

Modulación de la dermatitis atópica mediante la administración de antígenos totales de *Toxoplasma gondii*

Tesis de Licenciatura en Biotecnología

ITECA, ECyT_UNSAM, CONICET

Autora: Julieta Santos

Directora: Dra. Alejandra Goldman

Co-Director: Dr. Francisco Astort

Agradecimientos

Primero, quiero agradecer a mis viejos por haberme permitido irme de casa para estudiar la carrera que quería y en la universidad que quería. Gracias por apoyarme siempre, tanto emocional como económicamente, soy consciente de que sin ustedes no podría haber llegado hasta acá. Gracias mamá por darme la confianza y la fuerza que a veces me faltaba para levantarme y seguir y gracias eternamente por acompañarme, escucharme y guiarme desde lejos. Agradezco la tremenda madre y mejor amiga que tengo. Gracias papá por tranquilizarme cuando me pasaba de vueltas, por siempre hacerme ver las situaciones desde otro punto de vista, por acompañarme donde sea que estés y por nunca dudar de mí.

Gracias Lu y Matu por ser los mejores hermanos que la vida me podría haber dado, por siempre creer en mí, incluso cuando yo no podía, por siempre alentarme a seguir y por estar ahí. Gracias Luqui por siempre ser tan centrado, por escucharme cada vez que te necesité y por darme claridad. Gracias Matu por darme la tranquilidad que tanto me faltaba y por siempre estar para alegrarme la tarde con un videito. Gracias a ambos por hacerme sentir que los tenía cerca aunque estaban a 2000 km, por apoyarme en todas mis decisiones y por hacer mi vida más feliz.

Gracias a todas las personas que trabajan en el laboratorio todos los días y a aquellas que ya no están. Gracias a Paco por darme la tranquilidad y claridad que a veces me faltaba y por ayudarme siempre que lo necesité. Gracias a Valen por enseñarme tanto, por responder a todas mis dudas, por ser tan paciente y por siempre darme una mano con todo. Gracias a absolutamente todos los investigadores, a Nadia por alegrarme los Elisás, a Nacho por saber tanto y responder todas mis consultas, a Vane por su vibra tan positiva que levanta a cualquiera y a Maruri por siempre estar dispuesto a ayudar y por ser tan genuino. Por último, y la más importante, gracias a la Goldman por ser la mejor persona, investigadora y directora que podría haber elegido, porque vos sabes que yo elegí a mi directora y la tesis vino con ella y no al revés. Gracias por aceptarme como tesinista, por acompañarme en cada paso de este proceso y por hacerlo con tanta dedicación. Gracias por ser tan alegre, tan auténtica, tan empática y por siempre hacerme sentir escuchada.

A los chicos del laboratorio, gracias por ser parte del día a día y por siempre ayudar en absolutamente todo. Son todas personas buenísimas y brillantes. Gracias Joel por ser el primero que me enseñó a agarrar una pipeta, por tu buena predisposición a todo y por tus sabios consejos. Mención especial para Constanza, porque sin ella mis días en el laboratorio, en la facultad y en este último año no hubieran sido lo que fueron. Gracias Coti por tu apoyo, tu compañía y por ser la única que me entendía. La vida me cruzó con vos y estoy plenamente agradecida por eso, espero que sigamos teniendo aventuras juntas pero esta vez sin tanto llanto de por medio.

Gracias a todo el grupo de Rabanito: Emicha, Catita, Capuj, Noe, Vic, Cotita, Cam y Lu. Son lo mejor que me llevo de esta experiencia facultativa. Gracias por siempre estar, por escuchar, por acompañar, por

entender y por apoyar. Ustedes fueron el sostén que muchas veces no encontraba en otro lado. Hicieron que mis últimos años en la facultad sean más hermosos (y ruidosos) de lo que podría haber imaginado. Todas y cada una de ustedes son personas tan diferentes entre sí y a su vez tan geniales por sus particularidades. Gracias por bajar mi ansiedad y por hacer mis días mejores.

Gracias a las hermanas Muratore por ser la familia que me faltó durante todo este proceso. Gracias Maru por enseñarme tantas cosas, por siempre darme los mejores consejos, por hacerme ver que la vida no necesitaba tanto estrés encima, por bajarme mil cambios y por enseñarme tantos buenos hábitos. Lula, con vos no tengo palabras suficientes para agradecer a la vida por la amistad que me dió. Sos la mejor persona que conozco, mi incondicional, sos la hermana que no tengo y la que me sostuvo y contuvo cuando más lo necesite. No podría haber hecho la mitad de las cosas que hice si no te hubiera tenido al lado durante el proceso, realmente no puedo agradecer todo lo que hiciste y haces por mí. Gracias por haberte auto invitado a dormir a mi casa ese día hace ya no me acuerdo cuantos años. Gracias a ambas por siempre darme una mano en todo, por siempre estar y por darme una segunda casa.

Quiero agradecer a Vladi, porque fue otra de las personas que estuvo durante todos estos años aguantándome en los momentos más difíciles y conteniéndome. Gracias por seguir acompañándome hasta el final, por bancarme tantas, por tu optimismo constante y por tu apoyo incondicional.

También quiero agradecer a mi amiga Mery, por estar siempre dispuesta a ayudarme, por aconsejarme cada vez que lo necesité, por las múltiples meriendas, por la compañía y por hacerme sentir que tenía en quien recaer.

Gracias también a mi mejor amiga Meli que, a pesar de estar muy lejos, siempre confió en mí, me apoyó durante todos estos años, me acompañó y escuchó desde la distancia.

Gracias a mi amigo Boni por escucharme, por cocinarme cuando estaba triste, por invitarme a algún café, por bajar mi intranquilidad y por darme claridad. Gracias por haber seguido acompañándome.

A mis abuelos, Otilio y Custodia, gracias por su sabiduría. Sus palabras me guiaron durante todo el proceso. Siempre recuerdo su optimismo, sus ganas de seguir a pesar de todo y la pasión y el amor que le ponían a todo lo que hacían. Esos consejos seguí para poder terminar esto.

Gracias a Rena por mostrarme otra forma de ver las cosas y la vida. Gracias por siempre estar, a pesar de que los años pasaron y la distancia se hizo grande. Gracias por siempre mantenerme como parte de tu vida, por escucharme, por guiarme y por siempre haber tenido fe en mí. Fuiste y sos una inspiración.

Gracias a Richie, por haber entrado a mi vida en los primeros años de facultad y por haber estado ahí, acompañándome, en los momentos más difíciles. Gracias por siempre alentarme a seguir y por siempre ayudarme. Gracias también a Caro por haberme dado una mano tantas veces los primeros años de facultad, por darme un lugar donde vivir y por estar ahí.

Gracias a la UNSAM, por ser la institución que es. Gracias a los docentes que tanto me enseñaron y no solo académicamente. Gracias por hacer que el transcurso por esta carrera sea el mejor posible.

Índice

1. Resumen	8
2. Introducción	11
2.1 Desórdenes alérgicos	11
2.2 Dermatitis atópica	12
2.2.1 La piel: Estructura y Fisiología	13
2.2.2 Patología y respuesta inmune	14
2.2.3 Tratamientos actuales para la dermatitis atópica	18
2.2.3.1 Tratamientos básicos	18
2.2.3.1 Tratamientos médicos estándar	19
2.2.3.1 Tratamientos adyuvantes	20
2.2.4 Modelos Animales	20
2.2.4.1 Modelos murinos inducidos por sensibilización epicutánea con alérgenos	20
2.2.4.2 Modelos murinos inducidos por haptenos	21
2.2.4.3 Modelos murinos inducidos por Calcipotriol (MC903)	21
2.3 <i>Toxoplasma gondii</i> y desórdenes alérgicos	21
2.3.1 Teoría higiénica	21
2.3.2 <i>Toxoplasma gondii</i>	22
2.4 Antígenos del lisado de taquizoitos de <i>Toxoplasma gondii</i> (TLA)	24
3. Hipótesis y Objetivos	26
3.1 Construcción de la Hipótesis	26
3.2 Objetivo general	26
3.3 Objetivos específicos	26
4. Resultados	27
4.1 Evaluación <i>in vitro</i> del efecto del TLA sobre respuestas T _H 2	27
4.1.1 Cultivo de taquizoitos <i>in vitro</i>	27
4.1.2 Evaluación del efecto del TLA de taquizoitos	28
4.1.3 Evaluación del efecto del TLA proveniente de quistes	30
4.2 Desarrollo de un protocolo corto de dermatitis	34
4.2.1 Primer protocolo	34
4.2.1.1 Anticuerpos en suero	34
4.2.1.2 Histopatología y lesiones cutáneas	35
4.2.1.3 Frotis de sangre	38
4.2.1.4 Respuesta Celular: Perfil de Citoquinas T _H 1 y T _H 2	39

4.2.2 Segundo protocolo	40
4.2.2.1 Anticuerpos en suero	40
4.2.2.2 Lesiones cutáneas e Histopatología	41
4.2.2.3 Respuesta Celular: Perfil de Citoquinas T _H 1 y T _H 2	44
4.2.3 Tercer protocolo	44
4.2.3.1 Anticuerpos en suero	45
4.2.3.2 Lesiones cutáneas e Histopatología	45
4.2.3.3 Frotis de sangre	47
4.2.3.4 Respuesta Celular: Perfil de Citoquinas T _H 1 y T _H 2	48
4.2.4 Comparación de los tres protocolos desarrollados	48
4.3 Estudio del TLA como tratamiento de la dermatitis atópica	49
4.3.1 Anticuerpos en suero	50
4.3.2 Histopatología	51
4.3.3 Frotis de sangre	53
4.3.4 Respuesta Celular: Perfil de Citoquinas	54
5. Discusión	56
6. Materiales y Métodos	64
6.1 Animales	64
6.2 Mantenimiento del parásito <i>in vivo</i> , purificación de quistes de cerebro y obtención de antígenos totales (TLAQ)	64
6.3 Cultivo de taquizoitos <i>in vitro</i> y obtención de antígenos totales de <i>T. gondii</i> (TLA)	64
6.4 Evaluación <i>in vitro</i> del efecto del TLA sobre respuestas inmunes de tipo T _H 2	65
6.5 Protocolos de dermatitis atópica	65
6.5.1 Primer protocolo	65
6.5.2 Segundo protocolo	66
6.5.3 Tercer protocolo	66
6.6 Modulación <i>in vivo</i> del efecto del TLA sobre la dermatitis atópica	66
6.6.1 Aplicación del TLA en el segundo protocolo de sensibilización	66
6.6.2 Aplicación del TLA en el tercer protocolo de sensibilización	66
6.7 Análisis histopatológico	67
6.8 Anticuerpos específicos para OVA	68
6.8.1 Medición de IgE	68
6.8.1 Medición de IgG1 e IgG2a	68
6.9 Cultivos <i>ex vivo</i>	68

6.9.1 Medición de Citoquinas	69
6.10 Análisis estadístico	69
8. Bibliografía	70

Abreviaturas

IL: interleuquina

IFN- γ : interferón gamma

TNF- α : factor de necrosis tumoral

TLA: antígenos totales de *T. gondii*

OLA: antígenos de ooquistes de *T. gondii*

DA: dermatitis atópica

N: *naive*

TDA: ratones DA a los cuales se les aplicó TLA *in vivo*

OVA: ovoalbúmina

ConA: Concanavalina A

Alum: Hidróxido de Aluminio

SE: sin estimular

IgE: inmunoglobulina E

IgG1: inmunoglobulina G1

IgG2a: inmunoglobulina G2a

T_H: T helper

T_R: T regulatoria

TSLP: linfopoyetina estromal tímica

ILC: células linfoides innatas

FLG: filagrina

DCs: células dendríticas

DECs: células dendríticas epidérmicas

LC: célula de Langerhans

OXZ: oxazolona

TNCB: trinitroclorobenceno

HDM: House Dust Mite

TGF- β : factor de crecimiento transformante β

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad

TLR: receptor de tipo Toll

BMDC: células dendríticas derivadas de médula ósea

MDSCs: células supresoras granulocíticas mieloides

MC: mastocito

E: eosinófilo

N: neutrófilo

ELISA: ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas

TMB: tetrametilbenzidina

HRP: peroxidasa de rábano

IP: intraperitoneal

DO: densidad óptica

CLA: antígeno linfocitario cutáneo

TCR: receptor de célula T

APC: célula presentadora de antígeno

BAL: lavado broncoalveolar

T. gondii: Toxoplasma gondii

1. Resumen

Las enfermedades alérgicas son desórdenes inflamatorios originados por complejas interacciones entre genes y medio ambiente. La dermatitis atópica (DA), una enfermedad crónica inflamatoria de la piel, es una de las patologías inflamatorias dérmicas más habituales, afectando entre el 1 y el 20% de la población total y entre el 8 al 30% de los niños alrededor del mundo. Dado el aumento sostenido de su incidencia y los altos costos de los tratamientos, sumado al empobrecimiento en la calidad de vida de los pacientes, el desarrollo de terapias para esta patología que combinen eficiencia con seguridad y accesibilidad, sigue siendo un desafío.

Al igual que el resto de los desórdenes atópicos, la DA está orquestada por una fuerte respuesta de tipo 2 caracterizada por la secreción de citoquinas provenientes de las células adaptativas $CD4^+ T_H2$ y células linfoides innatas (ILC2), sumado a altos niveles de anticuerpos IgE alérgeno-específicos en suero.

A nivel histopatológico se observa espongiosis (edema epidérmico intercelular), para/hiperqueratosis y engrosamiento epidérmico (acantosis) junto con un aumento de infiltrado leucocitario y de mastocitos.

La teoría higiénica postula que una reducción o alteración a exposiciones microbianas causa una maduración desbalanceada del sistema inmune, predisponiéndolo al desarrollo de desórdenes alérgicos. En este contexto, datos epidemiológicos indican que la seropositividad para *Toxoplasma gondii*, un parásito intracelular obligado, está inversamente relacionada con la sensibilización alérgica y sus manifestaciones sintomáticas, en humanos. Apoyando estas observaciones, en nuestro laboratorio hemos demostrado que la infección con *T. gondii* disminuye el posterior desarrollo de inflamaciones alérgicas pulmonares. Los mecanismos inmunológicos involucran, dependiendo del momento de la sensibilización (etapa aguda o crónica de la infección), el desvío de la respuesta hacia un perfil T_H1 o la inducción de células con actividad supresora. Posteriormente, también observamos que la infección crónica con *T. gondii* previa a la sensibilización alérgica bloquea completamente el desarrollo de la DA.

Hipotetizamos que moléculas de *T. gondii* con propiedades inmunomoduladoras serían responsables de la capacidad del parásito de proteger frente al desarrollo de la DA. En este contexto, recientemente se demostró en un modelo de asma experimental que la administración de antígenos totales de *T. gondii* (TLA) en conjunto con el alérgeno durante la sensibilización disminuye la susceptibilidad a desarrollar una inflamación alérgica pulmonar.

En base a lo mencionado, en este trabajo nos propusimos estudiar en un modelo murino de DA la capacidad del TLA de modular el desarrollo de esta patología dérmica.

En paralelo a la puesta a punto del modelo murino de DA, se comenzó con el estudio del efecto modulador del TLA *in vitro* utilizando células del ganglio y del bazo de ratones alérgicos, sensibilizados con un protocolo de asma experimental ya establecido en el laboratorio. Para tal fin, se hizo uso no sólo

del TLA derivado de taquizoitos de *T. gondii* (TLA) sino también de quistes provenientes de cerebros de ratones crónicamente infectados (TLAQ). Se pudo observar una disminución de IL-4 con la estimulación *in vitro* con el TLA proveniente de los quistes cuando éste se aplicó sobre las células provenientes de ratones alérgicos una hora antes de la estimulación con Concanavalina A (ConA) y con la mayor concentración estudiada.

En la segunda parte del trabajo se puso a punto un modelo murino de DA. Para ello se desarrollaron tres protocolos de sensibilización diferentes. En todos ellos, con mayor o menor severidad, se lograron reproducir los parámetros histopatológicos característicos de la dermatitis que incluyen engrosamiento de la epidermis y de la capa de queratina de la piel junto con un incremento de los niveles de eosinófilos y mastocitos infiltrados en la dermis de los ratones. Asimismo, se detectaron altos niveles de IgE e IgG1 en el suero de los ratones, lo que comprobó su estado alérgico. Por último, también se observaron mayores niveles de IL-4 comparando con ratones *naïve*, lo que da indicio del contexto T_H2 desencadenado.

Para finalizar, el último objetivo de esta tesis fue evaluar el efecto *in vivo* del TLA sobre la DA. Para ello se utilizaron el segundo y el tercer protocolo de sensibilización alérgica.

En cuanto a la aplicación del TLA utilizando el tercer protocolo de sensibilización, no se observaron cambios en cuanto al nivel de anticuerpos alérgeno-específicos en el suero de los ratones ni diferencias en la respuesta celular de citoquinas secretadas. Paralelamente, se observó un incremento en la infiltración de neutrófilos en los cortes histológicos y un aumento del porcentaje de esta población celular en frotis de sangre. En cuanto al engrosamiento de la epidermis, se detectó un incremento de la misma en la piel de los ratones que recibieron las aplicaciones de TLA.

Sin embargo, cuando se administró el TLA con el segundo protocolo de DA, se pudo observar una disminución, aunque no significativa, de los niveles de IgE comparando con los ratones que no recibieron las aplicaciones de TLA. Adicionalmente, se detectó un aumento de anticuerpos IgG2a (anticuerpos de tipo 1) y mayores niveles de IFN- γ , lo que señala un posible switch de la respuesta hacia un perfil de tipo 1, como era de esperarse por los antecedentes mencionados sobre la inmunomodulación ejercida por *T. gondii*. En cuanto a los parámetros histopatológicos, se detectó un aumento de la infiltración de neutrófilos y una disminución, aunque no significativa, del nivel de eosinófilos en la dermis en comparación con los ratones que no recibieron el TLA. Estos cambios en los niveles de IgE y el infiltrado de eosinófilos en la piel fueron tales que los valores alcanzados no presentaron diferencias significativas en comparación con los ratones *naïve*.

Los hallazgos de este trabajo contribuyen no solo al desarrollo de un modelo de DA apropiado para estudiar los mecanismos inmunológicos que desencadenan la patología dérmica, sino que también

ofrecen una contribución significativa a la comprensión de los efectos de los antígenos totales de *T. gondii* sobre las respuestas inmunes en contextos alérgicos complejos como lo es la DA.

2. Introducción

2.1 Desórdenes alérgicos

Las enfermedades alérgicas son desórdenes inflamatorios que se desarrollan por complejas interacciones entre genes y el medio ambiente¹. El marcado incremento en la incidencia y prevalencia de estos desórdenes en las últimas décadas hizo de su estudio una urgente necesidad²⁻⁴. Este fenómeno se atribuye a diversos factores relacionados con sociedades más urbanizadas, como cambios en la alimentación, una mayor exposición a alérgenos y contaminantes ambientales como el humo de tabaco, el frecuente uso de antibióticos y la reducción de exposición a agentes infecciosos⁴⁻⁷.

Las alergias se caracterizan por una activación inapropiada del sistema inmune hacia uno o varios antígenos inocuos, denominados alérgenos. Esta respuesta, puede dar lugar a condiciones tales como el asma bronquial, rinoconjuntivitis o dermatitis atópica (DA)^{8,9}. La sensibilización puede darse por exposición al alérgeno tanto por vía inhalatoria, como por ingestión o por contacto con la piel¹⁰. Todas ellas son desencadenadas por respuestas hiperreactivas del tipo 2. Este tipo de respuesta se caracteriza por elevados niveles de IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, citoquinas asociadas tanto con la respuesta inmune adaptativa de células CD4⁺ T_H2 como con la respuesta innata de células linfoides tipo 2 (ILC2). A su vez, este tipo de desórdenes se caracterizan por la presencia en suero de anticuerpos IgE específicos para el alérgeno involucrado en la sensibilización alérgica¹⁰⁻¹³.

En contraste con el desencadenamiento de una respuesta alérgica, puede ocurrir una tolerancia local o sistémica hacia los potenciales alérgenos. Esta tolerancia puede darse mediante un efecto anérgico en los linfocitos o por acciones supresoras provenientes de células T regulatorias, siendo las mejor caracterizadas las células T CD4⁺Foxp3⁺ y las células T CD4⁺Foxp3⁻ productoras de IL-10 (T_R1). Por lo general, las enfermedades alérgicas se caracterizan por defectos en la generación de tolerancia hacia alérgenos específicos¹⁴.

Estudios genómicos identificaron la existencia de *loci* de susceptibilidad en asma, DA y rinitis alérgica, en regiones génicas asociadas a funciones de la barrera epidérmica, a células T regulatorias, a las señales de activación de las ILC2 (TSLP e IL-33), a la producción de citoquinas por parte de las ILC2 y a los factores de transcripción que definen a esta población celular (GATA3, RORA)^{15,16}.

La DA es uno de los desórdenes inflamatorios dérmicos más comunes, afectando entre el 1 y el 20% de la población total y entre el 8 al 30% de los niños alrededor del mundo^{6,17}. Dado el aumento sostenido de su incidencia y los altos costos de los tratamientos, sumado a la naturaleza de los síntomas de esta enfermedad que conducen a un empobrecimiento en la calidad de vida de los pacientes, el desarrollo de terapias para esta patología que combinen eficiencia con seguridad y accesibilidad, sigue siendo un desafío^{7,18,19}.

2.2 Dermatitis atópica

La DA es una enfermedad crónica inflamatoria de la piel caracterizada por hiperreactividad cutánea, erupción con prurito intenso y epidermis engrosada (liquenificación) y apergaminada (eczema), que se observa típicamente en los pliegues de la piel, cara y cuello. Esta patología frecuentemente comienza a temprana edad, con un 45% de los casos observados entre los primeros 6 meses, tendiendo a revertir alrededor de los 5 años de edad pero pudiendo persistir en la adultez en un 15% de los casos^{20,21}. En Argentina, entre el 30% y 40% de los niños menores de 5 años presentan DA, superando ampliamente el promedio del resto del mundo^{2,22}.

Existen tres fases de la enfermedad según la edad de los pacientes y la distribución de las lesiones características de la DA. En infantes las lesiones cutáneas están localizadas en la piel de las mejillas, la frente y el cuero cabelludo. En niños se localizan en pliegues, cuello y en zonas dorsales de extremidades. En adolescentes y adultos se observan zonas liquenificadas en los pliegues, cabeza, manos y cuello, mostrando una dermatitis crónica^{7,20}.

La DA es una enfermedad compleja y heterogénea que se cree desencadenada por interacción de factores ambientales en individuos genéticamente susceptibles a montar una respuesta inmune T_H2/IgE . El mayor factor de riesgo es poseer una historia familiar con enfermedades atópicas, sumado a exposiciones a alérgenos y falta de exposición a agentes infecciosos en edades tempranas^{7,20,23,24}. Los factores clave que contribuyen al desarrollo de la DA incluyen una deficiencia en la barrera epidérmica junto con una respuesta inmune mediada por anticuerpos IgE y una respuesta exagerada de tipo T_H2 que desencadena una inflamación cutánea. También se atribuyen consecuencias provenientes de un desbalance de la microbiota comensal de la piel y una función antimicrobiana defectuosa²³.

Se ha observado que, durante el transcurso de la vida, pacientes con DA tienen una marcada tendencia a desarrollar otras enfermedades atópicas como la rinitis alérgica, el asma y alergias alimenticias. Este fenómeno es conocido como marcha atópica y sugiere que al prevenir o tratar la DA se frenaría el desarrollo de otras enfermedades alérgicas^{7,25}. Se vio que defectos en la función barrera de la piel están asociados con respuestas sistémicas como un aumento de la IgE total y una hiperreactividad aérea^{25,26}. La sensibilización cutánea precede a la sensibilización aérea para el mismo alérgeno, siendo éste el principal predictor para el desarrollo de asma o rinitis alérgica en niños^{27,28}. Este aumento del riesgo de contraer otras patologías atópicas se atribuye a una herencia compartida de factores de susceptibilidad²⁹.

Como se mencionó previamente, existe una susceptibilidad genética en los individuos que padecen DA. Los *loci* de DA se ven enriquecidos con genes involucrados en el mantenimiento de la integridad de la barrera epidérmica así como genes que contribuyen a anomalías inmunes, en particular con la regulación del sistema inmune innato y la activación de las células T. El factor de riesgo genético más fuerte se trata de mutaciones en *FLG*, gen que codifica para una proteína epidérmica

denominada filagrina. Esta proteína se ve reducida en su expresión, causando principalmente un desorden en la cornificación en donde se da una diferenciación anormal de los queratinocitos resultando en una piel seca, descamada y engrosada^{30,31}.

2.2.1 La piel: Estructura y Fisiología

La principal función de la piel es ofrecer una barrera físico-mecánica entre el organismo y el medio ambiente, evitando la entrada de materiales foráneos potencialmente dañinos como los irritantes, alérgenos y patógenos, y regulando a su vez la pérdida de agua. Sumado a esto, la piel es la primera línea de defensa inmunológica hacia posibles agentes infecciosos. Esta defensa involucra la respuesta tanto de las células epiteliales, como las del estroma y las células inmunes en la piel^{32,33}.

La piel está conformada por tres capas esenciales: la epidermis, la dermis y la hipodermis (Fig. 1). La epidermis está constituida principalmente por células epiteliales estratificadas (queratinocitos), organizados en una capa basal, una espinosa, una granular y un estrato córneo, el cual consta de queratinocitos terminalmente diferenciados (corneocitos). A su vez, incluye células de Langerhans presentadoras de antígenos (LCs) y células dendríticas epidérmicas (DECs). La dermis, por otro lado, es una capa de tejido conectivo conformada por fibras de colágeno y elastina, conteniendo células del estroma como fibroblastos, fibrocitos y células estructurales de los vasos sanguíneos y linfáticos. A su vez está poblada por células del sistema inmune como células dendríticas, ILCs, mastocitos, macrófagos y linfocitos T. Por último, la hipodermis consta de células adiposas y tejido conectivo en contacto con una capa muscular inferior^{20,32}.

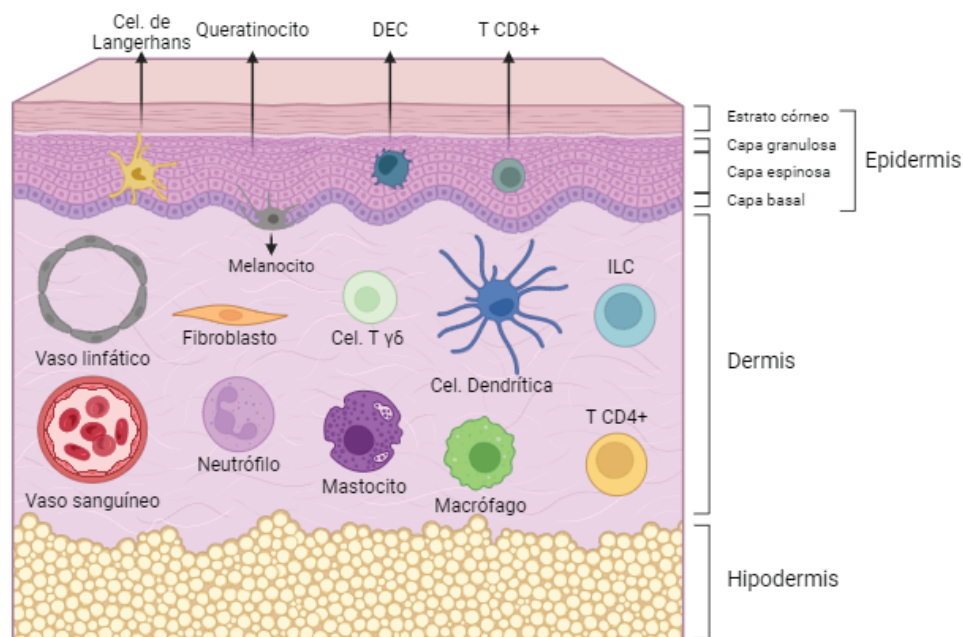


Figura 1. Estructura de la piel normal y células que la conforman.

La función de barrera en la piel se da principalmente por la epidermis y particularmente por el estrato córneo, formado por una capa lipídica de ceramidas, ácidos grasos libres y colesterol. Esta función barrera también está determinada por proteínas estructurales, proteasas e inhibidores de proteasas.

En la DA, esta barrera se encuentra alterada probablemente como resultado de la reducción en las concentraciones de ceramidas junto con la presencia de sequedad cutánea (xerosis) y el incremento de la pérdida de agua transepidermal³⁴. Sumado a esto, se observan otros cambios epidérmicos que incluyen irritabilidad³⁵ y aumento de la permeabilidad a agentes exógenos³⁶ y de la susceptibilidad a infecciones³⁷. La alteración de la barrera cutánea lleva a su vez hacia una respuesta neuroinmune-inflamatoria con consecuentes síntomas como la picazón²².

A nivel molecular, se observa un desbalance de las interacciones proteasa-inhibidores de proteasas previamente mencionados³⁸, lo cual afecta el mantenimiento de la homeostasis de la piel. Sumado a la composición alterada de los lípidos y ceramidas de la epidermis³⁹, también hay reducción en las proteínas de uniones estrechas⁴⁰ y un patrón alterado de la microbiota que coloniza la superficie cutánea, con una mayor abundancia de *Staphylococcus aureus*⁴¹. Esta disfunción también puede ser por causa de mutaciones, como la reducción en la expresión en proteínas estructurales cruciales⁴².

Se observó que en la DA, el daño de la piel persiste debido a un ciclo inflamatorio difícil de romper: los desórdenes cutáneos aumentan la pérdida de agua transepidermal y la inflamación que a su vez estimulan la picazón y el rascado, incrementando el daño en la piel y la inflamación que en consecuencia causan más xerosis (sequedad cutánea). Esta sequedad cutánea característica de la DA se da por una reducción en la hidratación del estrato córneo y en el contenido de lípidos de la superficie de la piel^{22,43}.

