



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTABLECIMIENTO DE UN MODELO MURINO DE RINITIS ALÉRGICA Y SU
EVALUACIÓN MEDIANTE LOS NIVELES DE IL-4, IgG E IgE ANTI-
OVOALBÚMINA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA

PRESENTA (N)

BRENDA LIZETH MARTÍNEZ HERNÁNDEZ



CDMX

2024



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: MORENO EUTIMIO MARIO ADAN.

VOCAL: PEREZ MONTESINOS GIBRAN.

SECRETARIO: LUCAS GONZALEZ AMELLALLI.

1er. SUPLENTE: RAMIREZ CARRETO RICARDO JAIR.

2° SUPLENTE: TEPALE SEGURA SILVIA ARACELI.

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Unidad de Desarrollo e Investigación en Bioterapéuticos (UDIBI) de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional

ASESOR DEL TEMA: LUCAS GONZALEZ AMELLALLI.

SUSTENTANTE (S): MARTÍNEZ HERNÁNDEZ BRENDA LIZETH.

AGRADECIMIENTOS

A mí asesora, la M. en C. Amellalli Lucas Gonzalez por brindarme la oportunidad de desarrollar este trabajo, por sus enseñanzas, por su gran apoyo y el tiempo brindado que ayudaron a mi formación académica y personal.

Al Dr. Luis Alberto Vallejo Castillo por la oportunidad y la confianza de poder formar parte de su grupo de trabajo. Así como su tiempo, atención y consejos brindados en la elaboración de este proyecto.

A la Dra. Gabriela Mellado Sánchez por ser el puente que me permitió formar parte de este proyecto, así como por su gran apoyo y los consejos brindados durante el desarrollo de este.

A el Q.B.P Ismael Trejo Martínez por sus enseñanzas, consejos, apoyo y tiempo brindados durante el desarrollo de este trabajo.

A los miembros de mi jurado por su paciencia, cooperación y sus recomendaciones que contribuyeron a la mejora de este trabajo.

Finalmente, agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México y en especial a la Facultad de Química por la formación académica, profesional y personal brindada.

Lugar de realización y Financiamiento

El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la M. en C Amellalli Lucas Gonzalez y en colaboración con el Dr. Luis Alberto Vallejo Castillo en la Unidad de Desarrollo e Investigación en Bioterapéuticos (UDIBI) de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB) del Instituto Politécnico Nacional (IPN).

Para la realización del presente trabajo se contó con el financiamiento del proyecto de investigación UDIP21-018 de la UDIBI y del Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONAHCYT) y su programa “Ciencia de fronteras 2023” a través del proyecto de investigación “Evaluación de los efectos inmunomoduladores de Ubiquitina monomérica extracelular (Ubme) oral en la Rinitis alérgica: eficacia y farmacocinética” con clave: CF-2023-G-836.

Instalaciones

Para el desarrollo de la presente tesis se emplearon el equipamiento e instalaciones del “Laboratorio Nacional para Servicios Especializados de Investigación, Desarrollo e Innovación (I+D+i) para Farmoquímicos y Biotecnológicos”, LANSEIDI-FarBiotec-CONACyT. Este Laboratorio Nacional es parte de la UDIBI-IPN.



ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Reacciones de hipersensibilidad	3
1.2 Antecedentes históricos de las alergias	3
1.3 Clasificación de las reacciones de hipersensibilidad tipo 1	5
1.4 Inmunoglobulina E.....	6
1.5 Fisiopatología de las reacciones de Hipersensibilidad tipo I	6
1.5.1 Sensibilización	7
1.5.2 Fase efectora: Respuesta de fase temprana	8
1.5.3 Fase efectora: Respuesta de fase tardía.....	9
1.6 Rinitis alérgica	9
1.6.1 Clasificación de la RA.....	10
1.6.2 Fisiopatología de la rinitis alérgica	11
1.6.3 Epidemiología de la rinitis alérgica.....	13
1.6.3.1 Prevalencia	13
1.6.3.2 Impacto económico.....	15
1.6.4 Diagnóstico	16
1.6.5 Tratamiento.....	20
1.6.5.1 Evitar exposición a los alérgenos.....	20
1.6.5.2 Farmacoterapia.....	20
1.6.5.3 Inmunoterapia específica con alérgenos	22
1.6.3.4 Otros tratamientos	22
1.7 Modelos de RA en ratones	23
2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	25

3	HIPOTÉISIS	26
4	OBJETIVOS	26
	4.1 Objetivo general	26
	4.2 Objetivos particulares	26
5	MATERIALES Y MÉTODO	26
	5.1 Animales.....	26
	5.2 Modelo de rinitis alérgica inducido por ovoalbúmina.	27
	5.3 Muestras de suero y plasma	27
	5.4 Muestras de lavado intranasal.....	28
	5.5 ELISA	28
	5.5.1 Detección de IgG anti-OVA.....	29
	5.5.2 Detección de IgE anti-OVA	29
	5.5.3 Detección de IL-4	30
	5.6 Análisis estadístico	31
6	RESULTADOS	31
	6.1 Respuesta de la IL-4 en LIN, suero y plasma de ratones sensibilizados y RIN con OVA.	32
	6.2 Respuesta anticuerpos anti-OVA de los isotipos IgG e IgE en suero de ratones sensibilizados con OVA.	33
	6.3 Análisis clinimétrico de los ratones BALB/c provocadas por la administración I.P e I.N de OVA.	36
7	DISCUSIÓN.....	38
8	CONCLUSIONES.....	43
9	PERSPECTIVAS	43
10	REFERENCIAS	44
11	ANEXOS	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Resumen de las reacciones de hipersensibilidad.	6
Figura 2. Comorbilidades de la RA.....	10
Figura 3. Clasificación de la RA por duración y severidad de los síntomas.	11
Figura 4. Fisiopatología de la rinitis alérgica.	13
Figura 5. Prevalencias de RA alrededor del mundo	15
Figura 6. Distribución de los costos directos e indirectos causados por la RA.....	16
Figura 7. Diagrama de flujo para diagnóstico de la RA.	19
Figura 8. Esquema representativo del modelo murino de RA	27
Figura 9. Evaluación del efecto de la sensibilización I.P y RIN con OVA en ratones BALB/c sobre la concentración de IL-4 en LIN.....	32
Figura 10. Evaluación del efecto de la sensibilización I.P y RIN con OVA en ratones BALB/c sobre la concentración sérica de IL-4.....	32
Figura 11. Evaluación del efecto de la sensibilización I.P y RIN con OVA en ratones BALB/c sobre la concentración plasmática de IL-4.	33
Figura 12. Efecto de la administración repetida de OVA emulsificada con hidróxido de aluminio sobre los anticuerpos IgG anti-OVA séricos de ratones.....	34
Figura 13. Evaluación de la respuesta de anticuerpos séricos de IgE anti-OVA en animales previamente sensibilizados con OVA e hidróxido de aluminio y posteriormente retado con OVA vía intranasal	35
Figura 14. Estado físico de los ratones BALB/c durante el tratamiento desde el término de sensibilización hasta el termino de RIN.	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cronología de las enfermedades alérgicas documentadas.....	4
Tabla 2. Clinimetría de la RA en humanos frente a ratones del grupo OVA.	42

LISTA DE ABREVIATURAS

APC:	Células presentadoras de antígeno.
ARIA:	Allergic rhinitis and its impact on asthma. (Rinitis Alérgica y su Impacto en el Asma)
ARLT:	Antagonistas de los receptores de leucotrienos.
BCR:	Receptores de los linfocitos B.
CD:	Células dendríticas.
CysLT:	Cisteinil leucotrienos.
ECP:	Proteína catiónica eosinofílica.
EDN:	Neurotoxina derivada de eosinófilos.
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético.
ELISA:	Ensayo por inmunoadsorción enzimática.
Fc:	Fragmento cristalizable.
FcεRI:	Receptor de IgE de alta afinidad.
FcεRII:	Receptor de IgE de baja afinidad.
GM-CSF:	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos.
I.N:	Intranasal.
I.P:	Intraperitoneal.
ICAM-1:	Molécula de adhesión intercelular 1.
IFN:	Interferón.
IgE:	Inmunoglobulina E.

IL:	Interleucina.
ILC2:	Células linfoides innatas del grupo 2.
ITA:	Inmunoterapia específica con alérgenos.
LIN:	Lavado intranasal.
LT:	Leucotrienos.
LTD4:	Leucotrieno D4.
LTE4:	Leucotrieno E4.
MAPK:	Proteínas cinasas activadas por mitógenos.
MBP:	Proteína básica principal.
MHC-II:	Complejo mayor de histocompatibilidad de clase II.
MMP-9:	Metalopeptidasa de la matriz 9.
MPO:	Mieloperoxidasa.
OMS:	Organización Mundial de la Salud.
OVA:	Ovoalbúmina.
PGD2:	Prostaglandina D2.
PLA ₂ :	Fosfolipasa A ₂ .
RA:	Rinitis alérgica.
ROS:	Especies reactivas de oxígeno.
RT-PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa.
STAT6:	Transductor de señales y activador de la transcripción 6.
TCR:	Receptor de células T.

Th0: Linfocitos T CD4+ naive.
TNF: Factor de necrosis tumoral.
Treg: Linfocitos T reguladoras.
TSLP: Linfopoyetina estromal tímica.
VCAM-1: Molécula de adhesión a células vasculares 1.

RESUMEN

La rinitis alérgica (RA) es una enfermedad inflamatoria de la mucosa nasal, desencadenada por la respuesta de hipersensibilidad tipo I mediada por inmunoglobulina E (IgE) ante la exposición a alérgenos inhalados, generalmente comórbida con asma y conjuntivitis. Afecta aproximadamente al 25% de la población infantil y al 40% de los adultos en el rendimiento escolar y laboral debido a sus molestos síntomas como estornudos, picazón, rinorrea, congestión nasal y goteo postnatal, impactando no solo en los costos económicos directos, relacionados con la atención médica, sino también en los indirectos debido a la disminución de la productividad laboral. En ese sentido, la búsqueda de moléculas para el tratamiento de la RA, así como el establecimiento de modelos preclínicos que permitan medir la eficacia resulta de vital importancia. El presente trabajo tuvo por objetivo establecer un modelo murino de RA empleando los niveles de interleucina 4 (IL-4), IgG e IgE anti-ovoalbúmina como marcadores del establecimiento del cuadro clínico de RA con el fin de comprender mejor su fisiopatología y su probable uso en la investigación preclínica donde se están desarrollando nuevas terapias contra esta enfermedad.

Los modelos de RA se conformaron de dos etapas: sensibilización, en donde se indujo una respuesta inmunológica sistémica y reto que desencadena una respuesta alérgica. Para establecer el modelo se usó ovoalbúmina (OVA) como antígeno y ratones hembra BALB/c de 8 semanas de edad divididas en dos grupos: control y OVA. Los ratones del grupo OVA se sensibilizaron vía intraperitoneal inyectando una disolución de OVA emulsificada con hidróxido de aluminio a los 0, 1, 2, 7, 8 y 14 días (etapa de sensibilización). A los 21 días post-sensibilización, se les administró diariamente OVA vía intranasal por 21 días más (etapa de reto). Por otro lado, el grupo control (ratones sanos) no recibió ningún tratamiento. Al término de la sensibilización, se tomaron muestras de suero de los animales, para determinar los niveles de IgG anti-OVA a través de la técnica ELISA, mientras que los niveles de IgE anti-OVA se midieron a los 21, 28, 35 y 42 días. Por su parte, las concentraciones de IL-4 se midieron en suero y plasma a partir de muestras de sangre tomadas a los 21, 24, 25, 26, 27 y 28 días, también se determinaron los niveles de IL-4 en lavado

intranasales a los 21, 23, 25, 27 y 28 días por el mismo método. Asimismo, se comparó al largo de estudio signos clínicos como: prurito nasal y ocular, enrojecimiento, pelado, conjuntivitis y enrojecimiento.

La administración intraperitoneal de OVA emulsificada con hidróxido de aluminio, seguida de una exposición intranasal repetida a OVA, provocó que los animales presentaran: títulos elevados de IgE e IgG anti-OVA en el suero de los animales y signos clínicos asociados a la RA contrastando con los niveles de inmunoglobulinas. Sin embargo, no fue posible cuantificar los niveles de IL-4 en ninguna de las matrices utilizadas (suero, plasma, LIN) dando como posibles explicaciones: en los ratones BALB/c la expresión de IL-4 se ocurre temprano durante la sensibilización y posteriormente tiene una regulación a la baja; esta se degrada rápidamente y no pueda ser detectable. Para futuros estudios para detectar IL-4 se debería usar muestrear en otros sitios, como partir de cultivos celulares de esplenocitos o ganglios linfáticos o por otro lado probar técnicas de biología molecular como RT-PCR. Además de complementar la evaluación del modelo con técnicas histológicas con el fin de tener una mejor comprensión de la enfermedad y ayudar al desarrollo y evaluación de nuevos tratamientos.

Finalmente, se concluye que fue posible establecer un modelo de RA inducido por OVA en ratones hembra BALB/c, evaluándolo mediante los niveles de inmunoglobulinas anti-OVA y por medio de observaciones clinimétricas. Sin embargo, se debe desarrollar y mejorar los modelos preclínicos de RA a fin de que reproduzcan el padecimiento de manera fidedigna.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Reacciones de hipersensibilidad

El sistema inmunológico tiene la función de proteger al hospedero de infecciones y de sustancias potencialmente dañinas del entorno. Sin embargo, puede ocurrir que antígenos propios o extraños, normalmente inocuos para la mayoría de los individuos, desencadenen respuestas inmunitarias adaptativas excesivas provocando lesiones tisulares y enfermedades. Este tipo de trastorno se denomina reacción alérgica o de hipersensibilidad (Lloyd *et al.*, 2014; Regueiro *et al.*, 2022).

1.2 Antecedentes históricos de las alergias

Las enfermedades alérgicas son descritas en la literatura médica de varias culturas antiguas. Por ejemplo, la primera reacción alérgica documentada en la historia fue la muerte del faraón egipcio Menes, quien murió después de ser picado por una avispa alrededor del 2641 a.C. Por otra parte, en la antigua China utilizaban plantas contra el asma y la secreción nasal, como la *Efedra distachya* de la cual se aisló la efedrina en 1878. Por su parte, la RA, también conocida como fiebre del heno, fue muy bien documentada porque el emperador romano Octavianus Augustus la padeció (Ring 2021; Wang *et al.*, 2023).

Las teorías sobre las causas y el diagnóstico de las alergias se desarrollan años más tarde, como es el caso del médico inglés del siglo XIX John Bostock, quien atribuyó al heno las molestias oculares y nasales de verano, nombrando a la condición “fiebre del heno” y proporcionando así la primera explicación científica de la enfermedad alérgica más común. Más tarde, Charles Blackley demostró que el polen es el agente causante de la fiebre del heno al realizar las primeras pruebas de provocación cutánea y conjuntival junto con las mediciones de polen en el aire (Ring 2021; Wang *et al.*, 2023).

En el siglo XX, la patogenia y el tratamiento de las enfermedades alérgicas progresó rápidamente. En 1906, el pediatra Clemens von Pirquet acuñó la palabra “alergia” de las palabras griegas *allos* que significa “otro”, y *ergon* cuyo significado es

“trabajo”. Considerando de esta manera el comienzo de la ciencia moderna de las alergias (Wang *et al.*, 2023).

Tabla 1. Cronología de las enfermedades alérgicas documentadas Adaptada de Ring, 2021.

Año	Personaje	Enfermedad alérgica
641 a. C.	Faraón Menes	Anafilaxis
460 a. C.	Hipócrates	Idiosincrasia del queso
200 a. C.	Dioscúrides	Asma
70 a. C.	Lucretius	Alergia alimentaria
600	Aecio Amida	Eccema
900	Al Rhazes	Fiebre rosa
1783	Febo	Fiebre del heno
1819	Bostock	Estudios experimentales sobre la Fiebre del heno
1870	Alejandra	Polen, prueba cutánea
1872	Quincke	Angioedema
1891	Brocq	Neurodermita
1902	Richet/Portier	Anafilaxis

En 1963, los profesores Philip Gell y Robin Coombs clasificaron las reacciones de hipersensibilidad, llamadas generalmente reacciones alérgicas, en cuatro tipos (I al IV) según los elementos característicos de la respuesta inflamatoria que genera el daño o según la velocidad a la cual aparece el daño (Murphy *et al.*, 2019; Pavón *et al.*, 2020).

Fue durante la segunda mitad del siglo XX, cuando se produjeron dos avances importantes para comprender mejor la fisiopatología de las alergias: la detección de la inmunoglobulina E (IgE) y el descubrimiento de nuevos mediadores inflamatorios. La pareja de científicos Ishizaka en 1966 y los científicos Johansson y Hans Bennich identificaron a la IgE como el anticuerpo responsable de las reacciones alérgicas en

1967, proporcionando así una nueva herramienta experimental (Ring 2021; Wang *et al.*, 2023).

