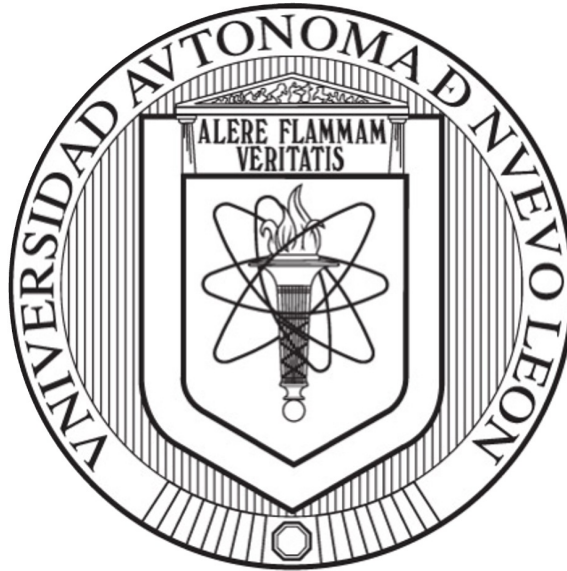


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DESARROLLO DE UN SISTEMA DE LIBERACIÓN CONTROLADA
A BASE DE PARTÍCULAS DE ZEÍNA EN EL TRATAMIENTO DE
LA HIPERSENSIBILIDAD A *Arachis hypogaea* EN UN MODELO
MURINO

POR

L.B.G. BRUNO ALEJANDRO VALADES AGUILAR

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN
INMUNOBIOLOGÍA

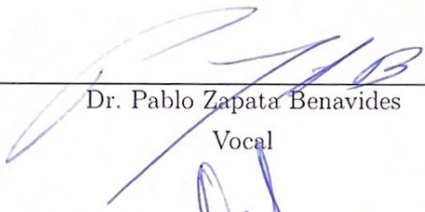
2022

DESARROLLO DE UN SISTEMA DE LIBERACIÓN CONTROLADA
A BASE DE PARTÍCULAS DE ZEINA EN LA HIPERSENSIBILIDAD
A *Arachis hypogaea* EN UN MODELO MURINO

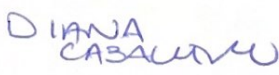
Comité de Tesis

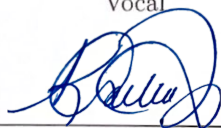

Dra. Diana Cinette Zárate Triviño
Presidente

Dra. María Cristina Rodríguez Padilla
Secretario


Dr. Pablo Zapata Benavides
Vocal


Dr. Moisés Armides Franco Molina
Vocal


Dra. Diana Elia Caballero Hernández
Vocal


Dra. Katiushka Arévalo Niño
Subdirector de Posgrado



DIRECCIÓN
DE POSGRADO

DESARROLLO DE UN SISTEMA DE LIBERACIÓN CONTROLADA
A BASE DE PARTÍCULAS DE ZEINA EN EL TRATAMIENTO DE
LA HIPERSENSIBILIDAD A *Arachis hypogaea* EN UN MODELO
MURINO

Dirección de Tesis



Dra. Diana Ginette Zárate Triviño
Director



Dr. David Eugenio Román Cañamar
Asesor Externo

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

Lugar de trabajo



Este proyecto de investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Nanobiotecnología del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Agradecimientos

A la **Dra. Diana Ginette Zárate Triviño** por ser la persona que creyó en mí, me inspiró a crecer tanto académicamente, laboralmente y personalmente. Con quién siempre me sentiré agradecido y honrado por ser su estudiante y técnico. Además de crear un ambiente en el laboratorio donde uno se siente parte de una familia, por más que ser un jefe, es una amiga.

Al **Dr. Moisés Armides Franco Molina** por exigir más y demostrarme lo que soy capaz, por enseñarme a siempre buscar una alternativa ante un problema, tanto en el laboratorio como en la vida.

Al **Dr. David Eugenio Román Cañamar**

A mis compañeros de otro laboratorio por apoyarme en este trabajo: **Beatriz Castro, Brandon Garza, Natanael Palacios, Paola García y Pedro Felix.**

A mis compañeros del laboratorio **Dr. Juan José Martínez, Denisse Campa y Jessica Rivera** por su apoyo en este trabajo y apoyo como amigos.

A mis compañeros del laboratorio **Nayeli Molina, Alexandro Salazar, Allende Villarreal, Armando Conchos y Gerardo García** por ser mis compañeros y amigos durante esta etapa.

Y en especial a **Raúl Rangel** y a **Jennifer Leos** por apoyarme durante estos dos años en lo académico y lo persona, por ser mis amigos y mi familia de laboratorio.

Dedicatoria

A mis padres, **Emigido Valades** y **Carmen Aguilar**, a mi hermana **Carolina Valades**, a mi tía **Caro Aguilar** y a mis sobrinos **Secundino** y **María Emilia Andrade**, por ser los pilares de mi vida, quienes tienen mi amor incondicional, quienes me han apoyado en cada paso que he dado, quienes fueron mi soporte y mi motivación de seguir creciendo, a quienes les debo todo lo que soy y quien seré.

Índice general

1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1. Hipersensibilidad	3
2.2. Hipersensibilidad tipo 1	5
2.2.1. Mediadores	6
2.2.2. Sensibilización	7
2.2.3. Reexposición	7
2.2.4. Alergias alimenticias	9
2.2.5. Tratamiento	11
2.3. Inmunoterapia	11
2.4. Diseño de biomateriales	12
2.4.1. Zeína	12
3. Justificación	15
4. Hipótesis	16
5. Objetivo	17
6. Materiales y métodos	18
6.1. Síntesis de partículas de zeína	19

6.2.	Caracterización de las partículas de zeína	19
6.2.1.	Tamaño y polidispersidad por dispersión de luz dinámica . . .	19
6.2.2.	Carga superficial de la partícula	19
6.3.	Modelo <i>in vitro</i>	20
6.3.1.	Prueba de viabilidad por ensayo de resazurina	20
6.4.	Cuantificación de proteína encapsulada de las partículas de zeína . . .	21
6.5.	Cuantificación de liberación de proteína de las partículas de zeína . .	21
6.6.	Animales	22
6.6.1.	Desparasitación del modelo murino	22
6.6.2.	Sensibilización del modelo murino	23
6.6.3.	Anestesia del modelo murino	23
6.6.4.	Escarificación en un modelo murino	23
6.6.5.	Toma de muestra a modelo murino	23
6.6.6.	Determinación de la inmunoglobulina E por ELISA	24
6.6.7.	Conteo de células sanguíneas	24
6.6.8.	Administración del tratamiento	25
6.7.	Determinación de la presencia de citocinas Th1, Th2 y Th17	25
6.8.	Análisis estadístico	26
7.	Resultados	27
7.1.	Estandarización de los parámetros de sensibilización en el modelo murino contra el alérgeno de <i>Arachis hypogaea</i>	27
7.1.1.	Escarificación un modelo <i>in vivo</i>	28
7.1.2.	Conteo celular de basófilos y eosinófilos en ratones sensibilizados	33
7.1.3.	Determinación de la dosis mínima del alérgeno	33
7.2.	Síntesis y caracterización de las partículas de zeína	34

7.2.1. Pruebas de viabilidad de las partículas en la línea celular HT29	37
7.3. Determinar el porcentaje de encapsulación de las partículas de zeína .	39
7.4. Determinar los perfiles de liberación de las partículas de zeína a pH 2 y 8.	39
7.5. Determinar la presencia de citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IFN, TFN, IL- 17A y IL-10	40
8. Discusión	42
9. Conclusión	47
10.Perspectivas	48
Bibliografía	49

Índice de figuras

2.1. Diagrama de una sensibilización del primer tipo de hipersensibilidad.	7
2.2. Diagrama de una reexposición del primer tipo de hipersensibilidad.	9
2.3. Estructura proteica de la zeína. En la primera imagen se observa la estructura aminoacídica de la zeína, el segundo la estructura física y en la tercera imagen en 3D cilíndrica.	13
2.4. Diagrama del cambio estructural de la zeína con tratamiento por calor (Sun et al. 2016).	14
6.1. Diagrama del modelo experimental	18
7.1. Gráfica de concentración de Inmunoglobulina E en ratones sensibilizados.	28
7.2. Fotografías de almohadilla del modelo <i>in vivo</i> previamente sensibilizado expuestos a control, control negativo e histamina. Se observa como los ratones son alérgicos a las proteínas del cacahuete.	29
7.3. Fotografías de almohadilla del modelo <i>in vivo</i> previamente sensibilizado expuestos a control, control negativo e histamina. Se observa como los ratones son alérgicos a las proteínas del cacahuete.	30
7.4. Fotografías de almohadilla del modelo <i>in vivo</i> previamente sensibilizado expuestos a control, control negativo e histamina. Se observa como los ratones son alérgicos a las proteínas del cacahuete.	31
7.5. Fotografías de almohadilla del modelo <i>in vivo</i> previamente sensibilizado expuestos a control, control negativo e histamina. Se observa como los ratones no son alérgicos a las proteínas del cacahuete.	32
7.6. Cuantificación de basófilos y eosinófilos en sangre de ratones alérgicos.	33
7.7. Determinación de la dosis mínima del alérgeno <i>in vitro</i> .	34

7.8. Partículas de zeína en estado nanométrico. Donde se observa un color azul en tonalidad tornasol.	35
7.9. Caracterización del tamaño y polidispersidad de las ZNps al día 0 y con un de 30.	36
7.10. Caracterización de la carga superficial de las partículas de zeína al día 0 y 30.	37
7.11. Curva de viabilidad de las partículas de zeína y zeína diferentes concentraciones en la línea celular HT29	38
7.12. Porcentaje de encapsulamiento, con una media del 60 %.	39
7.13. Porcentaje de liberación a pH 2 y 8, teniendo como punto máximo de liberación a 2 horas en pH básico	40
7.14. Perfil de citocinas, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF- α y IFN- γ en suero de ratones alérgicos con sus respectivos tratamientos	41

Índice de tablas

2.1. Clasificación moderna de reacciones hipersensibles (Dispenza 2019; Levinson et al. 2022)	4
7.1. Cuantificación de basófilos y eosinófilos en un modelo sensibilizado y control.	33
7.2. Parámetros de caracterización de ZNps.	35

Abreviaturas

AZNps	Partículas de zeína cargadas con el alérgeno de <i>Arachis hypogea</i>
BCA	Técnica de ácido bicinconínico
IgE	Inmunoglobulina E
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-17a	Interleucina 17A
IFN-γ	Interferón gamma
mV	Milivoltios
nm	Nanometros
OZNps	Partículas de zeína encapsulando ovoalbumina
TNF-α	Factor de necrosis tumoral
ZNps	Partículas de zeína

Resumen

Una alergia o hipersensibilidad es la sobre-reacción del sistema inmunológico contra un alérgeno, que comúnmente no es dañino para la población en general, en la alergia alimenticia el 90 % de las muertes se deben al cacahuete y las terapias para tratarla tienen varias deficiencias, tiempos de tratamientos extendidos, vías de administración poco eficientes y una poca inducción de la tolerancia. Por lo que en este trabajo se propuso el desarrollo y evaluación de un sistema de liberación controlada a base de partículas de zeína como una alternativa en el tratamiento de la hipersensibilidad en un modelo murino. Se estandarizó un modelo de alergia contra el cacahuete en ratones de la cepa BALB/c, se cuantificó la inmunoglobulina E (IgE) en suero y se evaluaron las escarificaciones en la almohadilla plantar del ratón y se cuantificaron basófilos y eosinófilos en sangre, validando la metodología de inducción de hipersensibilidad al cacahuete, por otra parte se sintetizaron partículas de zeína, se evaluó su estabilidad a 30 días y se caracterizaron por dispersión de luz dinámica (DLS) y potencial Z, obteniendo un tamaño promedio de 109 nanómetros (nm) y una carga superficial de -23.4 milivolts (mV). Se evaluó el porcentaje de encapsulación del sistema obtenido el cual fue de un 60 %, presentando una liberación máxima de 2 horas en un ambiente básico. Se observó un aumento en la producción de IL-2 e IL-6 y una baja en IL-10, lo que implica una activación de T reguladoras y una inducción de la vía inflamatoria, lo que sugiere que es necesario aumentar las dosis del tratamiento para observar una mayor respuesta un perfil de citocinas que correlacione con una respuesta de tolerancia.

Abstract

An allergy or hypersensitivity is the overreaction of the immune system against an allergen, which is not commonly harmful to the general population. In food allergies, 45 % of deaths are due to peanuts and the therapies to treat have several deficiencies such as: extended treatments, inefficient routes of administration and little tolerance induction. Therefore, in this work we propose the development and evaluation of a controlled delivery system based on zein particles as an alternative in the treatment of hypersensitivity in a murine model. The allergy model against peanuts on BALB/c strain was standardized by quantifying immunoglobulin E (IgE) in serum, the scarifications in the plantar pad were evaluated and a quantification of basophils and eosinophils in blood, validating the model of induction of hypersensitivity to peanuts. On the other hand, zein particles were synthesized, their stability was evaluated at 30 days and they were characterized by dynamic light scattering (DLS) and Z potential, obtaining an average size of 109 nanometers (nm) and a surface charge of -23.4 millivolts (mV). The encapsulation percentage had 60 %, presenting a maximum release of 2 hours in a basic pH and resisting acid pH at maximum 6 hours. An increase in the production of IL-2 and IL-6 and a decrease in IL-10 were observed, which implies an activation of regulatory T and an induction of the inflammatory pathway, which suggests that it is necessary to increase the doses of the treatment to observe a greater response a cytokine profile that correlates with a tolerance response.

Introducción

Una alergia o hipersensibilidad es la sobre-reacción del sistema inmunológico contra un alérgeno, que comúnmente no son dañinos para la población en general. Este se divide en 4 tipos, siendo el primero el causante en alergias alimenticias produciendo inmunoglobulina E, un anticuerpo que cuando se une a basófilos y eosinófilos, estos liberan químicos que ocasionan síntomas leves como estornudos, comezón y subir en gravedad como diarrea, urticaria o un angioedema hasta más graves como desmayos, broncoespasmos, un shock anafiláctico y una eventual muerte (Abbas, Lichtman y Pillai 2015)

El tratamiento convencional es evitar el alimento y/o el uso de drogas que busquen disminuir los síntomas, sin enfocarse en la raíz de la hipersensibilidad y su uso constante y prologando disminuye la tolerancia contra este fármaco, por lo que es necesario aumentar la dosis o combinarlo con fármacos más fuertes (Grayson 2018).

