



Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Químicas - Departamento de Bioquímica Clínica
Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología CIBICI-CONICET-
UNC

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Candidiasis vaginal: estudio de receptores y mediadores inmunes innatos locales involucrados en la patogenia de la infección

Bioquímica
MARÍA SOLEDAD MIRÓ

Directora de Tesis: Dra. Claudia Elena Sotomayor

Córdoba, Argentina
-2017-

Comisión asesora:

Dr. José Luis Bocco

Dra. Andrea Smania

Dra. María Carolina Touz

Evaluador externo:

Dr. Pablo César Baldi

El presente trabajo de tesis fue realizado gracias al apoyo económico del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT-FONCyT), y la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (Secyt-UNC).

A mis padres, por su apoyo
y amor incondicional

Agradecimientos

Esta parte de la tesis, si bien es la última que escribí, no es en absoluto menos importante que todas las demás. Nada de lo aquí escrito hubiera sido posible sin la ayuda de todas y cada una de las personas mencionadas en esta sección, que de una manera u otra me han ayudado a transitar este camino y son parte de este logro.

A los integrantes de mi comisión de tesis, Dr. José Luis Bocco, Dra. Andrea Smania y Dra. Carolina Touz, por haber recorrido conmigo este camino, de reunión en reunión, siempre con muy buena predisposición y por sus correcciones constructivas sobre el manuscrito, que ayudaron a mejorarlo. Al Dr. Pablo Baldi, por haber accedido a ser el evaluador externo de la tesis.

A todos los integrantes de Departamento de Bioquímica Clínica-CIBICI porque siempre que he necesitado algo han estado dispuestos a brindar su ayuda.

A mi grupo de trabajo, el SotoTeam. A Claudia, por haber confiado en mí desde un primer momento y habernos embarcado en esta tarea nada sencilla de dirigir y hacer un doctorado. Por tu constante apoyo, no sólo a nivel científico sino también personal. Por tus consejos, por la paciencia, por estar siempre de mi lado (aunque no me guste poner títulos de colores). Sos una gran persona! Sin tu ayuda esto no hubiera sido posible. A Pauli, por toda tu ayuda desde mi primer día en el laboratorio. Por aconsejarme, por las charlas en el box, por ser mi cómplice en las maldades y porque con sólo una mirada ya sabemos que está pensando la otra. A Ceci y Emi, compañeras de grupo, de trabajo, de mesada y amigas. Por brindarme su ayuda cuando la he necesitado, por bancarme en mi orden y mi desorden, por el día a día. Gracias a todas!

A Juan Pablo, Fernando, Claudio y Lara, porque sin su ayuda no hubiera sido posible todo el trabajo con muestras de pacientes.

A Anabel y Graciela, por su gran ayuda con la determinación de factores de virulencia, con el análisis de datos y por su buena predisposición de siempre.

A la Dra. Amy Hise, por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme hacer una pasantía en Cleveland, y a Elaheh y Yan por la ayuda brindada con los experimentos.

A todos los integrantes del laboratorio 104, a Silvia, Ceci, Mariana, Vicky, Rubén y Dra. Riera; porque siempre me hicieron sentir parte del laboratorio y por su buena predisposición a ayudar. En especial a Silvia y Ceci por el cariño brindado en el día a día y por sus consejos.

A mi familia laboratorística formada por un excelente grupo de personas, las cuales hacen que sea un gusto el tiempo pasado en el laboratorio y saben cómo sacar una sonrisa aún en los días más malos. A Nati y Bibi, con quienes compartí todo el doctorado, gracias por su amistad, las charlas, los consejos, la ayuda, su buena onda y cariño de siempre. Que nuestra amistad continúe por muchos años más. Las quiero mucho! A Leo, por tu ayuda, por escucharme y hacer de psicólogo, por las charlas después de las 18 hs, por adivinar mi tema. A Pauli (mi roomate y compañera de viaje), Janechi (ocupaste el lugar de Leo en el intercambio de miradas), Ivi (la mamá del grupo), Li (pequeño saltamontes que sigue mis pasos en la maldad), Coni (compañera de caminatas), Flor, Caro y Dani, las más recientes incorporaciones, por ser parte de este grupo tan hermoso con el cual he compartido horas de charlas, risas, mates, chusmerios, almuerzos amontonados, congresos, salidas, cenas y miles de momentos que siempre voy a recordar con mucho cariño. Gracias chicas por hacer cada día un día especial. A Emi(lío) Roselli, por tu ayuda cada vez que la he necesitado y por bancarte sin decir nada estar rodeado de todas nosotras. A los que estaban cuando comencé el doctorado: Lau, Nico, David, Javi y Lucho; por haberme enseñado y ayudado en todo lo que necesité.

A los integrantes del laboratorio 103 (Jime, Luisi, Colo, Ceci, Dani, Nico, Flaco, Fer Suarez, Xime, Coti Insfran, Facu, Cris, David, Lili, Cin, Fer Canale) por la buena predisposición para ayudarme en cada oportunidad y por la buena onda. En especial a Meli, por los momentos compartidos, las risas y las charlas.

A mis amigos hospitalarios: Rodri, Nico, Majo, Aye, Facha, Lau, Ceci y Seba por estar siempre, por su amistad, por las juntadas, las salidas, los chistes, las risas y por tantos momentos hermosos compartidos durante estos años.

A Nati, por haber formado parte de mi vida durante tanto tiempo, y a tu familia por tratarme como a una más.

A Gabi y Nacho, mis hermanos de la vida. A Gabi por tu amistad, por los años compartidos, por las innumerables charlas y risas desde la secundaria hasta el día de hoy. Por estar presente en mi vida y formar parte de mi familia. A Nacho, porque puedo contar con vos

pase lo que pase (you're my person), por las horas que pasamos juntos, por los viajes, los consejos, las risas y tu cariño sincero.

A Shú, por tu amistad, por los momentos compartidos, charlas, mates, juntadas, por tus audios interminables con novedades y por tantas frases célebres que al día de hoy siguen en vigencia.

A Iván, Flor, Juan, Kevin y Perla, amigos peñeros, por las cenas y momentos compartidos, por las charlas, risas, juegos y por hacer de los domingos a la noche un momento de la semana que espero con ganas.

A Bachi, mi casi compañero de grupo, por las juntadas, las charlas, tus consejos que siempre han sido de gran ayuda y por tu amistad.

A Nati V. porque has sabido ganarte un lugar en mi vida. Por tu compañía, cariño, aguante y por los momentos compartidos.

A Belu y Sofi, por su amistad, por las cenas de los miércoles, su cariño y los consejos. Belu por más que nos separen kilómetros y un océano de distancia, sé que puedo contar con vos.

A mis padres, por estar siempre presentes en todos los momentos importantes de mi vida. Por su amor incondicional. Por ser mi ejemplo a seguir. Sin su constante apoyo nunca hubiera llegado hasta donde estoy. Sé que puedo contar con ustedes para lo que sea y cuando sea. A mi hermano, por estar siempre que lo he necesitado y por compartir conmigo su visión tan fresca de la vida. A mi tía Marina, la tía más loca de todas, como siempre te digo, por amarme de esa manera tan sincera. Por estar pendiente de mi, y siempre dispuesta a ayudarme. Gracias a ustedes por todo esto y por mucho más!

A todos, muchas gracias!

RESUMEN

Candidiasis vaginal: estudio de receptores y mediadores inmunes innatos locales involucrados en la patogenia de la infección

La infección vaginal por especies de *Candida*, conocida como Candidiasis Vulvovaginal (CVV), constituye una enfermedad inflamatoria aguda y una razón frecuente de consulta ginecológica. Junto con su forma recurrente (CVVR) representan un importante problema de salud a nivel mundial. Pese a que el conocimiento sobre las causas y factores de riesgo para la adquisición y el desarrollo de esta micosis es extenso, los mecanismos inmunes que rigen la respuesta antifúngica protectora a nivel vaginal aún no han sido completamente esclarecidos.

A pesar de la marcada incidencia de esta patología, varios aspectos de su etiopatogenia aún no han sido resueltos. Se desconocen muchos de los mecanismos que rigen las interacciones entre el hongo y las células residentes a nivel del tracto genital femenino. El rol del dimorfismo fúngico, la liberación de factores de virulencia como enzimas hidrolíticas y su efecto en la modulación de mediadores inmunes por la célula del epitelio vaginal aún no están totalmente establecidos.

En este escenario el rol de los péptidos antimicrobianos, en particular las β -Defensinas, su mecanismo de inducción, regulación e impacto en la respuesta local en esta patología permanecen aún sin definir.

En este trabajo de tesis estudiamos la relevancia de diversos receptores de la inmunidad innata en el desarrollo de la patología, a través de un modelo murino de CVV. Asimismo, fue nuestro objetivo esclarecer la participación de péptidos antimicrobianos de la familia de las β -Defensinas durante la infección vaginal por *C. albicans*.

Nuestros resultados demuestran un rol protector de las señales mediadas por el receptor innato TLR2 y la molécula adaptadora MyD88 en la infección vaginal por *C. albicans*, siendo necesarios para el correcto control de la invasión tisular y de la respuesta inflamatoria asociada. El receptor innato Dectin-1 demostró ser importante durante esta patología contribuyendo en el reconocimiento del patógeno y limitando la exacerbación de la inflamación.

Demostramos que β -Defensina 1, péptido antimicrobiano constitutivo y de relevantes funciones en los tractos mucosos, se encuentra aumentado durante la infección vaginal por *C. albicans*.

Estudios efectuados en pacientes con CVV y CVVR, nos permitieron establecer las características clínico-epidemiológicas de esta infección en nuestro medio. Evaluando el lavado cervicovaginal de estas pacientes encontramos un perfil diferencial en la respuesta de mediadores inmunes como citoquinas y péptidos antimicrobianos en los dos grupos en estudio, que aportan nueva evidencia sobre los mecanismos inmunopatogénicos y la recurrencia de la patología en pacientes con CVVR.

Finalmente, el uso de un modelo *in vitro* de interacción *Candida*-célula epitelial de tracto genital femenino humano, permitió establecer las señales involucradas en la modulación de la β -Defensina 1.

ABSTRACT

Vaginal candidiasis: receptors and local innate immune mediators involved in the immunopathogenesis of the infection.

Vaginal infection caused by *Candida* species, known as Vulvovaginal Candidiasis (VVC) is an acute inflammatory disease and a frequent cause of gynaecological consultation. VVC and its recurrent form (RVVC) constitute an important health problem worldwide. Despite the knowledge about the causes and risk factors for the development of this infection are extensive, the immune mechanisms that govern the antifungal response in the vaginal tract are not well understood.

Despite the high incidence of this disease, some aspects of its immunopathogenesis are still unclear. The role of fungal morphogenesis, the secretion of virulence factors such as hydrolytic enzymes and its effect on the modulation of immune mediators in vaginal epithelial cells remain poorly understood.

In this scenario, the role of antimicrobial peptides, in particular β -Defensins, its induction, regulation and impact on the local response of this pathology are still undefined.

In the present work we studied the relevance of different innate immune receptors in the development of the disease, through a murine model of VVC. Likewise, it was one of our aims to study the participation of β -Defensins during the course of *C. albicans* vaginal infection.

Our results show a protective role of TLR2 and MyD88-mediated signals in the vaginal infection by *C. albicans*, to the control of tisular invasion and the associated inflammatory response. Dectin-1 innate immune receptor demonstrated to be important during VVC, contributing to the correct recognition of the fungus and restricting the inflammation.

We demonstrate that the constitutive antimicrobial peptide β -Defensin 1 is augmented during *C. albicans* vaginal infection.

Results from our study with VVC and RVVC patients allowed us to establish clinical and epidemiological characteristics of these diseases in our city. Through the evaluation of cervicovaginal lavage from these patients we found a different profile in the immune mediators such as cytokines and antimicrobial peptides, which provides new evidence of the immunopathogenic mechanisms that underlie in the recurrence of RVVC.

Finally, the use of an *in vitro* model of *Candida*-epithelial cell from the female genital tract interaction let us establish the signals involved in the modulation of β -Defensin 1.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	4
Candidiasis Vulvovaginal	5
Distribución de especies.....	5
Factores predisponentes	6
<i>Candida albicans</i> : un patógeno particular	7
Características generales.....	7
Composición de la pared celular.....	8
Factores de virulencia	9
Reconocimiento inmune y respuesta inmune efectora frente a <i>C. albicans</i>	11
Receptores innatos y activación de la respuesta inmune.....	11
Mecanismos inmunes efectores frente a <i>C. albicans</i>	16
Errores genéticos y susceptibilidad a las infecciones por <i>Candida</i>	18
Respuesta inmune a <i>C. albicans</i> en tracto genital femenino.....	20
Péptidos Antimicrobianos	23
BDs e inmunidad	24
Mecanismo de acción	25
OBJETIVOS	28
RESULTADOS.....	30
CAPÍTULO I.....	31
Establecimiento del modelo murino de infección vaginal por <i>C. albicans</i>	33
Invasividad y respuesta tisular durante la infección vaginal por <i>C. albicans</i>	37
Participación de receptores de la inmunidad innata en la patogenia de la CVV	40
Contribución de la vía de señalización del receptor innato TLR2 en la patogenia de la CVV	40

Contribución de la vía de señalización de la molécula adaptadora MyD88 en la patogenicidad de la CVV	43
Contribución de la vía de señalización del receptor innato Dectin-1 en la patogenicidad de la CVV.....	46
Susceptibilidad a la CVV en animales infectados con cepas de <i>C. albicans</i> defectivas en la expresión de β -glucanos.....	49
Susceptibilidad a la CVV en animales deficientes en el receptor Dectin-1	53
CONCLUSIONES CAPÍTULO I	56
CAPÍTULO II.....	58
Expresión de BDs en tracto genital femenino murino durante la CVV.....	59
Expresión de BD1 en tracto genital femenino murino durante la CVV	60
Contribución de la señal del receptor innato TLR2 en la expresión de BD1 en tracto genital femenino murino durante la CVV.....	62
Expresión de BD1 en tracto genital femenino murino durante la infección con una cepa clínica aislada de una paciente con CVVR	64
CONCLUSIONES CAPÍTULO II.....	69
CAPÍTULO III.....	70
Estudio en pacientes	72
Caracterización del estudio en pacientes.....	73
Caracterización del agente causal.....	75
Estudios inmunológicos.....	78
Niveles de citoquinas intravaginales	79
Niveles de citoquinas séricas	80
Estudio de PAMs de la familia de BDs en pacientes con CVV.....	81
Estudios <i>in vitro</i>	86
Caracterización del modelo <i>in vitro</i> de CVV	86
Regulación de hBD1 <i>in vitro</i>	90

Efecto de diferentes estímulos sobre la producción de hBD1 en CE	90
Efecto de <i>C. albicans</i> sobre la producción de hBD1 en CE	92
CONCLUSIONES CAPÍTULO III.....	95
DISCUSIÓN	96
Respuesta inmune local según magnitud del inóculo infeccioso y característica de la cepa de <i>C. albicans</i>	102
Participación de PRRs en la patogenia de la CVV	104
Contribución de la vía de señalización de TLR2 en la patogenia de la CVVR	104
Contribución de la vía de señalización de MyD88 en la patogenia de la CVVR	107
Contribución de la vía de señalización de Dectin-1 en la patogenia de la CVVR	109
Estudio en pacientes con CVVA y CVVR	113
Perfil de virulencia de los aislados clínicos de pacientes con CVVA y CVVR.....	115
Estudios inmunológicos en pacientes	117
β-Defensinas durante la Candidiasis Vulvovaginal	120
MATERIALES Y MÉTODOS.....	126
Animales	127
Cepas de <i>Candida</i>	127
Condiciones de crecimiento de <i>Candida</i>	128
Modelo murino de Candidiasis Vulvovaginal	128
Infección vaginal	128
Lavados vaginales.....	129
Unidades Formadoras de Colonias en lavado vaginal	129
Citoextendidos	129
Tinción de May-Grünwald Giemsa.....	129
Análisis histológico	130
Inmunohistoquímica	130
Cuantificación de citoquinas	131

Modelo animal: Lavado vaginal	131
Pacientes: Lavado cervicovaginal y suero.....	131
Concentración de muestras de pacientes	131
Inmunofluorescencia	132
Citometría de flujo	132
Células de lavado vaginal de ratón	132
Células Epiteliales humanas en cultivo	133
Biología Molecular	133
Extracción de ARN.....	133
Tratamiento con ADNasa y Retrotranscripción.....	134
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en Tiempo Real	134
Análisis para la cuantificación relativa de genes	135
Pacientes	135
Toma de muestras.....	137
Estudios inmunológicos realizados en muestras de pacientes	137
Estudios realizados en aislado clínicos de pacientes	137
Identificación de las levaduras.....	137
Estudio de factores de virulencia	138
Capacidad formadora de Biofilm	138
Estudio de la actividad lipolítica.....	138
Estudio de la actividad de Sap.....	139
Ensayo de hidrofobicidad de la superficie celular (HSC)	139
Estudios <i>in vitro</i>	140
Cultivo de células epiteliales con estímulos	140
Determinación de la viabilidad celular y crecimiento fúngico	140
Determinación de daño celular	141

Producción Especies Reactivas de Oxígeno (ERO)	141
Análisis Estadístico	142
BIBLIOGRAFÍA	143
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.....	156

ABREVIATURAS

AAS: Ácido Acetilsalicílico

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario.

Als: Aglutininas fúngicas (del inglés: *Agglutinin-Like Sequence*)

AP-1: Proteína Activadora 1 (del inglés: *Activator Protein-1*)

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

Bcl10: del inglés *B-cell lymphoma/leukemia 10*

BD: Beta Defensina

CARD9: del inglés *Caspase Recruitment Domain Family, member 9*

CCR2: Receptor de quemoquinas tipo C-C 2

CCR6: Receptor de quemoquinas tipo C-C 6

CD: Célula Dendrítica

CD4: Cluster de diferenciación 4 (del inglés: *cluster of differentiation 4*)

CE: Célula Epitelial

CLR: Receptor de Lectinas Tipo C (del inglés: *C-Type Lectin Receptor*)

CMC: Candidiasis Mucocutánea Crónica

CREB: del inglés *cAMP Responsive Element-Binding Protein*

CVV: Candidiasis Vulvovaginal

CVVA: Candidiasis Vulvovaginal Aguda

CVVR: Candidiasis Vulvovaginal Recurrente

DC-SIGN: del inglés *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*

pi: Post infección.

EDTA: Ácido etildiaminotetraacético

EGFR: Receptor de Factor de Crecimiento Epidermal (del inglés: *Epidermal Growth Factor Receptor*)

ELISA: Enzimoimmunoanálisis (del inglés: *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*)

ERO: Especies Reactivas del Oxígeno

ESM: Error estándar de la media

- IFN- γ** : Interferón-gamma
- IL- R**: Receptor de Interleuquina
- IL-**: Interleuquina
- ILC**: Célula linfoide innata (del inglés: *Innate Lymphoid Cell*)
- iNOS**: Óxido Nítrico Sintasa Inducible (del inglés: *inducible Nitric Oxide Sintase*)
- ITAM**: del inglés *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*
- iv**: Intravaginal
- KO**: del inglés *knock-out*.
- Li**: Linfocito
- Lip**: Lipasa
- LPS**: Lipopolisacárido
- MAL**: Adaptador Tipo MyD88 (del inglés *MyD88-Adapter-Like*)
- MALT1**: del inglés *Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1*
- MAP**: Proteína activada por mitógenos (del inglés *Mitogen-Activated Protein*)
- MyD88**: Factor de Diferenciación Mieloide 88 (del inglés *Myeloid Differentiation factor 88*)
- NADPH**: del inglés *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*
- NETs**: Trampas extracelulares de neutrófilos (del inglés *Neutrophil Extracellular Tramps*)
- NF-kB**: Factor nuclear kappa B (del inglés: *Nuclear factor kB*)
- NK**: Células *Natural Killer*
- NKT**: Células T tipo NK
- NLR**: Receptor tipo NOD (del inglés *NOD Like Receptors*)
- NLRP3**: del inglés *Nucleotide oligomerization domain like receptor family, pyrin domain containing 3*
- PAM**: Péptido Antimicrobiano
- PAMP**: Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (del inglés *Pathogen Associated Molecular Patterns*)
- PBS**: Buffer fosfato salino
- PCR**: Reacción en cadena de la polimerasa
- PE**: Ficoeritrina (del inglés: *phycoerithrin*)
- pi**: Post-infección
- PMN**: Polimorfonuclear neutrófilo
- PRR**: Receptor de Reconocimiento de Patrones (del inglés *Pattern Recognition Receptor*)

RT: Transcripción Reversa

Sap: Aspartato proteinasa (del inglés *secreted aspartyl proteinases*)

SNP: polimorfismo de un solo nucleótido (del inglés *Single Nucleotide Polymorphism*)

STAT-1: Factor transductor y activador de la transcripción 1 (del inglés *Signal Transducer and Activator of Transcription*)

Syk: Tirosin Kinasa de Bazo (del inglés *Spleen tyrosine Kinase*)

TA: Temperatura ambiente

TGF- β : Factor de crecimiento transformable beta (del inglés *Transforming Growth Factor β*)

Th: Linfocitos T CD4⁺ cooperadores (del inglés *T helper lymphocytes*)

TIR: del inglés *Toll/Interleukin-1 Receptor*

TLR: Receptor Tipo Toll (del inglés *Toll Like Receptor*)

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa (del inglés *tumor necrosis factor alpha*)

TRIF: del inglés *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

WT: Ratones C57BL/6 (del inglés *Wild Type*)

INTRODUCCIÓN

Candidiasis Vulvovaginal

La infección vaginal por especies de *Candida*, conocida como Candidiasis Vulvovaginal (CVV), constituye una enfermedad inflamatoria aguda y una razón frecuente de consulta ginecológica. Afecta al 75% de las mujeres en edad reproductiva al menos una vez en su vida ¹⁻³. Esta patología es la segunda causa más común de infecciones vaginales, antecedida por las vaginosis bacterianas.

Los síntomas clínicos no son específicos y pueden ser asociados a una gran variedad de infecciones vaginales. Los más frecuentes son prurito y quemazón vulvar, acompañado de enrojecimiento, irritación y secreción vaginal ⁴.

La forma recurrente de esta micosis, conocida como CVV Recurrente (CVVR) se define por la presencia de al menos cuatro episodios sintomáticos en los últimos doce meses ^{1, 5, 6}. En un estudio reciente que incluyó a 6000 mujeres de 5 países (Alemania, Francia, Italia, Reino Unido y Estados Unidos), Foxman y col. ⁷ determinaron que la prevalencia de la CVVR es del 9% y la probabilidad de que la CVV progrese a su forma recurrente es alta. Los datos globales permiten estimar que esta forma de micosis afecta aproximadamente a 138 millones de mujeres anualmente en el mundo ⁶. Debido a sus características, esta patología es más severa por la recurrencia de los síntomas y su naturaleza refractaria a los tratamientos convencionales. La terapia recomendada es el uso de drogas antifúngicas como fluconazol que a largo plazo puede prolongar los periodos asintomáticos, pero no provee una cura ^{1, 5}. Las mujeres que padecen CVVR tienen una calidad de vida disminuida, impactando de manera negativa en su desempeño social y laboral, por lo que esta patología cobra relevancia en la salud pública ^{1,6}.

Distribución de especies

Generalmente, una sola especie de *Candida* es identificada como responsable de la patología, pero en una minoría de cultivos vaginales (2-5%) se han aislado dos o más especies del hongo ⁴. De las cepas de levaduras aisladas de vagina un 85-95% corresponden a *C. albicans* ^{8, 9} y entre los aislados restantes, clasificados como *Candida no-albicans*, *C. glabrata* es la más frecuente. Mujeres con diabetes mellitus tipo II son más propensas a estar colonizadas por esta especie. Pese a ser poco frecuente, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y

C. krusei también son identificadas como agentes etiológicos de esta patología. La CVV producida por estas especies es clínicamente indistinguible de la causada por *C. albicans*⁹.

Factores predisponentes

Una variedad de factores de riesgo, propios del hospedador o asociados a su comportamiento, están claramente relacionados con la aparición de CVV, debido a la naturaleza oportunista de esta micosis. Los episodios sintomáticos son causados por el crecimiento desmedido de *Candida*⁴.

A nivel del tracto genital femenino el crecimiento de este hongo oportunista se encuentra regulado por la flora residente, principalmente compuesta por bacilos Gram-positivos del género *Lactobacillus*. Dentro de los mecanismos por los cuales los lactobacilos mantienen estable la composición de la microbiota vaginal se encuentran la producción de compuestos antimicrobianos (peróxido de hidrógeno, ácido láctico y sustancias tipo bacteriocinas), la competencia por los sitios de adhesión al epitelio vaginal y el mantenimiento de un pH ácido^{10, 11}. Recientemente, Parolin y col.¹² demostraron que diferentes especies de lactobacilos aislados de mujeres sin síntomas de CVV presentan actividad fungicida y fungistática contra *C. albicans* y además tienen la capacidad de disminuir la adhesión del hongo a la línea celular de epitelio cervical humano, HeLa. En este sentido, los diferentes cambios que comprometen el delicado equilibrio de la microbiota local favorecen el establecimiento de la infección. Los episodios de CVV generalmente ocurren luego del uso de antibióticos de amplio espectro como consecuencia del impacto de estos fármacos sobre la flora normal del tracto reproductor femenino⁹⁻¹¹.

La disponibilidad de nutrientes en este nicho mucoso constituye un factor relevante. En pacientes diabéticas, los altos contenidos en glucosa favorecen la colonización del tracto genital. Por otra parte, elevados niveles de estrógeno también constituyen una causa predisponente importante ya que incrementan el contenido de glucógeno en las células epiteliales (CE) vaginales, proporcionando una abundante fuente de carbono para *Candida*. También se demostró que el estrógeno aumenta la adherencia del hongo a la superficie de las células que conforman este tracto mucoso. Es por ello que el uso de anticonceptivos orales con alto contenido de estrógenos y el embarazo son factores que predisponen al sobrecrecimiento del patógeno^{9, 13, 14}. Otro hecho que pone en evidencia la

importancia de las hormonas reproductivas en la presentación de la enfermedad es que la CVV rara vez ocurre previo a la menarquía o luego de la menopausia ⁴.

Los factores que determinan qué mujer sufrirá la transición de CVV esporádica a CVVR son aún desconocidos. En la mayoría de los casos, las mujeres no presentan ninguno de los factores de riesgo conocidos asociados a la patología sugiriendo una posible predisposición genética ^{1, 15}. En los últimos años son numerosas las investigaciones que reportan asociaciones entre la CVVR con mutaciones o fallas en el sistema inmune de estas pacientes. Las evidencias señalan un predominio de mutaciones en los receptores de la inmunidad innata y en sus vías de señalización ¹⁶⁻²⁶. Estos conceptos serán profundizados más adelante.

***Candida albicans*: un patógeno particular**

Características generales

Una de las características distintivas de *C. albicans* lo constituye su naturaleza saprófita y su habilidad de sobrevivir en el hospedador. Este hongo es el único microorganismo capaz de colonizar, infectar y persistir en las superficies mucosas y evadir los mecanismos de inmunovigilancia locales ²⁷. *C. albicans* es un comensal habitual de estas superficies y debido a ello la transición entre su estado comensal a patogénico ocurre en la interfaz entre el hongo y las CE del tejido mucoso. En los últimos años, el avance del conocimiento sobre las características de este patógeno en cuanto a la producción de factores de virulencia y la respuesta protectora produjo un cambio significativo en la comprensión de la interacción patógeno-hospedador en esta micosis ²⁸⁻³⁰. En el caso de este patógeno que posee la capacidad de colonizar diferentes tejidos, cobran importancia las características del sitio infectado y los mecanismos de respuesta locales ³¹. Durante los procesos de invasión e infección ocurren numerosos eventos transcripcionales relacionados a la morfogénesis, expresión de moléculas y producción de factores de virulencia. La evidencia experimental también indica que *C. albicans* posee la capacidad de regular diferencialmente sus genes en un proceso de adaptación al nicho biológico que coloniza ³²⁻³⁴ y de exhibir un perfil particular de factores de virulencia de acuerdo a que la infección ocurra en la mucosa oral, gastrointestinal o vaginal ³¹.

Composición de la pared celular

La integridad estructural de la pared de *Candida* es crítica para la supervivencia en su medio natural, participando activamente en los procesos de adhesión, contribuyendo a la estabilidad morfológica y actuando como barrera de resistencia frente a las drogas antifúngicas, la mayoría de las cuales tienen como blanco diversas estructuras de la pared. La gruesa pared constituye el 30% del peso seco de la célula y está compuesta por β -(1,3) (40%) y β -(1,6) glucanos (20%), quitina (5%), correspondiendo el porcentaje restante a otras proteínas fuertemente manosiladas y lípidos^{35,36}.

Los β -glucanos, componentes mayoritarios de la pared, son biosintetizados por el complejo enzimático 1,3- β -D Glucan Sintasa, el cual presenta al menos dos subunidades, Fksp y Rho1p. La subunidad Fksp está codificada por tres genes relacionados, *FKS1*, *FKS2* y *FKS3* y contiene el sitio activo³⁷. Mutaciones en *FKS1*, conducen a cepas con deficiencia en la expresión de β -(1,3) glucanos en la pared fúngica y están asociadas a la resistencia a drogas de la familia de las equinocandinas³⁸.

La capa externa es rica en proteínas y mananoproteínas y ha sido relacionada a la patogenicidad, adherencia y fagocitosis. Dentro de ella, varias adhesinas fúngicas fueron identificadas y son las responsables de la interacción con proteínas del hospedador como laminina, fibrinógeno y el C3d del Complemento (Figura 1). El componente glucídico organizado en polímeros conforma el exoesqueleto, que constituye un verdadero andamiaje que le otorga rigidez a la pared y determina su forma³⁶. Varias de estas estructuras han sido clasificadas como PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*)²⁷, haciendo referencia a estructuras altamente conservadas durante la evolución, relevantes para la supervivencia del patógeno. Los PAMPs son reconocidos por receptores de la inmunidad innata presentes en las células del hospedador, agrupados bajo el nombre genérico PRRs (*Pattern Recognition Receptors*). El reconocimiento de los patógenos por medio de estos sensores promueve una rápida respuesta local, capaz de gatillar mecanismos efectores o condicionar el perfil de la respuesta inmune adaptativa. El equilibrio que existe entre protección/infección resulta a su vez, del complejo balance molecular entre los componentes del hongo accesibles al hospedador y de los receptores innatos gatillados en la célula del hospedador ante el encuentro con el patógeno^{27,39,40}. La mayor evidencia sobre estas interacciones proviene de estudios de infecciones sistémicas y poco se conoce sobre el impacto y la contribución del reconocimiento de los PAMPs fúngicos a nivel del tracto genital femenino^{5,41}.

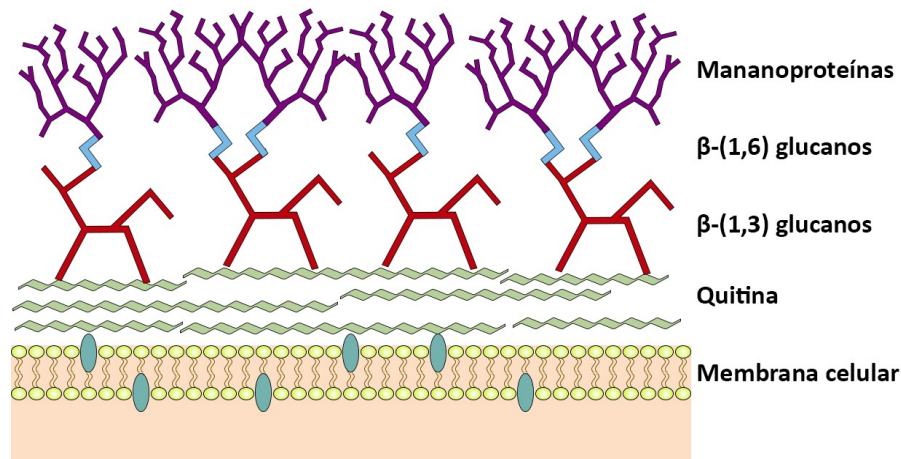


Figura 1. Composición de la pared celular de *Candida albicans*. Principales componentes de la pared celular de *C. albicans* y su distribución. β -(1,3), (1,6) glucanos y quitina son los componentes estructurales principales ubicados en las capas más internas de la pared celular (Adaptado de Cowen 2008 ⁴²).

Factores de virulencia

C. albicans es un microorganismo pleomorfo que puede existir en forma de levadura, durante una relación de comensalismo con el hospedador. Sin embargo, para establecer una infección debe cambiar a la forma hifal, transición que se considera el mayor factor de virulencia de *C. albicans* ⁴³⁻⁴⁵. Este cambio morfológico se encuentra regulado por una compleja red de elementos sensores que detectan cambios en el microambiente y que están acoplados a factores de transcripción regulatorios que codifican para la formación de la hifa, producción de adhesinas, generación de enzimas hidrolíticas y factores asociados a la formación del biofilm ⁴⁶. El mayor cúmulo de conocimiento deriva de experiencias realizadas con cepas que presentan mutaciones por delección o inserción. Estos tipos de estudios demostraron que las adhesinas, en particular la Als3 (*Agglutinin-Like Sequence*), desempeñan un rol importante en la patogenia de la CVV facilitando la adherencia del hongo al epitelio vaginal ⁴³.

Durante la infección vaginal en modelos *in vivo* y *ex vivo* es frecuente observar las hifas del hongo fuertemente adheridas a la superficie cornificada del epitelio vaginal e incluso infiltrando el estrato subepitelial ^{43, 47, 48}.

La formación de biofilm le confiere a *Candida* diferentes características que aumentan su patogenicidad: a) el crecimiento del hongo embebido en una matriz rica en exopolisacáridos dificulta la penetración de las drogas antifúngicas, generando resistencia; b)

modifica la interacción entre el hongo y la CE, impidiendo el adecuado reconocimiento y activación de los mecanismos innatos y la respuesta inflamatoria; y c) torna ineficientes los mecanismos inmunes de defensa evadiendo de esta manera la respuesta del hospedador ^{49, 50}. La formación de biofilm sobre la mucosa vaginal ha sido reportada en modelos *in vivo* de CVV, en modelos *ex vivo* de tejido vaginal reconstituido y en cultivos *in vitro* de líneas de CE y el hongo ^{51, 52}. Al presente, y a diferencia de lo que ocurre con *Gardnerella vaginalis*, no existen estudios concluyentes realizados en biopsias de tejidos de pacientes con CVV y CVVR que evidencien la formación de biofilm de *Candida* ^{6, 53}. A pesar del avance de los conocimientos en esta temática, el rol del biofilm en la patogenia de la CVVR constituye una desafiante área de trabajo.

Dentro de los factores de virulencia de este hongo, la producción de enzimas hidrolíticas, su regulación y los mecanismos por los cuales ejercen su función son objeto de estudio desde hace mucho tiempo. La evidencia clínica y experimental demuestra que las Sap (*Secretory aspartyl proteinases*) desempeñan múltiples roles en la vaginitis por *Candida* ^{51, 54}. Al menos 10 son los genes que codifican esta familia de exoenzimas (*Sap1-Sap10*) y su expresión puede ser diferencialmente regulada por cambios en el microambiente, como el pH, presencia de un determinado morfotipo y etapa del proceso infeccioso ⁵⁵. Se observó que el fluido vaginal de mujeres con CVV y CVVR presentan mayor concentración de una o varias Sap ⁵⁶. En ensayos *in vitro*, los aislados clínicos de estas pacientes también produjeron mayor cantidad de Sap comparado con las cepas provenientes de pacientes asintomáticas. Respecto a los mecanismos por los cuales las Sap participan en la patogenia de la CVV y CVVR, el consenso indica que dos mecanismos no necesariamente excluyentes pueden estar actuando. Uno está relacionado directamente con la actividad enzimática de las Sap y su capacidad de degradar tanto elementos importantes en la estabilidad de las CE del tracto mucoso como diferentes mediadores inmunes solubles. El otro mecanismo recientemente descrito es la activación del inflammasoma NLRP3 (*Nucleotide oligomerization domain like receptor family, pyrin domain containing 3*), estructura multimérica fundamental en la producción de Interleuquina (IL) 1 β , citoquina clave en la patogenia de la vaginitis por *Candida* ⁵⁷⁻⁵⁹. Gabrielli y col. reportaron que las enzimas Sap2 y Sap6 de *C. albicans* participan en la activación del inflammasoma NLRP3. Ambos mecanismos convergen en la inducción y producción de mediadores inmunes como alarminas, péptidos antimicrobianos

(PAMs) y reclutamiento de poblaciones celulares, actores esenciales en el proceso que conlleva a la inflamación local ⁶⁰.

Además de las Sap, otro grupo de enzimas hidrolíticas producidas por *Candida*, lo constituyen las Lipasas (Lip), cuya familia también está compuesta por 10 miembros (Lip1-Lip10). Estas enzimas tienen la capacidad de hidrolizar lípidos, permitiendo el crecimiento de *Candida* donde esta es la única fuente de carbono ^{61, 62}. Sin embargo, hay evidencias de que la función de estas enzimas excede los aspectos meramente nutricionales. La liberación de ácidos grasos puede cambiar el pH del medioambiente en el que se encuentran, resultando en la optimización de otras enzimas fúngicas, como las Sap ⁶³. Además se ha descrito que cepas de *C. albicans* carentes de Lip8 son menos virulentas en un modelo murino de infección diseminada ⁶⁴. Al momento el rol de las Lip como factor de virulencia durante la CVV no ha sido estudiado.

Reconocimiento inmune y respuesta inmune efectora frente a *C. albicans*

Receptores innatos y activación de la respuesta inmune

En el reconocimiento de los PAMPs de *Candida* intervienen tres familias de PRRs. Ellas son: Receptores Tipo Toll (TLRs, *Toll Like Receptors*), Receptores de Lectinas Tipo C (CLRs, *C-Type Lectin Receptors*) y los Receptores Tipo NOD (NLRs, *NOD Like Receptors*) ⁶⁵⁻⁶⁸ (Figura 2).

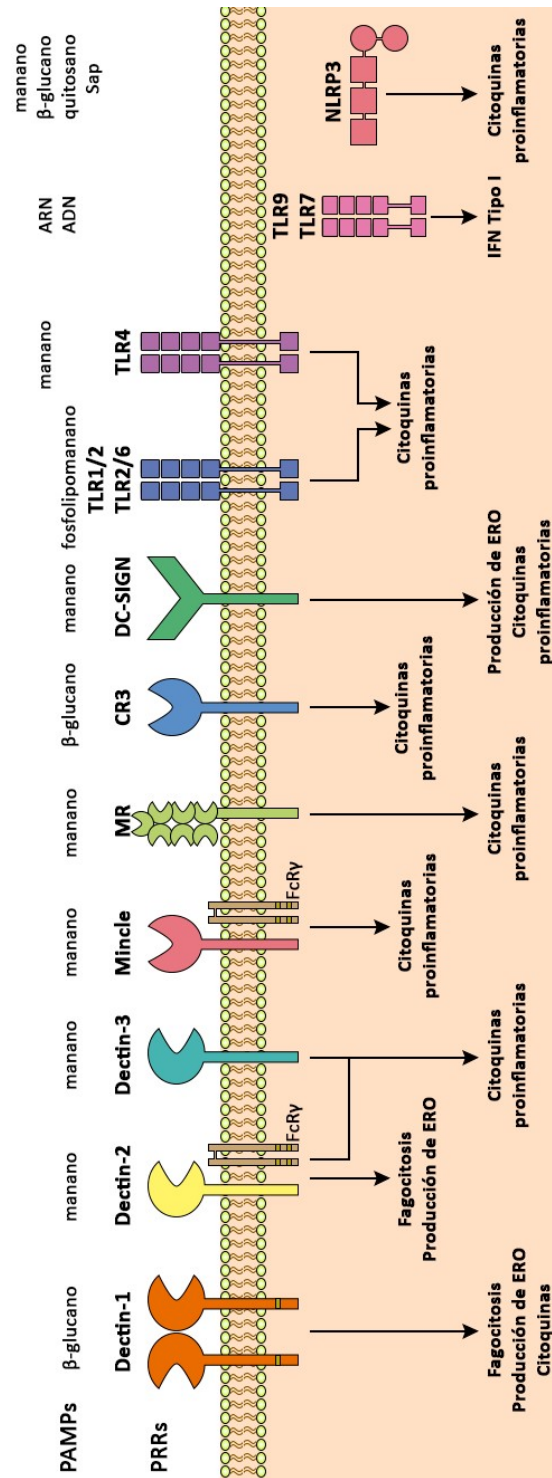


Figura 2. Receptores de Reconocimientos de Patrones involucrados en la interacción con *C. albicans*. Receptores de las familias TLR, CLR y NLR presentes en diferentes poblaciones celulares involucrados en el reconocimiento de PAMPs de *C. albicans*. Luego de contactar con sus ligandos y a través de diversas vías de señalización, se producen diferentes eventos biológicos en las células blanco tales como inducción de fagocitosis, producción de Especies Reactivas del Oxígeno (ERO) y secreción de citoquinas (Adaptado de Miró 2016⁴⁰).

Generalmente los PRRs no actúan en forma independiente, y es frecuente encontrar respuestas en las cuales intervienen más de uno de ellos y redundancia en las vías de activación^{40, 69}.

La familia de los TLRs ha sido ampliamente estudiada en cuanto al reconocimiento fúngico. Esta familia está compuesta por 10 miembros de receptores transmembrana que reconocen diversos ligandos. Se pueden clasificar en dos grupos, dependiendo de su ubicación. Un grupo, el cual incluye a TLR1, 2, 4, 5 y 6, se localiza en la membrana plasmática de las células, mientras que el otro grupo, que incluye a TLR3, 7 y 9 se localiza en compartimentos intracelulares como endosomas^{66, 68, 69}.

Luego de contactar con su ligando, los TLRs reclutan proteínas adaptadoras que contienen al dominio TIR (*Toll/Interleukin-1 Receptor*) a la porción citoplasmática del TLR. A través de la interacción de estos dominios TIR, se induce la activación de cascadas de kinasas, llevando a la activación de factores de transcripción como NF- κ B (*Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), AP-1 (*Activator Protein-1*), CREB (*cAMP Response Element-Binding*) y a la familia de factores reguladores de interferón. Este proceso induce la expresión de genes y la producción de diferentes citoquinas como por ejemplo IL-1 β , IL-6 y TNF- α (Factor de Necrosis Tumoral- α , *Tumor Necrosis Factor α*), quemoquinas y moléculas requeridas para la presentación antigénica y la coestimulación. Ejemplos de las moléculas adaptadoras son MyD88 (*Myeloid Differentiation factor 88*) y MAL (*MyD88-Adapter-Like*) entre otras^{66, 69, 70} (Figura 3).

Diferentes PAMPs de *Candida* son reconocidos por la familia TLR: TLR2, reconoce fosfolipomananos, TLR4 estructuras ricas en mananos, TLR7 reconoce el ARN fúngico y TLR9 al ADN de *Candida* (Figura 2).

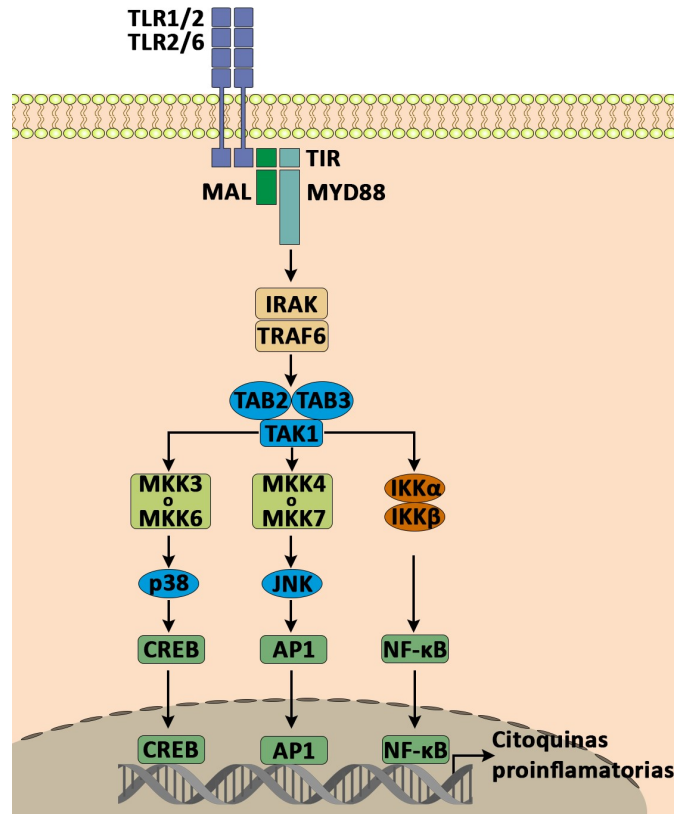


Figura 3. Vía de señalización de TLR2. Los heterodímeros TLR1/TLR2 o TLR2/TLR6 se unen a sus respectivos ligandos sobre la superficie celular. Los dominios TIR de los TLRs se acoplan a dominios TIR presentes en proteínas adaptadoras (MyD88, MAL). Luego de una cascada de fosforilaciones, uno de los factores de transcripción más importantes activados por estas vías es NF- κ B. La principal consecuencia de la señalización a través de los TLRs es la inducción de citoquinas proinflamatorias IL-1 β , TNF- α e IL-6 (Adaptado de Strober 2006 ⁷¹).

Los TLRs pueden actuar como homodímeros o heterodímeros (las asociaciones más comunes son TLR1/TLR2 y TLR2/TLR6) y pueden colaborar con otros PRRs no TLRs en el reconocimiento de ligandos o en la iniciación de señales intracelulares de activación ^{66, 69, 70}.

Los CLRs y sus vías de señalización son esenciales para la inmunidad antifúngica. Forman parte de una superfamilia heterogénea de proteínas solubles y transmembrana que se definen por la característica de poseer un dominio de Lectina Tipo C. Dentro de esta familia el receptor más estudiado es Dectin-1, que posee como ligando los β -(1,3) glucanos de la pared del hongo ^{65, 72, 73}.

Este receptor es expresado principalmente por células mieloides y tiene asociadas complejas vías de señalización intracelulares, de las cuales la mejor caracterizada es la de Syk-CARD9 (*Spleen tyrosine Kinase/Caspase Recruitment Domain Family, member 9*), en la cual la tirosina del inmunoreceptor ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*)

es fosforilada por la familia de kinasas Src luego del reconocimiento de β -(1,3) glucanos. Los eventos de fosforilación permiten el reclutamiento de las kinasas Syk y la formación del complejo molecular compuesto por CARD9, Bcl10 (*B-cell lymphoma/leukemia 10*) y MALT1 (*Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1*). La cascada de señalización es responsable de la activación y translocación de diversos factores de transcripción al núcleo (NF- κ B, AP-1). Estas vías producen una diversidad de respuestas celulares, incluyendo la fagocitosis, producción de citoquinas, estallido respiratorio y activación del inflamasoma^{65, 72, 73} (Figura 4).

Los demás miembros de la familia, como el Receptor de Manosa, Dectin-2, DC-SIGN (*Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*), Mincle, entre otros, reconocen otras estructuras glucídicas como manosa presentes en la pared de *Candida*^{73, 74}.

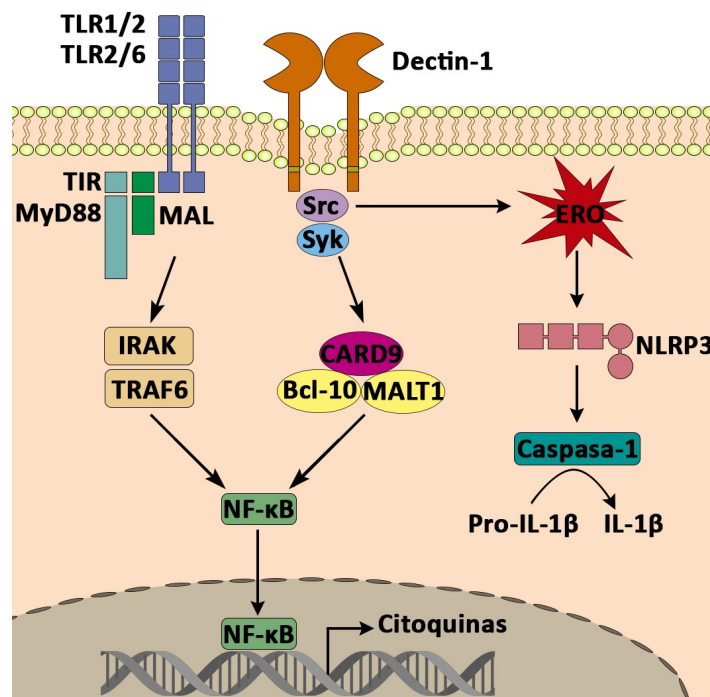


Figura 4. Vía de señalización de Dectin-1. Dectin-1 reconoce selectivamente a β -(1,3) glucanos e induce la fosforilación de Syk por la tirosin quinasa Src. Así Syk es activada y promueve la formación del complejo CARD9-Bcl10-MALT1. Este complejo media la activación del factor de transcripción NF- κ B y la producción de citoquinas proinflamatorias. El reconocimiento de Dectin-1 también sinergiza con el reconocimiento a través del heterodímero TLR2/TLR6. Otra consecuencia de la señalización vía Dectin-1 es la activación del inflamasoma NLRP3, quien media la conversión de pro-IL-1 β a su forma biológicamente activa (Adaptado de Drummond 2011⁷⁵).

Los NLRs se encuentran en el citosol celular. El receptor más estudiado de esta familia es el NLRP3, que forma parte del inflamasoma, un complejo multiproteico citoplasmático con actividad enzimática involucrado en la inducción de IL-1 β e IL-18. La inducción de la actividad de Caspasa-1, enzima proteolítica activada por el inflamasoma, es la responsable de clivar la pro-IL-1 β para dar origen a la molécula activa de IL-1 β . La transcripción de la pro-IL-1 β está asociada a señales generadas a partir de TLR2/TLR4 y Dectin-1, y la liberación de la IL-1 β a la actividad de los inflasomas⁷⁶. NLRP3 se encuentra expresado en macrófagos, monocitos, Células Dendríticas (CD) y CE. Debido a su rol en la producción de IL-1 β estos receptores cobran relevancia en la respuesta inmune antifúngica^{58, 60}.

Mecanismos inmunes efectores frente a *C. albicans*

El reconocimiento de los patógenos fúngicos a través de los receptores innatos conduce a la inmediata activación de los mecanismos inmunes efectores, reclutamiento de poblaciones celulares, producción de citoquinas, inducción de fagocitosis y activación de mecanismos fungicidas. Diferentes poblaciones celulares que forman parte de la inmunidad innata contribuyen a la respuesta antifúngica como los polimorfonucleares neutrófilos (PMN), los monocitos, los macrófagos, las CD, las células NK (*Natural Killer*) y las recientemente clasificadas como células linfoides innatas (ILC, *Innate Lymphoid Cells*). Algunas de estas poblaciones actúan en forma directa sobre el hongo provocando su muerte y otras mediante la producción de mediadores inmunes. Los mecanismos efectores innatos contienen al patógeno durante la maduración de la respuesta inmune adaptativa y la definición hacia un perfil celular o humoral más apropiado para la protección^{40, 69}.

La función efectora de los fagocitos incluye la muerte y la inhibición del crecimiento del hongo, así como la activación de mecanismos que contrarresten su infectividad, incluyendo efectos sobre el dimorfismo y el cambio de fenotipo. Aunque la actividad antifúngica es intrínseca a las células fagocíticas, ésta puede ser amplificada por moléculas como las opsoninas y las citoquinas derivadas de los Linfocitos (Li) T. La combinación de mecanismos oxidativos y no-oxidativos como la degranulación y liberación intracelular o extracelular de moléculas efectoras, secuestro de iones, etc. son utilizados por estas células para dañar al patógeno. Enzimas como la NADPH oxidasa (*Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) y la Óxido Nítrico Sintasa Inducible (iNOS, *inducible Nitric Oxide Sintase*) inician

las vías oxidativas y la producción de metabolitos microbicidas. El estallido respiratorio produce ERO que provocan peroxidación lipídica, modificación de proteínas y daño del ADN fúngico^{69, 77}.

Además de la eliminación del patógeno a través de las vías clásicas, otro mecanismo fungicida utilizado por los PMNs es la formación de NETs (*Neutrophil Extracellular Tramps*), verdaderas redes biológicas conformadas por ADN, histonas y proteínas antimicrobianas. Pacientes neutropénicos presentan severas manifestaciones clínicas durante la infección por *C. albicans* evidenciando la relevancia del rol protector de los neutrófilos en la respuesta a este hongo. Hallazgos clínicos y la evidencia experimental indican que, tanto alteraciones cuantitativas como cualitativas en esta población celular comprometen seriamente la respuesta del individuo frente a los patógenos fúngicos⁷⁸.

La inflamación es también un elemento clave en la infección fúngica. La respuesta inflamatoria en la que están presentes PMN, mediadores innatos y citoquinas proinflamatorias es fundamental para limitar la infección. Sin embargo, una inflamación exacerbada o no controlada puede contribuir al daño tisular y ser parte de los componentes inmunopatogénicos desencadenados durante las micosis^{27, 44}.

Para lograr una eliminación exitosa de los patógenos se requiere una respuesta coordinada entre la inmunidad innata y la adaptativa. Las CD, presentadoras de antígenos por excelencia, son el nexo que une ambas ramas de la inmunidad. Son capaces de captar y procesar antígenos provenientes de los patógenos y presentarlos en el contexto del Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase I o clase II a Li T vírgenes. De esta manera, mediante la secreción de citoquinas y la expresión de moléculas coestimuladoras, las CD promueven la diferenciación de Li T CD4⁺ vírgenes en células T cooperadoras (Th, *T helper*)⁶⁸.

Dentro de los Li T CD4⁺ se encuentran las células Th1, que se diferencian en presencia de la citoquina IL-12. Estas células orquestan la respuesta antifúngica a través de la liberación de IFN- γ (Interferón- γ) que produce la activación clásica del macrófago, evento que promueve el arresto del crecimiento de patógenos fúngicos intracelulares^{68, 69}. Esta citoquina también es importante en la activación y promoción de poblaciones linfoides innatas como células NK y NKT^{79, 80}.

