones para la cuantificación de SCFA	41
2.4.2.2. Fundamento del método	41
2.4.3. Método dirigido para ácidos biliares (BA)	42
2.4.3.1. Estándares y solventes	42
2.4.3.2. Preparación de disoluciones estándares	43
2.4.3.3. Preparación de muestras	43
2.4.3.4. Características y condiciones de trabajo	44
2.4.4. Método dirigido para metabolitos relacionados con inflamación alérgica	46
2.4.4.1. Estándares y solventes	46
2.4.4.2. Preparación de disoluciones estándares	48
2.4.4.3. Preparación de muestras	48
2.4.4.4. Características y condiciones de trabajo	48
2.4.4.4.1. Método HILIC	49
2.4.4.4.2. LC fase inversa	49
2.4.5. Tratamiento de datos obtenidos	51
2.4.5.1. Creación del método e integración de las señales cromatográficas	51
2.4.5.2. Cuantificación de muestras	52
2.4.5.3. Análisis estadístico	52
2.4.5.3.1. Análisis estadístico univariante y su representación gráfica	52

2.4.5.3.2. Análisis estadístico multivariante y su representación gráfica	53
Capítulo 3	55
3.1. Resultados	55
3.1.1. Análisis univariante	55
3.1.1.1. Comparativa de grupos alérgicos vs controles a t = 0 meses	55
3.1.1.2. Comparativa de la abundancia de los metabolitos a través del tiempo por tratamiento	58
3.1.1.3. Comparativa entre los tratamientos a t = 2 meses	61
3.1.1.4. Respuesta clínica del tratamiento	62
3.1.2. Análisis multivariante	66
3.2. Discusión	70
Capítulo 4	77
4. Conclusiones	77
Referencias	78
Anexos	84
Anexo 1. Concentración obtenida de cada metabolito en suero	84
Anexo 2. Resultados del análisis de comparación de dos muestras	90
Anexo 3. Resultados del análisis ANOVA de medias repetidas de 1 factor	92
Anexo 4. Resultados del análisis de ANOVA de dos factores	96

RESUMEN

La hipótesis de este trabajo es que en pacientes con alergia alimentaria (AA), causada por proteínas de transferencia lipídica (LTP) empleando un tratamiento complementario en la dieta a base de pectina puede ayudar a combatir la AA y esto debería verse reflejado en un cambio en la tolerancia al alérgeno y en los principales metabolitos de comunicación entre la microbiota y el hospedero. Para esta hipótesis, el proyecto planteó el análisis de los siguientes metabolitos: 1) los ácidos grasos de cadena corta (SCFA, del inglés “*short chain fatty acids*” (n= 6), 2) los ácidos biliares (n= 25), y 3) metabolitos relacionados con la inflamación alérgica (n= 36). Estos metabolitos fueron cuantificados en suero de pacientes con AA antes y después de 2 meses de ser sometidos a 3 tratamientos: 2 pectinas con diferentes propiedades químicas y placebo.

Por todo lo anterior, este trabajo de tesis, está centrado en el tratamiento estadístico de los datos generados del proyecto, y para poder llevarlo adecuadamente, se exploraron 2 estrategias estadísticas. La primera fue el análisis univariante, el cual se hizo comparando variable a variable en cada una de las comparaciones propuestas. La segunda estrategia fue el análisis multivariante, el cual compara todos los datos en su conjunto para disminuir la dimensionalidad de los datos y con este mirar patrones y agrupaciones de las muestras. Ambas estrategias fueron probadas con el fin de observar los cambios en el metaboloma producidos por cada uno de los tratamientos y así poder inferir cuál de estos podría funcionar de forma más adecuada en un futuro como posible tratamiento para pacientes con AA.

Se realizaron diversas comparaciones que permitieron identificar cambios significativos a lo largo del tiempo desde distintas perspectivas, lo que permitió observar la influencia de cada una de las variables implicadas en el ensayo clínico. En este sentido, las comparaciones fueron: 1) diferencias de los pacientes con AA del estudio frente a un grupo control no alérgico antes de recibir el tratamiento; 2) diferencias de los pacientes con AA antes y después de recibir el respectivo tratamiento (pectina 1, pectina 2, placebo); 3) diferencias de los pacientes con AA tras 2 meses de tratamiento (pectina 1, pectina 2, placebo); 4) diferencias de los pacientes con AA tratados con alguna de las 2 pectinas tolerantes frente a no tolerantes para observar la respuesta clínica a cada tratamiento.

En el análisis univariante se identificaron cambios significativos en varios metabolitos en cada una de las 4 comparaciones antes descritas. Los cambios de estos metabolitos según la evidencia en otras publicaciones indicarían que su cambio resultaría positivo para la mejora de la AA. Además, de acuerdo con los resultados se pudo identificar que la naturaleza de la pectina administrada provoca cambios significativos en distintos tipos de metabolitos. De los metabolitos más importantes que están relacionados con la eficacia clínica se encuentra el ácido biliar hiodesoxicólico (HDCA) que tiene propiedades antiinflamatorias. En el caso del análisis multivariante, no se obtuvieron modelos que mostraran cambios significativos en las distintas comparaciones realizadas, este hecho indica que los cambios entre los grupos bajo estas condiciones no son muy grandes y que esto puede estar relacionado a que sea necesario el aumento del tiempo de tratamiento, la concentración de la pectina, analizar otros metabolitos o el aumento de la cantidad de pacientes en el estudio.

Los resultados obtenidos de este trabajo son muy alentadores, y marcan una posibilidad prometedora para mejorar los síntomas de estos pacientes y ayudarlos a combatir la AA. Sin embargo, estudios futuros son necesarios para establecer las mejores condiciones en las que se tiene que llevar a cabo el tratamiento.

Capítulo 1

1. ANTECEDENTES

1.1. Alergia alimentaria

El primer informe de hipersensibilidad alimentaria se remonta a hace más de 2,300 años y se le atribuye a Hipócrates, quien observó que existía relación entre cuadros de urticaria y la ingesta de leche de vaca [1-3]. La reacción más severa de la hipersensibilidad alimentaria es la anafilaxia, el primer caso clínico por un shock anafiláctico tras el consumo consecuente de leche de vaca fue reportado en 1905 por Finkelstein [3,4]. Más tarde, en 1921, dos médicos austriacos: Prausnitz y Küstner, realizaron un experimento de la transferencia de un suero de una persona a otra con alergia al pescado (transferencia local pasiva), lo cual proporcionó las bases para explicar la anafilaxia. Los estudios alérgicos de esa época se referían a la sustancia responsable de la reacción alérgica como “reagina” y fue hasta 1967 que dicha sustancia fue identificada como el anticuerpo IgE [3].

La alergia alimentaria (AA) está definida como una reacción adversa tras la ingesta de un determinado alimento [4,5]. La AA puede diferenciarse de la intolerancia alimentaria, dado que la AA es una respuesta inmunitaria específica que se da de forma reproducible tras la exposición de un alimento determinado [6]. En contraste, la intolerancia alimentaria es una respuesta fisiológica tras la exposición de un alimento o aditivo que no involucra mecanismos inmunológicos, esta puede ser causada por distintos factores, tales como contaminantes tóxicos, propiedades farmacológicas del alimento, o bien, deficiencias del huésped para procesar el alimento como lo son trastornos metabólicos, enzimáticos o bien, reacciones idiosincráticas [5,7].

La respuesta inmunitaria de la AA puede dividirse en trastornos mediados por inmunoglobulina E (IgE), trastornos no mediados por IgE y trastornos mixtos, siendo la primera la forma más frecuente de hipersensibilidad alimentaria [7][6]. La respuesta inmune está enfocada en un alérgeno específico presente en el alimento y comúnmente las afecciones se focalizan en el tracto intestinal, respiratorio y/o piel [4]. Se trata de una reacción adversa a

un alimento caracterizada por la aparición aguda de urticaria, hinchazón, dificultad respiratoria y/o emesis tras el consumo de un alimento [8]. El conjunto de reacciones alérgicas oscilan entre leves, tales como el enrojecimiento, hasta potencialmente mortales; siendo la anafilaxia la reacción más grave [7]. Estas suelen clasificarse como reacciones de respuesta inmediata, pues se presentan en las primeras dos horas tras la ingesta del alimento (incluso pueden ser minutos) [4]. Los pacientes con un riesgo más elevado de sufrir choques anafilácticos son los adolescentes y adultos jóvenes dado que se encuentran mayormente expuestos a conductas de riesgo [3,7]. En este sentido, la anafilaxia alimentaria es la segunda causa más común de anafilaxia, después de los medicamentos. El aumento en las incidencias de anafilaxia va en aumento, debido a que la incidencia en la AA de una forma continúa aumentando a través de los años, los reportes han demostrado que el porcentaje de casos de anafilaxia en emergencias se ha duplicado en los últimos años; de estos casos, más del 80% corresponden a anafilaxia inducida por AA [13].

1.1.1. Alérgenos y reactividad cruzada

La respuesta de hipersensibilidad a los alimentos se debe a los alérgenos específicos presentes en el alimento. Es por ello, que sólo un pequeño número de alimentos es responsable de la mayoría de las reacciones alérgicas [4,9]. Los alérgenos alimentarios están conformados por un número limitado de familias de proteínas cuyas características generales son: un bajo peso molecular (<70 kDa), hidrosolubles y resistentes a la desnaturalización y degradación mediante proteasas o acidificación [4,7]. Tienen propiedades moleculares distintas lo que hace que las rutas de sensibilización entre alérgenos varíen, es decir que la alergenidad está relacionada con ciertas características estructurales de la familia de proteínas a las que pertenezca el alérgeno [10].

La gran estabilidad de los alérgenos los hace resistentes a la degradación, lo que les permite interactuar con el sistema inmunitario intestinal, haciendo posible que estos puedan transportarse a través del organismo de una forma inmunológicamente intacta [7]. En la tabla 1.1 se muestran los principales alimentos alérgenos, responsables de la mayoría de las reacciones en adultos y niños.

Tabla 1.1. Principales alimentos alérgenos en adultos y niños [4].

RESPONSABLES DEL 90% DE LAS REACCIONES EN NIÑOS		RESPONSABLES DEL 80% DE LAS REACCIONES EN ADULTOS	
LECHE	TRIGO	MANÍ	PESCADO
HUEVO	PESCADO	NUEZ	MARISCOS
MANÍ	NUECES		
SOJA			

Los alérgenos a su vez pueden clasificarse en verdaderos y no verdaderos. Los primeros son aquellos que desencadenan la producción de una IgE específica, mientras que los no verdaderos no son capaces de inducir por sí solos reacciones alérgicas, sino que son potenciales alérgenos mediante reacción cruzada [4,11].

En este sentido, resulta difícil medir la exposición a los alérgenos alimentarios cuando la exposición es mediante vía oral ya que el contacto cruzado puede producirse durante el procesamiento de los mismos alimentos, mediante la introducción de un alérgeno alimentario no intencionado. Por ejemplo, la producción de alimentos, tales como mantequillas de frutos secos, incluido el cacahuate, suele realizarse en una misma línea de producción, lo cual permitiría la contaminación del siguiente producto fabricado [7].

De igual forma, gran parte de la reactividad cruzada existente entre alimentos del reino vegetal se debe a proteínas comunes en su composición, donde la profilina y las proteínas de transferencia lipídica (LTP, del inglés *lipid transfer proteins*) suelen ser las más comunes. En este sentido, la profilina es causante de reacciones habitualmente moderadas mientras que las LTP son causantes de reacciones más graves tales como anafilaxia dada su termoestabilidad y resistencia a la digestión; las reacciones causadas por este tipo de proteínas son más frecuentes en países mediterráneos [9].

En este sentido, la sensibilización a los alérgenos de los alimentos o a los aero-alérgenos, a través de las vías respiratorias, puede ser causante de la AA mediante reactividad cruzada. Por ejemplo, varios alérgenos del polen pueden tener reactividad cruzada con proteínas alérgicas presentes en alimentos vegetales [7]. En 2006, Fernández-Rivas, et. al., realizaron un estudio multicéntrico de la alergia a la manzana en toda Europa a partir del cual se encontró que, en Países Bajos, Austria y el norte de Italia, la alergia a la manzana es el

resultado de la reactividad cruzada entre el alérgeno del polen de abedul (Bet v 1) y el alérgeno de la manzana (Mal d 1). Por otro lado, en España, la exposición al polen de abedul es prácticamente nula y el alérgeno de la manzana responsable de las reacciones de hipersensibilidad es el Mal d 3. Los autores consideraron que en España, la alergia a la manzana se debe a una sensibilización primaria al durazno (melocotón), cuyo principal alérgeno es el Pru p 3, que presenta reactividad cruzada con Mal d 3. Ambas proteínas pertenecen a la familia de las LTP [12].

1.1.2. Respuesta inmunológica

Para que ocurra una reacción alérgica, el huésped pasa por dos etapas, la etapa de sensibilización y una posterior etapa de exposición. Dentro del proceso de sensibilización, los antígenos son captados por las células presentadoras de antígenos para posteriormente ser expuestos a los receptores de los linfocitos T. En este sentido, cuando el cuerpo reconoce estas sustancias como inofensivas por el sistema inmunitario, son toleradas y se forman anticuerpos de tipo IgG. En contraparte, cuando son reconocidas como una amenaza (en personas alérgicas) se producen anticuerpos de tipo IgE [14]. Una vez que se ha formado el IgE específico del ahora denominado alérgeno alimentario, su posterior exposición dará paso a la liberación de histamina y otras sustancias pro-inflamatorias (figura 1.1.1) [14]. Si la exposición al alérgeno es de forma recurrente, se puede producir una respuesta inflamatoria crónica, dada por la interacción compleja entre células inflamatorias que afecta, entre otras cosas, a las células tisulares produciendo cambios estructurales crónicos en el tejido, tales como hipertrofia del músculo liso de las vías respiratorias, fibrosis y disfunción de los órganos. De igual forma, los nervios sensitivos se encuentran sensibilizados durante el proceso inflamatorio, produciendo síntomas [7].

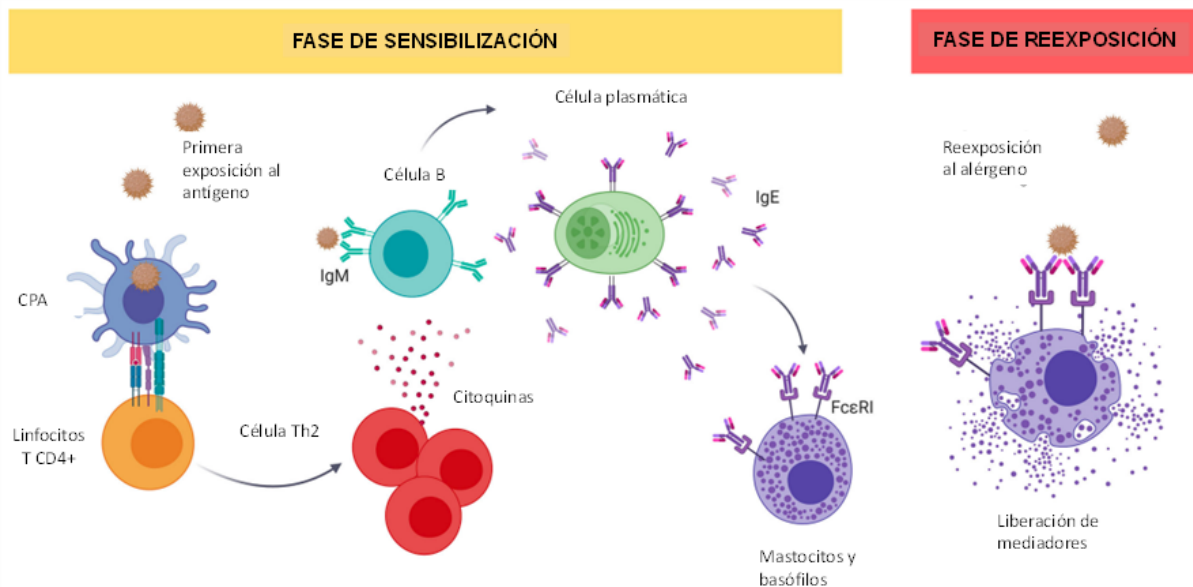


Figura 1.1.1. Mecanismo inmunario clásico de reacciones alérgicas mediadas por IgE.
Reproducción de [15].

El proceso de sensibilización que da paso a la síntesis de IgE específica de un alérgeno alimentario toma lugar en el tubo digestivo si se trata de un alérgeno verdadero, mientras que para aquellos de reacción cruzada toma lugar en la vía pulmonar. Dada la naturaleza resistente a la degradación de los alérgenos, estos pueden atravesar la barrera de la mucosa y así transportarse a través del organismo de una forma inmunológicamente intacta, de esta forma es que se unen al IgE específico [7].

En contraste, la inmunomodulación no mediada por IgE incluye mecanismos celulares, los trastornos como la colitis y celiacía son ejemplos típicos. Las reacciones adversas de este tipo involucran frecuentemente al aparato digestivo por lo que los síntomas suelen ser más subagudos o crónicos y no desaparecen de manera inmediata tras la suspensión del alimento como las afecciones inmuno mediadas por IgE. Las reacciones alérgicas de este tipo son de respuesta retardada y ocurren entre varias horas y pocos días tras la ingesta del alimento alérgico [4,7,9].

1.1.3. Factores asociados en el desarrollo de la alergia alimentaria

Las AA se pueden producir por diversos factores genéticos, ambientales y del desarrollo, de igual forma, las características antigénicas de las proteínas de los alimentos influyen en el desarrollo de este tipo de patologías [7,16].

Factores ambientales, tales como la higiene, uso de antibióticos, cambios en el estilo de vida y particularmente, cambios en la dieta dan paso a cambios epigenéticos en el huésped, lo cual puede influir en las reacciones alérgicas dependientes de la IgE [16,17]. Si bien el o los mecanismos implicados en los cambios epigenéticos inducidos por factores ambientales aún no se han dilucidado en su totalidad, estudios demuestran que las exposiciones ambientales tempranas desempeñan una función clave en la activación o silenciamiento de genes mediante la alteración del ADN. Dicha alteración puede ocurrir a través de la acetilación/metilación de las histonas y la estructura de la cromatina. Los cambios estructurales generados determinan el grado de compactación del ADN y la accesibilidad para la transcripción genética, alterando de esta forma la expresión de los genes, el fenotipo y la susceptibilidad a la enfermedad [17,18].

De igual manera, se ha demostrado que la mejora de las condiciones sociales que conduce a condiciones de vida más sanitarias puede aumentar el riesgo de desarrollar AA. En contraparte, crecer en un medio rural manteniendo contacto con animales y gran variedad de microorganismos otorga una protección contra el desarrollo de AA [19,20].

Otros factores del desarrollo tales como la inmadurez de la mucosa y del sistema inmune intestinal en niños y lactantes puede contribuir al desarrollo de la AA [4,7,9]. En este sentido, el funcionamiento óptimo del sistema inmune debe permitir, la tolerancia de alimentos procesados para mantener las células en el organismo de forma íntegra pero, ser capaz de reaccionar frente a patógenos, generalmente mediante la producción de anticuerpos [2].

Particularmente, la respuesta inmune a un antígeno alimentario es una tarea específica del sistema inmunitario de la mucosa intestinal (considerado el órgano inmunológico más grande del cuerpo). Este sistema se caracteriza por poblaciones únicas de células tales como linfocitos intraepiteliales, linfocitos de lámina propia, células dendríticas, macrófagos presentadores de antígeno, placas de Peyer y linfocitos T con receptores para la presentación de antígenos que en conjunto forman el complejo de la barrera intestinal [2,7].

La barrera de la mucosa, junto con los sistemas innato y adaptativo, constituyen la defensa primaria del huésped en el aparato digestivo. El sistema inmunitario innato proporciona protección mediante mecanismos de barrera, mientras que el sistema inmunitario adaptativo impide que se produzcan respuestas indiscriminadas frente a antígenos inocuos [7].

El estado de la barrera intestinal, así como la madurez del sistema inmune de la mucosa están asociados al desarrollo de la AA. Los seres humanos tienen un sistema inmunitario intestinal bien desarrollado a las 19 semanas de gestación, aunque incluso en estado maduro, hasta el 2% de antígenos alimentarios son capaces de absorberse y transportarse de forma intacta en el organismo [2,21]. Se ha comprobado que la permeabilidad de la barrera se ve afectada por la exposición a virus, alcohol, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, así mismo, cambios en la dieta pueden ocasionar una disbiosis en la microbiota intestinal, pulmonar y cutánea [16,21].

En los últimos años ha llamado la atención la función de la microbiota comensal en el tratamiento de la AA. Además de contribuir a la digestión intestinal, estimula la inmunidad de la mucosa del intestino interactuando con las partes innata y adaptativa del sistema inmunitario de la mucosa intestinal y de esta forma impulsa la diferenciación celular reguladora en el intestino, que es parte fundamental para el mantenimiento de la intolerancia inmunitaria [7,22,23]. Así mismo, la microbiota intestinal, ha sido asociada en múltiples estudios a la producción de células T reguladoras (T_{reg}), linfocitos encargados de controlar las respuestas inmunitarias de antígenos y ayudan a prevenir enfermedades autoinmunes [22].

1.1.4. Prevalencia de alergia alimentaria

Si bien la prevalencia de la AA es mayor en la infancia, teniendo un pico de prevalencia en el primer año de edad del 6 a 8%, esta disminuye con la edad, mostrando una proporción de prevalencia promedio del 3 a 4% [9,24].

En las últimas décadas, la prevalencia de la AA ha aumentado, especialmente aquellas que se encuentran mediadas por IgE, dado que dicho aumento se ha desarrollado en un corto periodo de tiempo, se contribuye una mayor influencia a los factores de tipo ambiental al propiciar cambios epigenéticos. La prevalencia de las AA se encuentra en aumento especialmente en países industrializados, en contraparte, es considerablemente menor en países en vías de desarrollo y en zonas rurales, en comparación con las zonas urbanas de un mismo país [18,25,26]. Así mismo, como se ha mencionado, factores en los cambios en la dieta, la exposición temprana a alérgenos, la lactancia materna, el uso generalizado de antibióticos, la higiene y una menor exposición a la luz solar (lo que ocasiona una reducción en el vitamina D), son algunos de los factores que pueden influir en el aumento de la prevalencia de AA. Estos podrían actuar por separado o de forma combinada para dicho desarrollo, de igual

forma, estos factores tendrán efectos distintos según la genética de cada persona [25,26]. La figura 1.1.2 ilustra un resumen de los factores potenciales en el desarrollo de AA en edad temprana.

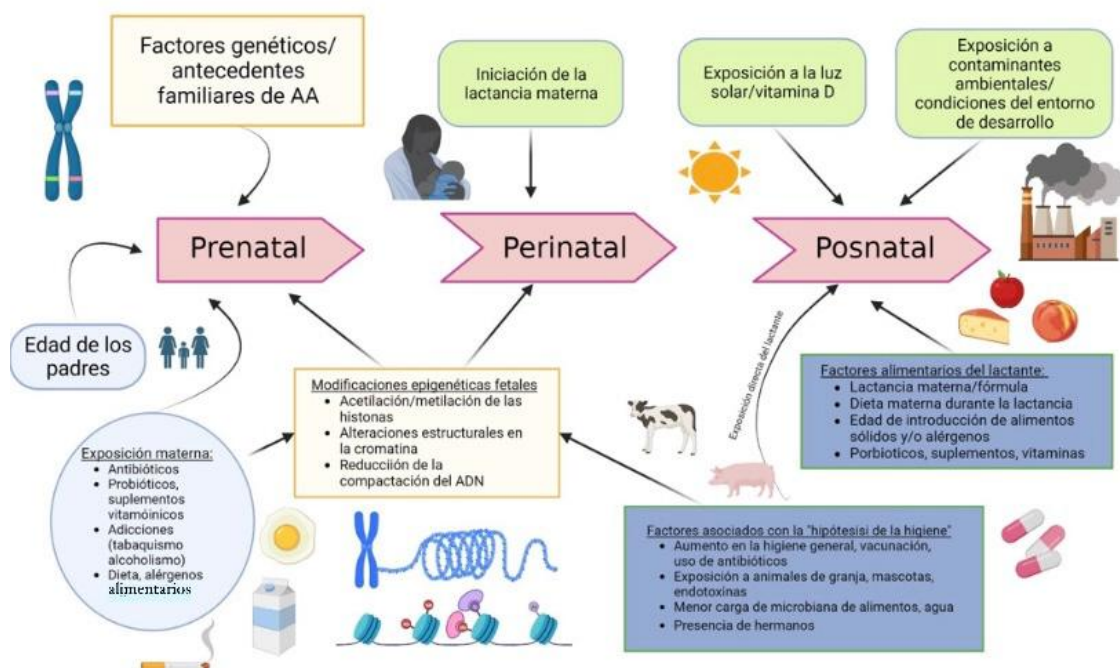


Figura 1.1.2. Factores potenciales ligados al incremento de la prevalencia de AA inmuno mediadas por IgE en las primeras etapas de desarrollo. Adaptación de [18].

Poco se sabe de la prevalencia de AA en adultos, es decir, se tienen datos de que la prevalencia es menor en la edad adulta pero pocos estudios se han focalizado en medir dicha prevalencia. Existen reportes que indican que en Estados Unidos de América (EUA) al menos el 10% de la población adulta parece sufrir una AA mediada por IgE; un reporte de la FDA (por sus siglas en inglés, *U.S. Food and Drug Administration*) en 2010 estimó que la prevalencia de AA en adultos en EUA era del 13% [27].

1.1.5. Diagnóstico, tratamiento e impacto de la alergia alimentaria

El diagnóstico de AA tiene cierto grado de complejidad, ya que deben realizarse una serie de diversas pruebas para poder confirmar o negar la presencia de AA. El diagnóstico es personalizado y varía con cada paciente, aunque de forma general, se realizan una serie de entrevistas para conocer los hábitos y antecedentes del paciente, así como la realización de diferentes pruebas, tales como la prueba de punción cutánea (comúnmente conocido en inglés como *skin prick test*) y la provocación alimentaria oral (PAO). La provocación alimentaria

oral doble ciega controlada con placebo (PAODCCP) se considera la prueba de referencia para el diagnóstico de AA [5,7].

El tratamiento de una AA debe ser personalizado, se requiere que un equipo multidisciplinario de profesionales en alergias y nutrición [5,7]. El horizonte terapéutico de la alergia alimentaria está ciertamente limitado, siendo de primera instancia, la supresión del alimento de la dieta, así como de todos los alimentos que puedan provocar reacciones cruzadas [3,5].

Si bien la dieta de eliminación es la piedra angular en el tratamiento de AA, existen ciertos inconvenientes del uso de esta de forma prolongada debido a las carencias nutricionales o la pérdida del estado de tolerancia [7]. Por otro lado, las dietas de eliminación resultan ser agobiantes para las actividades sociales, por lo que muchos pacientes optan finalmente por alejarse del resto pues el riesgo de que el alimento alérgeno esté en pequeñas cantidades en otro alimento está siempre presente, afectando de esta forma la calidad de vida del paciente e incluso familiares. Estudios han confirmado que la AA deteriora gravemente la calidad de vida sobre todo en niños [7,28,29].

Padecer una AA podría tener un impacto tal de desarrollar un trastorno psiquiátrico tal como depresión, trastorno somatomorfo y trastorno de angustia, así como desencadenar cuadros de ansiedad en el paciente y los padres, cuando el paciente es diagnosticado a edad temprana. Un diagnóstico adecuado y un buen plan de tratamiento claro y concreto ayuda a reducir la ansiedad en pacientes y padres [22,29].

Existen diversas alternativas terapéuticas para AA, tales como los alimentos hipoalergénicos y la inmunoterapia con alérgenos. De igual forma, se ha demostrado que el uso de probióticos tiene efectos benéficos ya que puede generar una mayor diversidad de la flora intestinal y favorece la homeostasis del microbioma [3].

1.2. Proteínas de transferencia lipídica

Las proteínas de transferencia lipídica no específicas, mejor conocidas por sus siglas en inglés como *non-specific lipid transfer proteins* (nsLTP) fueron descubiertas por primera vez hace 40 años por Jean-Claude Kader [30]. Se trata de proteínas de defensa presentes en vegetales y pólenes, encargadas de evitar situaciones de estrés tales como frío, salinidad o la

acción bacteriana, por ello estas tienden a concentrarse en mayor medida en la cáscara, piel y hojas de las frutas que las contienen. En este sentido, la concentración de nsLTP en la pulpa de las frutas puede ser hasta 220 veces menor [31,32].

Las nsLTP son alérgenos sumamente estables que presentan una alta reactividad cruzada entre ellos lo que puede causar un patrón clínico grave de alergias múltiples conocido como síndrome LTP, el cual incluye reacciones leves tales como ronchas o urticaria o bien, reacciones graves como anafilaxia [16,33]. En este sentido, son los alérgenos alimentarios de origen vegetal más prevalentes en el sur de Europa, capaces de sensibilizar y producir síntomas en un gran número de alimentos de origen vegetal, incluyendo a aquellos que se encuentran en forma cruda, cocinada o procesada [30,32,34]. Se trata de una alergia típica de los países mediterráneos (principalmente España e Italia) que al igual que otras AA, ha aumentado su incidencia a lo largo de los años, en dicha región geográfica es la causa más frecuente de AA y de reacciones anafilácticas [35].

Tabla 1.2. Miembros representativos de la familia nsLTP. Adaptación de [32].

Familia botánica	Fuente de alérgenos	Alérgeno
Alimentos vegetales		
	Durazno (<i>Prunus persica</i>)	Pru p 3
Rosáceas	Manzana (<i>Malus domestica</i>)	Mal d 3
	Cereza (<i>Prunus avium</i>)	Pru av 3
Vitáceas	Uva (<i>Vitis vinifera</i>)	Vit v 1
Rutáceas	Naranja (<i>Citrus sinensis</i>)	Cit s 3
Solanáceas	Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	Lyc e 3
Coriláceas	Avellana (<i>Corylus avellana</i>)	Cor a 8
Jugandáceas	Nuez de castilla (<i>Juglans regia</i>)	Jug r 3
Fabáceas	Cacahuete (<i>Arachis hypogaea</i>)	Ara h 9
Asteráceas	Lechuga (<i>Lactuca sativa</i>)	Lec s 1
	Maíz (<i>Zea mays</i>)	Zea m 14
Poáceas	Trigo (<i>Triticum aestivum</i>)	Tri a 14
Alérgenos ocupacionales		
Euforibiáceas	Látex (<i>Hevea brasiliensis</i>)	Heb b 12
Asparagáceas	Espárragos (<i>Asparagus officinalis</i>)	Aspa o 1
Pólenes		
Urticáceas	Parietaria (<i>Parietaria judaica</i>)	Par j 1
	Ambrosía (<i>Ambrosia artemisiifolia</i>)	Amb a 6
Asteráceas	Artemisa (<i>Artemisa vulgaris</i>)	Art v 3
	Olivo (<i>Olea europaea</i>)	Ole e 7
Oleáceas		
Platanáceas	Platanus x hispánica (<i>Platanus acerifolia</i>)	Pla a 3

Existen diversos tipos de nsLTP, siendo el alérgeno más importante el Pru p 3, una nsLTP presente principalmente en el durazno y en todas las frutas de la Familia Rosáceas y en el grupo de nueces y cereales, tales como trigo, maíz y arroz [16,32]. No obstante, debe de

tomarse en cuenta que las nsLTP están presentes en todos los tejidos vegetales, aunque en menor proporción; factores como la maduración, así como las condiciones de almacenamiento pueden fluctuar la cantidad de nsLTP presente en la fruta [32,36].

La Prup p 3 fue la primer nsLTP es ser ampliamente identificada y caracterizada como un alérgeno alimentario relevante, que juega un papel como precursor en la sensibilización de otras nsLTP. Como se muestra en la tabla 1.2, la principal fuente de este alérgeno es el durazno, la concentración de Pru p 3 presente en la piel del durazno es de aproximadamente 6 mg/g, una concentración considerablemente alta, (en la piel de manzana la concentración aproximada es de 66 µg/g) [30,32].

La Prup p 3 es una proteína pequeña de 91 aminoácidos con un peso molecular de 9,178 Da [30,32]. El dominio proteico consiste en hélices alfa que albergan ocho residuos de cisteína, los cuales forman cuatro puentes intramoleculares de disulfuro. Estos, confieren a la proteína una alta resistencia a la temperatura y cambios de pH, así mismo, son responsables del comportamiento de la proteína [30,32]. La Prup p 3 (figura 1.2.1) puede ligarse a diversos ligandos lipídicos, tales como ácidos grasos, Acyl-coenzyme A y fosfolípidos que confieren cambios estructurales en la proteína los cuales alteran la superficie de la proteína lo cual puede modificar a su vez las propiedades de unión a la IgE específica [30,32].

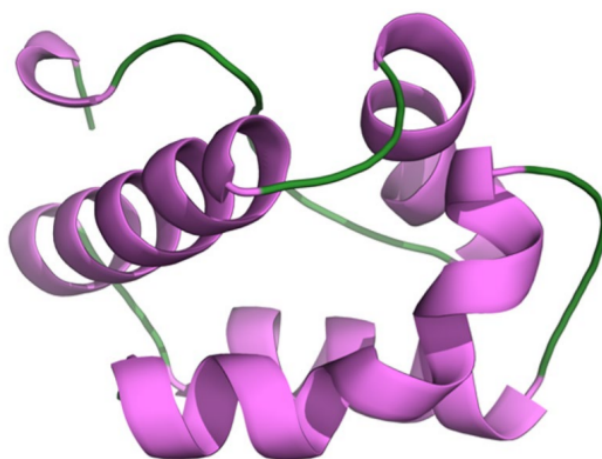


Figura 1.2.1. Estructura cristalina del alérgeno Pru p 3. Reproducción de [32].

Las reacciones alérgicas que pueden manifestarse en el síndrome de LTP son muy variadas, estas pueden ir de urticaria hasta anafilaxia. La concentración de IgE específico Pru p 3 no está relacionado con la gravedad de las reacciones alérgicas. La sensibilización a nsLTP puede ocurrir en distintas vías [30,32]. Pruebas de sensibilización cutánea a través de extracto

de durazno han sido ligadas a su vez a la sensibilización de nsLTP [37]. De igual forma, la sensibilización vía gastrointestinal es posible para la Pru p 3. Se ha demostrado que esta tiene una alta capacidad de cruzar la barrera intestinal, lo cual es un paso típico de la sensibilización de alérgenos alimentarios [38].