Para tratar la raíz del problema existen las inmunoterapias consta de la administración del alérgeno a bajas cantidades durante un periodo de tiempo, sin embargo tiene varias deficiencias, como una duración de tiempo prologado (mínimo de 3 años), es de varias dosis progresivas, cuando se administra de manera oral tiene una vía de administración poco eficiente y puede no generar una tolerancia (Moote, Kim y Ellis 2018).

Por lo que se ha visto la necesidad de utilizar materiales alternativos que puedan optimizar la administración del tratamiento, entre ellos se encuentra la zeína, una proteína proveniente de la semilla del maíz que se ha utilizado en síntesis de partículas como sistemas de liberación de enzimas, drogas y aceites esenciales, esto es debido a su alta capacidad protectora, su biodegradabilidad y su biocompatibilidad (Pascoli,

Lima y Fraceto 2018).

Por lo que en este trabajo nos proponemos el desarrollo y evaluación de partículas de zeína como un sistema de liberación controlada como una alternativa en el tratamiento de alergias en un modelo murino.

Antecedentes

Hipersensibilidad

La hipersensibilidad es la respuesta inmunológica exagerada o inapropiada contra antígenos externos benignos, siendo dañina al huésped. Estas reacciones son específicas a un antígeno, el primer contacto con el antígeno sensibiliza el sistema inmunológico y subsecuente el contacto origina una respuesta hipersensible. En los individuos la constante exposición al antígeno demuestra manifestaciones clínicas, aunque la severidad de las reacciones de hipersensibilidad incrementan a través del tiempo (Levinson et al. 2022).

Robert Coombs y Philip Gell clasificaron 4 tipos de reacciones de hipersensibilidad:

El primer tipo es mediado por una unión específica entre el alérgeno y la inmunoglobulina E, con unión a el receptor FcRI con en los mastocitos y basófilos. La unión del alérgeno libera los mediadores procedentes de las células resultando en urticaria, angioedema y/o anafilaxis, este tipo es el que comúnmente se relaciona con las alergias alimenticias.

En el segundo tipo de hipersensibilidad es una respuesta citotóxica mediada por las inmunoglobulinas IgG y IgM que reconoce proteínas en la superficie celular o matrix extracelular, estos anticuerpos involucran las reacciones activadas por el sistema del complemento o fagocitos. Este tipo de hipersensibilidad puede ser visto en trombocitopenia, anemia hemolítica autoinmune y neutropenia autoinmune.

El tercer tipo es caracterizado por las inmunoglobulinas IgG e IgM los cuales se depositan en el tejido y causan daño al órgano.

El cuarto tipo es una respuesta tardía mediada por los linfocitos T y se subdivide en otros 4 tipos.

A pesar de haber sido clasificados en 1963, se han ido actualizando con el paso del tiempo (Dispenza 2019).

Tipo	Tiempo de reacción	Mecanismo inmunológico	Ejemplos clínicos
I	Minutos	Dependiente de IgE Independiente de IgE	Anafilaxis, angioedema urticaria, asma, rinitis alérgica Reacciones a reactivos yodados y algunos biológicos
Ila	Horas a días	Citotoxicidad mediada por IgG/IgM y sistema del complemento	Citopenias inmunológicas
Ilb		Estimulación por células mediadas por anticuerpos	Enfermedad de Graves, urticaria crónica idiopática
III	Dos a tres semanas	Activación de la vía del complemento	Enfermedad del suero, lupus inducido por fármacos, vasculitis
IVa	Dos a tres días	Activación de macrófagos mediado por linfocitos Th1	Diabetes tipo 1, dermatitis por contacto (combinada con IVc), reacciones a pruebas de tuberculina
IVb		Inflamación eosinofílica mediado por linfocitos Th2	Exantema papular, síndrome de Dress, asma persistente, rinitis alérgica
IVc		Reacciones citotóxicas mediado por linfocitos T	Síndrome de Stevens-Johnson, necrólisis epidérmica tóxica, penfigoide ampolloso
IVd		Inflamación neutrofílica mediado por linfocitos T	Pustulosis exantematosa generalizada aguda, síndrome de Behcet

Tabla 2.1: Clasificación moderna de reacciones hipersensibles (Dispenza 2019; Levinson et al. 2022)

Hipersensibilidad tipo 1

El término alergia es comúnmente asociado a la hipersensibilidad tipo 1, mediada por la inmunoglobulina E (Levinson et al. 2022).

Una reacción hipersensible inmediata ocurre cuando un alérgeno (antígenos que producen alergia) se une a el anticuerpo IgE, previamente unido a los receptores de mastocitos y basófilos, liberando diferentes mediadores químicos, generando síntomas o complicaciones (Levinson et al. 2022).

El proceso inicia cuando un antígeno induce la formación del anticuerpo IgE, el cual se une firmemente por la porción Fc en los receptores de los basófilos y mastocitos. La reexposición a el mismo antígeno resulta en la reacción cruzada en la célula, desgranulandose y liberando mediadores farmacológicos en minutos (**fase inmediata**). Nucleótidos cíclicos y calcio juegan un rol esencial en la liberación de los mediadores. Los síntomas como edema, eritema y comezón aparecen rápidamente debido a estos mediadores (Levinson et al. 2022).

La **fase tardía** de inflamación de IgE ocurre aproximadamente 6 horas después de la exposición del alérgeno y esto es debido a los mediadores (leucotrenos) que son sintetizados después de la desgranulación de las células. Estos mediadores causan un afluencia de células inflamatorias, como los neutrófilos y eosinófilos, causando síntomas como eritema e induración. Como ejemplo, los eosinófilos juegan un gran papel en la reacción tardía en asma (Levinson et al. 2022).

La vía del complemento no se encuentra involucrada con ninguna de las fases, tanto inmediata como tardía, esto es debido a que la IgE no activa esta vía (Levinson et al. 2022).

El incremento de la IgE es causado por el cambio de isotopo por los linfocitos B, causado por la alta producción de interleucina 4, producida por los linfocitos Th2. Los individuos sanos responden de la misma manera produciendo IgG, el cual no activa los mediadores de los mastocitos y basófilos (Levinson et al. 2022).

Las manifestaciones clinicas de este tipo de hipersensibilidad pueden aparecer de

varias formas como: urticaria, eczema, rinitis, conjuntivitis y asma. La presentación de estos síntomas depende en gran parte la vía de entrada del alérgeno y la ubicación de los mastocitos con los IgE específicos (Levinson et al. 2022).

La complicación mas severa es el **shock anafiláctico**, donde existe una broncoconstricción y una hipotensión (shock), el cual puede ser fatal. El paciente puede sentir mareos, estornudos, ronquera debido un edema laríngeo, prurito y urticaria. También puede ocurrir taquicardia, arritmia, cianosis o un arresto cardiaco (Levinson et al. 2022).

Los alérgenos más comunes que causan shock anafiláctico son: veneno de abeja, drogas como la penicilina y comidas como mariscos y cacahuates (*Arachis hypogaea*). Si algunas de estas proteínas tiene una reacción cruzada con la IgE, activando la liberación de histamina u otros mediadores. La penicilina es un heptano que se une a proteínas humanas para tener una reacción cruzada adjunta a los IgE (Levinson et al. 2022).

Mediadores

No un solo mediador químico es responsable de todas las manifestaciones. Los síntomas irán dependiendo del mediador (Levinson et al. 2022).

La **histamina** ocurre en los gránulos de los mastocitos y basófilos en un estado preformado. Cuando son liberados causan vasodilatación, un incremento en la permeabilidad capilar y contracción del músculo liso (Levinson et al. 2022). Clínicamente, pueden ocurrir desórdenes como rinitis alérgica, urticaria y/o un angioedema. El broncoespasmo es prominente en una anafilaxis aguda, como resultado de la liberación de la histamina. Los antihistamínicos bloquean los receptores de histamina y pueden ser efectivos en rinitis alérgica, pero no en asma (Levinson et al. 2022).

La primera exposición hacia el antígeno causa a los pacientes un incremento en la respuesta primaria, seguido de una respuesta inmunológica normal. En la actualidad sigue siendo una incógnita la razón específica por la cual algunos individuos padecen esta sobre-reacción inmunológica (Dispenza 2019).

Esta hipersensibilidad cuenta con dos etapas, la etapa de sensibilización, en el que ocurre la primera respuesta inmunológica contra el antígeno, mientras que en la etapa efectora, ocurre la segunda respuesta (Abbas, Lichtman y Pillai 2015).

Sensibilización

Para que se desarrolle una hipersensibilidad tipo 1, es necesario la etapa de sensibilización, es decir originar una alergia.

Esto ocurre al ser expuesto a un antígeno, este se introduce por el epitelio tanto respiratorio o digestivo (bronquios o intestino delgado), el alérgeno es reconocido por los macrófagos o células dendríticas, fagocitan al alérgeno y utilizan sus proteínas.

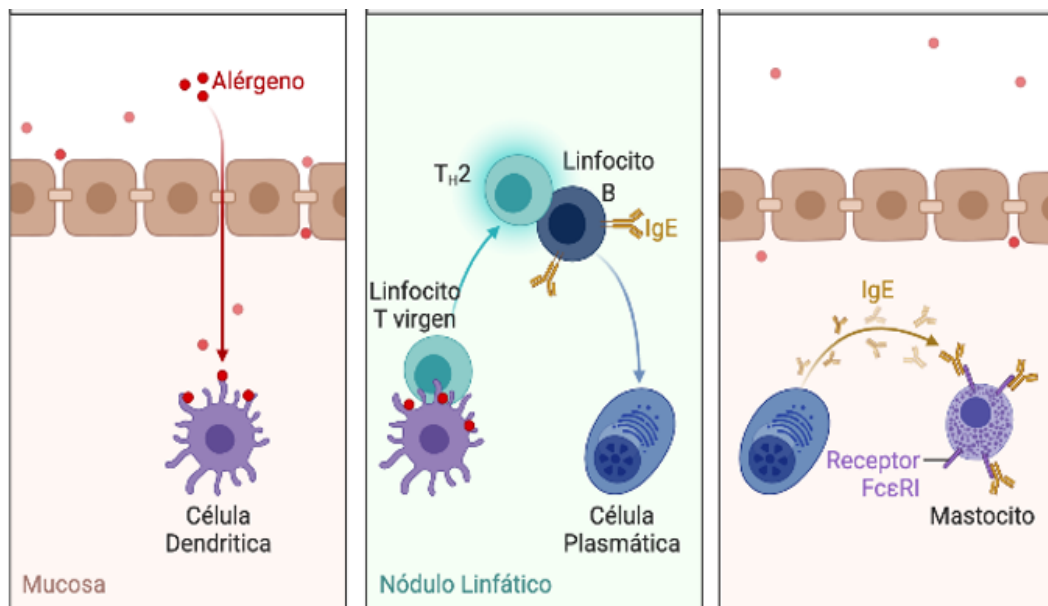


Figura 2.1: Diagrama de una sensibilización del primer tipo de hipersensibilidad.

Reexposición

Esto es debido a una respuestas inmunitarias frente a antígenos en los que participan linfocitos T cooperadores que producen IL-4, IL-5 e IL-13, inmunoglobulina E (IgE),

mastocitos y eosinófilos. En la fase efectora de estas respuestas, los mastocitos y los eosinófilos se activan para liberar rápidamente mediadores que aumentan la permeabilidad vascular, producen vasodilatación y contraen el músculo liso bronquial y visceral. Esta reacción se llama hipersensibilidad inmediata, ya que comienza a los pocos minutos de la provocación con el antígeno.

Tras esta respuesta hay un componente inflamatorio de instauración más lenta llamado reacción de fase tardía, el cual está caracterizado por la acumulación de neutrófilos, eosinófilos, macrófagos. Los brotes repetidos de estas reacciones pueden dar lugar a enfermedades alérgicas crónicas, con lesión y reestructuración tisular.

La secuencia de acontecimientos en la hipersensibilidad inmediata consiste en la exposición a un antígeno, la activación de los linfocitos (linfocitos TH2, linfocitos T cooperadores foliculares [TFH] productores de IL -4 y linfocitos B) específicos frente al antígeno, la producción de anticuerpos IgE, la unión del anticuerpo a receptores para la Fe de los mastocitos y la activación de los mastocitos por la reexposición al antígeno, lo que provoca la liberación de mediadores de los mastocitos y la posterior reacción patológica. La unión de la IgE a los mastocitos también se llama sensibilización, porque los mastocitos cubiertos de IgE están listos para activarse ante el encuentro con el antígeno.

La alergia es la enfermedad prototípica mediada por los linfocitos Th2. Muchos de los primeros acontecimientos y características anatomopatológicas de la reacción son desencadenados por las citocinas TH2, que pueden producir los linfocitos Tfh en los órganos linfáticos, y por los linfocitos Th2 clásicos en los tejidos. Esto contrasta con la hipersensibilidad de tipo retardado, que es en gran medida una reacción inmunitaria mediada por los linfocitos Th1. Las manifestaciones clínicas y anatomopatológicas de la alergia consisten en varias reacciones vasculares y del músculo liso que aparecen rápidamente tras la hipersensibilidad inmediata y una reacción inflamatoria de fase tardía retardada. Todas estas reacciones pueden desencadenarlas la activación del mastocito mediada por la IgE, pero diferentes mediadores son responsables de las reacciones inmediata y tardía. Como los mastocitos están en los tejidos conjuntivos y debajo del epitelio, estos tejidos son los lugares más frecuentes de las reacciones de hipersensibilidad inmediata.