1.3 Clasificación de las reacciones de hipersensibilidad tipo 1

Las reacciones de hipersensibilidad se clasifican en cuatro tipos, dependiendo de si las respuestas son humorales o mediada por células, el tipo de antígeno involucrado y cómo se presenta a las células del sistema inmunitario (Figura 1) (Regueiro *et al.*, 2022).

Hipersensibilidad tipo I o hipersensibilidad inmediata. Es causada por alérgenos que inducen la producción de IgE específica al mismo y desencadena una serie de eventos celulares y moleculares produciendo las manifestaciones clínicas de la enfermedad alérgica. Esta hipersensibilidad se observa en las enfermedades alérgicas como rinitis o asma (Jessica, 2012; Lloyd *et al.*, 2014).

Hipersensibilidad tipo II. Esta mediada por anticuerpos IgG o IgM capaces de opsonizar, reclutar leucocitos y activar el sistema del complemento. Algunos de estos anticuerpos reconocen antígenos presentes en las superficies celulares o en la matriz extracelular, provocando su destrucción. Como ejemplo de enfermedades está la anemia hemolítica inducida por fármacos y las reacciones transfusionales (Abbas *et al.*, 2015; Regueiro *et al.*, 2022).

Hipersensibilidad tipo III. En esta respuesta los antígenos forman inmunocomplejos con los anticuerpos fijadores de complemento (habitualmente IgG) en circulación, los cuales se depositan en los tejidos, en especial en los vasos sanguíneos, promoviendo el reclutamiento de neutrófilos que liberan sus gránulos produciendo lesiones. El lupus eritematoso sistémico es la enfermedad más representativa (Jessica, 2012; Regueiro *et al.*, 2022).

Hipersensibilidad tipo IV o hipersensibilidad tardía. Se caracteriza por la lesión tisular mediada por linfocitos T que secretan citocinas que promueven la inflamación y la activación de macrófagos y neutrófilos, principalmente. La manifestación típica es la dermatitis por contacto (Abbas *et al.*, 2015).

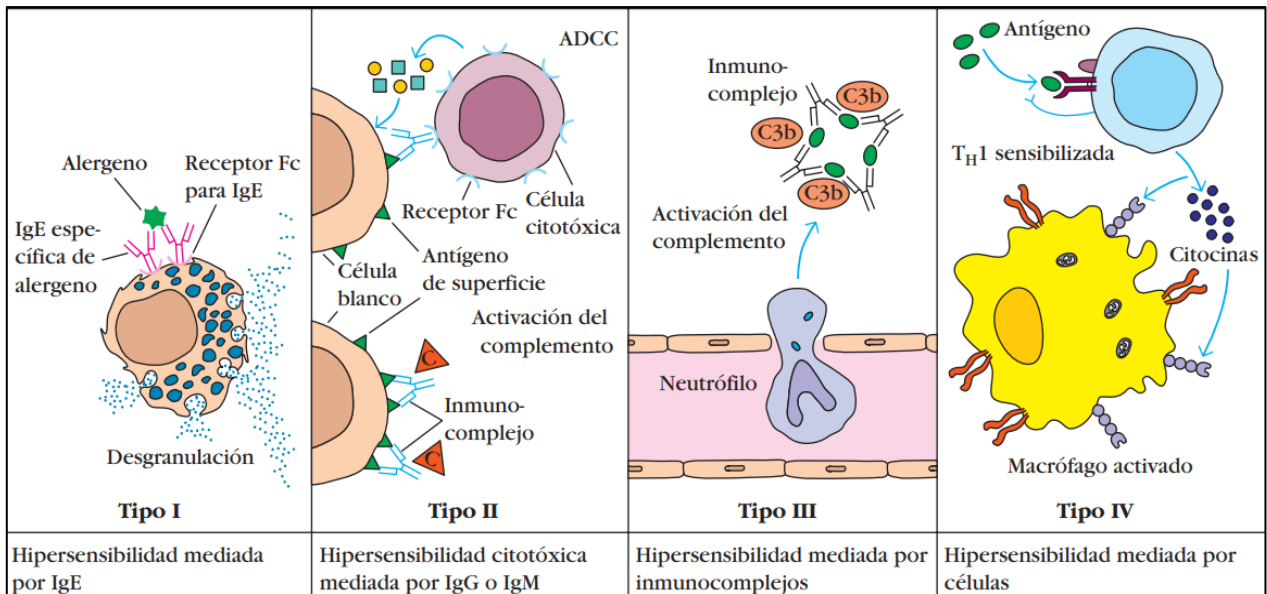


Figura 1. Resumen de las reacciones de hipersensibilidad. Las reacciones tipo I, II y III son mediadas por anticuerpos. Mientras que el tipo IV es mediada por células (Tomada de Kindt *et al.*, 2007)

1.4 Inmunoglobulina E

La producción de anticuerpos IgE es la principal característica de las enfermedades alérgicas. La concentración sérica de IgE ronda los 50 a 100 ng/mL. Los bajos niveles y su corta vida media en circulación (2 días) se debe por el número tan reducido de linfocitos B comprometidas con su síntesis y su rápida unión a su receptor de alta afinidad (FcεRI) localizado en mastocitos tisulares y basófilos, donde puede persistir por largos períodos de tiempo. La IgE se compone de un par de cadenas ligeras (23 kD) y un par de cadenas pesadas (50-70 kD) unidas por puentes disulfuros, además de carecer de una región bisagra. La cadena pesada tiene cinco dominios, cuatro constantes (Cε1-Cε4) y una variable (V_H), mientras que la cadena ligera cuenta con un dominio variable (V_L) y otro constante. Esta inmunoglobulina no activa complemento y sus funciones son ejercidas a través de receptores (Dullaers *et al.*, 2012; Jessica, 2012; Lloyd *et al.*, 2014)

1.5 Fisiopatología de las reacciones de Hipersensibilidad tipo I

El proceso fisiológico de las reacciones de hipersensibilidad inmediata consta de dos fases: la fase de sensibilización se caracteriza por tener el primer contacto con el alérgeno sin presentar síntomas clínicos, pero se induce la síntesis de anticuerpos

IgE alérgeno específico; más tarde, en la fase efectora (temprana y tardía) hay una reexposición al antígeno se presentan síntomas, pues todos los elementos desarrollados durante la fase de sensibilización están listos para ejercer sus mecanismos biológicos.

1.5.1 Sensibilización

Aunque el sistema inmunológico está en contacto constante con alérgenos, la combinación de la susceptibilidad genética del huésped para producir IgE específica de alérgeno, llamada atopia, y los factores ambientales pueden desencadenar una respuesta alérgica. Para que ello ocurra primero debe presentarse la sensibilización al alérgeno, ésta sucede cuando el paciente se expone por primera vez a un alérgeno sin experimentar síntomas clínicos (O'Hehir *et al.*, 2017; Pavón *et al.*, 2020; Watts *et al.*, 2019).

Los alérgenos que son inhalados o atraviesan la piel o mucosa son capturados vía fagocitosis por las células presentadoras de antígeno (APC), para después ser procesados y transportados a los ganglios linfáticos, donde son presentados como péptidos cortos a través de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase II (MHC II) de las APC a los receptores de los linfocitos T CD4+ naïve (Th0) (Bousquet *et al.*, 2020; Regueiro *et al.*, 2022; Watts *et al.*, 2019). Los Th0 se pueden diferenciar hacia la subpoblación Th2 alérgeno específica bajo un microambiente de IL-4 e IL-13 por medio de la vía STAT6, lo que activa el factor de transcripción GATA-3 que induce la síntesis de IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 (Pavón *et al.*, 2020; Watts *et al.*, 2019). A continuación, la cooperación entre los linfocitos B y los linfocitos Th2 es mediada por moléculas coestimuladoras: CD40, expresado en la superficie de los linfocitos B, se une a su ligando CD154 (CD40L) presente en la superficie de los linfocitos T. Esta interacción junto a un microambiente rico en IL-4 e IL-13 permite el cambio de isotipo, porque favorece el reordenamiento genético de las cadenas pesadas de C γ o C μ hacia C ϵ de los linfocitos B, para producir anticuerpos de tipo IgE, responsables de la reacción alérgica. Además de participar en la estimulación y activación de los linfocitos B a células plasmáticas productoras de IgE, la IL-4 y la IL-13 promueven la generación de linfocitos B de memoria. Los sujetos no atópicos, por

el contrario, inician una respuesta reguladora, transformando las células T CD4+ alérgeno específico en células Th1 productoras de IFN- γ y en células T reguladoras (Treg) productoras de IL-10 (Pavón *et al.*, 2020; Watts *et al.*, 2019).

La IgE se encuentra presente en membrana y soluble. En membrana funciona como receptor de los linfocitos B (BCR) y cuando la porción Fc se une a sus receptores de alta afinidad (Fc ϵ RI) en la superficie de mastocitos, eosinófilos y basófilos, origina células sensibilizadas y preparadas para reaccionar frente a un próximo encuentro con el antígeno. Los linfocitos B que expresan IgE en su membrana son células de memoria (Jessica, 2012; Pavón *et al.*, 2020).

1.5.2 Fase efectora: Respuesta de fase temprana

La reacción de fase temprana ocurre desde el primer minuto que exista una reexposición al alérgeno y dura un máximo de 60 minutos (Drazdauskaitė *et al.*, 2021). El reconocimiento de los antígenos por la IgE de membrana (BCR) en los linfocitos B favorece la síntesis de IL-4, IL-5 e IL-13, se cree que estas citocinas son sintetizadas tanto por linfocitos Th2 como por mastocitos. Por su parte, la IgE unida a su receptor Fc ϵ RI puede reconocer al antígeno y activar a las células sensibilizadas produciendo la liberación de mediadores preformados, como la histamina, tripsina, proteoglicanos, entre muchos otros, y la síntesis de *novo* de mediadores lipídicos de membranas al activar la PLA2 (fosfolipasa A2) por la vía del MAPK. La PLA2 es responsable de romper al ácido araquidónico generando eicosanoides, los cuales son precursores de las prostaglandinas (PGD2), leucotrienos (LTB4, LTC4), entre otros mediadores lipídicos. La liberación de estas moléculas promueve el aumento del flujo sanguíneo local y de la permeabilidad vascular y la contracción del músculo liso, para reclutar más componentes de la respuesta inmunitaria, incluidos los linfocitos, eosinófilos y basófilos, al sitio de inflamación. Las contracciones de músculo liso se presentan como tos, vómito o diarrea, para intentar expulsar el alérgeno del cuerpo (O'Hehir *et al.*, 2017; Pavón *et al.*, 2020; Regueiro *et al.*, 2022).

1.5.3 Fase efectora: Respuesta de fase tardía

La respuesta de fase tardía ocurre de 4 a 12 horas después de la exposición al alérgeno y puede durar hasta 24 horas. Se caracteriza por el reclutamiento de células inflamatorias a la mucosa nasal, como linfocitos Th2, células linfoides innatas 2 (ILC2), basófilos, neutrófilos y eosinófilos, promovido por los mediadores preformados y de *novo* liberados en la fase temprana. Las células reclutadas, especialmente los eosinófilos, secretan más moléculas vasoactivas que exacerbaban y prolongan la sintomatología, causando daño tardío y la producción de moco asociado a las reacciones alérgicas crónicas, como la congestión nasal (Drazdauskaitė *et al.*, 2021; Regueiro *et al.*, 2022; Watts *et al.*, 2019).

1.6 Rinitis alérgica

La RA es una enfermedad inflamatoria de la mucosa nasal, desencadenada por la respuesta de hipersensibilidad tipo I mediada por IgE ante la exposición a alérgenos inhalados en personas previamente sensibilizadas. Es caracterizada por síntomas como: estornudos, rinorrea, congestión y prurito nasales. Asimismo, comórbida generalmente con otras enfermedades como el asma, la conjuntivitis y/o otros padecimientos (Figura 2) (Akhouri, 2022; Bousquet *et al.*, 2020; Nur *et al.*, 2022).

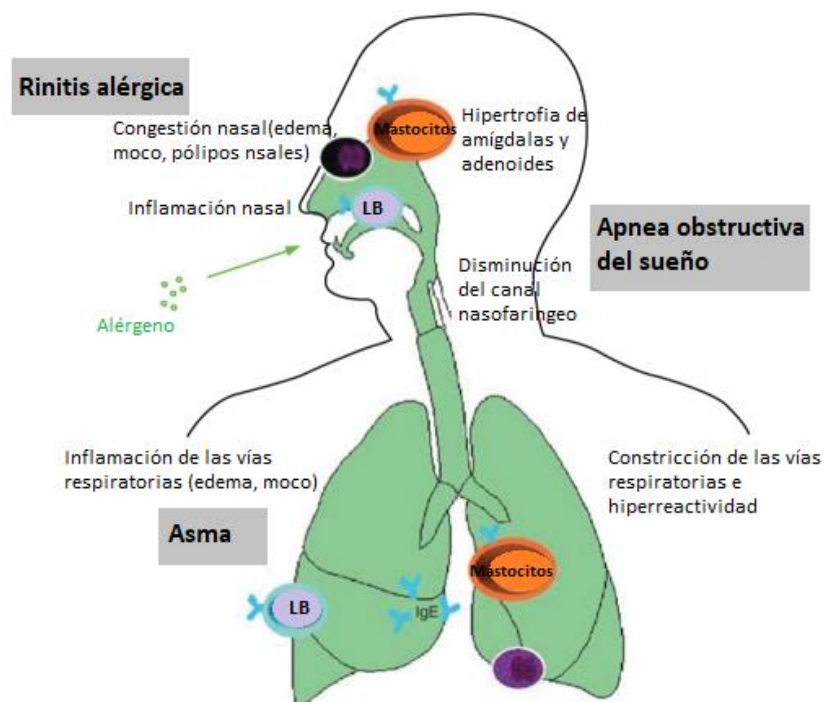


Figura 2. Comorbilidades de la RA. La RA está relacionada con diversos padecimientos: asma, rinosinusitis, poliposis nasal, otitis media serosa y trastornos del sueño. Adaptada de Pawankar *et al.*, 2011.

1.6.1 Clasificación de la RA

La RA puede clasificarse en estacional, perenne y episódica según el tiempo de exposición al alérgeno. El primero ocurre durante una temporada específica, como en las estaciones polínicas. Por su parte, la RA perenne persiste durante todo el año y es causada principalmente por los ácaros del polvo. La RA episódica ocurre cuando el paciente se expone a entornos que normalmente no frecuenta, por ejemplo, visitar un hogar con mascotas cuando normalmente no se tiene contacto con animales. Clasificar la RA de esta manera permite predecir cuando la rinitis estará activa y planificar el tratamiento (Seidman *et al.*, 2015).

La RA también se puede dividir según la duración de los síntomas de la siguiente manera: rinitis intermitente, si los síntomas se presentan menos de 4 días a la semana o durante al menos 4 semanas consecutivas; y rinitis persistente, cuando los síntomas persisten 4 días o más a la semana o durante más de 4 semanas consecutivas (Figura 3) (Seidman *et al.*, 2015; Small *et al.*, 2018).

En términos de severidad, la RA se clasifica como leve y moderada-severa (Figura 3). Se considera leve cuando los síntomas están presentes, pero no interfieren con el sueño y tampoco afectan la calidad de vida del paciente. La RA moderada-severa altera significativamente el sueño, las actividades cotidianas y/o los síntomas se consideran molestos. Clasificar la RA dependiendo de la severidad y la duración de los síntomas puede ayudar a seleccionar el tratamiento más adecuado para los pacientes de forma personalizada (Seidman *et al.*, 2015; Small *et al.*, 2018). Cabe mencionar que en México la mayoría de los pacientes presentan síntomas perennes y no estacionales (López y Díaz, 2023).