La sensibilización a esta clase de alérgenos depende de factores individuales tales como la dieta y ocupación de cada persona, así como de factores geográficos; las reacciones más graves son frecuentemente asociadas a diversos cofactores tales como: ejercicio, ingesta de alcohol, antiácidos y antiinflamatorios no esteroideos [30,32].

1.3. Pectinas y su papel terapéutico en alergias alimentarias

Hasta este punto, se ha clarificado que los cambios nutricionales y ambientales podrían desencadenar la disbiosis de la microbiota intestinal, pulmonar y cutánea, generando alteraciones en la producción de metabolitos de la microbiota correspondiente, lo cual desencadenaría a su vez, modificaciones epigenéticas, relacionadas, entre otras cosas, con la susceptibilidad a la inflamación alérgica [16,39,40].

Los componentes de la dieta y las comunidades microbianas influyen en la disponibilidad de metabolitos existentes en la microbiota intestinal, que son pieza clave en la comunicación huésped - hospedador, y por ende, de la salud del tracto intestinal [40]. Se tiene evidencia de que la incorporación de suplementos en la dieta alimentaria puede ayudar a tratar alergias, tal es el caso de los prebióticos que estimulan el crecimiento y actividad de ciertos microorganismos, particularmente, aumentan indirectamente la secreción de metabolitos derivados de bacterias intestinales que afectan de forma directa la respuesta inmunitaria de ciertas células [39].

Las fibras dietéticas son polisacáridos de al menos tres unidades poliméricas cuya alta resistencia a la digestión los clasifica a su vez como prebióticos de los cuales se tiene evidencia que cuya fermentación selectiva, producida por bacterias intestinales, confiere diversos efectos benéficos a la salud del huésped, principalmente el aumento de la concentración de ácidos grasos de cadena corta (SCFA por sus siglas en inglés *Short Chain Fatty Acids*) en la microbiota, los cuales, a su vez, tienen propiedades inmunomoduladoras [39,40]. De igual forma, disminuye el riesgo de enfermedad coronaria, cáncer de colon y diabetes tipo 2, en contraste, la deficiencia de fibra en la dieta incrementa el riesgo de padecer cáncer de mama, colon e hígado [41].

En este contexto, las pectinas son fibras dietéticas que se encuentran de forma natural acumuladas en paredes y tejidos intercelulares de las plantas, donde funcionan como un agente hidratante y estructural. Se clasifican como ácidos complejos y heterogéneos cuyo peso molecular va de los 50,000 a 150,000 g/mol. Se trata de prebióticos cuyo componente dominante es una cadena lineal de ácido galacturónico (GalA) (al menos en un 65% están constituidos por GalA), en la cual una proporción de los grupos ácido carboxílico (C6) están presentes en forma de metil ésteres. La proporción de grupos GalA esterificados respecto al total de grupos GalA se denomina grado de esterificación (DE, por sus siglas en inglés *Degree of Esterification*). En este sentido, existen dos tipos de pectina: pectina de alta metoxilación (HMP por sus siglas en inglés *high methoxyl pectin*) con DE >50% y pectina de baja metoxilación (LMP por sus siglas en inglés *low methoxyl pectin*) con DE <50% (Figura 1.3.1). En la naturaleza la mayoría de las pectinas son de tipo HMP, mientras que las LMP son más comunes en alimentos procesados [39].

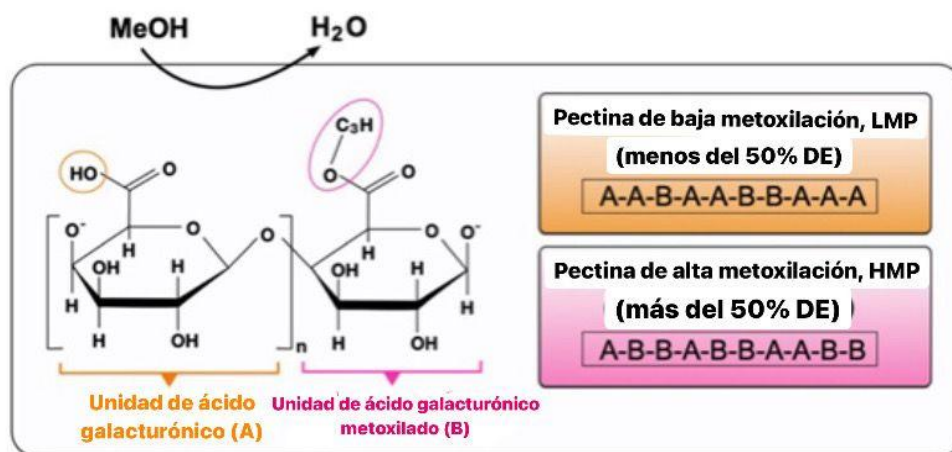


Figura 1.3.1. Estructura de las pectinas y grado de esterificación. El esqueleto de la pectina se constituye en al menos un 65% de ácido galacturónico (GalA) que puede o no estar esterificado en el grupo carboxilo presente en C-6. Reproducción de [39].

El grado de esterificación determina las propiedades de la pectina en alimentos lo cual está relacionado con su función inmunomoduladora. En este sentido, las pectinas de tipo HMP son más resistentes a la degradación y la digestión, por lo que tienden a permanecer un mayor tiempo en el intestino [39].

Al igual que otras fibras dietéticas, los niveles ingeridos de pectina son directamente proporcionales con los niveles de SCFA en el sistema, así como a la abundancia relativa de

bacterias y por ende, a la inmunomodulación de las AA. En la figura 1.3.2. se ilustra el efecto de la suplementación dietética con pectinas.

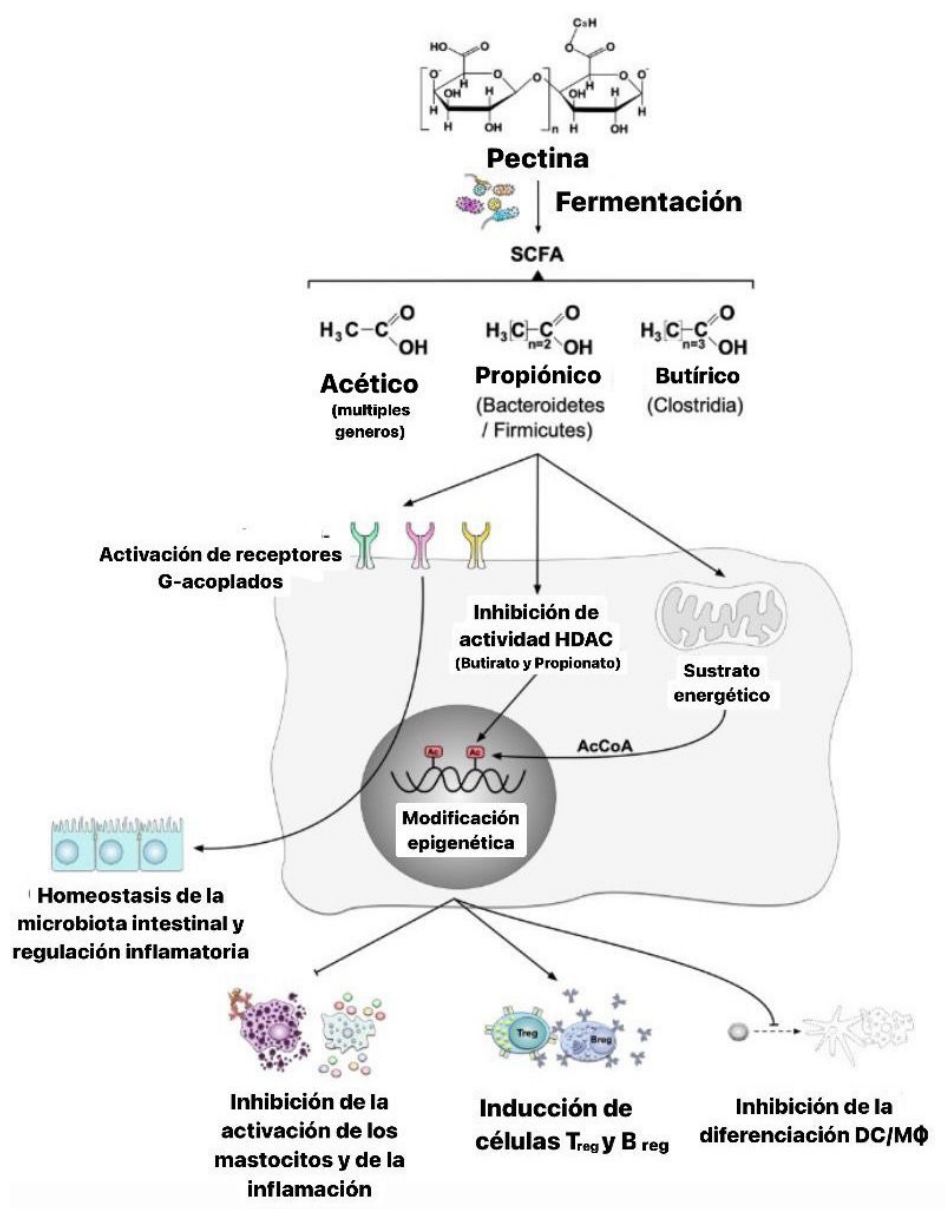


Figura 1.3.2. Efecto de la suplementación dietética de pectinas en el organismo. Reproducción de [39].

1.4. Metabolómica

El avance tecnológico ha permitido el análisis más detallado de genes, transcritos, proteínas, metabolitos y diversas macromoléculas del organismo vivo mediante el desarrollo de ciencias ómicas [42]. Las ciencias ómicas han hecho uso de técnicas analíticas de alto rendimiento que generan grandes cantidades de datos lo que ha permitido el estudio y entendimiento de

muchas enfermedades complejas, pues ayuda a descifrar mecanismos moleculares complejos [42,43].

Las ciencias ómicas incluyen la genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica, cada una de ellas se enfoca en el estudio de distintos componentes dentro de un organismo vivo (Figura 1.4.1). La genómica se enfoca en la estructura, función, edición de genomas, y define las posibles características genéticas de una persona asociadas a una enfermedad. Por su parte, la transcriptómica estudia la suma de todos los transcritos de ARN en cualquiera de sus formas (ARN mensajero, ARN ribosómico, ARN de transferencia, etc.). La proteómica es la caracterización de la estructura, función, interacción y/o modificación de las proteínas en cualquier fase [42].

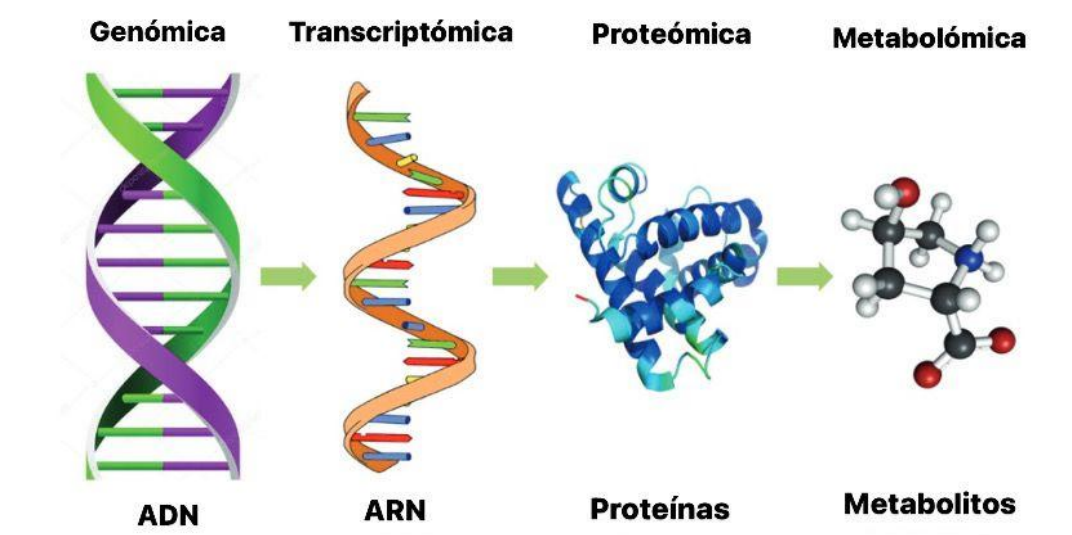


Figura 1.4.1. Representación del enfoque de las ciencias ómicas. Reproducción de [42].

La metabolómica es la última de las ciencias ómicas en consolidarse y está enfocada en el análisis del metaboloma, en este sentido, el metaboloma es el conjunto de moléculas intermedias y finales del metabolismo (metabolitos). Por definición un metabolito tiene un peso molecular menor a 1500 Da y su estudio puede permitir conocer de forma rápida el estado biológico del huésped, ya que la abundancia de metabolitos cambiarían bajo una condición fisiopatológica. Es por ello que, los metabolitos son el último paso en una sucesión de eventos biológicos, por lo que cualquier alteración de genes, transcritos o enzimas tendría un impacto directo en ellos; de esta manera permitiría conocer los procesos exactos asociado a la progresión de una enfermedad. En este sentido, la identificación y cuantificación de determinados metabolitos podría ser una importante herramienta para el diagnóstico precoz de enfermedades y para conocer la respuesta a un determinado tratamiento [42,44].

Es importante destacar que el metaboloma de un organismo vivo no está compuesto únicamente por sus propios metabolitos, es decir, que también los metabolitos procedentes del microbioma (especialmente del intestino), los metabolitos xenobióticos (por ejemplo, procedentes de medicamentos) y los metabolitos de la dieta son parte del metaboloma. Los niveles en los que se encuentre cada uno de estos dependerá de diferentes factores, tales como ejercicio, edad, sexo y medio en el que se desarrolla el huésped [42].

Dentro del análisis metabolómico, existen dos enfoques complementarios de trabajo: el análisis no dirigido y el dirigido [42,44]. El análisis no dirigido es la medición de una gama más amplia de metabolitos extraídos de una muestra biológica, en donde no se cuenta con un hipótesis previa respecto a los metabolitos que se espera encontrar o la proporción de estos dentro del organismo, es decir, se analizan tantas señales sean posibles en un sólo análisis ejecutado. Los metabolitos medidos conjuntamente a partir de una muestra se consideran la huella metabólica del paciente [42,44]. El objetivo del enfoque no dirigido es estudiar las diferencias significativas en las abundancias relativas de metabolitos entre grupos de la huella metabolómica obtenida ya que se estima que en el estado de una enfermedad, habría conjuntos de metabolitos que se ven alterados debido a la progresión de la patología y por ende, caracterizan a la enfermedad. En este sentido, el enfoque no dirigido ayuda a obtener nuevos biomarcadores potenciales de una condición clínica para mejorar el diagnóstico de enfermedades o bien, para comprender sus mecanismos fisiopatológicos [42,44].

El análisis dirigido se enfoca en la identificación y cuantificación más precisa de un grupo pequeño de metabolitos previamente seleccionados, implicados en rutas metabólicas definidas. En este sentido, para el análisis dirigido se requiere de información inicial, es decir una hipótesis previa para poder desarrollar y optimizar el método para que este sea más sensible y selectivo. El análisis dirigido es utilizado, entre otras cosas, para la validación analítica de biomarcadores potenciales que finalmente serán sometidos a la validación clínica para su aplicación en diagnósticos y tratamientos [42,44]. De igual forma, se utiliza en aplicaciones clínicas con el fin de confirmar biomarcadores que prueban una hipótesis; el análisis se puede realizar de manera cuantitativa o semicuantitativa con el uso de estándares internos isotópicamente marcados y técnicas analíticas desarrolladas *ad hoc* [42]. No obstante, el uso de estándares resulta ser una limitación en este enfoque metabolómico ya que algunos metabolitos carecen de estándares; este hecho reduce el número de metabolitos posible a analizar y cuantificar mediante análisis dirigido [44].

Si bien ambos enfoques pueden trabajarse de forma individual, en la búsqueda de nuevos biomarcadores potenciales suelen utilizarse ambos enfoques, en primer instancia se utiliza el enfoque no dirigido para la realización de una nueva hipótesis respecto a los metabolitos potenciales, que posteriormente será corroborada a partir de un análisis metabolómico dirigido y finalmente, si resultan favorables los resultados obtenidos, los metabolitos serán sometidos a una validación clínica. Esta metodología, por ejemplo, es utilizada en la búsqueda de biomarcadores en fenotipos alérgicos en los que aún no se ha realizado una caracterización metabólica, en la figura 1.4.2 se ilustra el proceso general para la identificación de potenciales biomarcadores utilizando metabolómica.

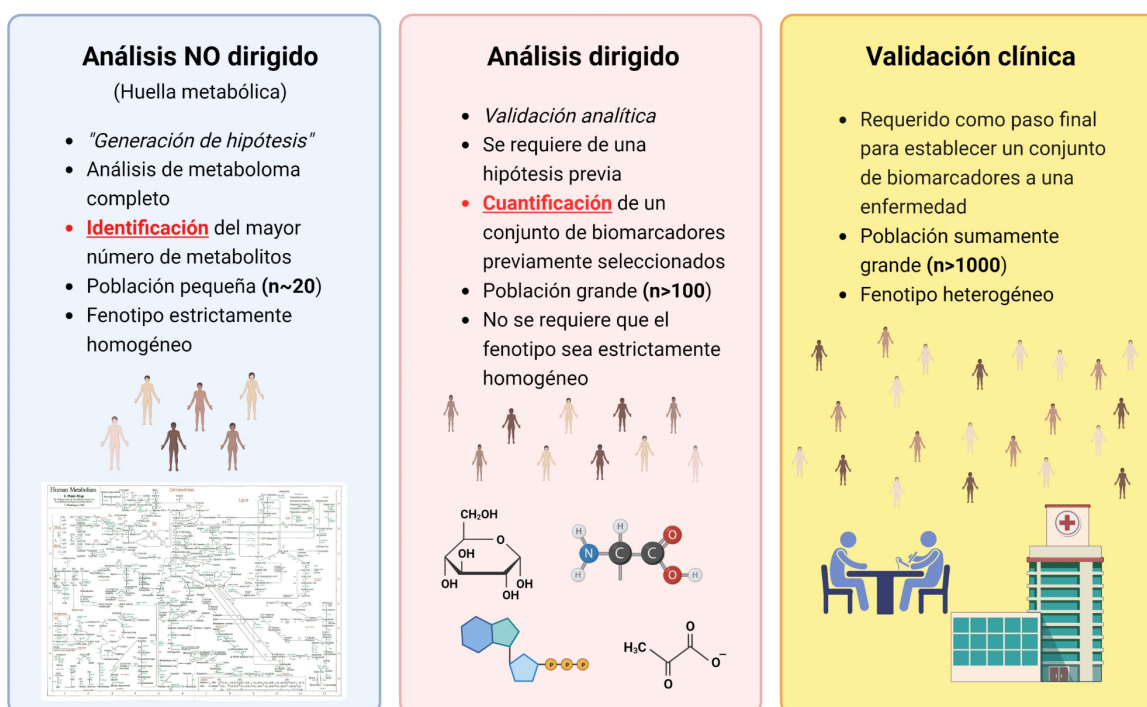


Figura 1.4.2. Representación del proceso metabolómico para la caracterización de potenciales biomarcadores.

Para que un metabolito pueda ser considerado un potencial biomarcador debe de tener un respaldo de evidencias que permitan dar una explicación biológica de su relación con una determinada enfermedad, por ejemplo, el metabolito que actúa actualmente como biomarcador para el diagnóstico de la diabetes es la glucosa [42].

La aplicación de las ciencias ómicas en enfermedades complejas es un gran avance en la investigación ya que permite generar un panorama completo de lo que ocurre en un

organismo vivo y con ello entender el estado de una patología y su progresión, con ello, resulta muy útil para encontrar nuevas estrategias de intervención y tratamiento [42].

1.5. Metabolitos de interés

El análisis metabolómico de este trabajo está enfocado en la aplicación de la metabolómica dirigida en tres grupos de metabolitos: 1) ácidos grasos de cadena corta (SCFA, por sus siglas en inglés *short chain fatty acids*), 2) ácidos biliares (BA, por sus siglas en inglés *bile acids*) y 3) metabolitos relacionados con la inflamación alérgica (AIM, por sus siglas en inglés *allergic inflammation metabolites*), dado que todos ellos guardan relación o bien con la alergia, o bien con la relación huésped-microbiota.

Los SFCA, especialmente acético, propiónico y butírico promueven la generación de células T reguladoras (T_{reg}) y suprimen la función inflamatoria de las células dendríticas (DC) en las vías respiratorias, así mismo, mantienen un pH bajo en el intestino lo que inhibe el crecimiento de bacterias patógenas; en este sentido, la deficiencia de SCFA en el intestino está relacionado con el desarrollo de AA [39,45]. Los SFCA son fuente de energía para diversos grupos bacterianos y células epiteliales intestinales, el acético, propiónico y butírico son los metabolitos más abundantes de su tipo, pueden encontrarse en la sangre y el tracto intestinal [40].

Trompette et. al., encontraron mediante un estudio en modelo de ratón que la incorporación de fibra en la dieta resulta en comunidades microbianas intestinales marcadamente diversas; por el contrario, la falta de fibra dietética disminuye notablemente la riqueza y diversidad bacteriana de la microbiota intestinal. De forma particular, las fibras fermentables promueven el crecimiento de bacterias del filo bacteroidetes, lo que a su vez lleva a un aumento en la concentración local y sistémica de SCFA. De forma particular, se encontró que el propiónico provoca un efecto protector contra la inflamación alérgica en las vías respiratorias [40].

Por su parte, Tan, et. al., pudieron establecer que una dieta con un contenido alto en fibra da paso a una reducción significativa en los síntomas clínicos tales como anafilaxia. De igual manera, mediante la suplementación directa de SFCA a modelos de ratón pudieron establecer que los ácidos acético y butírico brindan una protección contra la AA al observar una reducción en los síntomas clínicos y una reducción en los niveles séricos de IgE. Dado que la suplementación directa con SCFA no provocó cambios en la composición de la microbiota de los ratones se pudo comprobar que el efecto de estos metabolitos sobre la AA es directo [45].

Por otro lado, los BA son moléculas derivadas del colesterol y sintetizadas en el hígado envueltas en procesos fisiológicos esenciales, por ejemplo, dadas sus propiedades detergentes, facilitan la absorción y/o eliminación de lípidos y vitaminas liposolubles en el lumen intestinal, así mismo, contribuyen a la homeostasis de la microbiota intestinal y a la regulación del gasto energético del huésped [46,47]. Los BA primarios son sintetizados en el hígado y posteriormente metabolizados en la microbiota intestinal para dar paso a la formación de BA secundarios. En este contexto, los BA pueden causar efectos benéficos o dañinos para el huésped según sea el ácido en cuestión. En el plano de las alergias, se ha demostrado que el ácido ursodesoxicólico (UDCA) tiene efectos inmunomoduladores tales como la supresión de la producción de inmunoglobulinas [47-50]. Así mismo, se ha encontrado que los BA modulan la diferenciación y función de las células T, ayudando a la protección contra patógenos [51].

Finalmente, estudios previos de nuestro grupo de investigación utilizando la metabolómica no dirigida en combinación con la transcriptómica y la proteómica en diferentes modelos de gravedad de la enfermedad alérgica, permitió identificar metabolitos relacionados con el metabolismo energético, los esfingolípidos, las vías de los fosfolípidos y la función plaquetaria asociados al fenotipo grave de alergia y anafilaxia [52-54]. Así que en función de la existencia de los patrones comerciales, se desarrolló y validó una metodología para medir hasta 36 metabolitos relacionados con la inflamación alérgica [52]. Entre ellos, por ejemplo, la esfingosina-1-fosfato (S1P, por sus siglas en inglés *sphingosine 1-phosphate*), es una molécula con propiedades pro-inflamatorias en las vías respiratorias [55-58]. Por su parte, la oleamida tiene efectos antiinflamatorios a nivel neurológico e interviene en la regulación de la respuesta inmune a través del sistema endocannabinoide [59-61]. De igual manera las lisofosfatidilcolinas (LPC) son metabolitos con propiedades pro-inflamatorias, inductoras de vasoconstricción [62].

1.6. Técnicas analíticas aplicada en análisis metabolómico

El análisis metabolómico completo requiere la integración de diversas técnicas analíticas, dado que resulta difícil detectar todos los metabolitos presentes en un metaboloma utilizando una única técnica de análisis. Actualmente, se utilizan dos técnicas analíticas principales en metabolómica: la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR, por sus siglas en inglés *Nuclear Magnetic Resonance*) y la espectrometría de masas de alta resolución (HRMS, por sus siglas en inglés *High Resolution Mass Spectrometry*). Esta última se utiliza

generalmente siendo acoplada a técnicas analíticas de separación como son la cromatografía de líquidos (LC-MS), cromatografía de gases (GC-MS) y la electroforesis capilar (CE-MS), y son las más utilizadas debido a su alta sensibilidad y potencial de elucidación estructural [42,63,64]. Entre todas las técnicas, la LC-MS es la más utilizada [42,64].

1.6.1. Espectrometría de masas

La MS es una técnica analítica enfocada en la separación y detección de múltiples compuestos. El avance tecnológico y la modernización de esta técnica ha hecho que los equipos de MS sean más fáciles de manejar, llevando a la MS a ser una técnica fundamental en el estudio de proteínas, lípidos y metabolitos [65]. El análisis de analitos mediante MS se fundamenta en el estudio de iones cargados en fase gaseosa los cuales son separados en función de su masa carga (m/z) y su abundancia [44,65].

Los componentes principales de un equipo de MS son: la fuente de ionización, el analizador de masas y el detector. En este sentido, el analizador y el detector se encuentran en condiciones de alto vacío, de esta forma se evita su influencia en el patrón de fragmentación de las moléculas, reduciendo de esta manera el ruido instrumental en el análisis [65,66]. Los espectrómetros de masas en tándem (MS/MS) poseen la capacidad adicional de seleccionar iones e inducir su fragmentación para obtener información estructural detallada de las especies seleccionadas [65,66].

1.6.1.1. Métodos de ionización

Existen diversas fuentes de ionización, la técnica tradicional es el impacto electrónico (EI), esta técnica está enfocada en la análisis de moléculas pequeñas, volátiles y termoestables, generalmente, utilizada en el acoplamiento de la técnica GC-MS. En EI las moléculas colisionan con un haz de electrones acelerados y energéticos (70 eV), el choque de las moléculas con el haz electrónico provoca la retirada de un electrón dentro de la molécula que genera un ión molecular (catión radical [M^{+*}]), cuya relación m/z corresponde a la masa nominal del compuesto. A partir de este la molécula se fragmenta, teniendo la ventaja de que el patrón de fragmentación es característico de cada molécula por lo que resulta ser reproducible (figura 1.6.1) [65].

Este tipo de ionización se considera agresiva con el analito, además, para la ionización es necesario que el analito se encuentre en estado gaseoso, por lo que los compuestos no volátiles, polares y termolábiles no pueden ser ionizados mediante EI [65,66].

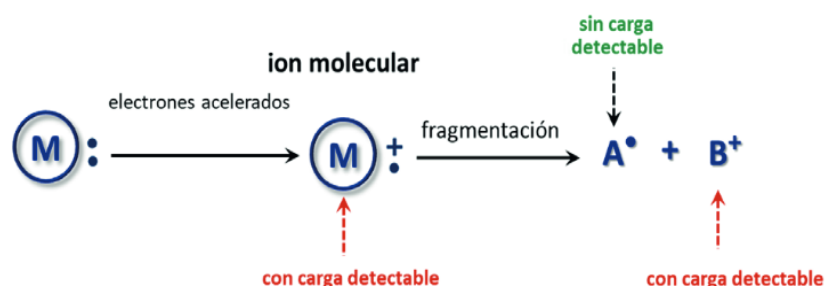


Figura 1.6.1. Representación del proceso de ionización y subsecuente ionización por impacto electrónico (EI). Reproducción de [65].

A partir de la necesidad de analizar compuestos termolábiles y no volátiles, se han desarrollado nuevos sistemas de ionización. A finales de la década de los ochenta, se desarrollaron entre otras, la ionización por electrospray (ESI) y la ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI), ambas son técnicas de ionización suaves, utilizadas comúnmente para los análisis LC-MS de moléculas biológicas como péptidos, proteínas o lípidos [65].

En la ionización mediante ESI, el analito (que se encuentra en disolución), fluye a través de un capilar metálico al que se le aplica un alto voltaje con el fin de producir iones, trabajando a presión atmosférica. El extremo del capilar por el que la disolución que contiene al analito sale, está en forma de cono (cono de Taylor), esto hace que a su salida, se formen gotas pequeñas que contienen a los analitos cargados que posteriormente son desolvatados normalmente, a través de una corriente alta de nitrógeno (N₂), las gotas posteriormente se volverán más pequeñas produciendo un fenómeno denominado explosión de Coulomb cuando la tensión superficial del líquido se vea superada por la repulsión entre cargas presentes en la superficie de la gota hasta formarse finalmente los iones del analito en estado gas (figura 1.6.2) [65].

En este sentido, dado que la ionización en ESI es a partir de una solución, los compuestos termolábiles pueden ionizarse y volatilizarse mediante esta técnica idealmente sin que sufran una fragmentación [65].

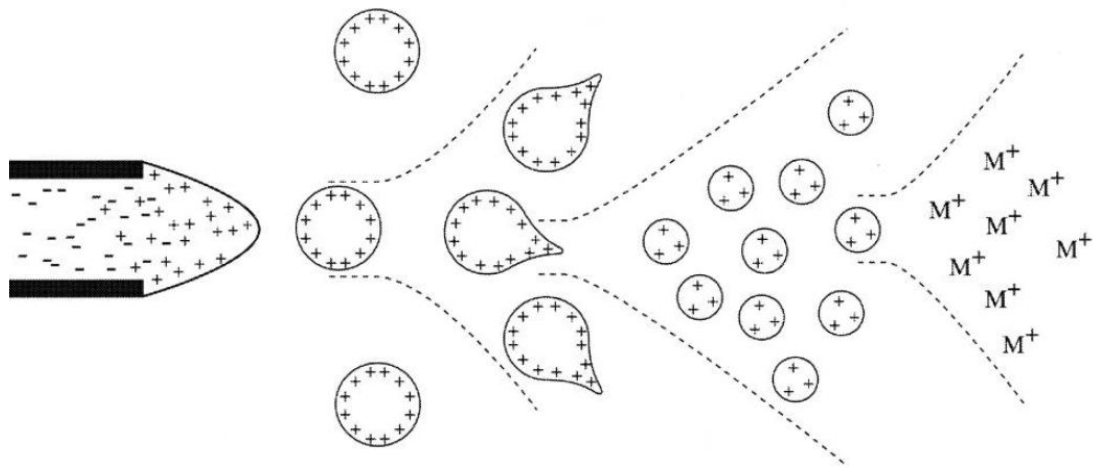


Figura 1.6.2. Representación del proceso de ionización por electrospray (ESI).
Reproducción de [67].

Por su parte, en MALDI la muestra que contiene el analito (en baja concentración) es embebida en un material matriz (sólida o líquida) que está depositada en el extremo de una sonda de acero inoxidable o colocada en una placa metálica dentro de una cámara de vacío. Durante el proceso de ionización, del analito junto con la matriz son irradiados con un láser de pulso corto, en este sentido, la matriz es capaz de absorber cantidades grandes de energía por lo la energía proveniente de la irradiación láser es absorbida por la matriz y transferida a las moléculas de la muestra, el analito y la matriz son posteriormente desorbidos, formando iones en fase gaseosa (figura 1.6.3) [65,66]. Este tipo de ionización es utilizada para el análisis de ciertos biopolímeros tales como proteínas, péptidos, oligonucleótidos, polisacáridos y polímeros sintéticos [65,66].

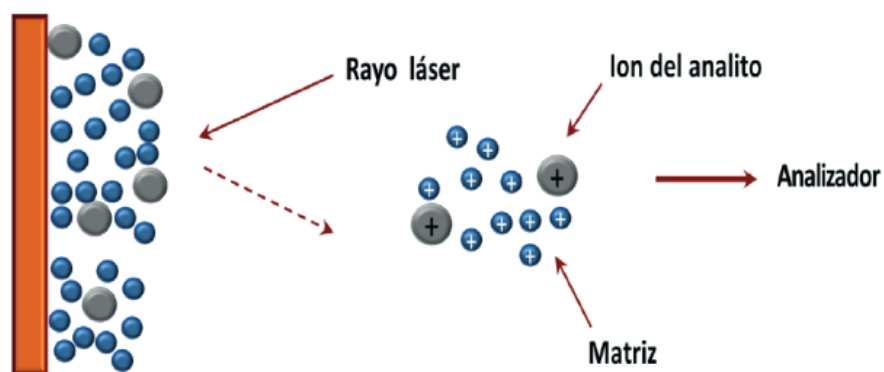


Figura 1.6.3. Representación del proceso de ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI). Reproducción de [65].

1.6.1.2. Analizadores

En MS, los analizadores de masas son aquellos componentes encargados de la separación de iones en base a su m/z , en este sentido, para el análisis de moléculas biológicas los analizadores utilizados con mayor frecuencia son: los cuadrupolos (Q) y tiempo de vuelo (TOF, por sus siglas en inglés *Time of flight*) [65].

El analizador de Q consta de 4 varillas metálicas paralelas dispuestas en un cuadrado a las que se les aplica un potencial de corriente continua (CD) y radiofrecuencia (RF) siendo de esta forma separados los iones en función de sus valores m/z . Aplicando valores específicos de DC y RF iones de determinado valor de m/z pueden seleccionarse, pues tendrán una trayectoria estable y serán capaces de pasar a través del analizador al detector [44,65]. El inconveniente del analizador Q es que tiene una resolución baja de la masa del ión (un decimal), para compensar esto, se utilizan 3 cuadrupolos dispuestos uno detrás de otro. Este tipo de configuración se denomina triple cuadrupolo (QqQ). Cada cuadrupolo tiene una función distinta: el primer cuadrupolo (Q1) funge como un filtro de masas ordinario, el segundo cuadrupolo (q2) actúa como celda de colisión donde se fragmenta la masa cargada del ión seleccionado en el Q1, y el tercer cuadrupolo (Q3) aísla un fragmento específico. El q2 aplica las condiciones más favorables para la producción de fragmentos específicos. La selección de una masa inicial que da un fragmento específico se denomina transición y se considera única del compuesto o metabolito (figura 1.6.4) [44,65,66]. Esta configuración proporciona mayores capacidades de especificidad, sensibilidad y selectividad [44].