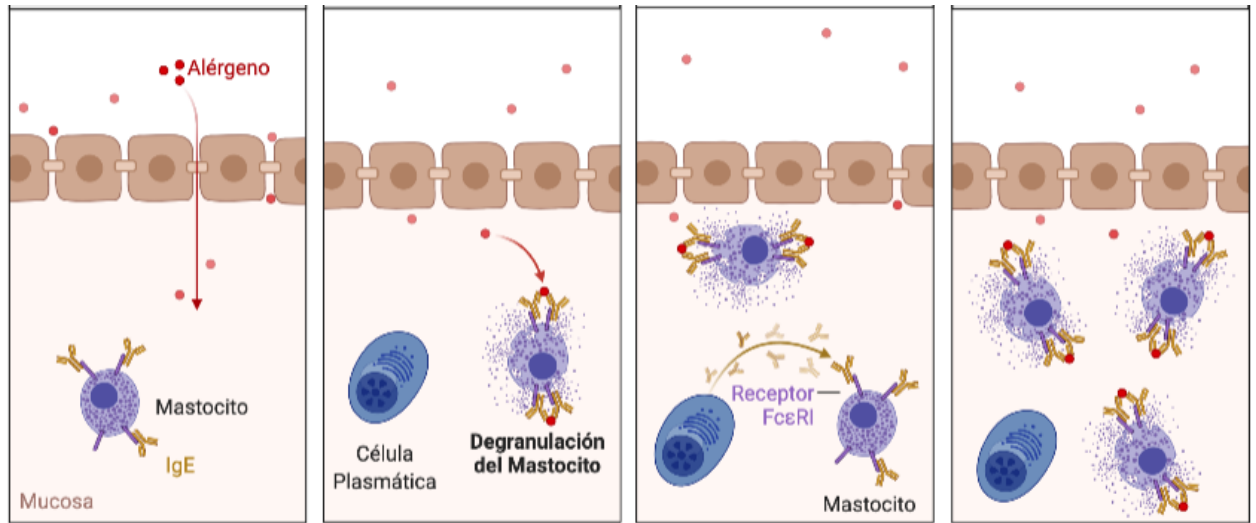


Figura 2.2: Diagrama de una reexposición del primer tipo de hipersensibilidad.

Las reacciones alérgicas se manifiestan de diferentes formas, dependiendo de los tejidos afectados, como los exantemas cutáneos, la congestión sinusal, la constricción bronquial, el dolor abdominal, la diarrea y el choque sistémico. En la forma sistémica más extrema, llamada anafilaxia, los mediadores derivados del mastocito pueden constreñir las vías respiratorias hasta el punto de la asfixia y producir un colapso cardiovascular que lleve a la muerte. (Abbas, Lichtman y Pillai 2015).

Alergias alimenticias

Las alergias alimenticias es un problema global creciente, en Europa y Norte America mas de 6 millones de personas son afectadas, incluyendo 8 % en infantes y 2-3 % en adultos. A pesar que las alergias hacia la leche y huevo usualmente suele superarse entre las edades de 5 a 10 años, existen alergias como hacia el cacahuete suelen ser de por vida (80-85 %) (Chu et al. 2019).

La alergia alimentaria es una reacción del sistema inmunitario que ocurre poco después de haber ingerido un determinado alimento. Incluso una pequeña cantidad del alimento que causa la alergia puede ocasionar signos y síntomas, como problemas digestivos, urticaria o inflamación de las vías respiratorias. En algunas personas, una

alergia alimentaria puede ocasionar síntomas graves o, incluso una reacción denominada anafilaxis, que puede poner en riesgo la vida.

Se calcula que la alergia alimentaria afecta al 6 y 8 % de niños y niñas menores de 3 años y hasta al 3 % de adultos. A pesar de que no existe cura, algunos niños superan su alergia alimentaria cuando crecen.

Es fácil confundir la alergia alimentaria con una reacción mucho más frecuente llamada *intolerancia alimentaria*. Aunque es molesta, la intolerancia alimentaria es una enfermedad de menor gravedad que no involucra al sistema inmunitario.

Se estima que entre 250 y 520 millones de personas padecen alergia a algún tipo de alimento. El número de afectados aumenta tanto en países desarrollados como en desarrollo, sobre todo en niños y niñas. La alergia alimentaria se complica por otras enfermedades, como asma y dermatitis atópica, erupciones en la piel.

Datos del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) estiman que 25 % de la población del país padece algún tipo de alergia, incluida la alimentaria. La automedicación para controlar los síntomas es un factor que ha provocado aumento en el número de casos. Y según la Dirección de Información en Salud en México en el 2017 hubo 340 caso a nivel nacional de alergias alimentarias y en el Estado de México 30 casos. La población infantil es la más afectada. La prevalencia es de 4.2 % en menores de 3 a 5 años y es de 3.9 % en menores de 18 años. Proteína de la leche, cacahuete, mariscos, frutos secos, huevo y trigo son los principales alimentos involucrados en alergias (Instituto Mexicano del Seguro Social 2017).

Tanto los cacahuates y las nueces son de diferentes familias, ambas contienen una potentes alérgenos, siendo responsables del 90 % de las reacciones de shock anafilácticos fatales, a comparación de otros alimentos alérgicos como la leche o el huevo, rara vez es curada (Van-Gramberg et al. 2013).

Tratamiento

El tratamiento estándar hacia las alergias es evitar el alérgeno y el uso de medicamentos de reacción para las reacciones alérgicas o anafilaxis y reacciones sistemáticas y potencialmente dañar la vida. Sin opciones de tratamientos, existe un crecimiento en el interés público, médico y comercial en potenciales terapias en especial de carácter oral en las alergias alimenticias(Chu et al. 2019).

Existen diferentes tipos de terapias, entre ellas las específicas a alérgenos y las no específicas, el tratamiento específico incluye inmunoterapia oral, sublingual y subdermal con alérgenos del alimento o proteínas recombinadas mutadas, estas terapias disminuyen la actividad de IgE y combinada con *E. coli* administrada con color.

Otra terapia es de dietas que contienen alimentos sobre cocidos, tales como el huevo o la leche, el cual representa una alternativa el cual cambia el paradigma de las alergias. La terapias no específicas incluye anticuerpos monoclonales anti-IgE, los cuales incrementan la dosis del alérgeno alimenticio.

Cuando un paciente entra en estado anafiláctico es una emergencia médica a nivel mundial, y la terapia más utilizada son las autoinyecciones de epinefrina/adrenalina y únicamente se prescribe a una pequeña parte de la población (World Allergy Organization 2020).

Inmunoterapia

La inmunoterapia es un tratamiento preventivo para las reacciones alérgicas a sustancias como el polen, ácaros y veneno de abeja. La inmunoterapia involucra el incremento gradual de las sustancias o alérgenos a una persona hipersensible. El incremento del alérgeno causa al sistema inmunológico ser menos sensible a la sustancia, probablemente "bloqueado" el anticuerpo, el cual reduce los síntomas de la alergia cuando haya una reexposición futura. La inmunoterapia reduce la inflamación

características de una alergia (American College of Allergy 2022).

La tolerancia inmunológica es esencialmente para el mantenimiento de la homeostasis. En esta red de regulaciones inmunológicas, la constante interacción estímulo-respuesta están en armonía con los mecanismos de tolerancia.

Varios antígenos son captados por el huésped en la vida diaria, especialmente a través de superficies mucosas, son retadas por un sistema inmunológico, pero el sistema tiene una no respuesta hacia los alérgenos, típica en pacientes sanos, la tolerancia. Esta es una no respuesta esencial para el bienestar del huésped, la reactividad a alérgenos puede dirigir a una hipersensibilidad tipo 1, la hiperreactividad a antígenos propios genera enfermedades autoinmunes y en su opuesto, una excesiva tolerancia, permite una invasión por microorganismos, parásitos o un desarrollo de cáncer. La regulación de la tolerancia es esencial, por lo que la inducción de esta como terapia podría restaurar la inmunidad normal en pacientes alérgicos y hasta en pacientes autoinmunes. La inmunoterapia específica con alérgeno (ITA) es el mejor modelo para ilustrar la inducción de la tolerancia. (Kucuksezer et al. 2013).

Diseño de biomateriales

Los biomateriales han sido definidos como sustancias además de fármacos o alimento que contienen sistemas terapéuticos o diagnósticos y en algunos casos, son descritos como materiales compuestos de componentes biológicos irrelevantes de su aplicación.

Zeína

La proteína de la zeína se encuentra en el endosperma del maíz el cual es el mayor coproducto en la industria del biocombustible. Se clasifica en α -, β -, γ - y δ -zeína. La α -zeína es la más abundante, siendo el 80% de la proteína total y es lo que usualmente se describe a la zeína, es soluble en alcohol-agua y contiene 2/3 de los residuos aminoácidos hidrofóbicos y 1/3 hidrofílicos en su estructura primaria.

La composición amino ácida contiene 21.4 % de glutamina, 19.3 % leucina, 9 % prolina, 8.3 % alanina, 6.8 % fenilalanina, 6.2 % isoleucina, 5.7 % serina y 5.1 % de tirosina, con un peso molecular de 19 a 21 kDa (Zhang, Luo y Wang 2011)

Esta reconocida como segura (GRAS) por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos de América (Food and Drug Administration 2008) y debido a sus propiedades fisico-químicas, puede ser convertido fácilmente en nanopartículas coloidales, debido a su alta capacidad protectora, su biodegradabilidad y biocompatibilidad, la zeína ha sido utilizada para la liberación de enzimas, drogas, aceites esenciales entre otras sustancias (Pascoli, Lima y Fraceto 2018).

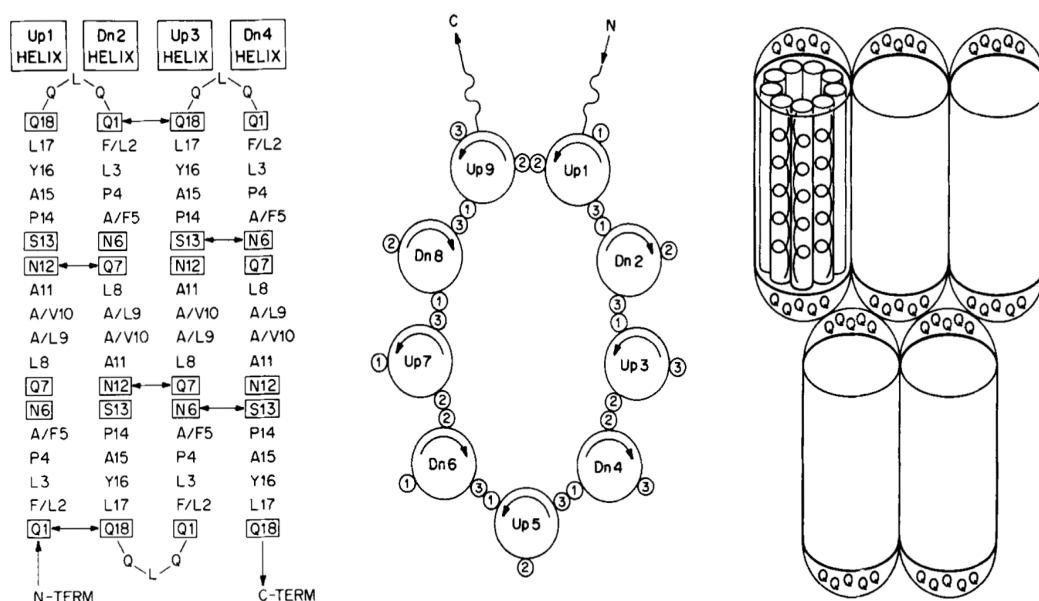


Figura 2.3: Estructura proteica de la zeína. En la primera imagen se observa la estructura aminoacídica de la zeína, el segundo la estructura física y en la tercera imagen en 3D cilíndrica.

A pesar de su naturaleza química, los métodos utilizados para la preparación de las nanopartículas de zeína, existen diferentes obstáculos con respecto a la estabilidad temporal química. Chen y Zhong estudiaron ciertas características de las nanopartículas y concluyeron que este tipo de nanopartículas presentan poca estabilidad, forman agregados de manera rápida y en varias formulaciones se precipitan, perdiendo la funcionalización de estas partículas (Chen y Zhong 2014b).

A altos pH de síntesis las formulaciones de las nanopartículas de zeína tienen a agregarse o precipitarse, esto es debido a que las soluciones de pH mayores a 5 tienden

a estar muy cerca a su punto isoeléctrico, pH 6.2. En el caso de la fuerza iónica y el pH, las nanopartículas han mostrado una alta agregación a bajas concentraciones de cloruro de sodio y permanecen inestables a un pH menor de 5. La sal añadida a las formulaciones incrementa la fuerza iónica y por consiguiente incrementa las interacciones Van der Waals y efectos hidrofóbicos unido a las cadenas proteínas, favoreciendo la agregación y precipitado de las proteínas.

Utilizando la tecnología de encapsulamiento, las nanopartículas ofrecen la posibilidad de mejorar las propiedades de encapsulamiento, esencialmente, el desarrollo de estas técnicas es mejorando su estabilidad química y extender el tiempo de vida de los sistemas, estos aspectos son considerados al analizar el tamaño de partículas, su índice de polidispersidad, eficiencia de encapsulamiento y liberación del agente activo durante un periodo de tiempo (Pascoli, Lima y Fraceto 2018).

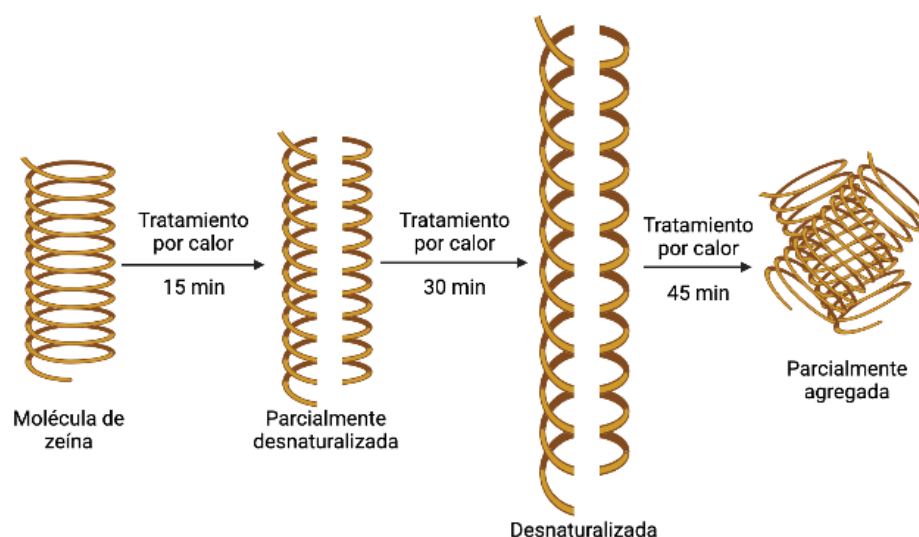


Figura 2.4: Diagrama del cambio estructural de la zeína con tratamiento por calor (Sun et al. 2016).