Otro subtipo de Li T CD4⁺ son los Th17, que se diferencia en presencia de citoquinas como IL-1 β , IL-6 y TGF- β (*Transforming Growth Factor β*)^{81, 82}. La IL-23 es necesaria para la

expansión, el mantenimiento, y la función efectora de esta población celular. Las células Th17 se caracterizan por producir IL-17A, IL-17F, IL-22 e IL-26. Las citoquinas del perfil Th17 son importantes para las defensas antifúngicas del individuo puesto que promueven el reclutamiento y la función de los PMNs y por su efecto sobre otras poblaciones celulares, induciendo la liberación de alarminas, IL-37 y PAMs como las β -Defensinas (BD) entre otros⁶⁸. Además de estas células que forman parte de la inmunidad adaptativa, algunos linfocitos innatos como las células NKT, linfocitos T $\gamma\delta$ y las ILC3 producen IL-17 y cumplen importantes roles en la defensa a nivel de la mucosa^{69,83}.

Errores genéticos y susceptibilidad a las infecciones por *Candida*

Descubrimientos de polimorfismos o mutaciones genéticas en individuos que poseen una mayor susceptibilidad a las infecciones por *Candida*, han aportado nueva evidencia sobre los receptores, las citoquinas, las vías de señalización y los mecanismos efectores que participan en el control de la candidiasis en humanos.

La importancia de Dectin-1 en la defensa antifúngica en mucosas fue demostrada al comprobarse la asociación del polimorfismo Y238X en este receptor con la presencia de infecciones mucocutáneas por *Candida*, entre ellas CVVR. Este polimorfismo genera un codón de terminación temprano, produciendo que la forma mutante de Dectin-1 se exprese pobremente en los individuos que lo portan. Este fenómeno provoca un deficiente reconocimiento de β -(1,3) glucanos y una defectuosa producción de citoquinas como IL-17, IL-6 y TNF- α en monocitos de sangre periférica¹⁷ (Tabla 1). De manera interesante, el polimorfismo Y238X no se asocia a un riesgo aumentado de padecer candidiasis sistémica probablemente debido a que no afecta la fagocitosis ni la eliminación de *C. albicans* por parte de los leucocitos¹⁷.

La deficiencia humana de CARD9 es una inmunodeficiencia primaria autosomal recesiva causada por la mutación bialélica del gen *CARD9*, el cual codifica una proteína que se encuentra en la vía de señalización de diversos CLRs (Figura 4). Esta deficiencia está asociada al desarrollo espontáneo de severas infecciones fúngicas con localización primaria en piel y tejido subcutáneo, superficies mucosas y sistema nervioso central⁶⁷. Fue descrita por primera vez en 2009 en una numerosa familia consanguínea, cuyos miembros presentaban infecciones mucosas e infecciones sistémicas letales por especies de *Candida*¹⁶. En los últimos tres años se han reportado más de 15 mutaciones en *CARD9*, asociadas a gran

variedad de infecciones fúngicas, entre ellas las más frecuentes son causadas por *Candida*¹⁹⁻²¹.

En relación al receptor TLR2, el polimorfismo no sinónimo P631H está involucrado en un aumento en la susceptibilidad a la CVVR. Esto puede deberse a que la función del receptor se ve modificada, llevando a una reducción en la producción de IL-17 e IFN- γ en células mononucleares de sangre periférica, luego de la estimulación con *C. albicans*.^{22, 23}.

Lev-Sagie y col.²⁴ describieron una asociación entre polimorfismos en el gen que codifica al NLRP3 y la presentación de CVVR. Recientemente, los mismos investigadores²⁵ profundizaron en este hallazgo describiendo que el genotipo 12/9 del gen se encuentra presente de manera diferencial en pacientes con CVVR comparado con controles y que además la concentración de IL-1 β en lavado vaginal de las pacientes con este genotipo se halla aumentada de manera significativa.

A nivel de los mecanismos adaptativos se describió la asociación entre Candidiasis Mucocutánea Crónica (CMC) y ciertas inmunodeficiencias como el Síndrome Poliendócrino Autoinmune tipo-I, Síndrome de Hiper IgE, mutaciones en el gen STAT-1 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 1*), fallas en el receptor de la IL-17 y deficiencia en la IL-17F⁸⁴⁻⁸⁷. Estos defectos convergen en una respuesta defectuosa a nivel de los Li productores de IL-17, evidenciando su importancia en la respuesta a *C. albicans* a nivel de la mucosa.

También se reportó que la sustitución de un nucleótido en el gen que codifica a IL-4 provoca en las pacientes que la presentan niveles aumentados de esta citoquina, lo que lleva a una disminución en la producción de óxido nítrico por parte de los macrófagos lo que podría resultar en la mayor susceptibilidad a la CVVR observada en estos individuos⁸⁸.

La Tabla 1 incluye las mutaciones genéticas asociadas a la susceptibilidad de infecciones mucosas por *C. albicans* descritas hasta el momento. En su conjunto, estos hallazgos clínicos demuestran la importancia del rol de los PRRs en el reconocimiento del hongo y en el establecimiento de una eficiente respuesta antifúngica.

Tabla 1. Mutaciones genéticas asociadas a la susceptibilidad de infecciones mucosas por *C. albicans*

Gen	Mutación	Enfermedad
<i>IL-4</i>	C589T	CVVR
<i>CARD9</i>	Q295X	CMC, CVVR
<i>NLRP3</i>	Polimorfismos de longitud (Alelo 7)	CVVR
<i>CLEC7A</i>	Y238X	CMC, CVVR
<i>TLR2</i>	P631H	CVVR
<i>IL-17F</i>	S65L	CMC
<i>IL-17RA</i>	Q284X	Dermatitis por <i>C. albicans</i> , CVVR

CMC: Candidiasis Mucocutánea Crónica

CVVR: Candidiasis Vulvovaginal Recurrente

Respuesta inmune a *C. albicans* en tracto genital femenino

El rol establecido para la Inmunidad Mediada por Células en la protección frente a infecciones por *Candida* en mucosa oral, gastrointestinal y en la CMC, motivó la presunción que este tipo de respuesta era también crucial en la protección durante la infección vaginal⁸⁹. Sin embargo, la evidencia clínica demostró que mujeres con CVVR no presentaban defectos en esta rama de la respuesta inmune^{8, 41} y estudios en la actualidad avalan la relevante contribución de las células y los mediadores inmunes innatos en la respuesta local durante la vaginitis por *Candida*⁹⁰⁻⁹².

Varios componentes de la inmunidad innata poseen localizaciones claves en el tracto genital femenino y son importantes en el mantenimiento de la vigilancia inmunológica frente a los microorganismos, en los acuerdos básicos del comensalismo y en la protección durante la invasión. Diferentes poblaciones celulares como los PMN, macrófagos, CD, CE, células NK, Li T $\gamma\delta$ y las ILC, contribuyen activamente en la respuesta antifúngica local. Algunos de estos tipos celulares poseen carácter de residentes, mientras otros son reclutados en respuesta a los estímulos locales y su mecanismo de acción incluye un efecto directo sobre el hongo provocando su muerte o a través de la producción de mediadores inmunes^{5, 31}.

De todas las superficies mucosas del organismo, el tracto reproductor femenino tiene requerimientos especiales para su inmunoregulación, donde los elevados niveles de la citoquina antiinflamatoria TGF- β desempeñan un papel fundamental ^{8, 91}. Las CE conforman una barrera ininterrumpida en la mucosa vaginal que protege al tracto reproductor femenino de la infección con microorganismos patógenos y oportunistas (Figura 5). Por lo tanto, no es sorprendente el hecho de que estas células expresen PRRs capaces de sensor la presencia de microorganismos y enviar señales de activación para la secreción de mediadores inmunes ^{15, 77}.

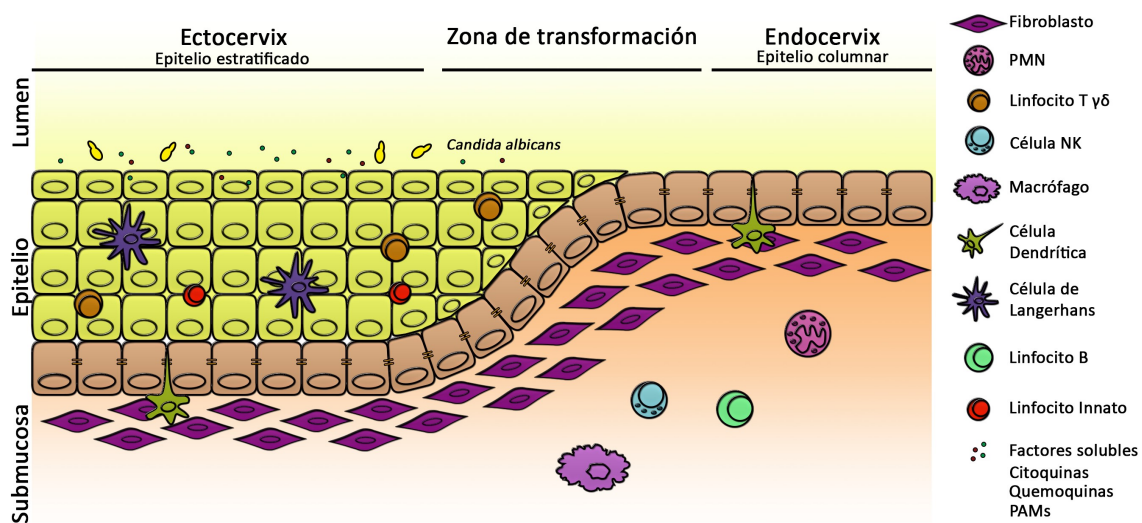


Figura 5. Tracto genital femenino y células de la inmunidad. El epitelio presente en vagina y ectocérnix es de tipo estratificado, compuesto por CE superficiales, intermedias y basales; mientras que el endocervix presenta epitelio columnar compuesto por una sola capa de células. La zona de transformación es donde ambos tipos de epitelios convergen. Sobre el epitelio estratificado del ectocérnix se encuentra una capa de mucus. Bajo el epitelio yace una gruesa capa de fibroblastos. Las células inmunes se encuentran a lo largo de todo el tracto. Algunas de ellas, como los Li T $\gamma\delta$, las ILC y las CD y células de Langerhans se encuentran entre las capas de células del epitelio estratificado, cumpliendo una función de vigilancia inmunológica. Otras células, como los macrófagos, NK, Li B y PMN se encuentran en la capa de fibroblastos y en la submucosa. Las CE se encuentran en contacto permanente con microorganismos presentes en la flora vaginal y ante determinadas señales producen factores solubles que liberan al medio, entre ellos citoquinas, quemoquinas y PAMs. En respuesta a estos mediadores pueden ser reclutadas otras poblaciones celulares que participan en los mecanismos locales de protección frente a agentes patogénicos (Adaptado de Miró 2017 ⁵).

Las CE producen un amplio espectro de PAMs que están presentes en forma constitutiva en las superficies mucosas, y responden rápidamente a la exposición de estímulos inflamatorios o patogénicos aumentando su concentración y variedad ^{93, 94}. La secreción de mediadores solubles como alarminas, PAMs, quemoquinas y citoquinas como la

IL-1 β , IL-6, IL-8, y TNF- α están involucradas activamente en la fase inicial de la respuesta y contribuyen al reclutamiento de otras poblaciones celulares. Las CE poseen además la capacidad de discriminar entre la forma saprofitica de *C. albicans* y su transición a la fase hifal, de esta manera, el morfotipo levaduriforme es tolerado y la emisión de la pseudohifa es considerada una señal de peligro ante la cual, la CE inicia la respuesta inflamatoria local ^{5, 45}. La liberación de alarminas e IL-8 favorece el infiltrado de PMN y contribuye a la aparición de síntomas en la CVV. De esta manera la colonización asintomática vaginal ocurre en ausencia de respuesta inflamatoria, mientras que la forma sintomática está acompañada de un abundante infiltrado de PMN (Figura 6). La evidencia acumulada al presente sugiere que la susceptibilidad a la infección está asociada a una respuesta inflamatoria agresiva, mientras que la resistencia, a la activación de un perfil antiinflamatorio ^{9, 27, 41}.

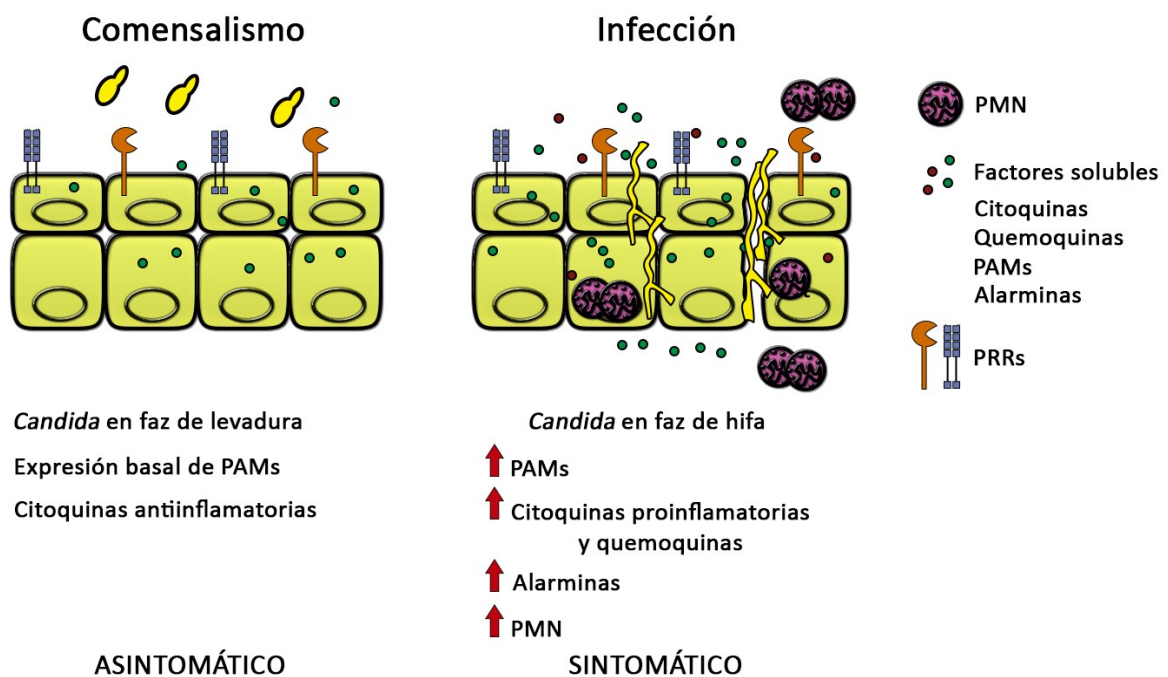


Figura 6. Inmunopatogénesis de la Candidiasis Vulvovaginal. Durante la relación de comensalismo (izquierda) las levaduras de *C. albicans* colonizan el epitelio vaginal en presencia de numerosos PRRs en las CE, producción basal de PAMs y de la citoquina antiinflamatoria TGF- β que mantiene la regulación inmune homeostática del tracto y la ausencia de síntomas. Ante la presencia de ciertos factores predisponentes, se produce el cambio de morfotipo del hongo hacia su faz hifal (derecha) expresando diferentes PAMPs y factores de virulencia que participan en la penetración del epitelio y provocan daño tisular. La interacción de componentes fúngicos con los PRRs de las CE promueven su activación y conducen a la liberación de factores solubles como citoquinas proinflamatorias, quemoquinas, alarminas y diversos PAMs, que reclutan al sitio de infección a PMN, fenómenos que en su conjunto, determinan la aparición de los síntomas de la enfermedad (Adaptado de Miró 2017 ⁵).

En estudios efectuados en pacientes con CVV donde se estableció un score de inflamación, se observó una correlación positiva entre la presencia de PMN y la carga fúngica vaginal ⁴¹. En este escenario, la contribución del PMN está relacionada a la respuesta inflamatoria local más que a su rol como célula efectora fungicida. Experiencias *in vitro* demostraron que los lavados vaginales de pacientes sintomáticas poseen una elevada actividad quimiotáctica sobre los PMN. Recientemente, las alarminas S100A8 y S100A9 liberadas por las CE han sido involucradas en este proceso ⁹⁵. La ausencia de estas moléculas y la depleción de PMN en modelos murinos no provoca un aumento de la carga fúngica intravaginal ^{96, 97}; sin embargo, la depleción de PMN disminuye la evidencia histológica de inflamación vaginal ⁹⁷. En la generación de este proceso, la transición de levadura a hifa y la producción de factores de virulencia causan la disrupción epitelial; esta injuria celular provoca como respuesta el reclutamiento de PMN, contribuyendo a la exacerbación del fenómeno ^{41, 44}.

Péptidos Antimicrobianos

Los PAMs probablemente representan uno de los primeros mecanismos de defensa químicos en células eucariotas contra bacterias, protozoos, hongos y virus. Estas moléculas altamente conservadas en la evolución son indispensables para la inmunidad innata ⁹⁸.

Son expresados en las barreras primarias de los organismos multicelulares, como la piel y las mucosas, previniendo así la colonización de los tejidos por patógenos. En estos sitios anatómicos, los queratinocitos y las CE presentan un rol relevante en su producción. Además, estos péptidos son almacenados en gránulos de los fagocitos, donde ayudan en la eliminación de microorganismos fagocitados ^{99, 100}. El reclutamiento de estas células durante los procesos infecciosos en el tracto mucoso contribuye a amplificar la función de los PAMs.

La clasificación de los PAMs es dificultosa debido a la gran diversidad que existe. En función de la composición de aminoácidos, tamaño y conformación estructural, pueden dividirse en diferentes categorías como péptidos con plegamientos en α -hélices, como las catelicidinas humanas; péptidos con plegamientos en hojas β estabilizados por puentes disulfuro, como las BDs humanas o péptidos con estructuras cíclicas como las θ -Defensinas, presentes en macacos ¹⁰⁰.

Los PAMs son generados por procesamiento proteolítico de sus precursores y los péptidos activos contienen de 10 a 50 aminoácidos. Están cargados de manera positiva

principalmente, por la cantidad de residuos lisina y arginina que poseen, aunque también contienen una proporción sustancial de residuos hidrofóbicos¹⁰¹.

BDs e inmunidad

Dentro de la superfamilia de PAMs se encuentran las BDs, pequeños péptidos catiónicos (4-6 kDa), ricos en cisteína, estabilizados por la presencia de tres puentes disulfuro. Estos son esenciales para su actividad inmunomoduladora, no así para la antimicrobiana. Están presentes en diversos tejidos mucosos como los tractos gastrointestinal, respiratorio y urogenital. Su distribución anatómica refleja la habilidad de neutralizar diferentes patógenos y son más abundantes en sitios propensos a las infecciones contra las cuales poseen especificidad^{98, 102, 103}.

Hay una gran diversidad de BDs en humanos, sin embargo sólo las BDs humanas (hBD) 1, 2 y 3 se expresan en tracto urogenital. En ratón, estos péptidos también han sido identificados y se denominan BD murinas (mBD) 1, 3 y 14^{104, 105}.

Pueden ser de expresión constitutiva, como hBD1 o de expresión inducible por diferentes estímulos, como hBD2 y hBD3. Componentes bacterianos como lipopolisacárido (LPS) y peptidoglicano; citoquinas proinflamatorias, como IL-1 β y TNF- α inducen la expresión de hBD2^{103, 106}. Por su parte, hBD3 es inducida por TNF- α , IFN- γ y por ligandos del Receptor de Factor Epidermal (EGFR, *Epidermal Growth Factor Receptor*)^{103, 106, 107}.

La importancia de las BDs en humanos y la capacidad de ciertos microorganismos de regular su expresión han sido demostradas en numerosos trabajos. Patel y col. probaron que la bacteria *Helicobacter pylori* persiste, en pacientes que la portan, promoviendo una disminución en la expresión de hBD1 en la mucosa gastrointestinal por un mecanismo en el que participan ciertos factores de virulencia¹⁰⁸. Por su parte, la hBD3 posee actividad contra *H. pylori in vitro*, y es rápidamente inducida durante la infección temprana por esta bacteria a través de la activación de la vía de las MAP (*Mitogen-Activated Protein*) kinasas mediante señales en el receptor EGFR. Sin embargo, durante una infección prolongada, *H. pylori* disminuye la expresión de hBD3 por acción del determinante de virulencia CagA¹⁰⁹.

Mecanismo de acción

Las BDs poseen actividad antifúngica por sí mismas o ejercen su acción a través de la inmunomodulación. Su naturaleza de moléculas anfipáticas con zonas de aminoácidos cargados positivamente y de aminoácidos hidrofóbicos les permite interactuar con los fosfolípidos cargados negativamente en las membranas de los microorganismos y con las cadenas de ácidos grasos hidrofóbicos. Comúnmente las BDs se depositan en la interfase de la membrana de los microorganismos hasta que se alcanza un umbral en la concentración del péptido. Esto lleva a la formación de un poro en la membrana, al incremento de la permeabilidad y a la muerte de los mismos mediante lisis osmótica (Figura 7)^{98, 110}.

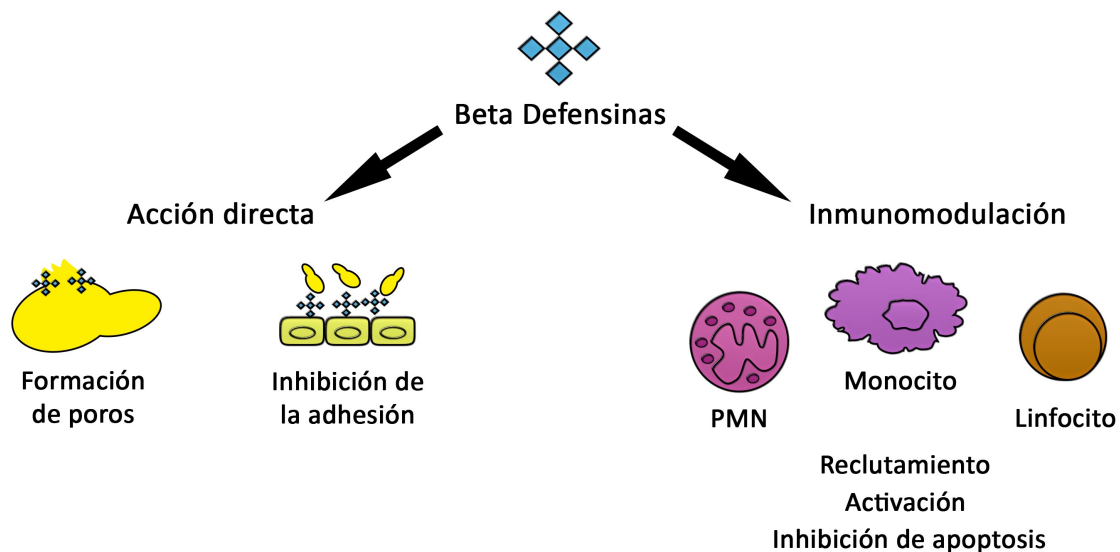


Figura 7. Mecanismos de acción de las β -Defensinas. Las BDs tienen dos modos de ejercer su función antimicrobiana: directa e indirecta. Dentro de sus mecanismos directos de acción se encuentran la formación de poros en la pared celular de los microorganismos que poseen carga negativa ocasionando la lisis de los mismos. También son capaces de inhibir la adhesión de los mismos a superficies epiteliales, impidiendo la primera etapa en una infección. Dentro de los mecanismos indirectos de acción se encuentran el reclutamiento de células de la inmunidad al sitio de infección, la activación de las mismas, y la inhibición de la apoptosis. La inmunomodulación se produce a través de la interacción con receptores presentes en las células (Adaptado de Ulm 2014¹¹¹).

Se demostró que hBD1 posee actividad antimicrobiana a concentraciones micromolares frente a bacterias Gram negativas y a levaduras del género *Candida*. Proporciona la protección constitutiva contra organismos potencialmente patogénicos en las mucosas epiteliales internas y expuestas. Además, la expresión insuficiente de hBD1 está asociada a una pobre respuesta innata frente a agentes infecciosos en estos pacientes¹¹². En

relación a su homóloga en ratones, recientemente se demostró que la mBD1 recombinante posee actividad fungicida directa sobre *Candida* mediante la inhibición de la generación del tubo germinativo ¹¹³. Otro estudio reveló que compuestos miméticos de mBD1 utilizados en el tratamiento de ratones infectados con *Candida* disminuyen significativamente la carga fúngica en la cavidad oral ¹¹⁴. Además ratones deficientes en mBD1 presentan fallas en la respuesta aguda frente a *Candida* en un modelo de candidiasis oral. En estos animales el reclutamiento de PMN a la mucosa oral está significativamente disminuido ¹¹⁵.

Por su parte hBD2 posee actividad antimicrobiana contra bacterias Gram negativas y también contra *C. albicans* ¹¹⁶. hBD3 demostró tener actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas y negativas y su capacidad candidicida sinergiza con las propiedades antifúngicas de la anfotericina B ¹¹⁷. Su actividad frente a *Candida* es cuatro veces mayor a la reportada para la hBD2 ¹¹⁶. También se demostró que este PAM reduce la capacidad de adhesión de *Candida*, evento clave que antecede la invasión tisular y fundamental para el crecimiento en biofilm.

Además de su potente actividad antimicrobiana, las BD son reconocidas debido a su función quimioattractante y a su capacidad inmunomoduladora sobre células de la inmunidad adaptativa. Un importante atributo de las BDs es su capacidad de reclutar CD inmaduras y células T de memoria a través del receptor de quemoquinas CCR6 ¹¹⁸. Las células Th17 expresan CCR6 y responden a la acción quimioattractante de las BDs. Además, citoquinas como la IL-17 e IL-22 promueven la secreción de BDs por diferentes CE, resultando en una amplificación de la respuesta de las células Th17 ^{119, 120}. A nivel vaginal este circuito podría resultar relevante y aún no ha sido explorado. La BD1 también puede activar y madurar CD a través de CCR6 y de receptores de la familia de los TLRs ^{121, 122} promoviendo de esta manera la inducción de los mecanismos adaptativos de defensa.

La interacción de hBD3 con CCR6 presente en PMN inhibe la apoptosis de los mismos, a través de señales que aumentan los niveles de la proteína antiapoptótica Bcl-xL e inhiben la actividad de caspasas. El incremento en la vida media de los PMN es un evento inflamatorio beneficioso para la eliminación de ciertos microorganismos ⁹⁸.

Otra serie de estudios involucra a CCR2 expresado en monocitos y macrófagos como ligando de hBD2 y hBD3 y sus homólogos en ratón ¹²³. Mientras que la actividad de las hBD está siendo activamente caracterizada en la colonización oral de *Candida*, poco se conoce sobre el rol de estas moléculas a nivel del epitelio vaginal y su impacto en los

mecanismos locales de control durante la CVV. De manera interesante, estos péptidos y sus análogos sintéticos están siendo propuestos para el tratamiento de diversas patologías^{114, 124, 125}.

OBJETIVOS

A pesar de los avances terapéuticos, la Candidiasis Vulvovaginal (CVV) y la CVV recurrente (CVVR) constituyen un importante problema a nivel mundial. Aunque el conocimiento sobre las causas y factores de riesgo para la adquisición y el desarrollo de esta micosis es extenso, los mecanismos inmunes que rigen la respuesta antifúngica protectora a nivel vaginal aún no han sido completamente esclarecidos, y varios aspectos de su etiopatogenia no han sido resueltos. Se desconocen muchos de los mecanismos que rigen las interacciones entre el hongo y las células residentes a nivel del tracto genital femenino. El rol del dimorfismo fúngico y la liberación de factores de virulencia y su efecto en la modulación de mediadores inmunes por las células del epitelio vaginal no están totalmente establecidos. En este escenario el rol de ciertos receptores de la inmunidad innata y de los péptidos antimicrobianos, en particular las β -defensinas, su mecanismo de inducción, regulación e impacto en la respuesta local en esta patología permanecen aún sin definir.

En base a los antecedentes expuestos y a los interrogantes abiertos en relación a esta micosis en esta tesis doctoral se plantearon los siguientes objetivos:

OBJETIVO GENERAL

Estudiar las interacciones locales entre el hongo oportunista *Candida albicans* y las células del tracto cervicovaginal, evaluando la contribución de elementos de la inmunidad innata como péptidos antimicrobianos y receptores innatos en la etiopatogenia de la Candidiasis Vulvovaginal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Estudiar la respuesta inmune innata en el tracto genital femenino murino durante la infección por *C. albicans*: respuesta inflamatoria y contribución de los Receptores Innatos en la patogenia de la enfermedad.

- II. Estudiar los péptidos antimicrobianos de la familia de β -Defensinas en el tracto genital femenino murino en un modelo de CVV.

- III. Estudiar los mediadores inmunes y los péptidos antimicrobianos de la familia de las β -Defensinas en tracto genital femenino de pacientes con CVV.

RESULTADOS

CAPÍTULO I

Estudio de la respuesta inmune innata en el tracto genital femenino murino durante la infección por *C. albicans*: respuesta inflamatoria y contribución de los Receptores Innatos en la patogenia de la enfermedad.

Los modelos animales constituyen poderosas herramientas para el estudio de la patogénesis molecular y celular de las candidiasis. Los modelos murinos de CVV son ampliamente utilizados con este fin y para el estudio de estrategias terapéuticas. *C. albicans* no es un patógeno habitual del tracto genital femenino murino, por lo tanto para que se establezca la infección es necesario inducir cierta fase del ciclo estral de los animales, denominada pseudo estro, lo que se logra mediante la inyección subcutánea de valerato de β -Estradiol^{8,9}.

Con el objetivo de establecer un modelo válido de infección se evaluaron diferentes esquemas de administración de valerato de β -Estradiol e inóculos infectivos de *C. albicans*, hasta encontrar los parámetros más adecuados. Una vez establecido el modelo experimental se procedió a caracterizar la progresión de la infección, evaluando la carga fúngica intravaginal, la reacción inflamatoria tisular en respuesta a la invasión por el hongo y la activación de los mecanismos innatos locales mediante niveles de citoquinas intravaginales a diferentes días post infección. Los resultados obtenidos permitieron definir el comportamiento de la infección en un hospedador normal.

El reconocimiento de PAMPs de *Candida* por PRRs presentes en las células del hospedador, promueve una rápida respuesta local capaz de gatillar mecanismos efectores o condicionar el perfil de la respuesta inmune adaptativa. Estudios en pacientes demuestran la asociación entre mutaciones o polimorfismos en los PRRs, o en sus vías de señalización, con la susceptibilidad a la CVV. La mayoría de estos reportes explora la respuesta *in vitro* de monocitos y CD frente al hongo y en muchos de ellos no existen evidencias sobre la respuesta inmune a nivel local. El uso de animales deficientes en determinados PRRs permite aportar evidencias sobre la contribución de un determinado receptor o sus vías de activación en la patogenia de la infección.

En este capítulo se propuso como objetivo evaluar el rol de ciertos PRRs en el desarrollo y progresión de la vaginitis por *Candida*. En particular, se evaluó la contribución

del receptor TLR2 y de la molécula adaptadora MyD88, imprescindible en la vía de señalización de los TLRs en el reconocimiento fúngico (TLR2, TLR4, TLR7 y TLR9), desarrollando el modelo de CVV en animales TLR2^{-/-} y MyD88^{-/-}. Con el fin de evaluar la participación de los CLRs en la patogenia de la enfermedad se usaron dos estrategias experimentales, la primera fue trabajar con cepas de *C. albicans* defectivas en la producción de β -(1,3) glucanos de su pared y la segunda la utilización de animales deficientes en el receptor de β -(1,3) glucanos Dectin-1 (*CLEC7A*^{-/-}), ensayando el modelo de CVV desarrollado en el laboratorio.

Establecimiento del modelo murino de infección vaginal por *C. albicans*

A fin de establecer un modelo experimental de la patología en estudio que permita evaluar los mecanismos inmunes innatos tempranos activados durante el curso de la infección por este hongo, debió establecerse un esquema apropiado de administración de valerato de β -Estradiol y del inóculo infectivo del hongo.

Diferentes protocolos, variando días de administración de valerato de β -Estradiol y frecuencia, fueron ensayados y evaluados. El esquema mostrado en la Figura 8 presentó las condiciones óptimas de respuesta y fue el seleccionado para el desarrollo de todos los experimentos en animales. Los días 6 y 3 previos a la infección, los animales de los grupos estrogenizado e infectado se inyectaron de manera subcutánea con 100 μ L de valerato de β -estradiol 2 mg/mL, en aceite de sésamo. Al día 0 del protocolo los animales se infectaron intravaginalmente con diferentes inóculos de levaduras viables de *C. albicans* y a los días 2 y 4 post infección (pi) fueron inyectados nuevamente con la hormona, a fin de mantener la fase pseudo estro del ciclo estral. De acuerdo al protocolo utilizado los animales se clasificaron en: Grupo Estrogenizado, ratones que recibieron el tratamiento con estradiol; Grupo Infectado, animales tratados con estradiol e infectados con *C. albicans*; y Grupo No Estrogenizado, ratones normales que no recibieron el tratamiento con estradiol y no fueron infectados. Según el experimento, a los días 2, 4 y 8 pi se llevaron a cabo lavados vaginales con PBS estéril mediante inoculación y aspiración con pipeta, o los animales fueron sacrificados y las vaginas extraídas para estudios histológicos o extracción de ARN.

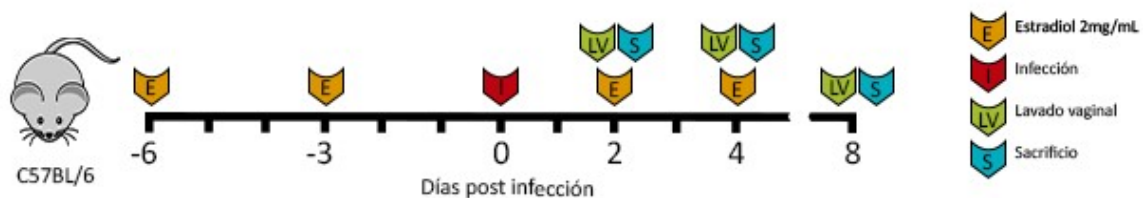


Figura 8. Modelo experimental de Candidiasis Vulvovaginal murina. Los ratones de los grupos estrogenizado e infectado son inyectados con 100 μ L de Valerato de β -Estradiol 2 mg/mL a los días -6,-3, 2 y 4, considerando como día 0 al de la infección. La infección se realiza de manera intravaginal, introduciendo con pipeta y tip 20 μ L de una suspensión de levaduras viables de *C. albicans* de concentración conocida. Los días 2, 4 y 8 pi se realizan lavados vaginales con PBS estéril o se sacrifican los animales para estudios histológicos o extracción de material genético, según el experimento.

Como primera aproximación, los animales se infectaron con un inóculo de $5 \cdot 10^5$ levaduras viables de *C. albicans* ATCC 36801^{47, 126, 127}. A fin de evaluar la progresión de la infección y la activación de los mecanismos innatos locales en respuesta a la misma se procedió a determinar el recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) y los niveles de citoquinas presentes en lavado vaginal a los días 2, 4 y 8 pi. La infección se mantuvo detectable durante todos los días evaluados, no observándose cambios en la carga fúngica intravaginal en los diferentes puntos estudiados (Figura 9A).

Al cuantificar los niveles locales de citoquinas intravaginales, no hubo cambios en la expresión de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF- α ni de la citoquina antiinflamatoria TGF- β en ninguno de los días evaluados (Figura 9B).

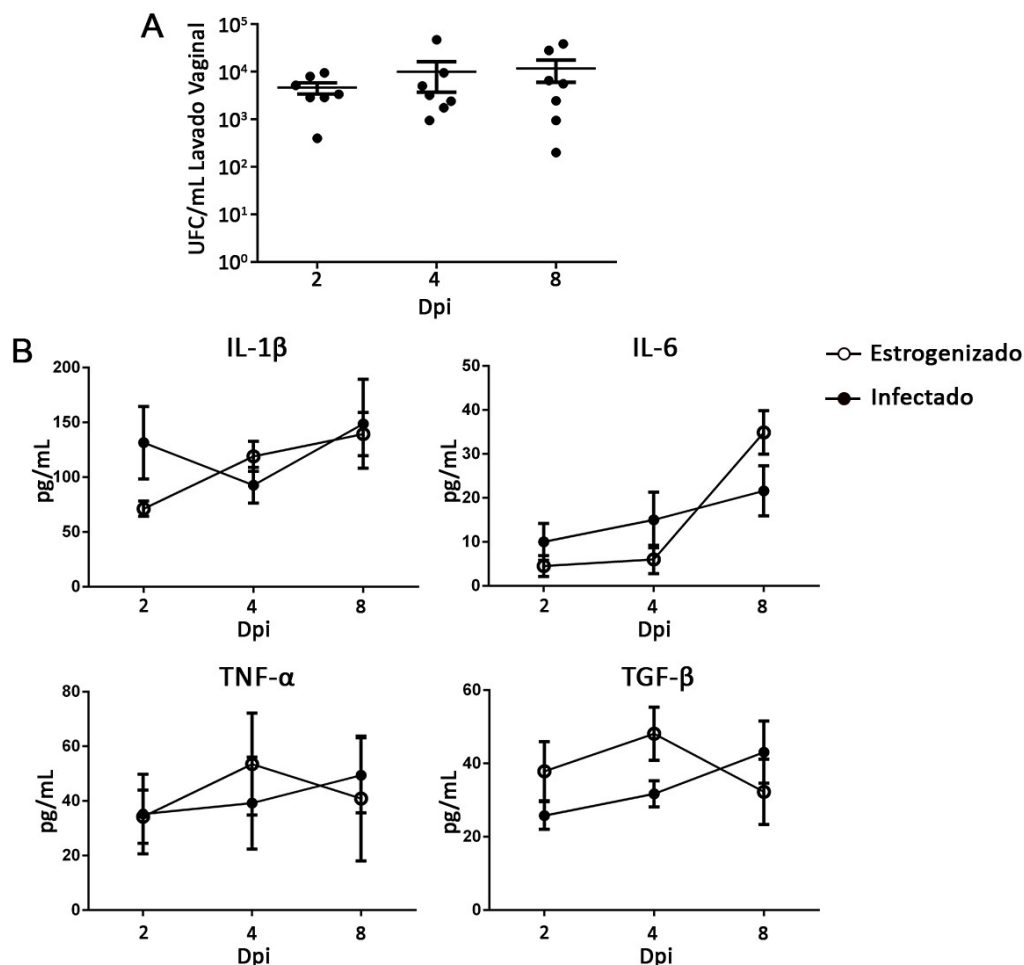


Figura 9. Susceptibilidad y cambios en el microambiente local durante la infección vaginal con bajas dosis de *C. albicans*. **A)** Recuento de UFC por mL de lavado vaginal de animales infectados a los días 2, 4 y 8 pi con $5 \cdot 10^5$ levaduras viables de *C. albicans* ATCC 36801. $n=7$. **B)** Niveles de citoquinas en muestras de lavado vaginal a los días 2, 4 y 8 pi evaluadas por la técnica de ELISA. En círculos vacíos animales estrogenizados y en círculos llenos animales infectados. Los valores representan la media \pm ESM. $n \geq 7$.

Con el inóculo de *C. albicans* utilizado, la carga fúngica en vagina se mantuvo constante y la presencia del patógeno fue tolerada sin observarse remoción del hongo a lo largo de los diferentes días de estudio ($p=ns$). Tampoco se detectaron cambios en los niveles de citoquinas intravaginales evaluadas. En este nicho estrictamente regulado es necesario alcanzar un determinado umbral de estimulación para promover una perturbación en la homeostasis local y permitir la activación de la respuesta frente al hongo²⁷. Se decidió entonces utilizar como dosis infectiva un inóculo mayor en un orden de magnitud y se procedió a evaluar los parámetros antes mencionados.

Cuando el inóculo infectivo fue de 5.10^6 *C. albicans* ATCC 36801, el hongo fue recuperado de la cavidad vaginal durante todos los días del estudio (Figura 10A) y, acorde a la magnitud del inóculo inicial, el número de UFC aisladas fue superior comparado con la dosis infectiva utilizada en el protocolo anterior. Por su parte, la carga fúngica intravaginal presentó una reducción hacia el día 8 pi ($p<0,05$ día 4 vs 8), con un porcentaje de remoción del 78% entre ambos días estudiados, evidenciando que el hospedador es capaz de activar mecanismos locales de respuesta y limitar la infección.

La visualización de PMN en citoextendidos de lavado vaginal es un hallazgo característico de pacientes sintomáticas con CVV. Para evaluar las poblaciones celulares presentes en lavado vaginal durante el modelo murino, se realizaron citoextendidos de animales estrogenizados e infectados, los cuales fueron observados en fresco y teñidos con la técnica de May-Grünwald Giemsa. En ambos grupos se observaron CE queratinizadas provenientes de la descamación del estrato córneo vaginal, y en el grupo infectado presencia de hifas de *C. albicans*, (morfotipo invasivo del hongo) y PMN reclutados al lumen vaginal (Figura 10B).

Por su parte los niveles intravaginales de las citoquinas IL-6, TNF- α y TGF- β fueron comparables entre los grupos estrogenizado e infectado. Sólo se observó una disminución en los niveles de IL-1 β en animales infectados a los días 4 y 8 pi con respecto al grupo estrogenizado (Figura 10C). La dosis infectiva mayor permitió la inducción de una respuesta local que condujo a una remoción significativa del hongo en la cavidad vaginal. Estos hallazgos promovieron el estudio de otros parámetros locales de respuesta que son desarrollados a continuación y en el Capítulo II de este trabajo. La dosis infectiva de 5.10^6 levaduras viables de *C. albicans* fue seleccionada para ser utilizada a lo largo de todo el estudio.

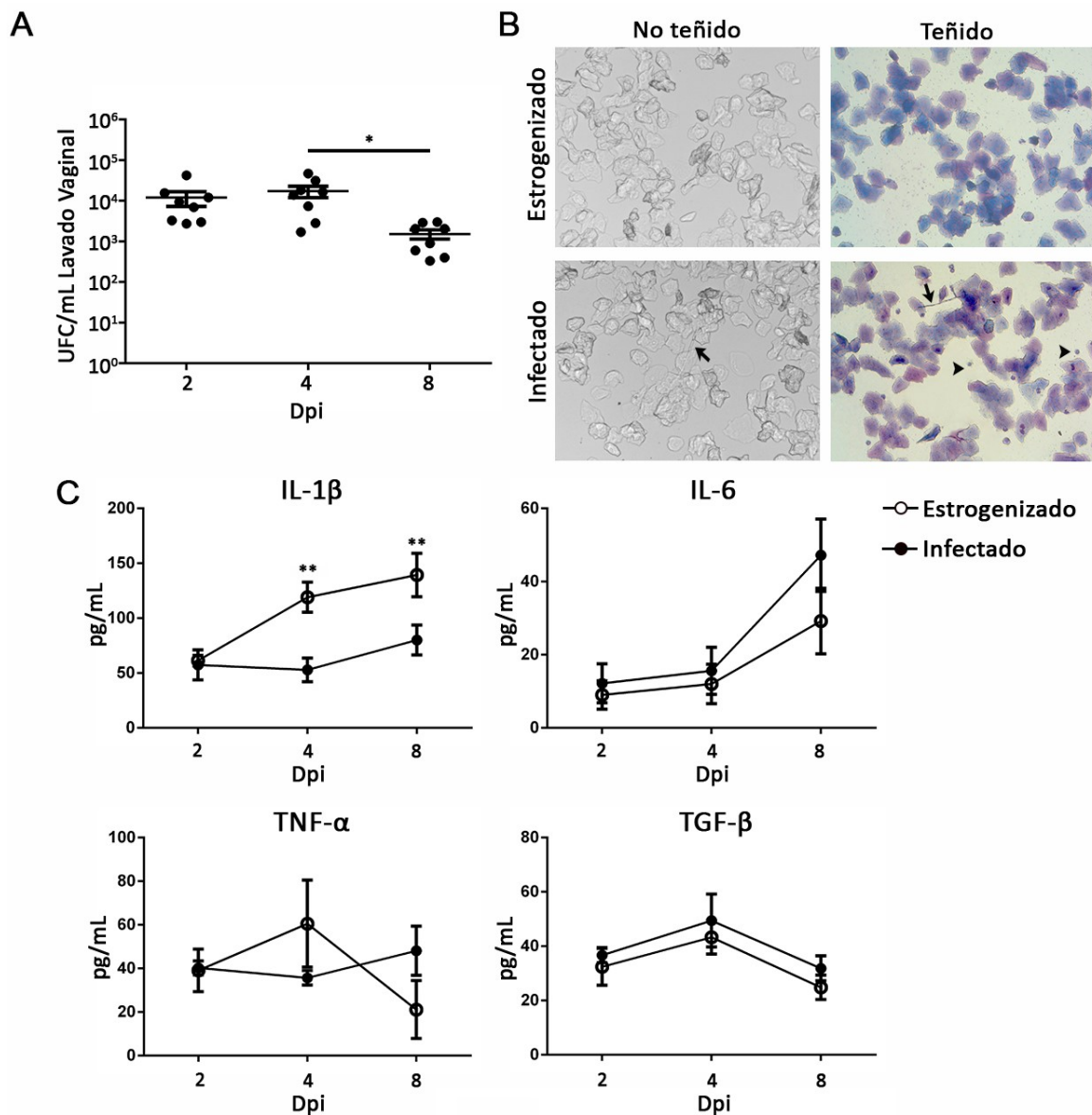


Figura 10. Susceptibilidad y cambios en el microambiente local durante la infección vaginal con altas dosis de *C. albicans*. **A)** Recuento de UFC por mL de lavado vaginal de animales infectados a los días 2, 4 y 8 pi con $5 \cdot 10^6$ levaduras viables de *C. albicans* ATCC 36801. $n=7$. * $p<0,05$. **B)** Fotografías representativas de citoextendidos de lavado vaginal de ratones estrogenizados (arriba) o infectados (abajo) en fresco o teñidos con May-Grünwald Giemsa, al día 2 pi. Presencia de hifas (flechas) y PMN (puntas de flechas). Magnificación $\times 400$. **C)** Niveles de citoquinas en muestras de lavado vaginal los días 2, 4 y 8 pi evaluadas por la técnica de ELISA. En círculos vacíos animales estrogenizados y en círculos llenos animales infectados. Los valores representan la media \pm ESM. $n \geq 7$. * $p<0,05$. ** $p<0,01$.

Invasividad y respuesta tisular durante la infección vaginal por *C. albicans*

La mucosa vaginal normal de mujeres en edad reproductiva está constituida por epitelio estratificado escamoso que yace sobre la lámina propia. El epitelio sufre una diferenciación y está compuesto por distintas capas o estratos: la capa basal, mitóticamente activa (estrato basal), la capa suprabasal y una capa superficial de células aplanadas y cornificadas (estrato córneo). Poco se conoce sobre la diferenciación del epitelio vaginal, debido a ello la mayoría de los autores realizan inferencias sobre los estudios llevados a cabo en epidermis, un epitelio escamoso estratificado que consiste en células aplanadas, muertas y queratinizadas.¹²⁸.

La estructura del epitelio vaginal cambia a lo largo de la vida de la mujer y es afectado por hormonas y las condiciones del medio. En niñas antes de la pubertad, el epitelio vaginal es delgado y se compone únicamente de las capas basal y parabasal. Durante los años reproductivos, el epitelio se engrosa y desarrolla el estrato córneo. Los niveles hormonales influyen levemente el grosor del epitelio, pero afectan el almacenamiento de glucógeno en las células, ya que la síntesis del mismo es dependiente de los niveles de estrógeno. Después de la menopausia el epitelio vaginal se torna más delgado, las reservas de glucógeno disminuyen y el estrato córneo muestra diferentes grados de queratinización.

Los leucocitos pueden moverse libremente a través de este estrato ya que las CE carecen de E-caderina y posiblemente de otras moléculas de adhesión que retienen células inmunes a la mucosa epitelial¹²⁸. En respuesta a la invasión por agentes patogénicos es frecuente observar la presencia de infiltrado leucocitario intraepitelial.

La cuantificación de UFC en lavado vaginal es la técnica estándar para la determinación de la carga fúngica intravaginal, sin embargo no refleja la invasión epitelial por *C. albicans*, que es la que genera el daño celular y la activación de la respuesta inmune del hospedador⁴¹.

En concordancia con este concepto, y a fin de evaluar la invasión tisular y la respuesta inflamatoria local se realizaron estudios histológicos de animales no estrogenizados (Figura 11A), estrogenizados (Figura 11B) e infectados (Figura 11C). Debido a la capacidad de respuesta de las CE hacia las hormonas sexuales, el tratamiento estrogénico produjo un engrosamiento del epitelio (Figura 11A y B). A diferentes días pi se observó una

marcada presencia de hifas de *C. albicans*, morfotipo infeccioso, en el lumen vaginal (Figura 11C, paneles superiores).

Mientras que al día 2 pudieron visualizarse pseudohifas del hongo y blastoconidias adheridas al epitelio cornificado, al día 4 se observaron numerosas hifas sobre las CE e invadiendo el tejido, fenómeno que se mantuvo hasta el día 8 pi. Al día 2 se encontró infiltrado de PMN y presencia de microabscesos de leucocitos (Figura 11C, paneles inferiores). Hacia los días 4 y 8 pi se produjo un incremento progresivo en la cantidad de infiltrado inflamatorio y de microabscesos subcorneales, pudiéndose visualizar en el día 8 pi algunos abscesos de tamaño regular esparcidos en la mucosa vaginal conteniendo elementos del hongo en su interior.

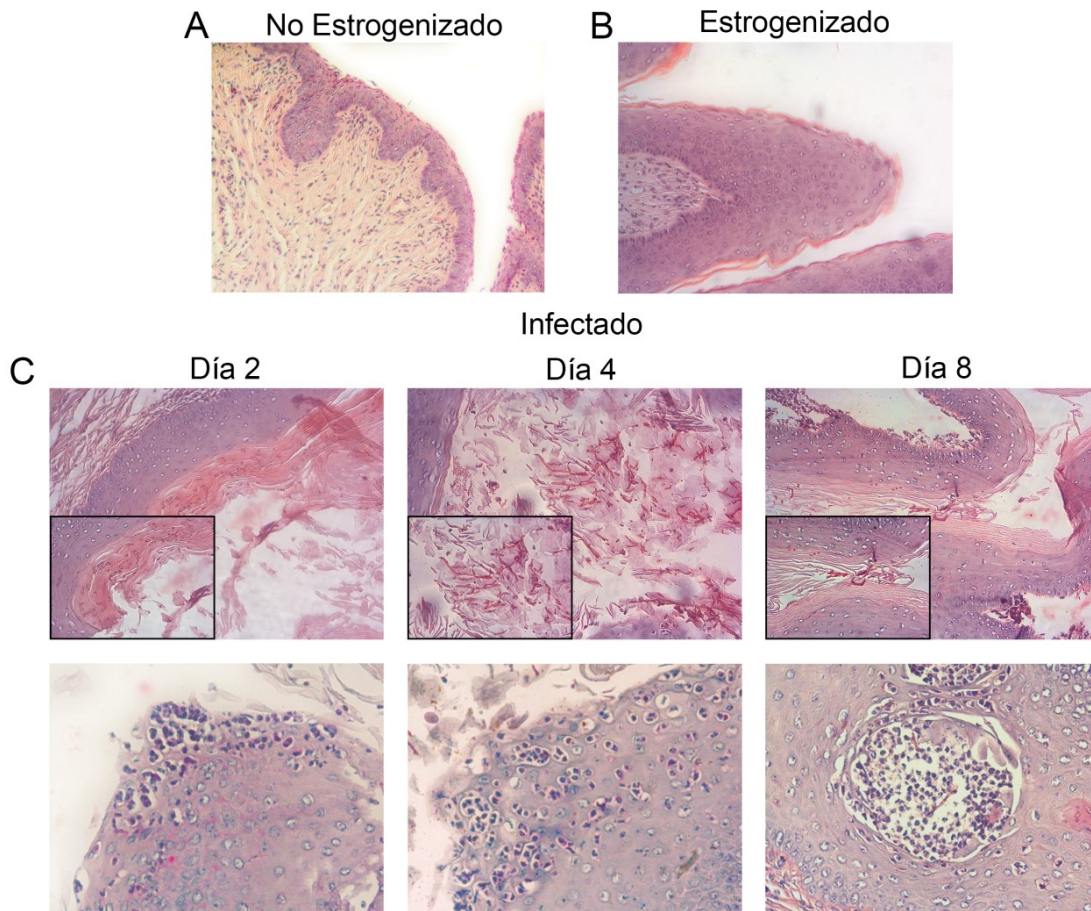


Figura 11. Hallazgos histopatológicos y respuesta inflamatoria durante la infección vaginal por *C. albicans* ATCC 36801. Fotografías representativas de cortes histológicos de vagina de animales no estrogenizados (A) estrogenizados al día 2 (B) o infectados con 5.10^6 levaduras viables de *C. albicans* ATCC 36801 a los días 2, 4 y 8 pi (C), teñidos con PAS-HE. Presencia de levaduras e hifas de *C. albicans* (panel superior). Aumento x200 y x400 en recuadros. Presencia de infiltrado inflamatorio (panel inferior). Aumento x400.

La proteína de superficie celular Gr-1 es expresada en altos niveles por PMN, además de otras poblaciones celulares como CD plasmocitoideas, monocitos inflamatorios y monocitos mieloides supresores¹²⁹. El estudio de las poblaciones celulares de la inmunidad innata en modelos murinos de CVV identificó a los PMN como los leucocitos predominantes en vagina^{41, 126, 127}. Por tal motivo evaluamos el porcentaje y número absoluto de células Gr-1⁺ reclutadas a la cavidad vaginal a lo largo del período de infección utilizando para ello citometría de flujo.

En concordancia con la bibliografía, en animales infectados se observó un aumento en la cantidad de PMN. Si bien la diferencia es estadísticamente significativa sólo al día 8 pi tanto en porcentaje de células Gr-1⁺ como en número absoluto, a los días 2 y 4 se observó una tendencia al aumento en esta población celular en el grupo infectado con respecto a los grupos no estrogenizado y estrogenizado (Figura 12). En citoextendidos de lavado vaginal de animales infectados también se corroboró el aumento de PMN (Figura 10B).