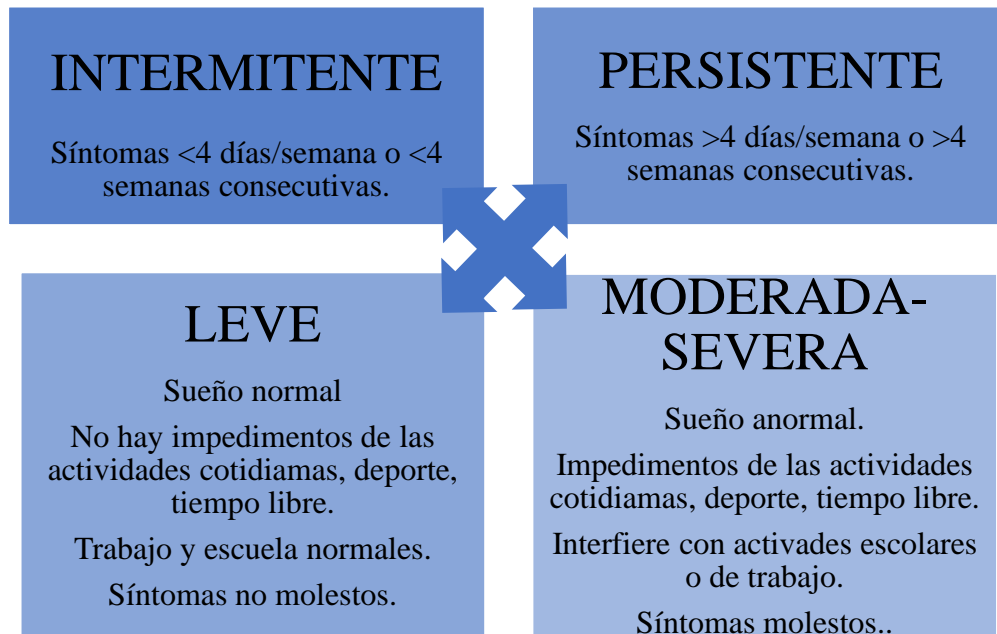


Figura 3. Clasificación de la RA por duración y severidad de los síntomas. ARIA clasifica a la RA por la cronicidad (intermitente o persistente) y la severidad (leve o moderada-severa) de los síntomas, desplazando así a la clasificación tradicional (estacional, perenne y episódico). Adaptada de Lloyd *et al.*, 2014.

1.6.2 Fisiopatología de la rinitis alérgica

La fisiopatología de la RA sigue el mismo mecanismo de la respuesta de hipersensibilidad tipo I con ciertas particularidades detalladas a continuación. En este caso la sensibilización ocurre a través de la mucosa nasal y los alérgenos son transportados por el aire.

Por su parte, la fase efectora temprana donde se presenta síntomas nasales agudos (estornudos y rinorrea) y síntomas oculares (picazón, enrojecimiento y lagrimeo) desencadenadas por la liberación de histamina (Bjerner *et al.*, 2019). En las terminaciones nerviosas sensoriales, la histamina transmite señales al sistema nervioso central que causan picazón e induce reflejos motores, como estornudos. Además, promueve la secreción de moco de las glándulas mucosas, lo que se manifiesta como rinorrea. La histamina también estimula los receptores H1 y H2 en los vasos sanguíneos nasales promoviendo la permeabilidad vascular y vasodilatación ocasionando congestión nasal (Drazdauskaitė *et al.*, 2021; Watts *et al.*, 2019). Durante esta etapa otros mediadores liberados por los mastocitos y los basófilos, como la

heparina, serotonina, betatripsina o los leucotrienos (LT), también participan en la contracción del músculo liso, el aumento de la secreción de moco, la permeabilidad vascular, el reclutamiento de eosinófilos y la hipertrofia del músculo liso. Los mediadores de *novo*, tal como las citocinas TNF- α y β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-1 β e IL-13, promueven el estado inflamatorio y la respuesta tipo Th2 (Drazdauskaitė *et al.*, 2021; Pavón *et al.*, 2020; Watts *et al.*, 2019).

Mientras que, durante la respuesta de fase tardía de la RA, los mastocitos liberan IL-4, IL-13 y TNF- α que actúan sobre las células endoteliales y en las vénulas postcapilares promoviendo la expresión de moléculas de adhesión vascular celular (ICAM-1, VCAM-1) y E-selectina. Estas promueven la migración y adhesión de los leucocitos circulantes a las células endoteliales, aumentando la permeabilidad vascular y la migración de células efectoras a la mucosa nasal. Los neutrófilos reclutados a la mucosa nasal contribuyen al daño epitelial y al reclutamiento de más células efectoras a través de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), proteasas (elastasa) y enzimas (MMP-9, MPO) (Pavón *et al.*, 2020; Watts *et al.*, 2019). Los linfocitos Th2 también contribuyen a la infiltración eosinofílica en la mucosa nasal al secretar IL-5. Los mediadores producidos por los eosinófilos incluyen ROS, LTC₄, factor activador de plaquetas y eotaxinas, y las proteínas catiónicas de sus gránulos, tal como la proteína básica principal (MBP), la proteína catiónica del eosinófilo (ECP), la neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN) y la peroxidasa eosinofílica. Estos mediadores dañan el epitelio dejando las fibras nerviosas conduciendo una inflamación neurogénica, causando que factores ambientales no alérgicos como los olores fuertes, la temperatura o los irritantes puedan inducir rinitis, condición conocida hiperreactividad nasal. Los linfocitos Th2 y los mastocitos también contribuyen a la supervivencia de los eosinófilos en la mucosa nasal a través de la liberación de GM-CSF e IL-5 (Kariyawasam y Rotiroti, 2021; Pavón *et al.*, 2020; Watts *et al.*, 2019). Paralelamente, las células del epitelio nasal no solo se comportan como barrera, también liberan mediadores inflamatorios como TSLP, IL-25 e IL-33 los cuales activan a las ILC-2 y secretan IL-5 e IL-13 ayudando a mantener la inflamación (Kariyawasam y Rotiroti, 2021).

Esta última etapa es compleja porque involucra varias citocinas, quimiocinas y mediadores provenientes de diferentes tipos de células, lo que lleva a un estado inflamatorio nasal crónico. Las reacciones de fase tardía se asocian con remodelación tisular, edema y daño tisular local, así como el desarrollo de la congestión nasal, considerada por los pacientes como uno de los síntomas más problemáticos de la RA (Bjermer *et al.*, 2019; Kariyawasam y Rotiroti, 2021).

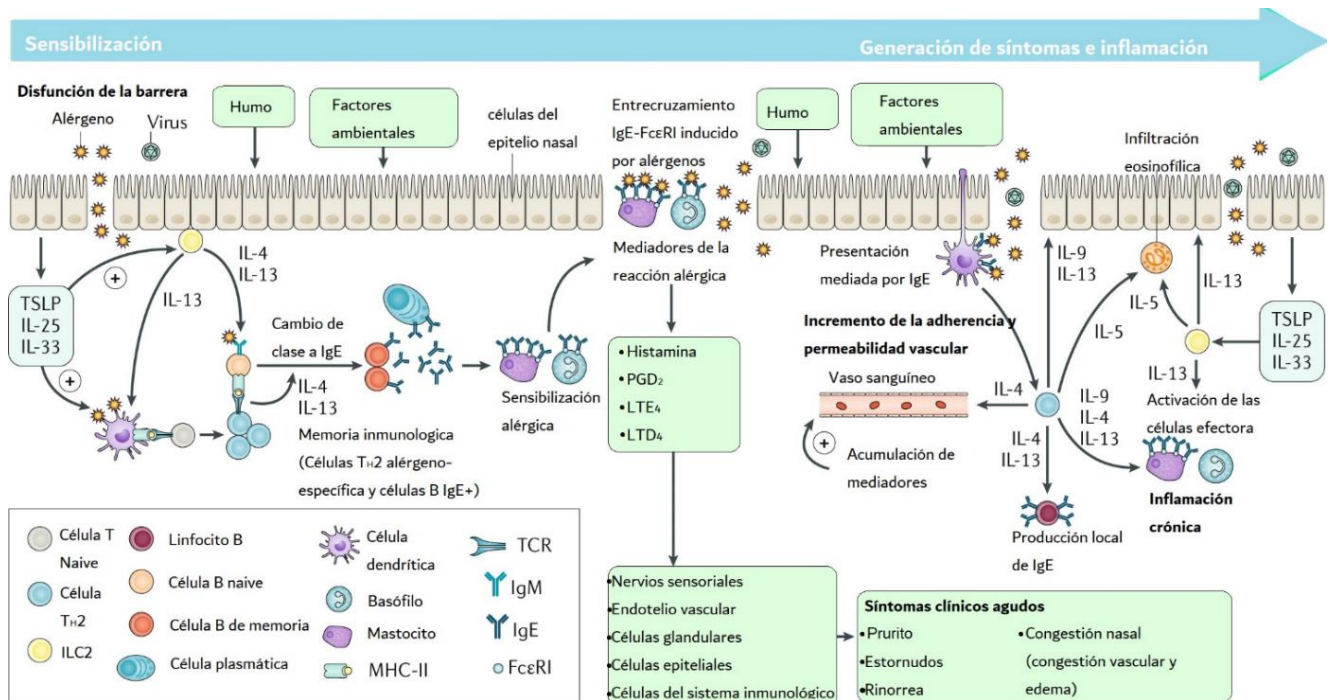


Figura 4. Fisiopatología de la rinitis alérgica. En la fase de sensibilización, los alérgenos son captados por las células dendríticas de la mucosa nasal lo que induce una serie de eventos que promueven la generación de células plasmáticas productoras de IgE alérgeno específico. En individuos sensibilizados la reexposición al alérgeno activa a basófilos y mastocitos de la mucosa nasal, promoviendo la liberación de mediadores responsables de los síntomas agudos de la RA. Horas después, se produce el reclutamiento de más células inflamatorias lo que provoca la disfuncionalidad de la mucosa nasal. ILC2: células linfoides innatas del grupo 2; LTD₄, leucotrieno D₄; LTE₄, leucotrieno E₄; MHC-II: complejo mayor de histocompatibilidad de clase II; PGD₂; prostaglandina D₂; TCR: receptor de células T; TSLP: linfopoyetina estromal tímica. (Tomada y adaptada de Bousquet *et al.*, 2020).

1.6.3 Epidemiología de la rinitis alérgica

1.6.3.1 Prevalencia

Se estima que más de 600 millones de personas en el mundo padecen RA, pero en su mayoría es poco diagnosticada y tratada (Wang *et al.*, 2023). A nivel mundial

aproximadamente el 40% de los adultos y el 25% de los niños padecen de RA (Nur *et al.*, 2022). Desafortunadamente, la prevalencia de la RA no se ha estudiado en los últimos años porque los estudios epidemiológicos sobre enfermedades alérgicas se centran en el asma. De igual manera, su estudio epidemiológico se complica por la variedad de definiciones y formas en que se realizan y registran los diagnósticos, adicionando que el 70% de los pacientes se automedican con medicamento de libre venta (Dierick *et al.*, 2020).

La prevalencia en los Estados Unidos se estima en el 7.7% y afecta a 19.2 millones de adultos cada año. Por su parte, la Comunidad Europea registra tasas de prevalencia del 10 al 41% de adultos con RA. En 2009, la prevalencia más alta entre niños se registró en África (18.0%) y Latino América (17.3%) (Dierick *et al.*, 2020; Jean, 2023). De igual manera, una revisión bibliográfica estima que la prevalencia de RA es del 3.6 al 22.8% en África, del 3.5-54.5% en América, del 1.0-47.9% en Asia, del 1.0-43.9% en Europa y del 19.2-47.5% en Oceanía (Figura 5) (Bousquet *et al.*, 2020; Savouré *et al.*, 2022). Por su parte, México tiene reportes de prevalencia de la RA que oscila entre 5.5% y 47.7% (Mancilla *et al.*, 2015) y según el reporte de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012 más de 36 millones de personas en México padecen RA, de las cuales solo 2 millones reciben tratamiento adecuado (IMSS, 2017).

La variación epidemiológica no es de sorprendente, ya que la RA es una condición heterogénea que varía por factores genéticos, epigenéticos y ambientales que aún no se entiende completamente. A pesar de esta variabilidad, es seguro que la prevalencia ha ido en aumento en los últimos años a causa de varios factores, incluida la urbanización global por el aumento de los contaminantes y el cambio climático debido a temporadas de polen más largas (Nur *et al.*, 2022; Seidman *et al.*, 2015).

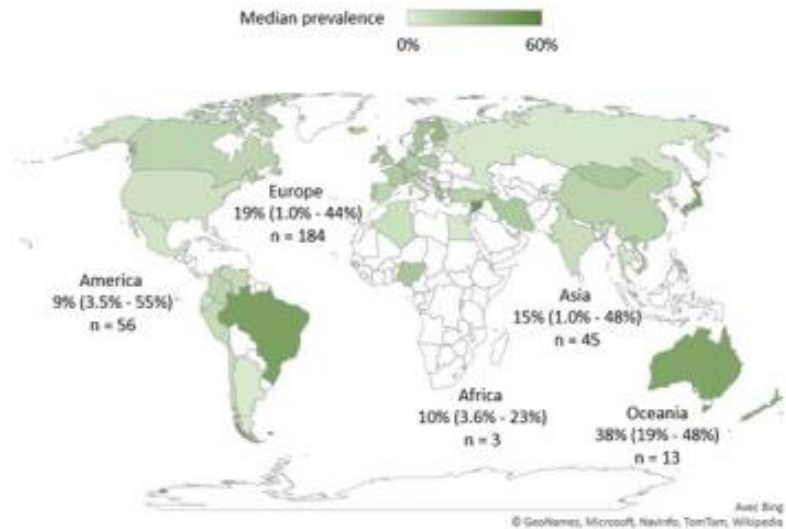


Figura 5. Prevalencias de RA alrededor del mundo. Los datos continentales se muestran de la siguiente manera: mediana (mínimo informado-máximo informado), n = número de prevalencias informadas. Los países con color son aquellos para los que hay datos disponibles. Los países con la prevalencia más alta con los que presentan un color más oscuro (Tomada de Savouré *et al.*, 2022).

1.6.3.2 Impacto económico

La RA usualmente no requiere hospitalización o cirugías, sin embargo, esto no significa que represente un problema menor, pues también impacta en la productividad de un país (Figura 6). Para el sistema de salud de los Estados Unidos se estima que los costos directos anuales (costos en tratamiento médico) son de \$ 4.9 mil millones, mientras que los costos indirectos (disminución de la productividad laboral y días de ausencia en el trabajo) pueden duplicar los gastos, especialmente en los países con economías emergentes. Solo en Estados Unidos se estima que la disminución de la productividad les cuesta entre \$2 mil y \$4 mil millones anuales. En el caso de los niños, la RA y sus comorbilidades son responsables de 800 000 a 2 millones de días escolares anuales perdidos (Czech *et al.*, 2023; Seidman *et al.*, 2015). En México, se calcula que la RA genera altos costos ya que anualmente es la causante de 16.7 millones de consultas, 3.5 millones de días de ausentismo laboral y 2 millones de días de ausentismo escolar (López y Díaz, 2023).

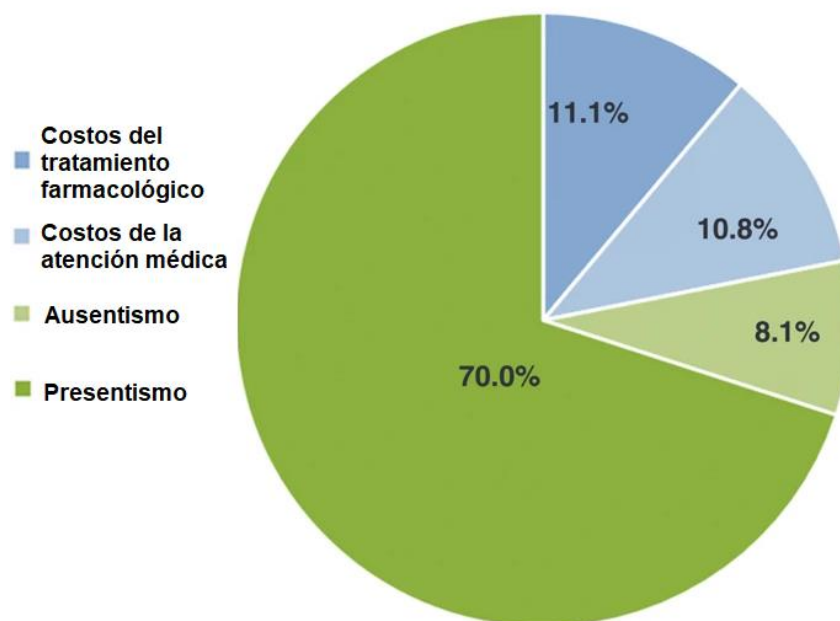


Figura 6. Distribución de los costos directos e indirectos causados por la RA Una encuesta enfocada a la RA realizada en Suecia a personas entre 18 y 65 años evaluó el acceso a la atención médica, los medicamentos, el ausentismo laboral y el presentismo (reducción de la capacidad laboral) de esta manera calcular los costos directo e indirectos provocados por la RA (Tomado y modificado de Cardell *et al.*, 2016).

1.6.4 Diagnóstico

El diagnóstico de la RA comienza con el historial clínico completo y detallado del paciente, tomando en consideración la duración, frecuencia e intensidad de los síntomas; posibles factores que exacerben o disminuyan los síntomas; respuesta y eficacia de terapias previas; antecedentes familiares de enfermedades alérgicas; y patologías asociadas. Un historial completo ayuda a conocer la etiología de la RA. Sin embargo, su diagnóstico puede pasar desapercibido debido a percepciones erróneas, como atribuir los síntomas a resfriados comunes (Akhouri, 2022; Bousquet *et al.*, 2020; Cortés y Santaella, 2012).

