



**FCQ**  
Facultad de  
Ciencias Químicas

C I B I C I

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**Contribución de los Interferones tipo I  
en la respuesta inmune frente a  
*Candida albicans* en el tracto genital  
femenino**

Bioq. Emilse Rodriguez

Directora: Claudia E. Sotomayor

Universidad Nacional de Córdoba

Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas

Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología-CONICET

Córdoba, Argentina 2021

**Comisión asesora:**

Dra. Mariana Maccioni

Dra. María Cecilia Becerra

Dr. Hugo Luján

**Evaluador externo:**

Dr. Guillermo Docena

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 mi familia, por el inmenso amor  
que me brindan día a día.*

# Resumen

## **Contribución de los Interferones tipo I en la respuesta inmune frente a *Candida albicans* en el tracto genital femenino.**

La Candidiasis Vulvovaginal (CVV) es una enfermedad inflamatoria aguda causada por especies de *Candida* que afecta aproximadamente al 75% de las mujeres sanas durante la edad fértil. Junto con su forma recurrente (CVVR), presenta una elevada prevalencia y constituyen un importante problema de salud a nivel mundial.

A pesar del extenso conocimiento sobre los factores predisponentes del huésped para el desarrollo de esta micosis, muchos de los mecanismos que rigen la compleja interacción *Candida*-Célula epitelial (CE) como así también los eventos y mediadores inmunes que se activan en respuesta al patógeno no han sido completamente esclarecidos.

En este escenario, el rol de ciertos mediadores inmunes como los Interferones tipo I (IFNs-I), receptores de la inmunidad innata involucrados en su inducción y regulación, y el impacto en la respuesta local y periférica en la CVV permanecen aún sin definir.

En este trabajo de tesis abordamos el estudio de la interacción *C. albicans*-CE y los eventos capaces de inducir la activación de la vía de IFNs-I, a través del desarrollo de un modelo *in vitro* de CVV. Asimismo, fue nuestro objetivo esclarecer la contribución de los IFNs-I y su vía de señalización en la respuesta antifúngica local y periférica durante la infección vaginal por *C. albicans*, mediante el uso de un modelo murino de CVV.

Nuestros resultados demuestran que *C. albicans* es capaz de activar la transcripción de elementos de la vía de IFNs-I en CE del tracto genital femenino *in vitro* y que la intensidad de la respuesta depende de los diferentes mecanismos de invasión que emplea el hongo, de la magnitud del inóculo y del tiempo de interacción. Además, demostramos que el reconocimiento inmune de componentes de la pared del hongo como los  $\beta$ -glucanos y de componentes nucleares de *Candida* inducen la activación de esta vía en CE.

El estudio proteómico cuantitativo aportó información novedosa sobre los procesos biológicos que ocurren en las CE del tracto genital femenino en la interacción con *C. albicans* y proporcionó evidencia sólida sobre la relevancia de la vía de IFNs-I en la respuesta mediada por CE frente al hongo. Este estudio también demostró que la activación del receptor inmune Dectin-1, capaz de reconocer  $\beta$ -glucanos de la pared fúngica, cumple un papel relevante en la inducción de la vía de IFNs-I, además de activar funciones endógenas importantes en la fisiología de las CE.

Finalmente, el uso de un modelo *in vivo* de CVV, con animales deficientes en el receptor de IFNs-I (*Ifnar1*<sup>-/-</sup>), permitió establecer que los IFNs-I cumplen una importante función reguladora y protectora durante el desarrollo de la CVV murina. Participan en varios procesos claves como el control de la carga fúngica e invasión tisular al inicio de la infección, el reclutamiento de células polimorfonucleares, la organización de la respuesta tisular y la regulación de los niveles de distintas citoquinas secretadas al lumen vaginal de crucial importancia en la tolerancia e inmunopatogenia de la CVV. El estudio complementario de las poblaciones celulares mieloides y linfoides presentes en nódulos linfáticos drenantes de vagina aportó evidencia sobre el rol regulador de los IFNs-I a nivel periférico durante la CVV.

El conocimiento sobre los eventos regulados por los IFNs-I aportados en este trabajo, proporcionan una base racional sobre la función de estas citoquinas en el tracto genital femenino y brinda, a través de su modulación, una importante alternativa terapéutica para las formas recurrentes de esta micosis.

# Abstract

## **Contribution of Type I Interferons to the immune response against *Candida albicans* in the female genital tract.**

Vulvovaginal Candidiasis (VVC) is an acute inflammatory disease caused by *Candida* species affecting 75% of healthy women during childbearing age. VVC and its recurrent form (RVVC) present a high prevalence and constitute an important health problem worldwide.

Despite the extensive knowledge about host predisposing factors for the development of this mycosis, many of the mechanisms that govern the complex *Candida*-Epithelial Cell (EC) interaction and the events and immune mediators involved in the response to the pathogen have not been completely clarified.

In this scenario, the role of certain immune mediators such as type I interferons (IFNs-I), and the innate immunity receptors involved in their induction and regulation, as well as their impact on the local and peripheral response in VVC, remain undefined.

In the present work we address the study of *C. albicans*-EC interaction and the events that induce the activation of the IFNs-I pathway, through the development of an *in vitro* VVC model. Likewise, it was our aim to study the contribution of IFNs-I and their signaling pathway to the local and peripheral antifungal response during *C. albicans* vaginal infection, using a murine model of VVC.

Our results show that *C. albicans* activates the transcription of elements involved in IFNs-I pathway in EC of the female genital tract *in vitro*, and that the intensity of the response depends on the different fungal invasion mechanisms, the fungal load and interaction time. Furthermore, we demonstrated that immune recognition of fungal cell wall components, such as  $\beta$ -glucans, and nuclear components of *Candida* induce activation of IFNs-I pathway in EC.

A quantitative proteomic study provided novel information about the biological processes that take place on the EC of the female genital tract in interaction with *C. albicans* and provided solid evidence on the relevance of IFNs-I pathway in the EC-mediated response against the fungus. This study also demonstrated that the activation

of the immune receptor Dectin-1, which recognizes  $\beta$ -glucans of fungal cell wall, plays a relevant role in IFNs-I pathway induction, and also in the promotion of important endogenous functions in the physiology of the EC.

Finally, the use of an *in vivo* model of VVC, with animals deficient in the IFNs-I receptor (*Ifnar1*  $-/-$ ), allowed us to establish that IFNs-I play an important regulatory and protective function during the development of murine VVC. They participate in several key processes such as the control of fungal load and tissue invasion at the beginning of the infection, recruitment of polymorphonuclear cells, organization of the tissue response and regulation of different cytokines secreted into the vaginal lumen of crucial importance in tolerance and immunopathogenesis of VVC. The complementary study of myeloid and lymphoid cell populations in vaginal draining lymph nodes provided evidence on regulatory role of IFNs-I at the peripheral level during VVC.

The knowledge on the events regulated by IFNs-I, provides a rational basis about the role of these cytokines in the female genital tract and, through their modulation, an important therapeutic alternative for the recurrent forms of this mycosis.

# ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	1
INTRODUCCIÓN.....	4
Candidiasis Vulvovaginal.....	5
Conceptos generales y epidemiología.....	5
Distribución de especies.....	6
Factores predisponentes.....	7
Factores genéticos asociados a la susceptibilidad a CVV.....	8
<i>Candida albicans</i> .....	10
Características generales.....	10
Composición de la pared celular.....	10
Factores de virulencia y mecanismos de patogenicidad.....	12
Polimorfismo fúngico.....	12
Adhesión y formación de biofilm.....	13
Invasión.....	15
Factores secretados para la supervivencia y el daño epitelial.....	15
Reconocimiento inmune de <i>C. albicans</i> y respuesta inmune efectora en el tracto genital femenino.....	16
Receptores de la inmunidad innata.....	16
TLRs.....	17
CLRs.....	19
NLRs.....	19
RLRs.....	20
Respuesta inmune innata en el tracto genital femenino.....	21
Barreras físicas: Rol relevante de las CE.....	21
Componentes solubles.....	22
Componentes celulares.....	23
Respuesta inmune adaptativa en el tracto genital femenino.....	24
Inmunopatogenia de la CVV.....	25
Interferones tipo I.....	27

Inducción y señalización de IFNs-I.....	27
Inducción de la producción de IFNs-I.....	27
Señalización de IFNs-I e inducción de Genes Estimulados por IFN (ISGs).....	28
Interferones tipo I en la respuesta inmune frente a <i>Candida</i> spp. ....	29
Interferones tipo I en CVV.....	30
OBJETIVOS.....	32
RESULTADOS.....	34
CAPÍTULO I.....	35
Estrategia experimental para el estudio de la relevancia del dimorfismo fúngico sobre la inducción de la vía de los IFNs-I en CE del tracto genital femenino durante la interacción con <i>C. albicans</i> .....	36
Características de la invasión de las CE del tracto genital femenino por diferentes morfotipos <i>C. albicans</i> .....	38
Impacto del dimorfismo fúngico en la inducción de la transcripción de <i>IFN<math>\beta</math></i> e <i>IRFs</i> .....	40
Contribución del reconocimiento de $\beta$ -glucanos de <i>C. albicans</i> en la inducción de la transcripción de <i>IFN<math>\beta</math></i> e <i>IRFs</i> .....	43
Contribución de los componentes nucleares de <i>C. albicans</i> en la inducción de la transcripción de <i>IFN<math>\beta</math></i> e <i>IRFs</i> .....	45
CONCLUSIONES CAPÍTULO I.....	48
CAPÍTULO II.....	50
Evaluación de la calidad de los datos obtenidos a partir de LC-MS/MS.....	52
Análisis de la expresión diferencial de proteínas en células HeLa en interacción con <i>C. albicans</i> y estimuladas con Curdlan.....	55
Análisis funcional de las proteínas diferencialmente expresadas en células HeLa en interacción con <i>C. albicans</i> y Curdlan.....	58
Análisis de las principales vías en las que participan las proteínas diferencialmente expresadas en células HeLa en interacción con <i>C. albicans</i> y Curdlan.....	61
CONCLUSIONES CAPÍTULO II.....	71
CAPÍTULO III.....	73
Susceptibilidad a la infección vaginal por <i>C. albicans</i> en el modelo experimental de CVV murina.....	75
Invasión tisular y respuesta inflamatoria durante la infección vaginal por <i>C. albicans</i> en animales C57BL/6 e <i>Ifnar1</i> <sup>-/-</sup> .....	78

Perfil local de citoquinas durante la infección vaginal por <i>C. albicans</i> en animales C57BL/6 e <i>Ifnar1</i> <sup>-/-</sup> .....	82
Estudio de poblaciones inmunes en nódulos linfáticos drenantes de vagina de animales C57BL/6 e <i>Ifnar1</i> <sup>-/-</sup> al día 4 pi con <i>C. albicans</i> .....	84
CONCLUSIONES CAPÍTULO III.....	90
DISCUSIÓN.....	93
Interacción <i>C. albicans</i> -CE.....	96
Activación de vía de IFNs-I en CE del tracto genital femenino por <i>C. albicans</i> .....	100
Contribución del dimorfismo, carga fúngica y tiempos de interacción con <i>C. albicans</i> .....	101
Contribución del reconocimiento inmune de PAMPs fúngicos.....	103
Análisis proteómico de la interacción: <i>C. albicans</i> -CE.....	107
Análisis proteómico de la interacción: $\beta$ -glucanos-Dectin-1.....	112
Contribución de los IFNs-I en la respuesta inmune local durante la CVV.....	114
Contribución de los IFNs-I en la respuesta inmune periférica en CVV.....	122
MATERIALES Y MÉTODOS.....	128
<i>C. albicans</i> .....	129
Condiciones de crecimiento de <i>C. albicans</i> .....	129
Modelo <i>in vitro</i> de CVV.....	129
Cultivo de CE humanas de tracto genital femenino.....	129
Estímulos de CE humanas de tracto genital femenino.....	130
Estímulos fúngicos.....	130
Agonistas de PRRs.....	131
Microscopía electrónica de transmisión.....	132
Biología molecular.....	132
Extracción de ARN.....	132
Tratamiento con ADNasa y Retrotranscripción.....	133
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en Tiempo Real.....	133
Análisis para la cuantificación relativa de genes.....	134
Proteómica cuantitativa.....	134
Condiciones experimentales.....	134
Preparación de las muestras para proteómica cuantitativa.....	135

Lisis celular.....	135
Digestión trípica en gel.....	135
<i>"Label-free" Liquid Chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)</i> .....	136
Identificación de proteínas.....	137
Cuantificación relativa de proteínas.....	137
Análisis bioinformático de las proteínas expresadas diferencialmente.....	139
Análisis de enriquecimiento: Procesos biológicos regulados diferencialmente en las CE.....	139
Análisis de vías celulares reguladas diferencialmente en las CE.....	140
Modelo murino de Candidiasis Vulvovaginal.....	140
Animales.....	140
Infección vaginal.....	140
Lavados cervicovaginales (LCV).....	141
Unidades Formadoras de Colonias.....	141
Citoextendidos.....	142
Tinción de May-Grünwald Giemsa.....	142
Recuento de Polimorfonucleares neutrófilos.....	142
Cuantificación de citoquinas.....	143
Cortes histológicos de vagina.....	143
Score de Invasividad e inflamación.....	144
Citometría de flujo.....	145
Preparación de células de nódulos linfáticos drenantes de vagina.....	145
Marcación celular.....	145
Análisis estadístico.....	146
ANEXOS.....	147
Anexo Capítulo II.....	148
Anexo Capítulo III.....	176
BIBLIOGRAFÍA.....	179
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.....	198

# ABREVIATURAS

**ACP:** Análisis de Componentes Principales

**ADN:** Ácido Desoxirribonucleico

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

**AMP:** Péptidos Antimicrobianos (del inglés *Antimicrobial Peptides*)

**ANMAT:** Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica

**ARNm:** Ácido Ribonucleico mensajero

**Bcr1:** del inglés *Biofilm and cell wall regulator 1*

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

**CD:** Células Dendríticas

**CD-número:** Cluster de Diferenciación (del inglés: *Cluster of Differentiation*)

**CE:** Célula Epitelial

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

**CMC:** Candidiasis Mucocutánea Crónica

**CMI:** Inmunidad Mediada por Células (del inglés *Cell-Mediated Immunity*)

**CNA:** *Candida no albicans*

**CPA:** Células Presentadoras de Antígeno

**CR3:** del inglés *Complement Receptor 3*

**CV:** Coeficiente de Variación

**CVV:** Candidiasis Vulvovaginal

**CVVR:** Candidiasis Vulvovaginal Recurrente

**DAMPs:** del inglés *Damage-associated Molecular Patterns*

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

**DMEM:** del inglés *Dulbecco's Modified Eagle's medium*

**Efg1:** del inglés *Enhanced filamentous growth protein 1*

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

**ESM:** Error Estándar de la Media

**FC:** Veces de Cambio (del inglés *Fold Change*)

**FDA:** del inglés *Food and Drug Administration*

**FDR:** del inglés *False Discovery Rate*

**FoxP3:** del inglés *Forkhead box P3*

**GO:** del inglés *Gene Ontology*

**HK-Ca:** *C. albicans* muerta por calor (del inglés *Heat-Killed C. albicans*)

**Hwp:** del inglés *Hyphal wall protein*

**IFN:** Interferón

**IFNAR:** del inglés *Interferon alfa/beta Receptor*

**IFNs-I:** Interferones tipo I

**IL-:** Interleuquina

**ILC:** Células Linfoides Innatas (del inglés *Innate Lymphoid Cells*)

**IRFs:** Factores Reguladores de Interferón (del inglés *Interferon Regulatory Factors*)

**ISGs:** Genes Estimulados por Interferón (del inglés *Interferon-Stimulated Genes*)

**ISGF3:** del inglés *Interferon-Stimulated Gene Factor 3*

**JAK1:** del inglés *Janus Kinase 1*

**LC-MS/MS:** Cromatografía Líquida acoplada a un Espectrómetro de Masas de alta resolución

**LCV:** Lavado Cervicovaginal

**LIP:** Lipasas

**LP:** Lámina Propia

**LPS:** Lipopolisacárido

**MAPK:** del inglés *Mitogen-Activated Protein Kinases*

**MBL:** del inglés *Mannose Binding Lectin*

**MDA5:** del inglés *Melanoma Differentiation-Associated protein 5*

**MET:** Microscopía Electrónica de Transmisión

**MHC:** Complejo Mayor de Histocompatibilidad

**Mincle:** del inglés *Macrophage-Inducible C-Type Lectin*

**MR:** del inglés *Mannose Receptor*

**NK:** del inglés *Natural Killer*

**NL:** Nódulos Linfáticos

**NLR:** Receptor tipo NOD (del inglés *NOD Like Receptors*)

**NLRP3:** del inglés *Nucleotide oligomerization domain like receptor family, pyrin domain containing 3*

**PAMPs:** Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (del inglés *Pathogen Associated Molecular Patterns*)

**PBMC:** Células Mononucleares de Sangre Periférica (del inglés *Peripheral Blood Mononuclear Cells*)

**PBS:** Buffer Fosfato Salino

**pCD:** Células Dendríticas plasmocitoideas

**PEI:** Polietilenimina

**Pi:** Post-infección

**PMN:** Polimorfonucleares

**PRR:** Receptor de Reconocimiento de Patrones (del inglés *Pattern Recognition Receptor*)

**qPCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa en tiempo real

**RLR:** Receptor tipo RIG (del inglés *RIG Like Receptors*)

**S. Inf:** *Score* de Inflamación

**S. Inv:** *Score* de Invasividad

**SAP:** del inglés *Secreted Aspartic Proteases*

**SFB:** Suero Fetal Bovino

**STAT1:** del inglés *Signal Transducer and Activator of Transcription 1*

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

**TGF- $\beta$ :** del inglés *Transforming Growth Factor  $\beta$*

**Th:** Linfocitos T CD4<sup>+</sup> cooperadores (del inglés *T helper lymphocytes*)

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

**TNF:** del inglés *Tumor Necrosis Factor*

**Treg:** Células T regulatorias CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup>

**TYK2:** del inglés *Tyrosine Kinase 2*

**UFC:** Unidades Formadoras de Colonias

**VE:** Vesículas Extracelulares

**VIH:** Virus de la Inmunodeficiencia Humana

**VPH:** Virus Papiloma Humano

**WT:** del inglés *Wild Type*

# INTRODUCCIÓN

## Candidiasis Vulvovaginal

### Conceptos generales y epidemiología

La candidiasis vulvovaginal (CVV) es una infección de la mucosa del tracto genital femenino, extremadamente común, causada principalmente por el hongo oportunista polimórfico *Candida albicans*<sup>1-3</sup>. Como miembro de la microbiota humana normal, *C. albicans* comúnmente coloniza la mucosa vaginal de forma asintomática<sup>4</sup>. Sin embargo, la infección sintomática ocurre como resultado de la pérdida del equilibrio finamente regulado entre los factores de virulencia del hongo y el sistema inmune del huésped<sup>5,6</sup>. Los síntomas comunes de la enfermedad incluyen picazón vaginal, ardor, dolor y enrojecimiento. A menudo, estos se acompañan de una secreción vaginal que consiste en células epiteliales (CE) descamadas, células inmunes, levaduras y fluido vaginal<sup>3,7,8</sup>.

La CVV es la infección humana por *Candida* spp. con mayor prevalencia. Se estima que afecta aproximadamente al 75% de todas las mujeres al menos una vez en su vida y es considerada la segunda causa más común de infección vaginal, antecedida por las vaginosis bacterianas<sup>7,9,10</sup>. La forma recurrente de esta micosis, CVV Recurrente (CVVR) se define por la presencia de al menos cuatro episodios sintomáticos al año<sup>8,11</sup>. Foxman y col. (2013) determinaron en un estudio multicéntrico que la prevalencia de la CVVR es del 9% y la probabilidad de que la CVV progrese a su forma recurrente es alta<sup>12</sup>. Los datos globales analizados permiten estimar que esta forma de micosis afecta aproximadamente a 138 millones de mujeres anualmente en el mundo<sup>12,13</sup>.

En una revisión sistemática reciente que incluyó 17.365 pacientes de 11 países, Denning y col. (2018) estimaron que, siendo la prevalencia global anual de 3.871/100.000 mujeres, y teniendo en cuenta el crecimiento poblacional mundial de mujeres en paralelo con la progresión de la CVVR, se espera un incremento de 158 millones de casos anuales para el año 2030<sup>14</sup>. La mayoría de las mujeres afectadas son pacientes que se encuentran en su edad fértil y productiva y a consecuencia de la patología, su calidad de vida se encuentra afectada impactando de manera negativa en su desempeño social y laboral, por lo que esta patología cobra relevancia en la Salud

Pública<sup>11,12</sup>. En países desarrollados, la carga económica por pérdida de productividad alcanza los US\$14.39 billones anualmente<sup>14</sup>.

En nuestro país, no existen reportes oficiales sobre la prevalencia de la CVV; la información disponible proviene únicamente de las publicaciones realizadas por los grupos de investigación que trabajan en el tema. Se estima que la CVV es también la segunda causa de vaginitis y la especie más frecuentemente aislada es *C. albicans*<sup>8,15-18</sup>. Nuestros datos nacionales establecen que más de medio millón de mujeres anualmente padecen CVVR<sup>18,19</sup>, sin embargo, las pérdidas económicas asociadas a esta patología no se encuentran estimadas.

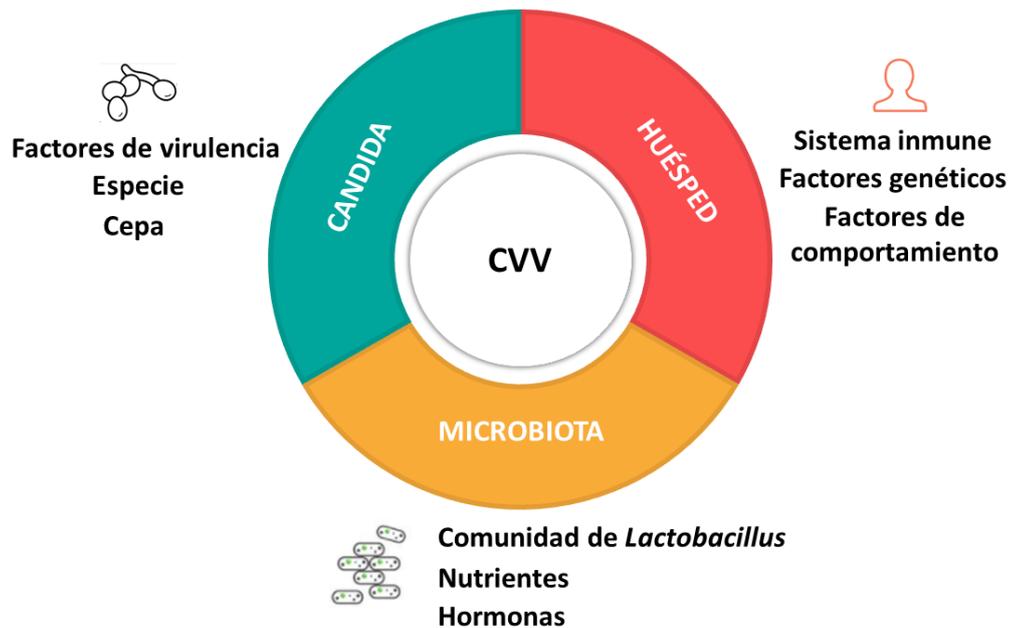
### **Distribución de especies**

Si bien *C. albicans* es el agente causante de más del 90% de los casos de CVV, se han identificado otras especies de *Candida* no-*albicans* (CNA) como agentes etiológicos. En algunos casos, la prevalencia de especies de CNA es desproporcionadamente alta, superando el 50%<sup>20</sup>, estando asociada en la mayoría de los casos a la distribución geográfica y su circulación regional<sup>14</sup>. De las especies de CNA, *C. glabrata* se considera la segunda causa principal de CVV (~8% de los casos), mientras que *C. krusei*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* constituyen la mayoría del resto<sup>14,20</sup>. Los síntomas vaginales resultantes de la infección con especies de CNA a menudo se informan cómo más leves que los experimentados durante la CVV causada por *C. albicans*<sup>3</sup>.

Estudios locales realizados por nuestro grupo, demostraron que en pacientes con CVV, *C. albicans* estuvo presente en el 93% de los aislados clínicos y el 7% restante correspondió a *C. glabrata*, mientras que en los aislados recuperados de pacientes con CVVR la especie prevalente fue *C. albicans* (95,6%), seguida por *C. guilliermondii* en un 2.7% y 1.5% correspondiente a *C. glabrata*<sup>8,21</sup>.

## Factores predisponentes

La CVV es considerada un trastorno multifactorial, en el que es probable que una composición desequilibrada de la microbiota vaginal, factores predisponentes del huésped y la genética, así como características inherentes a las cepas de *Candida* spp., favorezcan la aparición de la enfermedad<sup>10</sup> (Figura 1).



**Figura 1. Factores que contribuyen a la aparición de la CVV.** La CVV es una patología multifactorial. Cada sección del círculo representa los principales factores que contribuyen a la inmunopatogénesis de la CVV. Se requieren factores del huésped (rojo), del patógeno (verde) y de la microbiota (amarillo) para impulsar la aparición de la enfermedad y la infección sintomática (Adaptado de Rosati y col. 2020<sup>10</sup>).

El microbioma vaginal está habitado comúnmente tanto por comunidades bacterianas, principalmente representadas por el género *Lactobacillus* (*L. iners* y *L. crispatus*), como por levaduras. Se cree que las especies de *Lactobacillus* favorecen un microbioma vaginal saludable al acidificar el medio a través del metabolismo anaeróbico del glucógeno a ácido D-láctico y de la producción de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), inhibiendo el crecimiento y la invasión de *Candida*<sup>22,23</sup>. Se demostró que diferentes condiciones que alteran el microbioma vaginal tales como cambios en la comunidad de *Lactobacillus* productores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (por ej., *L. acidophilus*, *L. gasseri* y *L. vaginalis*), cambios en la composición de nutrientes (fuentes de carbono, eicosanoides),

así como elevados niveles de estrógenos (terapia de reemplazo de estrógenos, fase lútea o embarazo) favorecen la adherencia de *Candida* al epitelio de la mucosa vaginal y el crecimiento de levaduras, aumentando el riesgo de contraer CVV<sup>24-26</sup>.

Además, se sugiere que un amplio espectro de factores predisponentes relacionados con el huésped, como la Diabetes Mellitus tipo 2, los regímenes de inmunosupresión, la terapia prolongada con antibióticos, así como factores de comportamiento relacionados al uso de anticonceptivos, dispositivos intrauterinos<sup>11,13</sup> y el estrés crónico<sup>27</sup> promueven la aparición de CVV. Sin embargo, dado que alrededor del 20-30% de las pacientes con CVV son mujeres sanas sin factores predisponentes, también se postula que las diferencias interindividuales, como la infección con diferentes especies de *Candida* y factores genéticos, podrían jugar un papel clave en la patogenia idiopática de la CVV<sup>28,29</sup>.

Aunque se cree que las causas predisponentes antes mencionadas explican algunos casos de CVV en todo el mundo, queda por dilucidar qué contribuye a la transición de la CVV esporádica a la CVVR<sup>10</sup>.

### **Factores genéticos asociados a la susceptibilidad a CVV**

Los descubrimientos de polimorfismos o mutaciones genéticas en individuos que poseen una mayor susceptibilidad a las infecciones por *Candida*, aportaron nuevas evidencias sobre los receptores, las citoquinas, las vías de señalización y los mecanismos efectores que participan en el control de la candidiasis en humanos.

En relación a receptores inmunes, se reportó que el polimorfismo no sinónimo P631H de TLR2 (*Toll-like receptor 2*) está involucrado en un aumento en la susceptibilidad a la CVVR<sup>30,31</sup>. Nuestros resultados en un modelo murino de CVV en animales deficientes en TLR2, corroboraron estos hallazgos y aportaron evidencia sobre la relevancia de este receptor en el reconocimiento inmune temprano del hongo, la invasión tisular y en el inicio de la respuesta inflamatoria local<sup>8</sup>.

Por otra parte, Babula y col. (2005) demostraron que pacientes portadores homocigotos del polimorfismo en IL-4<sup>32</sup>, asociado a un aumento en la producción de esta citoquina, presentaron mayor susceptibilidad a la CVVR debido a una disminución

en los niveles de mediadores antifúngicos como óxido nítrico y MBL (*Mannose Binding Lectin*) en lavados cervicovaginales (LCV).

Lev-Sagie y col. (2009) describieron una asociación entre polimorfismos en el gen que codifica al NLRP3 (*NLR family pyrin domain containing 3*) y la aparición de CVVR<sup>33</sup>. También se demostró que el genotipo 12/9 del gen se encuentra presente de manera diferencial en pacientes con CVVR comparado con controles y que la concentración de IL-1 $\beta$  en LCV de las pacientes con este genotipo se halla aumentada de manera significativa<sup>34,35</sup>.

Respecto a receptores inmunes de la familia de los CLR (*C-Type lectin receptors*), se describió que el número variable de repeticiones en tándem en el gen *MBL2* que codifica el receptor soluble MBL se encuentra asociado a mayor susceptibilidad de las pacientes a desarrollar CVVR<sup>35-37</sup>.

La importancia del receptor Dectin-1 en la defensa antifúngica en mucosas se demostró al comprobarse la asociación del polimorfismo Y238X en este receptor con la presencia de infecciones mucocutáneas por *Candida*, entre ellas CVVR. Este polimorfismo provoca un cambio del aminoácido 238 de tirosina a un codón de terminación, generando la pérdida de los últimos 9 aminoácidos del dominio de reconocimiento de carbohidratos. Este reconocimiento deficiente de los  $\beta$ -(1,3) glucanos redujo significativamente la producción de citoquinas como IL-17, IL-6 y TNF (*Tumor Necrosis Factor*) en monocitos de sangre periférica<sup>38</sup>. Además, se reportó que una mutación puntual (Q295X) en el gen *CARD9* (*Caspase Recruitment Domain Family member 9*), que codifica para la molécula adaptadora de la señalización intracelular de Dectin-1, impide la correcta activación de dicha vía, dando como resultado una disminución del número de células efectoras Th17 productoras de IL-17 y un mayor riesgo de CVVR<sup>39</sup>.

También se demostraron asociaciones entre Candidiasis Mucocutánea Crónica (CMC) y ciertas inmunodeficiencias como el Síndrome Poliendócrino Autoinmune tipo-I, Síndrome de Hiper IgE, mutaciones en el gen *STAT1* (*Signal Transducer and Activator of Transcription 1*), alteraciones en el receptor de la IL-17 y deficiencia en la IL-17F<sup>40-43</sup>.

Estas evidencias en su conjunto señalan la importancia de las fallas en los mecanismos inmunes de respuesta en estos pacientes y su rol en la etiopatogenia de esta micosis.

## ***Candida albicans***

### **Características generales**

*C. albicans* es un microorganismo comensal que forma parte de la microbiota normal de aproximadamente el 50% de la población mundial <sup>44</sup>. Como comensal, *C. albicans* coloniza las superficies mucocutáneas de la boca, la piel, el tracto genital femenino y el tracto gastrointestinal de la mayoría de los seres humanos sanos <sup>45</sup>, sin embargo, bajo condiciones de predisposición adecuadas, puede ocurrir la transición de su estado comensal a patogénico <sup>8,46</sup>.

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 del individuo, produjo un cambio significativo en la comprensión de la interacción patógeno-huésped en esta micosis <sup>47,48</sup>. En el caso de este patógeno que posee la capacidad de colonizar diferentes tejidos, cobran importancia las características fisiológicas del nicho infectado y la respuesta inmune sitio-específica <sup>49-51</sup>. 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 la expresión de sus genes en un proceso de adaptación al nicho biológico que coloniza <sup>45,52,53</sup> y de exhibir un perfil particular de factores de virulencia de acuerdo al sitio de infección <sup>49,51</sup>.

### **Composición de la pared celular**

La superficie de *C. albicans* está compuesta por una pared celular, una estructura externa que define la forma y proporciona fuerza física a la célula fúngica, que constituye una barrera eficiente contra la respuesta inmune del huésped y protege al

hongo del estrés ambiental y la presión osmótica<sup>54</sup>. Esta pared constituye el 30% del peso seco de la célula y está compuesta por  $\beta$ -(1,3) (40%) y  $\beta$ -(1,6) glucanos (20%), quitina (5%), correspondiendo el porcentaje restante a otras proteínas fuertemente manosiladas y lípidos<sup>55,56</sup>.

La pared celular de *C. albicans* desempeña varias funciones importantes para la supervivencia del hongo en un huésped inmunocompetente y para iniciar una infección: (i) portar determinantes antigénicos importantes; (ii) iniciar el contacto con las células del huésped; (iii) mediar la adherencia del patógeno a las superficies; y (iv) cumplir un rol indispensable en la invasión tisular, estableciendo de este modo una interacción dinámica (*Cross-talk*) con su hospedador<sup>57</sup>.

Varias de estas estructuras son clasificadas como PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*)<sup>5</sup>, haciendo referencia a estructuras altamente conservadas durante la evolución, relevantes para la sobrevivencia del patógeno. Los PAMPs son reconocidos por receptores de la inmunidad innata presentes en las células del huésped, agrupados bajo el nombre genérico de PRRs (*Pattern Recognition Receptors*). El reconocimiento de los patógenos por medio de estos sensores promueve una rápida respuesta local, capaz de gatillar mecanismos efectoros o condicionar el perfil de la respuesta inmune adaptativa<sup>58</sup>. 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 activados en la célula del huésped ante el encuentro con el patógeno<sup>5,8,17</sup>.

A lo largo de los años, diferentes estrategias experimentales empleando agonistas de los PRRs, permitieron establecer la relevancia de los componentes de la pared del hongo y comprender los mecanismos de respuesta antifúngica<sup>59</sup>.

Los  $\beta$ -(1,3) glucanos de la pared fúngica ejercen efectos potentes sobre el sistema inmunológico, estimulando la actividad antimicrobiana, por ej., al unirse a los receptores de los macrófagos y otras células, y activando diferentes vías de señalización<sup>60</sup>. Aunque se sabe que los  $\beta$ -(1,3) glucanos se unen a varios PRRs, Dectin-1, es uno de los receptores que se encuentra mejor caracterizado<sup>59,61,62</sup>. El modelo actual de activación de Dectin-1 establece que solo los  $\beta$ -glucanos en forma de partículas pueden activar la señalización. El  $\beta$ -(1,3) glucano Curdlan, un polímero lineal de alto

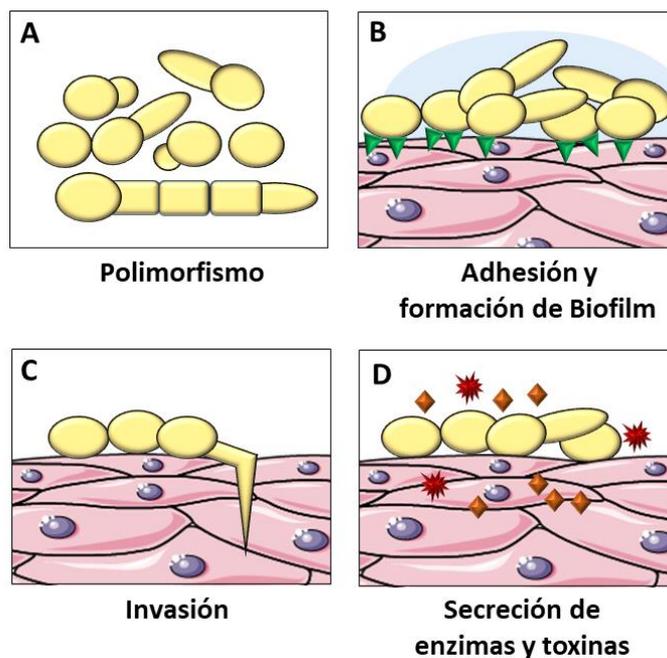
peso molecular <sup>63</sup>, es el agonista de Dectin-1 más utilizado para el estudio del rol de este importante PRR en la inmunidad antifúngica <sup>64</sup>.

## Factores de virulencia y mecanismos de patogenicidad

### *Polimorfismo fúngico*

*C. albicans* es un hongo pleiomórfico y su habilidad para crecer en diferentes morfotipos: levaduras, pseudohifas e hifas verdaderas, constituye uno de los factores de virulencia más relevantes <sup>65</sup>. Tradicionalmente, las formas filamentosas de *C. albicans* (hifas y pseudohifas o pseudomicelios) son consideradas patógenas, mientras que las levaduras principalmente comensales <sup>45</sup>. Esta morfogénesis es promovida por una variedad de condiciones ambientales, como la temperatura y la disponibilidad de nutrientes, que señalizan a través de diferentes vías y activan una variedad de circuitos transcripcionales regulatorios <sup>45,65</sup> (Figura 2A).

Las hifas de *C. albicans* expresan numerosos factores de virulencia, como las adhesinas, enzimas hidrolíticas, proteínas de defensa antioxidantes e incluso una toxina peptídica citolítica descrita recientemente, cuyas características serán desarrolladas con mayor detalle más adelante <sup>45,66,67</sup>.



**Figura 2. Principales factores de virulencia de *C. albicans*.** **A) Polimorfismo:** capacidad del hongo para llevar a cabo transiciones morfológicas (levaduras, pseudohifas e hifas verdaderas), le permite adaptarse a diferentes condiciones de crecimiento. **B) Adhesión y formación de biofilm:** una batería de adhesinas en el hongo promueve la adhesión a superficies biológicas y abióticas, lo que puede conducir al desarrollo de biofilm. **C) Invasión:** una combinación de endocitosis inducida y penetración activa promueve la invasión fúngica de los tejidos del huésped. **D) Secreción de enzimas y toxinas:** *C. albicans* es capaz de secretar múltiples hidrolasas como SAP (*Secreted Aspartic Proteases*) y LIP (Lipasas), como así también la toxina Candidalísina que promueven la invasión y el daño celular (Adaptado de Pekmezovic y col. 2019<sup>68</sup> y d'Enfert y col. 2020<sup>49</sup>). Figura creada con imágenes adaptadas de Servier Medical Art por Servier.

El mayor potencial de virulencia de las hifas en comparación con otros morfotipos se demostró de manera concluyente a partir de experimentos realizados con cepas de *C. albicans* que presentan mutaciones por delección o inserción<sup>69</sup>. En un trabajo con modelos animales y con cepas de *C. albicans* con delecciones en reguladores transcripcionales que participan en la transición de levadura a hifa (*bcr1*<sup>-/-</sup>, *efg1*<sup>-/-</sup>, *cph1*<sup>-/-</sup> triple mutante y *efg1*<sup>-/-</sup> *cph1*<sup>-/-</sup> doble mutante), Peters y col. (2014) determinaron el rol crucial de Efg1 (*Enhanced filamentous growth protein 1*) durante la morfogénesis y una menor participación de la vía de Bcr1 (*Biofilm and cell wall regulator 1*) en este fenómeno<sup>70</sup>. La sobreexpresión de factores de transcripción responsables del mantenimiento de los distintos morfotipos como NRG1 (levadura) y UME6 (hifa) corroboraron la importancia de los cambios morfogénicos en la activación de los mecanismos inmunes que participan en la patogénesis de la infección y pusieron en evidencia la relevancia de la transición de levadura a hifa como un importante factor de virulencia en la CVV.

### **Adhesión y formación de biofilm**

Durante la infección vaginal en modelos *in vivo* y *ex vivo* es frecuente observar hifas de *C. albicans* fuertemente adheridas a la superficie cornificada del epitelio vaginal e incluso infiltrando el estrato subepitelial<sup>52,71</sup>. La adhesión del hongo a las CE es un paso inicial y un requisito previo importante para el inicio de la infección<sup>72,73</sup> (Figura 2B). Se demostró que el gen que codifica la adhesina Als3 (*Agglutinin-like sequence 3*), principalmente asociado a hifas, se encuentra sobreexpresado durante la infección

epitelial *in vitro*<sup>74</sup>. Sin embargo, esta proteína también actúa como invasina al unirse a los receptores de la célula huésped como E-cadherina, induciendo así endocitosis por parte de las células<sup>75</sup>. Además, Als3 juega un papel importante en la formación de biofilm<sup>76</sup>. Otras adhesinas de *C. albicans*, incluidas Hwp1, Hwp2 (*Hyphal wall protein 1 y 2*) y Rbt1, también tienen múltiples funciones, principalmente relacionadas con el desarrollo de biofilm.

La formación de biofilm por microorganismos patógenos es una estrategia eficaz para su supervivencia en el huésped, ya sea evitando la exposición total a los agentes antimicrobianos y/o escapando de los mecanismos de defensa del sistema inmune<sup>77</sup>. La presencia de biofilm sobre la mucosa vaginal se reportó en modelos *ex vivo* de tejido vaginal reconstituido y en cultivos *in vitro* de líneas de CE con el hongo<sup>77-80</sup>.

En un estudio reciente, Swidsinski y col. (2019) analizaron biopsias de tejido vaginal de mujeres sanas, mujeres con Vaginosis Bacteriana y mujeres con CVV mediante fluorescencia de hibridización *in situ* y determinaron que las lesiones histopatológicas de la CVV son principalmente de naturaleza invasiva y polimicrobiana sin presencia de biofilm<sup>81</sup>. Sin embargo, algunos autores proponen que es razonable asumir que los biofilm de *Candida* tengan un rol importante durante la CVVR ya que el patrón de recurrencia coincide con el modelo de infecciones recurrentes por biofilm propuesto por Lewis (2010)<sup>82</sup>, en el que las células persistentes son las principales responsables<sup>83</sup>. Nuestro grupo de investigación evaluó la capacidad formadora de biofilm en aislados provenientes de LCV de pacientes con CVV de un episodio y CVVR. Se determinó que todas las cepas de *Candida* recuperadas de los distintos grupos de pacientes presentaron entre alta y buena capacidad formadora de biofilm<sup>84</sup>, corroborando la presencia de este factor de virulencia asociado a la infección vaginal.

Al presente, no existen estudios concluyentes que evidencien la formación *in vivo* de biofilm de *Candida* durante la CVV y CVVR<sup>80</sup>. 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.

## ***Invasión***

La invasión de células y tejidos del huésped proporciona una estrategia eficaz para acceder a más nutrientes, evitar la competencia con otros miembros de la microbiota y, potencialmente, escapar del tratamiento antimicrobiano (Figura 2C). Se conocen dos rutas distintas para la invasión de epitelios y endotelios para *C. albicans*: endocitosis inducida y penetración activa <sup>73,85</sup>.

Experimentos de purificación por afinidad con cepas de *C. albicans wild type* (WT) y mutantes en la adhesina-invasina *als3*<sup>-/-</sup> demostraron que se requiere Als3 para que el hongo se una a múltiples proteínas de la superficie de la célula huésped. Entre ellas se incluye la N-cadherina en las células endoteliales y la E-cadherina de CE, como así también al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, *Epidermal Growth Factor Receptor*) de las CE orales para inducir la captación de células fúngicas a través de la remodelación del citoesqueleto del huésped <sup>75,86-88</sup>.

Por otro lado, la penetración activa se logra mediante el crecimiento de hifas que ejercen fuerzas físicas sobre el tejido del huésped. Esta es la ruta dominante de invasión de hongos en las CE orales y la única ruta observada en los enterocitos <sup>68,73,85</sup>.

## ***Factores secretados para la supervivencia y el daño epitelial***

Las principales hidrolasas extracelulares producidas por *C. albicans* son las SAPs (*Secreted Aspartic Proteases*), fosfolipasas y lipasas (LIP) (Figura 2D). De todas ellas, las SAPs (SAP1-10) han sido las más estudiadas como determinantes claves de la virulencia <sup>89</sup>. Su función biológica principal es la digestión enzimática de proteínas extracelulares complejas con fines nutricionales, y su función secundaria está involucrada en la virulencia, incluida la señalización inmune innata, el daño epitelial y la invasión <sup>90,91</sup>. Los genes *SAP* se expresan en gran medida durante las infecciones vaginales tanto en ratas como en ratones, y tienen distintos niveles de expresión en muestras clínicas <sup>78</sup>. Nuestros estudios en aislados clínicos de pacientes con CVV y CVVR demuestran la preponderancia de la producción de SAP como factor de virulencia, siendo la frecuencia observada mayor en las cepas recuperadas de mujeres con la forma recurrente de la micosis <sup>92</sup>. De manera interesante, un estudio en un modelo murino de

vaginitis demostró que la sobreexpresión de *SAP2* o *SAP5* fue insuficiente para inducir una inmunopatología, lo que sugiere que las contribuciones fisiológicas de SAPs a la inmunopatogenia de la infección vaginal requieren factores adicionales, como la formación de hifas (y la producción de toxinas), para provocar una infección sintomática <sup>68,90</sup>.

Durante los últimos años se observó un aumento en la evidencia que avala el rol de las LIP de *Candida* como atributo de virulencia de este hongo. Estas enzimas están involucradas en la activación de células inmunes, polarización de los macrófagos al perfil M2 e inducción de daño celular tanto en células inmunes como parenquimales <sup>48,93</sup>. A nivel de los tractos mucosos, reportamos que los aislados clínicos de lesiones premalignas (Cáncer Oral y Liquen Plano) y crónicas producen niveles significativos de LIP <sup>94,95</sup> observándose una mayor expresión del gen *LIP9* en cepas aisladas de pacientes con Cáncer Bucal <sup>96</sup>. A nivel vaginal, la mayor frecuencia y actividad enzimática se observó en los aislados clínicos de pacientes con CVV comparados con cepas recuperadas de mujeres con CVVR <sup>84</sup>.

La toxina peptídica citolítica "candidalisina", fue descrita recientemente en *C. albicans* y es la primera toxina descubierta en un hongo patógeno humano<sup>97</sup>. Daña directamente las membranas epiteliales, desencadena una vía de señalización de la respuesta al daño y activa la inmunidad epitelial a través del EGFR <sup>98,99</sup>.

## **Reconocimiento inmune de *C. albicans* y respuesta inmune efectora en el tracto genital femenino**

### **Receptores de la inmunidad innata**

El sistema inmune innato constituye la primera línea de defensa contra los patógenos y protege ampliamente contra los microorganismos invasores. Los PRRs son utilizados por las células innatas para el reconocimiento de PAMPs presentes en *C. albicans*. La señalización activada desencadena diversas respuestas celulares y mecanismos antifúngicos, que ayudan a iniciar las respuestas inmunitarias adaptativas.

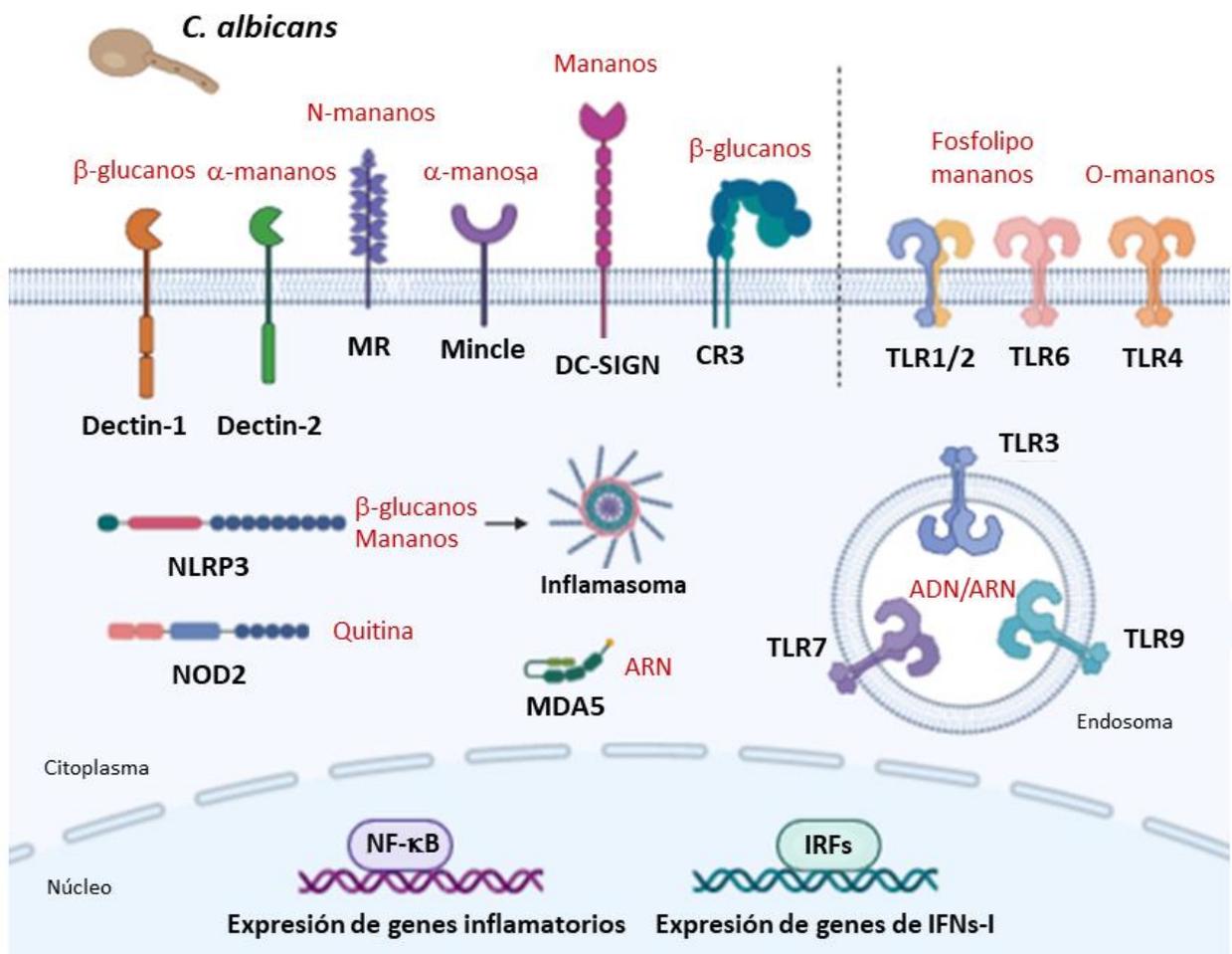
En el reconocimiento de los PAMPs de *Candida* spp. intervienen varias familias de PRRs. Ellas son: Receptores Tipo Toll (TLRs), Receptores de Lectinas Tipo C (CLRs, *C-Type Lectin Receptors*), Receptores Tipo NOD (NLRs, *NOD-Like Receptors*) y los Receptores tipo RIG (RLRs, *RIG-Like Receptors*)<sup>49,100-102</sup> (Figura 3).

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<sup>17,102</sup>.

### **TLRs**

Los TLRs son proteínas transmembrana conservadas evolutivamente que detectan patógenos extracelulares e intracelulares en endosomas y lisosomas<sup>102,103</sup>. Esta familia de receptores está compuesta por TLR1, 2, 4, 5 y 6, localizados en la membrana plasmática de las células, mientras que TLR3, 7 y 9 se localizan en compartimentos intracelulares como endosomas.

Diferentes PAMPs de *Candida* son reconocidos por la familia de TLRs: TLR2, reconoce fosfolipomananos, TLR4 estructuras ricas en mananos, TLR7 reconoce el ARN fúngico y TLR9 al ADN de *Candida*<sup>8,104-106</sup> (Figura 3).



**Figura 3. Receptores de Reconocimientos de Patrones involucrados en la interacción con *C. albicans*.** Receptores de las familias TLR, CLR, NLR y RLR presentes en diferentes poblaciones celulares involucrados en el reconocimiento de PAMPs de *C. albicans*. Luego de contactar con sus ligandos (rojo), a través de diversas vías de señalización y activación de factores de transcripción como NF- $\kappa$ B e IRFs, se producen diferentes eventos biológicos en las células blanco tales como inducción de fagocitosis, producción de especies reactivas del oxígeno y secreción de citoquinas (Adaptado de Becker y col. 2014<sup>107</sup>, Miró y col. 2016<sup>17</sup>). Figura creada con imágenes de BioRender.

La señalización de TLRs induce la activación de cascadas de kinasas, llevando a la activación de factores de transcripción como NF- $\kappa$ 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 IRFs (*Interferon Regulatory Factors*). Este proceso induce la expresión de genes y la producción de diferentes citoquinas, por ejemplo, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF, Interferones tipo I (IFNs-I), quimiocinas y moléculas requeridas para la presentación antigénica y la coestimulación<sup>102,105,108,109</sup>.

**CLRs**

Los CLRs y sus vías de señalización son esenciales para la inmunidad antifúngica<sup>103</sup>. 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. Está constituida por Dectin-1, Dectin-2, Mincle (*Macrophage-Inducible C-Type Lectin*), DC-SIGN (*DC-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*), MR (*Mannose Receptor*) y CR3 (*Complement Receptor 3*).

Dentro de esta familia el receptor más estudiado es Dectin-1, que posee como ligando los  $\beta$ -(1,3) glucanos de la pared del hongo<sup>60</sup>. Dectin-1 se expresa principalmente en células mieloides, aunque también puede expresarse en CE de manera diferencial según el tipo de tejido<sup>110,111</sup>. Su activación inicia vías de señalización intracelulares complejas como la de Syk-CARD9 (*Spleen tyrosine Kinase-CARD9*) y Raf-1 (*Raf-1 Proto-Oncogene Serine/Threonine Kinase*), independiente de Syk<sup>100,102</sup>. La señalización conduce a la activación de factores de transcripción (principalmente NF- $\kappa$ B) y la subsecuente transcripción de genes para iniciar una multitud de respuestas celulares, que incluyen fagocitosis, producción de citoquinas, estallido respiratorio y activación de inflammasomas<sup>100,102</sup>. La señalización de Dectin-1 también activa los factores de transcripción IRF1, IRF5 y NFAT (*Nuclear Factor of Activated T-cells*) en células presentadoras de antígeno (CPA). El IRF5 se activa de manera dependiente de CARD9 e induce la producción de IFN $\beta$ , cuyo papel en la defensa antifúngica sistémica aún es controvertido<sup>59,112,113</sup>.

**NLRs**

Los NLRs se localizan en el citosol celular y, según su dominio N-terminal, se dividen en cuatro subfamilias: NLRA, NLRB, NLRC y NLRP.

El NLR mejor caracterizado en términos de inmunidad antifúngica es NLRP3, que constituye un componente clave del inflammasoma. El inflammasoma es un complejo multiproteico caracterizado por la activación de la Caspasa-1 y la posterior producción de IL-1 $\beta$  e IL-18<sup>47,114</sup>.

NLRP3 es expresado por muchas células, incluidos macrófagos, células dendríticas (CD), células T, células B y CE<sup>114</sup>. La transcripción de la pro-IL-1 $\beta$ , que luego será clivada por la Caspasa-1, está asociada a señales generadas a partir de TLR2/TLR4 y Dectin-1, y la liberación de la IL-1 $\beta$  a la actividad de los inflammasomas<sup>115</sup>. De manera relevante, Roselletti y col. (2017) demostraron que la activación del inflammasoma NLRP3 por los factores de virulencia SAP2 y 6 de *C. albicans* juega un papel crítico para la patogénesis en la CVV humana<sup>116</sup>.

El rol del inflammasoma NLRP3 en las respuestas inflamatorias se ha investigado ampliamente; sin embargo, recientemente se identificó al inflammasoma Caspasa-11 y fue clasificado como un inflammasoma "no canónico". Los estudios emergentes han destacado su papel en la inflamación<sup>117</sup>.

Por su parte, Wagener y col. (2014) describieron que el reconocimiento de quitina de *C. albicans* por el receptor NOD2, perteneciente a la subfamilia NLRC, cumple un rol inhibitorio de la inflamación *in vivo* ocasionada por la infección peritoneal con el hongo<sup>118</sup>.

### **RLRs**

Los RLRs son receptores de reconocimiento de patógenos citoplasmáticos que reconocen y se unen al ARN no propio para activar la inmunidad innata<sup>103</sup>.

Se expresan en células inmunes y no inmunes y regulan las vías de señalización que promueven la producción de IFNs-I e IFNs-III, tradicionalmente asociados con la inmunidad antiviral<sup>114</sup>. Se demostró en macrófagos, que el RLR MDA5 (*Melanoma Differentiation-Associated protein 5*) es activado específicamente por las hifas de *C. albicans*, y los pacientes que padecen CMC expresan niveles más bajos de *MDA5* que los controles sanos<sup>119</sup>.

Además, esplenocitos de ratones *Mda5*<sup>-/-</sup> y células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC, *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) con diferentes genotipos de *IFIH1* (*Interferon Induced With Helicase C Domain 1*) muestran una respuesta de citoquinas alterada frente a *C. albicans*<sup>103,119</sup>, con aumento de IFN $\gamma$  e IL-17 y disminución en la producción de IL-10.

El estudio de polimorfismos y mutaciones de diferentes PRRs en pacientes susceptibles a determinadas infecciones fúngicas y el empleo de modelos animales deficientes en PRRs o moléculas involucradas en su cascada de señalización han aportado significativamente al conocimiento de estos receptores<sup>46,119</sup>.

### **Respuesta inmune innata en el tracto genital femenino**

El tracto genital femenino presenta características anatómicas e histológicas particulares, relacionadas a su biología y su función. El epitelio que recubre la vagina y el cérvix actúa como barrera protectora y funcional conservando la integridad del tracto. En relación a los mecanismos de respuesta contra *C. albicans*, la respuesta inmune local posee un rol relevante durante la vaginitis<sup>1,4,8,70</sup>.

La inmunidad innata de la vagina y el cérvix en humanos involucra componentes físicos, químicos y celulares. Las interacciones entre estos componentes forman un microambiente complejo que media las respuestas inmunes en el tracto<sup>35</sup>.

#### ***Barreras físicas: Rol relevante de las CE***

Hace una década, comenzó a apreciarse el papel de las CE en la homeostasis y la inmunidad. Ahora sabemos que las CE no solo actúan como una barrera física contra patógenos, alérgenos y sustancias extrañas, sino que también constituyen la primera línea de defensa mediante la expresión de una amplia gama de PRRs. Los TLRs son ampliamente expresados por CE, mientras que la expresión de CLR es menos definida. Los estudios sugieren que el MR se expresa en las CE de diversos tejidos y que Dectin-1 puede inducirse en las CE después del encuentro microbiano<sup>114</sup>. En CE del tracto genital femenino, observamos expresión constitutiva de este último PRR y que el contacto *in vitro* con *C. albicans* produce un aumento de su expresión<sup>84</sup>.

Además de su capacidad para reconocer directamente hongos, las CE también participan en la fagocitosis fúngica y la producción de alarminas, quimiocinas y citoquinas<sup>102,107</sup>. Por ej., las CE producen mucinas y péptidos antimicrobianos (AMP, *Antimicrobial Peptides*), como  $\beta$ -defensinas y catelicidina, que pueden reprimir la invasión tisular y mostrar actividades fungicidas directas<sup>8</sup>. Curiosamente, el dimorfismo

fúngico puede ser visto como una señal de peligro por las CE, ya que pueden discriminar entre levaduras comensales y formas hifales patógenas de *C. albicans*, respondiendo a través de una vía de señalización NF- $\kappa$ B y MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) bifásica, destacando la importancia de las CE en el mantenimiento de poblaciones comensales <sup>120</sup>.

Los modelos experimentales *in vitro* han contribuido de manera significativa al avance del conocimiento sobre el rol activo de las CE en la respuesta del huésped frente a *Candida*. En relación al estudio de la CVV, las líneas celulares epiteliales humanas HeLa<sup>71,84,121-126</sup> proveniente de carcinoma cervical, y VK2/E6E7 <sup>127-131</sup> de origen vaginal, son las más utilizadas para el estudio de la interacción patógeno-huésped.

### ***Componentes solubles***

Los patrones moleculares asociados a daño (DAMPs, *Damage-associated molecular patterns*) y las alarminas, son moléculas liberadas por las células como consecuencia de un daño infringido por un patógeno, apoptosis o necrosis. Algunos ejemplos incluyen ADN, fibronectina, proteínas S-100, proteínas de fase aguda, ATP (*Adenosine Triphosphate*), entre otros. Yano y col. (2014) determinaron que las CE vaginales producen alarminas S100A8 y S100A9 en respuesta a *C. albicans* que conducen a un fuerte reclutamiento de células polimorfonucleares (PMN) durante la CVV <sup>132</sup>.

Es ampliamente conocido que citoquinas y quimiocinas como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, y TNF están involucrados en los mecanismos inmunoregulatorios involucrados en la homeostasis local, donde la citoquina antiinflamatoria TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor  $\beta$* ) ejerce un papel central.

Los AMP son expresados por numerosas células del tracto genital femenino en respuesta al hongo, principalmente por PMN y CE <sup>133</sup>. Dentro de los diferentes AMPs, las defensinas humanas (tanto  $\alpha$  como  $\beta$ ) se encuentran entre los más ampliamente caracterizadas y abundantes en el tracto genital inferior, incluida la vagina <sup>134,135</sup>. Estos AMP pueden destruir a los microorganismos mediante la formación de poros en la pared celular, inhibiendo su adhesión o mediante el reclutamiento de células inmunes al sitio de la infección <sup>136</sup>. Nuestro grupo demostró, a través del uso de un modelo

murino de CVV, que en respuesta a una infección vaginal aguda por *C. albicans*,  $\beta$ -Defensina 1 y 3 aumentan su expresión en el epitelio y en PMN. Otra importante contribución fue el hallazgo sobre la expresión diferencial de  $\beta$ -Defensina 1 en pacientes con CVV de un episodio y CVVR. Mientras que en LCV de pacientes con episodios agudos, la infección vaginal por *Candida* aumenta los transcritos de este AMP y mantiene los niveles proteicos constitutivos, durante la CVVR no se observaron cambios a nivel transcripcional, pero si una franca disminución de  $\beta$ -Defensina 1. La expresión proteica de  $\beta$ -Defensina 3 en estos pacientes también estuvo severamente disminuida <sup>92</sup>, demostrando que tanto los niveles del AMP constitutivo, como el inducible se encuentran suprimidos en la forma recurrente de esta micosis.

### ***Componentes celulares***

Los PMN están presentes a lo largo de todo el tracto genital femenino y son las células principalmente reclutadas al sitio de la infección durante la respuesta inflamatoria contra *C. albicans*. Además de la fagocitosis y la potente actividad fungicida, estas células también responden mediante la producción de compuestos oxidativos, liberando AMP y citoquinas para su propia estimulación o para el reclutamiento de otras células <sup>8,35</sup>. Otras células inmunes innatas importantes en el tracto incluyen macrófagos, CD y células NK (*Natural Killer*) que en conjunto constituyen el 10% del total de leucocitos presentes en el tracto genital femenino <sup>137,138</sup>. Los macrófagos y las CD actúan como CPA profesionales para inducir respuestas inmunitarias adaptativas <sup>139</sup>. Además, la secreción de IFN $\gamma$  por las células NK en la vagina provocan la activación de los macrófagos y generan respuestas de células T cooperadoras y citotóxicas <sup>35,137</sup>.

Las células recientemente clasificadas como ILC (*Innate Lymphoid Cells*) se encuentran principalmente en las superficies mucosas. La contribución de las ILC en las infecciones fúngicas es un área nueva con resultados difíciles de conciliar en la actualidad <sup>102</sup>. Se demostró que ILC3, productoras de IL-17 e IL-22, juegan un papel importante en la candidiasis oral <sup>140</sup>.

## Respuesta inmune adaptativa en el tracto genital femenino

Durante mucho tiempo se creyó que la susceptibilidad a la vaginitis por *Candida* era el resultado de defectos en la respuesta inmune adaptativa similares a los de otras formas de candidiasis mucosas (oral, CMC o gastrointestinal) en las que se demostró que la susceptibilidad depende de las células T<sup>141,142</sup>. Sin embargo, numerosos estudios clínicos que examinaron a mujeres con CVVR no mostraron inmunodeficiencias humorales o mediadas por células<sup>143,144</sup>. Esto se vio reforzado por el hecho de que no hubo un aumento de la prevalencia de CVV/CVVR en mujeres VIH (Virus de la Inmunodeficiencia Humana) positivas, con un número reducido de células T CD4+<sup>145,146</sup>. Esta evidencia clínica fue consistente con los resultados de modelos murinos que no revelaron funciones protectoras para la inmunidad adaptativa local o sistémica (mediada por células (CMI) o humoral)<sup>9,141</sup>. Incluso los intentos de usar terapia génica mediante la inducción de citoquinas de tipo Th1 (una respuesta protectora en la mayoría de las otras formas de candidiasis) en la mucosa vaginal no proporcionaron ningún nivel de protección<sup>147</sup>. Esto se explica en parte por la producción relativamente alta de factores inmunoreguladores (por ej., TGF- $\beta$ , células T reguladoras (Tregs) y células T $\gamma\delta$ ) en la vagina, lo que puede limitar la inmunidad local mediada por células como mecanismo de tolerancia<sup>142,148</sup>.

La activación de células Th17 induce la liberación de IL-17, una citoquina proinflamatoria multifuncional, que aumenta aún más el reclutamiento de PMN, quimiocinas y AMP, lo que promueve una respuesta inflamatoria eficaz<sup>149</sup>. En relación a esta población celular, los estudios demuestran que la inhibición de la diferenciación de las células Th17 condujo a una disminución considerable de la producción de IL-17 y  $\beta$ -defensina 2 con la consiguiente exacerbación de la CVV<sup>150,151</sup>. Sin embargo, algunos trabajos han sugerido que la respuesta inflamatoria durante la CVV se produce independientemente del linaje celular Th17<sup>144,152,153</sup>. En relación a estos conceptos, nuestro grupo condujo un estudio en pacientes en el que se determinaron los niveles intravaginales de diversas citoquinas. Sobre un total de 83 LCV, de mujeres sanas (n=27) y de pacientes con CVV (n=18) y CVVR (n=48), no detectamos expresión basal de esta citoquina, ni aumento asociado tanto a la forma aguda como recurrente de la micosis<sup>84,92</sup>.

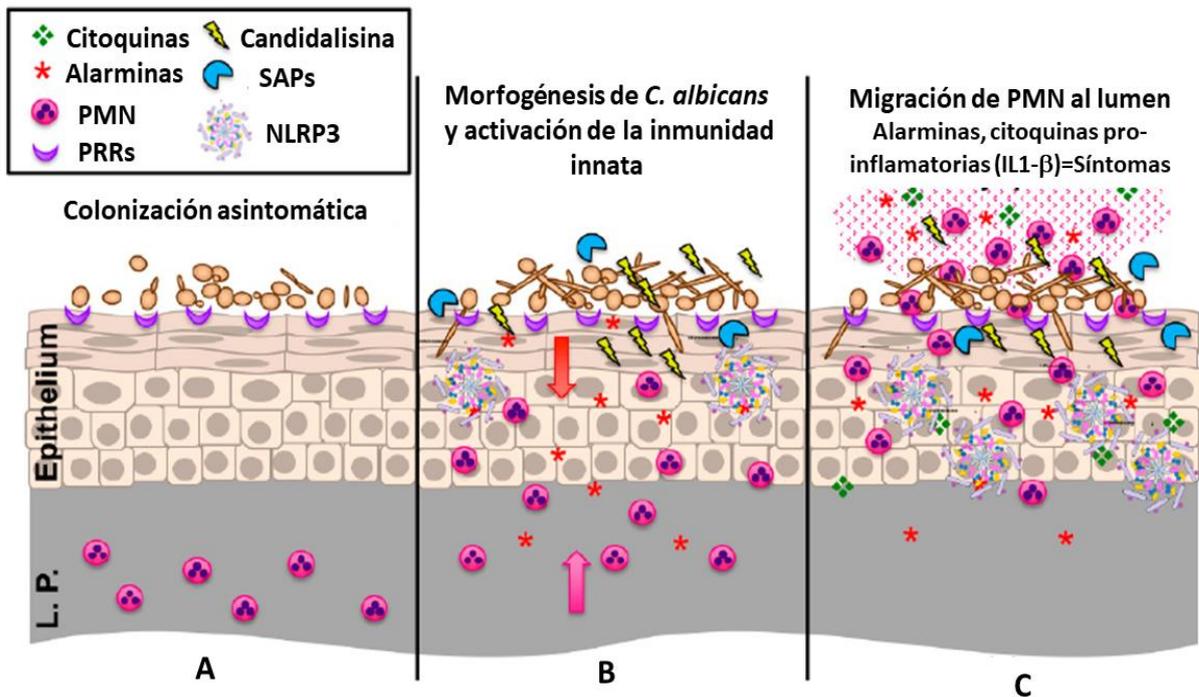
Mientras que para la infección oral por *C. albicans* la evidencia sobre el rol de inmunidad adaptativa mediada por células Th17 es abundante <sup>154-157</sup>, para la CVV continúa siendo controversial.

### **Inmunopatogenia de la CVV**

Un estudio pionero que se realizó en mujeres voluntarias sanas desafiadas por vía intravaginal con *C. albicans* viable, reveló que en la CVV participan fundamentalmente mecanismos de respuestas inmunes innatas, en los que el reclutamiento de PMN a la luz vaginal se correlacionó positivamente con los síntomas de la enfermedad <sup>9</sup>. Debido al impacto negativo que provoca una respuesta inmune local exacerbada y a las consecuencias de este estado de activación en la progresión de la enfermedad y aparición de los síntomas, la CVV es considerada una enfermedad inflamatoria donde los mecanismos innatos son partícipes centrales en la inmunopatogenia de esta micosis <sup>3</sup>.

Normalmente, las levaduras de *C. albicans* colonizan asintóticamente el epitelio vaginal a pesar de la presencia de numerosos PRRs en la superficie epitelial <sup>99,158</sup>. Sin embargo, el hongo puede experimentar el cambio de levadura a hifa bajo condiciones que favorezcan la morfogénesis (por ej., mayores niveles de estrógeno, pH vaginal elevado, alteración del microbioma). El aumento del reconocimiento por los PRRs, el incremento de la biomasa de las hifas y la expresión de factores de virulencia asociados a las hifas (candidalísina, SAPs) activan al sistema inmune del huésped. La activación y señalización del inflammasoma NLRP3 y otros PRR, aumenta los niveles de citoquinas y quimiocinas inflamatorias como la IL-1 $\beta$  y las alarminas S100A8/9 en el epitelio vaginal, lo que resulta en la migración inicial de PMN desde la lámina propia hacia la luz vaginal.

Las fallas en la regulación de los desencadenantes inmunopatogénicos dan como resultado la acción continua de los mediadores inmunes innatos en el epitelio vaginal. Estas señales iniciales, junto con la amplificación secundaria de los mediadores inmunes provocada por los PMN reclutados, contribuyen a la infección sintomática y la inmunopatología característica de la CVV <sup>3,8,70,159</sup> (Figura 4).