El desarrollo de DA se da en dos etapas, una aguda y una crónica. Las lesiones agudas se caracterizan por parches eritematosos y con prurito intenso asociados con exoriación y sudoración. A nivel histopatológico se observa espongiosis (edema epidérmico intercelular), para/hiperqueratosis, caracterizada por un engrosamiento del estrato córneo e hiperplasia y engrosamiento epidérmico (acantosis). A su vez hay una marcada infiltración de eosinófilos, mastocitos, células T CD4⁺ de memoria y células presentadoras de antígenos (APCs) las cuales incluyen las células de Langerhans (LCs), células dendríticas epidérmicas y macrófagos^{20,23,44,45}. Las lesiones crónicas se caracterizan por zonas secas y engrosadas con un aumento de liquenificación, resultado de una fibrosis y un incremento de la deposición de colágeno en la piel. A nivel histológico se observa un incremento de la acantosis, paraqueratosis e infiltración de células mononucleares en la dermis, principalmente macrófagos, junto con acumulación perivascular de linfocitos^{20,44}.

2.2.2 Patología y respuesta inmune

Al igual que el resto de los desórdenes atópicos, la DA está orquestada por una fuerte respuesta de tipo 2 caracterizada por la secreción de citoquinas provenientes de las células adaptativas CD4⁺ T_H2 e

innatas ILC2, como se mencionó anteriormente¹¹. La relación de células T_H2/T_H1 se ve incrementado en la piel y sangre periférica de pacientes con DA⁴⁶.

La picazón es una de las características principales de la DA, dada por una variedad de pruritógenos²³. El rascado de la piel seca causa daño mecánico que activa a los queratinocitos para liberar citoquinas proinflamatorias y quimoquinas que inducen la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio vascular lo que facilita la extravasación de células inflamatorias en la piel. A su vez, este daño ocasionado por el rascado promueve la entrada de alérgenos y agentes infecciosos. Los mediadores asociados a la picazón en DA son la histamina, IL-31, neuropéptidos, opioides y serinproteasas²⁰. La histamina, secretada por basófilos y mastocitos, y la linfopoyetina estromal tímica (TSLP), secretada por queratinocitos, activan neuronas sensoriales epidérmicas²³ que se observan aumentadas en densidad y grosor, en modelos animales de DA⁴⁷, lo que también explica la picazón intensa generada. La IL-31, secretada por células $T\text{ CLA}^+$, actúa sobre los queratinocitos induciendo la expresión de quimioquinas para reclutar más células T inflamatorias⁴⁸.

La disrupción de la barrera epidérmica mencionada previamente promueve una reacción inflamatoria a través de la desregulación de proteínas inmunomoduladoras y la liberación por parte de los queratinocitos de quimioquinas y de moléculas asociadas a daños que incluyen alarminas como IL- 1β , IL-25, IL-33 y TSLP²³. Estos mediadores se expandirán y activarán a las ILC2, incrementadas en pacientes con DA¹¹, las células de Langerhans de la epidermis (LCs) y las DCs de la dermis y de la epidermis, favoreciendo la respuesta inflamatoria. El efecto del daño cutáneo y la liberación de citoquinas como TSLP, IL-6, IL-1 y TNF- α , por parte de los queratinocitos, tenderán a polarizar a las DCs de la piel predominantemente hacia una respuesta del tipo 2^{20,49}. Esto a su vez permitirá la conversión de DCs inmaduras a DCs maduras profesionales presentadoras de antígenos (APCs) debido a la sobreexpresión de moléculas MHC de clase II y moléculas coestimuladoras CD80 y CD86⁴⁹. Las APCs que capturaron el antígeno en la piel expresarán el receptor CCR7 y migrarán a los ganglios linfáticos, que expresan las quimioquinas CCL19 y CCL21⁵⁰. Allí presentarán los alérgenos de la piel a linfocitos T inmaduros (tanto a los $CD4^+$ como a los $CD8^+$), provocando su activación y maduración hacia células T específicas del alérgeno que, predominantemente, tendrán un perfil T_H2 ^{22,49}. Los linfocitos diferenciados, tanto efectoras como de memoria, expresarán receptores para volver a localizarse en la piel, como el antígeno leucocitario cutáneo (CLA), CCR4 y CCR10²⁰. Los linfocitos T_H2 secretarán IL-4 e IL-13, que estimularán la activación de linfocitos B promoviendo un cambio de clase de anticuerpos hacia la generación de inmunoglobulina E (IgE)^{23,51}. También secretarán IL-5, la cual posee un rol fundamental en el reclutamiento y supervivencia de eosinófilos⁵². La IgE será capaz de unirse a receptores de alta afinidad ($Fc\epsilon RI$) expuestos en la membrana de diversas células inmunes de la piel, como los basófilos y los mastocitos, pudiendo unirse también a eosinófilos en la circulación periférica⁵³. La unión alérgeno-IgE-receptor provocará la degranulación de las células anteriormente mencionadas, liberando histamina, eicosanoides y citoquinas proinflamatorias, junto

con la producción de quimioquinas que promueven la inflamación y migración de nuevos linfocitos T maduros^{20,22}. Los receptores FcεRI en la superficie de las LCs y las DCs epidérmicas también contribuyen a la captación e internalización de los antígenos para su posterior presentación a las células T de la piel atópica^{7,54}. Junto con los elevados niveles de IgE en suero, se observa presencia de eosinofilia en sangre²⁰. Las ILC2s también contribuyen a la liberación de IL-5 e IL-13, amplificando la respuesta inmune⁵⁵. Paralelamente, la respuesta inflamatoria puede exacerbar la disrupción de la barrera epidérmica reduciendo la expresión de proteínas del estrato córneo y de uniones estrechas²³.

La respuesta inmune desarrollada durante la enfermedad alérgica comprende dos fases (Fig. 2). Las lesiones de la DA aguda presentan una inflamación dominada por una respuesta T_H2, caracterizada por la infiltración dérmica de células T y eosinófilos junto con una aumentada expresión de citoquinas de tipo T_H2, (IL-4, IL-5 e IL-13), y de tipo T_H22 (IL-22), y baja expresión de tipo T_H1 (IFN-γ). A su vez, se observó que las citoquinas de tipo T_H2 y T_H22 suprimen la expresión de proteínas de diferenciación como la filagrina, sumado a la inducción de hiperplasia epidérmica resultante de una respuesta de los queratinocitos a la IL-22⁴⁵. Cuando estas lesiones se vuelven crónicas, se observa un cambio hacia una respuesta inmune del tipo T_H1 con aumento de la expresión de IFN-γ, IL-12 y GM-CSF, junto con una remodelación del tejido con un aumento de la deposición de colágeno y engrosamiento de la epidermis y la dermis^{20,45,56}. La sobreexpresión de IFN-γ induce la apoptosis de los queratinocitos epidérmicos a través de la sobreexpresión de Fas (CD95) en los queratinocitos²⁰. Existe entonces una regulación progresiva, dependiente de la etapa de la enfermedad, de las citoquinas T_H2, T_H22 y T_H1, desde la piel no lesionada hasta las lesiones agudas y crónicas⁴⁵.

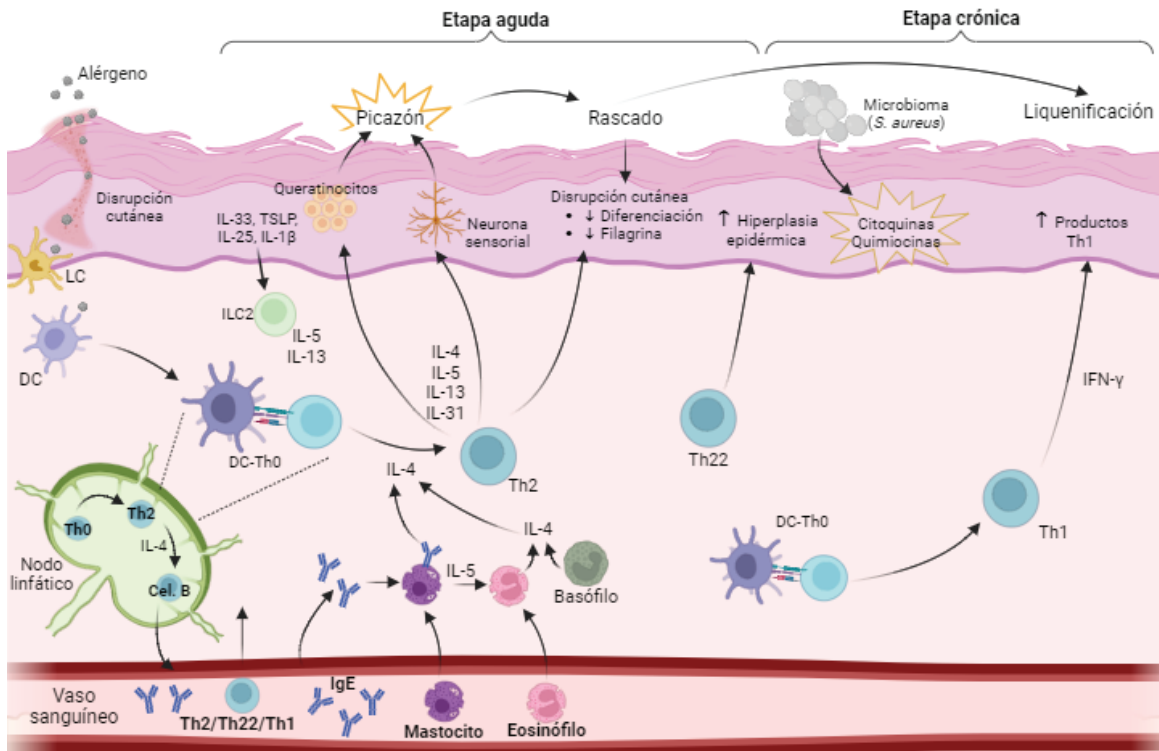


Figura 2. Mecanismos inmunológicos desencadenados en la piel durante la dermatitis atópica.

Los defectos en la barrera epidérmica permiten el ingreso de alérgenos y a su vez estimulan a los queratinocitos a expresar quimiocinas como la TSLP, IL-1β, IL-33 e IL-25. Estos mediadores amplifican y activan la respuesta inmune. Las células dendríticas inflamatorias epidérmicas (DECs) así como las células dendríticas dérmicas captan los alérgenos promoviendo la respuesta inmune de tipo 2 y reclutando más células inflamatorias. El aumento de células T_H2 en la etapa aguda conduce a un aumento en la secreción de citoquinas, principalmente IL-4 e IL-5, que promueven el cambio de clase hacia IgE (producida por las células B). Estas citoquinas también alteran la barrera cutánea al disminuir la expresión de proteínas epidérmicas de diferenciación como la filagrina. Las ILC2s son una fuente potente de IL-5 e IL-13 y pueden amplificar aún más la inmunidad de tipo 2 y, junto con los eosinófilos y basófilos reclutados, aumentan la producción de IgE. En contraste con la piel sana, la piel de individuos con DA tiene un número incrementado de subtipos de DCs, incluidas las células de Langerhans, que expresan receptores de alta afinidad para la inmunoglobulina-ε ($FcεR1$). Los anticuerpos IgE unidos a las DCs por $FcεR1$ pueden facilitar la captación de alérgenos. Por otro lado, los eosinófilos, basófilos y los mastocitos activados también se unen a IgE y liberan mediadores proinflamatorios, potenciando aún más la respuesta. IL-33, IL-31, TSLP y las citoquinas T_H2 se comunican directamente con las neuronas sensoriales cutáneas para exacerbar el prurito y la picazón. A su vez, con la aparición de la enfermedad aguda, las células T_H22 liberan IL-22, lo cual induce la hiperplasia epidérmica. En la etapa crónica de la enfermedad hay una respuesta sesgada de células T_H1 , lo que conduce a una mayor inflamación y activación inmune, produciendo liquenificación de la piel. Las citoquinas de tipo 2 también afectan las respuestas de péptidos antimicrobianos lo que, en combinación con la alteración de la barrera cutánea, aumentan el riesgo de colonización y penetración de patógenos (principalmente *S aureus*). TSLP = linfopoyetina estromal tímica. DC = célula dendrítica. IL = interleuquina. LC = célula de Langerhans. *S aureus* = *Staphylococcus aureus*. T_H = célula T-helper. ILCs = células linfoides innatas. IgE = Inmunoglobulina E.

Por otro lado, ante daños o inflamación cutánea, hay secreción de péptidos antimicrobianos (AMPs), como defensinas y catelicidinas, por parte de los queratinocitos residentes de la piel, mastocitos y células reclutadas hacia el tejido, como las NK. Estos péptidos tienen actividad antibiótica y las defensinas, aparte de tener función antimicrobiana, actúan como quimioattractantes para DCs inmaduras y células T

de memoria, estimulando a su vez la respuesta inmune innata en la epidermis por aumento de la expresión de moléculas co-estimuladoras y maduración de DCs inmaduras^{20,57}. Se ha descrito una reducción en los niveles de estos AMPs en las lesiones de DA, lo que puede explicarse por la presencia de altos niveles de citoquinas T_H2. Esto sugiere que la deficiencia en AMPs podría contribuir a la susceptibilidad de pacientes atópicos a infecciones cutáneas^{20,54,57}. Esta susceptibilidad a infecciones también se atribuye a alteraciones en el reconocimiento de antígenos microbianos por polimorfismos en los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs)⁵⁷.

2.2.3 Tratamientos actuales para la dermatitis atópica

Debido a la complejidad de los procesos inflamatorios implicados en la DA, se requieren tratamientos multidimensionales, es decir, que aborden varios aspectos así como los factores ambientales y de estilo de vida y las manifestaciones clínicas de la enfermedad.

Estos tratamientos para la DA incluyen hidratación cutánea, el uso de corticosteroides tópicos para reducir la inflamación, y la identificación y eliminación de factores exacerbantes como irritantes, alérgenos, factores de estrés emocional y agentes infecciosos⁵⁸. Los tratamientos se dividen en tres categorías: tratamientos básicos, tratamientos médicos estándar y tratamientos adyuvantes⁵ (Tabla 1).

Tabla 1. Tratamientos actuales para la dermatitis atópica.

Tratamientos básicos	Tratamientos médicos estándar	Tratamientos adyuvantes
<ul style="list-style-type: none"> ● Hidratación cutánea ● Eliminación de factores agravantes 	<ul style="list-style-type: none"> ● Tratamientos tópicos: glucocorticoides e inhibidores de calcineurina ● Antihistamínicos ● Biológicos ● Terapias sistémicas: Glucocorticoides y ciclosporina ● Fototerapia 	<ul style="list-style-type: none"> ● Probióticos y prebióticos ● Omega-3 ● Suplementación con Vitamina D

2.2.3.1 Tratamientos básicos

Este tipo de tratamiento se enfoca en reducir la sequedad de la piel y eliminar factores exacerbantes como los irritantes o alérgenos.

- *Reducir sequedad de la piel:* es fundamental controlar la hidratación de la piel dado que la DA se caracteriza por una barrera cutánea deteriorada con xerosis. Para controlar la hidratación cutánea se utilizan emolientes e hidratantes más de una vez al día, junto con baños cortos con agua tibia evitando el uso de productos con perfumes^{5,22}. Esto ayuda a la piel a retener agua, mejorar la función de barrera, aliviar las sensaciones de picazón y remover irritantes y alérgenos de la piel^{59,60}.
- *Remoción de factores exacerbantes:* se debe evitar el uso frecuente de jabones o detergentes, productos químicos, ropa de lana o nylon así como los cambios bruscos de temperatura/humedad. Paralelamente, los alérgenos alimenticios y aéreos son considerados otro factor agravante⁵.

2.2.3.1 Tratamientos médicos estándar

- *Medicamentos tópicos:* son el primer tratamiento que se da a un paciente con DA. Dentro de ellos, se encuentran los glucocorticoides y los inhibidores de calcineurina. Los primeros son uno de los fármacos más efectivos para controlar los síntomas de la DA, como la picazón y la inflamación, aunque su aplicación puede ir acompañada de varios efectos secundarios como atrofia cutánea, desarrollo de estrías, dermatitis perioral, rosácea acneica y supresión adrenal⁵. Los inhibidores de calcineurina son inmunomoduladores no-esteroides. Los fármacos más utilizados son tacrolimus y pimecrolimus^{5,22}. Las reacciones adversas son sensaciones de ardor o picazón transitorias pero no se asocian complicaciones como la atrofia cutánea con su uso a largo plazo⁶¹.
- *Antihistamínicos:* el tratamiento con antihistamínicos orales, como la loratadina o la cetirizina, es usado para reducir la picazón inducida por la histamina. Dado a que la picazón es provocada por otros mediadores aparte de la histamina, como IL-31, hay pacientes donde este tratamiento no es efectivo⁵.
- *Tratamientos sistémicos:* Se utilizan cuando los tratamientos básicos sumados a los medicamentos tópicos no dan resultado. Entre estos tratamientos se encuentra el uso de glucocorticoides y ciclosporina. Estos tratamientos suprimen temporalmente los síntomas de DA, con una rápida reaparición con su discontinuación. El frecuente uso de ciclosporina conlleva efectos adversos como deterioro de la función hepática y renal e hipertensión⁵, mientras que el uso de glucocorticoides también posee diversos efectos secundarios relacionados con los sistemas musculoesquelético, endocrino, cardiovascular y nervioso central⁶². Sumado a estos dos tratamientos mencionados, también existe la aplicación sistémica de IFN- γ ^{5,22}.
- *Biológicos:* entre ellos se encuentra la aplicación de anti-IL-4R, anti-IgE, anti-TSLP, anti-IL-31, anti-IL-5, entre otros.
- *Fototerapia*

Desde los últimos años, se están desarrollando avances en el uso de fármacos dirigidos modificadores de la enfermedad. Dentro de ellos, se ha demostrado la eficacia y seguridad de la inmunoterapia con alérgenos (SIT) en informes de casos, estudios de cohortes pequeños y algunos ensayos multicéntricos más grandes^{63,64}. Más aún, la Academia Europea de Dermatología sugiere que los médicos podrían considerar el tratamiento con SIT en pacientes con DA grave, sensibilizados a aeroalérgenos y con exacerbación clínica después de la exposición al alérgeno causante^{65,66}.

2.2.3.1 Tratamientos adyuvantes

Estos tratamientos son considerados únicamente si los tratamientos básicos no dieron resultado.

Entre éstos se encuentra el uso de:

- *Probióticos y prebióticos*
- *Omega-3*
- *Vitamina D oral*^{62,22}

2.2.4 Modelos Animales

El alto número de individuos que padecen DA, sumado al constante aumento en la incidencia de este desorden, muestran la necesidad de establecer un modelo de estudio adecuado, que permita dilucidar los mecanismos inmunológicos involucrados en su desarrollo, así como también la generación y evaluación de nuevas terapias.

Los modelos animales existentes se pueden distribuir en cuatro grupos:

- 1) Ratones que espontáneamente desarrollan lesiones de la piel con las características de la DA.
- 2) Ratones transgénicos que expresan diferencialmente determinadas citoquinas.
- 3) Modelos genéticamente modificados en donde se alteran genes relacionados con la DA.
- 4) Modelos en los que la DA es inducida por la aplicación epicutánea de agentes sensibilizantes^{20,67}.

Dentro de este modelo, la sensibilización se puede lograr por la aplicación de alérgenos, de haptenos o de análogos de la vitamina D^{67,68}.

2.2.4.1 Modelos murinos inducidos por sensibilización epicutánea con alérgenos

En modelos en donde se sensibiliza con alérgenos, se utiliza principalmente ovoalbúmina (OVA) o ácaros de polvo doméstico (HDM, *House Dust Mite*)^{26,68-70}. Basados en el trabajo de Spergel *et al.*²⁶ en nuestro laboratorio se desarrolló previamente un modelo murino de sensibilización por vía epicutánea con OVA, utilizando parches embebidos con el alérgeno⁷¹. Cada ratón tuvo un total de tres exposiciones de una semana al parche con OVA, separadas entre sí por intervalos de dos semanas. Con este protocolo se logró reproducir la histopatología típica de DA, caracterizada por engrosamiento de la epidermis, infiltración de mastocitos, de células T CD4⁺ y eosinófilos y una expresión incrementada de citoquinas tipo T_H2 (IL-4, IL-5 e IL-13), sin observar cambios en las citoquinas tipo T_H1 (IFN- γ). A nivel sistémico, se observaron niveles

elevados de anticuerpos IgG1, Ig2a e IgE específicos para OVA en suero y aumento del nivel de citoquinas de tipo T_H2 junto con IFN- γ en la re-estimulación con OVA de esplenocitos de ratones sensibilizados.

La disminución de los ciclos de sensibilización de tres a dos semanas o el acortamiento de la duración del protocolo de sensibilización epicutánea puede llevar a un desarrollo subóptimo de la inflamación alérgica de la piel²⁰.

2.2.4.2 Modelos murinos inducidos por haptenos

En los modelos en los que la inducción de dermatitis se da a través de la aplicación de haptenos, se utiliza principalmente oxazolona (OXZ) o trinitroclorobenceno (TNCB). Los haptenos son moléculas pequeñas irritantes que generalmente son utilizados para el estudio de la dermatitis de contacto, en donde se desencadena una respuesta inmune del tipo T_H1 ^{20,68}. Aún así, se observó que una exposición múltiple, en una zona sin pelo del ratón, con OXZ o TNCB durante un período extendido causa una inflamación cutánea crónica con un cambio de la respuesta hacia un perfil tipo T_H2 y con lesiones cutáneas similares a la dermatitis característica de los humanos⁶⁷. A pesar de la reproducibilidad, predictibilidad y bajo costo de este tipo de modelos⁶⁷, las desventajas son el largo tiempo en la inducción de la respuesta alérgica sumado a la alta variabilidad en los resultados de las sensibilizaciones⁶⁸.

2.2.4.3 Modelos murinos inducidos por Calcipotriol (MC903)

La sensibilización por la aplicación de Calcipotriol, un análogo de la vitamina D, es dependiente de la inducción de la expresión de TSLP a nivel epidérmico⁷². El TSLP promueve que las ILC2, potentes reguladoras de la respuesta inmune en la DA, secreten citoquinas del tipo T_H2 ⁷³. La aplicación tópica de MC903 no solo activa a las ILC2 sino que también causa eosinofilia y lesiones cutáneas con sequedad y prurito asociadas a una inflamación de tipo 2 con un infiltrado dérmico principalmente de linfocitos T CD4, acompañados de eosinófilos, mastocitos y DCs. A su vez se observa un aumento cutáneo de citoquinas de tipo T_H2 y elevados niveles de IgE e IgG en suero^{68,72}.

2.3 *Toxoplasma gondii* y desórdenes alérgicos

2.3.1 Teoría higiénica

A partir de datos epidemiológicos que permitieron establecer una relación entre la disminución de determinadas infecciones durante la niñez y un aumento de desórdenes alérgicos en países desarrollados se elaboró la “teoría higiénica”. Esta teoría postula que una reducción o alteración a exposiciones microbianas en edades tempranas, causan una maduración desbalanceada del sistema inmune, predisponiéndolo al desarrollo de desórdenes alérgicos, lo cual podría explicar el marcado incremento en la prevalencia y severidad de las enfermedades atópicas en las últimas décadas^{23,57}. La reducción en la

exposición a infecciones se debe a factores como el frecuente uso de antibióticos, la reducción en el tamaño de los grupos familiares, cambios en el ambiente y a un aumento en las prácticas higiénicas⁷⁴.

Se ha propuesto que la falta de una inducción de respuestas estimuladas por antígenos microbianos llevaría hacia el descenso de células T_H1 y, consecuentemente, un incremento en células inmunes T_H2 , alterando el balance de las respuestas de tipo 1 y de tipo 2⁵⁷. A su vez, se hipotetiza que el incremento en las células inmunes T_H2 se da por una pérdida de células T regulatorias o células B productoras de IL-10¹⁰.

2.3.2 *Toxoplasma gondii*

La teoría higiénica se construye primero a partir de datos epidemiológicos y luego a partir de datos experimentales que muestran la capacidad de ciertos microorganismos de otorgar protección frente al desarrollo de desórdenes alérgicos. En este contexto, datos epidemiológicos indican que la seropositividad para *T. gondii* está inversamente relacionada con la sensibilización alérgica y sus manifestaciones sintomáticas, en humanos^{75,76}.

T. gondii es un parásito intracelular obligado que durante su ciclo infeccioso atraviesa dos fases. La fase aguda de la infección inicia en la primer semana y se caracteriza por la presencia de taquizoitos, estadio asexual de rápida división del parásito. Alrededor de la tercer semana de infección se da la fase crónica de la misma, en donde el parásito se encuentra en un estadio de división más lenta denominado bradizoito contenido dentro de quistes tisulares, que son estructuras de resistencia que se alojan principalmente en el cerebro y el músculo esquelético⁷⁷. La infección crónica establecida es asintomática en individuos inmunocompetentes⁷⁸.

T. gondii tiene características particulares que lo hacen un potencial patógeno modulador de alergias: i) es un protozoo intracelular obligado que se distribuye globalmente; ii) la infección lleva a la inducción de una fuerte respuesta inmune del tipo T_H1 en las etapas tempranas de la infección, respuesta que se mantiene también durante la etapa crónica de la misma^{79,80}; iii) la infección con *T. gondii* estimula la producción de citoquinas anti-inflamatorias como IL-10 y TGF- β ⁸¹ que inhiben la producción de IFN- γ ⁸² y la activación de macrófagos⁸³.

En nuestro laboratorio se demostró previamente que la infección con *T. gondii*, tanto en la etapa aguda como crónica de la infección, disminuye el posterior desarrollo de inflamaciones alérgicas pulmonares en ratones adultos BALB/c. Se observó una disminución en la eosinofilia del lavado bronquioalveolar (BAL), en la infiltración de eosinófilos y células mononucleares alrededor de las vías aéreas y una reducción en la hiperplasia de las células productoras de mucus de pulmón. A su vez se detectaron bajos niveles de anticuerpos IgE e IgG1 y altos niveles de IgG2a específicos para el alérgeno, así como una disminución en la secreción de IL-4 e IL-5 en ganglios linfáticos en respuesta al alérgeno⁸⁴.

Los mecanismos inmunológicos por los cuales *T. gondii* modula las alergias involucran, dependiendo del momento de la sensibilización (etapa aguda o crónica de la infección) el desvío de la respuesta hacia un perfil T_H1 (etapa aguda) o la inducción de células con actividad supresora (tanto en la infección aguda como crónica). Esta actividad supresora se demostró *in vitro* e *in vivo*, comprobando que las células de los ganglios linfáticos torácicos tanto de ratones infectados y sensibilizados como ratones únicamente infectados, disminuyeron los síntomas de inflamación alérgica pulmonar y la proliferación de células T efectoras alérgeno-específicas de ratones alérgicos. Se demostró a su vez que esta habilidad supresora es independiente de contacto y correlaciona con altos niveles de TGF- β y de células regulatorias $CD4^+Foxp3^+$. Por otro lado, se vio que la IL-10 no estaría involucrada en la supresión alérgica ya que ratones deficientes en esta citoquina mostraron comportamientos similares (ante la infección y sensibilización) que ratones *wild type*^{85,86}.

Posteriormente se demostró que la modulación ejercida por el parásito no sólo opera a nivel local sino también a nivel sistémico. La sensibilización, durante tanto la etapa aguda como crónica de la infección, resultó en una disminución de una reacción de anafilaxia comparado con ratones alérgicos sin infectar. A su vez, se detectó una reversión de la respuesta de tipo 2 en esplenocitos de ratones alérgicos previamente infectados, en la etapa aguda y la crónica. Estos resultados sugieren la posibilidad de que la infección con *T. gondii* pueda modular otros desórdenes alérgicos, aparte de las inflamaciones alérgicas pulmonares, como la DA⁸⁷.

En base a estos antecedentes, y considerando que la gran mayoría de los trabajos publicados donde se estudia la modulación de alergias por microorganismos se basan en modelos de alergias respiratorias, y son pocos los que utilizan modelos de DA, se estudió si la infección crónica con *T. gondii* es también capaz de modular el desarrollo de esta enfermedad dérmica. Para ello, se desarrolló un modelo de sensibilización por vía epicutánea con OVA como alérgeno en ratones BALB/c a partir del cual se observó que la infección crónica previa a la sensibilización alérgica bloquea completamente el desarrollo de la DA. Se vio una marcada reducción del grosor de la epidermis y del infiltrado celular en la dermis junto con una reducción de la cantidad de mastocitos. Esto se vio correlacionado con una disminución en la respuesta T_H1 y T_H2 alérgeno-específica, con reducción de citoquinas de tipo 2, IL-4 e IL-5, en ganglios drenantes y en esplenocitos y menor cantidad de ILC2 en los ganglios linfáticos drenantes⁷¹.

En conclusión, la infección con *T. gondii* posee dos fases, con una respuesta innata y del tipo T_H1 , con alta producción de IFN- γ , IL-6 y TNF- α , durante la fase aguda, y un aumento de la respuesta inmune regulatoria a nivel sistémico, con incremento de células T regulatorias y mayores niveles de IL-10 y TGF- β , durante la fase crónica⁸⁸.

Una mejor comprensión de los mecanismos inmunológicos involucrados en la regulación de las respuestas alérgicas por parte de diferentes microorganismos puede resultar de gran ayuda no sólo para entender el aumento de la incidencia de desórdenes atópicos observada en las últimas décadas sino

particularmente para encontrar herramientas que permitan intervenir en dichos procesos con menos efectos secundarios que las terapias convencionales.

2.4 Antígenos del lisado de taquizoitos de *Toxoplasma gondii* (TLA)

Debido a los riesgos asociados con la infección, los patógenos vivos no son adecuados para el desarrollo de nuevas estrategias para reducir las alergias en humanos. Por ello, el uso de moléculas derivadas de los parásitos muestran un mayor potencial para el desarrollo de estrategias profilácticas y terapéuticas para los desórdenes atópicos⁸⁸.