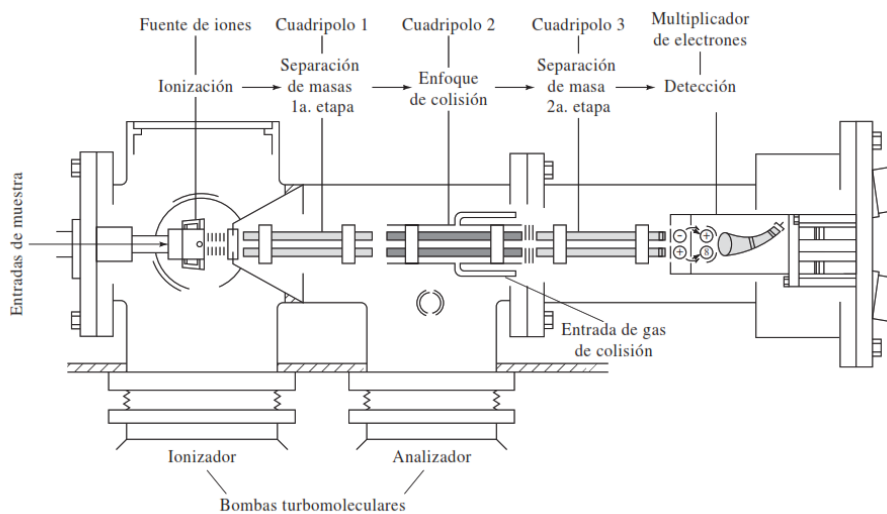


Figura 1.6.4. Esquema de un QqQ-MS. Reproducción de [66].

En el analizador TOF mide el tiempo requerido para que los iones cargados viajen dentro del analizador hasta llegar al detector. El fundamento de este analizador consiste en que los iones al ser acelerados estos reciben la misma energía cinética por unidad de carga (E_k) y pasarán a través de un tubo de deriva libre de campo de 1-2 m de longitud (en condiciones de alto vacío). Debido a esto, la velocidad que adquiera cada ión estará relacionada con su m/z . En este sentido, la velocidad será inversamente proporcional a su masa, por lo que los iones más ligeros llegarán al detector primero que aquellos de un mayor peso (figura 1.6.5) [65,66]. En comparación con el analizador Q, el TOF tiene una mayor resolución y exactitud de las relaciones m/z (hasta 4 decimales), que a su vez se ve aumentada al incrementar la longitud del tubo de deriva [65].

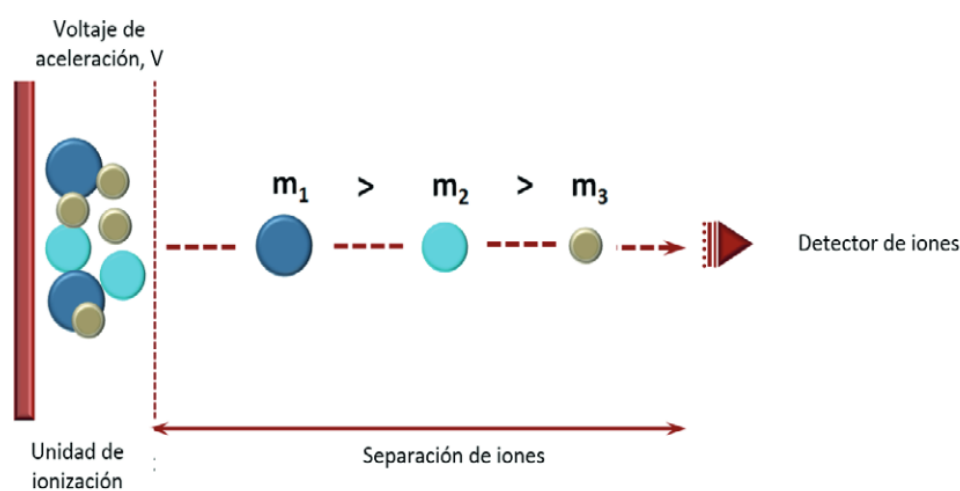


Figura 1.6.5. Mecanismo de separación del analizador TOF. Reproducción de [65].

1.6.2. Cromatografía de líquidos (LC)

Las técnicas cromatográficas son métodos físicos de separación en los que los componentes a separar se distribuyen en dos fases, una fase que permanece inmóvil (fase estacionaria) y otra fase que se mueve a través de la fase estacionaria (fase móvil) en una dirección definida. En este sentido, la cromatografía de líquidos (LC, por sus siglas en inglés *Liquid Chromatography*) tal y como su nombre lo indica, hace uso de una fase móvil en forma líquida para la separación de compuestos. Dentro de la cromatografía de líquidos, la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés *High Performance Liquid Chromatography*) es la más utilizada actualmente por su gran versatilidad, cuya principal diferencia con la cromatografía de líquidos convencional es que la fase móvil en LC se mueve por la fuerza de gravedad, mientras que en HPLC, la fase móvil

fluye en altas presiones creadas por una bomba, lo que reduce el tiempo análisis y optimiza la separación de los analitos en una determinada muestra [66]. En este sentido, en la actualidad, se refiere comúnmente a LC a todos los sistemas que generalmente hacen uso de un equipo HPLC.

Tomando en cuenta lo anterior, existen diversos tipos de LC, que son clasificados ya sea por el principio de separación en el que se basan o bien, por el tipo de interacción con la fase estacionaria que utilizan; entre ellos se encuentran la cromatografía de partición o líquido-líquido, cromatografía de adsorción o líquido-sólido, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía por afinidad, cromatografía quiral y cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC, por sus siglas en inglés *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*) [66]. Para cualquier tipo de LC, se cuentan con los mismos componentes principales: inyector de muestras, fases móviles, fase estacionaria (columna) y detector; en este sentido, la diferencia entre cada uno de ellos está en función a la fase estacionaria que se utiliza [66].

Las condiciones cromatográficas se pueden ajustar según la muestra a separar, aunque de forma general, la separación de los analitos en la muestra se basa según el grado de afinidad o el tipo de interacción con la fase estacionaria o la fase móvil. En este sentido, no siempre es posible conseguir una buena separación de compuestos utilizando una fase móvil que contenga un solo disolvente. Generalmente se utilizan mezclas de disolventes, que a su vez pueden eluir de manera isocrática (composición de la fase móvil constante a lo largo del análisis) o bien, en gradiente (la proporción de disolventes de la fase móvil se altera a lo largo del análisis), en esta última se va aumentando a lo largo del análisis la proporción de un disolvente que se sabe que es más eficaz para eluir los compuestos más retenidos [65].

Históricamente, dentro de la LC, la cromatografía en fase normal fue la primera de desarrollarse, en ella se utiliza una fase estacionaria polar, generalmente, las columnas son empacadas con sílice o compuestos con grupos amino, ciano o diol, mientras que la fase móvil se trata de disolventes orgánicos no polares, tales como diclorometano o acetato de etilo [65,66]. La separación en la fase normal es posible por la diferencia en las interacciones polares de cada compuesto con la fase estacionaria, es decir, dentro de esta técnica, los compuestos polares se retienen un mayor tiempo en la columna, al aumentar la polaridad de la fase móvil a lo largo del análisis es posible disminuir su retención, es decir, cuanto más polar sea la fase móvil, la retención será menor [65,66]. Esta técnica actualmente es poco utilizada dada la gran toxicidad de los disolventes utilizados como fase móvil.

En contraparte, la LC en fase inversa tiene una fase estacionaria no polar o de baja polaridad, donde se utilizan columnas empacadas con hidrocarburos de cadena larga enlazados covalentemente a la superficie de la sílice (C8 o C18) y una fase móvil orgánica polar (como metanol o acetonitrilo) en mezcla con soluciones acuosas. Este tipo de cromatografía es la más habitual dada su gran versatilidad y baja peligrosidad de los disolventes utilizados como fase móvil [65,66]. En este tipo de separación, los componentes no polares tendrán una mayor retención en la columna, siendo los compuestos polares aquellos que se retengan un menor tiempo en la fase estacionaria. El principio de esta separación es la diferencia en la hidrofobicidad de cada compuesto presente en la muestra [65].

En la HPLC los compuestos son identificados por su tiempo de retención (t_R), sin embargo, cuando los compuestos tienen un t_R similar, no es posible separarlos por este método [65]. Entonces, se hacen uso técnicas acopladas para una mejor detección de los componentes. En este sentido, la LC-MS (cromatografía de líquidos acoplada a cromatografía de masas, por sus siglas en inglés *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) permite diferenciar numerosos compuestos con t_R similar pero diferente m/z , se trata de una técnica analítica que puede utilizarse para el análisis cualitativo y/o cuantitativo, cuya principal ventaja es el alto número de especies detectables al utilizar dicha técnica [65].

1.6.3. Resonancia magnética nuclear

La RMN se basa en medir la absorción de un núcleo atómico al someterlo a un campo magnético intenso que es irradiado con ondas de radiofrecuencia (RF, 4 a 900 MHz) [66].

El fundamento teórico de esta técnica analítica se remonta a 1924, cuando W. Pauli sugirió que algunos núcleos atómicos tienen las propiedades de giro o *spin* (en inglés), así como un momento magnético, por ello, al exponerlos a un campo magnético se produciría el desdoblamiento de sus niveles energéticos. Posteriormente, en 1946 F. Bloch y E. Purcell realizaron trabajos independientes en donde demostraron de forma experimental lo dicho por Pauli, razón que les hizo merecedores del Premio Nobel en 1952 [66].

Avances posteriores revelaron que la absorción de RF por parte del núcleo se veía influenciada por el entorno molecular, aspecto que podría relacionarse con la estructura molecular. A partir de 1953, cuando Varian Associates comercializa el primer RMN es que el crecimiento y aprovechamiento de esta técnica crece a nivel exponencial y con ello la investigación y avances en diversas áreas de la química [66].

Dentro del análisis metabolómico, la RMN es una técnica rápida, no invasiva y no destructiva que cuya ventaja adicional es que puede aplicarse para muestras sólidas, líquidas y gaseosas, así mismo, requiere de una preparación mínima para la muestra. La RMN genera información sobre la identidad y cantidad de un elevado número de metabolitos en un solo experimento, sin embargo, en comparación con MS, tiene una menor sensibilidad y, aunado a eso, el análisis de los espectros es altamente complejo comparado con cualquier técnica de MS [44,65].

Capítulo 2

2.1 JUSTIFICACIÓN

Este trabajo forma parte del proyecto de investigación llamado DIFAMEM (abreviación del inglés para *Dietary Intervention in Food Allergy: Microbiome, Epigenetic and Metabolomic interactions*), el cual es un estudio Europeo novedoso que pretende aprovechar el potencial de una dieta enriquecida en pectina para tratar la AA abordando de forma exhaustiva sus efectos sobre el epigenoma y el microbioma, las modificaciones metabolómicas y la modulación inmunitaria. Se trata de un proyecto internacional y multidisciplinario en donde colaboradores de distintas instituciones trabajarán en conjunto para identificar qué tipo de pectina (HMP o LMP) ejerce los efectos benéficos más fuertes en las AA en términos de cambios inmunológicos, así como investigar los mecanismos inmunomoduladores subyacentes de las AAs analizando entre otros aspectos la metabolómica e identificando potencialmente biomarcadores y dianas terapéuticas [16].

Dentro del conjunto de colaboradores, se encuentra el Centro de Excelencia en Metabolómica y Bioanálisis (CEMBIO), perteneciente a la Facultad de Farmacia de la Universidad San Pablo CEU (Madrid, España). En este proyecto, el CEMBIO será encargado del análisis metabolómico dirigido de los metabolitos de interés (SCFA, BA, y AIM) en suero de pacientes con AA a LTP con el fin de dilucidar el impacto de ambos tratamientos en el metaboloma de los pacientes y así, evaluar la posibilidad de ser usados posteriormente como tratamiento clínico.

En este sentido, esta tesis se centra en el análisis estadístico de los metabolitos: SCFA, BA, y AIM cuantificados en muestras de suero obtenidas de pacientes con AA mediada por LTP antes y después de una intervención de 2 meses con pectinas de tipo HMP, LMP y placebo, así como el análisis de un grupo control de sujetos no alérgicos.

2.2. HIPÓTESIS

La hipótesis del presente trabajo es que tras recibir el tratamiento con pectinas, los pacientes alérgicos deberían mostrar cambios en la composición de los metabolitos de estudio (SCFA, BA y AIM) que resulten positivos para la salud del hospedero. Se espera que dichos cambios sean distintos para cada grupo de pacientes alérgicos y que guarden relación con el tipo de pectina administrada (LMP o HMP).

2.3. OBJETIVOS

2.3.1. Objetivo General

Realizar el tratamiento estadístico de los metabolitos cuantificados (SCFA, BA y AIM) a partir de tres análisis dirigidos, basados en el uso de la cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas con analizador de triple cuadrupolo (LC-QqQ-MS) en muestras séricas de pacientes con AA a LTP que recibieron diferentes tratamientos con pectinas y placebo y determinar si existe mejoría en su condición alérgica.

2.3.2. Objetivos Particulares

- Aplicar estadística diferencial univariante y multivariante para encontrar aquellas diferencias significativas en los metabolitos cuantificados que se correlacionen con el efecto del tratamiento en el tiempo y con la eficacia clínica del tratamiento.
- Comparar e interpretar los resultados obtenidos con la literatura existente respecto a los efectos observados en estudios previos.
- Determinar si el grado de esterificación de la pectina guarda relación con los cambios positivos observados en la salud del paciente.

2.4. MATERIALES Y MÉTODOS

2.4.1. Diseño experimental

2.4.1.1. Elección de pacientes alérgicos a nsLTP y controles

Para el estudio se reclutaron pacientes alérgicos a nsLTP así como sujetos no alérgicos utilizados como controles, cuyas edades se encontraban de los 14 a 60 años por el Hospital Regional Universitario de Málaga, España.

Para confirmar la alergia a nsLTP, se utilizaron protocolos validados y estandarizados que consistieron en:

1. Presentar una respuesta positiva a la prueba de punción cutánea frente a extractos de distintos pólenes así como al extracto de nsLTP proveniente de durazno (Pru p 3), el criterio de respuesta positiva fue presentar una roncha de al menos 3 mm de diámetro.
2. Presentar una respuesta positiva de IgE específica a Pru p 3 con una concentración mayor a 0.35 kU_A/L.
3. Presentar una respuesta positiva a una prueba de provocación alimentaria oral de doble ciego controlada con placebo (PAODCCP) con durazno. En este sentido, la PAODCCP no fue efectuada a aquellos pacientes que hayan presentado más de dos episodios de anafilaxia tras la ingesta de durazno en los dos años anteriores al estudio.

De 137 pacientes a los que se realizaron las pruebas, 34 fueron los pacientes seleccionados que culminaron con éxito el tratamiento. Así mismo, los individuos del grupo control no alérgico está compuesto de aquellos individuos que dieron negativo a todas las pruebas realizadas.

2.4.1.2. Tratamiento administrado y toma de muestra

De los 34 pacientes, 12 fueron tratados con la pectina LMP (CU901, proveniente de cáscara de frutos cítricos), 13 pacientes con la pectina HMP (Herbapekt, proveniente de la cáscara de manzana) y 9 fueron tratados con placebo (preparado con almidón de maíz y saborizante a durazno). La asignación del tratamiento se hizo de manera aleatoria y ciega para el paciente y el médico. Para este estudio, ambas pectinas (HMP y LMP) contaron con un bajo peso molecular y tenían un grado de esterificación del 57% y 7.3%, respectivamente [16].

Durante el tratamiento, a los pacientes alérgicos se les administró 10 g de la pectina correspondiente junto con 5 g de almidón de maíz o bien sólo 5 g de almidón de maíz para el caso de los placebos, disueltos en agua o jugo de limón de forma oral dos veces al día durante dos meses.

Se tomaron muestras de suero de los pacientes alérgicos y del grupo control antes de recibir el tratamiento (semana 0) y tras culminar el tratamiento (semana 8, 2 meses), se tomaron muestras de suero únicamente de los pacientes alérgicos. Para ello se obtuvieron muestras de sangre por venopunción, transcurridos 12 minutos después de la extracción de sangre y tras la coagulación de la misma, esta fue centrifugada durante 10 minutos a temperatura ambiente y se recolectó el suero en tubos de 5 mL que finalmente fueron congelados a -80°C para su posterior análisis [16].

Así mismo, una vez terminado el tratamiento (2 meses, T2), se realizó una prueba de provocación oral con durazno en los pacientes alérgicos para diferenciar aquellos pacientes Tolerantes de los No Tolerantes, ya que este es un criterio sobre la eficacia clínica del tratamiento. La figura 2.4.1 resume el diseño experimental que se realizó para este proyecto.

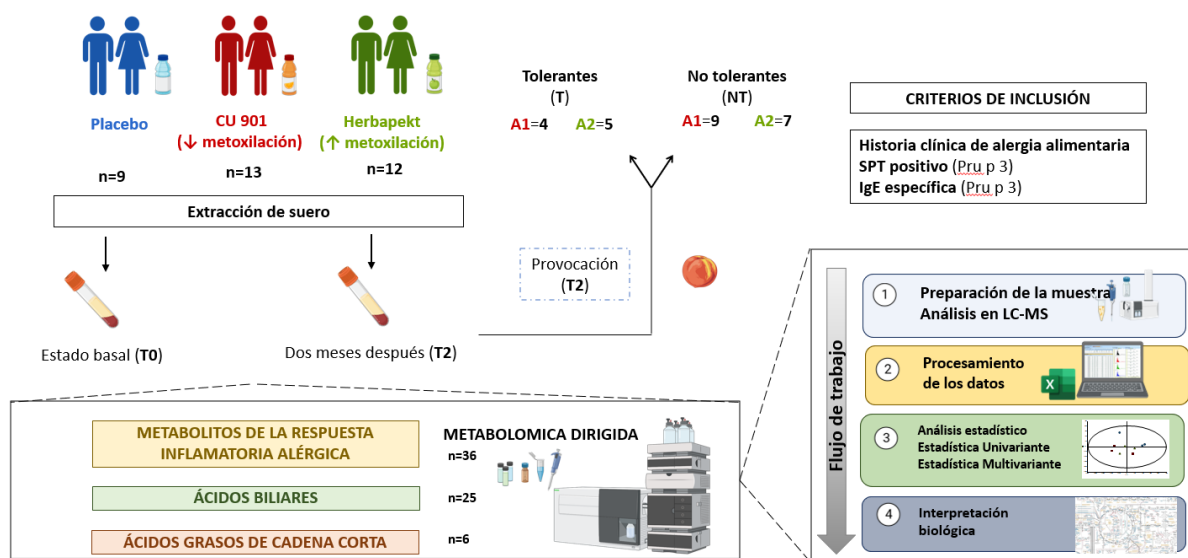


Figura 2.4.1. Diseño experimental de los análisis metabolómicos del proyecto DIFAMEM.

2.4.2 Método analítico para ácidos grasos de cadena corta (SCFA)

2.4.2.1. Patrones para la cuantificación de SCFA

Se utilizaron los siguientes estándares: ^{13}C -AcéticoDnsHz, ^{13}C -ButíricoDnsHz, ^{13}C -PropionicoDnsHz, ^{12}C -AceticoDnsHZ, ^{12}C -ButíricoDnsHz, ^{12}C -IsobutiricoDnsHz, ^{12}C -IsovaléricoDnsHz, ^{12}C -PropiónicoDnsHz, ^{12}C -ValéricoDnsHz.

Para la cuantificación de estos, se llevó a cabo una curva externa de calibración, así mismo, para la detección de cada especie se utilizaron las transiciones correspondientes de m/z los valores de cada uno se enlistan en la tabla 2.1.

Tabla 2.1. Tabla de transiciones dMRM del método analítico LC-QqQ-MS para SCFA[&].

Compuesto	Ion precursor (m/z)	Ion fragmento (m/z)	Voltaje de fragmentación (V)	Energía de colisión (V)
13C-AcéticoDnsHz	309.1	171	119	25
13C-ButíricoDnsHz	337.1	171	124	29
13C-PropionicoDnsHz	323.1	171	129	25
12C-AceticoDnsHZ	308.1	171	119	25
12C-ButíricoDnsHz	336.1	171	124	29
12C-IsobutiricoDnsHz	336.1	171	124	25
12C-IsovaléricoDnsHz	350.1	171	129	25
12C-PropiónicoDnsHz	322.1	171	129	25
12C-ValéricoDnsHz	350.1	171	129	25

&: Voltaje de aceleración: 4 V; Tiempo de retención: 15min; Ventana de tiempo de retención:30min; Polaridad: positiva.

2.4.2.2. Fundamento del método

El método para la determinación de SCFA es un método optimizado por colaboradores del CEMBIO que aún no está publicado, pero que está basado en un método publicado por Zhao y Li en 2018 [68].

En este sentido, se trata de un método analítico para ácidos carboxílicos, entre los que se incluyen los SCFA: ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido isobutírico, ácido valérico y ácido isovalérico, mediante una previa derivatización y marcaje isotópico (^{13}C) con dansyl hidrazina (^{12}C -DnsHz y ^{13}C -DnsHz) para dar paso a la formación de los correspondientes hidrazidas (Figura 2.4.2). El marcaje isotópico se lleva a cabo a temperatura ambiente en una solución acuosa en 2 horas y tiene como principal objetivo cambiar las propiedades de los SCFA que dificultan su análisis. Así, al estar unidos a una molécula

grande tal como DnsHz, se aumenta su peso molecular, reduciendo su volatilidad y facilitando su capacidad de fragmentación lo que permite una mejor identificación en el análisis QqQ [68]. Debido a la confidencialidad, las características del tratamiento de muestra y preparación de patrones para la cuantificación de los SCFA en el método optimizado por el grupo de investigación, no se describe.

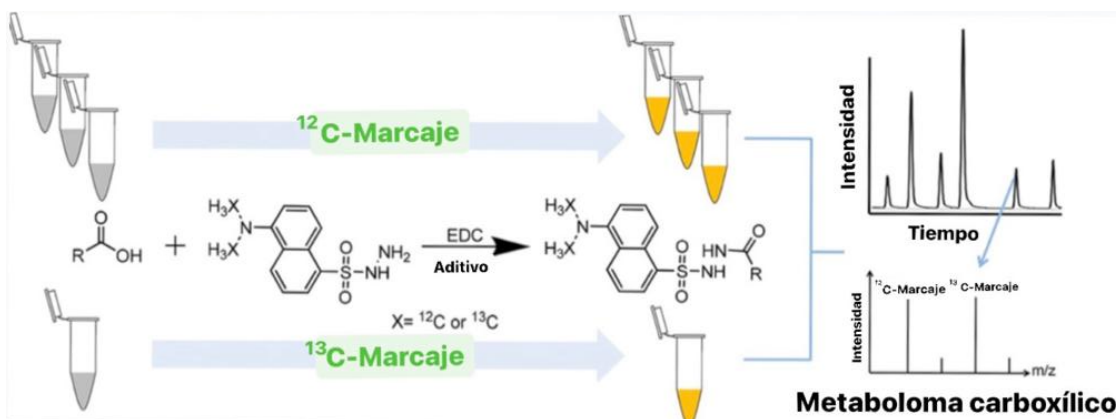


Figura 2.4.2. Representación gráfica del método desarrollado por Zhao y Li, 2018.
Reproducción de [68].

2.4.3. Método analítico para ácidos biliares (BA)

2.4.3.1. Estándares y solventes

El método consiste en analizar BA primarios y secundarios, para el estudio se utilizaron un total de 44 BA: 36 de ellos descritos en la literatura como posibles de encontrar en muestras de humanos, 3 sintéticos y 5 deuterados.

Los estándares internos de BA sintéticos: ácido glicodehidrocólico (3,7,12-GDHCA), ácido taurodehidrocólico (3,7,12-TDHCA) y ácido hidrocólico (3,7,12-DHCA), todos a 1000 ppm.

Los estándares de BA deuterados: ácido glicocólico deuterado (GCA_d4), ácido desoxicólico deuterado (DCA_d4), ácido quenodesoxicólico deuterado (CDCA_d4), ácido cólico deuterado (CA_d4) y ácido ursodesoxicólico deuterado (UDCA_d4), todos a una concentración de 100 ppm.

En este sentido, los BA fueron comprados en Steraloids (Rhode Island, Estados Unidos), Sigma-Aldrich (Missouri, Estados Unidos) y Cayman Chemicals (Michigan, Estados Unidos). Los solventes utilizados fueron: agua grado Milli-Q (H_2O), acetonitrilo, alcohol isopropílico y ácido acético. Por su parte, los reactivos químicos adicionales utilizados fueron el acetato

amónico (Panreac, USA). Dentro de este estudio fue posible detectar 25 BA, enlistados en la tabla 2.2.

Tabla 2.2. Ácidos biliares detectados en el análisis dirigido.

Nombre	Abreviación	Nombre	Abreviación
Ácido cólico	CA	Ácido glicolítico	GLCA
Ácido glicólico	GCA	Ácido taurolitocólico	TLCA
Ácido 5-colánico-3 β -ol	5-cholenic	Ácido isolitocólico	iLCA
Ácido desoxicólico	DCA	Ácido 7-cetolítico	KLCA
Ácido glicodesoxicólico	GDCA	Ácido glicohiocólico	GHCA
Ácido quenodesoxicólico	CDCA	Ácido hiodesoxicólico	HDCA
Ácido glicoursodesoxicólico	GUDCA	3 β -Ácido 5 β -colánico-12 α -diol	3b-DCA
Ácido taurocólico	TCA	Ácido tauro- ω -muricólico	TwMCA
Ácido taurodesoxicólico	TDCA	Ácido hiocólico	HCA
Ácido tauroquenodesoxicólico	TCDCA	Ácido taurohiocólico	THCA
Ácido taoursodesoxicólico	TUDCA	Ácido ursodesoxicólico	UDCA
Ácido litocólico	LCA	Ácido glicokenodesoxicólico	GCDCA
Ácido-3-dehidrocólico	3-DHCA		

2.4.3.2. Preparación de disoluciones estándares

Cada uno de los estándares se preparó de forma individual. Para favorecer la asignación y validación de los 25 BA, estos se dividieron en dos grupos: “alto” o grupo de BA con mayor señal analítica y “bajo” con señales analíticas bajas. Con esta aproximación todos los BA podían separarse en tiempo de retención unos de otros.

Las disoluciones *stock* fueron mezcladas en una única disolución por grupo (alto y bajo) a una concentración 8 veces mayor que la concentración estimada de BA en las muestras de suero (800%). Las curvas de calibración correspondientes fueron preparadas a partir de estas disoluciones *stock*, teniendo 5 puntos a concentraciones de 25, 50, 100, 200 y 400%, y el blanco.

2.4.3.3. Preparación de muestras

La preparación de las muestras se realizó siguiendo el protocolo publicado por Sarafian et. al., 2015 [69] y adaptado por el grupo investigador del CEMBIO (publicación en proceso).

Para la preparación de las muestras se prepararon dos mezclas:

- La mezcla de estándares sintéticos (MeOH-SIS), en donde cada uno se encontraba a una concentración de 500 ppb disueltos en metanol (MeOH).

- La mezcla de estándares deuterados (MeOH-D4-IS), en donde cada uno de los estándares se encontraba a una concentración de 500 ppb disueltos en MeOH.

De las muestras almacenadas, de cada una se midieron 100 μL de suero, se mezclaron con 300 μL de la mezcla fría de MeOH-SIS, se vorteo e incubó la muestra a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 min para posteriormente centrifugar a rpm máxima por 15 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Posteriormente, 245 μL del sobrenadante fueron evaporados en un SpeedVac por 2 h a $47\text{ }^{\circ}\text{C}$ a una presión de 10 mbar. Finalmente, al producto evaporado se le añadieron 50 μL de la mezcla MeOH-D4-IS que fue agitado por vortex y finalmente centrifugado por 10 min a 2000 rcf, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Megafuga) para su posterior análisis.

En este sentido, los estándares internos (IS del inglés *internal standards*) sintéticos (MeOH-SIS) y deuterados (MeOH-D4-IS) fueron añadidos a todas las muestras y a la mezcla de los estándares (disoluciones *stock*) en una concentración final de 1,875 ppb (antes de evaporar) y 500 ppb (añadido después de evaporar), respectivamente.

2.4.3.4. Características y condiciones de trabajo

Los análisis de las muestras se realizaron en un equipo de LC-QqQ-MS modelo 6470B de Agilent Technologies. Las muestras fueron separadas en una columna cromatográfica ACQUITY BEH C8 (Waters) con un tamaño de poro de 130 \AA , tamaño de partícula $1.7\text{ }\mu\text{m}$, diámetro interno de 2.1mm y longitud de 100 mm. Se utilizó una pre-columna VanGuard (Waters) de 2.1 mm de diámetro y 5 mm de longitud para la protección y mantenimiento de la eficacia de la columna cromatográfica, que estaba a una temperatura constante de 60°C .

Las fases móviles consistieron en solvente A: una mezcla de acetonitrilo y agua (ACN/ H_2O) en proporción 1:10 añadiendo 1 mM de acetato amónico y ajustando el pH a 4.15 con ácido acético; solvente B: una mezcla de acetonitrilo y alcohol isopropílico (ACN/IPA) en proporción 1:1. Por otra parte, la solución de lava sellos fue una mezcla de H_2O /IPA en una proporción 1:1. El volumen de inyección fue de 5 μL y el tiempo de análisis total fue de 15 min. La temperatura del auto-muestreador fue 4°C . Previo al análisis, se realizaron 3 ciclos de lavado de columna suaves (H_2O /IPA, 90:10) y un lavado fuerte con IPA.

El sistema de QqQ-MS fue operado en modo dMRM (por sus siglas en inglés, *dynamic multiple reaction monitoring*) a una velocidad de 1 ciclo por 500 milisegundos en modo de ionización por electrospray negativo (ESI-). Los parámetros del MS fueron los siguientes:

temperatura de la fuente ionización 150 °C, temperatura de desolvatación 600 °C, voltaje del cono 60 V, voltaje del capilar 1500 V, flujo de gas de desolvatación 1000 L/h y flujo de gas del cono 150 L/h.

Para la cuantificación de estos, se utilizó una curva externa de calibración, así mismo, para la detección de cada especie se utilizaron las transiciones correspondientes de m/z los valores de cada uno se enlistan en la tabla 2.3.

Tabla 2.3. Tabla de transiciones dMRM del método analítico LC-QqQ-MS para BA[&].

Compuesto	Ion precursor (m/z)	Ion fragmento (m/z)	Voltaje de fragmentación (V)	Energía de colisión (V)	Tiempo de retención (min)	Grupo (señal analítica)
CA	407.3	407.3	220	0	7.461	Alto
GCA	464.3	464.3	215	50	6.35	Alto
5-cholenic	373.3	373.3	220	0	10.581	Alto
DCA	391.3	391.3	220	0	10.752	Bajo
DCA	391.3	345.2	220	38	10.752	Bajo
GDCA	448.3	448.3	220	0	8.85	Alto
GDCA	448.3	74	220	50	8.85	Alto
CDCA	391.3	391.3	220	0	10.676	Alto
GUDCA	448.3	448.3	205	0	5.732	Alto
GUDCA	448.3	74	205	46	5.732	Alto
TCA	514.3	514.3	215	0	5.928	Bajo
TCA	514.3	80	215	80	5.928	Bajo
TDCA	498.3	498.3	210	0	8.317	Alto
TDCA	498.3	80	210	80	8.317	Alto
TCDCa	498.3	498.3	220	0	7.86	Alto
TCDCa	498.3	80	220	78	7.86	Alto
TUDCA	498.3	498.3	220	0	5.34	Bajo
TUDCA	498.3	80	220	80	5.34	Bajo
LCA	375.3	375.3	220	0	11.131	Alto
3-DHCA	401.2	401.2	220	0	4.412	Alto
GLCA	432.3	432.3	220	0	10.28	Alto
GLCA	432.3	74	220	42	10.28	Alto
TLCA	482.3	482.3	220	0	10.02	Bajo
TLCA	482.3	80	220	78	10.02	Bajo
iLCA	375.3	375.3	215	0	10.822	Bajo
KLCA	389.3	389.3	215	0	9.65	Bajo
GHCA	464.3	464.3	220	0	5.389	Bajo
GHCA	464.3	74	220	46	5.389	Bajo
HDCA	391.3	391.3	220	0	9.77	Bajo
TwMCA	514.3	514.3	220	0	3.74	Bajo
TwMCA	514.3	80	220	80	3.74	Bajo
HCA	407.3	407.3	220	0	8.897	Bajo
HCA	407.3	388.9	220	46	8.897	Bajo
THCA	514.3	514.3	220	0	4.991	Bajo
THCA	514.3	80	220	74	4.991	Bajo
UDCA	391.3	391.3	220	0	9.16	Bajo
GCDCA	448.3	448.3	215	0	8.35	Alto
GCDCA	448.3	74	215	50	8.35	Alto
CA_d4	411.3	411.3	220	0	9.233	Alto
CDCA_d4	395.3	395.3	220	0	10.617	Alto
DCA_d4	395.3	395.3	220	0	10.701	Bajo
GCA_d4	468.3	468.3	215	0	6.139	Alto
GCA_d4	468.3	74.1	215	54	6.139	Alto
UDCA_d4	395.3	395.3	220	0	8.946	Bajo

&: Voltaje de aceleración: 7 V; Ventana de tiempo de retención: 1.5 min; Polaridad: negativa.

2.4.4. Método analítico para metabolitos relacionados con inflamación alérgica (AIM)

El método dirigido para el análisis de 36 metabolitos relacionados con inflamación alérgica fue desarrollado a partir de varios análisis no dirigidos de distintos modelos de alergia dentro del grupo CEMBIO. Dada la gran variedad de especies involucradas, los metabolitos se separaron en dos grupos según sus propiedades fisicoquímicas para ser analizados por dos métodos analíticos diferentes. En este sentido, se emplearon dos técnicas cromatográficas complementarias: cromatografía de líquidos de interacción hidrofílica (HILIC), para el análisis de metabolitos polares pequeños (especialmente aminoácidos y ácidos orgánicos) y cromatografía de líquidos en fase inversa, para el análisis de metabolitos de mediana polaridad (principalmente fosfolípidos y esfingolípidos), ambas técnicas cromatográficas se realizaron en un equipo de LC-QqQ-MS [52].

