



***Actividad inmunomoduladora y antifúngica del péptido LL37-1 en el tratamiento de la candidiasis vulvovaginal: Un estudio in vitro e in vivo***

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca  
Facultad de Ciencias de la Salud  
Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico

Bogotá D.C. Noviembre de 2024



***Actividad inmunomoduladora y antifúngica del péptido LL37-1 en el tratamiento de la candidiasis vulvovaginal: Un estudio in vitro e in vivo***

**Maicol Mauricio Suarez Velandia**

Trabajo de grado para optar al título de Bacteriólogo y Laboratorista Clínico

**Asesor externo**

**PhD Julián Esteban Muñoz Henao**

Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud

Universidad del Rosario

**Asesora interna**

**PhD Claudia Andrea Cruz Baquero**

Facultad de Ciencias de la Salud, Uicolmayor

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Facultad de Ciencias de la Salud

Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico

Trabajo de grado

Bogotá, Noviembre de 2024



***Actividad inmunomoduladora y antifúngica del péptido LL37-1 en el tratamiento de la candidiasis vulvovaginal: Un estudio in vitro e in vivo***

**CONCEPTO**

LAUREADA

**JURADOS**

Nelson Arturo Salazar Buitrago

Luis Eduardo Vargas Díaz

**ASESORES**

**Asesor externo:** PhD Julián Esteban Muñoz Henao

**Asesora interna:** PhD Claudia Andrea Cruz Baquero

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Facultad de Ciencias de la Salud

Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico

Trabajo de grado

Bogotá, Noviembre de 2024

## **DEDICATORIA**

Este trabajo de grado está dedicado a la ciencia colombiana, que a pesar de las dificultades sociales y económicas, crece y se fortalece sobre las bases de la lucha, la entrega y el amor.

A la educación pública, que me acogió y me formó, a cada docente que día a día enriqueció mi camino de conocimiento y amor por la ciencia.

A mi madre, que con amor, dedicación y confianza en mí, me impulsó a dar lo mejor en cada paso.

Al Doctor Julian Esteban Muñoz Henao, que me guió y acompañó en todo momento, que me brindó apoyo incondicional y compartió conmigo sus valiosos conocimientos.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas (INBIOMED) de la Universidad de Buenos Aires, en especial a la Doctora Marianela Candolfi y al Doctor Jorge Peña Agudelo, que me ayudaron a formar mis habilidades y me motivaron a soñar en grande.

Este trabajo lo dedico a mi amada Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, que la considero mi hogar y el lugar donde crecí a nivel personal y profesional.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco enormemente a mi asesor Julian Esteban Muñoz Henao por sus valiosos aportes, por ser una guía y un apoyo incondicional, por impulsar día a día la realización de este trabajo y por su buena disposición en todo momento.

A mi madre por confiar en mí ciegamente, por su apoyo incondicional y por motivarme día a día.

Al grupo de investigación de Microbiología traslacional y enfermedades emergentes (MICROS) de la Universidad del Rosario y a su directora, la Dra. Beatriz Gomez por su acompañamiento y por permitirme realizar este trabajo en su maravilloso laboratorio.

A nuestra querida auxiliar de laboratorio, Lorena Mora por el apoyo técnico en cada uno de los procedimientos realizados durante este estudio.

A la Dra. Diana Marcela Carmona del Centro de Enfermedades Autoinmunes (CREA) de la Universidad del Rosario por su apoyo en microscopía de fluorescencia y por su aporte de recursos.

Al Dr. Rafael Parra Medina del Departamento de Patología del Instituto Nacional de Cancerología por su apoyo en el proceso de inmunotinción de los tejidos evaluados en este estudio.

A la Dra. Marianela Candolfi del INBIOMED de la Universidad de Buenos Aires por recibirme en su laboratorio y permitirme aprender muchos de los procedimientos realizados en este trabajo, bajo el acompañamiento del Dr. Jorge Peña Agudelo, que siempre fue mi apoyo e inspiración durante este proceso.

A Don Arturo del bioterio de experimentación de la Universidad Nacional de Colombia, por poner a nuestra disposición los animales utilizados durante este estudio.

A la bacteriologa Karem Guzman por creer siempre en mí y apoyarme en el proceso de redacción.

Al grupo de Investigación REMA de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por su apoyo en la ponencia en eventos científicos.

A mi amada Unicolmayor y su cuerpo docente por formarme y aportar todos los conocimientos que me ayudaron a culminar este proyecto.

## TABLA DE CONTENIDO

1. Introducción	10
2. Antecedentes	12
3. Objetivos	14
4. Marco Teórico	15
4.1. Género Candida	15
4.2 Factores de virulencia	15
4.3 Candidiasis vulvovaginal (VVC)	16
4.4 Factores de riesgo y síntomas de la VVC	17
4.5. Inmunopatología de la VVC	17
4.6.Tratamiento de la VVC	19
4.7. Catelicidina humana LL37	19
4.8 Propiedades antifúngicas de LL37	19
4.9 Propiedades inmunomoduladoras de LL37	20
4.10 Modificaciones estructurales del péptido LL 37	21
4.11 Péptido LL37-1	21
5. Metodología	22
5.1 Diseño metodológico	22
5.2 Materiales y métodos	22
5.2.1 Microorganismo	22
5.2.2 Péptido LL37-1	22
5.2.3 Viabilidad de línea celular L929	23
5.2.4 Ensayo de Citotoxicidad	23
5.2.5 Aislamiento de polimorfonucleares	23
5.2.6 Actividad fungicida y fagocítica de PMN	24
5.2.7 Viabilidad celular de PMN	24
5.2.8 Estimulación de PMN y NETosis	24
5.2.9 Inmunofluorescencia	25
5.2.10 Estimulación de PBMC	25
5.2.11 Animales experimentales	25
5.2.12 Modelo in vivo de Candidiasis Vulvovaginal.	25
5.2.13 Evaluación de la carga fúngica	26
5.2.14 Análisis histopatológico	26
5.2.15 Inmunohistoquímica de células MPO + en el canal vaginal	27
5.2.16 Medición de citoquinas	27
5.2.17 Análisis estadístico	27
6. Resultados	28
6.1 El péptido LL37-1 posee una baja toxicidad en células L929	28