Diversos trabajos han demostrado previamente que los antígenos solubles de taquizoitos de *T. gondii* (TLA) modulan la producción de citoquinas, la capacidad de respuesta de distintos tipos celulares y la expresión de MHC. Particularmente, se observó que el tratamiento de una línea celular mielomonocítica humana con el lisado de *T. gondii* inhibió la secreción de IL-12, TNF- α e IL-8 inducidas por LPS, mientras que aumentaron los niveles de IL-10. Se propuso que esta inmunosupresión inducida por el tratamiento con el lisado del parásito actúa mediante la activación de NF- κ B vía TLR2⁸⁹. Paralelamente, se demostró que el TLA inhibe la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II (MHC-II), inducido por IFN- γ , en la superficie de macrófagos infectados, interfiriendo con la presentación antigénica y activación de linfocitos T. Sumado a esto, los antígenos secretados por taquizoitos extracelulares también presentan propiedades inmunomoduladoras interfiriendo con vías de señalización y transcripción de genes ligados a la inhibición de la expresión de MHC-II y la secreción de la citoquina TNF- α , la cual se sabe que es importante al montar una respuesta inmune frente al parásito⁹⁰.

Asimismo, más recientemente se ha demostrado que antígenos provenientes del lisado de los esporozoitos contenidos en los ooquistes de *T. gondii* (OLA) tienen actividad inmunomoduladora, comparable con lo observado en la infección con el parásito, en un modelo de inflamación alérgica pulmonar. La estimulación *in vitro* de esplenocitos y células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC) de ratones *naive* con OLA mostró altos niveles de IFN- γ , IL-6 e IL-10. El pretratamiento con OLA previo a la sensibilización alérgica mostró una reducción de la inflamación pulmonar así como de la sensibilización alérgica, viéndose reducidas las respuestas celulares y humorales alérgeno-específicas. Esta reducción en la respuesta inmune de tipo alérgica se vio correlacionada con un incremento de las células T regulatorias CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ en bazo así como de células supresoras granulocíticas mieloides (MDSCs) en pulmón⁸⁸.

La administración de antígenos derivados del lisado de taquizoitos de *T. gondii* (TLA) en lugar de ooquistes, en conjunto con el alérgeno durante la sensibilización disminuyó también la susceptibilidad a desarrollar una inflamación alérgica pulmonar. La estimulación *in vitro* de esplenocitos de ratones *naive*

con TLA indujo niveles significativos de citoquinas pro-inflamatorias como IL-6, IFN- γ y TNF- α así como IL-10 (regulatoria)⁹¹.

Estos antecedentes muestran que el TLA posee propiedades inmunomoduladoras tanto *in vitro* como *in vivo*.

3. Hipótesis y Objetivos

3.1 Construcción de la Hipótesis

Utilizando un modelo murino de DA observamos previamente que la infección crónica de *T. gondii* previa a una sensibilización epicutánea bloquea completamente el desarrollo de la patología⁷¹. La disminución de la patología dérmica correlaciona con menores niveles de anticuerpos alérgeno-específicos IgG1 e IgE y una secreción disminuida de citoquinas de tipo T_H2 y T_H1 a nivel sistémico y local al finalizar las tres semanas de sensibilización.

A partir de esto, hipotetizamos que moléculas de *T. gondii* con propiedades inmunomoduladoras serían responsables de la capacidad del parásito de proteger frente al desarrollo de desórdenes alérgicos. Reforzando nuestra hipótesis, diversos trabajos han demostrado previamente que los antígenos solubles de taquizoitos de *T. gondii* (TLA) modulan la producción de citoquinas, la capacidad de respuesta de distintos tipos celulares⁸⁹ y la expresión de MHC⁹⁰.

El uso de moléculas derivadas de los parásitos podría ser una estrategia más adecuada para la prevención y el tratamiento de afecciones alérgicas, siempre y cuando estos extractos/moléculas posean propiedades inmunomoduladoras comparables al parásito vivo. En efecto, se ha demostrado en un modelo de asma experimental, que la administración de TLA en conjunto con el alérgeno durante la sensibilización disminuye la susceptibilidad a desarrollar una inflamación alérgica pulmonar⁹¹.

3.2 Objetivo general

Estudiar en un modelo murino de dermatitis atópica (DA) la capacidad de los antígenos totales de *T. gondii* (TLA) de modular el desarrollo de la patología dérmica.

3.3 Objetivos específicos

1. Evaluación *in vitro* del efecto del TLA, proveniente tanto de taquizoitos cultivados *in vitro* como de quistes de cerebro, sobre respuestas T_H2.
2. Desarrollo de un protocolo corto de DA que reproduzca la histopatología, respuesta humoral y sintomatología observada en pacientes alérgicos.
3. Estudio del TLA como tratamiento de la DA: evaluación del efecto del TLA sobre la histopatología, las lesiones cutáneas y la respuesta humoral y celular.

4. Resultados

4.1 Evaluación *in vitro* del efecto del TLA sobre respuestas T_H2

Dado que hasta el momento son nulos los trabajos que analizan *in vitro* el efecto del TLA sobre una respuesta efectora de tipo T_H2 , se comenzó con la evaluación *in vitro* de la capacidad moduladora del TLA sobre una respuesta alérgica. Se analizó tanto el TLA obtenido de taquizoitos cultivados *in vitro* como el obtenido a partir de quistes purificados de cerebros de ratones crónicamente infectados con el parásito.

4.1.1 Cultivo de taquizoitos *in vitro*

Con el objetivo de obtener taquizoitos de *T. gondii* *in vitro* para la posterior obtención del TLA, se puso a punto el cultivo de células hospedadoras del parásito. Primeramente se inició con la línea celular A549 que son células humanas provenientes de carcinoma de epitelio alveolar basal. Dado que las células mencionadas dejaban mucho debris celular remanente y se buscaba obtener los taquizoitos lo más puros posible, se prosiguió probando con células HFF (human foreskin fibroblasts) provenientes de tejido del prepucio humano. Este cultivo se puso a punto para su óptimo crecimiento. Una vez que las células llegaron a confluencia se infectaron añadiendo taquizoitos de *T. gondii*. Aproximadamente 5 días después, cuando se llegó a la eclosión de los parásitos, los mismos fueron cosechados y lisados por sonicación para la posterior obtención del TLA. Se cuantificó por el método de Bradford la concentración de proteína total obtenida. La siguiente figura muestra el cultivo *in vitro* de células HFF (Fig. 3a) y las mismas células una vez que fueron infectadas y los taquizoitos se liberaron al medio extracelular (Fig. 3b).

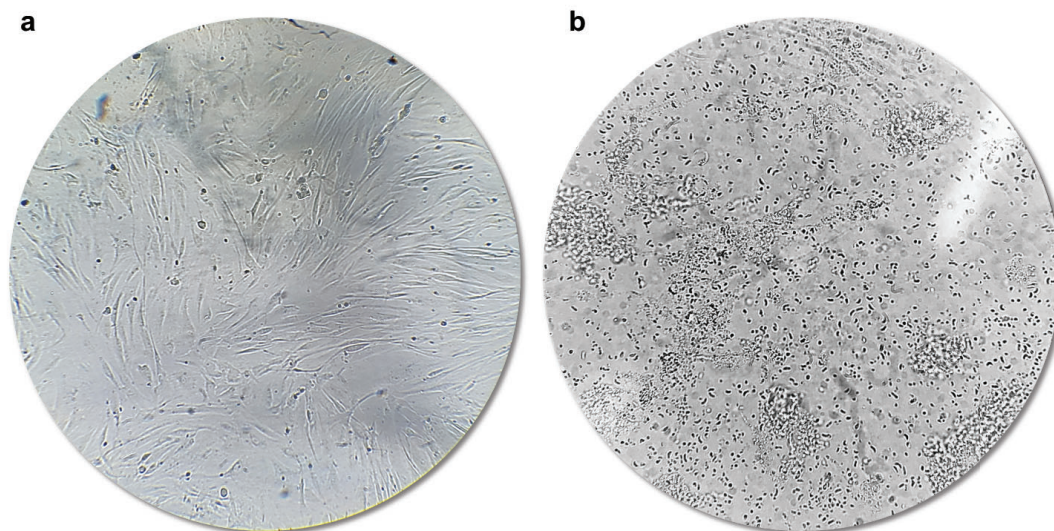


Figura 3. a) Células HFF sin infectar. b) Células HFF infectadas. Se visualizan los taquizoitos de *T. gondii* en el medio extracelular luego de haber lisado la monocapa de células.

4.1.2 Evaluación del efecto del TLA de taquizoitos

Con el objetivo de estudiar el efecto *in vitro* del TLA proveniente de los taquizoitos sobre una respuesta efectora de tipo T_H2 , en paralelo a la puesta a punto del modelo murino de DA, se comenzó con el estudio del efecto modulador utilizando células del ganglio y del bazo de ratones alérgicos, sensibilizados con un protocolo de asma experimental ya establecido en el laboratorio.

A fin de corroborar el estado alérgico de los ratones, se midieron los niveles de anticuerpos IgE, IgG1 e IgG2a específicos para OVA, el alérgeno con el cual fueron sensibilizados. Se observó un aumento de IgE en los ratones sensibilizados (OVA) vs los *naïve* (N). A su vez se detectaron mayores niveles de IgG1 (anticuerpo de tipo 2) que de IgG2a (anticuerpo de tipo 1) en los ratones OVA comparando con los N (Fig. 4). A partir de estos resultados, que confirmaron el estado alérgico de los ratones, se decidió evaluar el efecto modulador de TLA sobre cultivos de células de ganglio torácico y esplenocitos de estos animales.

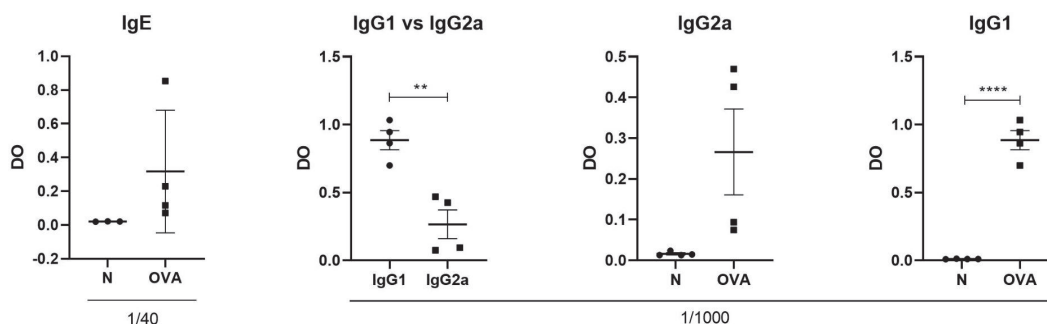


Figura 4. Presencia de anticuerpos séricos alérgeno-específicos de tipo IgE, IgG2a e IgG1 en los ratones sensibilizados con el protocolo de asma alérgica (OVA) vs ratones *naïve* (N). Se extrajo sangre de los ratones por punción cardíaca, se obtuvo el suero y se midieron niveles de anticuerpos específicos para OVA mediante el ensayo de ELISA. Dilución de suero: 1/40 para IgE; 1/1000 para IgG1 e IgG2a. Los datos se representan como la media \pm error estándar (SEM).

Análisis estadístico: t-test. ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

Las células del ganglio se estimularon *ex vivo* con OVA, OVA+TLA y TLA solo, mientras que las células provenientes del bazo se estimularon *ex vivo* tanto con OVA como con un mitógeno T (Concanavalina, ConA). Se probaron dos concentraciones diferentes de TLA, 0,75 $\mu\text{g}/\text{well}$ y 1,5 $\mu\text{g}/\text{well}$.

En un primer experimento, al analizar el perfil de citoquinas de tipo 1 y de tipo 2 en el sobrenadante de las células provenientes del ganglio torácico, como era esperable, se observó un aumento de IL-4 ($p=0,054$) que no resultó significativo, en las células estimuladas con OVA vs las sin estimular (SE). No se observaron diferencias en los niveles de IFN- γ entre los dos grupos mencionados. En cuanto a la estimulación con OVA+TLA (0,75 $\mu\text{g}/\text{well}$), no se visualizaron diferencias significativas en los niveles de las dos citoquinas mencionadas, comparando con las células únicamente estimuladas con OVA (Fig. 5a).

En un segundo experimento se evaluó una mayor concentración de TLA (1,5 $\mu\text{g}/\text{well}$). Se observó un aumento significativo de IL-4 e IL-5 en las células estimuladas con OVA vs las SE. Asimismo, también

se observó un aumento de IFN- γ entre los dos grupos mencionados. Al estimular las células con OVA+TLA, no se observaron diferencias significativas en los niveles de ninguna de las tres citoquinas evaluadas, con respecto a las estimuladas con OVA sola (Fig. 5b).

Paralelamente, no se detectó secreción de citoquinas con la estimulación con TLA solo, en ninguna de las dos concentraciones ensayadas.

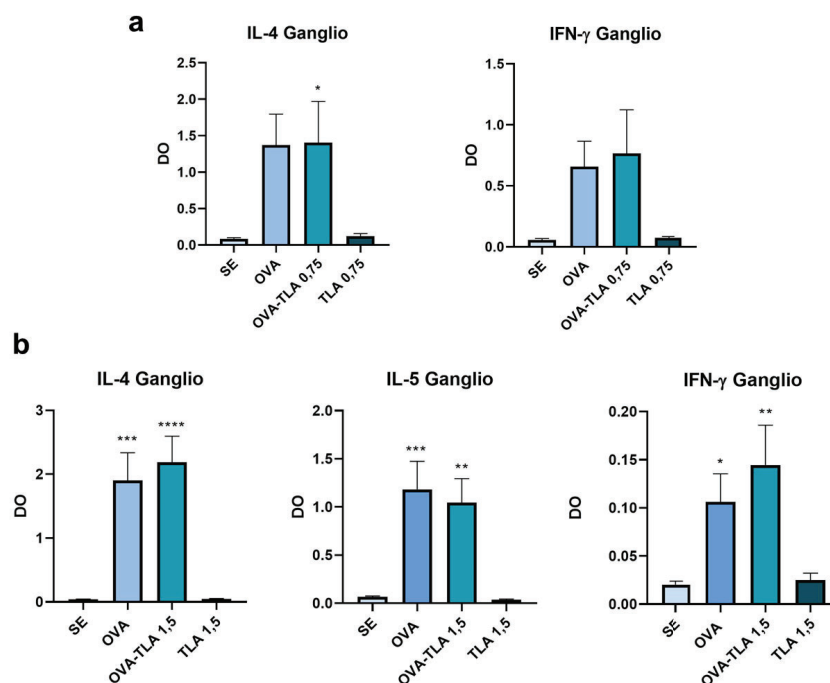


Figura 5. Perfil de respuesta T_H1/T_H2 . Se extrajeron los ganglios torácicos de los ratones sensibilizados con el protocolo de asma y se realizaron cultivos *ex vivo*. a) Se estimuló con OVA (40 $\mu\text{g}/\text{well}$), OVA (40 $\mu\text{g}/\text{well}$)+TLA (0,75 $\mu\text{g}/\text{well}$) y únicamente TLA (0,75 $\mu\text{g}/\text{well}$) y únicamente TLA (0,75 $\mu\text{g}/\text{well}$). b) Se estimuló con OVA (40 $\mu\text{g}/\text{well}$), OVA (40 $\mu\text{g}/\text{well}$)+TLA (1,5 $\mu\text{g}/\text{well}$) y únicamente TLA (1,5 $\mu\text{g}/\text{well}$). También se incluyeron células sin estimular (SE). Se colectaron los sobrenadantes y se midieron los niveles de citoquinas específicas para OVA mediante el ensayo de ELISA. Los datos se representan como la media \pm error estándar (SEM). Análisis estadístico: ANOVA con el método de Sidak como post test. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Se compara con SE.

Al analizar el perfil de citoquinas de tipo 1 y de tipo 2 secretadas por las células provenientes del bazo en respuesta a la estimulación con OVA, no se detectó un aumento significativo en ninguna de las citoquinas respecto de los esplenocitos sin estimular (datos no mostrados). Estos resultados probablemente sean consecuencia de que la respuesta alérgeno-específica se direccionó hacia el ganglio drenante al pulmón (respuesta inmune local) luego del desafío por vía aérea (protocolo de asma alérgica mostrado en Materiales y Métodos). Sin embargo, sí se observó un aumento significativo de IL-4 e IL-5, citoquinas correspondientes a una respuesta alérgica, en las células estimuladas con ConA vs las SE. Paralelamente, los niveles de IFN- γ también aumentaron significativamente entre los dos grupos mencionados. Esto era de esperarse dado que la ConA, un mitógeno independiente de antígeno, funciona como inductor de la primera señal, lo que lleva a las células T a una proliferación policlonal⁹², conduciendo

a su activación y provocando un aumento en la producción de citoquinas⁹³. La ConA se une a las glicoproteínas del receptor de las células T (TCR) constituido por el complejo T3/heterodímero Ti (T3/Ti) estimulando el crecimiento y proliferación de los linfocitos T y estimulando una vía autocrina que induce la producción endógena de IL-2 junto con su posterior liberación y unión a los receptores de IL-2⁹⁴⁻⁹⁷.

En cuanto a la estimulación con ConA en presencia de TLA (0,75 $\mu\text{g}/\text{well}$), no se observaron diferencias significativas en los niveles de IL-4 e IFN- γ con respecto a las células estimuladas únicamente con ConA (Fig. 6a), sin embargo, al aumentar la concentración de TLA a 1,5 $\mu\text{g}/\text{well}$, se observó un aumento de las tres citoquinas analizadas en comparación con las células estimuladas únicamente con ConA (Fig. 6b).

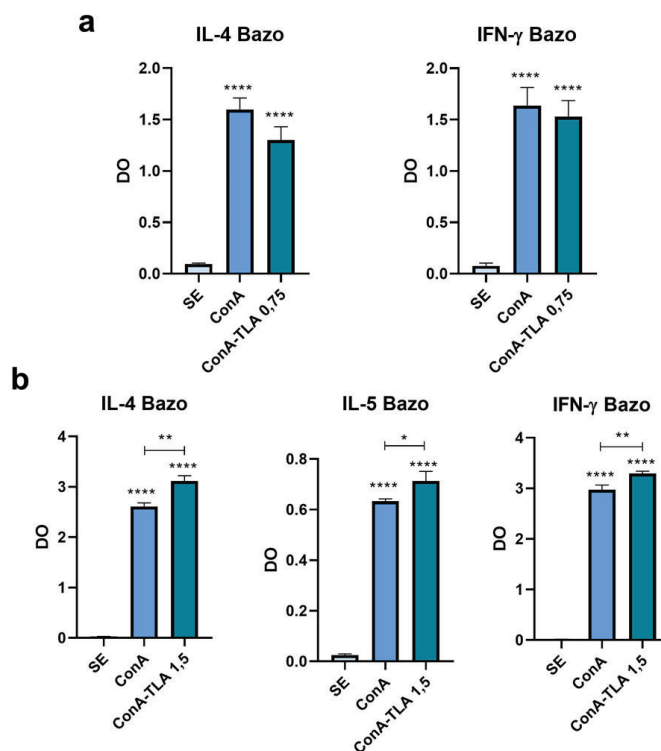


Figura 6. Perfil de respuesta T_H1/T_H2 . Se extrajo el bazo de los ratones sensibilizados con el protocolo de asma y se realizaron cultivos *ex vivo*. a) Se estimuló con ConA (0,5 $\mu\text{g}/\text{well}$) y ConA (0,5 $\mu\text{g}/\text{well}$)+TLA (0,75 $\mu\text{g}/\text{well}$). b) Se estimuló con ConA (0,5 $\mu\text{g}/\text{well}$) y ConA (0,5 $\mu\text{g}/\text{well}$)+TLA (1,5 $\mu\text{g}/\text{well}$). También se incluyeron células sin estimular (SE). Se colectaron los sobrenadantes y se midieron los niveles de citoquinas específicas para OVA mediante el ensayo de ELISA. Los datos se representan como la media \pm error estándar (SEM). Análisis estadístico: ANOVA con el método de Sidak como post test. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$. Se compara con SE.

4.1.3 Evaluación del efecto del TLA proveniente de quistes

El efecto *in vitro* del TLA proveniente de los quistes extraídos del cerebro de ratones crónicamente infectados con *T.gondii* (TLAQ) también se evaluó sobre células de ganglio torácico y bazo de ratones alérgicos. Las células del ganglio torácico se estimularon *ex vivo* con OVA, OVA+TLAQ, ConA y ConA+TLAQ. Las células provenientes del bazo se estimularon *ex vivo* con ConA y ConA+TLAQ.

Al evaluar la secreción de citoquinas por parte del ganglio, se observó un aumento significativo de IL-5 (citoquina de tipo T_H2) en las células estimuladas con OVA vs las SE. Asimismo, se detectó una tendencia a niveles incrementados de IL-4 que no resultaron significativamente diferentes. El IFN- γ no mostró diferencias entre los wells estimulados con OVA y los SE. En cuanto a la estimulación con OVA+TLAQ, no se observaron diferencias entre los niveles de las citoquinas de tipo 1 y tipo 2 evaluadas, en ninguna de las dos concentraciones aplicadas (0,75 $\mu\text{g}/\text{well}$ y 1,5 $\mu\text{g}/\text{well}$), comparando con las células únicamente estimuladas con OVA (Fig. 7).

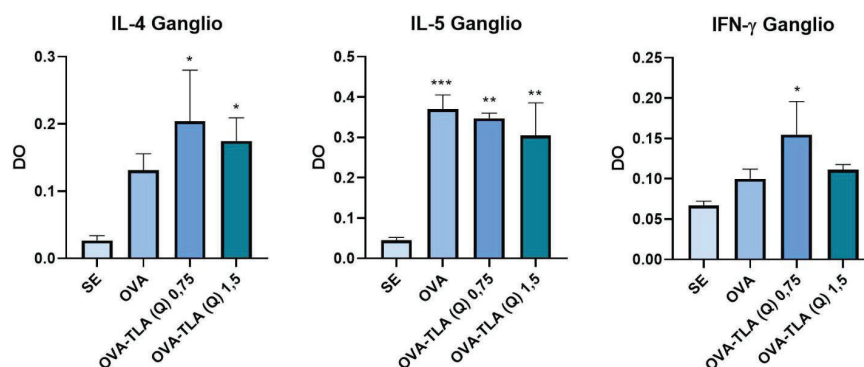


Figura 7. Perfil de respuesta celular T_H1/T_H2 . Se extrajeron los ganglios torácicos de los ratones sensibilizados con el protocolo de asma y se realizaron cultivos ex vivo empleando OVA (40 $\mu\text{g}/\text{well}$), OVA (40 $\mu\text{g}/\text{well}$)+TLAQ (0,75 $\mu\text{g}/\text{well}$)/TLAQ (1,5 $\mu\text{g}/\text{well}$) como estímulo. También se incluyeron células sin estimular (SE). Se colectaron los sobrenadantes y se midieron los niveles de citoquinas específicas para OVA mediante el ensayo de ELISA. Los datos se representan como la media \pm error estándar (SEM). Análisis estadístico: ANOVA con el método de Sidak como post test. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Se compara con SE.

En cuanto al nivel de secreción de citoquinas de las células del bazo, se observó un aumento significativo de IL-4 e IFN- γ en las células estimuladas con ConA vs las SE. Esta diferencia no resultó significativa para IL-5. Al estimular con ConA+TLAQ (0,75 $\mu\text{g}/\text{well}$), no se detectaron diferencias con respecto a las células únicamente estimuladas con ConA, para ninguna de las tres citoquinas evaluadas (Fig. 8).

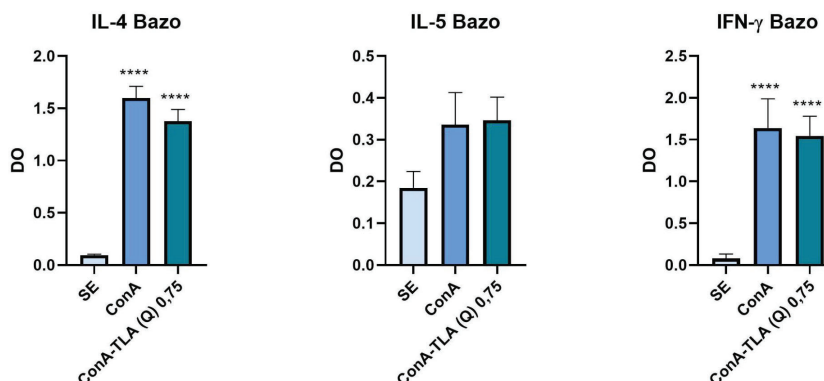


Figura 8. Perfil de respuesta T_H1/T_H2 . Se extrajo el bazo de los ratones sensibilizados con el protocolo de asma y se realizaron cultivos ex vivo empleando ConA (0,5 $\mu\text{g}/\text{well}$) y ConA (0,5 $\mu\text{g}/\text{well}$)+TLAQ (0,75 $\mu\text{g}/\text{well}$) como estímulo. También se incluyeron células sin estimular (SE). Se colectaron los sobrenadantes y se midieron

los niveles de citoquinas específicas para OVA mediante el ensayo de ELISA. Los datos se representan como la media \pm error estándar (SEM). Análisis estadístico: ANOVA con el método de Sidak como post test. **** $p < 0,0001$. Se compara con SE.

Dado que con las condiciones ensayadas no se logró una modulación por parte del TLAQ de la respuesta alérgeno-específica ni tampoco de la respuesta inespecífica estimulada con ConA, se decidió modificar el protocolo de estimulación. Las células de ganglio y bazo de ratones alérgicos fueron incubadas con el TLAQ durante una hora antes de la estimulación con OVA o ConA, utilizando a su vez una concentración más alta de TLAQ (10 $\mu\text{g}/\text{well}$).

En este caso, además de las citoquinas T_H1 y T_H2 también incluimos la evaluación de la citoquina regulatoria IL-10.

En el ganglio, al modular con OVA+TLAQ no se modificaron los niveles de ninguna de las citoquinas evaluadas (IL-4, IL-5, IFN- γ e IL-10), comparando con las células únicamente estimuladas con OVA. Esto indica que en estas condiciones, el TLAQ no moduló la respuesta inmune establecida (Fig. 9).

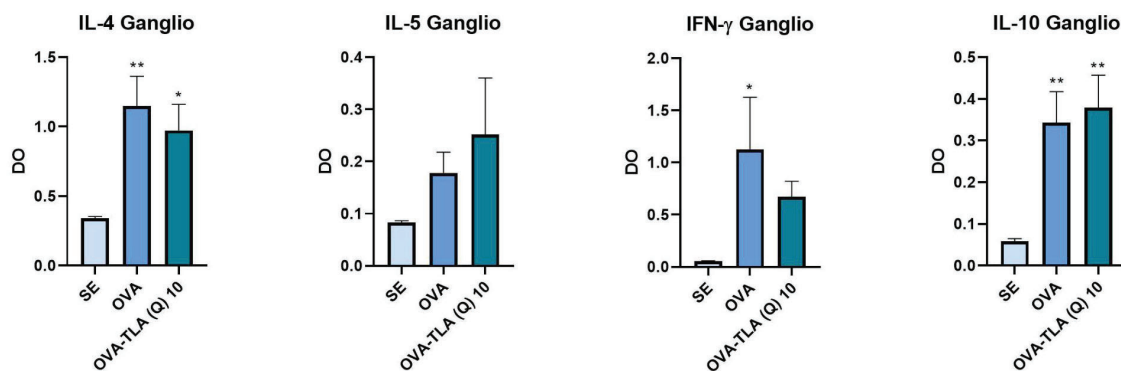


Figura 9. Perfil de respuesta celular. Se extrajeron los ganglios torácicos de los ratones sensibilizados con el protocolo de asma y se realizaron cultivos ex vivo empleando OVA (40 $\mu\text{g}/\text{well}$) y OVA (40 $\mu\text{g}/\text{well}$)+TLAQ (10 $\mu\text{g}/\text{well}$) como estímulo. También se incluyeron células sin estimular (SE). Se colectaron los sobrenadantes y se midieron los niveles de citoquinas específicas para OVA mediante el ensayo de ELISA. Los datos se representan como la media \pm error estándar (SEM). Análisis estadístico: ANOVA con el método de Sidak como post test. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Se compara con SE.

Posteriormente, se evaluó también la secreción de citoquinas de las células del ganglio torácico estimuladas con ConA y ConA+TLAQ (10 $\mu\text{g}/\text{well}$). Se observó un aumento significativo de las cuatro citoquinas evaluadas en las células estimuladas con ConA vs las SE, lo cual era esperado por la actividad mitógena del ConA ante la respuesta inmune previamente establecida.

Al modular con TLAQ, no se detectaron diferencias en los niveles de IL-5, IFN- γ e IL-10. Sin embargo e interesantemente, sí se registró una disminución significativa de IL-4 comparando con las células únicamente estimuladas con ConA. Esto podría indicar un potencial efecto modulador por parte del TLAQ sobre la secreción de esta citoquina (Fig. 10).

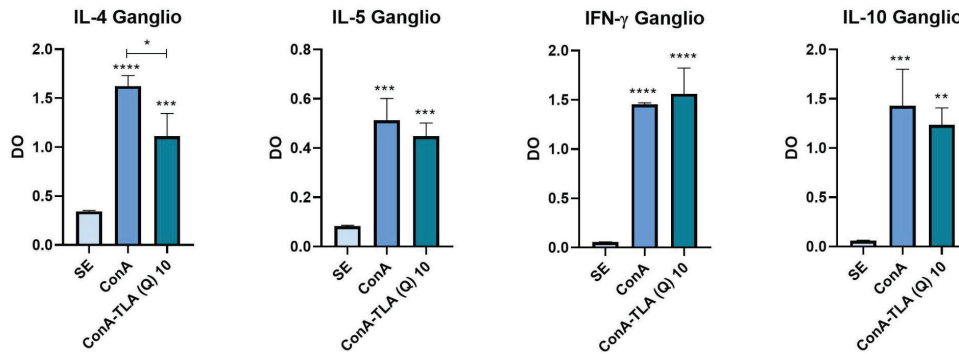


Figura 10. Perfil de respuesta celular. Se extrajeron los ganglios torácicos de los ratones sensibilizados con el protocolo de asma y se realizaron cultivos *ex vivo* empleando ConA (0,5 $\mu\text{g/well}$), ConA (0,5 $\mu\text{g/well}$)+TLAQ (10 $\mu\text{g/well}$) como estímulo. También se incluyeron células sin estimular (SE). Se colectaron los sobrenadantes y se midieron los niveles de citoquinas específicas para OVA mediante el ensayo de ELISA. Los datos se representan como la media \pm error estándar (SEM). Análisis estadístico: ANOVA con el método de Sidak como post test. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Se compara con SE.