2.4.4.1. Estándares y solventes

El método consiste en el análisis de 36 AIM que incluyen esfingolípidos, lisofosfolípidos, aminoácidos, ácidos grasos, carnitinas, entre otros, la lista de metabolitos completa se muestra en la tabla 2.4.

Tabla 2.4. Metabolitos relacionados con inflamación alérgica analizados en el método dirigido.

Método HILIC	Método fase inversa
Adenosina	Ácido araquidónico
Betaina	Bilirrubina
Cortisol	Ácido láctico
Creatina	Ácido láurico
Creatinina	LPC 14:0
Hexanoylcarnitina	LPC 16:0
Ácido hipúrico	LPC 17:0
Hipoxantina	LPC 17:1
L-Arginina	LPC 18:0
L-Carnitina	LPC 18:1
Leucina/isoleucina	LPI 16:0
Fenilalanina	LPI 20:4
Prolina	LPE 18:0
Propionilcarnitina	Oleamida
Urea	Ácido oleico
Ácido pirúvico	Ácido palmitoleico
	Esfinganina-1P
	Esfingosina
	Esfingosina-1P

LPC: lisofosfatidilcolina; **LPE:** lisofosfoetanolamina;
LPI: lisofosfatidilinositol

Los estándares de ácido araquidónico, LPC 14:0, LPC 16:0, LPC 17:0, LPC 17:1, LPC 18:0, LPC 18:1, LPE 18:0, LPI 16:0, LPI 20:4, ácido palmitoleico, oleamida, esfinganina-1P, esfingosina-1P, esfingosina, esfingosina d7 y LPC 18:1 d7 se adquirieron en Avanti lipids (Birmingham, AL, USA). Por otro lado, los estándares de bilirrubina, ácido láctico, ácido láurico, ácido oleico, adenosina, arginina, betaína, carnitina, cortisol, creatina, creatinina, hexanoyl carnitina, ácido hipúrico, hipoxantina, leucina/isoleucina, fenilalanina, prolina, propionilcarnitina, urea, carnitina d3, isoleucina d7 y ácido palmítico d31 se adquirieron en Sigma- Aldrich (Darmstadt. Germany). La fenilalanina d5 y valina d8 son de Cambridge Isotope Laboratories Inc. (Andover, MA, USA).

Los solventes utilizados fueron: agua ultrapura obtenida a través de osmosis inversa obtenida a partir de un sistema Milli-Q Plus 185 (Millipore, Billerica, MS, USA). MeOH grado MS y ACN, estos obtenidos de Fischer Scientific (Hampton, NH, USA). Solución de amonio grado

analítico (28%, GPR RECTAPUR[®]) y ácido acético glacial (AnalaR[®] NORMAPUR[®]), que fueron obtenidos de VWR Chemicals (Radnor, PA, USA).

2.4.4.2. Preparación de disoluciones estándares

Para cada uno de los métodos cromatográficos se construyeron las correspondientes curvas de calibración y disoluciones de IS. En este sentido, con el fin de optimizar tiempo, las curvas de calibración, los IS y las muestras fueron preparadas de la misma forma, es decir, utilizando como disolvente una mezcla de metanol:etanol (MeOH:EtOH) en una proporción 1:1.

En este sentido, dada la existencia de efecto matriz, para cada metabolito se preparó una curva de calibración externa con adición de un *pool* de muestra, para estas curvas se usaron volúmenes iguales 1:1 del *pool* de suero diluido (1:8) y de cada una de las disoluciones de la curva (0%, 25%, 50%, 100%, 200%, 400% y 800%). En cada una de las curvas de calibración el eje de las ordenadas (Y) corresponde al área relativa ($A_{\text{metabolito}^{\text{''X''}}}/A_{\text{IS}^{\text{''X''}}}$) y el eje de las abscisas (X) a la concentración del patrón añadido + la concentración estimada en el *pool* de muestra utilizado ($\mu\text{g/mL}$).

2.4.4.3. Preparación de muestras

Para cada muestra, se usaron 50 μL de suero que fueron mezclados con 150 μL de MeOH:EtOH 1:1, diluyendo de esta forma 4 veces el suero. Posteriormente la mezcla fue agitada en vortex por 1 min y puesta en un baño de hielo por 15 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se centrifugó a 16000 x g, 20 min a 4 °C. Se tomaron 70 μL de sobrenadante y fueron mezclados en un vial para LC con 50 μL de la mezcla de IS correspondiente (la concentración final de los IS fue de 0.2 $\mu\text{g/mL}$ para HILIC y 0.3 $\mu\text{g/mL}$ para fase inversa) y 440 μL de una mezcla: ACN: H₂O (95:5) + ácido acético 0.1% + acetato de amonio 7.5 mM (mezcla utilizada como fase móvil inicial en el método HILIC). Lo anterior dió como resultado una dilución final de la muestra 1:8, para su separación cromatográfica. En el caso del blanco, se siguió el mismo procedimiento sustituyendo los 50 μL de suero con agua.

2.4.4.4. Características y condiciones de trabajo

Ambos análisis fueron medidos utilizando el modo dMRM en una sistema de LC 1260 Infinity (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), acoplado a un QqQ-MS con

ionización ESI Agilent Jet Stream (ESI(AJS)/QqQ-MS), 6470 Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA).

2.4.4.4.1. Método HILIC

En el método HILIC se utilizó una columna Kinetex HILIC (150 mm x 2.1 mm x 100 Å) que se mantuvo a una temperatura de 25 °C. La separación se realizó mediante la elución en gradiente, en este sentido, las fases móviles consistieron en A: agua y B: ACN, ambas adicionadas con acetato de amonio 7.5 mM y ácido acético 0.1%, obteniendo un pH final en la fase acuosa (A) de 4.0. La velocidad de flujo fue de 0.5 mL/min. El gradiente comenzó con 5% de A durante 2 min que después incrementó a 50% hasta 12 min y finalmente volvió a las condiciones iniciales hasta los 22 min.

Las parámetros del MS fueron los siguientes: modo de ionización por electrospray positivo (ESI+), temperatura de la fuente de ionización a 250 °C, voltaje del capilar 5500 V, flujo de gas del nebulizador de 11 L/min y una presión de la fuente de 60 psi.

2.4.4.4.2. LC en fase inversa

En fase inversa se utilizó una columna Supelco Ascentis Express fase inversa (150 mm x 2.1 mm x 2.7 µm) que se mantuvo a una temperatura de 60 °C. La separación se realizó mediante la elución en gradiente, donde de igual manera las fases móviles consistieron en A: agua y B: ACN, ambas adicionadas con únicamente ácido acético 0.1%, obteniendo un pH final en la fase acuosa de 3.3. La velocidad de flujo fue de 0.6 mL/min. Para este caso, el gradiente comenzó con 20% de B durante 2 min que después incrementó al 100% hasta transcurridos 10 min y se mantuvo así durante 5 min para finalmente volver a las condiciones iniciales hasta los 20 min.

Las parámetros del MS fueron los siguientes: voltaje del capilar 3500 V en ionización ESI+ y 3000 V en ESI-, flujo de gas del nebulizador de 10 L/min, temperatura de la fuente de ionización de 250 °C y una presión de la fuente de 45 psi.

Para ambos métodos cromatográficos, durante el análisis los viales se mantuvieron a 4°C en un automuestreador termostatzado, con un volumen de inyección de 5 µL.

Respecto a la detección de los 36 AIM, se utilizaron las transiciones correspondientes de *m/z* los valores de cada uno se enlistan en las tablas 2.5 (método HILIC) y 2.6 (método fase inversa).

Tabla 2.5. Tabla de transiciones dMRM de los métodos analíticos LC-QqQ-MS para AIM por método HILIC&.

Compuesto	Ion precursor (m/z)	Ion fragmento (m/z)	Voltaje de fragmentación (V)	Energía de colisión (V)	Tiempo de retención (min)
Método HILIC					
Adenosina	268.11	135.9	100	20	3.02
Adenosina	268.11	118.9	100	56	3.02
Betaina	118.09	58	100	36	9.9
Betaina	118.09	42	100	72	9.9
Cortisol	363.22	121	121	25	0.91
Cortisol	363.22	91	121	77	0.91
Creatina	132.08	44.2	104	25	9.81
Creatina	132.08	43.1	104	57	9.81
Creatinina	114.07	44.2	104	17	6.45
Creatinina	114.07	43.1	104	57	6.45
Hexanoylcarnitina	260.19	84.9	100	24	9.99
Hexanoylcarnitina	260.19	29.1	100	64	9.99
Ácido hipúrico	180.07	105	100	64	6.54
Ácido hipúrico	180.07	77	72	13	6.54
Hipoxantina	137.05	118.9	100	24	3.01
Hipoxantina	137.05	55	100	36	3.01
L-Arginina	175.12	70.1	89	29	12.41
L-Arginina	175.12	60.1	89	13	12.41
L-Carnitina	162.11	85	80	19	11.8
L-Carnitina	162.11	60	80	15	11.8
Leucina/isoleucina	132.1	86	100	8	8.64
Leucina/isoleucina	132.1	30.1	100	20	8.64
Fenilalanina	166.09	119.9	100	16	8.33
Fenilalanina	166.09	76.9	100	48	8.33
Prolina	116.07	70	100	20	9.47
Prolina	116.07	28.1	100	48	9.47
Propionilcarnitina	218.14	84.9	100	20	11.19
Propionilcarnitina	218.14	29.1	100	52	11.19
Urea	61.04	44	100	24	1.9
Urea	61.04	29.1	100	90	1.9
Ácido pirúvico	87	87	50	0	1

&: Voltaje de aceleración: 7 V; Ventana de tiempo de retención: 5 min; Polaridad: positiva.

Tabla 2.6. Tabla de transiciones dMRM de los métodos analíticos LC-QqQ-MS para AIM por método Fase Inversa[&].

Compuesto	Ion precursor (m/z)	Ion fragmento (m/z)	Voltaje de fragmentación (V)	Energía de colisión (V)	Tiempo de retención (min)	Polaridad
Método fase inversa						
Ácido araquidónico	303.2	303.2	131	0	9.86	Negativo
Ácido araquidónico	303.2	259.2	131	13	9.86	Negativo
Bilirrubina	585.27	299.1	131	25	10.11	Positivo
Bilirrubina	585.27	271.1	131	50	10.11	Positivo
Ácido láctico	89	89	45	0	1	Negativo
Ácido láctico	89	43.1	45	9	1	Negativo
Ácido láurico	199.2	199.2	45	0	8.74	Negativo
LPC 14:0	468.31	183.9	100	28	7.83	Positivo
LPC 14:0	468.31	103.9	100	56	7.83	Positivo
LPC 16:0	496.34	183.8	100	28	8.63	Positivo
LPC 16:0	496.34	103.9	100	28	8.63	Positivo
LPC 17:0	510.36	184	180	29	9.06	Positivo
LPC 17:0	510.36	104	180	29	9.06	Positivo
LPC 17:1	508.34	183.9	185	29	8.45	Positivo
LPC 17:1	508.34	104	185	29	8.45	Positivo
LPC 18:0	524.37	183.8	100	28	9.55	Positivo
LPC 18:0	524.37	103.9	100	28	9.55	Positivo
LPC 18:1	522.36	183.8	100	28	8.85	Positivo
LPC 18:1	522.36	103.9	100	28	8.85	Positivo
LPI 16:0	573.3	555.2	104	5	9.83	Positivo
LPI 16:0	573.3	313.2	104	25	9.83	Positivo
LPI 20:4	621.31	603.3	89	5	9.77	Positivo
LPI 20:4	621.31	361.3	89	13	9.77	Positivo
LPE 18:0	482.33	341.1	100	20	8.9	Positivo
LPE 18:0	482.33	44.1	100	20	8.9	Positivo
Oleamida	282.28	55.1	104	45	9.84	Positivo
Oleamida	282.28	41.2	104	69	9.84	Positivo
Ácido oleico	281.25	281.25	161	0	9.5	Negativo
Ácido palmitoleico	253.23	253.23	109	0	9.66	Negativo
Esfinganina-1P	382.27	382.27	130	0	7.79	Positivo
Esfinganina-1P	382.27	284.1	130	12	7.79	Positivo
Esfinganina-1P	382.27	60	130	24	7.79	Positivo
Esfingosina	300.29	282.1	100	8	6.59	Positivo
Esfingosina	300.29	55.4	100	40	6.59	Positivo
Esfingosina-1P	380.26	264	100	16	7.62	Positivo
Esfingosina-1P	380.26	81.9	100	36	7.62	Positivo

&: Voltaje de aceleración: 7 V; Ventana de tiempo de retención: 6 min.

2.4.5. Tratamiento de datos obtenidos

2.4.5.1. Creación del método e integración de las señales cromatográficas

Para ambos tiempos ($t=0$ meses y $t=2$ meses), en los tres métodos dirigidos los datos fueron obtenidos en dMRM, base desarrollada por Agilent Technologies, en donde cada uno de los archivos generados contenía la señal analítica de cada una de las transiciones en los intervalos de tiempo establecidos en el método analítico. Las áreas de las curvas de cada compuesto

fueron integradas utilizando el programa QQQ Software B.08.00 (Agilent Technologies). Los valores de las áreas fueron exportados a un archivo excel para la posterior cuantificación.

2.4.5.2. Cuantificación de las muestras

La cuantificación de cada compuesto se realizó a partir de la interpolación del valor de área relativa ($A_{\text{metabolito } x} / A_{\text{IS } x}$) obtenida en cada muestra en su respectiva curva de calibración realizando los cálculos correspondientes, considerando las diluciones realizadas en cada caso para obtener la concentración final de cada uno de los compuestos en el suero de cada paciente. En el ANEXO 1 se muestran los resultados obtenidos de la cuantificación de cada compuesto en ambos tiempos para cada paciente.

2.4.5.3. Análisis estadístico

Este trabajo se encuentra centrado en el análisis estadístico y la interpretación de resultados. El análisis de las muestras y su cuantificación (partes anteriormente descritas) fueron realizadas por el personal del CEMBIO.

2.4.5.3.1. Análisis estadístico univariante y su representación gráfica

Se realizaron 3 diferentes análisis estadísticos univariantes con los datos obtenidos para poder explicar el efecto del tratamiento a lo largo del tiempo, cada uno de ellos fue realizado en MATLAB R 2018b, utilizando los “scripts” (códigos) desarrollados por el estadístico del CEMBIO, el Profesor Santiago Angulo.

1. Comparación de dos muestras en donde se aplicó una prueba de t-test o prueba U de Mann-Whitney dependiendo de la normalidad de los datos para comparar el grupo de alérgicos a $t = 0$ meses versus no alérgicos (controles) para ver la abundancia de los metabolitos presentes en su suero según su estado alérgico. Así mismo, utilizando esta prueba estadística, se comparó con los datos del Δ de todos los Tolerantes vs No Tolerantes. Los valores significativos son aquellos con un $p < 0.05$. Los resultados con todos los valores se muestran en el anexo 2.
2. ANOVA de media repetidas de 1 factor, donde el factor a evaluar es el tipo de tratamiento que recibieron los pacientes (Placebo, CU901, Herbapekt), y dónde se tienen 2 tiempos $t = 0$ meses y $t = 2$ meses. La intención de esta prueba estadística es responder a la pregunta ¿cómo responden los pacientes a cada tratamiento?. Para esta prueba, se analizan 2 rutas: el efecto del tiempo en cada grupo y la diferencia entre los 3 grupos en alguno de los tiempos. Es por ello, que se enfocó en las diferencias entre

los 3 grupos tras 2 meses de tratamiento y en las diferencias en el tiempo para cada grupo. Se seleccionaron como significativos aquellos valores con un $p < 0.05$. Los resultados con todos los valores se muestran en el anexo 3.

3. ANOVA de dos factores, en donde el factor 1 fue el tipo de tratamiento (CU901 o Herbapekt) y el factor 2 fue si había efecto clínico debido al tratamiento es decir si había la tolerancia al alérgeno (Tolerantes o No Tolerantes). Este análisis estadístico se realiza para dar una respuesta clínica del tratamiento, es decir, ¿con el tratamiento administrado mejora la tolerancia del paciente al alérgeno?. Para ello se utilizó el delta (Δ) de la concentración de cada metabolito ($[C]_{t2} - [C]_{t0}$). De igual forma, el criterio de significancia en los valores fue un $p < 0.05$. Para esta prueba, se analizan 2 rutas: la tolerancia dentro de cada tratamiento (Tolerante vs No Tolerante) y el efecto del tratamiento en la tolerancia (CU901 vs Herbapekt). Los resultados con todos los valores se muestran en el anexo 4.

Todos los análisis estadísticos univariantes fueron representados con sus gráficos correspondientes utilizando GraphPad Prism versión 9.0.0 para Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com. Así mismo, la representación de las variaciones observadas a lo largo del tiempo fueron representadas de forma más visual con ayuda de mapas de calor o *heatmaps* realizado en Metaboanalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>).

2.4.5.3.2. Análisis estadístico multivariante y su representación gráfica

El análisis multivariante fue realizado con la finalidad de relacionar la causa-efecto de las múltiples variables que se tiene: tipo de tratamiento, tiempo, tolerancia, estado alérgico, pues la variación de los metabolitos en conjunto puede dar una idea de los cambios entre los grupos de forma global. Para el análisis multivariante y respectiva representación gráfica se utilizó el programa SIMCA (v.17.0.2, Sartorius Stedim Data Analytics AB). Se realizaron distintas comparativas utilizando un modelo de análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés *Principal Component Analysis*) y un modelo de análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA, por sus siglas en inglés *Partial Least Square Discriminant Analysis*). Para todos los modelos realizados, se obtuvo un gráfico de barras el cual representa dos parámetros de calidad de los modelos. Las barras de color verde (R^2), representan la capacidad de clasificación de modelo; es decir, si el modelo es capaz de separar correctamente las muestras por grupos. En este sentido, el valor de R^2 es proporcional a la capacidad de separación. Por su parte, las barras azules (Q^2), miden la

capacidad de predicción del modelo; es decir, qué tan bien predice el modelo al introducir una muestra nueva en el grupo correcto [70]. En este contexto, se observará una barra R^2 y una barra Q^2 por componente que encuentre el modelo correspondiente, de forma general, ambos parámetros siempre seguirán un orden ascendente.

Capítulo 3

3.1. RESULTADOS

Para este trabajo se realizaron tres análisis metabolómicos dirigidos de un total de 43 muestras de suero, de las cuales, 9 pertenecían al grupo control y 34 pacientes con AA. De estos últimos se tomó suero antes de recibir en tratamiento ($t = 0$ meses) y después de recibir el tratamiento ($t = 2$ meses), mientras que del grupo control únicamente se tomaron muestras a $t = 0$ meses.

En resumen se midieron la siguiente cantidad de metabolitos: 6 SCFA, 25 BA y 36 AIM (para más detalles consultar Capítulo 2 y anexos) y se realizaron los análisis estadísticos: análisis univariante y análisis multivariante, cuyos resultados se muestran a continuación.

3.1.1. Análisis univariante

3.1.1.1. Comparativa de grupos alérgico vs controles a $t = 0$ meses

Se estudió la variación de los distintos metabolitos analizados entre el grupo control (no alérgicos) vs el grupo alérgico antes de recibir el respectivo tratamiento a T_0 . En este sentido, se encontró que 4 de los 6 SCFA medidos presentaban diferencias significativas entre ellos (ácido propiónico, ácido butírico, ácido isobutírico y ácido isovalérico), con niveles aumentados en el grupo alérgico ($p < 0.05$). Por su parte, en el análisis de BA se encontró una diferencia significativa en el ácido ursodesoxicólico (UDCA), observándose en mayor concentración en el grupo alérgico. En el caso de los AIM, existieron diferencias significativas en 3 metabolitos: ácido palmitoleico, ácido araquidónico y ácido pirúvico, en este caso, el ácido pirúvico se encontró en disminuido en el grupo alérgico. Mientras que el ácido palmitoleico y el ácido araquidónico se encuentran en mayor concentración en el grupo alérgico. Todos estos cambios fueron recogidos en la Tabla 3.1, donde además del valor de la prueba estadística, se recoge la media y la desviación estándar de cada uno de los grupos comparados y la tasa de cambio (aumento o disminución) con respecto al grupo de pacientes con AA. Además para lograr la visualización de estos cambios se realizaron las correspondientes gráficas entre los grupos, donde en color negro se encuentran representados los controles y en amarillo los pacientes alérgicos (Figura 3.1.1).

Tabla 3.1. Metabolitos significativos en la comparativa de grupo control vs grupo alérgico

a t = 0 meses^{de}.

Metabolito	p valor	$\bar{X}(\pm SD)$ (mg/mL) Alérgicos	$\bar{X}(\pm SD)$ (mg/mL) Controles	Tasa de cambio $\left(\frac{\bar{X}_{Alérgicos}}{\bar{X}_{Controles}}\right)$
Ác. Propiónico	0.0103	17.02 (± 4.56)	12.18 (± 5.66)	1.40
Ác. Butírico	0.0293	34.73 (± 12.8)	19.93 (± 18.04)	1.74
Ác. Isobutírico	0.0107	22.14 (± 14.09)	9.38 (± 8.12)	2.36
Ác. Isovalérico	0.0409	20.36 (± 15.11)	9.40 (± 5.50)	2.17
UDCA	0.0454	0.06 (± 0.055)	0.044 (± 0.72)	1.11
Ác. Palmitoleico	0.0207	4.64 (± 2.7)	2.70 (± 3.05)	1.72
Ác. Araquidónico	0.0057	1.61 (± 0.50)	0.998 (± 0.56)	1.61
Ác. Pirúvico	0.0409	9.68 (± 09.79)	21.453 (± 21.97)	0.45

&: UDCA: Ácido Ursodesoxicólico.

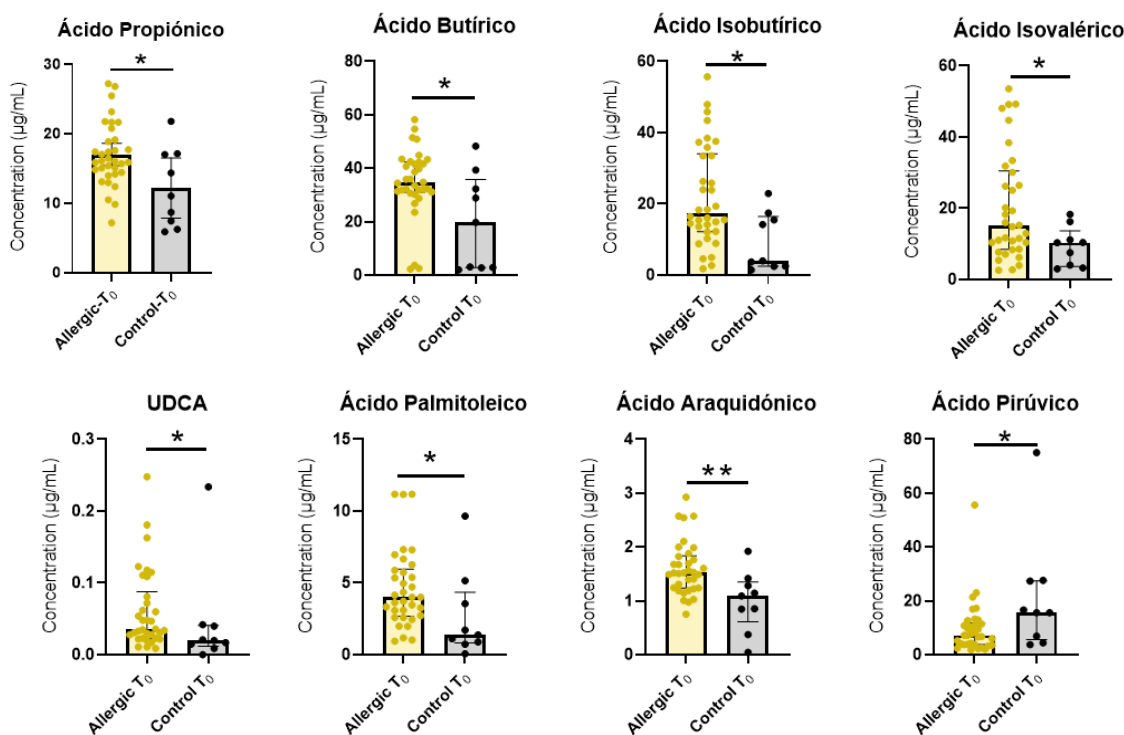


Figura 3.1.1. Representación gráfica de los metabolitos significativos por estado alérgico antes de recibir tratamiento. (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$). La representación gráfica consiste en la mediana observada para cada metabolito, las correspondientes barras de error denotan el rango intercuartílico pues el análisis estadístico se realizó mediante método no paramétrico con excepción del Ácido Propiónico, en donde el modelo ajustado fue una t de student y la representación gráfica es la media y las barras de error denotan el intervalo de confianza (IC=95%).

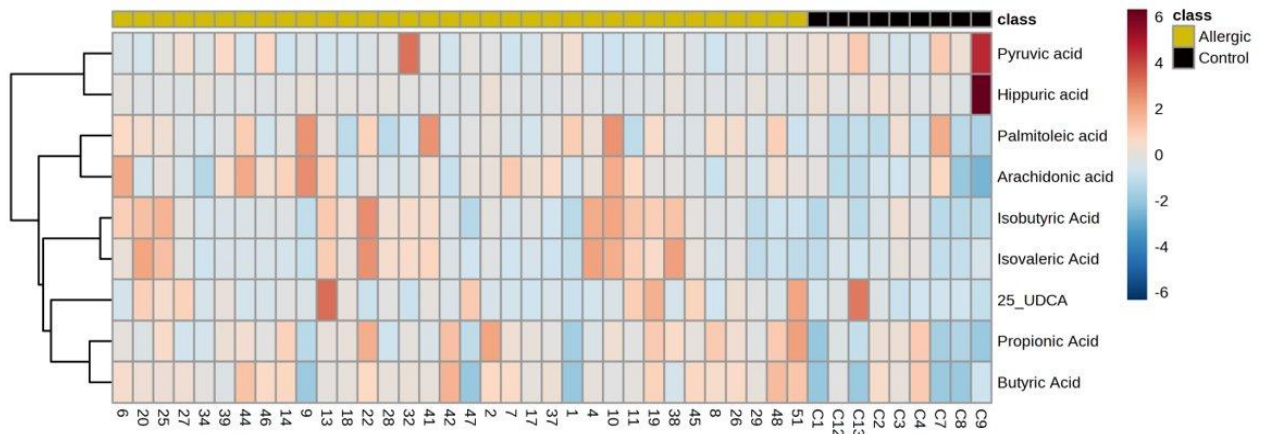


Figura 3.1.2. Representación gráfica de los metabolitos significativos por estado alérgico antes de recibir tratamiento: mapa de calor o heatmap. UDA: Ácido Ursodesoxicólico.

Como se puede observar en la tabla 3.1 a menor valor p mayor será la significancia que existe entre ambos grupos, tomando en cuenta esto se puede observar que el ácido araquidónico con un p valor de 0.005 es el metabolito con mayor diferencia significativa para la comparación entre el grupo alérgico vs control a 0 meses.

Finalmente, estos metabolitos significativos fueron representados de forma visual usando un gráfico de calor, también llamado *heatmap* por su nombre en inglés. Este gráfico permite visualizar la relación de los metabolitos entre los grupos. Los resultados de la figura 3.1.2 muestra a cada paciente alérgico en color amarillo y a cada control en color negro. Además, la escala de colores de las celdas, que va de rojo a azul, indica el nivel de aumento o disminución de cada metabolito en cada muestra, respectivamente. En la figura 3.1.2 se puede observar que las concentraciones de la mayoría de los metabolitos significativos son mayores en el grupo alérgico, dada la tendencia del mapa a tener de un color más rojizo las zonas correspondientes del grupo alérgico.

Como resumen, los resultados demuestran que antes del tratamiento los pacientes alérgicos presentaban diferencias en sus metabolitos con respecto a los pacientes controles no alérgicos.

3.1.1.2. Comparativa de la abundancia de los metabolitos a través del tiempo por tratamiento

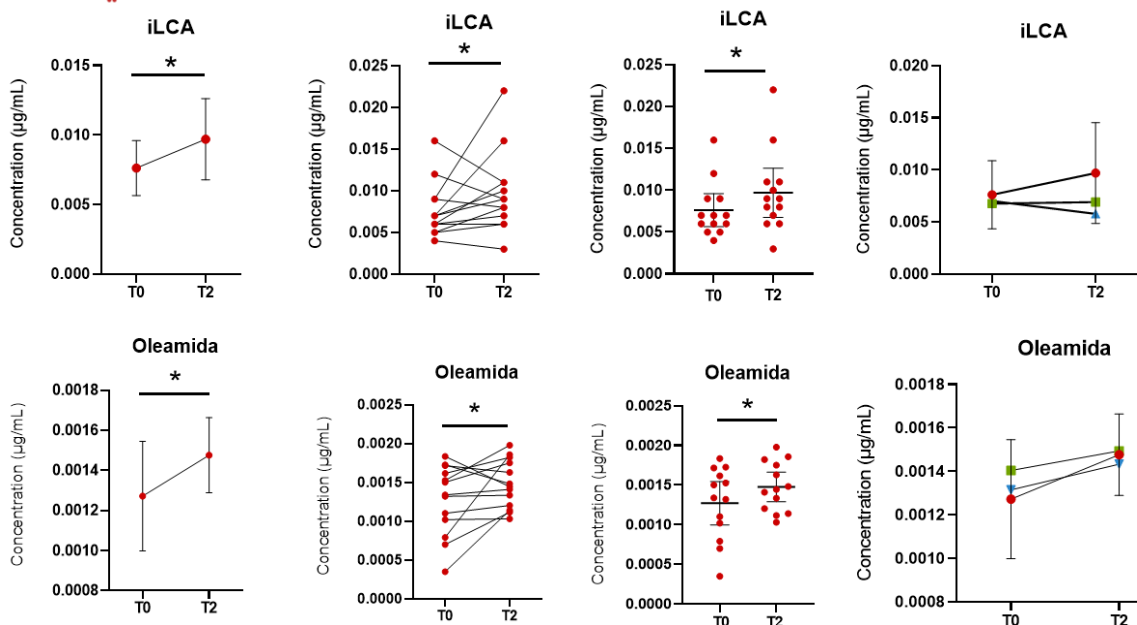
Se compararon los niveles de los metabolitos analizados en los pacientes alérgicos tras recibir su respectivo tratamiento durante 2 meses (CU 901 y Herbapekt). La tabla 3.2 sintetiza la información de aquellos metabolitos que mostraron cambios significativos en un determinado tratamiento tras 2 meses de su administración, así mismo, la interpretación gráfica corresponde a la figura 3.1.3. En este sentido, en la figura 3.1.3 cada metabolito con diferencias significativas es representado de diversas formas. El primer gráfico corresponde al comportamiento que tuvo la media del grupo alérgico en el que se encontró la diferencia significativa antes y después del tratamiento (T0 y T2, respectivamente). Por su parte, el segundo gráfico corresponde a las trayectorias individuales que tuvo cada paciente a través del tiempo. Adicionalmente, el tercer gráfico muestra la dispersión de los resultados obtenidos del grupo antes y después del tratamiento. Finalmente, el cuarto gráfico corresponde a la comparativa de la trayectoria media que siguió cada grupo de pacientes para compararlos entre sí.

Tabla 3.2. Cambios en la concentración de los metabolitos a causa del tratamiento recibido[&].

Tratamiento	Metabolito	p valor	$\bar{X}(\pm SD)$ (mg/mL) T ₀	$\bar{X}(\pm SD)$ (mg/mL) T ₂	Tasa de cambio $\left(\frac{\bar{X}_{T2}}{\bar{X}_{T0}}\right)$
CU 901	iLCA	0.0333	0.008 ($\pm 3.3 \times 10^{-3}$)	0.01 ($\pm 4.8 \times 10^{-3}$)	1.27
CU 901	Oleamida	0.0285	0.0013 ($\pm 4.5 \times 10^{-4}$)	0.0015 ($\pm 3.1 \times 10^{-4}$)	1.16
Herbapekt	Ác. Acético	0.0468	445.98 (± 118.33)	418.05 (± 91.52)	0.94
Herbapekt	Ác. Propiónico	0.0468	17.81 (± 5.06)	14.40 (± 6.94)	0.81
Herbapekt	Ác. Isovalérico	0.0339	21.79 (± 18.12)	12.30 (± 13.97)	0.57
Herbapekt	L- Arginina	0.0475	16.43 (± 3.32)	13.40 (± 5.85)	0.82
Herbapekt	Esfingosina-1P	0.0234	2.13 (± 0.64)	1.55 (± 0.56)	0.73

[&]: iLCA: Ácido iso litocólico, TDCA: Ácido taurodesoxicólico. GDCA: Ácido glicodesoxicólico, T0: antes del tratamiento, T2: 2 meses después del tratamiento.

CU 901 



Herbapekt 

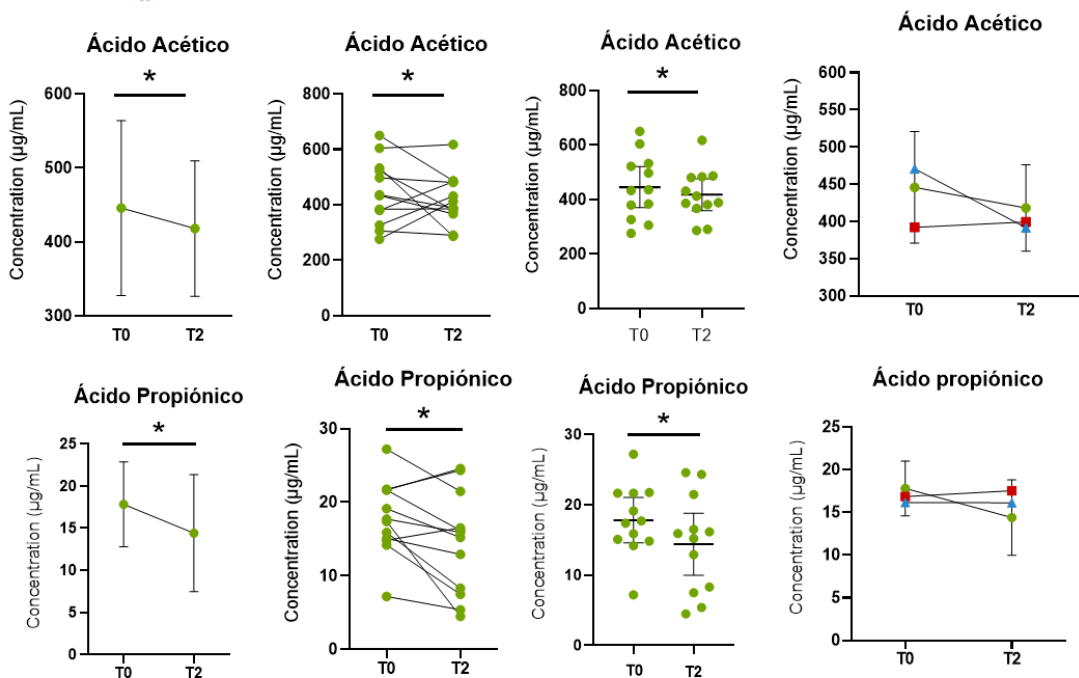


Figura 3.1.3. Representación gráfica de los cambios significativos a través del tiempo en la concentración de los metabolitos con respecto al tratamiento recibido. (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$) Las barras de error denotan el intervalo de confianza (IC=95%). iLCA: Ácido iso litocólico, TDCA: Ácido taurodesoxicólico. GDCA: Ácido glicodesoxicólico.

