

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

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 *naive*, 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 *naive*.

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.

Palabras clave: Dermatitis atópica, antígenos totales de *T. gondii*, respuesta T_H2, citoquinas, IgE, histopatología, modelo murino, infiltrado leucocitario, mastocitos.

Abstract

Allergic diseases are inflammatory disorders resulting from complex interactions between genes and the environment. Atopic dermatitis (AD), a chronic inflammatory skin disease, is one of the most common dermal inflammatory pathologies, affecting between 1% and 20% of the total population and between 8% and 30% of children worldwide. Given the sustained increase in its incidence and the high costs of treatments, along with the deterioration in the quality of life of patients, the development of therapies for this pathology that combine efficiency with safety and accessibility remains a challenge.

Like other atopic disorders, AD is orchestrated by a strong type 2 response characterized by the secretion of cytokines from adaptive CD4⁺ T_H2 cells and innate lymphoid cells (ILC2), along with

high levels of allergen-specific IgE antibodies in serum. At the histopathological level, spongiosis (intercellular epidermal edema), para/hyperkeratosis, and epidermal thickening (acanthosis) are observed along with an increase in leukocyte and mast cell infiltration.

The hygiene hypothesis postulates that a reduction or alteration in microbial exposures causes unbalanced maturation of the immune system, predisposing it to the development of allergic disorders. In this context, epidemiological data indicate that seropositivity for *Toxoplasma gondii*, an obligate intracellular parasite, is inversely related to allergic sensitization and its symptomatic manifestations in humans. Supporting these observations, our laboratory has demonstrated that *T. gondii* infection decreases the subsequent development of allergic lung inflammations. The immunological mechanisms involve, depending on the timing of sensitization (acute or chronic stage of infection), the shift of the response towards a T_H1 profile or the induction of cells with suppressor activity. Subsequently, we also observed that chronic infection with *T. gondii* prior to allergic sensitization completely blocks the development of AD.

We hypothesize that *T. gondii* molecules with immunomodulatory properties are responsible for the parasite's ability to protect against the development of AD. In this context, it was recently demonstrated in an experimental asthma model that the administration of total *T. gondii* antigens (TLA) together with the allergen during sensitization decreases susceptibility to developing allergic lung inflammation. Based on the above, in this work we proposed to study in a murine model of AD the capacity of TLA to modulate the development of this dermal pathology.

In parallel to the establishment of the murine model of AD, the study of the modulatory effect of TLA *in vitro* using lymph node and spleen cells from allergic mice, sensitized with an already established experimental asthma protocol in the laboratory, was started. For this purpose, TLA derived from *T. gondii* tachyzoites (TLA) as well as cysts from the brains of chronically infected mice (TLAQ) were used. A decrease in IL-4 was observed with *in vitro* stimulation with TLA derived from cysts when applied to cells from allergic mice one hour before stimulation with Concanavalin A (ConA) and at the highest concentration studied.

In the second part of the work, a murine model of AD was established. Three different sensitization protocols were developed. In all of them, with greater or lesser severity, the characteristic histopathological parameters of dermatitis, including thickening of the epidermis and the keratin layer of the skin, along with an increase in the levels of eosinophils and mast cells infiltrated in the dermis of the mice, were reproduced. Additionally, high levels of IgE and IgG1 were detected in the serum of the mice, confirming their allergic status. Finally, higher levels of IL-4 were also observed compared to naive mice, indicating the triggered T_H2 context.

To conclude, the final objective of this thesis was to evaluate the in vivo effect of TLA on AD. For this purpose, the second and third protocols of allergic sensitization were used. Regarding the application of TLA using the third sensitization protocol, no changes were observed in the level of allergen-specific antibodies in the serum of the mice nor differences in the cytokine secretion cellular response. In parallel, an increase in neutrophil infiltration in histological sections and an increase in the percentage of this cell population in blood smears were observed. Regarding epidermal thickening, an increase was detected in the skin of mice that received TLA applications.

However, when TLA was administered with the second AD protocol, a decrease, albeit not significant, in IgE levels compared to mice that did not receive TLA applications was observed. Additionally, an increase in IgG2a (type 1 antibodies) and higher levels of IFN- γ were detected, indicating a possible switch of the response towards a type 1 profile, as expected from the mentioned background on the immunomodulation exerted by *T. gondii*. Regarding histopathological parameters, an increase in neutrophil infiltration and a decrease, although not significant, in eosinophil levels in the dermis compared to mice that did not receive TLA were detected. These changes in IgE levels and eosinophil infiltration in the skin were such that the values reached showed no significant differences compared to naive mice.

The findings of this work contribute not only to the development of an appropriate AD model to study the immunological mechanisms that trigger dermal pathology but also offer a significant contribution to the understanding of the effects of total *T. gondii* antigens on immune responses in complex allergic contexts such as AD.

Keywords: Atopic dermatitis, total *T. gondii* antigens, T_H2 response, cytokines, IgE, histopathology, murine model, leukocyte infiltration, mast cells.