Justificación

Se estima que para el año 2050 la mitad de la población mundial padecerá de algún tipo de alergia y al menos un 3 % puede tener un desenlace fatal, debido a que las terapias actuales no son eficaces, específicamente para alergias alimenticias. Por lo cual, la optimización de inmunoterapias que incrementen la capacidad de tolerancia contra un alérgeno ha sido un tema de interés y estudio persistente en diversas áreas de la ciencia.

Este trabajo propone desarrollar partículas de zeína aprovechando sus propiedades fisicoquímicas con el fin de generar un sistema efectivo de absorción de antígenos en la mucosa intestinal promoviendo una mayor tolerancia en menor tiempo.

Hipótesis

La administración de partículas compuestas de zeina cargadas con los alérgenos inducirán tolerancia inmunológica para atenuar la alergia alimenticia *Arachis hypogaea* en un modelo murino.

Objetivo

Desarrollar partículas de zeína como un sistema de liberación para el tratamiento de hipersensibilidad alimenticia del *Arachis hypogaea* en un modelo murino.

Objetivos específicos

1. Estandarizar los parámetros de sensibilización en el modelo murino contra el alérgeno de *Arachis hypogaea*.
2. Obtener y caracterizar las partículas de zeína.
3. Determinar el porcentaje de encapsulación de las partículas de zeína.
4. Determinar los perfiles de liberación de las partículas de zeína a pH 2 y 8.
5. Determinar el perfil de respuesta de citocinas asociado a la inducción de tolerancia.

Materiales y métodos

Este trabajo se divide en 3 etapas: La sensibilización y corroboración del modelo de hipersensibilidad, La síntesis y caracterización de las partículas de zeína y como parte final la administración de AZNps para inducir la tolerancia en el modelo, como se observa en la fig. 6.1.

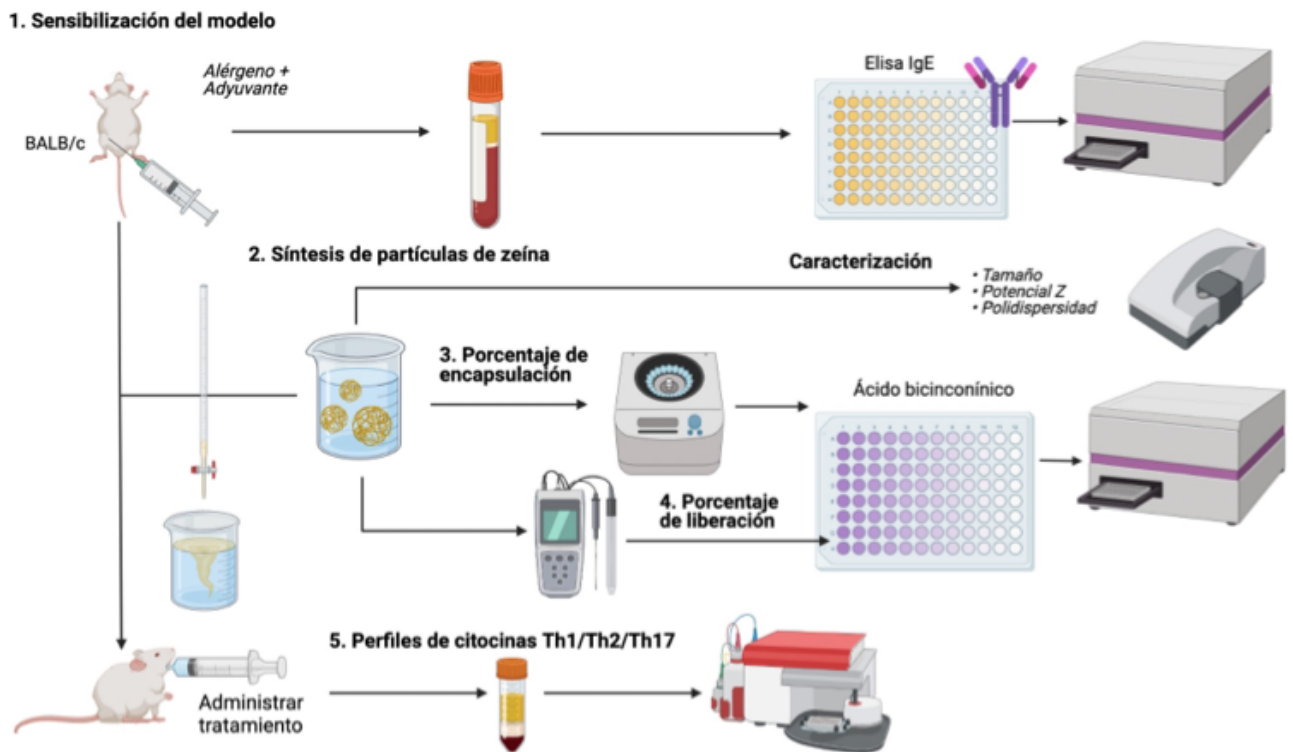


Figura 6.1: Diagrama del modelo experimental

Síntesis de partículas de zeína

Utilizando de base el método de Sun, se preparó una solución de zeína a una concentración de 1:1 w/v en una solución etanólica al 70 %. La solución se colocó en un baño de glicerina a 95°C por 30 minutos (Sun et al. 2016).

En una relación 3:1 se sintetizaron las vesículas utilizando agua desionizada, agitando a una velocidad de 5'000 rpm y se agregó la zeína tratada aun caliente una velocidad de 1 mL/min, dejando agitar 2 minutos más.

Caracterización de las partículas de zeína

Tamaño y polidispersidad por dispersión de luz dinámica

El tamaño y la polidispersidad se determinaron mediante dispersión de luz dinámica utilizando el equipo de nanosizer NS90 (Malvern Instruments, Malvern, UK). Las muestras de nanopartículas se cargaron en una celda capilar para espectrofotometría y se analizaron a 25°C.

Carga superficial de la partícula

La carga de la nanopartícula se determinaron mediante la dispersión de luz dinámica y se utilizó la electroforesis doppler láser para determinar el potencial Z utilizando el equipo de nanosizer NS90 (Malvern Instruments, Malvern, UK). Las muestras de nanopartículas se cargaron en una celda capilar para espectrofotometría y se analizaron a 25°C.

Modelo *in vitro*

Se utilizó la línea celular HT29 (Cáncer de colon humano), la cual fue obtenida del banco de líneas celulares del Laboratorio de Inmunología y Virología. Para su mantenimiento y proliferación se usó el medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), suplementado al 5 % con suero fetal bovino y con antibiótico/antimicótico al 1 %. Las células crecieron en monocapas adherentes y se mantuvieron a 37°C en una atmósfera húmeda al 5 % de CO₂.

Prueba de viabilidad por ensayo de resazurina

Utilizando tripsina al 0.05 % se disociaron las células en la caja de cultivo y se resuspendieron en medio suplementado. En cajas de 96 pozos se sembraron 5'000 células por pozo y procedió a incubarse por 24 horas.

Se utilizaron concentraciones de ZNps y Zeína a 100, 87.5, 75, 62.5, 50, 37.5, 25, 12.5 y 6.25 µg/mL previamente esterilizados y se dejó el tratamiento durante 24 horas.

Se retiró el tratamiento en la placa y procedió a lavarse con PBS (Buffer Fosfato Salino) dos veces y se agregaron 100 µL de resazurina, previamente diluida al 10 % en medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute), partiendo de un stock a 0.15 mg/mL a cada pozo en oscuridad. Se incubó durante 4 horas envuelta en aluminio y se midió en un lector de placa a una onda de excitación a 530 nm y 590 de emisión.

Cuantificación de proteína encapsulada de las partículas de zeína

Con el objetivo de estandarizar el encapsulamiento se utilizó a la proteína ovoalbúmina a una concentración de 0.5 mg/mL en el agua desionizada. Se sintetizaron ZNps y se centrifugaron a diferentes revoluciones. A 800, 1000, 3000, 7000, 10000, 13000, ahora OZNps y se procedió a medir la proteína por prueba de ácido bicinconínico.

Se utilizó la fórmula de eficacia de encapsulamiento (EE):

$$EE(\%) = \frac{Q_{\text{Asociado}}}{Q_{\text{Inicial}}} \times 100 \quad (6.1)$$

Donde Q_{Inicial} es la cantidad de proteína inicial en la síntesis de las OZNps y la Q_{Asociada} es la cantidad de proteína liberada por miligramo de partículas.

Cuantificación de liberación de proteína de las partículas de zeína

Siguiendo el protocolo de Chen y Zhong con varias modificaciones, se sintetizaron OZNps y fueron agregadas a una solución de buffer a un pH 2 y por separado a pH 8 a una relación 1:1. Se midió la proteína liberada a diferentes tiempos, a 0, 5 y 30 min. y a 1, 2, 3, 4, 5, 6 horas utilizando la prueba de ácido bicinconínico (Chen y Zhong 2014b).

Animales

Se utilizaron 20 ratones hembras de 8-12 semanas de edad de la cepa BALB/c los cuales serán proporcionados por el bioterio del Laboratorio de Inmunología y Virología de la UANL donde también se alojarán. Se mantendrán en jaulas microventiladas con acceso a agua y alimento ad libitum con un ciclo luz/oscuridad de 12 h, a una temperatura ambiental controlada de 22°C y humedad relativa de 45 %. Se enriquecerá su ambiente con tubos de cartón para la creación de nidos y recreación del murino.

Todos los procedimientos de trabajo con los animales cumplen con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio y han sido sometidos para su revisión por el Comité de Ética de Investigación y Bienestar Animal de la Facultad de Ciencias Biológicas (CEIBA) UANL, con número de registro CEIBA-2021-013.

Para comprobar si la cantidad de animales por grupo tiene una diferencia significativa se utilizó una fórmula utilizada por (Charan y Kantharia 2016).

$$E = \text{Número total de animales} - \text{Número total de grupos} \quad (6.2)$$

Desparasitación del modelo murino

Siguiendo el protocolo de Lytvynets, se diluyeron 25 mg de ivermectina en 1 L de agua para beber y se colocó en los bebederos a una concentración final de 2.5 mg/kg de peso corporal durante 5 días, para prevenir la precipitación del fármaco se agitó el agua cada día (Lytvynets et al. 2010).

Sensibilización del modelo murino

Siguiendo el protocolo de Orgel, los ratones hembra de la cepa BALB/c se inyectaron vía intraperitoneal administrando 50 μL del alérgeno comercial y 50 μL de alumbre inyectable, al día 0 y al 15 para la etapa de sensibilización, al día 28 y 30 se inyectó 100 μL del alérgeno para la etapa de reexposición (Orgel y Kulis 2018).

Anestesia del modelo murino

Siguiendo el protocolo de la Investigación de Animales Vertebrados se combinaron 1.75 mL de ketamina (100 mg/mL) con 0.25 mL de xylazine 10 % en 8 mL de solución salina estéril a una dosis de 0.1 mL por cada 10 g del animal y se inyectó de manera intramuscular (Vertebrate Animal Research 2020).

Escarificación en un modelo murino

Una vez anestesiado el modelo, utilizando una lanceta impregnada con el alérgeno se realizó una ligera herida en la almohadilla del animal, 10 minutos después se procedió tomar fotografías, si ocurría una inflamación se consideraba al ratón como alérgico. Se utilizó como control positivo la histamina (Mayo Clinic 2018).

Toma de muestra a modelo murino

Para la toma de muestra se procedió a realizar una toma de muestra sanguínea por medio de una punción cardiaca.

Con el animal previamente anestesiado se colocó en decúbito supino y se localizó la

apófisis xifoides del esternón y se pinchó de manera frontal debajo de la caja torácica con un ángulo de 30° , se llenará la jeringa retrayendo el émbolo lentamente y al final de la extracción se realizó una dislocación cervical al modelo (Gamazo et al. 2017).

Determinación de la inmunoglobulina E por ELISA

Siguiendo el protocolo de Ansotegui, se utilizará el Kit de Elisa IgE de ratón de la marca Invitrogen (Ansotegui et al. 2020).

Se agregaron $100\ \mu L$ de las muestras de suero de los ratones previamente sensibilizados y sus controles en cada pozo de la placa del kit y se cubrieron y fueron incubados por 2.5 horas a temperatura ambiente a una ligera agitación. Una vez pasado este tiempo, se removió la solución y se lavaron 4 veces utilizando $300\ \mu L$ de buffer de lavado 1X. Una vez lavada la placa, se colocó la fila de pozos sobre papel secante para decantar cualquier residuo del lavado.

Se agregaron $100\ \mu L$ de la solución del conjugado de biotina, se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente con ligera agitación y se volvió a lavar. Una vez lavado se agregaron $100\ \mu L$ de la solución preparada Streptavidin-HRP, se incubó por 45 minutos a temperatura ambiente con ligera agitación y se volvieron a lavar los pozos, después se agregaron $100\ \mu L$ del substrato de TMB a cada pozo y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y ligera agitación. Finalmente se agregó $50\ \mu L$ de solución stop, se dieron ligeros golpes en el extremo de la placa y durante los primeros 30 minutos se leyó la placa a una absorbancia de 450 nm en un lector de placa.

Conteo de células sanguíneas

Utilizando la sangre de la punción cardíaca se colocaron $5\ \mu L$ de la sangre a 3/4 en un portaobjetos y con otro a portaobjetos inclinado a 15° y se espera a que se forme una línea de la sangre y se arrastra el segundo portaobjetos sobre el primero.

Después de realizar el protocolo de tinción de Wright (Gurrola y Vidal 2012), en donde se fijaron los frotis con metanol en una gradilla de tinción, después se colocaron de 1 a 2 mL de colorante durante 3 a 4 min., después se agregó suavemente el Buffer de Fosfatos a una misma cantidad y se dejó reposar de 5 a 6 min, tratando de evitar derrames (Se recomienda soplar con una pipeta). Se procedió a quitar el colorante con agua destilada en forma horizontal y se dejó secar la muestra. Una vez seca se colocó en el microscopio con una gota de aceite de inmersión y se observó con un objetivo de 100X y se procedió a contar hasta llegar a un número de 100 células por muestra.