Los síntomas asociados a la RA incluyen estornudos, picazón (nariz, ojos, oídos, paladar), rinorrea, goteo postnasal, congestión, anosmia, cefalea, dolor de oído, lagrimeo, ojos rojos, hinchazón de ojos, fatiga, somnolencia y malestar general (Jean, 2023).

Durante el examen físico, los médicos deben evaluar rasgos faciales, ojos, oídos, nariz y garganta. En la inspección facial se pueden notar características como respiración por la boca; ojeras alérgicas, relacionados con la vasodilatación y congestión nasal; pliegue nasal, debido al roce repetido de la punta de la nariz hacia arriba con la palma de la mano; líneas de Dennie-Morgan, pliegues palpebrales que corresponde a edema de la zona. Paralelamente, la inspección nasal se realiza con un rinoscopio donde generalmente se observa la mucosa nasal pálida, edematosa y con un tono azulado, e hipertrofia de los cornetes nasales (Czech *et al.*, 2023; Jean, 2023). También se debe evaluar la presencia de masas como pólipos o tumores. Siempre que sea posible, la rinoscopia debe ser seguida por un naso laringoscopia que es la mejor manera de evaluar el estado de la mucosa nasal y diagnosticar las distintas enfermedades inflamatorias nasosinusales (Akhouri, 2022; Testera *et al.*, 2021). En el examen ocular generalmente se presenta lagrimeo y conjuntivitis, mientras que la otoscopia se estudia la retracción anormal del tímpano que suele estar asociado con la RA en especial si hay disfunción de la trompa de Eustaquio u otitis media (Jean, 2023).

El diagnóstico y la clasificación de la RA se basan principalmente en la historia clínica y el examen físico del paciente, a fin de brindar un diagnóstico más exhaustivo se realizan pruebas de laboratorio, para confirmar el diagnóstico e identificar los alérgenos específicos responsables de la enfermedad. La prueba principal es la punción cutánea, un método *in vivo* para determinar la hipersensibilidad mediada por IgE a alérgenos específicos, la cual consiste en introducir alérgenos relevantes del entorno del paciente vía intradérmica en la piel de los antebrazos o la espalda. Cuando el antígeno se introduce interactúa con los mastocitos de la piel y se une a IgE desencadenando una respuesta de fase temprana liberando histamina, lo que provoca la aparición de una roncha y eritema, cuyo tamaño se correlaciona con el grado de sensibilidad a los alérgenos, todo esto ocurre dentro de 15-20 minutos (Cortés y Santaella, 2012; Jean, 2023; Small *et al.*, 2018).

Las pruebas *in vitro*, por otro lado, permiten medir los niveles de IgE alérgeno específica en muestras de sangre mediante ensayos de inmunoadsorción. La cantidad

de IgE específicas se correlaciona con la sensibilidad a los alérgenos. Según lo establecido por la Academia Americana de Otorrinolaringología, las pruebas de alergia deben reservarse para pacientes que no responden al tratamiento o que requieren identificar alérgenos específicos para dirigir la terapia (Cortés y Santaella, 2012; Jean, 2023).

Existen otras pruebas que apoyan el diagnóstico de la RA como estudios de imagen, por ejemplo, los exámenes radiográficos pueden ser útiles para evaluar anomalías estructurales o para detectar comorbilidades. También, la tomografía computarizada ayuda a detectar pólipos, cornetes nasales inflamados y defectos septales, sin embargo, no se recomiendan usar de manera inmediata, pues no son fundamentales para evaluar la RA (Jean, 2023; López y Díaz, 2023).

La figura 7 muestra el algoritmo utilizado por una de las principales instituciones médicas de México para el diagnóstico de la RA. Esto es consistente con los puntos anteriores. Inicialmente, el paciente presenta síntomas característicos de la RA, por lo que es necesario descartar la posibilidad de una etiología infecciosa. Después, el médico realiza el historial clínico y la exploración física, para realizar el diagnóstico clínico de RA y comenzar el tratamiento más adecuado. Si el paciente no responde al tratamiento se le realizan pruebas de laboratorio más exhaustivas y de ser el caso el paciente es canalizado a otorrinolaringología.

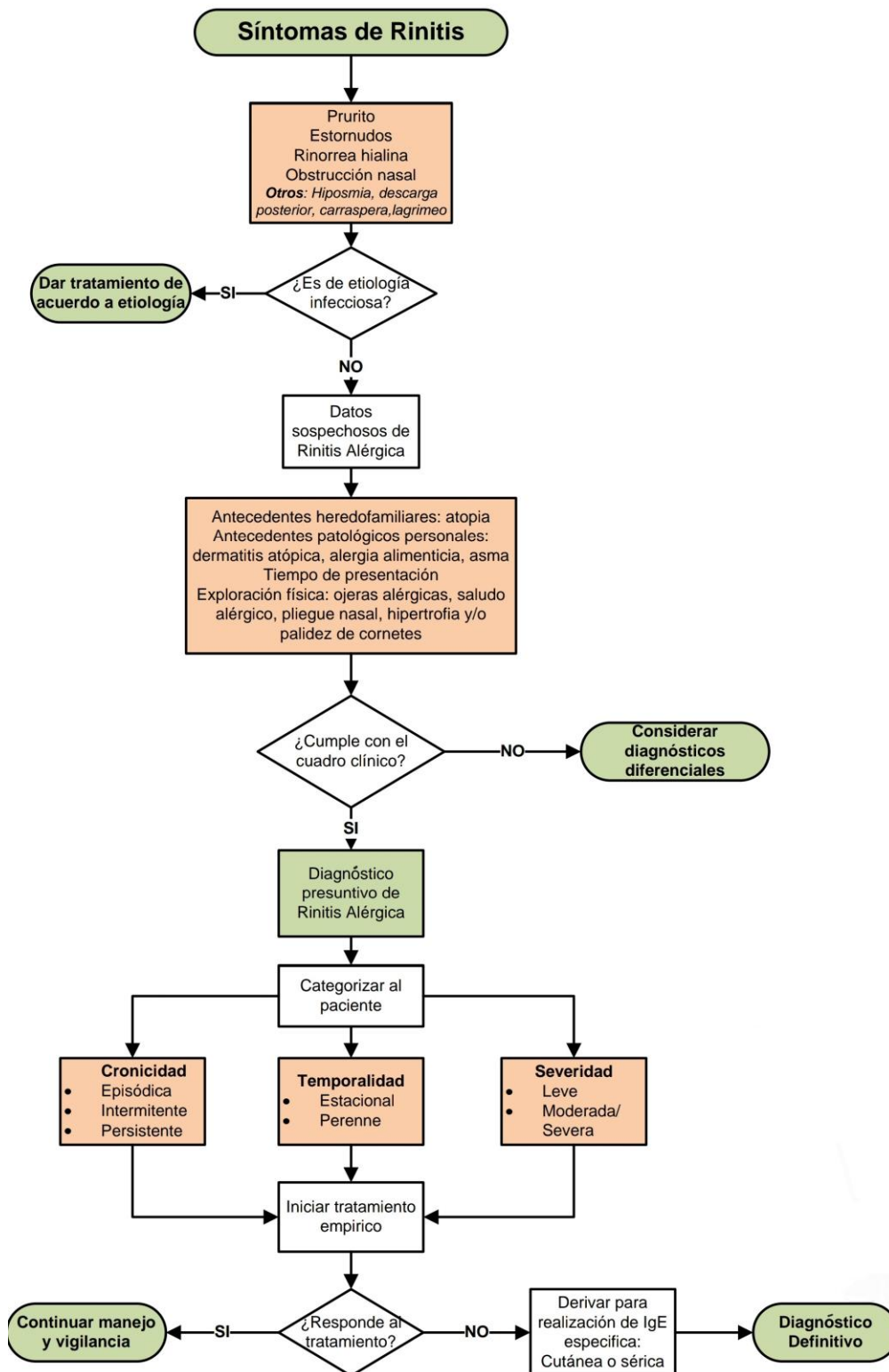


Figura 7. Diagrama de flujo para diagnóstico de la RA. En el IMSS el diagnóstico de la RA primero evalúa los síntomas más comunes, seguido del historial clínico y la exploración física, para poder clasificar el tipo de RA y brindar el tratamiento más adecuado (Tomado de Instituto Mexicano del Seguro Social, 2017).

1.6.5 Tratamiento

Una vez establecido el diagnóstico de la RA, el tratamiento debe tener en cuenta la gravedad de la enfermedad, la presencia de comorbilidades y las preferencias del paciente. Los tratamientos más importantes son evitar la exposición a los alérgenos, la farmacoterapia y la inmunoterapia (Czech *et al.*, 2023).

1.6.5.1 Evitar exposición a los alérgenos

El tratamiento de primera línea es evitar que los pacientes entren en contacto con alérgenos relevantes (ácaros, moho, mascotas, polen) e irritantes (humo de tabaco) tomando medidas preventivas como cerrar las ventanas, para evitar la exposición del polen y moho; usar cubiertas impermeables a los ácaros en las fundas de cama; mantener la humedad menor al 40% en los hogares, a fin de evitar el crecimiento de ácaros del polvo y moho; usar aire acondicionado o filtros HEPA (del inglés, High Efficiency Particle Arresting) con el fin de eliminar alérgenos del aire. Estas medidas ayudan a reducir los síntomas de la RA y se recomienda combinarlas con otros tratamientos, para obtener mejores resultados (Hossenbaccus *et al.*, 2020; Small *et al.*, 2018).

1.6.5.2 Farmacoterapia

Las opciones farmacológicas para el tratamiento de la RA incluyen antihistamínicos, descongestionantes, antagonistas de los receptores de leucotrienos (ARLT).

Los antihistamínicos están disponibles en formulaciones orales, intranasales y oculares. Su mecanismo de acción consiste en bloquear la acción de la histamina actuando como antagonistas de los receptores H1. La primera generación de antihistamínicos incluye difenhidramina, clorfeniramina e hidroxicina, mientras que la fexofenadina, loratadina, desloratadina y cetirizina son ejemplos de antihistamínicos de segunda generación. Los antihistamínicos de la primera generación son sedantes debido a su capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica y actúan sobre los receptores muscarínicos provocando efectos secundarios como sequedad de boca, retención urinaria, estreñimiento y/o taquicardia. Los antihistamínicos de segunda generación tienen mejor selectividad a los receptores H1, menos sedación y tiempos

de vida media prolongados (12 a 24 horas) (Akhouri 2022; Bousquet *et al.*, 2020; Small *et al.*, 2018). Los antihistamínicos ayudan a controlar síntomas como estornudos, rinorrea y picazón, pero no alivian significativamente la congestión nasal, por ello, algunos antihistamínicos de segunda generación se combinan con descongestionantes. Adicionalmente, se prefiere la terapia de primera línea debido a su perfil de seguridad y eficacia, especialmente para los síntomas estacionales o episódicos (Jean, 2023).

Los corticoides intranasales como beclometasona, budesónida, ciclesonida, propionato de fluticasona, fluticasona y acetónido de triamcinolona son opciones terapéuticas de primera línea y pueden usarse solos o en combinación con antihistamínicos orales. Su mecanismo de acción inhibe la fase temprana y tardía de la RA evitando el reclutamiento de células inmunes y la liberación de mediadores inflamatorios de las células involucradas en la fisiopatología. Sus efectos se aprecian 6 a 8 h tras la primera dosis y se aprecia mejoría días después de la primera administración (Cortés y Santaella, 2012; Hossenbaccus *et al.*, 2020; Small *et al.*, 2018). Los corticoides nasales son efectivos para controlar los cuatro síntomas principales de la RA: estornudos, picazón, rinorrea y congestión. Debido a que estos no se absorben sistémicamente, no tienen efectos adversos sistémicos. Los efectos secundarios más comunes son locales e incluyen irritación nasal, escozor y epistaxis, pero generalmente se pueden prevenir con la administración adecuada de los aerosoles (Bousquet *et al.*, 2020; Jean, 2023; Small *et al.*, 2018).

Los antagonistas de los ARLT inhiben la unión de los leucotrienos a su el receptor CysLT, asociado con la congestión nasal, la producción de moco y el reclutamiento de células inflamatorias responsables de los síntomas de RA (Hossenbaccus *et al.*, 2020) Los ARLT montelukast y zafirlukast son eficaces en el tratamiento de la RA, sin embargo, no son tan efectivos como los corticosteroides intranasales. Su uso suele ser en terapia combinada con otros agentes para los síntomas graves y en Europa su uso ha sido aprobado solo para pacientes con comorbilidad de asma y RA. (Akhouri 2022; Bousquet *et al.*, 2020; Small *et al.*, 2018)

1.6.5.3 Inmunoterapia específica con alérgenos

La inmunoterapia específica con alérgenos (ITA) se puede implementar a los pacientes una vez que se ha identificado a los alérgenos causantes, con el objetivo de inducir tolerancia que alivie los molestos síntomas alérgicos al modificar: la respuesta de los LT y LB de memoria, los niveles de anticuerpos IgE e IgG alérgeno específico, y los umbrales de activación de los mastocitos, basófilos y CD (Bousquet *et al.*,2020).

A pesar de que la ITA es un tratamiento innovador capaz de alterar la historia natural de la enfermedad, conlleva riesgos, como inducir reacciones anafilácticas, y en la práctica solo se utiliza en pacientes que no responden a las terapias convencionales o en quienes no quieren usar medicamentos de forma crónica (Bousquet *et al.*,2020; Hossenbaccus *et al.*, 2020)

La inmunoterapia puede aplicarse por dos vías: subcutánea o sublingual. La primera generalmente se administra en la zona superior del brazo y las reacciones adversas pueden incluir enrojecimiento, irritación o hinchazón en el sitio de la administración. Se recomienda administrarse en centros especializados y los pacientes deben ser vigilados después de la inyección, debido a las posibles reacciones sistémicas (Hossenbaccus *et al.*, 2020). En la administración sublingual, se coloca una tableta con el alérgeno estandarizado que se disuelve debajo de lengua una vez al día durante un periodo largo de tiempo. Esta vía es menos efectiva que la subcutánea, sin embargo, presenta menos efectos adversos por lo tanto requiere una vigilancia menos estrecha y puede resultar más cómoda para el paciente (Cortés y Santaella, 2012; Hossenbaccus *et al.*, 2020; Small *et al.*, 2018).

La ITA se administra en dosis crecientes en los primeros 6 a 8 meses, seguido de dosis de mantenimiento durante 3 a 5 años. Algunos estudios han demostrado la efectividad de la inmunoterapia en pacientes con RA, la cual persiste años después de finalizar el tratamiento (Small *et al.*, 2018).

1.6.3.4 Otros tratamientos

Los descongestionantes actúan como agonistas alfa-adrenérgicos, aliviando la congestión nasal y la rinorrea por medio de la vasoconstricción. Sin embargo, efectos adversos como aumento de la presión arterial, palpitaciones, dolor de cabeza,

irritabilidad, supresión del apetito e insomnio limita su uso en pacientes con enfermedades coronarias, hipertensión glaucoma, afecciones psiquiátricas y cerebrovasculares. Además, su aplicación intranasal prolongada aumenta el riesgo de provocar rinitis medicamentosa, por ello su uso debe limitarse a un máximo de 3-5 días (Czech *et al.*, 2023; Small *et al.*, 2018).

El uso de medicamentos biotecnológicos es una alternativa, un ejemplo de ello es el omalizumab, un anticuerpo monoclonal humanizado que se une selectivamente a la IgE humana, y el cual ha demostrado ser eficaz para el tratamiento de la RA estacional, pero su alto costo limita su uso terapéutico (Small *et al.*, 2018).

Finalmente, el tratamiento quirúrgico está indicado para pacientes con comorbilidades o con afecciones más complejas como sinusitis crónica, desviación septal grave, poliposis nasal u otras anomalías anatómicas (Jean, 2023; Small *et al.*, 2018).

1.7 Modelos de RA en ratones

Los modelos animales son de gran importancia para comprender los mecanismos inmunológicos y fisiopatológicos de las reacciones alérgicas y para proponer y evaluar nuevas terapias en estudios preclínicos (Ko *et al.*, 2015; O'Mahony, 2015). Varios modelos animales de RA tienen como objetivo evaluar la eficacia terapéutica de nuevas moléculas y comprender sus posibles mecanismos de acción.

Los ratones son los animales preferidos para los modelos de RA, debido a su fácil manejo y bajos costos de mantenimiento, pero también se utilizan otras especies como los conejillos de indias. Las cepas de ratones comúnmente utilizadas son los BALB/c y C57BL/6 los cuales montan una respuesta inmunología dominante de tipo Th2 y Th1, respectivamente. Los ratones BALB/c también presentan una mayor hiperactividad de las vías respiratorias y, por tanto, son los más empleados. Así que, es relevante considerar la especie y cepa utilizada, puesto que los mecanismos y fenotipos de las enfermedades alérgicas varía entre cepas (Lloyd *et al.*, 2014; Park, 2022).