6.2 Los PMN estimulados con LL37-1 poseen un mayor potencial antifúngico	29
6.3 LL37-1 inhibe la NETosis en neutrófilos humanos e induce IFN- $\gamma$	30
6.4 LL37-1 regula positivamente IL-71A e IFN- $\gamma$ en PBMC humanos	32
6.5 LL37-1 resuelve la VVC en un modelo murino	33
6.6 LL37-1 modula el estado inflamatorio en VVC	35
7. Discusión	37
8. Conclusión	41
9. Bibliografía	42

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Principales factores de virulencia de <i>Candida albicans</i> .	16
<b>Figura 2:</b> Fisiopatología de la VVC.	18
<b>Figura 3:</b> Rol de LL37 en la inmunidad innata.	20
<b>Figura 4:</b> Modificaciones estructurales del péptido LL37-1	21
<b>Figura 5:</b> LL37-1 no genera efectos tóxicos en línea celular murina	28
<b>Figura 6:</b> LL37-1 potencia la capacidad antifúngica de PMN humanos	29
<b>Figura 7:</b> LL37-1 ejerce un efecto citoprotector en PMN humanos.	30
<b>Figura 8:</b> LL37-1 inhibe la NETosis en neutrófilos humanos	31
<b>Figura 9:</b> LL37-1 regula positivamente IL-71A e IFN- $\gamma$ en PBMC humanos	32
<b>Figura 10:</b> LL37-1 resuelve la VVC en un modelo murino	34
<b>Figura 11:</b> LL37-1 regula la presencia de células MPO+	35
<b>Figura 12:</b> LL37-1 regula positivamente IL-17A en VVC	36
<b>Figura 13:</b> LL 37-1 es un potente candidato para tratar la VVC	40



**Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca**  
**Facultad de Ciencia de la Salud**  
**Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico**

**Actividad inmunomoduladora y antifúngica del péptido LL37-1 en el tratamiento de la candidiasis vulvovaginal: Un estudio *in vitro* e *in vivo***

**RESUMEN**

*Candida albicans*, es el principal agente etiológico de la candidiasis vulvovaginal (VVC), una enfermedad inflamatoria del tracto genital que afecta a mujeres inmunocompetentes. En este estudio se evaluó la actividad antifúngica e inmunomoduladora del péptido LL37-1 en el tratamiento de la VVC. Este péptido es un derivado de la catelicidina humana LL37, que en estudios previos demostró un efecto antifúngico promisorio. Determinamos la toxicidad de LL37-1 en fibroblastos embrionarios murinos L929 y evaluamos su interacción con polimorfonucleares (PMN) humanos. Además, se analizó el efecto de LL37-1 en el proceso de NETosis mediante la evaluación de MPO. *In vivo* se cuantificó la carga fúngica de animales tratados con el péptido LL37-1, se analizó la presencia de PMN mediante inmunohistoquímica de células MPO+ y los niveles de citoquinas en el canal vaginal se midieron a través de ELISA. Demostramos que LL37-1 potencia la capacidad fagocítica, induce la muerte de levaduras en PMN e inhibe la NETosis. LL37-1 aumenta la viabilidad de PMN y no es tóxico en células murinas. Los PMN estimulados con LL37-1 aumentaron significativamente los niveles de IFN- $\gamma$ . LL37-1 disminuye la carga fúngica en el canal vaginal, reduce la presencia de células MPO+ y la producción de citoquinas proinflamatorias, regulando positivamente IL-17A en VVC. Comprobamos que LL37-1 es una alternativa terapéutica promisorio para el tratamiento de la VVC, ya que disminuye la carga fúngica y mejora la inmunidad innata frente a *Candida albicans*.

**Palabras clave:** Candidiasis vulvovaginal, neutrófilos, catelicidina humana, actividad inmunomoduladora, péptidos antimicrobianos, *Candida albicans*

**Estudiante:** Maicol Mauricio Suarez Velandia

**Docentes:** PhD Julián Esteban Muñoz Henao y PhD Claudia Andrea Cruz Baquero

**Instituciones:** Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Universidad del Rosario, Instituto Nacional de Cancerología y Universidad Nacional de Colombia.

**Fecha:** Noviembre de 2024

## 1. INTRODUCCIÓN

La candidiasis vulvovaginal (VVC) es una enfermedad inflamatoria del tracto genital causada por hongos del género *Candida*<sup>1</sup>. Tradicionalmente se afirma que el 75% de las mujeres han padecido un episodio de VVC al menos una vez en sus años fértiles<sup>2-3</sup>, dado que los altos niveles de estrógenos favorecen la proliferación de este microorganismo en la cavidad vaginal<sup>4</sup>. Esta enfermedad provoca un costo de \$368 millones de dólares en Estados Unidos<sup>5</sup>. La evidencia demuestra que el patógeno oportunista *Candida albicans* es el principal agente etiológico de estas infecciones, representando el 95% de los casos de VVC<sup>6</sup>. Se estima que 138 millones de mujeres alrededor del mundo desarrollan candidiasis vulvovaginal recurrente (RVVC)<sup>7</sup>, una manifestación complicada de la enfermedad que se caracteriza por la aparición de 4 o más episodios de VVC durante un año<sup>8</sup>. El prurito vulvar constituye el principal síntoma de VVC, así como el enrojecimiento, sensación de dolor, ardor, dispareunia y disuria<sup>9</sup>. Las recurrencias suelen ser difíciles de tratar, ya que pueden estar asociadas a condiciones más serias, como la infección por VIH, neutropenias, polimorfismos genéticos, diabetes mellitus y la resistencia antifúngica<sup>6</sup>. Durante la fisiopatología de esta enfermedad, *C. albicans* se adhiere al tejido y produce una toxina citolítica denominada candidalísina, que ataca las células del revestimiento epitelial; desencadenando la inmunopatogénesis de la VVC<sup>10</sup>. Esta toxina provoca un mayor reclutamiento de neutrófilos e induce la expresión de citoquinas proinflamatorias en el canal vaginal<sup>10</sup>. La candidalísina promueve la activación de las vías de señalización NF-κB y MKP1 en las células del epitelio vaginal, dando lugar a la producción de IL-1α, IL-1β, IL-8, G-CSF, GM-CSF; que son vitales para el reclutamiento de leucocitos<sup>11</sup>. Sin embargo, durante la VVC se produce sulfato de heparán (HS), un polisacárido que actúa como ligando competitivo del receptor Mac-1 de neutrófilos, impidiendo la fagocitosis de las levaduras de *C. albicans* y generando un estado de “anergia” que desencadena un proceso inflamatorio, en el que no se logra reducir la carga fúngica<sup>12</sup>. Por este motivo, es necesaria la búsqueda de alternativas terapéuticas que no solo se limiten a erradicar el hongo, sino que también logren controlar el estado inflamatorio.