Administración del tratamiento

En los 5 grupos: **control positivo, control negativo, Alérgeno, ZNps, AZNps** se siguió el protocolo de Jones, una vez a la semana se administró 1 mL del tratamiento por medio de una aguja sin filo de 5 mL teniendo al modelo en posición vertical y evitando lastimar el esófago, esto se realizó durante 4 semanas (Jones, Boyd y Wallace 2016).

Determinación de la presencia de citocinas Th1, Th2 y Th17

Siguiendo el protocolo de Gamazo, se utilizó el kit de citocinas BD™Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 de la marca Becton, Dickinson and Company (BD).

Previamente resuspendidas se agregaron 150 μ L de cada perla de captura a un tubo de microcentrífuga previamente etiquetado como "Mezcla de perlas" se agitó por vortex por 60 segundos.

Se resuspendió la "Mezcla de perlas" utilizando un vortex y se agregaron 50 μ L, 50 μ L de cada muestras y 50 μ L del reactivo de detección PE Th1/Th2/Th17 de ratón en todos los tubos de ensayo. Se incubó por 3 horas a temperatura ambiente

protegido de luz y después se agregó 1 mL de buffer de lavado a cada tubo de ensayo y se centrifugó a 200g durante 5 minutos y se retiró el sobrenadante a cada tubo y se agregaron 300 μ L de PBS estéril a cada tubo para resuspender la perla y se leyeron en un citómetro de flujo para su análisis y determinación de citocinas (Gamazo et al. 2017).

Análisis estadístico

Los datos se representan como la media $\pm$ desviación estándar. Las diferencias entre el grupo control y grupos experimentales fueron analizados mediante una prueba de ANOVA una vía y fueron analizados mediante el software GraphPad 8.

Resultados

Estandarización de los parámetros de sensibilización en el modelo murino contra el alérgeno de *Arachis hypogaea*

Se sensibilizaron ratones hembra de la cepa BALB/c contra las proteínas del cacahuate y se cuantificó la IgE en suero. En los ratones sensibilizados se encontró una concentración de 400 a 500 ng/mL, mientras que en los controles se encontró una concentración de 100 a 150 ng/mL, como se observa en la fig. 7.1.

Concentración de IgE en suero en un modelo murino

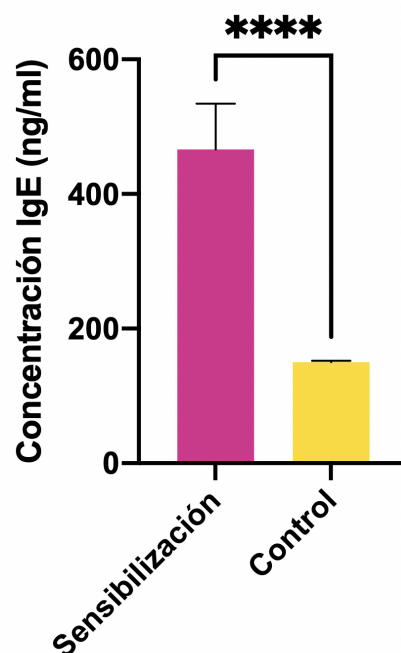


Figura 7.1: Gráfica de concentración de Inmunoglobulina E en ratones sensibilizados.

Escarificación un modelo *in vivo*

Se realizó una ligera herida en las almohadillas de los ratones y se expusieron a proteínas de cacahuete (Fig 7.2, 7.3, 7.4 y 7.5). En todas las imágenes, la primera columna se encuentran los ratones sensibilizados sin exposición, en la segunda columna se encuentran los ratones sensibilizados y la tercera columna se observa expuestas al control positivo, siendo la histamina. En las figuras 7.2, 7.3, 7.4 se observa como hay una inflamación y un enrojecimiento en las almohadillas del modelo similar o mayor a la histamina. En la figura 7.5 se observa como no hay un inflamación al compararse con el control positivo, demostrando que estos ratones no desarrollaron alergia al cacahuete.

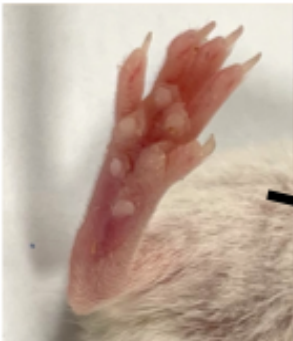
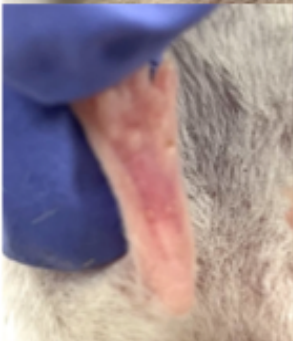
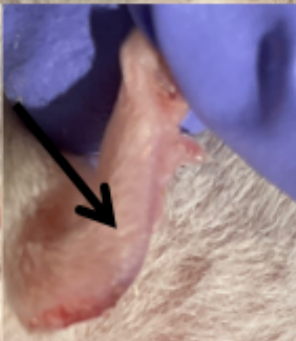
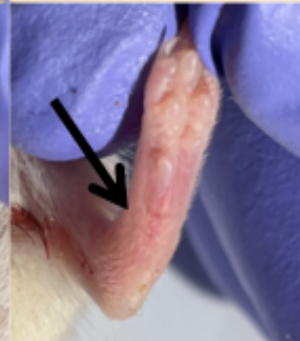
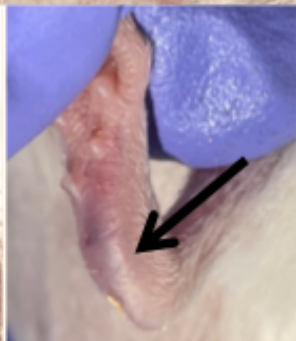
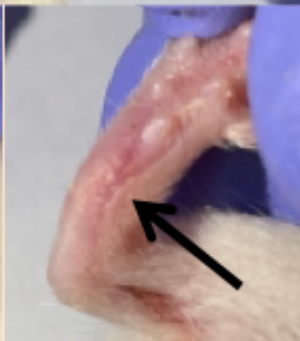
Control	Alérgeno	Control Positivo	Resultado
			Positivo
			Positivo
			Positivo
			Positivo

Figura 7.2: Fotografías de almohadilla del modelo *in vivo* previamente sensibilizado expuestos a control, control negativo e histamina. Se observa como los ratones son alérgicos a las proteínas del cacahuete.

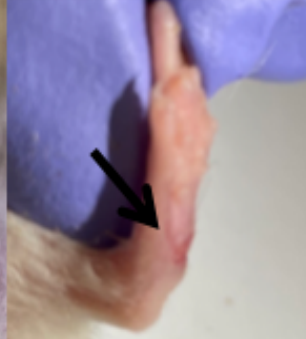
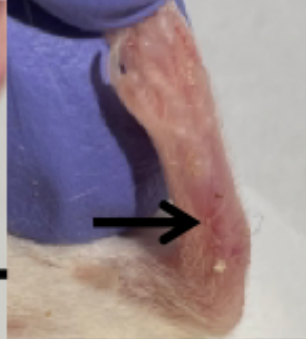
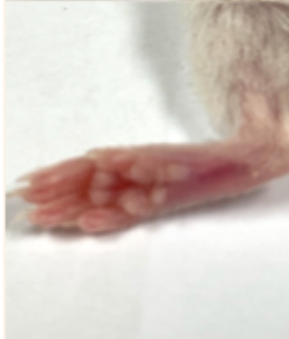
Control	Alérgeno	Control Positivo	Resultado
			Positivo
			Positivo
			Positivo
			Positivo

Figura 7.3: Fotografías de almohadilla del modelo *in vivo* previamente sensibilizado expuestos a control, control negativo e histamina. Se observa como los ratones son alérgicos a las proteínas del cacahuete.

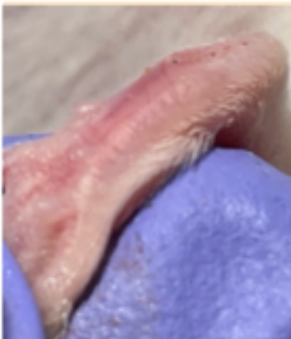
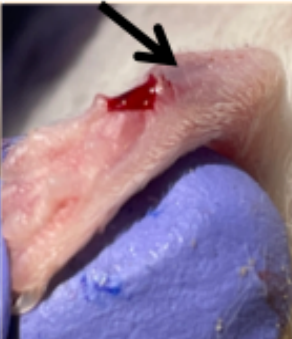
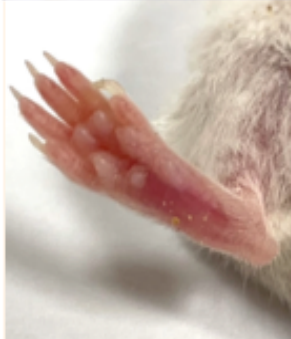
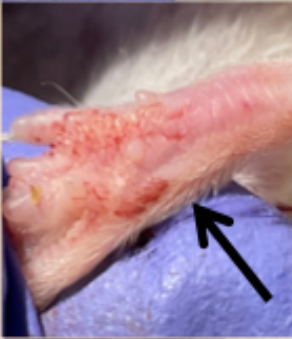
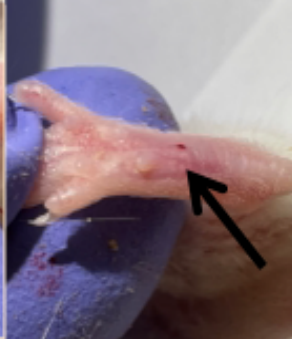
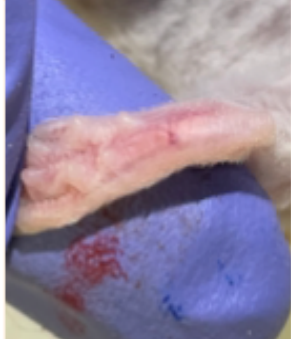
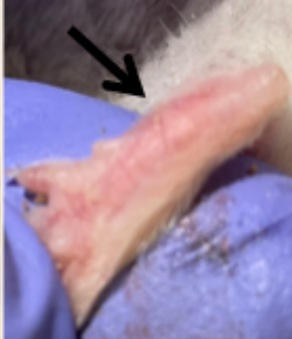
Control	Alérgeno	Control Positivo	Resultado
			Positivo
			Positivo
			Positivo
			Positivo

Figura 7.4: Fotografías de almohadilla del modelo *in vivo* previamente sensibilizado expuestos a control, control negativo e histamina. Se observa como los ratones son alérgicos a las proteínas del cacahuete.

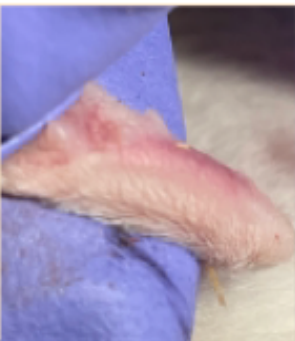
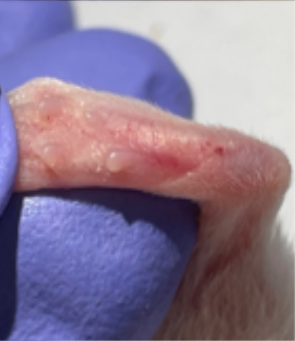
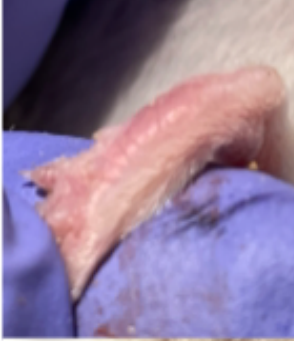
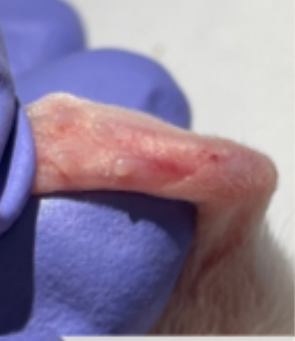
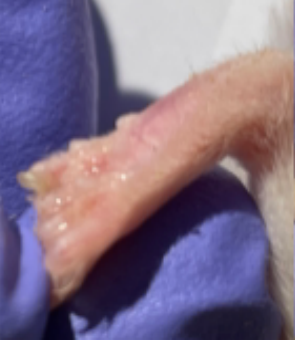
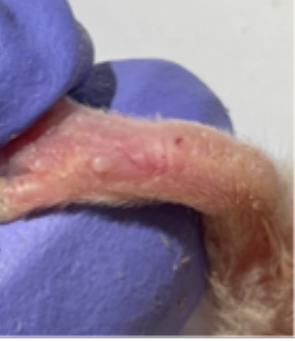
Control	Alérgeno	Control Positivo	Resultado
			Negativo
			Negativo
			Negativo
			Negativo

Figura 7.5: Fotografías de almohadilla del modelo *in vivo* previamente sensibilizado expuestos a control, control negativo e histamina. Se observa como los ratones no son alérgicos a las proteínas del cacahuete.

Conteo celular de basófilos y eosinófilos en ratones sensibilizados

	Basófilos	Eosinófilos
Control	1 %	1 %
Alérgico	6 %	6 %

Tabla 7.1: Cuantificación de basófilos y eosinófilos en un modelo sensibilizado y control.

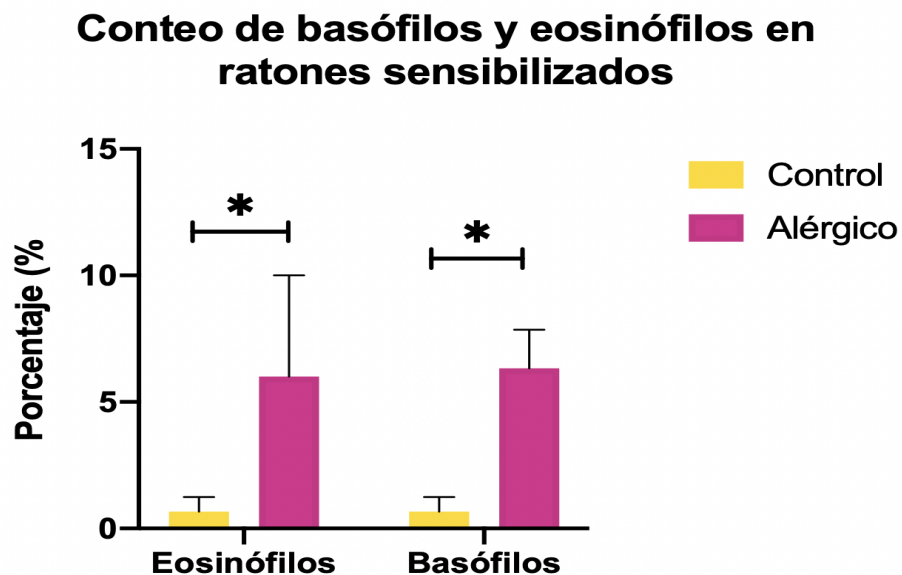


Figura 7.6: Cuantificación de basófilos y eosinófilos en sangre de ratones alérgicos.