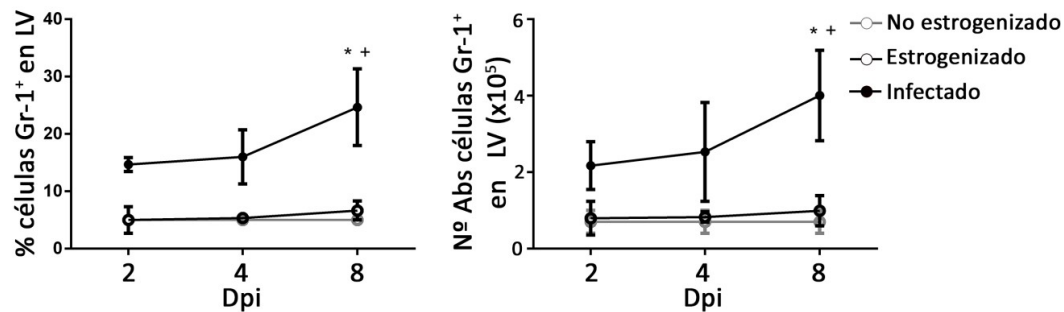


Figura 12. Presencia de PMN en lavado vaginal durante la infección vaginal por *C. albicans* ATCC 36801. Presencia de PMN (Gr-1⁺) en lavado vaginal de animales no estrogenizados (círculo vacío gris), estrogenizados (círculo vacío negro) e infectados (círculo negro) a los días 2, 4 y 8 pi en porcentaje (izquierda) y número absoluto (derecha), evaluados por la técnica de citometría de flujo. Los valores representan la media \pm ESM de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$ infectados vs estrogenizados. + $p < 0,05$ infectados vs no estrogenizados.

Durante la infección vaginal con *C. albicans*, el hongo es capaz de invadir el tejido. La presencia del mismo promueve el reclutamiento de PMN al sitio de infección, los cuales se organizan en microabscesos a fin de contener al patógeno.

Participación de receptores de la inmunidad innata en la patogenia de la CVV

Contribución de la vía de señalización del receptor innato TLR2 en la patogenia de la CVV

Los receptores TLR son PRRs que participan en el reconocimiento de microorganismos y en la iniciación de la respuesta inmune del hospedador contra patógenos. Estos receptores innatos son expresados por varios tipos celulares, incluyendo a monocitos, macrófagos, CD y PMN, dentro de las células inmunes y en las CE, consideradas actualmente no como meras espectadoras inertes o componentes de barreras anatómicas, sino como importantes participantes en la respuesta inmune innata y adaptativa en superficies mucosas⁷⁰. La expresión de TLR2 en vagina ha sido previamente demostrada^{130, 131}.

TLR2 reconoce fosfolipomananos presentes en la pared celular de *Candida*. Resultados dispares se obtuvieron al estudiar la contribución de este receptor en el control de la candidiasis diseminada. Mientras que algunos autores le atribuyen un rol protector frente a la diseminación de la infección¹³², otros proponen que el reconocimiento a través de TLR2 puede ser usado por *Candida* como una herramienta de evasión inmune¹³³.

Recientemente, Rosentul y col. demostraron que la presencia del polimorfismo P631H en el gen de TLR2 en humanos, aumenta la susceptibilidad de padecer CVVR²², resultados corroborados por Colombo y col.²³. Estos estudios aportan información sobre la susceptibilidad a padecer la patología; sin embargo, el rol de TLR2 en infecciones en mucosas causadas por *C. albicans* no ha sido estudiado en modelos animales.

Con el fin de dilucidar la participación de este receptor innato durante la CVV, el modelo de infección se desarrolló en animales deficientes en TLR2 (TLR2^{-/-}). Los resultados obtenidos indican que en estos animales la infección se mantuvo durante todos los días ensayados (Figura 13A), pero el desarrollo de la misma fue diferente entre estos ratones y los WT (*Wild Type*). Animales TLR2^{-/-} exhibieron una máxima colonización al día 2 pi, seguido de una progresiva disminución hacia el último día en estudio (p<0,05). El análisis comparativo de la infección con *C. albicans* entre ambas cepas reveló que la carga fúngica intravaginal fue mayor al día 2 pi en ausencia de TLR2 (p<0,01) (Figura 13B). En los restantes

tiempos evaluados no se observaron diferencias, encontrándose una remoción del hongo del 84% entre el día 2 y el 4 y un 92% entre el día 2 y el 8 pi.

Con respecto a las citoquinas intravaginales, los niveles de IL-1 β se encontraron aumentados en animales TLR2^{-/-} infectados a los días 4 y 8 pi en comparación con el grupo estrogenizado TLR2^{-/-} y con animales WT infectados (p<0,001) (Figura 13C). Por su parte, al día 2 pi, se observó un incremento en los niveles de IL-6 en animales infectados, que se mantuvo a lo largo de la cinética estudiada, mostrando diferencias significativas con el grupo estrogenizado TLR2^{-/-} y con animales WT infectados (p<0,001). No se encontraron diferencias significativas entre grupos al evaluar los niveles de TNF- α ni de TGF- β durante la infección (Figura 13C).

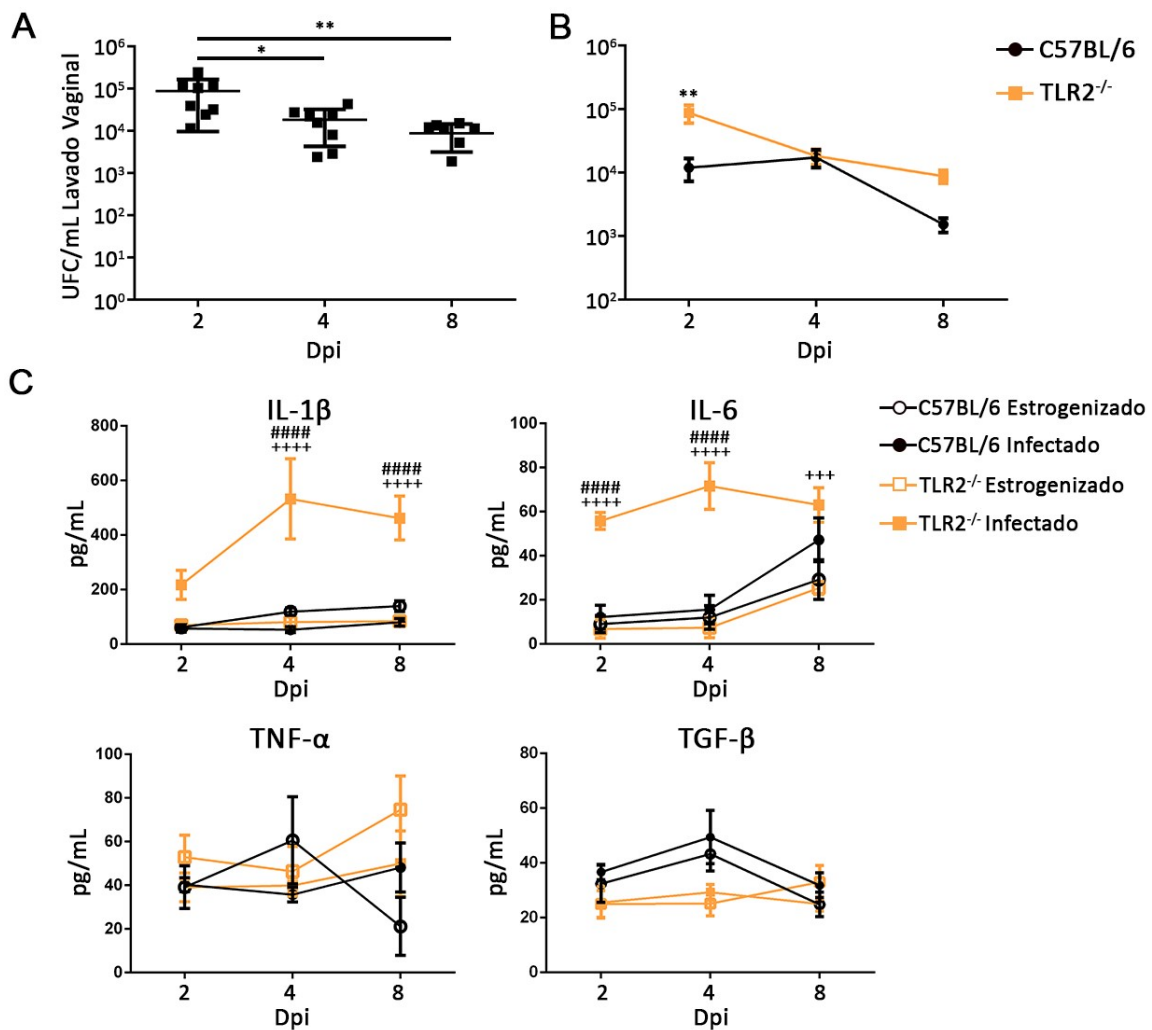


Figura 13. Susceptibilidad y cambios en el microambiente local durante la infección vaginal con *C. albicans* en animales deficientes en TLR2. A) Recuento de UFC por mL de lavado vaginal de animales infectados a los días 2, 4 y 8 pi con $5 \cdot 10^6$ levaduras viables de *C. albicans* ATCC 36801. n=7. * p<0,05.

** $p < 0,01$. **B)** Recuento de UFC por mL de lavado vaginal de animales WT (negro) o TLR2^{-/-} (naranja) infectados a los D 2, 4 y 8 pi. Los valores representan la media \pm ESM. $n \geq 7$. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$. **C)** Niveles de citoquinas en muestras de lavado vaginal los días 2, 4 y 8 pi evaluadas por la técnica de ELISA. Los valores representan la media \pm ESM. $n \geq 7$. +++ $p < 0,001$. ++++ $p < 0,0001$. TLR2^{-/-} infectados vs TLR2^{-/-} estrogenizados. ### $p < 0,001$. ##### $p < 0,0001$. TLR2^{-/-} infectados vs WT infectados.

Los estudios histológicos mostraron una invasión significativa de *C. albicans* en el epitelio (Figura 14, paneles superiores). Se encontró una presencia masiva del morfotipo fúngico invasivo penetrando el estrato córneo y llegando hasta capas más profundas (días 2 y 4). Además, en el lumen vaginal se observó gran cantidad de debris celular. Hacia el último día evaluado, mientras que en animales WT se encontró escasa presencia fúngica, los animales TLR2^{-/-} presentaron gran cantidad de hifas adheridas al estrato córneo o libres en el lumen vaginal.

Con respecto a la reacción inflamatoria, al día 2 pi se encontró una robusta respuesta tisular, con grandes abscesos intraepiteliales y numerosos PMN infiltrantes que también se observaron al día 4 pi. Gran cantidad de microabscesos subcorneales e infiltrado de PMN se encontraron hacia el final del estudio (Figura 14, paneles inferiores).

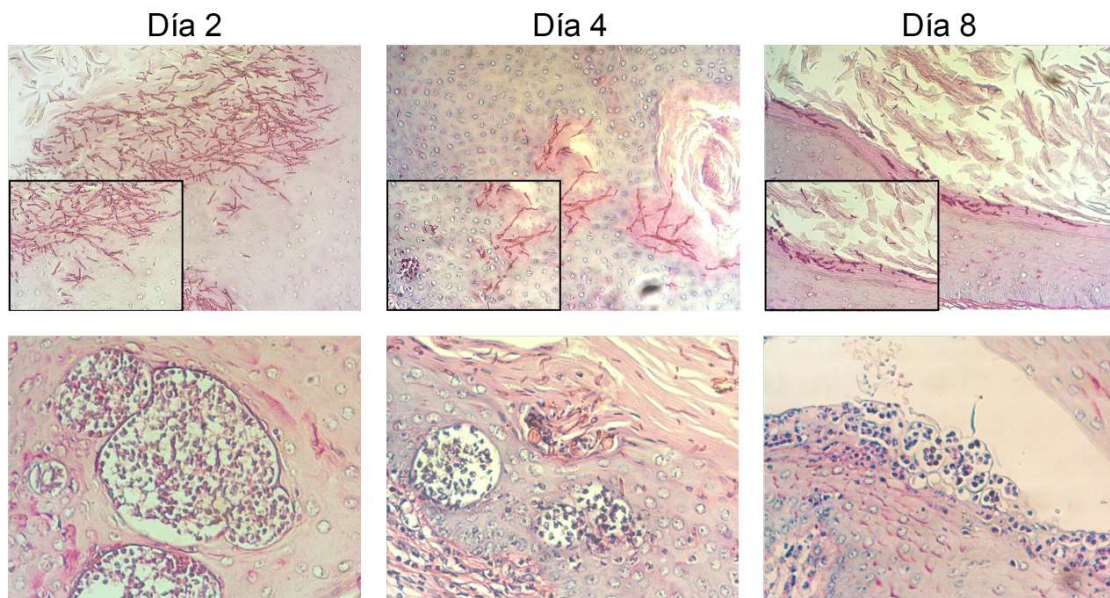


Figura 14. Hallazgos histopatológicos y respuesta inflamatoria en animales deficientes en TLR2. Fotografías representativas de cortes histológicos de vagina de animales infectados con 5.10^6 levaduras viables de *C. albicans* ATCC 36801 a los días 2, 4 y 8 pi teñidos con PAS-HE. Presencia de levaduras e hifas de *C. albicans* (panel superior). Aumento x200 y x400 en recuadros. Presencia de infiltrado inflamatorio (panel inferior). Aumento x400.

Estos resultados demuestran que en ausencia del receptor innato TLR2, *Candida* pudo penetrar e invadir capas epiteliales más profundas y generar una respuesta inflamatoria más robusta, evidenciada por niveles aumentados de las citoquinas IL-1 β e IL-6 en lavado vaginal y una franca y organizada reacción tisular.

Contribución de la vía de señalización de la molécula adaptadora MyD88 en la patogenia de la CVV

La transducción de señales a través de TLRs comienza con el reclutamiento de una serie de proteínas adaptadoras que contienen dominios TIR que interaccionan con dominios TIR citoplasmáticos de los TLRs. La molécula adaptadora universal, compartida por todos los TLRs, excepto TLR3, es MyD88, que gatilla vías inflamatorias a través de la activación de factores de transcripción como NF- κ B y AP-1, los cuales inducen la expresión de genes que codifican citoquinas¹³⁴.

Recientemente, se describió una mutación en la molécula de MyD88 en una paciente que durante toda su vida padeció CVV y onicomicosis. Pruebas funcionales en células mononucleares de sangre periférica portadoras de la mutación y estimuladas con *C. albicans* demostraron una disminución en la producción de IL-17²⁶.

Para el estudio de la participación de la señalización de la proteína adaptadora MyD88 en la vía de los TLRs durante la CVV se infectaron ratones deficientes en MyD88 (MyD88^{-/-}) siguiendo el protocolo descrito en la Figura 8.

En todos los días estudiados fue posible la recuperación de *Candida* de lavado vaginal (Figura 15A). La carga fúngica intravaginal fue superior en esta cepa de ratones comparado con los animales WT a los días 4 y 8 pi ($p < 0,05$ y $p < 0,01$). La infección en la cepa WT muestra una disminución hacia el día 8 pi (78% de remoción), mientras que en ratones MyD88^{-/-} este fenómeno no ocurre, observándose niveles constantes y elevados de *C. albicans* en la cavidad vaginal durante todos los días evaluados (Figura 15B).

En cuanto a la producción local de citoquinas proinflamatorias se observó un aumento en los niveles de IL-1 β al día 8 pi en animales MyD88^{-/-} infectados con respecto a los animales WT infectados ($p < 0,01$). Sin embargo, la producción local de IL-6 en animales infectados deficientes se encontró disminuida con respecto a sus controles WT infectados al

mismo día pi ($p < 0,001$) (Figura 15C). No hubo cambios significativos en la producción de TNF- α .

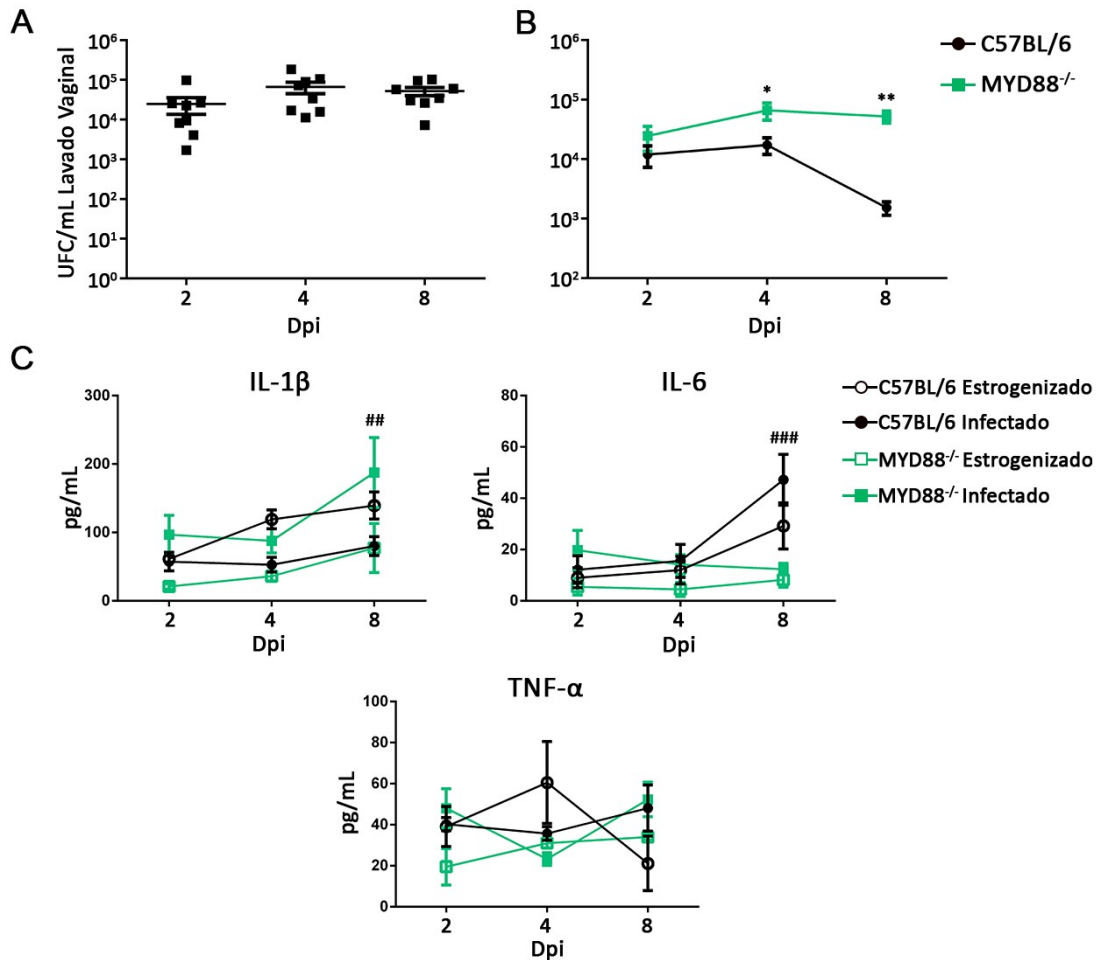


Figura 15. Susceptibilidad y cambios en el microambiente local durante la infección vaginal con *C. albicans* en animales deficientes en MyD88. **A)** Recuento de UFC por mL de lavado vaginal de animales MyD88^{-/-} infectados a los días 2, 4 y 8 pi con 5.10^6 levaduras viables de *C. albicans* ATCC 36801. $n=7$. **B)** Recuento de UFC por mL de lavado vaginal de animales WT (negro) o MyD88^{-/-} (verde) infectados a los días 2, 4 y 8 pi. Los valores representan la media \pm ESM. $n \geq 7$. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$. **C)** Niveles de citoquinas en muestras de lavado vaginal a los días 2, 4 y 8 pi evaluadas por la técnica de ELISA. Los valores representan la media \pm ESM. $n \geq 7$. ## $p < 0,01$. ### $p < 0,001$. WT Infectados vs MyD88^{-/-} infectados.

Cuando se analizaron los cortes histológicos de vagina de animales MyD88^{-/-} infectados, se observaron grandes cantidades de hifas de *C. albicans* en el lumen e invadiendo las capas epiteliales de la mucosa vaginal (Figura 16, paneles superiores). Este fenómeno fue claramente visualizado en el día 8 pi, observándose en algunas regiones pérdida de la arquitectura tisular y el crecimiento del hongo conformando una tupida masa fúngica. La respuesta tisular estuvo caracterizada por infiltrado de PMN y la presencia de

abscesos organizados alrededor de formas fúngicas invasivas y próximos al lumen vaginal. Este tipo de respuesta fue observada tanto en etapas iniciales como en el día 8 pi. Mientras que en los animales WT la invasión epitelial del hongo pudo ser controlada, la respuesta tisular presentó un aumento gradual y la carga fúngica intravaginal fue francamente disminuida, en los animales *MyD88*^{-/-}, a pesar de la robusta inflamación tisular, *C. albicans* no pudo ser removida del lumen vaginal.

La formación temprana de abscesos intraepiteliales en respuesta a la infección fue similar en ratones *MyD88*^{-/-} y *TLR2*^{-/-} (Figura 13) en días tempranos pi. Sin embargo, mientras que la cantidad de hifas y la presencia de PMN disminuyó progresivamente en animales *TLR2*^{-/-}, estos elementos se mantuvieron constantes hacia el día 8 pi ante la ausencia de la vía de señalización de *MyD88* (Figura 16).

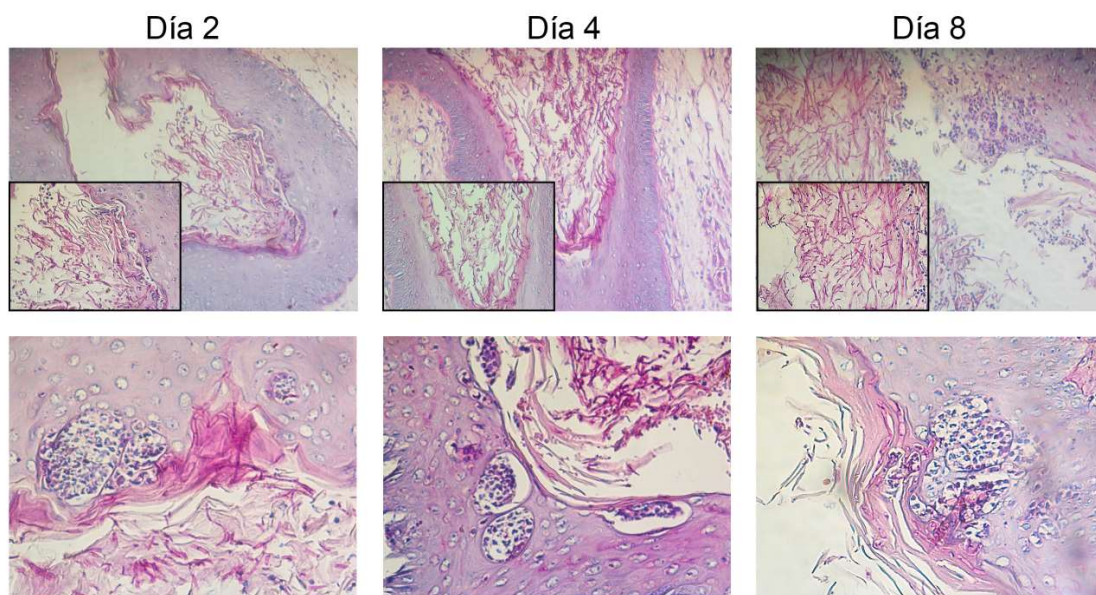


Figura 16. Hallazgos histopatológicos y respuesta inflamatoria en animales deficientes en *MyD88*. Fotografías representativas de cortes histológicos de vagina de animales infectados con 5.10^6 levaduras viables de *C. albicans* ATCC 36801 a los días 2, 4 y 8 pi teñidos con PAS-HE. Presencia de levaduras e hifas de *C. albicans* (panel superior). Aumento x200 y x400 en recuadros. Presencia de infiltrado inflamatorio (panel inferior). Aumento x400.

Estos resultados sugieren que la señal generada por *MyD88* no es requerida para el desarrollo de una robusta respuesta tisular y para la producción de IL-1 β hacia tiempos tardíos pi; sin embargo, participa en la inducción de procesos que regulan el control del crecimiento fúngico en el tracto mucoso vaginal.

Contribución de la vía de señalización del receptor innato Dectin-1 en la patogenia de la CVV

Dada la importancia de la participación de los CLRs en la respuesta antifúngica, la contribución de Dectin-1 fue previamente estudiada. El rol esencial de este receptor fue demostrado en modelos animales, donde la carencia de Dectin-1 resulta en la incapacidad de montar una respuesta inflamatoria protectora y la imposibilidad de controlar el crecimiento fúngico.

Diversas publicaciones demostraron que durante la infección con *C. albicans*, la ausencia de Dectin-1 resulta en una susceptibilidad aumentada a infecciones sistémicas y mucosas en modelos animales, incluyendo la CVV ¹²⁷. Sin embargo, otros autores comprobaron la falta de asociación entre la carencia de Dectin-1 y una susceptibilidad incrementada hacia infecciones por *Candida* ¹³⁵.

Las discrepancias entre los resultados podrían explicarse debido a que en los diferentes estudios se utilizaron ratones deficientes en Dectin-1 (Dectin-1^{-/-}) con distintos *backgrounds* genéticos. Además se utilizaron diferentes cepas de *C. albicans* para realizar las infecciones. Por lo tanto es importante tener en cuenta las características del *background* genético del hospedador y de la cepa de *Candida* utilizada, ya que los resultados obtenidos pueden variar ¹³⁶.

A fin de evaluar la contribución de la señal generada a través del receptor de β -glucanos Dectin-1 se utilizaron dos estrategias experimentales. En la primera de ellas se trabajó con cepas de *C. albicans* con mutaciones en la síntesis de β -glucanos de la pared celular y en la segunda se trabajó desarrollando el modelo de CVV en animales deficientes en el receptor.

Las cepas de *C. albicans* defectivas en la síntesis de β -glucanos presentan mutaciones inducidas sobre la cepa de referencia *C. albicans* SC5314, ampliamente estudiada en modelos de infección ^{44, 59}. Con el fin de poder comparar los resultados obtenidos con estas mutantes fue necesario establecer la susceptibilidad de los ratones C57BL/6 a esta cepa. Para ello el modelo experimental descrito en la Figura 8 fue llevado a cabo en ratones WT utilizando como inóculo infectivo $5 \cdot 10^6$ levaduras viables de *C. albicans* SC5314.

Observamos que esta cepa tuvo una capacidad infectiva similar a la cepa previamente utilizada, y *C. albicans* pudo ser recuperada de la cavidad vaginal a lo largo de todos los días evaluados (Figura 17A). Las poblaciones celulares en lavado vaginal fueron similares a lo encontrado en citoextendidos de animales infectados con la cepa ATCC 36801 (Figura 10B), pudiéndose observar abundantes CE descamadas, el morfotipo invasivo del hongo y PMN reclutados a la cavidad vaginal (Figura 17B).

En cuanto a las citoquinas intravaginales se decidió estudiar como ejemplo de citoquinas proinflamatorias a IL-1 β y TNF- α . A diferencia de lo observado en la infección de animales WT con la cepa ATCC 36801, la cepa SC5314 tiene la capacidad de generar una respuesta más robusta en cuanto a la producción de estas citoquinas proinflamatorias en el sitio de infección. A todos los días ensayados, los niveles de IL-1 β fueron superiores en animales infectados respecto a los estrogenizados ($p < 0,0001$ día 2 y 4, $p < 0,05$ día 8 pi). Similares resultados se encontraron para la citoquina TNF- α ($p < 0,0001$ día 2 y 4, $p < 0,01$ día 8 pi) (Figura 17C). Por su parte, los niveles de IL-17, IL-22 e IL-23 fueron indetectables en todas las muestras.

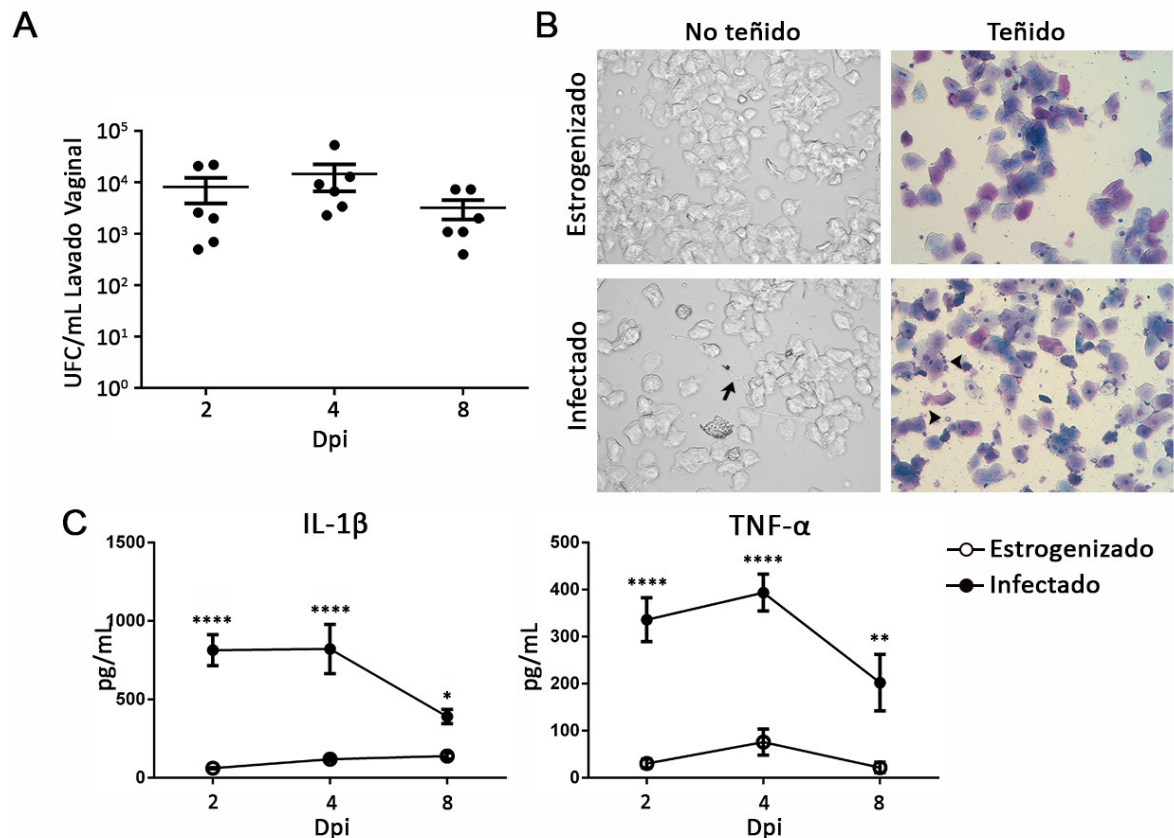


Figura 17. Susceptibilidad y cambios en el microambiente local durante la infección vaginal con altas dosis de *C. albicans* SC5314. **A)** Recuento de UFC por mL de lavado vaginal de animales infectados a los días 2, 4 y 8 pi con $5 \cdot 10^6$ levaduras viables de *C. albicans* SC5314. $n=6$. **B)** Fotografías representativas de citoextendidos de lavado vaginal de ratones estrogenizados (arriba) o infectados (abajo) en fresco o teñidos con May-Grünwald Giemsa, al día 2 pi. Presencia de hifas (flechas) y PMN (puntas de flechas). Magnificación x400. **C)** Niveles de citoquinas en muestras de lavado vaginal los días 2, 4 y 8 pi por la técnica de ELISA. En círculos vacíos animales estrogenizados y en círculos llenos animales infectados. Los valores representan la media \pm ESM. $n \geq 7$. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$. **** $p < 0,0001$ infectados vs estrogenizados.

Los cortes histológicos de animales infectados con la cepa de *C. albicans* SC5314 evidenciaron la presencia del patógeno en su forma infectiva de hifa, tanto en el lumen vaginal, como penetrando hacia capas internas de tejido (día 2 y 4 pi) (Figura 18, paneles superiores). Hacia el final del estudio se observaron menos hifas de *C. albicans* en las capas epiteliales más profundas y frecuentes formas fúngicas en el epitelio cornificado. La respuesta inflamatoria estuvo caracterizada por una importante presencia de PMN en el sitio, dispersos entre las capas epiteliales y formando numerosos microabscesos intraepiteliales y subcorneales (Figura 18, paneles inferiores).

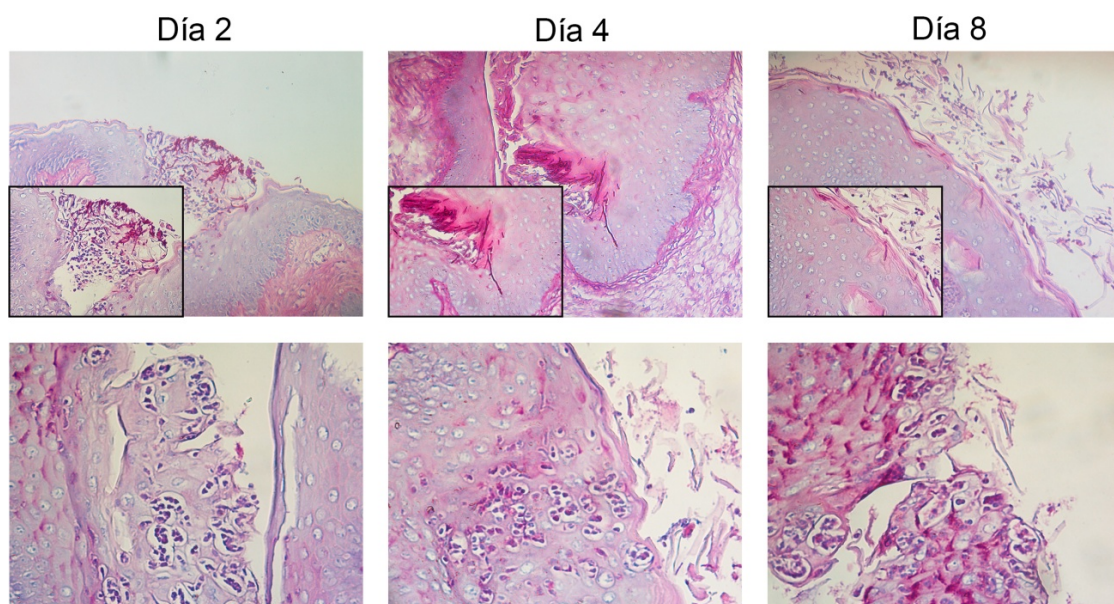


Figura 18. Hallazgos histopatológicos y respuesta inflamatoria durante la infección vaginal por *C. albicans* SC5314. Fotografías representativas de cortes histológicos de vagina de animales infectados con $5 \cdot 10^6$ levaduras viables de *C. albicans* SC5314 a los días 2, 4 y 8 pi teñidos con PAS-HE. Presencia de levaduras e hifas de *C. albicans* (panel superior). Aumento x200 y x400 en recuadros. Presencia de infiltrado inflamatorio (panel inferior). Aumento x400.

La infección vaginal con la cepa de *C. albicans* SC5314 estuvo caracterizada por la presencia de elevados niveles de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β y TNF- α en el lavado vaginal, una robusta respuesta inflamatoria y una menor invasividad del hongo hacia el final del estudio.

Susceptibilidad a la CVV en animales infectados con cepas de *C. albicans* defectivas en la expresión de β -glucanos

Un componente importante de la pared de *C. albicans* son los β -(1,3) glucanos. El complejo enzimático 1,3- β -D Glucan Sintasa se encarga de catalizar la biosíntesis de estos compuestos. Presenta al menos dos subunidades, Fksp y Rho1p, siendo este último un elemento regulatorio relacionado a gran cantidad de procesos celulares. La subunidad Fksp es codificada por tres genes relacionados, *FKS1*, *FKS2* y *FKS3* y contiene el sitio activo que cataliza la transferencia de azúcares de moléculas donantes activadas (Glucosa UDP) a moléculasceptoras específicas (1,3- β -D-glucosil(N)) formando enlaces glucosídicos³⁷. El gen *FKS1* es esencial en *C. albicans* y en la mayoría de las demás especies de *Candida*. *FKS2* se expresa cuando *FKS1* es delecionado o cuando las levaduras crecen en ausencia de glucosa y en otras situaciones de estrés como por ejemplo altas temperaturas. Por su parte, *FKS3* se expresa en bajos niveles en comparación con los otros genes y no parece contribuir de manera significativa a la capacidad de biosíntesis de los β -(1,3) glucanos.

Hay dos regiones altamente conservadas en el gen *FKS1*, denominadas *hot-spot*, en las cuales se han encontrado altas tasas de mutaciones. El *hot-spot 1* comprende 9 aminoácidos desde las posiciones 641 a 649 y el *hot-spot 2*, 8 aminoácidos, desde 1357 a 1364. Las sustituciones en Ser645 y Phe641 son las más abundantes y producen los fenotipos más diferentes a las cepas parentales. Estas mutaciones originan la disminución en la cantidad de β -(1,3) glucanos presentes en la pared del hongo. Estas cepas además se tornan resistentes al tratamiento con antifúngicos de la familia de las equinocandinas cuyo mecanismo de acción es la inhibición de la 1,3- β -D Glucan Sintasa. Las equinocandinas son utilizadas en el tratamiento de micosis invasivas, y las mutaciones en *FKS* son responsables de la falla terapéutica³⁸.

Para llevar a cabo el estudio del rol que desempeñan las señales a través de Dectin-1, se utilizaron cepas de *C. albicans* con mutaciones en diferentes aminoácidos de los *hot-spot 1* y *2* del gen *FKS1*. Las cepas de *C. albicans FKS1 S645S/P* (heterocigota para la

mutación) y *FKS1* S645P (homocigota para la mutación) se obtuvieron por presión selectiva con el agente antifúngico de la familia de las equinocandinas, anidulafungina, a partir de la cepa de *C. albicans* SC5314³⁷. Se infectaron hembras C57BL/6 con las diferentes cepas en estudio de acuerdo al protocolo establecido en la Figura 8, con una dosis infectiva de $5 \cdot 10^6$ levaduras viables. La carga fúngica intravaginal se evaluó mediante el recuento de UFC a los días 2, 4 y 8 pi (Figura 19A y B). No se encontraron diferencias significativas al comparar la carga fúngica obtenida durante la infección con las cepas *FKS1* S645S/P y *FKS1* S645P, con la cepa parental (Figura 19C).

La producción de las citoquinas IL-1 β y TNF- α se evaluó en animales infectados con la cepa *FKS1* S645P, cepa homocigota para la mutación, ya que presenta un fenotipo más alejado de la cepa parental con respecto a la mutante heterocigota. Se encontró que los niveles intravaginales de estas citoquinas en animales infectados con la cepa defectiva en β -glucanos fueron comparables a los encontrados en el grupo estrogenizado, y estuvieron disminuidos de manera significativa comparados con animales infectados con la cepa parental (Figura 19D).

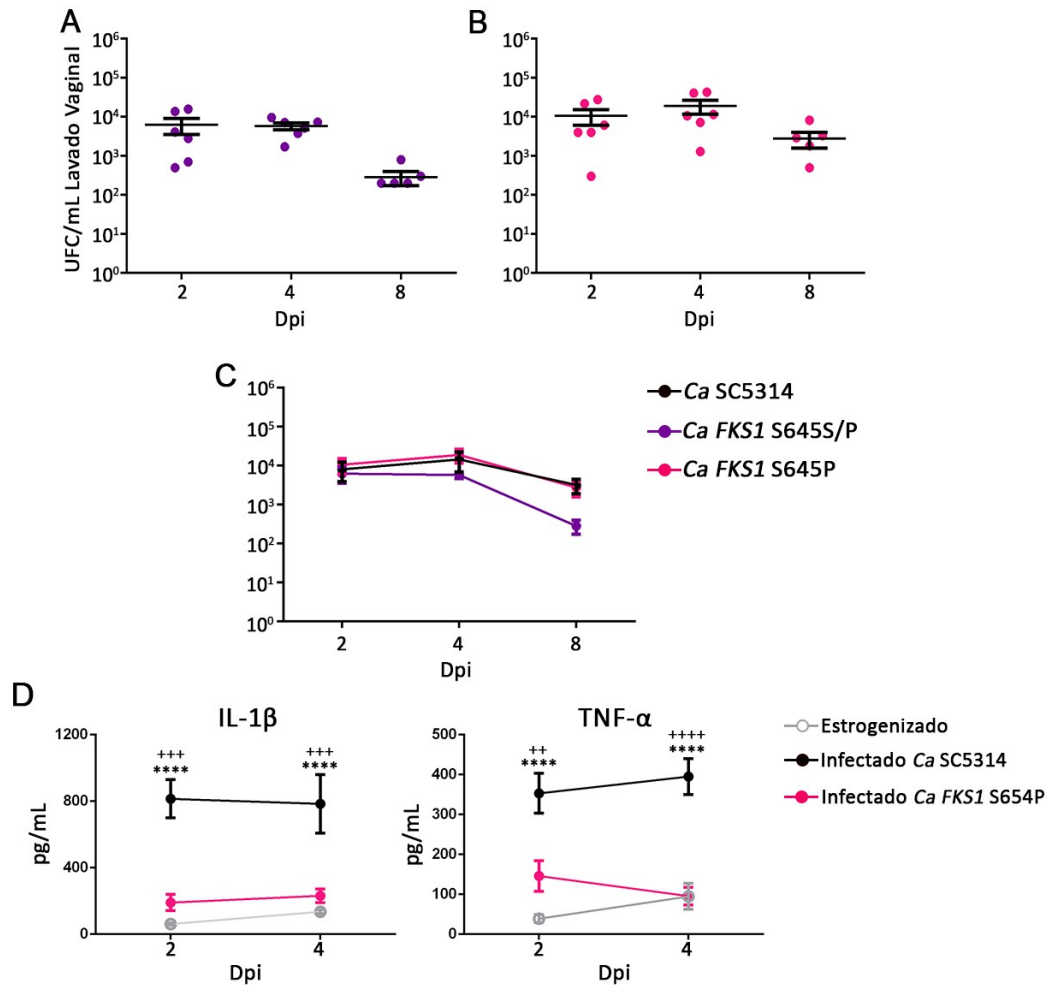


Figura 19. Susceptibilidad y cambios en el microambiente local durante la infección vaginal con cepas de *C. albicans* con diferente expresión de β -(1,3) glucanos por mutaciones en el *hot-spot 1* del gen *FKS1*. **A)** Recuento de UFC por mL de lavado vaginal de animales infectados a los días 2, 4 y 8 pi con $5 \cdot 10^6$ levaduras viables de *C. albicans* SC5314 *FKS1* S645S/P (**A**) o *C. albicans* SC5314 *FKS1* S645P (**B**). $n=6$. **C)** Recuento de UFC por mL de lavado vaginal de animales infectados con $5 \cdot 10^6$ levaduras viables de *C. albicans* SC5314 (negro), SC5314 *FKS1* S645S/P (violeta) o SC5314 *FKS1* S645P (rosa) a los días 2, 4 y 8 pi. Los valores representan la media \pm ESM. $n=6$. **D)** Niveles de citoquinas en muestras de lavado vaginal a los días 2 y 4 pi por la técnica de ELISA. Los valores representan la media \pm ESM. $n \geq 7$. **** $p < 0,001$. Animales infectados vs estrogenizados. ++ $p < 0,01$. +++ $p < 0,001$. ++++ $p < 0,0001$. Animales infectados con *C. albicans* SC5314 vs infectados con *C. albicans* *FKS1* S645P.

Estos resultados indican que esta mutación en el *hot-spot 1* del gen *FKS1* no modifica la capacidad infectiva de *Candida* ni facilita su remoción del lumen vaginal. Sin embargo, las cepas portadoras de la mutación que presentan alteraciones en la expresión de β -glucanos de su pared son incapaces de gatillar una robusta respuesta inflamatoria caracterizada por la producción de bajos niveles de IL-1 β y TNF- α en el microambiente vaginal.

Por otro lado se procedió a evaluar el impacto de la mutación en el *hot-spot 2* del gen *FKS1* de la 1,3- β -D Glucan Sintasa y su consecuencia en la progresión de la infección. Para ello se utilizó una cepa de *C. albicans* de origen clínico, *FKS1* R1361R/H aislada de hemocultivo de un paciente con candidiasis diseminada. Esta cepa fue utilizada para realizar la infección vaginal de ratones C57BL/6 de acuerdo al protocolo establecido. Al analizar la carga fúngica intravaginal de estos ratones, se observaron al día 2 pi mayores niveles de UFC comparados con los recuperados cuando la infección se realizó con la cepa SC5314 ($p < 0,01$) (Figura 20A y B).

La producción de TNF- α en el microambiente local se encontró ampliamente disminuida, de manera similar a lo observado en la infección con la cepa *FKS1* S645P (mutación en el *hot-spot 1*). Sin embargo, la disminución en los niveles de IL-1 β no fue tan marcada en estos animales con respecto a los infectados con la cepa de referencia, observándose un aumento significativo al día 2 pi con respecto al grupo estrogenizado ($p < 0,05$) (Figura 20C).

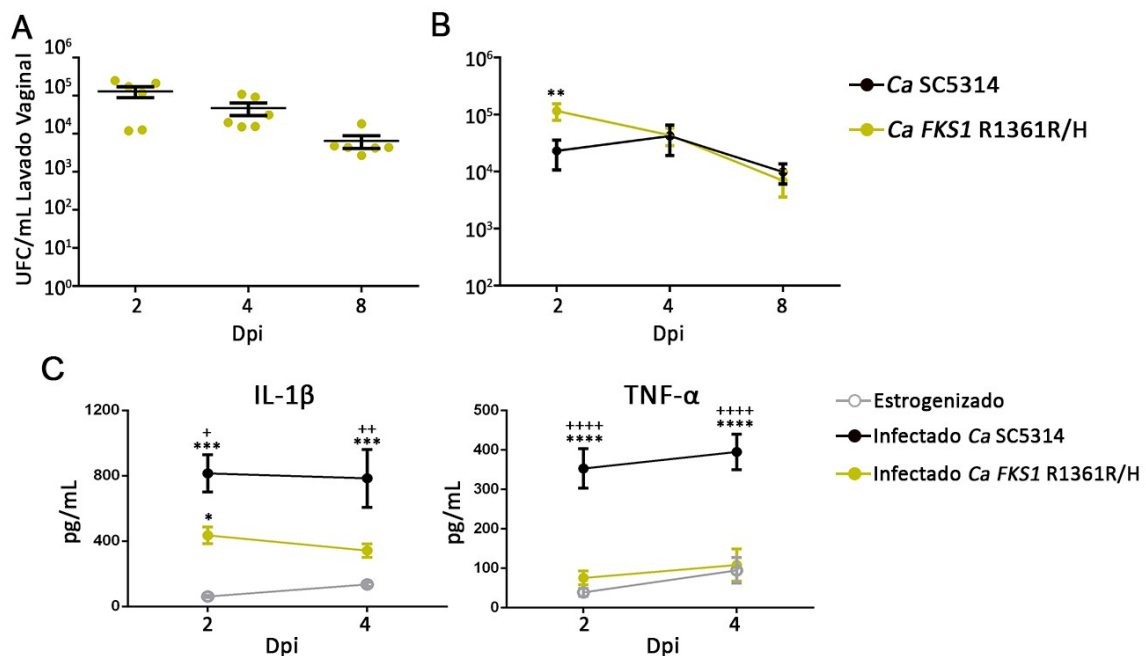


Figura 20. Susceptibilidad y cambios en el microambiente local durante la infección vaginal con cepas de *C. albicans* con diferente expresión de β -(1,3) glucanos por mutaciones en el *hot-spot 2* del gen *FKS1*. **A)** Recuento de UFC por mL de lavado vaginal de animales infectados a los días 2, 4 y 8 pi con $5 \cdot 10^6$ levaduras viables de *C. albicans* *FKS1* R1361R/H. $n=7$. **B)** Recuento de UFC por mL de lavado vaginal de animales infectados con $5 \cdot 10^6$ levaduras viables de *C. albicans* SC5314 (negro) o *FKS1* R1361R/H (verde) a los días 2, 4 y 8 pi. Los valores representan la media \pm ESM. $n=6$. ** $p < 0,01$. **C)** Niveles de citoquinas en muestras de lavado vaginal a los días 2 y 4 pi. Los valores representan la

media \pm ESM. n \geq 7. * p<0,05. *** p<0,001. **** p<0,0001. Animales infectados vs estrogenizados. + p<0,05. ++ p<0,01. +++ p<0,0001. Animales infectados con *C. albicans* SC5314 vs infectados con *C. albicans* FKS1 R1361R/H.

Estos resultados indican que las modificaciones en la pared celular que presentan las cepas defectivas en β -(1,3) glucanos impactan en la característica y magnitud de la respuesta inflamatoria local afectando la producción de IL-1 β y TNF- α por parte del hospedador, durante el modelo de CVV.

Susceptibilidad a la CVV en animales deficientes en el receptor Dectin-1

Como segunda estrategia experimental para evaluar la contribución de la señal generada a través del receptor de β -glucanos Dectin-1 en la patogenia de CVV, se infectaron ratones hembras deficientes en este receptor (Dectin-1^{-/-}) con *background* C57BL/6, según el modelo experimental descrito en la Figura 8 con la cepa de *C. albicans* SC5314. Los animales resultaron susceptibles a la infección por *C. albicans*, con UFC mayores al día 2 pi y una disminución progresiva de la carga fúngica hacia los días 4 y 8 pi (Figura 21A) pero sin diferencias significativas con respecto a la carga fúngica recuperada de animales WT (Figura 21B).

En el microambiente local se encontraron niveles aumentados de las citoquinas IL-1 β (p<0,0001 día 2 y 4, p<0,001 día 8 pi) y TNF- α (p<0,05 día 2, p<0,001 día 4, p<0,01 día 8 pi) durante toda la infección, en comparación con animales estrogenizados (Figura 21C). En ambas cepas de ratones, WT y Dectin-1^{-/-}, los niveles de IL-1 β en el grupo infectado fueron disminuyendo con el tiempo. Sin embargo, en animales deficientes, esta citoquina continuó aumentada el día 8 pi con respecto al grupo estrogenizado, a diferencia de la cepa WT.

Por su parte, las citoquinas IL-17, IL-22 e IL-23 fueron indetectables en todas las muestras ensayadas.

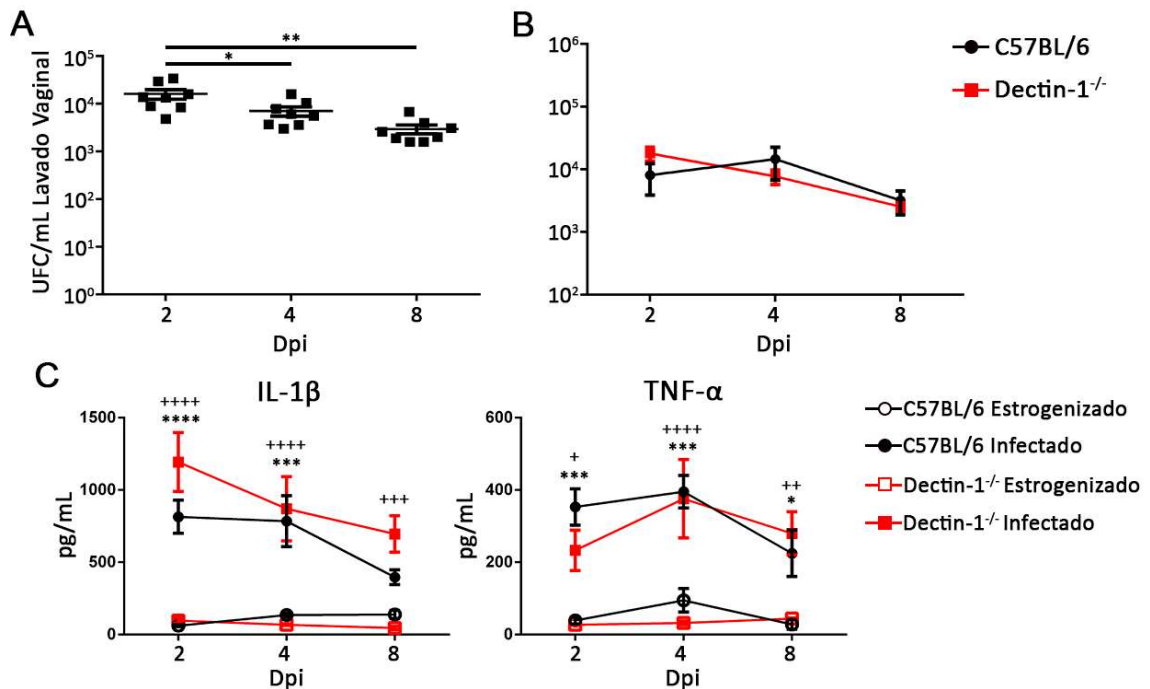


Figura 21. Susceptibilidad y cambios en el microambiente local durante la infección vaginal con *C. albicans* en animales deficientes en Dectin-1. **A)** Recuento de UFC por mL de lavado vaginal de animales Dectin1^{-/-} infectados a los días 2, 4 y 8 pi con 5.10⁶ levaduras viables de *C. albicans* SC5314. n=8. * p<0,05. ** p<0,01. **B)** Recuento de UFC por mL de lavado vaginal de animales WT (negro) o Dectin1^{-/-} (rojo) infectados a los días 2, 4 y 8 pi. Los valores representan la media \pm ESM. n \geq 7. * p<0,05. ** p<0,01. **C)** Niveles de citoquinas en muestras de lavado vaginal a los días 2, 4 y 8 pi de animales estrogenizados o infectados. Los valores representan la media \pm ESM. n \geq 7. * p<0,05. *** p<0,001. **** p<0,0001. WT infectados vs WT estrogenizados. + p<0,05. ++ p<0,01. +++ p<0,001. ++++ p<0,0001. Dectin1^{-/-} infectados vs Dectin-1^{-/-} estrogenizados.

Cortes histológicos de animales Dectin1^{-/-} mostraron la presencia de *C. albicans* adherida al estrato córneo del epitelio el día 2 pi. La evolución del proceso reveló abundantes hifas del hongo libre en el lumen de la cavidad, junto con gran cantidad de células descamadas e invadiendo el estrato epitelial (días 4 y 8) (Figura 22, paneles superiores). Además, se encontraron PMN infiltrando el estrato córneo (día 2), microabcesos en las capas epiteliales más profundas de tejido (día 4) y un franco infiltrado hacia el tiempo final del estudio (Figura 22, paneles inferiores).