**Figura 4. Inmunopatogénesis de la CVV. A)** Levaduras de *C. albicans* colonizan el epitelio vaginal a pesar de la presencia de numerosos PRRs en la superficie epitelial. **B)** En condiciones que favorecen la morfogénesis, *C. albicans* cambia del morfotipo levaduriforme al hifal y aumenta la expresión de factores de virulencia (por ej. candidalislina, SAP). Esto incrementa el reconocimiento por los PRR, activa la señalización del inflamasoma NLRP3, y el aumento de las citoquinas y quimiocinas inflamatorias (IL-1 $\beta$ , alarminas S100A8/9) en el epitelio vaginal, lo que resulta en la migración inicial de PMN desde la lámina propia (LP) hasta la luz vaginal. **C)** La falta de control adecuada de la respuesta inmune iniciada en el epitelio vaginal contribuye a un estado de hiperinflamación local que caracteriza a la infección sintomática y a la aparición de la inmunopatología (Adaptado de Willems y col. 2020<sup>3</sup>).

Los PMN son considerados las células inmunitarias innatas más relevantes para la inmunopatología de la CVV<sup>2</sup>. A pesar del reclutamiento masivo de PMN en respuesta a *C. albicans*, la evidencia acumulada indica claramente que estas células no logran reducir la carga fúngica durante el estado sintomático de la enfermedad<sup>70,132</sup>. En relación a esto, Yano y col. (2017 a y b) demostraron en un modelo animal que la disfunción de los PMN durante la CVV se debe a la presencia del proteoglicano Heparan Sulfato en el microambiente vaginal que actúa como un inhibidor competitivo de la interacción *C. albicans*-PMN. La interacción defectuosa con esta célula, caracterizada por su actividad candidicida, provoca fallas en la eliminación del hongo y

el control de su crecimiento<sup>2,160</sup>. Los autores definen este fenómeno como “anergia de PMN”<sup>2,142</sup>.

Se requiere de mayores estudios para comprender completamente los mecanismos inmunológicos y el rol de células y mediadores que intervienen en el control y remoción del hongo durante la CVV, como así también los eventos que determinan su progresión a CVVR. La investigación orientada a la búsqueda de nuevos roles aún no descriptos para mediadores inmunes en la respuesta antifúngica en mucosas, contribuye no solo a acrecentar el conocimiento sobre la inmunopatogenia de esta micosis, sino a vislumbrar nuevas vías de tratamiento para una enfermedad de elevada incidencia y difícil terapéutica.

## **Interferones tipo I**

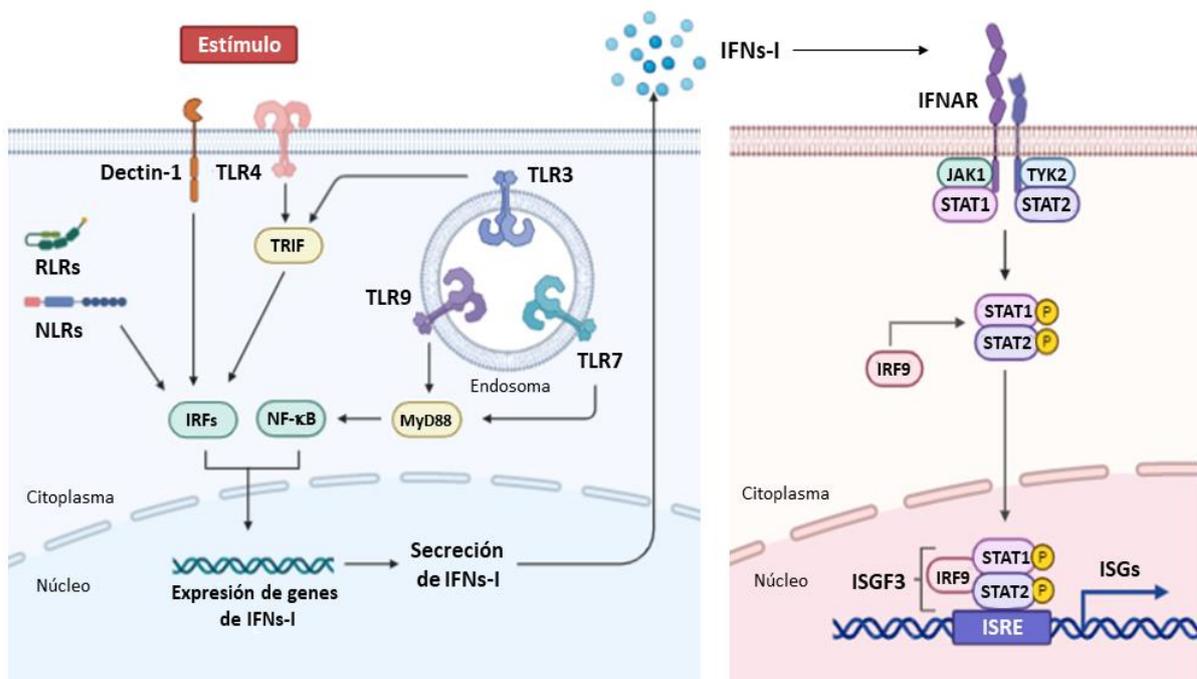
Los IFNs-I constituyen una familia de citoquinas que regulan la resistencia a virus, aumentan la inmunidad innata y adaptativa, y modulan la supervivencia y apoptosis de distintos tipos celulares. Los IFNs-I más estudiados son los IFN $\alpha$ , familia compuesta por 13 subtipos y el IFN $\beta$ , donde sólo un miembro fue identificado en humanos y en ratón<sup>161</sup>. Las respuestas mediadas por IFNs-I constan de dos fases o etapas<sup>162,163</sup>:

### **Inducción y señalización de IFNs-I**

#### ***Inducción de la producción de IFNs-I***

Casi todas las células del organismo pueden producir IFNs-I, y esto suele ocurrir en respuesta a la activación de PRRs citosólicos (RIG-I, MDA5, NOD2), superficiales (TLR4, Dectin-1) o endosomales (TLR3, 7, 9)<sup>162,164</sup>. La posterior activación de diversas cascadas de señalización converge en los factores de transcripción IRFs, que activan la transcripción de los genes que codifican IFN $\alpha/\beta$ . En la mayoría de los casos, IRF3 e IRF7 son los IRFs fundamentales requeridos. El IRF3 se expresa de manera ubicua, mientras que el IRF7 se expresa solo a niveles muy bajos, excepto en las CD plasmocitoideas (pCD) donde es relativamente abundante. El principio central de la producción de IFN $\alpha/\beta$  es que los genes *IFNB* e *IFNA4* se inducen en una ola inicial de transcripción

que se basa principalmente en IRF3, para luego desencadenar la transcripción de IRF7. Esto da como resultado un ciclo de retroalimentación positiva, que induce una segunda ola de transcripción de genes, potenciada por IRF7, impulsando al máximo la expresión



de IFNs-I<sup>165,166</sup> (Figura 5).

**Figura 5. Mecanismos involucrados en la producción de IFNs-I y su vía de señalización.**

Diferentes estímulos pueden inducir la producción de IFNs-I en las células de huésped a través de la activación de PRRs como TLRs, CLRs, RLRs y NLRs. Todas estas vías conducen a la activación de los factores de transcripción NF-κB e IRFs para iniciar la transcripción de los IFNs-I. Una vez secretados, los IFNs-I se unen al receptor IFNAR y activan la vía transcripcional JAK-STAT. El complejo transcripcional formado (ISGF3) trasloca al núcleo y se une a secuencias específicas de ISRE para iniciar la transcripción de varios ISGs importantes para la muerte celular, la proliferación celular y las respuestas inmunitarias (Adaptado de Malireddi y Kanneganti 2013<sup>163</sup>) Figura creada con imágenes de BioRender.

**Señalización de IFNs-I e inducción de Genes Estimulados por IFN (ISGs)**

Los IFNs-I señalizan de forma autócrina o parácrina a través del receptor común IFNAR (*IFNα/β Receptor*) formado por dos cadenas, IFNAR1 e IFNAR2. La unión de estas citoquinas a su receptor activa las quinasas JAK1 (*Janus Kinase 1*) y TYK2 (*Tyrosine*

*Kinase 2*) asociadas al receptor, que fosforilan los factores de transcripción citoplasmáticos latentes, STAT1 y STAT2.

Una vez fosforiladas, las moléculas de STAT1 y STAT2 dimerizan y se ensamblan con el IRF9 para formar un complejo trimolecular llamado ISGF3 (*Interferon-Stimulated Gene Factor 3*) que trasloca al núcleo. Allí, el complejo ISGF3 se une a determinadas secuencias del ADN, que se conocen como elementos de respuesta estimulados por IFN (ISRE), para activar la transcripción de ISGs involucrados en la producción de moléculas con diferente actividad biológica <sup>162,167</sup> (Figura 5).

PRRs, IRFs y varias proteínas transductoras de señales descritas anteriormente, como JAK2, STAT1/2, IRF7 e IRF9, se encuentran presentes en niveles basales en las células, pero también son ISGs y su expresión refuerza la vía de IFNs-I en la llamada segunda ola de activación. Muchos ISGs controlan infecciones dirigiéndose directamente a las vías y funciones necesarias durante los ciclos de vida de los patógenos, algunos ejemplos son Mx1 y Mx2 (*Myxovirus resistance 1 y 2*), IFITM (*IFN-Inducible Transmembrane*), ISG15, entre otros. Otros ISGs codifican reguladores negativos de la señalización que ayudan a revertir el estado inducido por los IFNs-I y facilitan el retorno a la homeostasis celular como las proteínas SOCS (*Suppressor Of Cytokine Signaling*) y USP18 (*Ubiquitin Specific Peptidase 18*). Otros ISGs codifican proteínas proapoptóticas, lo que conduce a la muerte celular en determinadas condiciones como Caspasa-8 <sup>168</sup>.

### **Interferones tipo I en la respuesta inmune frente a *Candida* spp.**

Los IFNs-I son mediadores críticos de la defensa inmune innata que fueron descubiertos originalmente por su acción contra las infecciones virales <sup>161</sup>. Sin embargo, estas citoquinas también se producen en respuesta a diferentes infecciones bacterianas y fúngicas <sup>113</sup>.

En relación a los patógenos fúngicos, la información es muy escasa y la mayoría de los estudios fueron realizados en modelos de candidiasis sistémica que involucra mecanismos inmunes y patogénicos diferentes a los reportados a nivel de los tractos

mucosos<sup>49,51</sup>. En este escenario las estrategias experimentales se concentran en evaluar la respuesta de células inmunes clásicas como CD y macrófagos expuestas al hongo.

Las evidencias derivadas de estudios *in vitro* realizados con CD y macrófagos cultivados en presencia de *Candida* spp. demostraron que PRRs como TLR7, TLR9 y Dectin-1 están involucrados en la inducción de IFN $\beta$ <sup>105,112,113,169</sup>. Sin embargo, experimentos *in vivo* en modelos animales de infección sistémica por el hongo (candidemia), presentan resultados contradictorios con respecto al rol de estas moléculas<sup>112,113,170</sup>. Se descubrió que la señalización mediada por IFNs-I es necesaria para varios procesos, incluida la inducción de los intermediarios reactivos de oxígeno necesarios para la muerte de *C. albicans* por las células fagocíticas<sup>169</sup> y para atraer leucocitos (en particular PMN) al sitio de la infección, aumentando así la supervivencia de ratones con candidiasis diseminada<sup>112</sup>. Curiosamente, otro estudio en ratones WT e *Ifnar1*<sup>-/-</sup> (deficientes en el receptor de IFNs-I) infectados sistémicamente con *Candida* spp., demostró que los IFNs-I promueven el reclutamiento de PMN y monocitos inflamatorios al sitio blanco de la infección ocasionando una inmunopatología letal<sup>113</sup>. También se reportó que la inducción previa de IFNs-I mediante Poly (I:C) (ligando de TLR3) aumenta la susceptibilidad de ratones frente a la infección sistémica con *C. albicans*, mediante la supresión de IL-1 $\beta$  y la actividad del inflamasoma<sup>171</sup>.

Smeekens y col. (2013) demostraron mediante un estudio genómico funcional, en PBMC humanas estimuladas *in vitro* con *C. albicans*, una fuerte inducción de genes involucrados en las vías de respuesta de los IFNs-I. Este perfil fue diferente al inducido por la estimulación de las células con LPS (Lipopolisacárido) de *Escherichia coli*, y con las bacterias *Borrelia burgdorferi* y *Mycobacterium tuberculosis*, destacando la particularidad de la respuesta frente al hongo. Estos mismos autores reportaron la asociación de defectos en la expresión de genes de la vía de señalización de los IFNs-I en CD de pacientes con CMC<sup>172</sup>.

## **Interferones tipo I en CVV**

En la actualidad existe escasa evidencia sobre el rol de los IFNs-I durante la infección por *C. albicans* en el tracto genital femenino.

Un estudio interesante reportó la remisión de una paciente con CVVR de 17 años de duración y con registro de episodios mensuales al ser tratada contra una infección por el VPH (Virus Papiloma Humano) con imiquimod<sup>173</sup>. El imiquimod es un agente inmunomodulador, utilizado para el tratamiento de numerosas afecciones cutáneas, aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*) y ANMAT (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica) para tratar verrugas anogenitales y perianales causadas por el VPH, carcinoma basocelular y queratosis actínicas. Una extensa experiencia desarrollada en ensayos clínicos y reportes de casos, ha validado su uso en otras afecciones<sup>174-176</sup>. El imiquimod actúa como agonista de TLR7 estimulando la inmunidad innata y la producción de IFNs-I. Kofler y col (2013) observaron que luego del tratamiento tópico prolongado con esta droga, la paciente no necesitó más terapia antifúngica y mostró una remisión prolongada de la patología. Los autores sugieren ser plausible el efecto de esta droga en CVVR resistente a tratamientos convencionales<sup>173</sup>.

Nuestro equipo de investigación demostró con un grupo numeroso de pacientes con CVVR, que el tratamiento con imiquimod asociado al tratamiento clásico con fluconazol produjo, luego de 6 y 12 meses, la remisión de los síntomas en el 92% de las pacientes vs el 44% de las pacientes que recibieron sólo el tratamiento antifúngico<sup>177</sup>.

Por otro lado, Li y col. (2017, 2019) proponen un novedoso tratamiento contra la CVV empleando IFN $\alpha$ -2b recombinante humano. Mediante estudios *in vitro* con CE vaginales humanas e *in vivo* en un modelo con ratas, demostraron que el tratamiento podría inhibir la adhesión, la formación de hifas y la proliferación de *C. albicans* como así también restaurar la función inmune de las células<sup>128,178</sup>.

Los eventos que inducen la activación de la vía de IFNs-I, así como sus mecanismos de respuesta frente a la infección por *C. albicans* en el tracto genital femenino continúan siendo grandes interrogantes hasta el presente.

# OBJETIVOS

A pesar de los avances terapéuticos, la prevalencia de la CVV y la CVVR continúa siendo elevada afectando a millones de mujeres 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 se encuentran resueltos. Muchos de los eventos que subyacen a las interacciones entre el hongo y las células residentes a nivel del tracto genital femenino continúan siendo desconocidos.

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 la contribución de los IFNs-I en la inducción de los mecanismos inmunológicos locales involucrados en el control y crecimiento de *C. albicans* y en la inmunopatogenia de CVV. Evaluar el rol del receptor innato Dectin-1 en la inducción de IFN $\beta$  a nivel del tracto genital femenino.

### **Objetivos específicos**

- I-** Estudiar de la activación de la vía de IFNs-I en CE del tracto genital femenino. Determinar la relevancia del dimorfismo de *C. albicans* y del reconocimiento inmune de  $\beta$ -glucanos y material genético del hongo en su inducción.
- II-** Realizar un estudio proteómico cuantitativo de los procesos biológicos y vías reguladas diferencialmente en CE del tracto genital femenino en interacción con *C. albicans*. Evaluar la importancia del receptor de Dectin-1 en estos procesos.
- III-** Estudiar de la contribución de los IFNs-I y su vía de señalización en la respuesta antifúngica durante la infección vaginal por *C. albicans*.

# RESULTADOS

## CAPÍTULO I

### **Estudio de la activación de la vía de IFNs-I en CE del tracto genital femenino. Relevancia del dimorfismo de *C. albicans* y del reconocimiento inmune de $\beta$ -glucanos y material genético del hongo en su inducción.**

En el tracto genital femenino, el epitelio cervicovaginal constituye una barrera activa que desempeña importantes funciones en la inmunovigilancia y defensa del organismo. Dotado de un amplio espectro de PRRs, posee la capacidad de detectar la presencia de diferentes microorganismos, distinguir entre aquellos que forman parte de la microbiota comensal y los que son patogénicos, y dar inicio a una respuesta inflamatoria local o participar en los mecanismos homeostáticos de control<sup>8,17</sup>.

Por su naturaleza oportunista, *C. albicans* tiene la capacidad de colonizar el epitelio cervicovaginal como comensal, sin embargo, cuando las condiciones del medio le resultan favorables, es capaz de iniciar su morfogénesis y transformarse en patógeno<sup>11,70,179</sup>. En este contexto, las interacciones de *C. albicans* con las CE son críticas para el crecimiento comensal, la patogenicidad fúngica y la defensa del huésped<sup>44</sup>.

Con el fin de abordar el estudio de la interacción patógeno-CE y establecer aquellos eventos capaces de inducir la activación de la vía de IFNs-I, se utilizó un modelo *in vitro* de CVV empleando la línea celular epitelial HeLa, proveniente de carcinoma cervical, ampliamente reportado en la literatura<sup>71,84,121-126</sup>.

Este modelo se utilizó para evaluar el efecto de los diferentes morfotipos fúngicos, tiempos de contacto CE-patógeno, carga infectiva, componentes de la pared fúngica y material nuclear del hongo en la activación transcripcional de la vía de IFNs-I.

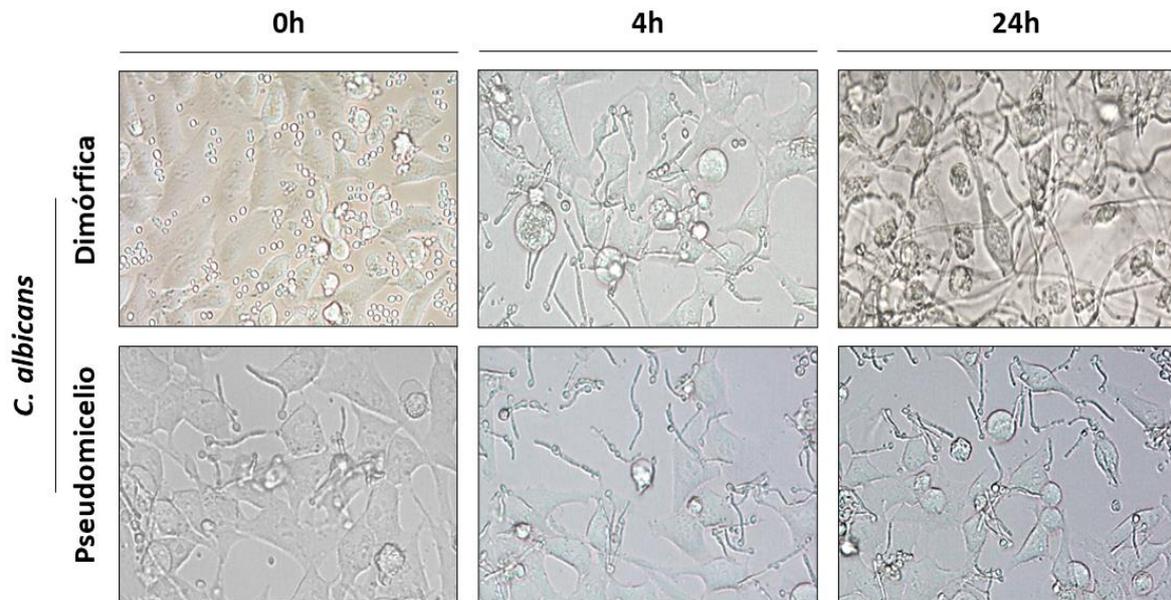
### **Estrategia experimental para el estudio de la relevancia del dimorfismo fúngico sobre la inducción de la vía de los IFNs-I en CE del tracto genital femenino durante la interacción con *C. albicans*.**

El dimorfismo de *C. albicans* es considerado uno de los factores de virulencia más importantes del hongo. La adhesión de *C. albicans* a una CE es un fuerte inductor de la emisión de pseudomicelios y posterior crecimiento de hifas. Es bien conocido que las mismas poseen papeles críticos en la invasión, inducción de daño y activación/evasión inmunológica<sup>180</sup>.

Con el fin de establecer la relevancia del dimorfismo fúngico durante la interacción con las CE y su impacto en la inducción de IFNs-I e IRFs, se diseñó una estrategia experimental empleando la línea celular HeLa y *C. albicans* en distintas condiciones de crecimiento y relaciones hongo: CE.

En la primera condición de trabajo, se incubaron diferentes inóculos de levaduras viables de *C. albicans* con células HeLa y, en este cultivo, el hongo inició su cambio morfológico progresivo a pseudomicelio y posteriormente a hifa verdadera. Este estímulo se denominó ***C. albicans* dimórfica**. Los co-cultivos se realizaron a las dos relaciones de trabajo seleccionadas, 0,25:1 y 5:1, hongo: CE y durante un período de incubación de 4 y 24h.

Para la segunda condición de trabajo, se utilizaron suspensiones de *C. albicans* en DMEM-10% SFB que se incubaron durante 2h a 37°C para permitir la formación del pseudomicelio. Luego de este tiempo, la suspensión de hongos fue tratada con Anfotericina B (dosis inhibitoria y no fungicida), a fin de obtener pseudomicelios viables y estables<sup>181</sup>. El estímulo utilizado en esta condición se denominó ***C. albicans* pseudomicelio**. Los co-cultivos se realizaron a las relaciones, 0,25:1 y 5:1, hongo: CE y durante un período de incubación de 4 y 24h. La Figura 6 muestra imágenes microscópicas representativas de los diferentes estímulos empleados para realizar los estudios cuando la relación entre los morfotipos fúngicos y las CE fue 5:1 y a los tiempos evaluados.



**Figura 6. Estrategia experimental *in vitro* para el estudio de la interacción entre CE humanas HeLa y *C. albicans* dimórfica y pseudomicelio.** Fotografías representativas de cocultivos de células HeLa y *C. albicans* SC5314 en morfotipo dimórfico (panel superior) y pseudomicelio (panel inferior) a una relación hongo:CE de 5:1 a diferentes tiempos de incubación (0, 4h y 24h). Aumento x400.

En el panel superior se muestran las características del cultivo cuando el estímulo empleado fue *C. albicans* dimórfica. A tiempo 0 se observaron las levaduras del hongo en contacto con las CE, luego de 4h de cultivo comienza el proceso de emisión del pseudomicelio, evento clave en la transición entre el estado de comensal al patagénico. A las 24h el morfotipo predominante fue el hifal, comúnmente asociado a la invasión tisular. El panel inferior de la figura muestra las características del cultivo cuando el estímulo empleado fue *C. albicans* pseudomicelio. A tiempo 0 se observa la presencia de los pseudomicelios del hongo en contacto con las CE y la estabilidad del morfotipo mencionado a los restantes tiempos de cultivo, validando con esta observación la estrategia de trabajo.

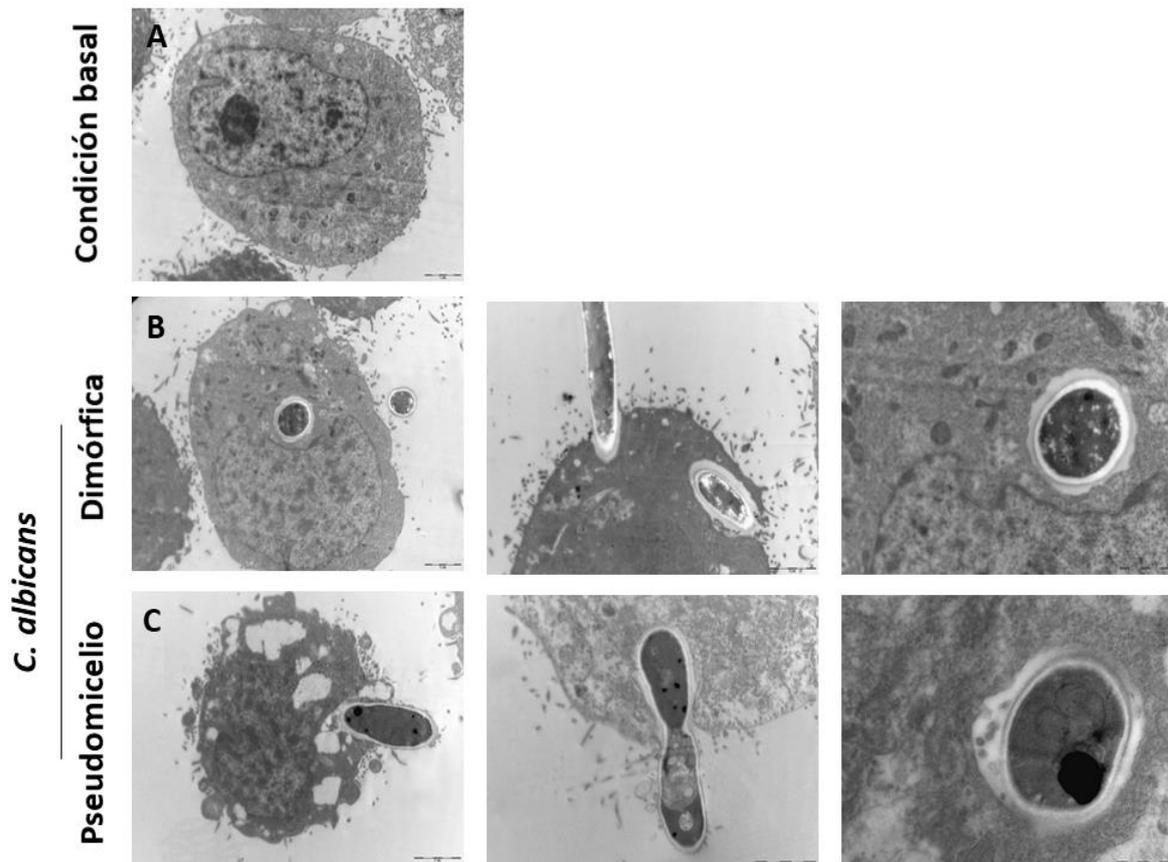
En relación a la magnitud del inóculo empleado, los ensayos demostraron que las células HeLa se mantuvieron viables luego de incubación con pseudomicelios de *C. albicans* en todas las condiciones ensayadas y para los cultivos realizados con la forma dimórfica del hongo, solo la incubación de 24h a la relación 5:1 mostró un marcado sobrecrecimiento fúngico que dificultó el estudio de los parámetros de interés al comprometer la viabilidad celular<sup>84</sup>.

## **Características de la invasión de las CE del tracto genital femenino por diferentes morfotipos *C. albicans***

La invasión y el daño de las CE se consideran características "patogénicas" más que atributos "comensales" de *C. albicans*. A diferencia de las bacterias, que desarrollan varias estrategias para desencadenar la captación por endocitosis inducida, *C. albicans* puede utilizar dos mecanismos de invasión distintos para ingresar a las células del huésped: endocitosis inducida y penetración activa <sup>44</sup>.

La invasión de las CE vía endocitosis inducida depende de cambios en los microfilamentos de la membrana plasmática de las células del huésped, mientras que la penetración activa depende de la viabilidad fúngica. Phan y col. (2007) demostraron que la endocitosis de *C. albicans* por CE es mediada por la interacción entre la adhesina fúngica Als3 y las cadherinas expresadas en las membranas de las células de mamíferos. Esta interacción promueve el reordenamiento del citoesqueleto de actina y la posterior internalización de las células fúngicas<sup>75</sup>. Por otra parte, se postula que la invasión de las CE a través de la penetración activa depende de una combinación de distintos factores como la presión física ejercida por la extensión de las hifas y la secreción de enzimas hidrolíticas liberadas durante el dimorfismo, destacándose el rol de las SAP y la toxina fúngica candidalislina <sup>73,182</sup>. Sin embargo, los mecanismos exactos subyacentes a la penetración activa son, en gran medida, desconocidos.

Con el propósito de establecer cuál es el mecanismo de invasión que rige durante la interacción de las células HeLa y los morfotipos fúngicos empleados como estímulo, se realizaron cultivos de 4h con *C. albicans* dimórfica y *C. albicans* pseudomicelio y se evaluaron por Microscopía Electrónica de Transmisión (MET). La interpretación de los diferentes tipos de interacción *C. albicans*-CE en las imágenes obtenidas se realizó tomando como referencia los trabajos de Wachtler y col. (2012) y Dalle y col. (2010) <sup>73,85</sup>. La Figura 7 muestra imágenes representativas de un co-cultivo de células HeLa con ambos morfotipos de *C. albicans* en una relación 5:1, hongo: CE.



**Figura 7. Interacción *C. albicans*-CE *in vitro*: Microscopía electrónica de transmisión. A)** Fotografías representativas de células HeLa en estado basal **B)** Células HeLa estimuladas con *C. albicans* SC5314 morfotipo dimórfico durante 4h, se observa presencia de penetración activa del hongo sobre las CE. **C)** Células HeLa estimuladas con pseudomicelios de *C. albicans* durante 4h, donde se observa endocitosis inducida por el hongo en las CE. Aumento 4646x, 6000x y 12930x según los paneles de izquierda a derecha.

El panel A de la figura 7 muestra la morfología normal de la CE en cultivo. En las imágenes del panel B se observaron, para la forma dimórfica del hongo, características típicas de penetración activa de *C. albicans*, entre las que se destacan la presencia de invaginaciones y espacios amplios e irregulares entre el hongo y las membranas de las células. También se observó que la invasión fúngica ocurrió con pocos contactos físicos directos entre *C. albicans* y las estructuras de la superficie epitelial. Por otro lado, en el panel C pueden distinguirse características típicas de endocitosis inducida por *C. albicans* pseudomicelio en las CE. Se observaron formas fúngicas engolfadas por las CE y estrechamente rodeadas por las membranas celulares. También pueden distinguirse protrusiones y ondulaciones de la membrana plasmática de las CE alrededor de los

pseudomicelios del hongo. En el corte transversal se observa el hongo completamente internalizado y rodeado estrechamente y de manera uniforme por la membrana celular (panel derecho).

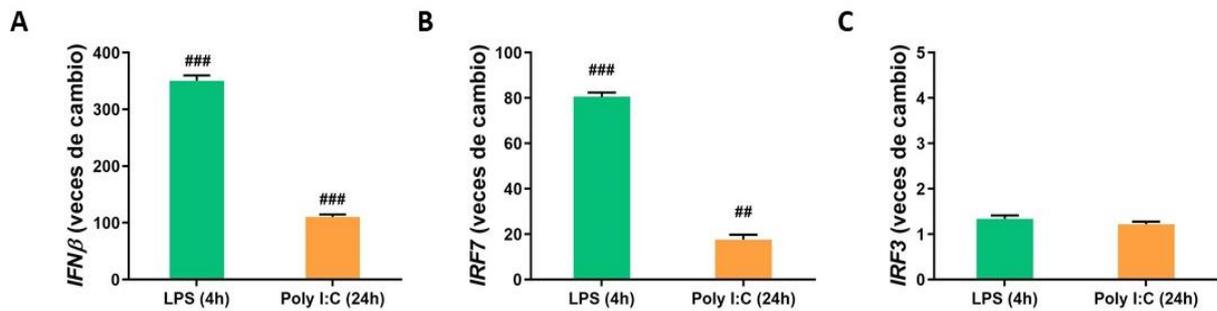
Estos resultados permiten establecer que los distintos estímulos empleados invaden a las CE por dos mecanismos diferentes, pudiendo tener implicancia sobre las vías en estudio.

### **Impacto del dimorfismo fúngico en la inducción de la transcripción de *IFN $\beta$* e *IRFs***

Diferentes autores postulan que, dentro de la familia de IFNs-I, el IFN $\beta$  es la citoquina mayormente involucrada en la respuesta inmune frente a infecciones por *C. albicans*<sup>105,112,169,172</sup>.

Con el propósito de abordar el estudio de la inducción de IFN $\beta$  y los IRFs en las CE del tracto genital femenino, en primer lugar, se evaluó el nivel de respuesta de la vía en estudio utilizando dos activadores clásicos: LPS, agonista del receptor TLR4, conocido inductor de la vía de IFNs-I a tiempos cortos<sup>112</sup> y Poly I:C, agonista de los receptores TLR3, RIG-I y MDA5, ampliamente utilizado como control positivo de activación de la vía de interés<sup>169,183</sup>.

Las CE se cultivaron durante 4h con LPS y 24h con Poly I:C y al cabo de ese tiempo se evaluó el nivel de expresión de transcritos de *IFN $\beta$* , *IRF3* y *IRF7* por RT-qPCR. La figura 8 muestra los resultados obtenidos. El estímulo vía TLR4 produjo un marcado y significativo aumento en la transcripción de *IFN $\beta$*  ( $p < 0,001$ ), acompañado de altos niveles de *IRF7* ( $p < 0,001$ ) respecto a la condición basal en ausencia de estímulo, y escasa inducción de *IRF3*. El estímulo con Poly I:C, empleado como control de activación de la vía luego de 24h de incubación, mostró un aumento de la transcripción de *IFN $\beta$*  ( $p < 0,001$ ), y de *IRF7* ( $p < 0,01$ ) respecto a la condición basal y escasa inducción de *IRF3*. Ambos estímulos indujeron *IFN $\beta$*  e *IRF7*, sin embargo, en las condiciones de trabajo empleadas, el LPS produjo la mayor activación de la vía.

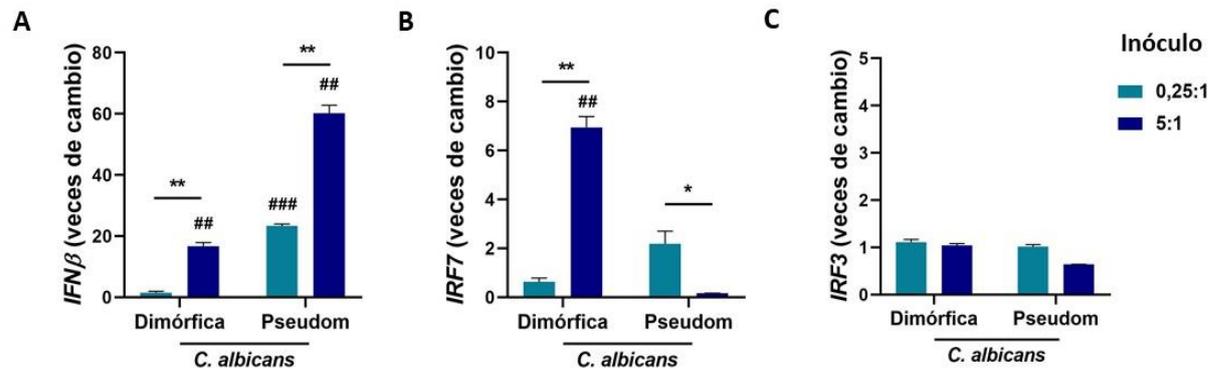


**Figura 8. Expresión de transcritos de *IFNβ*, *IRF7* e *IRF3* en CE HeLa estimuladas con LPS y Poly I:C.** **A)** Veces de cambio de ARNm de *IFNβ*, **B)** *IRF7* e **C)** *IRF3* en CE HeLa estimuladas con LPS durante 4h y Poly I:C durante 24h respecto a la condición basal (células sin estimular), evaluado mediante RT-qPCR. Experimento representativo de tres experimentos independientes. Los valores representan la media  $\pm$  ESM. ## $p < 0,01$ . ###  $p < 0,001$  comparado con la expresión basal.

Durante el curso de un proceso infeccioso, la magnitud del inóculo infeccioso es considerado un factor relevante en la patogenicidad y en la respuesta inmune del huésped. En conocimiento de que *C. albicans* tiene la capacidad de invadir las CE por mecanismos diferentes y que los distintos morfotipos fúngicos empleados como estímulo cumplen con estas características, se evaluó el impacto de diferentes cargas fúngicas sobre la vía en estudio. Las células HeLa se incubaron con *C. albicans* dimórfica y pseudomicelio a relaciones 0,25:1 y 5:1 durante 4h, y al cabo de ese tiempo se determinó el nivel de los transcritos en estudio (Figura 9). A las 4h de cultivo sólo el mayor inóculo del hongo dimórfico fue capaz de activar la transcripción de *IFNβ* ( $p < 0,01$ ), y de *IRF7* ( $p < 0,01$ ), sin modificar la expresión de *IRF3*. Por otra parte, se observó que cuando el hongo ingresa a las CE por endocitosis inducida, como ocurre durante la incubación con pseudomicelios de *C. albicans*, ambos inóculos, y de manera dosis dependiente, activaron la transcripción de *IFNβ* ( $p < 0,01$ ); sin embargo, a pesar del aumento observado, no hubo cambios significativos en la inducción de *IRF7* e *IRF3* respecto a la condición basal.

De manera interesante, se observó que durante el estímulo de las CE con el mayor inóculo (5:1), *C. albicans* pseudomicelio indujo mayores niveles de transcritos de *IFNβ* que *C. albicans* dimórfica (veces de cambio 60 vs 16,  $p < 0,01$ , no indicado en el gráfico), evidenciando la contribución de la vía endocítica durante los eventos tempranos. Sin embargo, solo la penetración activa produjo la transcripción de *IFNβ* e

*IRF7* a las 4h. Este fenómeno puede indicar diferencias en los tiempos necesarios para activar la transcripción de los ISGs, entre ellos *IRF7* (que participa en la retroalimentación positiva de la vía)<sup>166</sup> cuando *C. albicans* invade las CE por mecanismos diferentes.

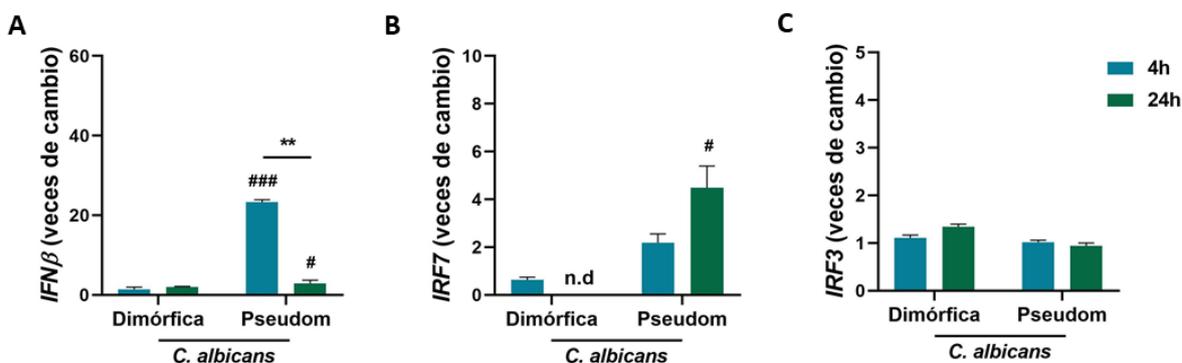


**Figura 9. Expresión de transcritos de *IFNβ*, *IRF7* e *IRF3* en CE HeLa estimuladas con *C. albicans* dimórfica y pseudomicelio a diferentes inóculos. A) Veces de cambio de ARNm de *IFNβ*, B) *IRF7* e C) *IRF3* en células HeLa estimuladas con *C. albicans* dimórfica y pseudomicelio durante 4h a diferentes relaciones hongo:CE (0,25:1 y 5:1), mediante RT-qPCR. Experimento representativo de tres experimentos independientes. Los valores representan la media  $\pm$  ESM. ###p<0,01. ### p<0,001 comparado con expresión basal. \*p<0,05. \*\*p<0,01 comparado entre inóculos.**

Con el propósito de evaluar el efecto del tiempo de exposición al estímulo sobre la activación de la vía en estudio, se realizaron cultivos a 4 y 24h utilizando la relación 0,25:1 hongo: CE. La elección del inóculo indicado se debe a que a la relación 5:1 el sobrecrecimiento fúngico afectó la viabilidad de las CE a las 24h de estímulo<sup>84</sup>. La figura 10 muestra los resultados obtenidos.

*C. albicans* dimórfica, al inóculo testeado, fue incapaz de inducir la transcripción de *IFNβ*, *IRF7* e *IRF3* en CE a los tiempos evaluados, sugiriendo un umbral de activación asociado a la magnitud de la carga fúngica para el inicio de la expresión de los ARNm estudiados. Por otra parte, el ingreso del hongo a las CE por la vía endocítica produjo un aumento en la transcripción de *IFNβ* tanto a las 4h (p<0,001) como a las 24h (p<0,05) respecto a la condición basal, sin embargo, la magnitud de la respuesta fue diferente (23 vs 3 veces de cambio, respectivamente) (p<0,01). A las 24h de interacción

se observó un aumento de la transcripción de *IRF7* en las CE ( $p < 0,05$ ). No se observaron cambios en los niveles de ARNm de *IRF3* en CE a los tiempos evaluados.



**Figura 10. Expresión de transcritos de *IFNβ*, *IRF7* e *IRF3* en CE HeLa estimuladas con *C. albicans* dimórfica y pseudomicelio a diferentes tiempos de interacción. A) Veces de cambio de ARNm de *IFNβ*, B) *IRF7* e C) *IRF3* en células HeLa estimuladas con *C. albicans* dimórfica y pseudomicelio durante 4h y 24h en una relación 0,25:1, mediante RT-qPCR. Experimento representativo de tres experimentos independientes. Los valores representan la media  $\pm$  ESM. # $p < 0,05$ . ###  $p < 0,001$  comparado con expresión basal. \*\* $p < 0,01$  comparando 4h vs 24h.**

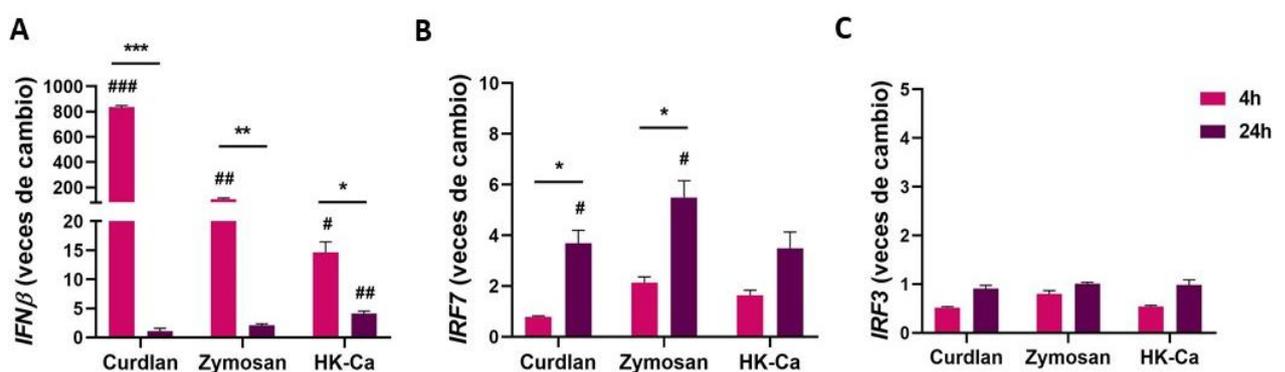
Estos resultados en su conjunto indican que *C. albicans* fue capaz de activar la vía de IFNs-I en CE del tracto genital femenino involucrando al menos a *IRF7* y sugieren que los niveles de expresión de *IFNβ* por estas células está determinado por los diferentes mecanismos de invasión que emplea el hongo, la magnitud del inóculo y que se encuentran favorecidos a tiempos tempranos de la interacción.

### **Contribución del reconocimiento de $\beta$ -glucanos de *C. albicans* en la inducción de la transcripción de *IFNβ* e *IRFs***

Los componentes de la pared de *C. albicans* actúan como PAMPs fúngicos y son reconocidos por PRRs expresados sobre las células del huésped. La familia de CLR s caracteriza por su capacidad de reconocimiento de carbohidratos y su receptor más estudiado es Dectin-1 cuyo ligando son los  $\beta$ -(1,3) glucanos. Del Fresno y col. (2013) describieron que la producción de *IFNβ* por CD inducida por *C. albicans* depende en gran medida de la activación del receptor Dectin-1<sup>112</sup>.

Con el fin de evaluar la relevancia de estos componentes de la pared fúngica en la activación de la vía en estudio en CE, se emplearon diferentes estímulos. Por un lado, Zymosan, un glucano con unidades de glucosa repetidas, unidas por enlaces  $\beta$ -(1,3) glucosídicos, reconocido por los receptores TLR2/TLR6 y Dectin-1 y, por otro, Curdlan, un  $\beta$ -(1,3) glucano que constituye un polímero lineal de alto peso molecular<sup>63</sup>, agonista específico de Dectin-1<sup>64,112</sup>. El tercer estímulo empleado fueron pseudomicelios de *C. albicans* SC5314 muertos por calor (HK-Ca), debido a que es ampliamente aceptado que este tratamiento además de provocar la muerte del hongo produce un aumento en la exposición de los  $\beta$ -glucanos en su pared, por lo tanto, este PAMP es considerado el predominante en estas condiciones<sup>38,112,184</sup>. Las CE se incubaron durante 4 y 24h, la Figura 11 muestra los resultados obtenidos.

Todos los estímulos utilizados activaron la producción de *IFN $\beta$*  luego de 4h de incubación, destacándose los niveles significativamente elevados cuando las células se cultivaron con Curdlan ( $p < 0,001$ ) y en segundo orden de magnitud, luego del tratamiento con Zymosan ( $p < 0,01$ ). De manera interesante, y aunque en niveles significativamente menores, HK-Ca indujo la expresión de ARNm de *IFN $\beta$*  a 4 y 24h ( $p < 0,05$  y  $p < 0,01$ , respectivamente). La transcripción de *IRF7* estuvo significativamente aumentada para Curdlan y Zymosan a las 24h de cultivo ( $p < 0,05$ ). No se observaron cambios en los niveles de *IRF3* en respuesta a ninguno de los 3 estímulos evaluados.



**Figura 11. Rol de los  $\beta$ -glucanos en la inducción de la transcripción de *IFN $\beta$* , *IRF7* e *IRF3* en CE HeLa. A) Veces de cambio de ARNm de *IFN $\beta$* , B) *IRF7* e C) *IRF3* en células HeLa estimuladas con Curdlan (100 mg/ml), Zymosan y *C. albicans* muertas por calor (HK-Ca) (relación 5:1) durante 4h y 24h, mediante RT-qPCR. Experimento representativo de tres experimentos independientes. Los valores representan la media  $\pm$  ESM. # $p < 0,05$ . ## $p < 0,01$ , ### $p < 0,001$  comparado con expresión basal. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  comparando 4h vs 24h.**

Los resultados obtenidos demuestran que el reconocimiento de los  $\beta$ -glucanos por los receptores Dectin-1 presentes en CE del tracto genital femenino, es un evento importante para la inducción de la vía de IFNs-I, principalmente a tiempos cortos de interacción (4h).

### **Contribución de los componentes nucleares de *C. albicans* en la inducción de la transcripción de *IFN $\beta$* e *IRFs***

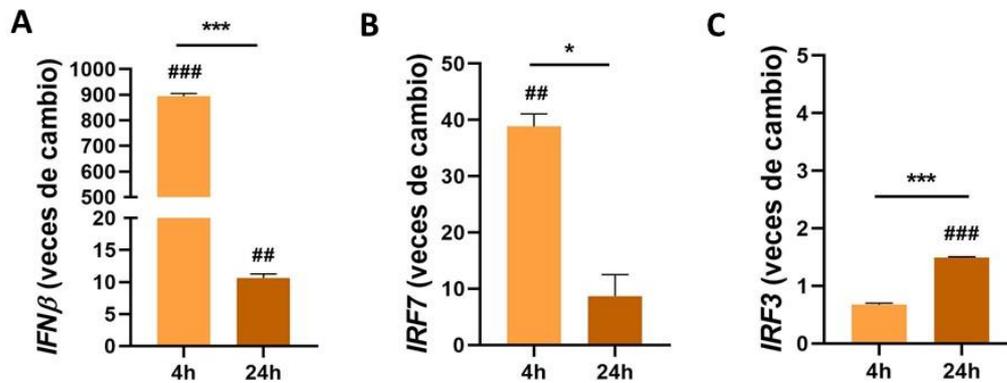
La respuesta inmune frente a las infecciones fúngicas es compleja e involucra la activación de distintos PRRs que reconocen PAMPs tanto en la superficie de la pared celular de los hongos como en su material genético. En los últimos años, el papel de los PRRs intracelulares (TLRs, RIG-I, Inflamasoma) se ha vuelto cada vez más importante en la fisiopatología de algunas micosis, como paracoccidiodomicosis, criptococosis, aspergilosis y candidiasis<sup>185-187</sup>. El reconocimiento de ácidos nucleicos que realizan estos receptores puede ser fundamental para el control de algunas infecciones fúngicas, o pueden resultar perjudiciales para otras<sup>188</sup>.

Estudios recientes demostraron que el reconocimiento de ácidos nucleicos de *Candida* spp. por TLR7 y TLR9 es capaz de inducir la activación de la vía de IFNs-I en CD y macrófagos<sup>113,169,189</sup>.

Con el objetivo de evaluar si el ADN de *C. albicans* es capaz de inducir la activación de la vía de los IFNs-I en CE del tracto genital femenino, se extrajo el material genético del hongo y se acompañó a polietilenimina (PEI), vector polimérico sintético que facilita la captación celular. En presencia de PEI, las moléculas de ADN se condensan y compactan formando el complejo ADN-PEI, de esta manera, adquiere la capacidad de interactuar con restos electrostáticamente negativos como los proteoglicanos de sulfato de heparina en la superficie de las células para ser endocitados/fagocitados<sup>190</sup>.

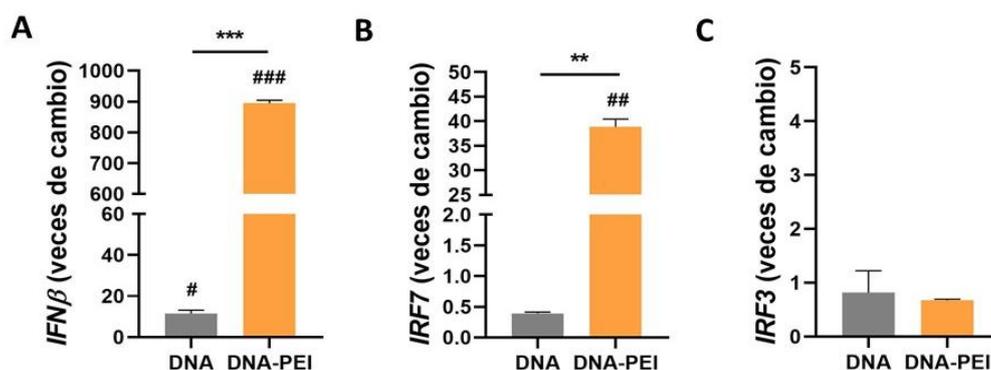
Las CE se incubaron durante 4 y 24h con ADN de *C. albicans*-PEI y se evaluó la vía en estudio (Figura 12). El estímulo de 4h produjo un marcado incremento en los niveles de *IFN $\beta$*  ( $p < 0,001$ ) que estuvo acompañado por un aumento en la transcripción de *IRF7* ( $p < 0,01$ ). El mismo estímulo, con un período de incubación de

24h, también indujo la transcripción de *IFN $\beta$*  ( $p < 0,01$ ) aunque en niveles significativamente menores que a las 4h ( $p < 0,001$ ); además, en estas condiciones se detectó la transcripción de *IRF3* ( $p < 0,001$ ).



**Figura 12. Inducción de la transcripción de *IFN $\beta$* , *IRF7* e *IRF3* en CE HeLa por ADN de *C. albicans* acompañado con PEI. A) Veces de cambio de ARNm de *IFN $\beta$* , B) *IRF7* e C) *IRF3* en células HeLa estimuladas con ADN de *C. albicans* acompañado con PEI durante 4h y 24h, mediante RT-qPCR. Experimento representativo de tres experimentos independientes. Los valores representan la media  $\pm$  ESM. ## $p < 0,01$ , ###  $p < 0,001$  comparado con expresión basal. \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$  comparando 4h vs 24h.**

En otro abordaje experimental, con el objetivo de evaluar si las CE son capaces de sensar el ADN fúngico libre y así activar la vía de IFNs-I, se incubó ADN de *C. albicans* sin acompañar con las células HeLa durante 4h y los resultados obtenidos se compararon con la respuesta frente a ADN-PEI (Figura 13). El ADN fúngico libre también fue capaz de promover la transcripción de *IFN $\beta$*  ( $p < 0,05$ ) pero en niveles significativamente menores que cuando fue acompañado a PEI ( $p < 0,001$ ). En estas condiciones no pudo detectarse actividad transcripcional para *IRF7* e *IRF3*. Esta observación puede estar relacionada con la menor estabilidad del ADN desnudo al ser internalizado por las CE <sup>190</sup>.



**Figura 13. Inducción de la transcripción de *IFN $\beta$* , *IRF7* e *IRF3* en CE HeLa por ADN de *C. albicans* libre y acomplejado con PEI. A)** Veces de cambio de ARNm de *IFN $\beta$* , **B)** *IRF7* e **C)** *IRF3* en células HeLa estimuladas con ADN libre de *C. albicans* y acomplejado con polietilenimina durante 4h, mediante RT-qPCR. Experimento representativo de tres experimentos independientes. Los valores representan la media  $\pm$  ESM. #p<0,05. ##p<0,01. ### p<0,001 comparado con expresión basal. \*\*p<0,01. \*\*\*p<0,001 comparando entre ADN libre y acomplejado.

Los resultados obtenidos demostraron que no solo el reconocimiento de componentes de la pared de *C. albicans* inducen la activación de la vía de IFNs-I, sino que el reconocimiento inmune del ADN del hongo, también tiene relevancia en la inducción de la vía en estudio en CE del tracto genital femenino.

## CONCLUSIONES CAPÍTULO I

### **Estudio de la activación de la vía de IFNs-I en CE del tracto genital femenino. Relevancia del dimorfismo de *C. albicans* y del reconocimiento inmune de $\beta$ -glucanos y material genético del hongo en su inducción.**

- El estudio de caracterización de los mecanismos de invasión de *C. albicans* sobre las CE mediante MET, evidenció que la penetración activa es el principal mecanismo utilizado por el morfotipo dimórfico de *C. albicans* mientras que los pseudomicelios ingresan a las CE mediante endocitosis inducida. Esto define que la interacción de las CE con distintos morfotipos del hongo puede involucrar distintos PRRs en su reconocimiento, lo que se traduce en diferencias en el tipo e intensidad de la respuesta inmune desencadenada.
- La evaluación de la activación de la vía de IFNs-I en CE demostró que, tanto durante la penetración activa como durante la endocitosis inducida de la CE, *C. albicans* fue capaz de iniciar la transcripción de *IFN $\beta$*  con participación de *IRF7*, siendo este efecto dependiente de la magnitud del inóculo y favorecido a tiempos tempranos de la interacción.
- Al estimular las CE con Curdlan y Zymosan se observó una fuerte inducción de la expresión de *IFN $\beta$*  a las 4h; siendo Curdlan, agonista específico de Dectin-1, el estímulo que indujo mayores niveles. Puesto a que también se observó la transcripción de *IFN $\beta$*  luego del estímulo con *C. albicans* muertas por calor, caracterizada por la abundante exposición de  $\beta$ -glucanos en su pared, estos hallazgos sugieren en su conjunto que el reconocimiento de estos polisacáridos de la pared del hongo por el receptor Dectin-1 es un evento de crucial importancia para la activación de la vía de IFNs-I.
- En este estudio, también se determinó que no solo componentes externos de *C. albicans* son capaces de inducir la activación de la vía de IFNs-I, sino que el

reconocimiento de componentes nucleares del hongo también lo hacen. El estímulo de CE con ADN extraído de *C. albicans* indujo la expresión de niveles significativos de *IFN $\beta$*  tanto en forma soluble como acompañado a un sistema que favorece su endocitosis como PEI. En este último caso, la inducción se produjo tanto a las 4h como 24h, pero a través de diferentes *IRFs* (*IRF7* e *IRF3*, respectivamente).

## CAPÍTULO II

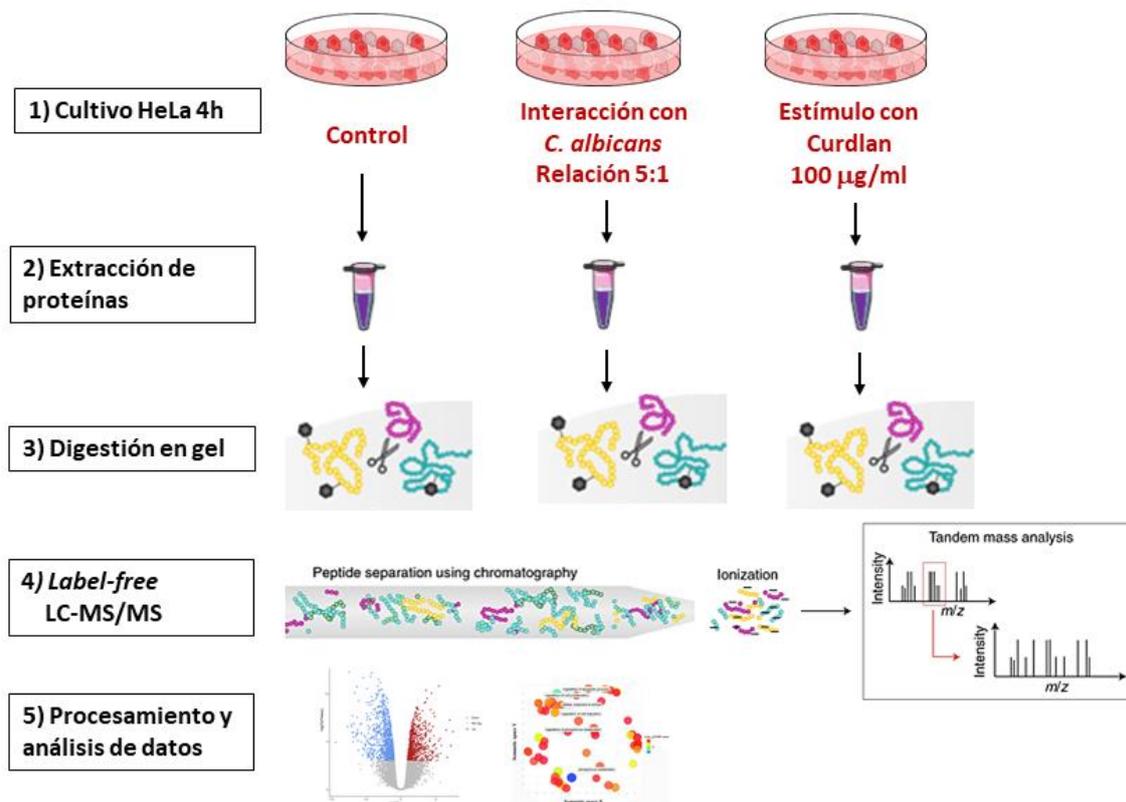
### **Estudio proteómico cuantitativo de los procesos biológicos y vías reguladas diferencialmente en CE del tracto genital femenino en interacción con *C. albicans*. Estudio de la relevancia del receptor de Dectin-1 en estos procesos.**

Las células del epitelio cervicovaginal conforman una barrera activa que protege al tracto genital femenino de la agresión de diferentes microorganismos. La expresión de PRRs en estas células, les confiere la capacidad de detectar la presencia de diferentes patógenos e inducir la activación de vías intracelulares que regulan diversos y complejos procesos que modifican su comportamiento <sup>8,191</sup>.

El estudio *in vitro* de la interacción patógeno-huésped constituye una estrategia sumamente valiosa para analizar los mecanismos celulares involucrados en este evento. Como es ampliamente conocido, las bases biológicas de los procesos celulares no pueden identificarse solo a partir del estudio del genoma y su transcripción; para una mejor comprensión de estos procesos y la forma en que éstos se alteran en las distintas enfermedades, es necesario el estudio de las proteínas y sus interacciones, debido a que éstas definen la complejidad, la estructura y el funcionamiento de un organismo <sup>192</sup>. La proteómica cuantitativa es el método de elección para el análisis de eventos regulados en células, tejidos y otros organismos.

Con el objetivo de estudiar los principales procesos biológicos y vías de señalización reguladas en CE del tracto genital femenino en interacción con *C. albicans*, se llevó a cabo un estudio proteómico cuantitativo mediante la técnica *Label-free* en células HeLa incubadas durante 4h con la cepa de *C. albicans* SC5314, morfotipo dimórfico (relación 5:1). En forma paralela, a fin de estudiar el rol de la activación del receptor innato Dectin-1 en la regulación de diferentes procesos celulares, también se realizó un estudio proteómico de células HeLa estimuladas durante 4h con el  $\beta$ -(1,3) glucano, Curdlan, agonista de este receptor.

El esquema experimental empleado en este estudio se muestra en la Figura 14.



**Figura 14. Esquema experimental proteómica cuantitativa *label-free*.** Se cultivaron CE HeLa sin estímulos (control), estimuladas con una suspensión de *C. albicans* SC5314 morfotipo dimórfico en una relación hongo:célula 5:1 y estimuladas con el  $\beta$ -(1,3) glucano, Curdlan. En todos los casos, los estímulos se llevaron a cabo durante 4h y se realizaron 4 réplicas biológicas de cada condición experimental. Se extrajeron las proteínas y se digirieron en gel con tripsina para obtener péptidos. Los péptidos de cada réplica biológica fueron analizados independientemente por nano-cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas de alta resolución Q-Exactive HF (LC-MS/MS). Finalmente se procesaron y analizaron los datos con softwares específicos.

Para realizar el estudio cuantitativo, se incluyó además una condición control conformada por células HeLa en cultivo durante 4h en ausencia de estímulo. Esto permitió realizar un análisis de las proteínas diferencialmente reguladas en las células expuestas a los diferentes estímulos (Interacción *C. albicans* vs Control y Curdlan vs Control). Para cada una de las 3 condiciones estudiadas se realizaron 4 réplicas biológicas independientes.

Una vez lisadas las células y aislado el extracto proteico de cada condición experimental, las proteínas se digirieron con tripsina para obtener, finalmente, péptidos. Los péptidos obtenidos en cada muestra fueron analizados sin ningún tipo de marcaje (*label-free*) por nano-cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de

masas de alta resolución Q-Exactive HF (LC-MS/MS, *Liquid Chromatography with tandem mass spectrometry*)<sup>193</sup>(Figura 14).

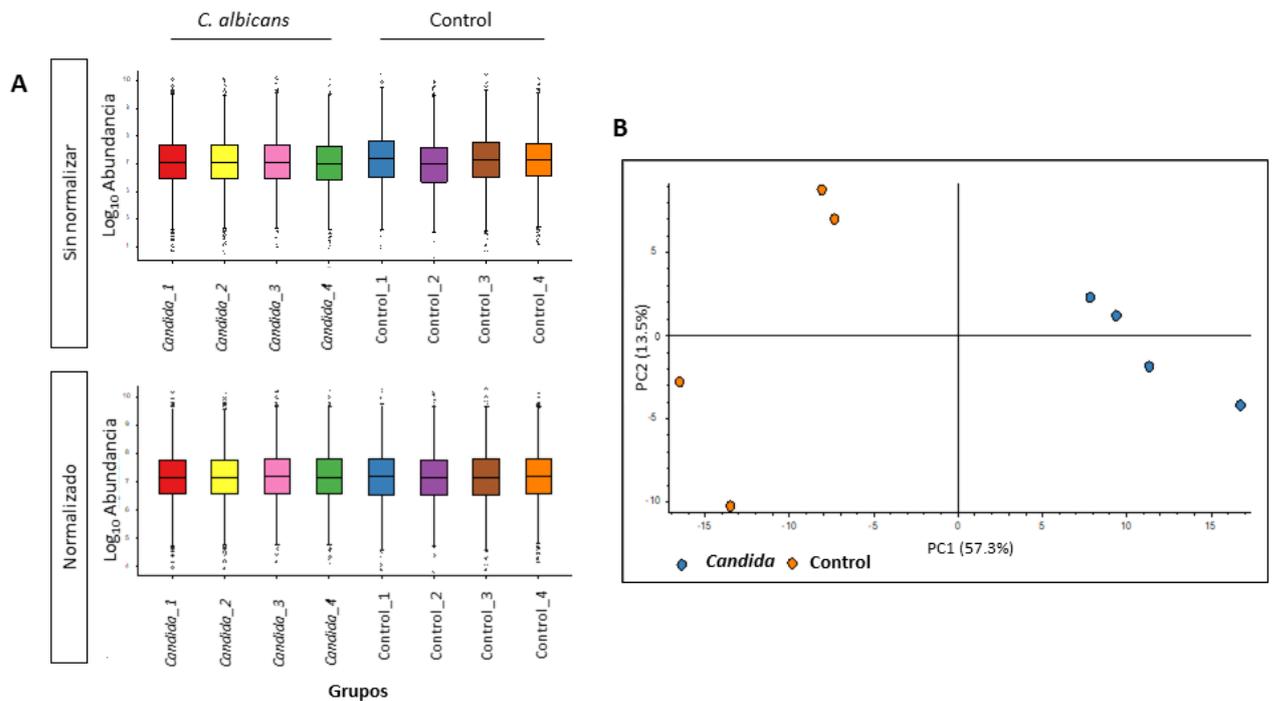
En el presente estudio, un total de 4988 proteínas fueron identificadas en células HeLa en interacción con *C. albicans*, y se obtuvo valores cuantitativos de 4862 de ellas. Mientras que, en células HeLa estimuladas con Curdlan, se identificaron 4939 proteínas, de las cuales se cuantificaron 4829.

### **Evaluación de la calidad de los datos obtenidos a partir de LC-MS/MS**

La normalización de la cantidad total de proteína entre las diferentes muestras utilizando la abundancia total de todos los péptidos, permite ajustar las corridas espectrométricas por diferencias en la cantidad de inyección o sesgos en la preparación de las muestras. Brevemente, las intensidades de proteína son transformadas a  $\text{Log}_2$  y normalizadas por el promedio de la distribución de todas las intensidades. La normalización es un paso común, aunque crítico, del procesamiento de datos; si los sesgos de inyección no se corrigen, pueden causar una visión imprecisa de la regulación de proteínas y conclusiones experimentales erróneas<sup>194</sup>.

En la Figura 15A se puede observar la distribución de las abundancias de las proteínas cuantificadas en cada réplica biológica de las muestras control y en interacción con *C. albicans* antes (panel superior) y después (panel inferior) de la normalización. Después de que cada muestra se ha normalizado por la media de la distribución, todas ellas quedaron centradas en el mismo valor lo que permite comparar los cambios característicos en el proteoma en respuesta a cada estímulo.

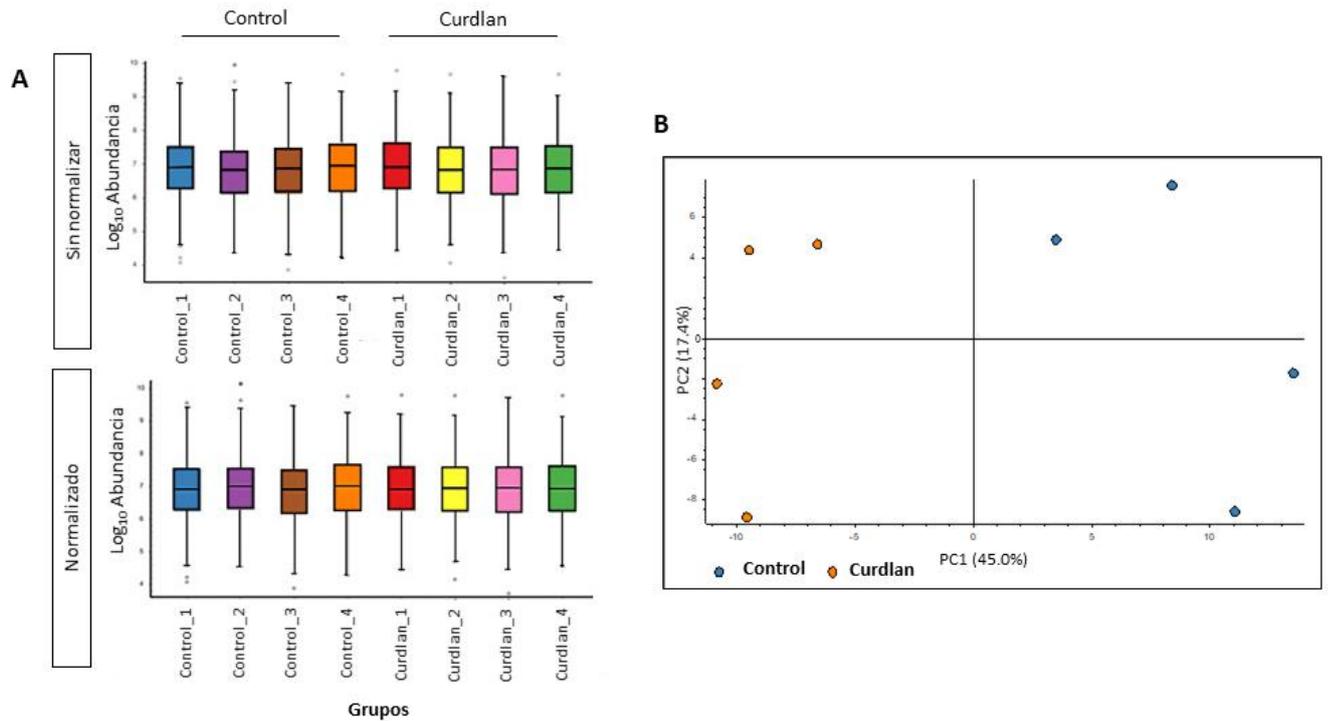
El análisis de componentes principales (ACP) se utiliza para determinar la reproducibilidad entre replicas, ya que las condiciones que son más similares deberían agruparse juntas. Estos gráficos muestran en dos dimensiones el conjunto de datos n-dimensionales, con el objetivo de simplificar la distancia entre muestras en un gráfico espacial en 2D. Las réplicas de la misma muestra deben agruparse cerca unas de otras, mientras que diferentes condiciones deberían estar más separadas.