Determinación de la dosis mínima del alérgeno

Con el objetivo de determinar la dosis mínima del alérgeno como tratamiento, se cuantificó la IgE en sangre de ratón hipersensible expuesto de manera *in vitro* al alérgeno. Sin embargo no se observó una diferencia significativa en este indicador entre las dosis evaluadas (Fig. 7.7).

Determinación de la dosis mínima del alérgeno

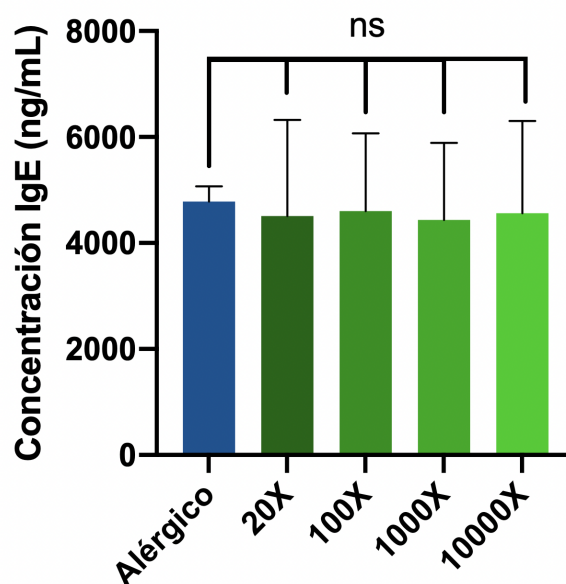


Figura 7.7: Determinación de la dosis mínima del alérgeno *in vitro*.

Síntesis y caracterización de las partículas de zeína

Se sintetizaron y caracterizaron partículas de zeína por DLS, tabla 7.2 y figs. 7.9 y 7.10, se obtuvieron un tamaño de 109 nm, una polidispersidad de 0.2 u.a. como se muestra en la fig 7.9a y una carga superficial de -23.7 mV al día 0 (fig. 7.10a). Al día 30 se obtuvieron resultados de 141.3 nm, 0.06 u.a. (Fig 7.9b) y -24.4 mV (7.10b), como se observa en la tabla 7.2. En la figura 7.8 se observa como las partículas tienen un color azul tornasol, característico de polímeros en estado nanométrico.

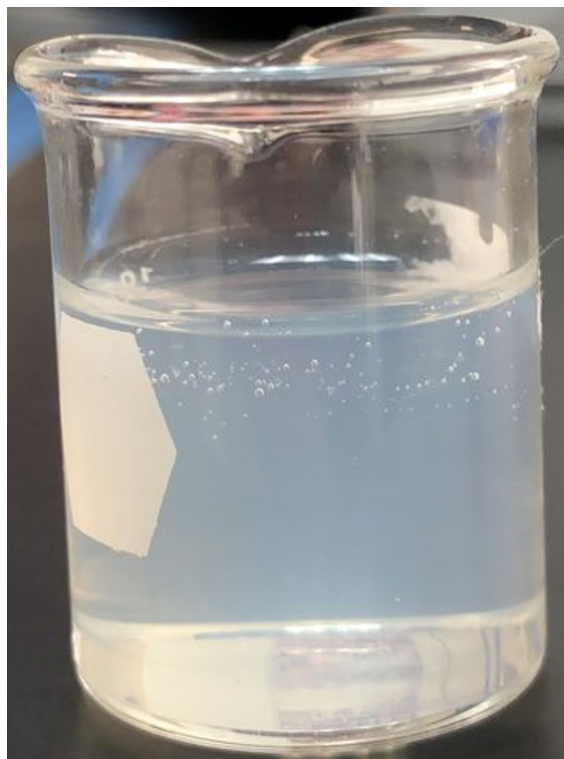
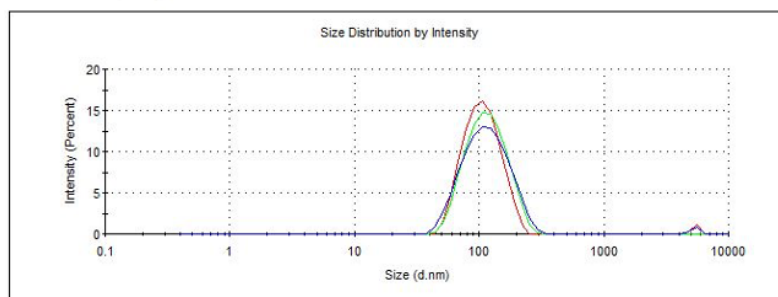


Figura 7.8: Partículas de zeína en estado nanométrico. Donde se observa un color azul en tonalidad tornasol.

Tiempo	Tamaño nm	Polidispersidad u.a.	Carga Superficial mV
Día 0	109.7	0.24	-23.7
Día 30	141.3	0.06	-24.4

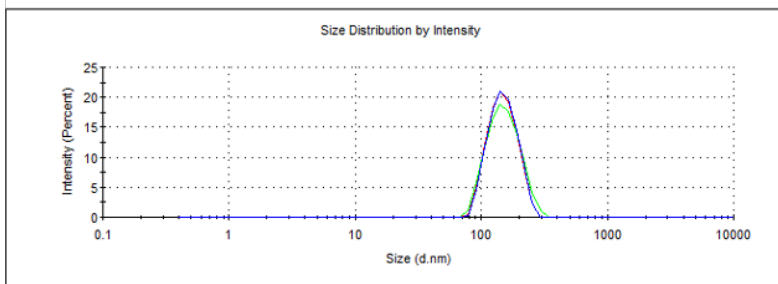
Tabla 7.2: Parámetros de caracterización de ZNps.

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 109.7	Peak 1: 109.7	98.6	35.99
Pdl: 0.240	Peak 2: 5404	1.4	306.6
Intercept: 0.957	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality: Good			



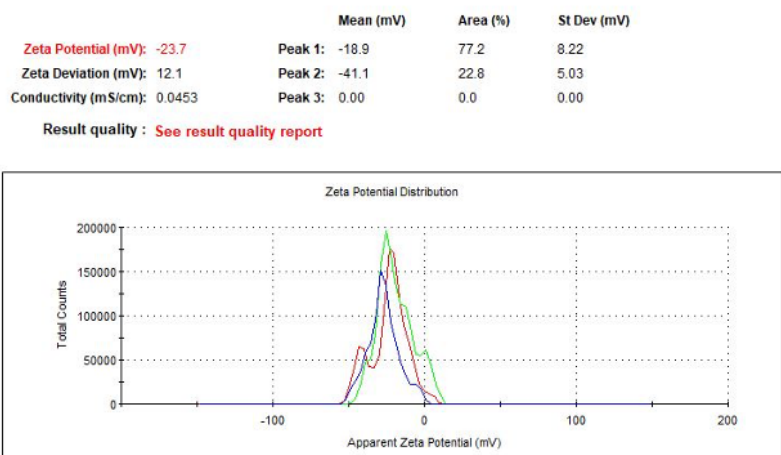
(a) ZNps al día 0 con un tamaño de 109 nm y 0.24 u.a.

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 141.3	Peak 1: 150.8	100.0	38.41
Pdl: 0.066	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.969	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality: Good			

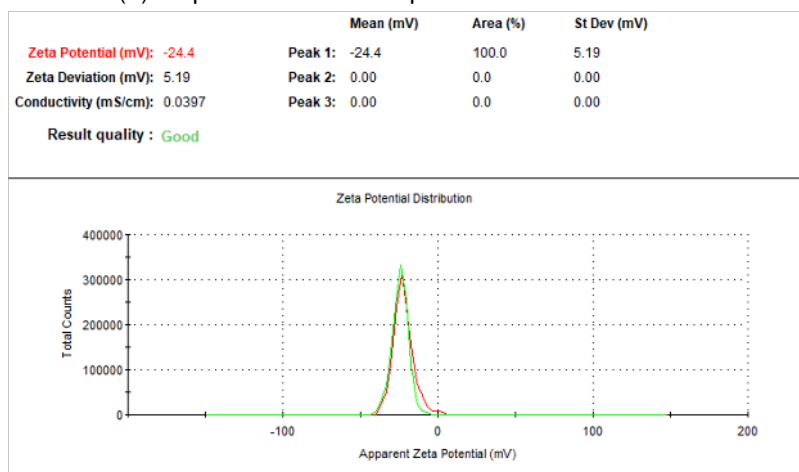


(b) ZNps al día 30 con un tamaño de 141 nm y 0.06 u.a.

Figura 7.9: Caracterización del tamaño y polidispersidad de las ZNps al día 0 y con un de 30.



(a) ZNps al día 0 con un potencial Z de -23.7 mV.



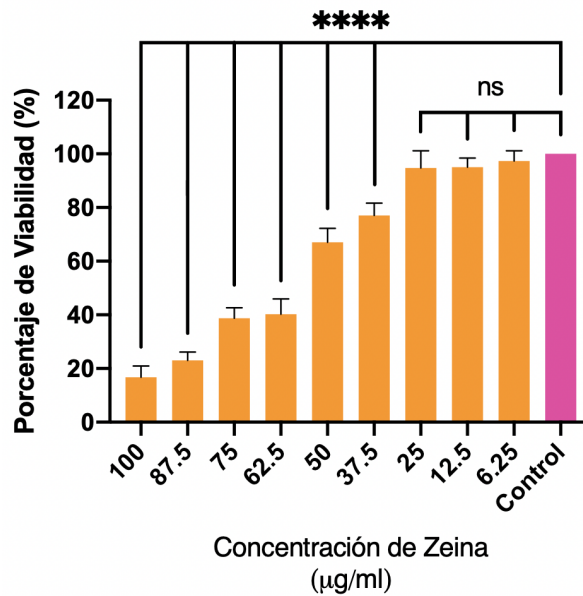
(b) ZNps al día 30 con un potencial Z de -24.4 mV.

Figura 7.10: Caracterización de la carga superficial de las partículas de zeína al día 0 y 30.

Pruebas de viabilidad de las partículas en la línea celular HT29

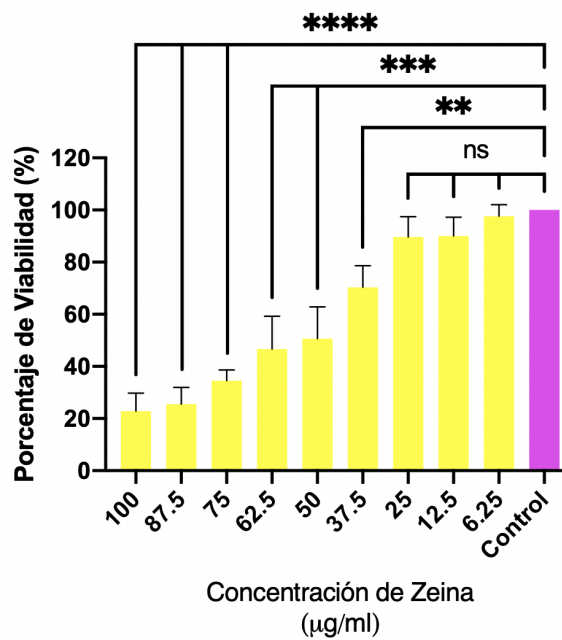
Se determinó la dosis máxima que no presentara una diferencia significativa comparada con el control de las partículas de zeína en la línea celular de cáncer de colón murino (Fig.7.11a), utilizando como dosis la concentración de 25 $\mu\text{g/mL}$. También se comparó la viabilidad de la zeína en la misma línea celular (Fig.7.11b) encontrando la misma dosis sin diferencia significativa que el control (Fig 7.11).

Prueba de Viabilidad de ZNps en HT29 a 24 h



(a) Partículas de zeína

Prueba de Viabilidad de Zeína en HT29 a 24 h



(b) Zeína

Figura 7.11: Curva de viabilidad de las partículas de zeína y zeína diferentes concentraciones en la línea celular HT29

Determinar el porcentaje de encapsulación de las partículas de zeína

Se determinó el porcentaje de encapsulamiento de las OZNps a 500, 1000, 3000, 7000 y 13000 revoluciones por minuto, realizando un promedio de la cantidad de proteína liberada, comparando contra las partículas sin encapsular, se determinó que las partículas encapsulan en un 60 % en base de la proteína inicial (Fig. 7.12).

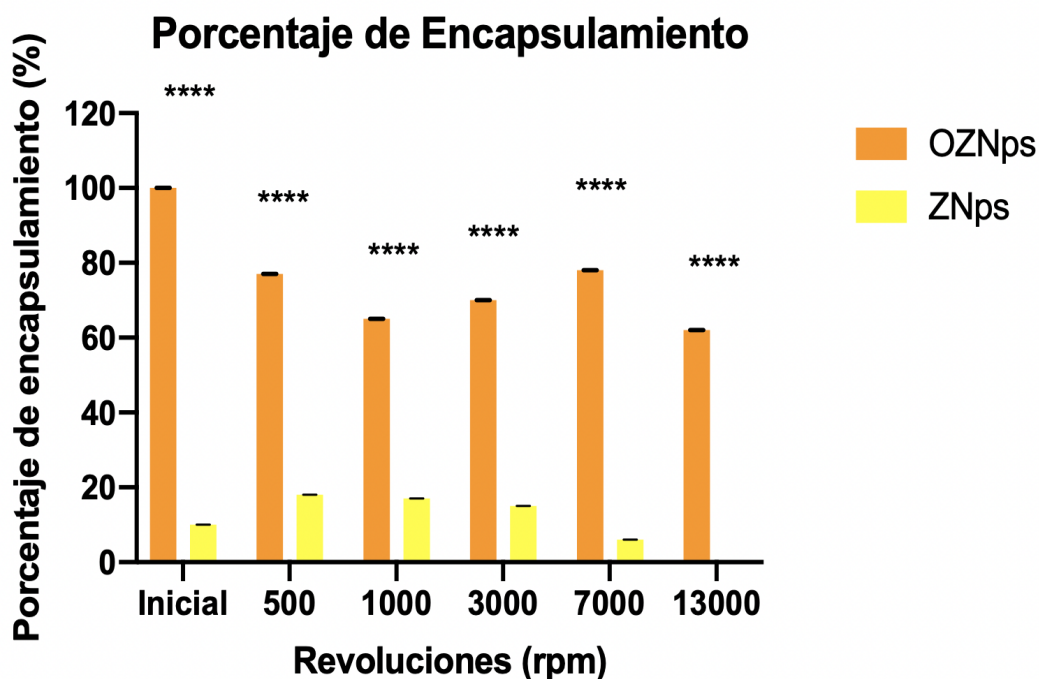


Figura 7.12: Porcentaje de encapsulamiento, con una media del 60 %.