Finalmente, al analizar la respuesta de esplenocitos de los ratones sensibilizados, se detectó un aumento significativo de IL-4, IL-5, IFN- γ e IL-10 en las células estimuladas con ConA vs las SE.

En cuanto al efecto del TLAQ, al igual que en el ganglio, se logró observar una disminución significativa de los niveles de IL-4 en las células estimuladas con ConA+TLAQ comparando con las células únicamente estimuladas con ConA. Estos niveles diferenciales entre ambas condiciones no se observaron para el caso de IL-5, IFN- γ e IL-10 (Fig. 11).

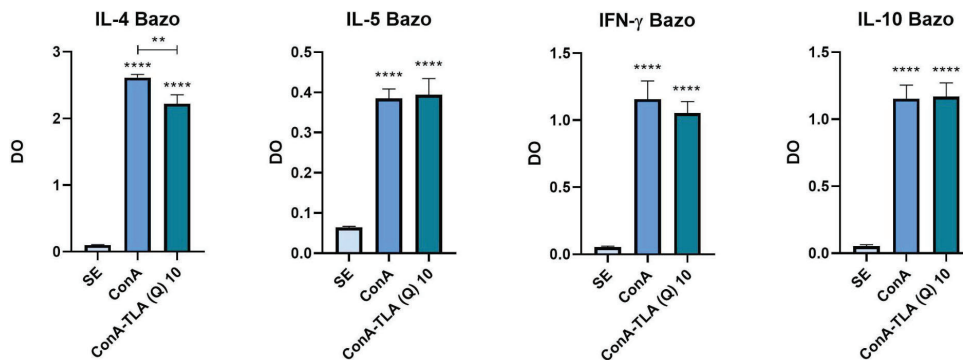


Figura 11. Perfil de respuesta celular. Se extrajo el bazo de los ratones sensibilizados con el protocolo de asma y se realizaron cultivos *ex vivo* empleando ConA (0,5 $\mu\text{g/well}$) y ConA (0,5 $\mu\text{g/well}$)+TLAQ (10 $\mu\text{g/well}$) como estímulo. También se incluyeron células sin estimular (SE). Se colectaron los sobrenadantes y se midieron los niveles de citoquinas específicas para OVA mediante el ensayo de ELISA. Los datos se representan como la media \pm error estándar (SEM). Análisis estadístico: ANOVA con el método de Sidak como post test. ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$. Se compara con SE.

Los resultados obtenidos en esta primera parte muestran que el TLA obtenido tanto de taquizoitos como de quistes no fue capaz de modular *in vitro* una respuesta T alérgeno-específica (estimulación con OVA). Sin embargo, interesantemente, cuando las células se incubaron con el TLA

provenientes de quistes, una hora antes de la estimulación con ConA y con una mayor dosis, tanto las células del ganglio (respuesta inmune local) como en las células del bazo (respuesta inmune sistémica) mostraron una reducción significativa en la secreción de IL-4.

4.2 Desarrollo de un protocolo corto de dermatitis

En nuestro laboratorio se estableció previamente un modelo murino de DA que consistía en la sensibilización de los ratones por vía epicutánea con OVA como alérgeno. Los ratones sensibilizados presentaban en la piel un cuadro histopatológico típico de pacientes con DA y niveles elevados de IgE alérgeno-específicos. Sin embargo, no se registraban lesiones cutáneas macroscópicas y la duración del protocolo era muy extensa (7 semanas). Nos propusimos entonces desarrollar un nuevo protocolo de DA con el objetivo no sólo de acortar los tiempos de sensibilización sino también de replicar la sintomatología observada en pacientes con DA, incluyendo lesiones macroscópicas en la piel de los ratones.

4.2.1 Primer protocolo

El protocolo de DA desarrollado se basó en una modificación de un protocolo previamente descrito por Rie Yatsuzuka y col⁹⁸. Los ratones se sensibilizan por vía sistémica (i.p) con el alérgeno OVA (100 µg) utilizando como adyuvante aluminio (2 mg), a diferencia del protocolo original que incluye también la toxina Pertussis. Seis días después se aplica OVA (50 µg en PBS) por vía subcutánea. Posteriormente se efectúa un desafío por vía epicutánea, desde el día 18 al 33 desde la primera inmunización sistémica, aplicando parches con OVA (150 µg/100 µl) (grupo DA) (Fig. 12). Los controles negativos (N) recibieron las mismas aplicaciones intraperitoneal y subcutánea, así como los parches, pero únicamente con PBS.

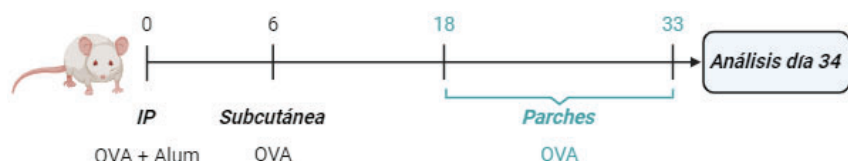


Figura 12. Primer protocolo experimental de dermatitis atópica.

4.2.1.1 Anticuerpos en suero

Como se mencionó previamente, los individuos con DA presentan altos niveles de IgE. Comenzamos entonces evaluando el nivel de estos anticuerpos en el suero de los ratones, así como también los niveles de IgG1 e IgG2a, característicos de una respuesta de tipo 2 y de tipo 1, respectivamente.

Se pudo visualizar un aumento significativo de los anticuerpos IgE alérgeno-específicos en los ratones sensibilizados (DA) en comparación con los *naïve* (N) y, a su vez, se detectó un mayor nivel de

anticuerpos IgG1 en comparación con los IgG2a en los ratones DA. Este resultado era esperable ya que, como se mencionó anteriormente, la subclase de anticuerpos IgG1 es la involucrada en respuestas alérgicas (Fig. 13).

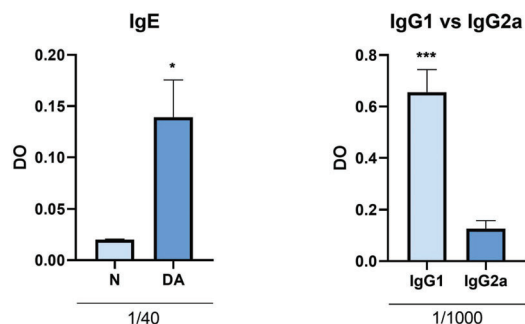


Figura 13. Presencia de anticuerpos séricos alérgeno-específicos de tipo IgE, IgG2a e IgG1 en los ratones sensibilizados (DA) vs ratones naive (N). Se extrajo sangre de los ratones por punción cardíaca, se obtuvo el suero y se midieron niveles de anticuerpos específicos para OVA mediante el ensayo de ELISA. Dilución de suero: 1/40 para IgE; 1/1000 para IgG1 e IgG2a. Los datos se representan como la media \pm error estándar (SEM). Análisis estadístico: *t*-test. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

4.2.1.2 Histopatología y lesiones cutáneas

Los ratones tratados no mostraron lesiones cutáneas macroscópicas como se esperaba, sin embargo, a nivel histológico se observaron marcadas diferencias en las secciones de piel del dorso de ratones sometidos al protocolo de DA respecto de los N. Los parámetros histopatológicos analizados incluyeron la evaluación del grado de infiltración y desgranulación de los mastocitos, del espesor de la epidermis y la capa córnea así como del nivel de infiltración leucocitaria. Para ello, luego de la eutanasia de los ratones, las secciones de piel se fijaron con una solución de formalina, se incluyeron en parafina y se realizaron cortes para microscopía.

Un parámetro clave para evaluar el desarrollo de la DA es el aumento del infiltrado de mastocitos (MC) en la dermis. En este caso se analizó también el estado de degranulación de los mismos categorizando entre MC intactos, MC parcialmente degranulados y totalmente degranulados (Fig. 14b). Los intactos presentan una forma de redonda a ovalada, con una membrana celular claramente definida y estaban asociados con ninguno o menos de 10 gránulos en el espacio extracelular inmediato. Los parcialmente degranulados tenían una forma ovalada o irregular, y su membrana celular estaba oscurecida por numerosos gránulos tanto en el citoplasma como en el espacio extracelular. Los totalmente degranulados presentaban un borde delgado de gránulos alrededor de la membrana celular, pero no había gránulos en el citoplasma central restante⁷¹.

A pesar de no haberse observado diferencias en la cantidad de MC totales entre los ratones DA y los N, al analizar la morfología de los MC como indicador del estado de activación, sí se visualizó un

aumento significativo de MC parcialmente degranulados en los primeros en comparación con los segundos (Fig 14 a y c).

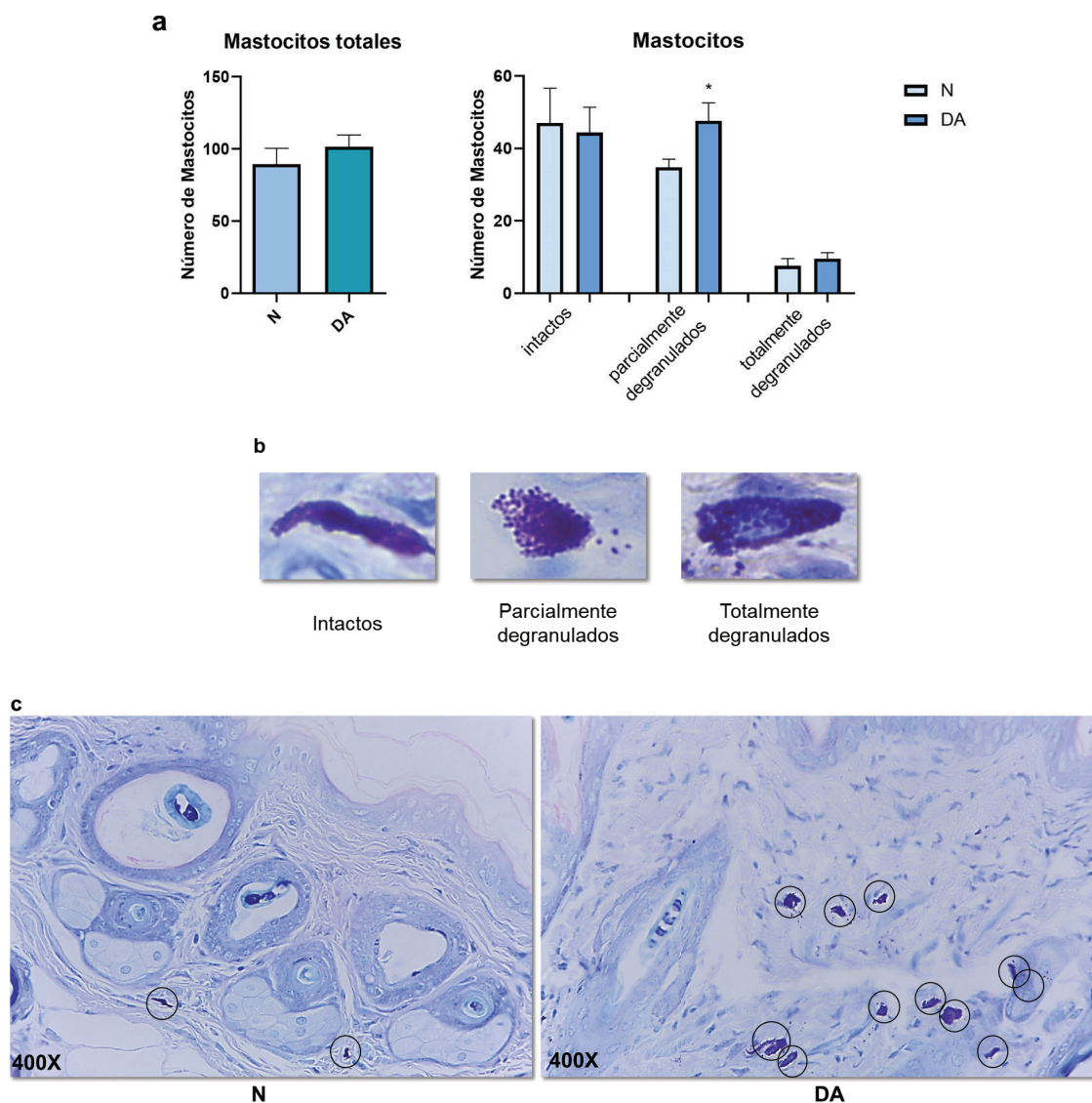


Figura 14. a) Nivel de infiltración de mastocitos (MC) y su estado de degranulación en ratones sensibilizados (DA) vs ratones naive (N). El recuento de MC se llevó a cabo mediante la cuantificación de 10 campos aleatorios en cada muestra. b) Imagen representativa de MC intactos, parcialmente degranulados y totalmente degranulados (aumento original 1000X). c) Imagen representativa de la infiltración de MC en un corte histológico de un ratón N a la izquierda y DA a la derecha (aumento original de 400X). Se utilizó la tinción de Giemsa, la cual permite identificar los MC en los campos por su color púrpura intenso. Se observa la presencia de MC indicados con círculos negros. Los datos se representan como la media \pm error estándar (SEM). Análisis estadístico: t-test. * $p < 0,05$.

Al analizar el nivel y tipo de infiltrado leucocitario se pudo ver un aumento del número de eosinófilos, característico de un proceso inflamatorio alérgico, en los ratones DA en comparación con los N (Fig. 15a). Para respaldar estas observaciones, se realizó una cuantificación de eosinófilos, neutrófilos y

linfocitos. Se observó un incremento significativo en la infiltración de eosinófilos en la dermis de los ratones DA vs los N, sin haber detectado diferencias en el nivel de linfocitos ni de neutrófilos (Fig. 15b).

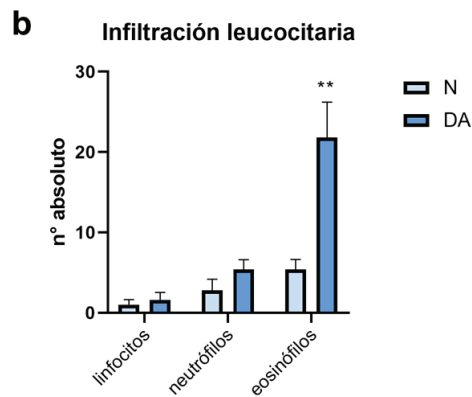
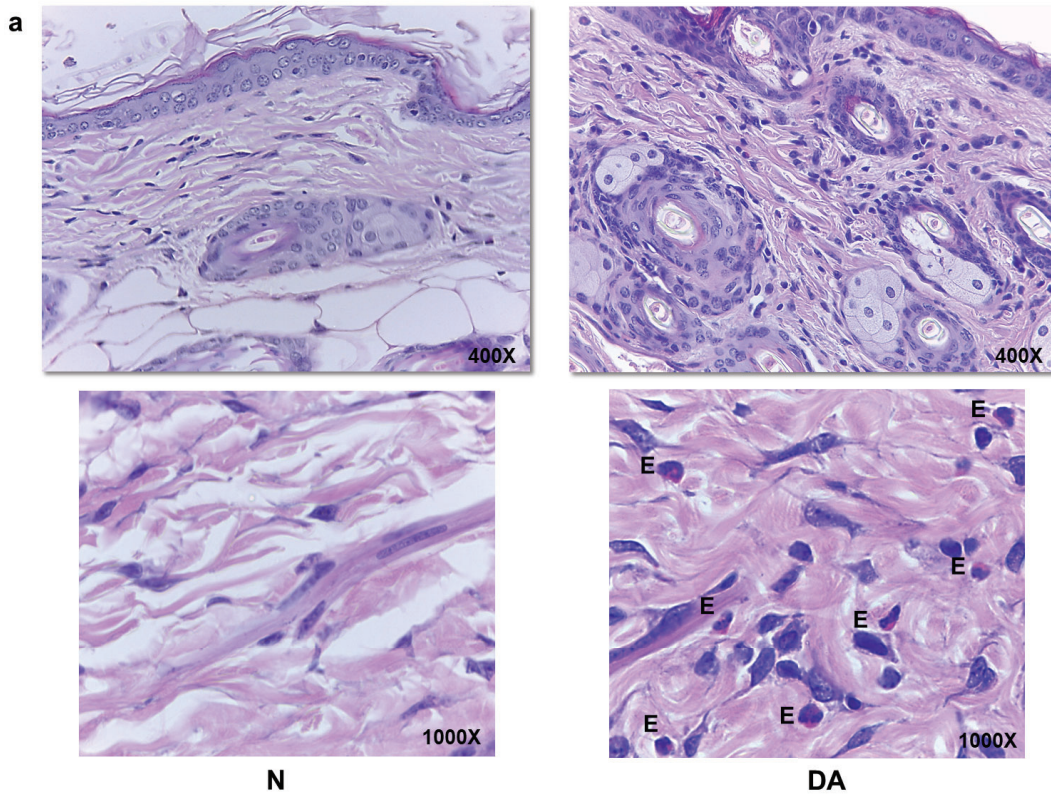


Figura 15. a) Imagen representativa del infiltrado de eosinófilos (E) en un corte histológico teñido con Hematoxilina-Eosina de un ratón DA vs un N (aumento original de 400X arriba y 1000X abajo). b) Infiltrado leucocitario en ratones sensibilizados (DA) vs ratones naive (N). El recuento de leucocitos se llevó a cabo mediante la cuantificación de linfocitos, neutrófilos y eosinófilos en 10 campos aleatorios en cada muestra. Los datos se representan como la media \pm error estándar (SEM). Análisis estadístico: t-test. ** $p < 0,01$.

La figura 16a muestra imágenes representativas de los cortes histológicos provenientes de la piel del dorso de los ratones N (izquierda) y DA (derecha), donde se puede visualizar acantosis en la capa epidérmica e hiperqueratosis en el estrato córneo (capa de queratina) en el grupo DA. El análisis

semi-cuantitativo mostró un aumento significativo de ambos parámetros en el grupo DA con respecto al N (Fig. 16 b y c).

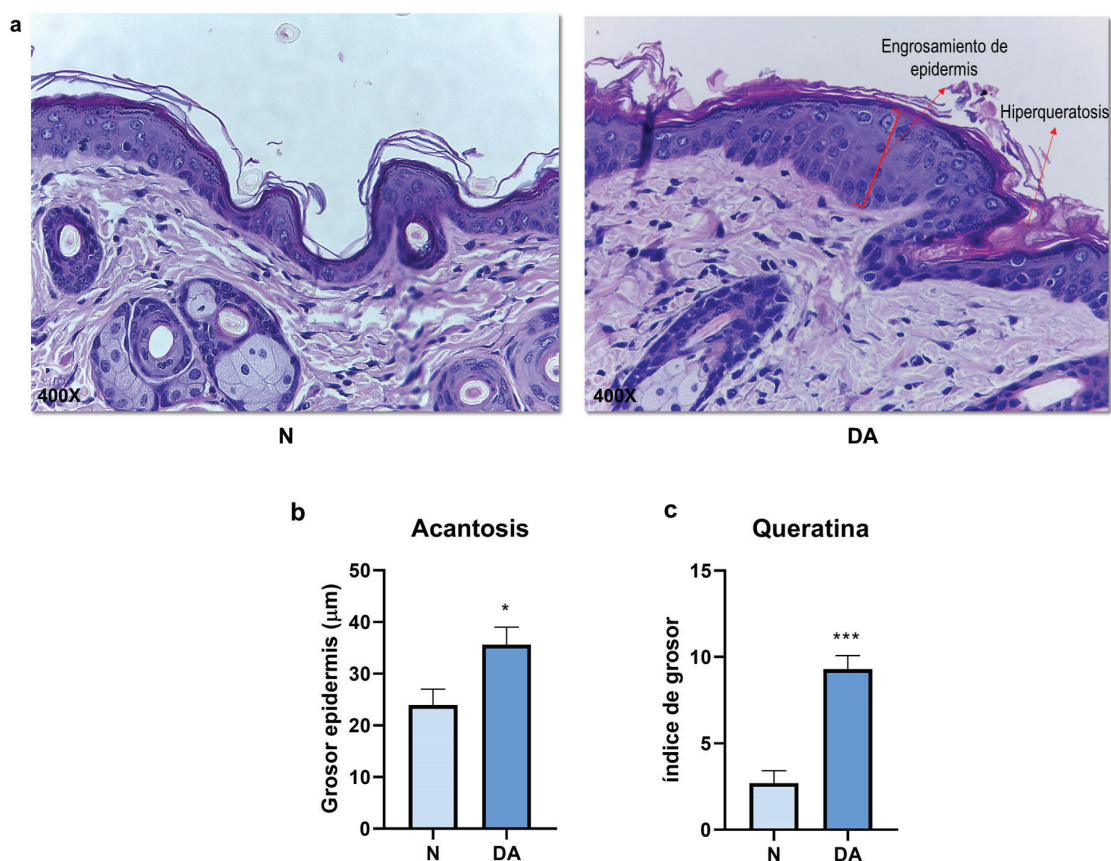


Figura 16. Nivel de engrosamiento de la epidermis (acantosis) y del estrato córneo (capa de queratina) en ratones DA vs N. a) Se muestra una imagen representativa de un ratón naive (N) y de uno sensibilizado (DA) (aumento original 400X). La toma de imágenes se efectuó mediante el software Leica Application Suite (LAS4) del microscopio. b) El engrosamiento de la epidermis (acantosis) se determinó midiendo con el programa ImageJ el espesor de la misma con una magnificación de 400X en al menos 12 campos por ratón, por grupo experimental. c) El engrosamiento de la capa de queratina se determinó en al menos 10 campos por ratón, por grupo experimental, mediante un índice de grosor previamente establecido. Los datos se representan como la media \pm error estándar (SEM). Análisis estadístico: t-test. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

4.2.1.3 Frotis de sangre

Los eosinófilos son células del sistema inmunológico que, junto con los basófilos y los mastocitos, median las respuestas alérgicas. Este tipo celular representa aproximadamente el 1-6% de los glóbulos blancos⁹⁹. La eosinofilia, es decir, el aumento del porcentaje de eosinófilos en sangre, se ha demostrado que está presente en la mayoría de los pacientes con DA y se correlaciona con la actividad de la enfermedad¹⁰⁰.

Evaluando el nivel de eosinófilos en los frotis de sangre de ratones DA vs ratones N, se pudo observar un aumento significativo del porcentaje de los mismos en los primeros en comparación con los

segundos (Fig. 17a). En la figura 17b se muestran imágenes representativas de un linfocito, un neutrófilo y un eosinófilo en un frotis de sangre de un ratón DA.

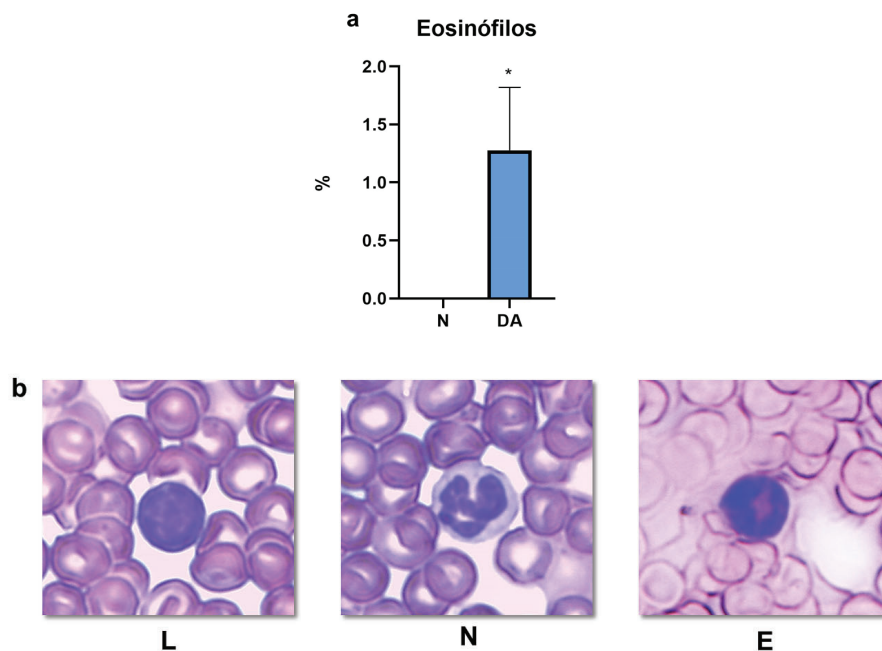


Figura 17. a) Porcentaje de eosinófilos en frotis de sangre de ratones sensibilizados con el protocolo (DA) vs ratones naive (N). El recuento de porcentaje de eosinófilos se llevó a cabo mediante la cuantificación de 100 células leucocitarias en cada muestra. b) Imágenes representativas de un linfocito (L), un neutrófilo (N) y un eosinófilo (E) en un frotis de sangre (aumento original 1000X). Los frotis fueron teñidos con la Tinción 15 (versión modificada del Wright-Giemsa). Los datos se representan como la media \pm error estándar (SEM). Análisis estadístico: t-test. * $p < 0,05$.

4.2.1.4 Respuesta Celular: Perfil de Citoquinas T_H1 y T_H2

En la DA, la sensibilización con el alérgeno lleva inicialmente a una diferenciación hacia una respuesta predominante de tipo T_H2 con secreción de IL-4, IL-5 e IL-13. La fase crónica se caracteriza por no sólo una respuesta de tipo 2 sino también por una respuesta de tipo 1, con presencia de IFN- γ .

Los aumentos de los niveles de citoquinas detectados, tanto de tipo 2 (IL-4 e IL-5) como de tipo 1 (IFN- γ), en los ganglios drenantes a la zona donde se aplicó el parche con OVA (grupo DA) no resultaron significativos respecto del grupo N.

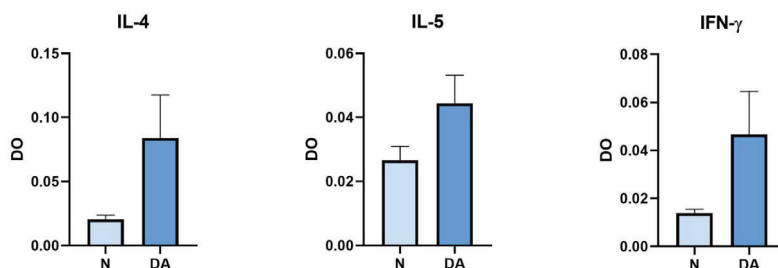


Figura 18. Perfil de respuesta T_H1/T_H2 . Se extrajeron los ganglios de los ratones sensibilizados (DA) y naive (N) y se realizaron cultivos ex vivo, empleando OVA como estímulo. Se colectaron los sobrenadantes y se midieron los

niveles de citoquinas específicas para OVA mediante el ensayo de ELISA. Los datos se representan como la media \pm error estándar (SEM). Análisis estadístico: t-test.

4.2.2 Segundo protocolo

Debido a que con el primer protocolo no se lograron observar lesiones cutáneas visibles ni una respuesta significativa de citoquinas de tipo 2, se decidió modificar el protocolo extendiendo una semana más el desafío con el alérgeno por vía epicutánea, aumentando la concentración de OVA a 250 μ g/100 μ l y alternando su exposición con Calcipotriol (Fig. 19). El Calcipotriol es un análogo de la vitamina D, el cual se ha demostrado que induce la expresión de TSLP en queratinocitos epidérmicos de ratones⁷², lo que haría que se genere una respuesta específica contra OVA en un contexto T_H2 exacerbado. Asimismo, se ha visto que el Calcipotriol induce dermatitis atópica en ratones^{68,101}. Los controles negativos (N) recibieron las mismas aplicaciones intraperitoneal y subcutánea, así como los parches pero únicamente con PBS.

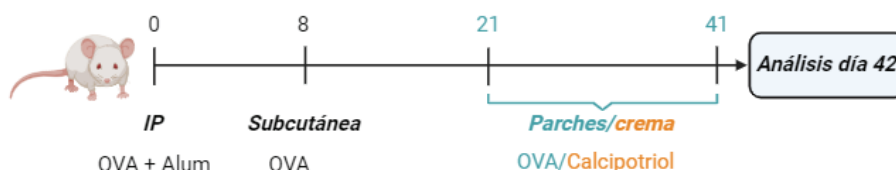


Figura 19. Segundo protocolo experimental de dermatitis atópica.

4.2.2.1 Anticuerpos en suero

Al evaluar la presencia de anticuerpos alérgeno-específicos en el suero de los ratones se pudo observar un aumento significativo de IgE en el grupo DA vs el N. Asimismo, se observó un incremento significativo de IgG1 e IgG2a (datos no mostrados), siendo los niveles del primero significativamente mayores que los del segundo anticuerpo (Fig. 20), lo que da indicio de que se logró generar una respuesta de tipo 2.

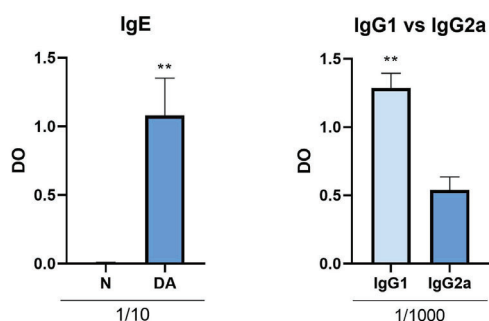


Figura 20. Presencia de anticuerpos séricos alérgeno-específicos de tipo IgE, IgG2a e IgG1 en los ratones sensibilizados (DA) vs ratones naive (N). Se extrajo sangre de los ratones por punción cardíaca, se obtuvo el suero y se midieron niveles de anticuerpos específicos para OVA mediante el ensayo de ELISA. Dilución de suero: 1/10 para IgE; 1/1000 para IgG1 e IgG2a. Los datos se representan como media \pm error estándar (SEM). Análisis estadístico: t-test. **p<0,01.