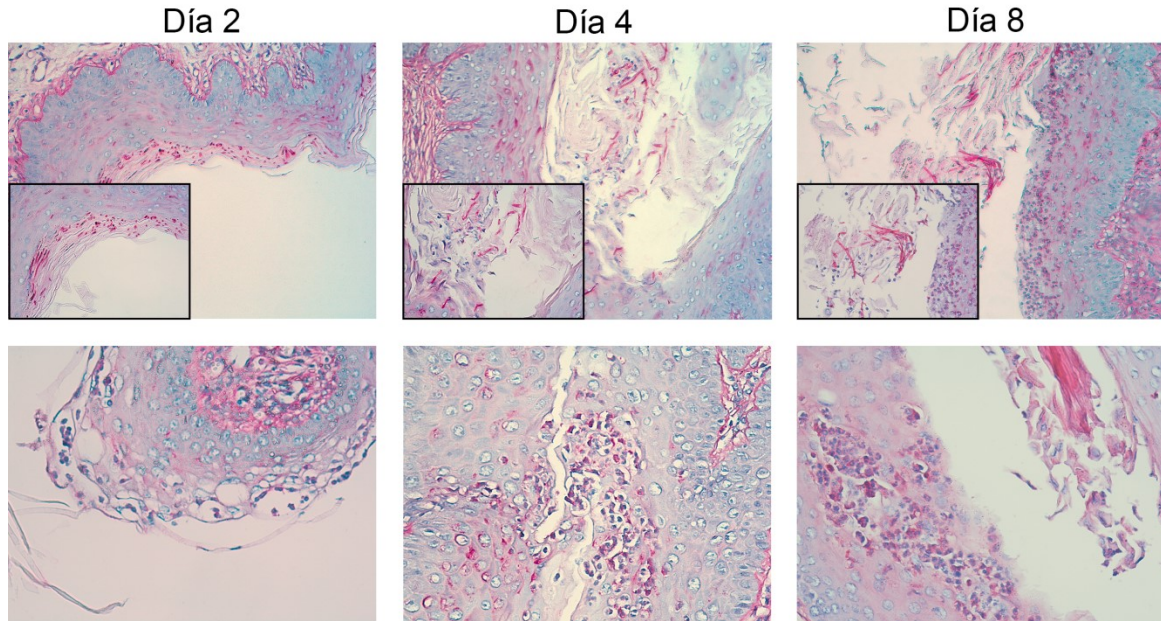


Figura 22. Hallazgos histopatológicos y respuesta inflamatoria en animales deficientes en Dectin1^{-/-}. Fotografías representativas de cortes histológicos de vagina de animales infectados con $5 \cdot 10^6$ levaduras viables de *C. albicans* SC5314 a los días 2, 4 y 8 pi teñidos con PAS-HE. Presencia de levaduras e hifas de *C. albicans* (panel superior). Aumento x200 y x400 en recuadros. Presencia de infiltrado inflamatorio (panel inferior). Aumento x400.

Estos resultados indican que el receptor Dectin-1 no desempeña un rol importante en el control de la carga fúngica vaginal en ratones con *background* C57BL/6 cuando la infección es producida por la cepa de *C. albicans* SC5314. Sin embargo, en su ausencia, los niveles de IL-1 β se mantienen aumentados, aún cuando en animales WT comienzan a disminuir en el día 8 pi, sugiriendo para Dectin-1 un rol en la modulación de esta citoquina durante el curso de la CVV.

CONCLUSIONES CAPÍTULO I

Estudio de la respuesta inmune innata en tracto genital femenino murino durante la infección por *C. albicans*: respuesta inflamatoria y contribución de los Receptores Innatos en la patogenia de la enfermedad.

Durante la patogenia de la infección vaginal aguda por *C. albicans*:

- La ausencia de señales mediadas por TLR2 determina una elevada carga fúngica intravaginal y una mayor invasividad del tracto mucoso en las etapas tempranas de la infección (48 horas), demostrando la relevancia de este PRR en el control inicial del crecimiento del hongo y en la invasión tisular. En respuesta a la elevada penetración de *C. albicans* los animales deficientes en TLR2 desarrollan una robusta reacción tisular y un ambiente proinflamatorio caracterizado por elevados niveles de citoquinas y presencia de células de la inmunidad innata que permiten la remoción del hongo y el control de la infección.

- La ausencia de señales mediadas por MyD88 determina una elevada y sostenida carga fúngica intravaginal, con un predominio masivo del morfotipo invasivo del hongo durante el transcurso de la infección, demostrando la relevancia de esta vía de señalización en el control sostenido del crecimiento del hongo y la invasión tisular. En respuesta a la elevada penetración de *C. albicans* los animales deficientes en MyD88 desarrollan una respuesta tisular con escasa producción de mediadores inmunes y aumento tardío de IL-1 β , que resultan insuficientes para remover al hongo y controlar la infección.

- La expresión defectiva de β -(1-3) glucanos en la pared de *C. albicans* no modifica la capacidad del hongo de colonizar la cavidad vaginal, observándose una infectividad similar a la cepa parental, demostrando que el reconocimiento de estos PAMPs fúngicos no es relevante para el control del crecimiento intravaginal del hongo. La atenuada estimulación de Dectin-1 por las cepas de *C. albicans* con mutaciones en *FKS1*, promueven una escasa inducción de mediadores inmunes y condicionan la producción local de IL-1 β .

- Las señales mediadas a través del receptor Dectin-1 no contribuyen en la modulación de la carga fúngica intravaginal, demostrando que este PRR no participa en el control del

crecimiento del hongo en la cavidad vaginal. En respuesta a la presencia y penetración de *C. albicans*, los animales deficientes en Dectin-1 desarrollan una eficiente reacción tisular y un ambiente proinflamatorio caracterizado por elevados niveles de IL-1 β y presencia de células de la inmunidad innata que permiten la remoción del hongo y el control de la infección.

CAPÍTULO II

Estudio de péptidos antimicrobianos de la familia de β -Defensinas en tracto genital femenino murino en un modelo de CVV.

Las BDs son pequeños péptidos catiónicos (4-6 kDa) que están presentes en diversos tejidos mucosos como los tractos gastrointestinal, respiratorio y urogenital. Pueden ser de expresión constitutiva o inducible por diferentes estímulos, como componentes bacterianos o citoquinas proinflamatorias^{98, 102, 103}.

Las BDs poseen actividad antifúngica por sí mismas o ejercen su acción a través de la inmunomodulación, ya que son quimioattractantes de ciertas poblaciones celulares al sitio de la infección.

Recientes estudios sobre la acción de las BDs se han abocado a la candidiasis oral. Sin embargo, el rol de estos péptidos durante la CVV se desconoce. Con el objetivo de esclarecer este interrogante se empleó el modelo murino de CVV, desarrollado previamente. A través de la extracción de material genético de vagina se determinó mediante qPCR la expresión de mBD1, 3 y 14 durante la infección. Debido a la importancia fisiológica de mBD1 en tejidos mucosos, se profundizó en el estudio de este péptido en particular. Para corroborar los resultados obtenidos por biología molecular, se determinaron los niveles proteicos de mBD1 en células de lavado vaginal de ratón, por citometría de flujo y la expresión tisular en vagina, por la técnica de inmunohistoquímica.

Para determinar la participación de las señales a través del receptor innato TLR2 en la inducción de la producción de mBD1 durante la CVV se desarrolló el modelo de infección en animales TLR2^{-/-}. En muestras de vagina, se determinó la expresión de transcritos del PAM, y se corroboró su expresión tisular en cortes histológicos mediante inmunohistoquímica.

Con el fin de evaluar si las características del patógeno pueden modular diferencialmente la expresión de BD1 en tracto genital femenino, se llevó a cabo la infección de ratones WT con una cepa de *C. albicans* aislada de una paciente con CVVR. En este grupo experimental se determinaron UFC, niveles intravaginales de IL-1 β y expresión de BD1 total y en la población de PMN.

Expresión de BDs en tracto genital femenino murino durante la CVV

Las BDs humanas 1, 2 y 3 han sido asociadas a la protección contra *Candida* en la cavidad oral^{94, 137}. García-Lopez y col. demostraron que las mismas son expresadas en tracto reproductor femenino¹³⁸, pero actualmente se desconoce su rol en la CVV. Los homólogos de estos péptidos en ratón se denominan mBD 1, 3 y 14^{104, 105}, respectivamente.

Las BDs son producidas principalmente por CE y también por ciertas células de la inmunidad innata. La primera línea de defensa y reconocimiento de los patógenos en la CVV son las CE, que pueden rápidamente liberar mediadores inflamatorios entre los que se encuentran las BDs¹¹⁰.

Con el fin de estudiar la expresión de las BDs en tracto reproductor femenino durante la CVV, hembras C57BL/6 de los tres grupos experimentales (no estrogenizado, estrogenizado, infectado) se sacrificaron y las vaginas se removieron con el fin de extraer ARN. Debido a la temprana liberación de estos mediadores inmunes, es que las primeras determinaciones se realizaron a un tiempo corto pi (48 horas). Luego de la obtención de ADNc y la amplificación mediante qPCR con *primers* específicos, se observó un aumento significativo de los transcritos de mBD1 en el grupo infectado ($p < 0,05$ con respecto al grupo no estrogenizado) y de mBD3 ($p < 0,05$ con respecto a los grupos no estrogenizado y estrogenizado) (Figura 23).

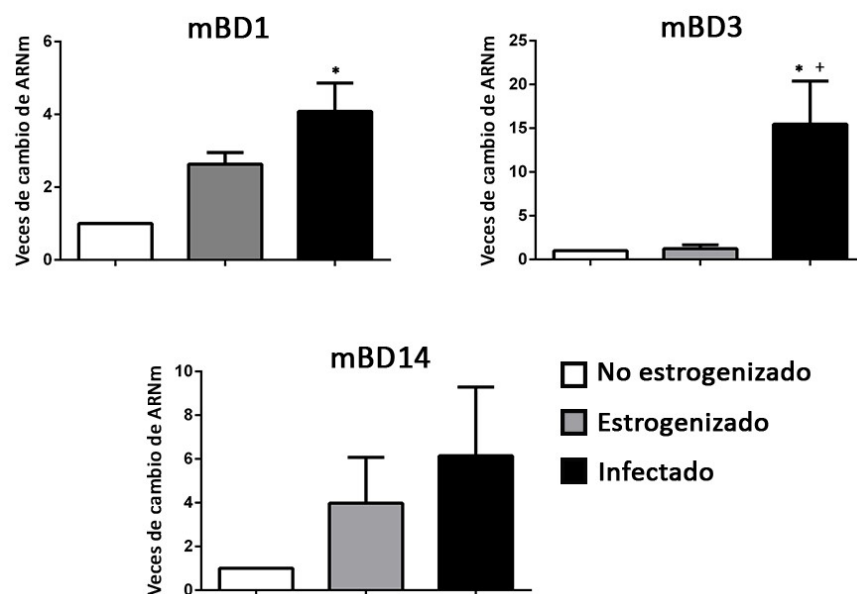


Figura 23. Expresión local de transcriptos de mBDs en Candidiasis Vulvovaginal. Expresión de ARNm en vagina de mBD1, mBD3 y mBD14 en animales no estrogenizados (blanco), estrogenizados (gris) e infectados con la cepa de *C. albicans* ATCC 36801 (negro) al día 2 pi mediante qPCR. Los valores representan la media \pm ESM. $n \geq 4$. * $p < 0,05$ Infectado vs no estrogenizado. + $p < 0,05$ Infectado vs estrogenizado.

Estos resultados indican que la presencia de *C. albicans* en el tracto genital femenino es capaz de inducir la expresión de mBD1 y mBD3 durante la CVV.

Expresión de BD1 en tracto genital femenino murino durante la CVV

BD1 es considerada el PAM más importante en la defensa de los epitelios frente a infecciones. Es la única BD de expresión constitutiva en piel, queratinocitos, tractos genitourinario y respiratorio. Su producción puede ser inducida por ciertos estímulos, como PAMPs microbianos y mediadores inmunes¹¹². Posee actividad directa frente a un amplio espectro de microorganismos, incluida *C. albicans*.

Ratones BD1 KO exhiben mayores niveles de *Staphylococcus sp.* en vejiga, y resuelven pobremente infecciones pulmonares con altas dosis de *Haemophilus influenzae*; por lo tanto, se considera que BD1 controla la flora microbiana presente en mucosas. Recientemente, se demostró la relación existente entre un polimorfismo en el gen que codifica a hBD1 y la susceptibilidad aumentada en pacientes a la infección por Virus del Papiloma Humano¹³⁹. En base a la evidencia existente y a la ausencia de información en la CVV, se decidió profundizar el estudio de este péptido en particular.

Para corroborar los resultados obtenidos a nivel molecular con la expresión de la proteína se evaluó la presencia de mBD1 en células de lavado vaginal de animales de los tres grupos experimentales a diferentes días pi, mediante citometría de flujo, utilizando un anticuerpo monoclonal específico para mBD1 y marcación intracelular. Teniendo en cuenta que las BDs, así como todos los PAMs, son liberados de manera rápida frente a una infección, es que se incluyó en la cinética de estudio un tiempo más temprano para su evaluación (día 1 pi).

Al día 1 pi no se observaron cambios, sin embargo, de modo similar a lo observado a nivel transcripcional, las células mBD1⁺ de lavado vaginal se encontraron aumentadas en animales infectados comparados con los grupos no estrogenizado y estrogenizado al día 2 pi ($p < 0,05$) en porcentaje (Figura 24A) y en número absoluto (Figura 24B). Al día 8 pi se observó

un aumento en la cantidad de células mBD1⁺ en el grupo infectado con respecto al no estrogenizado ($p < 0,0001$), pero no hubo diferencias entre los grupos infectado y estrogenizado, sugiriendo que el tratamiento con estrógeno es capaz de modular la expresión de este péptido (Figura 24A).

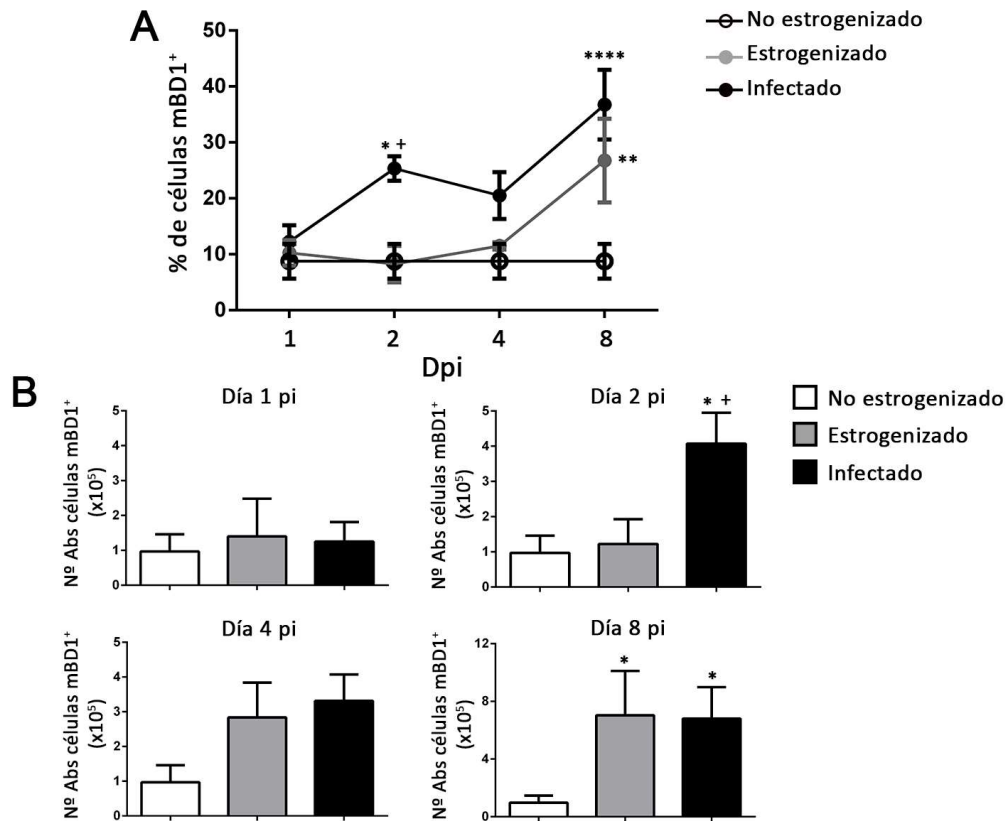


Figura 24. Cinética de expresión de mBD1 durante la Candidiasis Vulvovaginal. A) Expresión de mBD1 en lavado vaginal de animales no estrogenizados (círculos blancos), estrogenizados (círculos grises) e infectados con la cepa de *C. albicans* ATCC 36801 (círculos negros) a los días 1, 2, 4 y 8 pi utilizando un anticuerpo primario de conejo anti BD1 de ratón y un anticuerpo secundario anti conejo conjugado a AlexaFluor 647 y evaluadas por citometría de flujo. Porcentaje de células mBD1⁺. * $p < 0,05$. **** $p < 0,001$. Infectado vs no estrogenizado. + $p < 0,05$ Infectado vs estrogenizado. **B)** Número absoluto de células mBD1⁺ en los diferentes grupos y a los tiempos especificados. Los valores representan la media de tres experimentos independientes \pm ESM. * $p < 0,05$. Infectado vs no estrogenizado. + $p < 0,05$ Infectado vs estrogenizado.

La expresión de BD1 también se evaluó en cortes histológicos de vagina de animales de los tres grupos experimentales utilizando un anticuerpo específico para BD1 de ratón, mediante la técnica de Inmunohistoquímica. Se observó una expresión basal en animales no estrogenizados (Figura 25A) que se tornó más evidente en animales estrogenizados (Figura

25B) y mayor en el grupo infectado (Figura 25C). A nivel tisular el aumento en la expresión de este péptido en animales infectados fue sostenido a lo largo de todos los días evaluados.

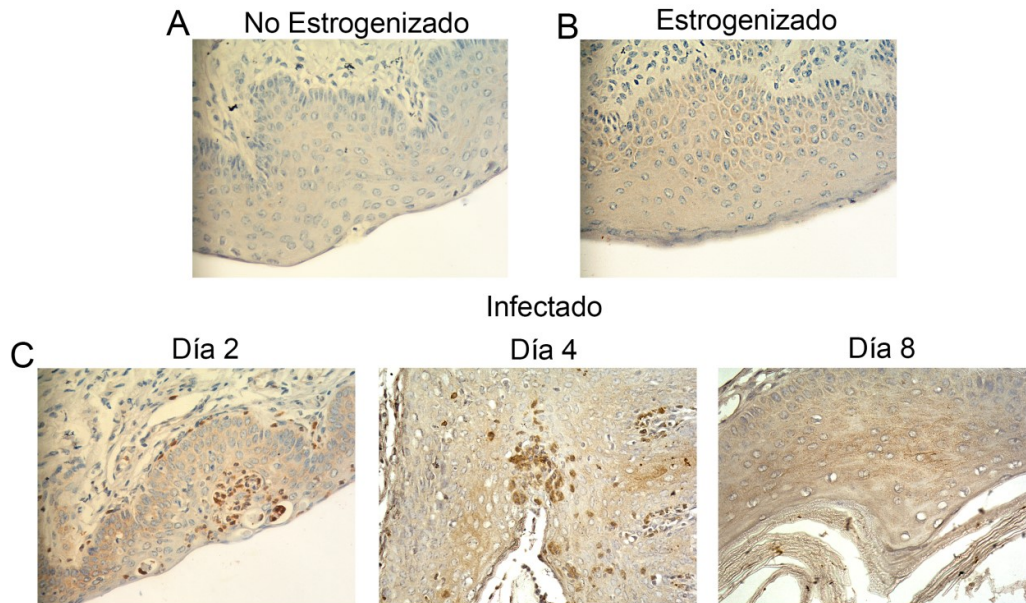


Figura 25. Cinética de expresión tisular de mBD1 durante la Candidiasis Vulvovaginal. Fotografías representativas de expresión de mBD1 en cortes histológicos de vagina de ratones no estrogenizados (A), estrogenizados al día 2 (B) o infectados con $5 \cdot 10^6$ levaduras viables de *C. albicans* ATCC 36801 a los días 2, 4 y 8 pi (C) mediante inmunomarcación con un anticuerpo primario de conejo anti BD1 de ratón y un anticuerpo secundario anti conejo conjugado a Peroxidasa y revelados con DAB. Magnificación x400.

Esta técnica permitió identificar las poblaciones celulares productoras del péptido, siendo posible observar que CE y PMN presentaron marca positiva para mBD1 (Figura 25C).

Contribución de la señal del receptor innato TLR2 en la expresión de BD1 en tracto genital femenino murino durante la CVV

Resultados previos demostraron la presencia de un microambiente más inflamatorio en tracto genital femenino durante el modelo de CVV en ausencia de las señales gatilladas a través del receptor TLR2. Ratones deficientes en TLR2 presentaron niveles elevados de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β e IL-6, además de una respuesta tisular exacerbada, evidenciada por la presencia de PMN, comparada con la observada en ratones WT (Figuras 13 y 14).

Diferentes estudios demostraron la relación existente entre señales sensadas por receptores de la familia de TLRs y la inducción en la expresión de BDs. Por ejemplo, en células madres mesenquimales, hBD2 es inducida a través de señales provenientes de TLR4¹⁴⁰, mientras que cultivos primarios de CE orales humanas producen este péptido a través de la señalización vía los heterodímeros TLR1/2 y TLR2/6¹⁴¹.

Sin embargo, poco se conoce sobre la contribución de las señales a través de TLR2 en la expresión de mBD1 durante la infección vaginal por *C. albicans*. Con el fin de abordar este interrogante, se desarrolló el esquema de infección, presentado en la Figura 8, en ratones TLR2^{-/-} y se llevaron a cabo diferentes determinaciones. Conociendo que el pico máximo de expresión de este péptido se produce a las 48 horas pi, a dicho tiempo se sacrificaron animales de los tres grupos experimentales, se extrajeron las vaginas y se purificó el ARN. Luego, mediante RT-qPCR se estudió la expresión de transcritos de mBD1. Al igual que en animales WT, hubo un aumento en la expresión de estos transcritos en animales infectados con respecto al grupo no estrogenizado ($p < 0,05$) (Figura 26).

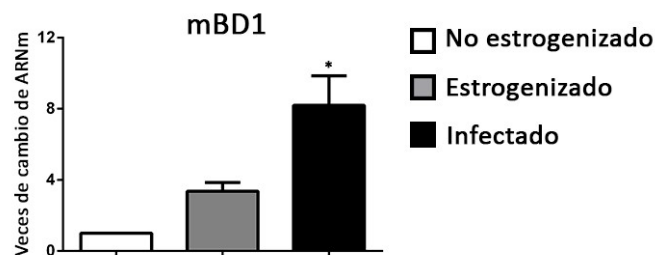


Figura 26. Expresión local de transcritos de mBDs durante la Candidiasis Vulvovaginal en animales deficientes en TLR2. Expresión de ARNm en vagina de mBD1 en animales no estrogenizados (blanco), estrogenizados (gris) e infectados con la cepa de *C. albicans* ATCC 36801 (negro) al día 2 pi mediante qPCR. Los valores representan la media \pm ESM. $n \geq 4$. * $p < 0,05$ Infectado vs no estrogenizado.

De manera interesante, mientras que en ratones WT los transcritos de mBD1 estuvieron aumentados 4 veces en el grupo infectado con respecto al no estrogenizado (Figura 23), en animales TLR2^{-/-} este cambio fue de 8 veces.

Para evaluar la expresión tisular proteica de mBD1 en el sitio de infección se realizaron tinciones con un anticuerpo específico para BD1 de ratón, mediante la técnica de Inmunohistoquímica en cortes de vagina de ratones TLR2^{-/-} de los tres grupos experimentales. Se observó una expresión basal del PAM en el grupo de animales que no recibieron tratamiento en concordancia a su expresión constitutiva (Figura 27A), encontrándose un ligero aumento en la expresión asociado el tratamiento hormonal (Figura

27B). En respuesta a la presencia del hongo, la BD1 se encontró aumentada en cortes histológicos provenientes de vaginas de animales infectados a los diferentes días pi (Figura 27C).

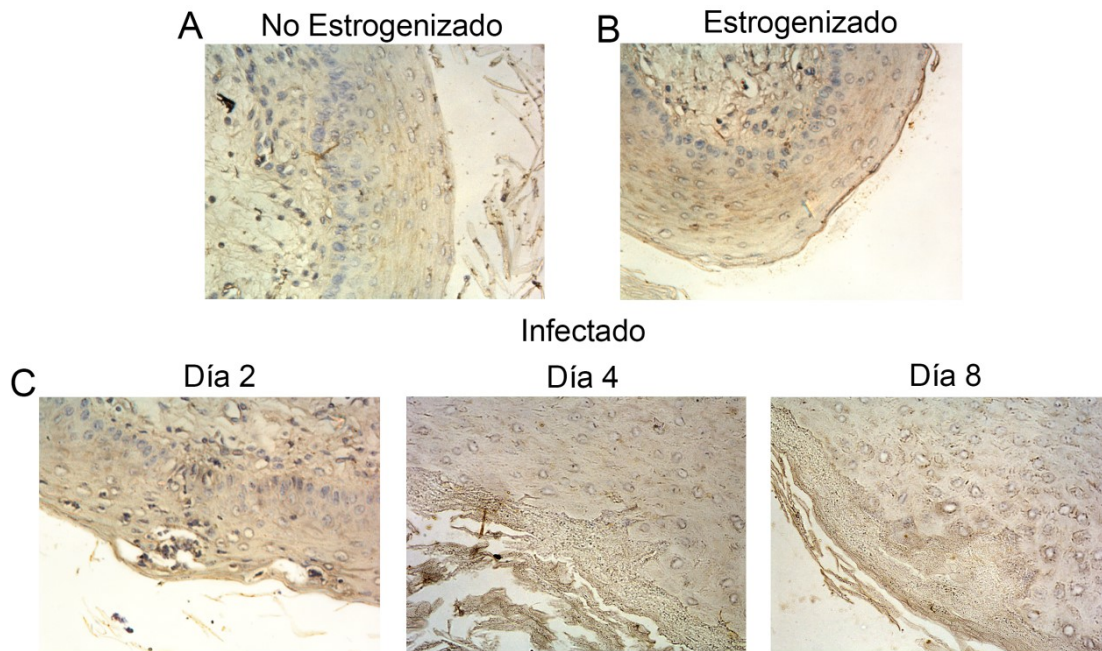


Figura 27. Cinética de expresión tisular de mBD1 durante la Candidiasis Vulvovaginal en animales deficientes en TLR2. Fotografías representativas de expresión de mBD1 en cortes histológicos de vagina de ratones TLR2^{-/-} no estrogenizados (**A**), estrogenizados al día 2 (**B**) o infectados con 5.10^6 levaduras viables de *C. albicans* ATCC 36801 a los días 2, 4 y 8 pi (**C**) mediante inmunomarcación con un anticuerpo primario de conejo anti BD1 de ratón y un anticuerpo secundario anti conejo conjugado a Peroxidasa y revelados con DAB. Magnificación x400.

Teniendo en cuenta estos resultados se puede inferir que la señalización a través del receptor innato TLR2 no sería necesaria para la expresión de mBD1 en este modelo de infección vaginal por *C. albicans*.

Expresión de BD1 en tracto genital femenino murino durante la infección con una cepa clínica aislada de una paciente con CVVR

Con el fin de evaluar si la expresión de BD1 puede ser modulada de manera diferente dependiendo de la patogenicidad del hongo, se llevó a cabo la infección de ratones C57BL/6 con una cepa de *C. albicans* aislada de una paciente con CVVR reclutada en nuestro estudio (ver Materiales y Métodos). La cepa fue identificada mediante MALDI-TOF y técnicas moleculares y denominada en este capítulo como *C. albicans* CVVR.

La carga fúngica intravaginal determinada mediante el recuento de UFC presentó niveles elevados y sostenidos en los días 2 y 4 pi, con una disminución hacia el día 8 pi ($p < 0,05$) (Figura 28A). Cuando fue evaluada la citoquina IL-1 β , considerada una de las responsables de los síntomas asociados a la inflamación vaginal, sus niveles se encontraron muy aumentados en lavados vaginales provenientes de animales infectados con la cepa clínica en comparación con el grupo estrogenizado ($p < 0,0001$) (Figura 28C). La producción de IL-1 β fue máxima al día 2 pi y su aumento se mantuvo hacia el día 4 pi.

La comparación entre las UFC obtenidas en ratones infectados con la cepa ATCC 36801 y la cepa *C. albicans* CVVR, arrojó que la carga fúngica fue significativamente mayor al día 2 pi cuando la infección fue causada por la cepa clínica ($p < 0,05$) (Figura 28B). Además, la cepa proveniente de paciente tuvo la capacidad de generar niveles mayores de IL-1 β en el tracto reproductor femenino, con respecto a la cepa de colección ($p < 0,0001$) (Figura 28B).

Al estudiar la expresión de mBD1 en células de lavado vaginal de animales infectados con la cepa *C. albicans* CVVR se observó un aumento en el porcentaje de células productoras de mBD1 a días 2 y 4 pi con respecto a los grupos no estrogenizado ($p < 0,001$) y estrogenizado ($p < 0,0001$ día 2 y $p < 0,01$ día 4) y un aumento en el número absoluto de las mismas a días 2 ($p < 0,05$ vs grupos no estrogenizado y estrogenizado) y 4 pi ($p < 0,05$ vs grupo no estrogenizado). Al comparar los resultados en animales infectados por las cepas de *C. albicans* de diferente origen (de colección y aislado clínico), se observó que la infección con *C. albicans* CVVR indujo una mayor expresión de mBD1 al día 2 pi ($p < 0,05$) (Figura 28D y E).

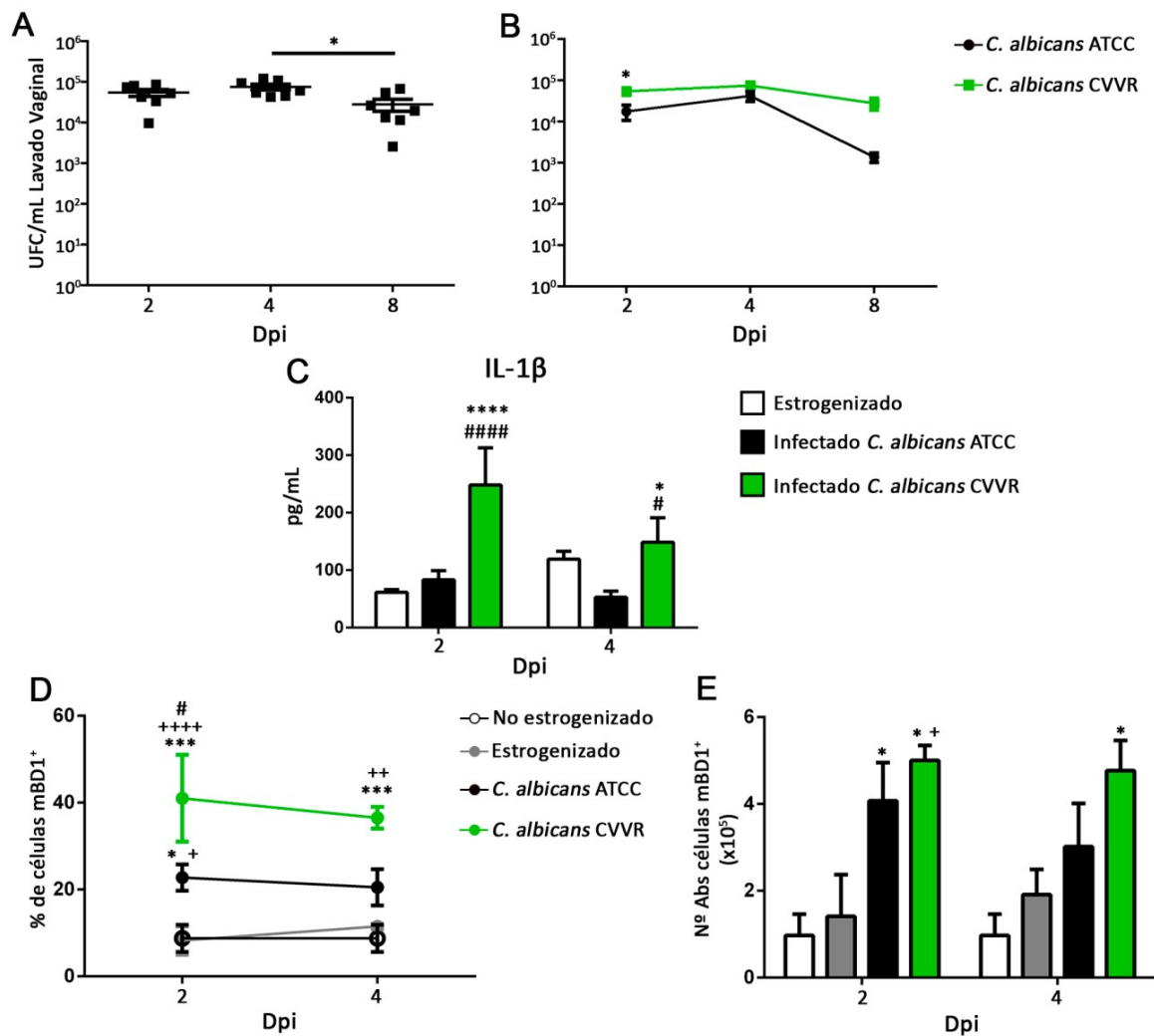


Figura 28. Susceptibilidad y producción de mediadores inmunes y mBD1 durante la Candidiasis Vulvovaginal utilizando una cepa de *C. albicans* recuperada de paciente con CVVR. **A)** Recuento de UFC por mL de lavado vaginal de animales infectados a los días 2, 4 y 8 pi con $5 \cdot 10^6$ levaduras viables de *C. albicans* CVVR. $n=7$. * $p<0.05$. **B)** Recuento de UFC por mL de lavado vaginal de animales infectados a los días 2, 4 y 8 pi con *C. albicans* ATCC 36801 (negro) o *C. albicans* CVVR (verde). Los valores representan la media \pm ESM. $n \geq 7$. * $p<0,05$. **C)** Niveles de IL-1 β en muestras de lavado vaginal los días 2 y 4 pi de animales estrogenizados (blanco), infectados con *C. albicans* ATCC (negro) o *C. albicans* CVVR (verde). Los valores representan la media \pm ESM. $n \geq 7$. * $p<0,05$. Infectado vs estrogenizado. # $p<0,01$. Infectado *C. albicans* ATCC vs *C. albicans* CVVR. **D)** Expresión de mBD1 en lavado vaginal de animales no estrogenizados (círculos blancos), estrogenizados (círculos grises), infectados con *C. albicans* ATCC (círculos negros) o *C. albicans* CVVR (círculos verdes) a los días 2 y 4 utilizando un anticuerpo de conejo anti BD1 de ratón y un anticuerpo secundario anti conejo conjugado a AlexaFluor 647 y evaluados por citometría de flujo. Porcentaje de células mBD1⁺. Los valores representan la media de tres experimentos independientes \pm ESM. * $p<0,05$. *** $p<0,001$. Infectado vs no estrogenizado. + $p<0,05$. +++ $p<0,001$. Infectado vs estrogenizado. # $p<0,5$. Infectado *C. albicans* ATCC vs *C. albicans* CVVR. **E)** Número absoluto de células mBD1⁺ en los diferentes grupos y a los tiempos especificados. Los valores representan la media de tres experimentos independientes \pm ESM. * $p<0,05$. Infectado vs no estrogenizado. + $p<0,05$ Infectado vs estrogenizado.

Los resultados indican que la cepa de *C. albicans* de origen clínico posee una mayor capacidad infectiva en el modelo de CVV usado en este trabajo, siendo capaz de generar una respuesta inmune temprana más robusta, evidenciada por mayores niveles de IL-1 β y células productoras de mBD1.

Teniendo en cuenta que el reclutamiento de PMN al tracto genital femenino durante la CVV contribuye al daño tisular y a la sintomatología de la patología, es que se estudió la presencia de esta población celular en lavado vaginal de ratones infectados con la cepa de *C. albicans* CVVR, mediante citometría de flujo.

La cantidad de PMN (células Gr-1⁺) a los días 2 y 4 pi no mostró cambios estadísticamente significativos entre todos los grupos experimentales utilizados tanto en porcentaje como en número absoluto (Figura 29A y B). La infección con la cepa proveniente de paciente con CVVR no generó cambios en el reclutamiento de PMN al sitio de infección comparado con el perfil observado en los lavados vaginales de animales infectados con la cepa de colección.

Debido a que previamente se estableció que BD1 es producida por CE y por PMN, se estudió la expresión del péptido en PMN reclutados a la cavidad vaginal de animales infectados con la cepa *C. albicans* CVVR, mediante doble marcación (de membrana para Gr-1 e intracelular para mBD1) y por citometría de flujo. Al día 2 pi los PMN productores de mBD1 estuvieron aumentados con respecto a la misma población aislada de animales infectados con la cepa ATCC ($p < 0,05$) (Figura 29C).

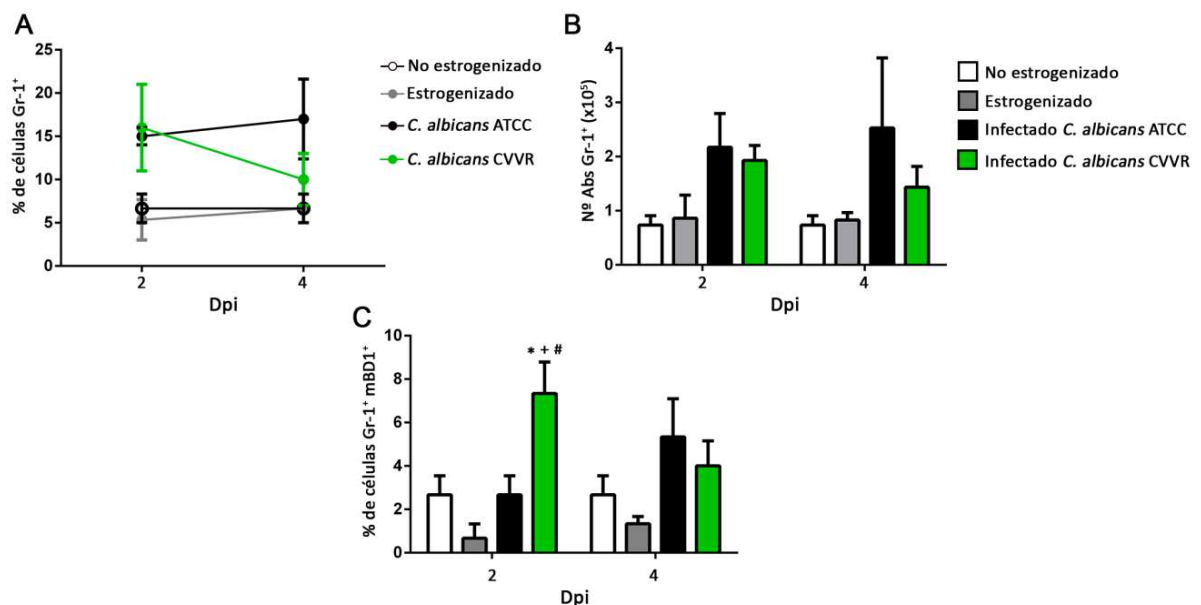


Figura 29. Presencia de infiltrado inflamatorio y producción de mBD1 por PMN durante la Candidiasis Vulvovaginal utilizando una cepa de *C. albicans* recuperada de paciente con CVVR. A) Presencia de PMN (Gr-1⁺) en lavado vaginal de animales no estrogenizados (círculo vacío), estrogenizados (círculo gris) e infectados con *C. albicans* ATCC 36801 (círculo negro) o *C. albicans* CVVR (círculo verde) a día 2 y 4 pi en porcentaje. Los valores representan la media \pm ESM de tres experimentos independientes. **B)** Número absoluto de células Gr-1⁺ en los diferentes grupos y a los tiempos especificados. Los valores representan la media de tres experimentos independientes \pm ESM. **C)** Porcentaje de células doble positivas Gr-1⁺/mBD1⁺ en lavado vaginal en los diferentes grupos y a los tiempos especificados. Los valores representan la media de tres experimentos independientes \pm ESM. * $p < 0,05$ Infectado vs no estrogenizado. + $p < 0,05$. Infectado vs estrogenizado. # $p < 0,05$ Infectado *C. albicans* CVVR vs *C. albicans* ATCC.

Estos resultados indican que los PMN reclutados al lumen vaginal durante la infección con *C. albicans* CVVR poseen una capacidad mayor de producir mBD1 a tiempos cortos pi.

CONCLUSIONES CAPÍTULO II

Estudio de péptidos antimicrobianos de la familia de β -Defensinas en tracto genital femenino murino en un modelo de CVV.

- La infección vaginal por *C. albicans* modifica la expresión del péptido antimicrobiano constitutivo β -Defensina 1 produciendo un incremento en su expresión a las 48 horas posteriores a la infección con respecto a controles.
- La vía de señalización a través del receptor innato TLR2 no se encuentra involucrada en la inducción de la expresión de β -Defensina 1 en el tracto vaginal de ratones infectados con *C. albicans*.
- La infección vaginal producida por una cepa de *C. albicans* de origen clínico induce un aumento en la producción de β -Defensina 1 de manera prolongada (48 y 96 horas pi) comparado con la infección causada por una cepa de colección.
- En la CVV producida por una cepa de *C. albicans* de origen clínico se encuentra incrementada de manera significativa la producción de β -Defensina 1 en la población de PMN reclutados al lumen vaginal a las 48 horas pi.

CAPÍTULO III

Estudio de mediadores inmunes y de péptidos antimicrobianos de la familia de las β -Defensinas en tracto genital femenino de pacientes con CVV y mecanismos involucrados en su regulación.

La CVV constituye una enfermedad inflamatoria aguda y una razón frecuente de consulta ginecológica y su incidencia en mujeres en edad fértil es elevada (75%). Existe otra presentación de esta patología caracterizada por la recurrencia de sus síntomas (4 o más episodios al año), la CVVR, con una prevalencia del 9% en la población. La probabilidad de que la CVV progrese a su forma recurrente es alta y muchos aspectos de su etiopatogenia permanecen sin definir^{1,5}.

Con el objetivo de abordar el estudio de la CVV y CVVR en nuestro medio, se llevó a cabo un estudio que involucró tres centros asistenciales y la conformación de un grupo interdisciplinario de trabajo. Se enrolaron pacientes con CVV o CVVR y controles sanos, de las cuales se obtuvieron datos relacionados con la presentación de la patología, factores predisponentes, tratamiento y eficacia del mismo. Las cepas de *Candida* aisladas de las pacientes se tipificaron con el fin de evaluar la distribución de especies. En los aislados clínicos de pacientes con CVV y CVVR se determinaron los siguientes factores de virulencia: hidrofobicidad celular, capacidad formadora de biofilm y la secreción de las enzimas hidrolíticas Sap y Lip. De las mujeres enroladas en el estudio se obtuvieron muestras de lavado cervicovaginal para el estudio de mediadores inmunes locales, entre ellos la expresión de PAMs de la familia de las BDs y citoquinas, y suero con el fin de evaluar niveles de citoquinas circulantes.

Con el objetivo de profundizar en el estudio de la interacción entre *Candida* y las CE de tracto reproductor femenino, se desarrolló y caracterizó un modelo *in vitro* de CVV con la línea celular HeLa, proveniente de carcinoma cervicovaginal, ampliamente utilizada en la bibliografía para el estudio de infecciones en el tracto genital femenino^{12, 47}. Para la validación de este modelo se llevaron a cabo determinaciones que incluyeron el estudio del cambio morfológico de *C. albicans* en presencia de la línea celular, la viabilidad total del sistema, la producción de daño celular por parte de *C. albicans* y la capacidad de activación y respuesta de las células frente al contacto con el hongo a través de la liberación de ERO.

En el modelo *in vitro* definido se procedió a desarrollar experiencias con el fin de evaluar la contribución de distintos mediadores en la modulación de la expresión de hBD1. Se determinaron las vías de señalización involucradas en la producción del péptido mediante el uso de agonistas de diferentes PRRs, así como la respuesta de las células HeLa frente a cepas de *C. albicans* de colección, de origen clínico y con mutaciones en el gen *FKS1*. Finalmente, usando inhibidores selectivos de enzimas solubles o impidiendo el contacto entre el hongo y las CE, se determinaron los factores involucrados en la modulación de la expresión de hBD1 por parte de *C. albicans*.

Estudio en pacientes

A pesar de la marcada incidencia de la CVV, numerosos aspectos de su patogenia aún no fueron establecidos. La ausencia de casuística local promovió un estudio multicéntrico con el propósito de establecer diferentes aspectos de esta patología en nuestro medio. La CVV fue diagnosticada por un cultivo positivo para *Candida* y de acuerdo a criterios clínicos⁹.

El estudio contó con la aprobación del Registro Provincial de Investigación en Salud para cada centro hospitalario involucrado y obtuvo el consentimiento informado de todas las pacientes que formaron parte (ver Materiales y Métodos). Todos los datos de las pacientes fueron compilados a través de un *Case Report Form* que fue designado según el número de paciente.

Las pacientes enroladas en este estudio, 95 en total, se clasificaron según los criterios preestablecidos (ver Materiales y Métodos), quedando asignadas a algunos de los tres grupos:

Grupo Control: mujeres sanas, sin historia de vulvovaginitis por *Candida*.

Grupo CVVA: mujeres con manifestaciones agudas de la patología, con signos y síntomas positivos de vaginitis como prurito, secreción vaginal e hisopado vaginal positivo para *Candida*, sin historia previa de CVV.

Grupo CVVR: pacientes con episodios activos de CVV aguda y que hayan tenido 4 o más episodios clínicos de CVV aguda en los últimos 12 meses.

Los criterios de exclusión considerados fueron: embarazo y lactancia, diabetes, infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), otras inmunodeficiencias y otras infecciones vaginales. La cantidad de pacientes enroladas que formaron parte de este estudio, así como la edad media de cada grupo se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2. Grupos de pacientes y edades promedio

Grupo	N	Edad (años)
Control	26	39,3±12,7
CVVA	20	28,6±4,7
CVVR	59	36,2±7,7

Caracterización del estudio en pacientes

De las historias clínicas se extrajo la información sobre la existencia de factores predisponentes. Se incluyeron como factores predisponentes el uso de anticonceptivos orales con alto contenido de estrógeno y el uso prolongado de antibióticos de amplio espectro. Como factores mixtos se consideró la combinación de uso de anticonceptivos y antibióticos.

Se observó que en el grupo con la forma aguda de la micosis, CVVA, el 73% de las pacientes tuvo alguno de los factores previamente descritos (Figura 30B), mientras que en el grupo CVVR este valor descendió al 43% (Figura 30A). El factor predisponente de mayor incidencia en ambos grupos fue la ingesta de anticonceptivos orales, correspondiendo a un 67% de las pacientes con CVVA y a un 38% en el grupo CVVR (Figura 30). De manera interesante, el 57% de las pacientes con CVVR no presentaron factores predisponentes.

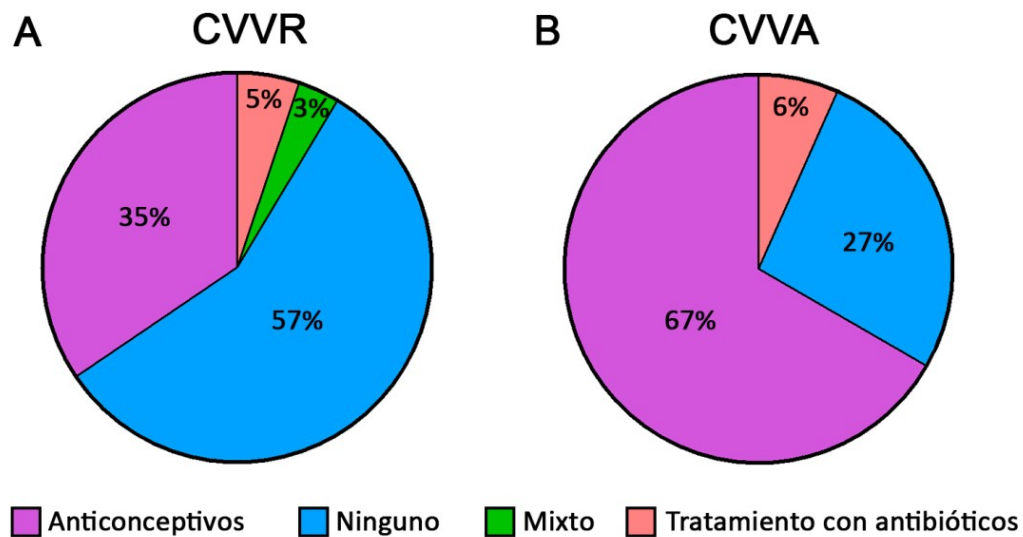


Figura 30. Distribución de factores predisponentes en pacientes con Candididasis Vulvovaginal. Los factores predisponentes evaluados fueron: uso de anticonceptivos orales y tratamiento con antibióticos de amplio espectro. La combinación de uso de anticonceptivos y antibióticos se consideró un factor mixto. **A)** Distribución de factores predisponentes en pacientes con CVVR. n=59. **B)** Distribución de factores predisponentes en pacientes con CVVA. n=15.

Con respecto al tratamiento de la CVV, la terapia local de corta duración, en forma de óvulos vaginales, o el tratamiento oral de una sola dosis de antifúngico, son efectivos en el 80-90% de los casos. Las drogas usualmente empleadas en formulaciones tópicos forman

parte de la familia de los azoles (miconazol, clotrimazol, butoconazol). La duración recomendada para este tipo de tratamiento es de 7 días. Por su parte, el tratamiento oral consiste en una única dosis de 150 mg de fluconazol. Ambos esquemas de tratamiento poseen igual eficacia ¹⁴².

La terapia recomendada para la CVVR es de mayor duración y el antifúngico elegido es el fluconazol. Las guías clínicas de Alemania del año 2015 recomiendan el uso local de clotrimazol (500 mg) o ketoconazol (100 mg), o fluconazol oral (150 mg). Sin embargo, se recalca que la mitad de las mujeres tendrán una recurrencia al terminar la terapia. Las guías de la Sociedad Americana de Infectología del 2016 recomiendan para la CVVR una terapia de inducción con un agente tópico o fluconazol por vía oral durante 14 días y mantenimiento semanal durante 6 meses con 150 mg de fluconazol por vía oral. La evidencia demuestra que el tratamiento de la CVVR es de mayor duración y complejidad que el de la CVV y, hasta el momento, no hay un único protocolo que asegure la desaparición de los síntomas a largo plazo ^{5, 142}.

La información sobre la eficacia del tratamiento en las pacientes del estudio se extrajo de la historia clínica y se muestra en la Figura 31. La eficacia del tratamiento alcanzada en pacientes con CVVA fue del 79%, mientras que en pacientes con CVVR este número fue 56% (Figura 31).

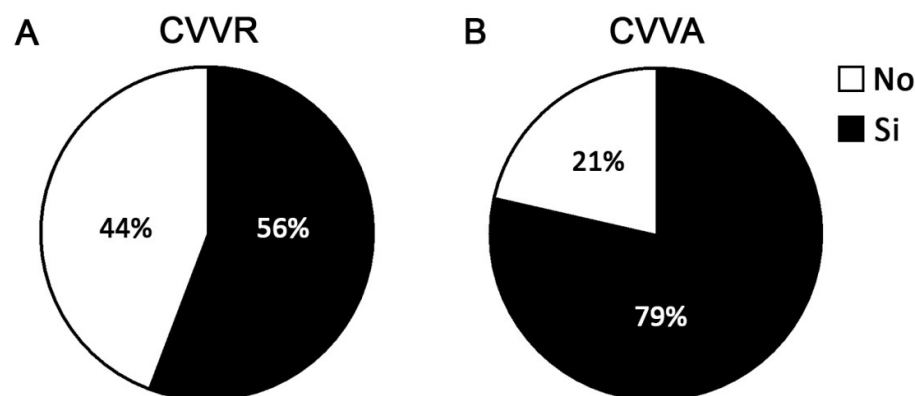


Figura 31. Eficacia del tratamiento antifúngico. Eficacia de diferentes esquemas de tratamiento antifúngico evaluados por la desaparición de síntomas clínicos. **A)** Eficacia del tratamiento en pacientes con CVVR n=52. **B)** Eficacia del tratamiento en pacientes con CVVA. n=14

El porcentaje de pacientes con CVVA que resuelven la infección luego de la aplicación de antifúngicos es mayor comparado con el grupo CVVR, observándose en este grupo un 44% de pacientes refractarias a los tratamientos.

Caracterización del agente causal

Con el fin de identificar la distribución de especies de *Candida* causantes de la patología en nuestro medio, los aislados provenientes de muestras de pacientes se tipificaron mediante MALDI-TOF.

Se encontró que en ambos grupos la especie predominante identificada fue *C. albicans*, siendo minoritaria la presencia de *Candida* no-*albicans* como *C. guilliermondii* en pacientes con CVVR (Figura 32A) y *C. glabrata* en pacientes con CVVA (Figura 32B), en concordancia con lo reportado en la bibliografía.

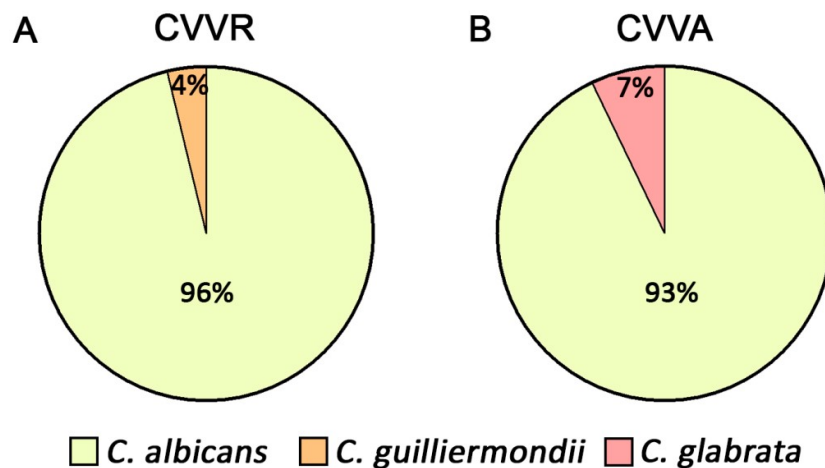


Figura 32. Distribución de especies de *Candida* causantes de Candidiasis Vulvovaginal. Tipificación de especies de *Candida* aisladas de pacientes de ambos grupos mediante MALDI-TOF. **A)** Especies de *Candida* causantes de CVVR. n=53. **B)** Especies de *Candida* causantes de CVVA. n=28.