Determinar los perfiles de liberación de las partículas de zeína a pH 2 y 8.

Se determinó el porcentaje de liberación de las OZNps a diferentes pHs. A pHs alcalinos se observa como se va incrementando la concentración de proteína liberada,

teniendo como liberación máxima a las 2 horas, comparandolo a un pH ácido se observa como se mantiene la cantidad de proteína, teniendo como un punto máximo a las 3 horas, después disminuye de manera considerable a las 6 horas (Fig. 7.13).

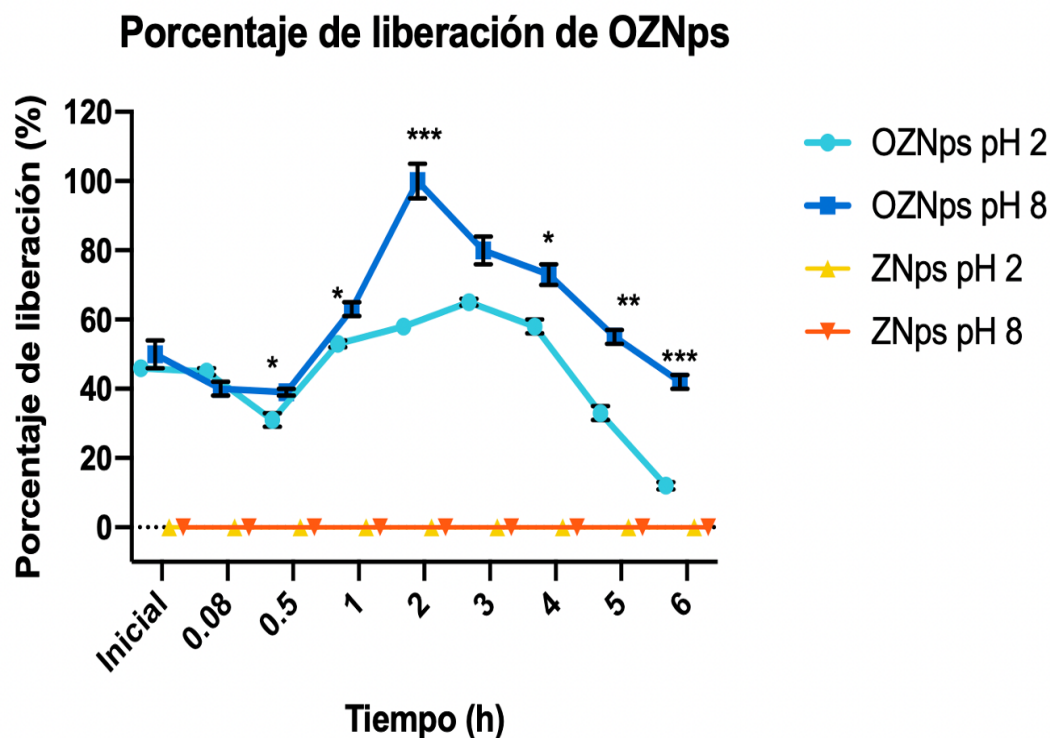


Figura 7.13: Porcentaje de liberación a pH 2 y 8, teniendo como punto máximo de liberación a 2 horas en pH básico

Determinar la presencia de citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IFN, TFN, IL-17A y IL-10

Se cuantifico el perfil de citocinas en el modelo murino para determinar la subpoblación de linfocitos Th1/Th2/Th17. El color azul es control positivo, el color gris indica color negativo, el color verde es el grupo donde se le administró el alérgeno, el color amarillo donde se administraron ZNps y el color rojo donde se administro AZNps. Se observó una diferencia significativa en la IL-2, IL-6 e IL-10. No se observó una diferencia significativa en IL-4, IL-17A, TNF- α e IFN- γ .

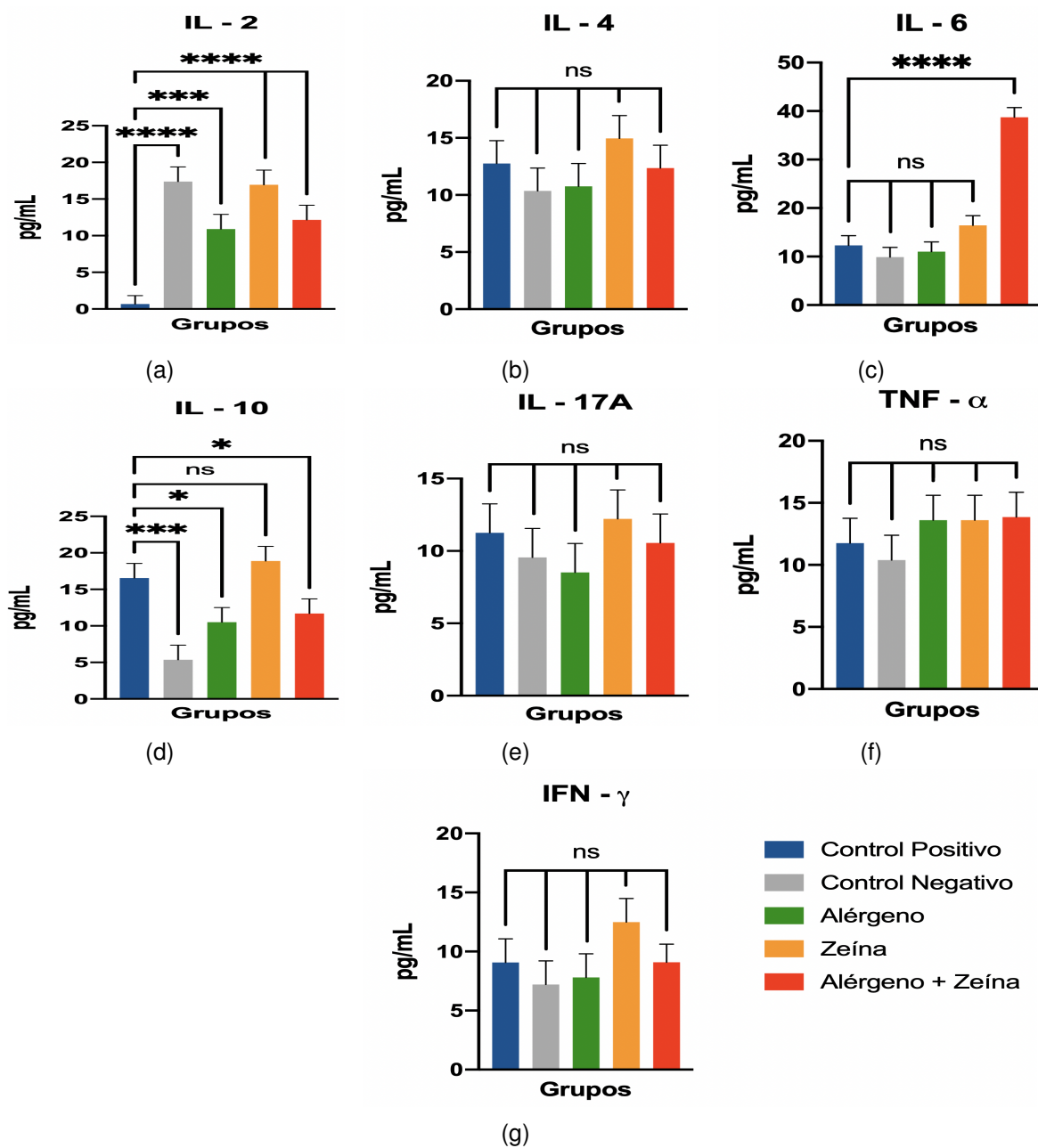


Figura 7.14: Perfil de citocinas, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF- α y IFN- γ en suero de ratones alérgicos con sus respectivos tratamientos

Discusión

Los ratones no padecen una alergia de manera natural, por lo que es necesario desarrollar un modelos murinos para analizar la hipersensibilidad, sin embargo no todos los modelos *in vivo* pueden utilizarse para cualquier hipersensibilidad, depende de la especie y que la cepa sean susceptible al alérgeno y al método de inducción (Schülke y Albrecht 2019). Se han reportado varios modelos murinos que son susceptibles a una sensibilización contra el cacahuete (Van-Gramberg et al. 2013). En el 2017 Gamazo menciona que más fácil lograr una sensibilización en la cepa CD1 que en BALB/c, sin embargo ellos utilizaron como agente sensibilizante la toxina de cólera, el cual lo utilizan para dañar la barrera intestinal (Gamazo et al. 2017), sin embargo se ha reportado que la cepa BALB/c, a diferencia de la cepa BALB/cj no es susceptible a la toxina de cólera (Briard et al. 2022), por lo fue necesario utilizar otro adyuvante.

Se utilizó el hidróxido de alumbre, utilizando la metodología de Platzer, modificando el alérgeno a cacahuete. (Platzer et al. 2015). Varios autores han reportado diferentes concentraciones de IgE, variando desde 400 pg/mL a 4 μ g/mL (Gamazo et al. 2017; Brandt et al. 2003), dependiendo del método de sensibilización, el alérgeno y la cantidad. Después de la sensibilización con su reexposición se midió la cantidad de IgE del modelo murino, como se observa en la gráfica 7.1, se utilizó un ratón al cual no se combinó con las proteínas de cacahuete y fungieron como control negativo, teniendo una concentración de 72 ng/mL, comparándolo con los controles sensibilizados, existe una diferencia significativa, indicando que el los ratones fueron exitosamente sensibilizados, produciendo mayores cantidades de IgE que el control.

Para confirmar si una persona es alérgica se realiza una prueba cutánea, en donde se lastima ligeramente la primera de la capa de la piel y se colocan los alérgenos,

si la persona es alérgica se originará un eritema y se hinchará la zona, si es mayor a 3 mm se considera a la persona alérgica a ese alérgeno (Ansotegui et al. 2020). Sin embargo, en modelos murinos no se realizan pruebas cutaneas, por lo que en este estudio, para corroborar la alergia sin sacrificar al animal, se inyectó solución de proteínas de cacahuete en la almohadilla del animal, solución de Hanss como control negativo e histamina como control positivo, como se observa en las figuras 7.2, 7.3, 7.4, y 7.5. En las primeras 3 figuras se observa una inflamación localizada, corroborando con estos resultados la sensibilización específica al cacahuete.

El conteo de eosinófilos y basófilos que se muestra en la figura 7.6 mostró un incremento del 6 % en relación a los controles basales, lo cual corresponde con lo reportado por Jacobsen y Siracusa, esto debido a que la inmunoglobulina E se une a la superficie de eosinófilos y basófilos, activando la desgranulación de estas células y liberando mediadores químicos causantes de cuadros de hipersensibilidad (Jacobsen et al. 2014; Siracusa et al. 2018).

Gamazo en el 2017 administró alérgenos pulverizados al modelo murino cepa BALB/c (Gamazo et al. 2017), en este trabajo se administraron alérgenos comerciales en solución líquida, por lo que se decidió cuantificar la IgE exponiendo a diferentes concentraciones el alérgeno, para determinar la mínima dosis que tuviera un aumento de esta inmunoglobulina. En la figura 7.7 no hubo diferencia significativa entre las concentraciones, por lo que se optó por utilizar una dosis más baja a la comúnmente administrada en México, 10'000X.

Reportes previos de nanopartículas de zeína utilizan algún tipo de estabilizante o molécula para lograr una síntesis más estable y con ello tamaños más grandes, desde 69 nm hasta 200 nm (Xu et al. 2011; Luo, Teng y Wang 2011). Existen reportes previos de síntesis sin estabilizantes con un tamaño mayor desde 200 nm y poca estabilidad (Chen y Zhong 2014b), en este trabajo se logró sintetizar partículas sin estabilizante, utilizando un tratamiento previo a la zeína con calor, esto le permitió desnaturalizarse parcialmente (Sun et al. 2016), al agregarse al agua, sus fragmentos hidrófobos al ser más cortos, permiten la formación de una partícula de menor tamaño, como la obtenida, de 104 nm.

Uno de los problemas al momento cuantificar la cantidad de proteína tanto encapsulada como liberada fue la metodología. Gamazo reportó la encapsulación de sus

nanopartículas poliméricas utilizando la técnica de ácido bicinconínico (Gamazo et al. 2017), sin embargo la técnica mide la reducción de Cu^{+2} a Cu^{+1} en 3 tipos de aminoácidos: cisteína, tirosina y tritófano (Scientific 2015), de los cuales la zeína contiene dos, 3 cisteínas y 8 tirosinas (Padua y Guardiola 2015), por lo que crea un error al momento de medir por esta técnica, por lo que fue necesario medir las partículas de zeína sin encapsular como control y la diferencia de proteína sería la cantidad encapsulada y subsecuentemente liberada.

La efectividad de la encapsulación de las ZNps ha sido reportada de un 15 % a un 50 % (Nunes et al. 2020; Xu et al. 2011). En este trabajo se logró encapsular un 60 % de proteína en las partículas, esto es debido al pre-tratamiento de la zeína y la optimización de parámetros de síntesis. Esto permitió aumentar el porcentaje de encapsulamiento sin necesidad de un estabilizador.

Debido al objetivo terapéutico de las partículas fue necesario cuantificar la liberación a diferentes pHs, simulando al estómago (pH 2) y al intestino (pH 8), por lo que se diseñó una metodología basada en Chen (Chen y Zhong 2014a), obteniendo una liberación máxima a las dos horas en un pH básico, mientras que la partícula logra mantenerse estable a un pH ácido. Esto es debido a que en soluciones pHs básicos sufre una modificación estructural, disminuyendo los α -hélices, de la proteína. (Zhang, Luo y Wang 2011).

