

## RECEPTORES INNATOS E IL-17 EN LA RESPUESTA INMUNE FRENTE A HONGOS PATÓGENOS HUMANOS.

### INNATE RECEPTORS AND IL-17 IN THE IMMUNE RESPONSE AGAINST HUMAN PATHOGENIC FUNGI

María Soledad Miró<sup>1</sup>, Cecilia Vigezzi<sup>1</sup>, Emilse Rodríguez<sup>1</sup>, Paula Alejandra Icely<sup>1</sup>, Juan Pablo Caeiro<sup>3</sup>, Fernando Riera<sup>4</sup>, Diana Teresa Masih<sup>2</sup>, Claudia Elena Sotomayor<sup>1,5</sup>.

#### Resumen:

Durante los últimos años, el aumento de las infecciones fúngicas invasivas en humanos, emerge asociado a la falta de diagnóstico precoz, terapias antifúngicas efectivas y al desarrollo de vacunas. Perturbaciones en la homeostasis inmune debido a intervenciones médicas o a estados de inmunosupresión inducidos por diferentes enfermedades, son conocidos factores de riesgo para la adquisición de estas micosis. Las células del sistema inmune innato están equipadas con receptores de superficie y citoplasmáticos que permiten el reconocimiento de diferentes microorganismos y que colectivamente han sido denominados Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRRs). Estos PRRs reconocen estructuras altamente conservadas en los microorganismos identificadas como Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs), que son claves para la activación del sistema inmune y la inducción de muerte de estos patógenos fúngicos. Esta revisión explora el rol de los PRRs, la participación de diferentes células en el desarrollo de una respuesta efectiva, con especial foco en la contribución de la IL-17 en la inmunidad antifúngica. La presencia de mutaciones naturales en humanos que confieren susceptibilidad a infecciones por hongos, su implicancia clínica y su aporte al conocimiento de la etiopatogenia de estas micosis es abordada en este artículo.

*Palabras clave:* infecciones fúngicas humanas; inmunidad antifúngica; receptores innatos; Dectin-1; inflamomas; IL-17.

#### Abstract:

In recent years, the rise of human fungal infections has been associated to lack of early diagnosis, uneffective antifungal therapies and vaccines. Disturbance in immune homeostasis, which can be caused by medical interventions and immunosuppression induced by disease, are well known as risk factors for these pathologies. Cells of the innate immune system are equipped with surface and cytoplasmic receptors for recognition of microorganisms called pattern recognition receptors (PRRs). PRRs recognize specific pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) that are crucial for the activation and killing of pathogenic fungi by immune system. This review will outline the PRRs and cells required for effective antifungal immunity, with a special focus on the major antifungal cytokine IL-17. Finally, naturally occurring human mutations involved in the increased susceptibility to fungal infections are also discussed.

*Keywords:* human fungal infections; antifungal immunity; innate receptors; Dectin-1, Inflamomas; IL-17.

1 Inmunología,

2 Parasitología y Micología. Departamento de Bioquímica Clínica- Centro de investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología-CIBICI- CONICET. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

3 Infectología Hospital Privado. 4Infectología Sanatorio Allende.

5 Email de contacto: [csotomay@fcq.unc.edu.ar](mailto:csotomay@fcq.unc.edu.ar)

## Introducción

Las infecciones fúngicas invasivas presentan un elevado índice de morbilidad y mortalidad. Las fallas en el diagnóstico, la dificultad de su tratamiento y la falta de nuevas estrategias terapéuticas y desarrollo de vacunas, transforman a este tipo de patologías en un problema creciente en la salud pública<sup>1,2</sup>.

Los factores de riesgo asociados a la elevada incidencia de este tipo de infecciones son numerosos y variados. Las causas primarias, se atribuyen sin dudas al número creciente de individuos inmunocomprometidos. Este grupo de pacientes no sólo incluye a individuos con inmunodeficiencias primarias o secundarias propiamente dichas, sino además a aquellos estados de vulnerabilidad asociados al tratamiento de enfermedades oncológicas, cirugías de alta complejidad y trasplante de órganos<sup>1,3</sup>. La permanencia de pacientes en unidades hospitalarias de cuidados críticos, el uso de catéteres de vía central y el empleo de antibióticos de amplio espectro contribuyen también a la aparición de este tipo de micosis. Recientemente, ciertas infecciones fúngicas emergen asociadas a enfermedades clasificadas como patologías con hiperactividad inmune, tales como el Síndrome Inflamatorio de Reconstitución (IRIS), una entidad caracterizada por inflamaciones locales o sistémicas que pueden presentar formas latentes de micosis oportunistas<sup>4</sup>.

La mayoría de los hongos son ubicuos en el medio ambiente y los individuos están expuestos por inhalación a formas o elementos fúngicos pequeños como esporos o células de levadura. Entre los hongos comunes productores de micosis profundas se encuentran *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans* y hongos dimórficos termales tales como: *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitides*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis*, *Penicillium marneffeii* y *Sporothrix schenckii*. Estos microorganismos presentan tropismo por diferentes órganos y pueden dar origen a distintas enfermedades. A excepción de *C. neoformans* (hongo monomorfo), en la mayoría de este grupo de patógenos la fase hifal se encuentra asociada al estado de vida libre del hongo, mientras que la fase levaduriforme a la localización tisular en el hospedador. Las infecciones por *Candida albicans* presentan características particulares, debido a que su hábitat como comensal lo constituyen la piel, superficies mucosas y tracto gastrointestinal. Mientras que para la mayoría de los agentes fúngicos mencionados la fuente de infección es exógena, para *C. albicans* el reservorio natural lo constituye el propio individuo<sup>5,6</sup>.