Hasta hace algunos años, se pensaba que *Candida* participaba pasivamente en el establecimiento de la infección oportunista. Sin embargo, hoy se conoce que este hongo utiliza múltiples factores de virulencia con importantes consecuencias en el desarrollo, evolución y tratamiento de las patologías que causa. Entre los factores de virulencia de *Candida* se incluyen la adherencia a las células del hospedador, la formación de biofilm y la secreción de enzimas hidrolíticas^{50, 143}.

La adherencia constituye la primera etapa para la colonización, siendo la hidrofobicidad de la superficie celular (HSC) de un microorganismo una medida de su afinidad a los sustratos hidrofóbicos, como lo son los tejidos queratinizados. Con el fin de

determinar la HSC de *Candida* aisladas de pacientes con CVVA y CVVR, se llevó a cabo el método bifásico agua-hidrocarburo MATH (test de adhesión microbiana a hidrocarburos)¹⁴⁴ no encontrándose diferencias en este parámetro entre los grupos evaluados (Figura 33A) ni con la cepa de *C. albicans* SC5314, utilizada como control.

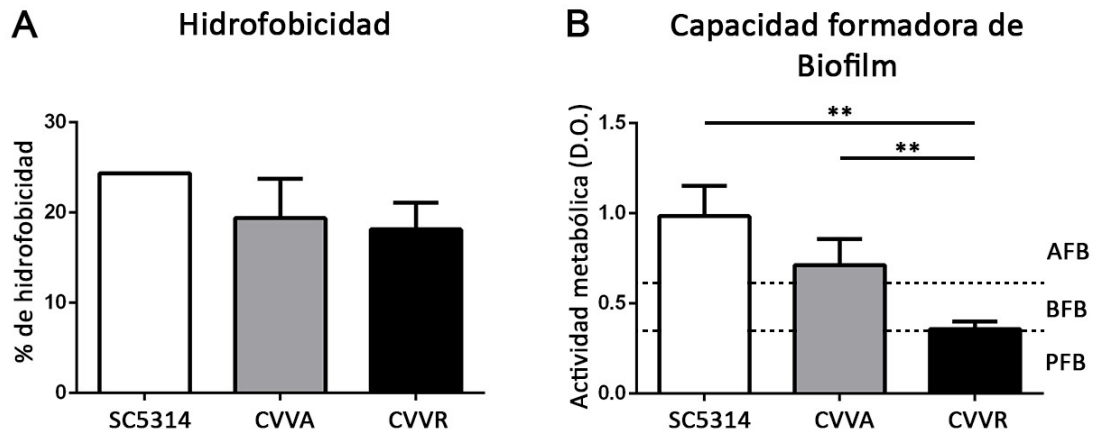


Figura 33. Factores de virulencia de *Candida* recuperadas de pacientes con CVVA y CVVR. A) Porcentaje de hidrofobicidad de cepas de *Candida* provenientes de pacientes con CVVA, CVVR y de la cepa SC5314, usada como control; determinada mediante el método bifásico agua-hidrocarburo MATH. **B)** Capacidad formadora de biofilm de cepas de *Candida* provenientes de pacientes con CVVA, CVVR y de la cepa SC5314, determinada por el ensayo de reducción de XTT. En base a resultados en nuestro laboratorio se estableció la siguiente escala: Pobre Formadora de Biofilm (PFB): Abs < 0,310, Buena Formadora de Biofilm (BFB): 0,310 < Abs < 0,570 y Alta Formadora de Biofilm (AFB): 0,570 < Abs. ** p < 0,01.

La presencia de biofilm contribuye al mantenimiento de la infección al permitir que se eludan los mecanismos de defensa del hospedador y dificulta la penetración de las drogas antifúngicas, generando resistencia⁵⁰. Hasta el momento existen escasos estudios sobre la formación de biofilm durante la CVV.

Se evaluó la capacidad formadora de biofilm en aislados provenientes de pacientes con CVVA y CVVR mediante la técnica de reducción de XTT^{145, 146}. Los aislados clínicos se clasificaron como cepa Pobre Formadora de Biofilm (PFB), Buena Formadora de Biofilm (BFB) y Alta Formadora de Biofilm (ver Materiales y Métodos).

Los resultados demostraron que las cepas de pacientes con la forma recurrente de la enfermedad tienen disminuida la capacidad de formar biofilm en comparación con la cepa de *C. albicans* SC5314 (p < 0,01) y con cepas aisladas de pacientes del grupo CVVA (p < 0,01) (Figura 33B). Otro dato aportado por este estudio es que mientras las cepas aisladas de

pacientes con CVVR se clasificaron como BFB, las recuperadas de pacientes con CVVA correspondieron a la categoría de AFB (Figura 33B).

Estos resultados indicarían que mientras no hubo diferencias entre la capacidad de adhesión a superficies entre cepas de los grupos CVVA y CVVR, la capacidad de producir biofilm se encuentra disminuida en cepas de *Candida* causantes de CVVR.

La secreción de enzimas hidrolíticas juega un rol muy importante en la invasión a los tejidos colonizados. La hidrólisis de lípidos por parte de las Lip produce la liberación de ácidos grasos, los que son fuente de carbono para el hongo y responsables de una disminución del pH del medio que favorece la actividad enzimática de las Sap fúngicas⁵⁰.

Con el objetivo de determinar la producción de dos importantes enzimas hidrolíticas en los aislados clínicos provenientes de los diferentes grupos, se llevaron a cabo los métodos de placas de agar suplementadas con albúmina sérica bovina (semicuantificación de Sap)¹⁴⁷ y el ensayo de Rodamina-B en placa (semicuantificación de Lip)¹⁴⁸.

Con respecto a la producción de Sap, un 60% de las cepas del grupo CVVA resultaron positivas para la actividad de estas enzimas con respecto a un 71% de las cepas del grupo CVVR. Sin embargo, la actividad proteasa en el grupo CVVA fue significativamente mayor con respecto al grupo CVVR ($p < 0,05$) (Tabla 3).

Al evaluar la actividad lipolítica se encontró un porcentaje variable de cepas productoras, siendo 60% en el grupo CVVA y 38% en el grupo CVVR, pero los valores medios fueron comparables.

Tabla 3. Enzimas hidrolíticas producidas por cepas de *Candida* recuperadas de pacientes con CVVA y CVVR.

	CVVA			CVVR		
	Nº cepas positivas (%)	Rango (Pz)	Media (Pz)	Nº cepas positivas (%)	Rango (Pz)	Media (Pz)
Sap	15/25 (60%)	1,00 - 2,57	1,62 ± 0,61*	17/24 (71%)	1,00 - 1,70	1,32 ± 0,28*
Lip	15/25 (60%)	1,00 - 4,00	1,72 ± 0,84	9/24 (38%)	1,00 - 2,66	1,46 ± 0,68

Sap: aspartato proteinasa

Lip: lipasa

CVVA: Candidiasis Vulvovaginal de un solo episodio

CVVR: Candidiasis Vulvovaginal Recurrente

* $p < 0,05$ Media Sap CVVA vs CVVR

Estudios inmunológicos

Los resultados del estudio en pacientes arrojaron que en el grupo CVVR un 57% de las mujeres no presentó una asociación clara con ninguno de los factores predisponentes conocidos. En los últimos años numerosas son las investigaciones que intentan relacionar esta patología con fallas genéticas en distintos componentes del sistema inmune de las pacientes^{16, 17, 22, 24-26}. Sin embargo, y en relación a las pruebas funcionales realizadas, se trabaja con cultivos de células mononucleares de sangre periférica estimuladas con *C. albicans* muertas por calor, células relacionadas a la respuesta sistémica. Estudios actuales avalan la relevante contribución de las células y los mediadores inmunes innatos en la respuesta local en el tracto genital femenino⁹⁰⁻⁹² y en la patogenia de la CVV murina⁴¹; por lo tanto, es de gran importancia el estudio del perfil local de respuesta frente al hongo. Teniendo en cuenta el rol fundamental que desempeñan las BDs en la inmunidad en tractos mucosos y los resultados obtenidos en nuestro modelo murino de CVV, que demuestran que BD1 aumenta durante el curso de infección vaginal aguda por *C. albicans*, es que se decidió profundizar en el estudio de este PAM en pacientes con la patología.

Numerosos estudios han demostrado la presencia de mediadores inmunes en secreciones del tracto genital femenino. Sin embargo, las diferencias en los métodos de obtención y procesamiento de muestras usados son responsables de la variabilidad de los hallazgos¹⁴⁹. El lavado cervicovaginal recolectado mediante la instilación de solución fisiológica y luego aspiración con jeringa, es considerado el método óptimo para la recuperación de mediadores inmunes solubles¹⁵⁰. El lavado cervicovaginal es un fluido biológico complejo formado por agua, electrolitos, compuestos orgánicos (glucosa, aminoácidos, lípidos), células (leucocitos y CE), gran cantidad de proteínas (PAMs, inmunoglobulinas, enzimas proteolíticas, citoquinas) y secreciones de organismos comensales¹⁴⁹.

Con el fin de caracterizar morfológicamente las poblaciones celulares mayoritarias presentes en lavado cervicovaginal, se realizaron citoextendidos de muestras de pacientes con CVVR. Luego de ser teñidos con May-Grünwald Giemsa, se realizó la observación microscópica de los mismos (Figura 34). Las poblaciones celulares predominantes correspondieron a CE descamadas acompañadas de algunos leucocitos, donde pudieron ser

identificados PMNs. Además fue posible observar la presencia de la formas hifales de *C. albicans* (Figura 34).

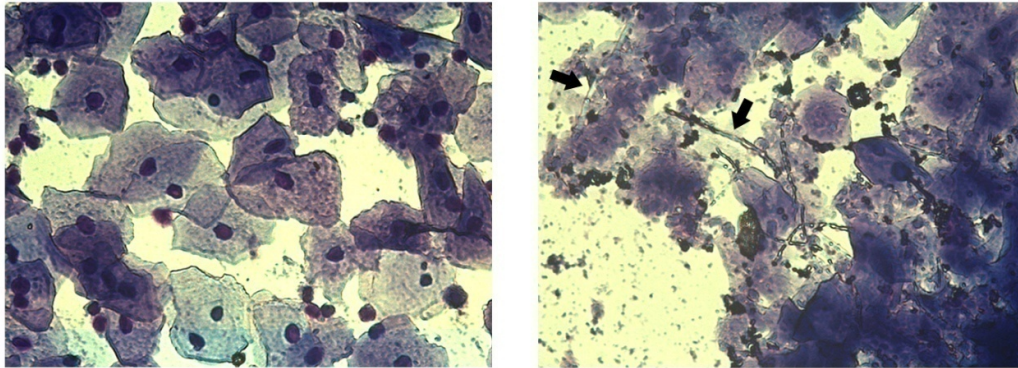


Figura 34. Poblaciones celulares presentes en lavado cervicovaginal de pacientes. Fotografías representativas de citoextendidos de lavado vaginal de pacientes con CVVR teñidos con May-Grünwald Giemsa. Flechas negras indican la presencia de hifas de *C. albicans*. Magnificación x1000.

Se pudo apreciar gran similitud entre las características de los citoextendidos de humanos y de ratón (Figura 10B).

Niveles de citoquinas intravaginales

Las citoquinas se pueden dividir en diferentes grupos de acuerdo a características generales: las proinflamatorias comprenden a IL-1 β , IL-6 y TNF- α ; las antiinflamatorias a IL-10, TGF- β , IL-4 entre otras; y las citoquinas asociadas al perfil Th17, donde se encuentran IL-17, IL-22 e IL-23¹⁵¹.

De los lavados cervicovaginales de controles y pacientes con CVVA y CVVR se separaron los sobrenadantes con el fin de determinar la concentración de IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-17, IL-22, IL-23 y TGF- β mediante la técnica de ELISA (Figura 35). Dentro de las citoquinas proinflamatorias se observó un aumento significativo en los niveles de IL-1 β en pacientes con CVVR con respecto al grupo control ($p < 0,01$). Además, la IL-6 se encontró elevada en este grupo comparado con controles y con el grupo CVVA ($p < 0,01$); mientras que TNF- α fue indetectable en todas las muestras evaluadas. La citoquina antiinflamatoria TGF- β , de importantes funciones en tracto reproductor femenino, no presentó cambios en los diferentes grupos en estudio. Respecto a la producción de citoquinas asociadas al perfil Th17, se encontraron disminuidos los niveles de IL-23 en el grupo CVVR con respecto al

grupo CVVA ($p < 0,05$) y tanto IL-17 como IL-22 fueron indetectables en todos los lavados cervicovaginales.

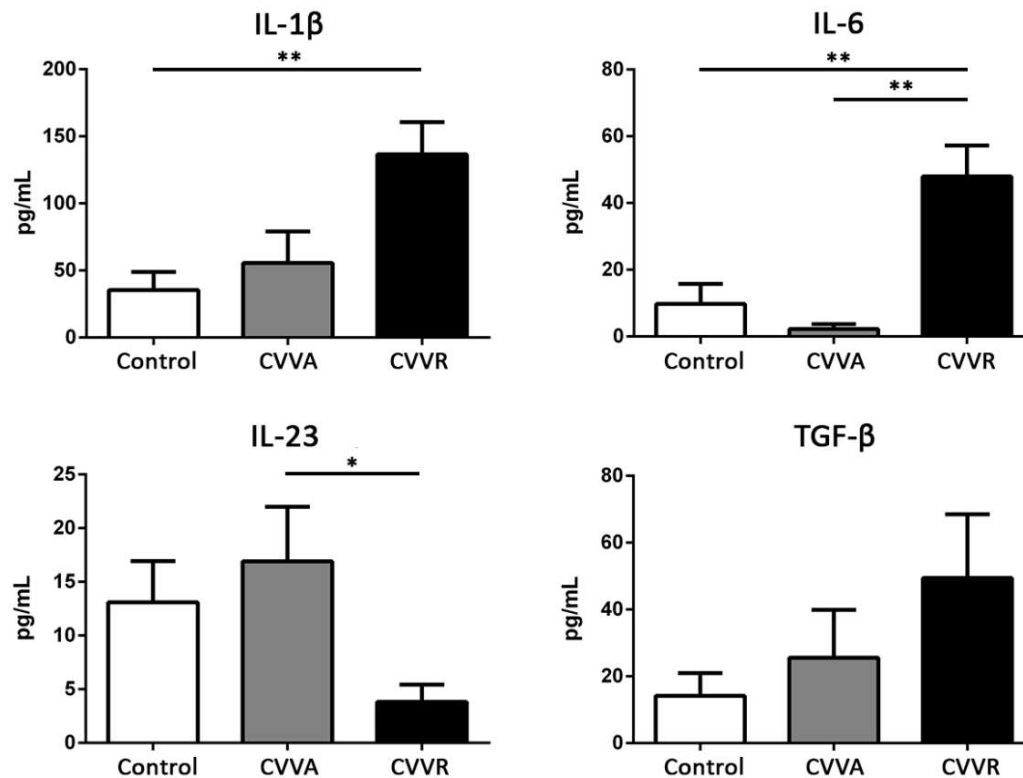


Figura 35. Niveles de citoquinas intravaginales de controles, pacientes con CVVA y CVVR. Concentración de diferentes citoquinas en muestras de lavado cervicovaginal de controles (blanco), pacientes con CVVA (gris) y CVVR (negro). Los valores representan la media \pm ESM. Grupo control $n=27$, grupo CVVA $n=18$, grupo CVVR $n=48$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Estos resultados indican que en lavado cervicovaginal de pacientes con CVVR predomina un perfil de citoquinas de tipo proinflamatorias, escasos niveles de IL-23 y ausencia de IL-17 e IL-22.

Niveles de citoquinas séricas

Con el objetivo de establecer si la infección vaginal con *Candida* posee algún efecto a nivel sistémico, se evaluaron los niveles de las mismas citoquinas previamente mencionadas en suero de controles y el grupo CVVR.

Los resultados obtenidos mostraron un franco aumento de las tres citoquinas proinflamatorias; IL-1 β ($p < 0,0001$), TNF- α ($p < 0,001$), IL-6 ($p < 0,01$), en muestras séricas de pacientes con CVVR respecto a los controles (Figura 36). Por su parte, no hubo cambios en

los niveles de TGF- β , IL-22 e IL-23 entre ambos grupos. Los niveles de IL-17 fueron indetectables en todas las muestras.

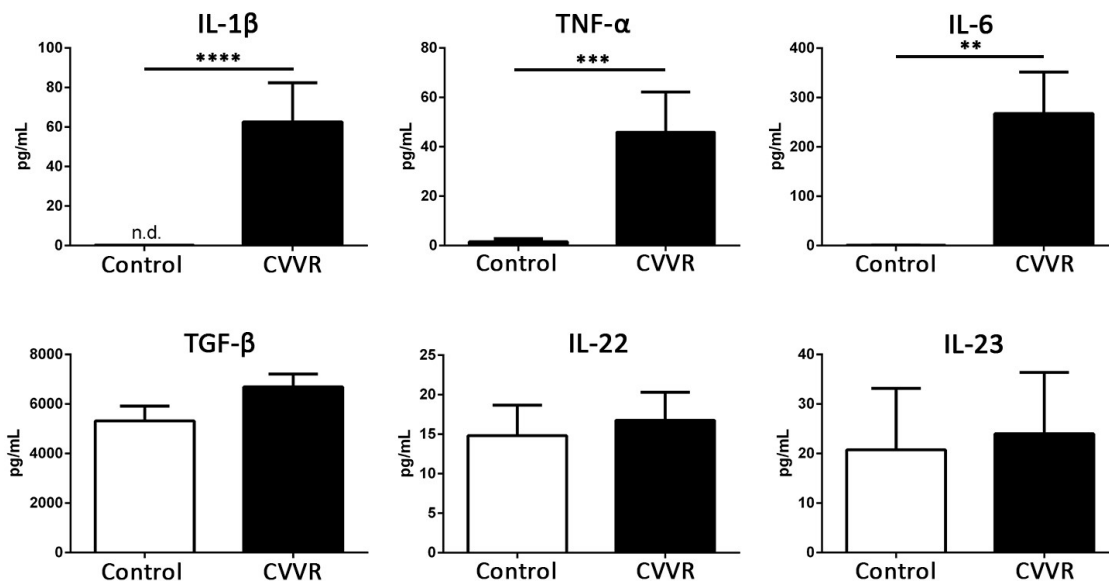


Figura 36. Niveles de citoquinas séricas de controles y pacientes con CVVR. Concentración de diferentes citoquinas en muestras de suero de controles (blanco) y pacientes con CVVR (negro). Los valores representan la media \pm ESM. Grupo control n=14, grupo CVVR n= 22. n.d.: No Detectable. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Este resultado indicaría que el proceso inflamatorio generado por la patología en el tracto genital no se suscribe únicamente al sitio de infección, sino que los cambios también se traducen a nivel sistémico.

Estudio de PAMs de la familia de BDs en pacientes con CVV

De los lavados cervicovaginales de todos los grupos de pacientes en estudio se recuperaron las células, que fueron fraccionadas para estudiar los niveles de transcritos de las BD o la expresión proteica en citoextendidos. La cantidad de células provenientes de cada muestra fue variable. De las células recuperadas se procedió a realizar la extracción de ARN, a partir del cual se obtuvo ADNc y se amplificaron los transcritos de hBD1, hBD2 y hBD3 con *primers* específicos mediante la técnica de qPCR.

Los transcritos de hBD1 se encontraron aumentados en pacientes con la forma aguda de la patología en comparación con el grupo control ($p < 0,001$) y con el grupo CVVR ($p < 0,01$) (Figura 37). Por su parte los transcritos de hBD2 mostraron una tendencia al

aumento en los grupos CVVA y CVVR sin llegar a encontrarse una diferencia significativa con respecto al grupo control. La expresión de hBD3 estuvo aumentada sólo en el grupo CVVR con respecto a los controles ($p < 0,05$).

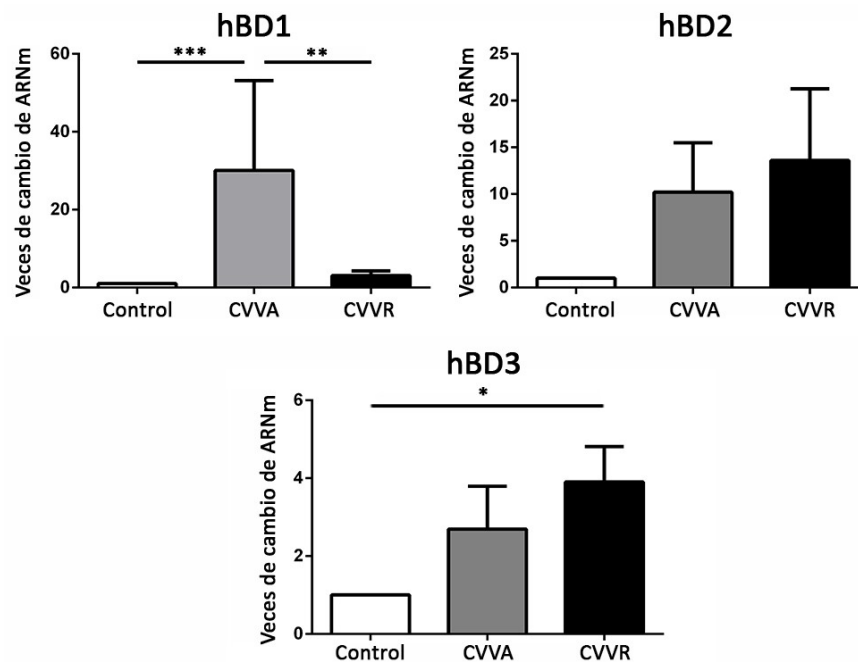


Figura 37. Expresión de transcritos de hBDs en células de lavado cervicovaginal de pacientes. Expresión de ARNm de hBD1, 2 y 3 relativizado a β -Actina en células de lavado cervicovaginal de pacientes con CVVA (gris), CVVR (negro) y controles sanos (blanco), evaluada mediante qPCR. Los valores representan la media \pm ESM. Grupo control $n=14$, grupo CVVA $n=5$ y grupo CVVR $n=15$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Para corroborar los resultados obtenidos a nivel molecular con la expresión de la proteína, citoextendidos de lavado cervicovaginal de pacientes con CVVA, CVVR y controles sanos fueron inmunomarcados con un anticuerpo específico para hBD1 y con un anticuerpo secundario conjugado a un fluorocromo (Figura 38).

Las células provenientes de controles sanos presentaron una expresión basal de hBD1, mientras que las CE de pacientes con CVVA exhibieron una expresión más homogénea en el citoplasma celular (Figura 38A). La expresión de esta proteína resultó notablemente disminuida en muestras de pacientes con CVVR con respecto a controles sanos y a pacientes con CVVA ($p < 0,05$) (Figura 38B).

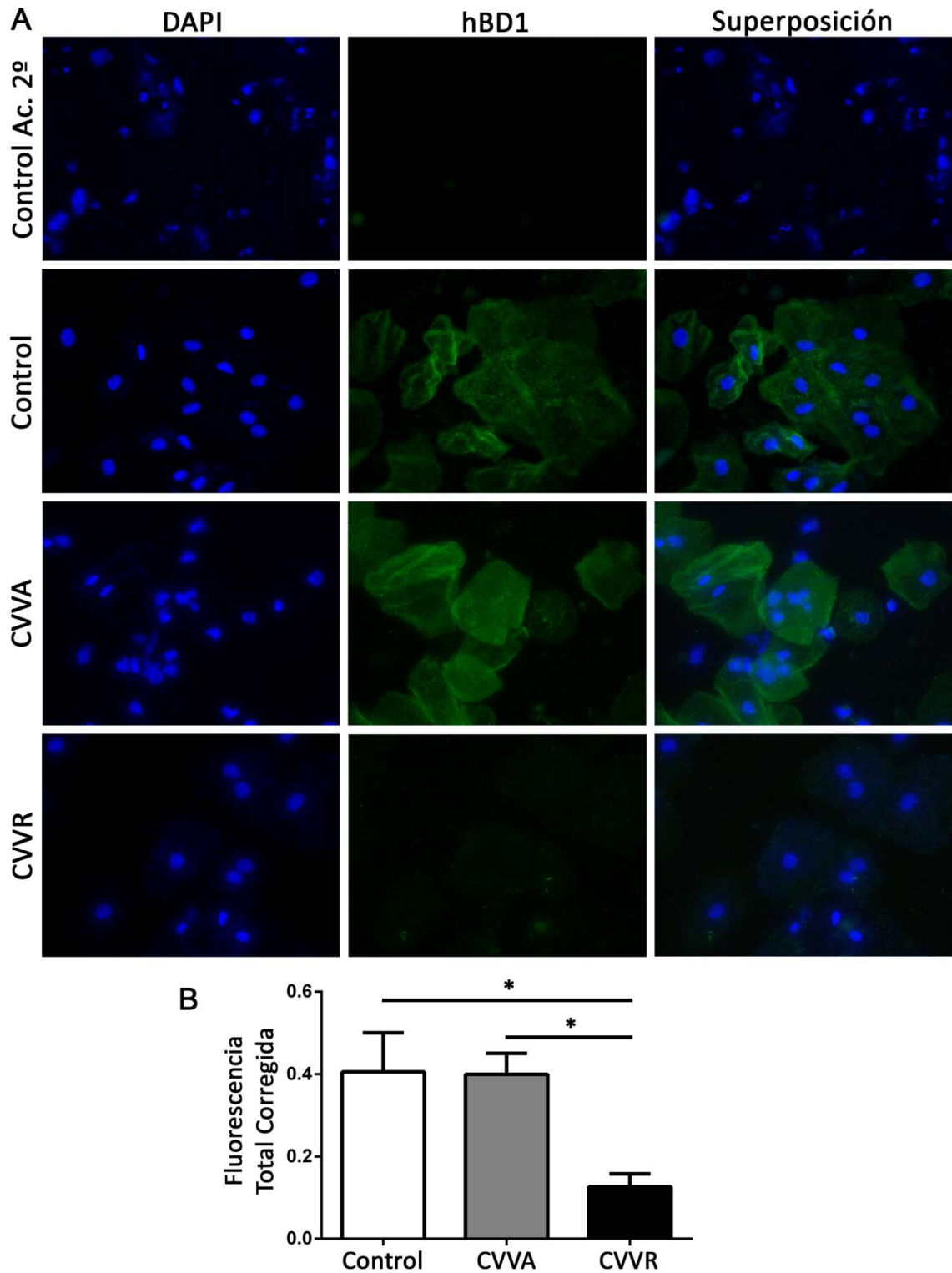


Figura 38. Expresión de hBD1 en lavado cervicovaginal de pacientes. A) Fotografías representativas de citoextendidos de lavado cervicovaginal de pacientes con CVVA, CVVR y controles sanos marcados mediante inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo primario hecho en conejo anti BD1 humana y un anticuerpo secundario anti conejo marcado con el fluorocromo AlexaFluor 647. Coloración de los núcleos celulares con DAPI. En columnas se muestran por separado la tinción con DAPI, con hBD1 y la superposición de ambas imágenes. Fotografías obtenidas con un microscopio invertido de fluorescencia LEICA DMI8. Magnificación x630. **B)** Semicuantificación de la fluorescencia

con el software ImageJ. Los valores representan la media \pm ESM. Grupo control n=4, grupo CVVA n=6, grupo CVVR n=5. * $p < 0,05$.

Además de la BD constitutiva, se procedió al estudio de hBD3, otro miembro de esta familia con probada actividad candidicida y quimioattractante. Citoextendidos de lavado cervicovaginal de los distintos grupos de pacientes fueron inmunomarcados con un anticuerpo específico para BD3 humana y con un anticuerpo secundario conjugado a un fluorocromo. De acuerdo a las características de este tipo de BD, se encontró que la expresión basal de hBD3 en las CE fue menor que la observada para la hBD1 (Figura 39A). En las células de pacientes con CVVA, la marca positiva mostró distribución homogénea en el citoplasma celular. En el caso de pacientes con CVVR, la expresión de hBD3 se encontró disminuida de manera significativa con respecto al grupo CVVA ($p < 0,05$) (Figura 39B).

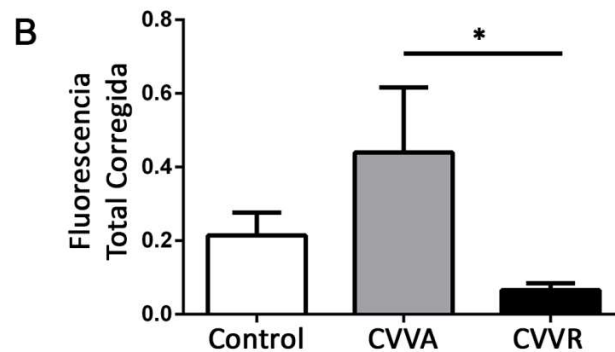
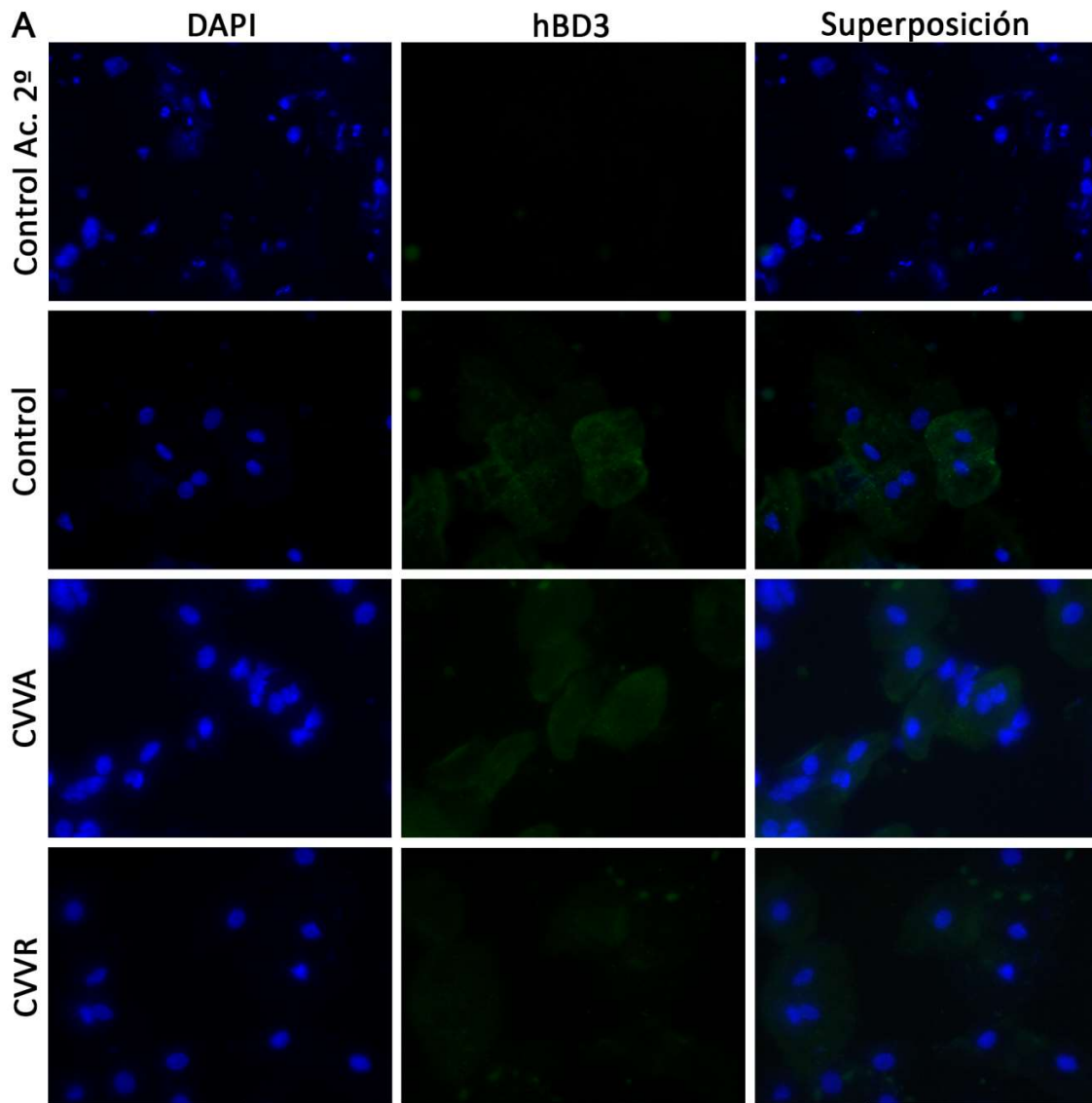


Figura 39. Expresión de hBD3 en lavado cervicovaginal de pacientes. A) Fotografías representativas de citoextendidos de lavado cervicovaginal de pacientes con CVVA, CVVR y controles sanos marcados mediante inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo primario hecho en conejo anti BD3 humana y un anticuerpo secundario anti conejo marcado con el fluorocromo AlexaFluor 647. Coloración de los núcleos celulares con DAPI. En columnas se muestran por separado la tinción con DAPI, con hBD3 y la superposición de ambas imágenes. Fotografías obtenidas con un microscopio

invertido de fluorescencia LEICA DMI8. Magnificación x630. **B)** Semicuantificación de la fluorescencia con el software ImageJ. Los valores representan la media \pm ESM. Grupo control n=4, grupo CVVA n=6, grupo CVVR n=5. * p<0,05.

Estos resultados muestran que mediadores importantes en la inmunidad en mucosas como son las hBD1 y hBD3, cambian su expresión basal en respuesta a la infección aguda por *C. albicans*. Este hallazgo coincide con el perfil de respuesta observado en los animales infectados con una única dosis del hongo, en los que pudo observarse un claro aumento de la BD constitutiva.

Un importante hallazgo aportado por estos estudios es la marcada disminución de la hBD1 y hBD3 en CE de pacientes con la forma recurrente de la micosis.

Estudios *in vitro*

Caracterización del modelo *in vitro* de CVV

El epitelio de las mucosas cumple importantes funciones en la inmunovigilancia y defensa del organismo y es donde ocurre el primer encuentro con la mayoría de los microorganismos. El epitelio vaginal constituye una barrera física, que reconoce microorganismos comensales y patógenos⁹¹. *C. albicans* es un hongo oportunista, es decir, comúnmente se encuentra en diferentes sitios del organismo como comensal pero es capaz de transformarse en patógeno. Por lo tanto, las CE del tracto reproductor femenino deben ser capaces de sentir la presencia del mismo, a través de los PRRs¹⁵ y deben reconocer de manera diferencial las formas comensales y patogénicas del hongo⁴⁵.

Con el fin de profundizar en el estudio de las interacciones patógeno-célula hospedadora se desarrolló un modelo *in vitro* de CVV. Para tal fin se utilizó la línea celular HeLa, proveniente de carcinoma cervicovaginal^{12,47}.

El modelo *in vitro* de interacción *C. albicans*-célula HeLa fue caracterizado según los cambios morfológicos del hongo en presencia de las células, la viabilidad total del sistema, la generación de daño en la línea celular y la producción de mediadores inmunes innatos en respuesta al patógeno.

C. albicans es un hongo pleomorfo, capaz de crecer como levadura, emitir un pseudomicelio o formar hifas verdaderas según las condiciones del medio en el que se

encuentre ^{34, 36}. Para evaluar la cinética en los cambios morfológicos de *C. albicans* en presencia de células HeLa, se llevaron a cabo cocultivos con diferentes relaciones *Candida*-célula HeLa (células solas; 0,5:1; 1:1 y 5:1) considerando distintos tiempos de interacción (1, 2 y 4 horas) (Figura 40). A la hora de cultivo, la forma fúngica predominante fue la levaduriforme. Luego de 2 horas de incubación se observó un incremento en el porcentaje de células con emisión de pseudomicelio y, a las 4 horas, el morfotipo predominante fue el hifal.

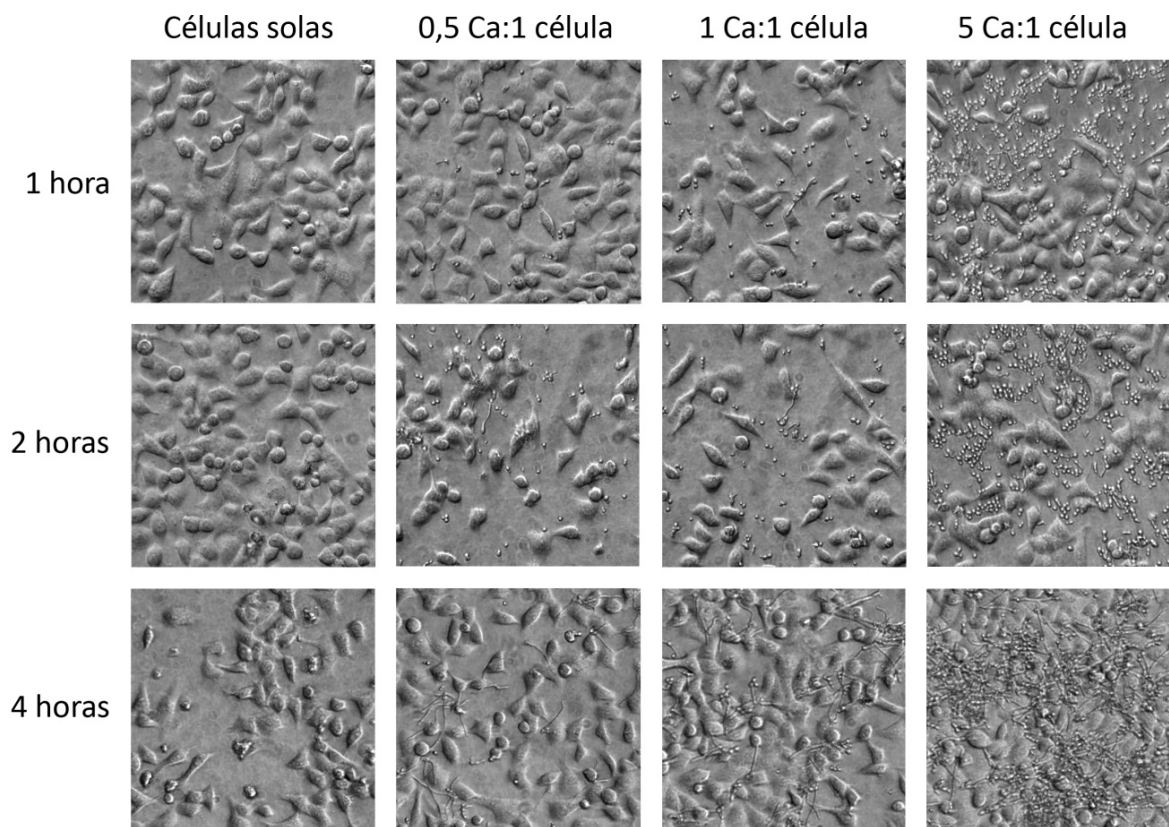


Figura 40. Morfología de *C. albicans* en cultivos con células HeLa. Fotografías representativas de cocultivos de células HeLa y *C. albicans* a diferentes relaciones *Candida*: célula (células solas; 0,5:1; 1:1 y 5:1) y luego de distintos tiempos de incubación (1, 2 y 4 horas). Magnificación x400.

Estos resultados demuestran que cuando las condiciones son las propicias, luego de 2 horas de cultivo, *C. albicans* comienza con el proceso de emisión del pseudomicelio, evento clave en la transición entre el estado de comensal al patogénico. Este evento continúa y se profundiza a las 4 horas de cultivo, encontrándose mayor cantidad de células en forma de hifa. Sin embargo, la línea celular HeLa presenta un aspecto normal.

A fin de evaluar el crecimiento de *Candida* en cultivo y la proliferación celular se llevaron a cabo cocultivos con diferentes relaciones *Candida*-célula HeLa (células solas, 0,5:1; 1:1; 5:1; 10:1 y 20:1) considerando distintos tiempos de interacción (2, 4 y 24 horas). La reacción colorimétrica de reducción de MTT permite determinar la funcionalidad mitocondrial de las células, siendo la cantidad de células vivas proporcional a la cantidad de formazán producido. El crecimiento fúngico fue claramente visualizable, *C. albicans* fue capaz de crecer en presencia de la línea celular HeLa a todas las relaciones ensayadas, observándose una cinética de desarrollo de manera dosis dependiente, llegando a las 24 horas de cultivo a sobrepasar el límite de detección de la técnica (Figura 41).

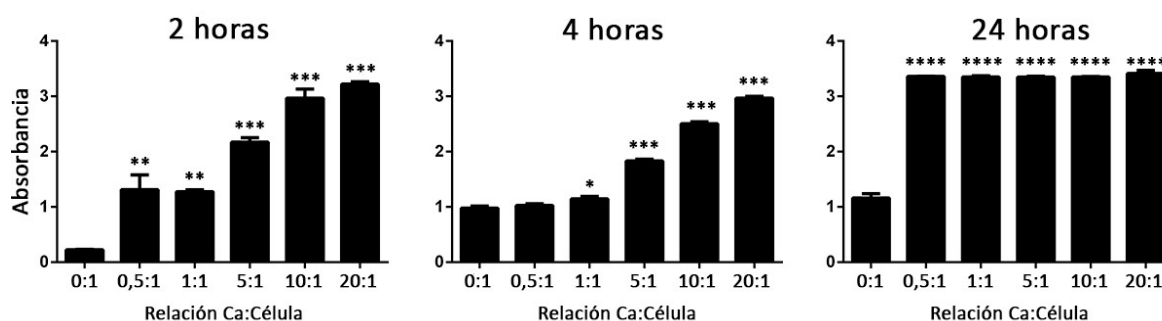


Figura 41. Proliferación celular y crecimiento fúngico. Células HeLa fueron cultivadas a diferentes relaciones *Candida*:célula (células solas; 0,5:1; 1:1 y 5:1; 10:1 y 20:1) y a distintos tiempos (2, 4 y 24 horas). La viabilidad del sistema fue expresada como absorbancia según el ensayo de MTT. Experimento representativo de tres experimentos independientes. Los valores representan la media \pm ESM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, * $p < 0,0001$ comparado con el valor de la relación 0:1.

Estos resultados indican que mientras avanza el tiempo de cultivo, la viabilidad del sistema aumenta por el sobrecrecimiento de *C. albicans*.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se procedió a evaluar si el sobrecrecimiento del hongo es capaz de provocar daño sobre las CE en cultivo con el objetivo de establecer la relación óptima *Candida*:célula HeLa para futuros estudios. Para ello se realizó el esquema experimental previamente descrito y en los sobrenadantes de cultivo se determinó la actividad de la enzima intracitoplasmática LDH como indicador de daño celular y expresada como porcentaje de lisis celular.

Luego de 2 horas de cultivo, sólo en la relación más alta ensayada (20:1) se produjo daño significativo en las CE ($p < 0,001$), observándose un porcentaje de lisis del 15% (Figura 42). A las 4 horas de contacto, el daño celular fue significativo con respecto a la condición basal a partir de la relación 1:1 ($p < 0,01$) en adelante, variando los porcentajes de lisis en un

rango de 11 a 17% entre las condiciones 1:1 y 20:1. Por su parte, a las 24 horas de cultivo la presencia de *C. albicans* a todas las relaciones generó daño significativo.

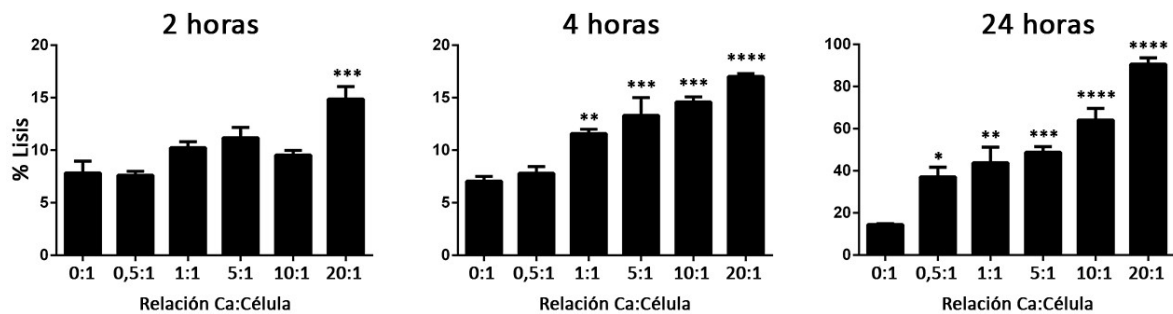


Figura 42. Daño celular en la línea celular HeLa. Células HeLa fueron cultivadas a diferentes relaciones *Candida*:célula (células solas; 0,5:1; 1:1 y 5:1; 10:1 y 20:1) y a distintos tiempos (2, 4 y 24 horas). El daño celular se expresó como porcentaje de lisis según el máximo de liberación de LDH. Experimento representativo de tres experimentos independientes. Los valores representan la media \pm ESM. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$. **** $p < 0,0001$ comparado con el valor de la relación 0:1.

Para evaluar la capacidad de activación y respuesta de la línea celular HeLa, se llevaron a cabo cocultivos según el modelo experimental ya descrito y luego de 2, 4 y 24 horas se midió la producción de ERO mediante la técnica de reducción de NBT y a través de ensayos de quimioluminiscencia.

Se observó mediante ambas técnicas que a tiempos cortos (2 horas) hubo producción de ERO significativamente mayor con respecto al nivel basal desde la relación 0,5:1 cuando la técnica utilizada fue la producción de quimioluminiscencia ($p < 0,05$) y a partir de la relación 1:1 para las determinaciones por reducción de NBT ($p < 0,01$) (Figura 43). La producción de ERO fue dosis dependiente y máxima luego de 24 horas de cultivo.

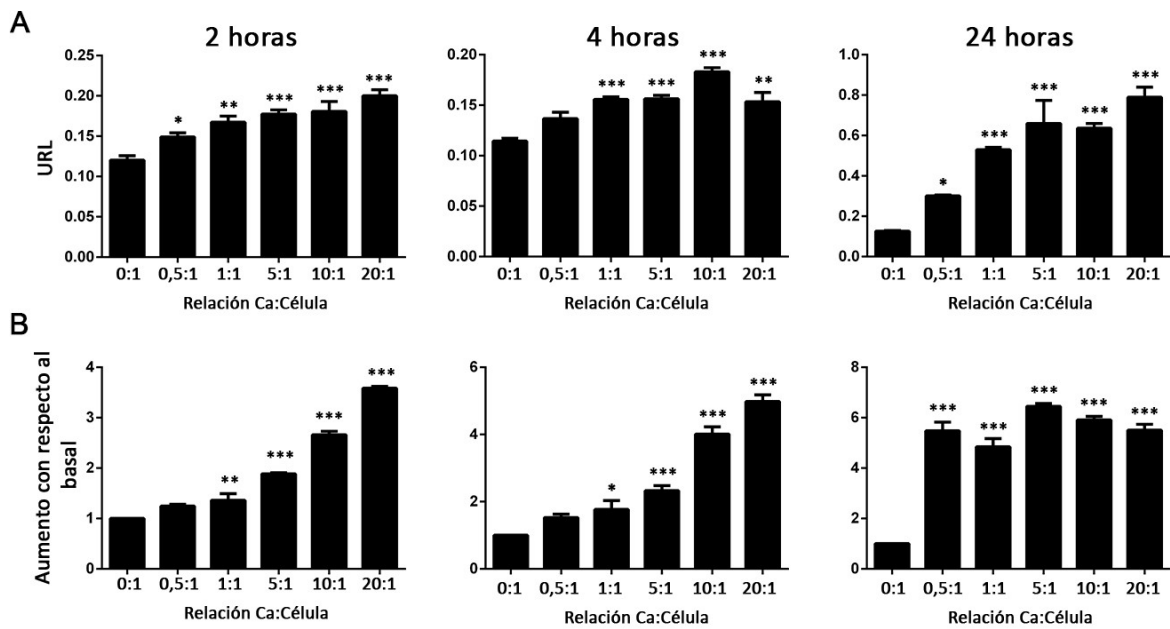


Figura 43. Producción de ERO por células HeLa frente a *C. albicans*. Células HeLa fueron cultivadas a diferentes relaciones *Candida*:célula (células solas; 0,5:1; 1:1 y 5:1; 10:1 y 20:1) y a distintos tiempos (2, 4 y 24 horas). Las ERO fueron medidas por quimioluminiscencia **(A)**, expresadas como Unidades Relativas de Luz, y con la técnica de reducción de NBT **(B)**, expresadas como aumento con respecto al basal. Experimentos representativos de tres experimentos independientes. Los valores representan la media \pm ESM. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$. **** $p < 0,0001$ comparado con el valor de la relación 0:1.

Estos resultados indican que CE humanas provenientes del tracto genital femenino tienen la capacidad de reaccionar frente a *C. albicans*, de activarse y de producir mediadores de la respuesta inmune innata con el objetivo de promover la eliminación del hongo o contener la infección.

Esta serie de experimentos, caracterizan y validan el modelo *in vitro* de interacción *Candida*-célula HeLa, el cual fue utilizado para el estudio de la regulación de hBD1 por *C. albicans* en esta línea celular.

Regulación de hBD1 *in vitro*

Efecto de diferentes estímulos sobre la producción de hBD1 en CE

hBD1, pese a ser de expresión constante, es capaz de ser regulada frente a la presencia de microorganismos o estímulos inflamatorios^{108, 152, 153}.

Con el fin de determinar si la expresión de hBD1 puede ser modulada en células HeLa, se incubó a esta línea celular con diferentes estímulos durante 4 horas y luego se

determinó la cantidad de células productoras de este péptido (CE hBD1⁺) utilizando inmunomarcación intracelular y citometría de flujo para su evaluación. Se emplearon los siguientes estímulos: LPS, agonista de TLR4; Pam3CSK4, agonista de TLR1/2; Zymosan, agonista de TLR2 y Dectin-1; *C. albicans* inactivadas por calor (*Heat Killed Candida*, HKC) y la citoquina proinflamatoria IL-1 β .

Se observó la expresión basal del PAM en la línea de CE y un aumento significativo en el porcentaje de células HeLa positivas para hBD1 al ser estimuladas con LPS a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0,05$) y posterior al tratamiento con IL-1 β humana recombinante ($p < 0,05$) (Figura 44). Los agonistas de TLR1/2, TLR2 y Dectin-1 no fueron capaces de modular la expresión de este péptido. Otro resultado concluyente obtenido de este experimento fue que la exposición de las CE al microorganismo inactivado (HKC) no produjo cambio en la expresión de hBD1.

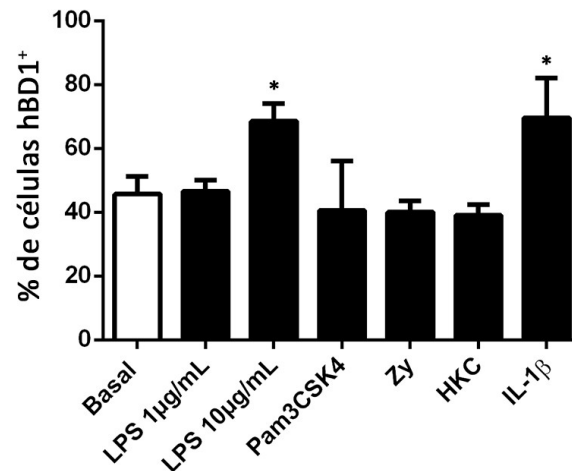


Figura 44. Efecto de diferentes estímulos sobre la producción de hBD1 en células HeLa. Porcentaje de células HeLa hBD1⁺ luego de 4 horas de cultivo en ausencia de estímulo (Basal) o tratadas con LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), Pam3CK4 100 ng/mL, IL-1 β 10 ng/mL, *C. albicans* inactivada por calor (HKC) relación 1:1 o Zymosan 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ utilizando un anticuerpo primario de conejo anti BD1 humana y un anticuerpo secundario anti conejo conjugado con AlexaFluor 647 y evaluadas por citometría de flujo. Experimento representativo de tres experimentos independientes. Los valores representan la media \pm ESM. * $p < 0,05$ comparado con la expresión basal.

Este resultado indica que en esta línea celular las vías de señalización de TLR4 y del Receptor de IL-1 (IL-1R) están involucradas en la regulación positiva de hBD1. Señales a través de TLR2 no producen modificaciones en la expresión de hBD1, resultado también observado en el modelo murino de CVV, donde la infección vaginal en ratones TLR2^{-/-}

produjo un incremento en hBD1 evidenciado a nivel transcripcional y proteico (Figuras 26 y 27).

Efecto de *C. albicans* sobre la producción de hBD1 en CE

Con el objetivo de determinar si cepas viables de *C. albicans* de distinta procedencia son capaces de regular la expresión de hBD1 en células HeLa, se realizaron diferentes cocultivos. Las cepas empleadas en estos ensayos fueron *C. albicans* ATCC 36801 y SC5314, como ejemplos de cepas de colección; la cepa *FKS1* R1361R/H que presenta una mutación en el *hot-spot 2* del gen *FKS1*, aislada de hemocultivo de un paciente con candidemia y una cepa recuperada de paciente con CVVR. Según el esquema experimental ya descrito y luego de 4 horas, se evaluaron los transcritos de hBD1 mediante RT-qPCR y el porcentaje de células positivas para hBD1 por citometría de flujo.

Luego de transcurridas 4 horas de cultivo no se observaron cambios en la expresión de los transcritos de hBD1 en las CE luego de la incubación con la cepa de colección *C. albicans* ATCC 36801 a ninguna de las relaciones ensayadas (Figura 45A). Cuando el porcentaje de CE hBD1⁺ expuestas a la cepa de colección SC5314 fue evaluado tampoco se observaron cambios en su expresión. Sin embargo, se encontró una disminución significativa en la expresión de hBD1 cuando las células estuvieron en contacto con las cepas de *C. albicans* *FKS1* R1361R/H ($p < 0,01$) y CVVR ($p < 0,05$) a una relación 5:1 (Figura 45B).