**Figura 15. Evaluación de calidad de los datos obtenidos a partir de LC-MS/MS en las muestras control y en interacción con *C. albicans*.** **A)** Gráficos de caja que representan las abundancias de proteínas cuantificadas en cada réplica biológica de las muestras control y en interacción con *C. albicans* antes (panel superior) y después (panel inferior) de su normalización medidas por LC-MS/MS. **B)** Análisis de Componentes principales (ACP) que compara la distribución de las 4 réplicas biológicas control (naranja) y en interacción con *C. albicans* (celestes). Los números entre paréntesis dan el porcentaje de la varianza total representada por los Componentes 1 y 2, respectivamente.

La Figura 15B muestra un ACP donde se pueden observar las diferentes réplicas biológicas de las muestras control distribuidas a la izquierda y las de interacción con *C. albicans* a la derecha. En nuestro conjunto de datos, las proteínas analizadas por MS en cada réplica biológica se agrupan de acuerdo al tratamiento. En general, esto indica fuerte reproducibilidad entre repeticiones biológicas, lo que sugiere datos de alta calidad<sup>195</sup>.

El análisis de la calidad de los datos obtenidos por LC-MS/MS descripto anteriormente se realizó también para las muestras de células HeLa estimuladas con Curdlan y muestras controles.



**Figura 16. Evaluación de calidad de los datos obtenidos a partir de LC-MS/MS en las muestras control y estimuladas con Curdlian. A)** Gráficos de caja que representan las abundancias de proteínas cuantificadas en cada réplica biológica de las muestras control y estimuladas con Curdlian antes (panel superior) y después (panel inferior) de su normalización medidas por LC-MS/MS. **B)** Análisis de Componentes principales (ACP) que compara la distribución de las 4 réplicas biológicas control (celeste) y estimuladas con Curdlian (naranja). Los números entre paréntesis dan el porcentaje de la varianza total representada por los Componentes 1 y 2, respectivamente.

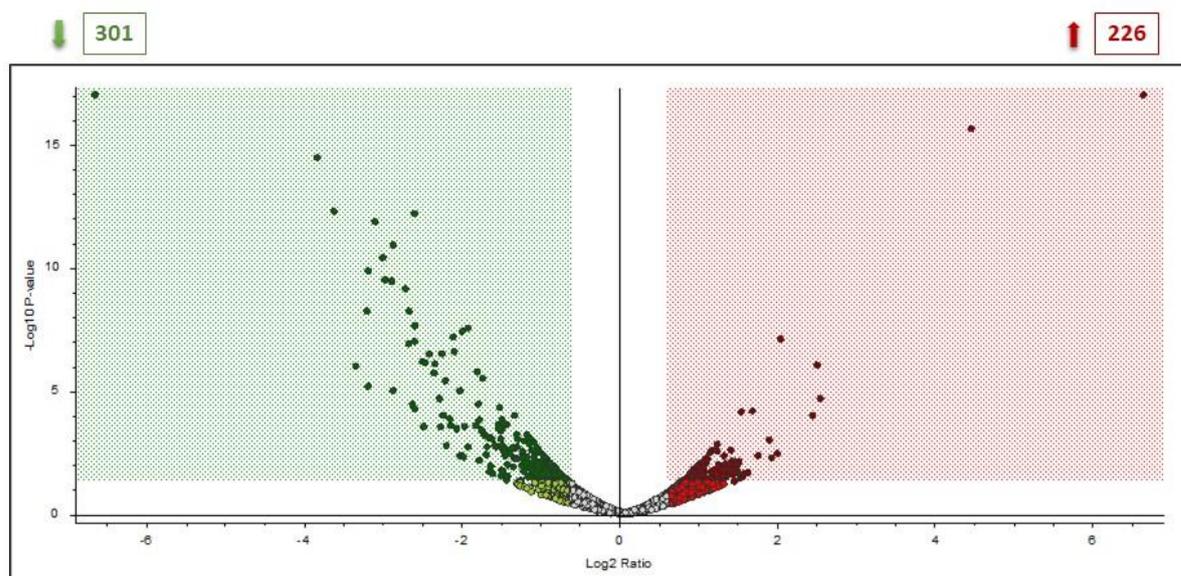
La Figura 16A muestra la normalización de las abundancias proteicas en las diferentes réplicas biológicas de las muestras estimuladas con Curdlian y controles. Luego de la normalización, todas las medianas quedaron centradas en el mismo valor permitiendo la comparación entre ellas en análisis posteriores.

El ACP de estas muestras puede observarse en la Figura 16B. Mientras que las réplicas biológicas de las muestras estimuladas con Curdlian se agrupan a la izquierda del gráfico, aquellas correspondientes a las réplicas de las muestras controles se agrupan a la derecha. Esto indica que ambas condiciones son diferentes desde el punto de vista de la expresión proteica y existe buena reproducibilidad entre réplicas.

## Análisis de la expresión diferencial de proteínas en células HeLa en interacción con *C. albicans* y estimuladas con Curdlan.

La detección de cambios significativos en la abundancia de proteínas es una tarea fundamental en los experimentos basados en espectrometría de masas cuando se intenta comparar células en diferentes condiciones experimentales. La inferencia estadística para los datos proteómicos en estos análisis generalmente se basa en pruebas t estándar de 2 muestras, comparando las abundancias relativas o absolutas medidas para cada proteína en las condiciones de interés <sup>195</sup>.

El Volcano plot es un gráfico que representa el  $\text{Log}_2$  de las veces de cambio o *Fold Change* (FC) en la observación entre dos condiciones en el eje x, por ej., la expresión de proteínas entre el tratamiento y las condiciones de control. En el eje y, se encuentra el p-valor correspondiente para cada proteína cuantificada, que representa la probabilidad de que un cambio observado se deba a las diferentes condiciones experimentales, en lugar de surgir de una variación natural en el FC que podría observarse si realizamos muchas réplicas del experimento. Estos gráficos permiten ver rápidamente el efecto de un experimento con dos condiciones en términos de un aumento y una disminución del valor observado, en este caso abundancia de



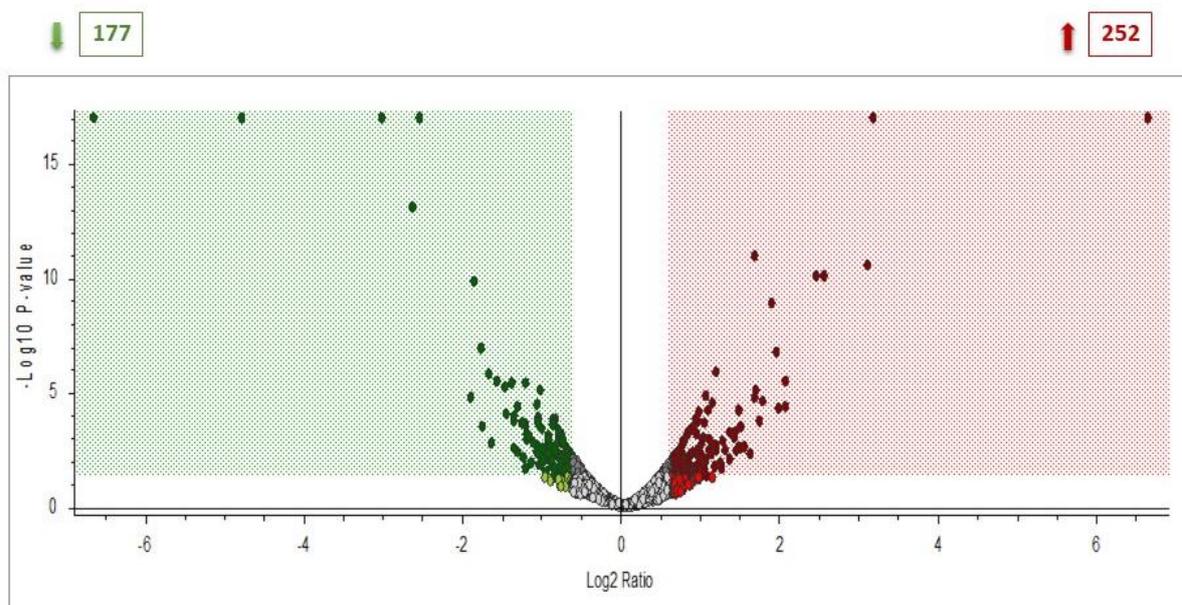
proteínas.

**Figura 17. Proteínas expresadas diferencialmente en células HeLa en interacción con *C. albicans* luego de 4h.** Volcano plot de 527 proteínas reguladas diferencialmente ( $p < 0,05$ ) en

células HeLa incubadas con *C. albicans* durante 4h. Los puntos rojos y verdes representan las proteínas *up*-reguladas (226) y *down*-reguladas (301), respectivamente. *Fold Change*  $\geq 0.6$  para las proteínas que se sobreexpresan y  $\leq -0.6$  para las que se subexpresan. Los puntos grises representan proteínas sin cambios significativos en su expresión.

La Figura 17 muestra el Volcano plot de las proteínas cuantificadas en las muestras en interacción con *C. albicans*. Aquellas proteínas que se sitúan en los recuadros de colores se consideran proteínas diferencialmente expresadas, ya que cumplen con las condiciones de presentar un  $p$ -valor  $< 0.05$  y un  $FC \geq 0.6$  para las proteínas que se sobreexpresan (rojo) y  $FC \leq -0.6$  para las que se subexpresan (verde). Se observó un total de 527 proteínas expresadas diferencialmente, de las cuales 226 se encuentran *up*-reguladas y 301 proteínas *down*-reguladas.

De la misma manera, para evidenciar la cantidad de proteínas reguladas diferencialmente en las muestras estimuladas con Curdlan en relación a las muestras control, se realizó un Volcano plot (Figura 18).



**Figura 18. Proteínas expresadas diferencialmente en células HeLa incubadas con Curdlan durante de 4h.** Volcano plot de 429 proteínas reguladas diferencialmente ( $p < 0,05$ ) en células HeLa incubadas con Curdlan durante 4h. Los puntos rojos y verdes representan las proteínas *up*-reguladas (252) y *down*-reguladas (177), respectivamente. *Fold Change*  $\geq 0.6$  para las proteínas que se sobreexpresan y  $\leq -0.6$  para las que se subexpresan. Los puntos grises representan proteínas sin cambios significativos en su expresión.

Se observó que las células HeLa estimuladas con Curdlan presentan un total de 429 proteínas expresadas diferencialmente, de las cuales 252 se encuentran *up*-reguladas y 177 proteínas *down*-reguladas.

Sin embargo, para reducir el impacto de posibles identificaciones de falsos positivos, utilizamos una serie de criterios establecidos como parámetros críticos por la Unidad de Proteómica de la UCM, donde fueron realizados los experimentos, que hacen más riguroso el análisis de las proteínas diferencialmente expresadas en las CE. Por lo tanto, continuamos el estudio de ambas condiciones experimentales solo con aquellas proteínas que fueron cuantificadas con 2 o más péptidos, en más de 2 réplicas biológicas y con un Coeficiente de variación (CV) < 30%<sup>196,197</sup>.

Según los parámetros establecidos, se observaron 95 proteínas *up*-reguladas y 121 *down*-reguladas en CE en interacción con *C. albicans* comparadas con la condición control. En el caso de las células estimuladas con Curdlan, se obtuvieron 190 proteínas *up*-reguladas y 97 *down*-reguladas (Tabla 1).

**Tabla 1. Número de proteínas *up/down*-reguladas en células HeLa en interacción con *C. albicans* y Curdlan.**

CE en interacción con	Proteínas	
	<i>Up</i> -reguladas	<i>Down</i> -reguladas
<i>C. albicans</i>	95	121
Curdlan	190	97

La cantidad de proteínas expresadas diferencialmente en las CE en interacción con *C. albicans* o Curdlan fue determinada según los siguientes parámetros: proteínas cuantificadas con 2 o más péptidos, en más de 2 réplicas biológicas y con un CV < 30%<sup>196,197</sup>.

La lista detallada de las proteínas reguladas diferencialmente en cada condición experimental se encuentra incluida en el anexo de este capítulo (Anexo CAP II, Tablas 1 y 2).

## **Análisis funcional de las proteínas diferencialmente expresadas en células HeLa en interacción con *C. albicans* y Curdlan.**

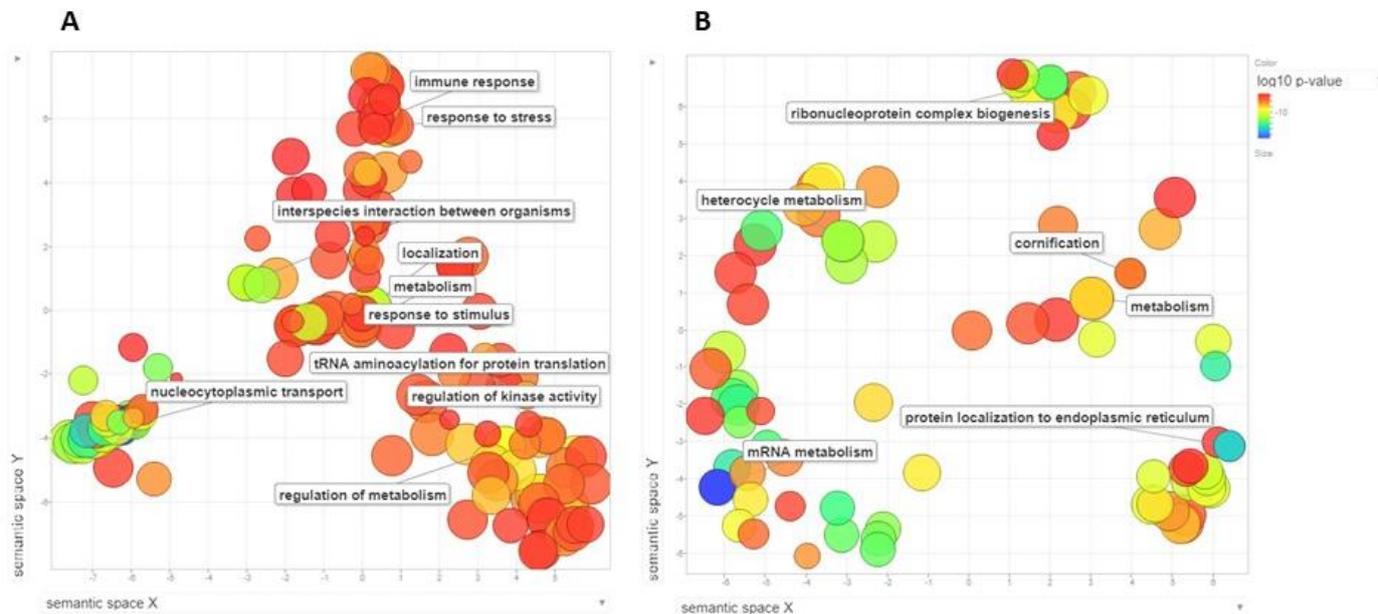
Las técnicas contemporáneas en biología generan información para grandes cantidades de genes o proteínas simultáneamente. Además, con esas proteínas a menudo se realizan análisis de enriquecimiento en términos GO (*Gene Ontology*) que describen la función de las mismas y pueden usarse para resumir los resultados de los experimentos a escala del proteoma<sup>198</sup>. GO aporta datos acerca de los procesos biológicos y funciones moleculares regulados en una muestra en estudio, como así también, los compartimentos celulares donde se ubican las proteínas estudiadas. Sin embargo, dar sentido a tales análisis de enriquecimiento de GO puede ser un desafío. Por ej., las funciones GO sobrerrepresentadas en un conjunto de proteínas expresadas diferencialmente, en general, se generan como una lista plana, un formato no adecuado para capturar las complejidades de la estructura jerárquica de las etiquetas de anotación GO.

Existen varios métodos para visualizar listas grandes y complejas de términos GO. La mayoría de ellos toman como entrada una lista plana de términos GO, a menudo acompañados de alguna medida de significación estadística suministrada por el usuario. Luego, resumen dichas listas para mostrar la información más exclusiva y/o relevante. Finalmente, estos métodos producen varios estilos de visualización que pueden ayudar en la interpretación<sup>199</sup>.

A fin de visualizar los principales procesos biológicos regulados en las células HeLa estimuladas con *C. albicans* obtenidos mediante el análisis GO, utilizamos la herramienta web REVIGO<sup>199</sup>. REVIGO analiza la lista de términos GO significativos y crea grupos que son semánticamente similares y selecciona un representante para cada grupo.

La Figura 19 muestra diagramas de dispersión (*Scatterplots*) que distribuyen los términos GO, representados como burbujas, en un espacio 2D que posiciona dos términos GO más juntos si son semánticamente similares. El color de cada burbuja refleja el p-valor obtenido en el análisis GO, mientras que su tamaño refleja la generalidad del término GO en la base de datos UniProt-GOA<sup>200</sup>. Se muestran los

diagramas de dispersión de términos GO correspondientes a los procesos biológicos *up*-regulados (Figura 19A) y *down*-regulados (Figura 19B) en CE estimuladas con *C.*



*albicans*.

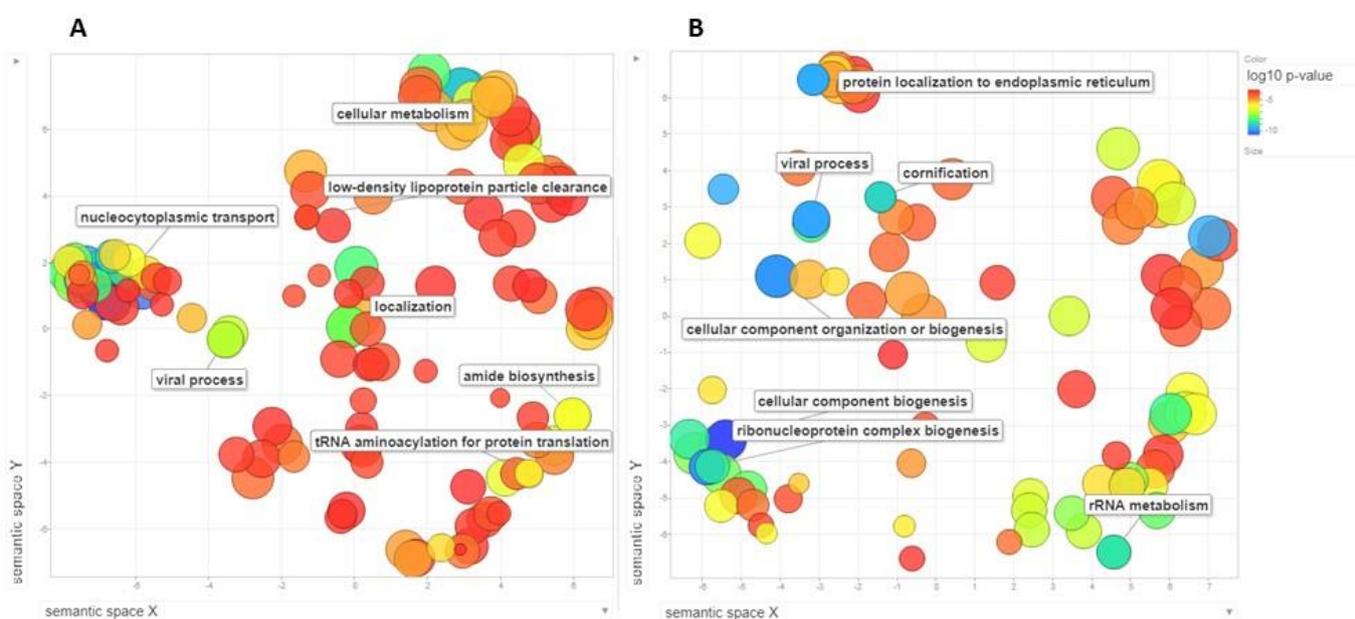
**Figura 19. Procesos biológicos regulados diferencialmente en células HeLa en interacción con *C. albicans* luego de 4h.** Diagramas de dispersión que representan los principales procesos biológicos **A)** *up*-regulados y **B)** *down*-regulados en células HeLa incubadas con *C. albicans* analizados en *Gene Ontology* (GO) y visualizados con REVIGO ( $p < 0,05$ ). La escala de colores indica el  $\log_{10}$  del p-valor, donde el azul representa los mínimos valores de p y el rojo el máximo p-valor, siendo todos ellos menores a 0,05.

Los procesos biológicos enriquecidos en estas células fueron principalmente el transporte nucleocitoplasmático de péptidos, proteínas, compuestos nitrogenados ( $\log_{10}$  p-valor= -13.8), entre otros; regulación del metabolismo ( $\log_{10}$  p-valor= -6.68), respuesta a estrés ( $\log_{10}$  p-valor= -6.38), aminoacilación de ARNt para la traducción de proteínas ( $\log_{10}$  p-valor= -5.61), regulación de actividad de kinasas ( $\log_{10}$  p-valor= -4.92) y procesos del sistema inmune ( $\log_{10}$  p-valor= -4.23).

Los principales procesos biológicos *down*-regulados en células HeLa al interactuar con el hongo fueron el metabolismo de ARNm ( $\log_{10}$  p-valor= -19.5), localización de proteínas en el retículo endoplásmico ( $\log_{10}$  p-valor= -15.7), biogénesis del complejo ribonucleoproteico ( $\log_{10}$  p-valor= -13.2) y cornificación (tipo de muerte

celular programada en CE, bioquímica y morfológicamente diferente a la apoptosis) ( $\log_{10}$  p-valor= -5.97).

Como se detalló en un comienzo, a fin de estudiar el rol de la activación del receptor Dectin-1 en la regulación de los diferentes procesos celulares, este mismo análisis se realizó en células HeLa estimuladas con el  $\beta$ -glucano Curdlan. La Figura 20 muestra los diagramas de dispersión de términos GO correspondientes a los procesos biológicos *up*-regulados (Figura 20A) y *down*-regulados (Figura 20B) en CE estimuladas con Curdlan.



**Figura 20. Procesos biológicos regulados diferencialmente en células HeLa incubadas durante 4h con Curdlan.** Diagramas de dispersión que representan los principales procesos biológicos **A)** *up*-regulados y **B)** *down*-regulados en células HeLa incubadas con Curdlan analizados en *Gene Ontology* (GO) y visualizados con REVIGO. La escala de colores indica el  $\log_{10}$  del p-valor, donde el azul representa los mínimos valores de p y el rojo el máximo p-valor, siendo todos ellos menores a 0,05.

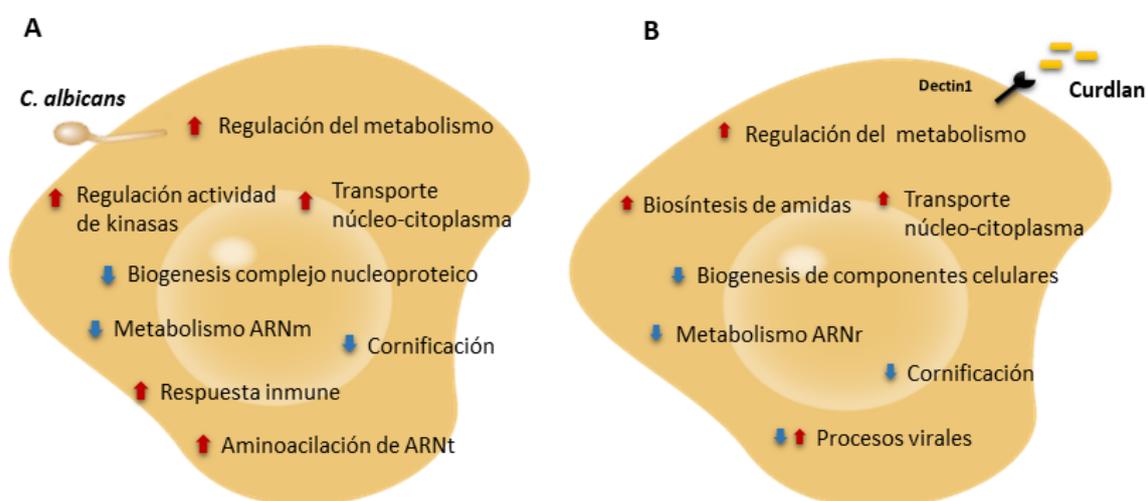
Los procesos biológicos enriquecidos en estas células fueron principalmente el transporte nucleocitoplasmático de macromoléculas ( $\log_{10}$  p-valor= -18.3), metabolismo celular ( $\log_{10}$  p-valor= -15.0), procesos virales ( $\log_{10}$  p-valor= -10.9), biosíntesis de amidas ( $\log_{10}$  p-valor= -8.6) y expresión de genes ( $\log_{10}$  p-valor= -6.79).

Los principales procesos biológicos *down*-regulados en células HeLa estimuladas con Curdlan fueron biogénesis de componentes celulares ( $\log_{10}$  p-valor= -19.5),

procesos virales (log10 p-valor= -9.57), cornificación (log10 p-valor= -8.93) y procesos metabólicos de ARNr (log10 p-valor= -8.67).

Estos hallazgos proporcionan información importante sobre la manera en la que las CE del tracto genital femenino responden biológicamente a la infección temprana con *C. albicans* como así también similitudes en su respuesta al activar exclusivamente el receptor de la inmunidad innata Dectin-1.

La Figura 21 resume los principales procesos biológicos regulados en las células HeLa en interacción con *C. albicans* y en presencia de Curdlan.



**Figura 21. Esquema representativo de los principales procesos biológicos regulados diferencialmente en células HeLa. A)** En interacción con *C. albicans* y **B)** en interacción con Curdlan luego de 4h de incubación, determinados por análisis funcional de las proteínas con *Gene Ontology* y REVIGO.

### **Análisis de las principales vías en las que participan las proteínas diferencialmente expresadas en células HeLa en interacción con *C. albicans* y Curdlan.**

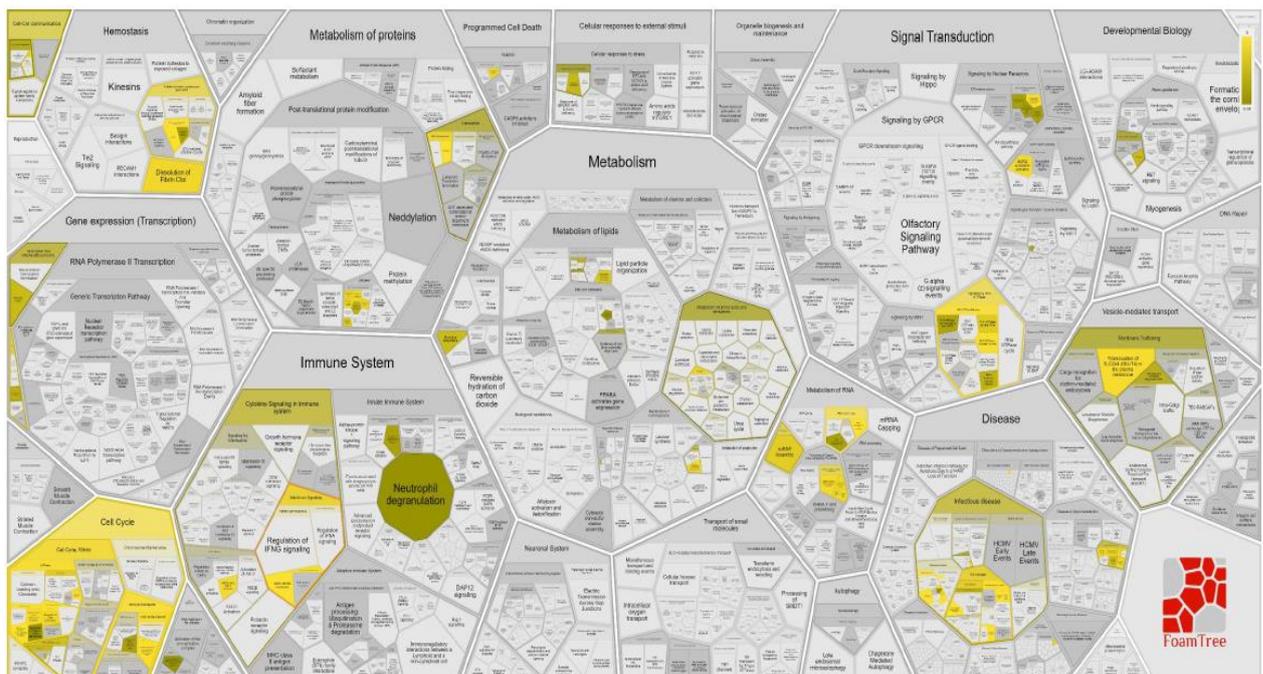
La información biológica obtenida en experimentos genómicos o proteómicos es tan abundante y compleja que es difícil gestionarlos en gráficos o esquemas tradicionales y con las herramientas de análisis clásicas. En la actualidad, los métodos de análisis de vías o rutas tienen una amplia gama de aplicaciones en la investigación fisiológica y biomédica. Basándose en un conjunto de datos dado, estos métodos

ayudan a los investigadores a descubrir qué áreas de la biología y las biomoléculas son cruciales para comprender los fenómenos en estudio<sup>201</sup>.

Con el objetivo de explorar las vías más relevantes en las que están involucradas las proteínas *up/down*-reguladas en las muestras en estudio se utilizó la herramienta web Reactome. Reactome (<http://reactome.org>) es una base de datos gratuita, de código abierto, con una rigurosa selección manual y revisión de las vías biomoleculares que proporciona una base ideal para nuestro estudio<sup>202</sup>.

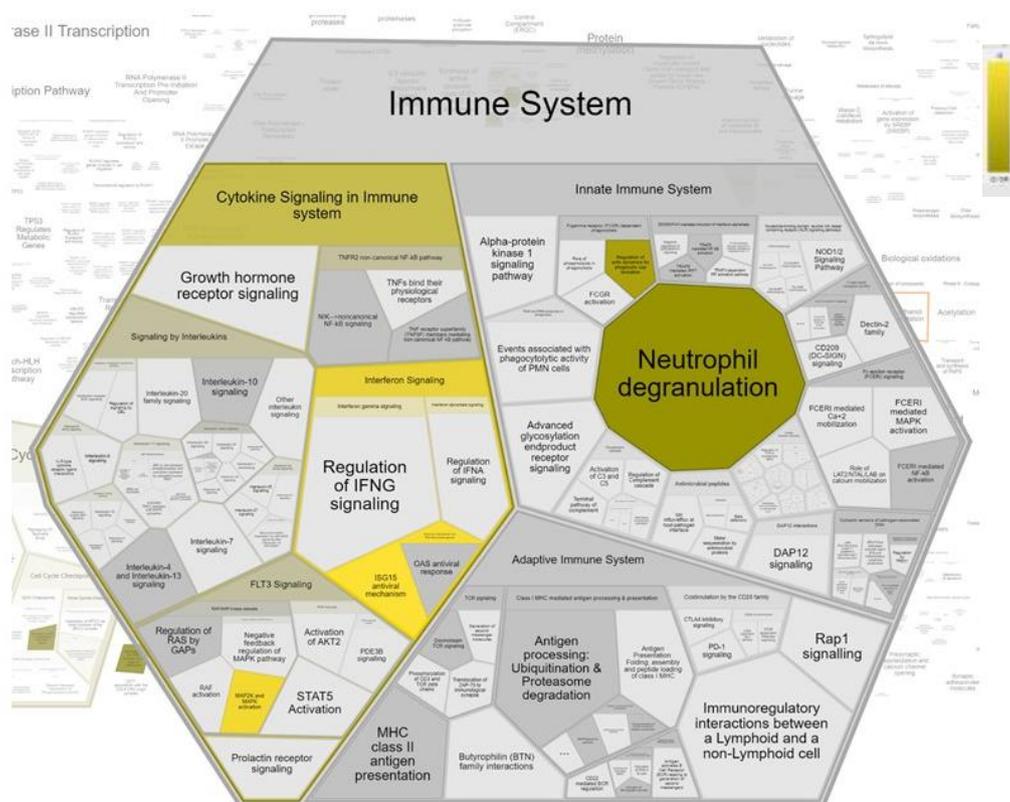
Las vías en Reactome se organizan jerárquicamente, agrupando aquellas que estén relacionadas, por ejemplo, traducción, plegamiento de proteínas y modificación postraduccional, en dominios más grandes de la función biológica como el metabolismo de las proteínas. Esta organización jerárquica sigue en gran medida la de los procesos biológicos de *Gene Ontology* (GO)<sup>203–205</sup>.

Reactome ofrece diferentes maneras de visualizar las vías que se encuentran sobre-representadas en una determinada muestra. Al ingresar en el software la lista de proteínas *up*-reguladas en las células en interacción con *C. albicans*, se obtuvo un esquema llamado "Reacfoam" (*treemap* de Voronoi) (Figura 22) que muestra, de manera jerárquica y esquematizada en polígonos, la totalidad de las vías que potencialmente pueden estar reguladas en las células humanas. En color amarillo están representadas las vías en las que participan las proteínas de interés.



**Figura 22. Representación de las diferentes vías *up*-reguladas en células HeLa en interacción con *C. albicans*.** Visualización general de las vías *up*-reguladas en las muestras en interacción con *C. albicans* basada en la teselación de Voronoi representada con la base de datos Reactome. El color amarillo indica entidades coincidentes o vías en las que están involucradas las 95 proteínas *up*-reguladas y el gradiente de color representa la significancia (p-valor).

El mapa muestra la *up*-regulación de diversas vías celulares que participan en el ciclo celular, expresión de genes, sistema inmune, transducción de señales, metabolismo, enfermedad, homeostasis, entre otras, durante la interacción con *C. albicans*. A su vez, este mapa es interactivo y permite hacer zoom en los diferentes polígonos para observar los detalles. Debido a que es de especial interés, en esta tesis, el estudio de la respuesta inmune de las CE en interacción con *C. albicans*, en la Figura 23 se muestra amplificado el polígono correspondiente a vías involucradas en el sistema inmune.

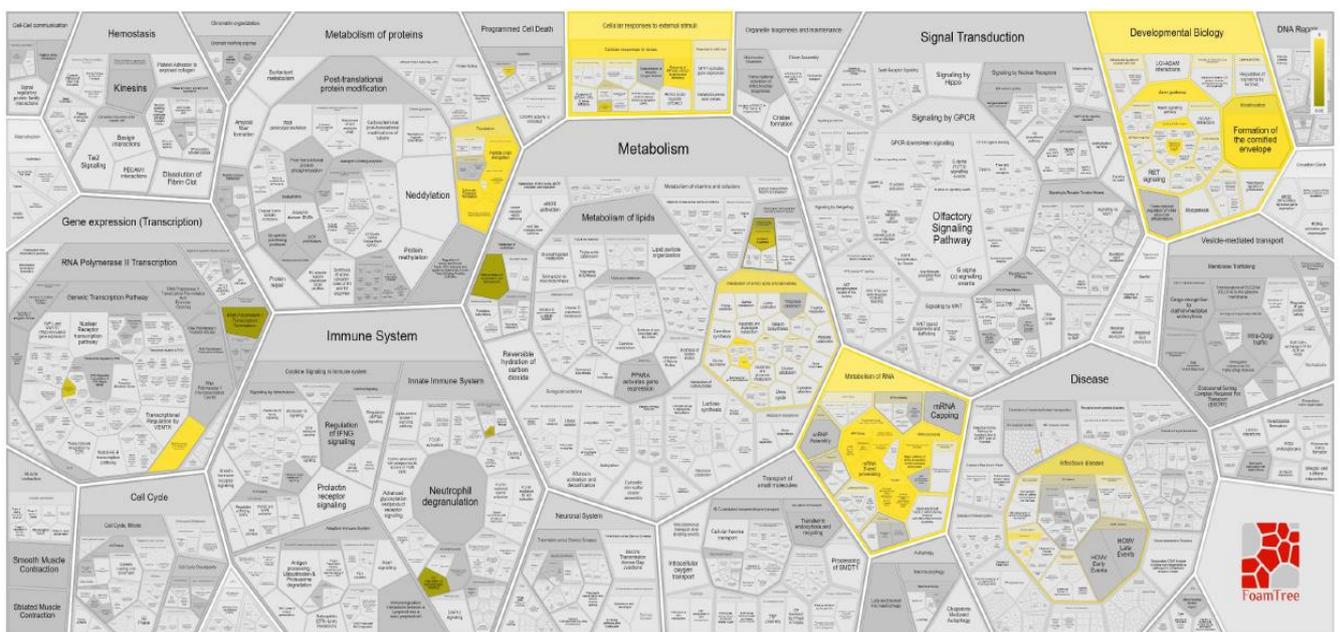


**Figura 23. Representación de las diferentes vías del sistema inmune *up*-reguladas en células HeLa en interacción con *C. albicans*.** Visualización general de las vías inmunes *up*-reguladas (coloreadas según su p-valor en diferentes tonos de amarillo) en las muestras en interacción con *C. albicans* basada en la teselación de Voronoi obtenida con la base de datos

Reactome. Los tonos más oscuros de amarillo representan p-valores elevados mientras que los tonos claros representan p-valores cercanos a cero.

Esta amplificación permite observar que en las muestras se encuentran *up*-reguladas vías involucradas en la señalización de citoquinas, en particular, interferones como así también vías relacionadas a la inducción de la desgranulación de neutrófilos.

Se efectuó el mismo análisis descripto anteriormente para las proteínas *down*-reguladas en las células HeLa en interacción con el patógeno fúngico en estudio (Figura 24).

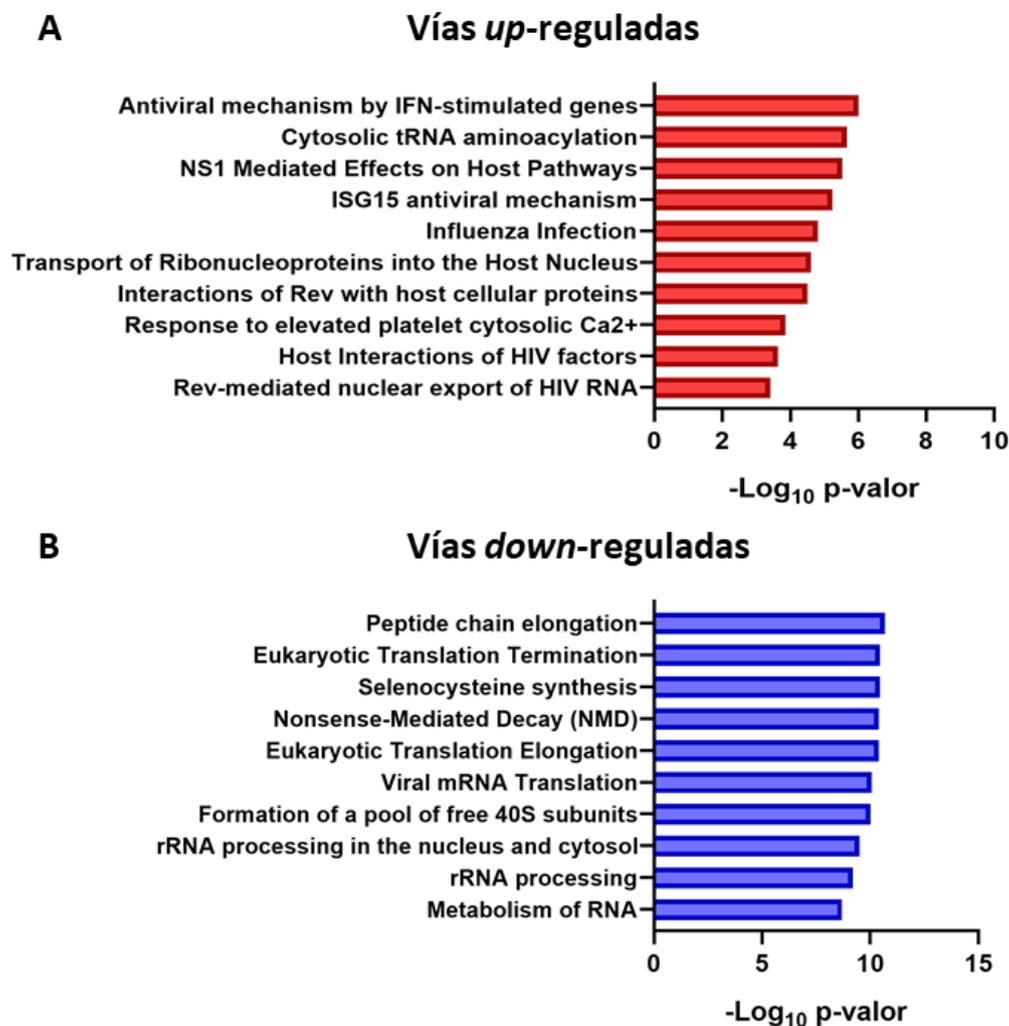


**Figura 24. Representación de las diferentes vías *down*-reguladas en células HeLa en interacción con *C. albicans*.** Visualización general de las vías *down*-reguladas en las muestras en interacción con *C. albicans* basada en la teselación de Voronoi representada con la base de datos Reactome. El color amarillo indica entidades coincidentes o vías en las que están involucradas las 121 proteínas *down*-reguladas y el gradiente de color representa la significancia (p-valor).

El análisis de las vías *down*-reguladas en las CE demostró que se encuentran principalmente involucradas en el metabolismo de ARN, biología del desarrollo y metabolismo celular.

El Software utilizado provee además tablas que ordena las vías más relevantes que se encuentran reguladas diferencialmente en las muestras según su p-valor (Anexo

CAP II, Tabla 3). La Figura 25 muestra las 10 vías principales que se encuentran *up* y *down*-reguladas en las CE en estudio luego de la interacción con el hongo.



**Figura 25. Vías reguladas diferencialmente en CE HeLa en interacción con *C. albicans*.** **A)** Representación gráfica según el cálculo del  $-\text{Log}_{10}$  del p-valor de 10 de las principales vías obtenidas con la herramienta web Reactome en las que participan las proteínas *up*-reguladas y **B)** *down*-reguladas en células HeLa luego de interactuar 4h con *C. albicans*. Los datos son consignados en el idioma proporcionado por la base de datos Reactome.

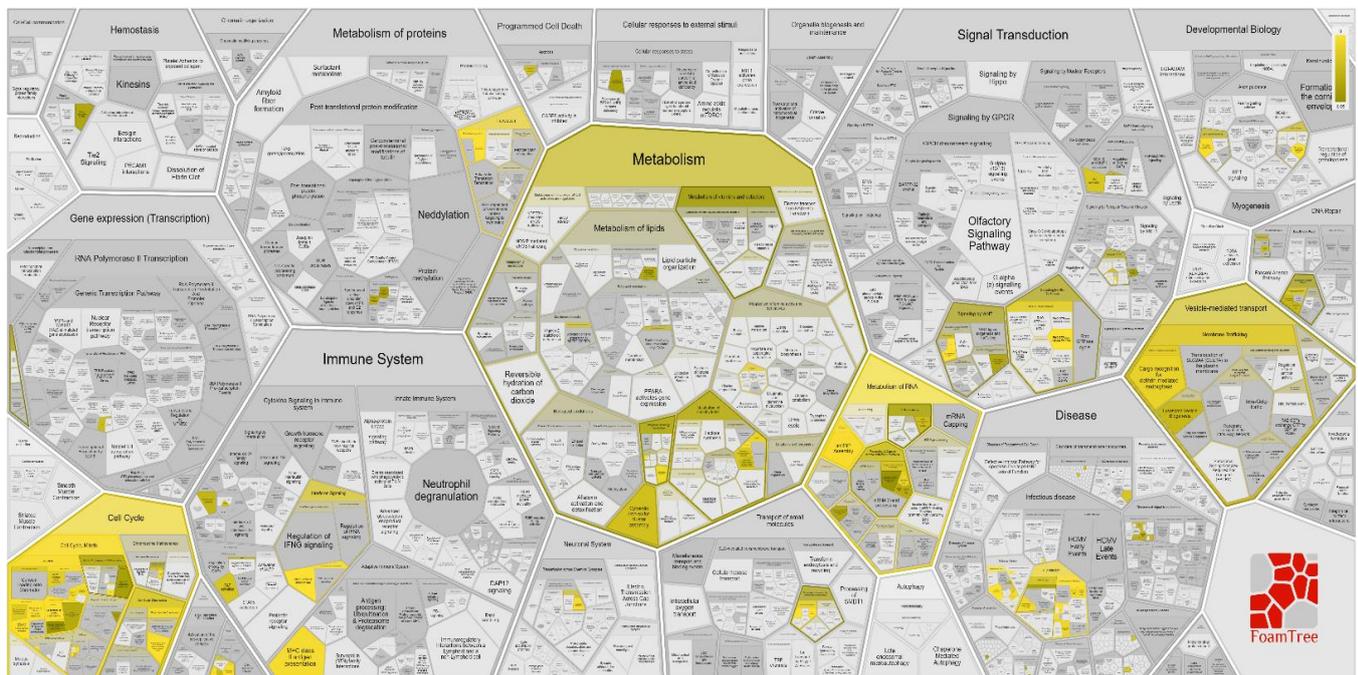
Este análisis posicionó en el primer lugar entre las vías que se encuentran *up*-reguladas en células HeLa luego de interactuar con *C. albicans* a los "Antiviral mechanisms by IFN-stimulated genes" con un p-valor de  $9.98 \times 10^{-7}$ . Además, otras vías presentes entre las más relevantes están estrechamente relacionadas a los mecanismos de señalización de IFNs-I como "NS1 mediated effects on host pathways" (p-valor  $2.94 \times 10^{-6}$ ), "ISG15 antiviral mechanisms" (p-valor  $5.81 \times 10^{-6}$ ), "Influenza infection" (p-valor

1.55e-5), "*Interferon signalling*" (p-valor 3.57e-3), "*HIV infection*" (p-valor 5.72e-3), "*Cytokine signalling in immune system*" (p-valor 3.39e-2).

En relación a las vías *down*-reguladas se destacan "*Peptide chain elongation*" (p-valor 2.07e-11), "*Selenocysteine synthesis*" (p-valor 3.51e-11), "*Non-sense mediated decay*" (degradación de ARNm mediada por mutaciones terminadoras) (p-valor 3.92e-11) y "*Viral mRNA traslation*" (p-valor 8.40e-11) (Figura 25; Anexo CAP II, Tabla 3).

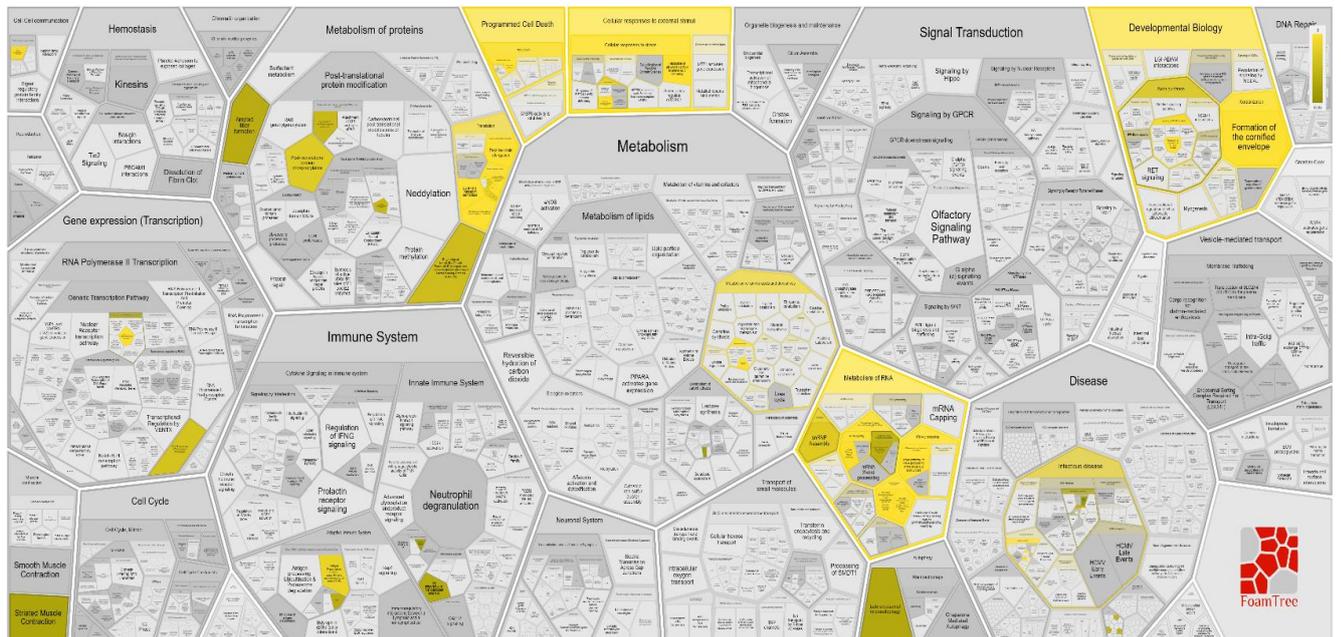
Como se detalló al inicio del capítulo, a fin de estudiar el rol de la activación del receptor innato Dectin-1 en la regulación de los diferentes procesos celulares, se estimularon células HeLa con su agonista Curdlan. Este estudio permite asociar las vías reguladas en estas condiciones con las que hemos observado en las células en interacción con *C. albicans*, ya que está ampliamente descripto que los  $\beta$ -glucanos de *Candida* son también capaces de activar el receptor Dectin-1.

Al analizar las proteínas *up* y *down*-reguladas en las células estimuladas con Curdlan en Reactome, en primera instancia y para tener una visión general de las vías reguladas, se obtuvieron los correspondientes Reactome (Figura 26 y Figura 27, respectivamente).



**Figura 26. Representación de las diferentes vías *up*-reguladas en células HeLa estimuladas con Curdlan.** Visualización general de las vías *up*-reguladas en las muestras estimuladas con curdlan basada en la teselación de Voronoi representada con la base de datos Reactome. El

color amarillo indica entidades coincidentes o vías en las que están involucradas las 190 proteínas *up*-reguladas y el gradiente de color representa la significancia (p-valor).



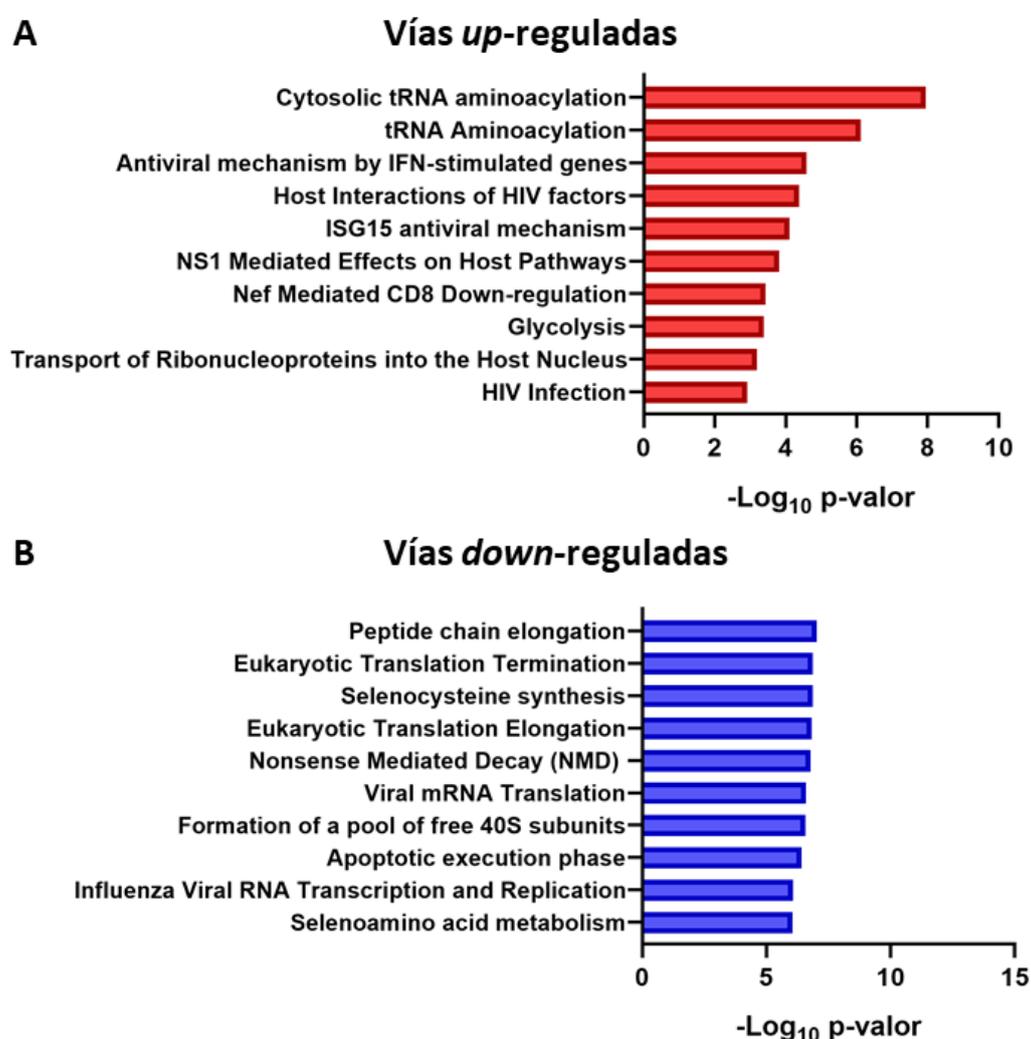
**Figura 27. Representación de las diferentes vías *down*-reguladas en células HeLa estimuladas con Curdlan.** Visualización general de las vías *down*-reguladas en las muestras estimuladas con curdlan basada en la teselación de Voronoi representada con la base de datos Reactome. El color amarillo indica entidades coincidentes o vías en las que están involucradas las 97 proteínas *down*-reguladas y el gradiente de color representa la significancia (p-valor).

Los correspondientes mapas indican que las vías que se encuentran *up*-reguladas en las CE en interacción con Curdlan participan en procesos como metabolismo, transporte celular mediado por vesículas, ciclo celular, metabolismo de ARN y sistema inmune. Por otro lado, las vías que se encontraron *down*-reguladas están relacionadas a la muerte celular programada, metabolismo de ARN, metabolismo de proteínas y biología del desarrollo.

La Figura 28 muestra en detalle las principales vías reguladas diferencialmente en CE estimuladas *in vitro* con el agonista de Dectin-1. Una visión general de las vías reguladas en células estimuladas con Curdlan demuestra amplias similitudes con las obtenidas en las muestras en interacción con *C. albicans*, sin embargo, se observa un orden diferente de las mismas según sus p-valores.

Al igual que en las células en interacción con *C. albicans*, al analizar las principales vías *up*-reguladas en células HeLa estimuladas con Curdlan, entre las que tienen un p-valor más significativo se ubica "*Antiviral mechanisms by IFN-stimulated genes*" (p-valor 2.63e-5) seguida por "*ISG15 antiviral mechanism*" (p-valor 8e-5) y "*NS1 mediated effects on host pathways*" (p-valor 1.55e-4) (Anexo CAP II, Tabla 4).

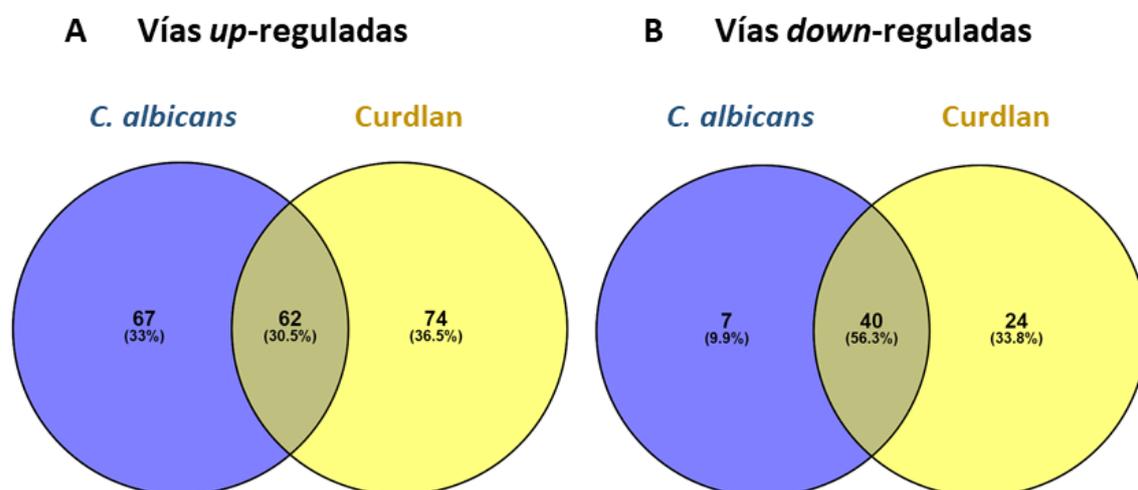
Nuestros hallazgos sugieren que la *up*-regulación de estas vías relacionadas estrechamente con la señalización intracelular por IFNs-I involucra la activación del receptor Dectin-1 por los  $\beta$ -glucanos de *C. albicans* o Curdlan.



**Figura 28. Vías reguladas diferencialmente en CE HeLa estimuladas con Curdlan. A)** Representación gráfica según el cálculo del  $-\text{Log}_{10}$  del p-valor de 10 de las principales vías obtenidas con la herramienta web Reactome en las que participan las proteínas *up*-reguladas y **B)** *down*-reguladas en células HeLa luego de interactuar 4h con el  $\beta$ -glucano Curdlan. Los datos son consignados en el idioma proporcionado por la base de datos Reactome.

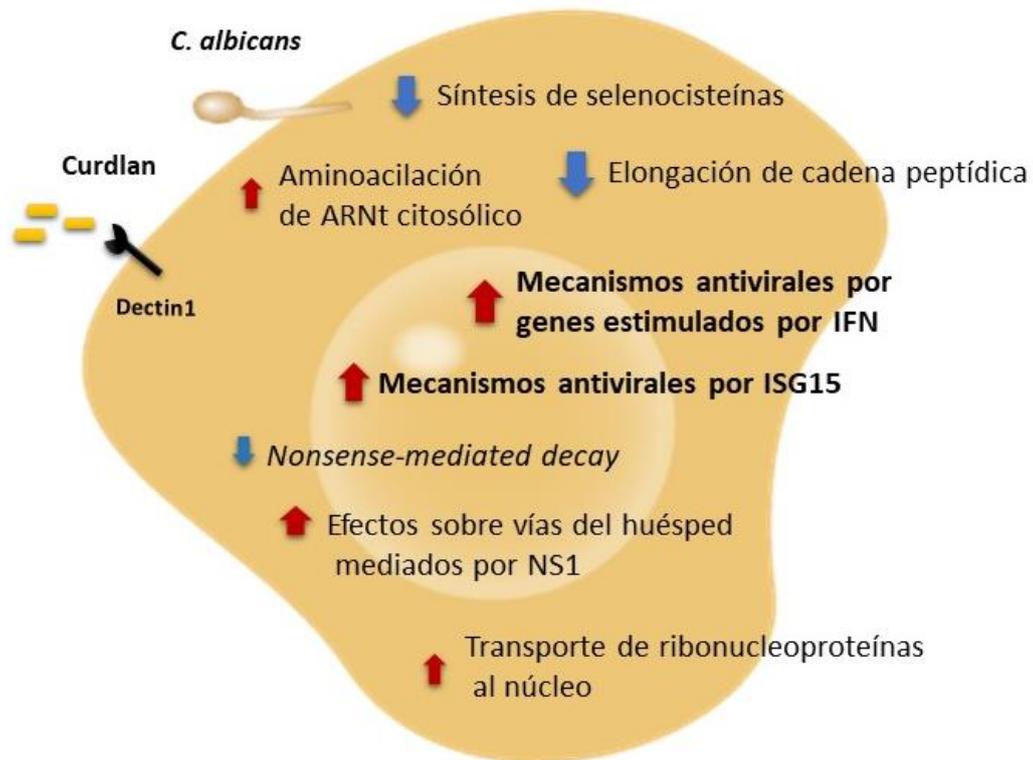
Dentro de las vías que se encuentran *down*-reguladas en las células HeLa estimuladas con Curdlan se destacan "*Peptide chain elongation*" (p-valor  $1e-7$ ), "*Selenocysteine synthesis*" (p-valor  $1.44e-7$ ), "*Non-sense mediated decay*" (degradación de ARNm mediada por mutaciones terminadoras) (p-valor  $1.71e-7$ ) y "*Viral mRNA traslation*" (p-valor  $2.61e-7$ ) al igual que las muestras en interacción con *C. albicans*.

Un análisis comparativo de las vías reguladas en las CE luego de los estímulos con *C. albicans* y Curdlan demostró la superposición tanto de vías *up*-reguladas como *down*-reguladas. Se observaron 62 vías *up*-reguladas en común en ambos sistemas evaluados, vinculadas principalmente a la señalización de IFNs-I, como se describió anteriormente, mientras que se obtuvieron 40 vías *down*-reguladas compartidas entre ambos estímulos relacionadas a la degradación de ARNm y a la elongación de la cadena peptídica, entre otras. La Figura 29 muestra diagramas de Venn que representan el número de vías *up* y *down*-reguladas que se comparten entre los estímulos utilizados en nuestro estudio, como así también la cantidad de vías exclusivas para cada uno de ellos.



**Figura 29. Análisis comparativo de las vías reguladas diferencialmente en las CE luego de interactuar con *C. albicans* y con el agonista de Dectin-1, Curdlan. A)** Diagrama de Venn que compara las vías *up*-reguladas y **B)** *down*-reguladas en las CE luego de ser estimuladas *in vitro* con *C. albicans* (azul) y Curdlan (amarillo).

Finalmente, la Figura 30 resume en un esquema las principales vías en común que se encuentran reguladas en células HeLa frente a la infección con *C. albicans* y luego del reconocimiento de Curdlan a través de Dectin-1.



**Figura 30. Esquema representativo de las principales vías reguladas diferencialmente en células HeLa en interacción con *C. albicans* y Curdlan.** Las vías reguladas luego de 4h de interacción fueron analizadas con Reactome a partir de las correspondientes listas de proteínas *up* y *down*-reguladas.

## CONCLUSIONES CAPÍTULO II

**Estudio proteómico cuantitativo de los procesos biológicos y vías reguladas diferencialmente en CE del tracto genital femenino en interacción con *C. albicans*. Estudio de la relevancia del receptor de Dectin-1 en estos procesos.**

- La evaluación de la calidad de los datos obtenidos a partir del análisis de células HeLa en interacción con *C. albicans* y estimuladas con Curdlan por espectrometría de masas de alta resolución LC-MS/MS, arrojó resultados satisfactorios; demostrando una buena reproducibilidad entre réplicas biológicas y una marcada diferencia respecto a las células controles desde el punto de vista proteico.
- El análisis de la expresión diferencial de proteínas en células HeLa en interacción con *C. albicans* indicó que, según los criterios de inclusión establecidos, se cuantificaron 95 proteínas *up*-reguladas y 121 *down*-reguladas respecto a la condición control. Mientras que, en células estimuladas con Curdlan se cuantificaron 190 proteínas *up*-reguladas y 97 *down*-reguladas.
- El análisis funcional de las proteínas diferencialmente expresadas en células HeLa en interacción con *C. albicans* demostró que los procesos biológicos enriquecidos en estas células fueron principalmente aquellos relacionados al transporte de moléculas entre el núcleo y el citoplasma, metabolismo, procesos relacionados a la síntesis de proteínas y respuesta inmune. Por otro lado, los procesos que se encontraron disminuidos fueron metabolismo de ARNm, localización de proteínas en el retículo endoplásmico, biogénesis del complejo ribonucleoproteico y cornificación.

Este análisis funcional aplicado a las muestras de células HeLa estimuladas con Curdlan demostró que los procesos biológicos enriquecidos fueron el transporte de moléculas entre el núcleo y el citoplasma, metabolismo, activación de

mecanismos relacionados a procesos virales y expresión de genes. Los principales procesos biológicos *down*-regulados fueron la biogénesis de componentes celulares, procesos virales, cornificación y procesos metabólicos de ARNr.

- Al analizar las principales vías en las que participan las proteínas diferencialmente expresadas en células HeLa en interacción con *C. albicans* y Curdlan se observaron resultados similares y numerosas vías coincidentes. De modo relevante, en ambos casos se determinó que varias de las principales vías *up*-reguladas en estas células están relacionadas a la señalización de IFNs-I: "*antiviral mechanisms by IFN-stimulated genes*", "*ISG15 antiviral mechanisms*" y "*NS1 mediated effects on host pathways*".

En su conjunto, los datos obtenidos mediante este estudio proteómico cuantitativo complementan los resultados previamente expuestos obtenidos por técnicas de biología molecular y apoyan la hipótesis de que los IFNs-I y la activación de su vía a través del receptor Dectin-1 cumplen un rol relevante en la respuesta del huésped frente al patógeno *C. albicans* en CE del tracto genital femenino.

## CAPÍTULO III

### **Estudio de la contribución de los IFNs-I y su vía de señalización en la respuesta antifúngica durante la infección vaginal por *C. albicans*.**

La CVV es una enfermedad de elevada incidencia que afecta gravemente la calidad de vida de las mujeres en todo el mundo, especialmente en su forma recurrente (CVVR), sin cura definitiva ni medidas preventivas<sup>14</sup>.

Los estudios experimentales en modelos animales de CVV utilizados actualmente han aportado importantes hallazgos sobre determinantes de patogenicidad, inflamación y respuestas inmunitarias de potencial importancia para el control de la patología humana<sup>91</sup>. El uso de animales deficientes en IFNs-I o en su vía de señalización es frecuente en el estudio de infecciones virales. En relación a su utilización en el estudio de infecciones fúngicas, la información es escasa y su empleo ha estado orientado al estudio de las micosis sistémicas.

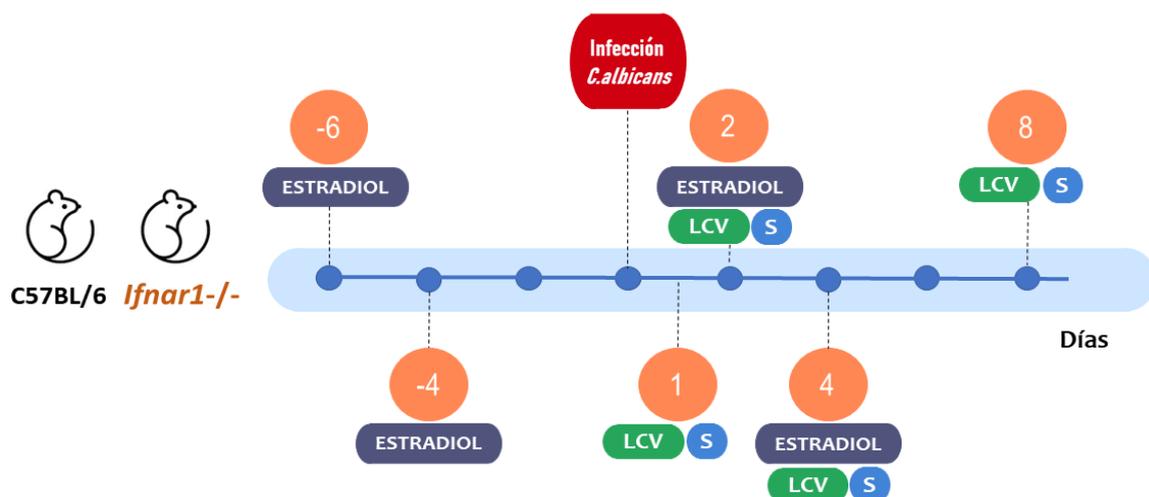
A fin de explorar el rol de los IFNs-I en la respuesta inmune frente a *C. albicans* se utilizó un modelo murino de CVV empleando ratones de la cepa C57BL/6 como controles<sup>8</sup> y animales deficientes en el receptor de IFNs-I (*Ifnar1*<sup>-/-</sup>). La ausencia del receptor IFNAR impide la activación de la vía JAK-STAT y la expresión final de ISGs que desempeñan un papel importante en la determinación de las respuestas inmunes innatas y adaptativas del huésped, quedando en evidencia aquellas funciones que dependen de la acción de los IFNs-I durante la infección con el hongo<sup>163</sup> (Figura 5).

*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 pseudoestro, mediante la inyección subcutánea de valerato de  $\beta$ -estradiol. El pseudoestro induce cambios en el epitelio vaginal, aumentando la superficie queratinizada a la que las células fúngicas se adhieren fuertemente y se multiplican por el crecimiento de hifas<sup>71,132</sup>.

El modelo experimental utilizado en este trabajo fue desarrollado en nuestro grupo durante el trabajo de tesis de la Dra. María Soledad Miró en animales C57BL/6 y deficientes en diferentes PRRs<sup>8,46,84,92</sup>. El esquema experimental utilizado en este

trabajo se muestra en la Figura 31. Los días -6 y -3 previos a la infección, considerada como día 0, los animales recibieron una inyección subcutánea con 100  $\mu$ L de valerato de  $\beta$ -estradiol 2 mg/mL, para inducir la fase de pseudoestro. Al día 0 del protocolo, los animales se infectaron intravaginalmente con  $5 \times 10^6$  levaduras viables de *C. albicans* SC5314 y a los días 2 y 4 post infección (pi) se inyectaron nuevamente con la hormona, a fin de mantener la fase de pseudoestro del ciclo estral. De acuerdo al protocolo utilizado, los animales se clasificaron en: Grupo **No infectado**, ratones que solo recibieron el tratamiento con estradiol y Grupo **Infectado**, animales tratados con estradiol e infectados con *C. albicans*. Los animales también se identificaron de acuerdo a sus características genéticas como C57BL/6 y animales deficientes en el receptor de IFNs-I (*Ifnar1*<sup>-/-</sup>) quedando de este modo conformados cuatro grupos experimentales.

La Figura 31 muestra la cinética del estudio y el esquema de trabajo empleado.