La catelicidina humana LL37 es un péptido catiónico de 37 aminoácidos producido principalmente por neutrófilos<sup>13</sup>. Este péptido posee una capacidad antimicrobiana gracias a su naturaleza catiónica, que le permite formar poros toroidales en la membrana de los microorganismos<sup>14</sup>. Así mismo, este péptido posee propiedades inmunomoduladoras, ya que participa activamente en el reclutamiento de leucocitos gracias a su interacción con el receptor de proteína formilo tipo 1 (FPRL-1)<sup>15</sup>, potencia la capacidad fagocítica al interactuar con el receptor Mac-1 de neutrófilos y

monocitos <sup>16</sup>, y regula el proceso inflamatorio, al unirse con lipopolisacáridos (LPS), impidiendo la activación del receptor TLR4 <sup>17</sup>.

En un estudio previo, se demostró que péptidos derivados de LL37 (AC-1, AC-2, D y LL37-1) poseen una capacidad antifúngica promisorio a bajas concentraciones, exhibiendo una actividad antibiopelícula e induciendo la formación de vacuolas intracitoplasmáticas en *C. albicans*. Estos péptidos fueron probados en aislamientos provenientes de pacientes con VVC y RVVC, donde LL37-1 demostró un efecto destacable en comparación con los demás derivados de LL37 <sup>18</sup>. Por tanto, en este estudio se evaluó la actividad antifúngica e inmunomoduladora del péptido LL37-1 en el tratamiento de la VVC. Nuestros hallazgos demuestran que LL37-1 potencia la capacidad fagocítica de polimorfonucleares (PMN) e inhibe la liberación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs), además posee un efecto citoprotector en PMN. Demostramos que en un modelo murino de VVC, LL37-1 disminuye la carga fúngica y el infiltrado de neutrófilos, aumentando los niveles de IL-17A, una citoquina fundamental para una respuesta inmune efectiva en VVC <sup>19</sup>. Por tanto, LL37-1 es un potencial candidato en la búsqueda de alternativas terapéuticas contra la VVC y RVVC.

## 2. ANTECEDENTES

En los últimos años se han estudiado alternativas terapéuticas para tratar la VVC utilizando péptidos antimicrobianos. Uno de estos péptidos, es la gomesina, obtenido de la hemolinfa del arácnido *Acanthoscurria gomesiana*. Este péptido antimicrobiano resolvió efectivamente la VVC en ratones portadores de VVC e indujo la liberación de IFN- $\gamma$  en un modelo de candidiasis diseminada, demostrando un potencial efecto antifúngico e inmunomodulador <sup>20</sup>. Se han utilizado también compuestos con capacidad antibacteriana, antitumoral y antifúngica como el C7a, un péptido con la capacidad de frenar el proceso de infección por *C. albicans* e inhibir la producción de factores de virulencia como la biopelícula <sup>21</sup>. Algunos péptidos ya han sido utilizados en ensayos clínicos como es el caso del CZEN002 derivado de la hormona estimulante de melanocitos alfa, el cual se encuentra en fase II mediante ensayos clínicos que corresponden a la aplicación en pacientes identificando dosis óptima, frecuencia, administración y seguridad de uso <sup>22</sup>.

La catelicidina humana LL37 es un péptido de 37 aminoácidos (LLGDFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES) con carga neta positiva, el cual ha demostrado una mayor afinidad por membranas celulares microbianas, por lo que genera lisis celular mediante la formación de poros toroidales <sup>23, 24, 25</sup> así mismo, se ha demostrado que LL37 puede evitar la formación de biopelículas en células planctónicas, inhibiendo la adhesión celular <sup>26</sup>. Cabe mencionar que este péptido, posee actividades inmunomoduladoras en el contexto proinflamatorio, ya que ejerce una actividad antagonista sobre respuestas mediadas por TNF- $\alpha$ , IL-4 e IL-12 <sup>27,28</sup>, por otra parte se ha evaluado que LL37 puede unirse al LPS microbiano, inhibiendo su unión al receptor TLR4, por lo que disminuye el estado inflamatorio <sup>29</sup>. Sin embargo, se ha demostrado que este péptido es susceptible a carbamilación y a la degradación por proteasas, afectando su eficiencia y actividad inmunomoduladora <sup>30</sup>.

El grupo de investigación REMA en colaboración con la Universidad Nacional de Colombia diseñaron 4 péptidos análogos al LL37, con una longitud menor al péptido original, haciéndolos menos susceptibles a carbamilación y degradación por proteasas. Estos péptidos fueron diseñados en peptide 2.0 y se analizaron mediante HPLC. Se obtuvo 2 péptidos de 24 aminoácidos: LL37-1 (GRKSAKKIGKRAKRIVQRIKDFLR) y AC-2 (GRKSAKKIGKRAKRIVQRIKDFLR) con una acetilación en el grupo amino terminal; así mismo se obtuvo un péptido de 23 aminoácidos: AC-1 (RKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLR) y un péptido con 25 aminoácidos ((d-PHE)GRKSAKKIGKRAKRIVQRIKD (dF)LR) <sup>18</sup>.

A comienzos del 2010 se empieza a analizar el papel antifúngico de LL37 en *Candida albicans*, demostrando que este péptido no solo inhibe el crecimiento de este hongo, sino que también afecta su adhesión a medios abióticos<sup>31,32</sup>, por lo que se comenzó a pensar en este péptido como alternativa terapéutica para procesos infecciosos provocados por *Candida albicans*. En el 2022 se realizó un estudio donde se evaluaron los efectos antifúngicos de péptidos análogos al LL37 *in vitro* mediante ensayos de concentración mínima inhibitoria (MIC) en células planctónicas de *Candida* y curvas de crecimiento en aislamientos clínicos de distintas especies de *Candida*, donde se demostraba que los péptidos LL37-AC2 y LL37-1 poseen un efecto promisorio para el establecimiento de estrategias terapéuticas<sup>18</sup>. Sin embargo, no hay evidencia de la eficiencia de estos péptidos análogos en un modelo *in vivo*, por lo que la interacción de este péptido con el sistema inmune en el contexto proinflamatorio de VVC no está dilucidado.