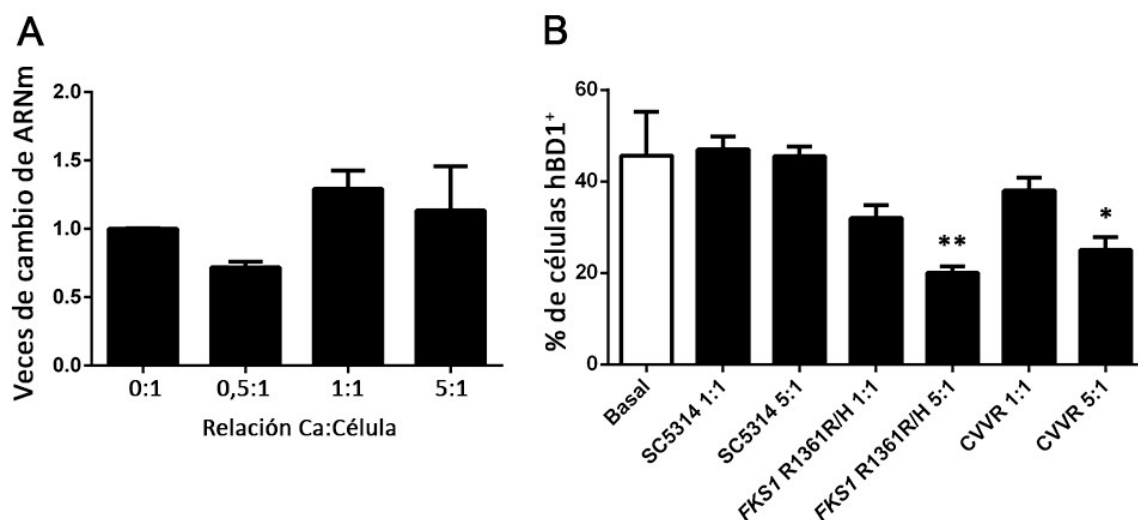


Figura 45. Modulación de la expresión de hBD1 en células HeLa por *C. albicans*. A) Veces de cambio de ARNm en células HeLa cultivadas a diferentes relaciones *Candida*:célula (células solas; 0,5:1; 1:1 y 5:1) durante 4 horas, mediante RT-qPCR, utilizando la cepa de *C. albicans* ATCC 36801. Experimento

representativo de dos experimentos independientes. Los valores representan la media \pm ESM. **B)** Porcentaje de células productoras de hBD1 luego de 4 horas de cultivo solas o con *C. albicans* SC5314, *C. albicans* FKS1 R1361R/H o *C. albicans* CVVR a diferentes relaciones *Candida*:célula. Experimento representativo de tres experimentos independientes. Los valores representan la media \pm ESM. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$ comparado con expresión basal.

Estos resultados indican que cepas de *C. albicans* provenientes de muestras clínicas tienen la capacidad de modular de manera negativa la expresión de hBD1 en la línea celular HeLa.

Para profundizar en el estudio del mecanismo por el cual las cepas clínicas de *C. albicans* tienen la capacidad de disminuir la expresión de hBD1 y evaluar si es necesario el contacto directo con el hongo para provocar el efecto o si es un factor soluble el responsable del fenómeno, se emplearon distintas estrategias. Se utilizó un sistema de transwell, con el fin de separar físicamente a las CE de los hongos, manteniendo la relación y el tiempo de cultivo establecido anteriormente. Se observó que el porcentaje de CE hBD1⁺ fue similar al obtenido a la condición de *Candida* CVVR:HeLa a una relación 5:1, es decir, una expresión disminuida de manera significativa con respecto a la expresión basal ($p < 0,05$) (Figura 47). En conocimiento de este hecho, se procedió a realizar los cocultivos en presencia de inhibidores de dos importantes enzimas fúngicas asociadas a la patogenia de la enfermedad (Tabla 3). Se utilizó Pepstatina A como inhibidor de las SAP y Ácido Acetil Salicílico (AAS) como inhibidor de las LIP. De manera interesante, la presencia de inhibidores de estos factores de virulencia de *C. albicans* revirtieron la disminución de la expresión de hBD1, restituyéndola a sus valores basales (Figura 47).

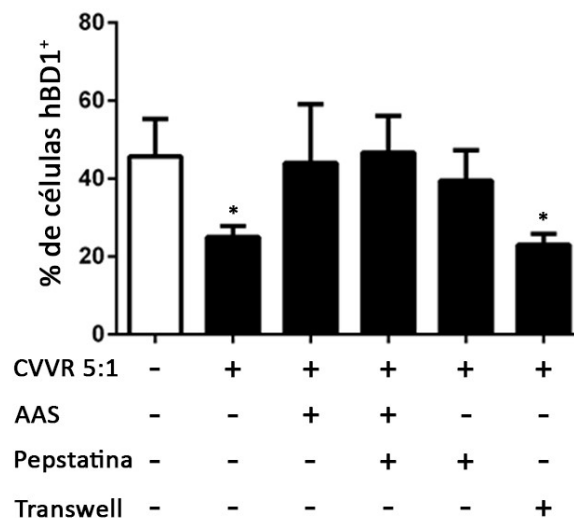


Figura 47. Mecanismo de inhibición de la producción de hBD1 en células HeLa por *C. albicans*. Porcentaje de células productoras de hBD1 luego de 4 horas de cultivo solas, con *C. albicans* CVVR a una relación 5:1, o con *C. albicans* CVVR a una relación 5:1 junto con un inhibidor de Sap, Pepstatina A 1 µg/mL; un inhibidor de Lip, AAS 625 µM; con ambos inhibidores o con uso de transwell. Experimento representativo de tres experimentos independientes. Los valores representan la media ± ESM * $p < 0,05$ comparado con expresión basal.

Estos resultados en conjunto indican que el contacto entre célula HeLa y *Candida* no es necesario para que se produzca la disminución en la expresión del PAM en estudio, sino que el efecto es mediado por un factor soluble liberado al medio por el hongo. Ambas enzimas hidrolíticas estarían involucradas en este efecto.

CONCLUSIONES CAPÍTULO III

Estudio de mediadores inmunes y de péptidos antimicrobianos de la familia de las β -Defensinas en tracto genital femenino de pacientes con CVV y mecanismos involucrados en su regulación.

- La infección vaginal por *C. albicans* produce a nivel local un aumento de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β e IL-6 en el microambiente local en pacientes con CVVR. Asimismo, los niveles séricos de estas mismas citoquinas junto con TNF- α se encuentran elevados en este grupo de pacientes.
- La expresión de β -Defensina 1 y β -Defensina 3 se encuentra disminuida en células aisladas de lavados cervicovaginales de pacientes con la forma recurrente de la enfermedad.
- En células epiteliales de tracto genital femenino β -Defensina 1 es regulada de manera positiva a través de las señales dadas por los receptores TLR4 e IL-1R.
- Cepas de *C. albicans* de origen clínico tienen la capacidad de disminuir la expresión de β -Defensina 1 en células epiteliales de tracto genital femenino. La disminución en este péptido es dependiente de la cantidad de hongo presente.
- La regulación de la expresión de β -Defensina 1 en células epiteliales vaginales por parte de cepas de *C. albicans* de origen clínico se produce a través de mediadores solubles liberados al medio. Las enzimas hidrolíticas Sap y Lip estarían involucradas en el fenómeno.

DISCUSIÓN

Dentro de las infecciones humanas causadas por *Candida*, la infección vaginal conocida como CVV, es la más frecuente ¹. Es una enfermedad inflamatoria aguda y una razón frecuente de consulta ginecológica. Afecta al 75% de las mujeres en edad reproductiva al menos una vez en su vida, de las cuales por lo menos la mitad experimenta un segundo episodio. Esta enfermedad es la segunda causa más común de infecciones vaginales, precediendo a las vaginosis bacterianas ^{1,4}.

La forma recurrente de esta micosis, CVVR, se define por la presencia de al menos 4 episodios sintomáticos en un año. La prevalencia de CVVR es del 9% según un estudio reciente que incluyó a 6000 mujeres de 5 países donde se determinó que la probabilidad de que la CVV progrese a su forma recurrente es alta ⁷. Actualmente, se estima que aproximadamente 138 millones de mujeres en el mundo padecen esta patología por año ⁶.

Con la excepción de raros casos donde la CVV es causada por especies de *Candida* resistentes a los antifúngicos comúnmente usados, esta patología es fácilmente tratable, siempre y cuando los factores de riesgo que la ocasionaron sean removidos o controlados ¹. Sin embargo, la CVVR es preocupante por la recurrencia de los síntomas y la escasa respuesta a los tratamientos convencionales. Las mujeres que la presentan tienen una calidad de vida disminuida, impactando negativamente en su desempeño social y laboral ^{5,6}.

C. albicans es responsable de entre un 85-95% de los casos de CVV. El resto corresponde a especies de *Candida* no-*albicans*, de las cuales la más común es *C. glabrata* ⁹.

La aparición de la CVV está relacionada a una variedad de factores de riesgo, propios del hospedador o asociados a su comportamiento, debido a la naturaleza oportunista de esta micosis. Los episodios sintomáticos son causados por el crecimiento desmedido de *Candida* ⁴. Dentro de los factores de riesgo se encuentran la ingesta de anticonceptivos orales, el embarazo, el tratamiento con antibióticos de amplio espectro y la diabetes mellitus ^{1,5}.

Los factores que determinan qué mujer sufrirá la transición de CVV esporádica a CVVR son aún desconocidos. Una pequeña fracción puede deberse a la persistencia de los factores predisponentes que desencadenan la CVV, pero en la mayoría de los casos la CVVR es idiopática, ya que ocurre en mujeres que no presentan factores de riesgo ^{1, 15}. Esto sugeriría la presencia de una predisposición genética, similar a lo que ocurre con otras infecciones por *Candida*, como la CMC. La alta prevalencia de la CVVR indica que probablemente estén involucrados diferentes genes. Se han asociado polimorfismos o

mutaciones genéticas sobre receptores de la inmunidad innata, citoquinas, vías de señalización y mecanismos efectores que participan en el control de la candidiasis en humanos, con la presentación de CVVR (Tabla 1) ^{16-18, 22-25}.

C. albicans es un hongo patógeno oportunista, miembro permanente de la microbiota en humanos que está presente en piel, mucosa oral, gastrointestinal y vaginal, de gran porcentaje de individuos sanos. Debido a su naturaleza oportunista, si las condiciones son las apropiadas, puede generar infecciones en los sitios que coloniza habitualmente. Además, tiene la capacidad de infectar y colonizar sitios distantes del organismo en individuos inmunocomprometidos, causando candidiasis invasiva, con alta tasa de mortalidad ^{27, 31}.

Romani y col. proponen que el estado comensal de *Candida* en el tracto mucoso, al igual que los platillos en una balanza, se mantiene en base al equilibrio entre la tolerancia al patógeno y el control de la inflamación local. Cambios en este balance determinan el sobrecrecimiento del hongo o la aparición de una respuesta inflamatoria exacerbada. Durante la infección fúngica, una respuesta inmune eficiente debe eliminar al patógeno y evitar el daño colateral en tejidos asociados. Mecanismos moduladores mediados por citoquinas antiinflamatorias y las células regulatorias, mientras cumplen con su rol de reducir el daño producido al hospedador, podrían limitar la eficacia de la respuesta inmune protectora. Por lo tanto, debe existir un estricto control en la calidad y magnitud de la respuesta efectora tanto innata como adaptativa. De no mediar los mecanismos antiinflamatorios, el daño producido por la activación de los mecanismos efectores sería perjudicial para el hospedador. Por el contrario, si estos mecanismos fueran excesivos, se favorecería la persistencia del patógeno. Esto sugiere que las interacciones entre el hongo y el sistema inmune del hospedador determinarían el establecimiento del microorganismo como comensal o patógeno ²⁷.

En la protección frente a infecciones por *C. albicans* participan diferentes ramas de la inmunidad y, si bien cualquiera de ellas puede contribuir en alguna medida en todos los sitios del organismo, estas respuestas se encuentran compartimentalizadas y son dependientes del sitio donde ocurra la infección ^{27, 126, 154}. Frente a infecciones diseminadas la protección la proveen las células Th1 a través de la liberación de IFN- γ ²⁷. Por su parte, mediante el uso de modelos intragástricos de colonización se determinó que células Th17 y la IL-22 son los factores protectores predominantes en mucosa gastrointestinal ¹⁵⁴. La

inmunidad mediada por células Th17 principalmente protege en la mucosa oral ¹⁵¹. Sin embargo, el rol de este tipo de inmunidad en las infecciones por *Candida* en el tracto genital femenino es controversial. Estudios clínicos en mujeres infectadas con VIH mostraron que mientras que la candidiasis oral era extremadamente común en estados avanzados de inmunosupresión, la CVV no presentaba mayor incidencia en comparación con la población sana. Por otro lado, Fidel y col. demostraron, con un modelo murino, que el desarrollo de una respuesta Th1 protectora frente a la candidiasis sistémica no protegía a los ratones frente a una infección vaginal posterior ¹⁵⁵. Estas observaciones sugirieron que los mecanismos de defensa en mucosa vaginal operan de manera diferente a los de otros tejidos mucosos ^{8,9}.

Teniendo en cuenta que la inmunidad mediada por células Th17 protege en mucosa oral contra infecciones por *C. albicans*, se propuso un papel similar en mucosa vaginal. Yano y col. usando un modelo de CVV en ratones IL-17RA^{-/-} (KO para el receptor de IL-17), IL-22^{-/-} e IL-23p19^{-/-} demostraron que ratones WT poseían igual carga fúngica, infiltrado de PMN y niveles de alarminas en lavado vaginal que ratones deficientes. Según estos resultados, la inmunidad mediada por células Th17 no sería importante en la respuesta inmunopatogénica de la CVV ¹⁵⁶.

Por el contrario, Pietrella y col. reportaron el aumento de los niveles de IL-17 e IL-23 en lavado vaginal de ratones infectados con *C. albicans* y, usando un inhibidor de la diferenciación de los Li Th17, se observó que el curso y la resolución de la infección estaba estrictamente relacionada con la presencia de IL-17 secretada por los Li Th17 ⁹². De acuerdo con estos resultados, Bruno y col. mediante una secuenciación del transcriptoma, encontraron en vagina de ratones infectados con *C. albicans* ciertos genes altamente expresados que codifican para citoquinas relacionados con la generación o función de la inmunidad de tipo Th17, como IL-22, IL-17A, IL-17F, IL-23 e IL-6 ⁵⁹. Estos hallazgos son discrepantes, pero plantean el interrogante de por qué las citoquinas del eje IL-17 estarían tan aumentadas si no cumplen un rol esencial. Una posible explicación podría ser que los estrógenos enmascaren o disminuyan posibles contribuciones de estas citoquinas. Esto fue demostrado por Chen y col. quienes encontraron que el estradiol inhibe la diferenciación de Li Th17 a través de la disminución en la expresión del factor de transcripción Ror γ t, clave en este linaje celular ¹⁵⁷.

El tracto genital femenino posee una regulación estricta debido a que, además de la protección contra agentes infecciosos, debe adaptarse a un espectro de eventos fisiológicos que incluyen la fertilización, implantación, embarazo y parto. El balance es mantenido por las hormonas sexuales a lo largo del ciclo menstrual y por los elevados niveles de la citoquina antiinflamatoria TGF- β , que permiten una respuesta finamente regulada frente a bacterias, hongos y virus, sin interferir con los eventos involucrados en la concepción^{8, 93}. De manera similar a lo que ocurre en otros sitios del organismo expuestos a patógenos potenciales, el medio ambiente del tracto genital femenino debe estar preparado para activar mecanismos de la inmunidad innata y montar una respuesta adaptativa para controlar o eliminar los patógenos. En este nicho tan estrictamente regulado, diversos autores plantean la existencia de un umbral de respuesta, que sólo cuando es sobrepasado por la magnitud de un determinado estímulo, conduce a la activación de los mecanismos locales^{8, 27}. Este sitio está equipado con factores solubles, como PAMs y alarminas; y celulares como CD, monocitos, macrófagos, PMN, células NK, ILC y Li T CD4⁺, capaces de producir citoquinas y quemoquinas que promueven el reclutamiento de más células desde sitios distantes del organismo^{1, 5, 9}.

En este nicho particular, un actor fundamental en la defensa frente a microorganismos patógenos son las CE. No sólo proporcionan una barrera física a través de las uniones estrechas que presentan, sino que además son capaces de sensar el posible peligro constituido por un patógeno a través de PRRs^{1, 90}. Producen un amplio espectro de PAMs, incluyendo las BDs, los cuales pueden estar presentes en forma constitutiva en las superficies mucosas o ser rápidamente aumentados por la presencia de estímulos inflamatorios o patogénicos^{94, 100, 158}. Las CE poseen además la capacidad de discriminar entre la forma saprofítica de *C. albicans* y su transición a la fase hifal, de esta manera, el morfotipo levaduriforme es tolerado y la emisión de la pseudohifa es considerada una señal de peligro ante la cual, la CE inicia la respuesta inflamatoria local^{5, 45}. La liberación de alarminas, IL-8 e IL-1 β favorecen el infiltrado de PMN y contribuyen a la aparición de síntomas en la CVV. De esta manera, la colonización asintomática vaginal ocurre en ausencia de respuesta inflamatoria, mientras que la forma sintomática está acompañada de un abundante infiltrado de PMN. Recientemente, Bruno y col. demostraron la relevancia de la activación del inflammasoma NLRP3 en el desarrollo de la inmunopatogenia de la CVV a través de la producción de la forma madura de la IL-1 β , ante la ausencia de la cual disminuye ampliamente el infiltrado de PMN y de la alarmina S100A9⁵⁹. La evidencia acumulada al

presente sugiere que la susceptibilidad a la infección está asociada a una respuesta inflamatoria agresiva, mientras que la resistencia, a la activación de un perfil antiinflamatorio y el adecuado balance que permita el control del crecimiento fúngico^{9, 27, 41}.

Al estudiar la respuesta inmune contra *Candida* es necesario tener en cuenta las características propias del patógeno, así como el sitio donde se desarrolla la infección y el tipo de respuesta predominante en ese lugar anatómico, debido al concepto de compartimentalización anteriormente mencionado. En gran cantidad de trabajos que estudian la infección vaginal por *Candida* se realizan determinaciones para intentar explicar los fenómenos observados con pruebas funcionales en macrófagos o CD, células que según lo expuesto previamente, no contribuyen de manera significativa a la patogenia y al control de la enfermedad. Además, en algunos de estos experimentos se utiliza *Candida* inactivada por calor para estimular a las células, proceso que altera significativamente la composición de la pared del hongo, cambiando los PAMPs que normalmente se expresan en su superficie¹⁵⁹ e impidiendo la producción y liberación de factores de virulencia. Estos fenómenos muchas veces generan conclusiones erróneas y discrepancias de interpretación.

Teniendo en cuenta los antecedentes existentes y los interrogantes sin resolver sobre esta patología, el presente trabajo de tesis se centró en el estudio de las interacciones locales entre *C. albicans* y las células del tracto genital femenino, evaluando la contribución de importantes elementos de la inmunidad innata como PAMPs de la familia de las BDs y PRRs en la patogenia de la CVV.

Para abordar el estudio de la relevancia de mediadores inmunes y PRRs en la patogenia de la infección vaginal por *C. albicans*, se desarrolló en nuestro laboratorio un modelo murino de CVV. El mismo fue ensayado en ratones WT y deficientes en diferentes vías de señalización de receptores innatos. Para evaluar la contribución de TLRs, se desarrolló el esquema experimental previamente establecido, en ratones deficientes en el receptor TLR2 y en la molécula adaptadora MyD88, imprescindible en la vía de señalización de diversos TLRs, entre ellos TLR2, TLR7 y TLR9 y compartido por la vía de activación de TLR4. Por otro lado, para estudiar la participación de los CLR en la patogenia de la enfermedad se usaron dos estrategias experimentales: la infección de animales deficientes en el receptor de β -(1,3) glucanos Dectin-1 y la infección con cepas de *C. albicans* defectivas en la producción de β -(1,3) glucanos de su pared.

Para el estudio de las BDs durante la patología se utilizó el modelo de CVV murino, donde se caracterizó la producción de estos péptidos durante la infección usando cepas de colección y clínicas.

Ante la falta de datos sobre casuística de CVV y CVVR en nuestro medio se desarrolló un estudio con pacientes. De las mismas se obtuvo información relacionada a la patología, las cepas de *Candida* responsables de la infección y muestras de lavados cervicovaginales y suero para la determinación de mediadores inmunes innatos como citoquinas y BDs.

Por último, se desarrolló y caracterizó un modelo *in vitro* de CVV con la línea celular HeLa, ampliamente utilizada ^{38, 47}, para el estudio de la modulación de BD1 por *C. albicans* y las vías de señalización involucradas en la producción del péptido.

Respuesta inmune local según magnitud del inóculo infectivo y característica de la cepa de *C. albicans*

Grandes avances en el estudio de la patogénesis molecular y celular de las candidiasis se realizaron mediante la utilización de modelos animales. El modelo de CVV en rata comenzó a utilizarse a partir de 1960, con el objetivo fundamental de probar la actividad antifúngica de nuevas drogas. Posteriormente, se desarrolló el modelo murino de CVV, desplazando al anterior, debido a los beneficios que reportaba en comparación, tales como el menor costo y la disponibilidad de animales modificados genéticamente ¹⁶⁰. Para abordar diferentes interrogantes, en este trabajo de tesis se desarrolló un modelo murino de CVV en nuestro laboratorio utilizando ratones C57BL/6.

Una de las consideraciones a tener en cuenta a la hora de establecer la infección *in vivo* es el inóculo infectivo inicial. Fidel y col. postulan que la CVV está asociada a señales que se producen luego de la interacción *Candida*-CE vaginal que promueve una respuesta inflamatoria de mediadores inmunes y leucocitos no protectora, que se asocia con los síntomas clínicos. Mientras tanto, la resistencia a la CVV estaría asociada a la ausencia de estas señales o a la actividad antifúngica de las CE vaginales ⁹⁰. Por lo tanto, este modelo propone la existencia de un umbral en el número de *Candida* en tracto genital femenino,

sobrepasado el cual habría inducción de la respuesta inflamatoria local y activación del inflamasoma NLRP3^{8, 58, 59}.

En el presente trabajo de tesis, durante el desarrollo del modelo murino de CVV, se utilizaron dos inóculos de la cepa de *C. albicans* ATCC 36801^{47, 127, 156}, encontrándose que una dosis menor no fue capaz de revertir los mecanismos homeostáticos locales que aseguran la integridad fisiológica de este nicho y en consecuencia la presencia del hongo fue tolerada sin producirse su remoción del lumen vaginal. Tampoco se observaron cambios en los niveles intravaginales de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β , TNF- α e IL-6 ni de la citoquina antiinflamatoria TGF- β (Figura 9). Sin embargo, al utilizar un inóculo mayor, si bien no hubo cambios en los niveles de citoquinas, observamos una importante remoción de la carga fúngica hacia el último día estudiado (78%), acompañado de un aumento en el reclutamiento de PMN y la formación de abscesos intraepiteliales en vagina de animales infectados (Figuras 10 y 11), indicando que se produjo activación de la respuesta inflamatoria local efectiva. Estos resultados refuerzan la teoría de la existencia de un umbral en la cantidad de *Candida* necesarias para promover un quiebre en los mecanismos de tolerancia local en el tracto vaginal frente al hongo, determinando el inicio de la patología, como fuera propuesto por Romani y col.²⁷

Por otro lado, la infección vaginal también se realizó con otra cepa de *C. albicans* de colección, denominada SC5314 ampliamente utilizada por otros autores^{44, 59}. Cabe destacar que esta cepa produjo altos niveles de las citoquinas IL-1 β y TNF- α en la cavidad vaginal (Figura 17C), en comparación con la cepa ATCC 36801, a un mismo inóculo inicial. La expresión de PAMPs, relacionada a la patogenicidad de *C. albicans*, puede variar entre las distintas cepas y provocar cambios en la afinidad por parte de los PRRs y en consecuencia promover diferentes señales de activación e inducción de distintos mecanismos efectores. En este sentido, Zhang y col. demostraron que la actividad microbicida de macrófagos frente a la cepa SC5314 fue menor que para otras cepas en estudio, aportando también evidencias sobre la resistencia de esta cepa en particular ante este mecanismo de control¹³⁶. Por lo tanto, las discrepancias en la producción de citoquinas y el tipo de respuesta inflamatoria observada en nuestro modelo de CVV, pueden ser atribuidas a las diferencias intrínsecas entre las cepas y su capacidad de ser reconocidas y activar de manera distinta a las células del sistema inmune. La respuesta diferencial específica según la cepa utilizada también fue descrita por Netea y col. quienes encontraron variaciones en la producción de IL-1 β y TNF- α

por parte de monocitos humanos de sangre periférica al ser estimulados con 14 cepas diferentes de *C. albicans*¹⁶¹.

Participación de PRRs en la patogenia de la CVV

Contribución de la vía de señalización de TLR2 en la patogenia de la CVVR

La iniciación de la respuesta inmune comienza con el reconocimiento del patógeno por parte de los PRRs, que desencadena mecanismos tempranos de respuesta críticos en la defensa del hospedador⁶⁹. En el reconocimiento de los PAMPs de *Candida* intervienen tres familias de PRRs, siendo los TLRs una de ellas. Estos receptores innatos son expresados por varios tipos celulares, incluyendo células inmunes como monocitos, macrófagos, CD y PMN, y por las CE, que actúan como primera línea de defensa en mucosas^{70, 134}. TLR2 reconoce fosfolipomananos presentes en la pared celular de *Candida*, además de formar heterodímeros con TLR1 y TLR6 y sinergizar con Dectin-1. Su activación promueve la producción de mediadores inflamatorios e inmunomoduladores^{69, 134}.

La bibliografía con respecto al rol que desempeña este receptor en la defensa contra infecciones sistémicas causadas por *Candida* es controversial. Villamón y col. trabajando con un modelo murino de candidiasis sistémica demostraron que ante la ausencia de TLR2 la sobrevivencia de los ratones se encontraba disminuida, atribuyendo este fenómeno a una pobre producción de TNF- α en macrófagos estimulados con levaduras o hifas de *C. albicans* y a un descenso en la migración de PMN a la cavidad peritoneal¹³². Acorde a este resultado, Tessarolli y col. demostraron la importancia de TLR2 en la funcionalidad de PMN luego de la infección intraperitoneal con *C. albicans*. Ante la ausencia de este receptor, observaron una disminución en la migración de los PMN al sitio de la infección, y una menor activación y sobrevivencia de estas células a las 24 horas pi¹⁶². Por su parte, otros autores encontraron que ratones TLR2^{-/-} fueron menos susceptibles a la infección diseminada por *Candida* y que el reconocimiento a través de este receptor puede ser usado por el hongo como una herramienta de evasión inmune¹³³. Nuestro grupo de investigación ha realizado aportes sobre la función de TLR2 en la protección frente a *C. albicans*, reportando que la señal gatillada por este receptor contribuye a montar una

respuesta protectora frente al hongo a nivel hepático, pero que también participa en la inducción del daño tisular favoreciendo la infección^{79, 80, 163}.

Con respecto a las infecciones mucosas causadas por *Candida*, recientemente se propuso la participación de TLR2 en la protección contra la colonización a nivel intestinal y la diseminación endógena. Según estos trabajos, la ausencia de TLR2 promueve una inflamación exacerbada en intestino frente a la infección por *C. albicans*, evaluada por hallazgos histológicos y niveles aumentados de TNF- α e IL-1 β en colon^{164, 165}. Por su parte, Rosentul y col. encontraron una relación entre el polimorfismo no sinónimo P631H en TLR2 y un aumento en la susceptibilidad a la CVVR. Individuos con este genotipo son 3 veces más propensos a presentar la patología. Análisis computacionales y funcionales indicaron que, al estar presente la mutación, la función de TLR2 fue modificada originando una reducción en la producción de IL-17 e IFN- γ en células mononucleares de sangre periférica, estimuladas con *C. albicans* inactivadas por calor. En el mencionado estudio sólo se encontraron dos pacientes con la mutación y los autores indican que para llegar a conclusiones más confiables sería necesario aumentar el número de voluntarios con este SNP (polimorfismo de un solo nucleótido, *Single Nucleotide Polymorphism*)²². Además, en otro estudio más reciente, se identificaron dos pacientes con la forma homocigota de la mutación, las cuales padecen CVVR desde la adolescencia. Lamentablemente, en dicho trabajo no se evaluaron parámetros de la respuesta inmune de las pacientes²³.

Ambos estudios indican la existencia de una relación entre la mutación en TLR2 y la presentación de CVVR. Sin embargo, no profundizan en los mecanismos que producen el aumento de la susceptibilidad y los estudios *in vitro* han sido efectuados con poblaciones celulares involucradas en la inmunidad durante el curso de infecciones sistémicas por el hongo, pero no en tracto genital femenino. Al presente, hay una ausencia de modelos que aporten evidencia sobre el rol de TLR2 a nivel del tracto genital femenino.

Nuestros resultados muestran que la ausencia de señales a través de TLR2 predisponen a una incrementada carga fúngica inicial, seguido por una disminución de la misma aunque sin llegar a la erradicación total del patógeno, alcanzando valores similares a animales WT (Figura 13). La evaluación de las UFC sólo ofrece una vista parcial del fenómeno local. Es bien sabido que el cambio morfogénico de levadura a hifa es uno de los mayores factores de virulencia de *C. albicans*, ya que la formación de la hifa está asociada a una elevada secreción de enzimas hidrolíticas, aumento en la adherencia a las superficies del

hospedador e invasión directa del tejido ¹⁶⁶. Mientras que en animales WT el hongo se encontró adherido al epitelio cornificado, en ratones deficientes en TLR2 la barrera epitelial fue fácilmente atravesada por hifas de *C. albicans* de manera masiva (Figura 14).

El daño tisular y la presencia del hongo se correlacionan con un aumento en las señales de la inmunidad innata durante la vaginitis. Recientemente, Peters y col. a través del uso de cepas de *C. albicans* con deleciones en reguladores transcripcionales que participan en la transición de levadura a hifa (*bcr1Δ/Δ*, *efg1Δ/Δ*, *cph1Δ/Δ* y *efg1Δ/Δ cph1Δ/Δ*), revelaron el rol crucial de la señalización originada por el cambio de morfotipo en las vías de Egf1 y Bcr1 durante el curso de la CVV murina. Además, demostraron que la respuesta inflamatoria observada durante la infección es dependiente de las vías que controlan el cambio morfogénético, sugiriendo una asociación entre estos fenómenos ⁴⁴.

Nuestra hipótesis inicial fue que la ausencia de señales a través de TLR2 conduciría a una susceptibilidad aumentada a la infección con mayor presencia del hongo hacia el final del estudio. Los resultados obtenidos mostraron que la carga fúngica e invasión tisular pudieron ser controladas en estos animales. En respuesta a la penetración masiva ocurrida durante los primeros días pi, se observó una respuesta inflamatoria local caracterizada por la presencia de grandes abscesos en el epitelio, mientras que en animales WT, el correcto reconocimiento del hongo previno la invasión más profunda, orquestando una respuesta inflamatoria tisular moderada y progresiva que controló la infección de manera exitosa. En ausencia del reconocimiento por parte de TLR2, los niveles intravaginales de IL-6 e IL-1 β estuvieron aumentados durante el curso de la infección (Figura 13).

Estos resultados reflejan que mientras la presencia de TLR2 en animales WT contribuye a la protección en este tracto mucoso previniendo la invasión fúngica masiva, en su ausencia, *C. albicans* puede penetrar a capas epiteliales más profundas y promover la liberación de dos mediadores inflamatorios clave, IL-1 β e IL-6, relacionados con el reclutamiento de PMN, la reacción tisular y la amplificación de la respuesta local.

Los inflamomas son receptores intracelulares involucrados en la producción de IL-1 β e IL-18. El rol esencial del NLRP3 durante el curso de la infección con *C. albicans* ha sido bien documentado ^{58, 167, 168}. La forma hifal de *Candida* se asocia con el daño celular y la secreción de IL-1 β durante la CVV ⁴⁴. Bruno y col. trabajando con ratones NLRP3^{-/-} infectados intravaginalmente con *C. albicans* demostraron la presencia de niveles ¹⁶⁴ disminuidos de PMN, alarminas y citoquinas proinflamatorias, incluyendo IL-1 β en lavado vaginal. Además

mostraron que la administración local a ratones WT de un inhibidor de NLRP3 disminuía el infiltrado de PMN e IL-1 β , a niveles similares a lo observado en ratones NLRP3^{-/-}, comprobando así la relación directa entre las señales a través de este receptor con la secreción de IL-1 β durante la CVV^{57, 59, 60}. Es importante destacar que la ausencia de señales a través de TLR2 y la elevada presencia de formas hifales del hongo contribuyen a la amplificación de la respuesta del inflammasoma y a la liberación de IL-1 β en respuesta a la infección fúngica. Estos hallazgos refuerzan la noción del rol relevante de la IL-1 β en la patogénesis de la vaginitis por *Candida*.

En conjunto, estos resultados indican que TLR2 frente a la infección vaginal por *C. albicans* protege contra la invasión y su ausencia exacerba la inflamación, de manera similar a lo reportado en mucosa gástrica^{164, 165}. Además, estos hallazgos, hasta ahora no reportados, sobre la función del receptor a nivel local explicarían la razón por la cual pacientes con mutaciones en TLR2 poseen aumentada susceptibilidad a padecer CVVR.

Contribución de la vía de señalización dependiente de MyD88 en la patogénesis de la CVVR

Luego del reconocimiento de sus ligandos, los TLRs activan una serie de señales intracelulares comenzando con el reclutamiento de proteínas que contienen dominios TIR que interactúan con dominios TIR citoplasmáticos de los TLRs. MyD88 es la molécula adaptadora universal, compartida por todos los TLRs, excepto TLR3. Gatilla vías inflamatorias a través de la activación de factores de transcripción como NF- κ B y AP-1, los cuales inducen la expresión de genes que codifican citoquinas como pro IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-12 e IFNs tipo I^{69, 70, 134}. En el caso particular de *C. albicans*, los TLRs que participan en el reconocimiento de PAMPs fúngicos y utilizan esta vía son TLR2, TLR7, TLR9 y TLR4 que también utiliza la vía TRIF (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*), de modo que su deficiencia converge en la falta de respuesta de aquellos receptores que tienen a MyD88 como única vía de señalización.

El rol global de los TLRs en la defensa del hospedador contra la candidiasis diseminada se demostró por la susceptibilidad aumentada de ratones MyD88^{-/-} a esta infección, determinada por la supervivencia de los animales y la carga fúngica en riñón, órgano blanco durante la candidemia¹⁶⁹. Estos autores también demuestran una falla en la inducción de la respuesta de tipo Th1 y una marcada disminución en la producción de

citoquinas como TNF- α , IFN- γ e IL-12 cuando los esplenocitos de animales MyD88^{-/-} fueron cultivados con levaduras e hifas de *C. albicans*. Estas tres citoquinas son claves en la respuesta sistémica a la infección y en la potenciación de los mecanismos microbicidas efectoros frente al hongo, mediados por macrófagos y PMN. Sin embargo, Platinga y col. evaluaron 2 SNPs en MyD88 en pacientes con candidiasis sistémica sin encontrar una asociación entre ambas variables¹⁷⁰. Estos hallazgos sobre la importancia de MyD88 durante la infección por *C. albicans* a nivel sistémico no han sido estudiados en infecciones en tractos mucosos.

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis demuestran que las señales a través de los TLRs que involucran a la molécula adaptadora MyD88 son necesarias para controlar la presencia de *C. albicans* en tracto reproductor femenino y su persistencia. Mientras que la ausencia de TLR2 produce una invasión masiva del tejido a tiempos cortos, alcanzando el control de la carga fúngica a tiempos prolongados, en ausencia de MyD88 no es posible regular la cantidad de *Candida* (Figura 15B).

Nuestro trabajo centró su atención en los eventos tempranos de la infección y en la contribución de los mecanismos innatos en respuesta al hongo y en este escenario la función fagocítica y candidicida de las células efectoras frente al hongo es fundamental. Bellocchio y col. demostraron que PMN provenientes de animales MyD88^{-/-} expuestos *in vitro* al hongo, tienen una capacidad fagocítica y microbicida frente a *Candida* muy disminuida comparada con la misma población celular aislada de ratones WT¹⁷¹. Marr y col. reportaron el mismo hallazgo trabajando con macrófagos de animales MyD88^{-/-}. Por lo tanto, células efectoras claves como PMN y macrófagos, fundamentales para la remoción del hongo tienen impedida su capacidad de fagocitar y matar a *C. albicans*¹⁷². Estas evidencias concuerdan con nuestros hallazgos que demuestran que durante el curso de la CVV en estos animales, aún en presencia de una robusta respuesta tisular y abundante cantidad de PMN infiltrantes u organizados en abscesos, *C. albicans* no pudo ser eliminada del tracto vaginal. La sostenida presencia de PMN en la cavidad vaginal, así como niveles elevados de la citoquina IL-1 β a tiempos más tardíos de la infección, son elementos fundamentales en el desarrollo de síntomas en esta patología. Estos resultados también sugieren la participación de otros PRRs que involucran al adaptador MyD88, para el reconocimiento de ADN y ARN de *C. albicans* por parte de TLR9 y TLR7 en CD y macrófagos periféricos¹⁷³.

Nuestros hallazgos con respecto a la importancia de MyD88 en la CVV estarían en concordancia con la reciente descripción de una mutación en la molécula MyD88 en una paciente que durante toda su vida padeció CVVR y onicomicosis causadas por dermatofitos. En este estudio se observó que la alteración genética estaba aparejada a una disminución en la producción de IL-17 en respuesta a *C. albicans* muertas por calor por parte de células mononucleares de sangre periférica²⁶; sin embargo, y aunque los síntomas de la patología no están asociados a fallas en los mecanismos de respuesta sistémica al hongo, no se efectuaron estudios sobre los mecanismos locales de respuesta al patógeno.

Contribución de la vía de señalización dependiente de Dectin-1 en la patogenia de la CVVR

Otra familia de PRRs la constituyen los CLR, cuyas vías de señalización son esenciales para la inmunidad antifúngica⁶⁵. El receptor de esta clase más estudiado es Dectin-1, que reconoce como ligando los β -(1,3) glucanos de la pared fúngica. La señalización a través de este receptor regula numerosas respuestas celulares que incluyen la fagocitosis, el estallido respiratorio y la formación de ERO, la producción de mediadores lipídicos y numerosas quemoquinas como CCL2, CXCL1 y CCL3 y citoquinas como TNF- α , IL-6, IL-23, además de IL-1 β a través de la activación del inflamasoma NLRP3^{65, 73}.

La importancia de Dectin-1 en la protección del hospedador frente a infecciones por *C. albicans* ha sido ampliamente reportada en modelos murinos y en estudios en humanos. Dos publicaciones simultáneas plantearon la asociación entre defectos en la vía de señalización del receptor Dectin-1 y la presentación de CVVR idiopática. Ferwerda y col. identificaron el codón temprano de terminación Y238X en este receptor en una familia de 5 miembros, 2 de las cuales padecían CVVR y los demás otras infecciones fúngicas en mucosa. A través de estudios funcionales, a nivel sistémico, encontraron que monocitos de sangre periférica de pacientes con la mutación homocigota poseían un deficiente reconocimiento de β -(1,3) glucanos y una defectuosa producción de citoquinas como IL-17, IL-6 y TNF- α , al ser estimulados con *C. albicans*¹⁷. Sin embargo, no se evaluó la respuesta inmune local en las pacientes con CVVR, ni se proporcionan datos sobre la producción de IL-1 β . Los autores postulan que al encontrarse la fagocitosis y los mecanismos fungicidas normales, pacientes que portan esta mutación sólo son susceptibles a infecciones mucosas, ya que no reportaron padecer otro tipo de infecciones a repetición.

Estos hallazgos motivaron otra serie de estudios que incluyeron mayor número de pacientes con CVVR. Usluogullari y col. encontraron que una paciente presentaba la forma homocigota de la mutación y 7 la forma heterocigota de un total de 50 mujeres, resultado que no difería de lo hallado en la población sana ¹⁷⁴. Por su parte, en otro estudio que incluyó 119 pacientes con CVVR no se encontró ninguna con la forma homocigota de la mutación ²². Lamentablemente, en ninguno de estos trabajos se evaluó la inmunidad local en tracto genital femenino.

Glocker y col. centraron su trabajo en el estudio de la mutación puntual Q295X en la molécula adaptadora CARD9, que forma parte de la vía de señalización de diversos CLRs, entre ellos Dectin-1, Dectin-2 y Mincle. El defecto genético se encontró presente en miembros de una familia que padecían CMC y en la cual se habían producido 3 fallecimientos por candidiasis invasiva ¹⁶. Recientemente, numerosos trabajos han asociado más de 15 mutaciones distintas en CARD9 con la susceptibilidad aumentada a padecer infecciones graves, principalmente por *Candida* ¹⁹⁻²¹. La consecuencia de estos errores genéticos resulta en una disminución en el número de células Th17, fallas en la producción de citoquinas en respuesta a *Candida* por parte de monocitos y en PMN la formación de fagolisosomas anormales y defectos en la eliminación de este patógeno ¹⁹. Por estos motivos, las mutaciones en CARD9 se asocian a infecciones más severas con respecto a las mutaciones en Dectin-1.

Por su parte, Carvalho y col. trabajando con un modelo murino de CVV e infectando con la cepa de *C. albicans* Vir3, determinaron que ratones Dectin-1^{-/-} con *background* C57BL/6 presentaron mayor carga fúngica intravaginal y presencia de PMN en el sitio de infección, aunque este resultado no es cuantitativo, pero encontraron resultados opuestos en ratones BALB/c Dectin-1^{-/-}. Además, la concentración de IL-17A, IL-17F e IL-17E estuvo disminuida en lavado vaginal de ratones C57BL/6 Dectin-1^{-/-} infectados con respecto a los controles WT, mientras que en los animales BALB/c el perfil fue inverso, observándose un claro aumento en estas citoquinas ¹²⁷. Los autores señalan la relevancia del *background* genético del hospedador en la señalización mediada por Dectin-1 tanto en la respuesta innata como adaptativa durante la infección por *Candida* ¹²⁷.

Nuestros resultados obtenidos en ratones Dectin-1^{-/-} con *background* genético C57BL/6 e infectados con la cepa de *C. albicans* SC5314 demostraron que la señalización a través de este receptor no es importante en el control de la carga fúngica intravaginal ya que

no encontramos diferencias entre las UFC recuperadas de animales WT y KO, sin embargo pudimos observar mayor presencia de hifas invadiendo el tejido vaginal (Figura 21). En las etapas tempranas de la infección tampoco detectamos producción de IL-17, IL-22 e IL-23 en el lavado vaginal de estos animales. Las diferencias observadas con respecto a la bibliografía podrían explicarse teniendo en cuenta que las cepas de *C. albicans* usadas en ambos trabajos fueron diferentes y ha sido reportado que el rol protector de Dectin-1 en modelos murinos de infección por este patógeno es dependiente de la cepa de *C. albicans* utilizada¹⁷⁵.

Si bien se ha demostrado que la señalización a través de Dectin-1 contribuye activamente a la producción de IL-1 β , mediante la activación clásica del inflammasoma NLRP3 y del inflammasoma no canónico caspasa-8^{58, 176}, en nuestro estudio encontramos que ante la ausencia de Dectin-1 la concentración de IL-1 β en la cavidad vaginal se mantuvo elevada durante todos los días ensayados (Figura 21). Esto podría explicarse por las diversas funciones de este receptor luego de contactar a su ligando, que incluyen endocitosis, fagocitosis, producción de ERO, mediadores lipídicos y citoquinas y quemoquinas, que en su conjunto contribuyen al control de la presencia de patógenos¹⁷⁷. En su ausencia, nuestros resultados demuestran una mayor cantidad de hifas presentes en cavidad vaginal y penetrando en el tejido. Como ya se mencionó, el cambio morfológico de levadura a hifa es fundamental para la respuesta inmune innata contra *C. albicans* y, particularmente en tracto genital femenino, determina la producción de IL-1 β ⁴⁴. Además, ha sido demostrado que enzimas hidrolíticas liberadas por *Candida*, como las Sap, activan de manera directa al inflammasoma NLRP3⁵⁷. Si bien la expresión de las Sap no está estrictamente vinculada a la transición de levadura a hifa, está gobernada por los mismos factores¹⁷⁸. Estos fenómenos podrían explicar los altos niveles de IL-1 β encontrados en ratones Dectin-1^{-/-} al día 8 pi. La ausencia de Dectin-1 genera mayor presencia de hifas en tejido, con la posible producción aumentada de Sap, ambos fenómenos asociados de manera directa a la producción de IL-1 β . Por lo tanto, si bien las señales a través de Dectin-1 no contribuyen al control de la carga fúngica intravaginal, si lo hacen a la correcta regulación de los niveles de IL-1 β .

Aproximadamente un 40% de la pared de *C. albicans* lo conforman β -(1,3) glucanos, y su disposición en la pared del hongo los ubica por debajo de las mananoproteínas (Figura 1). El enmascaramiento de estas moléculas es considerado una estrategia de evasión fúngica puesto que previene el reconocimiento por parte del receptor Dectin-1 y la activación de los mecanismos de respuesta protectores. También se ha reportado que existen diferencia

entre la estructura de los β -(1,3) glucanos expresados en los diferentes morfotipos de *C. albicans*. Así, las hifas expresan una forma cíclica de β -(1,3) glucanos, mientras que en la levadura la estructura predominante es de tipo lineal, sugiriendo una modificación en el reconocimiento inmune asociada al estado patogénico o comensal del hongo. Estos componentes de la pared fúngica son sintetizados por el complejo enzimático 1,3- β -D Glucan Sintasa, el cual está conformado por al menos dos subunidades, Fksp y Rho1p. La subunidad Fksp es codificada por tres genes relacionados, *FKS1*, *FKS2* y *FKS3* y contiene el sitio activo de biosíntesis^{37, 38}. Hay dos regiones altamente conservadas en el gen *FKS1*, denominadas *hot-spot*, en las cuales se han encontrado altas tasas de mutaciones. El *hot-spot* 1 comprende 9 aminoácidos desde las posiciones 641 a 649 y el *hot-spot* 2, 8 aminoácidos, desde 1357 a 1364. El resultado de estas mutaciones es la disminución en la cantidad de β -(1,3) glucanos presentes en la pared del hongo³⁸.

García-Effron y col. reportaron que las cepas de *C. albicans* con mutaciones homocigotas en los *hot-spot* del gen *FKS1* presentan una disminución en la velocidad máxima catalítica de la 1,3- β -D Glucan Sintasa, lo que provoca un engrosamiento de la pared celular atribuible a un aumento en el contenido de quitina. Las cepas que presentan el mayor contenido de quitina poseen una tasa de crecimiento reducida y la capacidad de filamentación disminuida¹⁷⁹. Por otra parte, Marakalala y col. en un estudio comparativo *in vivo* entre las cepas ATCC 18804 y SC5314 de *C. albicans* reportaron que cambios en la arquitectura y composición de la pared del hongo modifican el reconocimiento inmune por parte de Dectin-1. Tratamientos con equinocandinas sobre la cepa ATCC 18804, elevaron fuertemente la expresión del gen *CHS3* involucrado en la síntesis de quitina, modificando la composición de su pared. La respuesta inflamatoria de leucocitos frente a esta cepa fue menor comparada a la observada con la cepa SC5314, demostrando que el aumento de quitina en la pared del hongo modifica la respuesta del hospedador, principalmente en la inducción de los mecanismos innatos de respuesta¹⁷⁵.

Mora-Montes y col. demostraron que células mononucleares de sangre periférica estimuladas con quitina no producen niveles significativos de TNF- α , IL-1 β e IL-6 y la preincubación de estas células con quitina y posterior exposición al hongo, promueve una disminución en la producción de dichas citoquinas¹⁸⁰.

Nuestros resultados mostraron que cepas defectivas en β -(1,3) glucanos por mutaciones en el *hot-spot* 1 del gen *FKS1* no presentan modificaciones en la capacidad infectiva durante la CVV. Sin embargo, son incapaces de gatillar la producción de IL-1 β y TNF- α en el microambiente vaginal (Figura 19). En este escenario las cepas defectivas se comportaron como pobres inductoras de la inmunidad innata. La disminución en la producción de IL-1 β podría explicarse porque estas cepas con mutaciones en el gen *FKS1*, presentan una menor capacidad de formar hifas ¹⁷⁹, siendo el cambio morfológico de levadura a hifa fundamental para la respuesta inmune innata contra *C. albicans* y particularmente en tracto genital femenino determina el reclutamiento de PMN y la producción de IL-1 β ⁴⁴. Otra explicación podría estar relacionada a la modificación en los niveles de quitina en la pared celular y a la menor capacidad de inducción de respuesta inflamatoria.

En conjunto, la modificación en los niveles de quitina en la pared celular junto con la capacidad disminuida de formar hifas de las cepas de *C. albicans* mutantes en el gen *FKS1* produce un reconocimiento deficiente por parte del sistema inmune.

Estudio en pacientes con CVVA y CVVR

Como ya se ha mencionado previamente, la CVV afecta a aproximadamente el 75% de las mujeres en edad fértil al menos una vez en su vida y es la segunda causa de infecciones vaginales a nivel mundial. *C. albicans* es la especie aislada en el 85-95% de las pacientes ^{8, 9}. Estos datos corresponden a estudios realizados en otros países. Investigaciones realizadas en Argentina, indican que la incidencia de la CVV es alta y que constituye la segunda causa de vaginitis siendo *C. albicans* la especie más frecuentemente aislada ¹⁸¹. Arechavala y col. determinaron que la distribución de especies, sobre un total de 94 muestras de *Candida* aisladas de pacientes con CVVA, fue: 86% *C. albicans*, 6% *C. glabrata*, y en tercer y cuarto orden *C. inconspicua* (3%) y *C. krusei* (2%) ^{182, 183}. Recientemente, Mucci y col. trabajando con pacientes con CVVA embarazadas encontraron, con un total de 55 aislados, la siguiente distribución de especies: 81% *C. albicans*, 4% *C. dubliniensis*, 4% *C. glabrata*, 2% *C. parapsilosis*, correspondiendo el resto a asociaciones entre *C. albicans* con otra especie de *Candida* no-*albicans* ¹⁸³. Ninguno de los reportes locales incluyó a pacientes con CVVR.

En nuestro estudio, el primero realizado en la ciudad de Córdoba según nuestro conocimiento, encontramos que el 96% de las infecciones en pacientes con CVVR son causadas por *C. albicans* y el 4% restante por *C. guilliermondii* (Figura 32). Por su parte, en pacientes con CVVA la distribución de especies fue: 93% *C. albicans* y 7% *C. glabrata*. En ambos grupos de pacientes, CVVA y CVVR, y de acuerdo a lo reportado en bibliografía, la especie predominante es *C. albicans*, seguida por *C. glabrata* en el grupo CVVA, similar a lo observado por Arechavala y col. en la provincia de Buenos Aires ¹⁸².

El sobrecrecimiento de *Candida* produce los episodios sintomáticos de CVV. Este fenómeno se encuentra favorecido por determinados factores predisponentes como por ejemplo el embarazo, los anticonceptivos orales, el tratamiento con antibióticos de amplio espectro y la diabetes mellitus ^{1, 5}. En este trabajo de tesis encontramos que el 73% de las pacientes con CVVA tuvo alguno de los factores de riesgo previamente descritos en comparación con un 43% de las pacientes con CVVR (Figura 30). Estos resultados son similares a lo reportado recientemente por los grupos liderados por Sobel y Cassone, referentes internacionales en la temática ^{1, 6}. El alto porcentaje de pacientes con CVVR que no presentan ninguno de los factores de riesgo asociados a la CVV indicaría que posiblemente un componente genético sea lo que determina qué mujer sufrirá la transición de CVV esporádica a CVVR ^{6, 9}.

Como ya se mencionó, la terapia antifúngica local durante 7 días o el tratamiento oral de una sola dosis son efectivos en el 80-90% de los casos de CVV. Las drogas usualmente empleadas en formulaciones tópicas forman parte de la familia de los azoles y el tratamiento oral consiste en una única dosis de fluconazol. La eficacia en ambos esquemas de tratamiento es similar ¹⁴². Nuestros resultados indican que el tratamiento convencional, en el 79% de las pacientes con CVVA, resuelve la patología, en concordancia con lo reportado por otros autores (Figura 31B). El porcentaje de mujeres donde la terapia no es efectiva puede atribuirse a que la especie de *Candida* aislada sea resistente a los antifúngicos comúnmente usados, como *C. glabrata* que naturalmente posee sensibilidad disminuida a fluconazol ^{181, 182}. Otra explicación podría estar asociada a que los factores de riesgo que la ocasionaron no hayan sido removidos o controlados debidamente o que en estas pacientes, por causas desconocidas, los episodios agudos de CVV progresarán a CVVR. En las mujeres que presentan la forma recurrente de la patología, los tratamientos son de larga duración, más complejos, incluyen con frecuencia la combinación de diferentes drogas y la falla

terapéutica es más frecuente, encontrándose que la mitad de las mujeres tendrán una recurrencia al terminar la terapia ^{5, 142}. En nuestro estudio encontramos que en pacientes con CVVR el tratamiento resuelve la presentación de síntomas sólo en un 56% de los casos (Figura 31A), resultados similares a lo reportado.

Perfil de virulencia de los aislados clínicos de pacientes con CVVA y CVVR

La capacidad patogénica de *Candida* está directamente ligada a su extenso repertorio de factores de virulencia selectivamente expresados acorde a las etapas de la infección y a las características del sitio que coloniza ^{31, 32, 34}. Estos incluyen el dimorfismo celular, la adhesión, la producción de enzimas lipolíticas y proteolíticas, y la capacidad formadora de biofilm. Con el fin de determinar si existen diferencias entre los perfiles de virulencia de los aislados clínicos de las pacientes con la forma aguda o crónica de la CVV, se abordó el estudio de 4 importantes factores de virulencia de *C. albicans*. Se evaluó la adherencia (HSC), la capacidad formadora de biofilm y la producción de Lip y Sap en una muestra representativa de 25 aislados clínicos de cada condición. La adherencia es una etapa crucial durante la invasión del tracto mucoso y en las etapas tempranas de la infección. Nuestros resultados revelaron que no existe diferencia en esta propiedad cuando el hongo fue recuperado de pacientes con un único episodio de CVV, comparado con los aislados clínicos recuperados de pacientes con CVVR (Figura 33).