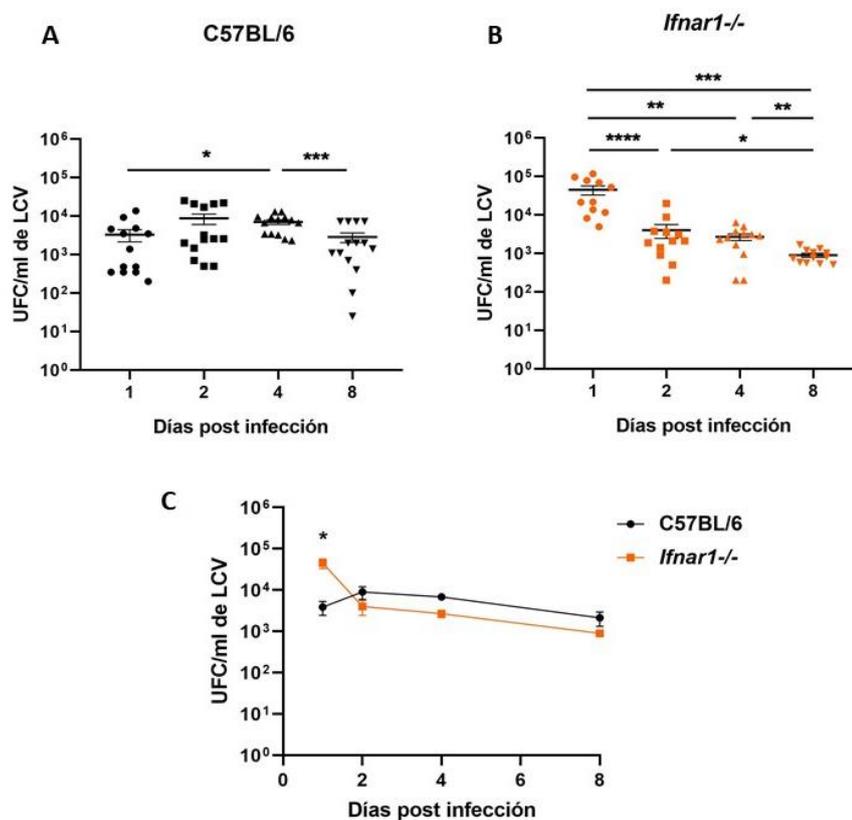
**Figura 31. Esquema del modelo experimental de CVV murina.** Los ratones C57BL/6 e *Ifnar1*<sup>-/-</sup> de los grupos no infectado e infectado fueron tratados con 100  $\mu$ L de Valerato de  $\beta$ -Estradiol 2 mg/mL a los días -6,-3, 2 y 4, considerando como día 0 al de la infección. La infección se realizó de manera intravaginal, introduciendo con pipeta y tip 20 $\mu$ L de una suspensión de  $5 \times 10^6$  levaduras viables de *C. albicans*. Los días 1, 2, 4 y 8 pi se realizaron LCV con PBS estéril o se sacrificaron los animales para estudios histológicos o poblacionales, según el experimento. LCV: Lavado Cervicovaginal. S: Sacrificio.

Según el experimento, a los días 1, 2, 4 y 8 pi se llevaron a cabo LCV con PBS estéril mediante inoculación y aspiración con pipeta, o los animales fueron sacrificados y las vaginas y nódulos linfáticos (NL) drenantes extraídos para estudios histológicos y poblacionales. En los distintos tiempos de la cinética se procedió a evaluar la carga

fúngica intravaginal, el reclutamiento de células PMN al lumen vaginal, la reacción inflamatoria tisular en respuesta a la invasión por el hongo mediante el *Score* de Invasividad (S. Inv) e Inflamación (S. Inf) y la activación de los mecanismos innatos locales mediante niveles de citoquinas intravaginales. Además, se evaluó la respuesta inmune periférica mediante el estudio de diferentes poblaciones celulares inmunes en NL drenantes de vagina por citometría de flujo.

### Susceptibilidad a la infección vaginal por *C. albicans* en el modelo experimental de CVV murina.

A fin de evaluar la progresión y severidad de la infección vaginal por *C. albicans* SC5314, se procedió a determinar el recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en LCV obtenidos de animales C57BL/6 e *Ifnar1*<sup>-/-</sup> a los días 1, 2, 4 y 8 pi. En la Figura 32 se observa la carga fúngica intravaginal (UFC) durante el curso de la infección en cada *background* genético (A y B), y en el panel C el perfil comparativo de ambas cepas de ratones frente a la infección.

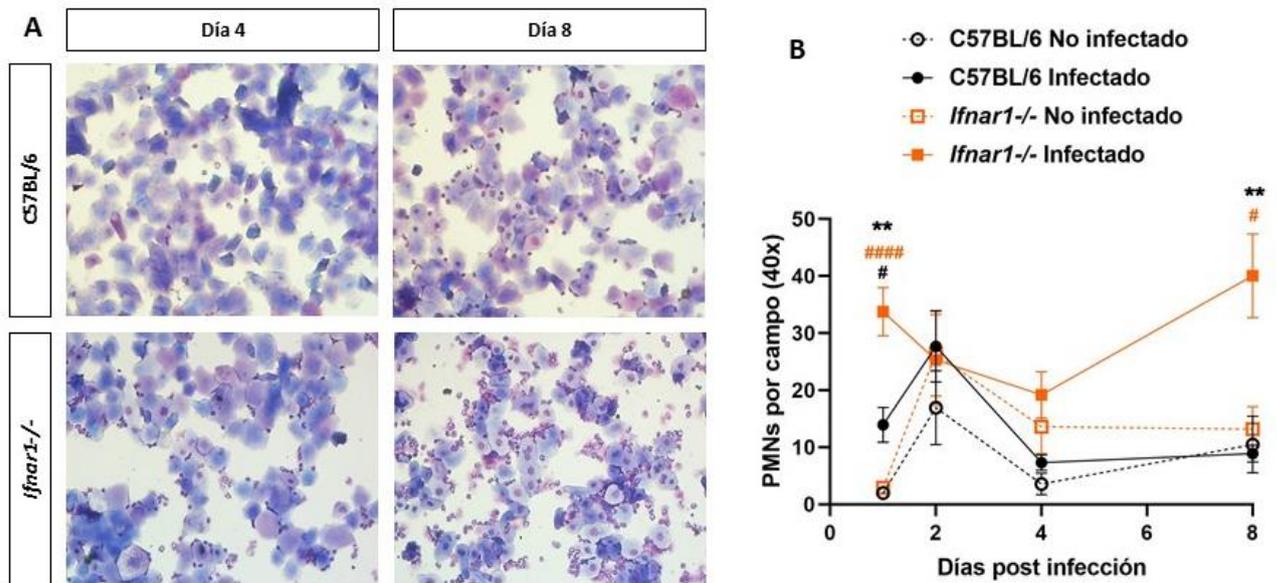


**Figura 32. Susceptibilidad a la infección por *C. albicans* SC5314 en ratones C57BL/6 e *Ifnar1*<sup>-/-</sup>.** **A)** Recuento de UFC de *C. albicans* por mL de LCV de animales C57BL/6 e **B)** *Ifnar1*<sup>-/-</sup> a los días 1, 2, 4 y 8 pi. Los valores representan la media  $\pm$  ESM.  $n \geq 10$ . Los datos se analizaron mediante la prueba de Mann-Whitney en cada punto específico de tiempo. \*  $p < 0,05$ . \*\* $p < 0,01$ . \*\*\* $p < 0,001$  \*\*\*\* $p < 0,0001$ . **C)** Perfil comparativo de las UFC por ml de ambas cepas de ratones a lo largo de la cinética estudiada. Los valores representan la media  $\pm$  ESM. \* $p < 0,05$ .

Los resultados obtenidos indican que en ambos grupos de animales la infección se mantuvo durante todos los días evaluados y el desarrollo de la misma fue diferente en los ratones *Ifnar1*<sup>-/-</sup> y en los C57BL/6. Los animales *Ifnar1*<sup>-/-</sup> exhibieron una máxima colonización al día 1 pi, seguido de una progresiva disminución hacia el último día en estudio ( $p < 0,01$ ) (Figura 32B), mientras que en los animales C57BL/6 la carga fúngica intravaginal se mantuvo estable a partir del día 2 hasta el día 4 con una disminución significativa hacia el día 8 ( $p < 0,001$ ) (Figura 32A). El análisis comparativo de la infección con *C. albicans* entre ambas cepas reveló que la carga fúngica intravaginal fue mayor al día 1 pi en ausencia del receptor IFNAR ( $p < 0,05$ ) (Figura 32C). En los restantes tiempos evaluados no se detectaron diferencias, observándose que la remoción del hongo al tiempo final del estudio fue similar en ambas cepas de ratones.

En la CVV, la inmunidad innata desempeña un papel importante tanto en la resistencia como en la susceptibilidad a la infección. Se postula que las CE brindan un importante nivel de protección al inhibir el crecimiento de *C. albicans*, lo que limita los niveles de colonización por debajo del umbral requerido para provocar una infección sintomática. Por otro lado, la CVV está fuertemente asociada con una respuesta inflamatoria aguda caracterizada por el reclutamiento de leucocitos PMN en la luz vaginal, lo que contribuye a los síntomas. Estudios recientes, que utilizaron el modelo experimental de CVV dependiente de estrógenos en ratones, revelaron que el cambio de levadura a hifa y las vías de señalización activadas por esta morfogénesis son factores críticos para la inmunopatología mediada por PMN <sup>2</sup>.

Para evaluar las poblaciones celulares predominantes en LCV durante el desarrollo de la infección en el modelo murino, se realizaron citoextendidos para cada grupo en estudio<sup>8</sup>. En ambos grupos se observaron CE queratinizadas provenientes de la descamación del estrato córneo vaginal y del epitelio cervical, y PMN reclutados al lumen vaginal (Figura 33A).



**Figura 33. Poblaciones celulares presentes en LCV de animales C57BL/6 e *Ifnar1*<sup>-/-</sup> infectados con *C. albicans*.** **A)** Fotografías representativas de citoextendidos de LCV de ratones C57BL/6 (arriba) e *Ifnar1*<sup>-/-</sup> (abajo) infectados con *C. albicans* a los días 4 y 8 pi teñidos con May-Grünwald Giemsa. Presencia de CE y PMNs. Aumento x400. **B)** Recuento de PMNs en citoextendidos de LCV de animales C57BL/6 (negro) e *Ifnar1*<sup>-/-</sup> (naranja) infectados (línea continua) y sin infectar (línea punteada) a los días 1, 2, 4 y 8 pi. Los PMNs se cuantificaron en diez campos al azar por citoextendido a x400 de aumento y se promediaron los valores. Los valores representan la media  $\pm$  ESM.  $n \geq 8$ . \*\* $p < 0,01$ . C57BL/6 Infectado vs *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Infectado. # $p < 0,05$ . #### $p < 0,0001$ . *Ifnar1*<sup>-/-</sup> No infectado vs *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Infectado. # $p < 0,05$ . C57BL/6 No infectado vs C57BL/6 Infectado.

En acuerdo a lo previamente descrito por nuestro grupo, y en concordancia con la bibliografía, en animales C57BL/6 infectados se observó un pico de reclutamiento de PMNs en el lumen vaginal hacia el día 2 pi<sup>8</sup>. Cuando se evaluó el reclutamiento de PMNs en los animales *Ifnar1*<sup>-/-</sup>, se observó un perfil de respuesta particular, caracterizado por un reclutamiento marcado en el día 1 pi, una disminución a los días 2 y 4 pi, y aumento hacia el último día de la cinética evaluada (día 8). El análisis comparativo entre ambas cepas de ratones permite evidenciar que las mayores diferencias se observaron en el día 1 ( $p < 0,01$ ) y el día 8 ( $p < 0,01$ ) posteriores al inicio de la infección, indicando la importancia de los IFNs-I y su vía de señalización en el reclutamiento de los PMN, considerados elementos cardinales en la respuesta inflamatoria asociada a la CVV (Figura 33B).

### **Invasión tisular y respuesta inflamatoria durante la infección vaginal por *C. albicans* en animales C57BL/6 e *Ifnar1*<sup>-/-</sup>.**

La estructura del epitelio vaginal cambia a lo largo de la vida de la mujer y es afectado tanto por hormonas como por las condiciones del medio. 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)<sup>206</sup>.

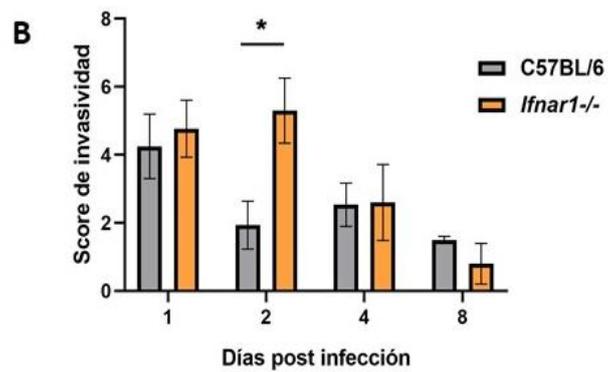
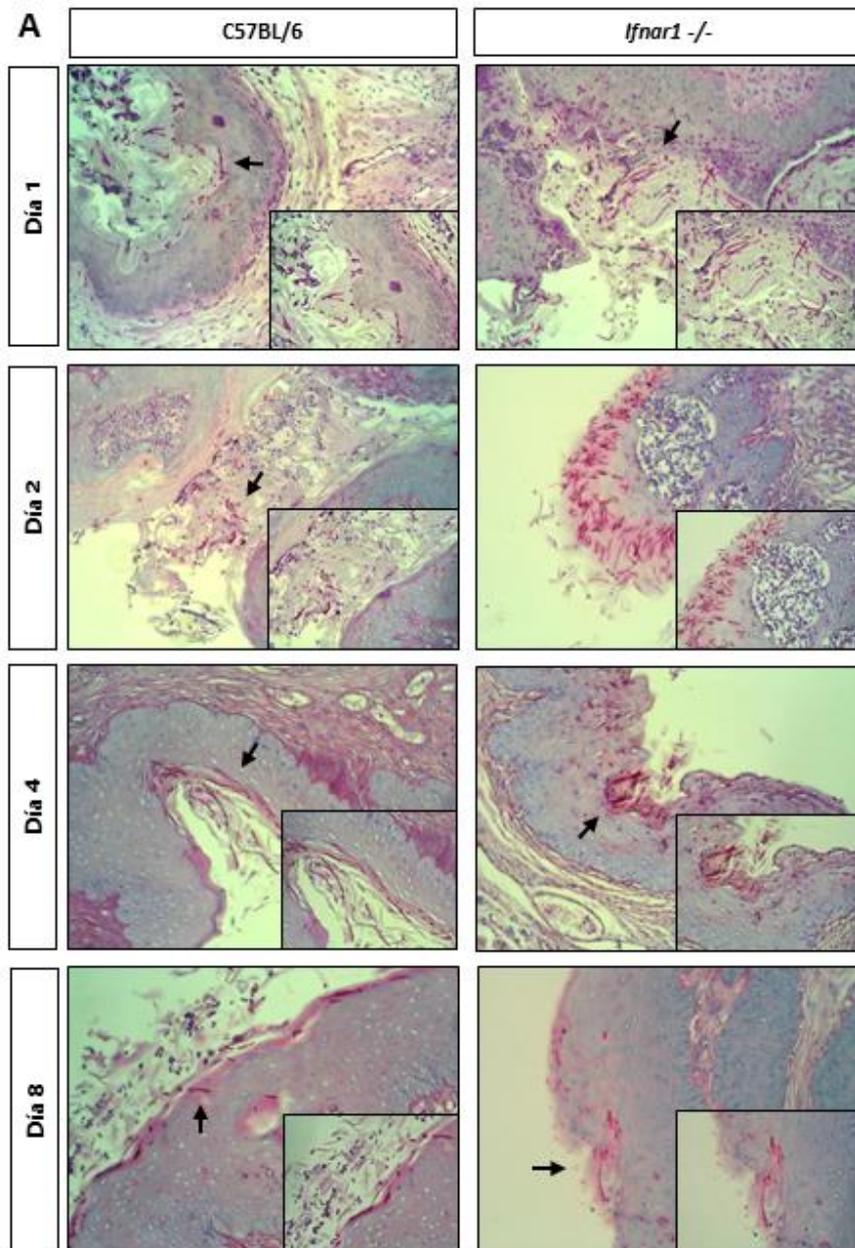
Debido a que las células del estrato córneo vaginal carecen de uniones intercelulares robustas (E-Cadherina) y no suele queratinizar, es potencialmente penetrable tanto por microorganismos como por células y mediadores moleculares del sistema inmunológico. Por esta razón, esta región comprende un microambiente único que permite el crecimiento de microbiota vaginal endógena al tiempo que disuade a las infecciones invasivas mediante la exfoliación y la acción de mediadores inmunes innatos y adaptativos<sup>206</sup>.

La cuantificación de UFC en LCV es la técnica estándar para la determinación de la carga fúngica intravaginal, sin embargo, no refleja la invasión epitelial por *C. albicans*, responsable del daño celular y la activación de la respuesta inmune del hospedador. En concordancia con este concepto, y a fin de evaluar la invasión tisular y la respuesta inflamatoria local se realizaron estudios histológicos en ambos grupos de animales.

La severidad y progresión de la infección también se evaluó mediante la determinación del *Score* de Invasividad (S. Inv) y el *Score* de inflamación (S. Inf) en los diferentes días en estudio<sup>8,84</sup>.

La Figura 34A muestra cortes histológicos de vaginas provenientes de animales C57BL/6 e *Ifnar1*<sup>-/-</sup> en los diferentes días en estudio. Al comienzo de la infección (Día 1) se observó moderada cantidad de blastoconidias y pseudohifas adheridas al epitelio cornificado en ambas cepas de ratones. Sin embargo, en el día 2 pi, mientras que en los ratones C57BL/6 las formas fúngicas permanecieron adheridas al epitelio cornificado,

en los animales *Ifnar1*<sup>-/-</sup> se observó la presencia de abundantes hifas de *C. albicans* penetrando masivamente capas epiteliales profundas. Al día 4 pi aún permanecían



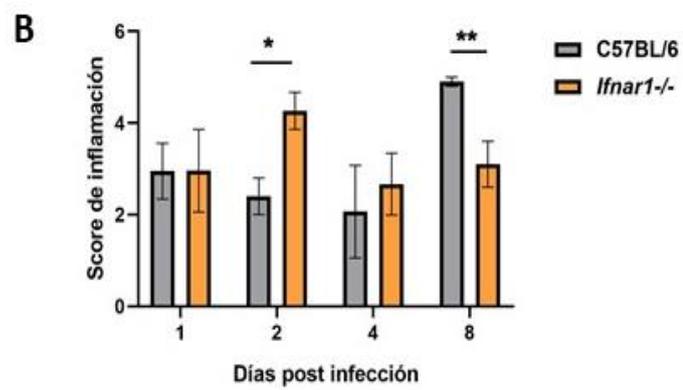
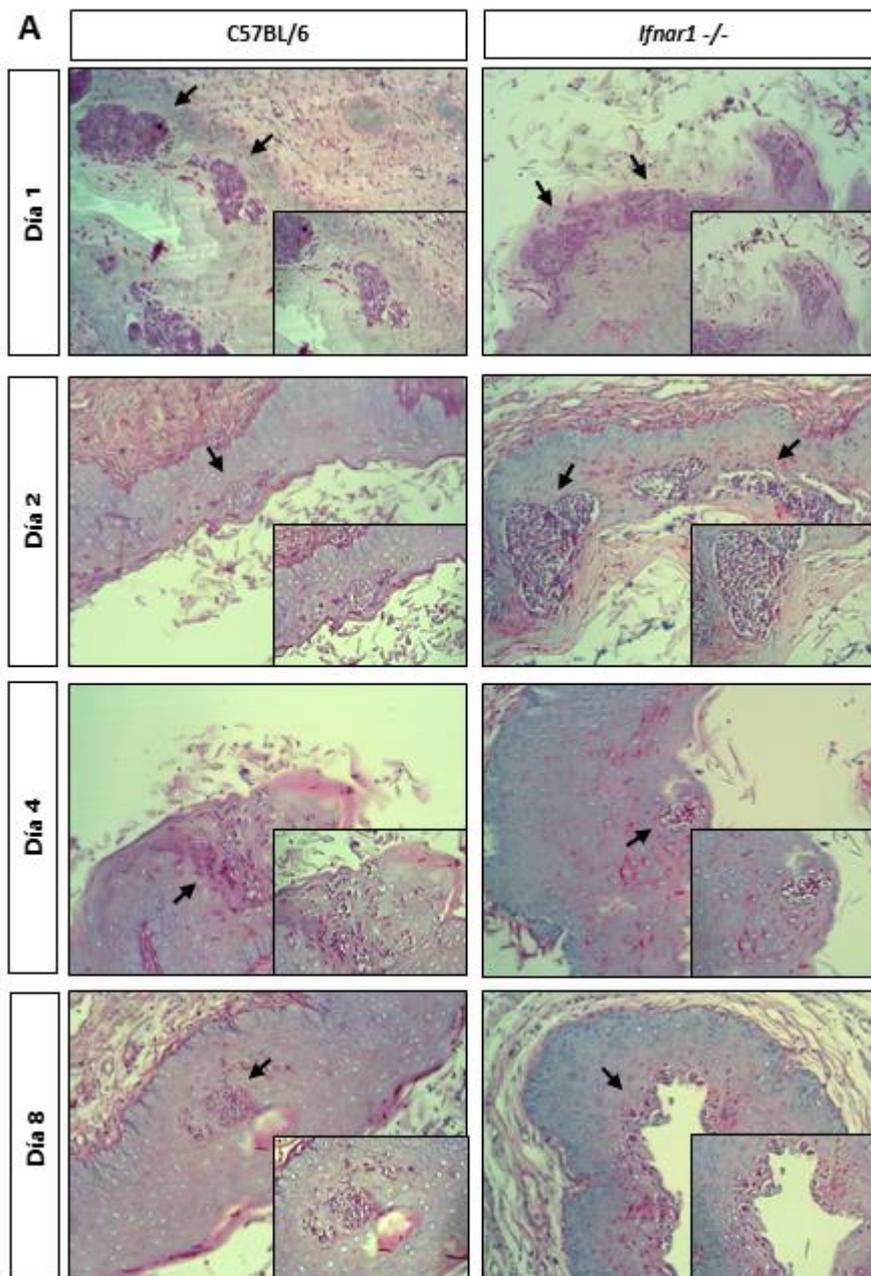
**Figura 34. Invasividad de *C. albicans* en el epitelio vaginal de animales C57BL/6 e *Ifnar1*<sup>-/-</sup> durante CVV. A)** Fotografías representativas de cortes histológicos de vagina de ratones C57BL/6 (panel izquierdo) e *Ifnar1*<sup>-/-</sup> (panel derecho) infectados con  $5 \times 10^6$  levaduras viables de *C. albicans* SC5314 a los días 1, 2, 4 y 8 pi teñidos con PAS/H. Con flechas negras se muestra la presencia de la forma infectiva del hongo. Aumento x200 y x400 en recuadros. **B)** *Score* de invasividad de cortes histológicos de vagina de ratones C57BL/6 e *Ifnar1*<sup>-/-</sup>. Se examinaron microscópicamente 5 campos al azar a x400 de aumento. El grado de invasividad fue evaluado por el método modificado basado en el reporte de Zhang *et al.* (2014)<sup>8,207</sup> \* $p < 0,05$ .

algunas pseudohifas e hifas adheridas en el epitelio vaginal de ambas cepas de ratones disminuyendo su cantidad hacia el día 8 pi. En las etapas iniciales de la infección (día 2) el S. Inv fue significativamente mayor en los animales *Ifnar1*<sup>-/-</sup> comparado con los C57BL/6 ( $p < 0,05$ ) (Figura 34B). En los días subsiguientes evaluados no se observaron cambios significativos en este *score*.

Durante la infección, la invasión fúngica generada por la elongación de hifas y la producción activa de factores de virulencia asociados al cambio morfológico del hongo, como a la liberación de enzimas hidrolíticas SAP y LIP y la toxina candidalísina, promueven la penetración del hongo y generan daño tisular<sup>69,182,208</sup>. La presencia del mismo favorece el reclutamiento de PMN al sitio de infección, los cuales se organizan en microabscesos para contener al patógeno.

A fin de evaluar el impacto de la ausencia de la señalización de la vía de los IFNs-I en la inflamación tisular a nivel de este tracto mucoso, se analizaron cortes histológicos de animales C57BL/6 e *Ifnar1*<sup>-/-</sup> infectados y se determinó el S. Inf a lo largo de la cinética estudiada. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 35. La respuesta tisular se caracterizó por la presencia de infiltrado de PMN, organizados en microabscesos subcorneales u abscesos intraepiteliales rodeando formas fúngicas (Figura 35A). Pueden observarse claras diferencias en las características de la organización tisular cuando la ubicación y tipo de absceso es comparada entre ambas cepas de animales conforme progresa la infección.

En relación al análisis comparativo entre los S. Inf en los diferentes días (Figura 35B) se puede observar que en el día 2 de la infección los animales C57BL/6 presentaron un S. Inf=2.4, mientras que los ratones *Ifnar1*<sup>-/-</sup> el S. Inf=4.3 ( $p < 0,05$ ); de modo interesante, al final del estudio se observó un perfil inverso (4,9 vs 3,1;  $p < 0,01$ ).



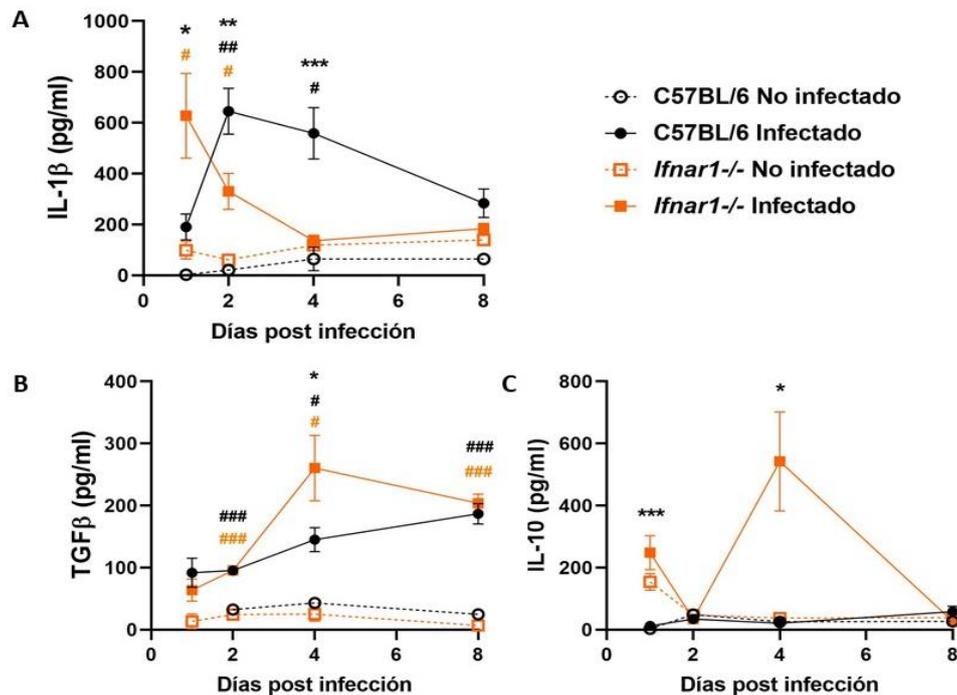
**Figura 35. Respuesta inflamatoria en el epitelio vaginal de animales C57BL/6 e *Ifnar1*<sup>-/-</sup> durante CVV. A)** Fotografías representativas de cortes histológicos de vagina de ratones C57BL/6 (panel izquierdo) e *Ifnar1*<sup>-/-</sup> (panel derecho) infectados  $5 \times 10^6$  levaduras viables de *C. albicans* SC5314 a los días 1, 2, 4 y 8 pi teñidos con PAS/H. Con flechas negras se muestra la presencia de infiltrados inflamatorios de células en el tejido. Aumento x200 y x400 en recuadros. **B)** Score de inflamación en cortes histológicos de vagina de ratones C57BL/6 e *Ifnar1*<sup>-/-</sup>. Se examinaron microscópicamente 5 campos al azar a x400 de aumento. El grado de inflamación fue evaluado por el método modificado basado en el reporte de Zhang *et al.* (2014)<sup>8,207</sup>. \* $p < 0,05$ . \*\* $p < 0,01$ .

Estos resultados en su conjunto demuestran que tanto la invasión fúngica como la respuesta tisular resultan significativamente diferentes en ausencia de la señal generada por los IFNs-I, poniendo en manifiesto la importancia de la regulación de ambos parámetros por estas citoquinas.

### **Perfil local de citoquinas durante la infección vaginal por *C. albicans* en animales C57BL/6 e *Ifnar1*<sup>-/-</sup>**

El delicado equilibrio entre la resistencia inmunológica y la tolerancia hacia *C. albicans*, comúnmente presente en las superficies mucosas humanas, es fundamental para limitar la inflamación y mantener la homeostasis<sup>209</sup>. Una característica distintiva del tracto genital femenino es que, debido a su función biológica, se encuentra estrictamente inmunoregulado y las citoquinas antiinflamatorias como TGF- $\beta$  e IL-10 desempeñan un papel fundamental. Durante la infección vaginal, la forma hifal de *C. albicans* se asocia con daño celular, secreción de enzimas hidrolíticas y activación del inflammasoma que inicia la producción de IL-1 $\beta$ <sup>70</sup>. La secreción de esta y otras citoquinas proinflamatorias, como TNF e IL-6, también están involucrados en la activación y reclutamiento de células como PMNs a la lámina propia y al lumen vaginal, componentes asociados a la aparición de síntomas en pacientes con CVV y CVVR<sup>2,8,70</sup>.

En el modelo descrito, se determinó la producción local de citoquinas proinflamatorias IL-1 $\beta$  e IL-6, y las citoquinas antiinflamatorias TGF- $\beta$  e IL-10. La Figura 36 muestra la cinética de aquellos mediadores que mostraron cambios significativos en su perfil.



**Figura 36. Citoquinas en el microambiente local durante la CVV en animales C57BL/6 e *Ifnar1*<sup>-/-</sup>.** **A)** Niveles de citoquinas IL-1 $\beta$ , **B)** TGF- $\beta$  e **C)** IL-10 en muestras de LCV los días 1, 2, 4 y 8 pi en animales C57BL/6 (negro) e *Ifnar1*<sup>-/-</sup> (naranja) infectados (línea continua) y sin infectar (línea punteada) evaluadas por la técnica de ELISA sándwich. Los valores representan la media  $\pm$  ESM.  $n \geq 6$ . \* $p < 0,05$ . \*\* $p < 0,01$ . \*\*\* $p < 0,001$ . C57BL/6 Infectado vs *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Infectado. # $p < 0,05$ . ## $p < 0,01$ . ### $p < 0,001$  para C57BL/6 No Infectado vs C57BL/6 Infectado. # $p < 0,05$ . ### $p < 0,001$  para *Ifnar1*<sup>-/-</sup> No Infectado vs *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Infectado.

En el día 1 pi, los animales *Ifnar1*<sup>-/-</sup> presentaron niveles significativamente aumentados de IL-1 $\beta$  en los LCV comparados con su grupo control no infectado ( $p < 0,05$ ), y una producción exacerbada respecto a los niveles locales detectados en los animales C57BL/6 infectados ( $p < 0,05$ ); sin embargo, este aumento prematuro no se mantuvo a lo largo de la infección, detectando una disminución significativa respecto a los animales C57BL/6 al día 4 ( $p < 0,001$ ) (Figura 36A). Las concentraciones de IL-6 fueron variables con ausencia de un perfil diferencial (datos no mostrados).

El estudio del perfil antiinflamatorio a nivel vaginal mostró que, en ambas cepas de ratones, los niveles de TGF- $\beta$  aumentaron en forma progresiva a partir del día 2 pi ( $p < 0,001$ ) conforme avanza la infección, en comparación con sus controles no infectados. Al realizar un estudio comparativo entre cepas, se observó en los animales *Ifnar1*<sup>-/-</sup> un pico de respuesta en el día 4 pi ( $p < 0,05$ ) (Figura 36B). Por otra parte, la IL-

10 estuvo aumentada en los animales *Ifnar1*<sup>-/-</sup> respecto al grupo de animales C57BL/6 en el día 1 pi y, de manera interesante, mostró un incremento significativo al día 4 pi ( $p < 0,05$ ) (Figura 36C) coincidente con el pico de TGF- $\beta$ .

Respecto a la IL-17, se conoce que tiene un papel central en la inmunidad protectora contra las infecciones sistémicas y orales por *C. albicans*<sup>155,210</sup>; sin embargo, su rol durante la CVV es controversial<sup>153,211</sup>. Su producción, junto a otras citoquinas del eje IL-17 está a cargo de las células Th17 que secretan IL-17A, IL-17F e IL-22 y por las ILC3 que también producen IL-17 e IL-22<sup>212</sup>. En el modelo murino de CVV, evaluamos también la presencia de IL-17A e IL-22 en LCV de animales C57BL/6 e *Ifnar1*<sup>-/-</sup> y no se observaron niveles detectables de ambas citoquinas en las dos cepas de animales, sugiriendo que la respuesta inmune local mediada estas citoquinas no cumple un papel relevante durante la vaginitis por *C. albicans*.

Estos hallazgos ponen en evidencia el importante rol de la activación de la vía de IFNs-I en la regulación de los niveles de citoquinas secretadas al lumen vaginal de crucial importancia en la tolerancia e inmunopatogenia de la CVV.

### **Estudio de poblaciones inmunes en nódulos linfáticos drenantes de vagina de animales C57BL/6 e *Ifnar1*<sup>-/-</sup> al día 4 pi con *C. albicans*.**

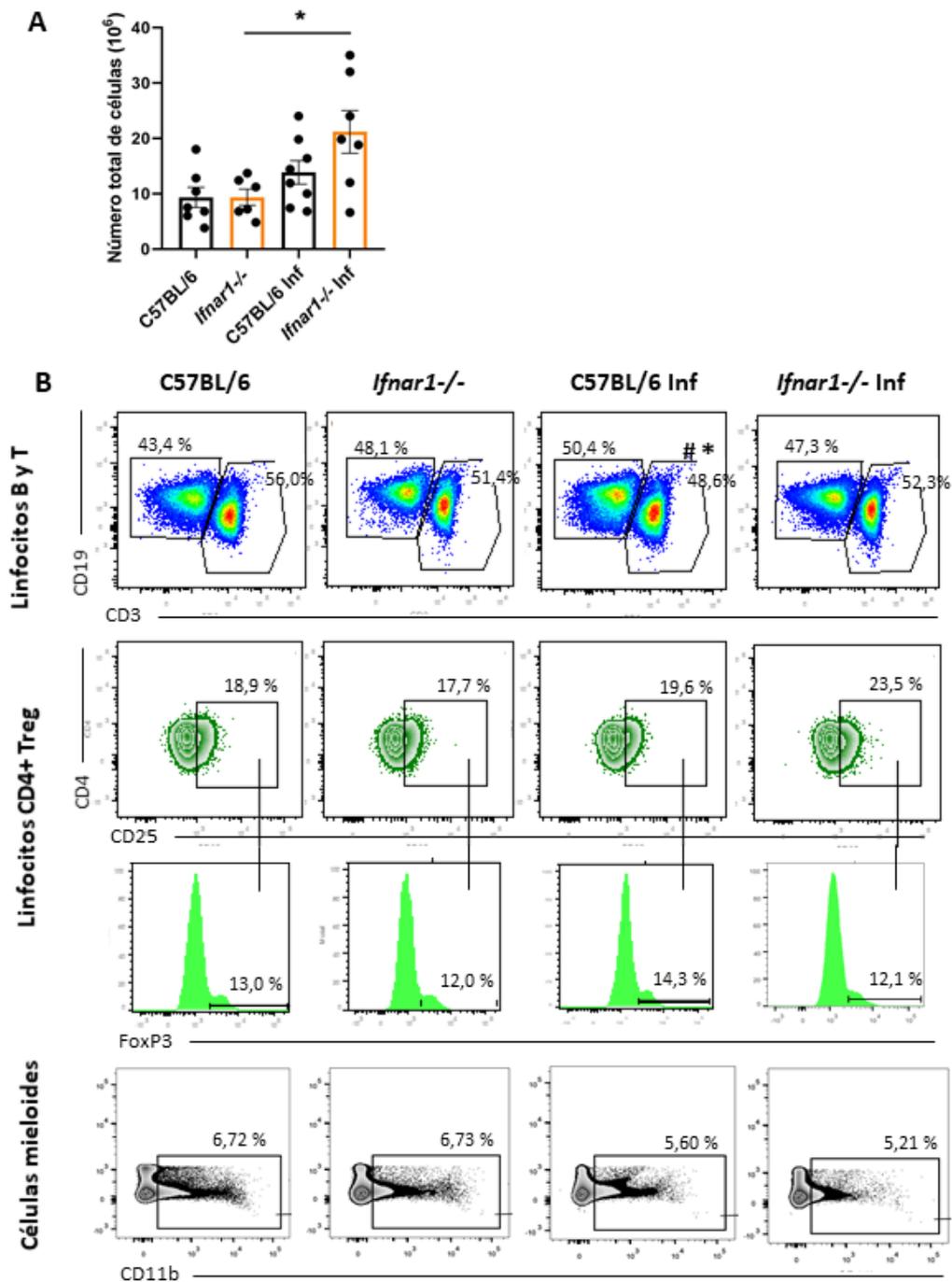
Existe una relación compleja y dinámica entre *C. albicans* y el huésped humano, cuyo equilibrio está muy influenciado por el sistema inmunológico. Se sabe que *C. albicans* infecta múltiples sitios mucosos que poseen sus propios mecanismos inmunológicos regulatorios y de susceptibilidad a las infecciones. Esto resalta el concepto de "compartimentalización de la respuesta inmune" o "respuesta inmune sitio-específica"; aunque existen respuestas inmunitarias antifúngicas comunes, también existen respuestas características de cada nicho frente al hongo, con repercusiones particulares a nivel periférico<sup>51,52</sup>. El impacto de la infección vaginal por *C. albicans* sobre las poblaciones celulares inmunes presentes en los NL drenantes no ha sido explorada hasta el momento. Del mismo modo, no hay evidencia sobre el papel de los IFNs-I sobre la respuesta inmune adaptativa en este contexto infeccioso.

Con el fin de complementar los hallazgos obtenidos a nivel local, analizamos los efectos de la ausencia del receptor IFNAR sobre la distribución leucocitaria en periferia durante la CVV. Para ello, teniendo en cuenta el tiempo estimado para la inducción de la respuesta inmune adaptativa, se estudiaron por citometría de flujo diferentes poblaciones celulares inmunes en NL drenantes de vagina, únicamente al día 4 pi, en ratones C57BL/6 e *Ifnar1*<sup>-/-</sup>, infectados y no infectados con *C. albicans*. La estrategia de "gate" utilizada para el análisis de las poblaciones linfoides y mieloides se incluye en el Anexo de este Capítulo (Anexo CAP III, Figura 1). De manera complementaria y con el fin de evaluar la presencia del hongo en los NL de estos animales, los mismos fueron disgregados y cultivados con el fin de determinar el número de UFC; no se observó crecimiento fúngico en ninguno de los grupos infectados.

La Figura 37 muestra el comportamiento de las poblaciones de linfocitos T CD3<sup>+</sup>, linfocitos T regulatorios (Treg) CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup>, linfocitos B CD19<sup>+</sup> y células mieloides CD11b<sup>+</sup> en los NL drenantes de vagina (día 4 pi) en los diferentes grupos de animales. El primer parámetro evaluado fue la celularidad total en los NL (Figura 37A). Se puede observar que en los animales C57BL/6 infectados (C57BL/6 Inf) no experimentaron cambios estadísticamente significativos respecto a su control, mientras que en los ratones *Ifnar1*<sup>-/-</sup> la infección con *C. albicans* SC5314 (*Ifnar1*<sup>-/-</sup> Inf) indujo un marcado incremento en la celularidad total de los NL estudiados ( $p < 0,05$ ).

La Figura 37B muestra *Dotplots* representativos de los resultados obtenidos en el análisis de las frecuencias de las poblaciones celulares estudiadas en las diferentes cepas de ratones y en las dos condiciones experimentales (No Infectado e Infectado).

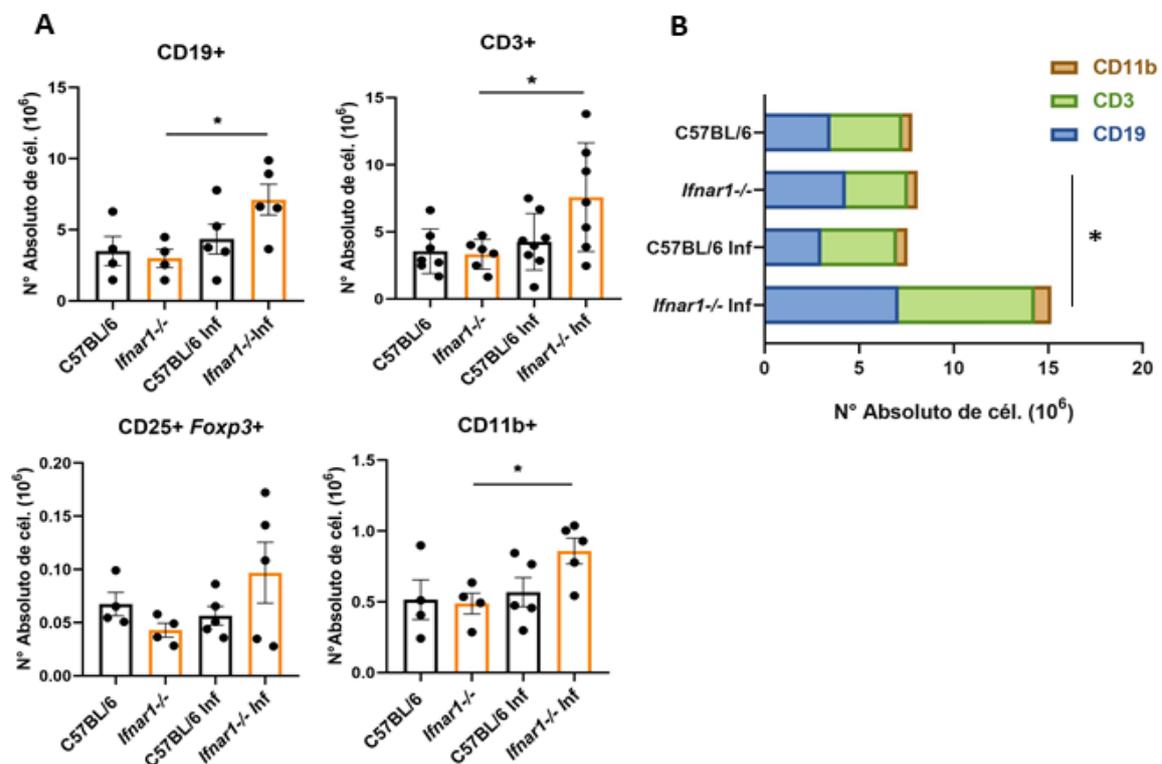
De manera relevante, se observó disminución en la frecuencia de linfocitos T en NL de animales C57BL/6 infectados con *C. albicans* respecto a los animales controles sin infectar ( $p < 0,05$ ). También se observó diferencia en la frecuencia de esta población cuando los valores se compararon con los de la cepa de animales *Ifnar1*<sup>-/-</sup> infectados con el hongo ( $p < 0,05$ ) (Figura 37B y Anexo CAP III, Figura 2). Respecto a las demás poblaciones en estudio, no se observaron cambios significativos en las frecuencias de linfocitos B (células CD19<sup>+</sup>, panel superior), linfocitos Treg (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup>, paneles centrales, *Dotplots* e histogramas) y células mieloides (CD11b<sup>+</sup>, paneles inferiores) en ambas cepas de animales durante la infección (Figura 37B).



**Figura 37. Efecto de la infección vaginal con *C. albicans* en la distribución leucocitaria en NL drenantes de vagina al día 4 pi. A)** Número total de células en NL drenantes de vagina de animales C57BL/6 e *Ifnar1*<sup>-/-</sup> no infectados e infectados con *C. albicans* al día 4 pi. Los valores representan la media  $\pm$  ESM.  $n \geq 5$ . \* $p < 0,05$ . **B)** Gráficos de puntos representativos de las frecuencias de linfocitos B CD19<sup>+</sup>, linfocitos T CD3<sup>+</sup>, linfocitos Treg CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> y células mieloides CD11b<sup>+</sup> en NL de ambas cepas de animales no infectados e infectados con *C. albicans* obtenidos por citometría de flujo.  $n \geq 5$ . #  $p < 0,05$  para C57BL/6 No Infectado vs C57BL/6 Infectado. \* $p < 0,05$  para C57BL/6 Infectado vs *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Infectado.

La Figura 38A muestra los números absolutos de células de cada población estudiada representadas de acuerdo a la cepa de ratón y al tratamiento. Se observó un aumento significativo en el número absoluto de linfocitos B (CD19+), linfocitos T (CD3+) y células mieloides (CD11b+) en los animales *Ifnar1*<sup>-/-</sup> infectados en comparación con el control sin infectar ( $p < 0,05$ ), sin embargo, este cambio no se observó en la población de linfocitos Treg (CD4+ CD25+ FoxP3+).

Por otra parte, el gráfico que muestra la figura 38B representa en conjunto la distribución de los números absolutos de las poblaciones de linfocitos T (CD3+), B (CD19+) y células mieloides (CD11b+) para los cuatro grupos de animales incluidos en el estudio. Mientras que la infección en animales C57BL/6 que poseen intacta y funcional la vía de los IFNs-I, la infección no produjo cambios en las poblaciones estudiadas, puede apreciarse claramente el aumento significativo de las poblaciones mencionadas en los animales *Ifnar1*<sup>-/-</sup> infectados con *C. albicans* respecto a los animales de la misma cepa sin infección ( $p < 0,05$ ).



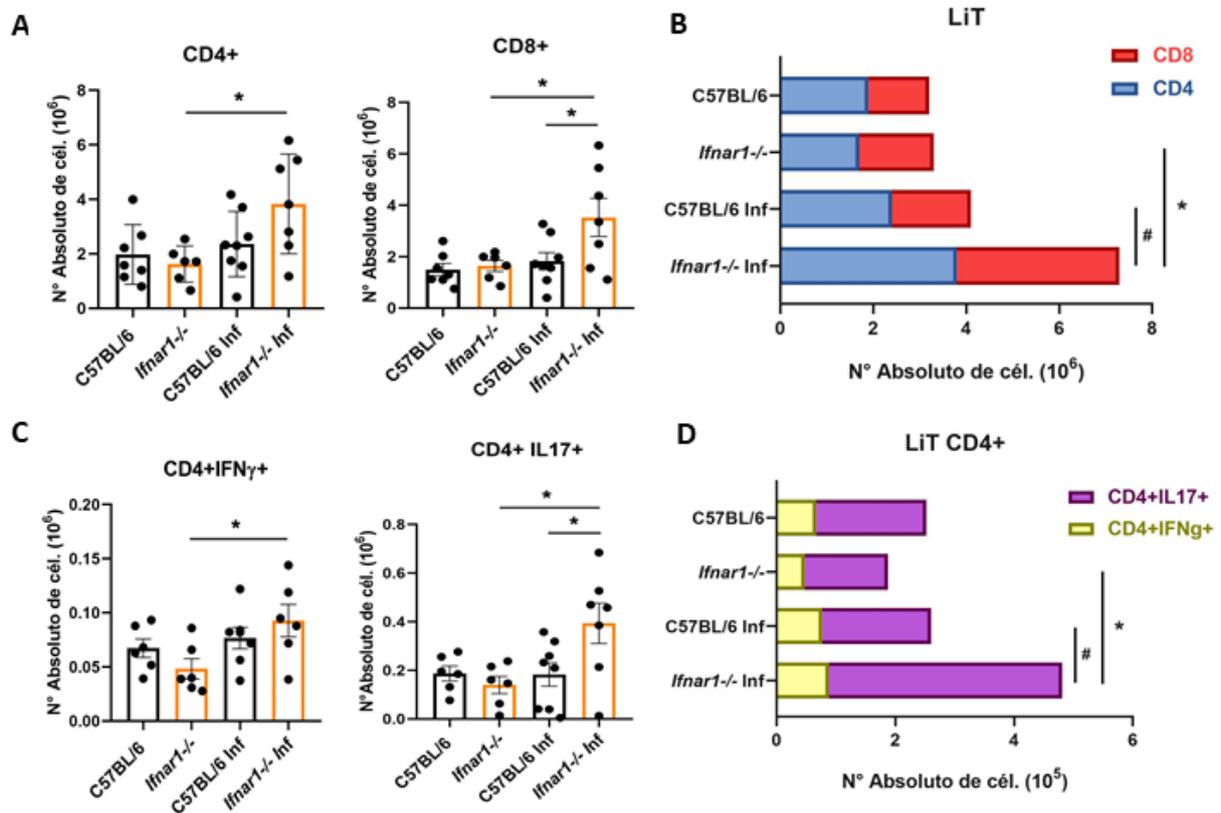
**Figura 38. Efecto de la infección vaginal con *C. albicans* sobre el número absoluto de poblaciones celulares inmunes en NL drenantes de vagina al día 4 pi. A)** Números absolutos de las distintas poblaciones leucocitarias estudiadas en NL representadas de acuerdo a la cepa de ratón y al tratamiento. **B)** Distribución de los números absolutos de las poblaciones celulares

estudiadas para cada grupo de animales. Los valores representan la media  $\pm$  ESM.  $n \geq 5$ . \* $p < 0,05$ .

En este estudio se evaluó además la distribución de las subpoblaciones de células T en NL drenantes de vagina, tanto la población de linfocitos T CD4+ como CD8+ (Figura 39). El panel A de la figura muestra los números absolutos de células T CD4+ y CD8+ para cada cepa de ratones según el tratamiento. Se observó un aumento significativo en el número absoluto de linfocitos T CD4+ y CD8+ en NL de animales *Ifnar1*<sup>-/-</sup> infectados con *C. albicans* respecto a los no infectados ( $p < 0,05$ ). Para los linfocitos CD8+ este incremento además fue significativo respecto a los ratones C57BL/6 infectados ( $p < 0,05$ ). En el panel B de la figura se encuentra representada la distribución global de ambas subpoblaciones de linfocitos T para los cuatro grupos en estudio donde se destacan los números absolutos significativamente aumentados de linfocitos T CD4+ y T CD8+ en los animales *Ifnar1*<sup>-/-</sup> infectados con el hongo ( $p < 0,05$ ).

A continuación, se analizó el impacto de la ausencia del receptor IFNAR sobre el número de células T CD4+ productoras de IL-17 e IFN $\gamma$  durante la infección con *C. albicans* (Figura 39). Para ello las células fueron estimuladas *in vitro* con PMA/ionomicina y procesadas posteriormente para marcar citoquinas intracelulares con los anticuerpos correspondientes.

En los animales C57BL/6 no se observaron cambios en ambas poblaciones en los NL drenantes a los 4 días de la infección vaginal. Se observó un aumento significativo en el número absoluto de células T CD4+ productoras de IL-17 e IFN $\gamma$  en animales *Ifnar1*<sup>-/-</sup> infectados con el hongo respecto al control no infectado ( $p < 0,05$ ); a su vez la cantidad de células productoras de IFN $\gamma$  fue significativamente mayor que en los animales C57BL/6 infectados ( $p < 0,05$ ). En el panel D de la figura se encuentra representada la distribución global de las poblaciones de linfocitos T productores de IFN $\gamma$  e IL-17 para los cuatro grupos en estudio, donde se destacan los números absolutos significativamente aumentados de linfocitos T productores de ambas citoquinas en los animales *Ifnar1*<sup>-/-</sup> infectados con *C. albicans* respecto a los no infectados ( $p < 0,05$ ) y a los animales C57BL/6 infectados ( $p < 0,05$ ). Se observó además que el número de células T CD4+ productoras de IL-17 predomina sobre el número de células productoras de IFN $\gamma$  ( $p < 0,05$ ).



**Figura 39. Efecto de la infección vaginal con *C. albicans* en el número de subpoblaciones de linfocitos T y linfocitos T CD4+ productores de IL-17 e IFN $\gamma$  en NL drenantes de vagina al día 4 pi.** **A)** Números absolutos de linfocitos T CD4+ y CD8+ en NL drenantes de vagina de animales C57BL/6 e *Ifnar1*<sup>-/-</sup> no infectados e infectados con *C. albicans* al día 4 pi determinados por citometría de flujo. \* $p < 0,05$  **B)** Distribución de los números absolutos de linfocitos T (LiT) CD4+ y CD8+ en los diferentes grupos de animales en estudio. \* $p < 0,05$  (para CD4+ y CD8+) # $p < 0,05$  (para CD8+) **C)** Números absolutos de células T CD4+ productoras de IFN $\gamma$  e IL-17 en NL drenantes de vagina de animales C57BL/6 e *Ifnar1*<sup>-/-</sup> no infectados e infectados con *C. albicans* al día 4 pi determinados por citometría de flujo. Las células obtenidas de los NL de animales pertenecientes a cada grupo experimental se estimularon *in vitro* con PMA/Ionomicina por 5hs y posteriormente se cosecharon y procesaron para la determinación de citoquinas intracelulares por citometría de flujo, utilizando los anticuerpos correspondientes. \* $p < 0,05$  **D)** Distribución de los números absolutos de linfocitos T (LiT) CD4+ productores de IFN $\gamma$  e IL-17 en los diferentes grupos de animales en estudio. \* $p < 0,05$  (para células productoras de IFN $\gamma$  e IL-17) # $p < 0,05$  (para células productoras de IL-17). Los valores representan la media  $\pm$  ESM.  $n \geq 6$ .

Estos hallazgos en su conjunto destacan la importancia de la señalización de IFNs-I en la regulación de la expansión de poblaciones mieloides y linfoides en los NL drenantes de vagina durante una infección con *C. albicans* como así también en el número linfocitos T CD4+productores de IL-17 e IFN $\gamma$ .

## CONCLUSIONES CAPÍTULO III

### **Estudio de la contribución de los IFNs-I y su vía de señalización en la respuesta antifúngica durante la infección vaginal por *C. albicans*.**

#### **A nivel local:**

- Los IFNs-I y su vía de señalización cumplen un rol importante en el control de la carga fúngica al inicio de la infección por *C. albicans* (día 1) y en la regulación del reclutamiento de células PMNs al lumen vaginal a lo largo de la cinética evaluada (día 1 y 8).
- Los estudios histológicos demostraron que los IFNs-I están involucrados en el control de la invasividad de *C. albicans* en el tracto mucoso durante etapas tempranas de la infección (día 2) como así también en el desarrollo de la respuesta inflamatoria tisular. Frente a la elevada penetración de *C. albicans*, los animales *Ifnar1*<sup>-/-</sup> desarrollaron una robusta respuesta inflamatoria al día 2 pi mediada principalmente por PMN. Sin embargo, hacia el final de nuestro estudio, se observó un perfil inverso con significativo aumento de la respuesta tisular en los animales C57BL/6.
- La evaluación del perfil de citoquinas secretadas al lumen vaginal demostró que la ausencia del receptor IFNAR favoreció un ambiente proinflamatorio al comienzo de la infección (día 1) caracterizado por elevados niveles de IL-1 $\beta$ , estrechamente relacionados con la reacción tisular observada. Sin embargo, este perfil no se mantuvo a lo largo de la infección detectando una disminución significativa respecto a los animales C57BL/6 hacia el día 4 pi.

En relación al estudio de citoquinas antiinflamatorias, se observó un pico de TGF- $\beta$  e IL-10 al día 4 pi en animales *Ifnar1*<sup>-/-</sup> coincidente con el nivel más bajo de IL-1 $\beta$ . Estas observaciones dejan en evidencia un rol importante de la señalización de IFNs-I en la regulación de diferentes mediadores inmunes durante el curso de la CVV.

Los resultados obtenidos sugieren que la activación de los IFNs-I y su vía de señalización tendrían un rol protector y regulador en etapas tempranas de la infección vaginal por *C. albicans*.

**A nivel periférico:**

- La señalización de los IFNs-I cumple un rol relevante en la regulación de la expansión de poblaciones mieloides y linfoides en NL drenantes de vagina en respuesta a la infección por *C. albicans* al día 4 pi.
- La activación de la vía de IFNs-I contribuye a la disminución en la frecuencia de linfocitos T CD3+ en los NL durante la infección con el hongo. Sin embargo, en ausencia del receptor IFNAR el número absoluto de las poblaciones de linfocitos B y T (totales) y células mieloides se encontraron aumentadas en los ratones con CVV respecto a los no infectados.
- El estudio de las subpoblaciones de células T CD3+ en los NL drenantes de vagina demostró que la vía en estudio cumple un rol relevante en la regulación del número de linfocitos T CD4+ y CD8+ al día 4 de la infección.
- La ausencia de señalización a través del receptor IFNAR provocó un aumento significativo en el número absoluto de células T CD4+ productoras de IFN $\gamma$  e IL-17 poniendo en evidencia su participación en el mantenimiento de niveles constitutivos de estas poblaciones celulares durante la infección vaginal por *C. albicans* al día 4.

En su conjunto, los resultados obtenidos con el modelo murino de CVV demuestran que la vía de IFNs-I y su señalización cumplen un rol relevante en la respuesta inmune del huésped frente al patógeno *C. albicans* en el tracto genital femenino.

Considerando que el papel de estas citoquinas en respuesta a la infección local por *C. albicans* no ha sido reportado hasta el momento, nuestro estudio constituye un aporte significativo al entendimiento de los mecanismos inmunes involucrados en la

patogenia de la CVV y le atribuye a los clásicos IFNs-I nuevas funciones en la respuesta  
inmune antifúngica no descritas con anterioridad.

# DISCUSIÓN

La CVV es una de las infecciones más frecuentes del tracto genital femenino que afecta a las mujeres en edad reproductiva. Se estima que el 75% de las mujeres experimentan la infección al menos una vez en la vida y en más del 90% de los casos, es causada por *C. albicans*<sup>8,213</sup>.

La forma recurrente de la patología (CVVR) (definida por la presencia de 4 o más episodios por año) afecta a casi el 9% de las mujeres en todo el mundo dando como resultado una disminución de la calidad de vida y un aumento de los costos sanitarios asociados<sup>3,14</sup>. Con la excepción de raros casos, la CVV es fácilmente tratable, siempre y cuando los factores de riesgo que la ocasionaron sean removidos o controlados<sup>6</sup>. Sin embargo, la CVVR es una patología preocupante por la recurrencia de los síntomas y la escasa respuesta a los tratamientos convencionales<sup>8,179</sup>.

Como miembro comensal de la microbiota humana, *C. albicans* comúnmente coloniza el epitelio vaginal de forma asintomática<sup>4</sup>. Sin embargo, la evolución hacia la infección sintomática puede deberse a múltiples factores. El desbalance en la composición de la microbiota vaginal, factores de virulencia del hongo, como así también factores propios del huésped promueven la aparición de la patología<sup>10</sup>.

Las causas que determinan la transición de CVV esporádica a CVVR son aún desconocidas. 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<sup>6,35,214</sup>. Diversas variantes genéticas en receptores de la inmunidad innata, citoquinas, vías de señalización, y mecanismos efectores que participan en el control de la candidiasis en humanos, están asociadas a alteraciones en la respuesta inmune antifúngica en pacientes con CVVR<sup>35,122,214</sup>.

Romani y col. (2011) 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<sup>5</sup>.

De manera similar a lo que ocurre en otros sitios del organismo expuestos a potenciales patógenos, el microambiente 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<sup>1,5</sup>. En este escenario, la CVV es considerada una enfermedad inflamatoria aguda, producto de una respuesta inflamatoria exacerbada desencadenada por el hongo y sus factores de virulencia, y directamente relacionada a la aparición de los síntomas<sup>10</sup>. En este contexto, el estudio de roles no descritos para ciertas moléculas y vías de señalización del sistema inmune en la patogenia de la CVV es relevante; desde el punto de vista básico, aportando nuevas evidencias sobre los mecanismos de respuesta, y desde la clínica, en la propuesta de nuevas terapias o alternativas mixtas de intervención.

Los IFNs-I constituyen una amplia familia de citoquinas inmunes innatas que se producen rápidamente en respuesta a la exposición frente a diferentes estímulos (exógenos y endógenos) y son capaces de orquestar efectos biológicos variados en la defensa, diferenciación, proliferación, metabolismo celular e inmunomodulación<sup>162</sup>. Poco se sabe hasta el presente sobre la relevancia de la vía de IFNs-I a nivel del tracto genital femenino durante la infección por *C. albicans*, particularmente en las CE, que constituyen la primera línea de defensa frente al patógeno, y que son capaces de responder rápidamente frente a la invasión<sup>128,164,178</sup>.

Teniendo en cuenta los antecedentes existentes y los interrogantes sin resolver sobre la CVV, 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 los IFNs-I en la patogenia de esta micosis.

Para estudiar la activación de la vía de IFNs-I en CE del tracto genital femenino en respuesta al dimorfismo de *C. albicans*, y al reconocimiento inmune de diferentes PAMPs fúngicos, se utilizó un modelo *in vitro* de CVV empleando la línea celular humana HeLa, validado para el estudio frente a este hongo, también empleado para mimetizar infecciones por otros microorganismos<sup>71,84,121-126</sup>.

El mismo modelo experimental se utilizó para llevar a cabo un estudio proteómico cuantitativo en las CE en interacción con *C. albicans* mediante LC-MS/MS, con el fin de evaluar la activación de la vía de IFNs-I y los eventos relacionados. Además, con el objetivo de establecer la contribución de la interacción PAMPs-PRRs en la inducción del fenómeno, se evaluó la interacción entre los  $\beta$ -glucanos, principales

componentes de la pared fúngica y el receptor Dectin-1, empleando su agonista (Curdlan) y CE en cultivo.

Finalmente, para estudiar la contribución de los IFNs-I y su vía de señalización en la respuesta antifúngica local y periférica durante la infección vaginal por *C. albicans*, se utilizó un modelo murino de CVV. El mismo fue desarrollado en ratones C57BL/6 y en animales deficientes en el receptor de IFNs-I, IFNAR.

### **Interacción *C. albicans*-CE**

Las CE constituyen una barrera activa que protege los diferentes tractos mucosos de la agresión de los patógenos. Además de expresar una amplia variedad de receptores innatos, también son capaces de producir diferentes componentes solubles como AMP, citoquinas, quimiocinas y alarminas importantes para la defensa del huésped<sup>35,136</sup>. En el caso particular de *C. albicans*, el dimorfismo fúngico es clave en la iniciación de este proceso. Moyes y col. (2010) trabajando con líneas de epitelio oral pudieron establecer que las CE poseen 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<sup>120</sup>.

A lo largo del tracto genital femenino, las CE constituyen la primera línea de defensa y son los elementos clave donde se inicia la interacción patógeno-huésped. Un estudio clínico demostró una mayor inhibición del crecimiento de *Candida* por CE vaginales recuperadas de mujeres sanas, en comparación con las de pacientes con CVVR, reportando un papel importante para estas células en la defensa del huésped<sup>142,215,216</sup>. En el mismo sentido, nuestros estudios sobre  $\beta$ -defensinas humanas 1 y 3, evidenciaron una menor producción de estos AMP con capacidad candidicida en CE recuperadas de pacientes con CVVR, reflejando la importancia de la competencia funcional de esta población celular<sup>84</sup>.

Las CE utilizan diferentes tipos de PRRs para detectar a *C. albicans*, incluidos TLR2, TLR4 y Dectin-1<sup>8,49,112,217</sup>. Los patrones de expresión de los PRRs varían entre los distintos tipos de CE y esto contribuye a variaciones específicas de nicho en las

respuestas de la mucosa contra *C. albicans*<sup>51,218</sup>. Por estas razones, el estudio de los mecanismos inmunes desencadenados luego de la interacción entre las CE del tracto genital femenino y el patógeno fúngico *C. albicans*, permite esclarecer el rol de los mediadores y células involucrados en la respuesta, contribuyendo así a una mejor comprensión de la inmunopatología de la CVV.

En el presente trabajo de tesis, mediante el empleo de un modelo *in vitro* de CVV<sup>84,121,122</sup>, se puso a punto una estrategia experimental para el estudio de los mecanismos de invasión fúngica que operan durante la interacción *C. albicans*-CE y su posterior impacto, en el inicio de la transcripción de ARNm de moléculas involucradas en la vía de los IFNs-I. Para ello se realizaron co-cultivos de CE (HeLa) con dos morfotipos diferentes del hongo: *C. albicans* SC5314 dimórfica y pseudomicelio, durante 4h y 24h. Estos ensayos se realizaron además a dos relaciones hongo:CE, 0,25:1 y 5:1. En todas las condiciones ensayadas las CE mantuvieron su viabilidad excepto en la incubación de 24h a la relación 5:1 debido al sobrecrecimiento fúngico.

La adhesión e invasión de los hongos a las CE es un proceso complejo que involucra diversos factores. Se sabe que el primer paso de adhesión implica una serie de interacciones entre los receptores epiteliales y las adhesinas de *Candida*, como Als3, Hwp1, Hwp2 y Rbt1 las cuales varían según el estado morfológico del hongo<sup>44,219,220</sup>, determinando, a su vez, diferencias en la invasión epitelial. Estudios recientes indican que tanto la endocitosis inducida como la penetración activa median la invasión epitelial de *C. albicans*, sin embargo, el mecanismo utilizado depende del linaje epitelial. Por ej., ambos mecanismos se utilizan durante la invasión de las CE orales, mientras que las CE intestinales sólo son invadidas a través de la penetración activa<sup>73,75,85</sup>.

A fin de explorar los mecanismos de invasión ejercidos sobre CE del tracto genital femenino por diferentes morfotipos del hongo, se analizaron por MET co-cultivos de *C. albicans* dimórfica y pseudomicelios con células HeLa luego de 4h de interacción a una relación 5:1. Los resultados pusieron en evidencia características típicas de invasión por penetración activa de *C. albicans* dimórfica sobre las CE, como la presencia de invaginaciones en el sitio de ingreso de las hifas y espacios amplios e irregulares entre el hongo y las membranas de las células, probablemente debido al efecto de las

enzimas hidrolíticas secretadas durante la emisión de las hifas (Figura 7B). Este mecanismo de invasión ocurre en presencia de hifas viables del hongo que, con ayuda de la secreción de enzimas como SAP y/o LIP, invaden a través o entre las CE independientemente de su viabilidad<sup>73,85,220</sup>. Por otro lado, en los cultivos con pseudomicelios de *C. albicans*, se observaron clásicos indicios de endocitosis inducida como protrusiones y ondulaciones de la membrana plasmática de las CE alrededor del hongo y formas fúngicas engolfadas, estrechamente rodeadas por las membranas celulares (Figura 7C). Este proceso requiere de CE viables que, en respuesta a las invasinas fúngicas, reordenan su citoesqueleto y forman procesos de membrana para la endocitosis del hongo en un mecanismo mediado por clatrina<sup>73,220,221</sup>.

Nuestros resultados indican que los dos mecanismos de invasión celular descritos para *C. albicans* pueden ocurrir en CE del tracto genital femenino. Sin embargo, el predominio de uno u otro depende del morfotipo del hongo con el cual interactúen. Este hecho podría tener implicancia sobre la exposición de los PAMPs fúngicos, los PRRs involucrados en el reconocimiento, las vías de señalización activadas y el daño ocasionado durante la invasión. Aunque se ha avanzado mucho en la comprensión de los PAMPs de *C. albicans* involucrados en los diferentes mecanismos de invasión, poco se sabe sobre el reconocimiento inmune diferencial del hongo por las CE<sup>222,223</sup>. En las CE orales, una vez endocitadas, las hifas de *C. albicans* obtienen acceso a los compartimentos endosomales<sup>224</sup>. En relación a esto, Khan y col. (2016) demostraron que el reconocimiento de  $\beta$ -(1,3) glucanos por Dectin-1 desencadena el tráfico de TLR9 hacia los fagosomas, sugiriendo que estos PRRs pueden ser fundamentales para coordinar la defensa antifúngica innata como consecuencia de la invasión de *C. albicans* por endocitosis inducida<sup>189</sup>.

Por otro lado, los procesos exactos y los PRRs involucrados en la penetración activa son poco conocidos en la actualidad, a pesar de ser objeto de muchos estudios<sup>220</sup>. La penetración activa de *C. albicans* en los tejidos provoca daños en la superficie epitelial y una potente respuesta de citoquinas proinflamatorias<sup>225</sup>. Además de la elongación de las hifas, los únicos factores solubles que han sido implicados como parte de este proceso son la familia de SAPs<sup>220</sup>. Por ej., SAP5 liberada por hifas de *C. albicans* degrada la proteína de unión estrecha epitelial, E-cadherina<sup>226</sup>, favoreciendo la

invasión por penetración activa. Bruno y col. (2015) demostraron en un modelo *in vivo* de CVV, mediante secuenciación del transcriptoma (ARN-seq) de *C. albicans*, que las SAPs secretadas por el hongo asociadas a hifas (SAP4-6 y SAP5, más específicamente) contribuyen a la inmunopatología de la enfermedad a través de la activación del inflammasoma NLRP3<sup>227</sup>. Esto sugiere un rol importante de este PRR durante la invasión epitelial por penetración activa.

La evidencia citada acompaña la hipótesis que de los diferentes mecanismos de invasión empleados por los distintos morfotipos de *C. albicans* utilizados en este trabajo de tesis podrían involucrar diferentes PRRs en su reconocimiento condicionando el tipo e intensidad de la respuesta inmune desencadenada.

En relación a los mecanismos de invasión utilizados por *C. albicans*, cabe señalar que, en los tejidos mucosos de epitelio escamoso estratificado como la cavidad oral y el lumen vaginal, las capas epiteliales superficiales más altas no son proliferativas y se consideran funcionalmente inactivas. Es poco probable que dichas células ejerzan un mecanismo de entrada celular que dependa únicamente de la endocitosis inducida, ya que esto requiere CE sanas y viables. Por lo tanto, es probable que la penetración activa *in vivo* sea el principal mecanismo de invasión inicial de la mucosa, que permite el acceso a las capas submucosas. Allí, las hifas de *C. albicans* encontrarán CE activas viables que permitirán la entrada celular a través de endocitosis inducida. Por lo tanto, aunque la endocitosis inducida y la penetración activa pueden considerarse mecanismos distintos, es probable que ambos procesos desempeñen funciones complementarias *in vivo* durante la invasión de los tejidos de la mucosa oral y vaginal

<sup>44</sup>.

Debido a estos hallazgos, resultó de interés explorar si las diferentes formas de invasión de las CE por parte del hongo tienen impacto en la activación de las vías que inducen la producción de los IFNs-I.

### **Activación de vía de IFNs-I en CE del tracto genital femenino por *C. albicans***

Los IFNs tienen un papel fundamental en la protección del huésped contra amenazas externas, como la infección por patógenos, y amenazas internas, como el cáncer<sup>228</sup>. En el tracto genital femenino, los estudios sobre estas moléculas han estado orientados a responder interrogantes sobre sus funciones frente a infecciones, la mayoría de ellas virales y asociadas a los mecanismos clásicos de control de las mismas<sup>228-230</sup>. En otros tractos mucosos como en intestino, el actual paradigma describe a los IFNs-I como elementos relevantes en la función de la barrera intestinal, manteniendo la actividad inmune a nivel basal y participando en el *clearance* de CE dañadas y patógenos<sup>231</sup>. Estudios en pacientes y en modelos animales señalan su rol clave en el mantenimiento de la homeostasis intestinal<sup>231,232,233</sup>.