4.2.2.2 Lesiones cutáneas e Histopatología

En este segundo protocolo de sensibilización, se lograron visualizar lesiones macroscópicas características de la DA en los primeros días de la sensibilización (Fig. 21a), las cuales fueron distintivas en comparación con la piel del dorso de ratones N (Fig. 21b). Sin embargo, al final del protocolo estas lesiones ya no fueron observables.

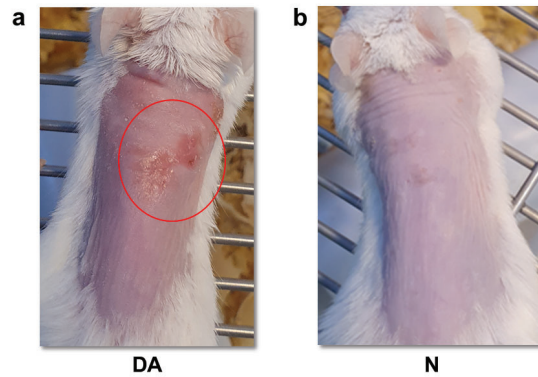
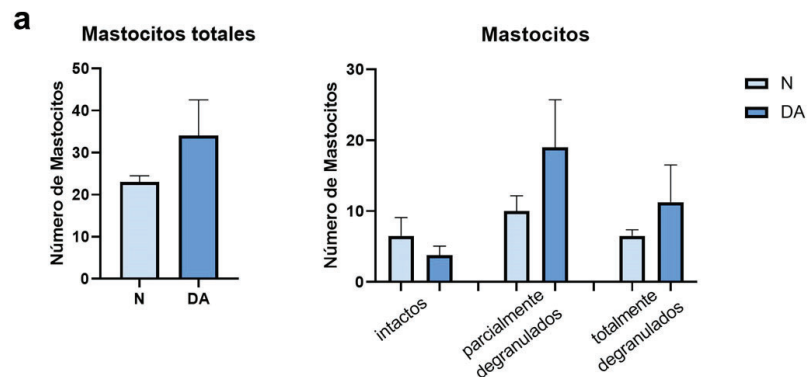


Figura 21. a) Piel del dorso de ratones sensibilizados con el segundo protocolo (DA). Lesiones señalizadas con círculo rojo. b) Piel del dorso de ratones naive (N).

Las secciones histológicas de piel no evidenciaron alteraciones significativas en la infiltración de MC, ni en su estado de degranulación en el grupo DA vs el N (Fig. 22a). A nivel cualitativo sí se visualizaron diferencias entre los grupos mencionados pero éstas no fueron tan marcadas como en el primer protocolo (Fig. 22b). Por otro lado, cuando se cuantificaron los leucocitos infiltrados, sí se detectó un incremento significativo en el nivel de infiltración de eosinófilos en el grupo DA vs el N, el cual se observó también a nivel cualitativo (Fig. 23 a y b).



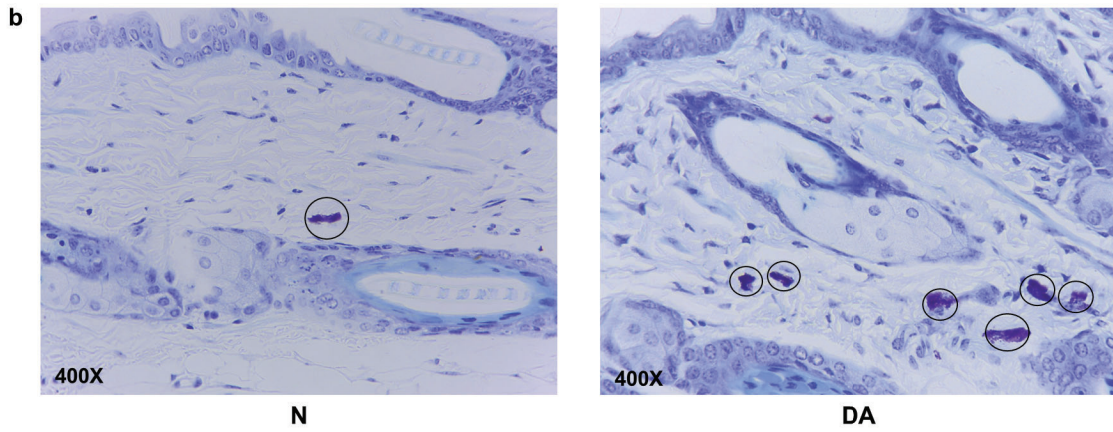
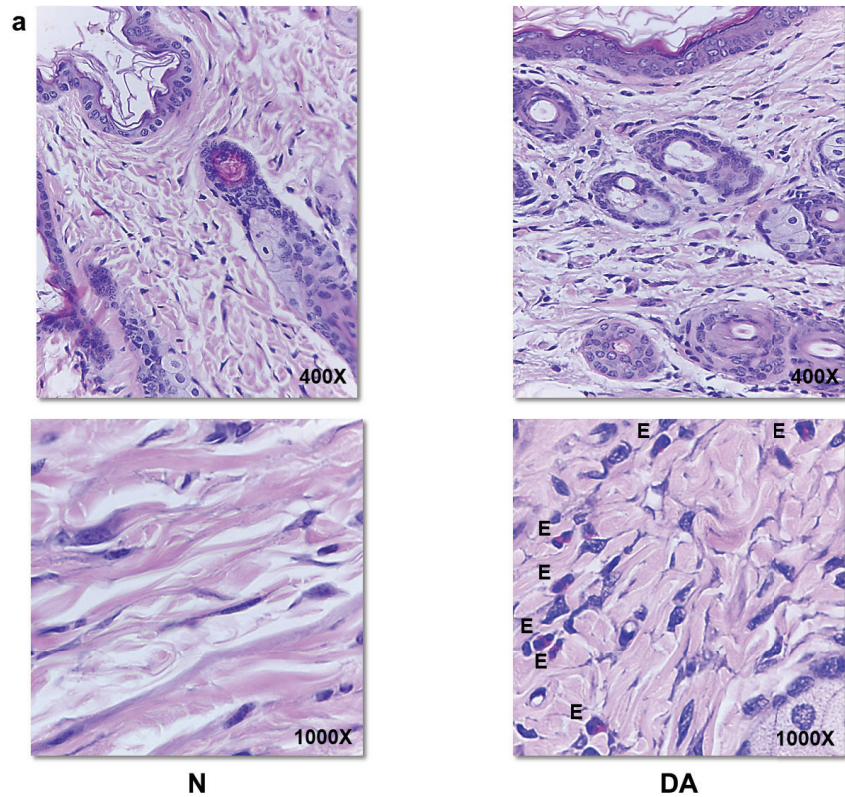


Figura 22. a) Nivel de infiltración de mastocitos (MC) y su estado de degranulación en ratones sensibilizados (DA) vs ratones naive (N). El recuento de MC se llevó a cabo mediante la cuantificación de 10 campos aleatorios en cada muestra. b) Imagen representativa de la infiltración de MC en un corte histológico de un ratón N a la izquierda y DA a la derecha (aumento original de 400X). Se utilizó la tinción de Giemsa, la cual permite identificar los MC en los campos por su color púrpura intenso. Se observa la presencia de mastocitos indicados con círculos negros. Los datos se representan como la media \pm error estándar (SEM). Análisis estadístico: t-test.



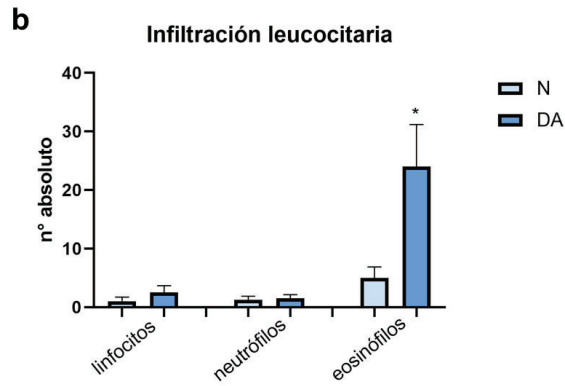


Figura 23. a) Imagen representativa de infiltración de eosinófilos (E) en un corte histológico teñido con Hematoxilina-Eosina de un ratón DA vs un N (aumento original de 400X arriba y 1000X abajo). b) Infiltración leucocitaria en ratones sensibilizados (DA) vs ratones naive (N). El recuento de leucocitos se llevó a cabo mediante la cuantificación de linfocitos, neutrófilos y eosinófilos en 10 campos aleatorios en cada muestra. Los datos se representan como la media \pm error estándar (SEM). Análisis estadístico: t-test. * $p < 0,05$.

En cuanto al análisis de las diferencias en la epidermis, se observó un aumento significativo del grosor de la misma en el grupo DA vs el N (Fig. 24 a y b). Por otro lado, no se detectó un aumento significativo del grosor de la capa de queratina entre ambos grupos experimentales (Fig. 24c).

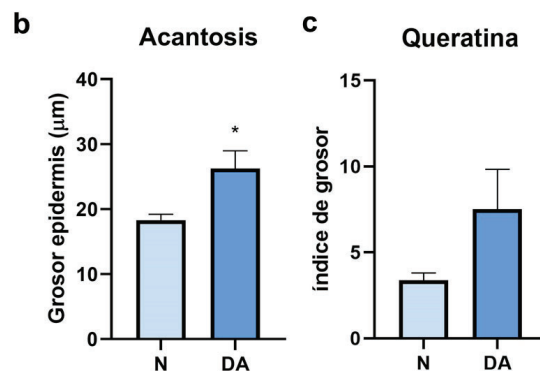
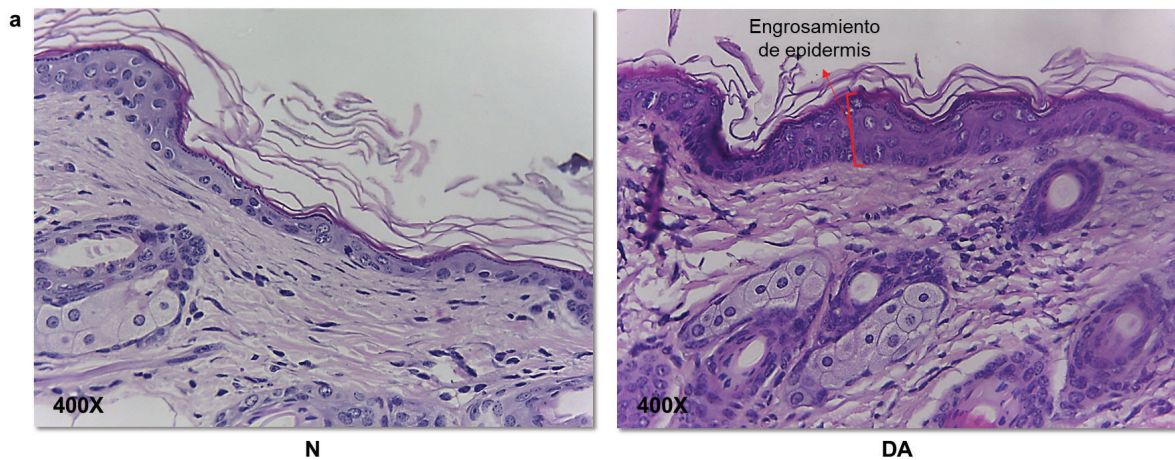


Figura 24. Nivel de engrosamiento de la epidermis (acantosis) y del estrato córneo (capa de queratina) en ratones DA vs N. a) Se muestra una imagen representativa de un ratón naive (N) y de uno sensibilizado (DA). La toma de imágenes se efectuó mediante el software Leica Application Suite (LAS4) del microscopio. b) El engrosamiento de la epidermis (acantosis) se determinó midiendo con el programa ImageJ el espesor de la misma con una magnificación de 400X en al menos 12 campos por ratón, por grupo experimental. c) El engrosamiento de la capa de queratina se determinó en al menos 10 campos por ratón, por grupo experimental, mediante un índice de grosor previamente establecido. Los datos se representan como la media \pm error estándar (SEM). Análisis estadístico: t-test. * $p < 0,05$.

4.2.2.3 Respuesta Celular: Perfil de Citoquinas T_H1 y T_H2

Al evaluar la secreción de citoquinas de tipo 2 por parte de los ganglios drenantes de los ratones DA, se pudo observar un aumento significativo de IL-4 en comparación con los niveles secretados por los ratones N, siendo estos niveles mayores a los observados en el primer protocolo para esta citoquina. Contrariamente, no se vio un aumento significativo de IL-5 en el grupo DA vs el N. En cuanto a la citoquina de tipo 1 (IFN- γ), no hubo diferencias entre los grupos experimentales mencionados (Fig. 25).

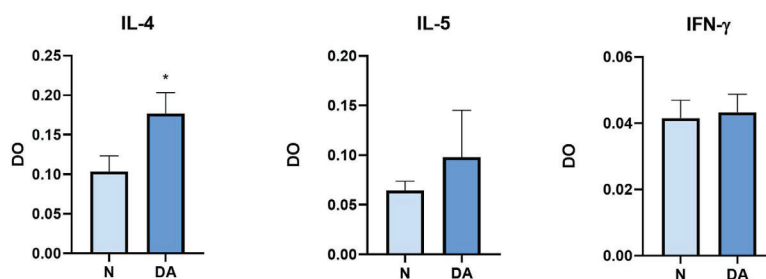


Figura 25. Perfil de respuesta T_H1/T_H2 . Se extrajeron los ganglios de los ratones sensibilizados (DA) y naive (N) y se realizaron cultivos ex vivo, empleando OVA como estímulo. Se colectaron los sobrenadantes y se midieron los niveles de citoquinas específicas para OVA mediante el ensayo de ELISA. Análisis estadístico: t-test. * $p < 0,05$.

4.2.3 Tercer protocolo

Con el objetivo de mejorar el desarrollo de lesiones cutáneas macroscópicas características de la dermatitis y generar una respuesta inmune de tipo 2 alérgeno-específica más significativa que la observada con los dos protocolos anteriores, se llevó adelante una tercera modificación del protocolo. Este último consistió en la misma sensibilización sistémica (OVA 100 μ g + Aluminio 2 mg en PBS) y desafío subcutáneo con OVA (50 μ g en PBS) que los protocolos anteriores, sumado a un desafío epicutáneo con el mismo número de dosis de OVA que en el primer protocolo pero con la concentración utilizada en el segundo protocolo (250 μ g/100 μ l). A su vez se disminuyó la exposición a Calcipotriol con respecto al segundo protocolo con el fin de asegurar una exposición más constante al alérgeno OVA (Fig. 26). Los controles negativos (N) recibieron las mismas aplicaciones intraperitoneal, subcutánea y epicutánea pero únicamente con PBS.

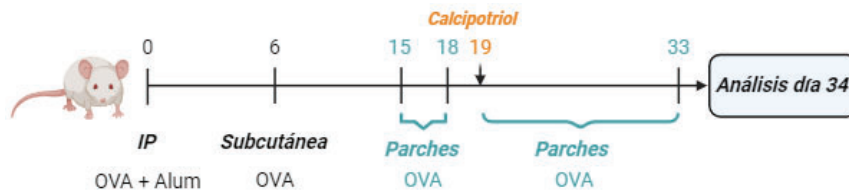


Figura 26. Tercer protocolo experimental de dermatitis atópica.

4.2.3.1 Anticuerpos en suero

Se evidenció un incremento notable de la IgE específica para OVA en los ratones DA en comparación con los ratones N, confirmando así su condición alérgica. Además, se detectó un aumento en los niveles de anticuerpos IgG1 e IgG2a en los ratones con DA en comparación con los ratones no sensibilizados. Llamativamente, no se observaron diferencias significativas entre los niveles de IgG1 y IgG2a, a diferencia de lo observado en los dos protocolos anteriores (Fig. 27).

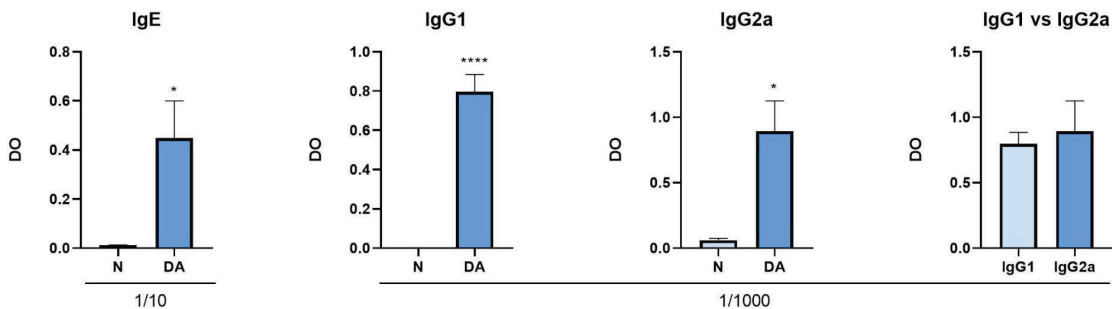


Figura 27. Presencia de anticuerpos séricos alérgeno-específicos de tipo IgE, IgG2a e IgG1 en los ratones sensibilizados (DA) vs ratones naive (N). Se extrajo sangre de los ratones por punción cardíaca, se obtuvo suero y se midieron niveles de anticuerpos específicos para OVA mediante el ensayo de ELISA. Dilución de suero: 1/10 para IgE; 1/1000 para IgG1 e IgG2a. Los datos se representan como la media \pm error estándar (SEM). Análisis estadístico: t-test * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$.

4.2.3.2 Lesiones cutáneas e Histopatología

Con este protocolo de sensibilización se logró visualizar la piel engrosada, apergaminada (eczema) y con signos de sequedad característica de la dermatitis hacia el final del protocolo. Sin embargo, no se lograron observar lesiones macroscópicas significativas (datos no mostrados).

Al analizar el infiltrado de MC y su estado de degranulación en los ratones sometidos al protocolo de sensibilización, se evidenció un aumento significativo en la cantidad total de MC, tanto intactos como degranulados, en los ratones DA en comparación con los ratones N (Fig. 28 a y c). Este hallazgo sugiere la presencia de una respuesta alérgica en la piel de los ratones sensibilizados. Además, se observó un incremento significativo en el grado de infiltración de eosinófilos en los ratones DA en comparación con los N (Fig. 28 b y d).

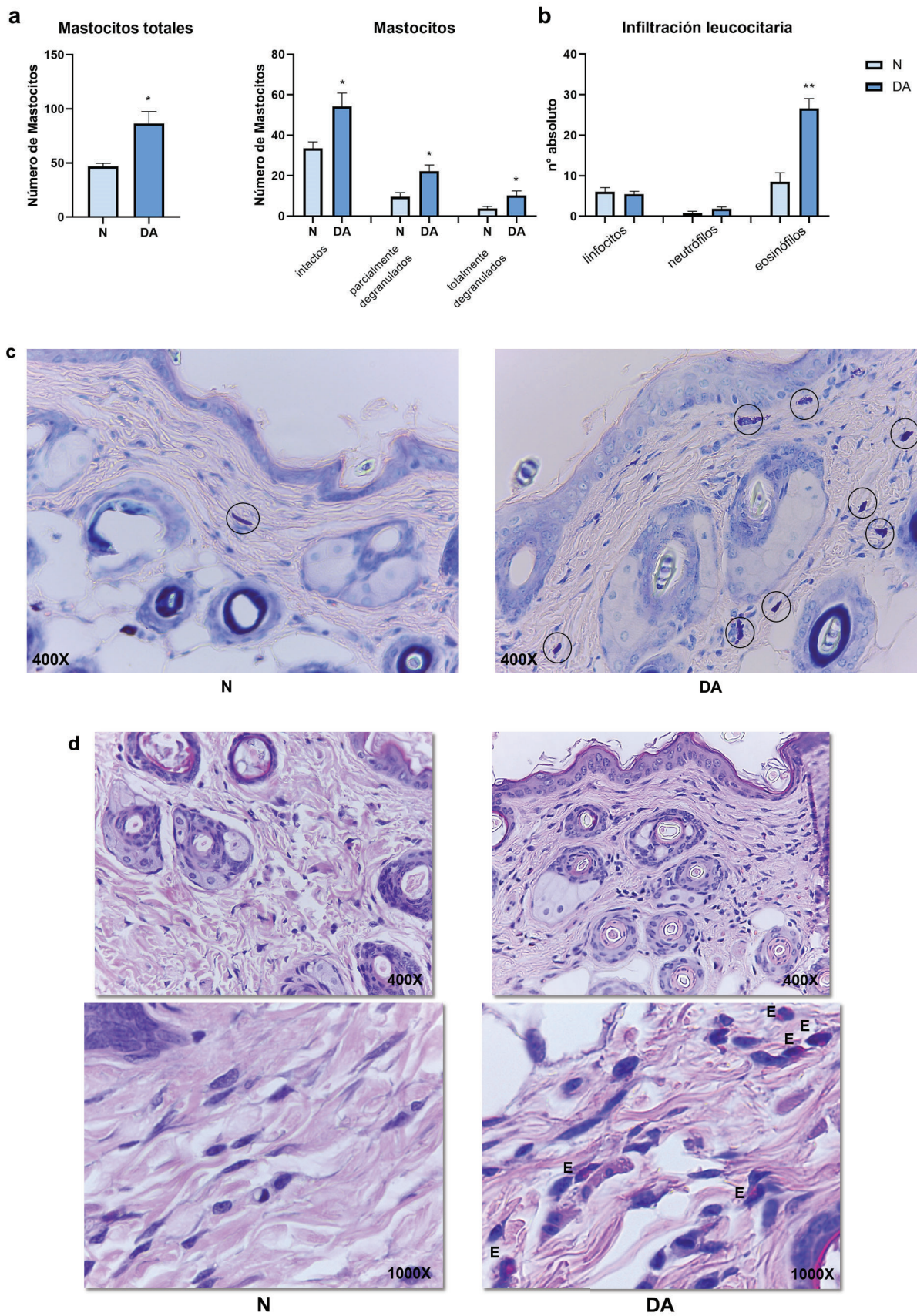


Figura 28. a) Nivel de infiltración de mastocitos (MC) totales y en diferentes estados de degranulación en ratones sensibilizados (DA) vs ratones naive (N). El recuento de MC se llevó a cabo mediante la cuantificación de 10 campos

aleatorios en cada muestra. b) Infiltrado de leucocitos en ratones sensibilizados (DA) vs ratones naive (N). El recuento se llevó a cabo mediante la cuantificación de linfocitos, neutrófilos y eosinófilos en 10 campos aleatorios en cada muestra. c) Imagen representativa de la infiltración de MC en un corte histológico de un ratón N a la izquierda y DA a la derecha (aumento original de 400X). Se utilizó la tinción de Giemsa, la cual permite identificar los MC en los campos por su color púrpura intenso. Se observa la presencia de MC indicados con círculos negros. d) Imagen representativa de infiltración de eosinófilos (E) en un corte histológico teñido con Hematoxilina-Eosina de un ratón DA vs un N (aumento original de 400X arriba y 1000X abajo). Los datos se representan como la media \pm error estándar (SEM). Análisis estadístico: t-test. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Al evaluar el grosor de la epidermis y del estrato córneo, se detectó un aumento en ambos parámetros en los ratones DA en comparación con los ratones N (Fig. 29 a, b y c).

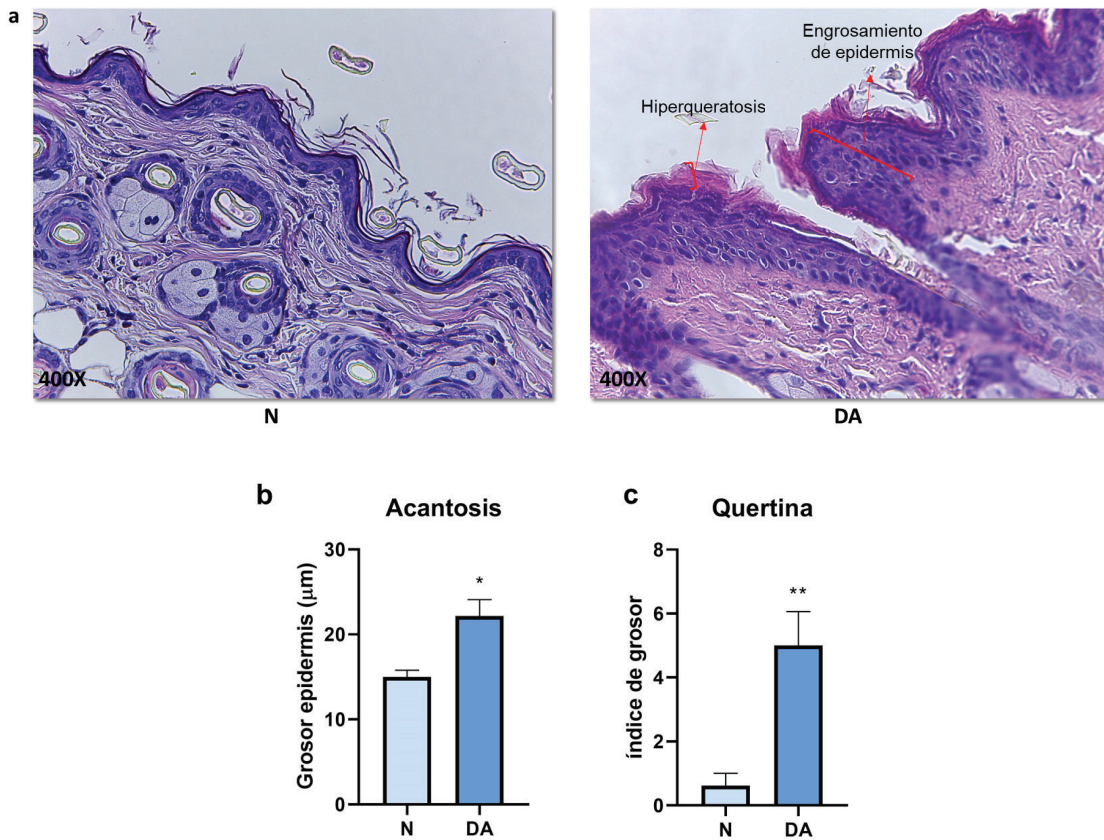


Figura 29. Nivel de engrosamiento de la epidermis (acantosis) y del estrato córneo (capa de queratina) en ratones DA vs N. a) Se muestra una imagen representativa de un ratón naive (N) y de uno sensibilizado (DA). La toma de imágenes se efectuó mediante el software Leica Application Suite (LAS4) del microscopio. b) El engrosamiento de la epidermis (acantosis) se determinó midiendo con el programa ImageJ el espesor de la misma con una magnificación de 400X en al menos 12 campos por ratón, por grupo experimental. c) El engrosamiento de la capa de queratina se determinó en al menos 10 campos por ratón, por grupo experimental, mediante un índice de grosor previamente establecido. Los datos se representan como la media \pm error estándar (SEM). Análisis estadístico: t-test. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.2.3.3 Frotis de sangre

Al evaluar los frotis de sangre de los ratones DA, no se observaron diferencias en el porcentaje de linfocitos, neutrófilos o eosinófilos con respecto a los ratones N (Fig. 30).

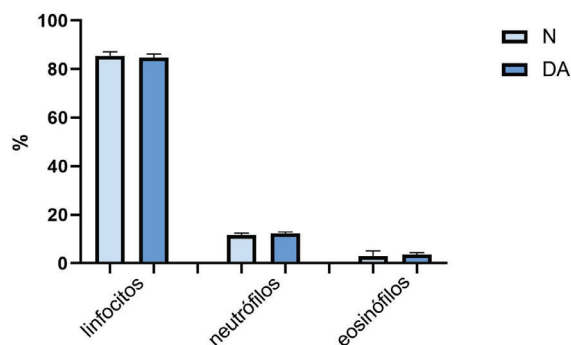


Figura 30. Porcentaje de linfocitos, neutrófilos y eosinófilos en el frotis de sangre de ratones sensibilizados con el protocolo (DA) vs ratones naïve (N). Los frotis fueron teñidos con Tinción 15 (versión modificada del Wright-Giemsa). El recuento de porcentaje de leucocitos se llevó a cabo mediante la cuantificación de 100 células leucocitarias en cada muestra. Los datos se representan como la media \pm error estándar (SEM). Análisis estadístico: t-test.

4.2.3.4 Respuesta Celular: Perfil de Citoquinas T_H1 y T_H2

La estimulación *ex vivo* con OVA de células de ganglio de ratones DA resultó en niveles significativamente incrementados de IL-4 con respecto a los ratones N. No se detectaron diferencias en la secreción de IL-5 ni tampoco en los niveles de IFN- γ (Fig. 31).

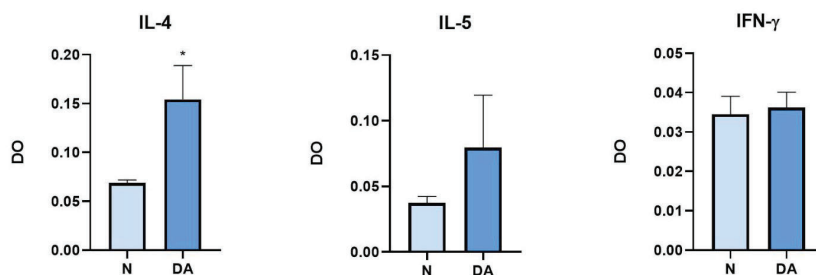


Figura 31. Perfil de respuesta T_H1/T_H2 . Se extrajeron los ganglios de los ratones sensibilizados (DA) y naïve (N) y se realizaron cultivos *ex vivo*, empleando OVA como estímulo. Se colectaron los sobrenadantes y se midieron los niveles de citoquinas específicas para OVA mediante el ensayo de ELISA. Los datos se representan como la media \pm error estándar (SEM). Análisis estadístico: t-test. * $p=0,05$.