En algunos esquemas de inmunización de RA, los animales son expuestos al antígeno únicamente vía intranasal (Sun *et al.*, 2015; Van De Rijn *et al.*, 1998). Sin embargo, el modelo más utilizado es la sensibilización sistémica seguido de provocación nasal, comúnmente se realizan de 2 a 3 sensibilizaciones a intervalos semanales, y la reexposición dura de 5 a 7 días (Bui *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2017). Entre los antígenos más usados se encuentran: extracto de ácaros de polvo (Zhu *et al.*, 2023), moho (Van De Rijn *et al.*, 1998), enterotoxina B estafilocócica (Sun *et al.*, 2015), ovoalbúmina (Bui *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2017) entre muchos otros. Para la sensibilización el antígeno suele ser administrados vía intraperitoneal (I.P) o subcutánea junto con un adyuvante. El hidróxido de aluminio es el adyuvante más utilizado, un potenciador de la respuesta Th2, pero también se ha reportado el uso adyuvante completo de Freud (Hirano *et al.*, 2012). Cuando se utiliza OVA para la sensibilización sistémica vía intraperitoneal se usa un aproximado de 25 µg de OVA con 1 mg de hidróxido de aluminio. Por otro lado, la provocación es mediante la instalación intranasal directamente en las fosas nasales o por medio de nebulización (Ko *et al.*, 2015). El número de dosis del antígeno y el adyuvante varía dependiendo de las necesidades de cada laboratorio, ya que estas influyen en el grado de sensibilización y la metodología empleada para inducir la patología (Ko *et al.*, 2015; Mo, 2015; Park, 2022).

Entre los modelos de RA se encuentra el trabajo de Kim *et al.* (2017) que para evaluar el efecto inmunomodulador de la proparacaína, utilizaron ratones BALB/c hembra sensibilizadas con 100 µg de OVA y 2 mg de hidróxido de aluminio vía I.P a los días 0, 7 y 14. Después de una semana, comenzaron el desafío administrando 500 µg de OVA en 30 µL de PBS vía I.N durante 7 días consecutivos. Otro ejemplo es el trabajo de Bui *et al.* (2019) para evaluar el posible efecto antialérgico y antiinflamatorio del extracto de fruta *Piper nigrum* emplearon ratones BALB/c machos que sensibilizaron mediante inyecciones intraperitoneales con 50 µg de OVA adsorbida en 1 mg de hidróxido de aluminio a los 1, 8 y 15 días. Posteriormente, desde el día 22 al día 28, los animales fueron retados recibiendo en cada fosa nasal 20 µL de una solución 1 mg/mL de OVA diariamente. En estos trabajos presentan similitudes y diferencias, lo que refleja la situación no estandarizada de los modelos de RA. La

complejidad de la enfermedad es una de las razones que ha complicado desarrollar un modelo estándar, adicionales a las diferencias genéticas y fisiológicas entre humanos y ratones. De igual forma, la investigación preclínica sobre la hiperreactividad de las vías respiratorias se ha centrado más en el asma y en menor medida en modelos de RA (de hecho, los modelos de RA en ratones se han desarrollado y modificado a partir de modelos de asma alérgico). Finalmente, es necesario considerar diversas variables al elaborar un modelo, incluido el animal de experimentación, la duración del esquema, el tipo y dosis de antígeno, la vía de administración y lo más importante es la pregunta experimental que se busca responder (Ko *et al.*, 2015; Mo, 2015; O'Mahony, 2015).

2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La RA es una de las enfermedades inflamatorias más comunes de las vías respiratorias. Afecta alrededor del 25% de la población infantil y el 40% de la población adulta en el rendimiento escolar y laboral, provocando síntomas molestos como estornudos, picazón, rinorrea, congestión nasal y goteo postnatal, impactando no solo en los costos económicos directos, relacionados con la atención médica, sino también en los indirectos derivado de la reducción de la productividad. Así mismo, en los últimos años solo se han proporcionado tratamientos paliativos y la prevalencia sigue aumentando. En este sentido, la búsqueda de nuevas moléculas para su tratamiento y el establecimiento de modelos preclínicos para medir la eficacia resultan de vital importancia, pues debido a la complejidad y naturaleza de la enfermedad no se cuenta como un modelo animal estándar. Si bien existen diversos modelos murinos reportados estos varían dependido de la necesidad de su aplicación. Al diseñar el modelo de RA y adaptarlo a nuestras necesidad y recursos disponibles, permitirá obtener mayor comprensión de la fisiopatología de la enfermedad y podrá ser usado en el entorno de la investigación preclínica donde se están desarrollando nuevas terapias contra esta enfermedad.

3 HIPOTÉISIS

La administración intraperitoneal de OVA emulsificada con hidróxido de aluminio a ratones BALB/c, seguida de la exposición repetida a OVA vía intranasal, inducirá una respuesta tipo alérgica caracterizada por un incremento en los niveles de IL-4, IgG e IgE específicas contra OVA.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Establecer un modelo murino de rinitis alérgica y evaluarlo mediante los niveles de IL-4, IgG e IgE anti-OVA.

4.2 Objetivos particulares

- Desarrollar un modelo de rinitis alérgica inducido por ovoalbúmina en ratones hembra de la cepa BALB/C.
- Estandarizar las técnicas de ELISA necesarias para la evaluación de IL-4, IgG e IgE anti-OVA.
- Evaluar el establecimiento de la rinitis alérgica en un modelo murino mediante la determinación de IL-4, IgG e IgE anti-OVA.
- Detectar la presencia y/o aumento de IgG e IgE en el suero de ratones utilizando la técnica de ELISA.
- Detectar la presencia y/o aumento de IL-4 en suero, plasma y lavados intranasal de ratón utilizando la técnica ELISA.

5 MATERIALES Y MÉTODO

5.1 Animales

Se utilizaron ratones hembra BALB/c de 8 semanas de edad. El Comité de Ética e Investigación de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (CEI-ENCB) revisó y

aprobó el protocolo de investigación con número ZOO-017-2021, de acuerdo con los principios éticos en la experimentación animal.

5.2 Modelo de rinitis alérgica inducido por ovoalbúmina.

Este modelo de RA empleó a la OVA como antígeno y ratones hembra BALB/c divididas en dos grupos: grupo control (GC) y grupo OVA. El modelo se conformó de la etapa de sensibilización y el reto intranasal (RIN). En la primera etapa, los animales del grupo OVA se sensibilizan I.P administrando 200 μ L de una solución compuesta de 50 μ L OVA (Sigma-Aldrich) hidratada con agua inyectable (PiSA) a una concentración final de 1 mg/mL y emulsificada con 150 μ L hidróxido de aluminio al 1.3 % (Alhydrogel, Croda), como adyuvante, a los 0, 1, 2, 7, 8 y 14 días. A los 21 días después de haber iniciado la sensibilización, se dio comienzo al RIN donde al grupo OVA se les administró una dilución de OVA (Sigma-Aldrich) a una concentración de 1 mg/mL hidratada con agua inyectable (PiSA) 10 μ L en cada narina diariamente por 21 días. Por otro lado, el GC no recibió ningún tratamiento a lo largo del ensayo.

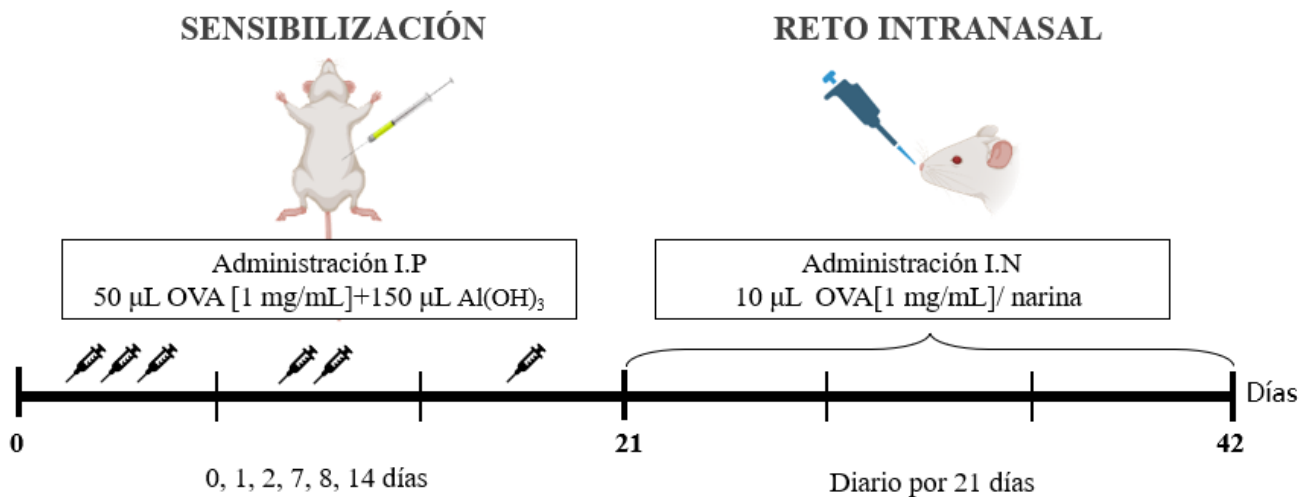


Figura 8. Esquema representativo del modelo murino de RA. El modelo consiste en dos etapas sensibilización y RIN. En la primera etapa, los animales son administrados con OVA y un adyuvante vía I.P a los días 0, 1, 2, 7, 8 y 14. Durante la etapa de RIN se administra OVA vía I.N. diariamente por 21 días.

5.3 Muestras de suero y plasma

Las muestras sanguíneas se extrajeron de la vena submandibular y se recolectaron en tubos con gel de polímero separador (BD Microtainer®) o en tubos con

EDTA (BD Microtainer®) para obtener suero y plasma, respectivamente. Posteriormente las muestras se centrifugaron a c. El suero y el plasma obtenidos se colocaron en microtubos (Eppendorf™ 0.2 mL) almacenándolos a -70 °C hasta su uso.

Las muestras de suero y plasma para determinar la concentración de IL-4 se recolectaron a los 21, 24, 25, 26, 27 y 28 días (RIN). Por otra parte, los sueros para determinar los niveles de IgG anti-OVA y IgE anti-OVA se recolectaron a los 21, 28, 35 y 42 días (RIN).

5.4 Muestras de lavado intranasal

Los lavados intranasales (LIN) se extrajeron a los 21, 23, 25, 27 y 28 días, para lo cual los animales fueron expuestos a isoflurano (Sofloran®, PiSA) seguidamente de aplicar eutanasia por dislocación cervical. A continuación, se procedió a retirar la zona de la mandíbula y aislar la tráquea retirando tejido muscular y adiposo presentes en el cuello del animal. Una vez aislado se cortó la tráquea y en donde termina la nasofaringe se implanto el catéter (Terumo®) para dar paso a los lavados con 1 mL de PBS 1x (Gibco™) + anti proteasa (Roche) con ayuda de una jeringa, el líquido se recolectó en un tubo de centrifuga (Corning™ 50 mL) y se volvía a tomar para ejecutar otro lavado, este procedimiento se repitió hasta realizar cinco lavados. Adicionalmente, se raspó la cavidad nasal para extraer mucosa y tejido que se macero con el líquido de los LIN en un filtro de células (Corning™) con ayuda de un pistón de una jeringa y vertiendo el macerado en el mismo tubo de centrifuga (Corning™ 50 mL). Finalmente, las muestras se colocaron en microtubos (Eppendorf™ 1.5 mL), para después ser centrifugadas a 4600 rpm por 12 minutos a 4 °C, el sobrenadante se recuperó guardándolos en microtubos (Eppendorf™ 0.5 mL) y almacenándolos a -70 °C. Todo el procesamiento de las muestras se hizo en condiciones frías, para reducir el riesgo de degradación de las citocinas.

5.5 ELISA

Se estandarizaron pruebas ELISA para detectar los niveles de IgG anti- OVA e IgE anti- OVA, en muestras de suero de ratones e IL-4 en suero, plasma y LIN previamente mencionadas. Las muestras problema recibieron diluciones seriadas (dependiendo el analito) o se añadieron directamente por triplicado o duplicado en

placas micro tituladoras de 96 pozos (Thermo Scientific™) con los respectivos controles y blancos.

5.5.1 Detección de IgG anti-OVA

Cada pozo de la placa (Thermo Scientific™) se sensibilizó con 100 µL de una disolución de OVA [1 mg/mL] (Sigma-Aldrich), se incubó toda la noche a 4 °C. Luego se lavó con 5 ciclos de PBS 1x (Gibco™) + Tween 20 (Sigma) al 0.1 %. Posteriormente los pozos se bloquearon con 200 µL de diluyente de ensayo, compuesto de suero fetal bovino y buffer de fosfatos pH 7.0 (Assay diluent, BD Pharmingen™) y se dejó incubar por 1 hora a temperatura ambiente. Terminando el bloqueo se realizó nuevamente 5 ciclos de lavado. Las muestras de suero del grupo OVA se diluyeron con diluyente de ensayo de la siguiente manera: 1:500, 1: 2000, 1:8000, 1: 32000 y 1:64000, mientras que las muestras del grupo GC solo tuvieron diluciones 1:50 y 1:500. Se adicionaron 100 µL de muestra a las diluciones 1:64000 y 1:500 en diferentes pozos por triplicado, incubándolas por 1 hora a temperatura ambiente. Trascurrido ese tiempo la placa se volvió a lavar y a continuación se agregó 100 µL de anticuerpos monoclonales anti-IgG de ratón unidos a la enzima peroxidasa de rábano conjugada con estreptavidina (Anti-Mouse IgG (gamma-chain)-HRP, Sigma) diluidos con diluyente de ensayo incubando por 1 hora a temperatura ambiente en ausencia de luz. Los pozos se volvieron a lavar, para luego colocar 100 µL de la solución de sustrato compuesta de TMB (3,3',5,5' tetrametilbenzidina) y peróxido de hidrógeno (Substrate Reagent Set, BD Pharmingen™) en una proporción 1:1, se dejó incubar por 20-25 minutos a temperatura ambiente y protegiendo de la luz. La reacción se detuvo con 50 µL en cada pozo con solución de paro (Abcam), H₂SO₄ 2N. Por último, se determinó la densidad óptica (D.O.) a una longitud de onda de 470 nm en el equipo Spectramax.

5.5.2 Detección de IgE anti-OVA

La placa se sensibilizó con 100 µL por pozo de una disolución de OVA [1 mg/mL] (Sigma-Aldrich) hidratada con agua inyectable (PiSA) dejándola incubar toda la noche a 4°C. Posteriormente se lavó 5 veces con PBS 1x (Gibco™) + Tween 20 (Sigma) al 0.1 %. El siguiente paso fue bloquear los pozos con 200 µL diluyente de ensayo (Assay diluent, BD Pharmingen™) por 1 hora a temperatura ambiente. Nuevamente se

llevaron a cabo 5 ciclos de lavado. Las muestras de los grupos OVA y GC tuvieron diluciones seriadas con diluyente de ensayo a 1:60, 1:120, 1:240 y 1:480. Se adicionó 100 μ L de muestra por triplicado, pero solo a las diluciones 1:240 y 1:480, incubándose por 2 horas a 37 °C. Se volvió a realizar cinco lavados para proceder a agregar 100 μ L el anticuerpo monoclonal anti-IgE de ratón biotinilado y la enzima peroxidasa de rábano conjugada con estreptavidina (Set Mouse IgE ELISA set, BD OptEIA™) incubando por 1 hora protegiendo de la luz a temperatura ambiente. Después se efectuaron otros 5 lavados, se añadió 100 μ L de TMB y peróxido de hidrógeno (Substrate Reagent Set, BD Pharmingen™) en una proporción 1:1, se incubó por 20-25 minutos a temperatura ambiente y en ausencia de luz. La reacción se detuvo con 50 μ L de solución de paro (Abcam) por pozo. Por último, se determinó la D.O. a una longitud de onda de 470 nm en el lector de placas Spectramax.