## 3.5. OBJETIVOS

### 3.5.1 Objetivo General

Evaluar la actividad antifúngica e inmunomoduladora *in vitro* e *in vivo* del péptido LL37-1 en el tratamiento de la candidiasis vulvovaginal.

### 3.5.2 Objetivos Específicos

- Determinar la toxicidad del péptido LL37-1 en línea celular de fibroblastos embrionarios murinos L929.
- Comprobar *in vitro* la interacción del péptido LL37-1 con PMN humanos en el proceso de fagocitosis, actividad fungicida y NETosis en la infección por *C. albicans*.
- Generar una formulación tópica del péptido LL37-1 para el tratamiento de la candidiasis vulvovaginal en un modelo murino.
- Analizar las alteraciones tisulares e inflamatorias del tejido vaginal infectado con *C. albicans* ATCC 10231 y tratado con LL37-1
- Identificar la capacidad inmunomoduladora *in vivo* del péptido LL37-1, mediante la medición de citoquinas proinflamatorias e infiltrado leucocitario

## 4. MARCO TEÓRICO

### 4.1 Género *Candida*

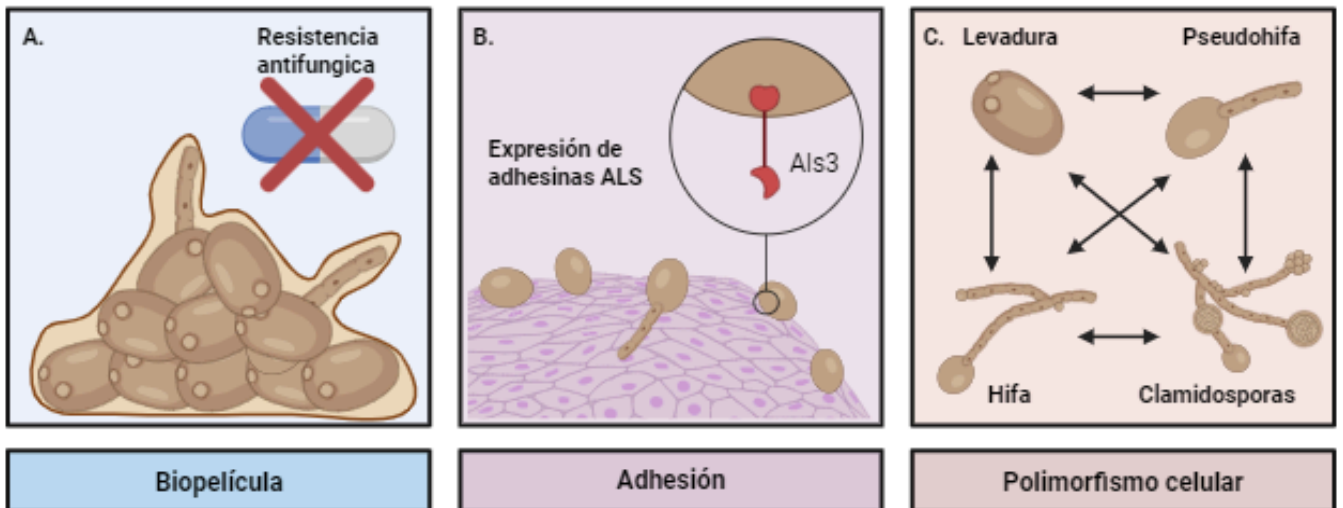
Las especies del género *Candida* son microorganismos fúngicos ubicuos pertenecientes al filo *Ascomycota*, que residen como comensales en la mucosa oral, genital y gastrointestinal de diversos organismos; así como en reservorios ambientales, especialmente en suelos <sup>33</sup>. El papel comensal de estos hongos está mediado por diferentes factores, como la microbiota bacteriana y la presencia de IgA anti-filamentos e IgG antimicótica, los cuales evitan la patogenicidad de *Candida* y el desarrollo de candidemia <sup>34</sup>. Sin embargo, estas especies son patógenos oportunistas, por lo que pueden proliferar, generando manifestaciones clínicas ante condiciones de inmunosupresión o disbiosis.

### 4.2 Factores de virulencia

Las especies de *Candida* poseen factores de virulencia que facilitan el proceso infeccioso y la colonización de la mucosa. La evidencia demuestra que *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. albicans* y *C. glabrata* presentan perfiles de adhesión variables, siendo este, uno de los principales factores de virulencia <sup>15</sup>, ya que permite la colonización de superficies abióticas como catéteres e implantes, promoviendo así la formación de biopelícula <sup>33</sup>. *C. albicans* particularmente posee una familia de adhesinas codificadas por secuencias similares a aglutininas (ALS) <sup>35</sup>, la adhesina Als3 es la mejor estudiada y se ha comprobado que facilita la invasión de *C. albicans* en distintos tejidos <sup>36</sup>.

La formación de biopelícula es un factor de virulencia de gran relevancia clínica, ya que se asocia con una mayor mortalidad en pacientes con candidiasis sistémica y constituye una de las principales fuentes de infección nosocomial <sup>28</sup>. La biopelícula limita la eficiencia de los antifúngicos convencionalmente usados; gracias a su compleja composición de levaduras, pseudohifas, hifas y matriz extracelular <sup>29</sup>. Además se ha documentado hallazgos que demuestran que hay una mayor expresión de bombas de eflujo y un mayor número de células persistentes recalcitrantes en dichas biopelículas <sup>30</sup>. El control transcripcional en la formación de estas estructuras está regulado por aproximadamente 1000 genes diferentes, dado que este proceso involucra la interacción entre adhesinas y la matriz extracelular, así como la regulación de la plasticidad celular <sup>30</sup>. Una vez ha madurado la biopelícula, las células levaduriformes se diseminan y adquieren nutrientes con mayor eficiencia, escapando fácilmente del tratamiento antifúngico <sup>31</sup>. Además, estos hongos pueden cambiar reversiblemente su morfología para adaptarse a las condiciones del ambiente en condición de comensal y como mecanismo de evasión inmune en condición de patógeno, facilitando la invasión <sup>32</sup>. La evidencia demuestra que las pseudohifas son

importantes para la invasión de tejidos, mientras la morfología levaduriforme facilita la diseminación del hongo <sup>37</sup>. Estos hongos presentan 4 tipos de morfología diferentes: levadura, pseudohifas, hifas verdaderas y clamidosporas <sup>38</sup>. Así mismo, se ha investigado el papel patológico de las células blancas, opacas y grises de *C. albicans*, las cuales presentan diferentes morfologías y colores en las colonias macroscópicas <sup>38</sup> y se ha evidenciado resistencia a la fagocitosis de células opacas, las cuales presentan una morfología alargada <sup>40</sup>.