El crecimiento de *Candida* en biofilm está asociado con la persistencia y la progresión de la infección ^{49, 50}. La formación del biofilm le confiere al hongo mayor resistencia frente a diferentes antifúngicos y a los mecanismos inmunes de defensa. Asociado a la colonización del tracto vaginal Harriot y col. demostraron la presencia de biofilm de *Candida* durante la infección en un modelo murino y de Bernardis y col. sobre CE en cultivo ^{51, 52}. Nuestro estudio permitió determinar que las cepas recuperadas de los distintos grupos de pacientes presentaron entre alta y buena capacidad formadora de biofilm (AFB y BFB) (Figura 33). Mientras los aislados clínicos de pacientes con CVVA se clasificaron AFB, con actividad comparable a la cepa SC5314, las cepas de pacientes con CVVR pudieron ser identificadas como BFB (Figura 33).

La producción de enzimas hidrolíticas está asociada a eventos de invasión tisular e injuria celular. Las Lip constituyen una familia compuesta por numerosos miembros conocidos por su función en la biología del hongo y no tan explorados como atributos de

virulencia de *Candida*¹⁸⁴. Nuestro grupo ha aportado importante evidencia sobre el rol de estas enzimas como factores de virulencia y sobre la existencia de una relación directa entre los niveles de producción de la Lip y el crecimiento fúngico. La Lip de *C. albicans* purificada en nuestro laboratorio fue capaz de inducir daño en células parenquimales y aumentar la vulnerabilidad de macrófagos activados al efecto tóxico de los ERO y derivados tóxicos del nitrógeno^{29,30}. Otros estudios reseñan la contribución de distintos miembros de esta familia durante la transición de levadura a hifa y un aumento de la transcripción de los genes de *Lip5*, *Lip6*, *Lip8* y *Lip9* durante infecciones experimentales¹⁸⁴. El rol patogénico de estas enzimas también fue demostrado durante el curso de la candidiasis diseminada en ratón donde se observó que cepas *Lip8Δ/Δ*, presentaban una menor virulencia¹⁶⁶. Stehr y col., en estudios sobre aislados clínicos de pacientes con candidiasis oral reportaron aumento de los transcritos de *Lip4*, *Lip5* y *Lip8*⁶³. En contraposición a la evidencia generada en la cavidad oral, existe una ausencia de información en relación a la expresión y a la contribución de estas enzimas tanto en modelos murinos de CVV como en la patología humana.

Nosotros observamos que el 60% de los aislados de pacientes con CVVA exhibieron actividad lipolítica, mientras que el porcentaje de cepas de *C. albicans* productoras de Lip fue del 38% en las muestras recuperadas de mujeres con la forma recurrente de la micosis (Tabla 3). Cuando los niveles de la actividad lipolítica se evaluaron, no detectamos diferencias significativas entre los distintos grupos. La diferente proporción de aislados positivos entre los grupos sugiere un rol aún no esclarecido para las Lip durante la infección vaginal. Aunque se carece de información sobre su capacidad de daño e injuria tisular sobre CE de este tracto, la capacidad patogénica de esta familia ha sido comprobada^{166,184}. Otros autores señalan que la liberación de ácidos grasos producido por la actividad lipolítica de estas enzimas contribuye a la modificación del pH del medioambiente en el que se encuentran, resultando en la optimización de otras enzimas fúngicas como las Sap⁶³.

Es conocido que reguladores transcripcionales claves como CpH1 y Efg1 que coordinan los cambios morfológicos tales como la transición de levadura a hifa, también regulan la expresión de genes asociados a la hifa como *HWP*, *ECE1*, *HYR1* y la producción de proteinasas de la hifa como Sap 4-6,¹⁸⁵. Por lo tanto, su expresión se encuentra aumentada durante la invasión y los procesos infecciosos. La transcripción de *Sap5*, *6* y *9* está incrementada durante la formación del biofilm. Schaller y col. usando epitelio oral y vaginal humano reconstituido reportaron que *Sap1-3* se expresan en las etapas iniciales de la

colonización y participan del daño tisular indicando un papel fundamental para estas enzimas en la infección por *Candida* en los tractos mucosos⁵⁵. Otras investigaciones demostraron que *Sap2* es un miembro dominante de la familia Sap y que se secreta en altos niveles durante la infección vaginal en ratas y en pacientes. El uso de anticuerpos específicos para la neutralización de Sap2 en modelos experimentales de CVV describen la actividad protectora de los mismos, mientras que el uso de fragmentos de la proteína Sap2 recombinante incorporados a diferentes formulaciones se encuentra en etapas avanzadas de estudio y aplicación como vacuna¹. Gabrielli y col.⁶⁰ reportaron que las enzimas Sap2 y Sap6 de *C. albicans* participan en la activación del inflamasoma NLRP3. Bruno y col. utilizando análisis de secuenciación del transcriptoma de *Candida*, demostraron una robusta expresión de *Sap5* durante la CVV murina. De manera complementaria, estos autores también reportaron que la infección vaginal con cepas con deleciones en *Sap4*, *Sap5* y *Sap6* produjeron bajos niveles de IL-1 β y un pobre reclutamiento de PMN al lumen vaginal,⁵⁹ demostrando en su conjunto la relevancia de este factor de virulencia en la inmunopatogenia de la vaginitis por *Candida*.

En este trabajo de tesis no se abordó el estudio de los miembros de esta familia, sin embargo en vista de la importancia de las Sap en el tracto mucoso en estudio, evaluamos la actividad de estas enzimas proteolíticas producidas por las cepas de los distintos grupos de pacientes (Tabla 3). Observamos que el 60% de los aislados de pacientes con un único episodio produjeron Sap frente al 71% de las cepas recuperadas de pacientes con CVVR, siendo mayor el nivel de Sap observado en los aislados de CVVA.

Nuestros resultados en su conjunto demuestran que las cepas aisladas de pacientes con CVVA y CVVR presentan diferentes atributos de virulencia, sugiriendo que la prolongada permanencia en este nicho particular modula su expresión. Enzimas claves en la etiopatogenia de esta enfermedad como las Sap están presentes en un número significativo de aislados, siendo ligeramente mayor en pacientes con CVVR.

Estudios inmunológicos en pacientes

Como previamente se mencionó, la inmunidad mediada por células no desempeña un rol relevante en la defensa del tracto reproductor femenino, siendo importante en este sitio el papel de la inmunidad innata^{1, 8}. Por tal motivo, y por la relevancia que presentan ciertas citoquinas en la patogenia de la CVV, algunos trabajos han abordado el estudio de

estos mediadores solubles en tracto genital femenino. La muestra biológica más representativa para el estudio de estas moléculas es el lavado cervicovaginal recolectado mediante la instilación de solución fisiológica y luego aspiración con jeringa ¹⁵⁰. Este es un fluido biológico complejo formado por agua, electrolitos, compuestos orgánicos, células, gran cantidad de proteínas y secreciones de organismos comensales ¹⁴⁹.

Barousse y col. realizaron mediciones de citoquinas en lavado cervicovaginal de pacientes adolescentes, clasificándolas según la presencia o no de *Candida* en muestras de hisopados vaginales. En su estudio no encontraron diferencias significativas en los niveles de ninguna de las citoquinas evaluadas (TNF- α , TGF- β , IL-1 α , IL-6, IL-10, IL-4, IL-12, IL-2, IFN- γ) entre pacientes colonizadas y no colonizadas por el hongo, ninguna de las cuales presentaba la forma recurrente de la enfermedad ¹⁸⁶. En otro estudio, Lev-Sagie y col. dosaron la presencia de IL-6, IL-12 e IL-23 en muestras de hisopados vaginales de 17 pacientes con CVVR encontrando un porcentaje variable de muestras positivas (6% para IL-23, 54% para IL-6 y 12% para IL-12); sin embargo, no incluyeron controles sanos ¹⁸⁷. Ya ha sido mencionado el rol que desempeña IL-1 β en la presentación de la sintomatología de la CVV. Basso y col., trabajando con pacientes embarazadas, encontraron un aumento significativo en la concentración de esta citoquina en lavado cervicovaginal de pacientes con vaginitis, donde no diferenciaron entre infectadas por *Candida* o *Trichomonas vaginalis*, comparado con controles sanos ¹⁸⁸. Por su parte, Fidel y col. intentando emular lo que sucede en la infección natural por *Candida* en mujeres sin antecedentes de CVVR, desarrollaron un protocolo de inoculación vaginal de un antígeno comercial del hongo en mujeres sanas. Entre 16 y 36 horas luego de la inoculación vaginal del antígeno evaluaron los niveles de citoquinas (IL-2, IFN- γ , IL-12, IL-4, IL-10, TGF- β , IL-1 α , IL-6 y TNF- α) en lavados cervicovaginales, no encontrando diferencias en los valores pre y post inoculación ¹⁸⁹. Recientemente Masson y col. establecieron una correlación entre colonización vaginal con *Candida* y bajos niveles de IL-17 en muestras de lavado cervicovaginal. En este trabajo se clasificó a las pacientes según la presencia de *Candida* en tracto genital femenino, y no según el cuadro clínico, CVVA o CVVR ¹⁹⁰.

Los resultados en nuestro estudio indican que pacientes con CVVR poseen elevados niveles de IL-1 β e IL-6 en muestras de lavado cervicovaginal en comparación con pacientes sanas y pacientes con CVVA. Por su parte, los niveles de TNF- α fueron indetectables en todas las muestras. Mientras tanto, la citoquina antiinflamatoria TGF- β no modifica sus niveles en

este tracto ante la presencia o no de infección por *Candida* (Figura 35), resultado similar a lo encontrado por Barousse y col. en pacientes colonizadas por el hongo ¹⁸⁶.

A diferencia de lo reportado por Masson y col. ¹⁹⁰, en ninguna de las muestras analizadas encontramos niveles detectables de IL-17. Esto podría explicarse por la diferencia de métodos utilizados en las determinaciones. Mientras que nosotros cuantificamos la citoquina mediante ELISA, con un límite de detección de 15 pg/mL, Masson y col. utilizaron Luminex, con un límite de detección de 0,31 pg/mL, y las concentraciones de IL-17 que reportaron en las muestras están por debajo de 15 pg/mL. Luego de una extensa revisión bibliográfica, sólo el trabajo de Masson y col. y el presente estudio aportan datos sobre la escasa producción local de IL-17.

Por otro lado, observamos que IL-23 se encuentra disminuida en pacientes con CVVR en comparación con pacientes con CVVA (Figura 35). Este resultado estaría en concordancia con lo reportado por Ryan y col. quienes observaron que CD de pacientes con CMC estimuladas con hifas de *C. albicans* presentaron bajos niveles de IL-23 comparado con los producidos por CD de controles sanos. Además, estas células de pacientes con CMC, ante el mismo estímulo, produjeron altas concentraciones de IL-6 ¹⁹¹. Como se mencionó previamente, IL-6 junto con TGF- β e IL-1, son necesarias para la diferenciación de las células Th17, mientras que la IL-23 se requiere para la expansión, el mantenimiento, y la función efectora de este linaje ⁸¹. Los autores proponen que los bajos niveles de IL-23 en estos pacientes en respuesta a *Candida* producen una desregulación del eje IL-6/IL-23/IL-17, que repercute en su habilidad de montar y sostener una respuesta antifúngica Th17 eficiente que permita remover al hongo ¹⁹¹.

Se ha demostrado que células mononucleares de sangre periférica de pacientes con CMC estimuladas con *Candida* producen menores cantidades de IL-22. El estímulo más significativo para la producción de esta citoquina es la IL-23. IL-22 cumple importantes funciones en epitelios y su receptor se expresa en CE y estromales del tracto gastrointestinal, hígado, pulmones, tiroides, páncreas, piel y corazón, siendo algunos de estos sitios propensos a la infección por *Candida* en pacientes con CMC. Por lo tanto, es posible que bajos niveles de IL-22 puedan predisponer a infecciones por el hongo ¹⁹². En nuestro estudio, este mediador fue indetectable en todas las muestras.

Se ha reportado en humanos que las células T de memoria específicas para *Candida* tienen fenotipo de linaje Th17 con un patrón de expresión de receptores de quemoquinas

que indican la capacidad de estas células de retornar a mucosas. Podría especularse que en pacientes con CVVR, los bajos niveles de IL-23, que repercuten en los niveles de IL-22, se traducirían en una incapacidad de montar y sostener una correcta respuesta antifúngica de tipo Th17, impidiendo la eficiente remoción de *Candida*¹⁹¹.

En este trabajo evaluamos además la concentración sérica de citoquinas en pacientes con CVVR, encontrando aumentados los niveles de IL-1 β , TNF- α e IL-6 con respecto a controles sanos. No observamos cambios en IL-23, IL-22 ni TGF- β entre ambos grupos y los niveles de IL-17 fueron indetectables en todas las muestras (Figura 36). Previamente Basso y col. determinaron la concentración sérica de IL-1 β e IL-6 en pacientes embarazadas con vaginitis causadas por *Candida* o *T. vaginalis*, siendo los niveles de ambas indetectables¹⁸⁸. En dicho trabajo no diferencian entre pacientes con CVVA y CVVR, si la hubiera. Hasta el momento, esta es la primera evidencia de aumento en la concentración de citoquinas proinflamatorias en suero de pacientes con CVVR.

β -Defensinas durante la Candidiasis Vulvovaginal

Los PAMs, importantes componentes de la inmunidad innata, son expresados por CE en las barreras primarias de los organismos multicelulares, como la piel y las mucosas, además de ser almacenados en gránulos de los fagocitos^{98, 99}. El grupo más numeroso dentro de la superfamilia de PAMs lo constituyen las BDs. De la gran diversidad de BDs existentes en humanos, sólo hBD1, 2 y 3 se expresan en tracto urogenital denominándose mBD1, 3 y 14 sus contrapartes murinas^{104, 105}. Acorde a lo reportado hasta el momento, en este trabajo de tesis se encontró que mBD1, 3 y 14 se expresan en vagina de ratón (Figura 23).

Probablemente el PAM más importante en tejidos epiteliales sea BD1 debido a que proporciona protección constitutiva contra organismos potencialmente patogénicos en las mucosas epiteliales internas y expuestas¹¹². Si bien en un principio se creía que su expresión era constante, recientes trabajos demostraron que puede ser regulada. Bajaj-Elliott y col. determinaron la modulación de hBD1 en 3 líneas celulares de epitelio gástrico y encontraron que aumenta su expresión ante la estimulación con IL-1 β ¹⁵². Por su parte, el efecto de *C. albicans* en la modulación de este péptido fue evaluado en cultivos *ex vivo* de membranas amniocoriónicas obtenidas de cesáreas, encontrando que el hongo aumenta los niveles de

hBD1¹⁵³. Estos trabajos y otros llevaron a la conclusión de que la inducción de BD1 es altamente dependiente del tipo celular estimulado, del tiempo de estimulación, del estímulo propiamente dicho y del contexto en el cual se produce esa estimulación¹¹⁰.

Por su parte hBD2 y hBD3 son de expresión inducible por diversos estímulos como LPS, IL-1 β y TNF- α para hBD2^{103, 106} y TNF- α , IFN- γ y ligandos de EGFR para hBD3^{103, 106, 107}. Ambos péptidos demostraron poseer actividad microbicida contra *C. albicans*^{116, 117}.

Trabajando con el modelo murino de CVV demostramos que, en respuesta a una infección vaginal aguda por *C. albicans*, mBD1 aumenta su expresión en el epitelio y en PMN (Figuras 23-25). De manera consistente con nuestros hallazgos, ha sido previamente reportado el rol protector de mBD1 durante la candidiasis oral, usando ratones BD1^{-/-}. En este trabajo se establece que la severidad de la infección y la diseminación se relacionan directamente con la ausencia del péptido. Los PMN desempeñan un importante papel en la defensa contra la candidiasis oral y, en ausencia de mBD1, los autores encontraron una disminución en el reclutamiento de esta población celular hacia la mucosa oral. Además, identificaron la importancia de BD1 en el control de la infección entre los días 2 y 3 luego de la administración oral del hongo¹¹⁵, resultado concordante con lo observado en nuestro estudio, donde encontramos al día 2 pi el mayor aumento en la expresión de BD1 en células de lavado vaginal de animales infectados con respecto a controles (Figura 24).

En el caso de PAMs como mBD3, fuertemente inducibles por estímulos inflamatorios y la presencia del patógeno, el efecto del microambiente es crucial en su producción. Detectamos un gran incremento de los transcritos de mBD3 a nivel vaginal luego de la infección, resultado en línea con lo reportado en bibliografía, donde se describió un aumento en la expresión de mBD3 en células de lavado vaginal aisladas de ratones infectados⁹². Por su parte, la expresión de mBD14 no fue modificada de manera significativa (Figura 23).

Observamos que el tratamiento con estrógenos induce un aumento en la expresión de mBD1 y mBD14, aunque no estadísticamente significativo. La modulación hormonal de BD1 ya fue reportada por Hickey y col. quienes encontraron que transcritos de este péptido aumentaban sus niveles durante la fase estro de los ratones, momento en el cual los estrógenos presentan un pico¹³¹. Este fenómeno podría explicarse ya que se encontró en la secuencia del gen de *hBD1* elementos respondedores a factores de transcripción, entre ellos

el Receptor de Estrógenos 1¹¹² y, si bien este hallazgo no ha sido reportado en ratones, la homología entre hBD1 y mBD1 es elevada.

A fin de determinar si la patogenicidad de la cepa de *C. albicans* promueve un aumento de mBD1, utilizamos el modelo murino de CVV usando una cepa aislada de una paciente con CVVR. Observamos que la cepa de origen clínico fue capaz de inducir una respuesta inflamatoria más robusta, evidenciada por una mayor producción de mBD1 en células de lavado vaginal, además de incrementados niveles vaginales de IL-1 β con respecto a la cepa de colección (Figura 28), evidenciando una correlación entre la modulación positiva de mBD1 en el tracto vaginal y la patogenicidad del hongo.

Mientras que la información existente sobre la modulación de BD2 y BD3 está mejor caracterizada, poco se sabe sobre los receptores y vías que participan en la regulación de BD1. Nuestro trabajo aporta valiosa información sobre este tema. En el modelo murino de CVV desarrollado en ratones TLR2^{-/-} observamos un incremento en los niveles de transcritos y en la expresión de este péptido durante la infección (Figuras 26 y 27), demostrando que la vía dependiente de TLR2 no está involucrada en la inducción de mBD1. Las evidencias generadas por nuestros estudios *in vitro* son coincidentes. Este mismo fenómeno se observó en células de epitelio cervicovaginal humano, utilizando agonistas de TLR2 como Pam3CSK4 y Zymosan, los que fueron incapaces de inducir un aumento en la expresión de hBD1 (Figura 44). Por su parte, encontramos que en esta misma línea celular, las señales a través de la citoquina IL-1 β modulan de manera positiva la expresión del péptido, resultado similar a lo encontrado por Bajaj-Elliot y col. en células de epitelio gástrico¹⁵². Asimismo, la estimulación con LPS, agonista del receptor TLR4 aumenta la expresión de hBD1. Sin embargo, Han y col. trabajando con células vaginales humanas, obtenidas luego de una vaginoplastia, estimuladas con LPS no encontraron cambios en la expresión del péptido¹⁹³. Las diferencias en los resultados pueden ser explicadas por la concentración de LPS usado en la estimulación. Mientras que Han y col. estimularon con 0,5 μ g/mL, nosotros ensayamos dos concentraciones, 1 μ g/mL y 10 μ g/mL, encontrando aumento de hBD1 sólo con la más alta.

La importancia de la correcta expresión de hBD1 ha sido demostrada ya que un aumento en la susceptibilidad a ciertas infecciones, como por ejemplo las causadas por el Virus del Papiloma Humano¹³⁹ y por la bacteria *Mycobacterium leprae*¹¹², se asocian a SNPs en el gen que codifica para este péptido.

Una importante contribución de nuestro trabajo fue el hallazgo de que hBD1 se expresa de manera diferente en pacientes con CVVA y CVVR. En pacientes con episodios agudos, la infección vaginal por *Candida* aumenta los transcritos de hBD1 con respecto a controles sanos mientras que los niveles del péptido en las células de lavado cervicovaginal se mantienen constantes. Por el contrario, la infección en pacientes con CVVR no genera cambios en los transcritos de este péptido y disminuye su expresión en células de lavado cervicovaginal (Figuras 37 y 38). Estos hallazgos, no descritos hasta el momento, indican que *Candida* tiene la capacidad de reducir la expresión de hBD1, un PAM de gran importancia en la defensa de tractos mucosos, fenómeno que sólo ocurre en pacientes con CVVR. Por su parte, los transcritos de hBD3 se encuentran aumentados en células de lavado cervicovaginal de pacientes con CVVR; sin embargo, la expresión de la proteína está disminuida con respecto a lo observado en pacientes con CVVA (Figuras 37 y 39). Recientemente, Noda-Nicolau y col., reportaron la disminución de hBDs asociada a la infección vaginal por *C. trachomatis*¹⁹⁴.

Considerando el rol crítico de los PAM debido a su capacidad microbicida e inmunomoduladora en las superficies mucosas, su disminución constituiría un modelo altamente eficiente de evasión para los patógenos. Durante los últimos años han surgido grupos de investigación que han abordado el estudio de la regulación de estos péptidos asociados a infecciones por distintos patógenos. La expresión constitutiva de los PAMs varía de acuerdo al tipo epitelial. En células de la mucosa gástrica la expresión constitutiva de hBD1 es elevada. Recientemente, Patel y col. reportaron que biopsias gástricas de pacientes infectados con *H. pylori* presentaban niveles significativamente disminuidos de transcritos de hBD1. Trabajando con líneas de epitelio gástrico y diferentes cepas de la bacteria, pudieron demostrar que el efecto era dependiente de la patogenicidad de la cepa y que estaba mediado por un factor de virulencia de *H. pylori* dependiente de la presencia de la isla de patogenicidad CagA. En el caso de esta bacteria la disminución de hBD1 en la mucosa gástrica contribuye a su permanencia¹⁰⁸. Chakraborty y col. evaluaron la modulación negativa de hBD1 en CE humanas de mucosa intestinal, expuestas a dos patógenos entéricos, *Vibrio cholerae* y *Escherichia coli* enterotoxigénica. En ambos patógenos, dos importantes factores de virulencia fueron responsables de producir este efecto. En experiencias *in vivo* e *in vitro* se observó que la toxina colérica y la toxina lábil ejercieron este efecto inhibiendo la transcripción de hBD1¹⁹⁵.

En concordancia a lo reportado por Patel y col. en epitelio gástrico, nuestros estudios *in vitro* nos permitieron corroborar que cepas de *C. albicans* de origen clínico (una aislada de una paciente con CVVR y otra que posee una mutación en el *hot-spot* 2 del gen *FKS1*, aislada de hemocultivo) son capaces de disminuir la expresión de hBD1 en células de epitelio cervicovaginal (Figura 45). El efecto biológico observado no requirió del contacto entre el hongo y la CE y estuvo mediado por un factor soluble liberado por el patógeno (Figura 46). El uso de inhibidores enzimáticos permitió determinar que dos importantes factores de virulencia de *C. albicans*, Lip y Sap están involucrados en este fenómeno.

Los síntomas de la CVV se asocian a una respuesta inflamatoria de mediadores inmunes y PMN no protectora, originada por las señales de las CE, mientras que la resistencia acontece en ausencia de las mismas. La existencia de un umbral crítico en relación al número de *Candida* presentes en vagina, necesarias para inducir las señales de peligro, sería diferente según el grupo de mujeres. En pacientes con CVVR, las CE son altamente intolerantes a *Candida* y aún en presencia de una baja carga fúngica, se desencadena una potente respuesta inflamatoria. Por su parte, mujeres con un historial infrecuente de CVV poseen un umbral más alto y sólo ante la existencia de factores que provocan fallas en el equilibrio local y favorecen el sobrecrecimiento del hongo presentan manifestaciones clínicas^{8, 41, 189}.

Nuestros resultados en su conjunto demuestran que la respuesta inmune frente a *Candida* es diferente entre pacientes con episodios esporádicos de CVV con respecto a pacientes con la forma recurrente. En mujeres con CVVA la presencia de la patología estuvo asociada a una mayor frecuencia de factores predisponentes, fundamentalmente asociados a la pérdida del equilibrio con la microbiota residente. En estas pacientes la presencia del hongo no produjo cambios significativos en los niveles intravaginales de citoquinas inflamatorias claves como IL-6 e IL-1 β , ni en las citoquinas del eje IL-23/IL-17/IL-22; sin embargo, la transcripción de hBD1 estuvo aumentada y su expresión permaneció constante, evidenciando el rol crítico de este PAM en la vigilancia y respuesta a la infección en este tracto.

Por su parte, en las mujeres con CVVR aún en ausencia de factores predisponentes, la presencia de una baja carga fúngica promueve una exacerbación de la respuesta de la CE y la generación de un microambiente inflamatorio caracterizado por elevados niveles de

mediadores inmunes como IL-6 e IL-1 β , que reclutan a otras poblaciones celulares amplificando la respuesta inflamatoria y perpetuando este circuito. En el tracto vaginal, PAMs de la familia de las BD, tanto constitutivos (hBD1) como inducibles (hBD3), con funciones claves en la inmunovigilancia y control se encuentran disminuidos en pacientes con CVVR, contribuyendo de esta manera a la persistencia del hongo. A pesar de que los niveles de IL-1 β en tracto genital femenino están aumentados, y que esta citoquina es capaz de promover producción de hBD1 en CE, la expresión de este péptido se encuentra disminuida en pacientes con CVVR. Factores de virulencia liberados por *Candida*, como las enzimas hidrolíticas Sap y Lip vinculados a la patogenia de la CVVR, estarían participando de este fenómeno. La ausencia o disminución de mediadores claves asociados al perfil Th17 y a la protección frente al hongo convergen en un escenario donde *C. albicans* encuentra las condiciones adecuadas para sobrevivir y perpetuarse.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Las cepas de animales utilizadas en este trabajo fueron:

- Ratones C57BL/6 adquiridos de la Facultad de Ciencias Veterinaria, Universidad Nacional de La Plata.
- Ratones deficientes en el receptor TLR2, *Tlr2*^{-/-} (B6.129-*Tlr2*^{tm1Kir}/J) y ratones deficientes en la molécula adaptadora MyD88, *MyD88*^{-/-} (B6.129P2(SJL)-*Myd88*^{tm1.defr}/J), Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, EEUU).
- Ratones deficientes en el receptor Dectin-1, *CLEC7A*^{-/-} (B6.129S6-*Clec7*^{atm1Gdb}/J) donados gentilmente por el Dr. Gordon Brown (Universidad de Averdeen, Escocia) ¹⁷⁵.

Todos los animales se endocriaron en el Bioterio del Departamento de Bioquímica Clínica - CIBICI-CONICET, de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, bajo condiciones libres de patógenos específicos y de acuerdo con los requisitos del Comité de Ética Institucional. Los animales se mantuvieron con agua y alimento *ad-libitum*, con ciclos de 12 horas luz/oscuridad a 20°C bajo humedad controlada; en concordancia con las recomendaciones de la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio publicado por el Concejo Canadiense de Cuidado Animal (OLAW número de certificación A5802-01).

Cepas de *Candida*

En el presente estudio se utilizaron cepas de *C. albicans* de diferente procedencia:

- Cepas de colección provenientes de la ATCC (*American Type Culture Collection*) (Rockville, MD, USA), *C. albicans* ATCC 36801 y *C. albicans* SC5314 (ATCC MYA-2876).
- Cepas de *C. albicans* defectivas en el *hot-spot 1* del gen *FKS1*: *C. albicans* *FKS1/fks1* S645S/P (heterocigota) y *C. albicans* *fks1/fks1* S645P (homocigota), clonales con *C. albicans* SC5314; y una cepa clínica, aislada de un hemocultivo, con una mutación en el *hot-spot 2* del mismo gen: *C. albicans* *FKS1/fks1* R1361R/H (heterocigota). Las cepas defectivas fueron gentilmente cedidas por el Dr. Guillermo García-Effron (Universidad Nacional del Litoral, Argentina) ³⁷.
- Cepas de *C. albicans* de origen clínico aisladas de pacientes con CVVA y CVVR obtenidos de hisopados de fondo de saco vaginal e identificadas por MALDI-TOF (desorción/ionización láser asistida por matriz-Tiempo de vuelo, del inglés: *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-Of-Flight*) (BioMerieux, Francia).

Condiciones de crecimiento de *Candida*

Antes de cada experimento, las cepas de *Candida* se cultivaron 48 horas en agar Sabouraud glucosado (Britania, Argentina) a temperatura ambiente (TA), tiempo que corresponde a la fase de crecimiento exponencial del hongo. Se resuspendieron a una concentración variable según el experimento, mediante recuento en cámara de Neubauer. La viabilidad de la suspensión fue verificada mediante siembra de 100 μ L de la misma en placas de agar Sabouraud glucosado y posterior recuento de UFC ¹⁶³.

Modelo murino de Candidiasis Vulvovaginal

Infección vaginal

C. albicans no es un patógeno habitual del tracto reproductor femenino murino. Para establecer la infección vaginal es necesario que los ratones se encuentren en la fase estro de su ciclo que, que se logra con la administración exógena de estradiol.

Para llevar a cabo el modelo murino de CVV, ratones hembras de 8-10 semanas de edad se inyectaron de manera subcutánea con 0,2 mg de valerato de β -estradiol (Sigma) disuelto en 100 μ l de aceite de sésamo (Sigma) los días -5 y -2 previos a la infección vaginal del día 0. Los días 2 y 4 pi recibieron otra dosis de inyecciones de estradiol para la mantención de la fase pseudoestro del ciclo.

Al día 0 del protocolo los animales se inocularon intravaginalmente con 20 μ l de una suspensión de $2,5 \cdot 10^8$ levaduras viables de *C. albicans*/mL en Buffer Fosfato Salino (PBS), de distintas cepas según el experimento. A lo largo del manuscrito este grupo de ratones es denominado Infectados. Se incluyeron además otros dos grupos de animales: ratones estrogenizados que recibieron todas las inyecciones del esquema de estradiol (días -5, -2, 2 y 4) y al día 0 del protocolo se inocularon sólo con 20 μ l de PBS, denominados grupo Estrogenizado y ratones normales que no recibieron el tratamiento con estradiol y no fueron infectados denominados grupo No Estrogenizado. El protocolo utilizado corresponde al descrito por Yano y col. ⁹⁵ con modificaciones.

Lavados vaginales

Para monitorear el curso de la infección y llevar a cabo diferentes determinaciones se realizaron lavados vaginales a animales de los grupos no estrogenizado, estrogenizado e infectado inoculando 70 μ l de PBS estéril en la cavidad vaginal con pipeta y tip, realizando 10 aspiraciones sucesivas^{44, 47, 95}. Este procedimiento se repitió cuatro veces en cada ratón. Una fracción de lavado vaginal se usó para determinar la carga fúngica intravaginal mediante el recuento de UFC y para la realización de citoextendidos. Otra alícuota se centrifugó a 2000 rpm con el fin de separar las células del sobrenadante. El sobrenadante se guardó a -80°C hasta su posterior uso para la determinación de citoquinas. Las células se preservaron en Suero Fetal Bovino (SFB, Natocor) /Dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma) 10% para su posterior tinción para citometría de flujo.

Unidades Formadoras de Colonias en lavado vaginal

La carga fúngica intravaginal de cada ratón se determinó cultivando 100 μ l de lavado vaginal (dilución 1/10) en placas con agar Sabouraud glucosado. Las UFC se contaron luego de 48 horas de incubación a TA y se expresaron como UFC/mL de lavado vaginal¹⁹⁶.

Citoextendidos

Células provenientes de lavado vaginal de ratones se contaron en cámara de Neubauer y se resuspendieron a una concentración de $5 \cdot 10^5$ células/mL. Un volumen de 100 μ l de esa suspensión se centrifugó en una citocentrífuga (Shandon Elliott) durante 5 minutos a 2000 rpm para obtener los citoextendidos sobre portaobjetos comunes (B&C, Alemania) o silanizados (Knittel Glass, Alemania) según el experimento⁷⁹.

Tinción de May-Grünwald Giemsa

Los citoextendidos de lavados vaginales se cubrieron completamente con el colorante May-Grünwald (Merck) durante 2 minutos. Luego se agregó la misma cantidad de agua que de May-Grünwald sobre el extendido durante 2 minutos. El colorante se lavó con abundante agua y los vidrios se cubrieron con una dilución 1/10 de Giemsa (Merck), durante 15 minutos, luego de los cuales los portaobjetos se lavaron con agua y se dejaron secar. Los

preparados se observaron en un microscopio Nikon Eclipse TE 2000 U equipado con una video cámara digital para la toma de fotografías.

Análisis histológico

Para los estudios histológicos, las vaginas de animales de los grupos no estrogenizado, estrogenizado e infectados se removieron a los diferentes días de estudio e inmediatamente se fijaron en formol 10% (Biopack, Argentina) por 24 horas. Luego se deshidrataron, embebieron en parafina y cortaron en secciones de 5 μm de espesor). Los cortes histológicos se tiñeron con hematoxilina-eosina (HE) o con la técnica de PAS (ácido periódico-reactivo de Schiff)⁴⁷. Los cortes se examinaron mediante microscopía óptica a diferentes aumentos. Las fotografías fueron tomadas con un microscopio Nikon Eclipse TE 2000 U equipado con una video cámara digital para la toma de fotografías.

Inmunohistoquímica

Las secciones histológicas 5 μm de vagina de los distintos grupos fueron desparafinadas y posteriormente sometidas a un protocolo de recuperación antigénica mediante la incubación con buffer citrato (10 mM, pH 6) y tratadas con microondas de 800W durante 30 segundos y 15 segundos a 160 W. Luego se procedió al bloqueo de la peroxidasa endógena con H_2O_2 3% en metanol durante 15 minutos, y las uniones inespecíficas con PBS-Albúmina Sérica Bovina 1% durante 30 minutos. Posteriormente los cortes fueron lavados con PBS, e incubados toda la noche a 4°C con un anticuerpo hecho en conejo anti BD 1 de ratón (Santa Cruz Biotechnology) a una dilución 1/50 y luego con un anticuerpo secundario anti conejo conjugado a biotina (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) a una dilución 1/130 en PBS-Albúmina Sérica Bovina 1% durante 30 minutos. Los cortes fueron incubados con el complejo ABC (VECTASTAIN Vector Labs, Southfield, MI, USA) por 30 minutos, posteriormente con Diaminobenzidina (DAB) (Sigma) utilizado como cromógeno y contrateñidos con HE¹⁹⁷. Los preparados se deshidrataron y montaron con medio de montaje DPX (Sigma). Los cortes de vagina se evaluaron por observación microscópica en un microscopio Nikon Eclipse TE 2000 U equipado con una video cámara digital para la toma de fotografías.

Cuantificación de citoquinas

Modelo animal: Lavado vaginal

Las concentraciones de IL-6, IL-1 β , TNF- α , TGF- β , IL-17, IL-22 e IL-23 en lavados vaginales de ratón se determinaron por el método de ELISA utilizando kits comerciales y siguiendo los protocolos brindados por el fabricante (R&D Systems, EEUU). El protocolo utilizado se describe brevemente a continuación. En primer lugar, se sensibilizaron placas de 96 pocillos con el anticuerpo de captura específico para cada citoquina diluido convenientemente en PBS; las placas se incubaron durante toda la noche a una temperatura de 4^o C. En todos los casos, luego de lavar 3 veces con buffer de lavado (PBS- Tween-20 0,05%), las placas se incubaron con buffer de bloqueo (PBS-SFB 10%) durante 1 hora en cámara húmeda a TA. Luego, las muestras y los estándares, se incubaron por duplicado toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Después de la incubación, las placas se lavaron 3 veces y se agregó el anticuerpo secundario biotinilado que se incubó durante 1 hora a TA. Posteriormente, se lavó el exceso de anticuerpo y se incubó con estreptavidina-HRP (*Horseradish Peroxidase*) durante 20 minutos. Finalmente, se realizaron 5 lavados con buffer de lavado y la reacción final se reveló agregando H₂O₂ como sustrato y TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidina) como cromógeno (BD OptEIA™, EEUU). La reacción se detuvo por al agregado de H₂SO₄ 2 N. La absorbancia fue medida usando un lector de placas (BIO-RAD, EEUU); las concentraciones de las muestras se obtuvieron a partir de la extrapolación de las absorbancias sobre las curvas construida con los estándares. Los datos se expresaron como picogramos por mililitro de lavado vaginal ¹⁶³.

Pacientes: Lavado cervicovaginal y suero

Las concentraciones de IL-6, IL-1 β , TNF- α , TGF- β , IL-17, IL-22 e IL-23 de lavados cervicovaginales o suero de pacientes se determinaron por el método de ELISA utilizando kits comerciales para citoquinas humanas (R&D Systems, EEUU) y siguiendo el protocolo descrito previamente.

Concentración de muestras de pacientes

Con el objetivo de concentrar las citoquinas presentes en las muestras de lavado cervicovaginal de pacientes para su posterior cuantificación por la técnica de ELISA, se

usaron concentradores Vivaspin 6 (GE Healthcare) de 5 kDa de corte de peso molecular. Las muestras se centrifugaron durante 30 minutos a 4000 rpm y se procedió inmediatamente a sembrar en las placas de 96 pocillos previamente sensibilizadas con los anticuerpos de captura y buffer bloqueante para la técnica de ELISA.

Inmunofluorescencia

Los citoextendidos realizados con lavados cervicovaginales de mujeres de los distintos grupos en estudio se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 40 minutos a TA. Posteriormente se lavaron con PBS, se bloquearon con Albúmina Sérica Bovina 10% (Sigma)-Tritón 0,3% en PBS durante 1 hora a TA y se incubaron con un anticuerpo de IgG de conejo anti BD 1 humana (Santa Cruz Biotechnology) o anti BD 3 humana a una dilución 1/50 durante toda la noche y a una temperatura de 4°C. Luego, las muestras se lavaron 3 veces con PBS y posteriormente se incubaron con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo marcado con el fluorocromo AlexaFluor 647 (BD Bioscience) a una dilución 1/1000, durante 30 minutos a TA. Por último, los preparados se lavaron y los núcleos celulares se tiñeron con DAPI (49-6-Diamino-2-fenylindol) 300 ng/ml (Sigma). Para montar los portaobjetos se usó FluorSave™ Reagent (Merck Millipore)^{80, 196}. Las fotografías fueron tomadas con un microscopio invertido LEICA DMI8. El aumento para la observación y toma de fotografías fue de 630x.

La semicuantificación de la expresión de hBD1 y hBD3 se realizaron con el Software ImageJ. Para la misma se usó la siguiente fórmula:

Fluorescencia total corregida = Densidad Integrada - (Área de la célula epitelial x fluorescencia media de lecturas del fondo)

La fluorescencia media de lecturas del fondo se calcula como un promedio de tres áreas de la imagen consideradas como negativas. De cada citoextendido se realizaron 4 mediciones que fueron promediadas.

Citometría de flujo

Células de lavado vaginal de ratón

Debido a que la cantidad de células obtenidas mediante lavado vaginal por ratón no son suficientes, para llevar a cabo la tinción para citometría de flujo, se realizaron pools de

células de 3-4 animales por grupo. Para determinar las células productoras de BD 1 y la cantidad de PMN presentes en el lavado vaginal, de los distintos grupos de ratones, controles, estrogenizados e infectados y a diferentes tiempos del protocolo experimental se resuspendieron en PBS-SFB 2% y luego se incubaron con un anticuerpo IgG de cabra anti Gr-1 de ratón conjugado a PE (Phicoeritrina) (BD Bioscience) diluido 1/1000, durante 30 minutos y a una temperatura de 4°C. Las células luego se fijaron y permeabilizaron con BD Cytotfix/Cytoperm y Perm/Wash (BD Biosciences) siguiendo el protocolo provisto por el fabricante. Posteriormente se realizó la marcación intracelular utilizando el anticuerpo IgG de conejo anti BD 1 de ratón (Santa Cruz Biotechnology) diluido 1/50, durante 1 hora a TA. Las células luego se lavaron e incubaron con el anticuerpo secundario anti IgG de conejo conjugado a AlexaFluor 647 (BD Bioscience) diluido 1/1000, por 30 minutos a una temperatura de 4°C, se lavaron y posteriormente se resuspendieron en PBS-SFB 2% y se adquirieron en un citómetro de flujo FACSCanto II (BD Bioscience). El análisis de los datos se realizó utilizando el programa FlowJo (Tree Star, Inc.)¹⁹⁶.

Células Epiteliales humanas en cultivo

Las células epiteliales de la línea HeLa provenientes de cocultivos con *C. albicans* o expuestas diferentes estímulos se lavaron con solución fisiológica (Roux-Ocefa, Argentina) y se recolectaron con PBS frío. Posteriormente las células epiteliales se fijaron como fuera indicado, se permeabilizaron y se marcaron para el estudio de BD 1, con el mismo protocolo definido previamente.

Biología Molecular

Extracción de ARN

Ratones de todos los grupos experimentales y de diferentes *backgrounds* genéticos se sacrificaron al día 2 pi y se les extrajo las vaginas. Las mismas se procesaron de manera mecánica con un homogeneizador UltraTurrax (IKA, Alemania) en hielo, durante 1 minuto aproximadamente. La extracción de ARN se realizó con el kit GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma) según indicaciones del fabricante.

El ARN de células provenientes de muestras de lavado cervicovaginal de pacientes o células HeLa se extrajo con TRIzol (Thermo Fisher Scientific) en una proporción de 1 mL cada

1-2.10⁶ células. Para extraer el ARN, las muestras tratadas con TRIZol se separaron utilizando 0,1 mL de cloroformo (Taurus, Argentina) por cada 0,5 mL de TRIZol, de esta manera se obtuvieron dos fases, quedando el ARN en la fase acuosa. La misma se extrajo y se precipitó con 0,25 mL de alcohol isopropílico (Sintorgan, Argentina). Finalmente, el ARN se lavó con etanol (Dorwil, Argentina) 75% en agua y luego se resuspendió en agua destilada libre de ARNasa y ADNasa (Invitrogen). La concentración de ARN se determinó por espectrofotometría, midiéndose la absorbancia de la muestra a 260 nm (BioTek, EEUU). Las muestras se mantuvieron a -80 °C hasta su utilización⁸⁰.

Tratamiento con ADNasa y Retrotranscripción

Antes de obtener el ADNc se realizó un tratamiento con ADNasa para evitar la contaminación de la muestra de ARN con ADN. Para esto se utilizó un kit de ADNasa Invitrogen (Invitrogen). Se tomaron 2 µg de ARN y se trataron con 2 U de ADNasa durante 15 minutos a TA, y luego 10 minutos a 65°C.

En todos los casos el ADNc fue sintetizado a partir de 2 µg de ARN en un volumen final de 25 µL. Para llevar a cabo cada reacción se utilizaron 0,25 µL de oligo(dT) (Biodynamics), 0,63 µL de inhibidores de ARNasas (Promega), 0,5 µL de dNTPs (Invitrogen) y 1 µL de la transcriptasa reversa Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) (Promega). La retrotranscripción se llevó a cabo en un termociclador MPI//02 y fue la siguiente: 5 minutos a 65°C, 1 hora a 42°C y 10 minutos a 70 °C. Las muestras de ADNc se almacenaron a -20°C⁸⁰.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en Tiempo Real

El ADNc obtenido a partir de tejidos y células se amplificó usando los siguientes *primers* específicos de humano:

BD1 Fw 5' ATGGCCTCAGGTGGTAACTTTC, Rev 5' TCGGGCAGGCAGAATAGAGA;

BD2 Fw 5' CCTGGAACAAAATGCTGCAA, Rev 5' ACATGTCGCACGTCTCTGATG;

BD3 Fw 5'GTGAAGCCTAGCAGCTATGAGGAT, Rev 5' TGATTCCTCCATGACCTGGAA; y

β-Actina 5' CTGGAACGGTGAAGGTGACA, Rev 5'TGCGTTGTTACAGGAAGTCCCTT, como gen de referencia.

Para las determinaciones realizadas en ratones se utilizaron:

BD1 Fw 5' AGGTGTTGGCATTCTCACAAG, Rev 5' GCTTATCTGGTTTACAGGTTCCC;

BD3 Fw 5' GTCAGATTGGCAGTTGTGGA, Rev 5' GCTAGGGAGCACTTGTTTGC, y

Rplp0 Fw 5' GGGCATCACCACGAAAATCTC, Rev 5' CTGCCGTTGTCAAACACCT como gen de referencia.

Las reacciones se realizaron en un termociclador StepOne™ System (Life Technologies). Se incubó 1 µg de ADNc con 0,5 µL de *primer* sentido 1 µM, 0,5 µL de *primer* anti-sentido 1 µM, 7,5 µL de SYBR® Select Master Mix (Life Technologies) y agua destilada libre de ADNasa y ARNasa para llevar a 15 µL de volumen final por pocillo de placa de 96 (Applied biosystems). El programa de PCR utilizado fue: 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 60 °C, 30 segundos a 72°C, 40 ciclos. Para la obtención de la curva de disociación las condiciones fueron: 60 segundos a 95°C, 60 segundos a 65°C. Los resultados se analizaron con el software StepOne 2.2.2 (Applied biosystems).

Análisis para la cuantificación relativa de genes

La amplificación de genes por PCR en tiempo real permite realizar la cuantificación de un determinado gen de interés. En este caso, se recurrió a la cuantificación relativa, utilizando un gen de referencia que presente una expresión constitutiva. El método aplicado para la cuantificación relativa de un gen de interés fue el de $\Delta\Delta CT$ ¹⁹⁸. En el mismo, se establece un parámetro denominado CT, que se define como el número de ciclo de la reacción de PCR en el cual la señal de fluorescencia supera un umbral arbitrario, determinado en la zona de fase exponencial de la reacción de amplificación. Para cada gen evaluado, los valores de CT se normalizan con los valores de CT correspondientes al gen de referencia, utilizando la siguiente fórmula: $\Delta CT = CT (\text{gen de interés}) - CT (\text{gen de referencia})$. Luego, se obtiene la expresión relativa del gen de interés en una muestra determinada expresando el ΔCT como $2^{-\Delta CT}$. El método también se aplica para determinar la expresión relativa de un gen en dos condiciones o muestras diferentes: $\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{condición A}) - \Delta CT (\text{condición B})$. De la misma manera, la expresión relativa del gen de interés se expresa como $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Pacientes

Las pacientes incluidas en este estudio corresponden a mujeres concurrentes al servicio de Ginecología y Obstetricia y al servicio de Infectología del Hospital Privado y del Sanatorio Allende en la ciudad de Córdoba. El estudio contó con la aprobación del Registro Provincial de Investigación en Salud para cada centro hospitalario involucrado, Repis HP 4-

168 para el hospital Privado. Se obtuvo el consentimiento informado de todas las pacientes que formaron parte de este estudio.

La selección e inclusión de las pacientes fue realizada por los Dr. Juan Pablo Caeiro médico infectólogo en el hospital Privado de Córdoba y la Dra. Lara Vargas especialista en Tocoginecología en el Sanatorio Allende.

Criterios de Inclusión: a) Mujeres con al menos 18 años, b) Mujeres con CVVA, c) Mujeres con CVVR y d) Mujeres sanas sin historia de vulvovaginitis por *Candida* que concurren al servicio de Ginecología para controles rutinarios.

Se consideró vulvovaginitis por hongos (CVVA) cuando las pacientes presentaron signos y síntomas positivos de vaginitis como prurito y secreción vaginal y el hisopado vaginal positivo para *Candida*. La vulvovaginitis recurrente (CVVR) fue diagnosticada con una historia clínica de por lo menos 4 episodios en el curso de un año⁹.

Criterios de exclusión: a) Mujeres embarazadas o en período de lactancia, b) Mujeres diabéticas, c) Pacientes con infección por VIH, d) Pacientes con inmunodeficiencias primarias, d) Pacientes con infecciones vaginales de origen bacteriano, infecciones mixtas y tricomoniasis.

Se consideraron como factores predisponentes para CVV: toma de anticonceptivos orales, tratamientos prolongados o recientes con antibióticos de amplio espectro y factores mixtos a la combinación de uso de anticonceptivos y antibióticos. En este estudio se trabajó con total de 95 pacientes, categorizadas de acuerdo a las características clínicas en los siguientes grupos:

Grupo Control: 26 mujeres sanas.

Grupo CVVA: 20 mujeres con criterio de infección para CVVA.

Grupo CVVR: 59 mujeres con criterio de infección para CVVR.

La información sobre tratamiento y eficacia del mismo fue proporcionada por el Dr. Caeiro y se obtuvieron de las historias clínicas de las pacientes. Para su procesamiento y almacenamiento, las muestras fueron anonimizadas mediante el uso de un código específico.

Toma de muestras

Las muestras de pacientes para la identificación del microorganismo responsable de la infección se obtuvieron por hisopado de fondo de saco vaginal previa colocación de espéculo.

Las muestras de células epiteliales del tracto genital femenino se obtuvieron por lavado cervicovaginal de acuerdo al protocolo estandarizado por Fidel y col.⁸⁹ y luego de la obtención del material para el estudio micológico¹⁹⁹. Para ello 3 mL de solución fisiológica estéril se instilaron en la vagina, luego de transcuridos 30-40 segundos la muestra se recolectó mediante aspiración con jeringa. Las muestras individuales obtenidas se centrifugaron a 2000 rpm; luego se procedió a separar los sobrenadantes, los que se conservaron a -80°C hasta su uso y las células se preservaron en TRIzol (Termo Fischer).

De los grupos control y CVVR también se obtuvo sangre por venopunción a fin de conservar suero en el cual se determinó la concentración de citoquinas.

Estudios inmunológicos realizados en muestras de pacientes

En el sobrenadante del lavado cervicovaginal de los distintos grupos de mujeres incluidas en este estudio se procedió a la determinación de las citoquinas IL-6, IL-1 β , TNF- α , TGF- β , IL-17, IL-22 e IL-23. Las células recuperadas del lavado cervicovaginal se utilizaron para extracción de ARN con el fin de evaluar la expresión de los transcritos de BD1, 2 y 3 por qPCR o para la realización de citoextendidos y posterior tinción con MGG o estudios de inmunofluorescencia con el fin de evaluar la expresión de BD1 y BD3 como fue descrito anteriormente.

Estudios realizados en aislado clínicos de pacientes

Identificación de las levaduras

Posterior a la obtención de las muestras de las pacientes las levaduras se cultivaron en agar Sabouraud glucosado por 48 horas a TA.

La identificación del agente etiológico causante de la infección se realizó mediante MALDI-TOF (BioMerieux).

Estudio de factores de virulencia

Capacidad formadora de Biofilm

Antes de cada experimento, las cepas en estudio se cultivaron 48 horas en agar Sabouraud glucosado a TA y se resuspendieron en una concentración de $3,5 \cdot 10^7$ levaduras/mL por recuento en cámara de Neubauer. El biofilm de cada cepa se desarrolló en placas de 96 pocillos (Costar), previamente tratadas con 50 μ L/pocillo de SFB durante 30 minutos a 37°C. Los pocillos se lavaron una vez con PBS y luego se agregó 100 μ L de suspensión de *Candida* estandarizada. Las placas se incubaron 90 minutos a 37°C a fin de permitir el desarrollo de la fase de adherencia y luego se realizaron dos lavados con PBS. Finalmente, se agregaron 200 μ L de caldo Sabouraud glucosado a cada pocillo y se incubó la placa durante 48 horas a 37°C. La evaluación del biofilm formado se reveló mediante el ensayo de reducción de XTT (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide) (Sigma) agregando a cada pocillo 100 μ L de una solución compuesta de XTT 0,5 g/L y 10 μ L de Menadiona 5,8 mM en acetona^{145, 146}. Las placas, protegidas de la luz, se incubaron a 37°C durante 5 horas. La cantidad de XTT reducido a formazán se determinó espectrofotométricamente en lector de placas a 490 nm (Bio-Rad). En base a nuestros resultados se estableció la siguiente escala: Pobre Formadora de Biofilm (PFB): Abs<0,310, Buena Formadora de Biofilm (BFB): 0,310<Abs<0,570 y Alta Formadora de Biofilm (AFB): 0,570<Abs.

Estudio de la actividad lipolítica

Para identificar y semicuantificar la actividad lipolítica se empleó el ensayo de Rodamina-B en placa¹⁴⁸. Para la inducción, se suspendieron $1 \cdot 10^8$ levaduras de *Candida* con 48 horas de crecimiento en 2 mL de caldo Sabouraud glucosado, 0,2 ml SFB al 10% y 0,05 mL de Tween 80 al 2,5% (Biopack, Argentina) y se incubaron por 72 horas a 37°C.

Se sembraron 150 μ L de cada suspensión en pocillos por triplicado en medio de cultivo con rodamina B (agar al 1,5%, aceite de oliva al 1%, caldo Sabouraud glucosado al 0,35% y Rodamina B al 0,001 %, Rhodamina B, LTD, England) y se incubaron a 37°C. A las 72-96 horas se leyeron los diámetros de fluorescencia naranja de los halos de difusión de la lipasa por exposición a irradiación UV empleando un transiluminador (BioDoc-IT Systems, UV). El diámetro del pocillo fue determinado para calcular el Pz LIP (Pz LIP= diámetro de fluorescencia/diámetro del pocillo). Para la semicuantificación de la actividad lipolítica se

realizó una curva de calibración, empleando como control lipasa de *C. antarctica* (Fluka, Suiza), estableciéndose la relación de linealidad existente entre el logaritmo del diámetro del halo fluorescente y la actividad lipolítica. Todos los valores de Pz mayores a 1,0 fueron considerados como actividad enzimática positiva. Como control negativo se empleó 150 µL de caldo Sabouraud glucosado sin el agregado de células.

Estudio de la actividad de Sap

Para semicuantificar la actividad proteolítica de las cepas aisladas, se empleó el método de agar suplementado con Albúmina Sérica Bovina: agar Sabouraud glucosado adicionado con Albúmina Sérica Bobina 1%. Se inocularon 100 µL de suspensión de 1.10^7 *Candida*/mL en agua estéril por triplicado en pocillos realizados en el medio sólido. Las placas fueron incubadas a 37°C por 72-96 horas. La actividad enzimática fue observada a través de la formación de un halo de proteólisis alrededor de la colonia y calculada como el cociente entre el diámetro del halo y el diámetro de la colonia (Pz PROT) ¹⁴⁷.