Aunque no hay un esquema definitivo de linfocitos T en individuos que hayan utilizando AIT, se han reportado tendencias a perfiles Th1/Th2/Th17 (Smeekens y Kulis 2020), sin embargo no hay estudios que describan un perfil específico de las citocinas relacionadas con la tolerancia inmunológica IL-4, IL-13, IL-9, $IFN\gamma$, IL-12, $TG-\beta$ e IL-10 (Zelm et al. 2019), para esto se han desarrollado una variedad de modelos murinos han sido desarrollados, sin embargo, ningún modelo mimetiza completamente los parámetros tanto clínicos como inmunológicos hacia la alergia en humanos, ya que los parámetros que afectan los resultados son: 1) la cepa del ratón, 2) el alérgeno, 3) la vía de administración (intraperitoneal, intranasal, intratraqueal, subcutánea o oral), 4) el régimen de dosis (baja, alta o escalante), 5) tipo de adyuvante (alumbre, endotoxinas o ninguno), 6) la duración del tratamiento (rápido, gradual, o intermedio) (Pfützner 2015), por lo que cada modelo debe analizarse manteniendo parámetros comparativos internos.

Solo el grupo ZNps se observó diferencia significativa en la secreción de interleucina IL-2, típicamente relacionada con las células Th2 (Fig. 7.14a), sin embargo no existen reportes donde se indique que la zeína induzca una inflamación de este tipo, al contrario, en el 2017, Liang reportó una disminución de TNF- α utilizando péptidos de zeína, sugiriendo una terapia alternativa con el objetivo de disminuir la inflamación (Liang et al. 2018), en este trabajo no se observó una diferencia significativa entre ZNps y los demás grupos (Fig. 7.14f), a diferencia de en este trabajo se sugiere que no se observó esta misma actividad debido a la conformación estructural y química de las nanopartículas, tratadas previamente con calor.

En el 2018 Utomo y colaboradores compilaron información con respecto a la IL-2, la cual tiene como objetivo mantener la supervivencia y función de las células Treg para suprimir la respuesta inmunológica, la deficiencia de esta interleucina aumenta la proliferación y la baja regulación de los linfocitos T y B, causando autoinmunidad (Utomo et al. 2019), en este trabajo se obtuvo una diferencia altamente significativa de esta interleucina con respecto al control positivo como se muestra en la figura 7.14a, este resultado sugiere que se presentó un aumento de T reguladoras, posiblemente, debido a una inducción de la tolerancia hacia el alérgeno de cacahuete después del tratamiento.

La IL-6 es producida por macrófagos y contribuye a la inflamación alérgica tipo 1 que incluye una acumulación de eosinófilos, producción de IgE y hipersecreción de mucosa (Gubernatorova et al. 2018), en la figura 7.14c se observa un aumento significativo de esta citocina en el grupo AZNps, lo que puede indicar una tendencia hacia el perfil Th2, sin embargo Wisniewski indica que los linfocitos Treg aumentan la producción de la IL-6 por parte de los mastocitos que son activados por la unión con TGF- β en su superficie (Wisniewski, Agrawal y Woodfolk 2018), lo que ocurre en una inmunoterapia, lo que puede indicar una diferenciación a células T reguladoras.

Para la producción IL-10 no se observó diferencia significativa en relación con el grupo de ZNps, pero se determinó una disminución significativa con los grupos de alérgeno y AZNps, lo cual contrasta con lo reportado por otros autores, sin embargo, Wisniewski reporta que la primera interleucina secretada en el proceso de inducción de la tolerancia es la IL-10, por lo que una disminución puede indicar que este proceso se encuentra en una etapa tardía del inicio de la tolerancia (Wisniewski, Agrawal y Woodfolk 2018).

Relacionando los resultados el tratamiento de AZNps y su efectividad los resultados mostraron activación de IL2 pero no de IL10, por lo que sería importante optimizar el tiempo del sacrificio, aumentar las dosis del tratamiento y medir linfocitos T reguladores para comprobar la inducción de la tolerancia. Para las ZNps el porcentaje de encapsulación es superior al reportado en literatura y demostraron ser un buen acarreador por lo que son una alternativa prometedora para estudios que requieran condiciones protección a pHs ácidos y una liberación en pHs básicos.

Conclusión

Se estandarizó y validó exitosamente un modelo de inducción de hipersensibilidad al cacahuete en ratones de la cepa BALB/c, caracterizado por un aumento en IgE en suero, e inflamación de la almohadilla plantar del ratón, e incremento en el porcentaje de basófilos y eosinófilos en sangre.

Se diseñó un sistema de liberación contralada a base de zeína dirigido a intestino, con un tamaño promedio de 109 nm y con una carga superficial de -23.4 mV. Con un porcentaje de encapsulación de un 60 %, superior al reportado en literatura, una liberación máxima de 2 horas en un ambiente básico y que puede resistir durante 6 horas a pH ácido.

Se observó un aumento en la producción de IL-2 e IL-6 y una baja en IL-10, lo que implica una activación de T reguladoras y la inducción de la vía inflamatoria, lo que sugiere que es necesario aumentar las dosis del tratamiento para observar una mayor respuesta un perfil de citocinas que correlacione con una respuesta de tolerancia.

Perspectivas

Optimizar los parámetros (Edad, ayuno, dosis, tiempo de reexposición) de sensibilización del modelo murino contra el alérgeno de *Arachis hypogaea* y cuantificar los valores basales y alérgicos de las inmunoglobulinas E, G1, A y el perfil de citocinas para una diferenciación de linfocitos Th1, Th2 y Th17.

Evaluar el efecto de enzimas del tracto digestivo en el perfil de liberación de AZNps a pH 2, 7 y 8.

Evaluar la inducción de la tolerancia post-tratamiento de AZNps con cortes histológicos, conteo de mastocitos, perfil de citocinas Th1/Th2/Th17 y la presencia de células T reguladoras como respuesta al tratamiento.

Bibliografía

- Abbas, Abul, Andrew Lichtman y Shiv Pillai (2015). *Inmunología celular y molecular*. Elsevier. ISBN: 9780323222754.
- American College of Allergy (2022). *Allergy Immunotherapy*. URL: <https://acaai.org/allergies/management-treatment/allergy-immunotherapy/>. (accessed: 25.03.2022).
- Ansotegui, Ignacio et al. (2020). "IgE allergy diagnostics and other relevant tests in allergy, a World Allergy Organization position paper". En: *World Allergy Organization Journal* 13.
- Brandt, Eric et al. (2003). "Mast cells are required for experimental oral allergen-induced diarrhea". En: *The Journal of Clinical Investigation* 211.11, págs. 1666-1677.
- Briard, Mélanie et al. (2022). "Route of sensitization to peanut influences immune cell recruitment at various mucosal sites in mouse: An integrative analysis". En: *Nutrients* 14.790.
- Charan, Jaykaran y N. Kantharia (2016). "How to calculate sample size in animal studies?" En: *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics* 4.4, págs. 303-306.
- Chen, Huaqiong y Qixin Zhong (2014a). "A novel method of preparing stable zein nanoparticle dispersions for encapsulation of peppermint oil". En: *Food Hydrocolloids*.
- (2014b). "Processes improving the dispersibility of spray-dried zein nanoparticles using sodium caseinate". En: *Food Hydrocolloids* 35, págs. 358-366.
- Chu, Derek et al. (2019). "Oral immunotherapy for peanut allergy (PACE): A systematic review and meta-analysis of efficacy and safety". En: *The Lancet* 393, págs. 2222-2232.
- Dispenza, Melanie (2019). "Classification of hypersensitivity reactions". En: *Allergy and Asthma Proceedings* 40.6, págs. 43-49.

- Food and Drug Administration (2008). *CFR - Code of Federal Regulations Title 21*. U.S. Food y Drug Administration.
- Gamazo, Carlos et al. (2017). "Oral immunotherapy using polymeric nanoparticles loaded with peanut proteins in a murine model of fatal anaphylaxis". En: *Immunotherapy* 9.15, págs. 1205-1217.
- Grayson, Mitchell (2018). *Allergy Treatment*. URL: <https://www.aafa.org/allergy-treatments/>. (accessed: 11.05.2022).
- Gubernatorova, Ekaterina et al. (2018). "Non-redundant functions of IL-6 produced by macrophages and dendritic cells in allergic airway inflammation". En: *Frontiers in Immunology* 9.
- Gurrola, Ana y Fernando Vidal (2012). "Tinción de Wright". En: *Introducción al Análisis Clínico - Manual de Prácticas*. Universidad Nacional Autónoma De México, págs. 214-222.
- Instituto Mexicano del Seguro Social (2017). *Personas con alergias, un grupo de riesgo ante la emergencia si no están bajo control*. URL: <http://www.imss.gob.mx/prensa/archivo/201708/244>. (accessed: 12.03.2021).
- Jacobsen, Elizabeth et al. (2014). "Eosinophil activities modulate the immune/inflammatory character of allergic respiratory responses in mice". En: *Allergy* 69.3, págs. 315-327.
- Jones, Carissa, Kelli Boyd y Jeanne Wallace (2016). "Evaluation of mice undergoing serial oral gavage while awake or anesthetized". En: *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS* 55, págs. 805-810.
- Kucuksezer, Umut et al. (2013). "Mechanisms of immune tolerance to allergens in children". En: *Korean Journal of Pediatrics* 56.12, págs. 505-513.
- Levinson, Warren et al. (2022). "Hypersensitivity (Allergy)". En: *Review of Medical Microbiology & Immunology: A Guide to Clinical Infectious Diseases*, vol. 1. 12. McGraw Hill.
- Liang, Qiufang et al. (2018). "Identification of new anti-inflammatory peptides from zein hydrolysate after simulated gastrointestinal digestion and transport in Caco-2 cells". En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66.5.
- Luo, Yangchao, Zi Teng y Qin Wang (2011). "Development of zein nanoparticles coated with carboxymethyl chitosan for encapsulation and controlled release of vitamin D3". En: *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 60, págs. 836-846.
- Lytvynets, A. et al. (2010). "Drinking water ivermectin treatment for eradication of pinworm infections from laboratory rat colonies". En: *Helminthologia* 47.4, págs. 233-237.

- Mayo Clinic (2018). *Allergy skin tests*. URL: <https://www.mayoclinic.org/tests-procedures/allergy-tests/about/pac-20392895#:~:text=A%5C%20skin%5C%20prick%5C%20test%5C%2C%5C%20also,usually%5C%20done%5C%20on%5C%20the%5C%20forearm..> (accessed: 10.06.2022).
- Moote, William, Harold Kim y Anne Ellis (2018). "Allergen-specific immunotherapy". En: *Allergy, Asthma & Clinical Immunology* 14.53, págs. 53-62.
- Nunes, Rute et al. (2020). "Zein nanoparticles as low-cost, safe, and effective carriers to improve the oral bioavailability of resveratrol". En: *Drug Delivery and Translational Research* 10, págs. 826-837.
- Orgel, Kelly y Michael Kulis (2018). *A mouse model of peanut allergy induced by sensitization through the gastrointestinal tract*. Humana. ISBN: 9781493978960.
- Padua, Graciela y Lía Guardiola (2015). "Microcapsules Produced from Zein". En: *Microencapsulation and Microspheres for Food Applications*. Academic Press, págs. 3-20.
- Pascoli, Mônica, Renata de Lima y Leonardo Fraceto (2018). "Zein nanoparticles and strategies to improve colloidal Stability: A Mini-Review". En: *Frontiers in Chemistry* 6.6.
- Pfützner, Wolfgang (2015). "Allergen-Specific Tolerance. Induction: Of mice and men". En: *International Archives of Allergy and Immunology* 166, págs. 81-83.
- Platzer, Barbara et al. (2015). "Dendritic cell-bound IgE functions to restrain allergic inflammation at mucosal sites". En: *Mucosal Immunology* 8.3, págs. 516-536.
- Schülke, Stefan y Melanie Albrecht (2019). "Mouse Models for Food Allergies: Where Do We Stand?" En: *Cells* 8.546.
- Scientific, ThermoFisher (2015). *Chemistry of Protein Assays*. URL: <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/chemistry-protein-assays.html>. (accessed: 24.02.2022).
- Siracusa, Mark et al. (2018). "Basophils and allergic inflammation". En: *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 123.4.
- Smeekens, Johanna y Michael Kulis (2020). "Evolution of immune responses in food immunotherapy". En: *Immunology and Allergy Clinics of North* 40.1, págs. 87-95.

- Sun, Cuixia et al. (2016). "Effect of heat treatment on physical, structural, thermal and morphological characteristics of zein in ethanol-water solution". En: *Food Hydrocolloids* 58, págs. 11-19.
- Utomo, Bambang et al. (2019). "The role of cytokine interleukin-2, transcription factor of FoxP3 in the immunological regulation of allergic rhinitis". En: *International Journal of Otolaryngology and Head & Neck Surgery* 7.1, págs. 7-19.
- Van-Gramberg, Jenna et al. (2013). "Use of animal models to investigate major allergens associated with food allergy". En: *Journal of Allergy* 2013.
- Vertebrate Animal Research (2020). *Anesthesia*. URL: <https://animal.research.uiowa.edu/iacuc-guidelines-anesthesia>. (accessed: 1.03.2022).
- Wisniewski, Julia, Rachana Agrawal y Judith Woodfolk (2018). "Mechanisms of tolerance induction in allergic disease: Integrating current and emerging concepts". En: *Clinical & Experimental Allergy* 43.2.
- World Allergy Organization (2020). *Anaphylaxis: Global Overview*. URL: <https://www.worldallergy.org/education-and-programs/education/allergic-disease-resource-center/professionals/anaphylaxis-global-overview>. (accessed: 12.03.2021).
- Xu, Helan et al. (2011). "Hollow nanoparticles from zein for potential medical applications". En: *Journal of Materials Chemistry* 21, págs. 18227-18235.
- Zelm, Menno Van et al. (2019). "Recent developments and highlights in immune monitoring of allergen immunotherapy". En: *Allergy* 74, págs. 2342-2354.
- Zhang, Boce, Yangchao Luo y Qin Wang (2011). "Effect of acid and base treatments on structural, rheological, and antioxidant properties of α -zein". En: *Food Chemistry* 124, págs. 210-220.