5.5.3 Detección de IL-4

La placa se sensibilizó con 100 μ L anticuerpos monoclonales de captura anti-IL4 de ratón (Anti-mouse IL-4 monoclonal antibody, BD OptEIA™) diluidos con buffer de cobertura pH 9.5 (Coating Buffer, BD OptEIA™) e incubando por una noche a 4 °C. Después se lavó 5 veces con PBS 1x (Gibco™) + Tween 20 (Sigma) al 0.1 %, para a continuación bloquear los pozos con 200 μ L diluyente de ensayo (Assay diluent, BD Pharmingen™) por 1 hora a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de bloqueo se realizaron 5 lavados más. Lo siguiente fue preparar e incorporar 100 μ L del estándar de IL-4 de ratón (Recombinant Mouse IL-4 lyophilized estándar, BD Pharmingen™) por duplicado a las concentraciones 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62.5 pg/mL, 31.2 pg/mL, 15.6 pg/mL y 7.8 pg/mL. También se adicionó directamente 100 μ L de suero, plasma o LIN, según corresponda por duplicado. Se incubó por 2 horas a temperatura ambiente. Nuevamente la placa se lavó y se prosiguió a añadir el anticuerpo monoclonal anti-IL-4 de ratón biotinilado y la enzima peroxidasa de rábano conjugada con estreptavidina (Set Mouse IL-4 ELISA set, BD OptEIA™) incubando por 1 hora a temperatura ambiente y sin exposición a la luz. Seguidamente, se realizaron otros 5 lavados y se agregó 100 μ L en cada pozo de TMB y peróxido de hidrógeno (Substrate Reagent Set, BD Pharmingen™) en una proporción 1:1, se incubó por 20-25 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz. La reacción se detuvo con 50

μL de solución de paro por cada pozo (Abcam). Se determinó la D.O. a una longitud de onda de 470 nm en el lector de placas Spectramax, para finalmente graficar la curva estándar e interpolar las concentraciones de IL-4 de las muestras problema.

5.6 Análisis estadístico

Los datos fueron procesados en Excel (Microsoft Office) y analizados en GraphPad Prism versión 8.0.1. La dispersión de los datos se reporta por medio de la desviación estándar. Se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk para determinar la distribución de los datos. La diferencia estadística entre grupos se determinó mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguida de un método de comparación múltiple de Dunn. La diferencia estadística se describe de la siguiente manera: * = $p \leq 0.05$; ** = $p \leq 0.01$; *** = $p \leq 0.001$; **** = $p \leq 0.0001$.

6 RESULTADOS

La IL-4 es una de las citocinas más importante que media las respuestas alérgicas, por lo cual su cuantificación es de gran interés. Debido a que los niveles de IL-4 fueron indetectables en experimentos pilotos, se propuso monitorear su cinética en diferentes matrices (suero, plasma y LIN) al término de la sensibilización y durante los primeros días de RIN con el supuesto de tener niveles elevados de IL-4 capaces de ser detectables por el sistema ELISA. Adicionalmente, se incluyó una dilución del estándar (IL-4 recombinante de ratón) como control positivo, para evaluar la eficacia del sistema.

El estándar de IL-4 fue detectable y cuantificable, pero no se detectaron niveles de IL-4 superiores a las del fondo en las diferentes matrices provenientes de los ratones OVA (Figura 9, Figura 10 y Figura 11), lo que indica que el sistema detecta la citosina, pero algo ocasionó que los niveles expresados en la cepa de ratones BALB/c no fueran detectadas ni cuantificables, descartando la posibilidad de que el sistema fuera el responsable de no cuantificar los niveles de citocina. Por lo tanto, se deben analizar todas las posibles causas por las que la citocina no fuera detectada.

6.1 Respuesta de la IL-4 en LIN, suero y plasma de ratones sensibilizados y RIN con OVA.

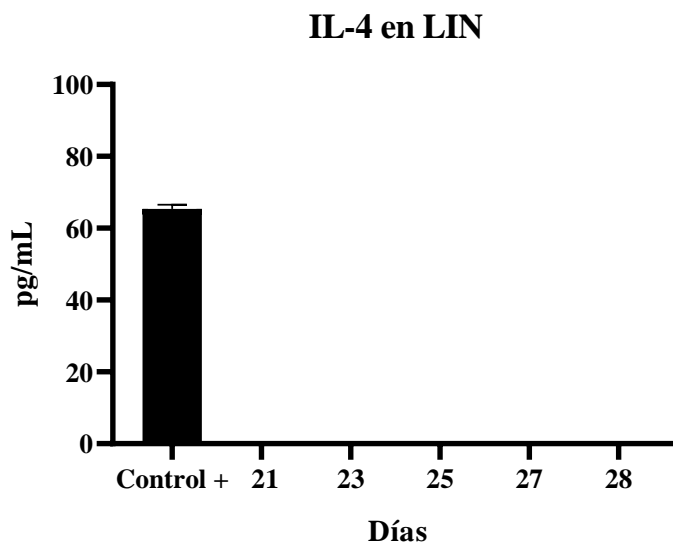


Figura 9. Evaluación del efecto de la sensibilización I.P y RIN con OVA en ratones BALB/c sobre la concentración de IL-4 en LIN. La concentración de IL-4 se reporta en pg/mL y se determinó a los 21, 23, 25, 27 y 28 días. La barra del control positivo representa la media \pm desviación estándar.

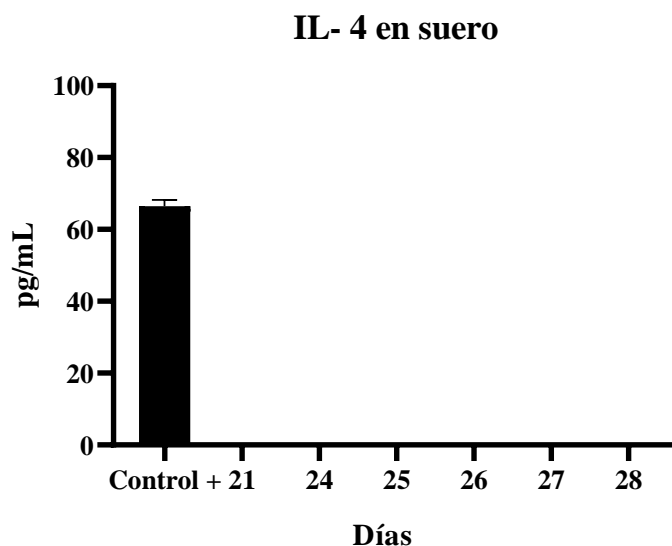


Figura 10. Evaluación del efecto de la sensibilización I.P y RIN con OVA en ratones BALB/c sobre la concentración sérica de IL-4. La concentración de IL-4 se reporta en pg/mL y se determinó a los 21, 24, 25, 26, 27 y 28 días. La barra del control positivo representa la media \pm desviación estándar.

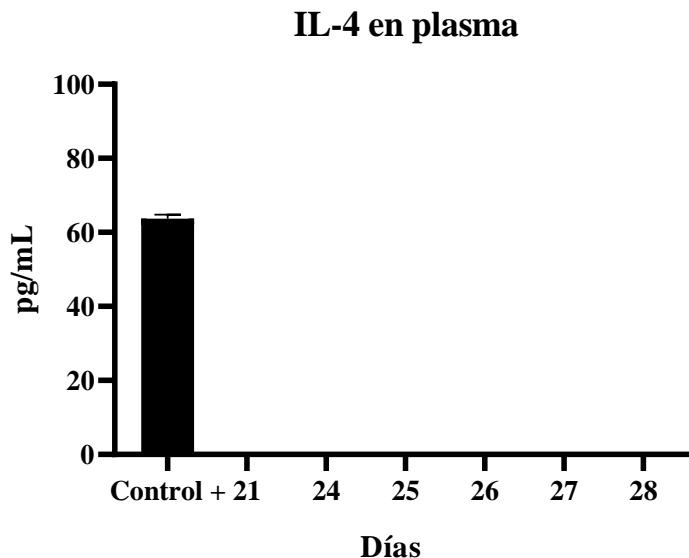


Figura 11. Evaluación del efecto de la sensibilización I.P y RIN con OVA en ratones BALB/c sobre la concentración plasmática de IL-4. La concentración de IL-4 se reporta en pg/mL y se midió a los 21, 24, 25, 26, 27 y 28 días. La barra del control positivo representa la media \pm desviación estándar.

6.2 Respuesta anticuerpos anti-OVA de los isotipos IgG e IgE en suero de ratones sensibilizados con OVA.

Se determinaron los niveles de anticuerpos de la clase IgG específicas contra OVA en suero de ratones mediante D.O (Figura 12). En el grupo OVA se observó un aumento de IgG específicas estadísticamente significativo respecto a los animales del GC. Estos resultados indican que al administrar OVA con hidróxido de aluminio vía I.P se indujo una respuesta inmunológica específica adaptativa sistémica.

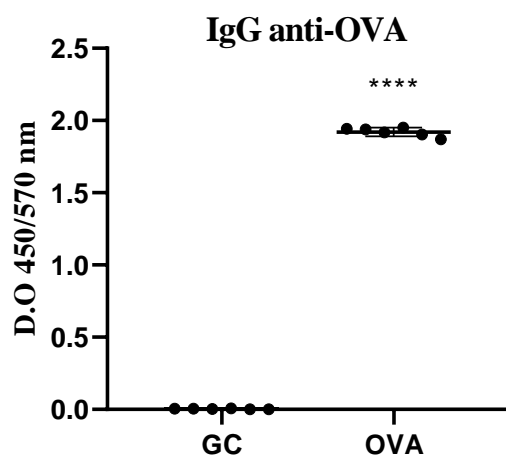


Figura 12. Efecto de la administración repetida de OVA emulsificada con hidróxido de aluminio sobre los anticuerpos IgG anti-OVA séricos de ratones. Los niveles IgG anti-OVA se representan en densidad óptica (D.O) y se determinaron al término de la sensibilización (21 días). La diferencia estadística se describe cómo **** = $p \leq 0.0001$ en comparación al GC. Las barras representan la media \pm desviación estándar (GC n=2 y OVA n=2).

Por otro lado, se obtuvieron muestras de suero a los días 21, 28, 35 y 42 días para determinar los niveles de IgE anti-OVA expresados en densidad óptica. Los niveles de IgE anti-OVA aumentaron en el grupo OVA, aunque el incremento no fue proporcional se encontró diferencias significativas respecto al grupo control con el análisis estadístico entre grupos (Figura 13).

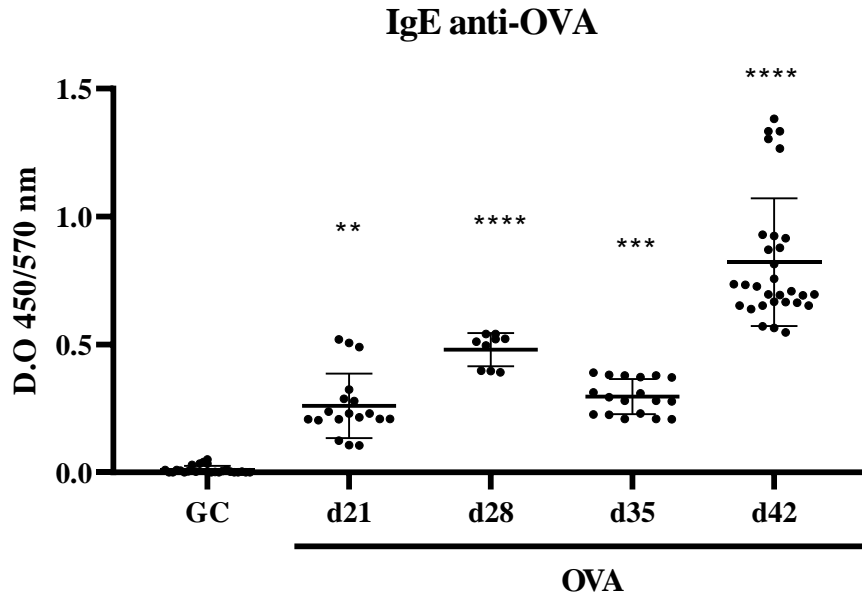


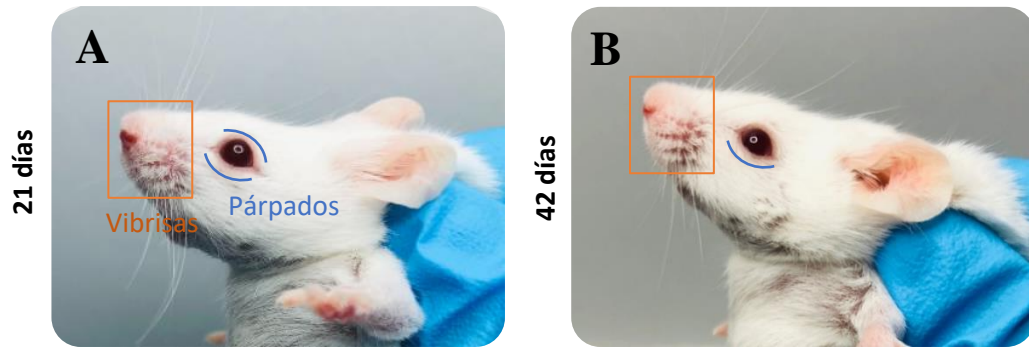
Figura 13. Evaluación de la respuesta de anticuerpos séricos de IgE anti-OVA en animales previamente sensibilizados con OVA e hidróxido de aluminio y posteriormente retado con OVA vía intranasal. Los niveles de IgE anti-OVA se representan en densidad óptica (D.O) los cuales se midieron a los 21(n=6), 28(n=3), 35 (n=6), y 42 días (n=10). GC n= 8. La diferencia estadística se describe de la siguiente manera: ** = $p \leq 0.01$; *** = $p \leq 0.001$; **** = $p \leq 0.0001$ en comparación al GC. Las barras representan la media \pm desviación estándar.

Posteriormente se hizo un análisis estadístico de Dunn, donde se evaluó el grupo control contra el grupo OVA por día, reconfirmando la diferencia estadística significativa entre ambos grupos. El promedio de los niveles de IgE anti-OVA en el grupo OVA al día 21 fueron los más bajos (Figura 13), sin embargo, indica que la sensibilización intraperitoneal con OVA también indujo la producción de IgE específicas a OVA. Finalmente, al día 42 los niveles de IgE anti-OVA incrementaron considerablemente al haber expuesto a los animales continuamente con OVA vía I.N (Figura 13).

6.3 Análisis clinimétrico de los ratones BALB/c provocadas por la administración I.P e I.N de OVA.

Los animales de experimentación fueron fotografiados durante el RIN, con el fin de monitorear su condición física y correlacionarlo con los valores de los biomarcadores medidos. Las figuras 14A y 14B, correspondientes al GC que no recibieron tratamiento, muestran ratones sanos con vibrisas de un color rosado, ojos no irritados y tampoco se observó cambios en el comportamiento durante la implementación del modelo. Por el contrario, los animales del grupo OVA manifestaron un deterioro físico paulatino a lo largo del ensayo. En la figura 14C, al inicio del RIN, los ratones OVA presentaron piloerección y temblores, sin otra alteración resaltable. Una semana después de ser administrados con OVA vía I.N, los animales continuaron exhibiendo piloerección, que se mantuvo hasta el final del ensayo, también se evidenciaron estornudos, lagrimeo de los ojos y enrojecimiento en la zona de las vibrisas, resultado del prurito y del rascado. La sintomatología se acentuó en las últimas semanas, y para el día 35 (Figura 14E) los síntomas mencionados anteriormente persistieron causando daño, pérdida del pelaje alrededor de las vibrisas y del parpado inferior por el rascado continuo, incluso la coloración en la zona de las vibrisas pasó de ser rosa a un color rojizo. Estos signos se mantuvieron hasta el día 42 (Figura 14E), cuando se presentó edema palpebral e hiperemia conjuntival además del lagrimeo.

Ratón GC



Ratón OVA

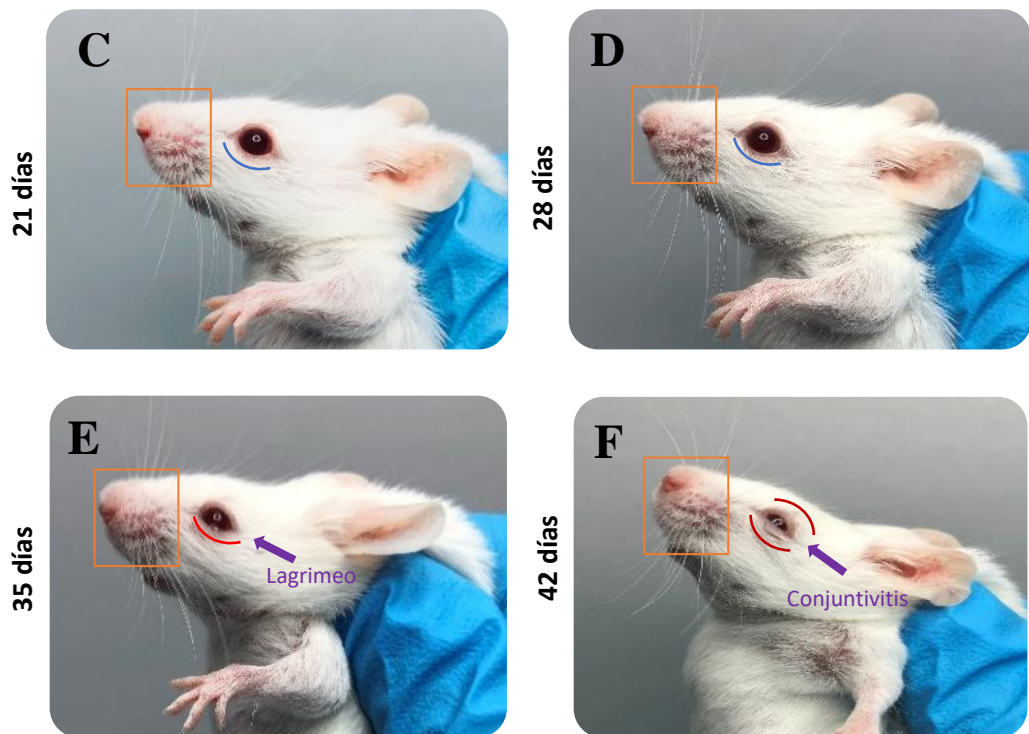


Figura 14. Estado físico de los ratones BALB/c durante el tratamiento desde el término de sensibilización hasta el término de RIN. **A.** Ratón GC, 21 días. **B.** Ratón GC, 42 días **C.** Ratón OVA, 21 días **D.** Ratón OVA, 28 días **E.** Ratón OVA, 35 días y **F.** Ratón OVA, 42 días.