Ensayo de hidrofobicidad de la superficie celular (HSC)

La HSC de las diferentes cepas en estudio se determinó utilizando el método bifásico agua-hidrocarburo MATH (test de adhesión microbiana a hidrocarburos). El procedimiento consistió en enfrentar 3 mL de las suspensiones de los aislados de *Candida* en PBS, con 1 mL de xileno (Cicarelli, Argentina). La mezcla se agitó durante 1 minuto y se dejó reposar 10 minutos para la separación de las fases. Se midieron las absorbancias de las fases acuosas a 520 nm antes y después la mezcla con xilol.

La HSC se calculó como el porcentaje de reducción de la absorbancia de la fase acuosa leída a 520 nm, antes y después de enfrentar la suspensión de *Candida* a la fase orgánica, lo que expresa la reducción de células en la fase acuosa inicial, al quedar las células hidrofóbicas retenidas en el xileno. Los cálculos se realizaron a través de la siguiente fórmula:

$$\text{HSC} = [1 - (\text{Abs}520 \text{ nm}_{\text{final}} / \text{Abs}520 \text{ nm}_{\text{inicial}})] \times 100^{144}.$$

Estudios *in vitro*

Se trabajó con la línea celular humana HeLa (ATCC CCL-2) derivada de carcinoma cervicovaginal, ampliamente aceptada como modelo mimético humano *in vitro* de CVV para el estudio de las interacciones *C. albicans*-epitelio^{12,47}.

Cultivo de células epiteliales con estímulos

Las células HeLa se cultivaron a 37°C con 5% de CO₂, en DMEM (Gibco-BRL), suplementado con 10% de SFB inactivado, 1% de L-glutamina (Gibco) 1% de Pen Step (Gibco). Las células epiteliales se incubaron en placas de 24 pocillos (Costar) (2,5.10⁵ células por pocillo) o en placas de 6 pocillos (Costar) (1.10⁶ células por pocillo) con suspensiones de levaduras a diferentes relaciones hongo:célula (0,5:1, 1:1, 5:1, 10:1 y 20:1) y con estímulos tales como: Lipopolisacárido (LPS) (agonista TLR4) (Sigma) 1 µg/mL o 10 µg/mL, Pam3CSK4 100 ng/mL (agonista TLR1/2) (Invivogen), Zymosan 20 µg/mL (Agonista TLR2 y Dectin-1) (Sigma). En algunos experimentos las CE se estimularon con *Candida* inactivadas por calor (*Heat killed Candida*, HKC) en una relación hongo:célula 1:1 o con IL-1β 10 ng/mL (R&D Systems). Las células se incubaron durante 2, 4 o 24 horas según el experimento.

En los estudios desarrollados para evaluar la regulación en la producción de hBD1 se utilizó un sistema de transwell (Costar) en placas de 24 pocillos. Se utilizaron además inhibidores de la actividad lipolítica como Ácido Acetil Salicílico a una concentración de 625 µM (Sigma), y Pepstatina A 1 µg/mL (Sigma) como inhibidor de la actividad de Sap. Las células se incubaron 4 horas.

Determinación de la viabilidad celular y crecimiento fúngico

Para evaluar la viabilidad celular se determinó la reducción metabólica del MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazán), permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células, siendo la cantidad de células vivas proporcional a la cantidad de formazán producido.

Para llevarlo a cabo 1.10⁵ células HeLa por pocillo se incubaron en placas de 24 pocillos con diferentes relaciones célula: *Candida* y luego de 2, 4 o 24 horas se agregaron 100 µL de una solución 5 mg/mL de MTT (Sigma) y se incubó 4 horas a 37°C. Transcurrido

este tiempo se descartó el sobrenadante, se agregaron 200 μL de DMSO y la placa se colocó en un agitador durante 5 minutos. Posteriormente se evaluó la absorbancia a 600 nm en un lector de placas (Bio-Rad). Los resultados se informaron como absorbancia ⁴⁷.

Determinación de daño celular

Con el fin de determinar el daño celular inducido en células HeLa por la presencia de *Candida* se midió la liberación de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH) en sobrenadante de cultivo, con el kit comercial LDH-P UV (Wiener, Argentina).

El fundamento del método consiste en medir la actividad enzimática de la LDH, presente en la muestra, para catalizar la conversión de piruvato en L-lactato, reacción en la cual se produce la oxidación de NADH a NAD⁺. La coenzima NADH absorbe a 340 nm, por lo tanto mientras ocurre su oxidación, la absorción a esa longitud de onda va disminuyendo, lo cual es proporcional a la actividad de LDH presente.

Para llevar a cabo este método se incubaron $2,5 \cdot 10^5$ células HeLa en placas de 24 pocillos con diferentes relaciones célula:*Candida* y luego de 2, 4 o 24 horas se recolectaron los sobrenadantes. Inmediatamente se agregaron 20 μL de muestra a 1 mL del reactivo provisto en el kit. Luego se evaluó la absorbancia a 340 nm a los 30 segundos, 1:30, 2:30 y 3:30 minutos en un espectrofotómetro UV-1601PC (Shimadzu, Japón). La actividad de LDH se calculó con la siguiente fórmula: LDH (U/l) = $\Delta A/\text{min} \times \text{factor}$.

Para determinar el porcentaje de lisis se incubaron la misma cantidad de células HeLa con agua para provocar la lisis osmótica de las mismas. El valor de LDH obtenido en esta condición fue considerado el 100% de lisis.

Producción Especies Reactivas de Oxígeno (ERO)

Para evaluar la producción de ERO, $1 \cdot 10^5$ células HeLa por pocillo se incubaron en placas de 24 pocillos con diferentes relaciones célula: *Candida* y luego de 2, 4 o 24 horas se determinó la producción intracelular de ERO a través de la reducción de nitroazul de tetrazolio (NBT) (Sigma). Se agregó 0,1 mL de NBT 1 mg/mL por pocillo y se incubó 30 minutos a 37°C. La reacción se detuvo con 0,1 mL de HCl 0,1 M, las muestras se centrifugaron y el pellet se trató con 0,4 mL de DMSO. La absorbancia fue medida a 540 nm en un lector de placas (Bio-Rad) ²⁹. Los resultados se expresaron como aumento respecto a la producción basal de células en cultivo en ausencia de estímulo.

La producción de ERO también fue determinada por ensayos de quimioluminiscencia. Luego de las mismas condiciones de incubación, a cada condición de agregó 0,1 mL de luminol 3,36 μ M en DMEM. La emisión de luz se produce por la oxidación de luminol en presencia de las ERO y fue medida en un luminómetro (BioOrbit modelo 1253). El resultado fue expresado como Unidades Relativas de Luz³⁰.

Análisis Estadístico

Los experimentos fueron realizados por triplicado a menos que se especifique lo contrario. Los datos fueron expresados como la media \pm Error Estándar de la Media (ESM). Las diferencias entre los grupos fueron evaluadas usando: T-Test, ANOVA de una o dos vías, según el experimento, seguido por el post test de múltiples comparaciones de Dunnett o de Bonferroni usando el software Prism (GraphPad, San Diego, CA). Valores de * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$ se consideraron estadísticamente significativos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cassone A. Vulvovaginal *Candida albicans* infections: pathogenesis, immunity and vaccine prospects. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 2015; 122(6): 785-94.
2. Sobel JD. Recurrent vulvovaginal candidiasis. *American journal of obstetrics and gynecology* 2016; 214(1): 15-21.
3. Goncalves B, Ferreira C, Alves CT, Henriques M, Azeredo J, Silva S. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiology, microbiology and risk factors. *Critical reviews in microbiology* 2016; 42(6): 905-27.
4. Achkar JM, Fries BC. *Candida* Infections of the Genitourinary Tract. *Clinical microbiology reviews* 2010; 23(2): 253-73.
5. Miro MS, Rodriguez E, Vigezzi C, et al. [Vulvovaginal candidiasis: An old disease with new challenges]. *Revista iberoamericana de micologia* 2017; 34(2): 65-71.
6. Sobel JD. Recurrent vulvovaginal candidiasis. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 2015; 214(1): 15-21.
7. Foxman B, Muraglia R, Dietz JP, Sobel JD, Wagner J. Prevalence of recurrent vulvovaginal candidiasis in 5 European countries and the United States: results from an internet panel survey. *J Low Genit Tract Dis* 2013; 17(3): 340-5.
8. Fidel PL. History and Update on Host Defense Against Vaginal Candidiasis. *American Journal of Reproductive Immunology* 2007; 57(1): 2-12.
9. Sobel JD. Vulvovaginal candidosis. *Lancet (London, England)* 2007; 369(9577): 1961-71.
10. Borges S, Silva J, Teixeira P. The role of lactobacilli and probiotics in maintaining vaginal health. *Archives of Gynecology and Obstetrics* 2014; 289(3): 479-89.
11. Santos CMA, Pires MCV, Leão TL, et al. Selection of Lactobacillus strains as potential probiotics for vaginitis treatment. *Microbiology* 2016; 162(7): 1195-207.
12. Parolin C, Marangoni A, Laghi L, et al. Isolation of Vaginal Lactobacilli and Characterization of Anti-*Candida* Activity. *PLoS ONE* 2015; 10(6): e0131220.
13. Dennerstein GJ, Ellis DH. Oestrogen, glycogen and vaginal candidiasis. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology* 2001; 41(3): 326-8.
14. Aguin TJ, Sobel JD. Vulvovaginal candidiasis in pregnancy. *Curr Infect Dis Rep* 2015; 17(6): 462.
15. Jaeger M, Plantinga TS, Joosten LA, Kullberg BJ, Netea MG. Genetic basis for recurrent vulvo-vaginal candidiasis. *Curr Infect Dis Rep* 2013; 15(2): 136-42.
16. Glocker EO, Hennigs A, Nabavi M, et al. A homozygous CARD9 mutation in a family with susceptibility to fungal infections. *The New England journal of medicine* 2009; 361(18): 1727-35.
17. Ferwerda B, Ferwerda G, Plantinga TS, et al. Human dectin-1 deficiency and mucocutaneous fungal infections. *The New England journal of medicine* 2009; 361(18): 1760-7.
18. Plantinga TS, van der Velden WJ, Ferwerda B, et al. Early stop polymorphism in human DECTIN-1 is associated with increased candida colonization in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2009; 49(5): 724-32.
19. Drewniak A, Gazendam RP, Tool AT, et al. Invasive fungal infection and impaired neutrophil killing in human CARD9 deficiency. *Blood* 2013; 121(13): 2385-92.
20. Drummond RA, Collar AL, Swamydas M, et al. CARD9-Dependent Neutrophil Recruitment Protects against Fungal Invasion of the Central Nervous System. *PLoS Pathog* 2015; 11(12): e1005293.

21. Gavino C, Cotter A, Lichtenstein D, et al. CARD9 deficiency and spontaneous central nervous system candidiasis: complete clinical remission with GM-CSF therapy. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2014; 59(1): 81-4.
22. Rosentul DC, Delsing CE, Jaeger M, et al. Gene polymorphisms in pattern recognition receptors and susceptibility to idiopathic recurrent vulvovaginal candidiasis. *Front Microbiol* 2014; 5: 483.
23. Colombo R, Boccia S, Ricciardi W, Canino A. TLR2 polymorphism and susceptibility to vulvovaginal colonisation by *Candida* species. *Journal of obstetrics and gynaecology : the journal of the Institute of Obstetrics and Gynaecology* 2017; 37(3): 404-5.
24. Lev-Sagie A, Prus D, Linhares IM, Lavy Y, Ledger WJ, Witkin SS. Polymorphism in a gene coding for the inflammasome component NALP3 and recurrent vulvovaginal candidiasis in women with vulvar vestibulitis syndrome. *American journal of obstetrics and gynecology* 2009; 200(3): 303.e1-6.
25. Jaeger M, Carvalho A, Cunha C, et al. Association of a variable number tandem repeat in the NLRP3 gene in women with susceptibility to RVVC. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 2016; 35(5): 797-801.
26. Vogelaar IP, Ligtenberg MJ, van der Post RS, et al. Recurrent candidiasis and early-onset gastric cancer in a patient with a genetically defined partial MYD88 defect. *Familial cancer* 2016; 15(2): 289-96.
27. Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol* 2011; 11(4): 275-88.
28. Cheng SC, Joosten LA, Kullberg BJ, Netea MG. Interplay between *Candida albicans* and the mammalian innate host defense. *Infect Immun* 2012; 80(4): 1304-13.
29. Paraje MG, Correa SG, Renna MS, Theumer M, Sotomayor CE. *Candida albicans*-secreted lipase induces injury and steatosis in immune and parenchymal cells. *Can J Microbiol* 2008; 54(8): 647-59.
30. Paraje MG, Correa SG, Albesa I, Sotomayor CE. Lipase of *Candida albicans* induces activation of NADPH oxidase and l-arginine pathways on resting and activated macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2009; 390(2): 263-8.
31. Rizzetto L, Weil T, Cavalieri D. Systems Level Dissection of *Candida* Recognition by Dectins: A Matter of Fungal Morphology and Site of Infection. *Pathogens (Basel, Switzerland)* 2015; 4(3): 639-61.
32. Kumamoto CA. Niche-specific gene expression during *C. albicans* infection. *Curr Opin Microbiol* 2008; 11(4): 325-30.
33. Thewes S, Moran GP, Magee BB, Schaller M, Sullivan DJ, Hube B. Phenotypic screening, transcriptional profiling, and comparative genomic analysis of an invasive and non-invasive strain of *Candida albicans*. *BMC Microbiol* 2008; 8: 187.
34. Noble SM, Gianetti BA, Witchley JN. *Candida albicans* cell-type switching and functional plasticity in the mammalian host. *Nature reviews Microbiology* 2017; 15(2): 96-108.
35. Poulain D, Jouault T. *Candida albicans* cell wall glycans, host receptors and responses: elements for a decisive crosstalk. *Curr Opin Microbiol* 2004; 7(4): 342-9.
36. Poulain D. *Candida albicans*, plasticity and pathogenesis. *Critical reviews in microbiology* 2015; 41(2): 208-17.
37. Garcia-Effron G, Park S, Perlin DS. Correlating echinocandin MIC and kinetic inhibition of *fks1* mutant glucan synthases for *Candida albicans*: implications for interpretive breakpoints. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(1): 112-22.

38. Perlin DS. Mechanisms of echinocandin antifungal drug resistance. *Ann N Y Acad Sci* 2015; 1354: 1-11.
39. Cambi A, Koopman M, Figdor CG. How C-type lectins detect pathogens. *Cell Microbiol* 2005; 7(4): 481-8.
40. Miro MS, Vigezzi C, Rodriguez E, et al. [Innate receptors and IL-17 in the immune response against human pathogenic fungi]. *Revista de la Facultad de Ciencias Medicas (Cordoba, Argentina)* 2016; 73(3): 188-96.
41. Peters BM, Yano J, Noverr MC, Fidel PL, Jr. *Candida vaginitis*: when opportunism knocks, the host responds. *PLoS Pathog* 2014; 10(4): e1003965.
42. Cowen LE, Steinbach WJ. Stress, drugs, and evolution: the role of cellular signaling in fungal drug resistance. *Eukaryot Cell* 2008; 7(5): 747-64.
43. Kumamoto CA, Vines MD. Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence. *Cell Microbiol* 2005; 7(11): 1546-54.
44. Peters BM, Palmer GE, Nash AK, Lilly EA, Fidel PL, Jr., Noverr MC. Fungal morphogenetic pathways are required for the hallmark inflammatory response during *Candida albicans* vaginitis. *Infect Immun* 2014; 82(2): 532-43.
45. Moyes DL, Runglall M, Murciano C, et al. A biphasic innate immune MAPK response discriminates between the yeast and hyphal forms of *Candida albicans* in epithelial cells. *Cell host & microbe* 2010; 8(3): 225-35.
46. Whiteway M, Bachewich C. Morphogenesis in *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol* 2007; 61: 529-53.
47. de Freitas Araujo MG, Pacifico M, Vilegas W, et al. Evaluation of *Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhl. extract as antifungal and in treatment of vulvovaginal candidiasis. *Med Mycol* 2013; 51(7): 673-82.
48. Saville SP, Lazzell AL, Monteagudo C, Lopez-Ribot JL. Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. *Eukaryot Cell* 2003; 2(5): 1053-60.
49. Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *Journal of bacteriology* 2001; 183(18): 5385-94.
50. Cauchie M, Desmet S, Lagrou K. *Candida* and its dual lifestyle as a commensal and a pathogen. *Research in microbiology* 2017.
51. De Bernardis F, Sullivan PA, Cassone A. Aspartyl proteinases of *Candida albicans* and their role in pathogenicity. *Med Mycol* 2001; 39(4): 303-13.
52. Harriott MM, Lilly EA, Rodriguez TE, Fidel PL, Jr., Noverr MC. *Candida albicans* forms biofilms on the vaginal mucosa. *Microbiology* 2010; 156(Pt 12): 3635-44.
53. Muzny CA, Schwebke JR. Biofilms: An Underappreciated Mechanism of Treatment Failure and Recurrence in Vaginal Infections. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2015; 61(4): 601-6.
54. Pericolini E, Gabrielli E, Amacker M, et al. Secretory Aspartyl Proteinases Cause Vaginitis and Can Mediate Vaginitis Caused by *Candida albicans* in Mice. *mBio* 2015; 6(3): e00724.
55. Schaller M, Krnjaic N, Niewerth M, Hamm G, Hube B, Korting HC. Effect of antimycotic agents on the activity of aspartyl proteinases secreted by *Candida albicans*. *J Med Microbiol* 2003; 52(Pt 3): 247-9.
56. De Bernardis F, Agatensi L, Ross IK, et al. Evidence for a role for secreted aspartate proteinase of *Candida albicans* in vulvovaginal candidiasis. *The Journal of infectious diseases* 1990; 161(6): 1276-83.

57. Pietrella D, Pandey N, Gabrielli E, et al. Secreted aspartic proteases of *Candida albicans* activate the NLRP3 inflammasome. *Eur J Immunol* 2013; 43(3): 679-92.
58. van de Veerdonk FL, Joosten LA, Netea MG. The interplay between inflammasome activation and antifungal host defense. *Immunol Rev* 2015; 265(1): 172-80.
59. Bruno VM, Shetty AC, Yano J, Fidel PL, Jr., Noverr MC, Peters BM. Transcriptomic analysis of vulvovaginal candidiasis identifies a role for the NLRP3 inflammasome. *mBio* 2015; 6(2).
60. Gabrielli E, Pericolini E, Luciano E, et al. Induction of caspase-11 by aspartyl proteinases of *Candida albicans* and implication in promoting inflammatory response. *Infect Immun* 2015; 83(5): 1940-8.
61. Hube B, Stehr F, Bossenz M, Mazur A, Kretschmar M, Schafer W. Secreted lipases of *Candida albicans*: cloning, characterisation and expression analysis of a new gene family with at least ten members. *Archives of microbiology* 2000; 174(5): 362-74.
62. Toth R, Alonso MF, Bain JM, Vagvolgyi C, Erwig LP, Gacser A. Different *Candida parapsilosis* clinical isolates and lipase deficient strain trigger an altered cellular immune response. *Front Microbiol* 2015; 6: 1102.
63. Stehr F, Kretschmar M, Kröger C, Hube B, Schäfer W. Microbial lipases as virulence factors. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2003; 22(5): 347-55.
64. Gácsér A, Stehr F, Kröger C, Kredics L, Schäfer W, Nosanchuk JD. Lipase 8 Affects the Pathogenesis of *Candida albicans*. *Infection and Immunity* 2007; 75(10): 4710-8.
65. Hardison SE, Brown GD. C-type lectin receptors orchestrate antifungal immunity. *Nature immunology* 2012; 13(9): 817-22.
66. Luisa Gil M, Murciano C, Yanez A, Gozalbo D. Role of Toll-like receptors in systemic *Candida albicans* infections. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* 2016; 21: 278-302.
67. Drummond RA, Lionakis MS. Mechanistic Insights into the Role of C-Type Lectin Receptor/CARD9 Signaling in Human Antifungal Immunity. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 2016; 6: 39.
68. Verma A, Wuthrich M, Deepe G, Klein B. Adaptive immunity to fungi. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2015; 5(3): a019612.
69. Drummond RA, Gaffen SL, Hise AG, Brown GD. Innate Defense against Fungal Pathogens. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2015; 5(6).
70. Cunha C, Romani L, Carvalho A. Cracking the Toll-like receptor code in fungal infections. *Expert review of anti-infective therapy* 2010; 8(10): 1121-37.
71. Strober W, Murray PJ, Kitani A, Watanabe T. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat Rev Immunol* 2006; 6(1): 9-20.
72. Hoving JC, Wilson GJ, Brown GD. Signalling C-type lectin receptors, microbial recognition and immunity. *Cell Microbiol* 2014; 16(2): 185-94.
73. Dambuza IM, Brown GD. C-type lectins in immunity: recent developments. *Current opinion in immunology* 2015; 32: 21-7.
74. Brown GD, Crocker PR. Lectin Receptors Expressed on Myeloid Cells. *Microbiology spectrum* 2016; 4(5).
75. Drummond RA, Saijo S, Iwakura Y, Brown GD. The role of Syk/CARD9 coupled C-type lectins in antifungal immunity. *Eur J Immunol* 2011; 41(2): 276-81.
76. Netea MG, Gow NA, Munro CA, et al. Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *J Clin Invest* 2006; 116(6): 1642-50.

77. Becker KL, Ifrim DC, Quintin J, Netea MG, van de Veerdonk FL. Antifungal innate immunity: recognition and inflammatory networks. *Seminars in immunopathology* 2015; 37(2): 107-16.
78. Delgado-Rizo V, Martinez-Guzman MA, Iniguez-Gutierrez L, Garcia-Orozco A, Alvarado-Navarro A, Fafutis-Morris M. Neutrophil Extracellular Traps and Its Implications in Inflammation: An Overview. *Frontiers in immunology* 2017; 8: 81.
79. Renna MS, Figueredo CM, Rodriguez-Galan MC, et al. Candida albicans up-regulates the Fas-L expression in liver Natural Killer and Natural Killer T cells. *Immunobiology* 2015; 220(11): 1210-8.
80. Renna MS, Figueredo CM, Rodriguez-Galan MC, et al. Abrogation of spontaneous liver tolerance during immune response to Candida albicans: contribution of NKT and hepatic mononuclear cells. *International immunology* 2012; 24(5): 315-25.
81. Annunziato F, Romagnani S. Do studies in humans better depict Th17 cells? *Blood* 2009; 114(11): 2213-9.
82. Yu JJ, Gaffen SL. Interleukin-17: a novel inflammatory cytokine that bridges innate and adaptive immunity. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 2008; 13: 170-7.
83. Gladiator A, Wangler N, Trautwein-Weidner K, LeibundGut-Landmann S. Cutting edge: IL-17-secreting innate lymphoid cells are essential for host defense against fungal infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2013; 190(2): 521-5.
84. Kisand K, Boe Wolff AS, Podkrajsek KT, et al. Chronic mucocutaneous candidiasis in APECED or thymoma patients correlates with autoimmunity to Th17-associated cytokines. *The Journal of experimental medicine* 2010; 207(2): 299-308.
85. Liu L, Okada S, Kong XF, et al. Gain-of-function human STAT1 mutations impair IL-17 immunity and underlie chronic mucocutaneous candidiasis. *The Journal of experimental medicine* 2011; 208(8): 1635-48.
86. Milner JD, Brenchley JM, Laurence A, et al. Impaired T(H)17 cell differentiation in subjects with autosomal dominant hyper-IgE syndrome. *Nature* 2008; 452(7188): 773-6.
87. Puel A, Cypowyj S, Bustamante J, et al. Chronic mucocutaneous candidiasis in humans with inborn errors of interleukin-17 immunity. *Science* 2011; 332(6025): 65-8.
88. Babula O, Lazdane G, Kroica J, Linhares IM, Ledger WJ, Witkin SS. Frequency of interleukin-4 (IL-4) -589 gene polymorphism and vaginal concentrations of IL-4, nitric oxide, and mannose-binding lectin in women with recurrent vulvovaginal candidiasis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2005; 40(9): 1258-62.
89. Fidel PL, Jr., Sobel JD. The role of cell-mediated immunity in candidiasis. *Trends Microbiol* 1994; 2(6): 202-6.
90. Barousse MM, Espinosa T, Dunlap K, Fidel PL, Jr. Vaginal epithelial cell anti-Candida albicans activity is associated with protection against symptomatic vaginal candidiasis. *Infect Immun* 2005; 73(11): 7765-7.
91. Wira CR, Fahey JV, Sentman CL, Pioli PA, Shen L. Innate and adaptive immunity in female genital tract: cellular responses and interactions. *Immunol Rev* 2005; 206: 306-35.
92. Pietrella D, Rachini A, Pines M, et al. Th17 cells and IL-17 in protective immunity to vaginal candidiasis. *PLoS One* 2011; 6(7): e22770.
93. Wira CR, Fahey JV, Rodriguez-Garcia M, Shen Z, Patel MV. Regulation of mucosal immunity in the female reproductive tract: the role of sex hormones in immune protection against sexually transmitted pathogens. *American journal of reproductive immunology (New York, NY : 1989)* 2014; 72(2): 236-58.

94. Bahri R, Saidane-Mosbahi D, Rouabhia M. *Candida famata* modulates toll-like receptor, beta-defensin, and proinflammatory cytokine expression by normal human epithelial cells. *Journal of cellular physiology* 2010; 222(1): 209-18.
95. Yano J, Lilly E, Barousse M, Fidel PL, Jr. Epithelial cell-derived S100 calcium-binding proteins as key mediators in the hallmark acute neutrophil response during *Candida vaginitis*. *Infect Immun* 2010; 78(12): 5126-37.
96. Yano J, Palmer GE, Eberle KE, et al. Vaginal Epithelial Cell-Derived S100 Alarmins Induced by *Candida albicans* via Pattern Recognition Receptor Interactions Are Sufficient but Not Necessary for the Acute Neutrophil Response during Experimental Vaginal Candidiasis. *Infection and Immunity* 2014; 82(2): 783-92.
97. Black CA, Eyers FM, Russell A, Dunkley ML, Clancy RL, Beagley KW. Acute neutropenia decreases inflammation associated with murine vaginal candidiasis but has no effect on the course of infection. *Infect Immun* 1998; 66(3): 1273-5.
98. Silva PM, Goncalves S, Santos NC. Defensins: antifungal lessons from eukaryotes. *Front Microbiol* 2014; 5: 97.
99. de la Fuente-Núñez C, Silva ON, Lu TK, Franco OL. Antimicrobial peptides: Role in human disease and potential as immunotherapies. *Pharmacology & Therapeutics* 2017.
100. Yarbrough VL, Winkle S, Herbst-Kralovetz MM. Antimicrobial peptides in the female reproductive tract: a critical component of the mucosal immune barrier with physiological and clinical implications. *Human reproduction update* 2015; 21(3): 353-77.
101. Swidergall M, Ernst JF. Interplay between *Candida albicans* and the antimicrobial peptide armory. *Eukaryot Cell* 2014; 13(8): 950-7.
102. Suarez-Carmona M, Hubert P, Delvenne P, Herfs M. Defensins: "Simple" antimicrobial peptides or broad-spectrum molecules? *Cytokine & growth factor reviews* 2015; 26(3): 361-70.
103. Machado LR, Ottolini B. An evolutionary history of defensins: a role for copy number variation in maximizing host innate and adaptive immune responses. *Frontiers in immunology* 2015; 6: 115.
104. Ahrens K, Schunck M, Podda GF, et al. Mechanical and metabolic injury to the skin barrier leads to increased expression of murine beta-defensin-1, -3, and -14. *The Journal of investigative dermatology* 2011; 131(2): 443-52.
105. Huttner KM, Kozak CA, Bevins CL. The mouse genome encodes a single homolog of the antimicrobial peptide human beta-defensin 1. *FEBS letters* 1997; 413(1): 45-9.
106. Pero R, Coretti L, Nigro E, et al. beta-Defensins in the Fight against *Helicobacter pylori*. *Molecules (Basel, Switzerland)* 2017; 22(3).
107. Burgey C, Kern WV, Romer W, Rieg S. Differential induction of innate defense antimicrobial peptides in primary nasal epithelial cells upon stimulation with inflammatory cytokines, Th17 cytokines or bacterial conditioned medium from *Staphylococcus aureus* isolates. *Microbial pathogenesis* 2016; 90: 69-77.
108. Patel SR, Smith K, Letley DP, et al. *Helicobacter pylori* downregulates expression of human β -defensin 1 in the gastric mucosa in a type IV secretion-dependent fashion. *Cellular Microbiology* 2013; 15(12): 2080-92.
109. Bauer B, Pang E, Holland C, Kessler M, Bartfeld S, Meyer TF. The *Helicobacter pylori* virulence effector CagA abrogates human beta-defensin 3 expression via inactivation of EGFR signaling. *Cell host & microbe* 2012; 11(6): 576-86.
110. Weinberg A, Jin G, Sieg S, McCormick TS. The yin and yang of human Beta-defensins in health and disease. *Frontiers in immunology* 2012; 3: 294.

111. Ulm H, Wilmes M, Shai Y, Sahl HG. Antimicrobial host defensins - specific antibiotic activities and innate defense modulation. *Frontiers in immunology* 2012; 3: 249.
112. Prado-Montes de Oca E. Human beta-defensin 1: a restless warrior against allergies, infections and cancer. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2010; 42(6): 800-4.
113. Wang Y, Jiang Y, Gong T, et al. High-level expression and novel antifungal activity of mouse beta defensin-1 mature peptide in Escherichia coli. *Applied biochemistry and biotechnology* 2010; 160(1): 213-21.
114. Ryan LK, Freeman KB, Masso-Silva JA, et al. Activity of potent and selective host defense peptide mimetics in mouse models of oral candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58(7): 3820-7.
115. Tomalka J, Azodi E, Narra HP, et al. beta-Defensin 1 plays a role in acute mucosal defense against Candida albicans. 2015; 194(4): 1788-95.
116. Feng Z, Jiang B, Chandra J, Ghannoum M, Nelson S, Weinberg A. Human beta-defensins: differential activity against candidal species and regulation by Candida albicans. *Journal of dental research* 2005; 84(5): 445-50.
117. Jiang Y, Yi X, Li M, Wang T, Qi T, She X. Antimicrobial activities of recombinant mouse beta-defensin 3 and its synergy with antibiotics. *Journal of materials science Materials in medicine* 2012; 23(7): 1723-8.
118. Semple F, Dorin JR. beta-Defensins: multifunctional modulators of infection, inflammation and more? *Journal of innate immunity* 2012; 4(4): 337-48.
119. Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, et al. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *The Journal of experimental medicine* 2006; 203(10): 2271-9.
120. Dixon BR, Radin JN, Piazuolo MB, Contreras DC, Algood HM. IL-17a and IL-22 Induce Expression of Antimicrobials in Gastrointestinal Epithelial Cells and May Contribute to Epithelial Cell Defense against Helicobacter pylori. *PLoS One* 2016; 11(2): e0148514.
121. Biragyn A, Ruffini PA, Leifer CA, et al. Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2. *Science* 2002; 298(5595): 1025-9.
122. Funderburg N, Lederman MM, Feng Z, et al. Human -defensin-3 activates professional antigen-presenting cells via Toll-like receptors 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(47): 18631-5.
123. Rohrl J, Yang D, Oppenheim JJ, Hehlhans T. Human beta-defensin 2 and 3 and their mouse orthologs induce chemotaxis through interaction with CCR2. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2010; 184(12): 6688-94.
124. Prado Montes de Oca E. Antimicrobial peptide elicitors: new hope for the post-antibiotic era. *Innate immunity* 2013; 19(3): 227-41.
125. Dong H, Lv Y, Zhao D, Barrow P. Defensins: The Case for Their Use against Mycobacterial Infections. 2016; 2016: 7515687.
126. Yano J, Noverr MC, Fidel PL, Jr. Cytokines in the host response to Candida vaginitis: Identifying a role for non-classical immune mediators, S100 alarmins. *Cytokine* 2012; 58(1): 118-28.
127. Carvalho A, Giovannini G, De Luca A, et al. Dectin-1 isoforms contribute to distinct Th1/Th17 cell activation in mucosal candidiasis. *Cellular & molecular immunology* 2012; 9(3): 276-86.
128. Anderson DJ, Marathe J, Pudney J. The structure of the human vaginal stratum corneum and its role in immune defense. *American journal of reproductive immunology (New York, NY : 1989)* 2014; 71(6): 618-23.

129. Egan CE, Sukhumavasi W, Bierly AL, Denkers EY. Understanding the multiple functions of Gr-1(+) cell subpopulations during microbial infection. *Immunologic research* 2008; 40(1): 35-48.
130. Fazeli A, Bruce C, Anumba DO. Characterization of Toll-like receptors in the female reproductive tract in humans. *Human reproduction (Oxford, England)* 2005; 20(5): 1372-8.
131. Hickey DK, Fahey JV, Wira CR. Mouse estrous cycle regulation of vaginal versus uterine cytokines, chemokines, alpha-/beta-defensins and TLRs. *Innate immunity* 2013; 19(2): 121-31.
132. Villamon E, Gozalbo D, Roig P, O'Connor JE, Fradelizi D, Gil ML. Toll-like receptor-2 is essential in murine defenses against *Candida albicans* infections. *Microbes and infection* 2004; 6(1): 1-7.
133. Netea MG, Suttmuller R, Hermann C, et al. Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2004; 172(6): 3712-8.
134. Gil ML, Gozalbo D. Role of Toll-like receptors in systemic *Candida albicans* infections. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* 2009; 14: 570-82.
135. Saijo S, Fujikado N, Furuta T, et al. Dectin-1 is required for host defense against *Pneumocystis carinii* but not against *Candida albicans*. *Nature immunology* 2007; 8(1): 39-46.
136. Zhang X, Ge Y, Li W, Hu Y. Diversities of interaction of murine macrophages with three strains of *Candida albicans* represented by MyD88, CARD9 gene expressions and ROS, IL-10 and TNF-alpha secretion. *International journal of clinical and experimental medicine* 2014; 7(12): 5235-43.
137. Chung WO, Dommisch H, Yin L, Dale BA. Expression of defensins in gingiva and their role in periodontal health and disease. *Current pharmaceutical design* 2007; 13(30): 3073-83.
138. Garcia-Lopez G, Flores-Espinosa P, Zaga-Clavellina V. Tissue-specific human beta-defensins (HBD)1, HBD2, and HBD3 secretion from human extra-placental membranes stimulated with *Escherichia coli*. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E* 2010; 8: 146.
139. Segat L, Zupin L, Moura RR, et al. DEFB1 polymorphisms are involved in susceptibility to human papillomavirus infection in Brazilian gynaecological patients. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2014; 109: 918-22.
140. Sung DK, Chang YS, Sung SI, Yoo HS, Ahn SY, Park WS. Antibacterial effect of mesenchymal stem cells against *Escherichia coli* is mediated by secretion of beta- defensin- 2 via toll- like receptor 4 signalling. *Cell Microbiol* 2016; 18(3): 424-36.
141. Bhattacharyya S, Ghosh SK. FAD-I, a *Fusobacterium nucleatum* Cell Wall-Associated Diacylated Lipoprotein That Mediates Human Beta Defensin 2 Induction through Toll-Like Receptor-1/2 (TLR-1/2) and TLR-2/6. 2016; 84(5): 1446-56.
142. Dovník A, Golle A, Novak D, Arko D, Takac I. Treatment of vulvovaginal candidiasis: a review of the literature. *Acta dermatovenerologica Alpina, Pannonica, et Adriatica* 2015; 24(1): 5-7.
143. Ziccardi M, Souza LO, Gandra RM, et al. *Candida parapsilosis* (sensu lato) isolated from hospitals located in the Southeast of Brazil: Species distribution, antifungal susceptibility and virulence attributes. *International journal of medical microbiology : IJMM* 2015; 305(8): 848-59.
144. Blanco MT, Sacristán B, Lucio L, Blanco J, Pérez-Giraldo C, Cándido Gómez-García A. La hidrofobicidad de la superficie celular como indicador de otros factores de virulencia en *Candida albicans*. *Revista iberoamericana de micología* 2010; 27(4): 195-9.

145. Pierce CG, Uppuluri P, Tristan AR, et al. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nature protocols* 2008; 3(9): 1494-500.
146. Tumbarello M, Fiori B, Trecarichi EM, et al. Risk Factors and Outcomes of Candidemia Caused by Biofilm-Forming Isolates in a Tertiary Care Hospital. *PLOS ONE* 2012; 7(3): e33705.
147. Mutlu Sariguzel F, Berk E, Koc AN, Sav H, Demir G. Investigation of the relationship between virulence factors and genotype of *Candida* spp. isolated from blood cultures. *Journal of infection in developing countries* 2015; 9(8): 857-64.
148. Kouker G, Jaeger KE. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Appl Environ Microbiol* 1987; 53(1): 211-3.
149. Ghosh M. Secreted mucosal antimicrobials in the female reproductive tract that are important to consider for HIV prevention. *American journal of reproductive immunology (New York, NY : 1989)* 2014; 71(6): 575-88.
150. Dezzutti CS, Hendrix CW, Marrazzo JM, et al. Performance of swabs, lavage, and diluents to quantify biomarkers of female genital tract soluble mucosal mediators. *PLoS One* 2011; 6(8): e23136.
151. Conti HR, Shen F, Nayyar N, et al. Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. *The Journal of experimental medicine* 2009; 206(2): 299-311.
152. Bajaj-Elliott M, Fedeli P, Smith GV, et al. Modulation of host antimicrobial peptide (beta-defensins 1 and 2) expression during gastritis. *Gut* 2002; 51(3): 356-61.
153. Zaga-Clavellina V, Ruiz M, Flores-Espinosa P, et al. Tissue-specific human beta-defensins (HBD)-1, HBD-2 and HBD-3 secretion profile from human amniochorionic membranes stimulated with *Candida albicans* in a two-compartment tissue culture system. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E* 2012; 10: 70.
154. Conti HR, Gaffen SL. IL-17-Mediated Immunity to the Opportunistic Fungal Pathogen *Candida albicans*. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2015; 195(3): 780-8.
155. Wozniak KL, Wormley FL, Jr., Fidel PL, Jr. *Candida*-specific antibodies during experimental vaginal candidiasis in mice. *Infect Immun* 2002; 70(10): 5790-9.
156. Yano J, Kolls JK, Happel KI, Wormley F, Wozniak KL, Fidel PL, Jr. The acute neutrophil response mediated by S100 alarmins during vaginal *Candida* infections is independent of the Th17-pathway. *PLoS One* 2012; 7(9): e46311.
157. Chen RY, Fan YM, Zhang Q, et al. Estradiol inhibits Th17 cell differentiation through inhibition of RORgammaT transcription by recruiting the ERalpha/REA complex to estrogen response elements of the RORgammaT promoter. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2015; 194(8): 4019-28.
158. Wira CR, Rodriguez-Garcia M, Patel MV. The role of sex hormones in immune protection of the female reproductive tract. *Nat Rev Immunol* 2015; 15(4): 217-30.
159. Wheeler RT, Fink GR. A drug-sensitive genetic network masks fungi from the immune system. *PLoS Pathog* 2006; 2(4): e35.
160. Cassone A, Sobel JD. Experimental Models of Vaginal Candidiasis and Their Relevance to Human Candidiasis. *Infect Immun* 2016; 84(5): 1255-61.
161. Netea MG, Kullberg BJ. Epithelial sensing of fungal invasion. *Cell host & microbe* 2010; 8(3): 219-20.
162. Tessarolli V, Gasparoto TH, Lima HR, et al. Absence of TLR2 influences survival of neutrophils after infection with *Candida albicans*. *Med Mycol* 2010; 48(1): 129-40.

163. Renna MS, Correa SG, Porporatto C, et al. Hepatocellular apoptosis during *Candida albicans* colonization: involvement of TNF-alpha and infiltrating Fas-L positive lymphocytes. *International immunology* 2006; 18(12): 1719-28.
164. Choteau L, Vancraeynest H, Le Roy D, et al. Role of TLR1, TLR2 and TLR6 in the modulation of intestinal inflammation and *Candida albicans* elimination. 2017; 9: 9.
165. Prieto D, Carpena N, Maneu V, Gil ML, Pla J, Gozalbo D. TLR2 modulates gut colonization and dissemination of *Candida albicans* in a murine model. *Microbes and infection* 2016; 18(10): 656-60.
166. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence* 2013; 4(2): 119-28.
167. Hise AG, Tomalka J, Ganesan S, et al. An essential role for the NLRP3 inflammasome in host defense against the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Cell host & microbe* 2009; 5(5): 487-97.
168. Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nature reviews Immunology* 2013; 13(6): 10.1038/nri3452.
169. Villamon E, Gozalbo D, Roig P, et al. Myeloid differentiation factor 88 (MyD88) is required for murine resistance to *Candida albicans* and is critically involved in *Candida* - induced production of cytokines. *European cytokine network* 2004; 15(3): 263-71.
170. Plantinga TS, Johnson MD, Scott WK, et al. Toll-like receptor 1 polymorphisms increase susceptibility to candidemia. *The Journal of infectious diseases* 2012; 205(6): 934-43.
171. Bellocchio S, Montagnoli C, Bozza S, et al. The contribution of the Toll-like/IL-1 receptor superfamily to innate and adaptive immunity to fungal pathogens in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2004; 172(5): 3059-69.
172. Marr KA, Balajee SA, Hawn TR, et al. Differential role of MyD88 in macrophage-mediated responses to opportunistic fungal pathogens. *Infect Immun* 2003; 71(9): 5280-6.
173. Majer O, Bourgeois C, Zwolanek F, et al. Type I Interferons Promote Fatal Immunopathology by Regulating Inflammatory Monocytes and Neutrophils during *Candida* Infections. *PLOS Pathogens* 2012; 8(7): e1002811.
174. Usluogullari B, Gumus I, Gunduz E, et al. The role of Human Dectin-1 Y238X Gene Polymorphism in recurrent vulvovaginal candidiasis infections. *Molecular biology reports* 2014; 41(10): 6763-8.
175. Marakalala MJ, Kerrigan AM, Brown GD. Dectin-1: a role in antifungal defense and consequences of genetic polymorphisms in humans. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* 2011; 22(1-2): 55-65.
176. Gringhuis SI, Kaptein TM, Wevers BA, et al. Dectin-1 is an extracellular pathogen sensor for the induction and processing of IL-1beta via a noncanonical caspase-8 inflammasome. *Nature immunology* 2012; 13(3): 246-54.
177. Tsoni SV, Brown GD. beta-Glucans and dectin-1. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1143: 45-60.
178. Silva NC, Nery JM, Dias AL. Aspartic proteinases of *Candida* spp.: role in pathogenicity and antifungal resistance. *Mycoses* 2014; 57(1): 1-11.
179. Ben-Ami R, Garcia-Effron G, Lewis RE, et al. Fitness and virulence costs of *Candida albicans* FKS1 hot spot mutations associated with echinocandin resistance. *The Journal of infectious diseases* 2011; 204(4): 626-35.
180. Mora-Montes HM, Netea MG, Ferwerda G, et al. Recognition and blocking of innate immunity cells by *Candida albicans* chitin. *Infect Immun* 2011; 79(5): 1961-70.

181. Buscemi L, Arechavala A, Negroni R. [Study of acute vulvovaginitis in sexually active adult women, with special reference to candidosis, in patients of the Francisco J. Muniz Infectious Diseases Hospital]. *Revista iberoamericana de micología* 2004; 21(4): 177-81.
182. Arechavala AI, Bianchi MH, Robles AM, Santiso G, Negroni R. [Identification and susceptibility against fluconazole and albaconazole of 100 yeasts' strains isolated from vaginal discharge]. *Revista iberoamericana de micología* 2007; 24(4): 305-8.
183. Mucci MJ, Cuestas ML, Landanburu MF, Mujica MT. Prevalence of *Candida albicans*, *Candida dubliniensis* and *Candida africana* in pregnant women suffering from vulvovaginal candidiasis in Argentina. *Revista iberoamericana de micología* 2017; 34(2): 72-6.
184. Park M, Do E, Jung WH. Lipolytic Enzymes Involved in the Virulence of Human Pathogenic Fungi. *Mycobiology* 2013; 41(2): 67-72.
185. Naglik J, Albrecht A, Bader O, Hube B. *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. *Cellular Microbiology* 2004; 6(10): 915-26.
186. Barousse MM, Van Der Pol BJ, Fortenberry D, Orr D, Fidel PL, Jr. Vaginal yeast colonisation, prevalence of vaginitis, and associated local immunity in adolescents. *Sexually transmitted infections* 2004; 80(1): 48-53.
187. Lev-Sagie A, Nyirjesy P, Tarangelo N, et al. Hyaluronan in vaginal secretions: association with recurrent vulvovaginal candidiasis. *American journal of obstetrics and gynecology* 2009; 201(2): 206.e1-5.
188. Basso B, Gimenez F, Lopez C. IL-1beta, IL-6 and IL-8 levels in gynecologic infections. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2005; 13(4): 207-11.
189. Fidel PL, Jr., Barousse M, Lounev V, Espinosa T, Chesson RR, Dunlap K. Local immune responsiveness following intravaginal challenge with *Candida* antigen in adult women at different stages of the menstrual cycle. *Med Mycol* 2003; 41(2): 97-109.
190. Masson L, Salkinder AL, Olivier AJ, et al. Relationship between female genital tract infections, mucosal interleukin-17 production and local T helper type 17 cells. *Immunology* 2015; 146(4): 557-67.
191. Ryan KR, Hong M, Arkwright PD, et al. Impaired dendritic cell maturation and cytokine production in patients with chronic mucocutaneous candidiasis with or without APECED. *Clinical and experimental immunology* 2008; 154(3): 406-14.
192. Ng WF, von Delwig A, Carmichael AJ, et al. Impaired T(H)17 responses in patients with chronic mucocutaneous candidiasis with and without autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2010; 126(5): 1006-15, 15.e1-4.
193. Han JH, Kim MS, Lee MY, et al. Modulation of human beta-defensin-2 expression by 17beta-estradiol and progesterone in vaginal epithelial cells. *Cytokine* 2010; 49(2): 209-14.
194. Noda-Nicolau NM, Bastos LB, Bolpetti AN, et al. Cervicovaginal Levels of Human beta-Defensin 1, 2, 3, and 4 of Reproductive-Aged Women With Chlamydia trachomatis Infection. *J Low Genit Tract Dis* 2017; 21(3): 189-92.
195. Chakraborty K, Ghosh S, Koley H, et al. Bacterial exotoxins downregulate cathelicidin (hCAP-18/LL-37) and human beta-defensin 1 (HBD-1) expression in the intestinal epithelial cells. *Cell Microbiol* 2008; 10(12): 2520-37.
196. De Luca A, Carvalho A, Cunha C, et al. IL-22 and IDO1 affect immunity and tolerance to murine and human vaginal candidiasis. *PLoS Pathog* 2013; 9(7): e1003486.
197. Garcia LN, Leimgruber C, Uribe Echevarria EM, et al. Protective phenotypes of club cells and alveolar macrophages are favored as part of endotoxin-mediated prevention of asthma. *Experimental biology and medicine (Maywood, NJ)* 2015; 240(7): 904-16.

198. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature protocols* 2008; 3(6): 1101-8.
199. Steele C, Fidel PL, Jr. Cytokine and chemokine production by human oral and vaginal epithelial cells in response to *Candida albicans*. *Infect Immun* 2002; 70(2): 577-83.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Publicaciones en revistas con referato

1- **Miró, MS**; Rodríguez, E; Vigezzi, C; Icely, PA; García, LN; Painetti, N; Maldonado, CA; Riera, F; Caeiro, JP y Sotomayor, CE. *Contribution of TLR2 pathway in the pathogenesis of Vulvovaginal Candidiasis*. En prensa en **Pathog Dis**.

2- **Miró, MS**; Rodríguez, E; Vigezzi, C; Icely, PA; Gonzaga de Freitas Araujo M; Riera, F; Vargas, L; Abiega, C; Caeiro, JP y Sotomayor, CE. *Candidiasis vulvovaginal: una antigua enfermedad con nuevos desafíos*. **Rev. Iberoam. Micol** 2017, 34 (2): 65-71.

3- **Miró, MS**; Vigezzi, C; Rodríguez, E; Icely, PA; Caeiro, JP; Riera, F; Masih, DT y Sotomayor, CE. *Receptores Innatos e IL-17 en la respuesta inmune frente a hongos patógenos humanos*. **Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba**. 2016; 73 (3): 188-196.

4- García LN, Leimgruber C, Uribe Echevarría EM, Acosta PL, Brahamian JM, Polack FP, **Miró MS**, Quintar AA, Sotomayor CE and Maldonado CA. *Protective phenotypes of club cells and alveolar macrophages are favored as part of endotoxin-mediated prevention of asthma*. **Experimental Biology and Medicine** 2014; 0: 1–13. DOI: 10.1177/1535370214562338.

5- Gonzaga de Freitas Araujo M, Pacifico M, Vilegas W, Campaner dos Santos L, Icely PA, **Miró MS**, Scarpa MV, Bauab TM and Sotomayor CE. *Evaluation of Syngonanthus nitens (Bong.) Ruhl. extract as antifungal and in treatment of vulvovaginal candidiasis*. **Med Mycol** 51(7):673-82. 2013.

Capítulos de libros

1- Basualdo, Coto, De Torres, “Microbiología Biomédica” 3ª edición. Editorial Atlante S.R.L. *Capítulo Respuesta Inmune a Infecciones fúngicas*. Sotomayor, CE; **Miró, MS** y Masih DT. En prensa

Participación en Congresos

1- **Miró, MS**; Rodríguez, E; Vigezzi, C; Vargas, L; Icely, PA; Riera, F; Caeiro, JP; Sotomayor, CE. **“Clinical *Candida albicans* strain downregulates human anti microbial peptide Beta defensin 1 *in vitro* and in patients with Recurrent Vulvovaginal Candidiasis”**. LXIV Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología, 15-19 de Noviembre de 2016, Mar del Plata, Argentina.

2- **Miró, MS**; Dudiuk, C; Rodríguez, E; Gamarra, S; Vigezzi, C; Icely, PA; Riera, F; Caeiro, JP; Garcia-Effron, G; Sotomayor, CE. **“*Candida africana*: caracterización bioquímica, molecular y capacidad patogénica *in vivo*”**. XVI Congreso de la Sociedad Argentina de Infectología, 22-25 de Mayo de 2016, Mendoza, Argentina.

3- **Miró, MS**; Rodríguez, E; Vigezzi, C; Icely, PA; Sotomayor, CE. **“*Candida albicans* pathogenic clinical strain upregulates relevant mediators involved in the Vulvovaginal Candidiasis immunopathogenesis”**. IV Reunión de LASID, LXIII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología, 18 – 21 de Noviembre de 2015, Buenos Aires.

4- **Miró, MS**; Dudiuk, C; Rodríguez, E; Gamarra, S; Vigezzi, C; Icely, PA; Riera, F; Caeiro, JP; Garcia-Effron, G; Sotomayor, CE. **“*Candida africana*: caracterización bioquímica, molecular y capacidad patogénica *in vivo*”**. XIII Foro de Infecciones Fúngicas en la Práctica Clínica, 5 – 7 de Noviembre de 2015, Córdoba.

5- **Miró, MS**; Abiega, C; Icely, PA; Riera, F; Vargas, L; Arbach, F; Grutadauria, MG; Vigezzi, C; Rodriguez, E; Caeiro, JP y Sotomayor, CE. **“Candidiasis vulvovaginal recurrente: susceptibilidad, factores de virulencia y respuesta de células epiteliales frente al hongo”**. XV Congreso de la Sociedad Argentina de Infectología, 28 – 30 de Mayo de 2015, Buenos Aires.

6- **Miró, MS**; Icely, PA; Vigezzi, C; Rodriguez, E; Cejas, H; Riera, F; Caeiro, JP y Sotomayor, CE. **“Receptores inmunes innatos implicados en la patogénesis de la candidiasis vulvovaginal”**. XV Congreso de la Sociedad Argentina de Infectología, 28 – 30 de Mayo de 2015, Buenos Aires.

7- Miró, MS; Rodríguez, E; Icely, PA; Vigezzi, C; Sotomayor CE. **“Constitutive β -Defensin 1 is modulated by *Candida albicans* in Vulvovaginal Candidiasis”**. LIX Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica y LXII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología, 19 - 23 de Noviembre de 2014, Mar del Plata.

8- Miró, MS; Abiega, C; Icely, PA; Riera, F; Arbach, F; Grutadauria, MG; Vigezzi, C; Rodriguez, E; Caeiro, JP y Sotomayor, CE. **“Recurrent vulvovaginal candidiasis: different aspects of *Candida*-host interaction”**. XII Forum on Fungal Infetion in the Clinical Practice, 16 – 18 de Octubre de 2014, Curitiba, PR, Brasil.

9- Miró, MS; Icely, PA; Vigezzi, C; Rodriguez, E; Cejas, H; Caeiro, JP; Riera, F y Sotomayor, CE. **“Innate immune receptors involved in the pathogenesis of vulvovaginal candidiasis”**. XII Forum on Fungal Infetion in the Clinical Practice, 16 – 18 de Octubre de 2014, Curitiba, PR, Brasil.

10- Miró, MS; Abiega, C; Icely, PA; Riera, F; Arbach, F; Grutadauria, MG; Melo, S; Cejas, H; Vigezzi, C; Rodriguez, E; Caeiro, JP y Sotomayor, CE. **“Candidiasis vulvovaginal recurrente y candidiasis vulvovaginal: aspectos clínicos y traslación al estudio experimental”**. V Jornadas Infectológicas de Invierno, Sociedad Argentina de Infectología Filial Córdoba, 6 y 7 de Agosto de 2014, Córdoba.

11- Miró MS; Icely PA; Sotomayor CE. **“Mouse β defensins regulation during Vulvovaginal Candidiasis (VVC)”**. LXI Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología, 7 - 9 de Noviembre de 2013, Los Cocos, Córdoba.

12- Miró MS; Icely PA; Cejas H; Sotomayor CE. **“Candidiasis vulvovaginal: respuesta inmune local y contribución del receptor innato TLR2”** LVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica y LX Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología, 14 – 17 de noviembre de 2012, Mar del Plata.

13- Miró, MS; Icely, PA; Sotomayor CE. “Respuesta *In Vitro* de células epiteliales frente a *Candida albicans*”. LIX Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología, 19 – 21 de octubre de 2011, San Miguel de Tucumán.