4.2.4 Comparación de los tres protocolos desarrollados

Con el objetivo de facilitar la comprensión de las distintas metodologías empleadas en cada protocolo y de los resultados obtenidos en relación con los parámetros analizados para determinar el establecimiento de la dermatitis atópica buscada, se presentan los datos de manera detallada en la Tabla 1.

Tabla 1. Comparación entre los tres protocolos de dermatitis atópica y sus respectivos resultados.

		Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3
Intraperitoneal con OVA (100 µg) + Aluminio (2 mg)		Sí	Sí	Sí
Subcutánea con OVA (50 µg)		Sí	Sí	Sí
Dosis en parches con OVA		150 µg/100 µl	250 µg/100 µl	250 µg/100 µl
Número de dosis con parches		12	10	12
Dosis Calcipotriol		-	10 mg	10 mg
Número de dosis con Calcipotriol		-	5	1
Anticuerpos en suero	IgE	↑ en DA vs N	↑ en DA vs N	↑ en DA vs N
	IgG1 vs IgG2a	> IgG1 vs IgG2a en los DA; ↑ ambos Abs en DA vs N	> IgG1 vs IgG2a en los DA; ↑ ambos Abs en DA vs N	Sin diferencias significativas IgG1 vs IgG2a en los DA; ↑ ambos Abs en DA vs N
Histología	Mastocitos	Mastocitos degranulados ↑ DA vs N	Sin diferencias significativas entre DA y N	↑ mastocitos totales, intactos y degranulados en DA vs N
	Infiltración leucocitaria	Eosinófilos ↑ en DA vs N	Eosinófilos ↑ en DA vs N	Eosinófilos ↑ en DA vs N
	Grosor de epidermis y capa de queratina	Epidermis y capa de queratina ↑	Epidermis: ↑ en DA vs N; Capa de queratina: sin diferencias significativas	Epidermis y capa de queratina ↑
Lesiones		No	Solo en los primeros días	Sin lesiones severas; Piel escamada y apergaminada
Frotis de sangre		% eosinófilos ↑ en DA vs N	-	Sin diferencias significativas entre DA y N en % de eosinófilos, neutrófilos o linfocitos
Citoquinas	IL-4	Sin diferencias significativas entre DA y N	↑ en DA vs N	↑ en DA vs N
	IL-5	Sin diferencias significativas entre DA y N	Sin diferencias significativas entre DA y N	Sin diferencias significativas entre DA y N
	IFN-γ	Sin diferencias significativas entre DA y N	Sin diferencias significativas entre DA y N	Sin diferencias significativas entre DA y N

4.3 Estudio del TLA como tratamiento de la dermatitis atópica

A fin de evaluar si la administración de TLA era capaz de modular el desarrollo de la dermatitis, durante la implementación de los protocolos 2 y 3, se incorporó un grupo experimental adicional en el cual se administró el TLA por vía intradérmica durante la sensibilización alérgica. El TLA utilizado fue el obtenido a partir de los taquizoitos cultivados *in vitro* y su aplicación fue diferente entre los dos protocolos. En el protocolo 2 la aplicación se efectuó en los últimos días del desafío por vía epicutánea (Fig. 32a) y en el tercer protocolo en los días intermedios (Fig. 32b).

Con el propósito de estudiar su impacto sobre la patología dérmica, se evaluaron los mismos parámetros mencionados previamente, es decir, la presencia de anticuerpos alérgeno-específicos, las lesiones cutáneas, los parámetros histopatológicos y el nivel de secreción de citoquinas de los ganglios drenantes, .

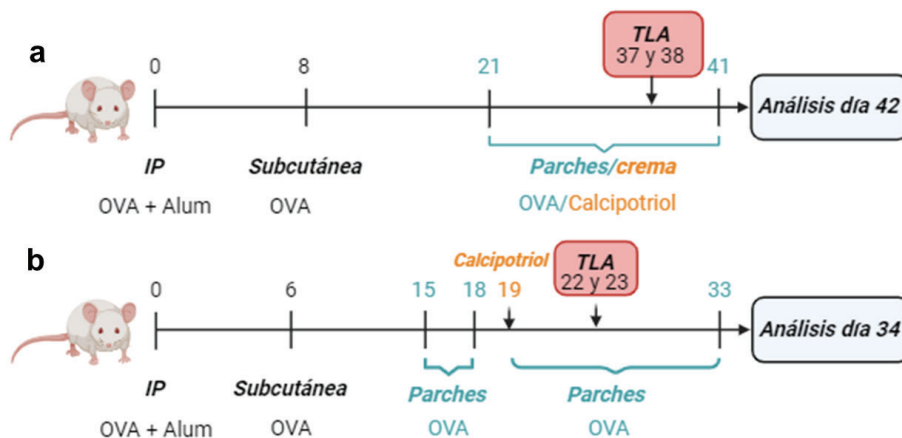


Figura 32. a) Administración in vivo de TLA en el segundo protocolo experimental de dermatitis atópica. b) Administración in vivo de TLA en el tercer protocolo experimental de dermatitis atópica.

Tabla 2. Grupos experimentales.

	intraperitoneal	subcutánea	sensibilización epicutánea	intradérmica
N	PBS	PBS	PBS	PBS
DA	OVA + Alum	OVA	OVA+Calcipotriol	PBS
TDA	OVA + Alum	OVA	OVA+Calcipotriol	TLA

4.3.1 Anticuerpos en suero

Al evaluar los niveles de anticuerpos alérgeno-específicos IgE, IgG1 e IgG2a no se observaron diferencias significativas entre el grupo TDA vs el DA con ninguno de los dos protocolos de sensibilización (Fig. 33). Interesantemente, al utilizar el segundo protocolo, los niveles de IgE de los ratones TDA, a diferencia de los DA, no mostraron diferencias significativas en comparación con los ratones N. Asimismo, el nivel de IgG2a en los ratones del grupo TDA, aunque como recién mencionamos no aumenta respecto del DA, sí resultó significativamente incrementado respecto de los ratones N.

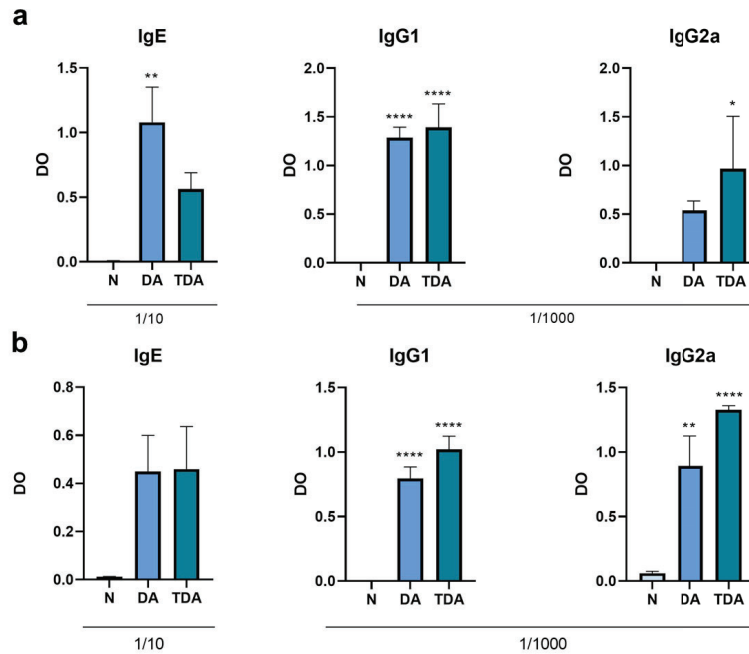


Figura 33. Presencia de anticuerpos séricos alérgeno-específicos de tipo IgE, IgG2a e IgG1 en los ratones sensibilizados (DA), sensibilizados y tratados con TLA (TDA) y ratones naive (N). Se extrajo sangre de los ratones por punción cardíaca, se obtuvo el suero y se midieron niveles de anticuerpos específicos para OVA mediante el ensayo de ELISA. a) Ratones sensibilizados con protocolo 2. Dilución de suero: 1/10 para IgE; 1/1000 para IgG1 e IgG2a. b) Ratones sensibilizados con protocolo 3. Dilución de suero: 1/10 para IgE; 1/1000 para IgG1 e IgG2a. Los datos se representan como la media \pm error estándar (SEM). Análisis estadístico: ANOVA con el método de Sidak como post test. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$. Se compara con el N.

4.3.2 Histopatología

No se observaron diferencias significativas en el infiltrado de mastocitos (MC) entre DA y TDA en ninguno de los dos protocolos utilizados. Sin embargo, cuando se utilizó el tercer protocolo de sensibilización alérgica se observó un aumento significativo de los MC intactos y degranulados (parcial y totalmente) en el grupo TDA vs el N (Fig. 34).

En relación al infiltrado leucocitario, se encontraron diferencias significativas en el nivel de neutrófilos, el cual aumentó significativamente en el TDA vs el DA, en ambos protocolos. Interesantemente en el segundo protocolo, en correlación con lo observado para la IgE, el infiltrado eosinofílico del TDA, a diferencia del DA, no resultó significativamente diferente del N (Fig. 34).

En la figura 35 se muestran imágenes representativas de la infiltración de neutrófilos y eosinófilos en los cortes histológicos del grupo TDA, en ambos protocolos de sensibilización.

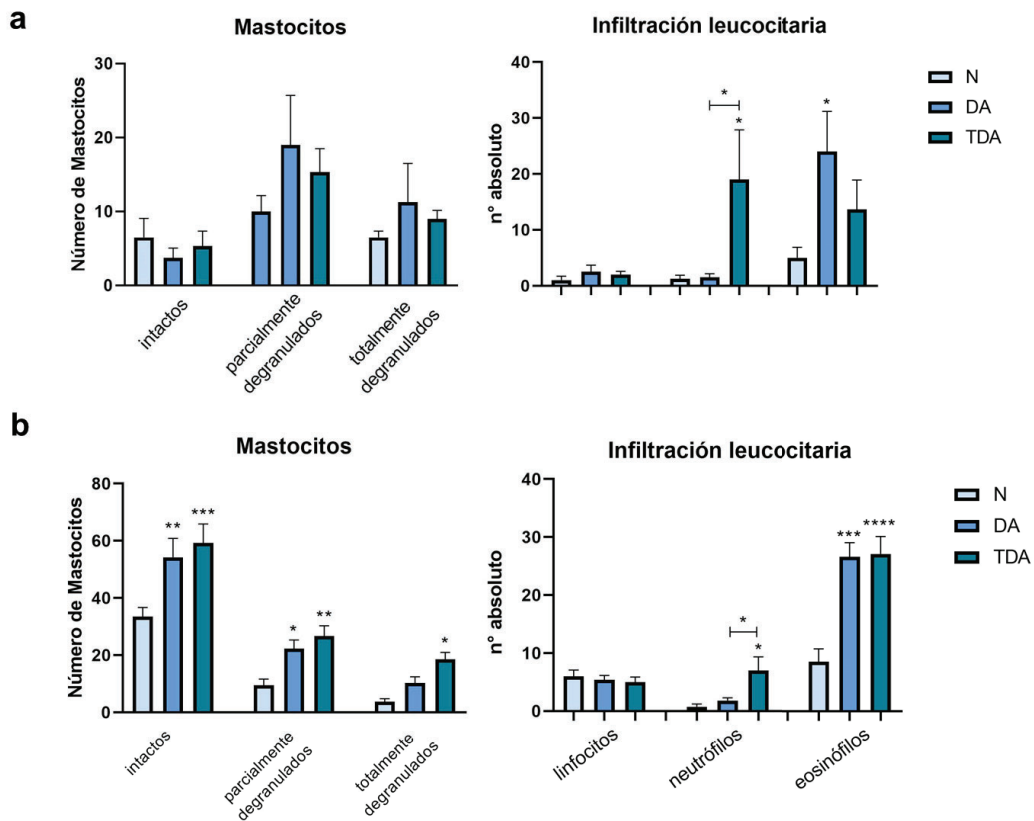


Figura 34. Nivel de infiltración de mastocitos (MC) en sus diferentes estados de degranulación y de leucocitos en ratones sensibilizados (DA), sensibilizados y tratados con TLA (TDA) y naïve (N). El recuento de MC se llevó a cabo mediante la cuantificación de 10 campos aleatorios en cada muestra. El recuento de infiltrado de leucocitos se llevó a cabo mediante la cuantificación de linfocitos, neutrófilos y eosinófilos en 10 campos aleatorios en cada muestra. a) Ratones sensibilizados con el protocolo 2. b) Ratones sensibilizados con el protocolo 3. Los datos se representan como la media \pm error estándar (SEM). Análisis estadístico: ANOVA con el método de Sidak como post test. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Se compara con el N.

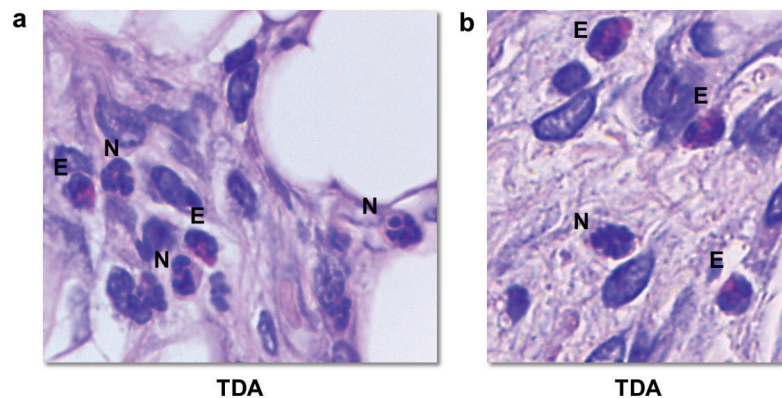


Figura 35. Imágenes representativas de infiltración de eosinófilos (E) y neutrófilos (N) en cortes histológicos de ratones TDA (aumento original de 1000X). Tinción realizada con Hematoxilina-Eosina. a) Ratones sensibilizados con el protocolo 2. b) Ratones sensibilizados con el protocolo 3.

En cuanto al grosor de la epidermis, con el segundo protocolo no se observó una diferencia significativa entre los ratones TDA vs los DA (Fig. 36a). Con el tercer protocolo de sensibilización se detectó un aumento significativo entre ambos grupos experimentales (Fig. 36b). Por otro lado, el tratamiento con TLA no modificó el grosor de la capa de queratina respecto del grupo DA en ninguno de los dos protocolos (Fig. 36 a y b).

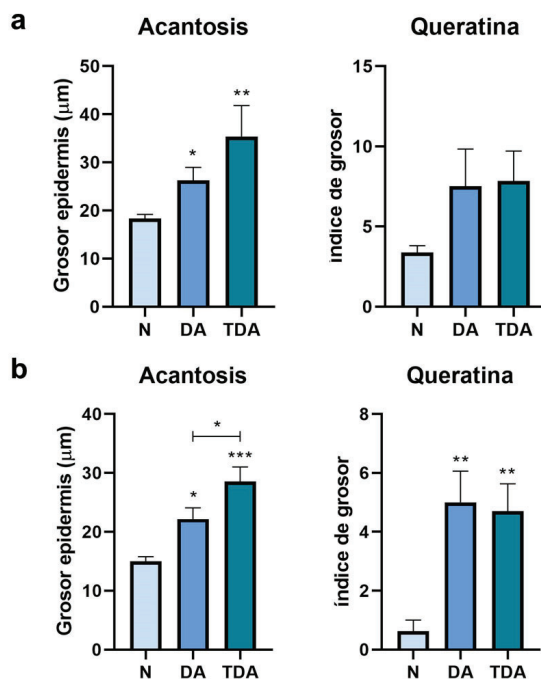


Figura 36. Nivel de engrosamiento de la epidermis (acantosis) y del estrato córneo (capa de queratina). El engrosamiento de la epidermis (acantosis) se determinó midiendo con el programa ImageJ el espesor de la misma con una magnificación de 400X en al menos 12 campos por ratón, por grupo experimental. El engrosamiento de la capa de queratina se determinó en al menos 10 campos por ratón, por grupo experimental, mediante un índice de grosor previamente establecido. a) Ratones sensibilizados con el protocolo 2. b) Ratones sensibilizados con el protocolo 3. Los datos se representan como la media \pm error estándar (SEM). Análisis estadístico: ANOVA con el método de Sidak como post test. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Se compara con el N.

4.3.3 Frotis de sangre

El análisis de los frotis de sangre se hizo únicamente en el tercer protocolo. No se observaron diferencias en el porcentaje de eosinófilos en la sangre de los ratones TDA vs los DA, sin embargo sí se observó un aumento significativo del porcentaje de neutrófilos en el primer grupo en comparación con el segundo (Fig. 37).

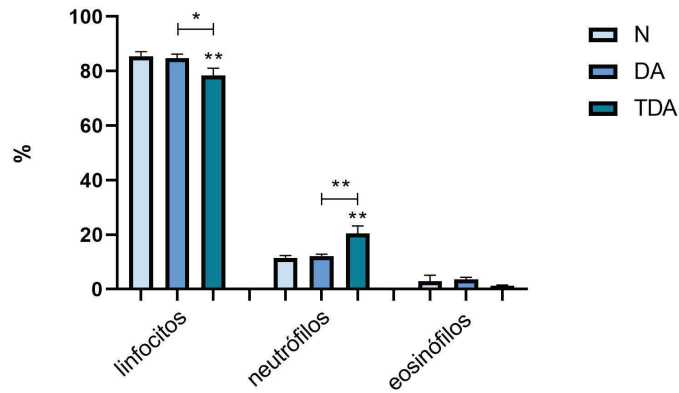


Figura 37. Porcentaje de linfocitos, neutrófilos y eosinófilos en el frotis de sangre de ratones sensibilizados con el protocolo (DA), sensibilizados y tratados con TLA (TDA) y ratones naive (N). Los frotis fueron teñidos con Tinción 15 (versión modificada del Wright-Giemsa). El recuento de porcentaje de leucocitos se llevó a cabo mediante la cuantificación de 100 células leucocitarias en cada muestra. Los datos se representan como la media \pm error estándar (SEM). Análisis estadístico: ANOVA con el método de Sidak como post test. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Se compara con el N.

4.3.4 Respuesta Celular: Perfil de Citoquinas

Al evaluar la respuesta celular por parte de las células en el ganglio drenante, los niveles de secreción de citoquinas de tipo 2 (IL-4 e IL-5) no mostraron diferencias significativas entre los ratones DA vs los TDA en ninguno de los dos protocolos de sensibilización alérgica (Fig. 38 a y b). Tampoco se registraron diferencias en la secreción de la citoquina regulatoria IL-10 en el tercer protocolo de sensibilización, entre los dos grupos experimentales mencionados (Fig. 38b). Sin embargo, se observó un aumento significativo de IFN- γ en el grupo TDA en comparación con el grupo DA con el protocolo 2 de sensibilización (Fig. 38a).

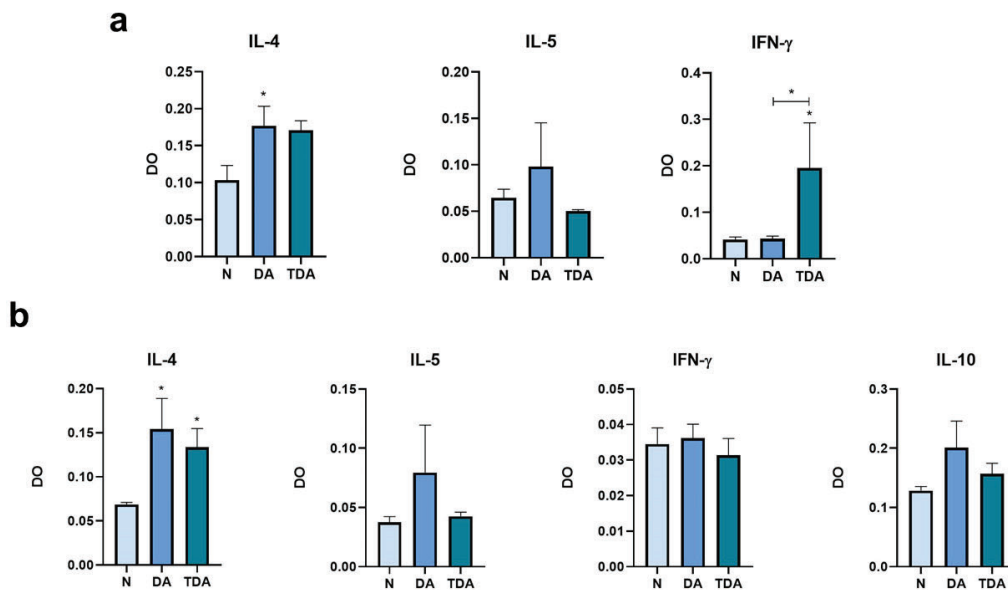


Figura 38. Perfil de respuesta celular. Se extrajeron los ganglios de los ratones sensibilizados (DA), sensibilizados y tratados con TLA (TDA) y naive (N) y se realizaron cultivos ex vivo empleando OVA como estímulo. Se colectaron los

sobrenadantes y se midieron los niveles de citoquinas específicas para OVA mediante el ensayo de ELISA. Los datos se representan como la media \pm error estándar (SEM). Análisis estadístico: ANOVA con el método de Sidak como post test. * $p < 0,05$. Se compara con el N.

5. Discusión

La dermatitis atópica (DA) es una enfermedad crónica recidivante caracterizada por hiperreactividad cutánea, erupción con prurito intenso y epidermis engrosada y apergaminada (eczema), que se observa típicamente en los pliegues de la piel, cara y cuello. Esta patología está orquestada por una fuerte respuesta de tipo 2 que se caracteriza por elevados niveles de IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, citoquinas asociadas tanto con la respuesta inmune adaptativa de células CD4+ T_H2, como con la respuesta innata de células linfoides tipo 2 (ILC2)^{5,11,25}.

El marcado incremento en la incidencia de los desórdenes atópicos en las últimas décadas hizo de su estudio una urgente necesidad. La DA es una de las enfermedades inflamatorias dérmicas más comunes. En Argentina, entre 30% y 40% de los niños menores de 5 años presentan DA superando ampliamente el promedio del resto del mundo^{2,22}.

Datos epidemiológicos permitieron establecer una relación entre la disminución de determinadas infecciones durante la niñez y un aumento de desórdenes alérgicos en países desarrollados. A partir de estos datos, se elaboró la “teoría higiénica” la cual postula que una reducción o alteración a exposiciones microbianas en edades tempranas, causan un desequilibrio en el sistema inmune, predisponiéndolo al desarrollo de desórdenes alérgicos^{23,57}.

En nuestro laboratorio se demostró previamente que la infección crónica con *T. gondii* previa a la sensibilización alérgica bloquea completamente el desarrollo DA⁷¹. En concordancia con nuestros resultados, pero sensibilizando durante la etapa aguda de la infección, Jeong y col. también observaron una disminución de este desorden¹⁰². Estos resultados nos permitieron hipotetizar que moléculas del parásito con propiedades inmunomoduladoras serían responsables de la capacidad del parásito de proteger frente al desarrollo de la DA. Apoyando nuestra hipótesis, otros modelos experimentales han demostrado la capacidad moduladora del TLA *in vivo*. En un modelo de asma experimental, la administración de TLA en conjunto con el alérgeno durante la sensibilización disminuyó la susceptibilidad a desarrollar una inflamación alérgica pulmonar⁹¹. Sumado a esto, el potencial del TLA para reducir las respuestas T_H2 ha sido documentado por Liesenfeld *et al.* en un modelo de infección con *Nippostrongylus brasiliensis* en ratones¹⁰³.

El hecho de poder estudiar si los extractos/antígenos derivados del parásito pueden emular los beneficios de la infección sobre las respuestas alérgicas es prometedor para el desarrollo de nuevas terapias.

Con estos antecedentes, nos propusimos estudiar en un modelo murino de DA la capacidad de los antígenos totales de *T. gondii* (TLA) de modular el desarrollo de esta patología dérmica.

Trabajos previos han demostrado que el agregado de TLA *in vitro* sobre esplenocitos de ratones *naive* estimula la producción de citoquinas proinflamatorias (IL-6, IFN- γ y TNF- α) y anti-inflamatorias

(IL-10)⁹¹. Sumado a esto, Wagner *et al.* también demostraron que extractos de ooquistes de *T. gondii* (OLA) indujeron un aumento de citoquinas inmunomoduladoras (IL-6, IFN- γ e IL-10) en esplenocitos y en células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDCs), provenientes de ratones *naïve*. También, en las BMDCs cultivadas con OLA, se detectó un aumento de los niveles de CD40, CD80, CD86 y MHC-II⁸⁸. Paralelamente, se vió que el co-tratamiento de una línea celular mielomonocítica humana con LPS y TLA indujo un aumento de la citoquina regulatoria IL-10⁸⁹.

Dado que hasta el momento no se había evaluado el efecto *in vitro* del TLA sobre células provenientes de ratones alérgicos, se comenzó este trabajo estudiando el efecto del TLA sobre una respuesta efectora de tipo 2. En paralelo a la puesta a punto del protocolo de dermatitis, se decidió avanzar con este objetivo utilizando ratones sometidos previamente a un protocolo de asma experimental, que emplea OVA como alérgeno. Los elevados niveles de IgE e IgG1 alérgeno-específicos en los ratones sensibilizados confirmaron el estado alérgico, permitiendo continuar con el resto del estudio al haber establecido la respuesta de tipo 2.

Primero se comenzó evaluando el TLA derivado de los taquizoitos de *T. gondii* sobre células de ganglio torácico y bazo de los ratones alérgicos.

Al analizar el perfil de citoquinas liberadas por las células del ganglio torácico, se observó un aumento significativo de IL-4 e IL-5 en las células estimuladas con OVA en comparación con las células no estimuladas, lo que demuestra una respuesta alérgica. Sin embargo, la estimulación con TLA junto con OVA no produjo cambios en los niveles de las citoquinas evaluadas en comparación con las células estimuladas sólo con OVA, independientemente de la concentración de TLA utilizada (0,75 y 1,5 $\mu\text{g}/\text{well}$).

Por otro lado, la falta de respuesta celular observada en células estimuladas únicamente con TLA (sin OVA) indica que la estimulación sólo con el TLA no disparó la respuesta T. Estos hallazgos contradicen con los resultados reportados por Drinić *et al.*⁹¹, en relación a la falta de secreción de IFN- γ en respuesta al TLA. Sin embargo hay que tener en cuenta que a diferencia de nuestro trabajo el estudio mencionado se llevó a cabo con esplenocitos de ratones *naïve*.

La ausencia de modulación de la respuesta T_H2 entre el grupo estimulado con OVA y el OVA+TLA, puede interpretarse de diferentes formas: i) el TLA no ejerce un efecto inmunomodulador *in vitro*, lo cual no era lo esperado teniendo en cuenta los antecedentes reportados⁸⁹⁻⁹¹; ii) la dosis utilizada no es la adecuada para observar diferencias; iii) es resultado del protocolo *in vitro* utilizado.

En el caso de las células del bazo, llamativamente, se observó un incremento de los niveles tanto de citoquinas T_H2 como de citoquinas T_H1 en las células estimuladas con ConA+TLA respecto de las estimuladas sólo con ConA. El aumento de los niveles de IFN- γ fue esperable dado los trabajos previos que muestran la asociación de *T. gondii* con la modulación de la respuesta inmune mediante la inducción de una respuesta de tipo 1^{79,80} y los estudios, mencionados anteriormente^{88,91}, que muestran que el TLA *in*

vitro también induce la producción de citoquinas de tipo 1, como IFN- γ . Sin embargo, el incremento de IL-4 e IL-5 fue inesperado teniendo en cuenta las publicaciones previas en donde la administración del TLA *in vivo* disminuyó una respuesta alérgica pulmonar⁹¹.

Se evaluó también la capacidad moduladora del TLA derivado de quistes extraídos del cerebro de ratones crónicamente infectados con *T. gondii* (TLAQ). Tanto en las células del ganglio torácico como en las del bazo, la adición de TLAQ no moduló la secreción de las citoquinas IL-4, IL-5 e IFN- γ dado que no se observaron diferencias entre las células OVA/ConA + TLAQ y las estimuladas únicamente con OVA/ConA.

Debido a que no se observó una disminución de la respuesta alérgica con la adición del TLA bajo las condiciones experimentales ensayadas, se planteó la posibilidad de que la interacción de los antígenos del parásito con las células inmunes pudiera estar siendo interferida por la OVA/ConA, la cual se estaba aplicando en conjunto con el TLA. Sumado a esto, también puede haber influido en la respuesta el hecho de que la relación entre la concentración de OVA (40 $\mu\text{g}/\text{well}$) y de TLA (0,75/1,5 $\mu\text{g}/\text{well}$) con la que se estimuló a las células era muy alta. Debido a ello, se decidió añadir el TLA en una concentración mayor (10 $\mu\text{g}/\text{well}$) y una hora antes de la estimulación con OVA/ConA. Esto último se decidió en base a que se quería observar si el TLA podría ejercer un efecto sobre las células presentadoras (APCs) o directamente sobre las células T previo a que las mismas sean estimuladas con OVA/ConA.

Cuando las células se incubaron con el TLAQ, una hora antes de la estimulación con ConA y con una mayor dosis, tanto las células del ganglio como en las células del bazo mostraron una reducción significativa en la secreción de IL-4. Estos resultados sugieren un posible efecto modulador *in vitro* sobre la respuesta alérgica por parte del TLAQ. Dado que el TLAQ, a diferencia del procedente de los taquizoitos, podría contener proteínas provenientes del cerebro del cual se obtienen los quistes, que podrían interferir en la respuesta frente al alérgeno o la modulación por el TLA, para concluir que el TLAQ está efectivamente influyendo sobre la respuesta de tipo 2, sería necesario un control adicional. Este control debería consistir en cerebros de ratones *naive* tratados con la misma metodología de purificación y obtención del TLAQ que para los cerebros de los ratones infectados, de manera de corroborar que la posible modulación del TLA sea por parte de proteínas del parásito en sí y no por componentes proteicos del cerebro que quedaron remanentes.