Los hongos pueden interactuar de diversas maneras con su hospedador, estableciendo relaciones simbióticas, comensales, latentes o patogénicas<sup>5</sup>. Su capacidad para colonizar e infectar el cuerpo humano involucra la reprogramación de eventos moleculares que le permitan adaptarse a las nuevas condiciones ambientales. Las aproximaciones genómicas y transcripcionales han revelado una fuerte asociación entre el metabolismo fúngico, la morfogénesis y la respuesta al estrés durante el proceso de adaptación al ambiente del hospedador<sup>7,8</sup>. Las formas levaduriformes e hifales de los hongos dimórficos termales tienen atributos que contribuyen a la infectividad fúngica. En el caso de *Candida* se demostró que muchos de los genes que codifican para factores de virulencia y cambios fenotípicos son coregulados con la morfogénesis celular<sup>8</sup>. *C. neoformans* y *C. gattii*, agentes etiológicos de criptococosis, se distinguen de otras levaduras patógenas como *Candida* por la presencia de una cápsula de polisacáridos, formación de melanina y actividad de ureasa, consideradas importantes determinantes de virulencia<sup>9</sup>. La producción de enzimas hidrolíticas liberadas por estos microorganismos como proteasas, fosfolipasas, lipasas, etc. que pueden actuar degradando componentes de la matriz extracelular, mediadores inmunes, membranas celulares o tener como blanco sustratos metabólicos relevantes para la sobrevivencia de estos patógenos<sup>10-12</sup>. Ciertos hongos además poseen la capacidad de crecer en comunidades formando biofilms. La coexistencia de formas fúngicas con diferentes estados metabólicos rodeadas por los componentes de la matriz, constituye una forma de crecimiento protegida que impide el acceso de células y mediadores inmunes para la remoción de los microorganismos. Los factores de virulencia también pueden ser liberados a partir del biofilm y provocar daño e injuria celular<sup>13</sup>. Adicionalmente esta forma de crecimiento genera resistencia a las drogas antifúngica.

Los aspectos señalados evidencian que el mantenimiento de una saludable interacción hongo-hospedador se encuentra sostenido por un complejo y delicado equilibrio de factores interconectados sobre el cual, diferentes causas pueden promover su desbalance y determinar la evolución a la enfermedad.

## Reconocimiento de los hongos por el sistema inmune innato

El sistema inmune innato constituye la primera línea de defensa del organismo frente a los patógenos. Codificados a nivel de la línea germinal, los denominados Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRRs), son empleados por las células de la inmunidad innata para reconocer estructuras altamente conservadas presentes en los microorganismos, colectivamente llamados Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs). El reconocimiento de los PAMPs fúngicos por los PRRs provoca en las células inmunes la inducción de vías intracelulares que promueven su activación, la producción de

diferentes mediadores y la inducción de funciones efectoras. Esta etapa de reconocimiento también es importante en el establecimiento del inicio de la respuesta inmune adaptativa y es fundamental en la definición de su perfil.

Este sistema de reconocimiento innato permite discriminar entre aquellos elementos fúngicos de hongos comensales frente a los que el sistema inmune debe permanecer tolerante, de aquellos otros provenientes de agentes patogénicos frente a los cuales debe ejercer una eficiente protección<sup>14</sup>. Las complejas interacciones entre el hongo y su hospedador comienzan en la interface célula-célula. La célula fúngica difiere de la célula del huésped principalmente por la presencia de una pared que rodea a la membrana plasmática. Los tres componentes mayoritarios de la pared y que se encuentran presentes en todos los hongos de importancia médica son: la quitina, los  $\alpha$  y  $\beta$  glucanos y los mananos<sup>15</sup>. La composición de la pared varía ampliamente entre los diferentes hongos, así por ejemplo la pared de *C. albicans*, está compuesta por una capa de k-(1,3)-glucanos ligados a  $\beta$ -(1,6)-glucanos y quitina, en la cual los O-mananos, los N-mananos y las proteínas se encuentran inmersas. *H. capsulatum* expresa una única forma de  $\alpha$ -(1,3)-glucanos que recubre una capa interna de  $\beta$ -glucanos. La composición de la pared de los hongos puede variar asociada a la prevalencia del morfotipo levaduriforme o al crecimiento micelial, como así también después de la división celular, la morfogénesis o la exposición a drogas antifúngicas. En algunos hongos, los PAMPs presentes en su pared pueden estar enmascarados por estructuras inertes tales como  $\alpha$ -glucanos en el caso de *H. capsulatum*, o por la presencia de hidrofobinas como ocurre con *A. fumigatus*<sup>16</sup>.

Fragmentos de ARN y ADN fúngico también pueden comportarse como PAMPs y ser reconocidos por receptores de la inmunidad innata. Recientemente se describió que ciertos factores de virulencia como las Aspartatoproteinasas SAP4 y SAP6, enzimas hidrolíticas liberadas por *C. albicans*, promueven la activación de PRRs solubles ubicados en el citosol de células macrofágicas<sup>17</sup>. Estos diversos ejemplos ilustran la habilidad del sistema inmune innato de “sensar” elementos provenientes de los patógenos. Durante el curso de una infección fúngica, numerosos PRRs expresados en las células del hospedador, están involucrados en el reconocimiento de un gran espectro de PAMPs fúngicos<sup>15,16</sup>. La respuesta inmune resultante dependerá no sólo de la estimulación relativa de los PRRs individuales, sino del grado de sinergismo o cooperación entre los receptores innatos y su localización celular.

### Receptores de reconocimiento de patrones

Existen varias familias de PRRs agrupadas en base a su filogenia, estructura y función. Las tres más importantes involucradas en el reconocimiento de los hongos son: los receptores tipo Toll-like (TLR), receptores de lectinas tipo C (CLR) y los receptores tipo NOD (NLR) (Figura 1). Mientras que los TLRs y CLR se encuentran mejor caracterizados y algunos de sus ligandos están identificados, el rol de los NLRs en la respuesta antifúngica se encuentra en las etapas iniciales de su estudio<sup>18,19</sup>. En este escenario, el desarrollo de modelos animales que reproducen patologías observadas en humanos, permiten explorar los mecanismos moleculares y etiopatogénicos desencadenados durante las micosis aportando nuevos conocimientos<sup>20,21</sup>. Experiencias realizadas con cepas de animales deficientes en PRRs, moléculas adaptadores de su señalización, mediadores inmunes o poblaciones celulares permiten obtener conclusiones sobre el rol de los diferentes elementos durante la respuesta. Sin embargo, en los últimos años, un significativo avance en esta temática fue el descubrimiento de mutaciones genéticas en individuos que poseen una mayor susceptibilidad a las infecciones fúngicas, aportando nueva evidencia sobre los mecanismos que participan en el control de las micosis en humanos<sup>22</sup>. La Tabla 1 resume las mutaciones descritas en distintos PRRs y la susceptibilidad frente a infecciones fúngicas.