**Figura 1: Principales factores de virulencia de *Candida albicans*.** La expresión de bombas de eflujo en biopelículas fúngicas son vitales para el desarrollo de la resistencia antifúngica (A), la formación de biopelículas es promovida gracias a la expresión de adhesinas de la familia ALS, facilitando el proceso de adhesión e invasión de tejidos (B), además el polimorfismo celular se relaciona con una mayor virulencia y escape inmunitario de *Candida albicans* (C).

### 4.3 Candidiasis vulvovaginal (VVC)

*Candida albicans* es el principal agente etiológico de la candidiasis vulvovaginal (VVC) <sup>41</sup>. La VVC es una vaginitis fúngica que puede propagarse fuera de los labios menores y labios mayores del conducto vaginal, así como la región intercrural y perianal <sup>42</sup>, esta infección afecta a un número importante de mujeres; los datos epidemiológicos estiman que entre el 70 a 75% de mujeres en edad fértil tendrán al menos un episodio de VVC durante su vida, por otra parte, la incidencia de las especies no-albicans, principalmente *C. glabrata* corresponde al 10 a 20% de los casos; sin embargo esta incidencia ha venido aumentado <sup>43</sup>. Así mismo, se ha estimado que aproximadamente el 10% de mujeres con VVC desarrolla candidiasis vulvovaginal recurrente (RVVC), en donde se llega a manifestar 4 o más episodios de la enfermedad en un año.

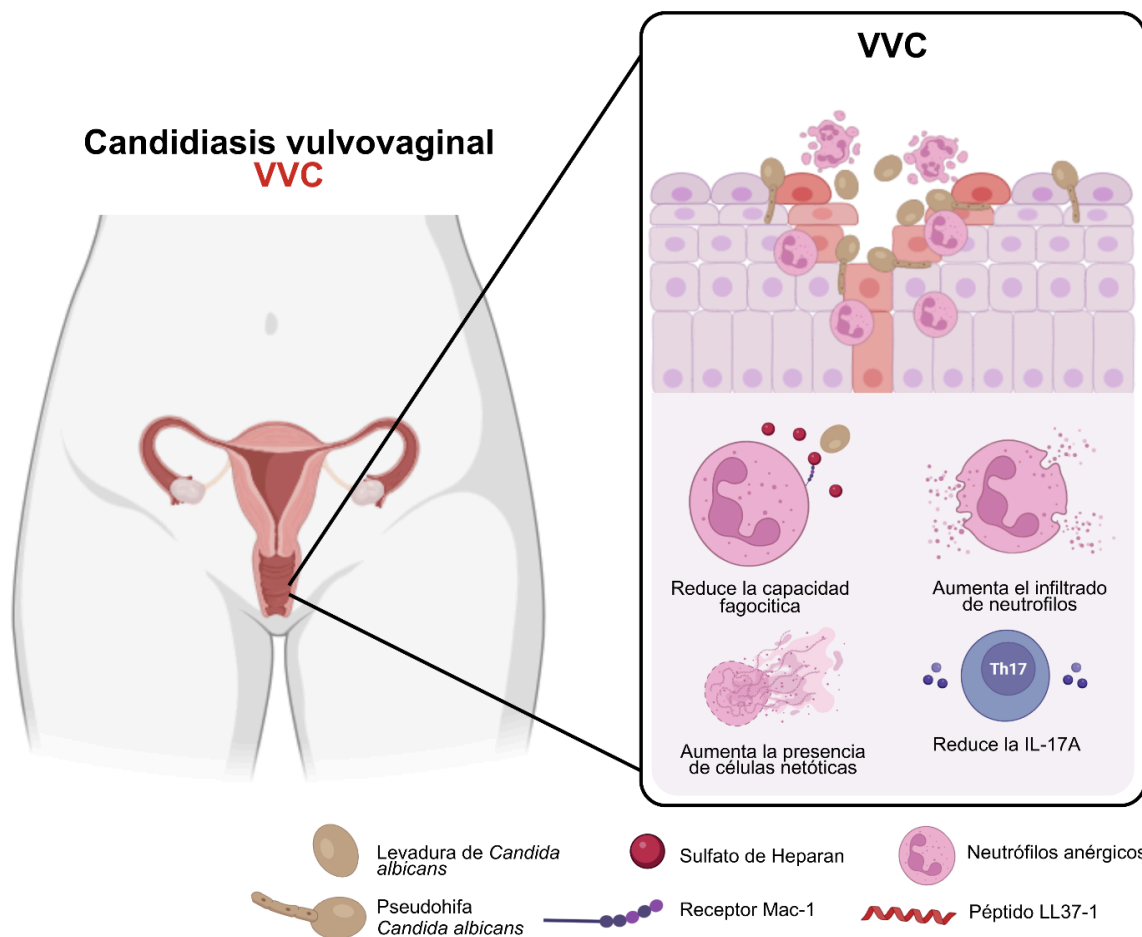
#### 4.4 Factores de riesgo y síntomas de la VVC

Diferentes factores son los que predisponen la aparición de esta infección, tales como niveles altos de estrógenos (por terapias de reemplazo de estrógenos para aliviar síntomas de la menopausia o por consumo de anticonceptivos orales, mujeres en fase lútea o en embarazo) <sup>44</sup>. Así mismo, la microbiota vaginal juega un papel muy importante en la RVVC, por lo que se ha evidenciado que cambios en la comunidad de Lactobacilos productores de ácido láctico y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); así como el desequilibrio de la microbiota puede favorecer la adherencia y proliferación de *Candida* en el epitelio vaginal <sup>45</sup>. Por otra parte, se ha evidenciado que algunas deficiencias inmunológicas pueden constituir un factor predisponente, por lo que se ha visto que mujeres con mutaciones en el receptor TLR2 y en el primer exón de MBL2 desarrollan más fácilmente la patología <sup>46</sup>. El prurito vulvar constituye el principal síntoma de la CVV, así como el enrojecimiento, sensación de dolor, ardor, dispareunia y disuria <sup>43</sup>. Las recurrencias no suelen ser de fácil erradicación, ya que pueden estar relacionadas a condiciones más serias, como la infección por VIH, neutropenias, diabetes mellitus, así como la resistencia antifúngica <sup>3</sup>. Sin embargo, se ha visto que en mujeres premenopáusicas hay una mayor afectación en el vestíbulo vaginal y en la vulva; además de estar muy relacionada la sintomatología con el ciclo menstrual, debido a que la citólisis inducida por la progesterona libera glucógeno en el tejido favoreciendo la colonización de *Candida*. En mujeres postmenopáusicas la afectación se da principalmente en la ingle y en la vulva <sup>47</sup>.