En contraposición a su función inmune antiviral, su contribución en la respuesta antifúngica está comenzando a ser explorada y diferentes estudios *in vivo* reportaron que poseen efectos tanto protectores como deletéreos durante la infección sistémica por *Candida*<sup>105,112,113,169</sup>. A lo largo de este trabajo se ha señalado la habilidad de *C. albicans* para regular su perfil transcripcional y factores de virulencia según los nichos que coloniza y los mecanismos inmunes que se ponen en marcha en diferentes sitios anatómicos<sup>51</sup>. Es importante recalcar entonces, que la mayor parte de la evidencia actual sobre la inducción, señalización y mecanismos de respuesta de los IFNs-I durante las infecciones por *Candida* fue obtenida mediante experimentos llevados a cabo en modelos de candidiasis diseminada y con células inmunes clásicas como macrófagos y CD<sup>112,113,171</sup>.

La respuesta inmune comienza con el reconocimiento del patógeno por los PRRs, que desencadenan mecanismos tempranos de respuesta críticos en la defensa del huésped<sup>102</sup>. En el reconocimiento de los PAMPs de *Candida* intervienen TLRs, CLRs, NLRs y RLRs. Estos receptores innatos son expresados por varios tipos celulares, incluyendo células inmunes como monocitos, macrófagos, CD y PMN, y por las CE<sup>17,108,234</sup>. Se describió que TLR7, TLR9 y Dectin-1, son capaces de inducir la producción de IFN $\beta$  en CD y macrófagos *in vitro* en respuesta a la exposición del hongo<sup>105,112,113,169</sup>. Además, estudios genómicos revelaron una fuerte inducción de genes involucrados en

las vías de respuesta de los IFNs-I en PBMC humanas estimuladas *in vitro* con *C. albicans*<sup>172,235</sup>. Sin embargo, no hay evidencia sobre la activación de la vía en CE del tracto genital femenino en respuesta a este patógeno.

### ***Contribución del dimorfismo, carga fúngica y tiempos de interacción con C. albicans***

Durante la interacción patógeno-huésped, la relación entre el inóculo infectivo y la magnitud de la respuesta es un parámetro relevante en el que deben tenerse en cuenta, las características particulares de la célula estimulada (inmune clásica o no) y el umbral basal al que dicha célula es capaz de ser activada. El tiempo durante el cual se produce la interacción también es importante, ya que permite evaluar la implicancia de la activación de la vía en estudio en respuesta al patógeno, su progresión y la detección de elementos indicadores o facilitadores de la misma. En este trabajo se evaluó, en primera instancia, los niveles de transcriptos de ARNm de *IFN $\beta$* , *IRF7* e *IRF3* en diferentes condiciones como magnitud de carga infectiva, tiempo de exposición al hongo, invasión de las CE y PAMPs fúngicos involucrados en la inducción de esta vía. Los estudios de proteómica cuantitativa complementan y refuerzan estas observaciones mediante la detección de elementos proteicos claves, indicadores de su activación.

En nuestros ensayos *in vitro*, la activación transcripcional de *IFN $\beta$* , *IRF7* e *IRF3* en las CE fue corroborada mediante el uso de dos agonistas clásicos de los receptores TLR3 y TLR4, Poly I:C y LPS, respectivamente<sup>112,169,183</sup>. Ambos estímulos activaron consistentemente la vía en estudio, sin embargo, el agonista de TLR4 indujo mayores niveles de transcripción de *IFN $\beta$*  y de *IRF7*. La expresión de *IRF3* no experimentó cambios significativos en respuesta a estos estímulos en las CE.

En relación a la magnitud de la carga infectiva, nuestros resultados demostraron que a tiempos tempranos de la interacción *C. albicans*-CE (4h), sólo el mayor inóculo del hongo con capacidad de dimorfizar, fue capaz de activar la transcripción de *IFN $\beta$*  y de *IRF7*, sin modificar los niveles de *IRF3*. Por otra parte, cuando el hongo ingresa a las CE vía endocitosis inducida por el pseudomicelio, los dos inóculos evaluados y de manera dosis dependiente, activaron la transcripción de *IFN $\beta$* , sugiriendo la existencia

de un menor umbral para el inicio de la activación de la vía cuando la invasión ocurre por este mecanismo. Sin embargo, aun cuando los niveles de ARNm de *IFN $\beta$*  fueron mayores que los observados durante la penetración activa, la expresión de *IRF7* e *IRF3* fue escasa. De manera interesante, los niveles de expresión de *IFN $\beta$*  registrados en nuestro estudio con el mayor inóculo de pseudomicelio del hongo fueron similares a los observados por Biondo y col. (2011) en CD convencionales estimuladas con *C. albicans* a una relación 2:1<sup>169</sup>. En estudios realizados a mayores tiempos de contacto (24h) y a una relación 0,25:1, sólo el ingreso del hongo por la vía endocítica indujo bajos niveles de transcritos de *IFN $\beta$* , aunque se detectó un aumento de la transcripción de *IRF7* en las CE. Debido a que *IRF7* es un ISG (Gen Estimulado por Interferón), esta observación sugiere que la invasión de *C. albicans* por distintos mecanismos puede determinar diferencias en los tiempos necesarios para inducir la transcripción de este grupo de genes<sup>166</sup>.

En otro tipo de infecciones como las bacterianas, el requisito de activación de *IRF3* e *IRF7* en la respuesta de *IFN $\beta$*  también fue demostrado ampliamente<sup>236,237</sup>, sin embargo, la relación temporal exacta entre estos *IRF* aún se encuentra sin definir<sup>238</sup>. Hu y col. (2015) reportaron un rol temprano para *IRF3* y un papel tardío (24h) para *IRF7* en la inducción de *IFN $\beta$*  en CE de oviducto murino infectadas con *Chlamydia muridarum*, lo cual es indicativo de un mecanismo de retroalimentación positiva de la síntesis de *IFN $\beta$*  durante esta infección<sup>238</sup>.

La evidencia acumulada indica que, aunque *IRF3* e *IRF7* son requeridos para una producción eficiente de *IFNs-I*, sus funciones no son redundantes. Se demostró que *IRF3* se expresa en la mayoría de las células, mientras que los bajos niveles constitutivos de *IRF7* en las células inmunes son indispensables en la iniciación de la respuesta, sin embargo, este *IRF* cumple su mayor rol en la retroalimentación y amplificación de la vía de los *IFNs-I*, cuando nuevas moléculas de *IRF7* son sintetizadas e *IRF3* es degradado<sup>239</sup>. Por otra parte, Honda y col. (2005) reportaron que en ratones deficientes en *IRF7* la respuesta antiviral estuvo severamente impedida, ya que, en condiciones normales, la primera fase de producción de *IRF7* amplifica la respuesta innata y favorece la inducción de la respuesta inmune adaptativa<sup>240</sup>. Los datos *in vitro* obtenidos en nuestro modelo indican que la invasión por penetración activa del hongo indujo la expresión de

*IFN $\beta$*  a través de la transcripción de *IRF7* a tiempos tempranos de la interacción, mientras que la presencia de ambos transcritos sólo fue detectada a tiempos mayores de contacto, cuando *C. albicans* ingresa a la célula por la vía endocítica.

Nuestras observaciones sugieren que la transición entre los diferentes morfotipos del hongo durante la infección por *C. albicans* y su habilidad para invadir las CE por distintos mecanismos son eventos relevantes que impactan sobre la intensidad de activación de la vía en estudio y los mediadores participantes.

### ***Contribución del reconocimiento inmune de PAMPs fúngicos***

Debido a la importancia de Dectin-1 en la protección del hospedador frente a infecciones por *C. albicans* reportada en humanos y en modelos murinos<sup>38,109</sup> y a la extensa evidencia sobre la expresión de este receptor en CE humanas<sup>84,217,241-243</sup>, planteamos como hipótesis que el reconocimiento de  $\beta$ -glucanos por este receptor constituye un evento importante para la inducción de la vía de IFNs-I en las CE del tracto genital femenino durante la CVV.

Con el fin de abordar este estudio, se realizaron cultivos de CE HeLa con diferentes estímulos. Se utilizaron agonistas de PRRs como Zymosan y Curdlan ( $\beta$ -(1,3) glucanos particulados) y, además, pseudomicelios de *C. albicans* muertos por calor (HK-*Ca*), ya que este tratamiento produce un aumento en la exposición de los  $\beta$ -glucanos en su pared<sup>38,112,184</sup>. Zymosan es reconocido por los receptores TLR2/TLR6 y Dectin-1, mientras que Curdlan actúa como ligando específico de Dectin-1<sup>112</sup>. Según las condiciones experimentales establecidas para este estudio, las CE estuvieron en contacto durante 4h o 24h con los estímulos. Nuestros resultados demostraron que la activación del receptor Dectin-1, con los agonistas empleados, como así también el estímulo con HK-*Ca*, indujeron de manera eficiente y significativa la activación de la vía de IFNs-I en las CE.

Del Fresno y col. (2013), reportaron un pico de expresión sostenida de *IFN $\beta$*  en CD estimuladas *in vitro* con Curdlan y Zymosan entre las 3h y 5h que luego disminuyó progresivamente hacia las 8h post-estímulo<sup>112</sup>. La cinética de estos resultados concuerda con nuestros hallazgos, ya que observamos una marcada inducción de ARNm de *IFN $\beta$*  en las CE a las 4h y ausencia de transcritos a tiempos prolongados

(24h). En relación a los niveles de expresión observados, Curdlan indujo mayor transcripción de *IFN $\beta$*  que Zymosan (Figura 11), contrario al perfil observado por estos autores en células inmunes clásicas. Respecto a la transcripción de *IRF7*, ambos agonistas de Dectin-1 mostraron un efecto tardío en su inducción (24h), similar a lo reportado por otros autores en la cinética de expresión de este transcripto y la retroalimentación de la vía<sup>166,238,244</sup>.

La inactivación de *C. albicans* por calor, es un proceso que altera la composición de la pared del hongo, cambiando los PAMPs que normalmente se expresan en su superficie<sup>38,112,184</sup> e impidiendo la producción y liberación de factores de virulencia. Si bien otros componentes del hongo podrían persistir luego de la exposición al calor, la evidencia indica que los  $\beta$ -glucanos son los PAMPs mayoritariamente expresados<sup>64,112,184</sup>. En relación a los experimentos realizados con CE estimuladas con HK-*Ca*, se observó inducción de la transcripción de *IFN $\beta$*  a las 4h, pero los niveles detectados fueron más bajos en comparación con Curdlan y Zymosan, sin inducción de *IRF3* o *IRF7* (Figura 11). Del Fresno y col. reportaron una respuesta de *IFN $\beta$*  lenta al utilizar este estímulo en CD que podría reflejar una exposición reducida de los patrones moleculares asociados a *Candida* que activan a las células y, en consecuencia, un reconocimiento menos eficiente de estos ligandos por los TLRs y CLRs expresados por las CD<sup>112</sup>.

Los resultados obtenidos sugieren que el reconocimiento de los  $\beta$ -glucanos por Dectin-1 es un evento de crucial importancia para la inducción de IFNs-I en CE del tracto genital femenino a tiempos cortos de interacción, sin embargo, otras vías de señalización también pueden participar en este proceso. Evidencia reciente vinculó el reconocimiento de  $\beta$ -glucanos del patógeno fúngico *Aspergillus fumigatus* mediado por Dectin-1, con la activación de una cascada protectora de IFNs-I y III en pulmón<sup>245</sup>. Además del importante rol de la señalización de Dectin-1 en CD estimuladas con *C. albicans* para la activación de IFNs-I reportado por Del Fresno y col. (2013), también describieron una contribución menor de la señalización de TLR2 en este evento<sup>112</sup>. Se demostró que Dectin-1 coopera con TLR2 para mediar respuestas proinflamatorias inducidas por Zymosan o patógenos fúngicos<sup>246-248</sup> y, en relación a la activación de IFNs-I por este PRR, Nazli y col. (2019) reportaron que la producción de *IFN $\beta$*  en CE del

tracto genital femenino inducida por la glicoproteína gp120 de VIH fue mediada por la señalización a través de TLR2 que, además, tuvo un efecto protector sobre las uniones estrechas de la barrera epitelial<sup>249</sup>. Hasta aquí, nuestros hallazgos aportan evidencia novedosa sobre la contribución del reconocimiento de componentes de la pared fúngica en la inducción de IFNs-I en CE del tracto genital femenino.

Por otra parte, Biondo y col. (2011) demostraron que las CD convencionales generan respuestas de IFN $\beta$  dependientes de TLR9 y TLR7, después de la estimulación *in vitro* con ADN y ARN de *Candida*<sup>169</sup>. Observaron, además, que en términos de capacidad inductora de IFN, el ARN de *C. albicans* fue tan potente como el ADN fúngico. En otro estudio, Bourgeois y col. (2011) también aportaron evidencia sobre el rol de TLR7 en la inducción de IFN $\beta$  en respuesta a *Candida* en CD<sup>105</sup>. Estos estudios sugieren que el reconocimiento inmune de ácidos nucleicos de *C. albicans* es un evento capaz de activar la producción de IFNs-I, al menos en células inmunes clásicas. Por otra parte, Beisswenger y col. (2012) describieron que el material genético presente en conidias de *A. fumigatus* induce la activación de la vía de señalización de IFN $\beta$  en CE bronquiales humanas<sup>243</sup>.

El ADN puede introducirse en una célula huésped mediante transfección con PEI (Polietilenimina), un polímero catiónico estable que induce la endocitosis del complejo ADN-PEI<sup>250</sup>. Un sistema de transfección similar fue utilizado por Beisswenger y col. (2012) para el estudio de la inducción de IFN $\beta$  por ARN de *A. fumigatus* en CE respiratorias<sup>243</sup> y por Biondo y col. (2011) en su estudio con ácidos nucleicos de *C. albicans*<sup>169</sup>. En este trabajo de tesis, el ADN extraído de *C. albicans* se empleó acompañado a PEI o en su forma libre para estimular a las CE. Nuestros resultados demostraron que este estímulo fue capaz de generar una potente inducción de IFN $\beta$  a los tiempos evaluados, especialmente a las 4h, donde se detectaron niveles similares a los obtenidos con el  $\beta$ -glucano, Curdlan. También se observó elevada participación de IRF7, relacionada principalmente por numerosos autores con la activación del PRR endosomal TLR9<sup>165,166,240</sup>. Cabe destacar, además, que este estímulo fue el único que indujo incremento en los transcritos de IRF3 acorde a la activación clásica reportada para este material genético<sup>166,238,244</sup>. En nuestro modelo, el ADN libre de *C. albicans*

luego de 4h, activó la transcripción de *IFN $\beta$*  a niveles significativamente menores que el complejo ADN-PEI, probablemente debido a la menor estabilidad del ácido nucleico<sup>190</sup>.

Nuestros hallazgos sugieren la participación de PRRs intracelulares en el reconocimiento del hongo. El hecho de que TLR9 es el único receptor endosomal capaz de sensor ADN indica que podría estar involucrado en la inducción de IFNs-I en las CE del tracto genital femenino. La activación de este PRR por patógenos fúngicos fue reportada con anterioridad en diferentes tipos celulares<sup>106,186,251,252</sup>, sin embargo, existe escasa evidencia sobre su rol en activación de la vía de IFNs-I en respuesta a *Candida*<sup>169</sup>.

Recientemente se descubrió que las vesículas extracelulares (VE) secretadas por *C. albicans* contienen, entre otros elementos, ARN fúngico lo cual puede ser determinante para varios procesos biológicos, incluida la comunicación celular y la patogénesis<sup>253</sup>. Estudios proteómicos demostraron que estas VE poseen propiedades inmunoestimuladoras sobre macrófagos y CD *in vitro*<sup>254,255</sup> aportando evidencia adicional sobre la relevancia del reconocimiento del material genético de *C. albicans* por las células del huésped.

En conjunto, nuestros resultados demostraron por primera vez que *C. albicans* es capaz de activar la transcripción de elementos de la vía de IFNs-I en CE del tracto genital femenino *in vitro* y que la intensidad de la respuesta depende de los diferentes mecanismos de invasión que emplea el hongo, de la magnitud del inóculo y del tiempo de interacción. Este estudio además demostró que el reconocimiento inmune de componentes externos de *C. albicans* como los  $\beta$ -glucanos de la pared y el reconocimiento de componentes nucleares del hongo gatillan PRRs que activan la vía de IFNs-I en CE. En un escenario más complejo como el que rige las interacciones *in vivo*, en el contexto global de la patología, y teniendo en cuenta los PAMPs fúngicos predominantemente expuestos durante la interacción patógeno-huésped, resulta de mayor relevancia el estudio del reconocimiento de los  $\beta$ -glucanos de la pared de *C. albicans*. En particular, la contribución de Dectin-1 en este evento aporta evidencia al conocimiento de nuevas vías propuestas para la respuesta antifúngica mediada por IFNs-I en CE durante el curso de la CVV.

### **Análisis proteómico de la interacción: *C. albicans*-CE**

Los avances recientes en las técnicas de alto rendimiento brindan la posibilidad de analizar las interacciones patógeno-huésped a gran escala. La combinación de modelos experimentales *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* con los avances tecnológicos en el campo de la proteómica constituye una herramienta valiosa para la caracterización de enfermedades infecciosas<sup>256</sup>.

La utilización del modelo *in vitro* de CVV permitió llevar a cabo un estudio proteómico cuantitativo de CE humanas, con el fin de cuantificar proteínas involucradas en la respuesta del huésped frente a *C. albicans* y promover evidencias concluyentes que avalan la participación de la vía de los IFNs-I en células no inmunes y en respuesta al reconocimiento de un patógeno fúngico.

El estudio proteómico permite obtener información a diferentes niveles y su aplicación implica la extracción y digestión de proteínas. Los enfoques proteómicos que separan y analizan los péptidos obtenidos mediante cromatografía líquida acoplada a espectrómetros de masas (LC-MS/MS), permiten una cuantificación de alto rendimiento del proteoma<sup>193,195</sup>. Para esto se requiere de una elevada calidad y representatividad de datos que permita mapear miles de espectros de MS de péptidos a sus proteínas para su identificación y cuantificación, y efectuar así la caracterización detallada del proteoma.

En este trabajo de tesis y empleando LC-MS/MS se identificaron un total de 4988 proteínas en CE HeLa luego de 4h de interacción con *C. albicans*, y se obtuvieron valores cuantitativos de 4862 de ellas. Posteriormente se efectuó un análisis comparativo con la expresión proteica basal en las CE, con el fin de determinar aquellas proteínas diferencialmente reguladas luego del contacto con el hongo. Los resultados de este análisis se representaron en un Volcano plot que muestra la relación entre las veces de cambio (FC) y el valor estadístico de  $p$  para cada proteína cuantificada (Figura 17)<sup>195</sup>. Este estudio demostró 527 proteínas reguladas diferencialmente, 226 proteínas sobreexpresadas y 301 que se subexpresan.

Sobre estos valores, se establecieron criterios analíticos más rigurosos, con el fin de reducir el impacto de posibles falsos positivos, basados en el número de péptidos con los que fueron identificadas las proteínas, la cantidad de réplicas biológicas en las

que se cuantificó dicha proteína y su CV <sup>192,196,197</sup>. Este estudio permitió identificar un total de 216 proteínas reguladas diferencialmente, 95 *up*-reguladas y 121 *down*-reguladas.

Estudios proteómicos funcionales de muestras de tejido y de mucus cervicovaginal demostraron la presencia de proteínas comunes involucradas en funciones intracelulares y extracelulares, transporte, adhesión focal, respuesta inmune innata y metabolismo<sup>257-259</sup>. Particularmente en los tejidos del tracto genital femenino, las funciones destacadas de sus proteínas están involucradas en el transporte nuclear, la organización de los cromosomas, la expresión génica, la diferenciación y motilidad celular, lo que es consistente con el mantenimiento del tejido<sup>257</sup>. Un aspecto único de la barrera de CE del tracto genital femenino a considerar, es que las hormonas sexuales femeninas (estradiol y progesterona), pueden ocasionar fluctuaciones en el proteoma a lo largo del ciclo menstrual, probablemente relacionadas al reclutamiento de células inmunes y remodelación del tejido<sup>260-262</sup>.

En nuestro trabajo, el análisis funcional de las proteínas diferencialmente reguladas demostró que varios de los procesos biológicos descritos anteriormente se vieron afectados en las CE luego de la interacción con *C. albicans*. En relación a los principales procesos *up*-regulados se destaca el transporte nucleocitoplasmático de macromoléculas, la regulación del metabolismo, la respuesta al estrés, la aminoacilación de ARNt, la regulación de actividad de kinasas y procesos del sistema inmune que, dada su complejidad y los objetivos de trabajo, nos referiremos más adelante. En relación a las funciones identificadas, la mayoría corresponden a eventos de la fisiología celular relacionados a la respuesta frente al patógeno, con intensa actividad de kinasas fosforilando moléculas para gatillar diversas vías de señalización, con síntesis de proteínas y movilización de macromoléculas. El balance metabólico y la provisión de energía son fundamentales en la construcción y mantenimiento de una respuesta celular eficiente. En concordancia, Zhang y col. (2020) descubrieron que proteínas expresadas diferencialmente en las células A549 en la etapa temprana de la infección por *A. fumigatus*, están relacionadas principalmente con procesos biológicos, como el metabolismo celular, la síntesis y la respuesta al estrés celular<sup>263</sup>.

Por otra parte, frente a un estímulo complejo como es la invasión del hongo a la CE, mientras que algunos procesos y vías son amplificados para enfrentar la agresión, otros deben ser regulados negativamente a fin de preservar funciones claves y reorientar recursos energéticos en función de la inducción y mantenimiento de vías que permitan una resolución exitosa. En nuestro modelo *in vitro* estos procesos fueron el metabolismo de ARNm, la localización de proteínas en el retículo endoplásmico, la biogénesis de complejos ribonucleoproteicos y la cornificación. En el tracto genital femenino, el proceso de cornificación es un mecanismo frecuente y está fuertemente influenciado por la presencia de estrógenos. En estudios citológicos de LCV se describe un alto grado de cornificación en CE vaginales y cervicales de mujeres sanas<sup>264</sup>. Mientras que en vagina es el estado evolutivo final posterior a la proliferación y maduración de las CE, en CE cervicales correspondería a un tipo de muerte celular diferente a la apoptosis, descrito en queratinocitos<sup>265</sup>. En concordancia con este hallazgo, Zevin y col. (2016) observaron que la presencia de la bacteria *Gardnerella vaginalis* en LCV de mujeres con Vaginosis Bacteriana condujo a una disminución de las proteínas epiteliales implicadas en la formación de la envoltura cornificada<sup>266</sup>.

El estudio de los procesos biológicos es muy amplio y comprende una variedad de mecanismos. Los enfoques proteómicos también permiten profundizar el análisis de los circuitos intracelulares de interés, su relevancia biológica y su significancia de manera detallada. En este trabajo, el estudio de las vías *up/down*-reguladas se realizó utilizando la base de datos Reactome y se obtuvo el "Reacfoam" o *treemap* de Voronoi que organiza los hallazgos de manera jerárquica y por relación de funciones (Figuras 22 y 24).

Durante el desarrollo de esta tesis se generaron numerosos datos con valiosa información sobre las vías celulares reguladas en CE durante el contacto con el hongo (Anexo CAP II, Tabla 3 y 4). De acuerdo a los objetivos de estudio planteados, nuestros análisis se centraron en el bloque "*Immune System*", donde se observa una importante y destacada participación de vías relacionadas a la señalización de IFNs-I, principalmente descritas en infecciones virales como influenza y VIH. De manera relevante y novedosa, la vía "*Antiviral mechanisms by IFN-stimulated genes*" estuvo ubicada en primer lugar, según su p-valor (Figura 25). Este importante hallazgo

confirma la evidencia obtenida a nivel transcripcional y demuestra que, durante la invasión de la CE por penetración activa, *C. albicans* es capaz de activar la vía de los IFNs-I y su prosecución a través de la detección de otros elementos ubicados cascada debajo de la señalización de los receptores IFNAR. Además, otras vías presentes entre las más relevantes están estrechamente relacionadas a los mecanismos de señalización de IFNs-I como “*NS1 mediated effects on host pathways*”<sup>267,268</sup>, “*ISG15 antiviral mechanisms*”<sup>269</sup>, “*Influenza infection*”<sup>270</sup>, “*Interferon signalling*”, “*HIV infection*”<sup>271</sup>, “*Cytokine signalling in immune system*”. La detección de vías con alto grado de significancia biológica y relacionadas a infecciones virales corresponde a la construcción de la base de datos y los espectros de MS que permiten la identificación y cuantificación de las proteínas, por lo que llevan el nombre del proceso en el cual fueron originalmente descritas. En el contexto de nuestro trabajo, evidencian la convergencia de vías comunes activadas tanto por patógenos virales como por *C. albicans*.

En correspondencia con nuestros resultados, estudios transcriptómicos de células inmunes vinculan a vías relacionadas a los IFNs-I en la respuesta frente a la infección por *Candida*, lo cual refuerza nuestros hallazgos. Bruno y col. (2021) realizaron un análisis de enriquecimiento de las vías en las que participan los genes *up*-regulados que codifican proteínas luego de la estimulación *in vitro* de PBMC humanas con los hongos *C. albicans*, *A. fumigatus* o *Rhizopus oryzae*. El estudio confirmó a la señalización de IFNs-I ( $p=1,33e-19$ , Reactome) como una vía única para la respuesta frente a *C. albicans*, en comparación con la respuesta transcripcional observada frente a los demás patógenos fúngicos<sup>235</sup>. Además, Smeekens y col. (2013) demostraron anteriormente, en otro estudio con PBMC humanas, que la vía de IFNs-I es una vía transcripcional característica de la defensa del huésped frente a *Candida* a tiempos tempranos en comparación con la respuesta frente a estímulos bacterianos como LPS derivado de *E. coli* y las bacterias *B. burgdorferi* y *M. tuberculosis*<sup>172</sup>.

Los IFNs-I activan la señalización JAK-STAT, que conduce a la inducción transcripcional de cientos de ISGs. Las proteínas codificadas por estos genes juegan un papel clave en la inducción de respuestas inmunes innatas y adaptativas<sup>272</sup>. ISG15, identificado como partícipe de una vía relevante en CE, codifica una pequeña proteína

similar a la ubiquitina involucrada en un proceso de modificación postraduccional denominado ISGilación. A través de este proceso, ISG15 se une covalentemente a una amplia gama de proteínas diana<sup>269</sup>. En los seres humanos, ISG15 se une a USP18, lo que aumenta su estabilidad y conduce a una disminución en la señalización de IFNs-I<sup>272</sup>. ISG15 posee funciones antivirales, sin embargo, también se ha descrito que en su forma extracelular "secretada", actúa como factor quimiotáctico para los PMN<sup>273</sup>. Durante una infección parasitaria, la presencia de formas diméricas y multiméricas de ISG15 extracelular fueron importantes para la regulación de citoquinas, sugiriendo también un rol activo sobre la quimiotaxis de las CD al sitio de infección<sup>269,274</sup>.

Dong y col. (2017) demostraron, *in vitro* y en un modelo murino, que ISG15 actúa como inmunomodulador en la córnea y juega un papel crítico en el control de la queratitis fúngica. *C. albicans* muertas por calor indujeron la expresión de ISG15 en CE corneales (CEC) primarias humanas cultivadas. *In vivo*, la infección por *C. albicans* indujo la expresión de ISG15 e ISGilación en CEC de ratón. La administración de ISG15 recombinante, por otro lado, mejoró la inmunidad innata de la córnea contra *C. albicans* y suprimió la IL-1 $\beta$  inducida por la infección<sup>275</sup>.

La sobreexpresión de esta vía en las CE del tracto genital femenino durante la invasión por *C. albicans* propone un nuevo horizonte para el estudio de los ISGs y su rol en la respuesta inmune y otras cascadas de señalización del huésped.

En relación a las vías *down*-reguladas en las CE en interacción con *C. albicans* se destacan "Peptide chain elongation"<sup>276</sup>, "Selenocysteine synthesis"<sup>277</sup>, "Non-sense mediated decay" (degradación de ARNm mediada por mutaciones terminadoras) y "Viral mRNA translation"<sup>278</sup>. En relación a la última vía descrita, los hallazgos recientes implican a un subconjunto de ISGs en la regulación traduccional de los ARNm virales y del huésped<sup>279</sup>. La unión covalente de ISG15, el cual es *up*-regulado por IFNs-I, a las proteínas en proceso de traducción, tanto de origen viral como del huésped, es considerada como una modificación proteica que contribuye a la inhibición de dicho proceso<sup>279,280</sup>.

En su conjunto, los resultados obtenidos mediante este estudio proteómico cuantitativo aportan información novedosa sobre los procesos biológicos que ocurren en las CE del huésped en la interacción con *C. albicans* y proporcionan evidencia sólida

sobre la participación de la vía de IFNs-I en CE del tracto genital femenino durante esta micosis, complementando, de esta manera, los hallazgos obtenidos mediante biología molecular.

### **Análisis proteómico de la interacción: $\beta$ -glucanos-Dectin-1**

El  $\beta$ -glucano es uno de los polisacáridos más abundantes en la pared de *C. albicans*<sup>281</sup>. Existen numerosos estudios que vinculan el reconocimiento de los  $\beta$ -glucanos del hongo por el PRR Dectin-1 con el inicio de mecanismos de respuesta antifúngicos eficaces; sin embargo, su rol en la activación de la vía de señalización de IFNs-I ha sido poco explorado<sup>112,282,283</sup>. Con el objetivo de establecer la contribución de la interacción  $\beta$ -glucano-Dectin-1 en la inducción de la vía de IFNs-I, se evaluaron los cambios en el proteoma de las CE del tracto genital femenino luego de ser cultivadas con el agonista Curdlan.

En nuestro estudio de proteómica cuantitativa “*label-free*” se identificaron 4939 proteínas en las CE, de las cuales se cuantificaron 4829. El primer análisis comparativo con las CE en ausencia de estímulo identificó 252 proteínas sobreexpresadas y 177 subexpresadas luego de estimular al receptor Dectin-1. Según los criterios analíticos detallados anteriormente para la evaluación de la expresión diferencial de proteínas en relación a la condición control, se observaron 190 proteínas *up*-reguladas y 97 *down*-reguladas.

El análisis funcional realizado con las proteínas diferencialmente reguladas en CE estimuladas con Curdlan demostró la sobreexpresión de procesos biológicos similares a los observados en CE en interacción con *C. albicans* y a los descritos por Berard y col. (2018) en tejido del tracto genital femenino<sup>257</sup>. Los procesos biológicos enriquecidos fueron principalmente el transporte de moléculas entre el núcleo y el citoplasma, metabolismo, activación de mecanismos relacionados a procesos virales y expresión de genes. Por otra parte, los principales procesos biológicos *down*-regulados que se observaron en las CE fueron la biogénesis de componentes celulares, procesos virales, cornificación y procesos metabólicos del ARNr.

En este campo de estudio, el equipo de trabajo de la Dra. Concepción Gil García, con extensa trayectoria, realizó aportes significativos sobre el proteoma de *C. albicans*<sup>284-287</sup>. Del mismo modo, su contribución en el estudio proteómico de macrófagos durante la interacción con el hongo, aportó información interesante sobre la respuesta de células inmunes frente a *C. albicans*, como por ej. la activación de una intensa respuesta inflamatoria e inhibición de la apoptosis inducida por el hongo<sup>192,196,255,288</sup>.

En un estudio proteómico realizado en macrófagos humanos luego de interactuar *in vitro* con *C. albicans*, Vaz y col. (2019) reportaron la *up*-regulación de proteínas involucradas la expresión de genes, procesos metabólicos del ARN, terminación y elongación traduccional, varios de ellos coincidentes con nuestros resultados<sup>192</sup>. En relación al hallazgo de proteínas *up* y *down*-reguladas involucradas en procesos virales en nuestras muestras, Vaz y col. (2019) reportaron procesos biológicos similares en los macrófagos tales como la *up*-regulación de reproducción viral, transcripción viral, ciclo de infección viral y la *down*-regulación de la replicación del genoma viral<sup>192</sup>.

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo sugieren que la activación exclusiva del receptor Dectin-1 por Curdlan regula la expresión de proteínas involucradas en procesos vinculados previamente a infecciones virales, no descriptos aún durante el curso de infecciones fúngicas.

El análisis de vías se ha convertido en una opción ampliamente utilizada en el campo de la proteómica y la genómica para profundizar el conocimiento sobre la patogénesis de enfermedades complejas<sup>289</sup>. Al igual que en las células en interacción con el hongo, al analizar las principales vías *up*-reguladas en respuesta al  $\beta$ -glucano también fueron altamente significativas algunas vías relacionadas a la señalización de IFNs-I que forman parte del bloque "*Immune System*" obtenido con Reactome (Figuras 26 y 27): "*Antiviral mechanisms by IFN-stimulated genes*", "*ISG15 antiviral mechanisms*" y "*NS1 mediated effects on host pathways*". Por otra parte, dentro de las vías que se encontraron *down*-reguladas luego del reconocimiento del receptor Dectin-1 se destacan "*Peptide chain elongation*", "*Selenocysteine synthesis*", "*Non-sense mediated decay*" y "*Viral mRNA traslation*" al igual que las muestras en interacción con *C. albicans*. Este es el primer estudio de proteómica cuantitativa y funcional que proporciona datos de procesos biológicos y vías gatilladas por el reconocimiento de

este PAMP fúngico por su PRR en CE. Otras vías y procesos no analizados en este trabajo muestran un elevado valor jerárquico asociado a la activación de Dectin-1, denotando funciones endógenas relevantes en la fisiología de las CE, más allá de su función en el reconocimiento inmune de patógenos.

El hecho de que ambos estímulos utilizados para los estudios proteómicos compartan numerosas vías (Figura 30) sugiere que su regulación involucra la activación del receptor Dectin-1 ya sea por los  $\beta$ -glucanos de *C. albicans* o por Curdlan, destacando la relevancia de este PRR en la activación de la vía de IFNs-I.

En resumen, la proteómica cuantitativa de alto rendimiento ofreció nuevas perspectivas sobre la interfaz funcional de las interacciones del hongo con el hospedador y aportó evidencia significativa sobre la relevancia de los IFNs-I en la respuesta mediada por CE del tracto genital femenino y la importancia del receptor Dectin-1 en su inducción.

### **Contribución de los IFNs-I en la respuesta inmune local durante la CVV**

Durante décadas, se consideró a la CVV como el resultado de una respuesta inmune adaptativa defectuosa. Sin embargo, varios estudios clínicos transversales revelaron que mujeres VIH positivas (con recuentos reducidos de células T CD4+) no tenían mayor riesgo de desarrollar CVV en comparación con los controles sanos<sup>141,145,146</sup>. Esto, junto con los datos de modelos animales que demuestran que las respuestas inmunitarias celulares o humorales no tienen un papel sólido, señalan claramente hacia un mecanismo explicativo alternativo<sup>3</sup>. Un importante estudio en humanos reveló que la CVV esta mediada por respuestas inmunes innatas en las que el reclutamiento masivo de PMN a la luz vaginal se correlacionó positivamente con la sintomatología de la infección<sup>9</sup>, hecho que fue posteriormente corroborado por distintos autores<sup>3,70</sup>. Debido al impacto negativo de la inmunidad del huésped en la progresión de la enfermedad, en la actualidad se considera a la CVV una consecuencia de la respuesta inmunopatogénica<sup>3</sup> caracterizada por una hiperinflamación local.

Los IFNs-I se encuentran entre las primeras citoquinas cuya producción es inducida en múltiples células durante una infección. Debido a la amplia distribución de la expresión del receptor IFNAR, los IFNs-I tienen efectos de amplio alcance sobre las

CE y las células inmunes innatas y adaptativas. El efecto neto de los IFNs-I sobre la protección o patogénesis durante una infección está determinado por el tipo y el inóculo del patógeno, como así también por los antecedentes genéticos del huésped y, a nivel de los tractos mucosos, por la microbiota<sup>162,290,291</sup>.

Los IFNs-I también pueden tener roles duales y opuestos en la inmunidad, con efectos que son beneficiosos o perjudiciales para el individuo dependiendo si la activación de la vía es transitoria o sostenida. Esto puede estar determinado por la naturaleza del estímulo microbiano, el tipo de PRR involucrado en la inducción, el subtipo predominante de IFNs-I producido y el microambiente de citoquinas en el momento de su expresión<sup>292</sup>. Lee y Ashkar (2018) describieron la naturaleza dual de los IFNs-I en el sentido de que además de promover funciones antivirales e inflamatorias, también limitan las respuestas inmunitarias dañinas que pueden provocar patología tisular y daño colateral<sup>290</sup>. Tanto las propiedades de activación como las de regulación negativa de los IFNs-I trabajan en conjunto para crear una respuesta inmune equilibrada<sup>293</sup>. Tal complejidad ha llevado a muchos resultados discrepantes en la literatura sobre las acciones inmunoestimuladoras e inmunomoduladoras de los IFNs-I en diferentes contextos<sup>294,295</sup>.

Los estudios sobre el rol de los IFNs-I durante infecciones por *Candida* han generado resultados contradictorios. Biondo y col. (2011) trabajando con un modelo murino de candidiasis sistémica demostraron que, ante la ausencia del receptor IFNAR, la supervivencia de los ratones se encontraba drásticamente disminuida. Este estudio propone un rol protector para los IFNs-I ya que promueven la inducción de intermediarios reactivos del oxígeno que son necesarios para la muerte de *C. albicans* por parte de las células fagocíticas<sup>169</sup>. Acorde a este resultado, Del Fresno y col. (2013) también atribuyen un rol protector a los IFNs-I durante la candidiasis sistémica ya que inducen el reclutamiento de leucocitos, particularmente PMN, hacia los riñones (blanco de la infección sistémica) de animales infectados con el hongo mediante la producción de las quimiocinas CXCL1 y CXCL2, para su destrucción<sup>112</sup>.

Curiosamente, otro estudio sobre la infección sistémica por *C. albicans* en ratones WT e *Ifnar1*<sup>-/-</sup>, obtuvo resultados similares sobre la señalización mediada por IFNs-I para atraer PMN y monocitos inflamatorios al sitio blanco de la infección; sin embargo,

en este caso, estas células no tuvieron ningún efecto sobre la carga fúngica, sino que causaron una inmunopatología letal<sup>113</sup>.

Hasta el presente, existe escasa evidencia sobre el rol de los IFNs-I y sus vías de inducción y señalización en tractos mucosos durante una infección por *C. albicans*. En la mucosa intestinal, varios estudios demostraron un papel importante de la señalización basal/tónica de IFNs-I inducida por microorganismos comensales, en el mantenimiento del sistema inmune del huésped en un estado de alerta contra posibles infecciones y en la homeostasis del nicho<sup>231,296</sup>. La expresión basal de ISGs que contribuyen a la homeostasis intestinal parece estar impulsada por IFNs-I e IFNs-III de una manera específica del tipo celular<sup>296</sup>. Los IFNs-III, también conocidos como IFNs- $\lambda$ , son los miembros más recientes de la familia de IFNs. Estas citoquinas poseen funciones inmunomoduladoras asociadas principalmente a la protección de las barreras mucosas. Señalizan a través de un receptor heterodimérico diferente al receptor IFNAR, altamente expresado en CE de mucosas. Si bien inicialmente se pensaba que los IFNs-I e IFNs-III poseían funciones redundantes, ya que estímulos y vías intracelulares similares conducen a su activación, en la actualidad se están comenzando a definir aquellas competencias comunes y las que presentan diferencias tales como la magnitud y la cinética de sus respuestas<sup>296,297</sup>. En el marco de la escasa evidencia sobre el rol de los IFNs-I y III en infecciones fúngicas en tractos mucosos, este trabajo de tesis aporta información relevante sobre las funciones de los IFNs-I y plantea un interesante escenario de estudio para los IFNs-III durante las micosis<sup>298</sup>.

A fin de explorar el rol de los IFNs-I en la respuesta inmune frente a *C. albicans* durante el curso de la CVV realizamos un estudio cinético empleando ratones de la cepa C57BL/6 como controles<sup>8,84</sup> y animales deficientes en el receptor de IFNs-I, *Ifnar1*<sup>-/-</sup>. Los resultados obtenidos en el modelo *in vivo* demostraron que la ausencia de señalización a través del receptor IFNAR predisponen a una incrementada carga fúngica vaginal inicial (11,6 veces más elevada que en los C57BL/6 al día 1), seguido por una disminución de la misma, alcanzando valores similares a los animales C57BL/6 hacia el final del período de estudio. El cambio morfogénico de levadura a hifa que antecede a la invasión 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, penetración del tejido y daño epitelial ocasionado por candidalislina<sup>8,97</sup>. En nuestro trabajo, el S. Inv reflejó parámetros relacionados a las características de la penetración tisular. En el estudio histológico de vagina al día 2 pi se observó que, mientras en animales C57BL/6 *C. albicans* permaneció adherida al epitelio, en ratones deficientes en IFNAR, la barrera epitelial fue fácilmente atravesada por hifas del hongo de manera masiva dando como resultado un S. Inv elevado (5,3 vs 1,9 en los ratones C57BL/6). Tanto la carga fúngica en la cavidad vaginal como la invasión tisular demuestran que la ausencia de señales a través del receptor IFNAR conduce a un aumento de susceptibilidad a la CVV al inicio de la infección por *C. albicans*.

La CVV sintomática está asociada con una respuesta inflamatoria caracterizada por el reclutamiento de PMN en la luz vaginal, lo que contribuye a los síntomas, pero no elimina la infección<sup>2</sup>. Estudios recientes en un modelo murino de CVV demostraron que el cambio de levadura a hifa y las vías de señalización morfogénicas asociadas, son contribuyentes críticos de la inmunopatología mediada por PMN<sup>70</sup>. Nuestros resultados demostraron que en ausencia del receptor IFNAR hubo mayor infiltrado de PMN al lumen vaginal durante el inicio de infección (día 1) lo que sugiere un importante rol de los IFNs-I en la regulación del reclutamiento temprano de esta población celular al sitio de infección. En concordancia con lo observado por Yano y col. (2018)<sup>142</sup> en relación a la falta de respuesta de PMN en un modelo *in vivo* de CVV y a la falla en los mecanismos candidicidas reportada por Biondo y col. (2011) en los animales *Ifnar1*<sup>-/-</sup><sup>169</sup>, en nuestro estudio se detectó una carga fúngica elevada a pesar del intenso reclutamiento de PMNs. Curiosamente, al final de la cinética en estudio (día 8), la ausencia del receptor IFNAR produjo un nuevo incremento en el número de PMN reclutados al lumen vaginal. En relación a esta observación, Rauch y col. (2014) reportaron en un modelo murino de colitis, que los IFNs-I cumplen roles diferentes en fases específicas de la lesión e inflamación de la mucosa intestinal<sup>232</sup>. Esto puede sugerir la presencia de un comportamiento bifásico similar de los IFNs-I en el tracto genital femenino. En el mismo sentido, el hecho de que los IFNs-I, además de promover funciones inflamatorias, son capaces de limitar las respuestas inmunitarias que provocan daño tisular en determinados contextos<sup>290</sup>, podría explicar el aumento

del reclutamiento de PMN al lumen vaginal observado en animales *Ifnar1*<sup>-/-</sup> en etapas tardías de la CVV.

A nivel tisular y en respuesta a la penetración masiva de *C. albicans* en el epitelio vaginal detectada los primeros días pi en los ratones *Ifnar1*<sup>-/-</sup>, la respuesta inflamatoria local se caracterizó por la presencia de grandes abscesos en el epitelio, mientras que en animales C57BL/6, la correcta señalización a través del receptor IFNAR previno la invasión más profunda, orquestando una respuesta inflamatoria tisular moderada con menor daño del epitelio. En la fase final del estudio los cambios de perfil de la respuesta tisular acompañan la hipótesis sobre el efecto bifásico de los IFNs-I propuesta por Rauch y col. (2014)<sup>232</sup> y avalada por otros autores<sup>290,292</sup>.

El entorno único del tracto genital femenino exige respuestas inmunitarias especializadas para asegurar una reproducción exitosa mientras se mantiene la inmunidad en la mucosa que permanentemente está en contacto con microorganismos. En modelos murinos se determinó firmemente que los IFNs-I son reguladores claves de la inmunidad en este nicho, ya sea manteniendo la homeostasis, establecida por la expresión constitutiva del IFN-I recientemente descrito, IFN $\epsilon$  (regulado exclusivamente por hormonas sexuales), o mediante inmunidad inducible por una infección, donde IFN $\alpha$  e IFN $\beta$  pueden ser expresados rápidamente tras la detección de una amenaza patógena<sup>228,299</sup>. Al igual que en la candidiasis gastrointestinal<sup>300</sup>, los mecanismos de resistencia y tolerancia en la CVV se activan mediante la contribución de distintos elementos de la inmunidad, por ej., IL-22 y células Th1/Th17 para la resistencia y células Treg productoras de IL-10 para la tolerancia<sup>301</sup>. Se han descrito múltiples mecanismos de tolerancia, a pesar de estar menos estudiados que los mecanismos de resistencia<sup>301,302</sup>. En CVV murina, se demostró la presencia de células Treg<sup>303</sup>, células T $\gamma/\delta$ <sup>304</sup> y citoquinas inmunoreguladoras, como IL-10, además de TGF- $\beta$ <sup>148,301</sup>. Las características particulares de este tracto estrictamente regulado, evidencian la complejidad de los eventos que subyacen al quiebre de la tolerancia local desencadenada por la invasión tisular del hongo, la activación de la respuesta protectora y la aparición de la respuesta inmunopatogénica, donde los elementos del hongo y la disfunción inmune contribuyen a la recurrencia de esta micosis.

Las citoquinas presentes en el lumen cervicovaginal reflejan la condición homeostática basal o la respuesta local a la agresión patógena. En el presente trabajo se evaluaron los niveles de las citoquinas IL-1 $\beta$ , IL-6, TGF- $\beta$  e IL-10, así como citoquinas del eje Th17 como IL-17 e IL-22. Entre estos mediadores, la IL-1 $\beta$  cobra una relevancia particular, ya que se le asigna un rol cardinal en la respuesta local donde niveles regulados esta citoquina participan en una eficiente respuesta tisular y niveles exacerbados contribuyen en la patogenia de la CVV <sup>8,70,227</sup>.

Los inflamasomas son complejos multiproteicos que comprenden PRRs intracelulares, principalmente NLRs, y otras moléculas. Se clasifican en dos grupos principales: canónicos y no canónicos; aunque ambos están involucrados en la producción de IL-1 $\beta$  e IL-18. Bruno y col. (2015) utilizando enfoques genómicos, inmunológicos y farmacológicos en un modelo animal de CVV, demostraron que la producción de IL-1 $\beta$  por el inflamasoma NLRP3 es un mecanismo molecular crucial que contribuye a la inmunopatología del huésped<sup>227</sup>. Los modelos animales reproducen las características de la CVV de un único episodio y diferentes trabajos, entre ellos los de nuestro grupo, documentan que animales susceptibles a la CVV presentan en el LCV altas concentraciones de esta citoquina proinflamatoria <sup>8,70,227</sup>. Este hecho fue también reportado por Roselletti y col. (2017, 2019) en un estudio en pacientes con CVV de un solo episodio<sup>116,191</sup>. En el mismo sentido, nuestros resultados obtenidos en LCV de mujeres con CVVR confirman la asociación entre exacerbados niveles de IL-1 $\beta$  y la recurrencia de la micosis <sup>92</sup>.

Diferentes autores demostraron que los IFNs-I ejercen funciones reguladoras sobre la actividad de los inflamasomas en variedad de contextos infecciosos<sup>163,231,294,305</sup>. De manera interesante, Gabrielli y col. (2015), trabajando con una línea celular de macrófagos murinos, reportaron que el silenciamiento de NLRP3 no condujo a la inhibición completa de la secreción de IL-1 $\beta$  luego de la estimulación con SAPs de *C. albicans*. El estudio demostró que los IFNs-I inducidos por los factores de virulencia SAP2 y SAP6 purificados de *C. albicans* activaron el inflamasoma no canónico caspasa-11 en estas células. También observaron que al bloquear el receptor IFNAR, la producción de IL-1 $\beta$  e IL-18 inducida por SAPs se redujo significativamente<sup>306</sup>. Es

interesante destacar que la caspasa-11 es un ISG, por lo tanto, su expresión aumenta cuando se activa la vía de señalización de IFNs-I mediante diferentes mecanismos<sup>307,308</sup>.

Recientemente, se reportó la existencia de cooperación funcional entre caspasa-11 no canónica e inflamasomas canónicos NLRP3 durante ciertas infecciones<sup>117</sup>. En relación a esto, Gabrielli y col. (2015) proponen que caspasa-11 juega un papel clave en potenciar y prolongar la activación inicial de caspasa-1 (canónica) a través de la inducción de IFNs-I<sup>306</sup>, aportando evidencia sobre el efecto de factores de virulencia del hongo, la inducción de IL-1 $\beta$  y la contribución de IFNs-I en este fenómeno. Nuestros resultados demostraron que la elevada carga fúngica de *C. albicans* observada al día 1 en ausencia de señalización a través de IFNAR, indujo la producción de abundantes niveles de IL-1 $\beta$  en el lumen vaginal, posiblemente debido a la rápida activación del inflamasoma canónico y la actividad de la caspasa-1 constitutiva. Sin embargo, la IL-1 $\beta$  disminuyó rápidamente hacia el día 2 y 4 pi. Se podría hipotetizar que la ausencia de IFNAR impide la expresión de diversos ISGs, entre ellos de caspasa-11, la cual colaboraría con caspasa-1 para potenciar y prolongar la producción de IL-1 $\beta$  en el tiempo. En los animales C57BL/6, donde la señalización de los IFNs-I estuvo intacta, el perfil de respuesta estuvo caracterizado por niveles elevados de IL-1 $\beta$  en los días 2 y 4 pi, acompañados de un aumento progresivo de la citoquina antiinflamatoria TGF- $\beta$ , poniendo nuevamente en evidencia la relevancia del tono regulatorio en este tracto mucoso.

Las CE son la principal fuente de TGF- $\beta$ . Taylor y col. (2000) demostraron en un modelo murino de CVV, que la infección por *C. albicans* aumenta significativamente los niveles de TGF- $\beta$  en el tejido vaginal en comparación con animales no infectados<sup>148</sup>. En nuestro modelo, la infección con el hongo provocó un aumento TGF- $\beta$  en LCV en ambas cepas de ratones. Sin embargo, en ausencia del receptor IFNAR, se observó un aumento significativo de esta citoquina al día 4 pi, que estuvo acompañado de un pico de IL-10 (Figura 36). Tanto TGF- $\beta$  como IL-10 son citoquinas cruciales para la inducción y función de las células Treg, y como será discutido más adelante, existe abundante evidencia sobre los efectos de los IFNs-I sobre esta población celular.

Por otra parte, la IL-10 puede ser producida por una amplia variedad de células inmunes, incluidos macrófagos, monocitos, CD, mastocitos, neutrófilos, células NK,

células T CD4+ (especialmente las Treg), T CD8+ y células B<sup>309</sup>, sin embargo, con los ensayos abordados en este trabajo de tesis no podemos afirmar el origen de la producción elevada de esta citoquina al día 4 pi. Marks y col. (2010) reportaron, utilizando un modelo murino de infección vaginal con *Chlamydia trachomatis*, que las CD convencionales del tracto genital femenino inferior fueron las principales responsables de la producción de IL-10 observada durante la infección<sup>310</sup>, lo que podría orientar futuros estudios sobre el tema.

Respecto a la IL-17, el consenso indica que tiene un papel central en la inmunidad protectora contra las infecciones sistémicas y orales por *C. albicans*<sup>155,210</sup>; sin embargo, su rol durante la CVV es controversial<sup>153,211</sup>. Su producción está a cargo de las células Th17 que secretan IL-17A, IL-17F e IL-22 y por los ILC3<sup>212</sup>. En los LCV de animales C57BL/6 e *Ifnar1*<sup>-/-</sup> no detectamos niveles significativos de IL-17A e IL-22, sugiriendo que la respuesta inmune local mediada por estas citoquinas no cumple un papel relevante durante la vaginitis por *C. albicans*. Datos obtenidos en nuestro laboratorio en distintas cepas de animales deficientes en PRRs como TLR2, TLR4 y Dectin-1 y cepas de *C. albicans* de colección y de origen clínico muestran el mismo perfil<sup>84</sup>. Estos resultados también concuerdan con nuestro estudio en pacientes con CVV y CVVR que no mostraron cambios en la producción local de IL-17 ni de IL-22<sup>92</sup>.

Los datos obtenidos ponen en evidencia el importante rol de la activación de la vía de IFNs-I en varios procesos claves como el control de la carga fúngica e invasión tisular al inicio de la infección, el reclutamiento de PMNs, la organización de la respuesta tisular y la regulación de los niveles de distintas citoquinas secretadas al lumen vaginal de crucial importancia en la tolerancia e inmunopatogenia de la CVV. La evidencia experimental generada en este trabajo demuestra que los IFNs-I cumplen una importante función reguladora y protectora durante el desarrollo de la CVV murina.

En humanos, los pocos estudios sobre IFNs-I en pacientes con infecciones mucosas por *C. albicans* también orientan a un rol protector de estas moléculas. Smeekens y col. (2013) reportaron la asociación entre defectos en la expresión de genes de la vía de señalización de los IFNs-I en CD de pacientes con CMC<sup>172</sup>. Sobre la

infección vaginal por *C. albicans*, un reporte de caso de una paciente con infección mixta por VPH y CVVR de 17 años de duración, demostró los efectos combinados del tratamiento con antimicóticos clásicos e imiquimod. El imiquimod es un agente inmunomodulador que actúa como agonista de TLR7 estimulando la inmunidad innata y la producción de IFNs-I. Kofler y col. (2013) reportaron que luego del tratamiento tópico con imiquimod, la paciente no requirió de terapia antifúngica y mostró una remisión prolongada de la patología<sup>173</sup>. En conocimiento de esta evidencia, nuestro grupo condujo un ensayo clínico, controlado, aleatorizado y doble ciego, para evaluar eficacia y seguridad del tratamiento inmunomodulador con imiquimod vs placebo en pacientes con CVVR, asociado al tratamiento antimicótico estándar con fluconazol. Las pacientes se monitorearon durante un año; la eficacia clínica se evaluó utilizando el *Score* Clínico de CVV de Sobel (síntomas y signos)<sup>311</sup> y la eficacia micológica mediante el cultivo de flujo vaginal. En este estudio, la inducción local de la vía de IFNs-I por imiquimod redujo significativamente los episodios de vaginitis por *Candida*, promoviendo la curación clínica y micológica, en el 92% de las pacientes a los 6 y 12 meses de tratamiento<sup>177</sup>.

Los resultados obtenidos con el modelo *in vivo* de CVV en conjunto con los datos provenientes de pacientes con CVVR aportan evidencia valiosa sobre los mediadores inmunes que participan en la respuesta del huésped y refuerzan la relevancia de la vía de IFNs-I durante la infección vaginal por *C. albicans*. El conocimiento sobre los eventos regulados por los IFNs-I aportados en este trabajo, proporcionan una base racional sobre la función de estas citoquinas en el tracto genital femenino y brinda una importante alternativa terapéutica para las formas recurrentes de esta micosis.

### **Contribución de los IFNs-I en la respuesta inmune periférica en CVV**

En general, para lograr una eliminación exitosa de los patógenos se requiere una respuesta coordinada entre la inmunidad innata y la adaptativa. En el desarrollo de la inmunidad adaptativa, existen tres elementos claves que orquestan esta respuesta: CD y células T y B específicas de antígeno. Un equilibrio calibrado de respuestas de células T y B cooperadoras, reguladoras y efectoras integra una inmunidad óptima frente a los

hongos patógenos<sup>312</sup>. Si bien la inmunidad mediada por células (CMI) de tipo T CD4+ Th1 o Th17 es un mecanismo de defensa del huésped relevante para muchas de las infecciones por *Candida*, en las mucosas<sup>313-315</sup> existen grandes discrepancias sobre el papel protector de la CMI local o sistémica en las infecciones vaginales por *Candida*<sup>153,301,316</sup>. En relación a esto, se postula que una respuesta inmunitaria adaptativa protectora frente a *C. albicans* estaría inhibida por una condición de tolerancia local o un entorno inmunoregulador en la mucosa vaginal y en los NL drenantes<sup>303,304,316</sup>. Hasta el presente, se han realizado escasos estudios de este tipo durante la CVV experimental. LeBlanc y col. (2006) estudiaron el rol de las CD en NL drenantes de vagina y reportaron la presencia de abundantes pCD (con escasa expresión MHC clase II y moléculas coestimuladoras)<sup>316</sup>, caracterizadas por favorecer la inducción de tolerancia<sup>216,317</sup>, lo que sugiere su participación en los eventos inmunoreguladores manifestados durante la infección vaginal por *Candida*.

En el presente trabajo de tesis, se realizó un estudio cinético en el modelo murino de CVV, que permitió establecer el perfil de la respuesta antifúngica en este tracto mucoso. De manera complementaria, con el objetivo de explorar si los IFNs-I tienen influencia sobre la distribución leucocitaria periférica durante la CVV, se seleccionó un día intermedio del estudio cinético (día 4), tiempo estimado para la inducción de la respuesta inmune adaptativa<sup>211,315</sup>, y se analizaron por citometría de flujo diferentes poblaciones inmunes presentes en NL drenantes de vagina en animales C57BL/6 e *Ifnar1*<sup>-/-</sup>. Al día evaluado, se observó que la infección por *C. albicans* generó cambios en la celularidad total y en las poblaciones inmunes de los NL drenantes de vagina, siendo este fenómeno relevante en ausencia de señalización a través del receptor IFNAR (Figura 37 y 38). Estos cambios podrían atribuirse principalmente a tres causas: la presencia del hongo, la inducción de la respuesta inmune adaptativa y/o a los efectos biológicos de los IFNs-I. La invasión del ganglio por el hongo fue descartada ya que *C. albicans* no se recuperó de los NL drenantes. La presentación antigénica y activación de las poblaciones linfoides en los NL provoca cambios en la celularidad y variaciones en las proporciones de las diferentes poblaciones inmunes dependiendo de la naturaleza del estímulo y características de su respuesta. El aumento en la celularidad observado en los animales *Ifnar1*<sup>-/-</sup> podría estar asociada a la capacidad de los IFNs-I de modular

la proliferación y la supervivencia de varios tipos celulares<sup>232</sup>, mediante eventos como la inducción de apoptosis, diferenciación y migración celular<sup>318</sup>. De manera interesante, en nuestro modelo no se observaron modificaciones en la proporción de células mieloides CD11b+, linfocitos B CD19+ y linfocitos Treg CD4+ CD25+ FoxP3+ entre los grupos de animales en estudio, sin embargo, la frecuencia de linfocitos T totales (CD3+) mostró una disminución en los NL de animales C57BL/6 infectados (Figura 37B). En concordancia con este resultado, se describió que los IFNs-I pueden actuar directamente sobre las células T para inhibir su expansión en los NL<sup>231,319</sup> y que este efecto depende de la magnitud y del tiempo de producción de los IFNs-I.

Nuestro estudio también demostró que en ausencia del receptor IFNAR, los números absolutos de células mieloides CD11b+, linfocitos B CD19+ y linfocitos T CD3+ estuvieron elevados en NL drenantes de vagina. Dentro de las células mieloides, las CD son las coordinadoras centrales de la inmunidad antifúngica al activar a las células T en los tejidos de barrera y en los NL<sup>49,320</sup>. Si bien la regulación positiva de IFNs-I inducida por infecciones agudas es beneficiosa para mejorar la activación de las células T por CD, también se demostró que una infección crónica con producción sostenida de IFNs-I amortigua la expansión de las CD e induce un fenotipo supresor<sup>321,322</sup>. Por otra parte, también se reportó que la estimulación de las CD esplénicas con IFN $\beta$ , *in vivo*, dio como resultado una disminución en el número total de células CD11c+<sup>290,323</sup>. La evidencia expuesta podría sugerir que los IFNs-I producidos luego de la infección vaginal por *C. albicans* podrían tener un efecto inhibitorio sobre la proliferación o migración de células mieloides en los NL, ya que en ausencia del receptor IFNAR, el número de células CD11b+ aumenta.

Los resultados obtenidos con la población de células Treg son más difíciles de interpretar, tal vez por haberse evaluado un único día del estudio cinético y porque este trabajo planteó otros objetivos de estudio. Sin duda los interesantes hallazgos observados en los perfiles poblacionales merecen una profundización, tanto a nivel de la evolución de los procesos desencadenados en los NL drenantes, como su comportamiento y distribución en el tracto vaginal.

Las células Treg se caracterizan por poseer funciones inmunosupresoras capaces de prevenir respuestas inmunitarias potencialmente dañinas<sup>295</sup>. El impacto de los IFNs-I

en la homeostasis y en las funciones de las Treg es bastante controvertido, ya que algunos estudios afirman que los IFNs-I mantienen la estabilidad y la función supresora de las Treg, mientras que otros describen un papel nulo o incluso negativo de los IFNs-I en las actividades de estas células<sup>295</sup>. Se describió ampliamente que las Treg mantienen la homeostasis intestinal en condiciones de continua exposición a microorganismos inflamatorios<sup>324</sup> y que los IFNs-I tienen un efecto beneficioso sobre la población intestinal de Treg<sup>231,296,325</sup>. Por otro lado, también se reportó que durante las respuestas inmunes agudas con liberación de grandes cantidades de IFNs-I, estos mediadores pueden inducir una contracción temporal de las Treg y/o inhibición funcional, lo que permite el desarrollo de respuestas efectivas. De hecho, numerosos estudios reportan las funciones inhibitorias de IFN $\alpha$  frente a las poblaciones Treg murinas o humanas, que afectan a la supresión y/o la proliferación a diferentes niveles<sup>295,326,327</sup>.

En nuestro modelo experimental esta fue la única población que a nivel ganglionar no presentó un aumento significativo del número absoluto en ausencia del receptor IFNAR durante la infección con *C. albicans*, sin embargo, los elevados niveles intravaginales de las citoquinas IL-10 y TGF- $\beta$  detectados en el día 4, podrían sugerir un rol importante para esta población en el control de la inflamación local, pero; teniendo en cuenta que existen otros factores independientes de la señalización de IFNs-I con efecto modulador sobre la población de células Treg<sup>295,328</sup>, más estudios son necesarios para probar esta hipótesis.

Los IFNs-I además de afectar la competencia de las CD promoviendo o impidiendo la correcta activación de las células T, pueden actuar directamente sobre las células T CD4 + y CD8 + influyendo en su función. Se reportaron efectos inhibitorios y estimulantes sobre la supervivencia y proliferación de las células T, la producción de citoquinas, la función citotóxica y la inducción de memoria<sup>162</sup>. Nuestro estudio demostró que al día 4 pi con *C. albicans* los IFNs-I cumplen un papel importante en la regulación del número absoluto de las subpoblaciones de células T, CD4+ y CD8+ en los NL. Ambas poblaciones se encontraron aumentadas en ausencia de señalización del receptor IFNAR, aunque el aumento fue más marcado en las células T CD8+. En relación a esta población, Hassanzadeh-Kiabi y col. (2017) demostraron, con estudios *in vitro* e *in vivo*, que la señalización autocrina de IFNAR en las CD estimuladas con  $\beta$ -

glucano es necesaria para la activación eficaz de estas células<sup>329</sup>. Sin embargo, y en concordancia con nuestros resultados, otros autores postulan que los IFNs-I pueden promover señales inhibitoras del crecimiento en las células T CD8+<sup>162,330,331</sup>, en consonancia con los efectos antiproliferativos de IFNs-I dependientes de STAT1<sup>162,332</sup>.

Los estudios en humanos con errores hereditarios en los componentes de señalización inmunitaria pueden proporcionar bases sólidas sobre el papel de los IFNs-I en las infecciones por hongos. Numerosos trabajos probaron que pacientes con CMC autosómica dominante, con mayor susceptibilidad a las infecciones fúngicas de las mucosas, poseen mutaciones con ganancia de función en STAT1 que conducen a la hiperfosforilación del mismo, afectando su capacidad para formar heterodímeros con otras moléculas de STAT y, por lo tanto, la señalización de IFNs-I<sup>41,172,333,334</sup>. Trabajando con pacientes con CMC, Smeekens y col. (2013) observaron, en co-cultivos de CD y células T, respuestas defectuosas en las poblaciones Th1 y Th17, lo que indica un rol importante de los IFNs-I en esta patología<sup>41,172,294</sup>. En este mismo estudio, los autores reportaron que los IFNs-I inducidos por *Candida* modulan los perfiles de citoquinas Th1/Th17 en PBMC de personas sanas; los IFN $\alpha$  e IFN $\beta$  aumentaron la producción de IFN $\gamma$ , al tiempo que disminuyeron la producción de IL-17<sup>172</sup>. Este efecto regulatorio sobre las células Th17 también fue reportado por varios autores en enfermedades autoinmunes como esclerosis múltiple<sup>231,335,336</sup>. En el mismo sentido, nuestros resultados demostraron un efecto inhibitor de los IFNs-I sobre el número de células T CD4+ productoras de IL-17 en NL drenantes de vagina al día 4 pi en el modelo de CVV. De manera interesante el efecto global de los IFNs-I, sobre las poblaciones de células T CD4+ IFN $\gamma$ + o IL-17+, fue preponderante sobre las células productoras de IL-17 (Figura 39).

En este trabajo de tesis, el estudio complementario de las poblaciones celulares mieloides y linfoides presentes en NL drenantes de vagina al día 4 pi aportó nueva evidencia sobre el importante rol regulador de los IFNs-I a nivel periférico durante la CVV, contribuyendo al conocimiento global de la patología y planteando nuevos escenarios para futuros estudios de profundización.

En conjunto, este trabajo de tesis aporta nueva e importante evidencia sobre funciones no descritas para los IFNs-I en la respuesta inmune antifúngica. En la mucosa del tracto genital femenino, *C. albicans* es capaz de iniciar su transición morfogénica e invadir por diferentes mecanismos a las CE. Durante esta compleja interacción, eventos como la transición del estado comensal al patogénico y el reconocimiento de PAMPs fúngicos por PRRs, tanto de superficie como citosólicos, promueven en las CE el inicio de procesos transcripcionales que convergen en la inducción y la activación de la vía de los IFNs-I. Durante la patogenia de la CVV, la vía de los IFNs-I regula, a diferentes niveles, mecanismos claves de respuesta local y sistémica frente al hongo. Los resultados obtenidos permiten asignar a los IFNs-I una importante función reguladora y protectora durante el desarrollo de esta micosis.

Los avances en el conocimiento de los eventos regulados por los IFNs-I en el contexto de la CVV aportados en este trabajo, proporcionan una base racional sobre la función de estas citoquinas en el tracto genital femenino y presentan un potencial blanco terapéutico para las formas recurrentes de esta micosis.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

## ***C. albicans***

En el presente estudio se utilizó la cepa de colección *C. albicans* SC5314 (ATCC MYA-2876) gentilmente cedida por el Dr. Guillermo García-Effrón (Universidad Nacional del Litoral, Argentina) <sup>337</sup>.

### **Condiciones de crecimiento de *C. albicans***

Antes de cada experimento, *C. albicans* fue cultivada durante 48h en agar Sabouraud glucosado (Britania, Argentina) suplementado con extracto de levadura (Britania, Argentina) a temperatura ambiente (TA), tiempo que corresponde a la fase de crecimiento exponencial del hongo<sup>71</sup>. Se resuspendieron a una concentración variable según el experimento en buffer fosfato salino (PBS), y su número se determinó mediante recuento en cámara de Neubauer (Boeco, Alemania).

La viabilidad de la suspensión se verificó mediante la siembra de 100 µl de la misma en placas de agar Sabouraud glucosado y posterior recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) <sup>8</sup>.

## **Modelo *in vitro* de CVV**

### **Cultivo de CE humanas de tracto genital femenino**

Se trabajó con la línea celular epitelial humana HeLa (ATCC CCL-2) derivada de carcinoma cervical, ampliamente aceptada como modelo mimético humano *in vitro* para el estudio de las interacciones *C. albicans*-epitelio <sup>71,84,122,125,126</sup> y para el estudio de otras interacciones con microorganismos causantes de infecciones en el tracto genital femenino <sup>121,123,124</sup>.

Las células HeLa se cultivaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>, en medio de cultivo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's medium*, Gibco) completo, es decir, suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) inactivado (NatoCor, Argentina), 1% de L-glutamina (Gibco) y 1% de Penicilina-Streptomina (Gibco).

La línea celular utilizada fue negativa para infección con *Mycoplasma* y periódicamente testeada por PCR por el Stan de Cultivo Celular del CIBICI.

## Estímulos de CE humanas de tracto genital femenino

Las CE HeLa se dejaron en reposo durante 24h en placas de 24 pocillos (Costar) ( $2,5 \cdot 10^5$  células por pocillo) o en placas de 6 pocillos (Costar) ( $1 \cdot 10^6$  células por pocillo) en DMEM completo y posteriormente se incubaron con diferentes estímulos fúngicos y agonistas de PRRs según el experimento:

### ***Estímulos fúngicos***

-Diferentes morfotipos de *C. albicans* SC5314:

Se definió el estímulo con el morfotipo "dimórfico" de *C. albicans* al agregado de levaduras viables capaces de iniciar su cambio morfológico progresivo a pseudomicelos y posteriormente a hifas verdaderas. Mientras que en el estímulo con el morfotipo "pseudomicelio" del hongo, las levaduras se incubaron previamente durante 2h a 37°C en medio de cultivo DMEM con 10% de SFB para inducir la formación de tubos germinativos y luego, se trataron con una dosis inhibitoria, no fungicida de Anfotericina B (0,5 µg/ml) (Laboratorio Fada, Argentina) para detener su crecimiento sin afectar su viabilidad. Las suspensiones de ambos morfotipos se agregaron al cultivo celular a diferentes relaciones hongo:CE. De las relaciones testeadas (0,25:1, 1:1, 5:1), las relaciones 0,25:1 y 5:1 fueron seleccionadas como condiciones óptimas de trabajo. En presencia de *C. albicans* dimórfica a la relación 5:1 y luego de 24h de cultivo, la viabilidad celular determinada por la liberación de LDH estuvo severamente comprometida<sup>84</sup>.