**Tabla 1.** Mutaciones genéticas asociadas a la susceptibilidad a infecciones fúngicas

Gen	Mutación	Enfermedad Asociada
TLR1	R80T/N248S	Aspergilosis invasiva
TLR4	D299G/T399I	Aspergilosis invasiva, candidiasis sistémica
TLR6	S249P	Aspergilosis invasiva
TLR9	T-1237C	Aspergilosis broncopulmonar alérgica
Dectin-1	Y238X	CMC <sup>a</sup> , aspergilosis
CARD9	Q295X	CMC, dermatofitosis
NLRP3	Polimorfismos de longitud (alelo 7)	CVVR <sup>b</sup>
IL17F	S65L	CMC
IL17RA	Q284X	Dermatitis por <i>C. albicans</i> , dermatitis por <i>S. aureus</i>
AIRE	Alrededor de 60 mutaciones conocidas	APECED <sup>c</sup> : endocrinopatías autoinmunes, hipoparatiroidismo, insuficiencia adrenal, CMC

a Candidiasis Mucocutánea Crónica. b Candidiasis Vulvovaginal Recurrente. c Poliendocrinopatía autoinmune – candidiasis – distrofia ectodérmica

### TLRs.

Los TLRs corresponden a una familia de receptores ubicados estratégicamente en la membrana plasmática y endosomal. Inician su señal intracelular utilizando las proteínas adaptadoras MyD88 o TRIF, las cuales determinan la activación del factor de transcripción NFκB y de los genes reguladores de Interferón (IRS). La respuesta desencadenada mediante la señalización de estos receptores conduce a la producción de Interferones Tipo I (IFNs), citocinas proinflamatorias TNF-α e IL-12 y la promoción de la respuesta inmune adaptativa.

Los TLR 1- 4, 6, 7 y 9 reconocen una amplia variedad de especies fúngicas a través de la interacción con diferentes moléculas no completamente identificadas. Los TLRs más importantes involucrados en el reconocimiento de PAMPs fúngicos son TLR2, TLR4 y TLR9 que reconocen Zymosan, fosfolipomananos, O-mananos, glucuronoxilomananos y DNA fúngico (Figura 1). La contribución de un TLR particular puede variar dependiendo de la especie del hongo, su morfotipo, ruta de ingreso al organismo y la existencia o no de cooperación con otros PRRs<sup>19,23</sup>.

Estudios experimentales y clínicos aportan evidencia sobre el rol de los TLRs en la respuesta a los hongos patógenos. Ratones que carecen de la proteína adaptadora MyD88 presentan una mayor susceptibilidad a las infecciones por *C. neoformans*, *C. albicans*, *A. fumigatus*, *B. dermatitidis* y *P. brasiliensis*<sup>24,25</sup>. Sin embargo, pacientes pediátricos con deficiencia en MyD88 no muestran una mayor susceptibilidad a la adquisición de micosis. Interesantemente, el polimorfismo en TLR1 y TLR4 predispone a la Candidiasis diseminada<sup>27</sup>. En pacientes con trasplantes de células hematopoyéticas alogénicas las mutaciones en TLR4 están asociadas a la susceptibilidad a Aspergilosis Invasiva<sup>28</sup> y polimorfismos en el promotor de TLR9 aumenta el riesgo a la Aspergilosis Broncopulmonar Alérgica<sup>22</sup> (Tabla 1).

Otro rol relevante de esta familia de receptores es su capacidad de modular la respuesta de los CLR. Por ejemplo, TLR2 que reconoce fosfolípidos fúngicos, sinergiza con el receptor Dectin-1 promoviendo la fagocitosis y producción de citocinas por parte de macrófagos<sup>29</sup>.

### CLRs.

Caracterizados por la presencia de un dominio lectina tipo C, los CLRs son una familia de receptores especializados en el reconocimiento de carbohidratos. Sus principales ligandos son β-glucanos y mananos. El interés en estos receptores emerge debido a su importancia en el reconocimiento antifúngico y en la inducción de la inmunidad innata y adaptativa frente a los hongos. Algunos CLRs contienen motivos intracitoplasmáticos que conducen a la activación de cascadas intracelulares, mientras que otros que pierden esos motivos, pueden ser utilizados como proteínas adaptadoras e iniciar procesos de transducción<sup>30</sup>. Pertenecen a este grupo los receptores Dectin-1, Dectin-2, Receptor de Manosa (RM), el receptor de Complemento CR3 y DC-SIGN (Figura 1).

El estudio de Dectin-1 revolucionó la comprensión de las interacciones patógeno-huésped en las infecciones micóticas<sup>29</sup>. Este CLR reconoce β-glucanos presentes en la pared en la mayoría de las especies fúngicas y es necesario para el desarrollo de inmunidad frente a varios patógenos incluyendo especies de *Candida*, *Aspergillus*, *Pneumocystis* y *Coccidioides*. Dectin-1 es expresado principalmente en células mieloides y dirige complejas vías intracelulares caracterizadas por la activación de la SyK (*spleen tyrosine kinase*) y CARD9 (*caspase recruitment domain-containing protein 9*) y la vía que involucra a RAF. Estas vías pueden actuar de manera coordinada y promover la activación del factor nuclear NFκB y la expresión de genes de citocinas<sup>16,18,31</sup>. Las señales generadas conducen a la aparición de múltiples respuestas celulares como fagocitosis, estallido respiratorio, producción de citocinas pro y antiinflamatorias y activación de los inflamasomas. Recientemente este receptor ha sido involucrado en la modulación de la autofagia y en la inducción de IFNs tipo I<sup>32</sup>.