#### 4.5. Inmunopatología de la VVC

El microambiente vaginal cuenta con múltiples mecanismos de protección gracias a la inmunidad innata y adaptativa del organismo, sin embargo, este componente inmunológico del tejido vaginal está sujeto a diversos factores, como los niveles hormonales <sup>32</sup>. Una vez la *Candida* logra adherirse al tejido, produce una proteasa denominada candidalislina que ataca las células epiteliales, siendo esta una de las primeras proteínas que desencadenan la inmunopatogénesis de la VVC, ya que está asociada con un mayor reclutamiento de neutrófilos y expresión de citoquinas proinflamatorias en el canal vaginal <sup>33</sup>. La candidalislina promueve la activación de las vías de señalización NF-κB y MKP1 en las células del epitelio vaginal, dando lugar a la producción de IL-1α, IL-1β, IL-8, G-CSF, GM-CSF, que son vitales para el reclutamiento de leucocitos <sup>48</sup>. Sin embargo, en la VVC se lleva a cabo un proceso de anergia de neutrófilos, en el que se produce un estado inflamatorio que no logra reducir la carga de *Candida* en el tejido, ya que niveles altos de sulfato de heparán en el lumen vaginal impiden la unión de los neutrófilos a la *Candida*, ya que actúa como ligando competitivo para Mac-1, produciéndose así un estado inmunopatológico

crónico <sup>49</sup>. Cabe mencionar que la activación del inflammasoma NLRP3 es vital en el establecimiento de la respuesta inmunitaria anticandida, produciendo citoquinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$  e IL-18 que promueven la activación de células Th17 y Th1 respectivamente, siendo estas fundamentales para una respuesta inmunitaria adecuada <sup>50</sup>. Una vez activadas las células Th17, producen IL-17, promoviendo una respuesta inflamatoria efectiva <sup>51</sup>. Las mutaciones en el receptor TLR2 ha estado asociada con una mayor susceptibilidad a RVVC, encontrando una disminución en la producción de IL-17 e IFN- $\gamma$  <sup>52</sup>. Los neutrófilos poseen la capacidad de liberar trampas extracelulares (NETs) que atrapan y destruyen los microorganismos <sup>53</sup>. Se ha evidenciado que las pseudohifas de *C. albicans* inducen la NETosis debido a su tamaño <sup>54</sup>. Poco se sabe del rol de la NETosis en VVC, un estudio reciente demostró que la presencia de células netóticas dentro de la cavidad vaginal es elevada en mujeres con VVC <sup>55</sup>.



**Figura 2: Fisiopatología de la VVC.** La candidiasis promueve el infiltrado de neutrófilos anérgicos a la cavidad vaginal, provocando la invasión progresiva de *C. albicans* y la disfunción de la respuesta inmune.

#### **4.6. Tratamiento de la VVC**

El 90% de los casos de VVC se define como no complicada y su tratamiento consiste en la utilización de agentes imidazólicos/triazólicos (miconazol, fluconazol, itraconazol), el mecanismo de acción de estos agentes se da gracias a su interacción con la enzima fúngica CYP51, inhibiendo la formación de ergosterol <sup>56</sup>. Para el tratamiento de la VVC, los agentes antifúngicos tópicos son ampliamente usados y resuelven la infección al cabo de 2 días, sin embargo, algunos de estos tratamientos tópicos pueden causar ardor o comezón <sup>57</sup>. La Sociedad Estadounidense de Enfermedades Infecciosas sugiere el uso de tratamientos orales a corto plazo en combinación con tratamientos tópicos para evitar los efectos sistémicos y mejorar el éxito terapéutico <sup>58</sup>. La VVC complicada o RVVC corresponde al 10% de los casos y su tratamiento consiste en un tratamiento de inducción por 10 a 14 días con aplicación tópica o administración oral de fluconazol a una dosis de 150 mg, y posteriormente se realiza un tratamiento con 150 mg semanales por 6 meses <sup>59</sup>. Sin embargo, este tratamiento genera efectos secundarios, altos costos y en el 50% de las pacientes se reporta recurrencia en cuanto finaliza el tratamiento <sup>60</sup>. Actualmente han surgido algunas investigaciones que buscan alternativas terapéuticas para combatir la candidiasis vulvovaginal experimental utilizando péptidos antimicrobianos, como por ejemplo, la gomesina obtenida de la hemolinfa de un arácnido <sup>61</sup>. Compuestos con capacidad antibacteriana, antitumoral y antifúngica como el C7a recientemente descrita su capacidad para frenar el proceso de infección por *C. albicans* e inhibir la producción de factores de virulencia como la biopelícula <sup>62</sup>.