-*C. albicans* muerta por calor (*Heat killed Candida, HK-Ca*):

Se emplearon pseudomicelios de *C. albicans* SC5314 inactivados a 65°C durante 2h (*Heat killed Candida, HK-Ca*) y se utilizaron en una relación hongo:CE 5:1<sup>112</sup>.

-ADN de *C. albicans*:

Se extrajo el ADN de *C. albicans* SC5314 a partir de un cultivo de levaduras de 48h en medio Sabouraud glucosado. Se colocaron 200 µl de una suspensión densa del hongo en un tubo al que se le agregaron 500 µl de una solución detergente que contenía 1,4 M de NaCl, 20 mM de EDTA, 100 mM TRIS-HCl, 0,2% β-mercaptoetanol y 2% de Bromuro de hexadeciltrimetilamonio y se incubó a 65°C durante 45 min. Luego

se agregaron 500 µl de una mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) frío, se mezcló por inversión y centrifugó por 15 min en microcentrífuga a 12000 rpm. Del centrifugado se separó la fase acuosa, y se agregaron 250 µl de etanol absoluto frío e incubó 30 min en hielo. Se centrifugó 15 min a 10000 rpm y se descartó el sobrenadante. Se lavó el precipitado con 700 µl de etano 70% frío, se centrifugó 15 min a 12000 rpm, se descartó el sobrenadante y se secó el pellet toda la noche a 37°C. La concentración de ADN se determinó por espectrofotometría, midiéndose la absorbancia de la muestra a 260 nm (BioTek, EEUU).

Se estimularon las CE HeLa con 10 µg/ml de ADN de *C. albicans* SC5314 soluble o acompañado al polímero catiónico, polietilenimina (PEI) (Polisciences).

### ***Agonistas de PRRs***

Se utilizaron agonistas de PRRs que participan en el reconocimiento de *C. albicans*.

-Zymosan (10 µg/ml), glucano con unidades de glucosa repetidas conectadas por enlaces β-(1,3) glicosídicos proveniente de *Saccharomyces cerevisiae*. Agonista de TLR2 y Dectin-1 (Sigma-Aldrich, EEUU) <sup>112</sup>.

-Curdlan (100 µg/ml) polímero lineal de glucosa de alto peso molecular proveniente de *Alcaligenes faecalis*. Agonista de Dectin-1 (Wako Chemicals, Neuss, Alemania)<sup>112</sup>. Se utilizó polimixina B sulfato 25 µg/ml para descartar posible contaminación con LPS (Fluka, Argentina). Se determinó por qPCR que en presencia o ausencia de polimixina B, Curdlan fue capaz de activar la vía de IFNs-I, lo que indica ausencia de contaminación con LPS.

-Poly I:C, Ácido poliinosinico-policitidilico. Agonista de TLR3, MDA5/RIG-I y PKR (Invivogen). Se utilizó acompañado a 0,5 µg/ml de PEI (Polisciences).

-LPS (2 µg/ml). Agonista de TLR4 (Sigma-Aldrich, EEUU).

Las células se incubaron con los diferentes estímulos durante 4 o 24h según el experimento.

## **Microscopía electrónica de transmisión**

Para el estudio de las características ultraestructurales de las CE y los procesos de invasión celular luego de la interacción con *C. albicans* SC5314 en los morfotipos dimórfico y pseudomicelio, las células se evaluaron por Microscopía electrónica de transmisión (MET). Después de 4h de incubación, se eliminó el medio de cultivo y las células se fijaron por inmersión en glutaraldehído al 2,5% diluido en buffer cacodilato 0,1 M (pH 7,3). Las células fijadas se centrifugaron y el pellet se trató con 1% de OsO<sub>4</sub>. Luego de la deshidratación con una serie de acetonas frías graduadas, las células se incrustaron en Araldita (Ciba-Geigy, Cumbre, NJ). Se cortaron secciones delgadas en un ultramicrotomo MT2 Porter-Blum y se examinaron en un microscopio electrónico Zeiss 109 (Zeiss, Overkochen, Alemania) <sup>338,339</sup>. Las muestras fueron procesadas por el Centro de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba.

## **Biología molecular**

### ***Extracción de ARN***

El ARN de células HeLa se extrajo con TRIzol (Thermo Fisher Scientific) en una proporción de 1 ml cada 1-2.10<sup>6</sup> 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 utilización <sup>340</sup>.

### ***Tratamiento con ADNasa y Retrotranscripción***

Antes de obtener el ADN complementario (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). Se tomaron 2 µg de ARN y se trataron con 2 U de ADNasa durante 15 min a TA, y luego 10 min 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 min a 65°C, 1h a 42°C y 10 min a 70°C. Las muestras de ADNc se almacenaron a -20°C<sup>340</sup>.

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

El ADNc obtenido a partir de las células se amplificó usando los siguientes *primers* específicos de humano (Invitrogen):

*IFNB* 5' GCTTGGATTCTACAAAGAAGCA, Rev 5' ATAGATGGTCAATGCGGCGTC,

*IRF3* 5' AGAGGCTCGTGATGGTCAAG, Rev 5' AGGTCCACAGTATTCTCCAGG,

*IRF7* 5' GCTGGACGTGACCATCATGTA, Rev 5' GGGCCGTATAGGAACGTGC,

*β-Actina* 5' CTGGAACGGTGAAGGTGACA, Rev 5'TGCGTTGTTACAGGAAGTCCCTT, 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 seg a 95°C, 30 seg a 60°C, 30 seg a 72°C, 40 ciclos. Para la obtención de la curva de disociación las condiciones fueron: 60 seg a 95°C, 60 seg 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  $\Delta\Delta CT$ <sup>341</sup>.

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:  $\Delta CT = CT$  (gen de interés) – CT (gen de referencia).

Luego, se obtiene la expresión relativa del gen de interés en una muestra determinada expresando el  $\Delta CT$  como  $2^{-\Delta CT}$ . El método también se aplica para determinar la expresión relativa de un gen en dos condiciones o muestras diferentes:  $\Delta\Delta CT = \Delta CT$  (condición A) –  $\Delta CT$  (condición B). De la misma manera, la expresión relativa del gen de interés se expresa como  $2^{-\Delta\Delta CT}$ <sup>341</sup>.

## **Proteómica cuantitativa**

Los experimentos de proteómica cuantitativa fueron desarrollados en la Unidad de Proteómica, Departamento de Microbiología II y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, España; en el marco de una colaboración con la Dra. Concha Gil García, directora de dicho centro.

## **Condiciones experimentales**

Se definieron tres condiciones experimentales: a) Cultivos de la línea celular epitelial HeLa sin estímulos (control), b) Células HeLa estimuladas con una suspensión de *C. albicans* SC5314 morfotipo dimórfico en una relación hongo:CE 5:1 c) Células HeLa estimuladas con 100  $\mu\text{g/ml}$  de  $\beta$ -(1,3) glucano, Curdlan (Wako Chemicals, Neuss,

Alemania). En todos los casos, los estímulos se llevaron a cabo durante 4h y se realizaron 4 réplicas biológicas de cada condición experimental <sup>192,196</sup>.

## **Preparación de las muestras para proteómica cuantitativa**

### ***Lisis celular***

Luego del tiempo de incubación, las células HeLa se lavaron dos veces con PBS frío y se lisaron con buffer RIPA (150mM NaCl; 50 mM Tris-HCl pH 7.5; 1% NP40; 0.25% deoxycolato de sodio; 1% inhibidores de proteasas (Roche) y 0,5mM PMSF (*Phenylmethanesulfonyl fluoride*, Sigma) para obtener el extracto de proteínas <sup>192</sup>. Luego, el lisado celular se colocó en hielo durante 5 min, se agitó en vórtex durante otros 5 min y se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min y 4°C. El sobrenadante, que contiene el extracto de proteína de células HeLa, se removió y transfirió a un nuevo tubo. Las proteínas extraídas procedían del mismo número de células HeLa en condiciones de control e interacción. Se midió la concentración de proteínas usando el ensayo de Bradford (Bio-Rad).

### ***Digestión trípica en gel***

Antes de la digestión, se tomaron 50 µg de proteínas cada una de las muestras y se cargaron en un gel concentrador para la eliminación de contaminantes. El *stacking* gel es un gel SDS-PAGE discontinuo con una porción de gel concentrador al 4% seguida de un gel separador al 10%. La electroforesis se detuvo cuando el frente de corrida estaba a unos 3 mm del comienzo del gel separador. La banda de la muestra correspondiente a las proteínas sin separar, se visualizó con tinción de *Coomassie Brilliant Blue* coloidal G-250 (ThermoFisher) <sup>196</sup>.

Las proteínas presentes en las bandas del gel concentrador se recortaron y se digirieron con tripsina. Para ello las proteínas fueron reducidas con 10 mM de DTT (ditiotreitól) a 56°C durante 30 min y luego se alquilaron con 55 mM de Iodacetamida durante 20 min en oscuridad. Finalmente, se añadió 1/25 (w/w) de tripsina recombinante (Roche Molecular Biochemicals) en Bicarbonato amónico 25 mM (pH 8.5) a cada una de las muestras y se incubó durante toda la noche a 37°C <sup>196</sup>.

Se realizó una extracción de péptidos con acetonitrilo (ACN) al 80%, ácido trifluoroacético (TFA) 0.1% durante 15 min. Se secaron por centrifugación a vacío (SpeedVac, Savant) y se reconstituyeron en 30 µl de 2% ACN, 0.1% Acido Fórmico (AF) y se conservaron a -20°C hasta su análisis <sup>192</sup>.

### ***“Label-free” Liquid Chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)***

Se compararon las siguientes 2 condiciones: Interacción con *C. albicans* vs control y Curdlan vs control. Para todas las condiciones se analizaron 4 réplicas biológicas independientes, sin réplicas técnicas, de acuerdo a los protocolos establecidos en la Unidad de Proteómica de la UCM.

Los péptidos (1 µg) fueron analizados por nano-cromatografía líquida (nano Easy-nLC 1000, Thermo Scientific) acoplada a un espectrómetro de masas de alta resolución Q-Exactive HF (Thermo Scientific, Bremen, Germany). Los péptidos se concentraron *“on-line”* por cromatografía de fase reversa usando una precolumna Acclaim PepMap 100 (Thermo Scientific, 20mm x 75 µm ID, C18 de 3 µm diámetro de partícula y 100 Å de tamaño de poro) y entonces separados en una columna analítica de fase reversa C18 Picofrit (Thermo Scientific Easy Spray Column, PepMap RSLC C18 de 500 mm x 75 µm ID, 2 µm de diámetro de partícula, 100 Å de tamaño de poro) con punta integrada para spray, operando a un flujo de 250 nl/min. Los péptidos se eluyeron usando un gradiente desde el 2% hasta el 40% de buffer B en 140 min. Se utilizaron, como buffer A, 0.1% de AF en agua y como buffer B, 0.1% de AF en ACN.

El nano-HPLC esta acoplado *on-line* a la fuente Nanoelectrospray del espectrómetro de masas Q-exactive HF con el que se analizaron los péptidos. La entrada de los péptidos se realizó por ionización con electrospray utilizando la punta integrada en la columna analítica. La adquisición de datos se realizó con un voltaje de 1.8 Kv para el electrospray y el *‘ion transfer tube’* que guía los iones desde el spray hasta el interior del espectrómetro de masas tenía una temperatura de 270°C <sup>192</sup>.

Los péptidos se detectaron con una resolución de 60.000 en modo *Full scan* MS en un rango de masas m/z de 350-2000 Da. Los datos MS/MS fueron adquiridos en

modo de adquisición dependiente de la información (*Data-dependent acquisition, DDA*) del MS. Así, en cada *microscan* se seleccionaron hasta 15 precursores con carga de 2+ a 6+, en función de su intensidad (umbral:  $8 \times 10^3$ ), con exclusión dinámica de 27 seg, seguidos de su aislamiento con un ancho de ventana de +/- 2 unidades de m/z, en un tiempo máximo de 120 ms para su fragmentación por HCD (*High Collision Dissociation*) con una energía de colisión Normalizada (nce) del 27%. Los espectros MS/MS se adquirieron en modo positivo.

### **Identificación de proteínas**

Los espectros MS/MS adquiridos en las muestras se analizaron a través del software *Proteome Discoverer 2.4* (Thermo Scientific) con el motor de búsqueda MASCOT v.2.6.1. Se utilizaron las bases de datos de Uniprot con restricción taxonómica a *Homo sapiens* (UP-5640) (20416 secuencias).

-Parámetros de búsqueda para la identificación: Los parámetros empleados en las búsquedas fueron: tolerancia del péptido precursor de 10 ppm, tolerancia del fragmento de 0,02 Da, hasta 2 puntos de corte perdidos para la tripsina permitidos, carbamidometil cisteína como modificación fija y como modificaciones variables: oxidación de metionina, acetilación del extremo N-terminal de la proteína y acetilación del extremo amino terminal de la proteína<sup>192</sup>.

-Criterios de identificación: Se utilizó el algoritmo *Percolator* para estimar el FDR (tasa de falsos positivos) y se filtró por un q-valor <0.01 (explicado más adelante) para las proteínas identificadas con alta confianza (CI>95%).

### **Cuantificación relativa de proteínas**

Para determinar las abundancias de los péptidos y las proteínas identificadas se realizó un procesamiento iniciado con la recalibración de las masas mediante una búsqueda rápida con *Sequest HT* contra la base de datos y en base a las

identificaciones obtenidas, un alineamiento de los cromatogramas de todas las muestras con una tolerancia de hasta 10 min <sup>192</sup>.

Posteriormente se produce el alineamiento de los tiempos de retención entre las distintas muestras analizadas para la cuantificación de los iones precursores, teniendo en cuenta los péptidos únicos que estén presentes en al menos un 50% de las réplicas, sin tener en cuenta los péptidos modificados.

Finalmente se normalizan la cantidad total de proteína entre las diferentes muestras utilizando la abundancia total de todos los péptidos <sup>192</sup>.

-Agrupación de muestras y cuantificación: Para todas las condiciones se analizaron 4 réplicas biológicas independientes sin réplicas técnicas. Se seleccionó un diseño *No Nested/Parwise*. En este tipo de diseño, los *ratios* de los péptidos se calculan como la mediana geométrica de los ratios de estos en las diferentes réplicas biológicas. Finalmente, el *ratio* de proteínas es calculado como la mediana geométrica de los ratios del grupo de péptidos <sup>192</sup>.

-Análisis cuantificación: para poder comparar la abundancia de una proteína entre muestras se normalizan los datos, consiguiendo el factor de corrección adecuado para cada una de las muestras, de manera que la cantidad total de proteína sea la misma en todas <sup>192</sup>.

Para testar si la abundancia de una proteína varía entre condiciones, dado que tenemos más de tres réplicas, se aplica el test estadístico de Análisis de la Varianza (ANOVA) para estimar la probabilidad de que estas medidas sean diferentes entre condiciones.

Para descartar los cambios falsos positivos estimados por el p-valor, para un determinado nivel de FDR, se corrige el p-valor, por el test ac hoc de Benjamin-Hochberg consiguiendo un p-valor ajustado también llamado q-valor, que controla mejor el FDR.

En la cuantificación de proteínas se aplican una serie de filtros para determinar si una proteína se expresa de forma diferencial entre condiciones:

- *Abundance ratio variability*: La variabilidad de los *ratios* calculada en porcentaje debe presentar un valor por debajo del 30%. Aquellos que están con un valor

mayor se validaron manualmente viendo la tendencia de cada uno de los péptidos. Los que no tienen *abundance ratio variability* es porque solo se cuantifican en una condición.

- p-valor<0,05: Las proteínas cuantificadas deben tener un p-valor<0.05 para obtener significación estadística.
- q-valor: El q-valor corrige la proporción de falsos positivos para un valor de probabilidad elegido como umbral de significación. Los cambios son significativos cuando alcanza un q-valor es<0.05.
- *Fold Change* (FC): Se consideran proteínas diferenciales aquellas que se han seleccionado por p-valor o q-valor. Si el  $\log_2(\text{ratio})$  es positivo se determina como proteínas "*up*-reguladas" y si es negativo son proteínas "*down*-reguladas" <sup>192</sup>.

Se consideraron los datos de cuantificación de aquellas proteínas que presentan valores de cuantificación de más de un péptido y en más de dos réplicas biológicas.

Para que nuestros hallazgos estén disponibles públicamente y sean accesibles para la comunidad, hemos depositado nuestro conjunto de datos en el Consorcio *ProteomeXchange* a través del repositorio de socios de PRIDE con el identificador del conjunto de datos PXD020713 <sup>342</sup>.

## **Análisis bioinformático de las proteínas expresadas diferencialmente**

### ***Análisis de enriquecimiento: Procesos biológicos regulados diferencialmente en las CE***

El análisis de enriquecimiento de *Gene Ontology* (GO) se realizó utilizando la herramienta web *Panther* (<http://pantherdb.org/>). Para el análisis GO, la significancia estadística se estableció en el p-valor<0,05. La visualización de los términos GO obtenidos se realizó mediante el uso de la herramienta web REViGO (Reduce+Visualize Gene Ontology). REViGO analiza la lista de términos GO significativos y elimina los términos redundantes, para limitar aún más la búsqueda a un conjunto de términos no redundantes y altamente significativos<sup>199</sup>.

### ***Análisis de vías celulares reguladas diferencialmente en las CE***

También se realizó un análisis de vías enriquecidas en las muestras procesadas mediante el software Reactome (<http://reactome.org>). Las vías se estructuran jerárquicamente en Reactome siguiendo árboles de ontología de consenso que permiten la navegación intuitiva en una interfaz gráfica que admite el zoom y la visión panorámica.

## **Modelo murino de Candidiasis Vulvovaginal**

### **Animales**

En este trabajo se utilizaron las siguientes cepas de animales:

-Ratones C57BL/6 adquiridos de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

-Ratones deficientes en el receptor IFNAR, *Ifnar1*<sup>-/-</sup> (*Ifnar1*<sup>tm1Ag</sup>) donados gentilmente por el Dr. M. Albert (Institut Pasteur, Paris, Francia).

Todos los animales fueron endocriados 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 12h 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).

### **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 pseudoestro de su ciclo hormonal que se logra con la administración exógena de

estradiol. Para desarrollar el modelo murino de CVV, se utilizaron ratones hembras de 8-10 semanas de edad que fueron inyectados de manera subcutánea con 0,2 mg de valerato de  $\beta$ -estradiol (Sigma) disuelto en 100  $\mu$ l de aceite de sésamo (Sigma) los días -6 y -3 previos a la infección vaginal del día 0. Los días 2 y 4 pi recibieron otra dosis de inyecciones de estradiol para el mantenimiento de la fase pseudoestro del ciclo<sup>8,84</sup>.

Al día 0 del protocolo los animales se inocularon intravaginalmente con 20  $\mu$ l de una suspensión de  $5 \cdot 10^6$  levaduras viables *de C. albicans* en PBS. A lo largo del manuscrito este grupo de ratones es denominado **Infectados**. Se incluyó como grupo control, ratones estrogenizados que recibieron todas las inyecciones del esquema de estradiol (días -6, -3, 2 y 4) y en el día 0 del protocolo se les administró 20  $\mu$ l de PBS intravaginalmente; este grupo se denominó **No Infectado**. El protocolo utilizado corresponde al descrito por Miró y col. (2017)<sup>8</sup>.

### **Lavados cervicovaginales (LCV)**

Para monitorear el curso de la infección y llevar a cabo diferentes determinaciones se realizaron LCV a animales de los grupos infectado y no infectado inoculando 70  $\mu$ l de PBS estéril en la cavidad vaginal con pipeta y tip, realizando 10 aspiraciones sucesivas<sup>8,70,71,84,132</sup>. 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.

### **Unidades Formadoras de Colonias**

La carga fúngica intravaginal de cada ratón se determinó cultivando 100  $\mu$ l de LCV (dilución 1/10 y 1/100 en PBS estéril) en placas con agar Sabouraud glucosado. Las UFC se contaron luego de 48h de incubación a TA y se expresaron como UFC/ml de LCV<sup>8,71,340,343</sup>.

### **Citoextendidos**

Células provenientes de LCV de ratones se contaron en cámara de Neubauer (Boeco, Alemania) y se resuspendieron a una concentración de  $5 \cdot 10^4$  células/ml. Un volumen de 100  $\mu$ l de esa suspensión se centrifugó en una citocentrífuga (Shandon Elliott) durante 5 min a 2000 rpm para obtener los citoextendidos sobre portaobjetos comunes (B&C, Alemania)<sup>344</sup>.

### **Tinción de May-Grünwald Giemsa**

Los citoextendidos de LCV se cubrieron completamente con el colorante May-Grünwald (Merck) durante 2 min. Luego se agregó la misma cantidad de agua que de May-Grünwald sobre el extendido durante 2 min. El colorante se lavó con abundante agua y los vidrios se cubrieron con una dilución 1/10 de Giemsa (Merck), durante 15 min, 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<sup>71,343</sup>.

### **Recuento de Polimorfonucleares neutrófilos**

Los PMN fueron identificados por su morfología, apariencia de tinción y núcleos polilobulados característicos. Para cada citoextendido, los PMN se contaron manualmente mediante la observación por microscopía de luz estándar en diez campos no adyacentes utilizando un objetivo de 40 $\times$ . Los PMN contados se promediaron por campo. Los valores se informan como medias PMN cuenta por grupo  $\pm$  errores estándar de las medias (ESM)<sup>8,132,343</sup>.

## Cuantificación de citoquinas

Las concentraciones de IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ , IL-10, IL-17 e IL-22 en LCV 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°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 1h a TA. Posteriormente, se lavó el exceso de anticuerpo y se incubó con estreptavidina-HRP (*Horseradish Peroxidase*) durante 20 min. Luego, se realizaron 5 lavados con buffer de lavado y la reacción final se reveló agregando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como sustrato y TMB (3,3',5,5'- tetramethylbenzidina) como cromógeno (BD OptEIA™, EEUU). La reacción se detuvo por al agregado de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. La absorbancia fue medida usando un lector de placas (BIO-RAD, EEUU); las concentraciones de las muestras se obtuvieron a partir de la interpolación de las absorbancias sobre las curvas construida con los estándares. Los datos se expresaron como picogramos por mililitro de LCV <sup>181</sup>.

## Cortes histológicos de vagina

Para los estudios histológicos, las vaginas de animales de los grupos Infectados y No Infectados se removieron a los diferentes días de estudio e inmediatamente se fijaron en formol 10% (Biopack, Argentina) por 24h. Luego se deshidrataron, embebieron en parafina y cortaron en secciones de 5  $\mu$ m de espesor.

Los cortes histológicos se tiñeron con la técnica de PAS/H (ácido periódico-reactivo de Schiff/Hematoxilina)<sup>71</sup>. 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.

### ***Score de Invasividad e inflamación.***

Para la determinación del grado de invasividad e inflamación se procedió de la siguiente manera: se examinaron cinco campos visuales, recorriendo el campo de forma longitudinal a lo largo del epitelio vaginal a 400x de aumento de acuerdo al método de Zhang y col. (2014)<sup>207</sup>, y modificado por nuestro grupo <sup>8</sup>, los puntajes promedio de cinco campos se promediaron para cada sección.

El grado de invasividad se calificó de acuerdo a la siguiente escala:

Puntuación 0: ausencia de *Candida* en la capa epitelial; Puntuación 1: presencia de 1–5 morfotipos de *Candida*; Puntuación 2: 6–10 morfotipos *Candida*; Puntuación 3: 11-15 morfotipos de *Candida*; Puntuación 4: 16–20 morfotipos de *Candida*; Puntaje 5, 21–25 morfotipos de *Candida*; Puntuación 6, 26–30 morfotipos de *Candida*; Puntuación 7: 31–35 morfotipos de *Candida* y Puntaje 8, > 36 morfotipos de *Candida*.

El grado de inflamación se calificó como Puntuación 0 o ausencia de PMN; Puntuación 1, presencia de entre 1–5 PMN o 1–2 microabscesos en la capa epitelial y algunos PMN en la submucosa; Puntaje 2, presencia de entre 6-10 PMN o 3-4 microabscesos en la capa epitelial y algunos PMN en la submucosa; y Puntuación 3, presencia de entre 11-15 PMN o 5-6 microabscesos; Puntuación 4, presencia de entre 16-20 PMN o 7-8 microabscesos, Puntuación 5, >20 PMN o >8 microabscesos o abscesos grandes en la capa epitelial y numerosos PMN en el submucosa.

El score de Invasividad e Inflamación obtenido para cada animal en cada día de la cinética fue promediado con los scores independiente de cada animal de su grupo y expresado como la media +/- ESM.

## Citometría de flujo

### ***Preparación de células de nódulos linfáticos drenantes de vagina***

Para estudiar cambios a nivel periférico en las diferentes poblaciones celulares inmunes durante la CVV, se extrajeron los nódulos linfáticos lumbares e inguinales drenantes de vagina de animales C57BL/6 e *Ifnar1*<sup>-/-</sup> de ambos grupos experimentales, Infectados y No Infectados en el día 4 pi. Se realizó un pool de las células obtenidas para cada animal y se prepararon las suspensiones celulares para efectuar citometría de flujo multiparamétrica.

### ***Marcación celular***

Las suspensiones celulares se lavaron en PBS y se incubaron con la sonda de viabilidad Zombie Aqua (Biolegend) durante 15 min a TA. A continuación, las células se lavaron con PBS-SFB al 2% frío y se incubaron con diferentes combinaciones de anticuerpos monoclonales anti-ratón conjugados a fluorocromos (eBioscience, Biolegend, BD Biosciences o Santa Cruz Biotechnology). Para la tinción de marcadores de superficie se utilizó anti-CD11b conjugado a PE (*phycoerythrin*), anti-CD3 conjugado a PE-Cy5 (*phycoerythrin-Cy5*), anti-CD19 conjugado a PerCP (*peridinin chlorophyll protein*), anti-CD4 conjugado a APC-Cy7 (*allophycocyanin-Cy7*), anti-CD8 conjugado a AF700 (*alexa fluor 700*), anti-CD25 conjugado a FITC (*fluorescein isothiocyanate*) durante 30 min a 4°C. Para detectar la expresión intracelular de citoquinas o factores de transcripción, las células se cultivaron con 50 ng/ml de PMA (*phorbol 12-myristate 13-acetate*) (Sigma) y 1 µg/ml de iomomicina (Sigma) durante 4h y se agregaron 5 µg/ml Brefeldina A (Sigma) y monensina (Thermo Fisher Scientific) durante las últimas 3h<sup>344</sup>. A continuación, las células se tiñeron para los marcadores de superficie, se lavaron y se fijaron con buffer Cytofix/Cytoperm (BD Pharmingen) durante 30 min a 4°C. Posteriormente, las células se lavaron con Perm Wash Buffer (BD Pharmingen) y se incubaron con anti-IFN $\gamma$  conjugado a PE, anti-IL17A conjugado a APC y anti-Foxp3 conjugado a BV421 (Brilliant Violet 421) por 30 min a 4°C. Se lavaron nuevamente y luego se resuspendieron en PBS-SFB 2% y se adquirieron en un citómetro de flujo BD

LSR Fortessa X-20 (BD Biosciences, San José, CA, USA) (Baez 2019). El análisis de los datos se realizó utilizando el programa FlowJo VX (Tree Star, Ashland, OR, USA). La frecuencia de cada población celular se expresa como % dentro de las células vivas para cada animal y el número absoluto como la media +/- ESM.

La estrategia de Gate utilizada para el análisis de las poblaciones celulares se incluye en el Anexo CAP II, Figura 1<sup>344,345</sup>.

## **Análisis estadístico**

Los experimentos fueron realizados por triplicado a menos que se especifique lo contrario. Los datos fueron expresados como la media  $\pm$  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 Prism8 (GraphPad, San Diego, CA). Valores de \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  y \*\*\*\*  $p < 0,0001$  se consideraron estadísticamente significativos.

# ANEXOS

## **Anexo Capítulo II**

**Tabla 1. Proteínas Expresadas Diferencialmente en Células HeLa en Interacción con *C. albicans***

Proteínas <i>up</i> -reguladas en CE HeLa en interacción con <i>C. albicans</i>					
Código UniProt <sup>b</sup>	Nombre del gen	Nombre de la proteína <sup>b</sup>	Abundance ratio (Log2) <sup>a</sup>	p-valor	N° de réplicas <sup>c</sup>
A0A0C4D H01	POLR3E	DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC5	6,64	1,00E-17	3
F8W9J4	DST	Dystonin	6,64	1,00E-17	3
O94804	STK10	Serine/threonine-protein kinase 10	6,64	1,00E-17	4
P00747	PLG	Plasminogen	6,64	1,00E-17	4
P11717	IGF2R	Cation-independent mannose-6-phosphate receptor	6,64	1,00E-17	4
Q8IXW5	RPAP2	Putative RNA polymerase II subunit B1 CTD phosphatase RPAP2	6,64	1,00E-17	4
Q0116744 ABI	FOXK2	Forkhead box protein K2	2,51	9,17E-07	4
P69905	HBA1	Hemoglobin subunit alpha	2,05	8,18E-08	4
P02765	AHSG	Alpha-2-HS-glycoprotein	1,9	9,50E-04	4
Q8IWB1	ITPRIP	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-interacting protein	1,69	6,58E-05	4
P49327	FASN	Fatty acid synthase	1,54	6,98E-05	4
O60921	HUS1	Checkpoint protein HUS1	1,51	8,34E-03	4
O43156	TTI1	TELO2-interacting protein 1 homolog	1,47	1,38E-02	4
P05121	SERPINE1	Plasminogen activator inhibitor 1	1,43	2,14E-02	4
P28702	RXRB	Retinoic acid receptor RXR-beta	1,43	7,45E-03	4
Q12882	DPYD	Dihydropyrimidine dehydrogenase [NADP(+)]	1,36	2,14E-02	4
P27635	RPL10	60S ribosomal protein L10	1,35	1,10E-02	4
Q9NVV4-2	MTPAP	Isoform 2 of Poly(A) RNA polymerase, mitochondrial	1,34	9,20E-03	4
P29317	EPHA2	Ephrin type-A receptor 2	1,33	4,45E-03	4
A6NMQ1	POLA1	DNA polymerase	1,26	1,67E-02	4
J3KN16	KIAA0368	KIAA0368	1,25	1,00E-02	4
P63261	ACTG1	Actin, cytoplasmic 2	1,25	1,51E-03	4
Q12933	TRAF2	TNF receptor-associated factor 2	1,2	3,14E-02	4
P52294	KPNA1	Importin subunit alpha-5	1,19	1,75E-02	4
Q13049	TRIM32	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM32	1,19	2,58E-02	4
P35579	MYH9	Myosin-9	1,18	2,68E-03	4
O75369	FLNB	Filamin-B	1,17	2,96E-03	4
Q8NI27	THOC2	THO complex subunit 2	1,17	1,94E-02	4
Q14204	DYNC1H1	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1	1,15	3,15E-03	4
A0A087W YN9	DHX29	ATP-dependent RNA helicase DHX29	1,15	4,16E-02	4
Q92879	CELF1	CUGBP Elav-like family member 1	1,12	3,71E-02	4
P53621	COPA	Coatomer subunit alpha	1,11	5,14E-03	4
Q14008	CKAP5	Cytoskeleton-associated protein 5	1,11	6,34E-03	4
Q14315	FLNC	Filamin-C	1,1	8,81E-03	4
P56192	MARS	Methionine--tRNA ligase, cytoplasmic	1,1	5,74E-03	4
A6PW57	PIP5K1A	Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase type-1 alpha	1,09	4,22E-02	4
O00186	STXBP3	Syntaxin-binding protein 3	1,09	1,77E-02	4

**Tabla 1 (continuación)**

Código UniProt <sup>b</sup>	Nombre del gen	Nombre de la proteína <sup>b</sup>	Abundance ratio (Log2) <sup>a</sup>	p-valor	N° de réplicas <sup>c</sup>
O95373	IPO7	Importin-7	1,09	6,08E-03	4
Q9P2J5	LARS	Leucine--tRNA ligase, cytoplasmic	1,08	6,39E-03	4
Q8TD19	NEK9	Serine/threonine-protein kinase Nek9	1,08	4,34E-02	4
Q92973-2	TNPO1	Isoform 2 of Transportin-1	1,08	6,48E-03	4
Q5JVZ5	ELMO2	Engulfment and cell motility protein 2	1,08	3,29E-02	4
O00622	CYR61	Protein CYR61	1,08	1,33E-02	4
Q13131	PRKAA1	5'-AMP-activated protein kinase catalytic subunit alpha-1	1,08	2,68E-02	4
Q9BT22	ALG1	Chitobiosyldiphosphodolichol beta-mannosyltransferase	1,07	1,42E-02	4
Q9UBD5	ORC3	Origin recognition complex subunit 3	1,06	3,99E-02	4
Q8IZW8	TNS4	Tensin-4	1,06	3,48E-02	4
P07814	EPRS	Bifunctional glutamate/proline--tRNA ligase	1,05	8,29E-03	4
A0A087WTD7	AKAP13	A-kinase anchor protein 13	1,04	1,16E-02	4
P35354	PTGS2	Prostaglandin G/H synthase 2	1,04	2,59E-02	4
P07996	THBS1	Thrombospondin-1	1,04	1,27E-02	4
Q92616	GCN1	eIF-2-alpha kinase activator GCN1	1,03	9,26E-03	4
O43592	XPOT	Exportin-T	1,03	9,91E-03	4
O60684	KPNA6	Importin subunit alpha-7	1,02	1,44E-02	4
Q9H5Q4	TFB2M	Dimethyladenosine transferase 2, mitochondrial	1,02	1,72E-02	4
P27708	CAD	CAD protein	1,02	2,48E-02	4
Q96CW5	TUBGCP3	Gamma-tubulin complex component 3	1,02	4,47E-02	4
Q14974	KPNB1	Importin subunit beta-1	1,01	1,19E-02	4
Q14C86	GAPVD1	GTPase-activating protein and VPS9 domain-containing protein 1	1	1,53E-02	4
Q9UI26	IPO11	Importin-11	1	2,05E-02	4
O00629	KPNA4	Importin subunit alpha-3	1	1,06E-02	4
Q9Y490	TLN1	Talin-1	0,99	1,31E-02	4
Q86VP6	CAND1	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1	0,99	1,31E-02	4
Q9BW27	NUP85	Nuclear pore complex protein Nup85	0,99	1,89E-02	4
O60518	RANBP6	Ran-binding protein 6	0,98	1,57E-02	4
O95155	UBE4B	Ubiquitin conjugation factor E4 B	0,98	3,05E-02	4
O95573	ACSL3	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 3	0,97	1,41E-02	4
O00410	IPO5	Importin-5	0,97	1,57E-02	4
Q5JVF3	PCID2	PCI domain-containing protein 2	0,96	2,26E-02	4
Q9UID3	VPS51	Vacuolar protein sorting-associated protein 51 homolog	0,95	3,45E-02	4
Q9H9T3	ELP3	Elongator complex protein 3	0,95	4,29E-02	4
P41252	IARS	Isoleucine--tRNA ligase, cytoplasmic	0,95	1,87E-02	4
O75694	NUP155	Nuclear pore complex protein Nup155	0,94	1,44E-02	4
P21333	FLNA	Filamin-A	0,94	1,99E-02	4
A0A087WVQ6	CLTC	Clathrin heavy chain	0,93	2,10E-02	4
Q5VW32	BROX	BRO1 domain-containing protein BROX	0,93	2,55E-02	4
P54136	RARS	Arginine--tRNA ligase, cytoplasmic	0,93	2,17E-02	4

**Tabla 1 (continuación)**

Código UniProt <sup>b</sup>	Nombre del gen	Nombre de la proteína <sup>b</sup>	Abundance ratio (Log <sub>2</sub> ) <sup>a</sup>	p-valor	N° de réplicas <sup>c</sup>
P52888	THOP1	Thimet oligopeptidase	0,93	1,85E-02	4
P49792	RANBP2	E3 SUMO-protein ligase RanBP2	0,92	3,93E-02	4
A0A1W2P NX8	UNC45A	Protein unc-45 homolog A	0,92	2,18E-02	4
O43813	LANCL1	LanC-like protein 1	0,91	2,38E-02	4
P78527	PRKDC	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	0,91	2,66E-02	4
P13489	RNH1	Ribonuclease inhibitor	0,91	2,24E-02	4
O14980	XPO1	Exportin-1	0,89	2,88E-02	4
O94925-3	GLS	Isoform 3 of Glutaminase kidney isoform, mitochondrial	0,88	3,22E-02	4
P46940	IQGAP1	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	0,87	3,16E-02	4
Q8IXB1	DNAJC10	DnaJ homolog subfamily C member 10	0,87	4,46E-02	4
Q9Y678	COPG1	Coatomer subunit gamma-1	0,86	3,48E-02	4
Q96T76	MMS19	MMS19 nucleotide excision repair protein homolog	0,84	4,35E-02	4
P17655	CAPN2	Calpain-2 catalytic subunit	0,82	4,62E-02	4
Q99460	PSMD1	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1	0,81	4,71E-02	4
Q9HAV4	XPO5	Exportin-5	0,81	4,20E-02	4
Q9Y2A7	NCKAP1	Nck-associated protein 1	0,81	4,79E-02	4
O00159	MYO1C	Unconventional myosin-1c	0,79	4,95E-02	4
Q9BQ52	ELAC2	Zinc phosphodiesterase ELAC protein 2	0,79	4,76E-02	4

**Proteínas *down*-reguladas en CE HeLa en interacción con *C. albicans***

Código UniProt <sup>b</sup>	Nombre del gen	Nombre de la proteína <sup>b</sup>	Abundance ratio (Log <sub>2</sub> ) <sup>a</sup>	p-valor	N° de réplicas <sup>c</sup>
P11279	LAMP1	Lysosome-associated membrane glycoprotein 1	-0,64	4,81E-02	4
P05783	KRT18	Keratin, type I cytoskeletal 18	-0,64	4,73E-02	4
O75340	PDCD6	Programmed cell death protein 6	-0,64	4,59E-02	4
P04264	KRT1	Keratin, type II cytoskeletal 1	-0,65	4,40E-02	4
E7ETK0	RPS24	40S ribosomal protein S24	-0,66	4,24E-02	4
Q04837	SSBP1	Single-stranded DNA-binding protein, mitochondrial	-0,66	4,28E-02	4
G3V4C1	HNRNPC	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	-0,67	3,94E-02	4
P61353	RPL27	60S ribosomal protein L27	-0,68	3,66E-02	4
P01876	IGHA1	Immunoglobulin heavy constant alpha 1	-0,68	4,03E-02	4
Q03252	LMNB2	Lamin-B2	-0,68	3,88E-02	4
P05787	KRT8	Keratin, type II cytoskeletal 8	-0,68	3,50E-02	4
Q9Y639	NPTN	Neuroplastin	-0,69	4,77E-02	4
P14927	UQCRB	Cytochrome b-c1 complex subunit 7	-0,72	4,34E-02	4
P62854	RPS26	40S ribosomal protein S26	-0,74	2,39E-02	4
P46087	NOP2	Probable 28S rRNA (cytosine(4447)-C(5))-methyltransferase	-0,75	4,50E-02	4
P35527	KRT9	Keratin, type I cytoskeletal 9	-0,75	2,22E-02	4
P61326	MAGOH	Protein mago nashi homolog	-0,78	2,75E-02	4
E9PKP7	UBTF	Nucleolar transcription factor 1	-0,78	4,95E-02	4

**Tabla 1 (continuación)**

Código UniProt <sup>b</sup>	Nombre del gen	Nombre de la proteína <sup>b</sup>	Abundance ratio (Log2) <sup>a</sup>	p-valor	N° de réplicas <sup>c</sup>
H3BPJ9	NDUFB10	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 10	-0,79	2,80E-02	4
P17096	HMGA1	High mobility group protein HMG-I/HMG-Y	-0,79	3,69E-02	4
P39019	RPS19	40S ribosomal protein S19	-0,79	1,61E-02	4
P57105	SYNJ2BP	Synaptojanin-2-binding protein	-0,8	3,44E-02	4
Q9UKA9	PTBP2	Polypyrimidine tract-binding protein 2	-0,81	2,42E-02	4
O43290	SART1	U4/U6.U5 tri-snRNP-associated protein 1	-0,81	2,84E-02	4
P35609	ACTN2	Alpha-actinin-2	-0,82	1,22E-02	4
P15531	NME1	Nucleoside diphosphate kinase A	-0,82	1,80E-02	4
Q9UK45	LSM7	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm7	-0,83	2,64E-02	4
G3V203	RPL18	60S ribosomal protein L18	-0,84	1,10E-02	4
Q6NZI2	CAVIN1	Caveolae-associated protein 1	-0,86	1,06E-02	4
H0YKD8	RPL28	60S ribosomal protein L28	-0,87	1,41E-02	4
P82909	MRPS36	28S ribosomal protein S36, mitochondrial	-0,87	4,34E-02	4
Q86WR0	CCDC25	Coiled-coil domain-containing protein 25	-0,88	2,65E-02	4
P16401	HIST1H1B	Histone H1.5	-0,88	7,90E-03	4
Q9Y6D9	MAD1L1	Mitotic spindle assembly checkpoint protein MAD1	-0,88	2,15E-02	4
Q15428	SF3A2	Splicing factor 3A subunit 2	-0,89	2,02E-02	4
Q8TDN6	BRIX1	Ribosome biogenesis protein BRX1 homolog	-0,89	1,88E-02	4
Q9P1F3	ABRACL	Costars family protein ABRACL	-0,9	4,07E-02	4
A0A0B4J231	IGLL5	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5	-0,9	1,80E-02	4
Q9H1Z4	WDR13	WD repeat-containing protein 13	-0,91	2,80E-02	4
G3V1P5	MED15	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 15	-0,92	4,50E-02	4
P13984	GTF2F2	General transcription factor IIF subunit 2	-0,93	1,55E-02	4
Q9Y3U8	RPL36	60S ribosomal protein L36	-0,93	5,35E-03	4
P06702	S100A9	Protein S100-A9	-0,94	2,75E-02	4
P53999	SUB1	Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15	-0,94	4,85E-03	4
Q13247	SRSF6	Serine/arginine-rich splicing factor 6	-0,94	1,18E-02	4
Q9UKD2	MRTO4	mRNA turnover protein 4 homolog	-0,94	1,38E-02	4
Q658P3	STEAP3	Metalloreductase STEAP3	-0,94	1,17E-02	4
Q8N6M0	OTUD6B	OTU domain-containing protein 6B	-0,95	2,81E-02	4
Q5QP56	BCL2L1	Bcl-2-like protein 1 (Fragment)	-0,95	3,96E-02	4
Q8NBJ4	GOLM1	Golgi membrane protein 1	-0,95	2,23E-02	4
Q9BV40	VAMP8	Vesicle-associated membrane protein 8	-0,96	1,34E-02	4
K7EJV9	RPL23A	60S ribosomal protein L23a (Fragment)	-0,98	3,58E-03	4
Q14498	RBM39	RNA-binding protein 39	-0,98	7,03E-03	4
Q9UKR5	ERG28	Probable ergosterol biosynthetic protein 28	-0,99	2,42E-02	4
Q9NPJ3	ACOT13	Acyl-coenzyme A thioesterase 13	-1	9,14E-03	4
P62277	RPS13	40S ribosomal protein S13	-1,02	2,41E-03	4
P62316	SNRPD2	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2	-1,03	2,61E-03	4
P82979	SARNP	SAP domain-containing ribonucleoprotein	-1,03	2,98E-03	4

**Tabla 1 (continuación)**

Código UniProt <sup>b</sup>	Nombre del gen	Nombre de la proteína <sup>b</sup>	Abundance ratio (Log2) <sup>a</sup>	p-valor	N° de réplicas <sup>c</sup>
Q4TT34	NME4	Nucleoside diphosphate kinase	-1,03	3,14E-02	4
Q5T760	SRSF11	Serine/arginine-rich-splicing factor 11 (Fragment)	-1,03	2,50E-02	4
Q9P0S9	TMEM14C	Transmembrane protein 14C	-1,03	1,43E-02	4
P13645	KRT10	Keratin, type I cytoskeletal 10	-1,04	2,15E-03	4
P13647	KRT5	Keratin, type II cytoskeletal 5	-1,04	1,03E-02	4
P62269	RPS18	40S ribosomal protein S18	-1,04	2,12E-03	4
Q9Y2Q9	MRPS28	28S ribosomal protein S28, mitochondrial	-1,04	2,35E-02	4
Q13242	SRSF9	Serine/arginine-rich splicing factor 9	-1,06	7,28E-03	4
Q9GZR2	REXO4	RNA exonuclease 4	-1,06	2,36E-02	4
D6RD17	JCHAIN	Immunoglobulin J chain (Fragment)	-1,08	4,99E-03	4
O00461	GOLIM4	Golgi integral membrane protein 4	-1,08	2,55E-03	4
P35908	KRT2	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	-1,09	1,22E-03	4
Q96C01	FAM136A	Protein FAM136A	-1,09	1,89E-02	4
E5RGN3	ATOX1	Copper transport protein ATOX1	-1,1	1,76E-02	4
Q99848	EBNA1BP2	Probable rRNA-processing protein EBP2	-1,11	2,53E-03	4
P26583	HMGB2	High mobility group protein B2	-1,12	1,05E-03	4
P62857	RPS28	40S ribosomal protein S28	-1,14	1,36E-03	4
E9PQ56	PUF60	Poly(U)-binding-splicing factor PUF60 (Fragment)	-1,14	9,71E-03	4
P60866	RPS20	40S ribosomal protein S20	-1,17	5,73E-04	4
Q13595	TRA2A	Transformer-2 protein homolog alpha	-1,18	1,34E-02	4
O75600	GCAT	2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase, mitochondrial	-1,19	9,24E-03	4
A0A087WUC6	SPCS2	Signal peptidase complex subunit 2	-1,19	1,01E-02	4
P63165	SUMO1	Small ubiquitin-related modifier 1	-1,2	1,12E-03	4
Q8WXA9-2	SREK1	Isoform 2 of Splicing regulatory glutamine/lysine-rich protein 1	-1,21	1,88E-02	4
Q99442	SEC62	Translocation protein SEC62	-1,28	9,09E-04	4
P62306	SNRPF	Small nuclear ribonucleoprotein F	-1,29	6,05E-04	4
Q86XZ4	SPATS2	Spermatogenesis-associated serine-rich protein 2	-1,3	6,03E-03	4
P47914	RPL29	60S ribosomal protein L29	-1,33	9,52E-05	4
Q9UQN3	CHMP2B	Charged multivesicular body protein 2b	-1,33	2,01E-03	4
O43676	NDUFB3	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 3	-1,36	2,03E-03	4
E9PRJ5	NDUFC2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 subunit C2	-1,39	3,41E-03	4
Q8IYB3	SRRM1	Serine/arginine repetitive matrix protein 1	-1,43	2,24E-04	4
J3QR07	YTHDC1	YTH domain-containing protein 1	-1,44	4,47E-03	4
H0YK48	TPM1	Tropomyosin alpha-1 chain	-1,47	2,95E-04	4
J3KPD3	RBM7	RNA binding motif protein 7, isoform CRA_c	-1,48	2,60E-03	4
P78345	RPP38	Ribonuclease P protein subunit p38	-1,48	1,67E-03	4
Q969G5	CAVIN3	Caveolae-associated protein 3	-1,49	1,53E-04	4
Q92805	GOLGA1	Golgin subfamily A member 1	-1,49	1,88E-02	4
O43598	DNPH1	2'-deoxynucleoside 5'-phosphate N-hydrolase 1	-1,53	2,39E-04	4

**Tabla 1 (continuación)**

Código UniProt <sup>b</sup>	Nombre del gen	Nombre de la proteína <sup>b</sup>	Abundance ratio (Log2) <sup>a</sup>	p-valor	N° de réplicas <sup>c</sup>
P55081	MFAP1	Microfibrillar-associated protein 1	-1,53	3,19E-04	4
Q9BW72	HIGD2A	HIG1 domain family member 2A, mitochondrial	-1,57	1,71E-03	4
P11137-4	MAP2	Isoform 4 of Microtubule-associated protein 2	-1,67	1,93E-03	4
H0YBC7	BNIP3L	BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3-like (Fragment)	-1,69	3,76E-03	4
P18077	RPL35A	60S ribosomal protein L35a	-1,73	3,17E-06	4
Q8IUE6	HIST2H2A B	Histone H2A type 2-B	-1,75	3,85E-04	4
Q8WW12	PCNP	PEST proteolytic signal-containing nuclear protein	-1,81	1,71E-06	4
P49207	RPL34	60S ribosomal protein L34	-1,92	2,87E-08	4
P42766	RPL35	60S ribosomal protein L35	-1,99	4,05E-08	4
P33947	KDEL2	ER lumen protein-retaining receptor 2	-2,02	9,61E-06	4
P42677	RPS27	40S ribosomal protein S27	-2,1	6,28E-08	4
J3KQN4	RPL36A	60S ribosomal protein L36a	-2,21	4,03E-06	4
Q9BVT8	TMUB1	Transmembrane and ubiquitin-like domain-containing protein 1	-2,4	2,99E-07	4
P14209	CD99	CD99 antigen	-2,47	7,07E-07	4
O43896	KIF1C	Kinesin-like protein KIF1C	-2,59	2,33E-08	4
Q96FQ6	S100A16	Protein S100-A16	-2,72	7,32E-10	4
A0A0D9SE M4	SRSF4	Serine/arginine-rich-splicing factor 4 (Fragment)	-2,87	1,18E-11	4
A2A2F0	RALGAPB	Ral GTPase-activating protein subunit beta (Fragment)	-2,87	1,18E-11	4
C9J5N7	ARMC10	Armadillo repeat-containing protein 10 (Fragment)	-6,64	1,00E-17	4
F8VWB0	SLC11A2	Natural resistance-associated macrophage protein 2 (Fragment)	-6,64	1,00E-17	4
O95425	SVIL	Supervillin	-6,64	1,00E-17	4
Q6UWP8	SBSN	Suprabasin	-6,64	1,00E-17	4
Q8N4H5	TOMM5	Mitochondrial import receptor subunit TOM5 homolog	-6,64	1,00E-17	4
Q9H4B0	OSGEPL1	Probable tRNA N6-adenosine threonylcarbamoyltransferase, mitochondrial	-6,64	1,00E-17	3

<sup>a</sup>Las proteínas están ordenadas según el Log2 del *abundance ratio* dentro de cada categoría. <sup>b</sup>Código Uniprot y Nombre de proteína de acuerdo a la base de datos Uniprot. <sup>c</sup>Para este estudio se consideraron aquellas proteínas presentes en al menos 3 réplicas biológicas y con coeficiente de variación menor al 30%.

**Tabla 2. Proteínas Expresadas Diferencialmente en Células HeLa estimuladas con Curdlan**

Proteínas <i>up</i> -reguladas en CE HeLa estimuladas con Curdlan					
Código UniProt <sup>b</sup>	Nombre del gen	Nombre de la proteína <sup>b</sup>	Abundance ratio (Log2) <sup>a</sup>	p-valor	N° de réplicas <sup>c</sup>
Q96JB2	COG3	Conserved oligomeric Golgi complex subunit 3	6,64	1,00E-17	3
Q7Z674	DKFZp779C2259	Fasciculation and elongation protein zeta 2 (Zygin II), isoform CRA_d	1,7	7,61E-06	4
P69905	HBA1	Hemoglobin subunit alpha	1,68	1,00E-11	4
K7EIG1	CLUH	Clustered mitochondria protein homolog (Fragment)	1,49	5,97E-05	4
E7EW84	EXOC6	Exocyst complex component	1,37	5,12E-04	4
Q8IWB1	ITPRIP	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-interacting protein	1,2	1,27E-06	4
O43156	TTI1	TELO2-interacting protein 1 homolog	1,17	1,82E-03	4
P29317	EPHA2	Ephrin type-A receptor 2	1,16	2,73E-05	4
Q15004	PCLAF	PCNA-associated factor	1,11	1,06E-03	4
Q8NI27	THOC2	THO complex subunit 2	1,1	6,26E-05	4
P49327	FASN	Fatty acid synthase	1,07	1,49E-05	4
C9JRL4	MDH1	Malate dehydrogenase, cytoplasmic (Fragment)	1,06	2,18E-04	4
Q8IWZ3	ANKHD1	Ankyrin repeat and KH domain-containing protein 1	1,04	8,74E-03	4
Q8TD19	NEK9	Serine/threonine-protein kinase Nek9	1,03	1,35E-03	4
Q15629	TRAM1	Translocating chain-associated membrane protein 1	1,03	8,58E-03	4
A0A087WYN9	DHX29	ATP-dependent RNA helicase DHX29	1	4,80E-03	4
Q8IY17	PNPLA6	Neuropathy target esterase	0,99	1,19E-02	4
Q9HAU5	UPF2	Regulator of nonsense transcripts 2	0,99	6,50E-03	4
O95373	IPO7	Importin-7	0,98	7,19E-05	4
P50443	SLC26A2	Sulfate transporter	0,97	2,44E-02	4
Q9NR19	ACSS2	Acetyl-coenzyme A synthetase, cytoplasmic	0,97	3,13E-03	4
O00622	CYR61	Protein CYR61	0,97	1,79E-04	4
Q7L1W4	LRRC8D	Volume-regulated anion channel subunit LRRC8D	0,95	1,90E-02	4
Q92973-2	TNPO1	Isoform 2 of Transportin-1	0,94	1,47E-04	4
Q15796	SMAD2	Mothers against decapentaplegic homolog 2	0,91	2,82E-04	4
Q9BVQ7	SPATA5L1	Spermatogenesis-associated protein 5-like protein 1	0,91	3,85E-03	4
F8WC89	SAC3D1	SAC3 domain-containing protein 1	0,9	2,10E-02	4
Q9H8H0	NOL11	Nucleolar protein 11	0,9	2,07E-02	4
P30154	PPP2R1B	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A beta isoform	0,9	4,61E-03	4
F8VSC5	SCYL2	SCY1-like protein 2 (Fragment)	0,89	3,51E-02	4
Q8IZW8	TNS4	Tensin-4	0,88	5,22E-03	4
Q12882	DPYD	Dihydropyrimidine dehydrogenase [NADP(+)]	0,88	2,66E-02	4
Q9NV70	EXOC1	Exocyst complex component 1	0,87	1,48E-02	4
P35354	PTGS2	Prostaglandin G/H synthase 2	0,87	3,24E-02	4
Q9C0C9	UBE2O	(E3-independent) E2 ubiquitin-conjugating enzyme	0,86	3,06E-02	4
Q96D53	COQ8B	Atypical kinase COQ8B, mitochondrial	0,86	1,41E-02	4
Q14974	KPNB1	Importin subunit beta-1	0,86	5,78E-04	4

Tabla 2 (continuación)

Código UniProt <sup>b</sup>	Nombre del gen	Nombre de la proteína <sup>b</sup>	Abundance ratio (Log2) <sup>a</sup>	p-valor	N° de réplicas <sup>c</sup>
Q6KB66	KRT80	Keratin, type II cytoskeletal 80	0,86	2,55E-02	4
P52294	KPNA1	Importin subunit alpha-5	0,85	6,96E-03	4
P07814	EPRS	Bifunctional glutamate/proline--tRNA ligase	0,85	6,50E-04	4
P50579	METAP2	Methionine aminopeptidase 2	0,84	1,15E-02	4
A6PW57	PIP5K1A	Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase type-1 alpha	0,83	1,37E-02	4
O14787-2	TNPO2	Isoform 2 of Transportin-2	0,83	1,58E-02	4
O94973	AP2A2	AP-2 complex subunit alpha-2	0,81	1,64E-02	4
C9JKF1	SAMD9	Sterile alpha motif domain-containing protein 9 (Fragment)	0,81	3,96E-02	4
A6NML8	DIAPH2	Diaphanous homolog 2 (Drosophila), isoform CRA_c	0,81	2,58E-02	4
P57740	NUP107	Nuclear pore complex protein Nup107	0,8	2,54E-02	4
P54136	RARS	Arginine--tRNA ligase, cytoplasmic	0,8	1,40E-03	4
E7EQI7	WASHC5	WASH complex subunit 5	0,79	1,91E-03	4
P52888	THOP1	Thimet oligopeptidase	0,78	1,91E-03	4
Q86Y56	DNAAF5	Dynein assembly factor 5, axonemal	0,78	1,26E-03	4
A0A087WVQ6	CLTC	Clathrin heavy chain	0,78	1,72E-03	4
O96005	CLPTM1	Cleft lip and palate transmembrane protein 1	0,78	3,25E-02	4
A0A0A0MR98	NADK	NAD kinase	0,78	4,41E-02	4
P53621	COPA	Coatomer subunit alpha	0,78	1,82E-03	4
A6NMQ1	POLA1	DNA polymerase	0,78	3,35E-02	4
O95155	UBE4B	Ubiquitin conjugation factor E4 B	0,78	3,78E-03	4
Q16637	SMN1	Survival motor neuron protein	0,77	9,50E-03	4
Q9UI26	IPO11	Importin-11	0,77	2,49E-03	4
Q14C86	GAPVD1	GTPase-activating protein and VPS9 domain-containing protein 1	0,76	4,93E-03	4
P27635	RPL10 P	60S ribosomal protein L10	0,76	2,80E-02	4
P10398	ARAF	Serine/threonine-protein kinase A-Raf	0,76	1,84E-02	4
P41567	EIF1	Eukaryotic translation initiation factor 1	0,75	2,93E-03	4
Q86U38	NOP9	Nucleolar protein 9	0,75	3,28E-02	4
O95453	PARN	Poly(A)-specific ribonuclease PARN	0,74	3,29E-02	4
P41743	PRKCI	Protein kinase C iota type	0,74	2,56E-02	4
Q7Z4Q2	HEATR3	HEAT repeat-containing protein 3	0,73	4,47E-02	4
Q9UID3	VPS51	Vacuolar protein sorting-associated protein 51 homolog	0,73	1,28E-02	4
Q96KG9	SCYL1	N-terminal kinase-like protein	0,73	4,37E-03	4
Q9P2J5	LARS	Leucine--tRNA ligase, cytoplasmic	0,73	3,78E-03	4
Q9Y5L0	TNPO3	Transportin-3	0,72	3,68E-03	4
Q01433	AMPD2	AMP deaminase 2	0,72	3,69E-03	4
P56192	MARS	Methionine--tRNA ligase, cytoplasmic	0,72	3,88E-03	4
P17858	PFKL	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, liver type	0,72	5,63E-03	4
Q86VP6	CAND1	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1	0,72	4,19E-03	4
Q14008	CKAP5	Cytoskeleton-associated protein 5	0,71	5,12E-03	4

Tabla 2 (continuación)

Código UniProt <sup>b</sup>	Nombre del gen	Nombre de la proteína <sup>b</sup>	Abundance ratio (Log <sub>2</sub> ) <sup>a</sup>	p-valor	N° de réplicas <sup>c</sup>
P41252	IARS	Isoleucine--tRNA ligase, cytoplasmic	0,7	5,09E-03	4
Q9BW27	NUP85	Nuclear pore complex protein Nup85	0,7	4,73E-03	4
Q9UBK8	MTRR	Methionine synthase reductase	0,7	5,18E-03	4
Q96BN8	OTULIN	Ubiquitin thioesterase otulin	0,7	3,54E-02	4
G3V198	NUP160	Nuclear pore complex protein Nup160 (Fragment)	0,7	5,70E-03	4
O14980	XPO1	Exportin-1	0,7	5,65E-03	4
P55060	CSE1L	Exportin-2	0,7	5,63E-03	4
Q8TEQ6	GEMIN5	Gem-associated protein 5	0,69	6,27E-03	4
Q9BTE3-2	MCMBP	Isoform 2 of Mini-chromosome maintenance complex-binding protein	0,69	5,43E-03	4
O94906	PRPF6	Pre-mRNA-processing factor 6	0,69	1,00E-02	4
P31350	RRM2	Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit M2	0,69	5,82E-03	4
Q00534	CDK6	Cyclin-dependent kinase 6	0,68	7,75E-03	4
P47897	QARS	Glutamine--tRNA ligase	0,68	6,65E-03	4
P26640	VARS	Valine--tRNA ligase	0,68	6,75E-03	4
Q8N6R0	METTL13	Methyltransferase-like protein 13	0,68	1,41E-02	4
Q9Y6M5	SLC30A1	Zinc transporter 1	0,68	3,89E-02	4
Q99460	PSMD1	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1	0,68	7,02E-03	4
P26639	TARS	Threonine--tRNA ligase, cytoplasmic	0,67	7,34E-03	4
Q9Y263	PLAA	Phospholipase A-2-activating protein	0,67	7,52E-03	4
E9PDF6	MYO1B	Unconventional myosin-Ib	0,67	1,23E-02	4
O15357	INPPL1	Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase 2	0,67	8,14E-03	4
P07996	THBS1	Thrombospondin-1	0,66	7,82E-03	4
O00410	IPO5	Importin-5	0,66	8,84E-03	4
O60518	RANBP6	Ran-binding protein 6	0,66	6,47E-03	4
Q9NSV4	DIAPH3	Protein diaphanous homolog 3	0,66	4,85E-02	4
P35573	AGL	Glycogen debranching enzyme	0,65	2,37E-02	4
Q9H2V7	SPNS1	Protein spinster homolog 1	0,65	4,76E-02	4
O95239	KIF4A	Chromosome-associated kinesin KIF4A	0,64	3,23E-02	4
O95573	ACSL3	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 3	0,64	1,05E-02	4
P48449	LSS	Lanosterol synthase	0,63	1,18E-02	4
Q9H5Q4	TFB2M	Dimethyladenosine transferase 2, mitochondrial	0,63	1,48E-02	4
Q9NW64	RBM22	Pre-mRNA-splicing factor RBM22	0,63	2,93E-02	4
C9J2Y9	POLR2B	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	0,63	1,53E-02	4
Q6NUM9	RETSAT	All-trans-retinol 13,14-reductase	0,63	2,54E-02	4
Q9BPX3	NCAPG	Condensin complex subunit 3	0,63	1,91E-02	4
Q96T76	MMS19	MMS19 nucleotide excision repair protein homolog	0,62	1,46E-02	4
Q9Y2L1	DIS3	Exosome complex exonuclease RRP44	0,62	1,39E-02	4
P40938	RFC3	Replication factor C subunit 3	0,62	1,26E-02	4
P29144	TPP2	Tripeptidyl-peptidase 2	0,62	1,46E-02	4
P33897	ABCD1	ATP-binding cassette sub-family D member 1	0,62	1,76E-02	4

Tabla 2 (continuación)

Código UniProt <sup>b</sup>	Nombre del gen	Nombre de la proteína <sup>b</sup>	Abundance ratio (Log2) <sup>a</sup>	p-valor	N° de réplicas <sup>c</sup>
Q9HAV4	XPO5	Exportin-5	0,62	2,35E-02	4
O00186	STXBP3	Syntaxin-binding protein 3	0,61	4,92E-02	4
Q9UJX3	ANAPC7	Anaphase-promoting complex subunit 7	0,61	2,41E-02	4
O00629	KPNA4	Importin subunit alpha-3	0,61	1,60E-02	4
P09601	HMOX1	Heme oxygenase 1	0,61	2,03E-02	4
Q9UKF6	CPSF3	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 3	0,6	2,19E-02	4
Q15021	NCAPD2	Condensin complex subunit 1	0,6	2,21E-02	4
Q9H9T3	ELP3	Elongator complex protein 3	0,6	4,10E-02	4
O75694	NUP155	Nuclear pore complex protein Nup155	0,6	1,63E-02	4
P00533	EGFR	Epidermal growth factor receptor	0,6	1,51E-02	4
Q92616	GCN1	eIF-2-alpha kinase activator GCN1	0,6	1,89E-02	4
Q9BT22	ALG1	Chitobiosyldiphosphodolichol beta-mannosyltransferase	0,6	2,28E-02	4
A0A1W2P NX8	UNC45A	Protein unc-45 homolog A	0,59	2,10E-02	4
Q9Y678	COPG1	Coatomer subunit gamma-1	0,59	2,05E-02	4
Q14527	HLTF	Helicase-like transcription factor	0,59	1,90E-02	4
Q6P996	PDXDC1	Pyridoxal-dependent decarboxylase domain-containing protein 1	0,58	2,79E-02	4
P53350	PLK1	Serine/threonine-protein kinase PLK1	0,58	4,38E-02	4
Q12965	MYO1E	Unconventional myosin-1e	0,58	2,22E-02	4
Q9Y4X5	ARIH1	E3 ubiquitin-protein ligase ARIH1	0,58	2,17E-02	4
Q9UKN8	GTF3C4	General transcription factor 3C polypeptide 4	0,58	2,57E-02	4
O60610	DIAPH1	Protein diaphanous homolog 1	0,58	2,52E-02	4
Q93009	USP7	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7	0,58	2,24E-02	4
P17655	CAPN2	Calpain-2 catalytic subunit	0,58	2,38E-02	4
Q96QK1	VPS35	Vacuolar protein sorting-associated protein 35	0,58	2,38E-02	4
Q9Y679	AUP1	Ancient ubiquitous protein 1	0,57	2,79E-02	4
P13639	EEF2	Elongation factor 2	0,57	2,54E-02	4
P63010	AP2B1	AP-2 complex subunit beta	0,57	2,40E-02	4
P10155	TROVE2	60 kDa SS-A/Ro ribonucleoprotein	0,57	2,30E-02	4
P42224	STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta	0,57	2,54E-02	4
P35221	CTNNA1	Catenin alpha-1	0,56	2,67E-02	4
Q9BXJ9	NAA15	N-alpha-acetyltransferase 15, NatA auxiliary subunit	0,57	2,44E-02	4
Q8TEX9	IPO4	Importin-4	0,56	2,82E-02	4
O14617	AP3D1	AP-3 complex subunit delta-1	0,56	2,20E-02	4
Q9H7B4	SMYD3	Histone-lysine N-methyltransferase SMYD3	0,56	2,96E-02	4
O94925-3	GLS	Isoform 3 of Glutaminase kidney isoform, mitochondrial	0,55	2,78E-02	4
P42285	SKIV2L2	Superkiller viralicidic activity 2-like 2	0,55	3,40E-02	4
Q99797	MIPEP	Mitochondrial intermediate peptidase	0,55	3,53E-02	4
Q8IX11	RHOT2	Mitochondrial Rho GTPase 2	0,55	3,17E-02	4
M0R2B7	POLD1	DNA polymerase	0,55	3,63E-02	4
P61221	ABCE1	ATP-binding cassette sub-family E member 1	0,55	3,12E-02	4

Tabla 2 (continuación)

Código UniProt <sup>b</sup>	Nombre del gen	Nombre de la proteína <sup>b</sup>	Abundance ratio (Log2) <sup>a</sup>	p-valor	N° de réplicas <sup>c</sup>
Q8TC12	RDH11	Retinol dehydrogenase 11	0,55	3,53E-02	4
P30153	PPP2R1A	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform	0,54	3,32E-02	4
Q10567	AP1B1	AP-1 complex subunit beta-1	0,54	4,28E-02	4
Q01813	PFKP	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, platelet type	0,54	3,41E-02	4
Q9UQ13	SHOC2	Leucine-rich repeat protein SHOC-2	0,54	3,51E-02	4
Q13144	EIF2B5	Translation initiation factor eIF-2B subunit epsilon	0,54	3,23E-02	4
E7ETB3	DNPEP	Aspartyl aminopeptidase	0,54	2,99E-02	4
P42704	LRPPRC	Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial	0,54	3,56E-02	4
Q13617	CUL2	Cullin-2	0,54	4,27E-02	4
G5EA31	SEC24C	Protein transport protein Sec24C	0,53	4,07E-02	4
O43592	XPOT	Exportin-T	0,53	4,67E-02	4
P26232	CTNNA2	Catenin alpha-2	0,53	3,65E-02	4
P48506	GCLC	Glutamate--cysteine ligase catalytic subunit	0,53	4,02E-02	4
O60488	ACSL4	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 4	0,53	3,03E-02	4
Q96D46	NMD3	60S ribosomal export protein NMD3	0,53	4,10E-02	4
O60684	KPNA6	Importin subunit alpha-7	0,52	4,13E-02	4
P40939	HADHA	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	0,52	4,05E-02	4
Q13098	GPS1	COP9 signalosome complex subunit 1	0,52	4,12E-02	4
Q8WUM4	PDCD6IP	Programmed cell death 6-interacting protein	0,52	4,14E-02	4
A0A087W VM4	MTHFD1L	Monofunctional C1-tetrahydrofolate synthase, mitochondrial	0,52	4,44E-02	4
O43175	PHGDH	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	0,52	4,16E-02	4
Q13618	CUL3	Cullin-3	0,52	4,36E-02	4
P22059	OSBP	Oxysterol-binding protein 1	0,52	3,20E-02	4
Q92598	HSPH1	Heat shock protein 105 kDa	0,52	4,29E-02	4
O95782	AP2A1	AP-2 complex subunit alpha-1	0,52	4,68E-02	4
P53618	COPB1	Coatomer subunit beta	0,52	4,38E-02	4
Q9NZB2	FAM120A	Constitutive coactivator of PPAR-gamma-like protein 1	0,52	4,13E-02	4
Q8IXB1	DNAJC10	DnaJ homolog subfamily C member 10	0,52	4,96E-02	4
O00116	AGPS	Alkyldihydroxyacetonephosphate synthase, peroxisomal	0,51	4,81E-02	4
P52306	RAP1GDS 1	Rap1 GTPase-GDP dissociation stimulator 1	0,51	3,80E-02	4
Q14166	TTL12	Tubulin--tyrosine ligase-like protein 12	0,5	4,97E-02	4
Q29RF7	PDS5A	Sister chromatid cohesion protein PDS5 homolog A	0,5	4,75E-02	4
Q9Y6K9	IKBKG	NF-kappa-B essential modulator	0,5	4,86E-02	4
A0A1B0GT J7	ADSL	Adenylosuccinate lyase	0,5	4,84E-02	4
<b>Proteínas <i>down</i>-reguladas en CE HeLa estimuladas con Curdlan</b>					
Código UniProt <sup>b</sup>	Nombre del gen	Nombre de la proteína <sup>b</sup>	Abundance ratio (Log2) <sup>a</sup>	p-valor	N° de réplicas <sup>c</sup>
Q96G23	CERS2	Ceramide synthase 2	-0,43	4,89E-02	4

Tabla 2 (continuación)

Código UniProt <sup>b</sup>	Nombre del gen	Nombre de la proteína <sup>b</sup>	Abundance ratio (Log2) <sup>a</sup>	p-valor	N° de réplicas <sup>c</sup>
P62857	RPS28	40S ribosomal protein S28	-0,44	4,33E-02	4
P62805	HIST1H4A P	Histone H4	-0,44	4,30E-02	4
P61513	RPL37A	60S ribosomal protein L37a	-0,44	4,69E-02	4
Q9P016	THYN1	Thymocyte nuclear protein 1	-0,44	4,72E-02	4
Q53EL6	PDCD4	Programmed cell death protein 4	-0,45	3,90E-02	4
Q9BRK5	SDF4	45 kDa calcium-binding protein	-0,45	4,51E-02	4
P62316	SNRPD2	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2	-0,45	3,61E-02	4
Q9UKD2	MRTO4	mRNA turnover protein 4 homolog	-0,46	3,60E-02	4
Q8WW12	PCNP	PEST proteolytic signal-containing nuclear protein	-0,46	3,34E-02	4
O43290	SART1	U4/U6.U5 tri-snRNP-associated protein 1	-0,47	3,75E-02	4
Q13242	SRSF9	Serine/arginine-rich splicing factor 9	-0,47	3,84E-02	4
Q15363	TMED2	Transmembrane emp24 domain-containing protein 2	-0,47	3,88E-02	4
P30508	HLA-C	HLA class I histocompatibility antigen, Cw-12 alpha chain	-0,47	3,74E-02	4
P61769	B2M	Beta-2-microglobulin	-0,48	3,41E-02	4
P46087	NOP2	Probable 28S rRNA (cytosine(4447)-C(5))-methyltransferase	-0,48	3,10E-02	4
Q13428	TCOF1	Treacle protein	-0,48	2,98E-02	4
P07093	SERPINE2	Glia-derived nexin	-0,48	3,26E-02	4
O76021	RSL1D1	Ribosomal L1 domain-containing protein 1	-0,49	3,07E-02	4
P51991	HNRNPA3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	-0,49	2,88E-02	4
P42677	RPS27	40S ribosomal protein S27	-0,49	2,79E-02	4
Q13610	PWP1	Periodic tryptophan protein 1 homolog	-0,49	2,81E-02	4
Q9UQN3	CHMP2B	Charged multivesicular body protein 2b	-0,49	3,89E-02	4
P57105	SYNJ2BP	Synaptojanin-2-binding protein	-0,5	3,84E-02	4
P60866	RPS20	40S ribosomal protein S20	-0,5	2,27E-02	4
Q9Y3U8	RPL36	60S ribosomal protein L36	-0,5	2,24E-02	4
O43598	DNPH1	2'-deoxynucleoside 5'-phosphate N-hydrolase 1	-0,5	2,62E-02	4
P05783	KRT18	Keratin, type I cytoskeletal 18	-0,51	2,08E-02	4
Q9NRX2	MRPL17	39S ribosomal protein L17, mitochondrial	-0,51	2,39E-02	4
Q96IZ0	PAWR	PRKC apoptosis WT1 regulator protein	-0,51	2,93E-02	4
P05787	KRT8	Keratin, type II cytoskeletal 8	-0,52	1,84E-02	4
Q69YL0	NCBP2-AS2	Uncharacterized protein NCBP2-AS2	-0,53	4,81E-02	4
M0QXH4	HAS1	Hyaluronan synthase 1	-0,53	1,77E-02	4
P51572	BCAP31	B-cell receptor-associated protein 31	-0,53	1,76E-02	4
P11137-4	MAP2	Isoform 4 of Microtubule-associated protein 2	-0,54	4,91E-02	4
P06748	NPM1	Nucleophosmin	-0,55	1,34E-02	4
Q15059	BRD3	Bromodomain-containing protein 3	-0,55	3,56E-02	4
Q99848	EBNA1BP2	Probable rRNA-processing protein EBP2	-0,56	1,08E-02	4
P19823	ITIH2	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	-0,56	1,43E-02	4
C9JNV3	LSM8	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSM8 (Fragment)	-0,58	4,31E-02	4

Tabla 2 (continuación)

Código UniProt <sup>b</sup>	Nombre del gen	Nombre de la proteína <sup>b</sup>	Abundance ratio (Log2) <sup>a</sup>	p-valor	N° de réplicas <sup>c</sup>
Q14011	CIRBP	Cold-inducible RNA-binding protein	-0,58	3,71E-02	4
D6RD17	JCHAIN	Immunoglobulin J chain (Fragment)	-0,59	1,21E-02	4
P01024	KRT1	Keratin, type II cytoskeletal 1	-0,59	2,56E-02	4
P04264	C3	Complement C3	-0,59	7,73E-03	4
Q16775	HAGH	Hydroxyacylglutathione hydrolase, mitochondrial	-0,59	9,14E-03	4
H7BYY1	TPM1	Tropomyosin 1 (Alpha), isoform CRA_m	-0,6	9,28E-03	4
M0QZ21	AP2S1	AP complex subunit sigma	-0,61	2,84E-02	4
Q9H6F5	CCDC86	Coiled-coil domain-containing protein 86	-0,61	1,14E-02	4
A0A0B4J231	IGLL5	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5	-0,62	6,30E-03	4
P55081	MFAP1	Microfibrillar-associated protein 1	-0,64	2,41E-02	4
P42766	RPL35	60S ribosomal protein L35	-0,64	3,75E-03	4
Q8NC54	KCT2	Keratinocyte-associated transmembrane protein 2	-0,64	2,57E-02	4
Q13287	NMI	N-myc-interactor	-0,66	1,97E-02	4
Q8NBJ4	GOLM1	Golgi membrane protein 1	-0,66	7,09E-03	4
Q86SX6	GLRX5	Glutaredoxin-related protein 5, mitochondrial	-0,67	4,17E-03	4
E5RGN3	ATOX1	Copper transport protein ATOX1	-0,68	1,36E-02	4
A0A087WUC6	SPCS2	Signal peptidase complex subunit 2	-0,68	1,65E-02	4
Q969G5	CAVIN3	Caveolae-associated protein 3	-0,69	2,72E-03	4
Q05655	PRKCD	Protein kinase C delta type	-0,71	2,87E-02	4
Q9BU61	NDUFAF3	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex assembly factor 3	-0,72	9,03E-03	4
Q9GZR2	REXO4	RNA exonuclease 4	-0,72	2,28E-02	4
P35527	KRT9	Keratin, type I cytoskeletal 9	-0,72	1,39E-03	4
Q8WXA9-2	SREK1	Isoform 2 of Splicing regulatory glutamine/lysine-rich protein 1	-0,72	3,82E-02	4
O75915	ARL6IP5	PRA1 family protein 3	-0,74	9,99E-04	4
P01034	CST3	Cystatin-C	-0,75	1,41E-02	4
P49207	RPL34	60S ribosomal protein L34	-0,76	6,58E-04	4
P08670	VIM	Vimentin	-0,77	6,59E-04	4
P18077	RPL35A	60S ribosomal protein L35a	-0,77	6,67E-04	4
P16402	HIST1H1D	Histone H1.3	-0,78	4,93E-03	4
J3QR07	YTHDC1	YTH domain-containing protein 1	-0,79	6,73E-03	4
P16403	HIST1H1C	Histone H1.2	-0,78	4,74E-04	4
Q6UXH1	CRELD2	Cysteine-rich with EGF-like domain protein 2	-0,79	6,73E-03	4
P35908	KRT2	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	-0,83	1,55E-04	4
P10412	HIST1H1E	Histone H1.4	-0,83	2,09E-04	4
P62306	SNRPF	Small nuclear ribonucleoprotein F	-0,84	2,46E-04	4
P13645	KRT10	Keratin, type I cytoskeletal 10	-0,85	1,75E-04	4
P13647	KRT5	Keratin, type II cytoskeletal 5	-0,86	2,74E-04	4
P16401	HIST1H1B	Histone H1.	-0,86	1,55E-04	4
O60783	MRPS14	28S ribosomal protein S14, mitochondrial	-0,89	2,18E-03	4
Q8IUE6	HIST2H2A B	Histone H2A type 2-B	-0,9	7,77E-03	4

**Tabla 2 (continuación)**

Código UniProt <sup>b</sup>	Nombre del gen	Nombre de la proteína <sup>b</sup>	Abundance ratio (Log2) <sup>a</sup>	p-valor	N° de réplicas <sup>c</sup>
P02533	KRT14	Keratin, type I cytoskeletal 14	-0,91	8,10E-04	4
Q9BYG3	NIFK	MKI67 FHA domain-interacting nucleolar phosphoprotein	-0,91	1,16E-03	4
P05089	ARG1	Arginase-1	-0,95	2,78E-03	3
P47914	RPL29	60S ribosomal protein L29	-1,01	7,34E-06	4
O15066	KIF3B	Kinesin-like protein KIF3B	-1,04	1,16E-04	4
Q9P2X0	DPM3	Dolichol-phosphate mannosyltransferase subunit 3	-1,04	1,95E-04	4
O43676	NDUFB3	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 3	-1,05	2,18E-04	4
H0YBC7	BNIP3L	BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3-like (Fragment)	-1,1	1,52E-03	4
Q92621	NUP205	Nuclear pore complex protein Nup205	-1,19	1,17E-03	4
Q96FQ6	S100A16	Protein S100-A16	-1,2	3,95E-06	4
P14209	CD99	CD99 antigen	-1,24	1,96E-04	4
Q9HAF1	MEAF6	Chromatin modification-related protein MEAF6	-1,29	4,50E-05	4
J3KPD3	RBM7	RNA binding motif protein 7, isoform CRA_c	-1,34	1,90E-04	4
Q92805	GOLGA1	Golgin subfamily A member 1	-1,45	8,82E-05	4
A0A0D9SE M4	SRSF4	Serine/arginine-rich-splicing factor 4 (Fragment)	-2,54	1,00E-17	4
Q6UWP8	SBSN	Suprabasin	-6,64	1,00E-17	4
Q8N1N4	KRT78	Keratin, type II cytoskeletal 78	-6,64	1,00E-17	4

<sup>a</sup>Las proteínas están ordenadas según el Log2 del *abundance ratio* dentro de cada categoría. <sup>b</sup>Código Uniprot y Nombre de proteína de acuerdo a la base de datos Uniprot. <sup>c</sup>Para este estudio se consideraron aquellas proteínas presentes en al menos 3 réplicas biológicas y con coeficiente de variación menor al 30%.