Estudios efectuados en ratones deficientes en el receptor Dectin-1 evidenciaron una elevada mortalidad durante el curso de infecciones diseminadas por *C. albicans* y *A. fumigatus*. Sin embargo, en procesos infecciosos provocados por *Coccidioides immitis* y *P. carinii* la ausencia del receptor sólo tuvo impacto sobre el control de la carga fúngica<sup>18</sup>. Un hito en el estudio de la respuesta antifúngica lo constituyó el primer reporte de una deficiencia funcional en el receptor Dectin-1 descrita en tres hermanas que presentaban una mutación homocigota en posición Y238X y con manifestaciones de CVVR<sup>33</sup>. Esta mutación también determina el aumento del riesgo a la adquisición de Aspergilosis Invasiva posterior a los trasplantes. Otro hallazgo significativo fue la identificación de la mutación Q295X en la molécula adaptadora CARD-9, que determina la producción de una proteína truncada que es incapaz de transmitir la señales generadas por Dectin-1. La mutación fue descrita en los miembros de una gran familia cosanguínea de origen iraní, en la que los individuos homocigotas presentaban formas recurrentes de candidiasis orofaríngea y/o CVVR. Además algunos miembros desarrollaron formas fatales de neurocandidiasis. Este estudio evidenció la importancia de esta molécula adaptadora en la respuesta tanto a nivel del tracto mucoso como en la forma diseminada de la enfermedad<sup>34</sup>.

Bajo la denominación de Dectin-2 se incluyen a un grupo receptores entre los que se destacan: Dectin-2, Dectin-3 y Mincle. Dectin-2 reconoce estructuras altamente manosiladas que son comunes en las paredes de los hongos, recientemente también se identificaron como sus ligandos  $\alpha$ -manosa y glicoproteínas ricas en residuos de  $\alpha$ -manosa<sup>30</sup>. Este receptor participa del reconocimiento de especies como *C. albicans*, *P. brasiliensis*, *A. fumigatus* y *Malassezia*<sup>35</sup>.

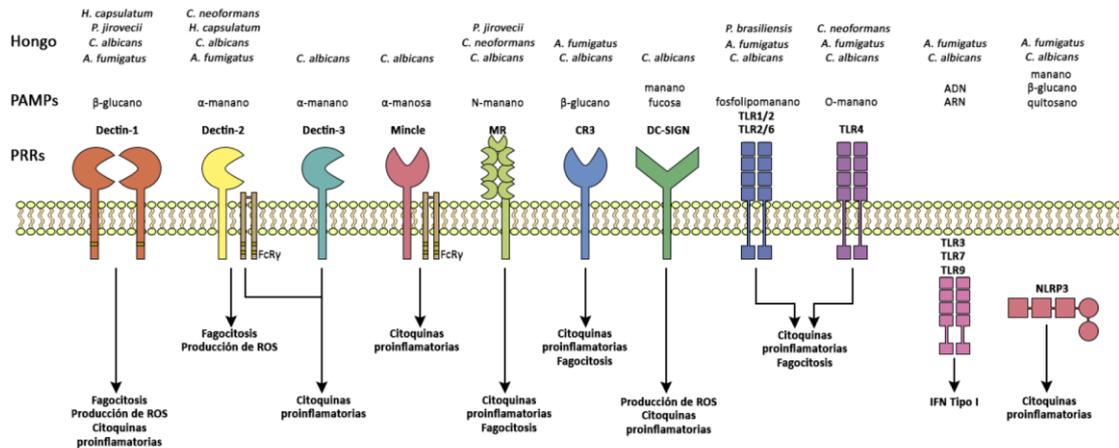


Figura 1. Receptores de la inmunidad innata involucrados en el reconocimiento fúngico

El RM promueve la endocitosis de por parte de las células dendríticas (DC) de moléculas fúngicas manosiladas, favoreciendo su procesamiento y la presentación antigénica a los Li T. Su activación induce la secreción de IL-12, GM-CSF, IL-8 e IL-6<sup>30</sup>. Interesantemente en estudios efectuados con células mononucleares de sangre periférica humanas estimuladas con mananos de *C. albicans* se indujo la producción de IL-17, citocina importante en la inmunidad antifúngica<sup>36</sup>. El receptor DC-SIGN es un CLR que se encuentra expresado en células mieloides humanas con capacidad de reconocer glicanos ligados a manosa o fucosa. Pacientes con Aspergilosis Pulmonar Invasiva presentaron polimorfismos en este receptor, aunque aún se desconoce las causas moleculares involucradas<sup>37</sup>. El receptor CR3 participa en el reconocimiento de partículas que contienen  $\beta$ -glucanos y promueve su endocitosis por parte de los polimorfonucleares neutrófilos (PMN) humanos. Durante la respuesta frente a *A. fumigatus* este receptor ubicado en la superficie de células innatas también participa en la inducción de la inmunidad antifúngica adaptativa ya que modula el perfil de respuesta Th1 y Th17<sup>18,19</sup>.

### Inflamasomas

Los inflamasomas son una familia de proteínas cuya activación promueve el ensamble de diversos componentes citoplasmáticos constituyendo una compleja estructura con actividad enzimática. La inducción de la actividad de caspasa-1, enzima proteolítica activada por el inflamasoma, es la responsable del clivaje de la pro-IL-1 (precursor inactivo), para dar origen a la molécula biológicamente activa de IL-1 $\beta$ . La transcripción de la pro-IL-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 inflamasomas. Esto muestra que la producción de IL-1 $\beta$  requiere de dos niveles de inducción. De manera similar, la producción de IL-18 está asociada a esta vía, sin embargo no existe hasta el presente evidencia de que esta citocina sea relevante para la respuesta antifúngica.

El inflamasoma más estudiado es el NLRP3 (*Nucleotide oligomerization domain like receptor family, pyrin domain containing 3*) que se encuentra expresado en macrófagos, monocitos, DCs y células epiteliales. Las primeras evidencias sobre este receptor derivan de estudios realizados en animales deficientes, donde se observó una mayor susceptibilidad a candidiasis oral, Candidiasis vulvovaginal (CVV) y a las infecciones diseminadas por este hongo<sup>38</sup>. El ligando que produce el ensamble de este inflamasoma aún no se encuentra identificado. Recientemente se reportó que las enzimas SAP4 y SAP6 de *C. albicans* participan en su activación<sup>17</sup>. En monocitos humanos los fragmentos de hifas, pero no los esporos de *Aspergillus* inducen la producción de IL-1 $\beta$  por esta vía. En un grupo de pacientes con Candidiasis Vulvovaginal Recurrente (CVVR) se identificaron polimorfismos en el inflamasoma NLRP3<sup>39</sup>.