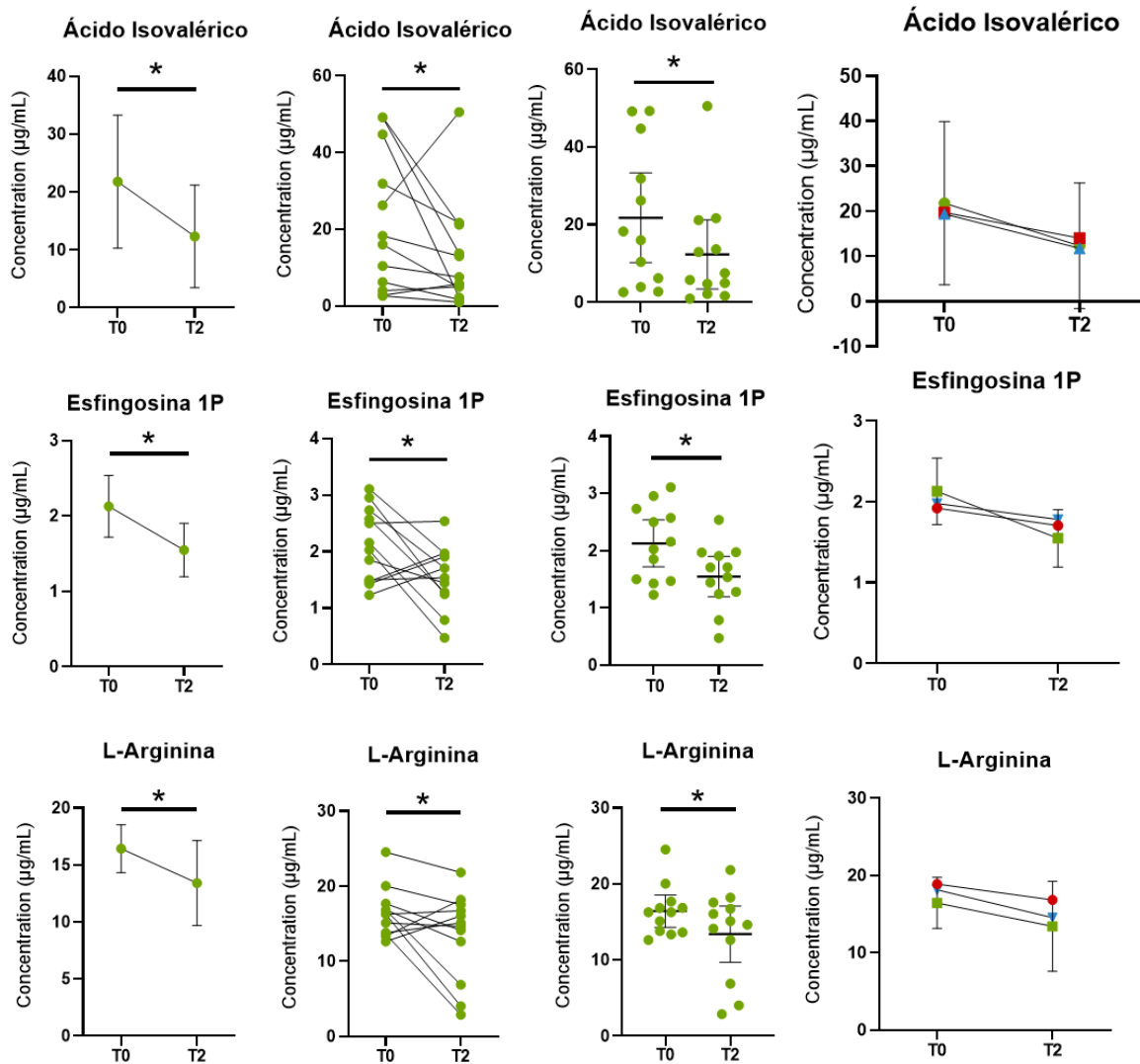


Figura 3.1.3. Continuación.

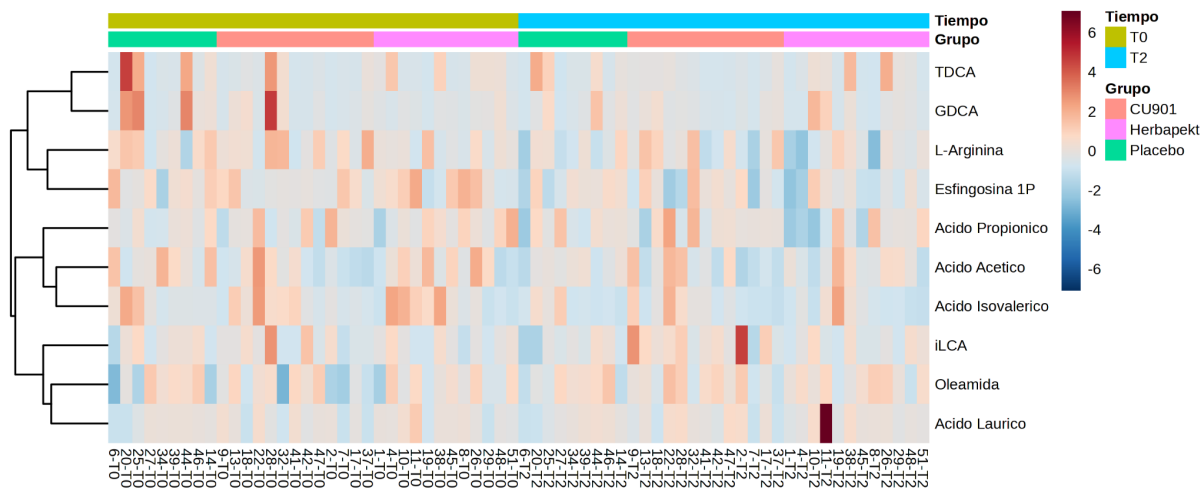


Figura 3.1.4. Representación gráfica de los cambios significativos a través del tiempo en la concentración de los metabolitos con respecto al tratamiento recibido: mapa de calor o heatmap. iLCA: Ácido iso litocólico, TDCA: Ácido taurodesoxicólico. GDCA: Ácido glicodesoxicólico.

Los resultados obtenidos muestran que de forma general, el activo Herbapekt fue aquel que presentó mayor número de cambios significativos en los metabolitos analizados (5 vs 2 de CU-901). Se observó que la concentración de los SCFA: acético, propiónico e isovalérico disminuyó de forma significativa tras el tratamiento de dos meses con Herbapekt. De forma particular, respecto al ácido acético y propiónico, en la figura 3.1.2 se puede observar que también existe un aumento en los niveles de estos SCFA con el tratamiento CU 901, aunque no de forma significativa (p valor de 0.6657 y 0.6658, respectivamente).

Los gráficos correspondientes a esfingosina-1P y L-Arginina permiten observar que los niveles de ambos metabolitos tienden a disminuir en los pacientes tratados con Herbapekt de forma significativa y, aunque de forma no significativa, esta tendencia se observa de igual forma en los pacientes tratados con CU 901 y Placebo.

El grupo de pacientes tratados con CU 901 mostró un aumento significativo en los niveles de oleamida y ácido iso litocólico (iLCA) tras culminar el tratamiento. El aumento en los niveles de oleamida también se observan en los grupos alérgicos tratados con Herbapekt y Placebo aunque de forma no significativa. Para el caso de iLCA se observa una disminución no significativa en el grupo Placebo y un aumento casi nulo en el grupo tratado con Herbapekt.

Para visualizar estos datos de forma conjunta, se observó a partir del mapa de calor que los cambios en los metabolitos significativos entre los 3 grupos tras 2 meses de tratamiento no es muy clara (Figura 3.1.4.), por lo que resulta conveniente explorar el análisis multivariante que permita su evaluación en conjunto.

Como resumen de esta parte, se logró identificar los cambios con respecto al tiempo en cada uno de los tratamientos con pectinas (HMP, LMP), estos cambios que se encontraron no se observaron en el grupo tratado con placebo.

3.1.1.3. Comparativa entre los tratamientos a $t= 2$ meses

A partir de la misma prueba estadística que se aplicó anteriormente, se obtuvieron las diferencias existentes entre los tres grupos de pacientes alérgicos una vez que el tratamiento culminó. La tabla 3.3 muestra que la única diferencia significativa corresponde a los niveles de Ácido iso litocólico (iLCA) entre el grupo que tomó CU 901 frente al Placebo, existiendo en mayor cantidad en el grupo CU 901 (Figura 3.1.5). De igual manera, aunque no de forma significativa ($p = 0.051$), los niveles de iLCA en pacientes tratados con CU 901 se encuentran aumentados frente a los pacientes tratados con Herbapekt.

Este resultado indica que hay pocas diferencias en suero tras 2 meses de tratamiento con pectina, sin embargo el cambio en el ácido biliar iLCA indica que este puede estar directamente asociado a la ingesta de pectina.

Tabla 3.3. Comparativa de los niveles de metabolitos entre grupos alérgicos a T = 2 meses[&].

Comparación que presenta la diferencia (Trat. ₁ vs Trat. ₂)	Metabolito	p valor	$\bar{X}(\pm SD)$ (mg/mL) T ₁	$\bar{X}(\pm SD)$ (mg/mL) T ₂	Tasa de cambio $(\frac{\bar{X}_{T1}}{\bar{X}_{T2}})$
CU 901 vs Placebo	iLCA	0.0127	0.010 ($\pm 4.8 \times 10^{-3}$)	0.006 ($\pm 2.4 \times 10^{-3}$)	1.67
CU 901 vs Herbapekt	iLCA	0.0509	0.010 ($\pm 4.8 \times 10^{-3}$)	0.007 ($\pm 1.7 \times 10^{-3}$)	1.43

&: iLCA: Ácido iso litocólico.

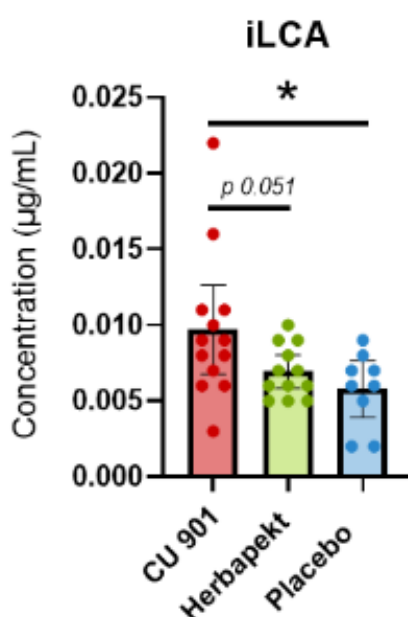


Figura 3.1.5. Representación gráfica de los cambios significativos entre grupos de pacientes una vez terminado el tratamiento. (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$). Las barras de error denotan el intervalo de confianza (IC=95%). iLCA: Ácido iso litocólico.

3.1.1.4. Respuesta clínica del tratamiento

Es necesario evaluar además del efecto de cada tratamiento en los metabolitos, cuál es su relación con el efecto clínico, es decir, si los metabolitos están asociados a la tolerancia al alérgeno. Para evaluar esto, se realizaron dos análisis estadísticos, donde cabe resaltar, se utilizaron los datos del delta (Δ) de la concentración de cada metabolito ($[C]_{t2} - [C]_{t0}$) para cada paciente.

El primer análisis consistió en la comparación de los pacientes Tolerantes y No Tolerantes de forma general uniendo los pacientes de ambos tratamientos (Tabla 3.3, Figura 3.1.6).

Tabla 3.4. Comparación de dos muestras: comparación de dos muestras: alérgicos tolerantes vs alérgicos no tolerantes[&].

Metabolito	p valor	$\bar{X}(\pm SD)(\text{mg/mL})$ Tolerantes	$\bar{X}(\pm SD)(\text{mg/mL})$ No tolerantes	Tasa de cambio $\left(\frac{\bar{X}_{\text{Tol}}}{\bar{X}_{\text{No tol}}}\right)$
LPC 19:0	0.0332	-0.051 (± 0.4064)	0.0068 (± 0.071)	-1.57

&: LPC: Lisofosfocolina.

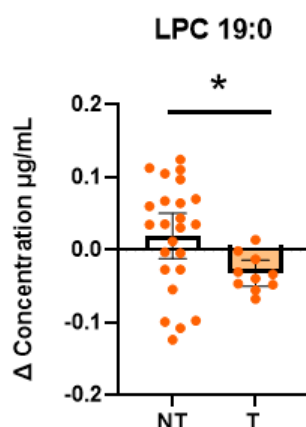


Figura 3.1.6. Representación gráfica de los cambios significativos entre pacientes alérgicos tolerantes y no tolerantes. (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$). LPC: Lisofosfatidilcolina. Para LPC 19:0 la representación gráfica consiste en la media observada y las barras de error corresponden al intervalo de confianza (IC=95%), pues el modelo ajustado fue una prueba t test. Para el cortisol la representación gráfica es la mediana y la barra de error denota el intervalo intercuartílico pues el método ajustado fue no paramétrico.

Para este primer análisis, se observaron cambios significativos en la lisofosfatidilcolina 19:0 (LPC 19:0). En este sentido, las barras con tendencia negativa indican una disminución en los niveles del metabolito correspondiente tras tomar cualquiera de las 2 pectinas durante 2 meses. Por lo tanto, se puede observar que los pacientes alérgicos tolerantes a LTPs tuvieron una reducción significativa en los niveles de LPC 19:0 frente a los alérgicos No Tolerantes.

Adicionalmente, se hizo una comparación de ANOVA de dos factores tomando en cuenta el tratamiento y la tolerancia de cada paciente con respecto a los cambios que presentaron.

En este sentido, se buscaron las diferencias en cuatro comparaciones:

1. Pacientes alérgicos tratados con CU 901: “Tolerantes-CU 901 vs No Tolerantes-CU 901”.

2. Pacientes alérgicos tratados con Herbapekt: “Tolerantes-Herbapekt vs No Tolerantes-Herbapekt.
3. Pacientes alérgicos Tolerantes: “Tolerantes-CU 901 vs Tolerantes-Herbapekt”.
4. Pacientes alérgicos No Tolerantes: “No Tolerantes-CU 901 vs No Tolerantes-Herbapekt”.

Los resultados significativos resultantes de este segundo análisis se muestran en la tabla 3.5 y la figura 3.1.7.

Tabla 3.5. ANOVA de dos factores para la comparación entre pacientes tolerantes y no tolerantes según el tratamiento administrado[&].

Metabolito	p valor	Comparación	$\bar{X}(\pm SD)$ (mg/mL) Gpo. 1	$\bar{X}(\pm SD)$ (mg/mL) Gpo. 2	Tasa de cambio $\left(\frac{\bar{X}_{Gpo.1}}{\bar{X}_{Gpo.2}}\right)$
Ácido propiónico	0.0229	No tolerantes CU 901 vs No tolerantes Herbapekt	1.985 (±6.155)	-4.649 (±4.963)	-0.427
Ácido valérico	0.0420	No tolerantes CU 901 vs No tolerantes Herbapekt	0.1214 (±0.5115)	-0.414 (±0.5874)	-0.2933
3b-DCA	0.0498	Tolerantes CU 901 vs No tolerantes CU 901	0.046 (±0.065)	0.003 (±0.035)	15.33
HDCA	0.0464	Tolerantes CU 901 vs No tolerantes CU 901	0.101 (±0.15)	0.008 (±0.043)	12.63
HDCA	0.0231	Tolerantes CU 901 vs Tolerantes Herbapekt	0.101 (±0.15)	-0.019 (±0.079)	-5.32

&: 3b-DCA: 3β-Ácido 5β-colánico-12α-diol; HDCA:Ácido hiodesoxicólico, Gpo.1: primer grupo mencionado en la columna de la comparación, Gpo. 2: segundo grupo mencionado en la comparación.

Dentro de todas las diferencias significativas encontradas en este análisis se ven involucrados tanto pacientes Tolerantes como pacientes No Tolerantes que fueron tratados con la pectina CU 901. Para esta comparación en el grupo tratado con CU 901, se encontró que los pacientes Tolerantes tuvieron un aumento significativo en los ácidos 3β-ácido 5β-colánico-12α-diol (3b-DCA) y el ácido hiodesoxicólico (HDCA) frente a los pacientes tratados con No Tolerantes.

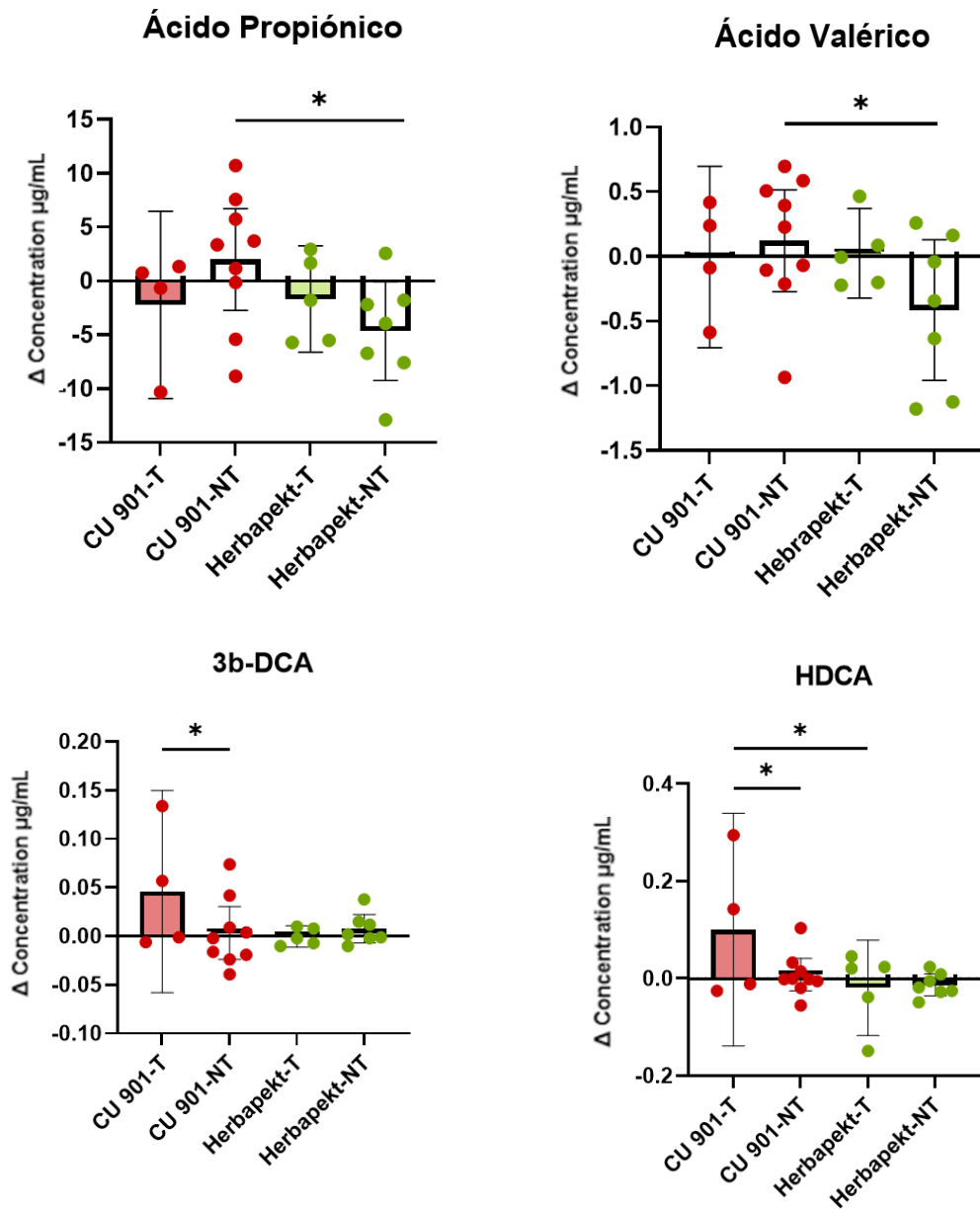


Figura 3.1.5. Representación gráfica del análisis ANOVA de dos factores para la comparación entre pacientes tolerantes y no tolerantes según el tratamiento administrado. (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$). Las barras de error denotan el intervalo de confianza (IC=95%). 3b-DCA: 3β -Ácido 5β -colánico- 12α -diol, HDCA: Ácido hiodesoxicólico.

En otra comparación, los pacientes No Tolerantes tratados con CU 901 tuvieron un aumento significativo en la concentración de ácido valérico y propiónico en comparación con los pacientes No Tolerantes tratados con Hebrapekt. Además en la comparación entre los Tolerantes entre CU 901 y Hebrapekt, se observó el aumento en los niveles de HDCA en pacientes Tolerantes tratados con CU 901 con respecto a Hebrapekt. Finalmente, no se encontraron diferencias en los tratados con Hebrapekt entre los Tolerantes y los No Tolerantes.

Como conclusión, se puede observar que se han encontrado diferencias según el tratamiento de pectina administrado y el efecto clínico en los pacientes, estos cambios son de gran importancia pues estarían asociados a una respuesta clínica efectiva tras solo 2 meses de tratamiento.

3.1.2. Análisis multivariante

El análisis metabolómico, sobre todo la aproximación no dirigida, suele tener un número bastante grande de variables muy relacionadas entre sí, arrojando resultados sumamente complejos (problema de multicolinealidad). No obstante, la suma complejidad de los datos crea una gran variabilidad e inestabilidad en las predicciones de un determinado experimento. Aplicar técnicas de análisis multivariante permite tratar con datos complejos tomando en cuenta variables sumamente correlacionadas [71]. En este sentido, en este trabajo se midieron 67 metabolitos, por lo que el análisis multivariante podría ser una herramienta que ayude a la interpretación correcta de los resultados, que es primordial para la posterior toma de decisiones.

El modelo de PCA descompone una matriz compleja en un gráfico separado por componentes principales que son líneas gráficas que separan a las muestras, las cuales recogen las variables que separarían esas muestras según sus similitudes o diferencias. Se trata de un modelo que separa o une a las muestras de forma “ciega”, por lo que permite ver tendencias y agrupaciones. Por su parte, el modelo de PLS-DA es considerado una versión supervisada del PCA en donde se realiza un análisis discriminante entre los grupos lo que consigue encontrar las diferencias significativas entre ellos. Ambos modelos consiguen disminuir la dimensionalidad de los resultados lo que permite resolver el problema de multicolinealidad, reduciendo así el error en las predicciones del comportamiento de un determinado experimento [71].

En este sentido, siempre se realiza un modelo no supervisado de PCA. La figura 3.2.1 muestra un modelo de PCA de la comparativa del grupo alérgico vs control a $t = 0$ meses. En esta se muestra que no hay una tendencia a separar los grupos antes de recibir el tratamiento, lo que indicaría que no existen diferencias significativas grandes entre ambos grupos en los metabolitos medidos. Esto podría ser debido a la alta heterogeneidad entre las muestras de los pacientes y los controles.

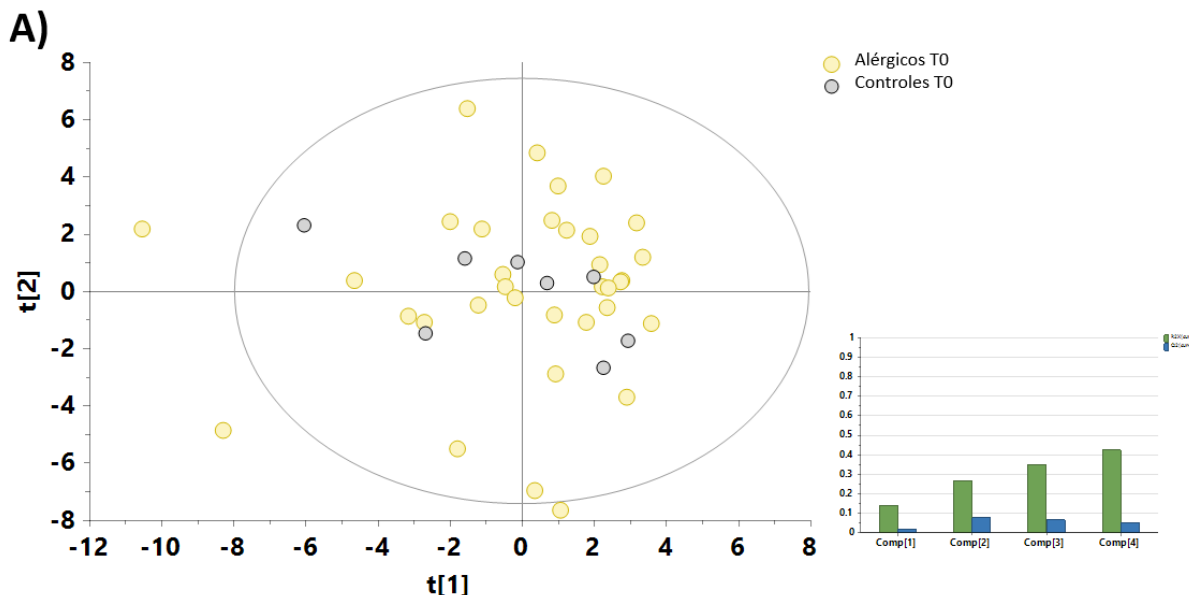


Figura 3.2.1. Modelo PCA para la diferenciación entre estado alérgico: pacientes alérgicos (amarillo) y grupo control (gris). A) Datos de pacientes alérgicos y controles a $t = 0$ meses. Presentados junto a sus parámetros de calidad: Q^2 (azul) y R^2 (verde).

Debido a que no se encontraron diferencias en la primera comparación y que estas podrían estar asociadas a la heterogeneidad de las muestras se procedió a realizar los demás modelos de PCA en las otras comparaciones realizadas en el análisis univariante.

La figura 3.2.2 muestra los modelos PCA para cada grupo de pacientes antes y después de recibir su respectivo tratamiento. En dicha figura se observa que para ninguno de los tres grupos: Placebo (en azul), CU 901 (en verde) y Herbapekt (en rojo) había una separación o tendencia de los pacientes según el tiempo en el que se recogió la muestra.

Respecto a la comparativa entre los distintos tratamientos a $t = 2$ meses tanto al comparar tres grupos, como en la comparativa dos a dos (Placebo vs CU 901, Placebo vs Herbapekt y CU 901 vs Herbapekt), la figura 3.2.3 nos muestra que no hay agrupaciones entre los grupos o tendencias que permitan separar a los tres grupos alérgicos entre sí.

Finalmente, se exploró el modelo PCA para analizar si existen diferencias entre los pacientes con respecto a la tolerancia. En la figura 3.2.4 no se observó algún tipo de agrupación debida al tratamiento y a la tolerancia entre los grupos.

Tras estas pruebas con los modelos ciegos, y con la intención de buscar si había alguna diferencia significativa entre los grupos se realizó el análisis de todas estas comparaciones utilizando los modelos discriminantes de tipo PLS-DA. Sin embargo no se obtuvo ningún modelo significativo para ninguna de las comparaciones realizadas por lo que las diferencias no fueron apreciables bajo este tipo de análisis.

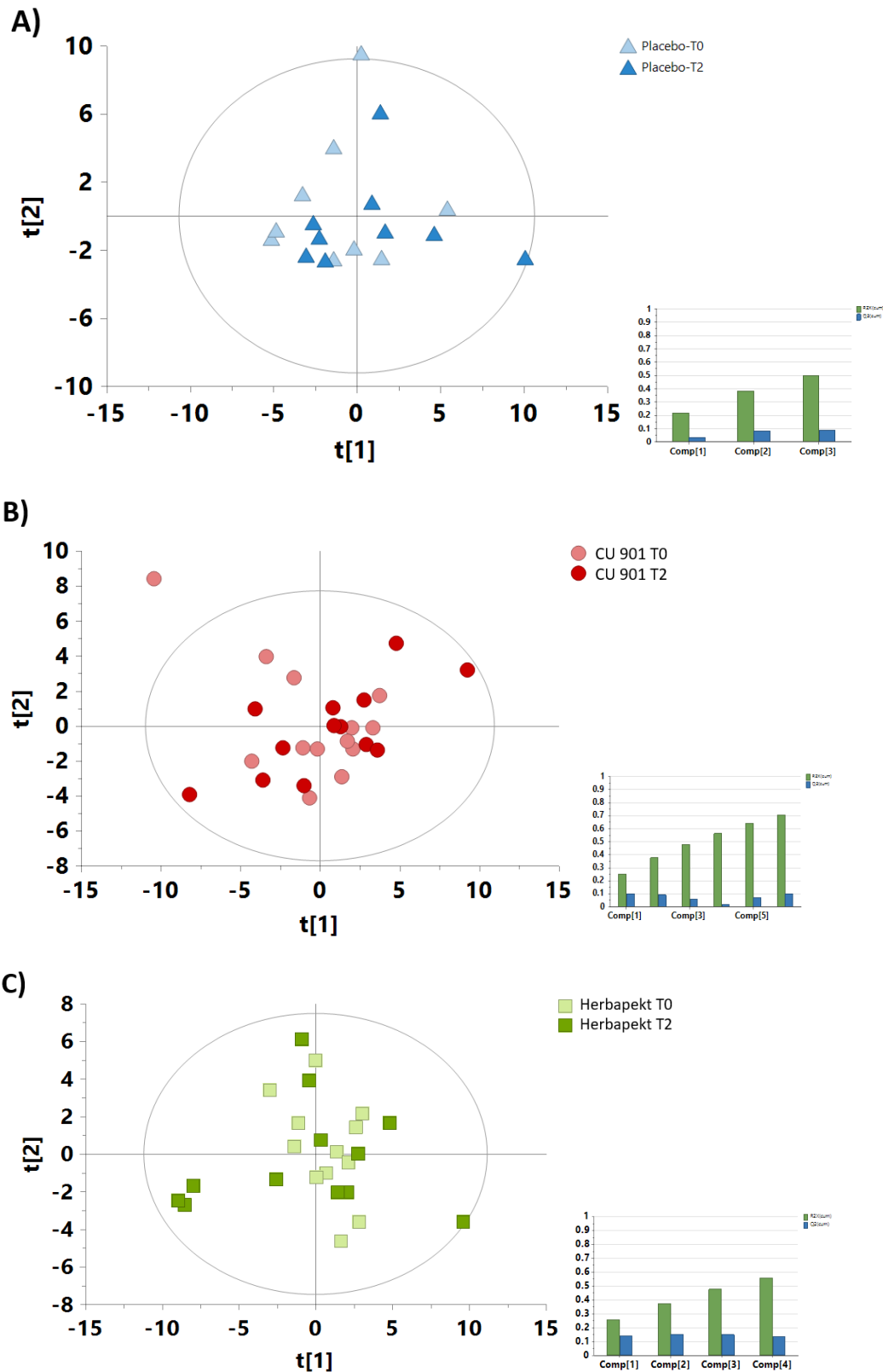


Figura 3.2.2. Modelo PCA para la diferenciación entre un mismo grupo antes y después de recibir el tratamiento. A) Datos de pacientes alérgicos tratados con placebo. B) Datos de pacientes alérgicos tratados con CU 901. C) Datos de pacientes alérgicos tratados con Herbapekt. Los colores más oscuros representan $t = 2$ meses para cada caso. Presentados junto a sus parámetros de calidad: Q^2 (azul) y R^2 (verde).

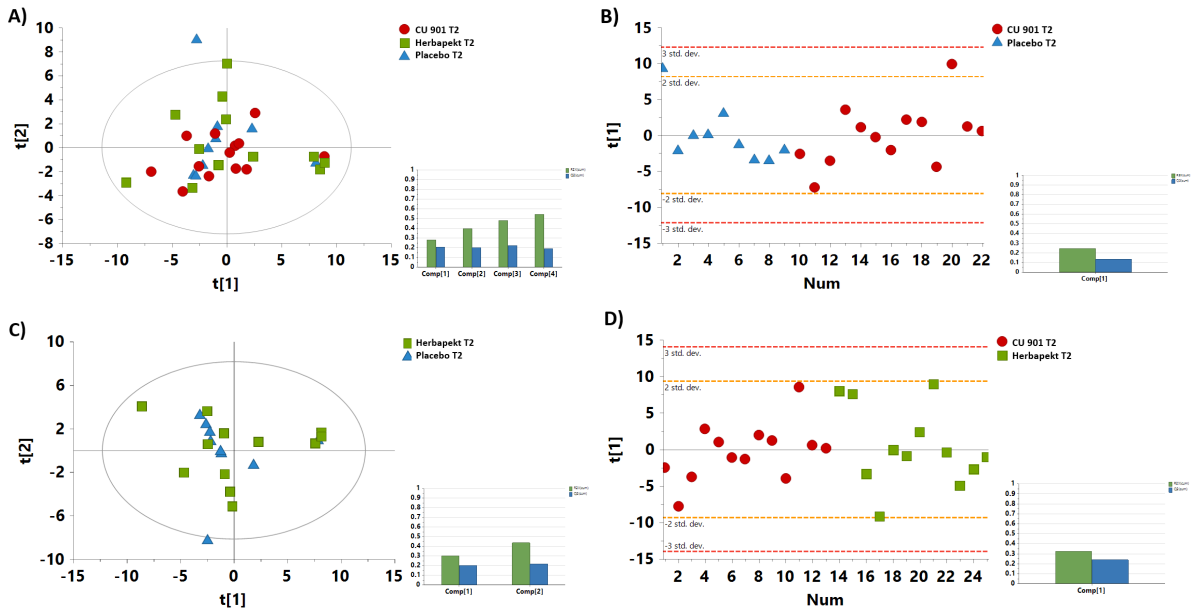


Figura 3.2.3. Modelo PCA para la diferenciación entre los distintos grupos alérgicos después de recibir su respectivo tratamiento (T=2 meses). A) Comparativa de los tres grupos alérgicos: Placebo vs CU 901 vs Herbapekt. B) Comparativa de los grupos alérgicos: Placebo vs CU 901. C) Comparativa de los grupos alérgicos: Placebo vs Herbapekt. D) Comparativa de los grupos alérgicos: CU 901 vs Herbapekt. Presentados junto a sus parámetros de calidad: Q^2 (azul) y R^2 (verde).