7 DISCUSIÓN

La RA es una enfermedad inflamatoria de la mucosa nasal que afecta a unos 500 millones de personas en todo el mundo y su prevalencia sigue aumentando (Wang *et al.*, 2023). Por lo cual, el descubrimiento de nuevas moléculas terapéuticas y el establecimiento de modelos preclínicos para evaluar su eficacia son de gran relevancia. El presente trabajo tuvo como objetivo establecer un modelo murino de RA inducido por OVA a ratones BALB/c, empleando los niveles de IL-4, IgG e IgE anti-OVA como marcadores del establecimiento del cuadro clínico de la RA.

Para establecer el modelo se empleó la línea consanguínea de ratones BALB/c más utilizada en estudios inmunológicos, cuya información genómica está completamente secuenciada y caracterizada, lo que asegura que no exista variabilidad en los parámetros experimentales causados por factores genéticos (Lloyd *et al.*, 2014; Tam *et al.*, 2020). Además, los modelos murinos se prefieren para estudiar reacciones alérgicas sobre otros modelos, por su bajo costo de adquisición y mantenimiento (Gonipeta *et al.*, 2014).

En la literatura se han descrito diferentes esquemas de inmunización en los que varía los animales de prueba, el tipo y la dosis de alérgeno, la vía de administración, la duración del esquema, entre otras variables. Aunque muchos de los modelos reportados tienen con similitudes y diferencias, esencialmente constan en dos etapas. La primera es la etapa de sensibilización que promueve una inmunización sistemática, y la segunda etapa es el reto o desafío que desencadena una respuesta alérgica. Esto es debido a que los ratones, como la mayoría de los animales, no desarrollan naturalmente una enfermedad inflamatoria en las vías respiratorias como la RA (Chapman *et al.*, 2014). Para la etapa de sensibilización y reto se empleó OVA como antígeno (de manera similar a otros modelos reportados) debido a su fácil disponibilidad, alta pureza y a sus epítomos completamente caracterizados, convirtiéndola en una proteína modelo para investigar los mecanismos moleculares y celulares de sensibilización, tolerancia y reacciones alérgicas (Lloyd *et al.*, 2014; Pablos-Tanarro *et al.*, 2016). No obstante, la OVA no es particularmente inmunogénica y cuando se administra en forma pura puede inducir tolerancia, así que, para evitar

este efecto no deseado, se administró simultáneamente hidróxido de aluminio como adyuvante, el cual ha sido utilizado ampliamente en modelos alérgicos, por tener un excelente perfil de seguridad, reactividad mínima y ser económico (HogenEsch *et al.*, 2018; Lloyd *et al.*, 2001). El hidróxido de aluminio funciona aumentando la disponibilidad de los antígenos solubles (como la OVA) convirtiéndolos en partículas, mejorando así la fagocitosis y la presentación del antígeno por parte de las APC (Pavón *et al.*, 2020). Además, según Kool *et al.* (2008), quienes estudiaron la cinética y distribución de la respuesta inmune innata y adaptativa después de la inyección I.P de OVA con hidróxido de aluminio, el posible mecanismo de acción para inducir una respuesta inmunológicas al inyectar OVA-hidróxido de aluminio consiste en atraer monocitos inflamatorios al peritoneo, quienes captan y procesan el antígeno llevándolo a los ganglios linfáticos, como el mediastinal e inguinal, donde maduran a CD inflamatorias y presenta la OVA en péptidos a los linfocitos TCD4 en un contexto molecular del MHC-II induciendo una respuesta Th2 específica al antígeno. El perfil Th2 promueve la secreción de IL-4 e IL-5 que a su vez inducen la diferenciación de los linfocitos B a células plasmáticas productoras de IgE e IgG, por la cooperación entre los linfocitos B y los linfocitos Th2 en un microambiente rico en IL-4, causando el cambio de isotipo en los linfocitos B al reordenar genéticamente las cadenas pesadas de C μ y C δ hacia y C ϵ (Kuroda *et al.*, 2013). Varios estudios han reportado que la IL-4 también es la encargada de regular la secreción de IgG1 en los linfocitos B (Fircative *et al.*, 2018), por otra parte, Looney *et al.*, 2016 proponen que el cambio de isotipo de IgE es a partir de células plasmáticas productoras de IgG1 y no de linfocitos vírgenes. El mecanismo planteado resulta un símil a la fisiopatología de la etapa de sensibilización de una reacción de hipersensibilidad tipo I, como lo es la RA en humanos, y explica el aumento de los títulos de IgG anti-OVA (figura 12) y de IgE anti-OVA (figura 13) obtenidos.

Aun cuando la sensibilización con OVA e hidróxido de aluminio vía I.P. indujo una respuesta inmunológica tipo Th2 que promovió la producción de cantidades detectables de IgE anti-OVA, no generó una alteración en las vías respiratorias, para inducir las características alérgicas de la RA fue necesario administrar OVA directamente en las fosas nasales, esto provocó un aumento significativo en los niveles

de IgE anti-OVA (figura 13) respecto al término de la etapa de sensibilización y la manifestación de signos alérgicos asociados a la RA. El incremento de los títulos de IgE puede explicarse debido a que durante la etapa de sensibilización se generan células de memoria, en consecuencia, cuando los animales fueron re-expuestos a OVA en el RI, se requirió de menos tiempo para sintetizar IgE anti-OVA, además, los títulos séricos de IgE anti-OVA depende de la exposición a OVA (Liang *et al.*, 2016). En consecuencia, cuantas más exposiciones recibieron los animales, mayores fueron sus niveles de inmunoglobulinas. De igual manera, parte de la OVA administrada vía I.N se unió a las inmunoglobulinas sintetizadas, activando células inmunes en las vías respiratorias y promoviendo la liberación de los mediadores. La histamina es un mediador destacable, porque esta molécula es la causante del prurito nasal y ocular en los ratones al activar los receptores H1 en los nervios sensoriales (Watts *et al.*, 2019), suscitando el rascado continuo de los animales, lo que eventualmente condujo a la pérdida del pelaje en la zona de las vibrisas y el parpado inferior del ojo. Más aún, la histamina estimula los receptores H1 y H2 de los vasos sanguíneos nasales, incrementando la permeabilidad vascular y vasodilatación permitiendo la infiltración de células inflamatorias, como eosinófilos, los macrófagos y neutrófilos conduciendo a una mayor liberación de mediadores vasoactivos, lo que se traduce en una respuesta inflamatoria de fase tardía (Kakli y Riley, 2016; Watts *et al.*, 2019). Otros mediadores como la serotonina, la betatripsina o los LT también participan en el reclutamiento de eosinófilos y contribuyen a la contracción del músculo liso, al aumento de la secreción de moco, a la permeabilidad vascular y a la hipertrofia del músculo liso (Drazdauskaitė *et al.*, 2021; Pavón *et al.*, 2020; Watts *et al.*, 2019). Adicionalmente, en la figura 14F (correspondiente al último día del esquema) se observó que los ratones presentaron signos clínicos de conjuntivitis como lagrimeo, edema palpebral, quemosis e hiperemia conjuntival (Gimenes *et al.*, 2015) esto no es de sorprender puesto que las fosas nasales y la conjuntiva ocular están conectados anatómicamente por el conducto naso lagrimal facilitando la propagación de la enfermedad y los mecanismos fisiopatológicos entre ambas patologías comparten características similares (Iordache *et al.*, 2022). Esta situación también se presenta en humanos, puesto que la RA comórbida con la conjuntivitis.

En cuanto a la IL-4, esta no fue posible cuantificarla por el método de ELISA en muestras de LIN, suero o plasma a pesar de obtenerla y procesarla con ciertos cuidados como usar antiproteasa o realizar las pruebas analíticas el mismo día que se obtenían las muestras, puesto los ciclos de congelación y descongelación produce una degradación significativa de las citocinas (Kordulewska *et al.*, 2021). En un estudio de McCusker *et al.* (2002) intentaron desarrollar y caracterizar un modelo murino de RA, cuyo esquema de inmunización fue similar al del presente trabajo, pero no pudieron cuantificar la IL-4 a partir de LIN al término del RIN usando ELISA dando como posibles causas: en los ratones BALB/c la expresión de IL-4 se ocurre temprano durante la sensibilización y posteriormente tiene una regulación a la baja; esta se degrada rápidamente y no pueda ser detectable. La primera causa es consistente, puesto que este trabajo tampoco se intentó cuantificar la IL-4 durante la sensibilización. En estudios futuros se podría optar por recolectar muestras a lo largo del estudio, especialmente durante la etapa de sensibilización, donde la citocina desempeña una de las funciones más importantes, es decir, el cambio de isotipo en los linfocitos B para producir IgE antígeno específico. Sin embargo, no se optaría por extraer suero, plasma o LIN, otros estudios han utilizado sobrenadante de esplenocitos o de ganglios linfáticos cultivados y estimulados con antígeno para cuantificar la cantidad de citocinas producidas (Hong *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2020). A nivel local se podría evaluar la expresión de RNA de la IL-4 en la mucosa nasal por RT-PCR (Lee *et al.*, 2020; Mo, 2015). Por lo tanto, no poder detectar la IL-4 pudo deberse al hecho que no se evaluó en los sitios y muestras apropiadas. A pesar de no hallar IL-4, se infiere su producción porque según informaron Takeda y Gerdanf (2009) los ratones genéticamente deficientes en IL-4 no desarrollan respuestas alérgicas, ya que esta regula la diferenciación de los linfocitos T a un perfil Th2, estimula la proliferación y activación de los linfocitos B, induciendo el cambio de clases de IgG a IgE (Ryff y Pestka, 2019) y en este trabajo se midieron los títulos de IgE anti-OVA. En futuros estudios se podría explorar cuantificar otros marcadores moleculares involucrados en la fisiopatología de las reacciones de hipersensibilidad inmediatas como IL-5, IL-13, histamina, entre muchos más.

Este trabajo se enfocó principalmente en los marcadores moleculares, sin embargo, para apoyar la implantación de la enfermedad también se monitoreo el estado de salud de los ratones sensibilizados y poder diseñar la tabla 2 que compara los principales síntomas alérgicos de pacientes con RA en comparación con la clinimetría observada en el modelo murino de RA, la cual muestra que los animales OVA presentaron síntomas alérgicos nasales y oculares similares, pues los modelos murinos de RA inducidos por OVA muestran síntomas alérgicos nasales similares a los observados en los humanos como estornudos, rascado, aumento de la infiltración de eosinófilos y mastocitos a la cavidad nasal (Bui *et al.*, 2017). Por lo tanto, la implantación de la RA no solo puede evaluarse mediante marcadores moleculares, sino también se refleja en el estado de salud de los animales.

Tabla 2. Clinimetría de la RA en humanos frente a ratones del grupo OVA.

Tipo de reacciones alérgicas	Síntomas en humanos	Síntomas captados en el modelo murino
Reacciones del tracto respiratorio	Estornudos	Sí
	Congestión nasal	No
	Prurito nasal	Sí
	Rinorrea	No
	Disnea	Sí
	Descarga nasal posterior	No
	Hiposmia	No
Reacciones oculares	Prurito ocular	Sí
	Lagrimeo	Sí
	Conjuntivitis	Sí
	Hiperemia conjuntival	No

Los animales retados con OVA presentaron: títulos elevados de IgE e IgG anti-OVA y sintomatologías asociadas a la RA, lo que significa que se logró implantar el modelo animal usando OVA. Sin embargo, ningún modelo animal abarca todas las manifestaciones clínicas de las enfermedades alérgicas en humanos y algunos solo reproducen los rasgos más comunes (Takeda *et al.*, 2009). Por lo tanto, los modelos animales deben seguir refinándose, para que pueda reflejar de forma más veraz a la RA lo que impulsa la comprensión de la enfermedad y ayuda al desarrollo y evaluación de nuevos tratamientos para pacientes cuyas terapias actuales son insuficientes.

8 CONCLUSIONES

-Se estableció un modelo de RA inducido por OVA en ratones hembra BALB/c, evaluándolo a través de los niveles de IgG e IgE anti-OVA, cuyos títulos incrementaron con forme aumento la exposición de los animales a la OVA. Adicionalmente, los animales presentaron signos asociadas a la patología que contrasta con los niveles de inmunoglobulinas.

-Fue posibles estandarizar la técnica de ELISA para determinar los títulos de IgG e IgE anti-OVA, así como la determinación de los niveles de estas inmunoglobulinas séricas de animales tratados con OVA.

-Se estandarizó la técnica de ELISA para cuantificar la concentración de IL-4. Sin embargo, no se pudo cuantificar en suero, plasma ni en LIN proveniente de los animales tratados con OVA.

9 PERSPECTIVAS

-Una de las limitaciones de este trabajo fue el uso de OVA para inducir la RA, porque no es un alérgeno natural, así que en futuros estudios se podría considerar el uso de polen, ácaros de polvo o mohos, para aumentar los títulos séricos de inmunoglobulinas y de citocinas.

-Para futuros estudios para detectar IL-4 se debería usar muestrear en otros sitios, como partir de cultivos celulares de esplenocitos o ganglios linfáticos si se quiere usar ELISA o por otro lado probar técnicas de biología molecular como RT-PCR que evalúen la expresión de IL-4 en el NALT. Incluso sería conveniente evaluar otras citocinas involucradas en la fisiopatología de las reacciones de hipersensibilidad.

-Con el fin de tener una estandarización más robusta se debería emplearse técnicas histológicas para estudiar los cambios de sufre la estructura de vías respiratorias y observar la infiltración de las células inflamatorias en las mismas.

10 REFERENCIAS

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2015) Trastornos por hipersensibilidad. *Inmunología celular y molecular* (pp. 399-416). Elsevier España.
- Akhouri, S., & House, S. A. (2023). Allergic Rhinitis. In StatPearls. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538186/>
- Bjermer, L., Westman, M., Holmström, M., & Wickman, M. C. (2019). The complex pathophysiology of allergic rhinitis: scientific rationale for the development of an alternative treatment option. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 15(1). doi:10.1186/s13223-018-0314-1
- Bousquet, J., Anto, J. M., Bachert, C., Baiardini, I., Bosnic-Anticevich, S., Walter Canonica, G., ... Toppila-Salmi, S. (2020). Allergic rhinitis. *Nature Reviews Disease Primers*, 6(1). doi:10.1038/s41572-020-00227-0
- Bui, T. T., Piao, C. H., Song, C. H., & Chai, O. H. (2017). Skullcapflavone II attenuates ovalbumin-induced allergic rhinitis through the blocking of Th2 cytokine production and mast cell histamine release. *International Immunopharmacology*, 52, 77–84. doi: 10.1016/j.intimp.2017.08.029
- Bui, T. T., Piao, C. H., Hyeon, E., Fan, Y., Van Nguyen, T., Jung, S. Y., ... Chai, O. H. (2019). The protective role of Piper nigrum fruit extract in an ovalbumin-induced allergic rhinitis by targeting of NFκBp65 and STAT3 signalings. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 109, 1915–1923. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.11.073>
- Cardell, L.-O., Olsson, P., Andersson, M., Welin, K.-O., Svensson, J., Tennvall, G. R., & Hellgren, J. (2016). TOTALL: high cost of allergic rhinitis—a national Swedish population-based questionnaire study. *Npj Primary Care Respiratory Medicine*, 26(1). doi:10.1038/npjpcrm.2015.82
- Chapman, D. G., Tully, J. E., Nolin, J. D., Janssen-Heininger, Y. M., & Irvin, C. G. (2014). Animal models of allergic airways disease: where are we and where to next? *Journal of cellular biochemistry*, 115(12), 2055–2064. <https://doi.org/10.1002/jcb.24881>
- Chen, MC., Tai, J.W., Wu, C.J. (2021). Induction of Airway Hypersensitivity to Ovalbumin and Dust Mite Allergens as Mouse Models of Allergic Asthma. In: Nagamoto-Combs, K.