El inflamasoma NLRC4 (*NLR family CARD domain-containing protein 4*) también desempeña un rol protector durante la candidiasis diseminada y su función es particularmente importante a nivel tisular. Recientemente se ha descrito que la activación de Dectin-1 por *C. albicans*, promueve la actividad de un inflamasoma no canónico que utiliza la caspasa-8<sup>19</sup>.

## Mecanismos efectores de la inmunidad innata en la defensa antifúngica

La piel y las superficies mucosas constituyen las barreras físicas que impiden el ingreso de patógenos al medio interno. Diferentes mediadores inmunes preformados y células de la inmunidad innata poseen localizaciones claves en los diferentes sitios anatómicos y son importantes en el mantenimiento de la vigilancia inmunológica frente a los microorganismos, en los acuerdos básicos del comensalismo y en la protección durante la invasión.

Las células epiteliales (CE) conforman una barrera activa que protege los distintos tractos de la agresión de diferentes patógenos y mantiene el equilibrio con la flora comensal. Las CE producen un amplio espectro de péptidos antimicrobianos (PAM) que están presentes en forma constitutiva en las superficies mucosas, y responden rápidamente a la exposición de estímulos inflamatorios o patogénicos aumentando su concentración y variedad. La expresión de PRR en las CE permite detectar la presencia de diferentes microorganismos e inducir la activación de vías intracelulares que promueven la secreción de alarminas, PAMs y mediadores inmunes como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, y TNF $\alpha$ <sup>40</sup>. Una interesante experiencia realizada con CE orales reveló que estas células pueden discriminar entre la forma saprofitica de *C. albicans* y su transición a la fase hifal, e inducir en respuesta al fenotipo patogénico del hongo la activación de vías de señalización intracitoplasmáticas<sup>41</sup>. 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. Estas células también contribuyen al reclutamiento de los PMN. La liberación de alarminas e IL-8 por las CE vaginales en respuesta a *Candida* favorecen el infiltrado de PMN y contribuyen a la aparición de síntomas en la CVV. Células epiteliales de otra localización anatómica como las del epitelio pulmonar, no sólo actúan como barrera eficiente sino que también tienen capacidad para fagocitar las conidias de *Aspergillus*. Sin embargo su capacidad microbicida es baja. Se reportó que líneas celulares humanas de epitelio pulmonar expresan receptores TLR y que en respuesta al estímulo con conidias de *Aspergillus* exponen el receptor Dectin-1 en su membrana, evidenciando su capacidad de activación y amplificación de la respuesta<sup>42</sup>.

El reconocimiento de los patógenos fúngicos a través de los receptores innatos conduce a la inmediata activación de los mecanismos inmunes efectores, reclutamiento de poblaciones celulares, producción de citocinas, inducción de fagocitosis y activación de mecanismos fungicidas. Diferentes poblaciones celulares que forman parte de la inmunidad innata contribuyen a la respuesta antifúngica como los PMN, monocitos, macrófagos, DC, células NK y las recientemente clasificadas como linfocitos innatos. Algunas de estas poblaciones actúan en forma directa sobre el hongo provocando su muerte y otras mediante la producción de mediadores inmunes. Los mecanismos efectores innatos contienen al patógeno durante la maduración de la respuesta adaptativa y la definición hacia un perfil celular o humoral más apropiado para la protección contra un patógeno determinado.

La función efectora de los fagocitos incluye la muerte y la inhibición del crecimiento del hongo, así como la activación de mecanismos que contrarresten su infectividad, incluyendo efectos sobre el dimorfismo y el cambio de fenotipo<sup>5,6,14</sup>. Aunque la actividad antifúngica es intrínseca a las células fagocíticas, ésta puede ser amplificada por moléculas como las opsoninas y las citocinas derivadas de los LiT<sup>43</sup>. La combinación de mecanismos oxidativos y no-oxidativos como la degranulación y liberación intracelular o extracelular de moléculas efectoras, secuestro de iones, etc. son utilizados por estas células para dañar al patógeno. Enzimas como la NADPH oxidasa y la iNOS (óxido nítrico sintasa inducible) inician las vías oxidativas y la producción de metabolitos microbicidas. El estallido respiratorio produce Intermedios Reactivos del Oxígeno (IRO) que provocan peroxidación lipídica, modificación de proteínas y daño del ADN fúngico<sup>6</sup>.

Luego de la invasión tisular, los macrófagos residentes en los tejidos son fagocitos esenciales durante las primeras etapas de la respuesta antifúngica. Esta célula puede además exhibir distintos fenotipos funcionales, el perfil M1 o inflamatorio asociado a la vía clásica de activación, o el perfil M2 o antiinflamatorio proveniente de la vía de activación alterna. Ciertos hongos como *C. albicans* pueden inducir el fenotipo antiinflamatorio favoreciendo la sobrevida del hongo a través del cambio del perfil M1 al M2. Por otra parte, también se demostró que durante la protección contra hongos patógenos respiratorios como *P. brasiliensis* ambos fenotipos, M1 y M2 participan en el control del crecimiento del hongo, actuando en diferentes etapas durante del proceso infeccioso<sup>44</sup>.

Además de la eliminación del patógeno a través de las vías clásicas, otro mecanismo fungicida utilizado por los PMNs es la formación de NETs (*neutrophil extracellular traps*), verdaderas redes biológicas conformadas por ADN, histonas y proteínas antimicrobianas. Estas estructuras fueron descritas en PMN humanos expuestos *A. fumigatus*, *C. albicans* y *C. neoformans*<sup>19,45</sup>. Pacientes neutropénicos presentan severas manifestaciones clínicas durante la infección por *C. albicans* evidenciando la relevancia del rol protector de los neutrófilos en la respuesta a este hongo. Individuos con enfermedad Granulomatosa Crónica ligada al cromosoma X, que poseen fallas en la generación de IRO, manifiestan una mayor susceptibilidad a la Aspergilosis Invasiva<sup>46</sup>. Estos hallazgos clínicos y la evidencia experimental indican

que, tanto alteraciones cuantitativas como cualitativas en esta población celular comprometen seriamente la respuesta del individuo frente a los patógenos fúngicos.