**Tabla 3. Vías Diferencialmente reguladas en Células HeLa en Interacción con *C. albicans***

Vías <i>up</i> -reguladas en CE HeLa en interacción con <i>C. albicans</i>					
Pathway name	Entities				
	Found	Total	Ratio	p-Value	FDR
Antiviral mechanism by IFN-stimulated genes	<u>8</u>	89	0.008	9.98E-7	5.12E-4
Cytosolic tRNA aminoacylation	<u>5</u>	24	0.002	2.16E-6	5.12E-4
NS1 Mediated Effects on Host Pathways	<u>6</u>	46	0.004	2.94E-6	5.12E-4
ISG15 antiviral mechanism	<u>7</u>	80	0.007	5.81E-6	7.55E-4
Influenza Infection	<u>9</u>	171	0.015	1.55E-5	2.00E-3
Transport of Ribonucleoproteins into the Host Nucleus	<u>5</u>	40	0.003	2.50E-5	2.01E-3
Interactions of Rev with host cellular proteins	<u>5</u>	42	0.004	3.15E-5	2.01E-3
tRNA Aminoacylation	<u>5</u>	42	0.004	3.15E-5	2.01E-3
Response to elevated platelet cytosolic Ca <sup>2+</sup>	<u>7</u>	133	0.012	1.42E-4	8.00E-3
tRNA processing in the nucleus	<u>5</u>	62	0.005	1.93E-4	9.16E-3
RHO GTPase Effectors	<u>10</u>	295	0.026	2.01E-4	9.16E-3
Host Interactions of HIV factors	<u>7</u>	144	0.013	2.30E-4	1.00E-2
Nuclear import of Rev protein	<u>4</u>	39	0.003	3.5E-4	1.20E-2
Nuclear Pore Complex (NPC) Disassembly	<u>4</u>	40	0.003	3.90E-4	1.20E-2
Rev-mediated nuclear export of HIV RNA	<u>4</u>	40	0.003	3.90E-4	1.20E-2
tRNA processing	<u>6</u>	113	0.01	4.12E-4	1.20E-2
NEP/NS2 Interacts with the Cellular Export Machinery	<u>4</u>	42	0.004	4.68E-4	1.20E-2
EML4 and NUDC in mitotic spindle formation	<u>6</u>	117	0.01	4.94E-4	1.20E-2
Cell-extracellular matrix interactions	<u>3</u>	18	0.002	5,05E-04	1.20E-2
Export of Viral Ribonucleoproteins from Nucleus	<u>4</u>	43	0.004	5.11E-4	1.20E-2
Selenoamino acid metabolism	<u>6</u>	118	0.01	5.16E-4	1.20E-2
Inhibition of nitric oxide production	<u>2</u>	4	3.51E-4	5.50E-4	1.20E-2
Vpr-mediated nuclear import of PICs	<u>4</u>	44	0.004	5.57E-4	1.20E-2
Interactions of Vpr with host cellular proteins	<u>4</u>	47	0.004	7.11E-4	1.4E-2
Platelet degranulation	<u>6</u>	128	0.011	7.87E-4	1.6E-2
Mitotic Anaphase	<u>8</u>	237	0.021	8.94E-4	1.65E-2
Mitotic Metaphase and Anaphase	<u>8</u>	238	0.021	9.19E-4	1.65E-2
Amplification of signal from the kinetochores	<u>5</u>	94	0.008	1.23E-3	2.02E-2
Amplification of signal from unattached kinetochores via a MAD2 inhibitory signal	<u>5</u>	94	0.008	1.23E-3	2.02E-2
RHO GTPases Activate Formins	<u>6</u>	141	0.012	1.26E-3	2.02E-2

**Tabla 3 (continuación)**

<b>Pathway name</b>	<b>Found</b>	<b>Total</b>	<b>Ratio</b>	<b>p-Value</b>	<b>FDR</b>
Nuclear Envelope Breakdown	<u>4</u>	58	0.005	1.52E-3	2.43E-2
Mitotic Prometaphase	<u>7</u>	203	0.018	1.67E-3	2.48E-2
M Phase	<u>10</u>	393	0.034	1.75E-3	2.48E-2
Postmitotic nuclear pore complex (NPC) reformation	<u>3</u>	28	0.002	1.77E-3	2.48E-2
Cell Cycle Checkpoints	<u>8</u>	275	0.024	2.27E-3	3.18E-2
Mitotic Spindle Checkpoint	<u>5</u>	111	0.01	2.53E-3	3.49E-2
NR1H2 & NR1H3 regulate gene expression linked to lipogenesis	<u>2</u>	9	0.001	2.69E-3	3.49E-2
Interferon Signaling	<u>8</u>	290	0.025	3.14E-3	4.08E-2
Translocation of SLC2A4 (GLUT4) to the plasma membrane	<u>4</u>	72	0.006	3.29E-3	4.25E-2
Defective TPR may confer susceptibility towards thyroid papillary carcinoma (TPC)	<u>3</u>	36	0.003	3.58E-3	4.25E-2
Regulation of Glucokinase by Glucokinase Regulatory Protein	<u>3</u>	36	0.003	3.58E-3	4.25E-2
Signaling by Rho GTPases	<u>10</u>	437	0.038	3.74E-3	4.25E-2
Signaling by high-kinase activity BRAF mutants	<u>3</u>	37	0.003	3.87E-3	4.25E-2
Resolution of Sister Chromatid Cohesion	<u>5</u>	126	0.011	4.33E-3	4.47E-2
Transport of Mature mRNA derived from an Intron-Containing Transcript	<u>4</u>	78	0.007	4.37E-3	4.47E-2
Transport of the SLBP independent Mature mRNA	<u>3</u>	39	0.003	4.47E-3	4.47E-2
SUMOylation of SUMOylation proteins	<u>3</u>	39	0.003	4.47E-3	4.47E-2
Transport of the SLBP Dependant Mature mRNA	<u>3</u>	40	0.003	4.8E-3	4.8E-2
HIV Infection	<u>7</u>	248	0.022	5.01E-3	4.94E-2
MAP2K and MAPK activation	<u>3</u>	41	0.004	5.14E-3	4.94E-2
Cell Cycle, Mitotic	<u>11</u>	537	0.047	5.44E-3	4.94E-2
Signaling by RAF1 mutants	<u>3</u>	42	0.004	5.49E-3	4.94E-2
Dissolution of Fibrin Clot	<u>2</u>	13	0.001	5.49E-3	4.94E-2
Apoptosis induced DNA fragmentation	<u>2</u>	13	0.001	5.49E-3	4.94E-2
Separation of Sister Chromatids	<u>6</u>	191	0.017	5.6E-3	5.04E-2
SUMOylation of ubiquitylation proteins	<u>3</u>	43	0.004	5.85E-3	5.11E-2
Transport of Mature Transcript to Cytoplasm	<u>4</u>	87	0.008	6.39E-3	5.11E-2
Transport of Mature mRNA Derived from an Intronless Transcript	<u>3</u>	46	0.004	7.04E-3	5.63E-2
Platelet activation, signaling and aggregation	<u>7</u>	265	0.023	7.11E-3	5.69E-2
Transport of Mature mRNAs Derived from Intronless Transcripts	<u>3</u>	47	0.004	7.46E-3	5.85E-2
Signaling downstream of RAS mutants	<u>3</u>	47	0.004	7.46E-3	5.85E-2

**Tabla 3 (continuación)**

<b>Pathway name</b>	<b>Found</b>	<b>Total</b>	<b>Ratio</b>	<b>p-Value</b>	<b>FDR</b>
Signaling by moderate kinase activity BRAF mutants	<u>3</u>	47	0.004	7.46E-3	5.85E-2
Paradoxical activation of RAF signaling by kinase inactive BRAF	<u>3</u>	47	0.004	7.46E-3	5.85E-2
Signaling by RAS mutants	<u>3</u>	47	0.004	7.46E-3	5.85E-2
Defective ALG1 causes ALG1-CDG (CDG-1k)	<u>1</u>	1	0	8.36E-3	5.85E-2
SUMOylation of DNA replication proteins	<u>3</u>	50	0.004	8.82E-3	6.18E-2
SUMOylation of RNA binding proteins	<u>3</u>	51	0.004	9.31E-3	6.52E-2
Influenza Viral RNA Transcription and Replication	<u>5</u>	152	0.013	9.34E-3	6.54E-2
Viral Messenger RNA Synthesis	<u>3</u>	52	0.005	9.81E-3	6.87E-2
Cell Cycle	<u>12</u>	670	0.059	1.04E-2	7.28E-2
snRNP Assembly	<u>3</u>	57	0.005	1.25E-2	8.23E-2
Metabolism of non-coding RNA	<u>3</u>	57	0.005	1.25E-2	8.23E-2
HIV Life Cycle	<u>5</u>	165	0.014	1.29E-2	8.23E-2
RHO GTPases activate PAKs	<u>2</u>	21	0.002	1.37E-2	8.23E-2
Gene Silencing by RNA	<u>4</u>	110	0.01	1.41E-2	8.47E-2
SUMOylation of chromatin organization proteins	<u>3</u>	62	0.005	1.57E-2	9.4E-2
Suppression of phagosomal maturation	<u>2</u>	23	0.002	1.63E-2	9.76E-2
Biosynthesis of electrophilic $\omega$ -3 PUFA oxo-derivatives	<u>1</u>	2	0	1.66E-2	9.99E-2
Mitotic Prophase	<u>4</u>	119	0.01	1.83E-2	1.1E-1
Signaling by BRAF and RAF fusions	<u>3</u>	66	0.006	1.84E-2	1.11E-1
Cell-Cell communication	<u>4</u>	130	0.011	2.43E-2	1.25E-1
Pyrimidine biosynthesis	<u>1</u>	3	0	2.49E-2	1.25E-1
Mitochondrial transcription initiation	<u>1</u>	3	0	2.49E-2	1.25E-1
Intracellular metabolism of fatty acids regulates insulin secretion	<u>1</u>	3	0	2.49E-2	1.25E-1
EPHA-mediated growth cone collapse	<u>2</u>	29	0.003	2.5E-2	1.25E-1
Diseases of programmed cell death	<u>2</u>	29	0.003	2.5E-2	1.25E-1
Regulation of HSF1-mediated heat shock response	<u>3</u>	75	0.007	2.57E-2	1.28E-1
G2/M Transition	<u>5</u>	198	0.017	2.6E-2	1.3E-1
Mitotic G2-G2/M phases	<u>5</u>	200	0.017	2.7E-2	1.35E-1
Nuclear Envelope (NE) Reassembly	<u>3</u>	78	0.007	2.84E-2	1.42E-1
Glycolysis	<u>3</u>	78	0.007	2.84E-2	1.42E-1
RHO GTPases activate IQGAPs	<u>2</u>	32	0.003	3,00E-02	1.49E-1
Intra-Golgi and retrograde Golgi-to-ER traffic	<u>5</u>	206	0.018	3.01E-2	1.49E-1

**Tabla 3 (continuación)**

<b>Pathway name</b>	<b>Found</b>	<b>Total</b>	<b>Ratio</b>	<b>p-Value</b>	<b>FDR</b>
Transcriptional regulation by small RNAs	<u>3</u>	80	0.007	3.02E-2	1.49E-1
Centrosome maturation	<u>3</u>	81	0.007	3.12E-2	1.49E-1
Recruitment of mitotic centrosome proteins and complexes	<u>3</u>	81	0.007	3.12E-2	1.49E-1
SUMOylation of DNA damage response and repair proteins	<u>3</u>	81	0.007	3.12E-2	1.49E-1
Transcription from mitochondrial promoters	<u>1</u>	4	0	3.3E-2	1.49E-1
Biosynthesis of DPAn-3 SPMs	<u>1</u>	4	0	3.3E-2	1.49E-1
Biosynthesis of DPA-derived SPMs	<u>1</u>	4	0	3.3E-2	1.49E-1
Oncogenic MAPK signaling	<u>3</u>	84	0.007	3.42E-2	1.49E-1
RHO GTPases Activate WASPs and WAVES	<u>2</u>	36	0.003	3.72E-2	1.49E-1
Leishmania phagocytosis	<u>4</u>	149	0.013	3.73E-2	1.49E-1
FCGR3A-mediated phagocytosis	<u>4</u>	149	0.013	3.73E-2	1.49E-1
Parasite infection	<u>4</u>	149	0.013	3.73E-2	1.49E-1
Translation	<u>6</u>	294	0.026	3.78E-2	1.5E-1
Regulation of actin dynamics for phagocytic cup formation	<u>4</u>	150	0.013	3.8E-2	1.5E-1
Activation of ATR in response to replication stress	<u>2</u>	37	0.003	3.91E-2	1.5E-1
Fatty acyl-CoA biosynthesis	<u>2</u>	37	0.003	3.91E-2	1.5E-1
Metabolism of amino acids and derivatives	<u>7</u>	376	0.033	3.92E-2	1.5E-1
Late Phase of HIV Life Cycle	<u>4</u>	152	0.013	3.96E-2	1.5E-1
Membrane Trafficking	<u>10</u>	635	0.056	4.07E-2	1.5E-1
NR1H2 & NR1H3 regulate gene expression linked to gluconeogenesis	<u>1</u>	5	0	4.11E-2	1.5E-1
NR1H2 & NR1H3 regulate gene expression to limit cholesterol uptake	<u>1</u>	5	0	4.11E-2	1.5E-1
NR1H2 & NR1H3 regulate gene expression linked to triglyceride lipolysis in adipose	<u>1</u>	5	0	4.11E-2	1.5E-1
Defective RIPK1-mediated regulated necrosis	<u>1</u>	5	0	4.11E-2	1.5E-1
tRNA processing in the mitochondrion	<u>1</u>	5	0	4.11E-2	1.5E-1
MET interacts with TNS proteins	<u>1</u>	5	0	4.11E-2	1.5E-1
Disinhibition of SNARE formation	<u>1</u>	5	0	4.11E-2	1.5E-1
EPH-Ephrin signaling	<u>3</u>	92	0.008	4.28E-2	1.5E-1
Cell junction organization	<u>3</u>	92	0.008	4.28E-2	1.5E-1
Response of Mtb to phagocytosis	<u>2</u>	39	0.003	4.29E-2	1.5E-1
Recruitment of NuMA to mitotic centrosomes	<u>3</u>	95	0.008	4.63E-2	1.5E-1
Cellular response to heat stress	<u>3</u>	95	0.008	4.63E-2	1.5E-1

Tabla 3 (continuación)

<b>Pathway name</b>	<b>Found</b>	<b>Total</b>	<b>Ratio</b>	<b>p-Value</b>	<b>FDR</b>
Neutrophil degranulation	<u>8</u>	480	0.042	4.9E-2	1.5E-1
Assembly of the ORC complex at the origin of replication	<u>1</u>	6	0.001	4.91E-2	1.5E-1
vRNP Assembly	<u>1</u>	6	0.001	4.91E-2	1.5E-1
Synthesis of 15-eicosatetraenoic acid derivatives	<u>1</u>	6	0.001	4.91E-2	1.5E-1
Biosynthesis of EPA-derived SPMs	<u>1</u>	6	0.001	4.91E-2	1.5E-1
<b>Vías down-reguladas en CE HeLa en interacción con <i>C. albicans</i></b>					
	<b>Entities</b>				
<b>Pathway name</b>	<b>Found</b>	<b>Total</b>	<b>Ratio</b>	<b>p-Value</b>	<b>FDR</b>
Peptide chain elongation	<u>13</u>	90	0.008	2.07E-11	1.91E-9
Eukaryotic Translation Termination	<u>13</u>	94	0.008	3.51E-11	1.91E-9
Selenocysteine synthesis	<u>13</u>	94	0.008	3.51E-11	1.91E-9
Nonsense-Mediated Decay (NMD)	<u>14</u>	117	0.01	3.92E-11	1.91E-9
Nonsense Mediated Decay (NMD) enhanced by the Exon Junction Complex (EJC)	<u>14</u>	117	0.01	3.92E-11	1.91E-9
Eukaryotic Translation Elongation	<u>13</u>	95	0.008	4.00E-11	1.91E-9
Nonsense Mediated Decay (NMD) independent of the Exon Junction Complex (EJC)	<u>13</u>	96	0.008	4.54E-11	1.91E-9
Viral mRNA Translation	<u>13</u>	101	0.009	8.40E-11	2.75E-9
Formation of a pool of free 40S subunits	<u>13</u>	102	0.009	9.47E-11	2.75E-9
Response of EIF2AK4 (GCN2) to amino acid deficiency	<u>13</u>	102	0.009	9.47E-11	2.75E-9
L13a-mediated translational silencing of Ceruloplasmin expression	<u>13</u>	112	0.01	2.92E-10	6.83E-9
rRNA processing in the nucleus and cytosol	<u>16</u>	193	0.017	3.06E-10	6.83E-9
SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane	<u>13</u>	113	0.01	3.25E-10	6.83E-9
GTP hydrolysis and joining of the 60S ribosomal subunit	<u>13</u>	113	0.01	3.25E-10	6.83E-9
Selenoamino acid metabolism	<u>13</u>	118	0.01	5.46E-10	1.04E-8
rRNA processing	<u>16</u>	203	0.018	6.28E-10	1.07E-8
Eukaryotic Translation Initiation	<u>13</u>	120	0.01	6.68E-10	1.07E-8
Cap-dependent Translation Initiation	<u>13</u>	120	0.01	6.68E-10	1.07E-8
Influenza Viral RNA Transcription and Replication	<u>14</u>	152	0.013	1.03E-9	1.55E-8
Major pathway of rRNA processing in the nucleolus and cytosol	<u>15</u>	183	0.016	1.33E-9	1.86E-8
Metabolism of RNA	<u>27</u>	675	0.059	2.02E-9	2.82E-8
Influenza infection	<u>14</u>	172	0.015	4.95E-9	6.39E-8
Regulation of expression of SLITs and ROBOs	<u>14</u>	172	0.015	5.32E-9	6.39E-8

**Tabla 3 (continuación)**

<b>Pathway name</b>	<b>Found</b>	<b>Total</b>	<b>Ratio</b>	<b>p-Value</b>	<b>FDR</b>
Signaling by ROBO receptors	<u>14</u>	218	0.019	9.79E-8	1.17E-6
Translation	<u>15</u>	294	0.026	6.12E-7	6.73E-6
Formation of the ternary complex, and subsequently, the 43S complex	<u>7</u>	52	0.005	1.61E-6	1.77E-5
Translation initiation complex formation	<u>7</u>	59	0.005	3.67E-6	3.67E-5
Ribosomal scanning and start codon recognition	<u>7</u>	59	0.005	3.67E-6	3.67E-5
Activation of the mRNA upon binding of the cap-binding complex and eIFs, and subsequent binding to 43S	<u>7</u>	60	0.005	4.1E-6	4.1E-5
mRNA Splicing - Major Pathway	<u>10</u>	180	0.016	2.41E-5	2.41E-4
mRNA Splicing	<u>10</u>	188	0.016	3.47E-5	3.12E-4
Metabolism of amino acids and derivatives	<u>14</u>	376	0.033	4.78E-5	4.3E-4
Processing of Capped Intron-Containing Pre-mRNA	<u>11</u>	245	0.021	6.4E-5	5.76E-4
RNA Polymerase II Transcription Termination	<u>6</u>	66	0.006	8.05E-5	6.44E-4
mRNA 3'-end processing	<u>5</u>	57	0.005	3.78E-4	3.03E-3
Formation of the cornified envelope	<u>7</u>	129	0.011	4.79E-4	3.83E-3
Cellular responses to stress	<u>15</u>	565	0.049	9.6E-4	7.68E-3
Cellular responses to external stimuli	<u>15</u>	579	0.051	1.22E-3	8.57E-3
Transport of Mature mRNA derived from an Intron-Containing Transcript	<u>5</u>	78	0.007	1.52E-3	1.07E-2
mRNA Splicing - Minor Pathway	<u>4</u>	52	0.005	2.38E-3	1.67E-2
Axon guidance	<u>14</u>	558	0.049	2.4E-3	1.68E-2
Transport of Mature Transcript to Cytoplasm	<u>5</u>	87	0.008	2.44E-3	1.71E-2
Nervous system development	<u>14</u>	584	0.051	3.61E-3	2.53E-2
Developmental Biology	<u>21</u>	1,11	0.097	6.28E-3	3.77E-2
Keratinization	<u>7</u>	217	0.019	8.56E-3	5.14E-2
Apoptosis induced DNA fragmentation	<u>2</u>	13	0.001	8.58E-3	5.15E-2
Formation of Senescence-Associated Heterochromatin Foci (SAHF)	<u>2</u>	16	0.001	1.27E-2	7.64E-2

**Tabla 4. Vías Diferencialmente reguladas en Células HeLa estimuladas con Curdlan**

Vías up-reguladas en CE HeLa estimuladas con Curdlan					
Pathway name	Entities				
	Found	Total	Ratio	p-Value	FDR
Cytosolic tRNA aminoacylation	<u>8</u>	24	0.002	1.14E-8	1.06E-5
tRNA Aminoacylation	<u>8</u>	42	0.004	7.76E-7	3.6E-4
Antiviral mechanism by IFN-stimulated genes	<u>9</u>	89	0.008	2.56E-5	7.87E-3
Host Interactions of HIV factors	<u>11</u>	144	0.013	4.21E-5	9.74E-3
ISG15 antiviral mechanism	<u>8</u>	80	0.007	7.79E-5	1.44E-2
NS1 Mediated Effects on Host Pathways	<u>6</u>	46	0.004	1.52E-4	2.34E-2
Nef Mediated CD8 Down-regulation	<u>3</u>	8	0.001	3.71E-4	4.57E-2
Glycolysis	<u>7</u>	78	0.007	4.17E-4	4.57E-2
Nef-mediates down modulation of cell surface receptors by recruiting them to clathrin adapters	<u>4</u>	22	0.002	5.86E-4	4.57E-2
Transport of Ribonucleoproteins into the Host Nucleus	<u>5</u>	40	0.003	6.58E-4	4.57E-2
Mitotic Spindle Checkpoint	<u>8</u>	111	0.01	6.88E-4	4.57E-2
Nef Mediated CD4 Down-regulation	<u>3</u>	10	0.001	7.07E-4	4.57E-2
RHO GTPases Activate Formins	<u>9</u>	141	0.012	7.6E-4	4.57E-2
Mitotic Prometaphase	<u>11</u>	203	0.018	7.81E-4	4.57E-2
Mitotic Anaphase	<u>12</u>	237	0.021	8.17E-4	4.57E-2
Interactions of Rev with host cellular proteins	<u>5</u>	42	0.004	8.18E-4	4.57E-2
Mitotic Metaphase and Anaphase	<u>12</u>	238	0.021	8.47E-4	4.57E-2
Cyclin A/B1/B2 associated events during G2/M transition	<u>4</u>	25	0.002	9.39E-4	4.62E-2
EML4 and NUDC in mitotic spindle formation	<u>8</u>	117	0.01	9.62E-4	4.62E-2
VLDLR internalisation and degradation	<u>3</u>	12	0.001	1.19E-3	4.73E-2
HIV Infection	<u>12</u>	248	0.022	1.2E-3	4.73E-2
Amplification of signal from unattached kinetochores via a MAD2 inhibitory signal	<u>7</u>	94	0.008	1.23E-3	4.73E-2
Amplification of signal from the kinetochores	<u>7</u>	94	0.008	1.23E-3	4.73E-2
Intracellular metabolism of fatty acids regulates insulin secretion	<u>2</u>	3	0	1.25E-3	4.73E-2
Postmitotic nuclear pore complex (NPC) reformation	<u>4</u>	28	0.002	1.42E-3	5,00E-02
WNT5A-dependent internalization of FZD2, FZD5 and ROR2	<u>3</u>	13	0.001	1.5E-3	5,00E-02
Resolution of Sister Chromatid Cohesion	<u>8</u>	126	0.011	1.53E-3	5,00E-02
Glucose metabolism	<u>7</u>	98	0.009	1.55E-3	5,00E-02
The role of Nef in HIV-1 replication and disease pathogenesis	<u>4</u>	29	0.003	1.61E-3	5,00E-02

Tabla 4 (continuación)

Pathway name	Found	Total	Ratio	p-Value	FDR
Separation of Sister Chromatids	<u>10</u>	191	0.017	1.73E-3	5.18E-2
Retrograde neurotrophin signalling	<u>3</u>	14	0.001	1.85E-3	5.35E-2
Inhibition of nitric oxide production	<u>2</u>	4	0	2.19E-3	6.13E-2
WNT5A-dependent internalization of FZD4	<u>3</u>	15	0.001	2.24E-3	6.28E-2
Influenza Infection	<u>9</u>	172	0.015	2.92E-3	7.32E-2
Metabolism of non-coding RNA	<u>5</u>	57	0.005	3.07E-3	7.32E-2
snRNP Assembly	<u>5</u>	57	0.005	3.07E-3	7.32E-2
M Phase	<u>15</u>	393	0.034	3.11E-3	7.32E-2
RAF activation	<u>4</u>	35	0.003	3.16E-3	7.32E-2
Trafficking of GluR2-containing AMPA receptors	<u>3</u>	17	0.001	3.18E-3	7.32E-2
Nuclear Envelope Breakdown	<u>5</u>	58	0.005	3.31E-3	7.61E-2
Selenoamino acid metabolism	<u>7</u>	118	0.01	4.31E-3	9.1E-2
LDL clearance	<u>3</u>	19	0.002	4.34E-3	9.1E-2
Mitotic Prophase	<u>7</u>	119	0.01	4.5E-3	9.1E-2
Nuclear import of Rev protein	<u>4</u>	39	0.003	4.63E-3	9.1E-2
Translation	<u>12</u>	294	0.026	4.73E-3	9.1E-2
Cell Cycle, Mitotic	<u>18</u>	537	0.047	4.85E-3	9.1E-2
Nuclear Pore Complex (NPC) Disassembly	<u>4</u>	40	0.003	5.06E-3	9.1E-2
Rev-mediated nuclear export of HIV RNA	<u>4</u>	40	0.003	5.06E-3	9.1E-2
NEP/NS2 Interacts with the Cellular Export Machinery	<u>4</u>	42	0.004	5.99E-3	1.08E-1
Activation of NIMA Kinases NEK9, NEK6, NEK7	<u>2</u>	7	0.001	6.49E-3	1.1E-1
PP2A-mediated dephosphorylation of key metabolic factors	<u>2</u>	7	0.001	6.49E-3	1.1E-1
Export of Viral Ribonucleoproteins from Nucleus	<u>4</u>	43	0.004	6.5E-3	1.1E-1
Vpr-mediated nuclear import of PICs	<u>4</u>	44	0.004	7.03E-3	1.2E-1
Transport of Mature mRNA Derived from an Intronless Transcript	<u>4</u>	46	0.004	8.18E-3	1.31E-1
Signaling by MRAS-complex mutants	<u>2</u>	8	0.001	8.38E-3	1.32E-1
Transport of Mature mRNAs Derived from Intronless Transcripts	<u>4</u>	47	0.004	8.8E-3	1.32E-1
Interactions of Vpr with host cellular proteins	<u>4</u>	47	0.004	8.8E-3	1.32E-1
Recycling pathway of L1	<u>4</u>	49	0.004	1.01E-2	1.52E-1
Nuclear Envelope (NE) Reassembly	<u>5</u>	78	0.007	1.11E-2	1.57E-1
Interferon Signaling	<u>11</u>	290	0.025	1.12E-2	1.57E-1
Metabolism of RNA	<u>20</u>	675	0.059	1.12E-2	1.57E-1

Tabla 4 (continuación)

Pathway name	Found	Total	Ratio	p-Value	FDR
EPH-ephrin mediated repulsion of cells	<u>4</u>	51	0.004	1.16E-2	1.62E-1
MASTL Facilitates Mitotic Progression	<u>2</u>	10	0.001	1.28E-2	1.79E-1
Condensation of Prometaphase Chromosomes	<u>2</u>	11	0.001	1.53E-2	2.02E-1
Free fatty acids regulate insulin secretion	<u>2</u>	11	0.001	1.53E-2	2.02E-1
Trafficking of AMPA receptors	<u>3</u>	31	0.003	1.63E-2	2.02E-1
Glutamate binding, activation of AMPA receptors and synaptic plasticity	<u>3</u>	31	0.003	1.63E-2	2.02E-1
Defective ALG1 causes ALG1-CDG (CDG-1k)	<u>1</u>	1	0	1.68E-2	2.02E-1
Defective SLC26A2 causes chondrodysplasias	<u>1</u>	1	0	1.68E-2	2.02E-1
Defective ABCD1 causes ALD	<u>1</u>	1	0	1.68E-2	2.02E-1
Transport of Mature Transcript to Cytoplasm	<u>5</u>	87	0.008	1.7E-2	2.04E-1
Regulation of glycolysis by fructose 2,6-bisphosphate metabolism	<u>2</u>	12	0.001	1.8E-2	2.09E-1
Plasma lipoprotein clearance	<u>3</u>	33	0.003	1.91E-2	2.09E-1
Cell Cycle Checkpoints	<u>10</u>	275	0.024	1.98E-2	2.09E-1
Mitotic Telophase/Cytokinesis	<u>2</u>	13	0.001	2.09E-2	2.09E-1
ERKs are inactivated	<u>2</u>	13	0.001	2.09E-2	2.09E-1
Inhibition of replication initiation of damaged DNA by RB1/E2F1	<u>2</u>	13	0.001	2.09E-2	2.09E-1
Apoptosis induced DNA fragmentation	<u>2</u>	13	0.001	2.09E-2	2.09E-1
tRNA processing in the nucleus	<u>4</u>	62	0.005	2.2E-2	2.16E-1
Defective TPR may confer susceptibility towards thyroid papillary carcinoma (TPC)	<u>3</u>	36	0.003	2.4E-2	2.16E-1
Regulation of Glucokinase by Glucokinase Regulatory Protein	<u>3</u>	36	0.003	2.4E-2	2.16E-1
Regulation of TP53 Degradation	<u>3</u>	36	0.003	2.4E-2	2.16E-1
AXIN missense mutants destabilize the destruction complex	<u>2</u>	14	0.001	2.4E-2	2.16E-1
APC truncation mutants have impaired AXIN binding	<u>2</u>	14	0.001	2.4E-2	2.16E-1
Truncations of AMER1 destabilize the destruction complex	<u>2</u>	14	0.001	2.4E-2	2.16E-1
Signaling by AMER1 mutants	<u>2</u>	14	0.001	2.4E-2	2.16E-1
Signaling by AXIN mutants	<u>2</u>	14	0.001	2.4E-2	2.16E-1
Signaling by APC mutants	<u>2</u>	14	0.001	2.4E-2	2.16E-1
Fatty acyl-CoA biosynthesis	<u>3</u>	37	0.003	2.57E-2	2.18E-1
Regulation of TP53 Expression and Degradation	<u>3</u>	37	0.003	2.57E-2	2.18E-1
Signaling by CTNNB1 phospho-site mutants	<u>2</u>	15	0.001	2.73E-2	2.18E-1
Signaling by GSK3beta mutants	<u>2</u>	15	0.001	2.73E-2	2.18E-1

Tabla 4 (continuación)

Pathway name	Found	Total	Ratio	p-Value	FDR
T41 mutants of beta-catenin aren't phosphorylated	<u>2</u>	15	0.001	2.73E-2	2.18E-1
S45 mutants of beta-catenin aren't phosphorylated	<u>2</u>	15	0.001	2.73E-2	2.18E-1
S37 mutants of beta-catenin aren't phosphorylated	<u>2</u>	15	0.001	2.73E-2	2.18E-1
S33 mutants of beta-catenin aren't phosphorylated	<u>2</u>	15	0.001	2.73E-2	2.18E-1
Interleukin-6 signaling	<u>2</u>	15	0.001	2.73E-2	2.18E-1
Transport of the SLBP independent Mature mRNA	<u>3</u>	39	0.003	2.94E-2	2.34E-1
SUMOylation of SUMOylation proteins	<u>3</u>	39	0.003	2.94E-2	2.34E-1
RHO GTPase Effectors	<u>10</u>	295	0.026	3.01E-2	2.34E-1
Transport of the SLBP Dependant Mature mRNA	<u>3</u>	40	0.003	3.13E-2	2.34E-1
Defective MTR causes methylmalonic aciduria and homocystinuria type cblG	<u>1</u>	2	0	3.34E-2	2.34E-1
Mitotic Metaphase/Anaphase Transition	<u>1</u>	2	0	3.34E-2	2.34E-1
Defective GCLC causes Hemolytic anemia due to gamma-glutamylcysteine synthetase deficiency (HAGGSD)	<u>1</u>	2	0	3.34E-2	2.34E-1
Defective MTRR causes methylmalonic aciduria and homocystinuria type cblE	<u>1</u>	2	0	3.34E-2	2.34E-1
Biosynthesis of electrophilic $\omega$ -3 PUFA oxo-derivatives	<u>1</u>	2	0	3.34E-2	2.34E-1
Beta-catenin phosphorylation cascade	<u>2</u>	17	0.001	3.43E-2	2.4E-1
KSRP (KHSRP) binds and destabilizes mRNA	<u>2</u>	17	0.001	3.43E-2	2.4E-1
Platelet sensitization by LDL	<u>2</u>	17	0.001	3.43E-2	2.4E-1
Cargo recognition for clathrin-mediated endocytosis	<u>5</u>	105	0.009	3.43E-2	2.4E-1
Cell Cycle	<u>18</u>	670	0.059	3.7E-2	2.59E-1
SUMOylation of ubiquitylation proteins	<u>3</u>	43	0.004	3.75E-2	2.63E-1
ERBB2 Regulates Cell Motility	<u>2</u>	18	0.002	3.8E-2	2.66E-1
Clathrin-mediated endocytosis	<u>6</u>	145	0.013	3.83E-2	2.68E-1
Integration of energy metabolism	<u>5</u>	109	0.01	3.93E-2	2.72E-1
Negative regulation of MAPK pathway	<u>3</u>	44	0.004	3.97E-2	2.72E-1
Regulation of HSF1-mediated heat shock response	<u>4</u>	75	0.007	3.98E-2	2.72E-1
tRNA processing	<u>5</u>	113	0.01	4.46E-2	2.72E-1
Transport of Mature mRNA derived from an Intron-Containing Transcript	<u>4</u>	78	0.007	4.48E-2	2.72E-1
Phosphorylation of the APC/C	<u>2</u>	20	0.002	4.59E-2	2.72E-1
Initiation of Nuclear Envelope (NE) Reformation	<u>2</u>	20	0.002	4.59E-2	2.72E-1
G1 Phase	<u>3</u>	47	0.004	4.67E-2	2.72E-1
Cyclin D associated events in G1	<u>3</u>	47	0.004	4.67E-2	2.72E-1

Tabla 4 (continuación)

Pathway name	Found	Total	Ratio	p-Value	FDR
Evasion of Oxidative Stress Induced Senescence Due to Defective p16INK4A binding to CDK4 and CDK6	<u>1</u>	3	0	4.96E-2	2.72E-1
SMAD4 MH2 Domain Mutants in Cancer	<u>1</u>	3	0	4.96E-2	2.72E-1
SMAD2/3 MH2 Domain Mutants in Cancer	<u>1</u>	3	0	4.96E-2	2.72E-1
IKBKB deficiency causes SCID	<u>1</u>	3	0	4.96E-2	2.72E-1
Evasion of Oncogene Induced Senescence Due to Defective p16INK4A binding to CDK4 and CDK6	<u>1</u>	3	0	4.96E-2	2.72E-1
Loss of Function of SMAD4 in Cancer	<u>1</u>	3	0	4.96E-2	2.72E-1
IKBKG deficiency causes anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency (EDA-ID) (via TLR)	<u>1</u>	3	0	4.96E-2	2.72E-1
Beta oxidation of palmitoyl-CoA to myristoyl-CoA	<u>1</u>	3	0	4.96E-2	2.72E-1
Beta oxidation of myristoyl-CoA to lauroyl-CoA	<u>1</u>	3	0	4.96E-2	2.72E-1
Plasmalogen biosynthesis	<u>1</u>	3	0	4.96E-2	2.72E-1
Evasion of Oncogene Induced Senescence Due to p16INK4A Defects	<u>1</u>	3	0	4.96E-2	2.72E-1
Evasion of Oxidative Stress Induced Senescence Due to p16INK4A Defects	<u>1</u>	3	0	4.96E-2	2.72E-1
Mitochondrial transcription initiation	<u>1</u>	3	0	4.96E-2	2.72E-1
<b>Vías down-reguladas en CE HeLa estimuladas con Curdlan</b>					
	<b>Entities</b>				
Pathway name	Found	Total	Ratio	p-Value	FDR
Peptide chain elongation	<u>9</u>	90	0.008	9.69E-8	1.23E-5
Eukaryotic Translation Termination	<u>9</u>	94	0.008	1.39E-7	1.23E-5
Selenocysteine synthesis	<u>9</u>	94	0.008	1.39E-7	1.23E-5
Eukaryotic Translation Elongation	<u>9</u>	95	0.008	1.52E-7	1.23E-5
Nonsense Mediated Decay (NMD) independent of the Exon Junction Complex (EJC)	<u>9</u>	96	0.008	1.66E-7	1.23E-5
Viral mRNA Translation	<u>9</u>	101	0.009	2.53E-7	1.26E-5
Formation of a pool of free 40S subunits	<u>9</u>	102	0.009	2.75E-7	1.26E-5
Response of EIF2AK4 (GCN2) to amino acid deficiency	<u>9</u>	102	0.009	2.75E-7	1.26E-5
Apoptotic execution phase	<u>7</u>	52	0.005	3.87E-7	1.59E-5
L13a-mediated translational silencing of Ceruloplasmin expression	<u>9</u>	112	0.01	5.95E-7	2,00E-05
SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane	<u>9</u>	113	0.01	6.4E-7	2,00E-05
GTP hydrolysis and joining of the 60S ribosomal subunit	<u>9</u>	113	0.01	6.4E-7	2,00E-05
Influenza Viral RNA Transcription and Replication	<u>10</u>	152	0.013	8.3E-7	2,00E-05
Nonsense-Mediated Decay (NMD)	<u>9</u>	117	0.01	8.51E-7	2,00E-05

Tabla 4 (continuación)

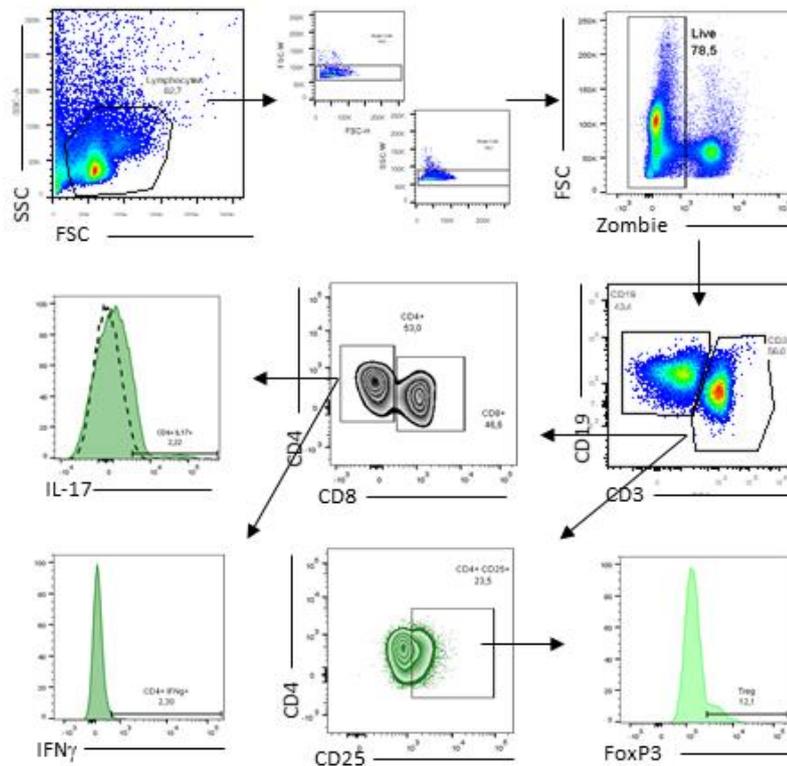
Pathway name	Found	Total	Ratio	p-Value	FDR
Nonsense Mediated Decay (NMD) enhanced by the Exon Junction Complex (EJC)	<u>9</u>	117	0.01	8.51E-7	2,00E-05
Selenoamino acid metabolism	<u>9</u>	118	0.01	9.12E-7	2,00E-05
rRNA processing in the nucleus and cytosol	<u>11</u>	193	0.017	9.18E-7	2,00E-05
Eukaryotic Translation Initiation	<u>9</u>	120	0.01	1.05E-6	2,00E-05
Cap-dependent Translation Initiation	<u>9</u>	120	0.01	1.05E-6	2,00E-05
rRNA processing	<u>11</u>	203	0.018	1.49E-6	2.69E-5
Formation of the cornified envelope	<u>9</u>	129	0.011	1.88E-6	3.2E-5
Influenza Infection	<u>10</u>	172	0.015	2.48E-6	4.22E-5
Major pathway of rRNA processing in the nucleolus and cytosol	<u>10</u>	183	0.016	4.27E-6	6.84E-5
Apoptosis induced DNA fragmentation	<u>4</u>	13	0.001	5.54E-6	8.3E-5
Formation of Senescence-Associated Heterochromatin Foci (SAHF)	<u>4</u>	16	0.001	1.25E-5	1.74E-4
Metabolism of RNA	<u>18</u>	675	0.059	1.61E-5	2.26E-4
Regulation of expression of SLITs and ROBOs	<u>9</u>	172	0.015	1.86E-5	2.41E-4
Translation	<u>11</u>	294	0.026	4.63E-5	6.03E-4
Cellular responses to stress	<u>15</u>	565	0.049	9.42E-5	1.13E-3
Keratinization	<u>9</u>	217	0.019	1.1E-4	1.32E-3
Signaling by ROBO receptors	<u>9</u>	218	0.019	1.14E-4	1.36E-3
Cellular responses to external stimuli	<u>15</u>	579	0.051	1.23E-4	1.36E-3
DNA Damage/Telomere Stress Induced Senescence	<u>5</u>	61	0.005	1.94E-4	2.14E-3
TFAP2A acts as a transcriptional repressor during retinoic acid induced cell differentiation	<u>2</u>	5	0	8.83E-4	9.5E-3
Apoptosis	<u>7</u>	180	0.016	9.5E-4	9.5E-3
Metabolism of amino acids and derivatives	<u>10</u>	376	0.033	1.48E-3	1.48E-2
Programmed Cell Death	<u>7</u>	198	0.017	1.63E-3	1.63E-2
Developmental Biology	<u>19</u>	1,11	0.097	2.61E-3	2.35E-2
Type I hemidesmosome assembly	<u>2</u>	11	0.001	4.14E-3	3.72E-2
Apoptotic cleavage of cellular proteins	<u>3</u>	38	0.003	4.41E-3	3.97E-2
Antigen Presentation: Folding, assembly and peptide loading of class I MHC	<u>4</u>	93	0.008	8.62E-3	7.76E-2
Formation of the ternary complex, and subsequently, the 43S complex	<u>3</u>	52	0.005	1.04E-2	8.3E-2
Metabolism of non-coding RNA	<u>3</u>	57	0.005	1.32E-2	1.02E-1
snRNP Assembly	<u>3</u>	57	0.005	1.32E-2	1.02E-1
Post-translational protein phosphorylation	<u>4</u>	107	0.009	1.38E-2	1.02E-1

Tabla 4 (continuación)

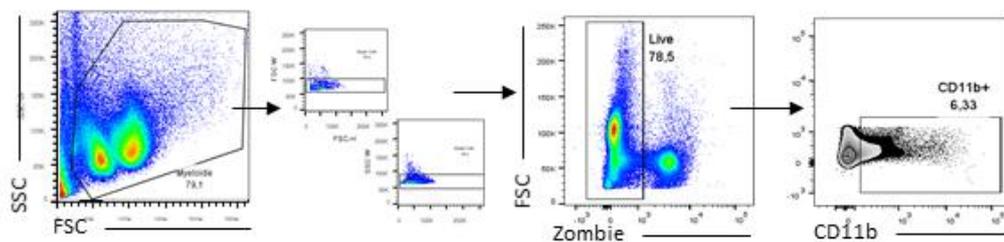
Pathway name	Found	Total	Ratio	p-Value	FDR
Cellular Senescence	<u>5</u>	166	0.015	1.44E-2	1.02E-1
Translation initiation complex formation	<u>3</u>	59	0.005	1.45E-2	1.02E-1
Ribosomal scanning and start codon recognition	<u>3</u>	59	0.005	1.45E-2	1.02E-1
Activation of the mRNA upon binding of the cap-binding complex and eIFs, and subsequent binding to 43S	<u>3</u>	60	0.005	1.52E-2	1.06E-1
Processing of Capped Intron-Containing Pre-mRNA	<u>6</u>	245	0.021	1.91E-2	1.34E-1
mRNA Splicing - Major Pathway	<u>5</u>	180	0.016	1.97E-2	1.38E-1
Regulation of Insulin-like Growth Factor (IGF) transport and uptake by Insulin-like Growth Factor Binding Proteins (IGFBPs)	<u>4</u>	124	0.011	2.23E-2	1.52E-1
mRNA Splicing	<u>5</u>	188	0.016	2.32E-2	1.52E-1
Defective DPM1 causes DPM1-CDG (CDG-1e)	<u>1</u>	3	0	2.54E-2	1.52E-1
Defective DPM3 causes DPM3-CDG (CDG-1o)	<u>1</u>	3	0	2.54E-2	1.52E-1
Defective DPM2 causes DPM2-CDG (CDG-1u)	<u>1</u>	3	0	2.54E-2	1.52E-1
Synthesis of dolichyl-phosphate mannose	<u>1</u>	3	0	2.54E-2	1.52E-1
Endosomal/Vacuolar pathway	<u>3</u>	79	0.007	3.09E-2	1.85E-1
Amyloid fiber formation	<u>3</u>	80	0.007	3.19E-2	1.91E-1
Late endosomal microautophagy	<u>2</u>	34	0.003	3.48E-2	2.09E-1
Transcriptional regulation by the AP-2 (TFAP2) family of transcription factors	<u>2</u>	37	0.003	4.05E-2	2.1E-1
Alternative complement activation	<u>1</u>	5	0	4.19E-2	2.1E-1
Infectious disease	<u>16</u>	1,182	0.103	4.38E-2	2.19E-1
Nuclear import of Rev protein	<u>2</u>	39	0.003	4.46E-2	2.23E-1

## **Anexo Capítulo III**

### A Poblaciones linfoides

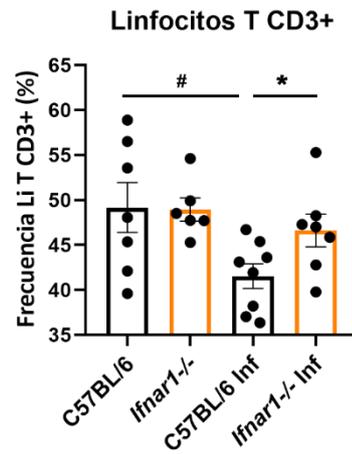


### B Células mieloides



**Figura 1. Estrategia de *Gate* utilizada para el análisis por citometría de flujo de poblaciones linfoides y mieloides en NL drenantes de vagina de animales C57BL/6 e *Ifnar1*<sup>-/-</sup> no infectados e infectados intravaginalmente con *C. albicans* SC5314 al día 4 pi.**

**A)** Estrategia utilizada para el análisis de poblaciones linfoides: linfocitos B (CD19+), linfocitos T (CD3+), linfocitos Treg (CD3+, CD4+, CD25+, FoxP3+), linfocitos T CD4+ (CD3+, CD4+), linfocitos T CD8+ (CD3+, CD8+), linfocitos T CD4+ productores de IL-17 (CD3+, CD4+, IL-17+), linfocitos T CD4+ productores de IFN $\gamma$  (CD3+, CD4+, IFN $\gamma$ +). **B)** Estrategia utilizada para el análisis de poblaciones mieloides: células CD11b+. SSC: *Side Scatter*. FSC: *Forward Scatter*.



**Figura 2. Frecuencia de linfocitos T CD3+ en NL drenantes de vagina de animales C57BL/6 e *Ifnar1*<sup>-/-</sup> no infectados e infectados con *C. albicans* al día 4 pi.** Los valores representan la media  $\pm$  ESM.  $n \geq 6$ . #  $p < 0,05$  para C57BL/6 No Infectado vs C57BL/6 Infectado. \*  $p < 0,05$  para C57BL/6 Infectado vs *Ifnar1*<sup>-/-</sup> Infectado

# **BIBLIOGRAFÍA**

1. Fidel PL. History and update on host defense against vaginal candidiasis. *Am J Reprod Immunol*. 2007;57(1):2–12.
2. Yano J, Noverr MC, Fidel PL. Vaginal heparan sulfate linked to neutrophil dysfunction in the acute inflammatory response associated with experimental vulvovaginal candidiasis. *MBio*. 2017;8(2):1–17.
3. Willems HME, Ahmed SS, Liu J, Xu Z, Peters BM. Vulvovaginal candidiasis: A current understanding and burning questions. *J Fungi*. 2020;6(1).
4. Achkar JM, Fries BC. Candida infections of the genitourinary tract. *Clin Microbiol Rev*. 2010;23(2):253–73.
5. Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(4):275–88.
6. Cassone A. Vulvovaginal Candida albicans infections: Pathogenesis, immunity and vaccine prospects. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol*. 2015;122(6):785–94.
7. Sobel JD, Faro S, Force RW, Foxman B, Ledger WJ, Nyirjesy PR, et al. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. *Am J Obstet Gynecol*. 1998 Feb;178(2):203–11.
8. Miró MS, Rodríguez E, Vigezzi C, Icely PA, García LN, Painetti N, et al. Contribution of TLR2 pathway in the pathogenesis of vulvovaginal candidiasis. *Pathog Dis*. 2017;75(7):1–10.
9. Fidel PL. History and new insights into host defense against vaginal candidiasis. *Trends Microbiol*. 2004 May;12(5):220–7.
10. Rosati D, Bruno M, Jaeger M, Ten Oever J, Netea MG. Recurrent vulvovaginal candidiasis: An immunological perspective. *Microorganisms*. 2020;8(2).
11. Sobel JD. Vulvovaginal candidosis. *Lancet*. 2007;369(9577):1961–71.
12. 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.
13. Gonçalves B, Ferreira C, Alves CT, Henriques M, Azeredo J, Silva S. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiology, microbiology and risk factors. *Crit Rev Microbiol*. 2016;42(6):905–27.
14. Denning DW, Kneale M, Sobel JD, Rautemaa-Richardson R. Global burden of recurrent vulvovaginal candidiasis: a systematic review. *Lancet Infect Dis*. 2018;18(11):e339–47.
15. Buscemi L, Arechavala A NR. Study of acute vulvovaginitis in sexually active adult women, with special reference to candidosis, in patients of the Francisco J. Muniz Infectious Diseases Hospital. *Rev Iberoam Micol*. 2004;21(4):177–81.
16. Arechavala AI, Bianchi MH, Robles AM, Santiso G NR. Identification and susceptibility against fluconazole and albaconazole of 100 yeasts' strains isolated from vaginal discharge. *Rev Iberoam Micol*. 2007;24(4):305–8.
17. Miró MS, Vigezzi C, Rodriguez E, Icely PA, Caeiro JP, Riera FO MD y SC. Receptores Innatos e IL-17 en la respuesta inmune frente a hongos patógenos humanos. *Rev Fac Cienc Med*. 2016;73(3):188–96.
18. Riera FO, Caeiro JP, Denning DW. Burden of serious fungal infections in Argentina. *J Fungi*. 2018;4(2):1–11.
19. Caeiro JP, Miró MS, Rodriguez E, Vargas L, Abiega C, Vigezzi C, Icely PA, Riera FO SC. Recurrent Vulvovaginal Candidiasis: clinical features, resistant patterns and response to treatment. In: 18th International Congress on Infectious Diseases. 2018.
20. Kennedy MA, Sobel JD. Vulvovaginal Candidiasis Caused by Non-albicans Candida Species: New Insights. *Curr Infect Dis Rep*. 2010 Nov 4;12(6):465–70.
21. Caeiro JP, Garzón MI. Controlling infectious disease outbreaks in low-income and middle-income countries. *Curr Treat Options Infect Dis*. 2018;10(1):55–64.
22. Parolin C, Marangoni A, Laghi L, Foschi C, Palomino RAÑ, Calonghi N, et al. Isolation of vaginal lactobacilli and characterization of anti-candida activity. *PLoS One*. 2015;10(6):1–

17

23. Jang SJ, Lee K, Kwon B, You HJ, Ko GP. Vaginal lactobacilli inhibit growth and hyphae formation of *Candida albicans*. *Sci Rep*. 2019;9(1):1–9.
24. Zhang X, Essmann M, Burt ET, Larsen B. Estrogen effects on *Candida albicans*: A potential virulence-regulating mechanism. *J Infect Dis*. 2000;181(4):1441–6.
25. Lourenço A, Pedro NA, Salazar SB, Mira NP. Effect of acetic acid and lactic acid at low pH in growth and azole resistance of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Front Microbiol*. 2019;10(JAN):1–11.
26. Ceccarani C, Foschi C, Parolin C, D'Antuono A, Gaspari V, Consolandi C, et al. Diversity of vaginal microbiome and metabolome during genital infections. *Sci Rep*. 2019;9(1):1–12.
27. Akimoto-Gunther L, De Bonfim-Mendonça PS, Takahachi G, Irie MMT, Miyamoto S, Consolaro MEL, et al. Highlights regarding host predisposing factors to recurrent vulvovaginal candidiasis: Chronic stress and reduced antioxidant capacity. *PLoS One*. 2016;11(7):1–14.
28. Hammad NM, El Badawy NE, Nasr AM, Ghramh HA, Al Kady LM. Mannose-binding lectin gene polymorphism and its association with susceptibility to recurrent vulvovaginal candidiasis. *Biomed Res Int*. 2018;2018.
29. Vermitsky JP, Self MJ, Chadwick SG, Trama JP, Adelson ME, Mordechai E, et al. Survey of vaginal-flora *Candida* species isolates from women of different age groups by use of species-specific PCR detection. *J Clin Microbiol*. 2008;46(4):1501–3.
30. Rosentul DC, Delsing CE, Jaeger M, Plantinga TS, Oosting M, Costantini I, et al. Gene polymorphisms in pattern recognition receptors and susceptibility to idiopathic recurrent vulvovaginal candidiasis. *Front Microbiol*. 2014;5(SEP):1–7.
31. Colombo R, Boccia S, Ricciardi W, Canino A. TLR2 polymorphism and susceptibility to vulvovaginal colonisation by *Candida* species. *J Obstet Gynaecol (Lahore)*. 2017;37(3):404–5.
32. Babula O, Lazdane G, Kroiča 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. *Clin Infect Dis*. 2005;40(9):1258–62.
33. 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. *Am J Obstet Gynecol*. 2009;200(3):303.e1-303.e6.
34. Jaeger M, Carvalho A, Cunha C, Plantinga TS, van de Veerdonk F, Puccetti M, et al. Association of a variable number tandem repeat in the NLRP3 gene in women with susceptibility to RVVC. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2016;35(5):797–801.
35. Kalia N, Singh J, Kaur M. Immunopathology of recurrent vulvovaginal infections: New aspects and research directions. *Front Immunol*. 2019;10(AUG):1–22.
36. Babula O, Lazdane G, Kroica J, Ledger WJ, Witkin SS. Relation between recurrent vulvovaginal candidiasis, vaginal concentrations of mannose-binding lectin, and a mannose-binding lectin gene polymorphism in latvian women. *Clin Infect Dis*. 2003;37(5):733–7.
37. Giraldo PC, Babula O, Gonçalves AKS, Linhares IM, Amaral RL, Ledger WJ, et al. Mannose-Binding Lectin Gene Polymorphism, Vulvovaginal Candidiasis, and Bacterial Vaginosis. *Obstet Gynecol*. 2007 May;109(5):1123–8.
38. Ferwerda B, Ferwerda G, Plantinga TS, Willment JA, van Spriel AB, Venselaar H, et al. Human Dectin-1 Deficiency and Mucocutaneous Fungal Infections. *N Engl J Med*. 2009;361(18):1760–7.
39. Glocker E-O, Hennigs A, Nabavi M, Schäffer AA, Woellner C, Salzer U, et al. A homozygous CARD9 mutation in a family with susceptibility to fungal infections. *N Engl J*

- Med. 2009 Oct 29;361(18):1727–35.
40. Kisand K, Bøe Wolff AS, Podkrajšek KT, Tserel L, Link M, Kisand K V., et al. Chronic mucocutaneous candidiasis in APECED or thymoma patients correlates with autoimmunity to Th17-associated cytokines. *J Exp Med.* 2010;207(2):299–308.
  41. Liu L, Okada S, Kong XF, Kreins AY, Cypowyj S, Abhyankar A, et al. Gain-of-function human STAT1 mutations impair IL-17 immunity and underlie chronic mucocutaneous candidiasis. *J Exp Med.* 2011;208(18):1635–48.
  42. Puel A, Picard C, Cypowyj S, Lilic D, Abel L, Casanova JL. Inborn errors of mucocutaneous immunity to *Candida albicans* in humans: A role for IL-17 cytokines? *Curr Opin Immunol.* 2010;22(4):467–74.
  43. Puel A, Cypowyj S, Bustamante J, Wright JF, Liu L, Lim HK, et al. Chronic mucocutaneous candidiasis in humans with inborn errors of interleukin-17 immunity. *Science (80- ).* 2011;332(6025):65–8.
  44. Naglik JR, Moyes DL, Wächtler B, Hube B. *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. *Microbes Infect.* 2011;13(12–13):963–76.
  45. Noble SM, Gianetti BA, Witchley JN. *Candida albicans* cell-type switching and functional plasticity in the mammalian host. *Nat Rev Microbiol.* 2017;15(2):96–108.
  46. Sotomayor CE, Miró MS, Masih D. Respuesta Inmune a Infecciones fúngicas. In: *Microbiología Biomédica. 3ª edición.* Editorial Atlante S.R.L.; 2018. p. 325–32.
  47. Cheng SC, Joosten LAB, Kullberg BJ, Netea MG. Interplay between *Candida albicans* and the mammalian innate host defense. *Infect Immun.* 2012;80(4):1304–13.
  48. Paraje MG, Correa SG, Albasa I, Sotomayor CE. Lipase of *Candida albicans* induces activation of NADPH oxidase and l-arginine pathways on resting and activated macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;390(2):263–8.
  49. d'Enfert C, Kaune A-K, Alaban L-R, Chakraborty S, Cole N, Delavy M, et al. The impact of the Fungus-Host-Microbiota interplay upon *Candida albicans* infections: current knowledge and new perspectives. *FEMS Microbiology Reviews.* 2020. 1–55 p.
  50. Basmacıyan L, Bon F, Paradis T, Lapaquette P, Dalle F. “*Candida Albicans* Interactions With The Host: Crossing The Intestinal Epithelial Barrier.” *Tissue Barriers.* 2019;7(2):1–31.
  51. Rizzetto L, Weil T, Cavalieri D. Systems level dissection of candida recognition by dectins: A matter of fungal morphology and site of infection. *Pathogens.* 2015;4(3):639–61.
  52. Kumamoto CA, Vences MD. Alternative *Candida albicans* lifestyles: Growth on surfaces. *Annu Rev Microbiol.* 2005;59:113–33.
  53. da Silva Dantas A, Lee KK, Raziunaite I, Schaefer K, Wagener J, Yadav B, et al. Cell biology of *Candida albicans*–host interactions. *Curr Opin Microbiol.* 2016;34:111–8.
  54. Gow NAR, Hube B. Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. *Curr Opin Microbiol.* 2012;15(4):406–12.
  55. 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.
  56. Poulain D. *Candida albicans*, plasticity and pathogenesis. *Crit Rev Microbiol.* 2015;41(2):208–17.
  57. Luo S, Skerka C, Kurzai O, Zipfel PF. Complement and innate immune evasion strategies of the human pathogenic fungus *Candida albicans*. *Mol Immunol.* 2013;56(3):161–9.
  58. Medzhitov R, Janeway CA. Innate immunity: The virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell.* 1997;91(3):295–8.
  59. Borriello F, Zanoni I, Granucci F. Cellular and molecular mechanisms of antifungal innate immunity at epithelial barriers: The role of C-type lectin receptors. *Eur J Immunol.* 2020;50(3):317–25.
  60. Brown GD, Gordon S. A new receptor for  $\beta$ -glucans. *Nature.* 2001;413(6851):36–7.
  61. Lionakis MS, Iliev ID, Hohl TM. Immunity against fungi. *JCI insight.* 2017;2(11):1–17.
  62. Tang Y, Yu F, Huang L, Hu Z. The changes of antifungal susceptibilities caused by the

- phenotypic switching of *Candida* species in 229 patients with vulvovaginal candidiasis. *J Clin Lab Anal.* 2019;33(1):1–6.
63. McIntosh M, Stone BA, Stanisich VA. Curdlan and other bacterial (1→3)- $\beta$ -D-glucans. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2005;68(2):163–73.
  64. Ferwerda G, Meyer-Wentrup F, Kullberg BJ, Netea MG, Adema GJ. Dectin-1 synergizes with TLR2 and TLR4 for cytokine production in human primary monocytes and macrophages. *Cell Microbiol.* 2008;10(10):2058–66.
  65. Kim J, Sudbery P. *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. *J Microbiol.* 2011;49(2):171–7.
  66. Whiteway M, Bachewich C. Morphogenesis in *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol.* 2007;61:529–53.
  67. Carlisle PL, Banerjee M, Lazzell A, Monteagudo C, López-Ribot JL, Kadosh D. Expression levels of a filament-specific transcriptional regulator are sufficient to determine *Candida albicans* morphology and virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(2):599–604.
  68. Pekmezovic M, Mogavero S, Naglik JR, Hube B. Host-Pathogen Interactions during Female Genital Tract Infections. *Trends Microbiol.* 2019;27(12):982–96.
  69. Pericolini E, Gabrielli E, Amacker M, Kasper L, Roselletti E, Luciano E, et al. Secretory aspartyl proteinases cause vaginitis and can mediate vaginitis caused by *Candida albicans* in mice. *MBio.* 2015;6(3):1–13.
  70. Peters BM, Yano J, Noverr MC, Fidel PL. *Candida* Vaginitis: When Opportunism Knocks, the Host Responds. *PLoS Pathog.* 2014;10(4).
  71. De Freitas Araújo MG, Pacífico M, Vilegas W, Dos Santos LC, Icely PA, Miró MS, et al. Evaluation of *Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhl. extract as antifungal and in treatment of vulvovaginal candidiasis. *Med Mycol.* 2013;51(7):673–82.
  72. Zárate G, Nader-Macias ME. Influence of probiotic vaginal lactobacilli on in vitro adhesion of urogenital pathogens to vaginal epithelial cells. *Lett Appl Microbiol.* 2006;43(2):174–80.
  73. Wächtler B, Citiulo F, Jablonowski N, Förster S, Dalle F, Schaller M, et al. *Candida albicans*-epithelial interactions: Dissecting the roles of active penetration, induced endocytosis and host factors on the infection process. *PLoS One.* 2012;7(5).
  74. Zakikhany K, Naglik JR, Schmidt-westhausen A, Holland G, Schaller M, Hube B. In vivo transcript profiling of *Candida albicans* identifies a gene essential for interepithelial dissemination. *Cell Microbiol.* 2007;9(12):2938–54.
  75. Phan QT, Myers CL, Fu Y, Sheppard DC, Yeaman MR, Welch WH, et al. Als3 is a *Candida albicans* invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells. *PLoS Biol.* 2007;5(3):0543–57.
  76. Liu Y, Filler SG. *Candida albicans* Als3, a multifunctional adhesin and invasin. *Eukaryot Cell.* 2011;10(2):168–73.
  77. Harriott MM, Lilly EA, Rodriguez TE, Fidel PL, Noverr MC. *Candida albicans* forms biofilms on the vaginal mucosa. *Microbiology.* 2010;156(12):3635–44.
  78. Naglik JR, Fidel PL, Odds FC. Animal models of mucosal *Candida* infection. *FEMS Microbiol Lett.* 2008 Apr 21;283(2):129–39.
  79. Schaller M, Korting HC, Borelli C, Hamm G, Hube B. *Candida albicans*-secreted aspartic proteinases modify the epithelial cytokine response in an in vitro model of vaginal candidiasis. *Infect Immun.* 2005;73(5):2758–65.
  80. Rodríguez-Cerdeira C, Martínez-Herrera E, Carnero-Gregorio M, López-Barcenas A, Fabbrocini G, Fida M, et al. Pathogenesis and Clinical Relevance of *Candida* Biofilms in Vulvovaginal Candidiasis. *Front Microbiol.* 2020;11(November).
  81. Swidsinski A, Guschin A, Tang Q, Dörffel Y, Verstraelen H, Tertychnyy A, et al. Vulvovaginal candidiasis: histologic lesions are primarily polymicrobial and invasive and do not contain biofilms. *Am J Obstet Gynecol.* 2019;220(1):91.e1-91.e8.