Llamativamente, la disminución en la secreción de IL-4 con el agregado de TLAQ sólo se observó para el caso de la estimulación con ConA y no así en el caso de la estimulación con OVA. Una posible explicación a la disminución de la respuesta observada con el agregado de ConA+TLAQ podría ser que el TLAQ efectivamente esté modulando la respuesta de tipo 2 y este efecto se logra visualizar únicamente cuando la respuesta celular es más fuerte, es decir, cuando se estimula con un mitógeno como lo es la ConA. Es por esto último que esta disminución de IL-4 no logró detectarse en el caso de las células estimuladas con OVA. Paralelamente, cabe destacar que esta modulación únicamente se observó cuando

el TLAQ se aplicó una hora antes que la ConA pero no así cuando se estimuló con el TLA en conjunto con la ConA. En base a esto, hipotetizamos que el TLA podría estar influyendo en la respuesta celular al interactuar con las células presentadoras y/o los linfocitos T que se encontraban en un contexto de tipo 2.

Por otro lado, dado que el posible efecto del TLA se observó cuando el mismo se colocó una hora previa a la estimulación con OVA/ConA, como se mencionó recientemente, y esa condición fue únicamente estudiada con los antígenos provenientes de los quistes, sería necesario hacer nuevos experimentos en donde se estimule una hora antes (o más) pero con el TLA proveniente de los taquizoitos el cual tiene una pureza mayor.

Los resultados diferenciales entre el TLA proveniente de los taquizoitos y el proveniente de los quistes obtenidos en los esplenocitos estimulados con ConA, da un indicio de que los antígenos constituyentes de cada tipo de TLA podrían generar respuestas diferentes. Los taquizoitos y los bradizoitos (contenidos en los quistes) son dos estadios del parásito que no solo difieren morfológicamente sino también a nivel molecular¹⁰⁴. Se han identificado antígenos de superficie (SAGs) que son específicos del estadio del parásito así como también enzimas, proteínas de choque térmico (Heat Shock Proteins, HSP)^{104,105} y proteínas asociadas a membranas que son excretadas a la membrana de la vacuola parasitófora, en el caso de los taquizoitos, o hacia la pared de los quistes, en el caso de los bradizoitos¹⁰⁵. En nuestro caso, dado que luego de la sonicación tanto de los taquizoitos como de los quistes nos quedamos con el sobrenadante, en nuestro extracto de antígenos sólo habrán proteínas solubles. Consecuentemente, los antígenos de superficie y aquellos asociados a membrana que son diferenciales entre los dos estadios del parásito no se encontrarán en el TLA con el que se trabajó, por lo que no serán de nuestro interés. Esto indica que la diferencia entre la respuesta ejercida por ambos tipos de TLA podría haber sido a causa de algún tipo de enzima o proteína soluble particular.

Adicionalmente, en este último experimento se midió, aparte de las citoquinas de tipo 1 y tipo 2, la secreción de la citoquina regulatoria IL-10. Esta citoquina regulatoria se evaluó ya que, como se mencionó previamente, se demostró que la infección con *T. gondii* modula las respuestas alérgicas no solo por el desvío de la respuesta hacia un perfil de tipo 1⁸⁵ sino también por la actividad de células supresoras^{85,86}. En este sentido, antecedentes comprobaron que la infección con este parásito estimula la producción de citoquinas anti-inflamatorias como IL-10⁸¹. Sumado a esto, también se demostró que la aplicación de TLA y de OLA *in vitro* sobre esplenocitos de ratones *naive* indujeron un aumento de IL-10^{88,91}. Sin embargo, en los experimentos *in vitro* detallados previamente no se observaron cambios en la secreción de IL-10 entre las células estimuladas con OVA/ConA + TLA vs las estimuladas únicamente con OVA/ConA, tanto en las células del ganglio como en las del bazo. Esto indica que esta citoquina no mostró estar implicada en la modulación *in vitro* de la respuesta de tipo 2, al menos en las condiciones ensayadas. En línea con estos resultados, en nuestro laboratorio se demostró que la capacidad de *T. gondii* de prevenir el desarrollo de una inflamación alérgica pulmonar fue independiente de IL-10⁸⁶.

En la segunda parte de este trabajo, se prosiguió con la evaluación del efecto *in vivo* del TLA sobre la DA.

Dado el elevado número de personas que sufren de dermatitis, junto con el continuo incremento en su incidencia, es evidente la necesidad de desarrollar un modelo de investigación apropiado. Este modelo es fundamental para entender los mecanismos inmunológicos implicados en el origen de la patología, además de facilitar el desarrollo y evaluación de nuevos tratamientos. Debido a esto, se buscó desarrollar un nuevo protocolo de DA que reproduzca la histopatología, respuesta humoral y sintomatología observada en pacientes alérgicos. Para ello, se llevaron a cabo tres protocolos de sensibilización diferentes.

El primer protocolo de DA desarrollado fue una modificación de un protocolo previamente descrito por Rie Yatsuzuka y col⁹⁸. Se efectuó la misma metodología de sensibilización pero sin la aplicación de la toxina Pertussis. Con este protocolo, se logró generar una respuesta alérgica demostrada por la presencia de anticuerpos IgE alérgeno-específicos en el suero de los ratones sensibilizados, y mayores niveles de IgG1 vs IgG2a. A su vez, se observaron cambios histopatológicos similares a los presentes en pacientes con DA que incluyeron un aumento del grosor de la epidermis y del estrato córneo junto con un incremento en el infiltrado de mastocitos y de eosinófilos en los ratones DA vs los N. Aun así, no se logró observar una respuesta celular de producción de citoquinas de tipo T_H2 (IL-4 e IL-5) significativa en respuesta a la estimulación *ex vivo* con OVA, ni se lograron obtener lesiones macroscópicas en la piel de los ratones.

En el segundo protocolo, en búsqueda de una respuesta alérgica más significativa, se decidió aumentar la concentración del alérgeno y alternar la exposición del mismo con Calcipotriol, un análogo de la vitamina D que induce la expresión de TSLP en queratinocitos epidérmicos⁷² y que es utilizado para inducir DA en ratones. En este caso, a diferencia del primer protocolo, sí se obtuvieron niveles incrementados de IL-4 en los ratones DA vs los N y se lograron visualizar lesiones macroscópicas en la piel de los ratones aunque únicamente en los primeros días. Sin embargo, no se observaron diferencias en cuanto al nivel de mastocitos infiltrados en la piel, obteniendo a su vez menor engrosamiento de la epidermis y estrato córneo.

Con el objetivo de seguir mejorando la intensidad de la respuesta alérgica específica contra el alérgeno y lograr generar lesiones macroscópicas características de la DA se llevó adelante un último protocolo de dermatitis. Este tercer protocolo consistió en la misma sensibilización sistémica y desafío subcutáneo con el alérgeno que los protocolos anteriores, sumado a un desafío epicutáneo con el mismo número de dosis del OVA que en el primer protocolo pero con la mayor concentración, utilizada en el segundo protocolo. A su vez se disminuyó la exposición a Calcipotriol con respecto al segundo protocolo. Esta decisión se tomó en base a la suposición de que la menor manifestación de los parámetros

histopatológicos en el grupo DA en el segundo protocolo podría deberse a: i) la disminución en el número de dosis de OVA en comparación con el primer protocolo; ii) la discontinuidad en la exposición al alérgeno; iii) el cambio en los apósitos hidrocoloides utilizados en el segundo protocolo, los cuales es posible que hayan afectado la adherencia de los parches con OVA al dorso de los ratones.

Con las modificaciones mencionadas, en el tercer protocolo se obtuvo una respuesta celular de citoquinas con aumento de IL-4 y con infiltración de eosinófilos y de mastocitos en estado degranulado en los cortes histológicos. Aún así, aunque no se observaron las lesiones macroscópicas esperadas, sí se visualizó que la piel de los ratones DA presentaba eritema, sequedad/descamación y zonas apergaminadas, características de la DA (datos no mostrados).

En conclusión, se logró generar la respuesta alérgica y los parámetros histopatológicos que definen a la patología dérmica pero no se lograron obtener lesiones macroscópicas severas en la piel de los ratones. En el protocolo original mencionado, a partir del cual derivó el desarrollado en este trabajo, sí hubo aumento en el nivel de eritema, edema, exoriación y sequedad/descamación⁹⁸. Estas diferencias podrían ser consecuencia del agregado de la toxina Pertussis en la sensibilización por vía intraperitoneal, dado que el resto del protocolo se efectuó de forma idéntica, a excepción de la menor concentración de OVA en los parches en el primer protocolo. La toxina mencionada se ha observado que es un potente adyuvante, induciendo asma y sensibilización alérgica en modelos animales de enfermedades humanas¹⁰⁶.

En otro protocolo establecido de DA, desarrollado por Ham WK *et al.*, la sensibilización se realizó por vía intraperitoneal (*i.p*) tres veces, con intervalos de una semana entre cada aplicación. Una semana después de la última *i.p* aplicada se aplicaron dos ciclos de una semana con parches con OVA, con una semana de intervalo entre cada ciclo. Se lograron observar lesiones macroscópicas caracterizadas por engrosamiento de la epidermis, espongirosis e infiltración celular en la piel junto con una severa inflamación con edema y eritema¹⁰⁷. En este caso, la diferencia con el protocolo utilizado en este trabajo fue, en nuestro caso, el menor número de dosis de OVA por vía *i.p* sumado a que no hubo una semana de descanso durante la sensibilización epicutánea con los parches con OVA.

El último objetivo de este trabajo, consistió en evaluar el efecto modulador del TLA *in vivo* en un modelo murino de DA. Esto se efectuó utilizando el segundo y tercer protocolo de DA, con la diferencia de que en el segundo protocolo el TLA se aplicó en los últimos días de la sensibilización epicutánea mientras que en el tercer protocolo el mismo se aplicó en los días intermedios de la sensibilización.

En cuanto al nivel de anticuerpos alérgeno-específicos en el suero de los ratones, no hubieron diferencias significativas entre el grupo TDA y el DA. Sin embargo, cabe remarcar que al utilizar el segundo protocolo, los niveles de IgE de los ratones TDA, a diferencia del DA, no mostraron diferencias significativas en comparación con los ratones N. Asimismo, el nivel de IgG2a en los ratones del grupo TDA, aunque no aumenta respecto del DA, sí resultó significativamente incrementado respecto de los ratones

N. Dado que IgG2a es un anticuerpo de tipo 1 esto sugeriría un posible desvío, por parte del TLA, de la respuesta de tipo 2 hacia un perfil de tipo 1.

En cuanto a la presencia de mastocitos, no se observó una disminución de la misma en el grupo TDA vs el DA. En relación al infiltrado leucocitario, en ambos protocolos de tratamiento se observó un aumento significativo del nivel de neutrófilos infiltrados en la piel lo cual puede deberse a que los antígenos aplicados podrían estar generando una respuesta inflamatoria. Esto correlaciona con lo observado en el frotis de sangre del grupo TDA sensibilizado con el protocolo 3, en donde también se detectó un aumento significativo del porcentaje de neutrófilos comparando con los ratones DA. En relación al nivel de infiltración de eosinófilos, no se observó una disminución significativa en los animales TDA respecto de los DA, sin embargo, es importante destacar que cuando se sensibilizó con el segundo protocolo, los niveles de eosinófilos del grupo TDA no se diferenciaron significativamente del grupo N.

Al evaluar el nivel de engrosamiento de la epidermis y de la capa de queratina, se observó un aumento del primer parámetro en el grupo TDA vs el DA cuando los ratones fueron sensibilizados con el tercer protocolo. Este resultado fue contrario a lo esperado e indica que la aplicación del TLA con este tercer protocolo de tratamiento no sólo no mejoró la dermatitis de los ratones con DA sino que hizo que los parámetros evaluados sean iguales o aún más desfavorables.

Paralelamente, en la respuesta de citoquinas se registró un incremento significativo en los niveles de secreción de IFN- γ en los ratones TDA sensibilizados con el segundo protocolo, en comparación con los DA. El resto de las citoquinas evaluadas no presentaron diferencias entre los ratones TDA vs los DA.

Como recién se describió, el TLA aplicado en el tercer protocolo arrojó resultados menos favorables en comparación con su aplicación en el segundo protocolo de sensibilización. Esta discrepancia se evidencia en el mantenimiento o el deterioro de los parámetros analizados, como lo fue el nivel de engrosamiento de la epidermis, en el tercer protocolo. En cambio, en el segundo protocolo, pese a no haber presentado diferencias significativas entre el grupo TDA y DA en relación al engrosamiento de epidermis y capa de queratina, los niveles de IgE y el infiltrado de eosinófilos en la piel, estos últimos dos parámetros no resultaron significativamente diferentes de los ratones N. Esta leve modulación de la respuesta de tipo T_H2 puede haber estado influenciada por el mencionado aumento en los niveles de la citoquina de tipo T_H1 (IFN- γ) en los ratones TDA vs los DA, incremento que no se detectó en los ratones TDA del tercer protocolo. En este sentido, el aumento significativo de IgG2a detectado en los animales TDA respecto del grupo N, en el segundo protocolo, refuerza esta hipótesis.

La diferencia observada entre la respuesta presentada por el TLA aplicado con los dos protocolos de sensibilización puede deberse a: i) la pureza del TLA utilizado, dado que el TLA aplicado en los dos protocolos no provino del mismo stock; ii) el momento en el que se administró el TLA, dado que en el segundo protocolo se aplicó en los últimos días y en el tercer protocolo en los días intermedios; iii) las variaciones en los protocolos de DA. En cuanto al momento de aplicación del TLA, se obtuvo un resultado

contrario al esperado ya que con lo observado durante el segundo protocolo, en donde el TLA se aplicó en los días finales de la sensibilización, se había hipotetizado que si el TLA se administraba cuando la respuesta alérgica todavía no se había montado de manera tan severa, es decir, en días intermedios a la sensibilización, se podría lograr una modulación más eficaz de la respuesta inmune de tipo 2, lo cual no fue lo observado. Cabe remarcar que, a diferencia de nuestro protocolo, en la mayor parte de los trabajos anteriores en los que se evaluó *in vivo* la capacidad moduladora del TLA sobre una inflamación alérgica pulmonar, la aplicación del mismo se llevó a cabo antes o durante la sensibilización^{88,91,108}.

En resumen:

i) En ninguna de las condiciones experimentales ensayadas, el TLA fue capaz de modular la respuesta T_H2 alérgeno-específica *in vitro*. Sin embargo, cuando las células se incubaron con el TLA proveniente de quistes, previo a la estimulación con ConA y con una mayor dosis, se detectó una disminución significativa en la secreción de IL-4. Estos resultados sugieren un posible efecto modulador *in vitro* sobre la respuesta alérgica por parte del TLAQ.

ii) Se logró desarrollar un protocolo de dermatitis más corto que el ya establecido en el laboratorio, que reproduce los parámetros histopatológicos de una DA. Estos resultados nos impulsan a seguir trabajando para lograr un protocolo que genere también el desarrollo de lesiones cutáneas macroscópicas.

iii) La administración intradérmica de TLA no indujo cambios significativos en ninguno de los parámetros evaluados entre los grupos TDA y DA. Sin embargo, es importante destacar que el tratamiento con TLA aplicado a los ratones sensibilizados con el segundo protocolo de dermatitis indujo cambios en los niveles de IgE y el infiltrado de eosinófilos en la piel. Estas modificaciones fueron tales que los valores alcanzados no presentaron diferencias significativas en comparación con los ratones *naive*.

Los resultados presentados en este estudio contribuyen, no sólo al desarrollo de mejores modelos para estudiar el desarrollo de una enfermedad alérgica tan compleja como lo es la dermatitis atópica, sino que también aportan a nuestra comprensión de los efectos de los antígenos totales de *T. gondii* sobre el sistema inmunológico en el contexto de la alergia.

6. Materiales y Métodos

6.1 Animales

Se utilizaron ratones de la cepa BALB/c de 6-8 semanas de vida provenientes del Bioterio de la Facultad de Veterinaria de la UBA. Los ratones se mantienen en el Bioterio del CESyMA-ECyT-UNSAM en condiciones de luz, temperatura y humedad controladas. El protocolo experimental ha sido evaluado y aprobado por la CICUAE de la UNSAM (19/2019). Cada grupo experimental (ver abajo) incluyó 4-5 ratones por experimento.

6.2 Mantenimiento del parásito *in vivo*, purificación de quistes de cerebro y obtención de antígenos totales (TLAQ)

Se obtuvieron antígenos totales de quistes de cerebro (TLAQ) de ratones de la cepa C57BL/6 crónicamente infectados. Para ello se utiliza la cepa ME49 de tipo II de baja virulencia. Los pasajes se realizaron por infección vía intragástrica con 25 quistes purificados de cerebros cada 1-2 meses. El tejido cerebral fue homogeneizado y resuspendido en Buffer Fosfato Salino (PBS). Los quistes se purificaron por centrifugación utilizando un gradiente de densidad dextran-PBS 30%. Para la preparación del TLAQ, luego de varios lavados, los pellets se resuspendieron en agua bidestilada y luego se sonicaron hasta su lisis completa. Se agregó 1 volumen de NaCl 0,3 M a la suspensión obtenida y se la centrifugó a 10.000 g, 10 min a 4°C. Se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford.

6.3 Cultivo de taquizoitos *in vitro* y obtención de antígenos totales de *T. gondii* (TLA)

Los antígenos totales de *T. gondii* (TLA), se prepararon a partir de taquizoitos RH mantenidos en cultivos *in vitro*. Los parásitos se mantuvieron en cultivos de células HFF en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% penicilina-estreptomicina a 37°C y 5% CO₂. Luego de la lisis celular, los taquizoitos se cosecharon, centrifugaron y resuspendieron en DMEM.

Para la preparación del TLA, los taquizoitos se lavaron con PBS por centrifugación y posteriormente se filtraron con filtros de policarbonato de 3 µm. Luego de varios lavados, los pellets se resuspendieron en agua bidestilada fría a una densidad de 10⁸ taquizoitos/ml y se sonicaron hasta su lisis completa. Se agregó 1 volumen de NaCl 0,3 M a la suspensión obtenida y se la centrifugó a 10.000 g, 10 min a 4°C. Se determinó la concentración de proteína en el sobrenadante por el método de Bradford y se la filtró con un filtro de 0,22 µm¹⁰⁹. Las proteínas resultantes se alicuotaron y guardaron a -80°C para ser utilizadas en los experimentos.

6.4 Evaluación *in vitro* del efecto del TLA sobre respuestas inmunes de tipo T_H2

Se evaluó el efecto *in vitro* sobre células de ganglio torácico y bazo de ratones alérgicos. Se utilizó un modelo de inflamación alérgica pulmonar utilizado previamente en nuestro laboratorio. Los ratones fueron sensibilizados con 2 inoculaciones del alérgeno ovoalbúmina (OVA, 20 µg) junto con hidróxido de aluminio (2 mg) en PBS por vía intraperitoneal. A la semana se desafiaron por vía aérea con OVA 3%, tres días consecutivos (Fig. 39). A las 48 hs se les realizó una punción cardiaca, se aislaron células de ganglio torácico y bazo y se estimularon *ex vivo* con OVA (40 µg/well) o ConA (0,5 µg/well), en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de TLA y, en algunos casos, únicamente con TLA. Se analizó, por ensayos de ELISA, la producción citoquinas T_H1/T_H2 y regulatorias (IL-10) (ver apartado 6.9). Asimismo, se evaluó, por ensayos de ELISA, la presencia de anticuerpos IgE, IgG1 e IgG2a alérgeno-específicos en suero para confirmar el estado alérgico de los ratones utilizados (ver apartado 6.8).



Figura 39. Protocolo experimental de asma alérgica.

6.5 Protocolos de dermatitis atópica

6.5.1 Primer protocolo

Los ratones DA se sensibilizaron sistémicamente por vía intraperitoneal con el alérgeno (OVA, 100 µg) utilizando como adyuvante aluminio (2 mg). Seis días después, recibieron un desafío con OVA sola (50 µg en PBS) por vía subcutánea. Luego, una vez al día, desde el día 18 al 33 después de la primera inmunización sistémica, se desafiaron por vía epicutánea. Para ello, se eliminó el pelo de la espalda con una máquina eléctrica y luego con crema depilatoria. Posteriormente se les realizó 6 pegadas y despegadas con cinta para producir microlesiones y se aplicó una gasa de 1x1 cm, embebida en OVA (150 µg/100 µl) (grupo DA), asegurada a la piel con un parche hidrocólicoide extrafino. El parche se retiró y volvió a colocar diariamente repitiendo este procedimiento (modificación del protocolo descrito por Rie Yatsuzuka y col)⁹⁸. Los controles negativos (N) recibieron las mismas aplicaciones intraperitoneal, subcutánea y epicutánea pero únicamente con PBS. Luego de 24hs se realizó la eutanasia de los animales y el sangrado por punción cardíaca. Se evaluó:

- 1) Alteración del balance de citoquinas.
- 2) Medición de anticuerpos en suero.
- 3) Lesiones cutáneas e histopatología de la piel tratada.

6.5.2 Segundo protocolo

Los ratones DA se sensibilizaron sistémicamente por vía intraperitoneal con el alérgeno (OVA, 100 µg) utilizando como adyuvante aluminio (2 mg). Ocho días después, recibieron un desafío con OVA sola (50 µg en PBS) por vía subcutánea. Luego, los días 21, 23, 29, 30 y 36 se desafiaron por vía epicutánea colocando 10 mg de Calcipotriol en el dorso de los ratones y los días 22, 24 al 28, 31 al 35 y 37 al 41 se colocaron los parches mencionados en el protocolo anterior colocando la gasa de 1 x 1 cm, embebida en OVA (250 µg/100 µl) (grupo DA). Los controles negativos (N) recibieron las mismas aplicaciones intraperitoneal, subcutánea y epicutánea pero únicamente con PBS y no se expusieron al Calcipotriol. Al día 42 se realizó la eutanasia de los animales y el sangrado por punción cardíaca. Posteriormente se evaluaron, sobre el grupo N y DA los mismos parámetros detallados en el primer protocolo.

6.5.3 Tercer protocolo

Los ratones se sensibilizaron sistémicamente por vía intraperitoneal con el alérgeno (OVA, 100 µg) utilizando como adyuvante aluminio (2 mg). Seis días después, recibieron un desafío con OVA sola (50 µg en PBS) por vía subcutánea. Luego los ratones se desafiaron por vía epicutánea de forma similar al segundo protocolo con la diferencia de que se redujo la aplicación de Calcipotriol y éste se aplicó únicamente al día 19. Los controles negativos (N) recibieron las mismas aplicaciones intraperitoneal, subcutánea y epicutánea pero únicamente con PBS y no se expusieron al Calcipotriol. Al día 34 se realizó la eutanasia de los animales y el sangrado por punción cardíaca. Posteriormente se evaluaron, sobre el grupo N y DA, los mismos parámetros detallados en el primer protocolo.

6.6 Modulación *in vivo* del efecto del TLA sobre la dermatitis atópica

6.6.1 Aplicación del TLA en el segundo protocolo de sensibilización

El protocolo de sensibilización alérgica efectuado es el mismo que el detallado en el apartado 6.5.2. Con el fin de evaluar la capacidad del TLA de modular *in vivo* la DA se aplicó, en los días 37 y 38 del protocolo mencionado, 50 µg de TLA por vía intradérmica en la zona dorsal de los ratones sensibilizados (grupo experimental TDA) o PBS (grupo experimental DA), colocando a continuación nuevamente el parche con OVA. Los controles negativos (N) recibieron las mismas aplicaciones intraperitoneal, subcutánea e intradérmica, así como los parches, pero únicamente con PBS y no se expusieron al Calcipotriol. Al día 42 se realizó la eutanasia de los animales y el sangrado por punción cardíaca. Posteriormente se evaluaron, sobre el grupo N, DA y TDA los mismos parámetros detallados previamente.

6.6.2 Aplicación del TLA en el tercer protocolo de sensibilización

El protocolo de sensibilización alérgica efectuado es el mismo que el detallado en el apartado 6.5.3. Para evaluar el efecto del TLA *in vivo*, los días 22 y 23 del protocolo se aplicó 50 µg de TLA por vía

intradérmica, o PBS (grupo experimental DA), colocando a continuación nuevamente el parche con OVA. Los controles negativos (N) recibieron las mismas aplicaciones intraperitoneal, subcutánea e intradérmica, así como los parches, pero únicamente con PBS y no se expusieron al Calcipotriol. Al día 34 se realizó la eutanasia de los animales y el sangrado por punción cardíaca. Posteriormente se evaluaron, sobre el grupo N, DA y TDA, los mismos parámetros detallados previamente.

6.7 Análisis histopatológico

Se extrajo cuidadosamente la zona de piel tratada (dorso de los ratones) para realizar cortes histológicos. Las secciones de piel se fijaron con una solución de formaldehído tamponada al 4% en PBS (formalina), se incluyeron en parafina y se realizaron cortes histológicos para microscopía óptica sobre los cuales se evaluó el desarrollo de la dermatitis. Para ello, se realizaron tinciones con Hematoxilina-Eosina y tinciones de Giemsa. Con la primera tinción se analizaron cambios en el grado de infiltración inflamatoria en la dermis y la hiperplasia y engrosamiento epidérmico. Para determinar el grado de infiltración leucocitaria se contaron linfocitos, neutrófilos y eosinófilos en al menos 10 campos aleatorios por ratón, por grupo experimental. Para efectuar el análisis semi-cuantitativo del grosor de la epidermis y de la capa de queratina se tomaron imágenes mediante el software Leica Application Suite (LAS4) del microscopio. El engrosamiento de la epidermis se determinó midiendo con el programa ImageJ el espesor de la misma con una magnificación de 400X en al menos 12 campos por ratón, por grupo experimental. Paralelamente, el engrosamiento de la capa de queratina se determinó en al menos 10 campos por ratón, por grupo experimental, mediante un índice de grosor previamente establecido.

Los cortes teñidos con Giemsa se emplearon para la cuantificación de los mastocitos. Se contaron, con una magnificación de 400X, 10 campos al azar por ratón, por grupo experimental. La caracterización de los mastocitos (MC) fue dividida en MC intactos, MC parcialmente degranulados y MC totalmente degranulados. Los intactos presentan una forma de redonda a ovalada, con un límite celular claramente definido y estaban asociados con ninguno o menos de 10 gránulos en el espacio extracelular inmediato. Los parcialmente degranulados tenían una forma ovalada o irregular, y su límite celular estaba oscurecido por numerosos gránulos tanto en el citoplasma como en el espacio extracelular. Los totalmente degranulados presentaban un borde delgado de gránulos alrededor de la límite celular, pero no había gránulos en el citoplasma central restante⁷¹.

Para llevar a cabo el análisis histopatológico fuimos asesorados por el Dr. Alejandro Maruri, Médico Veterinario, docente de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA y posdoctorando CONICET en nuestro laboratorio.

6.8 Anticuerpos específicos para OVA

Luego de la eutanasia de los ratones se realizó una punción cardíaca. El suero obtenido a partir de la sangre se congeló a -20°C para la posterior medición de niveles de anticuerpos.

Se utilizaron ensayos de ELISA directos para la medición de los anticuerpos IgE, IgG1 e IgG2a específicos para OVA a partir de los sueros.

6.8.1 Medición de IgE

Se cubrieron placas de ELISA de 96 pocillos (Nunc maxisorp) con $50\ \mu\text{l}$ de OVA ($10\ \mu\text{g}/\text{ml}$) en buffer carbonato ($\text{pH}=9,5$) y se incubaron a 4°C durante una noche. Al día siguiente se lavaron 3 veces con $300\ \mu\text{l}$ de buffer de lavado (PBS-0,05% Tween 20). Posteriormente, se realizó el bloqueo con $200\ \mu\text{l}$ de buffer de bloqueo (PBS-1% leche descremada en polvo) durante 2 horas a temperatura ambiente. Se adicionaron $50\ \mu\text{l}$ de las muestras de suero a evaluar previamente diluidas y se incubó nuevamente a temperatura ambiente durante 1 hora. Se repitió el paso de lavado y se agregó un anticuerpo anti-IgE de ratón biotilado (BD PharMingen, San Diego, CA) incubándolo por una hora a temperatura ambiente. Se lavó nuevamente y se adicionó la enzima peroxidasa acoplada a estreptavidina (HRP, streptavidin-horseradish peroxidase, Zymed, 1/4000). Luego de incubar media hora a temperatura ambiente, se reveló con tetrametilbencidina (TMB One-Step, Life Technologies). Luego de frenar la reacción con $50\ \mu\text{l}$ de H_2SO_4 1M, se midió la absorción a $450\ \text{nm}$ en un lector para placas (Sunrise RC, Tecan). Los resultados se muestran como densidad óptica (DO) a una dilución 1/10 y 1/40 del suero. Cada ensayo incluyó controles negativos, que consistían en buffer de bloqueo.

6.8.1 Medición de IgG1 e IgG2a

Para la medición de los dos subtipos de IgG se siguió el mismo protocolo que para IgE pero, en este caso, luego de haber incubado las muestras se agregaron $50\ \mu\text{l}$ de anticuerpos anti-IgG1 o anti-IgG2a, acoplados a HRP (1:3000, BD PharMingen, San Diego, CA) y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. Las placas se revelaron con TMB ($50\ \mu\text{l}$, One-Step, Life Technologies). La reacción colorimétrica fue medida a $450\ \text{nm}$ en un lector para placas (Sunrise RC, Tecan) luego de frenar la reacción con $50\ \mu\text{l}$ de H_2SO_4 1M. Los resultados se muestran como densidad óptica (DO) a una dilución 1/1000 del suero para IgG1 y para IgG2a. Para cada ensayo, se realizaron controles negativos que consistían en buffer de bloqueo.