La inflamación es también un elemento clave en la infección y en la enfermedad fúngica. La respuesta inflamatoria en la que están presentes PMN, mediadores innatos y citocinas proinflamatorias es fundamental para limitar la infección, sin embargo, una inflamación exacerbada o no controlada puede contribuir al daño tisular y ser parte de los componentes inmunopatogénicos desencadenados durante las micosis<sup>14</sup>. Este mecanismo se manifiesta en las denominadas IRIS y en patologías como la CVVR se encuentra asociado a la aparición de los síntomas clínicos<sup>4,47</sup>.

### IL-17 y defensa antifúngica

La inmunidad antifúngica ha sido tradicionalmente considerada altamente dependiente de la inmunidad adaptativa, particularmente por la asociación entre infecciones por HIV y Sida con infecciones como pneumosis, candidiasis oral y criptococosis. Las células de la inmunidad adaptativa particularmente los Li CD4 Th1 y Th17 a través de la liberación de citoquinas estimulan la función de células fagocíticas que son las encargadas de la remoción de los patógenos fúngicos. Durante los últimos años ha cobrado relevancia el rol de las citocinas de la familia IL-17 debido a su efecto sobre el reclutamiento y amplificación de las funciones de los PMN y sobre las células epiteliales<sup>14,23,43,48</sup>. Aunque la importancia de las citoquinas esta familia IL-17, en particular IL-17A e IL-17F se conoce desde hace varios años, las células productoras de estas citoquinas han sido identificadas recientemente.

Dentro de las poblaciones de la inmunidad innata las células linfoides innatas (ILCs), ubicadas estratégicamente en los tractos mucosos han sido señaladas como excelentes productoras de citoquinas. Las ILCs pueden ser clasificadas en 3 subpoblaciones diferentes de acuerdo a la expresión de determinados factores de transcripción y a su capacidad de producir citoquinas de un determinado perfil. La población de ILC 3, presenta como sello característico la expresión del factor de transcripción ROR-gamma t (retinoic acid receptor-related orphan receptor) y posee la capacidad de producir significativas concentraciones de IL-17 e IL-22<sup>49</sup>. Sólo unos pocos estudios han evaluado la contribución de esta población celular en la respuesta inmune del huésped frente a *Aspergillus* y *Candida*. La IL-17 producida por las ILC3 demostró ser importante en la defensa frente a *C. albicans* y en el control a nivel de las barreras mucosas<sup>50</sup>.

En la inmunidad adaptativa los Li Th17 son la población encargada de producir IL-17A, IL-17F e IL-22. Estas células son un subtipo particular de Li TCD4 caracterizados por la expresión de STAT3 y ROR-gt considerados marcadores de linaje<sup>51,52</sup>. La contribución particular de esta población en la respuesta antifúngica quedó en evidencia a partir del descubrimiento de individuos con defectos genéticos en algunos componentes en el eje de señalización de la IL-17. Pacientes con ciertas inmunodeficiencias como el Síndrome Poliendócrino Autoinmune tipo-I (APS-I o APECED), Síndrome de Hiper IgE, mutaciones en el gen STAT-1, fallas en el receptor de la IL-17 (IL-17RA) y deficiencia en la IL-17F, presentan mayor frecuencia de CMC<sup>53-57</sup> (Tabla 1). A nivel experimental el mayor avance del conocimiento sobre esta población proviene de estudios efectuados en modelos experimentales de candidiasis. Dos son los mecanismos efectores descritos a través de los cuales los Li Th17 participan en la respuesta antifúngica: durante el curso de infecciones diseminadas estos Li inducen el reclutamiento de PMN que son los responsables de la remoción del hongo a través de los mecanismos fungicidas; el otro mecanismo, opera a nivel de las superficies mucosas, donde la IL-17 estimula a queratinocitos y células epiteliales a liberar PAMs, que por sus características pueden actuar en forma directa sobre el patógeno induciendo su muerte y además pueden amplificar la respuesta inflamatoria mediante el reclutamiento de otras poblaciones celulares<sup>43,52</sup>.

En ciertas circunstancias, en las que la respuesta de los LiTh17 se encuentra exacerbada, se produce una descontrolada migración de PMN favoreciendo de esta manera la instauración de una inflamación crónica. Se comprobó que en estas condiciones la maquinaria microbicida de los neutrófilos se encuentra alterada y en consecuencia la remoción del hongo es deficiente. En tal situación, la sobreactivación de los Li Th17 contribuye a los mecanismos patogénicos presentes en las micosis crónicas<sup>52</sup>.

En respuesta a determinados hongos como *C. neoformans*, *P. carinii*, o *H. capsulatum*, las células Th17 participan de los mecanismos protectores, pero sin embargo no son necesarias para la supervivencia del hospedador. Por el contrario, la respuesta Th17 es crítica para la protección inducida por la vacuna dirigida contra *B. dermatitidis*, *C. posadasii*, e *H. capsulatum*. Si bien nuestros conocimientos sobre el rol de esta población ha avanzado en la última década, muchos aspectos permanecen aún sin dilucidar a la espera de futuras investigaciones.

## Conclusiones finales

Durante la última década, diferentes líneas de investigación han permitido importantes avances en la comprensión de los mecanismos innatos y adaptativos involucrados en la respuesta inmune antifúngica. El desarrollo de modelos animales y el descubrimiento de mutaciones y polimorfismos genéticos que confieren susceptibilidad a estos patógenos, han aportado conocimientos concretos sobre la contribución particular de células y moléculas en la etiopatogenia de estas infecciones. Estas líneas de estudio establecen el rol clave de los PPRs como los CLR, en la activación de las vías intracelulares y la inducción de mecanismos protectores. Otro aspecto relevante lo constituye la identificación del eje de citocinas de la familia IL-17 y el rol de estas moléculas en la promoción de la inflamación tisular y el control de la carga fúngica. El reciente descubrimiento de los linfocitos innatos y la activa participación de las células epiteliales evidencian la compleja red de interacciones gatillada en el hospedador como respuesta a la invasión por estos patógenos. El conocimiento acabado de los mecanismos moleculares y celulares que rigen la respuesta inmune antifúngica, permite la construcción de sólidas bases para la promoción y desarrollo de nuevas y alternativas estrategias terapéuticas para estas infecciones.