82. Lewis K. Persister cells. *Annu Rev Microbiol.* 2010;64:357–72.
83. Xu B, Qu Y, Deighton M. Should we absolutely reject the hypothesis that epithelium-based *Candida* biofilms contribute to the pathogenesis of human vulvovaginal candidiasis? *Am J Obstet Gynecol.* 2019;221(4):372–3.
84. Miró MS. Candidiasis vaginal: estudio de receptores y mediadores inmunes innatos locales involucrados en la patogenia de la infección. Universidad Nacional de Córdoba; 2017.
85. Dalle F, Wächtler B, L'Ollivier C, Holland G, Bannert N, Wilson D, et al. Cellular interactions of *Candida albicans* with human oral epithelial cells and enterocytes. *Cell Microbiol.* 2010;12(2):248–71.
86. Moreno-Ruiz E, Galán-Díez M, Zhu W, Fernández-Ruiz E, D'Enfert C, Filler SG, et al. *Candida albicans* internalization by host cells is mediated by a clathrin-dependent mechanism. *Cell Microbiol.* 2009 Aug;11(8):1179–89.
87. Sun JN, Solis N V., Phan QT, Bajwa JS, Kashleva H, Thompson A, et al. Host cell invasion and virulence mediated by *Candida albicans* Ssa1. *PLoS Pathog.* 2010;6(11).
88. Solis N V., Swidergall M, Bruno VM, Gaffen SL, Filler SG. The aryl hydrocarbon receptor governs epithelial cell invasion during oropharyngeal candidiasis. *MBio.* 2017;8(2):1–16.
89. Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003;67(3):400–28.
90. Willems HME, Bruner WS, Barker KS, Liu J, Palmer GE, Peters BM. Overexpression of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase 2 or 5 is not sufficient for exacerbation of immunopathology in a murine model of vaginitis. *Infect Immun.* 2017;85(10):1–12.
91. Cassone A, Sobel JD. Experimental models of vaginal candidiasis and their relevance to human candidiasis. *Infect Immun.* 2016;84(5):1255–61.
92. Miró MS, Rodríguez E, Caeiro JP, Vargas L, Vigezzi C, Icely PA, Castillo CV, Azcurra A, Riera F SC. Beta Defensin 1 in Host Response during Candidiasis vulvovaginal. *he J Infect Dis.*
93. 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 Aug;54(8):647–59.
94. Castillo G del V, Blanc SL de, Sotomayor CE, Azcurra AI. Study of virulence factor of *Candida* species in oral lesions and its association with potentially malignant and malignant lesions. *Arch Oral Biol.* 2018;91(May 2017):35–41.
95. Castillo GDV, Azcurra AI, Sotomayor CE. Lipasas de especies *Candida*: una revisión sobre aspectos bioquímicos, moleculares y patogénicos. *Rev Fac Cienc Med Cordoba.* 2019 Jun 19;76(2):107.
96. Castillo GDV, Miró MS, Azcurra AI, Sotomayor CE. Functional and molecular behavior of *Candida albicans* Lipase: association with stomatological lesions. *FEMS Yeast Res.* 2021;
97. Moyes DL, Wilson D, Richardson JP, Mogavero S, Tang SX, Wernecke J, et al. Candidalysin is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection. *Nature.* 2016 Apr 30;532(7597):64–8.
98. Verma A, Gaffen SL, Swidergall M. Innate immunity to mucosal candida infections. *J Fungi.* 2017;3(4):1–15.
99. Ho J, Yang X, Nikou SA, Kichik N, Donkin A, Ponde NO, et al. Candidalysin activates innate epithelial immune responses via epidermal growth factor receptor. *Nat Commun.* 2019;10(1).
100. Hardison SE, Brown GD. Europe PMC Funders Group C-type Lectin Receptors Orchestrate Anti-Fungal Immunity. 2013;13(9):817–22.
101. Luisa Gil M, Murciano C, Yáñez A, Gozalbo D. Role of Toll-like receptors in systemic *Candida albicans* infections. *Front Biosci (Landmark Ed.)* 2016 Jan 1;21(2):278–302.
102. Drummond RA, Gaffen SL, Hise AG, Brown GD, Ene I V, Brunke S, et al. Innate Defense

- against Fungal Pathogens. 2014;
103. Swidergall M. *Candida albicans* at Host Barrier Sites: Pattern Recognition Receptors and Beyond. *Pathogens*. 2019;8(1):1–14.
  104. Netea MG, Gow NAR, Joosten LAB, Verschueren I, Van Der Meer JWM, Kullberg BJ. Variable recognition of *Candida albicans* strains by TLR4 and lectin recognition receptors. *Med Mycol*. 2010;48(7):897–903.
  105. Bourgeois C, Majer O, Frohner IE, Lesiak-Markowicz I, Hildering K-S, Glaser W, et al. Conventional Dendritic Cells Mount a Type I IFN Response against *Candida* spp. Requiring Novel Phagosomal TLR7-Mediated IFN- $\beta$  Signaling . *J Immunol*. 2011;186(5):3104–12.
  106. Miyazato A, Nakamura K, Yamamoto N, Mora-Montes HM, Tanaka M, Abe Y, et al. Toll-like receptor 9-dependent activation of myeloid dendritic cells by deoxynucleic acids from *Candida albicans*. *Infect Immun*. 2009;77(7):3056–64.
  107. Becker KL, Ifrim DC, Quintin J, Netea MG, van de Veerdonk FL. Antifungal innate immunity: recognition and inflammatory networks. *Semin Immunopathol*. 2015;37(2):107–16.
  108. Cunha C, Romani L, Carvalho A. Cracking the Toll-like receptor code in fungal infections. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2010;8(10):1121–37.
  109. Carvalho A, Giovannini G, De Luca A, D'Angelo C, Casagrande A, Iannitti RG, et al. Dectin-1 isoforms contribute to distinct Th1/Th17 cell activation in mucosal candidiasis. *Cell Mol Immunol*. 2012;9(3):276–86.
  110. Brown GD, Willment JA, Whitehead L. C-type lectins in immunity and homeostasis. *Nat Rev Immunol*. 2018;18(6):374–89.
  111. Sun WK, Lu X, Li X, Sun QY, Su X, Song Y, et al. Dectin-1 is inducible and plays a crucial role in *Aspergillus*-induced innate immune responses in human bronchial epithelial cells. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31(10):2755–64.
  112. del Fresno C, Soulat D, Roth S, Blazek K, Udalova I, Sancho D, et al. Interferon- $\beta$  production via Dectin-1-Syk-IRF5 signaling in dendritic cells is crucial for immunity to *C. albicans*. *Immunity*. 2013 Jun 27;38(6):1176–86.
  113. Majer O, Bourgeois C, Zwolanek F, Lassnig C, Kerjaschki D, Mack M, et al. Type I interferons promote fatal immunopathology by regulating inflammatory monocytes and neutrophils during *Candida* infections. *PLoS Pathog*. 2012;8(7):10.
  114. Salazar F, Brown GD. Antifungal Innate Immunity: A Perspective from the Last 10 Years. *J Innate Immun*. 2018;10(5–6):373–97.
  115. Netea MG, Ferwerda G, van der Graaf CAA, Van der Meer JWM, Kullberg BJ. Recognition of fungal pathogens by toll-like receptors. *Curr Pharm Des*. 2006;12(32):4195–201.
  116. Roselletti E, Perito S, Gabrielli E, Mencacci A, Pericolini E, Sabbatini S, et al. NLRP3 inflammasome is a key player in human vulvovaginal disease caused by *Candida albicans*. *Sci Rep*. 2017;7(1):1–10.
  117. Yi YS. Functional crosstalk between non-canonical caspase-11 and canonical NLRP3 inflammasomes during infection-mediated inflammation. *Immunology*. 2020;159(2):142–55.
  118. Wagener J, Malireddi RKS, Lenardon MD, Köberle M, Vautier S, MacCallum DM, et al. Fungal Chitin Dampens Inflammation through IL-10 Induction Mediated by NOD2 and TLR9 Activation. *PLoS Pathog*. 2014;10(4).
  119. Jaeger M, van der Lee R, Cheng SC, Johnson MD, Kumar V, Ng A, et al. The RIG-I-like helicase receptor MDA5 (IFIH1) is involved in the host defense against *Candida* infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015;34(5):963–74.
  120. Moyes DL, Runglall M, Murciano C, Shen C, Nayar D, Thavaraj S, 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.

121. Foschi C, Bortolotti M, Marziali G, Polito L, Marangoni A, Bolognesi A. Survival and death of intestinal cells infected by *Chlamydia trachomatis*. *PLoS One*. 2019;14(4):1–15.
122. Jaeger M, Pinelli M, Borghi M, Constantini C, Dindo M, Van Emst L, et al. A systems genomics approach identifies SIGLEC15 as a susceptibility factor in recurrent vulvovaginal candidiasis. *Sci Transl Med*. 2019;11(496).
123. Lu Y, Stuart JH, Talbot-Cooper C, Agrawal-Singh S, Huntly B, Smid AI, et al. Histone deacetylase 4 promotes type I interferon signaling, restricts DNA viruses, and is degraded via vaccinia virus protein C6. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(24):11997–2006.
124. Plotkin BJ, Sigar IM, Tiwari V, Halkyard S. Herpes Simplex Virus (HSV) Modulation of *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* Initiation of HeLa 299 Cell-Associated Biofilm. *Curr Microbiol*. 2016;72(5):529–37.
125. Umeyama T, Kaneko A, Watanabe H, Hirai A, Uehara Y, Niimi M, et al. Deletion of the CaBIG1 gene reduces  $\beta$ -1,6-glucan synthesis, filamentation, adhesion, and virulence in *Candida albicans*. *Infect Immun*. 2006;74(4):2373–81.
126. Vartak R, Patki M, Menon S, Jablonski J, Mediouni S, Fu Y, et al.  $\beta$ -cyclodextrin polymer/Soluplus® encapsulated Ebselen ternary complex (E $\beta$ polySol) as a potential therapy for vaginal candidiasis and pre-exposure prophylactic for HIV. *Int J Pharm*. 2020;589(September):119863.
127. Niu XX, Li T, Zhang X, Wang SX, Liu ZH. *Lactobacillus crispatus* modulates vaginal epithelial cell innate response to *Candida albicans*. *Chin Med J (Engl)*. 2017;130(3):273–9.
128. Li T, Niu X, Zhang X, Wang S, Liu Z. Recombinant human IFN $\alpha$ -2b response promotes vaginal epithelial cells defense against *Candida albicans*. *Front Microbiol*. 2017;8(APR):1–8.
129. Shroff A, Sequeira R, Reddy KVR. Human vaginal epithelial cells augment autophagy marker genes in response to *Candida albicans* infection. *Am J Reprod Immunol*. 2017;77(4).
130. Kotani H, Koshizuka T, Matsubara K, Nishiyama K, Sugiyama T, Suzutani T. Relationship between human  $\beta$ -defensin 2 and the vaginal environment. *Jpn J Infect Dis*. 2020;73(3):214–20.
131. Gao Y, Liang G, Wang Q, She X, Shi D, Shen Y, et al. Different Host Immunological Response to *C. albicans* by Human Oral and Vaginal Epithelial Cells. *Mycopathologia*. 2019;184(1).
132. Yano J, Palmer GE, Eberle KE, Peters BM, Vogl T, McKenzie AN, 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. *Infect Immun*. 2014;82(2):783–92.
133. Bechinger B, Gorr SU. Antimicrobial Peptides: Mechanisms of Action and Resistance. *J Dent Res*. 2017;96(3):254–60.
134. Wira CR, Ghosh M, Smith JM, Shen L, Connor RI, Sundstrom P, et al. Epithelial cell secretions from the human female reproductive tract inhibit sexually transmitted pathogens and *Candida albicans* but not *Lactobacillus*. *Mucosal Immunol*. 2011 May 3;4(3):335–42.
135. Silva PM, Gonçalves S, Santos NC. Defensins: Antifungal lessons from eukaryotes. *Front Microbiol*. 2014;5(MAR):1–17.
136. Ulm H, Wilmes M, Shai Y, Sahl HG. Antimicrobial host defensins specific antibiotic activities and innate defense modulation. *Front Immunol*. 2012;3(AUG):1–4.
137. Wira CR, Fahey J V., Sentman CL, Pioli PA, Shen L. Innate and adaptive immunity in female genital tract: Cellular responses and interactions. *Immunol Rev*. 2005;206:306–35.
138. Ashley Moffett-King, Gary Entrican, Shirley Ellis JH and DB. Natural killer cells and reproduction. *Trends Immunol*. 2002;23(7):332–3.
139. Iijima N, Thompson JM, Iwasaki A. Dendritic cells and macrophages in the genitourinary

- tract. *Mucosal Immunol.* 2008 Nov 10;1(6):451–9.
140. 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. *J Immunol.* 2013;190(2):521–5.
  141. Wozniak KL, Wormley FL, Fidel PL. Candida-specific antibodies during experimental vaginal candidiasis in mice. *Infect Immun.* 2002;70(10):5790–9.
  142. Yano J, Peters BM, Noverr MC, Fidel PL. Novel mechanism behind the immunopathogenesis of vulvovaginal candidiasis: “neutrophil anergy.” *Infect Immun.* 2018;86(3).
  143. Fong IW. The value of treating the sexual partners of women with recurrent vaginal candidiasis with ketoconazole. *Genitourin Med.* 1992;68(3):174–6.
  144. Fidel PL, Lynch ME, Lopez VR, Sobel JD, Robinson R. Systemic Cell-Mediated Immune Reactivity in Women with Recurrent Vulvovaginal Candidiasis. *J Infect Dis.* 1993;168(6):1458–65.
  145. Sobel JD. Pathogenesis and treatment of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Clin Infect Dis.* 1992;14:S148–S153.
  146. Leigh JE, Barousse M, Swoboda RK, Myers T, Hager S, Wolf NA, et al. Candida-specific systemic cell-mediated immune reactivities in human immunodeficiency virus-positive persons with mucosal candidiasis. *J Infect Dis.* 2001;183(2):277–85.
  147. Wozniak KL, Palmer G, Kutner R, Fidel PL. Immunotherapeutic approaches to enhance protective immunity against *Candida* vaginitis. *Med Mycol.* 2005;43(7):589–601.
  148. Taylor BN, Saavedra M, Fidel PL. Local Th1/Th2 cytokine production during experimental vaginal candidiasis: Potential importance of transforming growth factor- $\beta$ . *Med Mycol.* 2000;38(6):419–31.
  149. Conti HR, Bruno VM, Childs EE, Daugherty S, Hunter JP, Mengesha BG, et al. IL-17 Receptor Signaling in Oral Epithelial Cells Is Critical for Protection against Oropharyngeal Candidiasis. *Cell Host Microbe.* 2016 Nov;20(5):606–17.
  150. Nawrot U, Grzybek-Hryniewicz K, Zielska U, Czarny A, Podwińska J. The study of cell-mediated immune response in recurrent vulvovaginal candidiasis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2000;29(2):89–94.
  151. Talaei Z, Sheikhabaei S, Ostadi V, Hakemi MG, Meidani M, Naghshineh E, et al. Recurrent vulvovaginal candidiasis: Could it be related to cell-mediated immunity defect in response to *Candida* antigen? *Int J Fertil Steril.* 2017;11(3):134–41.
  152. Yano J, Kolls JK, Happel KI, Wormley F, Wozniak KL, Fidel PL. The Acute Neutrophil Response Mediated by S100 Alarmins during Vaginal *Candida* Infections Is Independent of the Th17-Pathway. *PLoS One.* 2012;7(9):3–10.
  153. Peters BM, Coleman BM, Willems HME, Barker KS, Aggor FEY, Cipolla E, et al. The Interleukin (IL) 17R/IL-22R Signaling Axis Is Dispensable for Vulvovaginal Candidiasis Regardless of Estrogen Status. *J Infect Dis.* 2020 Apr 7;221(9):1554–63.
  154. Gaffen SL, Moutsopoulos NM. Regulation of host-microbe interactions at oral mucosal barriers by type 17 immunity. *Sci Immunol.* 2020 Jan 3;5(43):eaau4594.
  155. Conti HR, Shen F, Nayyar N, Stocum E, Sun JN, Lindemann MJ, et al. Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. *J Exp Med.* 2009;206(2):299–311.
  156. Conti HR, Peterson AC, Brane L, Huppler AR, Hernández-Santos N, Whibley N, et al. Oral-resident natural Th17 cells and  $\gamma\delta$  T cells control opportunistic *Candida albicans* infections. *J Exp Med.* 2014;211(10):2075–84.
  157. Hernández-Santos N, Gaffen SL. Th17 cells in immunity to *Candida albicans*. *Cell Host Microbe.* 2012 May 17;11(5):425–35.
  158. Ashman RB. Protective and pathologic immune responses against *Candida albicans* infection. *Front Biosci.* 2008 May 1;13:3334–51.

159. Pellon A, Sadeghi Nasab SD, Moyes DL. New Insights in *Candida albicans* Innate Immunity at the Mucosa: Toxins, Epithelium, Metabolism, and Beyond. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10(March):1–14.
160. Yano J, Noverr MC, Fidel PL. Reply to “Chronic vaginal candidiasis is achievable in outbred CD-1 mice.” *MBio*. 2017;8(5):1–2.
161. Borden EC, Sen GC, Uze G, Silverman RH, Ransohoff RM, Foster GR, et al. Interferons at age 50: Past, current and future impact on biomedicine. *Nat Rev Drug Discov*. 2007;6(12):975–90.
162. McNab F, Mayer-Barber K, Sher A, Wack A, O’Garra A. Type I interferons in infectious disease. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(2):87–103.
163. Malireddi RKS, Kanneganti TD. Role of type I interferons in inflammasome activation, cell death, and disease during microbial infection. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013;3(November):77.
164. Brice DC, Figgins E, Yu F, Diamond G. Type I interferon and interferon-stimulated gene expression in oral epithelial cells. *Mol Oral Microbiol*. 2019;34(6):245–53.
165. Honda K, Takaoka A, Taniguchi T. Type I Interferon Gene Induction by the Interferon Regulatory Factor Family of Transcription Factors. *Immunity*. 2006;25(3):349–60.
166. Jefferies CA. Regulating IRFs in IFN driven disease. *Front Immunol*. 2019;10(MAR):1–15.
167. Uma M, Nagarajan PD. Induction and Function of IFN $\beta$  During Viral and Bacterial Infection. *Crit Rev Immunol*. 2011;31(6):459–74.
168. Schneider WM, Chevillotte MD, Rice CM. Interferon-Stimulated Genes: A Complex Web of Host Defenses. *Annu Rev Immunol*. 2014 Mar 21;32(1):513–45.
169. Biondo C, Signorino G, Costa A, Midiri A, Gerace E, Galbo R, et al. Recognition of yeast nucleic acids triggers a host-protective type I interferon response. *Eur J Immunol*. 2011 Jul;41(7):1969–79.
170. Stawowczyk M, Naseem S, Montoya V, Baker DP, Konopka J, Reich NC. Pathogenic Effects of IFIT2 and Interferon- $\beta$  during Fatal Systemic *Candida albicans* Infection. *MBio*. 2018;9(2):1–17.
171. Guarda G, Braun M, Staehli F, Tardivel A, Mattmann C, Förster I, et al. Type I Interferon Inhibits Interleukin-1 Production and Inflammasome Activation. *Immunity*. 2011;34(2):213–23.
172. Smeekens SP, Ng A, Kumar V, Johnson MD, Plantinga TS, Van Diemen C, et al. Functional genomics identifies type I interferon pathway as central for host defense against *Candida albicans*. *Nat Commun*. 2013;4(855).
173. Kofler L, Nagele U, Kofler H. Recurrent vulvovaginal candidiasis: Successful suppression with imiquimod. *J Dermatol*. 2013;40(10):851.
174. Lipke MM. An armamentarium of wart treatments. *Clin Med Res*. 2006;4(4):273–93.
175. Miller RL, Gerster JF, Owens ML, Slade HB, Tomai MA. Review article Imiquimod applied topically: A novel immune response modifier and new class of drug. *Int J Immunopharmacol*. 1999;21(1):1–14.
176. Stern PL, van der Burg SH, Hampson IN, Broker TR, Fiander A, Lacey CJ, et al. Therapy of Human Papillomavirus-Related Disease. *Vaccine*. 2012 Nov;30:F71–82.
177. Vargas L. Candidiasis Vulvo Vaginal Recurrente: Tratamiento inmunomodulador. Instituto Universitario del Hospital Italiano de Buenos Aires; 2019.
178. Li T, Liu Z, Zhang X, Chen X, Wang S. Therapeutic effectiveness of type I interferon in vulvovaginal candidiasis. *Microb Pathog*. 2019;134(May):103562.
179. Sobel JD. Recurrent vulvovaginal candidiasis. *Am J Obstet Gynecol*. 2016;214(1):15–21.
180. Naglik JR, König A, Hube B, Gaffen SL. *Candida albicans*–epithelial interactions and induction of mucosal innate immunity. *Curr Opin Microbiol*. 2017;40:104–12.
181. Renna MS, Correa SG, Porporatto C, Figueredo CM, Aoki MP, Paraje MG, et al. Hepatocellular apoptosis during *Candida albicans* colonization: Involvement of TNF- $\alpha$

- and infiltrating Fas-L positive lymphocytes. *Int Immunol.* 2006;18(12):1719–28.
182. Naglik JR, Gaffen SL, Hube B. Candidalysin: discovery and function in *Candida albicans* infections. *Curr Opin Microbiol.* 2019;52:100–9.
  183. Patel M V., Ghosh M, Fahey J V., Wira CR. Uterine epithelial cells specifically induce interferon-stimulated genes in response to polyinosinic-polycytidylic acid independently of estradiol. *PLoS One.* 2012;7(4).
  184. Gow NAR, Netea MG, Munro CA, Ferwerda G, Bates S, Mora-Montes HM, et al. Immune recognition of *Candida albicans* beta-glucan by dectin-1. *J Infect Dis.* 2007 Nov 15;196(10):1565–71.
  185. Jannuzzi GP, de Almeida JRF, Amarante-Mendes GP, Romera LMDM, Kaihami GH, Vasconcelos JR, et al. TLR3 is a negative regulator of immune responses against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019;9(JAN):1–10.
  186. Kasperkovitz P V., Cardenas ML, Vyas JM. TLR9 Is Actively Recruited to *Aspergillus fumigatus* Phagosomes and Requires the N-Terminal Proteolytic Cleavage Domain for Proper Intracellular Trafficking . *J Immunol.* 2010;185(12):7614–22.
  187. Kasperkovitz P V., Khan NS, Tam JM, Mansour MK, Davids PJ, Vyas JM. Toll-like receptor 9 modulates macrophage antifungal effector function during innate recognition of *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Infect Immun.* 2011;79(12):4858–67.
  188. Jannuzzi GP, de Almeida JRF, Paulo LNM, de Almeida SR, Ferreira KS. Intracellular PRRs Activation in Targeting the Immune Response Against Fungal Infections. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10(October):1–11.
  189. Khan NS, Kasperkovitz P V., Timmons AK, Mansour MK, Tam JM, Seward MW, et al. Dectin-1 Controls TLR9 Trafficking to Phagosomes Containing  $\beta$ -1,3 Glucan. *J Immunol.* 2016;196(5):2249–61.
  190. Han X, Fang Q, Yao F, Wang X, Wang J, Yang S, et al. The heterogeneous nature of polyethylenimine-DNA complex formation affects transient gene expression. *Cytotechnology.* 2009 Jul 2;60(1–3):63–75.
  191. Roselletti E, Perito S, Sabbatini S, Monari C, Vecchiarelli A. Vaginal Epithelial Cells Discriminate Between Yeast and Hyphae of *Candida albicans* in Women Who Are Colonized or Have Vaginal Candidiasis. *J Infect Dis.* 2019 Oct 8;220(10):1645–54.
  192. Vaz C, Reales-Calderon JA, Pitarch A, Vellosillo P, Trevisan M, Hernández ML, et al. Enrichment of ATP Binding Proteins Unveils Proteomic Alterations in Human Macrophage Cell Death, Inflammatory Response, and Protein Synthesis after Interaction with *Candida albicans*. *J Proteome Res.* 2019;18(5):2139–59.
  193. Scheltema RA, Hauschild JP, Lange O, Hornburg D, Denisov E, Damoc E, et al. The Q exactive HF, a benchtop mass spectrometer with a pre-filter, high-performance quadrupole and an ultra-high-field orbitrap analyzer. *Mol Cell Proteomics.* 2014;13(12):3698–708.
  194. Weiner AK, Sidoli S, Diskin SJ, Garcia BA. Graphical interpretation and analysis of proteins and their ontologies (GiaPronto): A one-click graph visualization software for proteomics data sets. *Mol Cell Proteomics.* 2018;17(7):1426–31.
  195. Kammers K, Cole RN, Tiengwe C, Ruczinski I. Detecting significant changes in protein abundance. *EuPA Open Proteomics.* 2015;7:11–9.
  196. Reales-Calderón JA, Sylvester M, Strijbis K, Jensen ON, Nombela C, Molero G, et al. *Candida albicans* induces pro-inflammatory and anti-apoptotic signals in macrophages as revealed by quantitative proteomics and phosphoproteomics. *J Proteomics.* 2013;91:106–35.
  197. Trautwein-Schult A, Maaß S, Plate K, Otto A, Becher D. A metabolic labeling strategy for relative protein quantification in *clostridioides difficile*. *Front Microbiol.* 2018;9(OCT):1–14.
  198. du Plessis L, Škunca N, Dessimoz C. The what, where, how and why of gene ontology-A

- primer for bioinformaticians. *Brief Bioinform.* 2011;12(6):723–35.
199. Supek F, Bošnjak M, Škunca N, Šmuc T. Revigo summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PLoS One.* 2011;6(7).
  200. Bateman A, Martin M-J, Orchard S, Magrane M, Agivetova R, Ahmad S, et al. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res.* 2021 Jan 8;49(D1):D480–9.
  201. Fabregat A, Jupe S, Matthews L, Sidiropoulos K, Gillespie M, Garapati P, et al. The Reactome Pathway Knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(D1):D649–55.
  202. Jassal B, Matthews L, Viteri G, Gong C, Lorente P, Fabregat A, et al. The reactome pathway knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(D1):D498–503.
  203. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, et al. Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nat Genet.* 2000 May;25(1):25–9.
  204. Carbon S, Douglass E, Good BM, Unni DR, Harris NL, Mungall CJ, et al. The Gene Ontology resource: enriching a GOld mine. *Nucleic Acids Res.* 2021 Jan 8;49(D1):D325–34.
  205. Sidiropoulos K, Viteri G, Sevilla C, Jupe S, Webber M, Orlic-Milacic M, et al. Reactome enhanced pathway visualization. *Bioinformatics.* 2017;33(21):3461–7.
  206. Anderson DJ, Marathe J, Pudney J. The Structure of the Human Vaginal Stratum Corneum and its Role in Immune Defense. *Am J Reprod Immunol.* 2014;71(6):618–23.
  207. 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. *Int J Clin Exp Med.* 2014;7(12):5235–43.
  208. Hube B, Stehr F, Bossenz M, Mazur A, Kretschmar M, Schäfer W. Secreted lipases of *Candida albicans*: Cloning, characterisation and expression analysis of a new gene family with at least ten members. *Arch Microbiol.* 2000;174(5):362–74.
  209. Renga G, Borghi M, Oikonomou V, Mosci P, Bartoli A, Renauld JC, et al. IL-9 integrates the host-candidacross-talk in vulvovaginal candidiasis to balance inflammation and tolerance. *Front Immunol.* 2018;9(NOV):1–5.
  210. Huang S-H, Frydas S, Kempuraj D, Barbacane RC, Grilli A, Boucher W, et al. Interleukin-17 and the interleukin-17 family member network. *Allergy asthma Proc.* 2004;25(1):17–21.
  211. Pietrella D, Rachini A, Pines M, Pandey N, Mosci P, Bistoni F, et al. TH17 cells and IL-17 in protective immunity to vaginal candidiasis. *PLoS One.* 2011;6(7):1–11.
  212. Diefenbach A. Innate lymphoid cells in the defense against infections. *Eur J Microbiol Immunol.* 2013;3(3):143–51.
  213. De Bernardis F, Graziani S, Tirelli F, Antonopoulou S. *Candida* vaginitis: Virulence, host response and vaccine prospects. *Med Mycol.* 2018;56(March):S26–31.
  214. Jaeger M, Plantinga TS, Joosten LAB, Kullberg B-J, Netea MG. Genetic basis for recurrent vulvo-vaginal candidiasis. *Curr Infect Dis Rep.* 2013 Apr;15(2):136–42.
  215. Barousse MM, Steele C, Dunlap K, Espinosa T, Boikov D, Sobel JD, et al. Growth inhibition of *Candida albicans* by human vaginal epithelial cells. *J Infect Dis.* 2001 Dec 1;184(11):1489–93.
  216. Barousse MM, Espinosa T, Dunlap K, Fidel PL. Vaginal Epithelial Cell Anti-*Candida albicans* Activity Is Associated with Protection against Symptomatic Vaginal Candidiasis. *Infect Immun.* 2005 Nov;73(11):7765–7.
  217. Cohen-Kedar S, Baram L, Elad H, Brazowski E, Guzner-Gur H, Dotan I. Human intestinal epithelial cells respond to  $\beta$ -glucans via Dectin-1 and Syk. *Eur J Immunol.* 2014;44(12):3729–40.
  218. Nikou S-A, Kichik N, Brown R, Ponde N, Ho J, Naglik J, et al. *Candida albicans* Interactions with Mucosal Surfaces during Health and Disease. *Pathogens.* 2019 Apr 22;8(2):53.
  219. Chaffin WL. *Candida albicans* Cell Wall Proteins. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2008;72(3):495–544.
  220. Moyes DL, Richardson JP, Naglik JR. *Candida albicans*-epithelial interactions and

- pathogenicity mechanisms: scratching the surface. *Virulence*. 2015;6(4):338–46.
221. Zhu W, Phan QT, Boonthueung P, Solis N V., Loo JA, Fillera SG. EGFR and HER2 receptor kinase signaling mediate epithelial cell invasion by *Candida albicans* during oropharyngeal infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(35):14194–9.
  222. Gow NAR, Van De Veerdonk FL, Brown AJP, Netea MG. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: Discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol*. 2012;10(2):112–22.
  223. Naglik JR, Richardson JP, Moyes DL. *Candida albicans* Pathogenicity and Epithelial Immunity. *PLoS Pathog*. 2014;10(8):8–11.
  224. Zhao XR, Villar CC. Trafficking of *Candida albicans* through oral epithelial endocytic compartments. *Med Mycol*. 2011 Feb;49(2):212–7.
  225. Villar CC, Kashleva H, Mitchell AP, Dongari-Bagtzoglou A. Invasive phenotype of *Candida albicans* affects the host proinflammatory response to infection. *Infect Immun*. 2005;73(8):4588–95.
  226. Villar CC, Kashleva H, Nobile CJ, Mitchell AP, Dongari-Bagtzoglou A. Mucosal tissue invasion by *Candida albicans* is associated with E-cadherin degradation, mediated by transcription factor Rim101p and protease Sap5p. *Infect Immun*. 2007;75(5):2126–35.
  227. Bruno VM, Shetty AC, Yano J, Fidel PL, Noverr MC, Peters BM. Transcriptomic Analysis of Vulvovaginal Candidiasis Identifies a Role for the NLRP3 Inflammasome. *MBio*. 2015;6(2):1–15.
  228. Cumming HE, Bourke NM. Type I IFNs in the female reproductive tract: The first line of defense in an ever-changing battleground. *J Leukoc Biol*. 2019;105(2):353–61.
  229. Conrady CD, Halford WP, Carr DJJ. Loss of the Type I Interferon Pathway Increases Vulnerability of Mice to Genital Herpes Simplex Virus 2 Infection. *J Virol*. 2011;85(4):1625–33.
  230. Nagarajan UM, Prantner D, Sikes JD, Andrews CW, Goodwin AM, Nagarajan S, et al. Type I interferon signaling exacerbates *Chlamydia muridarum* genital infection in a murine model. *Infect Immun*. 2008;76(10):4642–8.
  231. Kotredes KP, Thomas B, Gamero AM. The protective role of Type I interferons in the gastrointestinal tract. *Front Immunol*. 2017;8(APR):1–10.
  232. Rauch I, Hainzl E, Rosebrock F, Heider S, Schwab C, Berry D, et al. Type I interferons have opposing effects during the emergence and recovery phases of colitis. *Eur J Immunol*. 2014;44(9):2749–60.
  233. Li JY, Xiao J, Gao M, Zhou HF, Fan H, Sun F, et al. IRF/Type I IFN signaling serves as a valuable therapeutic target in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Int Immunopharmacol*. 2021;92:107350.
  234. Gil ML, Gozalbo D. Role of Toll-like receptors in systemic *Candida albicans* infections. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2009 Jan 1;14:570–82.
  235. Bruno M, Dewi IMW, Matzaraki V, ter Horst R, Pekmezovic M, Rösler B, et al. Comparative host transcriptome in response to pathogenic fungi identifies common and species-specific transcriptional antifungal host response pathways. *Comput Struct Biotechnol J*. 2021;19:647–63.
  236. Aubry C, Corr SC, Wienerroither S, Goulard C, Jones R, Jamieson AM, et al. Both TLR2 and TRIF contribute to interferon- $\beta$  production during listeria infection. *PLoS One*. 2012;7(3):1–9.
  237. Buss C, Opitz B, Hocke AC, Lippmann J, van Laak V, Hippenstiel S, et al. Essential role of mitochondrial antiviral signaling, IFN regulatory factor (IRF)3, and IRF7 in *Chlamydia pneumoniae*-mediated IFN-beta response and control of bacterial replication in human endothelial cells. *J Immunol*. 2010 Mar 15;184(6):3072–8.
  238. Hu S, Hosey KL, Derbigny WA. Analyses of the pathways involved in early- and late-phase induction of IFN-beta during *C. Muridarum* infection of oviduct epithelial cells. *PLoS One*.

- 2015;10(3):1–26.
239. Ning S, Pagano JS, Barber GN. IRF7: activation, regulation, modification and function. *Genes Immun*. 2011 Sep 14;12(6):399–414.
  240. Honda K, Yanai H, Negishi H, Asagiri M, Sato M, Mizutani T, et al. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature*. 2005 Apr 30;434(7034):772–7.
  241. Li C, Zhao GQ, Che CY, Li N, Lin J, Xu Q, et al. Expression of dectin-1 during fungus infection in human corneal epithelial cells. *Int J Ophthalmol*. 2013;7(1):34–7.
  242. Yeh CC, Horng HC, Chou H, Tai HY, Shen H Der, Hsieh SL, et al. Dectin-1-mediated pathway contributes to *Fusarium proliferatum*-induced CXCL-8 release from human respiratory epithelial cells. *Int J Mol Sci*. 2017;18(3):1–10.
  243. Beisswenger C, Hess C, Bals R. *Aspergillus fumigatus* conidia induce interferon- $\beta$  signalling in respiratory epithelial cells. *Eur Respir J*. 2012;39(2):411–8.
  244. Prantner D, Darville T, Nagarajan UM. Stimulator of IFN Gene Is Critical for Induction of IFN- $\beta$  during *Chlamydia muridarum* Infection. *J Immunol*. 2010 Mar 1;184(5):2551–60.
  245. Dutta O, Espinosa V, Wang K, Avina S, Rivera A. Dectin-1 Promotes Type I and III Interferon Expression to Support Optimal Antifungal Immunity in the Lung. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10(July):1–10.
  246. Goodridge HS, Underhill DM. Fungal Recognition by TLR2 and Dectin-1. *Handb Exp Pharmacol*. 2008;(183):87–109.
  247. Zhao G-Q, Qiu X-Y, Lin J, Li Q, Hu L-T, Wang Q, et al. Co-regulation of Dectin-1 and TLR2 in inflammatory response of human corneal epithelial cells induced by *Aspergillus fumigatus*. *Int J Ophthalmol*. 2016;9(2):185–90.
  248. Yadav M, Schorey JS. The beta-glucan receptor dectin-1 functions together with TLR2 to mediate macrophage activation by mycobacteria. *Blood*. 2006 Nov 1;108(9):3168–75.
  249. Nazli A, Dizzell S, Zahoor MA, Ferreira VH, Kafka J, Woods MW, et al. Interferon- $\beta$  induced in female genital epithelium by HIV-1 glycoprotein 120 via Toll-like-receptor 2 pathway acts to protect the mucosal barrier. *Cell Mol Immunol*. 2019;16(2):178–94.
  250. Bousif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Aug 1;92(16):7297–301.
  251. Nakamura K, Miyazato A, Xiao G, Hatta M, Inden K, Aoyagi T, et al. Deoxynucleic Acids from *Cryptococcus neoformans* Activate Myeloid Dendritic Cells via a TLR9-Dependent Pathway. *J Immunol*. 2008;180(6):4067–74.
  252. Ramirez-Ortiz ZG, Specht CA, Wang JP, Lee CK, Bartholomeu DC, Gazzinelli RT, et al. Toll-like receptor 9-dependent immune activation by unmethylated CpG motifs in *Aspergillus fumigatus* DNA. *Infect Immun*. 2008;76(5):2123–9.
  253. Da Silva RP, Puccia R, Rodrigues ML, Oliveira DL, Joffe LS, César G V., et al. Extracellular vesicle-mediated export of fungal RNA. *Sci Rep*. 2015;5:1–12.
  254. Vargas G, Rocha JDB, Oliveira DL, Albuquerque PC, Frases S, Santos SS, et al. Compositional and immunobiological analyses of extracellular vesicles released by *Candida albicans*. *Cell Microbiol*. 2015;17(3):389–407.
  255. Reales-Calderón JA, Vaz C, Monteoliva L, Molero G, Gil C. *Candida albicans* Modifies the Protein Composition and Size Distribution of THP-1 Macrophage-Derived Extracellular Vesicles. *J Proteome Res*. 2017;16(1):87–105.
  256. Zhang CG, Chromy BA, McCutchen-Maloney SL. Host-pathogen interactions: A proteomic view. *Expert Rev Proteomics*. 2005;2(2):187–202.
  257. Berard AR, Perner M, Mutch S, Farr Zuend C, McQueen P, Burgener AD. Understanding mucosal and microbial functionality of the female reproductive tract by metaproteomics: Implications for HIV transmission. *Am J Reprod Immunol*. 2018;80(2).
  258. Shaw JLV, Smith CR, Diamandis EP. Proteomic analysis of human cervico-vaginal fluid. *J*

- Proteome Res. 2007;6(7):2859–65.
259. Burgener A, Tjernlund A, Kaldensjo T, Abou M, McCorrister S, Westmacott GR, et al. A Systems Biology Examination of the Human Female Genital Tract Shows Compartmentalization of Immune Factor Expression. *J Virol.* 2013;87(9):5141–50.
  260. Birse K, Arnold KB, Novak RM, McCorrister S, Shaw S, Westmacott GR, et al. Molecular Signatures of Immune Activation and Epithelial Barrier Remodeling Are Enhanced during the Luteal Phase of the Menstrual Cycle: Implications for HIV Susceptibility. *J Virol.* 2015;89(17):8793–805.
  261. Evans J, Salamonsen LA. Inflammation, leukocytes and menstruation. *Rev Endocr Metab Disord.* 2012 Dec;13(4):277–88.
  262. Salamonsen LA, Zhang J, Brasted M. Leukocyte networks and human endometrial remodelling. *J Reprod Immunol.* 2002;57(1–2):95–108.
  263. ZHANG X, HE D, GAO S, WEI Y, WANG L. iTRAQ-based proteomic analysis of the interaction of A549 human lung epithelial cells with *Aspergillus fumigatus* conidia. *Mol Med Rep.* 2020;22(6):4601–10.
  264. AYRE JE, CHEVALIER PM, AYRE WB. A comparative study of vaginal and cervical cornification in human subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 1977 Nov;7(11):749–52.
  265. Eckhart L, Lippens S, Tschachler E, Declercq W. Cell death by cornification. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2013;1833(12):3471–80.
  266. Zevin AS, Xie IY, Birse K, Arnold K, Romas L, Westmacott G, et al. Microbiome Composition and Function Drives Wound-Healing Impairment in the Female Genital Tract. *PLoS Pathog.* 2016;12(9):1–20.
  267. Tisoncik JR, Billharz R, Burmakina S, Belisle SE, Proll SC, Korth MJ, et al. The NS1 protein of influenza A virus suppresses interferon-regulated activation of antigen presentation and immune-proteasome pathways. *J Gen Virol.* 2011;92(9):2093–104.
  268. Haye K, Burmakina S, Moran T, García-Sastre A, Fernandez-Sesma A. The NS1 Protein of a Human Influenza Virus Inhibits Type I Interferon Production and the Induction of Antiviral Responses in Primary Human Dendritic and Respiratory Epithelial Cells. *J Virol.* 2009;83(13):6849–62.
  269. Albert M, Bécares M, Falqui M, Fernández-Lozano C, Guerra S. ISG15, a small molecule with huge implications: Regulation of mitochondrial homeostasis. *Viruses.* 2018;10(11).
  270. Lee S, Hirohama M, Noguchi M, Nagata K, Kawaguchi A. Influenza A Virus Infection Triggers Pyroptosis and Apoptosis of Respiratory Epithelial Cells through the Type I Interferon Signaling Pathway in a Mutually Exclusive Manner. *J Virol.* 2018;92(14):1–11.
  271. Bosinger SE, Utay NS. Type I Interferon: Understanding Its Role in HIV Pathogenesis and Therapy. *Curr HIV/AIDS Rep.* 2015 Mar 8;12(1):41–53.
  272. Perng YC, Lenschow DJ. ISG15 in antiviral immunity and beyond. *Nat Rev Microbiol.* 2018;16(7):423–39.
  273. Owhashi M, Taoka Y, Ishii K, Nakazawa S, Uemura H, Kambara H. Identification of a ubiquitin family protein as a novel neutrophil chemotactic factor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;309(3):533–9.
  274. Napolitano A, van der Veen AG, Bunyan M, Borg A, Frith D, Howell S, et al. Cysteine-Reactive Free ISG15 Generates IL-1 $\beta$ -Producing CD8 $\alpha$  + Dendritic Cells at the Site of Infection. *J Immunol.* 2018;201(2):604–14.
  275. Dong C, Gao N, Ross BX, Yu FSX. ISG15 in host defense against *Candida albicans* infection in a mouse model of fungal keratitis. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2017;58(7):2948–58.
  276. Green R, Lorsch JR. The path to perdition is paved with protons. *Cell.* 2002;110(6):665–8.
  277. Schmidt RL, Simonović M. Synthesis and decoding of selenocysteine and human health. *Croat Med J.* 2012;53(6):535–50.
  278. Kash JC, Goodman AG, Korth MJ, Katze MG. Hijacking of the host-cell response and

- translational control during influenza virus infection. *Virus Res.* 2006;119(1):111–20.
279. Li MMH, MacDonald MR, Rice CM. To translate, or not to translate: Viral and host mRNA regulation by interferon-stimulated genes. *Trends Cell Biol.* 2015;25(6):320–9.
280. Morales DJ, Lenschow DJ. The antiviral activities of ISG15. *J Mol Biol.* 2013;425(24):4995–5008.
281. Taylor PR, Tsoni SV, Willment JA, Dennehy KM, Rosas M, Findon H, et al. Dectin-1 is required for  $\beta$ -glucan recognition and control of fungal infection. *Nat Immunol.* 2007;8(1):31–8.
282. Filler SG. Insights from human studies into the host defense against candidiasis. *Cytokine.* 2012 Apr;58(1):129–32.
283. Höft MA, Hoving JC, Brown GD. Signaling C-Type Lectin Receptors in Antifungal Immunity. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2020;429:63–101.
284. Montserrat Martínez-Gomariz, Perumal P, Mekala S, Nombela C, Chaffin WLJ, Gil C. Proteomic analysis of cytoplasmic and surface proteins from yeast cells, hyphae, and biofilms of *Candida albicans*. *Proteomics.* 2009;9(8):2230–52.
285. Gil-Bona A, Llama-Palacios A, Parra CM, Vivanco F, Nombela C, Monteoliva L, et al. Proteomics unravels extracellular vesicles as carriers of classical cytoplasmic proteins in *Candida albicans*. *J Proteome Res.* 2015;14(1):142–53.
286. Gil-Bona A, Amador-García A, Gil C, Monteoliva L. The external face of *Candida albicans*: A proteomic view of the cell surface and the extracellular environment. *J Proteomics.* 2018;180(May 2017):70–9.
287. Hernández ML, Ximénez-Embún P, Martínez-Gomariz M, Gutiérrez-Blázquez MD, Nombela C, Gil C. Identification of *Candida albicans* exposed surface proteins in vivo by a rapid proteomic approach. *J Proteomics.* 2010 May 7;73(7):1404–9.
288. Reales-Calderón JA, Martínez-Solano L, Martínez-Gomariz M, Nombela C, Molero G, Gil C. Sub-proteomic study on macrophage response to *Candida albicans* unravels new proteins involved in the host defense against the fungus. *J Proteomics.* 2012;75(15):4734–46.
289. Zhang Q, Li J, Xie H, Xue H, Wang Y. A network-based pathway-expanding approach for pathway analysis. *BMC Bioinformatics.* 2016;17(Suppl 17).
290. Lee AJ, Ashkar AA. The dual nature of type I and type II interferons. *Front Immunol.* 2018;9(SEP):1–10.
291. Schreiber G. The molecular basis for differential type I interferon signaling. *J Biol Chem.* 2017;292(18):7285–94.
292. Crow MK, Ronnblom L. Type I interferons in host defence and inflammatory diseases. *Lupus Sci Med.* 2019;6(1):1–10.
293. Duerr CU, McCarthy CDA, Mindt BC, Rubio M, Meli AP, Pothlichet J, et al. Type I interferon restricts type 2 immunopathology through the regulation of group 2 innate lymphoid cells. *Nat Immunol.* 2016 Jan;17(1):65–75.
294. González-Navajas JM, Lee J, David M, Raz E. Immunomodulatory functions of type I interferons. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(2):125–35.
295. Piconese S, Pacella I, Timperi E, Barnaba V. Divergent effects of type-I interferons on regulatory T cells. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015;26(2):133–41.
296. Pott J, Stockinger S. Type I and III interferon in the gut: Tight balance between host protection and immunopathology. *Front Immunol.* 2017;8(MAR):1–15.
297. Broggi A, Granucci F, Zanoni I. Type III interferons: Balancing tissue tolerance and resistance to pathogen invasion. *J Exp Med.* 2020;217(1):1–12.
298. Espinosa V, Dutta O, McElrath C, Du P, Chang Y-J, Cicciarelli B, et al. Type III interferon is a critical regulator of innate antifungal immunity. *Sci Immunol.* 2017 Oct 6;2(16):eaan5357.
299. Fung KY, Mangan NE, Cumming H, Horvat JC, Mayall JR, Stifter SA, et al. Interferon-

- epsilon Protects the Female Reproductive Tract from Viral and Bacterial Infection. *Science* (80- ). 2013 Mar 1;339(6123):1088–92.
300. De Luca A, Zelante T, D'Angelo C, Zagarella S, Fallarino F, Spreca A, et al. IL-22 defines a novel immune pathway of antifungal resistance. *Mucosal Immunol*. 2010;3(4):361–73.
301. De Luca A, Carvalho A, Cunha C, Iannitti RG, Pitzurra L, Giovannini G, et al. IL-22 and IDO1 Affect Immunity and Tolerance to Murine and Human Vaginal Candidiasis. *PLoS Pathog*. 2013;9(7).
302. Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(3):170–81.
303. Wormley J, Chaiban J, Fidel J. Cell adhesion molecule and lymphocyte activation marker expression during experimental vaginal candidiasis. *Infect Immun*. 2001;69(8):5072–9.
304. Wormley J, Steele C, Wozniak K, Fujihashi K, McGhee JR, Fidel J. Resistance of T-cell receptor  $\delta$ -chain-deficient mice to experimental *Candida albicans* vaginitis. *Infect Immun*. 2001;69(11):7162–4.
305. Labzin LI, Lauterbach MAR, Latz E. Interferons and inflammasomes: Cooperation and counterregulation in disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138(1):37–46.
306. Gabrielli E, Pericolini E, Luciano E, Sabbatini S, Roselletti E, Perito S, 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.
307. Viganò E, Mortellaro A. Caspase-11: The driving factor for noncanonical inflammasomes. *Eur J Immunol*. 2013;43(9):2240–5.
308. Broz P, Monack DM. Noncanonical Inflammasomes: Caspase-11 Activation and Effector Mechanisms. *PLoS Pathog*. 2013;9(2):9–12.
309. Rutz S, Ouyang W. Regulation of Interleukin-10 Expression. In 2016. p. 89–116. Available from: [http://link.springer.com/10.1007/978-94-024-0921-5\\_5](http://link.springer.com/10.1007/978-94-024-0921-5_5)
310. Marks E, Tam MA, Lycke NY. The female lower genital tract is a privileged compartment with IL-10 producing dendritic cells and poor Th1 immunity following *Chlamydia trachomatis* infection. *PLoS Pathog*. 2010;6(11).
311. Sobel JD, Kapernick PS, Zervos M, Reed BD, Hooton T, Soper D, et al. Treatment of complicated *Candida* vaginitis: comparison of single and sequential doses of fluconazole. *Am J Obstet Gynecol*. 2001 Aug;185(2):363–9.
312. Verma A, Wüthrich M, Deepe G, Klein B, Giri G. Adaptive immunity to fungi. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015;5(3).
313. Romagnoli G, Nisini R, Chiani P, Mariotti S, Teloni R, Cassone A, et al. The interaction of human dendritic cells with yeast and germ-tube forms of *Candida albicans* leads to efficient fungal processing, dendritic cell maturation, and acquisition of a Th1 response-promoting function. *J Leukoc Biol*. 2004 Jan;75(1):117–26.
314. Conti HR, Gaffen SL. Host responses to *Candida albicans*: Th17 cells and mucosal candidiasis. *Microbes Infect*. 2010;12(7):518–27.
315. Carvalho A, Giovannini G, De Luca A, D'Angelo C, Casagrande A, Iannitti RG, et al. Dectin-1 isoforms contribute to distinct Th1/Th17 cell activation in mucosal candidiasis. *Cell Mol Immunol*. 2012;9(3):276–86.
316. LeBlanc DM, Barousse MM, Fidel PL. Role for dendritic cells in immunoregulation during experimental vaginal candidiasis. *Infect Immun*. 2006;74(6):3213–21.
317. Lu L, Bonham CA, Liang X, Chen Z, Li W, Wang L, et al. Liver-Derived DEC205 + B220 + CD19 – Dendritic Cells Regulate T Cell Responses. *J Immunol*. 2001 Jun 15;166(12):7042–52.
318. Trinchieri G. Type I interferon: Friend or foe? *J Exp Med*. 2010;207(10):2053–63.
319. Desbrien AL. Analysis of the innate response to adjuvants: Characterization of the draining lymph node by fluorescence-activated cell sorting. *Methods Mol Biol*. 2017;1494:305–12.
320. Whitney PG, Bär E, Osorio F, Rogers NC, Schraml BU, Deddouche S, et al. Syk Signaling in

- Dendritic Cells Orchestrates Innate Resistance to Systemic Fungal Infection. Gaffen S, editor. *PLoS Pathog.* 2014 Jul 17;10(7):e1004276.
321. Cunningham CR, Champhekar A, Tullius M V., Dillon BJ, Zhen A, de la Fuente JR, et al. Type I and Type II Interferon Coordinately Regulate Suppressive Dendritic Cell Fate and Function during Viral Persistence. *PLoS Pathog.* 2016;12(1):1–26.
  322. Teijaro JR, Ng C, Lee AM, Sullivan BM, Sheehan KCF, Welch M, et al. Persistent LCMV infection is controlled by blockade of type I interferon signaling. *Science.* 2013 Apr 12;340(6129):207–11.
  323. Wilson EB, Kidani Y, Elsaesser H, Barnard J, Raff L, Karp CL, et al. Emergence of Distinct Multiarmed Immunoregulatory Antigen-Presenting Cells during Persistent Viral Infection. *Cell Host Microbe.* 2012 May;11(5):481–91.
  324. Read S, Malmström V, Powrie F. Cytotoxic T Lymphocyte–Associated Antigen 4 Plays an Essential Role in the Function of Cd25+Cd4+ Regulatory Cells That Control Intestinal Inflammation. *J Exp Med.* 2000 Jul 17;192(2):295–302.
  325. Kole A, He J, Rivollier A, Silveira DD, Kitamura K, Maloy KJ, et al. Type I IFNs Regulate Effector and Regulatory T Cell Accumulation and Anti-Inflammatory Cytokine Production during T Cell–Mediated Colitis. *J Immunol.* 2013;191(5):2771–9.
  326. Pace L, Vitale S, Dettori B, Palombi C, La Sorsa V, Belardelli F, et al. APC activation by IFN- $\alpha$  decreases regulatory T cell and enhances Th cell functions. *J Immunol.* 2010 Jun 1;184(11):5969–79.
  327. Bacher N, Raker V, Hofmann C, Graulich E, Schwenk M, Baumgrass R, et al. Interferon- $\alpha$  suppresses cAMP to disarm human regulatory T cells. *Cancer Res.* 2013 Sep 15;73(18):5647–56.
  328. Franceschini D, Paroli M, Francavilla V, Videtta M, Morrone S, Labbadia G, et al. PD-L1 negatively regulates CD4+CD25+Foxp3+ Tregs by limiting STAT-5 phosphorylation in patients chronically infected with HCV. *J Clin Invest.* 2009 Mar;119(3):551–64.
  329. Hassanzadeh-Kiabi N, Yáñez A, Dang I, Martins GA, Underhill DM, Goodridge HS. Autocrine Type I IFN Signaling in Dendritic Cells Stimulated with Fungal  $\beta$ -Glucans or Lipopolysaccharide Promotes CD8 T Cell Activation. *J Immunol.* 2017 Jan 1;198(1):375–82.
  330. Petricoin EF, Ito S, Williams BL, Audet S, Stancato LF, Gamero A, et al. Antiproliferative action of interferon- $\alpha$  requires components of T-cell-receptor signalling. *Nature.* 1997 Dec 11;390(6660):629–32.
  331. Marshall HD, Urban SL, Welsh RM. Virus-Induced Transient Immune Suppression and the Inhibition of T Cell Proliferation by Type I Interferon. *J Virol.* 2011;85(12):5929–39.
  332. Tanabe Y, Nishibori T, Su L, Arduini RM, Baker DP, David M. Cutting Edge: Role of STAT1, STAT3, and STAT5 in IFN- $\alpha\beta$  Responses in T Lymphocytes. *J Immunol.* 2005 Jan 15;174(2):609–13.
  333. van de Veerdonk FL, Plantinga TS, Hoischen A, Smeekens SP, Joosten LAB, Gilissen C, et al. STAT1 mutations in autosomal dominant chronic mucocutaneous candidiasis. *N Engl J Med.* 2011 Jul 7;365(1):54–61.
  334. Smeekens SP, Plantinga TS, van de Veerdonk FL, Heinhuis B, Hoischen A, Joosten LAB, et al. STAT1 hyperphosphorylation and defective IL12R/IL23R signaling underlie defective immunity in autosomal dominant chronic mucocutaneous candidiasis. *PLoS One.* 2011;6(12):e29248.
  335. Durelli L, Conti L, Clerico M, Boselli D, Contessa G, Ripellino P, et al. T-helper 17 cells expand in multiple sclerosis and are inhibited by interferon- $\beta$ . *Ann Neurol.* 2009 May;65(5):499–509.
  336. Ramgolam VS, Sha Y, Jin J, Zhang X, Markovic-Plese S. IFN- $\beta$  Inhibits Human Th17 Cell Differentiation. *J Immunol.* 2009;183(8):5418–27.
  337. 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 Jan;53(1):112–22.
338. Rabinovich G, Iglesias M, Modesti N, Castagna L, Wolfenstein-Todel C, Riera C, et al. Activated rat macrophages produce a galectin-1-like protein that induces apoptosis of T cells: biochemical and functional characterization. *J Immunol.* 1998;160(10):4831–40.
339. Panzetta ME, Luján AL, Bastidas RJ, Damiani MT, Valdivia RH, Saka HA. Ptr/CTL0175 Is Required for the Efficient Recovery of *Chlamydia trachomatis* From Stress Induced by Gamma-Interferon. *Front Microbiol.* 2019;10:756.
340. Renna MS, Figueredo CM, Rodríguez-Galán MC, Icelly PA, Peralta Ramos JM, Correa SG, et al. Abrogation of spontaneous liver tolerance during immune response to *Candida albicans*: contribution of NKT and hepatic mononuclear cells. *Int Immunol.* 2012 May;24(5):315–25.
341. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.* 2008;3(6):1101–8.
342. Deutsch EW, Csordas A, Sun Z, Jarnuczak A, Perez-Riverol Y, Ternent T, et al. The ProteomeXchange consortium in 2017: supporting the cultural change in proteomics public data deposition. *Nucleic Acids Res.* 2017 Jan 4;45(D1):D1100–6.
343. Rodero CF, Fioramonti Calixto GM, Cristina Dos Santos K, Sato MR, Aparecido Dos Santos Ramos M, Miró MS, et al. Curcumin-Loaded Liquid Crystalline Systems for Controlled Drug Release and Improved Treatment of Vulvovaginal Candidiasis. *Mol Pharm.* 2018;15(10):4491–504.
344. Renna MS, Figueredo CM, Rodríguez-Galán MC, Icelly PA, Cejas H, Cano R, et al. *Candida albicans* up-regulates the Fas-L expression in liver Natural Killer and Natural Killer T cells. *Immunobiology.* 2015 Nov;220(11):1210–8.
345. Baez NS, Cerbán F, Savid-Frontera C, Hodge DL, Tosello J, Acosta-Rodriguez E, et al. Thymic expression of IL-4 and IL-15 after systemic inflammatory or infectious Th1 disease processes induce the acquisition of “innate” characteristics during CD8+ T cell development. Sacks D, editor. *PLOS Pathog.* 2019 Jan 4;15(1):e1007456.

# **PRODUCCIÓN CIENTÍFICA**

## Publicaciones en revistas con referato

- Miró MS, **Rodríguez E**, Caeiro JP, Vargas L, Vigezzi C, Icely PA, Castillo CV, Azcurra A, Riera F, Sotomayor CE. **Beta Defensin 1 in Host Response during Vulvovaginal Candidiasis.** *The Journal of Infectious Diseases.* Enviado.
- Icely PA, Vigezzi C, **Rodríguez E**, Miró MS, Salido Renteria B, Sotomayor CE. *Candida albicans* Activation of Human Monocytes Toward M2 Profile is Reversed by Amphotericin B and Fluconazole. *J Bacteriol Mycol.* 2021; 8(2): 1168.
- Vigezzi C, Riera FO, **Rodríguez E**, Icely PA, Miró MS, Figueredo CM, Caeiro JP, Sotomayor CE. **Candidiasis invasora: un enfoque a la infección en el sistema nervioso central.** *Rev Argent Microbiol.* 2020 Aug 4:S0325-7541(20)30056-0.
- Vigezzi C, Icely PA, Dudiuk C, **Rodríguez E**, Miró MS, Castillo GV, Azcurra AI, Abiega C, Caeiro JP, Riera FO, García-Effron G, Sotomayor CE. **Frequency, virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis* species complex isolated from patients with candidemia in the central region of Argentina.** *Journal de Mycologie Médicale.* 2019 Oct 15. doi:10.1016/j.mycmed.2019.100907
- Rodero CF, Fioramonti Calixto GM, Cristina Dos Santos K, Sato MR, Aparecido Dos Santos Ramos M, Miró MS, **Rodríguez E**, Vigezzi C, Bauab TM, Sotomayor CE, Chorilli M. **Curcumin-Loaded Liquid Crystalline Systems for Controlled Drug Release and Improved Treatment of Vulvovaginal Candidiasis.** *Mol Pharm.* 2018 Sep 14. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.8b00507
- Miró MS, **Rodríguez E**, Vigezzi C, Icely PA, García LN, Painetti N, Maldonado CA, Riera FO, Caeiro JP, Sotomayor CE. **Contribution of TLR2 pathway in the pathogenesis of Vulvovaginal Candidiasis.** *Pathogens and Disease.* 2017 Sep 29; 75(7).
- Miró MS, **Rodríguez E**, Vigezzi C, Icely PA, Gonzaga de Freitas Araújo M, Riera FO, Vargas L, Abiega C, Caeiro JP, Sotomayor CE. **Vulvovaginal Candidiasis: An old disease with new challenges.** *Revista Iberoamericana de Micología.* 2017; 34(2):65-71.
- Miró MS, Vigezzi C, **Rodríguez E**, Icely PA, Caeiro JP, Riera F, Masih DT, Sotomayor CE. **Innate receptors and IL-17 in immune response against human fungal pathogens.** *Revista Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.* 2016; 73 (3):188-196.

### En redacción:

- **Rodríguez E**, Angiolini SC, Miró MS, Vigezzi C, Icely PA, Gil García C, Sotomayor CE. **Quantitative study of the differential protein expression in Epithelial Cells of the female genital tract after *C. albicans* interaction.** Manuscrito en preparación.
- **Rodríguez E**, Savid-Frontera C, Miró MS, Angiolini SC, Vigezzi C, Icely PA, Rodríguez-Galán MC, Sotomayor CE. **Protective role of Type I Interferons in Vulvovaginal Candidiasis.** Manuscrito en preparación.

## Participación en Congresos

### Nacionales

- **Rodríguez E**, Angiolini SC, Vigezzi C, Miró MS, Icely PA, Sotomayor CE. ***C. albicans*  $\beta$ -1,3-glucan activates Type I Interferons pathway on epithelial cells of the female genital tract and modulates the local immune response in Vulvovaginal Candidiasis.**  
LXVII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. San Miguel de Tucumán, Argentina. Del 9 al 11 de octubre de 2019.
- **Rodríguez E**, Vigezzi C, Miró MS, Icely PA, Sotomayor CE. ***Candida albicans* activates Type I Interferons pathway in cells of the female genital tract.**  
LXVI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. Mar del Plata, Argentina. Del 14 al 17 de noviembre de 2018. Revista MEDICINA (Buenos Aires) 2018; Vol. 78 (Supl. III): 164-273.
- **Rodríguez E**, Miró MS, Vigezzi C, Cejas H, Icely PA, Sotomayor CE. **Type I Interferons pathway has a relevant role during the course of Vulvovaginal Candidiasis.**  
Reunión Conjunta de Sociedades de Biociencias. LXV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. Buenos Aires, Argentina. Del 13 al 17 de noviembre de 2017. Revista MEDICINA (Buenos Aires) 2017; Vol. 77 (Supl. I): 531-616.
- **Rodríguez E**, Vigezzi C, Miró MS, Icely PA, Gatti G, Maccioni M, Sotomayor CE. ***Candida albicans* induces IFN $\beta$  expression in epithelial cells of the female genital tract.**  
LXIV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. Del 16 al 19 de noviembre de 2016. Revista MEDICINA (Buenos Aires) 2016; Vol. 76, (Supl. I): 182-335
- **Rodríguez E**, Dudiuk C, Miró MS, Gamarra S, Vigezzi C, Icely PA, Riera FO, Caeiro JP, García-Effrón G, Sotomayor CE. **Rol de las subunidades FKSp del complejo 1,3- $\beta$ -D glucansintasa de *Candida glabrata* sobre la producción de biofilm y la interacción con células inmunes.**

XVI Congreso de la Sociedad Argentina de Infectología-SADI 2016. Mendoza, Argentina. Del 22 al 24 de mayo de 2016. **Poster seleccionado para su presentación oral por el comité científico del Congreso.**

- **Rodriguez E**, Miró MS, Vigezzi C, Cejas H, Icely PA, Sotomayor CE. **Increased susceptibility of Caspase-1 deficient mice to vaginal infection with a low virulent *Candida albicans* strain.**  
IV LASID meeting. LXIII Argentinean Immunology Society Meeting. II-French-Argentinean Immunology Meeting. Buenos Aires, Argentina. Del 18 al 21 de noviembre de 2015.

### **Internacionales**

- **Rodriguez E**, Angiolini SC, Miró MS, Vigezzi C, Icely PA, Riera FO, Caeiro JP, Sotomayor CE. **Protective Role of Type I Interferons in Vulvovaginal Candidiasis.**  
17th INFOCUS and 1st ISHAM Latin American Congress. Salvador de Bahía, Brasil. Del 13 al 16 de noviembre de 2019.
- **Rodriguez E**, Miró MS, Vigezzi C, Icely PA, Vargas L, Caeiro JP, Cejas H, Sotomayor CE. **Type I interferons pathway in Vulvovaginal Candidiasis.** Advanced Course on Mucosal Immunology. Los Cocos, Córdoba, Argentina. Del 22 al 27 de octubre de 2018.
- **Rodriguez E**, Miró MS, Vigezzi C, Icely PA, Maccioni M, Riera FO, Caeiro JP, Sotomayor CE. **Epithelial cells of female genital tract mount a Type I Interferon response against *Candida albicans*.**  
15th INFOCUS. Curitiba, Brasil. Noviembre 2017.
- **Rodriguez E**, Icely PA, Miró MS, Castillo G, Azcurra AI, Vigezzi C, Vargas L, Abiega C, Riera FO, Caeiro JP, Sotomayor CE. **Virulence factors of *Candida* species isolated from invasive and non-invasive infections: Biofilm formation and cell surface hydrophobicity.**  
XIV Forum on Fungal Infection in the Clinical Practice. INFOCUS 2016. Santiago de Chile, Chile. Del 13 al 15 de noviembre de 2016.