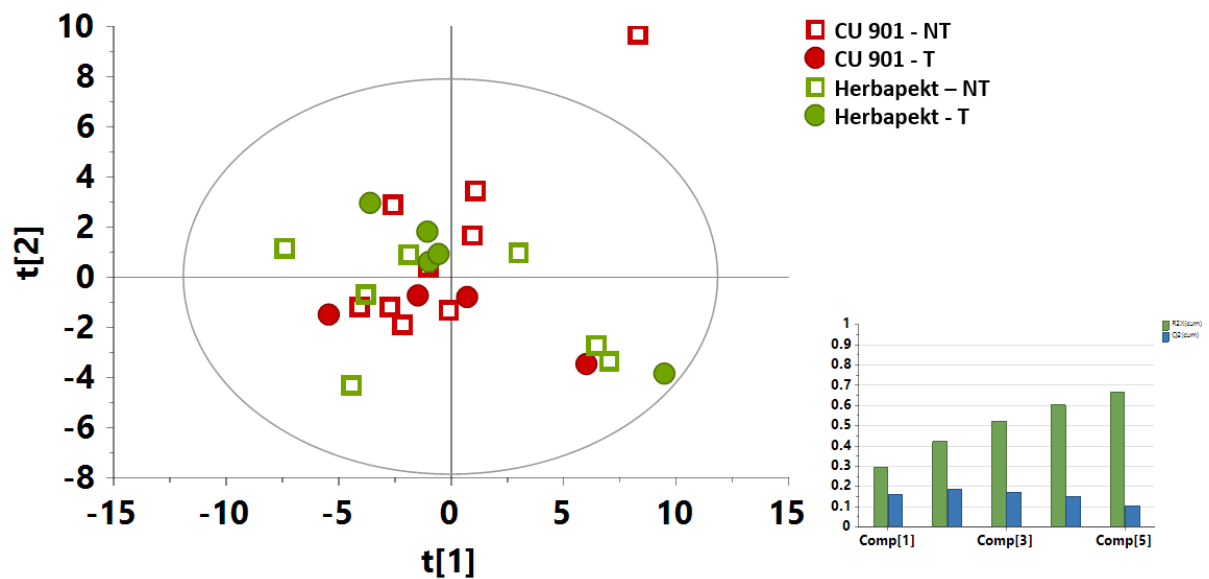


Figura 3.2.4. Modelo PCA para la diferenciación entre pacientes alérgicos tolerantes (círculos) y no tolerantes (cuadrados) para observar el efecto clínico. Presentados junto a sus parámetros de calidad: Q^2 (azul) y R^2 (verde).

3.2 DISCUSIÓN

La AA es un problema primordial en países como España, donde los pacientes que la sufren pueden llegar a tener reacciones anafilácticas que ponen en riesgo su vida y que además representan un elevado coste para el sistema sanitario. Es por ello, que la búsqueda de nuevos tratamientos que intentan curar la patología son necesarios. Este proyecto es único en su naturaleza ya que es el primer trabajo innovador que propone la intervención con pectinas para poder combatir la AA. El ensayo clínico del que se ha dispuesto y las muestras biológicas que se han medido demuestran ya de partida que el tratamiento sí que tiene un efecto clínico en una parte de la población, ya que se observa una tolerancia clara en un porcentaje de los pacientes con AA. Es importante además resaltar que aquellos pacientes con AA No Tolerantes, aumentaron su nivel de tolerancia al alérgeno tras el tratamiento, es decir, que fueron necesarias cantidades más altas del alérgeno para presentar una reacción alérgica. Estos resultados son prometedores para estos pacientes y marcan una posible vía de tratamiento a futuro que aún necesita ser explorada en los siguientes años, para lograr concretar factores como cuál es la mejor pectina para tratar la AA a LTP y cual es el tiempo de duración del tratamiento.

Dicho esto, además de estos factores clínicos prometedores que se observaron en el ensayo clínico, es necesario entender entre otros, los cambios metabólicos en suero entre los pacientes debido a los tratamientos con pectina.

Dado que dentro de la literatura existe un interés en los cambios observados en los niveles de los tres tipos de metabolitos estudiados (SCFA, BA y AIM) relacionado a la mejora o deteriora en el estado alérgico, se realizó el análisis estadístico univariante y multivariante de los resultados obtenidos en su respectivo análisis metabolómico dirigido con el fin de observar los cambios importantes en cada uno de los tratamientos observados y con ayuda de la literatura ya existente poder explicar dichas variaciones y su relación con la mejora en el estado alérgico.

Comenzando con el análisis entre los pacientes alérgicos antes del tratamiento frente a un grupo control no alérgico, se observó que el ácido araquidónico fue el metabolito con el p valor más significativo (figura 3.1.1). Este metabolito puede seguir diversas vías metabólicas, siendo el precursor de múltiples procesos, por ejemplo, dentro de los procesos inflamatorios la acumulación de ácido araquidónico libre se ve implicado, así mismo, al ser metabolizado por múltiples vías enzimáticas, da paso, entre otras cosas, a la formación de potentes inductores o moduladores en procesos inflamatorios. Los metabolitos derivados del ácido

araquidónico más representativos en los procesos de inflamación alérgica son los cisteinil leucotrienos (CysLTs) [72]. Los CysLTs son metabolitos conocidos como sustancias de lenta reacción en la anafilaxia, causantes de broncoconstricción, hipersecreción de moco, hiperreactividad bronquial e infiltración de eosinófilos [72]. Esta razón podría explicar que el ácido araquidónico se encuentre aumentado en concentración en el grupo alérgico respecto al grupo control antes del tratamiento.

Siguiendo con los resultados de la figura 3.1.1, tanto los SCFA como el ácido ursodesoxicólico (UDCA) muestran una tendencia de presentar mayores concentraciones en el grupo alérgico antes de recibir el tratamiento. Respecto al UDCA, tiene propiedades inmunomoduladoras tales como la supresión de la producción de inmunoglobulinas, es decir, que la existencia aumentada de este podría indicar un beneficio para el hospedero [47-50]. Dicha evidencia podría relacionar que el grupo alérgico intenta regular de forma metabólica la producción de inmunoglobulinas a través del aumento de UDCA en suero con respecto a los controles.

Adicionalmente, otra de las diferencias fueron las concentraciones elevadas de SCFA en suero en pacientes alérgicos frente a grupo control, especialmente de ácido butírico, acético y propiónico. Tal como se ha comentado en la introducción, los SCFA tienen propiedades inmunomoduladoras y antiinflamatorias, siendo metabolitos que ayudan a prevenir y/o disminuir las afecciones relacionadas con la AA [39,40,45]. Se ha descrito que estos SCFA suelen encontrarse disminuidos en el suero de pacientes alérgicos [73], sin embargo esta posible contradicción puede deberse a otros factores como son la matriz biológica que en nuestro caso ha sido suero, ya que la mayoría de estudios son en heces. Sin embargo, más adelante se explican otras razones.

Adicionalmente, estudios recientes revelan que bajos niveles de ácido pirúvico en suero, metabolito que igualmente se encuentra disminuido en el grupo alérgico de forma significativa, en paralelo con el aumento en los niveles de ácido acético, pueden desempeñar un papel crucial en la producción de IgE en respuesta a alérgenos a través del metabolismo del piruvato a energía a través del acetyl-CoA [74]. Dicho comportamiento se asocia al asma atópico y podría asociarse a otras enfermedades alérgicas, razón que podría explicar los niveles disminuidos pirúvico en el grupo alérgico, así como niveles mayores de algunos SCFA en pacientes alérgicos. De igual manera, se ha determinado que la activación de la piruvato cinasa M2, enzima implicada en el proceso de glucólisis y la producción de ácido pirúvico, ayuda a disminuir la condición alérgica en vías respiratorias en modelos de ratón

[75]. Es decir, que el aumento de ácido pirúvico en el hospedero guardaría una relación proporcional a la disminución de la condición alérgica, razón que explicaría que antes de recibir algún tratamiento, los pacientes alérgicos presentan niveles disminuidos de este metabolito.

Retomando el aumento observado en los SCFA: ácido propiónico, butírico, isobutírico e isovalérico, en pacientes alérgicos antes de recibir el tratamiento frente a grupo control y tomando en cuenta que estos tienen propiedades antiinflamatorias [40,45], los niveles elevados de estos SCFA en pacientes alérgicos frente a grupo control podrían asociarse a que al tener una condición alérgica, se requiere una mayor cantidad de estos por el mayor número de procesos inflamatorios que se llevan a cabo en el hospedero. De forma específica, el ácido propiónico provoca un efecto protector contra la inflamación alérgica en las vías respiratorias al potenciar la hematopoyesis de los precursores de las células dendríticas (DC) de la médula ósea provocando así una disminución en la capacidad de activar las células efectoras T_H2 en el pulmón, disminuyendo así la respuesta inflamatoria de las vías respiratorias [40]. Así mismo, se ha encontrado que el ácido propiónico estimula el crecimiento de bifidobacterias [76] que son consideradas probióticos con múltiples efectos beneficiosos, principalmente en el intestino del hospedero [76,77]. En este sentido, se podría decir que de forma general, los niveles altos de SCFA son benéficos para la salud del hospedero por lo que respecta a AA.

En los resultados de la comparativa de los niveles de metabolitos en pacientes alérgicos tras recibir su respectivo tratamiento (Tabla 3.2 y Figura 3.1.3), en donde la disminución de los SCFA: ácido acético, propiónico e isovalérico se observa de manera constante en los pacientes que recibieron el tratamiento de Herbapekt, esto podría significar no precisamente un cambio negativo en la salud del hospedero, sino que los niveles de SCFA se acercan a los niveles observados en el grupo control antes de recibir el tratamiento (Figura 3.1.1), es decir, se acercan a los niveles de SCFA observados en personas que no padecen AA.

Respecto a otros metabolitos de esta comparación se observa que la oleamida muestra un aumento significativo en los pacientes que recibieron el tratamiento con la pectina CU 901. En este sentido, se ha demostrado que la oleamida tiene efectos antiinflamatorios a nivel neurológico, ayudando a la prevención de enfermedades neurodegenerativas tales como el Alzheimer [59,60]. Al igual que otros endocannabinoides, ejerce la mayor parte de sus efectos uniéndose a proteínas G-acopladas del sistema endocannabinoide: los receptores tipo 1 (CB1) y tipo 2 (CB2). El receptor CB1 se expresa a través del sistema nervioso central y

está relacionado con la acción psicoactiva de dicho sistema, mientras que el receptor CB2 se expresa principalmente en células inmunes [61], por lo que su relación con la regulación de la respuesta inmune y sus propiedades antiinflamatorias, podrían no estar sólo concentradas en el sistema nervioso sino también guardar relación con patologías alérgicas, razón que podría relacionar el aumento de los niveles de oleamida en el suero de los pacientes que recibieron ambos tratamientos (CU 901 y Herbapekt), siendo CU 901 aquel activo con cambios significativos (figura 3.1.3).

Siguiendo con las diferencias significativas encontradas, se observó una tendencia a disminuir los niveles de esfingosina-1-fosfato (S1P, por sus siglas en inglés “*sphingosine 1phosphate*”) en ambos grupos de pacientes tratados (CU 901 y Herbapekt), donde sólo para Herbapekt, dicha disminución fue significativa (Figura 3.1.2). En este contexto, la S1P es un esfingolípido que ha demostrado tener un rol importante en procesos inflamatorios [55-58]. Se ha demostrado que niveles elevados de S1P son comunes en pacientes con asma [55]. Así mismo, estudios donde se ha suministrado S1P de forma exógena han resultado en el desarrollo progresivo de la inflamación de las vías respiratorias [56,57]. En contraparte, la inhibición de la esfingosina quinasa 1, enzima crucial en la síntesis de S1P resulta en la disminución de los niveles de inflamación en las vías respiratorias [58]. De forma más específica, en el caso de AA a LTP, se ha encontrado evidencia de que, dado que el ligando natural de este tipo de alérgenos es un derivado de esfingolípido, este podría imitar a la S1P en las respuestas inflamatorias [78]. Es decir, la disminución en los niveles de S1P transcurrido el tiempo de tratamiento, tiene un efecto positivo en la salud del hospedero, disminuyendo así los niveles de inflamación en los pacientes alérgicos.

Otro metabolito del que se pudo observar una disminución en ambos tratamientos, siendo Herbapekt el que cumplió con el criterio de significancia ($p < 0.05$) es la L-Arginina, la cual puede ser metabolizada para la producción de óxido nítrico (NO) vía NOS (por sus siglas en inglés “*Nitric Oxide Synthase*”) [79,80], en este sentido, el aumento en los niveles de L-Arginina resultará a su vez en el aumento de NO en el hospedero. Altas concentraciones de NO pueden ser perjudiciales promoviendo la inflamación de la mucosa y daño epitelial. De hecho, niveles elevados de NO exhalado en pacientes con asma suelen estar relacionados con asma severo. Es decir, la disminución en los niveles de L-Arginina resulta en la mejora de los síntomas inflamatorios en las vías respiratorias [79].

En la comparación de las diferencias entre tratamientos tras 2 meses de tratamiento, se pudo observar un aumento significativo en los niveles de iLCA en los pacientes tratados con la pectina CU 901 con respecto a Herbapekt y al grupo placebo. En este sentido, los BA modulan la diferenciación y función de las células T. De forma específica, los ácidos biliares secundarios, entre ellos iLCA, modulan la diferenciación de las células T_{reg}, que mantienen la inmunotolerancia del hospedero e inhiben la diferenciación de las células T_H17, células inflamatorias que ayudan a la protección contra patógenos. Así mismo, la producción bacteriana de iLCA podría contribuir a la homeostasis inmunitaria intestinal en humanos [51]. Tomando en cuenta esto, el aumento en las concentraciones de iLCA resultaría beneficioso para la salud del hospedero. Esto se ve demostrado en el aumento en el grupo CU-901 y aunque no significativo en el aumento en el grupo de Herbapekt ambos frente al control.

Esta diferencia en este ácido biliar ha llamado nuestra atención ya que las diferencias entre ambos activos radican tanto en la fuente de origen, como en el grado de esterificación. Como se ha mencionado con anterioridad, CU 901 es una pectina de tipo LMP, con un DE del 7.3%, proveniente de cítricos, mientras que Herbapekt es una pectina de tipo HMP DE del 57%, obtenida a partir de manzanas. En este sentido, las paredes celulares de las plantas y vegetales están conformadas principalmente por agua y una matriz compleja de polisacáridos tales como celulosa, hemicelulosa y pectinas. Muchas de las propiedades de las plantas, tales como textura, características reológicas y la facilidad para la extracción de sus componentes están directamente relacionadas con los cambios estructurales en los polímeros presentes en la pared celular, particularmente, los cambios en la pectina [81].

Usualmente, las pectinas son utilizadas como ingrediente en la elaboración de muchos alimentos dadas sus propiedades gelificantes [82,83]. El grado de esterificación de las pectinas conferirá distintas propiedades a los alimentos aunque ambos tipos (HMP y LMP) tienen efectos benéficos para la salud [39,82]. Si bien en la naturaleza la mayoría de pectinas (alrededor del 80%) son de tipo HMP, dependerá de la fuente y de la forma de extracción, la naturaleza de la pectina. Las pieles de cítricos y la pulpa de manzana son las principales fuentes de pectinas, siendo en la actualidad la principal fuente de extracción para su uso comercial [84.85].

La cantidad de pectina presente en cada fuente natural resulta relevante en este estudio pues podría ser que los cambios significativos en cada tratamiento se encuentren relacionados con la fuente natural de la que fue obtenida la pectina, en este sentido, la pulpa de la manzana

contiene 10-15% de pectina (materia seca), mientras que la cáscara de cítricos contiene un porcentaje relativamente mayor que el de manzanas, siendo del 20 - 30%. No obstante, desde el punto de vista aplicativo, las pectinas de cítricos y de manzana son en gran medida equivalentes [85].

Así mismo, el DE de cada pectina a nivel químico le confiere distintas propiedades. Las pectinas LMP contienen más grupos libres de ácido carboxílico, dando un mayor carácter hidrofílico a la pectina que entre otras cosas permite una mayor capacidad de absorción de líquidos y, de forma particular, se ha observado que las pectinas de tipo LMP refuerzan la red de proteínas del gluten dado que promueven la reticulación de las cadenas proteicas, mejorando sus propiedades reológicas [86]. A nivel químico, un grupo éster resulta ser menos reactivo que el ácido carboxílico dado que el carácter electrofílico del carbono del grupo carbonilo se reduce por efecto de resonancia, mediante la donación de electrones de un grupo libre del heteroátomo, en este caso, del oxígeno. Al existir efecto de resonancia en una molécula, hay una mayor estabilidad que se traduce en una menor reactividad. Todas estas características podrían estar relacionadas con el aumento en el ácido biliar iLCA en los pacientes tratados con CU 901.

Finalmente, en la comparación respecto al efecto clínico con ambos tratamientos, se demostró que los pacientes tolerantes tienden a disminuir los niveles de LPC 19:0 (Tabla 3.4 y Figura 3.1.6). Las LPCs son metabolitos con propiedades detergentes considerados potenciales pro-inflamatorios. Estudios han observado que el incremento de los niveles de LPC en plasma está involucrado en el desarrollo de algunas enfermedades inflamatorias a través de la vasoconstricción [62]. Esto podría explicar por qué los pacientes que presentan tolerancia a las LTP presentan una tendencia general a disminuir los niveles de LPC 19:0. Es decir muestran un cambio positivo en la respuesta inflamatoria a diferencia de los pacientes no tolerantes, cuya tendencia es a no disminuir

Además, a partir de los resultados ilustrados en la figura 3.1.7, utilizando los 4 sub-grupos que incluyen la tolerancia al alérgeno y el tratamiento con cada pectina, podemos destacar que los pacientes tolerantes que tomaron CU 901, presentaron un aumento significativo en los niveles de ácido hiodesoxicólico (HDCA) frente a los pacientes no tolerantes este mismo tratamiento y frente a los pacientes tolerantes tratados con Herbapekt. En este contexto, el ácido HDCA es un ácido biliar secundario obtenido a partir de AB primarios en la microbiota intestinal [87]. Recientes estudios han revelado que el HDCA tiene fuertes propiedades

antiinflamatorias; en pacientes con sepsis, los niveles de HDCA en plasma son considerablemente bajos y la subsecuente administración de este metabolito resultó disminuir las respuestas inflamatorias de estos pacientes al ser un antagonista del receptor TLR4, suprimiendo así la activación de excesiva de macrófagos pro-inflamatorios [88]. Es decir, el aumento en los niveles de HDCA resulta beneficioso en los pacientes tolerantes tratados con CU 901, pues se relaciona en una disminución en la respuesta inflamatoria.

Dado la cantidad de metabolitos cuantificados en este proyecto, se decidió explorar otra estrategia estadística que utilizará la información de todos los metabolitos en un solo análisis, por lo que se realizó un análisis multivariante. En este caso, se utilizaron modelos multivariantes ciegos de tipo PCA para determinar las tendencias o agrupaciones de las muestras. Según los resultados para todas las comparativas realizadas con este modelo: grupo alérgico vs grupo control antes del tratamiento, $t=0$ meses (figura 3.2.1), efecto de cada tratamiento a través del tiempo (figura 3.2.2), comparación entre los distintos grupos alérgicos una vez transcurrido el tratamiento, $t=2$ meses (Figura 3.2.3) y pacientes tolerantes vs pacientes no tolerantes tras cada uno de los tratamientos con pectina (figura 3.2.4), no se encontraron ningún tipo de tendencias o agrupaciones que nos indicarán algún tipo de separación según la variable de estudio en los modelos de PCA. Esto indicó que no había muchas diferencias de partida entre los grupos a comparar y sugiere que es necesario es necesario probar otros factores como realizar un tratamiento más prolongado, con una mayor concentración de pectinas, analizar otro tipo de metabolitos, realizar la prueba a un grupo de pacientes más homogéneo, etc. Es decir, cambiar las variables implicadas en futuros ensayos podría reflejar cambios más significativos, sobre todo en el análisis multivariante.

Ante este panorama, se intentó buscar diferencias entre los grupos utilizando el análisis discriminante, utilizando los modelos de tipo PLS-DA. Sin embargo, no se encontraron modelos discriminantes significativos para ninguna de las comparaciones. Esto refuerza que es necesario explorar otros factores en el diseño experimental antes mencionados.

Todos estos resultados y los cambios observados demuestran que este proyecto tiene un gran potencial para seguir explorando una posibilidad de tratamiento en pacientes con AA. Sin embargo, estudios futuros son necesarios para demostrar los cambios observados y su función en el organismo.

Capítulo 4

4. CONCLUSIONES

- Se realizó el análisis estadístico univariante de los datos obtenidos de tres grupos de metabolitos (SCFA, BA, AIM), enfocando en las 4 comparaciones del estudio.
- En la comparación entre pacientes alérgicos y controles se encontraron diferencias en metabolitos de los 3 grupos: SCFA, BA y AIM, siendo el más relevante el aumento de ácido araquidónico en pacientes alérgicos por su implicación en los procesos inflamatorios.
- En la comparación de los cambios en el tiempo en cada uno de los tratamientos, se encontró que el número de cambios son mayores en los pacientes que tomaron el tratamiento CU 901 con respecto a Herbapekt. Además, Herbapekt reflejó una disminución de los SCFA, lo que indicaría que sus niveles se acercan a los niveles de los controles.
- En la comparación entre los grupos tras 2 meses de tratamiento, se encontró un aumento significativo del ácido biliar iLCA en los pacientes con AA tratados con CU 901 con respecto a Herbapekt y al placebo. Este aumento está asociado al aumento de la respuesta inmunológica de las células T reguladoras. La diferencia entre tratamientos (CU 901 y Herbapekt) fue explicada en función a las propiedades físico-químicas de las pectinas.
- En cuanto a la comparación de la eficacia clínica, se determinó que una disminución de LPC 19:0 en los pacientes Tolerantes en comparación de los No Tolerantes de los pacientes tratados con pectinas demuestra que éste podría estar asociado a un cambio en la inflamación de estos pacientes.
- En la comparación complementaria de la eficacia clínica y el tipo de pectina administrada, se encontró principalmente que los ácidos biliares 3b-DCA y HDCA estaban aumentados en el grupo de pacientes tratados con CU 901 en Tolerantes en comparación con los No Tolerantes. De estos, el HDCA se ha visto involucrado en procesos antiinflamatorios.
- El análisis multivariante no supervisado de tipo PCA y el análisis multivariante discriminante de tipo PLSDA mostraron que no se encontró ningún tipo de agrupación o discriminación entre grupos, lo que sugiere que las diferencias en los metabolitos medidos y las condiciones no son muy grandes, con lo cual es necesario utilizar otras aproximaciones estadísticas como la estadística univariante, o hacer estudios posteriores transformando alguna de las variables implicadas en este estudio.

Referencias

1. Sampson HA. (1999). Food allergy. Part 1: immunopathogenesis and clinical disorders. *J Allergy Clin Immunol.* 103(5 Pt. 1):717–728. [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(99\)70411-2](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(99)70411-2)
2. Villamarín, E. A., Sánchez, N. (2010). Alergia alimentaria. *Gastrohnutp.* 12(3). S27-S34. <http://bitly.ws/DKD8>
3. García, B., Gómez, B., Arroabarren, E., et al. (2003). La alergia alimentaria en el siglo XXI. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra.* 26(2). 7-15. <https://scielo.isciii.es/pdf/asisna/v26s2/original1.pdf>
4. Cruchet, S. (2018). Alergia alimentaria. *Revista chilena de nutrición.* 45(2). <http://dx.doi.org/10.4067/s0717-75182018000300099>
5. Molinas, J., Arduoso, L., & Crisci, C. (2004). Alergia alimentaria. *Invenio.* 7(12). 133-141. <https://www.redalyc.org/pdf/877/87701212.pdf>
6. Boyce JA, Assa'ad A, Burks AW, et al. (2010). Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: report of the NIAID-sponsored expert panel. *Journal of Allergy and Clinical Immunology,* 126(6), S1-S58. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.10.007>
7. Metcalfe, D. D., Sampson, H. A., Simon, R. A., & Lack, G. (Eds.). (2015). *Alergias alimentarias. Reacciones adversas a alimentos y aditivos alimentarios* (5th ed.). Elsevier.
8. Motosue, M. S., Belloio, M. F., Van Houten, H. K., Shah, N. D., & Campbell, R. L. (2018). National trends in emergency department visits and hospitalizations for food-induced anaphylaxis in US children. *Pediatr Allergy Immunol.* 29(5), 538-544. doi:10.1111/pai.12908
9. Plaza-Martín, A. (2016). Alergia alimentaria en la edad pediátrica, conceptos actuales. *Anales de Pediatría.* 85(1). 50.e1-50.e5. <https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2016.01.017>
10. Jenkins JA, Griffiths-Jones S, Shewry PR, Breiteneder H, Mills EN. (2005). Structural relatedness of plant food allergens with specific reference to cross-reactive allergens: an in silico analysis. *J Allergy Clin Immunol.* 115(1):163–170. DOI: 10.1016/j.jaci.2004.10.026
11. Maloney JM, Chapman MD, Sicherer SH. (2006). Peanut allergen exposure through saliva: assessment and interventions to reduce exposure. *J Allergy Clin Immunol.* 118:719–724. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2006.05.017>
12. Fernandez-Rivas M, Bolhaar S, Gonzalez-Mancebo E, et al. (2006). Apple allergy across Europe: how allergen sensitization profiles determine the clinical expression of allergies to plant foods. *J Allergy Clin Immunol.* 118:481–488. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2006.05.012>
13. Miles, B. T., Gabrielli, S., Clarke, A., Eisman, H., Shand, G., & Ben-Shoshan, M. (2020). Rates of anaphylaxis for the most common food allergies. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice,* 8(7), 2402-2405.e3. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2020.03.014>
14. Zubeldia, J.M. (ed.) (2021) *El libro de las enfermedades alérgicas. segunda edición actualizada y ampliada.* Bilbao: Fundación BBVA.
15. Nuñez-Borque, E., Fernández-Bravo, S., Yuste-Montalvo, A., & Esteban, V. (2022). Pathophysiological, Cellular, and Molecular Events of the Vascular System in Anaphylaxis. *Frontiers in Immunology,* 13, 836222. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.836222>
16. Torres, M., Barber, D., Vieths, S., et al. (2022). Dietary Intervention in Food Allergy: Microbiome, Epigenetic and Metabolomic interactions: DIFAMEM., ERA HDHL - *Nutrition & the Epigenome.*

17. Martino, D. J., & Prescott, S. L. (2010). Silent mysteries: Epigenetic paradigms could hold the key to conquering the epidemic of allergy and immune disease: Epigenetics in allergic disease. *Allergy*, 65(1), 7-15. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2009.02186.x>
18. Tan, T. H.-T., Ellis, J. A., Saffery, R., & Allen, K. J. (2012). The role of genetics and environment in the rise of childhood food allergy: Role of genetics and environment in food allergy. *Clinical & Experimental Allergy*, 42(1), 20-29. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2011.03823.x>
19. Ege, M., Bieli, C., Frei, R., Vanstrien, R., Riedler, J., Ublagger, E., Schrambijkkerk, D., Brunekreef, B., Vanhage, M., & Scheynius, A. (2006). Prenatal farm exposure is related to the expression of receptors of the innate immunity and to atopic sensitization in school-age children. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 117(4), 817-823. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2005.12.1307>
20. Ege, M. J., Mayer M, Normand AC, et al. (2011). Exposure to Environmental Microorganisms and Childhood Asthma. *N Engl j Med*. 364(8). 701-709. DOI: 10.1056/NEJMoa1007302
21. Groschwitz, K. R., & Hogan, S. P. (2009). Intestinal barrier function: Molecular regulation and disease pathogenesis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 124(1), 3-20. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.05.038>
22. Barcenas Hernández, O. (2019). Alergia alimentaria en pacientes con rinitis alérgica y asma. [Tesis de especialidad, Universidad Nacional Autónoma de México]. TESIUNAM Digital. <http://132.248.9.195/ptd2019/agosto/0794576/Index.html>
23. Keeney, K. M., & Finlay, B. B. (2011). Enteric pathogen exploitation of the microbiota-generated nutrient environment of the gut. *Current Opinion in Microbiology*, 14(1), 92-98. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.12.012>
24. Sicherer, S., & Sampson, H. (2006). 9. Food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 117(2), S470-S475. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2005.05.048>
25. Cataldo, F., Accomando, S., Fragapane, M. L., Montaperto, D., & SIGENP and GLNBI Working Groups on Food Intolerances*. (2006). Are food intolerances and allergies increasing in immigrant children coming from developing countries? *Pediatric Allergy and Immunology*, 17(5), 364-369. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3038.2006.00421.x>
26. Prescott, S., & Allen, K. J. (2011). Food allergy: Riding the second wave of the allergy epidemic: The food allergy epidemic. *Pediatric Allergy and Immunology*, 22(2), 155-160. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3038.2011.01145.x>
27. Warren, C. M., Jiang, J., & Gupta, R. S. (2020). Epidemiology and Burden of Food Allergy. *Current Allergy and Asthma Reports*, 20(2), 6. <https://doi.org/10.1007/s11882-020-0898-7>
28. Abrams, E. M., Simons, E., Roos, L., Hurst, K., & Protudjer, J. L. P. (2020). Qualitative analysis of perceived impacts on childhood food allergy on caregiver mental health and lifestyle. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 124(6), 594-599. doi:10.1016/j.anai.2020.02.016
29. Antolin-Amerigo, D., Manso, L., Caminati, M., de la Hoz Caballer, B., Cerecedo, I., Muriel, A., Alvarez-Mon, M. (2016). Quality of life in patients with food allergy. *Clin Mol Allergy*, 14,4. doi:10.1186/s12948-016-0041-4
30. Skypala, I. J., Asero, R., Barber, D., Cecchi, L., et. al. (2021) Non-specific lipid-transfer proteins: Allergen structure and function, cross-reactivity, sensitization, and epidemiology. *Clinical and Translational Allergy*, 11(3). <https://doi.org/10.1002/ctt2.12010>
31. Alimmenta. (s.f.). Alergia a la LTPs (proteínas transportadoras de lípidos). <https://www.alimmenta.com/dietas/alergia-a-la-ltps-proteinas-transportadoras-de-lipidos/>
Fecha de consulta: Marzo, 2023.
32. Hoffman-Sommergruber, K., Hilger, C., Santos, A., et. al. (2022). Molecular Allergology User's Guide 2.0. EAACI.