## Agradecimientos

Los autores agradecen a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (FONCYT PICT-2012-2949), CONICET-PIP (2012-2014, 112 200801 02778), Secretaria de Ciencia y Tecnología (SECyT-UNC 162/14) and Ministerio de Ciencia y Técnica de la Provincia de Córdoba (MinCyT 2011-2014) por el financiamiento recibido para nuestras líneas de investigación.

## Bibliografía

- 1- Kohler JR, Casadevall A, Perfect JR. *The Spectrum of Fungi That Infects Humans*. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2014; doi: 10.1101/cshperspect.a019273
- 2- Pfaller MA, Diekema DJ. *Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem*. *Clin Microbiol Rev*, 2007; 27: 133-63.
- 3- Perfect JR, Hachem R, Wingard JR. *Update on Epidemiology of and Preventive Strategies for Invasive Fungal Infections in Cancer patients*. *Clin Infect Dis* 2014; 59: 352-55.
- 4- Singh N, Perfect JR. *Immune reconstitution syndrome associated with opportunistic mycoses*. *Lancet Infect Dis* 2007; 7: 395-401.
- 5- Hube B. *Fungal adaptation to the host environment*. *Curr Opin Microbiol* 2009; 12: 347-49.
- 6- Sotomayor CE and Rodríguez-Galán MC. *Aspectos celulares y moleculares de la respuesta inmune frente a hongos*. en *Inmunopatología Molecular: nuevas fronteras de la Medicina*. Bs. As. Editor: Gabriel Rabinovich. Editorial Panamericana. 2003; Cap 23: 154-72.
- 7- Pappas PG. *Opportunistic fungi: a view to the future*. *Am J Med Sci* 2010; 340: 253-57.
- 8- Brown A J, Odds FC, Gow NA. *Infection-related gene expression in Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* 2007; 10: 307-13.
- 9- Kwon-Chung KJ, Fraser JA, Doering TL, Wang Z, Janbon G, et al. *Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii, the etiologic agents of cryptococcosis*. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2014; 4:a019760. doi: 10.1101/cshperspect.a019760.
- 10- Casadevall A, Fang FC, Pirofski LA. *Microbial virulence as an emergent property: consequences and opportunities*. *PLoS Pathog* 2011; 7:e1002136.
- 11- Paraje MG, Correa SG, Renna MS, Theumer M and CE Sotomayor. *Candida albicans-secreted lipase induces injury and steatosis in immune and parenchymal cells*. *Can J Microbiol* 2008; 54:647-59.
- 12- Paraje MG, Correa SG, Albesa I and CE Sotomayor. *Lipase of Candida albicans induces activation of NADPH oxidase and L-arginine pathways on resting and activated macrophages*. *BBRC* 2009, 390:263-268.
- 13- Roilides E, Simitsopoulou M, Katragkou A, Walsh TJ. *How Biofilms Evade Host Defenses*. *Microbiol Spectr* 2015; 3: doi: 10.1128/microbiolspec.
- 14- Romani L. *Immunity to fungal infections*. *Nat Rev Immunol* 2011; 11:275-88.
- 15- van de Veerdonk FL, Kullberg BJ, van der Meer JW, Gow NA, Netea MG. *Host-microbe interactions: innate pattern recognition of fungal pathogens*. *Curr Opin Microbiol* 2008; 11: 305-12.
- 16- Brown GD. *Innate antifungal immunity: the key role of phagocytes*. *Annu Rev Immunol* 2011; 29:1-21.
- 17- Pericolini E, Gabrielli E, Amacker M, Kasper L, Roselletti E, et al. *Secretory Aspartyl Proteinases Cause Vaginitis and Can Mediate Vaginitis Caused by Candida albicans in Mice*. *MBio* 2015; 6:e00724. doi: 10.1128/mBio.00724-15.
- 18- Plato A, Hardison SE, Brown GD. *Pattern recognition receptors in antifungal immunity*. *Semin Immunopathol* 2015; 37: 97-106. doi: 10.1007/s00281-014-0462-4.
- 19- Drummond RA, Gaffen SL, Hise AG, Brown GD. *Innate Defense against Fungal Pathogens*. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2014; 5. pii: a019620. doi: 10.1101/cshperspect.a019620
- 20- Gonzaga de Freitas Araujo M, Pacifico M, Vilegas W, Campaner dos Santos L, Icely PA, Miró MS, Scarpa MV, Bauab TM, Sotomayor CE. *Evaluation of Syngonanthus nitens (Bong.) Ruhl. extract as antifungal and in treatment of vulvovaginal candidiasis*. *Med Mycol* 2013; 51: 673-82.
- 21- Renna MS, Figueredo CM, Rodríguez-Galán MC, Icely PA, Cejas H, Cano R, Correa SG, Sotomayor CE. *Candida albicans up-regulates the Fas-L expression in liver Natural Killer and Natural Killer T cells*. *Immunobiol* 2015; doi: 10.1016/j.imbio.
- 22- Jaeger M, Stappers MH, Joosten LA, Gyssens IC, Netea MG. *Genetic variation in pattern recognition receptors: functional consequences and susceptibility to infectious disease*. *Future Microbiol* 2015; 10: 989-1008. doi: 10.2217/fmb.15.37.
- 23- Becker DC, Ifrim JQ, Netea MG, van de Veerdonk FL. *Antifungal innate immunity: recognition and inflammatory networks*. *Semin Immunopathol* 2014; doi 10.1007/s00281-014-0467.