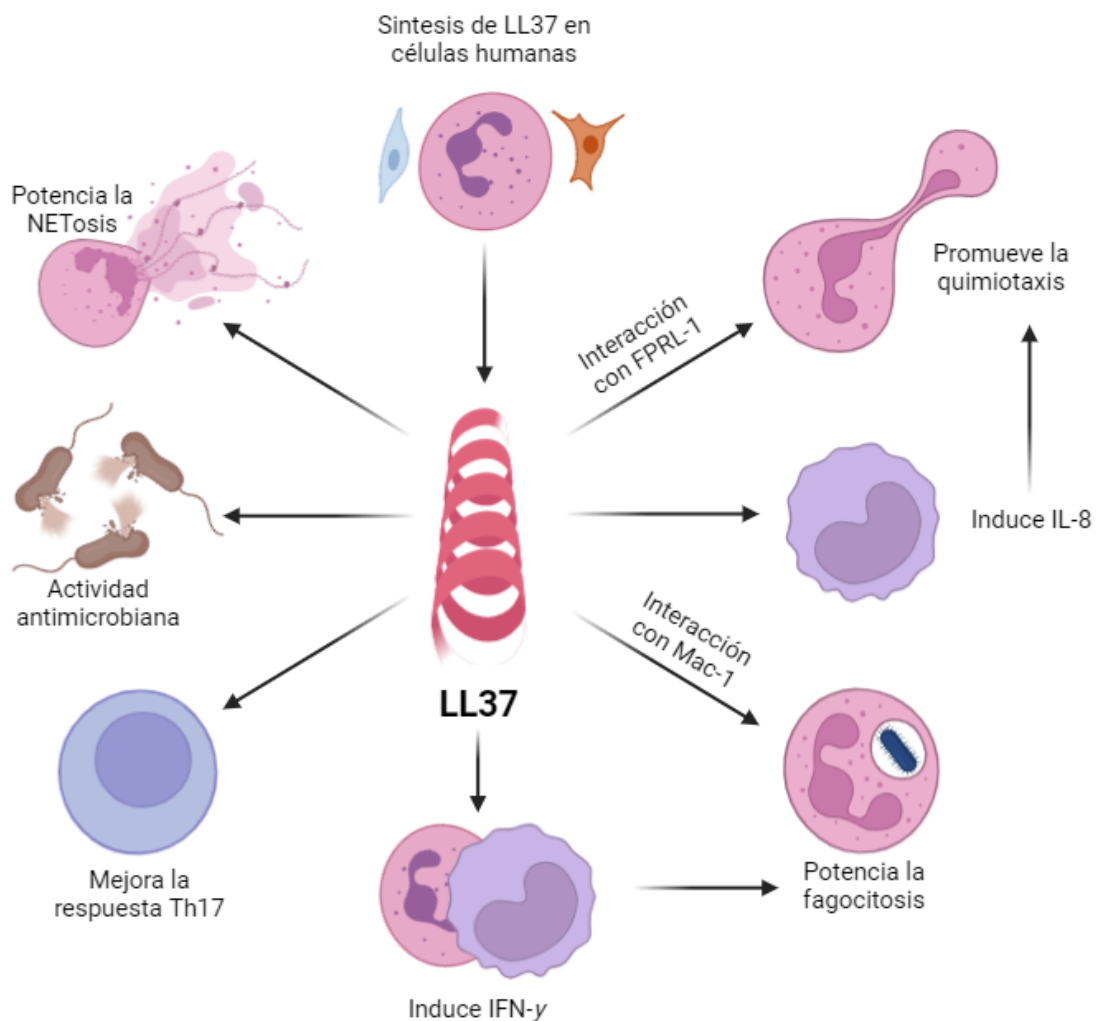
#### **4.7. Catelicidina humana LL37**

La catelicidina humana LL37 es un péptido catiónico de 37 aminoácidos (LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES) codificado en el cromosoma 3p21.3 <sup>63</sup>. Inicialmente se sintetiza una pre-proteína denominada hCAP18 que por escisión proteolítica da lugar a la forma madura de LL 37 <sup>64</sup>. LL37 posee una estructura de alfa hélice en condiciones fisiológicas que le permite interactuar con la membrana de microorganismos gracias a sus propiedades anfipáticas <sup>65</sup>. Este péptido es producido principalmente por neutrófilos, pero también los macrófagos, queratinocitos, células NK y células epiteliales de la mucosa son capaces de producir LL37 <sup>66</sup>.

#### **4.8 Propiedades antifúngicas de LL37**

La catelicidina humana LL37 posee una carga neta positiva y residuos hidrofóbicos que le permite interactuar con la membrana de los microorganismos induciendo la muerte celular <sup>67</sup>. Además, se ha comprobado que este péptido puede interactuar con la pared y con la membrana de *C. albicans* inhibiendo su capacidad de adhesión <sup>68,69</sup>,

puede generar vacuolas intracitoplasmáticas en *C. albicans*<sup>18</sup>, facilita la fuga de ATP y de iones citoplasmáticos<sup>70</sup> y tiene una potente actividad antibiopelícula en *C. albicans*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*<sup>71</sup>.



**Figura 3: Rol de LL37 en la inmunidad innata.** El péptido LL37 es producido principalmente por neutrófilos y promueve la quimiotaxis al interactuar con el receptor FPRL-1 y al inducir IL-8 en monocitos. LL37 mejora la respuesta Th17 y potencia la NETosis, además de sus propiedades antimicrobianas.

#### 4.9 Propiedades inmunomoduladoras de LL37

LL37 es un péptido vital en la inmunidad innata, se ha comprobado que este péptido induce la producción de citoquinas antiinflamatorias y proinflamatorias, manteniendo un equilibrio<sup>72</sup>. Se ha demostrado que LL37 tiene un papel vital en el reclutamiento de células inmunes, potenciando la quimiotaxis gracias a su interacción con el receptor FPRL1<sup>73</sup>, además induce la producción de IL-8 en monocitos, fibroblastos y células epiteliales, una citoquina vital en la quimiotaxis<sup>74</sup>. La catelicidina humana posee la capacidad de inducir la NETosis, un proceso que consiste en liberar el ADN y proteínas antimicrobianas de los neutrófilos para formar una trampa extracelular que

promueve la muerte de microorganismos <sup>75</sup>. Además, un estudio previo demostró que LL37 logra inducir la diferenciación de linfocitos T hacia un fenotipo Th17 en la mucosa oral murina, detectando altos niveles de IL-17 en presencia de LL37 <sup>76</sup>.

#### 4.10 Modificaciones estructurales del péptido LL37

La catelicidina humana ha demostrado una actividad anti-*Candida* promisorio *in vitro* e *in vivo*, por lo que se ha evidenciado que este puede interactuar con la membrana de la levadura, haciendo que esta pierda su estabilidad, así mismo se ha evidenciado la formación de vacuolas intracitoplasmáticas <sup>77</sup>. Es importante precisar que se ha rediseñado la estructura del péptido LL37 ya que esta es susceptible a la degradación por proteasas, por lo que se ha sintetizado 4 péptidos análogos (AC1, AC2, LL37-D y LL37-1) los cuales poseen una actividad anti-*Candida* favorable *in vitro*, especialmente el péptido LL37-1 <sup>18</sup>.