33. Gamboa, P., Sanchez-Monge, R., Sanz, M. L., Palacín, A., Salcedo, G., & Diaz-Perales, A. (2007). Sensitization to Cannabis sativa caused by a novel allergenic lipid transfer protein, Can s 3. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 120(6), 1459-1460. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.07.052>
34. Decuyper, I. I., Faber, M. A., Sabato, V., Bridts, C. H., Hagendorens, M. M., Rihs, H.-P., De Clerck, L. S., & Ebo, D. G. (2017). Where there's smoke, there's fire: Cannabis allergy through passive exposure. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, 5(3), 864-865. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2016.10.019>
35. Martín Pedraza, L. (2019). Proteínas transferidoras de lípidos (nsLTP): una familia de proteínas implicada en la alergia al tomate. [Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid]. <https://eprints.ucm.es/id/eprint/58049/1/T41514.pdf>
36. Sánchez-Monge, R., Lombardero, M., García-Sellés, F. J., Barber, D., & Salcedo, G. (1999). Lipid-transfer proteins are relevant allergens in fruit allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 103(3), 514-519. [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(99\)70479-3](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(99)70479-3)
37. Asero, R. (2011). Peach-Induced Contact Urticaria Is Associated with Lipid Transfer Protein Sensitization. *International Archives of Allergy and Immunology*, 154(4), 345-348. <https://doi.org/10.1159/000321827>
38. Tordesillas, L., Gómez-Casado, C., Garrido-Arandia, M., Murua-García, A., Palacín, A., Varela, J., Konieczna, P., Cuesta-Herranz, J., Akdis, C. A., O'Mahony, L., & Díaz-Perales, A. (2013). Transport of Pru p 3 across gastrointestinal epithelium—An essential step towards the induction of food allergy? *Clinical & Experimental Allergy*, 43(12), 1374-1383. <https://doi.org/10.1111/cea.12202>
39. Blanco-Pérez, F., Steigerwald H., Schülke, S., et. al. (2021). The Dietary Fiber Pectin: Health Benefits and Potential for the Treatment of Allergies by Modulation of Gut Microbiota. *Current Allergy and Asthma Reports*. 21:43. <https://doi.org/10.1007/s11882-021-01020-z>
40. Trompette, A., Gollwitzer E., Yadava K., et. al. (2014). Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nature Medicine*, 20(2), 159-166. <https://doi.org/10.1038/nm.3444>
41. O'Keefe, S. J. (2019). The association between dietary fibre deficiency and high-income lifestyle-associated diseases: Burkitt's hypothesis revisited. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, 4(12), 984-996. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(19\)30257-2](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(19)30257-2)
42. Barber, D., Villaseñor, A., & Escribese, M. M. (2019). Metabolomics strategies to discover new biomarkers associated to severe allergic phenotypes. *Asia Pacific Allergy*, 9(4), e37. <https://doi.org/10.5415/apallergy.2019.9.e37>
43. Radzikowska, U., Baerenfaller, K., Cornejo-García, J. A., Karaaslan, C., Barletta, E., Sarac, B. E., Zhakparov, D., Villaseñor, A., Eguluz-Gracia, I., Mayorga, C., Sokolowska, M., Barbas, C., Barber, D., Ollert, M., Chivato, T., Agache, I., & Escribese, M. M. (2022). Omics technologies in allergy and asthma research: An EAACI position paper. *Allergy*, 77(10), 2888-2908. <https://doi.org/10.1111/all.15412>
44. López-López, Á., López-González, Á., Barker-Tejeda, T. C., & Barbas, C. (2018). A review of validated biomarkers obtained through metabolomics. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 18(6), 557-575. <https://doi.org/10.1080/14737159.2018.1481391>
45. Tan, J., Mc Kenzei, C., Vuillermin, P., et. al. (2016). Dietary Fiber and Bacterial SCFA Enhance Oral Tolerance and Protect against Food Allergy through Diverse Cellular Pathways. *Cell reports*. 15(12). 2809-2824. <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2016.05.047>
46. Campbell, C., McKenney, P. T., Konstantinovskiy, D., Isaeva, O. I., Schizas, M., Verter, J., Mai, C., Jin, W.-B., Guo, C.-J., Violante, S., Ramos, R. J., Cross, J. R., Kadaveru, K., Hambor, J., & Rudensky, A. Y. (2020). Bacterial metabolism of bile acids promotes

- generation of peripheral regulatory T cells. *Nature*, 581(7809), 475-479. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2193-0>
47. Chen, M. L., Takeda, K., & Sundrud, M. S. (2019). Emerging roles of bile acids in mucosal immunity and inflammation. *Mucosal Immunology*, 12(4), 851-861. <https://doi.org/10.1038/s41385-019-0162-4>
 48. Bodge, M., Cumpston, A. (2019). Pharmacology of Drugs Used in Hematopoietic Cell Transplantation. En A. Bashir Q., Hamadani M. (Eds), Hematopoietic Cell Transplantations for Malignant Conditions (19-35). ScienceDirect.
 49. Lacaille, F., & Paradis, K. (1993). The immunosuppressive effect of ursodeoxycholic acid: A comparative in vitro study on human peripheral blood mononuclear cells. *Hepatology*, 18(1), 165-172. <https://doi.org/10.1002/hep.1840180125>
 50. Willart, M. A. M., Van Nimwegen, M., Grefhorst, A., Hammad, H., Moons, L., Hoogsteden, H. C., Lambrecht, B. N., & KleinJan, A. (2012). Ursodeoxycholic acid suppresses eosinophilic airway inflammation by inhibiting the function of dendritic cells through the nuclear farnesoid X receptor. *Allergy*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1111/all.12019>
 51. Paik, D., Yao, L., Zhang, Y., et.al. (2022). Human gut bacteria produce TH17-modulating bile acid metabolites. *Nature*, 603(7903), 907-912. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04480-z>
 52. Obeso, D., Contreras, N., Dolores-Hernández, M., Carrillo, T., Barbas, C., Escribese, M. M., Villaseñor, A., & Barber, D. (2022). Development of a Novel Targeted Metabolomic LC-QqQ-MS Method in Allergic Inflammation. *Metabolites*, 12(7), 592. <https://doi.org/10.3390/metabo12070592>
 53. Perales-Chorda, C., Obeso, D., Twomey, L., et. al.. (2021). Characterization of anaphylaxis reveals different metabolic changes depending on severity and triggers. *Clinical & Experimental Allergy*, 51(10), 1295-1309. <https://doi.org/10.1111/cea.13991>
 54. Delgado-Dolset, M. I., Obeso, D., Rodríguez-Coira, et. al. (2022). Understanding uncontrolled severe allergic asthma by integration of omic and clinical data. *Allergy*, 77(6), 1772-1785. <https://doi.org/10.1111/all.15192>
 55. Díaz-Perales, A., Escribese, M. M., Garrido-Arandia, M., et. al. (2021). The Role of Sphingolipids in Allergic Disorders. *Frontiers in Allergy*, 2, 675557. <https://doi.org/10.3389/falgy.2021.675557>
 56. Roviezzo, F., Sorrentino, R., Bertolino, A., et. al. (2015). S1P-induced airway smooth muscle hyperresponsiveness and lung inflammation in vivo: Molecular and cellular mechanisms: Sphingosine-1-phosphate and lung function. *British Journal of Pharmacology*, 172(7), 1882-1893. <https://doi.org/10.1111/bph.13033>
 57. Chiba, Y., Suzuki, K., Kurihara, E., Uechi, M., Sakai, H., & Misawa, M. (2010). Sphingosine-1-Phosphate Aggravates Antigen-Induced Airway Inflammation in Mice. *The Open Respiratory Medicine Journal*, 4(1), 82-85. <https://doi.org/10.2174/1874306401004010082>
 58. Price, M. M., Oskeritzian, C. A., Falanga, Y. T., et. al.. (2013). A specific sphingosine kinase 1 inhibitor attenuates airway hyperresponsiveness and inflammation in a mast cell-dependent murine model of allergic asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 131(2), 501-511.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.07.014>
 59. Kita, M., Ano, Y., Inoue, A., & Aoki, J. (2019). Identification of P2Y receptors involved in oleamide-suppressing inflammatory responses in murine microglia and human dendritic cells. *Scientific Reports*, 9(1), 3135. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40008-8>
 60. Ano, Y., Ozawa, M., Kutsukake, T., et. al. (2015). Preventive Effects of a Fermented Dairy Product against Alzheimer's Disease and Identification of a Novel Oleamide with Enhanced Microglial Phagocytosis and Anti-Inflammatory Activity. *PLOS ONE*, 10(3), e0118512. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118512>

61. Oh, Y. T., Lee, J. Y., Lee, J., Lee, J. H., Kim, J.-E., Ha, J., & Kang, I. (2010). Oleamide suppresses lipopolysaccharide-induced expression of iNOS and COX-2 through inhibition of NF- κ B activation in BV2 murine microglial cells. *Neuroscience Letters*, 474(3), 148-153. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.03.026>
62. Knuplez, E., & Marsche, G. (2020). An Updated Review of Pro- and Anti-Inflammatory Properties of Plasma Lysophosphatidylcholines in the Vascular System. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12), 4501. <https://doi.org/10.3390/ijms21124501>
63. University of Birmingham and Birmingham. Metabolomics Training Centre. (s.f.). Analytical Techniques applied in Metabolomics. [https://www.futurelearn.com/info/courses/metabolomics/0/steps/10710#:~:text=Nuclear%20magnetic%20resonance%20\(NMR\)%20spectroscopy%20and%20mass%20spectrometry%20are%20the,frequently%20applied%20in%20metabolomics%20research](https://www.futurelearn.com/info/courses/metabolomics/0/steps/10710#:~:text=Nuclear%20magnetic%20resonance%20(NMR)%20spectroscopy%20and%20mass%20spectrometry%20are%20the,frequently%20applied%20in%20metabolomics%20research). Fecha de consulta: Mayo, 2023.
64. David, A., & Rostkowski, P. (2020). Analytical techniques in metabolomics. En *Environmental Metabolomics* (pp. 35-64). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818196-6.00002-9>
65. Domingues, P., García, A., & Skrzydlewska, E. (2018). Química analítica avanzada en las ciencias de la vida = Advanced analytical chemistry for life sciences. Liberlibro.com A.C.
66. Skoog, D., Holler, F., Crouch, S. (2018). Principios de análisis instrumental. (7 ed). CENGAGE.
67. Ho, C., Lam, C., Chan, M., et. al. (2003). Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications. *Clin Biochem Rev*. Vol. 24. 3-12 p.
68. Zhao, S., & Li, L. (2018). Dansylhydrazine Isotope Labeling LC-MS for Comprehensive Carboxylic Acid Submetabolome Profiling. *Analytical Chemistry*, 90(22), 13524-13522. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b03435>
69. Sarafian, M. H., Lewis, M. R., Pechlivanis, A., Ralphs, S., et. al. (2015). Bile Acid Profiling and Quantification in Biofluids Using Ultra-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 87(19), 9662-9670. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b01556>
70. Álvarez, C. de M., & Solís, A. V. (2023). LIPIDOMIC CHARACTERIZATION OF IgE- AND IgG-MEDIATED ANAPHYLAXIS IN HEART OF A MICE MODEL. [Tesis de grado]. Universidad San Pablo CEU.
71. Rivera, L. V., & Escudero, L. Á. G. (s. f.). Aplicaciones del método PLS en Quimiometría. [Tesis de Licenciatura]. Universidad de Valladolid.
72. Serrano-Mollar, A., & Closa, D. (2005). Arachidonic Acid Signaling in Pathogenesis of Allergy: Therapeutic Implications. *Current Drug Target -Inflammation & Allergy*, 4(2), 151-155. <https://doi.org/10.2174/1568010053586354>
73. Tian, G., Peng, K., Yu, Y., etc. (2022). Propionic acid regulates immune tolerant properties in B Cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 26(10), 2766-2776. <https://doi.org/10.1111/jcmm.17287>
74. Chiu, C.-Y., Cheng, M.-L., Chiang, M.-H., et. al. (2021). Integrated metabolic and microbial analysis reveals host-microbial interactions in IgE-mediated childhood asthma. *Scientific Reports*, 11(1), 23407. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-02925-5>
75. Van De Wetering, C., Aboushousha, R., Manuel, A. M., et. al. (2020). Pyruvate Kinase M2 Promotes Expression of Proinflammatory Mediators in House Dust Mite-Induced Allergic Airways Disease. *The Journal of Immunology*, 204(4), 763-774. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1901086>
76. Kaneko, T., Mori, H., Iwata, M., & Meguro, S. (1994). Growth Stimulator for Bifidobacteria Produced by Propionibacterium freudenreichii and Several Intestinal Bacteria. *Journal of Dairy Science*, 77(2), 393-404. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(94\)76965-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)76965-4)

77. Hidalgo-Cantabrana, C., Delgado, S., Ruiz, L., Ruas-Madiedo, P., Sánchez, B., & Margolles, A. (2017). Bifidobacteria and Their Health-Promoting Effects. *Microbiology Spectrum*, 5(3), 5.3.21. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.BAD-0010-2016>
78. Gonzalez-Klein, Z., Cuevas-Zuñiga, B., Wangorsch, A., et al. (2021). The key to the allergenicity of lipid transfer protein (LTP) ligands: A structural characterization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1866(7), 158928. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2021.158928>
79. King, N. E., Rothenberg, M. E., & Zimmermann, N. (2004). Arginine in Asthma and Lung Inflammation. *The Journal of Nutrition*, 134(10), 2830S-2836S. <https://doi.org/10.1093/jn/134.10.2830S>
80. Kenyon, N. J., Last, M., Bratt, J. M., Kwan, V. W., O’Roark, E., & Linderholm, A. (2011). L-Arginine Supplementation and Metabolism in Asthma. *Pharmaceuticals*, 4(1), 187-201. <https://doi.org/10.3390/ph4010187>
81. Brosseau, C., Selle, A., Palmer, D. J., Prescott, S. L., Barbarot, S., & Bodinier, M. (2019). Prebiotics: Mechanisms and Preventive Effects in Allergy. *Nutrients*, 11(8), 1841. <https://doi.org/10.3390/nu11081841>
82. Sila, D. N., Van Buggenhout, S., Duvetter, T., et al. (2009). Pectins in Processed Fruits and Vegetables: Part II-Structure-Function Relationships. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8(2), 86-104. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2009.00071.x>
83. Brouns, F., Theuwissen, E., Adam, A., Bell, M., Berger, A., & Mensink, R. P. (2012). Cholesterol-lowering properties of different pectin types in mildly hyper-cholesterolemic men and women. *European Journal of Clinical Nutrition*, 66(5), 591-599. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2011.208>
84. Gómez, B., Gullón, B., Yáñez, R., et al. (2016). Prebiotic potential of pectins and pectic oligosaccharides derived from lemon peel wastes and sugar beet pulp: A comparative evaluation. *Journal of Functional Foods*, 20, 108-121. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.10.029>
85. Srivastava, P., & Malviya, R. (2011). Sources of pectin, extraction and its applications in pharmaceutical industry – An overview. *Indian Journal of Natural Products and Resources*. 2(1). 10-18 pp.
86. Cui, Y., Chen, J., & Zhang, S. (2023). The effect of degree of esterification of pectin on the interaction between pectin and wheat gluten protein. *Food Hydrocolloids*, 136, 108272. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.108272>
87. Wahlström, A., Sayin, S. I., Marschall, H.-U., & Bäckhed, F. (2016). Intestinal Crosstalk between Bile Acids and Microbiota and Its Impact on Host Metabolism. *Cell Metabolism*, 24(1), 41-50. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.05.005>
88. Li, J., Chen, Y., Li, R., Zhang, X., et al. (2023). Gut microbial metabolite hyodeoxycholic acid targets the TLR4/MD2 complex to attenuate inflammation and protect against sepsis. *Molecular Therapy*, 31(4), 1017-1032. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2023.01.018>

Anexos

ANEXO 1. Concentración obtenida de cada compuesto en suero.

- Ácidos grasos de cadena corta (SCFA)

Paciente	Grupo	[SCFA] t= 0 meses (µg/mL)						[SCFA] t= 2 meses (µg/mL)					
		Ác. Acético	Ác. Propionico	Ác. Butírico	Ác. Isobutírico	Ác. Valérico	Ác. Isovalérico	Ác. Acético	Ác. Propionico	Ác. Butírico	Ác. Isobutírico	Ác. Valérico	Ác. Isovalérico
6	Placebo	579.205	15.86	38.618	33.5	0.812	20.156	268.595	5.374	0.83	9.566	0.154	6.923
20	Placebo	330.923	14.431	36.046	38.498	0.994	48.066	401.254	20.918	40.539	26.353	1.083	23.784
25	Placebo	407.723	18.867	34.48	43.433	1.185	38.439	421.536	15.516	38.73	20.239	0.943	16.306
27	Placebo	422.291	12.957	35.868	19.396	0.711	15.29	398.916	24.337	27.711	33.203	1.027	33.568
34	Placebo	625.975	13.08	30.204	12.145	0.955	7.713	432.402	13.844	26.457	10.316	0.842	5.427
39	Placebo	497.011	17.027	26.852	13.63	0.961	11.746	453.92	12.359	46.553	11.162	1.552	6.666
44	Placebo	429.156	17.599	51.492	14.524	1.31	11.554	322.206	18.608	49.056	7.677	1.023	4.652
46	Placebo	356.473	15.062	41.658	14.956	1.405	11.072	387.255	17.002	45.582	10.968	1.347	6.09
14	Placebo	588.643	20.754	43.318	15.553	1.668	10.429	439.281	17.258	47.205	4.768	1.66	2.52
9	CU901	331.113	9.826	3.699	4.972	0.717	5.416	582.441	15.552	34.406	33.798	1.223	31.991
13	CU902	352.322	16.026	30.728	35.894	1.005	33.438	294.411	7.19	1.296	7.325	0.071	4.222
18	CU903	473.133	16.462	32.308	24.029	0.719	19.312	410.861	19.834	41.513	22.142	0.948	14.687
22	CU904	703.732	25.461	42.5	55.741	1.359	53.591	611.714	29.174	31.927	48.015	1.754	44.348
28	CU905	499.473	12.382	32.188	23.853	1.031	25.055	585.019	13.555	34.117	26.499	1.618	25.037
32	CU906	399.714	15.68	33.54	25.868	1.253	26.46	355.55	26.393	53.49	20.119	1.185	15.135
41	CU907	470.757	13.962	31.981	26.329	1.375	30.102	391.748	13.819	27.138	15.443	1.163	15.404
42	CU908	333.739	23.171	58.215	14.243	0.933	12.984	285.77	17.761	32.277	11.293	0.829	5.658
47	CU909	292.534	10.498	2.547	1.831	0.367	8.373	503.484	18.053	51.228	17.302	1.063	11.927
2	CU910	372.888	26.819	42.301	18.318	1.383	14.89	244.355	16.505	30.452	8.333	0.798	5.221
7	CU911	310.128	17.379	41.556	12.271	0.978	8.584	292.368	16.72	52.803	8.385	0.891	3.252
17	CU912	291.182	16.09	31.452	16.481	0.589	10.857	340.798	16.837	42.825	7.532	1.005	3.849
37	CU913	268.163	15.385	34.836	10.257	0.699	7.149	294.685	16.727	36.179	5.103	0.939	1.547
1	Herbapekt	326.763	7.188	2.292	2.719	0.993	3.976	431.582	5.392	0.992	5.051	0.65	4.995
4	Herbapekt	433.493	14.198	32.283	45.878	1.095	49.155	367.69	7.483	1.041	14.335	0.46	13.688
10	Herbapekt	532.705	17.383	28.765	47.928	1.179	44.702	286.95	4.49	0.361	1.442	0	2.152
11	Herbapekt	436.373	15.089	31.155	37.323	1.297	31.854	388.941	12.904	30.687	27.93	1.257	21.662
19	Herbapekt	604.651	21.77	44.894	33.472	1.481	26.212	617.645	24.34	45.668	62.462	1.645	50.521
38	Herbapekt	380.253	19.126	23.576	37.586	0.63	49.255	483.573	15.2	34.975	22.06	0.889	21.159
45	Herbapekt	522.326	15.899	43.406	18.402	1.769	18.258	381.836	8.301	1.736	20.654	0.645	12.959
8	Herbapekt	384.622	21.671	39.774	15.453	0.921	10.404	386.244	24.598	40.971	11.783	1.386	7.533
26	Herbapekt	650.61	17.706	40.784	16.096	1.345	16.04	486.812	15.915	40.096	9.427	1.144	4.786
29	Herbapekt	497.621	14.845	31.905	4.601	1.237	2.782	481.242	16.517	33.293	11.703	1.231	5.791
48	Herbapekt	276.161	21.675	54.681	8.908	1.262	6.224	413.166	16.167	54.637	3.439	1.039	1.698
51	Herbapekt	306.129	27.202	50.873	8.825	1.345	2.646	290.861	21.5	59.831	5.594	1.431	0.974
C1	Control	394.391	5.896	2.017	1.499	0.599	3.048						
C12	Control	570.848	14.36	28.873	15.51	1.378	10.389						
C13	Control	279.717	11.035	2.87	3.732	1.12	7.566						
C2	Control	327.721	17.005	39.369	14.227	1.116	11.199						
C3	Control	525.382	17.142	32.283	22.945	1.841	18.326						
C4	Control	497.325	21.794	48.285	17.485	1.487	16.297						
C7	Control	423.401	7.433	2.768	2.541	0.633	3.287						
C8	Control	268.101	8.686	3.113	2.485	0.378	4.064						
C9	Control	206.177	6.234	19.782	4.004	0	10.421						

[AIM] t= 2 meses (µg/mL)

Paciente	Grupo	Adenosina	Hipoxantina	Ác. Palmitoleico	Ác. Araquidónico	Ác. Laurico	LPI 16:0	Ác. Oleico	LPI 20:4	Cortisol	Hexanoilcar nitina	LPC 14:0	LPC 18:0	LPC 16:0	Oleamida	LPC 18:1	LPC 17:1	L-Arginina	Esfingalina 1P	Esfingosina
6	Placebo	5.8549E-05	24.3396022	1.54995369	0.58205683	0	0.00010752	59.8457799	0.25774155	0.32423822	0.00510488	0.4186206	11.5604827	1.29286199	0.00098251	7.12457614	0.02840724	6.52600335	3.21542574	0.41645324
20	Placebo	0	0	5.97539262	1.42671996	0.055842	0.00027927	211.362974	0.59071283	1.28708227	0.01149013	0.9767845	18.8500668	3.12539073	0.0013214	13.8665604	0.05283648	18.3922077	9.5848401	0.41644549
25	Placebo	0	967.836725	8.75474186	1.99939117	0.65822575	0.0002124	234.367971	0.57309942	0.64833291	0.02639006	0.48028037	23.5249923	2.60518647	0.00121889	15.9513982	0.04266929	17.9942452	0	0.41558491
27	Placebo	0	742.188498	2.97772575	1.04298455	0.95615025	7.8873E-05	192.347066	0.4721431	0.69180554	0.02095826	0.66980411	26.191182	3.1724172	0.0017104	33.5291948	0.05825607	10.8968228	3.42954265	0.41578374
34	Placebo	0	0	3.12106653	1.27214125	1.1285292	4.4716E-05	174.865264	0.40358553	0.69473696	0.00676939	0.59646892	14.3372414	1.88902099	0.00153645	12.0771137	0.04019008	12.5418886	4.78178124	0.41667687
39	Placebo	0	0	7.29617941	1.89115617	1.43671204	5.8493E-05	267.070557	0.37444688	0.83036604	0.01451936	1.25152511	28.1731764	3.45039499	0.00157322	18.8427122	0.06747487	17.7937908	0	0.41704651
44	Placebo	0	84.8328699	9.05618891	2.3318278	1.57070407	0.00015885	192.677921	0.45722856	0.95933565	0.01159388	1.32943434	34.0585132	3.75540128	0.00165344	20.4159055	0.07028857	11.0068936	0	0.41606677
46	Placebo	0	102.876202	0.67397892	0.72478517	1.3972509	0.00023298	53.0901129	0.59821283	0.80041591	0.00867213	1.8555784	37.616406	3.89153423	0.00192771	32.0766406	0.0874132	14.4936878	1.19703728	0.4167991
14	Placebo	0	0	4.36268934	1.70923894	1.00441058	0.00046197	204.120167	1.21856467	0.78453828	0.0111689	2.02932007	29.5734459	3.87494575	0.00097147	20.8581653	0.06634109	21.2735418	0	0.42111243
9	CU901	0	0	6.19105725	1.83809521	0.64554468	0.00046877	175.172856	0.602111	0.50350058	0.01423551	1.50069475	32.366109	3.75006594	0.00140942	23.6971536	0.08085907	15.3742477	0	0.41874106
13	CU902	0	0	5.61320126	2.20470093	1.22641581	0.00035037	237.951239	0.80477178	0.80969353	0.01218239	1.15622376	34.3407928	3.49222252	0.00148275	18.4012887	0.07027846	24.1211108	0	0.41909041
18	CU903	0	30.7418307	2.81295183	1.22515018	0.12039632	8.3409E-05	169.385279	0.42798722	0.77119806	0.01064173	1.11226917	38.4232209	4.12159286	0.00120357	28.7537244	0.0842119	21.3342001	5.21495309	0.41665505
22	CU904	0	1109.55827	8.12996656	1.38502394	1.71120319	1.5097E-05	245.187346	0.41247912	0.64205651	0.01409084	0.72300417	19.6052106	2.27537559	0.00197888	14.0288463	0.03895295	15.1387952	13.2944638	0.41654071
28	CU905	0	927.809294	11.0218889	1.69640648	1.83234824	9.5441E-05	261.735135	0.32309605	0.51170111	0.01211196	0.50144895	27.1057631	2.45723987	0.00182195	21.8235125	0.05376459	16.6833765	0	0.41583704
32	CU906	0	0	8.52816728	1.70078671	1.12002588	0.00014828	246.986894	0.65110348	0.50290881	0.01353469	1.02666048	23.7527162	2.45606489	0.00114083	11.1229585	0.04592089	24.5564931	0	0.4179391
41	CU907	0	0	4.50234827	1.36647565	1.00871439	0.00015122	163.966852	0.35662371	0.95117954	0.00846845	1.83080587	30.2963241	4.09963239	0.00162812	34.669943	0.10828143	10.2400339	0	0.41608124
42	CU908	0	44.6451637	3.29899485	0.95263457	0.68942589	7.3079E-05	232.202869	0.33780487	0.73508397	0.00757242	0.6571173	26.9603194	2.77215582	0.00175058	22.7687625	0.06337155	12.5139175	0	0.41663527
47	CU909	0	107.170513	9.11969746	1.72133583	1.9083525	2.9056E-05	254.015074	0.52787918	0.87564064	0.01955654	0.65261244	19.5819082	2.05022463	0.00144431	17.3806828	0.04219385	19.2160141	0	0.41607662
2	CU910	0	19.9846636	5.88511275	2.0903839	1.79088449	0.00037131	177.353732	0.71981833	0.84288796	0.00795007	1.61104252	38.4278186	3.94742371	0.00185725	22.1589958	0.10282206	12.7690994	0.47488343	0.41810525
7	CU911	0	0	1.09980047	0.60044003	0	0.00011247	73.7450187	0.33535068	0.29997019	0.00530081	0.33333141	10.4414104	1.07684013	0.00111496	5.80149279	0.02143019	7.28854688	1.51567986	0.41717334
17	CU912	0	0	3.72880915	1.38923859	1.33344403	0.00013285	150.339878	0.51351733	0.45142562	0.013812	0.72526877	26.5392526	2.58245104	0.00133358	21.0799002	0.06149417	16.2052042	0.21704502	0.41628128
37	CU913	0	356.466068	4.18468999	1.46356313	0.07896826	5.8236E-05	158.451085	0.57013733	0.80825965	0.01780687	1.11762249	20.2414418	2.54857758	0.00103015	14.4279741	0.05446247	23.5221303	0	0.41737806
1	Herbapekt	0	0	1.0506592	0.46964405	0.70137118	0.00010221	53.9765528	0.25239322	0.33552637	0.00516878	0.34985221	11.1912384	1.27084344	0.00143852	10.7456263	0.03293255	6.8927118	0	0.41606681
4	Herbapekt	4.5708E-06	15.2024456	2.46163914	0.56566753	0.98334622	8.5188E-05	111.259429	0.27957226	0.63468182	0.01418732	0.44486489	9.52528783	1.39067383	0.00163209	6.37738269	0.02908367	4.041385	0	0.41696086
10	Herbapekt	0	0	7.73439006	1.72546429	1.77415472	0.00047067	196.51701	0.36728569	0.75388737	0.00795559	1.34751621	26.766103	3.30813084	0.00142906	22.0267563	0.07813173	12.6323442	0	0.41754762
11	Herbapekt	0	0	4.75483705	2.47817172	9.4076421	0.00033568	219.341926	0.7261594	0.82029584	0.01576806	2.86557189	60.2299513	6.7778707	0.00171368	33.8652946	0.1161957	16.0703576	0	0.42293017
19	Herbapekt	0	0	7.04902439	1.6520829	0.76325163	0.00033401	198.932207	0.72836934	0.97989783	0.01839478	0.8763078	19.2838065	2.61347468	0.0011162	11.0718785	0.04576125	21.8481173	0	0.41671544
38	Herbapekt	0	1.12322843	1.16850567	1.06367335	1.80399668	0.00013536	78.6427396	0.45212212	1.39702296	0.00865122	1.55680529	17.6906828	2.45049588	0.0013435	11.3360173	0.03447854	18.2191044	0	0.41650177
45	Herbapekt	6.8132E-06	1494.55858	3.90618148	1.23995116	1.1740982	0.00019076	147.720145	0.61439313	0.64952426	0.0079695	1.19942188	19.1196421	2.50172702	0.00157489	14.3020086	0.05215348	14.6444643	0	0.41648708
8	Herbapekt	0	0	2.04651081	0.3191553	1.22695862	7.5687E-05	66.8312821	0.19598548	0.32899634	0.00658715	0.62886193	10.5266884	1.339597	0.00181509	8.98035911	0.03828027	2.89781673	0	0.41619227
26	Herbapekt	0	1826.30201	8.0480236	1.58957069	1.30333618	0.00018547	226.283649	0.34209045	1.20223577	0.01236055	0.66466027	10.826226	1.82598531	0.00179276	11.2434715	0.03890215	17.5701278	0	0.41731141
29	Herbapekt	0	488.88549	10.1538206	1.86003003	0.80240651	0.00019367	341.31298	0.62273401	0.8234965	0.01742942	0.61967377	30.0600054	2.98853423	0.0014223	39.4528736	0.10814858	15.1208806	2.37981516	0.41716206
48	Herbapekt	0	68.5718606	6.7199717	0.94180709	1.0748541	6.2973E-05	184.719606	0.7365132	0.67524718	0.01046487	1.01778563	29.3015057	2.97331365	0.00104087	21.1272594	0.08532402	14.1333199	0	0.41747378
51	Herbapekt	0	401.907558	1.72344152	1.11993808	0.97190496	3.1452E-05	142.003232	0.61818694	0.69509324	0.00912518	0.88242091	20.0124643	2.81664073	0.00160844	19.8519758	0.05849189	16.7466174	0	0.41695825

[AIM] t= 2 meses (µg/mL)																		
Paciente	Grupo	Esfingosina 1P	Leucina-Isoleucina	Ác. Láctico	LPC 17:0	L-Carnitina	LPC 19:0	LPE 18:0	Urea	Prolina	Creatina	Betaina	Fenilalanina	Ceatinina	Propionilcarnitina	Ác. Piruvico	Ác. Hípúrico	Bilirrubina
6	Placebo	0.92947086	17.550647	176.472744	0.39782532	9.8573736	0.14447555	0.68252929	182.932945	9.5753373	23.0195107	9.81307548	5.37521165	63.9397	0.09182545	0.90093876	0.34737368	1.7829E-05
20	Placebo	2.3836776	36.2064752	470.234577	1.01332055	14.5607303	0.119873	1.54189191	184.467031	20.1677026	27.1046755	10.9166248	15.1113446	100.501968	0.15760294	12.5624057	0.29459368	0.00020483
25	Placebo	1.07905693	32.6226399	177.52413	0.88058891	15.0199472	0.19015988	1.71693478	192.095123	25.0381549	40.7910504	12.8509036	11.4080619	103.549726	0.15531402	8.42815785	1.09020035	0.00064677
27	Placebo	1.49492974	27.0600968	174.247157	0.81816687	17.772049	0.1710895	2.15604425	192.161169	42.7527956	23.5440008	19.4763114	9.35593153	106.003735	0.17541307	13.6044996	0.61355024	5.4204E-05
34	Placebo	2.05668494	22.2391339	204.031835	0.53593293	15.9078141	0.05416507	1.19488132	202.940885	14.9031399	53.6379689	12.8336191	10.8991636	105.150544	0.16342041	5.66034778	1.57433237	0.00011671
39	Placebo	1.91572342	42.0313929	255.40629	0.96882568	22.063575	0.17291092	1.66913564	208.616072	21.3093666	27.8845159	17.3553764	17.7606652	133.025451	0.20076026	13.4419213	0.89337469	0.00134748
44	Placebo	1.88704601	24.6911752	212.289596	1.17434964	18.0684328	0.17532417	2.61869433	199.520123	49.9522102	25.3504467	15.5829299	12.4326491	103.721403	0.21377336	2.69657441	1.62646119	0.00013503
46	Placebo	2.21600633	45.027908	332.749303	1.10027838	18.1124182	0.26473359	2.41541646	195.986277	112.167706	20.9587021	20.0646809	13.0849385	109.470004	0.27294187	11.7825297	0.59991241	2.4468E-05
14	Placebo	2.06808074	41.2867728	344.017434	0.81864526	16.6720901	0.18458194	2.754109	184.181518	34.7390914	38.4998455	9.68833905	14.5684996	105.249184	0.1550963	4.02920563	0.81635257	0.00045112
9	CU901	1.38180334	34.1102427	258.537592	1.31496033	19.444759	0.15269239	1.58194063	202.982936	38.3806494	30.6592928	18.4437275	14.3180089	118.087119	0.27705001	5.08830798	1.59828241	0.00010218
13	CU902	2.47079864	60.8382661	272.987119	0.99147912	22.1069566	0.19571685	1.95438995	212.016841	37.4502544	38.7448425	19.4940826	17.9542256	134.649476	0.24433956	4.83970621	0.54573972	9.1657E-05
18	CU903	1.84459828	48.9793407	230.033162	1.40340724	16.5759775	0.1375699	2.13241361	212.699062	48.6909633	42.4750738	17.5827491	17.3333423	143.981928	0.19941422	7.4767992	0.77169583	0.00028657
22	CU904	0.70125194	26.601515	105.972617	0.69693543	13.7120142	0.1360228	1.23249858	192.170662	34.8819442	14.9702029	20.9076083	9.81655664	103.65045	0.13520977	5.85004728	6.61337242	0.00018063
28	CU905	1.00463151	31.3665672	139.631969	0.97507225	13.3673988	0.20165766	1.44823461	197.766204	19.3583033	30.0962625	20.8372862	14.5670088	112.121738	0.12891577	9.16465462	0.4439869	0.00032532
32	CU906	2.78156743	41.846138	392.753536	0.83818139	16.0139954	0.12724298	1.71874932	180.91689	33.9776348	29.279106	19.140516	17.6899865	103.18016	0.15635503	15.877206	0.91553206	0.00021139
41	CU907	1.90288526	32.617298	391.136951	1.10256201	21.4710487	0.17558054	2.42481492	196.962649	35.8160038	47.148268	17.7297435	18.6219682	116.546915	0.18393218	10.8480777	0.82860042	0.00045771
42	CU908	2.08922704	30.8275406	264.936807	0.91392835	10.5295951	0.13556366	1.5000354	198.494973	13.5909741	33.4079489	18.1899929	13.4194769	102.563169	0.11750636	6.6639895	1.33479228	0.00021961
47	CU909	1.82352427	28.3800312	196.498181	0.68042737	17.555926	0.19504704	1.21776007	191.316706	28.4651025	40.7324925	19.022186	11.7999368	100.725036	0.15077957	13.8491323	0.35636459	0.00057465
2	CU910	2.31464394	35.6524321	318.378133	1.64560287	16.1302029	0.13254105	2.00438533	208.523294	33.1724267	52.0338085	15.755627	16.0962749	99.7406199	0.20406095	4.08395773	1.31471408	5.778E-05
7	CU911	0.65285777	17.0942555	89.561752	0.41319594	7.55921688	0.11278433	0.4911498	175.287191	5.19884795	20.3073552	6.53514068	4.66801123	62.2132005	0.0889369	0.79895008	0.24727614	1.7754E-05
17	CU912	1.75380673	29.4694955	263.079689	0.80045243	14.808283	0.16348442	1.86710937	192.178017	27.3669694	31.0953972	16.4916919	10.7660694	96.8204018	0.14245779	4.45898603	0.43076419	9.0285E-05
37	CU913	1.45767576	42.6394216	193.719783	0.88367246	16.1369214	0.15988865	1.63248761	195.12063	24.9530533	24.886934	14.0142911	15.690619	107.548084	0.19928288	10.1738386	1.03444823	0.00043378
1	Herbapekt	0.47529553	12.76543	107.135825	0.44826412	8.06759284	0.19916926	0.88948433	187.082173	9.43563069	22.7562655	11.6280691	3.82179319	62.1085787	0.08921486	1.6617237	0.4210564	1.028E-05
4	Herbapekt	0.78871218	14.2828889	147.189643	0.32740895	8.17623987	0.1225332	0.84695169	179.853066	3.62321514	30.4978188	5.58043804	7.1938267	63.4859417	0.10589942	0.98947601	0.37286253	7.852E-07
10	Herbapekt	2.53817883	31.4582719	309.577278	1.02339453	17.5014164	0.23266924	2.03501942	200.333746	46.9290128	32.3097236	16.3056266	16.2964979	101.573795	0.17172022	4.12675415	0.68850603	0.00011225
11	Herbapekt	1.96689681	49.733848	275.918028	1.7627498	21.0991465	0.14908699	2.99819894	217.676999	38.8016624	27.2397306	21.5136559	18.2083964	136.478962	0.16271576	3.56772485	0.70712965	9.2502E-05
19	Herbapekt	1.70666836	32.5061424	442.057089	0.76641523	17.0651135	0.13433448	1.48818471	190.181308	18.2183809	38.2498298	9.23297787	14.2184543	106.69667	0.17377882	12.679307	1.03407211	0.00020652
38	Herbapekt	1.90684401	32.5557624	209.064933	0.4811274	15.877569	0.07457277	1.40775625	198.379122	30.8642147	66.6554769	9.72121135	12.8508181	110.757838	0.1359988	9.6465472	0.61941204	3.2734E-05
45	Herbapekt	1.28255369	35.6058554	165.531185	0.7476745	14.5600874	0.11731975	1.23043536	204.022618	24.3688625	44.312707	14.64695	12.0549999	110.988155	0.18641306	5.8110795	0.55112709	8.2309E-05
8	Herbapekt	1.2446231	10.957617	52.1174281	0.35885124	9.07260525	0.187658	0.86125301	178.509883	3.52907331	15.228026	7.54572922	2.05196454	54.8487266	0.0774316	4.78552102	0.26814941	1.4955E-06
26	Herbapekt	1.7119469	30.2904582	159.58929	0.53056146	13.3717805	0.11907466	1.36808305	205.221592	24.8956332	49.9825522	13.8802987	13.3223456	104.483169	0.14778113	9.81771922	0.4526617	4.7606E-05
29	Herbapekt	1.44611152	46.3744276	163.236103	1.12826193	21.1579157	0.13110201	1.87112305	210.502925	26.2513925	51.4429681	18.6000716	15.2985614	131.015303	0.25641403	13.5977502	0.64416422	0.00017309
48	Herbapekt	1.97340145	55.0100808	342.106312	1.06424951	18.554223	0.10417082	1.78674583	198.829582	96.744824	49.8286095	14.4594846	21.4880733	106.427912	0.21700826	6.93228062	0.65211734	0.00019958
51	Herbapekt	1.53876246	38.1793385	234.759836	0.83856357	21.5031492	0.08436015	1.17092392	201.228951	36.1849053	39.2050842	21.9841588	14.9036466	112.988047	0.21162022	2.86243489	0.46251963	0.00035479

ANEXO 2. Resultados del análisis de comparación de dos muestras.