(eds) *Animal Models of Allergic Disease. Methods in Molecular Biology*, vol 2223. Humana, New York, NY. https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1007/978-1-0716-1001-5_8

- Cortés Sánchez, R., & Santaella Sáez, J. I. (2012). Rinitis: concepto, clasificación, diagnóstico y tratamiento. *Manual de Otorrinolaringología Infantil*, 213–223. <https://doi.org/10.1016/B978-84-8086-905-8.50022-9>
- Czech, E. J., Overholser, A., & Schultz, P. (2023). Allergic Rhinitis. *Primary care*, 50(2), 159–178. <https://doi.org/10.1016/j.pop.2023.01.003>
- Dierick, B. J. H., van der Molen, T., Flokstra-de Blok, B. M. J., Muraro, A., Postma, M. J., Kocks, J. W. H., & van Boven, J. F. M. (2020). Burden and socioeconomics of asthma, allergic rhinitis, atopic dermatitis, and food allergy. *Expert review of pharmacoeconomics & outcomes research*, 20(5), 437–453. <https://doi.org/10.1080/14737167.2020.1819793>
- Drazdauskaitė, G., Layhadi, J. A., & Shamji, M. H. (2020). Mechanisms of Allergen Immunotherapy in Allergic Rhinitis. *Current Allergy and Asthma Reports*, 21(1). doi:10.1007/s11882-020-00977-7
- Dullaers, M., De Bruyne, R., Ramadani, F., Gould, H. J., Gevaert, P., & Lambrecht, B. N. (2012). The who, where, and when of IgE in allergic airway disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Mosby Inc. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.10.029>
- Firacative, C., Gressler, A.E., Schubert, K. *et al.* (2018) Identification of T helper (Th)1- and Th2-associated antigens of *Cryptococcus neoformans* in a murine model of pulmonary infection. *Sci Rep* 8, 2681 <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21039-z>
- Gimenes, A. D., Andrade, T. R. M., Mello, C. B., Ramos, L., Gil, C. D., & Oliani, S. M. (2015). Beneficial effect of annexin A1 in a model of experimental allergic conjunctivitis. *Experimental Eye Research*, 134, 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2015.03.013>
- Gonipeta, B., Kim, E., & Gangur, V. (2014). Mouse Models of Food Allergy: How Well do They Simulate the Human Disorder? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(3), 437–452. doi:10.1080/10408398.2012.657807

- Hirano, M., Ogita-Nakanishi, H., Miyachi, W., Hannya, N., Yamamoto-Kimoto, Y., Sakurai, K., Miyoshi-Higashino, M., Tashiro-Yamaji, J., Kato, R., Ijiri, Y., Tanaka, K., Kanazawa, A., Terada, T., Kawata, R., Takenaka, H., Kubota, T., & Yoshida, R. (2012). Essential role of macrophages in the initiation of allergic rhinitis in mice sensitized intranasally once with cedar pollen: regulation of class switching of immunoglobulin in B cells by controlling interleukin-4 production in T cells of submandibular lymph nodes. *Microbiology and immunology*, 56(6), 392–405. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2012.00449.x>
- Hong, S. H., Kim, S. R., Choi, H. S., Ku, J. M., Seo, H. S., Shin, Y. C., & Ko, S. G. (2014). Effects of Hyeonggaeyeongyo-tang in ovalbumin-induced allergic rhinitis model. *Mediators of inflammation*, 2014, 418705. <https://doi.org/10.1155/2014/418705>
- HogenEsch, H., O'Hagan, D.T. & Fox, C.B. (2018) Optimizing the utilization of aluminum adjuvants in vaccines: you might just get what you want. *npj Vaccines* 3, 51 <https://doi.org/10.1038/s41541-018-0089-x>
- Hossenbaccus, L., Linton, S., Garvey, S., & Ellis, A. K. (2020). Towards definitive management of allergic rhinitis: best use of new and established therapies. *Allergy, asthma, and clinical immunology: official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology*, 16, 39.
- Instituto Mexicano del Seguro Social (2017). Diagnóstico y tratamiento de rinitis alérgica. *Guía de Práctica Clínica, México*. Recuperado el 28 de abril del 2023 <https://www.imss.gob.mx/sites/all/statics/guiasclinicas/041GER.pdf>
- lordache, A., Boruga, M., Muşat, O., Jipa, D. A., Tătaru, C. P., & Muşat, G. C. (2022). Relationship between allergic rhinitis and allergic conjunctivitis (allergic rhinoconjunctivitis) - review. *Romanian journal of ophthalmology*, 66(1), 8–12. <https://doi.org/10.22336/rjo.2022.3>
- Jessica Salinas, L. (2012). Mecanismos de daño inmunológico. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 23(4), 458–463. [https://doi.org/10.1016/s0716-8640\(12\)70336-x](https://doi.org/10.1016/s0716-8640(12)70336-x)
- Kakli, H. A., & Riley, T. D. (2016). Allergic Rhinitis. *Primary Care - Clinics in Office Practice*. W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.pop.2016.04.009>

- Kariyawasam, H. H., & Rotiroti, G. (2021). Allergic Rhinitis. *Encyclopedia of Respiratory Medicine, Second Edition* Vol. 2, pp. 448–460. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102723-3.00089-5>
- Kindt, T. J., Goldsby, R. A., Osborne, B. A., & Palacios Martínez, R. (2007) Reacciones de hipersensibilidad. *Inmunología de Kuby* (pp 371-397). McGraw-Hill Interamericana.
- Kim, H. S., Won, S., Lee, E. K., Chun, Y. H., Yoon, J. S., Kim, J. T., & Kim, H. H. (2017). Effect of Proparacaine in a Mouse Model of Allergic Rhinitis. *Clinical and experimental otorhinolaryngology*, 10(4), 325–331. <https://doi.org/10.21053/ceo.2017.00101>
- Ko, M. T., Huang, S. C., & Kang, H. Y. (2015). Establishment and characterization of an experimental mouse model of allergic rhinitis. *European archives of oto-rhino-laryngology: official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS): affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery*, 272(5), 1149–1155. <https://doi.org/10.1007/s00405-014-3176-2>
- Kool, M., Soullié, T., van Nimwegen, M., Willart, M. A., Muskens, F., Jung, S., Hoogsteden, H. C., Hammad, H., & Lambrecht, B. N. (2008). Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *The Journal of experimental medicine*, 205(4), 869–882. <https://doi.org/10.1084/jem.20071087>
- Kordulewska, N. K., Topa, J., Tańska, M., Cieślińska, A., Fiedorowicz, E., & Jarmołowska, B. (2021). Stability of interleukin-1 β , -4, -6, -8, -10, -13, interferon- γ and tumor necrosis factor- α in human sera after repetitive freeze-thaw cycles and long storage. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 196, 113900. doi: 10.1016/j.jpba.2021.113900
- Kuroda, E., Coban, C., & Ishii, K. J. (2013). Particulate adjuvant and innate immunity: past achievements, present findings, and future prospects. *International reviews of immunology*, 32(2), 209–220. <https://doi.org/10.3109/08830185.2013.773326>
- Lee, K. I., Bae, J. S., Kim, E. H., Kim, J. H., Lyu, L., Chung, Y. J., & Mo, J. H. (2020). Strain-Specific Differences in House Dust Mite (*Dermatophagoides farinae*)-Induced

Mouse Models of Allergic Rhinitis. *Clinical and experimental otorhinolaryngology*, 13(4), 396–406. <https://doi.org/10.21053/ceo.2019.01837>

Liang, M.J., Fu, Q.L., Jiang, H.Y. et al. (2016) Immune responses to different patterns of exposure to ovalbumin in a mouse model of allergic rhinitis. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 273, 3783–3788. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1007/s00405-016-4128-9>

Lloyd, C. M., Gonzalo, J.-A., Coyle, A. J., & Gutierrez-Ramos, J.-C. (2001). Mouse models of allergic airway disease. *Advances in Immunology*, 263–295. doi:10.1016/s0065-2776(01)77019-8

Lloyd, C., Lewkowich, I. P., Wills-Karp, M., & Saglani, S. (2014). Mouse Models of Allergic Airways Disease. In *Middleton's Allergy: Principles and Practice: novena edición* (Vol. 1–2, pp. 842–860). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-08593-9.00052-8>

Looney, T. J., Lee, J. Y., Roskin, K. M., Hoh, R. A., King, J., Glanville, J., Liu, Y., Pham, T. D., Dekker, C. L., Davis, M. M., & Boyd, S. D. (2016). Human B-cell isotype switching origins of IgE. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 137(2), 579–586.e7. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.07.014>

López, G., & Díaz, L. (2023). Rinitis alérgica: a propósito de la llegada de la primavera. *Acta Pediátrica De México*, 44(2), 161-166. <https://doi.org/10.18233/apm.v44i2.2646>

Mancilla E, Medina M, Barnica R, Soto D, Guerrero R., & Nájera Y (2015) Prevalencia de rinitis alérgica en poblaciones de varios estados de México. *Revista Alergia México*, 62, 196-201.

McCusker, C., Chicoine, M., Hamid, Q., & Mazer, B. (2002). Site-specific sensitization in a murine model of allergic rhinitis: role of the upper airway in lower airways disease. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 110(6), 891–898. <https://doi.org/10.1067/mai.2002.130048>

Mirotti L, Alberca Custódio RW, Gomes E, Rammauro F, de Araujo EF, Garcia Calich VL and Russo M (2017) CpG-ODN Shapes Alum Adjuvant Activity Signaling via MyD88 and IL-10. *Front. Immunol.* 8:47. doi: 10.3389/fimmu.2017.00047

- Mo, Ji-Hun. (2015). Principles and Application of Mouse Model of Allergic Rhinitis. *Korean Journal of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery*. 58. 159. 10.3342/kjorl-hns.2015.58.3.159.
- Murphy, K., & Weaver, C. (2019). *Inmunología de JANEWAY*. Editorial El Manual Moderno.
- Nur Husna, S. M., Tan, H. T., Md Shukri, N., Mohd Ashari, N. S., & Wong, K. K. (2022). Allergic Rhinitis: A Clinical and Pathophysiological Overview. *Frontiers in medicine*, 9, 874114. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.874114>
- O'Hehir, R. E., Holgate, S. T., & Sheikh, A. (2017). Middleton. *Alergología esencial*. Elsevier Health Sciences.
- Pablos-Tanarro, A., López-Expósito, I., Lozano-Ojalvo, D., López-Fandiño, R., & Molina, E. (2016). Antibody production, anaphylactic signs, and T-cell responses induced by oral sensitization with ovalbumin in BALB/c and C3H/HeOuj mice. *Allergy, asthma & immunology research*, 8(3), 239-245.
- Park, S. C. (2022). Understanding the Mouse Model of Respiratory Allergic Diseases. *Korean Journal of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery*, 65(6), 309-318.
- Pavón Romero, L., Jiménez Martínez, M. del C., & Garcés Alvarez, M. E. (2020). *Inmunología molecular, celular y traslacional*. Wolters Kluwer.
- Pawankar, R., Mori, S., Ozu, C., & Kimura, S. (2011). Overview on the pathomechanisms of allergic rhinitis. *Asia Pacific allergy*, 1(3), 157–167. <https://doi.org/10.5415/apallergy.2011.1.3.157>
- Regueiro González, J. R., Martínez Naves, E., López Larrea, C., González Rodríguez, S., & Correll Almuzara, A. (2022). *Inmunología: biología y patología del sistema inmunitario (5a edición)*. Editorial Médica Panamericana.
- Ring, J. (2021). History of Allergy: Clinical Descriptions, Pathophysiology, and Treatment. In: Traidl-Hoffmann, C., Zuberbier, T., Werfel, T. (eds) *Allergic Diseases – From Basic Mechanisms to Comprehensive Management and Prevention. Handbook of Experimental Pharmacology*, vol 268. Springer, Cham. https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1007/164_2021_509

- Rotiroti, G., & Scadding, G. K. (2016). Allergic rhinitis-an overview of a common disease. *Paediatrics and Child Health*, 26(7), 298-303.
- Ryff, JC., & Pestka, S. (2019) Interferons and Interleukins.
- Ryff, Jean-Charles & Pestka, Sidney. (2019). Interferons and Interleukins. 10.1007/978-3-030-00710-2_27.
- Savouré, M., Bousquet, J., Jaakkola, J. J. K., Jaakkola, M. S., Jacquemin, B., & Nadif, R. (2022). Worldwide prevalence of rhinitis in adults: A review of definitions and temporal evolution. *Clinical and translational allergy*, 12(3), e12130. <https://doi.org/10.1002/ct2.12130>
- Seidman, M. D., Gurgel, R. K., Lin, S. Y., Schwartz, S. R., Baroody, F. M., Bonner, J. R., ... Nnacheta, L. C. (2015). Clinical Practice Guideline. Otolaryngology-Head and Neck Surgery, 152(1_suppl), S1–S43. doi:10.1177/0194599814561600
- Small, P., Keith, P. K., & Kim, H. (2018). Allergic rhinitis. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 14(S2). doi:10.1186/s13223-018-0280-7
- Sun, R., Tang, X., Yao, H., Hong, S., Yang, Y., Kou, W., & Wei, P. (2015). Establishment of a new animal model of allergic rhinitis with biphasic sneezing by intranasal sensitization with Staphylococcal enterotoxin B. *Experimental and therapeutic medicine*, 10(2), 407–412. <https://doi.org/10.3892/etm.2015.2506>
- Takeda, K., & Gelfand, E. W. (2009). Mouse models of allergic diseases. *Current opinion in immunology*, 21(6), 660-665.
- Tam, W.Y., & Cheung, KK. (2020) Phenotypic characteristics of commonly used inbred mouse strains. *J Mol Med* 98, 1215–1234 <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1007/s00109-020-01953-4>
- Testera-Montes, A., Jurado, R., Salas, M., Eguluz-Gracia, I., & Mayorga, C. (2021). Diagnostic Tools in Allergic Rhinitis. *Frontiers in allergy*, 2, 721851. <https://doi.org/10.3389/falgy.2021.721851>
- Van De Rijn, M., Mehlhop, P. D., Judkins, A., Rothenberg, M. E., Luster, A. D., & Oettgen, H. C. (1998). A murine model of allergic rhinitis: Studies on the role of IgE in pathogenesis and analysis of the eosinophil influx elicited by allergen and eotaxin.

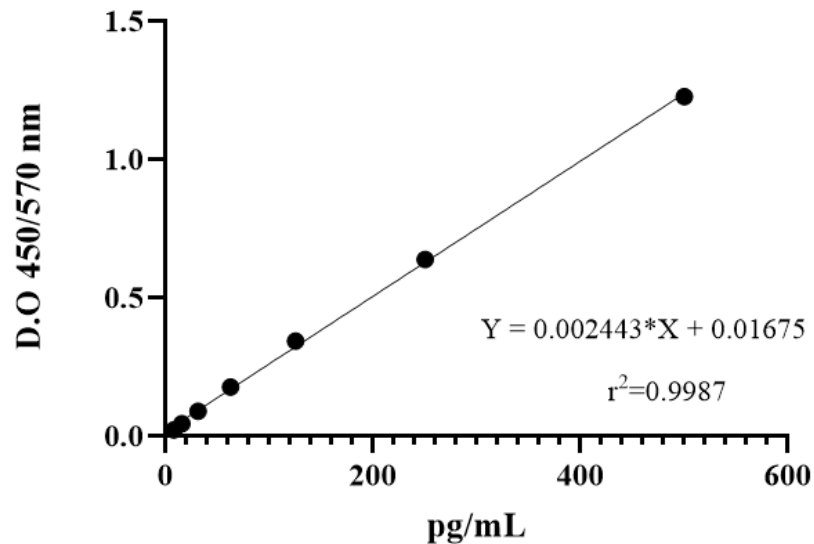
Journal of Allergy and Clinical Immunology, 102(1), 65–74.
[https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(98\)70056-9](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(98)70056-9)

Wang, J., Zhou, Y., Zhang, H., Hu, L., Liu, J., Wang, L., Wang, T., Zhang, H., Cong, L., & Wang, Q. (2023). Pathogenesis of allergic diseases and implications for therapeutic interventions. *Signal transduction and targeted therapy*, 8(1), 138.
<https://doi.org/10.1038/s41392-023-01344-4>

Watts, A. M., Cripps, A. W., West, N. P., & Cox, A. J. (2019). Modulation of Allergic Inflammation in the Nasal Mucosa of Allergic Rhinitis Sufferers with Topical Pharmaceutical Agents. *Frontiers in pharmacology*, 10, 294.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00294>

Zhu, Y., Yu, J., Zhu, X. et al. (2023) Experimental observation of the effect of immunotherapy on CD4+ T cells and Th1/Th2 cytokines in mice with allergic rhinitis. *Sci Rep* 13, 5273. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-32507-6>

11 ANEXOS



Curva de calibración para la cuantificación de IL-4. Como se observa la IL-4 recombinante proveniente del Kit fue cuantificable.