- 24- Bretz C, Gersuk G, Knoblauch S, Chaudhary N, Randolph-Habecker J, et al. MyD88 signaling contributes to early pulmonary responses to *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* 2008; 76: 952-58.
- 25- Calich VL, Pina A, Felonato M, Bernardino S, Costa TA, Loures FV. Toll-like receptors and fungal infections: The role of TLR2, TLR4 and MyD88 in paracoccidioidomycosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008; 53: 1-7.
- 26- von Bernuth H, Picard C, Jin Z, Pankla R, Xiao H, et al. Pyogenic bacterial infections in humans with MyD88 deficiency. *Science* 2008; 321: 691-96.
- 27- Plantinga TS, Johnson MD, Scott WK, van de Vosse E, Velez Edwards DR, et al. Toll-like receptor 1 polymorphisms increase susceptibility to candidemia. *J Infect Dis* 2012; 205: 934-43.
- 28- Bochud PY, Chien JW, Marr KA, Leisenring WM, Upton A, et al. Toll-like receptor 4 polymorphisms and aspergillosis in stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 2008; 359: 1766-1777.
- 29- Netea MG, Gow NAR, Munro CA, Bates S, Collins C, et al. Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *J Clin Invest* 2006; 116: 1642-50.
- 30- Dambuza IM, Brown GD. C-type lectins in immunity: recent developments. *Curr Opin Immunol* 2015; 32: 21-7. doi: 10.1016/j.coi.2015.02.001
- 31- Marakalala JM, Kerrigan AM and G D. Brown. Dectin-1: a role in antifungal defense and consequences of genetic polymorphisms in humans. *Mamm Genome* 2011, 22: 55-65.
- 32- Fresno C, Soulat D, Roth S, Blazek K, Udalova I, Sancho D, et al. Interferon- $\gamma$  Production via Dectin-1-Syk-IRF5 Signaling in Dendritic Cells Is Crucial for Immunity to *Candida albicans*. *Immunity* 2013, 38:1176-86.
- 33- Ferwerda B, Ferwerda G, Plantinga TS, Willment JA, van Spruiel AB, et al. Human dectin-1 deficiency and mucocutaneous fungal infections. *N Engl J Med* 2009; 361: 1760-1767.
- 34- Glocker EO, Hennigs A, Nabavi M, Schaffer AA, Woellner C, et al. A homozygous CARD9 mutation in a family with susceptibility to fungal infections. *N Engl J Med* 2009; 361: 1727-35.
- 35- Kerscher B, Willment JA, Brown GD. The Dectin-2 family of C-type lectin-like receptors: An update. *Int Immunol* 2013; 25: 271-77.
- 36- van de Veerdonk FL et al. The macrophage mannose receptor induces IL-17 in response to *Candida albicans*. *Cell Host Microbe* 2009; 5: 329-40.
- 37- Sainz J, Lupianez CB, Segura-Catena J, Vazquez L, Rios R, et al. Dectin-1 and DC-SIGN polymorphisms associated with invasive pulmonary Aspergillosis infection. *PLoS ONE* 2012; 7: e32273.
- 38- van de Veerdonk FL, Joosten LA, Netea MG. The interplay between inflammasome activation and antifungal host defense. *Immunol Rev* 2015; 265: 172-80. doi: 10.1111/imr.12280.
- 39- Lev-Sagie A, Prus D, Linhares IM, Lavy Y, Ledger WL, Witkins 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: 303 e1-6.
- 40- Netea MG, Kullberg BJ. Epithelial sensing of fungal invasion. *Cell Host Microbe* 2010; 16:219-26.
- 41- 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: 225-35.
- 42- Sun WK, Lu X, Li X, Sun QY, Su X, 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: 2755-64.
- 43- Wuthrich M, Deepe G Jr., Klein B. Adaptive Immunity to Fungi. *Annu Rev Immunol* 2012; 30: 115-48.
- 44- Feriotti C, Loures FV, de Araujo EF, da Costa TA, Calich VLG. Mannosyl-recognizing receptors induce an M1-like phenotype in macrophages of susceptible mice but an M2-like phenotype in mice resistant to a fungal infection. *PLoS ONE* 2013; 8: e54845.
- 45- Byrd AS, O'Brien XM, Johnson CM, Lavigne LM, Reichner JS. An extracellular matrix-based mechanism of rapid neutrophil extracellular trap formation in response to *Candida albicans*. *J Immunol* 2013; 190: 4136-48.
- 46- Holland SM: Chronic granulomatous disease. *Clin Rev Allergy Immunol* 2010; 38: 3-10.
- 47- Sobel JD. Recurrent vulvovaginal candidiasis. *Am J Obstet Gynecol* 2015; doi: 10.1016/j.ajog.2015.06.067.
- 48- Conti HR, Shen F, Nayyar N, Stocum E, Sun JN, et al. Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. *J Exp Med* 2009; 206: 299-311.
- 49- Stockinger, B., M. Veldhoen, and B. Martin. Th17 T cells: Linking innate and adaptive immunity. *Semin Immunol* 2007; 19: 353-61.
- 50- Gladiator A, LeibundGut-Landmann S. Cutting edge: IL-17-secreting innate lymphoid cells are essential for host defense against fungal infection. *J Immunol* 2013; 190: 521-25.
- 51- Yang XO, Pappu BP, Nurieva R, Akimzhanov A, Kang HS, et al. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity* 2008. 28: 29-39.
- 52- Borghi M, Renga G, Puccetti M, Oikonomou V, Palmieri M, et al. Antifungal Th Immunity: Growing up in Family. *Front Immunol* 2014 ; 5: 506. doi: 10.3389/fimmu.2014.00506
- 53- Milner JM, Brenchley JM, Laurence A, Freeman AF, Hill BJ et al. Impaired TH17 cell differentiation in subjects with autosomal dominant hyper-IgE syndrome. *Nature* 2008; 452: 773-776.
- 54- Kisand K, Boe Wolff AS, Podkrajsek KT, Tserel L, Link M, et al. Chronic mucocutaneous candidiasis in APECED or thymoma patients correlates with autoimmunity to Th17-associated cytokines. *J Exp Med* 2010, 207: 299-308.
- 55- Puel A, Doffinger R, Natividad A, Chrabieh M, Barcenas-Morales G, et al. Autoantibodies against IL-17A, IL-17F, and IL-22 in patients with chronic mucocutaneous candidiasis and autoimmune polyendocrine syndrome type I. *J Exp Med* 2010, 207: 291-97.
- 56- Puel A, Cypowyj S, Bustamante J, Wright JF, Liu L, et al. Chronic mucocutaneous candidiasis in humans with inborn errors of interleukin-17 immunity. *Science* 2011; 332: 65-72.
- 57- Liu L, Okada S, Kong XF, Kreins AY, Cypowyj S, et al. Gain-of function human STAT1 mutations impair IL-17 immunity and underlie chronic mucocutaneous candidiasis. *J Exp Med* 2011, 208: 1635-41.