- Ácidos grasos de cadena corta (SCFA)

Trabajando con nopar: 8						
Datos: a t = 0 meses			Datos: La diferencia (delta)			
Alergicos (Placebo+CU901+Herbapekt) vs Controles			Tolerantes (CU901 + Herbapekt) vs No Tolerantes (CU901+Herbapekt)			
	p valor	pBH	Proceso	p valor	pBH	Proceso
Ác. Acético	0.331875968	0.398251161	T var igu'	0.712880664	0.855456797	No paramétrico'
Ác. Propiónico	0.010257873	0.032083742	T var igu'	0.68261816	0.855456797	T var igu'
Ác. Butírico	0.029299775	0.058599551	No paramétrico'	0.392703843	0.855456797	T var dif'
Ác. Isobutírico	0.010694581	0.032083742	No paramétrico'	0.977417357	0.977417357	No paramétrico'
Ác. Valérico	0.518110405	0.518110405	T var dif'	0.57020564	0.855456797	T var igu'
Ác. Isovalérico	0.040854472	0.061281709	No paramétrico'	0.438577166	0.855456797	T var dif'

- Ácidos biliares (BA)

Trabajando con nopar: 8						
Datos: a t = 0 meses			Datos: La diferencia (delta)			
Alergicos (Placebo+CU901+Herbapekt) vs Controles			Tolerantes (CU901 + Herbapekt) vs No Tolerantes (CU901+Herbapekt)			
	p valor	pBH	Proceso	p valor	pBH	Proceso
GUDCA	0.437506308	0.844043527	No paramétrico'	0.411252602	0.902143944	No paramétrico'
GCA	0.580656881	0.844043527	No paramétrico'	0.671065907	0.902143944	No paramétrico'
TCDC	0.501683367	0.844043527	No paramétrico'	0.461570473	0.902143944	No paramétrico'
GDCDC	0.686914985	0.844043527	No paramétrico'	0.887447605	0.933292029	No paramétrico'
TDCA	0.822626547	0.934802895	No paramétrico'	0.650047115	0.902143944	No paramétrico'
GDCA	0.708996562	0.844043527	No paramétrico'	0.909815488	0.933292029	No paramétrico'
CA	0.324387344	0.844043527	No paramétrico'	0.41152281	0.902143944	No paramétrico'
3b-DCA	0.288844088	0.844043527	No paramétrico'	0.670767667	0.902143944	No paramétrico'
GLCA	0.964092986	1	No paramétrico'	0.277691697	0.902143944	No paramétrico'
5-cholenic	0.233470915	0.844043527	No paramétrico'	0.093605706	0.902143944	No paramétrico'
CDCA	0.44647338	0.844043527	No paramétrico'	0.41152281	0.902143944	No paramétrico'
LCA	0.880973995	0.957580429	No paramétrico'	0.933292029	0.933292029	T var igu'
TwMCA	0.549244259	0.844043527	No paramétrico'	0.33349594	0.902143944	No paramétrico'
THCA	0.665780015	0.844043527	No paramétrico'	0.685629398	0.902143944	No paramétrico'
GHCA	0.642571231	0.844043527	No paramétrico'	0.799351057	0.911711874	T var igu'
TUDCA	1	1	No paramétrico'	0.215043388	0.902143944	No paramétrico'
TCA	0.492209249	0.844043527	No paramétrico'	0.670767667	0.902143944	No paramétrico'
3-DHCA	0.673481116	0.844043527	No paramétrico'	0.587472467	0.902143944	T var igu'
HCA	0.436690973	0.844043527	No paramétrico'	0.608795613	0.902143944	No paramétrico'
UDCA	0.045402868	0.844043527	No paramétrico'	0.444433342	0.902143944	No paramétrico'
7-KLCA	0.344134672	0.844043527	No paramétrico'	0.62797129	0.902143944	No paramétrico'
HDCA	0.346883287	0.844043527	No paramétrico'	0.478809803	0.902143944	No paramétrico'
TLCA	0.342174381	0.844043527	No paramétrico'	0.739724158	0.911711874	No paramétrico'
DCA	0.244281086	0.844043527	No paramétrico'	0.802306449	0.911711874	T var igu'
iLCA	0.639281308	0.844043527	No paramétrico'	0.406971397	0.902143944	No paramétrico'

CA: Ácido cólico; GCA: Ácido glicólico; 5-cholenic: Ácido 5-colánico-3β-ol; DCA: Ácido desoxicólico; GDCA: Ácido glicodesoxicólico; CDCA: Ácido quenodesoxicólico; GUDCA: Ácido glicoursodesoxicólico; TCA: Ácido taurocólico; TDCA: Ácido taurodesoxicólico; TCDCA: Ácido tauroquenodesoxicólico; TUDCA: Ácido taurooursodesoxicólico; LCA: Ácido litocólico; 3-DHCA: Ácido-3-dehidrocólico; GLCA: Ácido glicoliticólico; TLCA: Ácido taurolitocólico; iLCA: Ácido isolitocólico; KLCA: Ácido 7-cetoliticólico; GHCA: Ácido glicohiocólico; HDCA: Ácido hiodesoxicólico; 3b-DCA: 3β-Ácido 5β-colánico-12α-diol; TwMCA: Ácido tauro-ω-muricólico; HCA: Ácido hioicólico; THCA: Ácido taurohioicólico; UDCA: Ácido ursodesoxicólico; GCDCA: Ácido glicokenodesoxicólico.

- Metabolitos relacionados con inflamación alérgica (AIM)

Trabajando con nopar: 8						
Datos: a t= 0 meses			Datos: La diferencia (delta)			
Alergicos (Placebo+CU901+Herbapekt) vs Controles			Tolerantes (CU901 + Herbapekt) vs No Tolerantes (CU901+Herbapekt)			
	p valor	pBH	Proceso	p valor	pBH	Proceso
Adenosine'	0.565633263	0.746515437	No paramétrico'	0.351857931	0.894833945	No paramétrico'
Hypoxanthine'	0.377734228	0.746515437	No paramétrico'	0.118787394	0.894833945	No paramétrico'
Palmitoleic acid'	0.020684702	0.248216427	No paramétrico'	0.87543026	0.96812466	T var igu'
Arachidonic acid'	0.005753623	0.207130424	No paramétrico'	0.543504743	0.894833945	T var igu'
Lauric acid'	0.940379035	0.996629215	No paramétrico'	0.630361754	0.894833945	No paramétrico'
LPI 16:0'	0.117035529	0.499304462	No paramétrico'	0.712880664	0.916560853	No paramétrico'
Oleic acid'	0.319511089	0.746515437	T var dif'	0.836702137	0.96812466	T var igu'
LPI 20:4'	0.378482861	0.746515437	No paramétrico'	0.977417357	0.977417357	No paramétrico'
Cortisol'	0.156170794	0.562214859	No paramétrico'	0.074531571	0.894833945	No paramétrico'
Hexanoylcarnitine'	0.215366246	0.596398836	No paramétrico'	0.480367852	0.894833945	T var igu'
LPC 14:0'	0.601359658	0.746515437	No paramétrico'	0.630361754	0.894833945	No paramétrico'
LPC 18:0'	0.103678933	0.499304462	T var igu'	0.218633585	0.894833945	T var igu'
LPC 16:0'	0.06464485	0.465442918	T var igu'	0.191174971	0.894833945	T var igu'
Oleamide'	0.601359658	0.746515437	No paramétrico'	0.44940094	0.894833945	T var igu'
LPC 18:1'	0.560462687	0.746515437	No paramétrico'	0.932324373	0.977417357	No paramétrico'
LPC 17:1'	0.394857659	0.746515437	No paramétrico'	0.823327972	0.96812466	T var igu'
L-Arginine'	0.411653689	0.746515437	No paramétrico'	0.463647091	0.894833945	T var igu'
Sphinganine 1P'	0.96894507	0.996629215	No paramétrico'	0.339440479	0.894833945	No paramétrico'
Sphingosine'	0.18401094	0.582190029	No paramétrico'	0.165429759	0.894833945	No paramétrico'
Sphingosine 1P'	0.124826116	0.499304462	T var igu'	0.650862611	0.894833945	T var igu'
Leucine-Isoleucine'	0.940504983	0.996629215	No paramétrico'	0.440536023	0.894833945	T var igu'
Lactic acid'	0.627027435	0.752432922	T var igu'	0.416724213	0.894833945	T var igu'
LPC 17:0'	0.916781098	0.996629215	No paramétrico'	0.88117752	0.96812466	T var igu'
L-Carnitine'	0.117035529	0.499304462	No paramétrico'	0.977417357	0.977417357	No paramétrico'
LPC 19:0'	0.429315444	0.746515437	T var igu'	0.03319935	0.894833945	T var dif'
LPE 18:0'	1	1	No paramétrico'	0.887447605	0.96812466	No paramétrico'
Urea'	0.446490543	0.746515437	No paramétrico'	0.552214222	0.894833945	No paramétrico'
Proline'	0.601359658	0.746515437	No paramétrico'	0.601381358	0.894833945	T var igu'
Creatine'	0.580742607	0.746515437	No paramétrico'	0.671125458	0.894833945	No paramétrico'
Betaine'	0.583351973	0.746515437	T var igu'	0.189946456	0.894833945	T var igu'
Phenylalanine'	0.520962438	0.746515437	No paramétrico'	0.476119177	0.894833945	T var igu'
Ceatinine'	0.964281784	0.996629215	No paramétrico'	0.515008211	0.894833945	No paramétrico'
Propionylcarnitine'	0.560462687	0.746515437	No paramétrico'	0.479148257	0.894833945	No paramétrico'
Pyruvic acid'	0.040854472	0.367690252	No paramétrico'	0.380207137	0.894833945	No paramétrico'
Hippuric acid'	0.016249951	0.248216427	No paramétrico'	0.630361754	0.894833945	No paramétrico'
Bilirubin	0.194063343	0.582190029	No paramétrico'	0.269606105	0.894833945	No paramétrico'

ANEXO 3. Resultados del análisis ANOVA de medias repetidas de 1 factor.

- Ácidos grasos de cadena corta (SCFA)

a) Variaciones existentes entre los tratamientos a t = 0 meses y t = 2 meses

	COMPARATIVA GRUPO TIEMPO					
	t = 0 meses			t = 2 meses		
	Placebo vs CU901	Placebo vs Herbapekt	CU901 vs Herbapekt	Placebo vs CU901	Placebo vs Herbapekt	CU901 vs Herbapekt
Ác. Acético	0.128597609	0.630835564	0.256265481	0.861320535	0.561338644	0.651587424
Ác. Propiónico	0.740585732	0.433503598	0.6121221	0.592926252	0.519027684	0.201957394
Ác. Butírico	0.339081111	0.697403621	0.540143895	0.971288458	0.3609696	0.297037734
Ác. Isobutírico	0.743818187	0.968935649	0.69159729	0.626503053	0.814599353	0.78747488
Ác. Valérico	0.249744935	0.460294436	0.044519103	0.865304227	0.650917435	0.752596141
Ác. Isovalérico	0.962048298	0.727969409	0.740134965	0.686656279	0.921861603	0.74200706

b) Cambios en el tiempo (0 y 2 meses) para un mismo tratamiento

	COMPARATIVA TIEMPO GRUPO		
	Placebo	CU901	Herbapekt
	0 vs 2 meses	0 vs 2 meses	0 vs 2 meses
Ác. Acético	0.980547033	0.665712681	0.046837288
Ác. Propiónico	0.980547033	0.665712681	0.046837288
Ác. Butírico	0.778796453	0.447496728	0.224907919
Ác. Isobutírico	0.129314893	0.486248301	0.134385678
Ác. Valérico	0.792390677	0.52418925	0.094368587
Ác. Isovalérico	0.132197983	0.175034506	0.033896513

- Ácidos biliares (BA)

a) Variaciones existentes entre los grupos a t = 0 meses y t = 2 meses

	COMPARATIVA GRUPO TIEMPO					
	t = 0 meses			t = 2 meses		
	Placebo vs CU901	Placebo vs Herbapekt	CU901 vs Herbapekt	Placebo vs CU901	Placebo vs Herbapekt	CU901 vs Herbapekt
GUDCA	0.566066613	0.503194077	0.906977611	0.451469378	0.597838317	0.812720307
GCA	0.173632117	0.433216239	0.530794519	0.215287525	0.484331421	0.559077338
TCDC	0.065722368	0.252047747	0.440805864	0.136148487	0.776154656	0.189534131
GCDCA	0.267445013	0.137814093	0.652471684	0.30680756	0.85578892	0.362793144
TDCA	0.094242271	0.150039612	0.808701308	0.219476507	0.880740713	0.242722753
GDCA	0.260114502	0.063273468	0.385981281	0.477260631	0.792417541	0.629756134
CA	0.769680348	0.843330652	0.593411924	0.695006509	0.757536805	0.932340782
3b-DCA	0.402216806	0.372550224	0.064543271	0.210926471	0.642947935	0.066847804
GLCA	0.673343852	0.453481728	0.204117386	0.52629692	0.69377186	0.799297962
5-cholenic	0.358540533	0.242516648	0.764017304	0.343489056	0.723134576	0.161058822
CDC	0.20859842	0.982563958	0.166953246	0.169878484	0.294209179	0.731014401
LCA	0.140130712	0.811729178	0.178848077	0.511434259	0.680202757	0.795673658
TwMCA	0.153303273	0.975562658	0.130901145	0.598187131	0.427629948	0.153752875
THCA	0.114334897	0.649510551	0.030619365	0.375786847	0.569849862	0.11839693
GHCA	0.615239031	0.832774726	0.754552776	0.713131347	0.755701191	0.955583017
TUDCA	0.156611076	0.669948963	0.280411571	0.29399715	0.679275054	0.491275478
TCA	0.150730012	0.85276853	0.174479301	0.220019138	0.708190285	0.354575967
3-DHCA	0.293455366	0.492424831	0.69743688	0.321157989	0.426634953	0.839091337
HCA	0.44717787	0.80502358	0.579687078	0.521864313	0.781345119	0.696775198
UDCA	0.928175036	0.64113996	0.541781178	0.479674403	0.450700793	0.947445787
7-KLCA	0.426012214	0.980932151	0.374896451	0.368124988	0.336724838	0.932389233
HDCA	0.650421667	0.686717002	0.962625089	0.42482908	0.975263258	0.369604179
TLCA	0.711133752	0.310234816	0.469974757	0.387422684	0.324757115	0.879693229
DCA	0.978473172	0.982270222	0.957169375	0.56894969	0.429949514	0.798662623
ILCA	0.583465551	0.826253379	0.40509021	0.012724596	0.455002251	0.050891948

b) Cambios en el tiempo (0 y 2 meses) para un mismo tratamiento

	COMPARATIVA TIEMPO GRUPO		
	Placebo	CU901	Herbapekt
	0 vs 2 meses	0 vs 2 meses	0 vs 2 meses
GCA	0.077480424	0.324260017	0.16200438
TCDCA	0.226837161	0.597910673	0.669996917
GCDCA	0.087342234	0.250258618	0.884300254
TDCA	0.034735992	0.440386909	0.823447648
GDCA	0.043300488	0.235404995	0.608656307
CA	0.836151462	0.813537418	0.313820079
3b-DCA	0.793892507	0.142049491	0.699074447
GLCA	0.366610734	0.290108303	0.64393516
5-cholenic	0.154765495	0.234091935	0.754292509
CDCA	0.678978245	0.783608554	0.150151842
LCA	0.525069981	0.969770053	0.274100009
TwMCA	0.058233331	0.772078321	0.368598089
THCA	0.830803462	0.929145464	0.781399343
GHCA	0.208559318	0.278953294	0.154409006
TUDCA	0.418407889	0.82155877	0.350964835
TCA	0.594130832	0.717981476	0.290744807
3-DHCA	0.33401568	0.467934593	0.315691918
HCA	0.618561137	0.816258819	0.569483012
UDCA	0.235053233	0.969530386	0.233261444
7-KLCA	0.924276912	1	0.134867832
HDCA	0.21602148	0.176079122	0.572968815
TLCA	0.353874336	0.201421922	0.787650989
DCA	0.2573811	0.64261637	0.982919458
iLCA	0.283676719	0.033259574	0.864719737

CA: Ácido cólico; GCA: Ácido glicólico; 5-cholenic: Ácido 5-colánico-3 β -ol; DCA: Ácido desoxicólico; GDCA: Ácido glicodesoxicólico; CDCA: Ácido quenodesoxicólico; GUDCA: Ácido glicoursodesoxicólico; TCA: Ácido taurocólico; TDCA: Ácido taurodesoxicólico; TCDCA: Ácido tauroquenodesoxicólico; TUDCA: Ácido tauroursodesoxicólico; LCA: Ácido litocólico; 3-DHCA: Ácido-3-dehidrocólico; GLCA: Ácido glicoliticólico; TLCA: Ácido taurolitocólico; iLCA: Ácido isoliticólico; KLCA: Ácido 7-cetoliticólico; GHCA: Ácido glicohiocólico; HDCA: Ácido hiodesoxicólico; 3b-DCA: 3 β -Ácido 5 β -colánico-12 α -diol; TwMCA: Ácido tauro- ω -muricólico; HCA: Ácido hiocólico; THCA: Ácido taurohiocólico; UDCA: Ácido ursodesoxicólico; GCDCA: Ácido glicoquenodesoxicólico.

- **Metabolitos relacionados con inflamación alérgica (AIM)**

a) Variaciones existentes entre los grupos a t = 0 meses y t = 2 meses

	COMPARATIVA GRUPO TIEMPO					
	t = 0 meses			t = 2 meses		
	Placebo vs CU901	Placebo vs Herbapekt	CU901 vs Herbapekt	Placebo vs CU901	Placebo vs Herbapekt	CU901 vs Herbapekt
Adenosine'	0.322099446	0.823374828	0.406244302	0.143896427	0.217277979	0.814337798
Hypoxanthine'	0.912404039	0.375612275	0.390953448	0.947782697	0.503005611	0.419609287
Palmitoleic acid'	0.970528947	0.669242654	0.609919777	0.524411565	0.923387311	0.427399409
Arachidonic acid'	0.793127335	0.430793371	0.557641433	0.779827461	0.444408646	0.255406725
Lauric acid'	0.994099503	0.399013018	0.349426377	0.852841124	0.181497672	0.202165956
LPI 16:0'	0.283261084	0.919740511	0.292468764	0.727386056	0.974893536	0.680280927
Oleic acid'	0.821961274	0.861220547	0.959141863	0.532273862	0.685262793	0.265151862
LPI 20:4'	0.246801851	0.127584558	0.658758793	0.636684498	0.555267247	0.889432052
Cortisol'	0.066523565	0.996367891	0.047361167	0.331148145	0.962193232	0.317122985
Hexanoylcarnitine'	0.676143388	0.566390791	0.857075078	0.694274447	0.425715605	0.649180904
LPC 14:0'	0.193095145	0.340680841	0.710110157	0.777084702	0.907843876	0.857696286
LPC 18:0'	0.81106239	0.102916598	0.122005617	0.686026231	0.554013518	0.279365848
LPC 16:0'	0.198490684	0.126594167	0.761703028	0.823112082	0.532418457	0.654933833
Oleamide'	0.820429533	0.646301084	0.453917061	0.734184078	0.641609545	0.884381054
LPC 18:1'	0.17421949	0.161216614	0.94102551	0.941440027	0.634015737	0.546400752
LPC 17:1'	0.979591269	0.577132861	0.557619001	0.555784191	0.810385159	0.707582297
L-Arginine'	0.710453313	0.410187239	0.194706328	0.336223816	0.635350622	0.122971747
Sphinganine 1P'	0.70422151	0.882565503	0.803490956	0.493400855	0.086613167	0.239776094
Sphingosine'	0.590938073	0.467911625	0.826367747	0.731767408	0.48574361	0.690079192
Sphingosine 1P'	0.800521508	0.533959647	0.34009245	0.768769548	0.372755279	0.504701206
Leucine-Isoleucine'	0.761779534	0.873147834	0.614629823	0.525566525	0.940602563	0.54453259
Lactic acid'	0.047106968	0.004515574	0.265791896	0.639476107	0.343309129	0.587864593
LPC 17:0'	0.461424416	0.389539184	0.086714704	0.438881497	0.664598419	0.192691107
L-Carnitine'	0.40355196	0.584413161	0.759759655	0.726648023	0.615131841	0.860414309
LPC 19:0'	0.658305603	0.948231714	0.582335197	0.666918184	0.188935606	0.320806877
LPE 18:0'	0.054716261	0.123967424	0.676716537	0.375965385	0.170741841	0.571639508
Urea'	0.046628667	0.011819643	0.488013948	0.528487199	0.409034072	0.818550662
Proline'	0.634517133	0.646244291	0.992472963	0.461375792	0.508801118	0.943367397
Creatine'	0.143615605	0.119912484	0.892476232	0.660424107	0.154943801	0.26908631
Betaine'	0.563917893	0.938674201	0.478584156	0.132358942	0.787498678	0.05738982
Phenylalaine'	0.581757253	0.894466021	0.651817513	0.362542744	0.836348604	0.446197208
Ceatinine'	0.848532083	0.989520017	0.824839566	0.642330122	0.737696427	0.385477796
Propionylcarnitine'	0.995207057	0.588403383	0.547019353	0.832911793	0.523720783	0.634641298
Pyruvic acid'	0.969744229	0.452843954	0.386242418	0.797896067	0.37545044	0.482542551
Hippuric acid'	0.242708749	0.954009884	0.185494982	0.404711596	0.52881404	0.116074967
Bilirubin	0.689991586	0.214206149	0.076431149	0.377444631	0.054608065	0.227821603

b) Cambios en el tiempo (0 y 2 meses) para un mismo tratamiento

	COMPARATIVA TIEMPO GRUPO		
	Placebo	CU901	Herbapekt
	0 vs 2 meses	0 vs 2 meses	0 vs 2 meses
Adenosine'	0.935072819	0.126204476	0.743869131
Hypoxanthine'	0.527310295	0.540567799	0.263564323
Palmitoleic acid'	0.756647368	0.230618021	0.809337721
Arachidonic acid'	0.25731688	0.499810425	0.174403732
Lauric acid'	0.922614112	0.626987859	0.046176879
LPI 16:0'	0.206220858	0.743860075	0.197457746
Oleic acid'	0.775906083	0.51179786	0.505658021
LPI 20:4'	0.233114574	0.888652782	0.708848506
Cortisol'	0.351884279	0.515998125	0.254133673
Hexanoylcarnitine'	0.963650704	0.977268123	0.732532071
LPC 14:0'	0.252827954	0.922656003	0.899142385
LPC 18:0'	0.134728536	0.371569871	0.543322952
LPC 16:0'	0.184793783	0.516759585	0.337353914
Oleamide'	0.279708054	0.028494387	0.338743059
LPC 18:1'	0.081269417	0.995877131	0.407390442
LPC 17:1'	0.256553345	0.737084299	0.773599777
L-Arginine'	0.042426378	0.158179465	0.047484307
Sphinganine 1P'	0.307342629	0.451454182	0.372821111
Sphingosine'	0.254278515	0.983984267	0.392292081
Sphingosine 1P'	0.48457896	0.365677364	0.023390181
Leucine-Isoleucine'	0.279597202	0.616285825	0.375515445
Lactic acid'	0.081285607	0.568874967	0.94989111
LPC 17:0'	0.316724217	0.370506573	0.438811413
L-Carnitine'	0.35343465	0.458629458	0.206079746
LPC 19:0'	0.405254265	0.958073722	0.795501591
LPE 18:0'	0.105098532	0.563566474	0.080332852
Urea'	0.423377149	0.668864365	0.420453336
Proline'	0.895132759	0.25229195	0.331240107
Creatine'	0.988577791	0.180313698	0.768341808
Betaine'	0.249916159	0.934758523	0.115375044
Phenylalaine'	0.386018123	0.662019538	0.381409874
Ceatinine'	0.324075717	0.580122548	0.092088434
Propionylcarnitine'	0.79676965	0.514548887	0.564980004
Pyruvic acid'	0.358279285	0.172316692	0.664746855
Hippuric acid'	0.584278448	0.22363531	0.769776575
Bilirubin	0.157310658	0.70016552	0.683713542

ANEXO 4. Resultados del análisis de ANOVA de dos factores.

- Ácidos grasos de cadena corta (SCFA)

	datos: deltas			
	COMPARATIVA PARAMÉTRICA CRUCE (p validf)			
	1 VS 2 (No tol, CU901 vs No Tol, Herbapekt)	1 VS 3 (No tol, CU901 vs Tol, CU901)	2 VS 4 (No tol, Herbapekt vs Tol, Herbapekt)	3 VS 4 (Tol CU901 vs Tol, Herbapekt)
Ác. Acético	0.346132452	0.939330892	0.623149275	0.688936139
Ác. Propiónico	0.022876369	0.205849063	0.35509395	0.881952784
Ác. Butírico	0.095089159	0.908444943	0.204343199	0.948498837
Ác. Isobutírico	0.314264653	0.571433264	0.451817884	0.686179186
Ác. Valérico	0.042029779	0.674250248	0.141977619	0.931466473
Ác. Isovalérico	0.29078318	0.854686499	0.277344155	0.748074486

- Ácido biliares (BA)

	datos: deltas			
	COMPARATIVA PARAMÉTRICA CRUCE (p validf)			
	1 VS 2 (No tol, CU901 vs No Tol, Herbapekt)	1 VS 3 (No tol, CU901 vs Tol, CU901)	2 VS 4 (No tol, Herbapekt vs Tol, Herbapekt)	3 VS 4 (Tol CU901 vs Tol, Herbapekt)
GUDCA	0.145572933	0.511865624	0.069167837	0.269533117
GCA	0.537050043	0.346099535	0.275121485	0.185138991
TCDCA	0.575970227	0.670964267	0.86937858	0.854110383
GCDCA	0.161285231	0.316912489	0.492100849	0.665904003
TDCA	0.551873194	0.532511936	0.719221628	0.840478484
GDCA	0.079008277	0.275578868	0.350489867	0.657752779
CA	0.642422716	0.723405821	0.686923764	0.753232788
3b-DCA	0.796911276	0.049810244	0.696669207	0.057021245
GLCA	0.185816454	0.421927407	0.548730688	0.814057745
5-cholenic	0.549067087	0.460028543	0.35618745	0.550496858
CDCA	0.175221258	0.569469158	0.187109489	0.706735115
LCA	0.396643138	0.724663811	0.73282478	0.977682706
TwMCA	0.910995513	0.711582484	0.835439236	0.552108498
THCA	0.859791909	0.958636256	0.837408954	1
GHCA	0.42429502	0.295276921	0.186060645	0.137849568
TUDCA	0.836196947	0.558027383	0.382570632	0.691375397
TCA	0.731312246	0.667141628	0.896586008	0.59667749
3-DHCA	0.79566421	0.311256918	0.834157941	0.369300901
HCA	0.687162176	0.75012527	0.828785402	0.863968479
UDCA	0.379736106	0.281113704	0.612461373	0.237382934
7-KLCA	0.292261935	0.707562908	0.367937209	0.730538482
HDCA	0.575176442	0.046387635	0.885754448	0.02309607
TLCA	0.511529922	0.459278393	0.84421215	1
DCA	0.595617018	0.42072523	0.285108782	0.21166341
iLCA	0.456140619	0.167191325	0.616805432	0.173532404

CA: Ácido cólico; GCA: Ácido glicólico; 5-cholenic: Ácido 5-colánico-3 β -ol; DCA: Ácido desoxicólico; GDCA: Ácido glicodesoxicólico; CDCA: Ácido quenodesoxicólico; GUDCA: Ácido glicoursodesoxicólico; TCA: Ácido taurocólico; TDCA: Ácido taurodesoxicólico; TCDCA: Ácido tauroquenodesoxicólico; TUDCA: Ácido taoursodesoxicólico; LCA: Ácido litocólico; 3-DHCA: Ácido-3-dehidrocólico; GLCA: Ácido glicoliticólico; TLCA: Ácido taurolitocólico; iLCA: Ácido isoliticólico; KLCA: Ácido 7-cetoliticólico; GHCA: Ácido glicohiocólico; HDCA: Ácido hiodesoxicólico; 3b-DCA: 3 β -Ácido 5 β -colánico-12 α -diol; TwMCA: Ácido tauro- ω -muricólico; HCA: Ácido hiocólico; THCA: Ácido taurohiocólico; UDCA: Ácido ursodesoxicólico; GCDCA: Ácido glicoquenodesoxicólico.

- **Metabolitos relacionados con inflamación alérgica (AIM)**

	datos: deltas			
	COMPARATIVA PARAMÉTRICA CRUCE (p validf)			
	1 VS 2 (No tol, CU901 vs No Tol, Herbapekt)	1 VS 3 (No tol, CU901 vs Tol, CU901)	2 VS 4 (No tol, Herbapekt vs Tol, Herbapekt)	3 VS 4 (Tol CU901 vs Tol, Herbapekt)
Adenosine'	0.30011616	0.38808692	0.728536861	0.768298211
Hypoxanthine'	0.626854569	0.855421779	0.150219454	0.284600294
Palmitoleic acid'	0.16541864	0.542524533	0.340702679	0.747716135
Arachidonic acid'	0.352940831	0.315664308	0.809742915	0.678739234
Lauric acid'	0.207801361	0.894997314	0.338602946	0.998470687
LPI 16:0'	0.713729334	0.946709153	0.838164263	0.608193319
Oleic acid'	0.240699283	0.481789635	0.591706743	0.835762824
LPI 20:4'	0.568741939	0.973177839	0.521152381	0.918081124
Cortisol'	0.082594548	0.754457887	0.056820444	0.916551778
Hexanoylcarnitine'	0.206492193	0.081628355	0.43759319	0.191414094
LPC 14:0'	0.710526409	0.843780027	0.249956813	0.573787539
LPC 18:0'	0.754730021	0.443815657	0.343569562	0.928253503
LPC 16:0'	0.819440564	0.290433816	0.480132928	0.866353282
Oleamide'	0.814767953	0.247936148	0.966269426	0.241432222
LPC 18:1'	0.556176347	0.801490192	0.868183352	0.9412635
LPC 17:1'	0.953489294	0.935302946	0.828148175	0.941772107
L-Arginine'	0.473792258	0.336971571	0.988975648	0.733917986
Sphinganine 1P'	0.105431716	0.582464655	0.261481918	0.815432002
Sphingosine'	0.585967483	0.25992201	0.311111347	0.590255251
Sphingosine 1P'	0.237385453	0.49641614	0.835759004	0.913116681
Leucine-Isoleucine'	0.807655741	0.537925039	0.691165596	0.980957845
Lactic acid'	0.764169663	0.508487758	0.607733291	0.710656058
LPC 17:0'	0.851903863	0.692196629	0.86015986	0.712709528
L-Carnitine'	0.308288343	0.348319794	0.45422589	0.467179808
LPC 19:0'	0.90376933	0.319695761	0.173014507	0.82316784
LPE 18:0'	0.456194287	0.783573307	0.997956352	0.753001632
Urea'	0.621923447	0.869606793	0.641895908	0.855215214
Proline'	0.941275922	0.697377568	0.758781488	0.979822702
Creatine'	0.661739413	0.588454484	0.559639697	0.723485908
Betaine'	0.142158247	0.084636593	0.989074556	0.630774083
Phenylalaine'	0.595328663	0.381566904	0.950589781	0.736681398
Ceatinine'	0.19935512	0.210713312	0.631924359	0.56456518
Propionylcarnitine'	0.900739759	0.859076203	0.737572817	0.968060668
Pyruvic acid'	0.633270468	0.88687147	0.965703028	0.787730917
Hippuric acid'	0.325705611	0.391149029	0.917645087	0.950372248
Bilirubin	0.231577802	0.067012632	0.317619462	0.104198553