6.9 Cultivos *ex vivo*

Se extrajeron y disgregaron mecánicamente los ganglios braquiales drenantes a la zona de tratamiento. Luego, las células fueron estimuladas *in vitro* (5×10^5 cel/well) con OVA ($0,2\ \text{mg}/\text{ml}$) en placas

de 96 pozos de fondo plano. Se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con 20% de suero fetal bovino (Gibco), 1% antibiótico-antimicótico (Gibco) y 5×10^{-5} M de 2-mercaptoetanol en estufa gaseada a 37°C. Para la evaluación de los niveles de secreción de citoquinas, las células fueron cultivadas durante 72 horas con el estímulo y luego, los sobrenadantes fueron congelados a -80°C para su posterior análisis.

6.9.1 Medición de Citoquinas

Se midió la concentración de citoquinas en los sobrenadantes de cultivo mediante ensayos de ELISA tipo “sándwich”, empleando kits BD OptEIA (BD Biosciences, San Diego, CA) para IL-4, IL-5, INF- γ y Biolegend (San Diego, CA) para IL-10 siguiendo las especificaciones de los fabricantes.

6.10 Análisis estadístico

Se utilizó t-test y ANOVA de una vía con el método de Sidak como post test. Como nivel de significancia se tomaron valores de $p < 0,05$.

8. Bibliografía

1. Kauffmann F, Demenais F. Gene-environment interactions in asthma and allergic diseases: Challenges and perspectives. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2012;130(6):1229-1240. doi:10.1016/j.jaci.2012.10.038
2. Dei-Cas PG, Acuña MK, Dei-Cas I. Dermatitis atópica en niños: estudio comparativo en dos grupos etarios. *Rev chil pediatr*. 2011;82(5):410-418. doi:10.4067/S0370-41062011000500006
3. Levy RM, Gelfand JM, Yan AC. The epidemiology of atopic dermatitis. *Clinics in Dermatology*. 2003;21(2):109-115. doi:10.1016/S0738-081X(02)00360-7
4. Platts-Mills TAE. The allergy epidemics: 1870-2010. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2015;136(1):3-13. doi:10.1016/j.jaci.2015.03.048
5. Lee JH, Son SW, Cho SH. A Comprehensive Review of the Treatment of Atopic Eczema. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2016;8(3):181. doi:10.4168/aaair.2016.8.3.181
6. Pyun BY. Natural History and Risk Factors of Atopic Dermatitis in Children. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2015;7(2):101. doi:10.4168/aaair.2015.7.2.101
7. Spergel J. Atopic dermatitis and the atopic march. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2003;112(6):S118-S127. doi:10.1016/j.jaci.2003.09.033
8. Reynolds LA, Finlay BB. Early life factors that affect allergy development. *Nat Rev Immunol*. 2017;17(8):518-528. doi:10.1038/nri.2017.39
9. Kubo T, Morita H, Sugita K, Akdis CA. Chapter 1 - Introduction to Mechanisms of Allergic Diseases. In: O'Hehir RE, Holgate ST, Sheikh A, eds. *Middleton's Allergy Essentials*. Elsevier; 2017:1-27. doi:10.1016/B978-0-323-37579-5.00001-5
10. Lambrecht BN, Hammad H. The immunology of the allergy epidemic and the hygiene hypothesis. *Nat Immunol*. 2017;18(10):1076-1083. doi:10.1038/ni.3829
11. Dahlgren MW, Molofsky AB. All along the watchtower: group 2 innate lymphoid cells in allergic responses. *Current Opinion in Immunology*. 2018;54:13-19. doi:10.1016/j.coi.2018.05.008
12. Fort MM, Cheung J, Yen D, et al. IL-25 Induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-Associated Pathologies In Vivo. *Immunity*. 2001;15(6):985-995. doi:10.1016/S1074-7613(01)00243-6
13. Licona-Limón P, Kim LK, Palm NW, Flavell RA. TH2, allergy and group 2 innate lymphoid cells. *Nat Immunol*. 2013;14(6):536-542. doi:10.1038/ni.2617
14. Noval Rivas M, Chatila TA. Regulatory T cells in allergic diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2016;138(3):639-652. doi:10.1016/j.jaci.2016.06.003
15. Tamari M, ShotaTanaka, Hirota T. Genome-Wide Association Studies of Allergic Diseases. *Allergology International*. 2013;62(1):21-28. doi:10.2332/allergolint.13-RAI-0539
16. Mexico City Childhood Asthma Study (MCAAS), Children's Health Study (CHS) and HARBORS study,

- Genetics of Asthma in Latino Americans (GALA) Study, the Study of Genes-Environment and Admixture in Latino Americans (GALA2) and the Study of African Americans, Asthma, Genes & Environments (SAGE), et al. Meta-analysis of genome-wide association studies of asthma in ethnically diverse North American populations. *Nat Genet.* 2011;43(9):887-892. doi:10.1038/ng.888
17. Odhiambo JA, Williams HC, Clayton TO, Robertson CF, Asher MI. Global variations in prevalence of eczema symptoms in children from ISAAC Phase Three. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2009;124(6):1251-1258.e23. doi:10.1016/j.jaci.2009.10.009
 18. Seger EW, Wechter T, Strowd L, Feldman SR. Relative efficacy of systemic treatments for atopic dermatitis. *Journal of the American Academy of Dermatology.* 2019;80(2):411-416.e4. doi:10.1016/j.jaad.2018.09.053
 19. Frantz T, Wright E, Balogh E, Cline A, Adler-Neal A, Feldman S. Topical and Oral Therapies for Childhood Atopic Dermatitis and Plaque Psoriasis. *Children.* 2019;6(11):125. doi:10.3390/children6110125
 20. Oyoshi MK, He R, Kumar L, Yoon J, Geha RS. Chapter 3 Cellular and Molecular Mechanisms in Atopic Dermatitis. In: *Advances in Immunology.* Vol 102. Elsevier; 2009:135-226. doi:10.1016/S0065-2776(09)01203-6
 21. Kay J, Gawkrödger DJ, Mortimer MJ, Jaron AG. The prevalence of childhood atopic eczema in a general population. *Journal of the American Academy of Dermatology.* 1994;30(1):35-39. doi:10.1016/S0190-9622(94)70004-4
 22. Sánchez, J., Páez, B., Macías, A., Olmos, C. & De Falco, A. Atopic dermatitis guideline. Position paper from the Latin American Society of allergy, asthma and immunology. *Revista Alergia Mexico.* 2014;61:178-211.
 23. Weidinger S, Beck LA, Bieber T, Kabashima K, Irvine AD. Atopic dermatitis. *Nat Rev Dis Primers.* 2018;4(1):1. doi:10.1038/s41572-018-0001-z
 24. Erb KJ. Atopic disorders: a default pathway in the absence of infection? *Immunology Today.* 1999;20(7):317-322. doi:10.1016/S0167-5699(99)01475-9
 25. Dharmage SC, Lowe AJ, Matheson MC, Burgess JA, Allen KJ, Abramson MJ. Atopic dermatitis and the atopic march revisited. *Allergy.* 2014;69(1):17-27. doi:10.1111/all.12268
 26. Spergel JM, Mizoguchi E, Brewer JP, Martin TR, Bhan AK, Geha RS. Epicutaneous sensitization with protein antigen induces localized allergic dermatitis and hyperresponsiveness to methacholine after single exposure to aerosolized antigen in mice. *J Clin Invest.* 1998;101(8):1614-1622. doi:10.1172/JCI1647
 27. Dohi M, Okudaira H, Sugiyama H, et al. Bronchial Responsiveness to Mite Allergen in Atopic Dermatitis without Asthma. *Int Arch Allergy Immunol.* 1990;92(2):138-142. doi:10.1159/000235204
 28. Lodge, C., Lowe, A. J., Gurrin, L. C., Hill, D., Hosking, C. S., Khalafzai, R. U., Hopper, J. L., Matheson, M. C., Abramson, M. J., Allen, K. J., & Dharmage, S. C. House dust mite sensitization in toddlers predicts current wheeze at age 12 years. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2011;128(4):782-788.e9.

doi:<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.06.038>

29. Ferreira MA, Vonk JM, Baurecht H, et al. Shared genetic origin of asthma, hay fever and eczema elucidates allergic disease biology. *Nat Genet.* 2017;49(12):1752-1757. doi:10.1038/ng.3985
30. Paternoster L, Standl M, Waage J, et al. Multi-ancestry genome-wide association study of 21,000 cases and 95,000 controls identifies new risk loci for atopic dermatitis. *Nat Genet.* 2015;47(12):1449-1456. doi:10.1038/ng.3424
31. Irvine AD, McLean WHI, Leung DYM. Filaggrin Mutations Associated with Skin and Allergic Diseases. *N Engl J Med.* 2011;365(14):1315-1327. doi:10.1056/NEJMra1011040
32. Pasparakis M, Haase I, Nestle FO. Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(5):289-301. doi:10.1038/nri3646
33. Nestle FO, Di Meglio P, Qin JZ, Nickoloff BJ. Skin immune sentinels in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(10):679-691. doi:10.1038/nri2622
34. Imokawa G. Lipid abnormalities in atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol.* 2001;45(1 Suppl):S29-32. doi:10.1067/mjd.2001.117020
35. Danby, S., Brown, K., Wigley, A., Chittock, J., Pyae, P. K., Flohr, C., & Cork, M. J. The effect of water hardness on surfactant deposition after washing and subsequent skin irritation in atopic dermatitis patients and healthy control subjects. *Journal of Investigative Dermatology.* 2018;138(1):68-77. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jid.2017.08.037>
36. Halling, A., Kežić, S., Jakaša, I., Engebretsen, K. A., Maibach, H. I., & Thyssen, J. P. Skin absorption through Atopic Dermatitis skin: A Systematic review. *British Journal of Dermatology.* 2017;177(1):84-106. doi:<https://doi.org/10.1111/bjd.15065>
37. Gao, P., Rafaels, N., Hand, T., Murray, T., Boguniewicz, M., Hata, T., Schneider, L. C., Hanifin, J. M., Gallo, R. L., Gao, L., Beaty, T. H., Beck, L. A., Barnes, K. C., & Leung, D. Y. Filaggrin mutations that confer risk of atopic dermatitis confer greater risk for eczema herpeticum. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2009;124(3):507-513.e7. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.07.034>
38. Rawlings, A. V., & Voegeli, R. Stratum corneum proteases and dry skin conditions. *Cell and Tissue Research.* 2012;351(2):217-235. doi:<https://doi.org/10.1007/s00441-012-1501-x>
39. Janssens, M., van Smeden, J., Gooris, G. S., Bras, W., Portale, G., Caspers, P. J., Vreeken, R. J., Hankemeier, T., Kezic, S., Wolterbeek, R., Lavrijsen, A. P., & Bouwstra, J. A. Increase in short-chain ceramides correlates with an altered lipid organization and decreased barrier function in atopic eczema patients. *Journal of Lipid Research.* 2012;53(12):2755-2766. doi:<https://doi.org/10.1194/jlr.P030338>
40. De Benedetto A, Rafaels NM, McGirt LY, et al. Tight junction defects in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127(3):773-786.e1-7. doi:10.1016/j.jaci.2010.10.018
41. Kong, H. H., Oh, J., Deming, C., Conlan, S., Grice, E. A., Beatson, M. A., Nomicos, E., Polley, E. C., Komarow, H. D., Program, N. C. S., Murray, P. R., Turner, M. L., & Segre, J. A. Temporal shifts in the skin microbiome

- associated with disease flares and treatment in children with atopic dermatitis. *Genome Research*. 2012;22(5):850-859. doi:<https://doi.org/10.1101/gr.131029.111>
42. Pellerin, L., Henry, J., Hsu, C., Balica, S., Jean-Decoster, C., Méchin, M., Hansmann, B., Rodríguez, E., Weindinger, S., Schmitt, A., Serre, G., Paul, C., & Simon, M. Defects of filaggrin-like proteins in both lesional and nonlesional atopic skin. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2013;131(4):1094-1102. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.12.1566>
 43. Sator PG, Schmidt JB, Hönigsmann H. Comparison of epidermal hydration and skin surface lipids in healthy individuals and in patients with atopic dermatitis. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2003;48(3):352-358. doi:10.1067/mjd.2003.105
 44. Leung, D. Y., & Bieber, T. Atopic dermatitis. *The Lancet*. 2003;361(9352):151-160. doi:[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12193-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12193-9)
 45. Gittler JK, Shemer A, Suárez-Fariñas M, et al. Progressive activation of TH2/TH22 cytokines and selective epidermal proteins characterizes acute and chronic atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2012;130(6):1344-1354. doi:10.1016/j.jaci.2012.07.012
 46. Kondo H, Ichikawa Y, Imokawa G. Percutaneous sensitization with allergens through barrier-disrupted skin elicits a Th2-dominant cytokine response. *Eur J Immunol*. 1998;28(3):769-779. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199803)28:03<769::AID-IMMU769>3.0.CO;2-H
 47. Feld, M., García, R., Buddenkotte, J., Katayama, S., Lewis, K. E., Muirhead, G., Hevezi, P., Plessner, K., Schruppf, H., Krjutškov, K., Sergeeva, O. A., Müller, H., Tsoka, S., Kere, J., Dillon, S. R., Steinhoff, M., & Homey, B. The pruritus- and TH2-associated cytokine IL-31 promotes growth of sensory nerves. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2016;138(2):500-508.e24. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.02.020>
 48. Sonkoly, E., Müller, A., Lauerma, A., Pivarcsi, A., Soto, H., Kemény, L., Alenius, H., Dieu-Nosjean, M. C., Meller, S., Rieker, J., Steinhoff, M., Hoffmann, T., Ruzicka, T., Zlotnik, A., & Homey, B. IL-31: A new link between T cells and pruritus in atopic skin inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2006;117(2):411-417. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2005.10.033>
 49. Oyoshi MK, Larson RP, Ziegler SF, Geha RS. Mechanical injury polarizes skin dendritic cells to elicit a TH2 response by inducing cutaneous thymic stromal lymphopoietin expression. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2010;126(5):976-984.e5. doi:10.1016/j.jaci.2010.08.041
 50. Ohl L, Mohaupt M, Czeloth N, et al. CCR7 Governs Skin Dendritic Cell Migration under Inflammatory and Steady-State Conditions. *Immunity*. 2004;21(2):279-288. doi:10.1016/j.immuni.2004.06.014
 51. Stott, B., Lavender, P., Lehmann, S., Pennino, D., Durham, S. R., & Schmidt-Weber, C. B. Human IL-31 is induced by IL-4 and promotes TH2-driven inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2013;132(2):446-454.e5. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.03.050>
 52. Kouro, T., & Takatsu, K. IL-5- and eosinophil-mediated inflammation: From discovery to therapy.

- International Immunology*. 2009;21(12):1303-1309. doi:<https://doi.org/10.1093/intimm/dxp102>
53. Matsuoka, K., Shitara, H., Taya, C., Kohno, K., Kikkawa, Y., & Yonekawa, H. Novel Basophil- or Eosinophil-Depleted Mouse Models for Functional Analyses of Allergic Inflammation. *PLoS One*. 2013;8(4):e60958. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060958>
 54. Novak N, Bieber T. Allergic and nonallergic forms of atopic diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2003;112(2):252-262. doi:10.1067/mai.2003.1595
 55. Salimi, M., Barlow, J. L., Saunders, S. P., Xue, L., Gutowska-Owsiak, D., Wang, X., Huang, L., Johnson, D. S., Scanlon, S. T., McKenzie, A. N. J., Fallon, P. G., & Ogg, G. S. A role for IL-25 and IL-33-driven type-2 innate lymphoid cells in atopic dermatitis. *Journal of Experimental Medicine*. 2013;210(13):2939-2950. doi:<https://doi.org/10.1084/jem.20130351>
 56. Homey, B., Steinhoff, M., Ruzicka, T., & Leung, D. Y. Cytokines and chemokines orchestrate atopic skin inflammation. 2006;118(1):178-189. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2006.03.047>
 57. Baker BS. The role of microorganisms in atopic dermatitis. *Clinical and Experimental Immunology*. 2006;144(1):1-9. doi:10.1111/j.1365-2249.2005.02980.x
 58. Hanifin JM, Tofte SJ. Update on therapy of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;104(3 Pt 2):S123-125. doi:10.1016/s0091-6749(99)70054-0
 59. Gutman AB, Kligman AM, Sciacca J, James WD. Soak and smear: a standard technique revisited. *Arch Dermatol*. 2005;141(12):1556-1559. doi:10.1001/archderm.141.12.1556
 60. Eichenfield LF, Tom WL, Berger TG, et al. Guidelines of care for the management of atopic dermatitis: section 2. Management and treatment of atopic dermatitis with topical therapies. *J Am Acad Dermatol*. 2014;71(1):116-132. doi:10.1016/j.jaad.2014.03.023
 61. Queille-Roussel C, Paul C, Duteil L, et al. The new topical ascomycin derivative SDZ ASM 981 does not induce skin atrophy when applied to normal skin for 4 weeks: a randomized, double-blind controlled study. *Br J Dermatol*. 2001;144(3):507-513. doi:10.1046/j.1365-2133.2001.04076.x
 62. Moghadam-Kia S, Werth VP. Prevention and treatment of systemic glucocorticoid side effects. *Int J Dermatol*. 2010;49(3):239-248. doi:10.1111/j.1365-4632.2009.04322.x
 63. Caminiti L, Panasiti I, Landi M, et al. Allergen immunotherapy in atopic dermatitis: Light and shadow in children. *Pediatr Allergy Immunol*. 2020;31 Suppl 26:46-48. doi:10.1111/pai.13390
 64. Hajdu K, Kapitány A, Dajnoki Z, et al. Improvement of clinical and immunological parameters after allergen-specific immunotherapy in atopic dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2021;35(6):1357-1361. doi:10.1111/jdv.17018
 65. Eichenfield LF, Ahluwalia J, Waldman A, Borok J, Udokoff J, Boguniewicz M. Current guidelines for the evaluation and management of atopic dermatitis: A comparison of the Joint Task Force Practice Parameter and American Academy of Dermatology guidelines. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;139(4S):S49-S57. doi:10.1016/j.jaci.2017.01.009

66. Wollenberg A, Barbarot S, Bieber T, et al. Consensus-based European guidelines for treatment of atopic eczema (atopic dermatitis) in adults and children: part I. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2018;32(5):657-682. doi:10.1111/jdv.14891
67. Man, M., Hatano, Y., Lee, S. H., Man, M., Chang, S. K. C., Feingold, K. R., Leung, D. Y., Holleran, W. M., Uchida, Y., & Elias, P. M. Characterization of a Hapten-Induced, murine model with multiple features of atopic dermatitis: structural, immunologic, and biochemical changes following single versus multiple oxazolone challenges. *Journal of Investigative Dermatology*. 2008;128(1):79-86. doi:https://doi.org/10.1038/sj.jid.5701011
68. Gilhar A, Reich K, Keren A, Kabashima K, Steinhoff M, Paus R. Mouse models of atopic dermatitis: a critical reappraisal. *Experimental Dermatology*. 2021;30(3):319-336. doi:10.1111/exd.14270
69. Jin H, He R, Oyoshi M, Geha RS. Animal models of atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*. 2009;129(1):31-40. doi:10.1038/jid.2008.106
70. Wang G, Savinko T, Wolff H, et al. Repeated epicutaneous exposures to ovalbumin progressively induce atopic dermatitis-like skin lesions in mice. *Clinical and Experimental Allergy*. 2007;37(1):151-161. doi:10.1111/j.1365-2222.2006.02621.x
71. Perrone Sibilila MD, Aldirico MDLÄ, Soto AS, et al. Chronic infection with the protozoan *Toxoplasma gondii* prevents the development of experimental atopic dermatitis in mice. *Journal of Dermatological Science*. 2019;96(3):143-150. doi:10.1016/j.jdermsci.2019.10.007
72. Li M, Hener P, Zhang Z, Kato S, Metzger D, Chambon P. Topical vitamin D3 and low-calcemic analogs induce thymic stromal lymphopoietin in mouse keratinocytes and trigger an atopic dermatitis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(31):11736-11741. doi:10.1073/pnas.0604575103
73. Kim, B., Siracusa, M. C., Saenz, S. A., Noti, M., Monticelli, L. A., Sonnenberg, G. F., Hepworth, M. R., Van Voorhees, A. S., Comeau, M. R., & Artis, D. TSLP elicits IL-33-Independent innate lymphoid cell responses to promote skin inflammation. *Science Translational Medicine*. 2013;5(170). doi:https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005374
74. Williams, H. C., Strachan, D. P., & Hay, R. J. Childhood eczema: disease of the advantaged? *The BMJ*. 1994;308(6937):1132-1135. doi:https://doi.org/10.1136/bmj.308.6937.1132
75. Matricardi, P. M. Exposure to foodborne and orofecal microbes versus airborne viruses in relation to atopy and allergic asthma: Epidemiological study. *The BMJ*. 2000;320(7232):412-417. doi:https://doi.org/10.1136/bmj.320.7232.412
76. Alcantara-Neves, N. M., Veiga, R., Dattoli, V. C. C., Fiaccone, R. L., Esquivel, R. M., Cruz, Á. A., Cooper, P. J., Rodrigues, L. C., & Barreto, M. L. The effect of single and multiple infections on atopy and wheezing in children. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2012;129(2):359-367.e3. doi:https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.09.015
77. Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and

- Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11(2):267-299.
doi:10.1128/CMR.11.2.267
78. Tenter, A. M., Heckerth, A. R., & Weiss, L. M. *Toxoplasma gondii*: From animals to humans. *International Journal for Parasitology.* 2000;30(12-13):1217-1258.
doi:https://doi.org/10.1016/s0020-7519(00)00124-7
79. Gazzinelli, R. T., Hakim, F., Hieny, S., Shearer, G. M., & Sher, A. Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. *J Immunol.* 1991;146(1):286-292.
doi:https://doi.org/10.4049/jimmunol.146.1.286
80. Gazzinelli, R. T., Wysocka, M., Hayashi, S., Denkers, E., Hieny, S., Caspar, P., Trinchieri, G., & Sher, A. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *Journal of Immunology.* 1994;153(6):2533-2543.
doi:https://doi.org/10.4049/jimmunol.153.6.2533
81. Gazzinelli, R. T., Amichay, D., Sharton-Kersten, T., Grunwald, E., Farber, J. M., & Sher, A. Role of Macrophage-Derived cytokines in the induction and regulation of Cell-Mediated immunity to *Toxoplasma gondii*. *Curr Top Microbiol Immunol.* Published online 1996:127-139.
doi:https://doi.org/10.1007/978-3-642-51014-4_12
82. Khan, I. A., Matsuura, T., & Kasper, L. H. IL-10 mediates immunosuppression following primary infection with *Toxoplasma gondii* in mice. *Parasite Immunology.* 1995;17(4):185-195.
doi:https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.1995.tb00888.x
83. Langermans, J. A. M., Nibbering, P. H., Van Vuren-Van Der Hulst, M. E., & Van Furth, R. Transforming growth factor- β suppresses interferon- γ -induced toxoplasma-stimulated activity in murine macrophages by inhibition of tumour necrosis factor- α production. *Parasite Immunology.* 2001;23(4):169-175.
doi:https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.2001.00371.x
84. Fenoy I, Giovannoni M, Batalla E, et al. *Toxoplasma gondii* infection blocks the development of allergic airway inflammation in BALB/c mice. *Clinical and Experimental Immunology.* 2009;155(2):275-284.
doi:10.1111/j.1365-2249.2008.03813.x
85. Fenoy IM, Sanchez VR, Soto AS, et al. Regulatory cells induced by acute toxoplasmosis prevent the development of allergic lung inflammation. *Immunobiology.* 2015;220(5):641-648.
doi:10.1016/j.imbio.2014.11.016
86. Fenoy IM, Chiurazzi R, Sánchez VR, et al. *Toxoplasma gondii* Infection Induces Suppression in a Mouse Model of Allergic Airway Inflammation. Igarashi I, ed. *PLoS ONE.* 2012;7(8):e43420.
doi:10.1371/journal.pone.0043420
87. Fenoy IM, Sánchez VR, Soto AS, Picchio MS, Martin V, Goldman A. *Toxoplasma gondii* infection modulate systemic allergic immune response in BALB/c mice. *Experimental Parasitology.*

- 2015;154:47-50. doi:10.1016/j.exppara.2015.04.001
88. Wagner A, Schabussova I, Drinic M, et al. Oocyst-Derived Extract of *Toxoplasma Gondii* Serves as Potent Immunomodulator in a Mouse Model of Birch Pollen Allergy. Ryffel B, ed. *PLoS ONE*. 2016;11(5):e0155081. doi:10.1371/journal.pone.0155081
 89. Lee EJ, Heo YM, Choi JH, Song HO, Ryu JS, Ahn MH. Suppressed Production of Pro-inflammatory Cytokines by LPS-Activated Macrophages after Treatment with *Toxoplasma gondii* Lysate. *Korean J Parasitol*. 2008;46(3):145. doi:10.3347/kjp.2008.46.3.145
 90. Leroux LP, Dasanayake D, Rommereim LM, et al. Secreted *Toxoplasma gondii* molecules interfere with expression of MHC-II in interferon gamma-activated macrophages. *International Journal for Parasitology*. 2015;45(5):319-332. doi:10.1016/j.ijpara.2015.01.003
 91. Drinić, M. et al. *Toxoplasma gondii* tachyzoite-extract acts as a potent immunomodulator against allergic sensitization and airway inflammation. *Sci Rep*. 2017;(15211). doi:https://doi.org/10.1038/s41598-017-15663-4
 92. Ando Y, Yasuoka C, Mishima T, et al. Concanavalin A-mediated T cell proliferation is regulated by herpes virus entry mediator costimulatory molecule. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2014;50(4):313-320. doi:10.1007/s11626-013-9705-2
 93. Dwyer JM, Johnson C. The use of concanavalin A to study the immunoregulation of human T cells. *Clin Exp Immunol*. 1981;46(2):237-249.
 94. Weiss A, Shields R, Newton M, Manger B, Imboden J. Ligand-receptor interactions required for commitment to the activation of the interleukin 2 gene. *J Immunol*. 1987;138(7):2169-2176.
 95. Kanellopoulos JM, De Petris S, Leca G, Crumpton MJ. The mitogenic lectin from *Phaseolus vulgaris* does not recognize the T3 antigen of human T lymphocytes. *Eur J Immunol*. 1985;15(5):479-486. doi:10.1002/eji.1830150512
 96. Weiss A, Imboden J, Hardy K, Manger B, Terhorst C, Stobo J. The role of the T3/antigen receptor complex in T-cell activation. *Annu Rev Immunol*. 1986;4:593-619. doi:10.1146/annurev.iy.04.040186.003113
 97. Reinherz EL, Royer HD, Campen TJ, Ramarli D, Chang HC, Acuto O. The structure and function of the T3-Ti molecular complex on human T lymphocytes. *Symp Fundam Cancer Res*. 1986;38:3-30.
 98. Yatsuzuka R, Inoue T, Jiang S, Nakano Y, Kamei C. Development of new atopic dermatitis models characterized by not only itching but also inflammatory skin in mice. *Eur J Pharmacol*. 2007;565(1-3):225-231. doi:10.1016/j.ejphar.2007.02.062
 99. Liu FT, Goodarzi H, Chen HY. IgE, mast cells, and eosinophils in atopic dermatitis. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2011;41(3):298-310. doi:10.1007/s12016-011-8252-4
 100. Kägi MK, Joller-Jemelka H, Wüthrich B. Correlation of eosinophils, eosinophil cationic protein and soluble interleukin-2 receptor with the clinical activity of atopic dermatitis. *Dermatology*.

- 1992;185(2):88-92. doi:10.1159/000247419
101. Xiao C, Sun Z, Gao J, et al. Enhanced phenotype of calcipotriol-induced atopic dermatitis in filaggrin-deficient mice. *FASEB J*. 2021;35(5):e21574. doi:10.1096/fj.202002709R
 102. Jeong YI, Hong SH, Cho SH, Lee WJ, Lee SE. Toxoplasma gondii Infection Suppresses House Dust Mite Extract-Induced Atopic Dermatitis in NC/Nga Mice. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2015;7(6):557-564. doi:10.4168/aair.2015.7.6.557
 103. Liesenfeld O, Dunay IR, Erb KJ. Infection with Toxoplasma gondii Reduces Established and Developing Th2 Responses Induced by Nippostrongylus brasiliensis Infection. *Infect Immun*. 2004;72(7):3812-3822. doi:10.1128/IAI.72.7.3812-3822.2004
 104. Lyons RE, McLeod R, Roberts CW. Toxoplasma gondii tachyzoite-bradyzoite interconversion. *Trends Parasitol*. 2002;18(5):198-201. doi:10.1016/s1471-4922(02)02248-1
 105. Pan M, Ge CC, Fan YM, Jin QW, Shen B, Huang SY. The determinants regulating Toxoplasma gondii bradyzoite development. *Front Microbiol*. 2022;13:1027073. doi:10.3389/fmicb.2022.1027073
 106. Rubin K, Glazer S. The pertussis hypothesis: *Bordetella pertussis* colonization in the etiology of asthma and diseases of allergic sensitization. *Medical Hypotheses*. 2018;120:101-115. doi:10.1016/j.mehy.2018.08.006
 107. Ham WK, Lee EJ, Jeon MS, et al. Treatment with phosphodiester CpG-ODN ameliorates atopic dermatitis by enhancing TGF- β signaling. *BMB Rep*. 2021;54(2):142-147. doi:10.5483/BMBRep.2021.54.2.254
 108. Korb E, Drinić M, Wagner A, et al. Reduction of Allergic Lung Disease by Mucosal Application of Toxoplasma gondii-Derived Molecules: Possible Role of Carbohydrates. *Front Immunol*. 2021;11:612766. doi:10.3389/fimmu.2020.612766
 109. Zorgi NE, Costa A, Galisteo AJ, do Nascimento N, de Andrade HF. Humoral responses and immune protection in mice immunized with irradiated T. gondii tachyzoites and challenged with three genetically distinct strains of T. gondii. *Immunol Lett*. 2011;138(2):187-196. doi:10.1016/j.imlet.2011.04.007


05/07/2024

Se da constancia que este manuscrito corresponde a la última versión de la tesis y que incluye las correcciones de los jurados.



Julieta Valentina Santos

Firma del tesista



Alejandra Goldman

Firma del director