**Figura 4: Modificaciones estructurales del péptido LL37-1.** Se rediseñó por bioinformática la estructura del péptido LL37 para hacerlo menos susceptible a la degradación por proteasas, obteniendo 4 péptidos análogos con un alto potencial antifúngico.

#### 4.11 Péptido LL37-1

El péptido LL37-1 es un péptido análogo de la catelicidina humana, que posee 24 aminoácidos (GRKSAKKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTES), el cual se sintetiza mediante el método de síntesis peptídica Fmoc, que permite agregar aminoácido por aminoácido en una matriz sólida <sup>78</sup>. LL37-1 ha demostrado un potencial antifúngico promisorio, sin embargo, se desconocen sus capacidades inmunomoduladoras y su citotoxicidad.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 Diseño Metodológico

<b>Tipo de investigación</b> Cuantitativa	<b>Alcance</b> Experimental
<b>Población objeto de estudio</b> Ratones hembra BALB/c estrogenizadas de 6 a 8 semanas	<b>Muestra</b> <i>Candida albicans</i> ATCC 10231

El desarrollo de este trabajo permitió el estudio de las capacidades antifúngicas e inmunomoduladoras del péptido LL37-1 en el contexto de las infecciones vaginales causadas por *C. albicans*. En primera instancia, determinamos los posibles efectos citotóxicos de LL37-1 en células de mamífero, para ello, utilizamos la línea celular de fibroblastos embrionarios murinos L929. El estudio de las propiedades inmunomoduladoras de este péptido, se llevó a cabo en PMN y PBMC aislados de sangre periférica humana, mediante ensayos de actividad fagocítica, capacidad fungicida, NETosis y medición de IFN- $\gamma$  e IL-17A. La actividad antifúngica de LL37-1 se determinó a través de un modelo murino de VVC, el cual permitió evaluar la efectividad de esta molécula en el control de la infección por medio de conteo de unidades formadoras de colonia (UFC), inmunohistoquímica, medición del grosor epitelial, análisis histopatológico y medición de los niveles de citoquinas antiinflamatorias y proinflamatorias en el canal vaginal de animales tratados y no tratados. Este trabajo fue realizado gracias a la colaboración conjunta del grupo REMA de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, el grupo MICROS y el grupo CREA de la Escuela de Medicina de la Universidad del Rosario, el Instituto Nacional de Cancerología y la Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud FUCS.

### 5.2 Materiales y métodos

**5.2.1 Microorganismo.** Se utilizó la cepa de referencia de *Candida albicans* ATCC 10231, obtenida del Laboratorio del Grupo de Estudios en Microbiología Traslacional y Enfermedades Emergentes (MICROS) de la Universidad del Rosario, mantenida en criopreservación a  $-80^{\circ}\text{C}$ . 24 a 48 horas antes de realizar los experimentos, las levaduras se cultivaron en medio agar Sabouraud dextrosa (SDA, Difco, Becton Dickinson, New Jersey, NJ, USA) a  $37^{\circ}\text{C}$ .

**5.2.2 Péptido LL37-1.** La secuencia del péptido análogo LL37-1, se diseñó en estudios previos<sup>18</sup> y corresponde a la secuencia de aminoácidos (GRKSAKKIGKRAKRIVQRIKDFLR). Este péptido fue sintetizado por peptide 2.0 (Chantilly, CYA, USA), y su pureza ( $> 95\%$ ) fue analizada mediante HPLC y MS.

**5.2.3 Viabilidad de línea celular L929.** La línea celular de fibroblastos embrionarios murinos L929 se sembró en medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco, Massachusetts, MA, USA) con 10 % de suero fetal bovino (SFB) y 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina (Gibco, Massachusetts, MA, USA). Posteriormente se incubó a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, y una vez alcanzada la confluencia del 90% se recolectaron con tripsina al 0.05% (Gibco, Massachusetts, MA, USA) y se contaron mediante exclusión con azul de trypan (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA). Para el ensayo de viabilidad se utilizaron 7.5x10<sup>3</sup> células/well en placas de 96 wells (Costar 3595, NY, USA) con medio de cultivo DMEM, 10 % de SFB y 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina durante 24°C a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurrido el tiempo de incubación, se agregó el péptido antimicrobiano LL37-1 a cada pozo, en diferentes concentraciones (1.56 µM a 200 µM) y se estableció un grupo control de células no tratadas. La placa se incubó a 37°C por 24, 48 y 72 horas. Posteriormente se determinó la viabilidad celular agregando 0.5 mg/ml de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) - 2,5 - diphenyltetrazolium bromide) (Roche, Mannheim, Alemania) a cada pozo y se incubó por 4 horas a 37°C. Una vez completada la incubación, se agregó Dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA). La absorbancia se midió utilizando un espectrofotómetro FC multiscan (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) a longitud de onda de 530 nm. Los controles y los grupos tratados con el péptido se realizaron por triplicado, haciendo lecturas a las 24, 48 y 72 horas. El porcentaje de viabilidad celular se determinó normalizando los datos al control no tratado.

**5.2.4 Ensayo de Citotoxicidad.** La citotoxicidad celular fue evaluada mediante la detección de lactato deshidrogenasa (LDH) en el sobrenadante del cultivo celular de fibroblastos murinos L929. Para este ensayo se utilizó el kit de detección *CyQUANT™ LDH Cytotoxicity Assay* (Thermo Fisher Scientific, Eugene, OR, USA). La siembra y el tratamiento de las células fue similar al ensayo de MTT, pero utilizando 1.5x10<sup>3</sup> células/well. Además, se agregó un control de células tratadas con buffer de lisis (Control de lisis) y un control no tratado. Al finalizar la incubación, se siguió el protocolo recomendado por el fabricante. La absorbancia se midió a 490 nm y 680 nm. Para hallar el porcentaje de citotoxicidad se normalizaron los valores al control de lisis. Los controles y los grupos tratados con el péptido fueron realizados por triplicado, haciendo lecturas a las 24, 48 y 72 horas.

**5.2.5 Aislamiento de polimorfonucleares.** Se obtuvo 10 ml de sangre de donantes sanos en tubos con EDTA. Los eritrocitos fueron sedimentados durante 20 minutos a temperatura ambiente en presencia de 5 ml de dextrano al 6%. El plasma rico en leucocitos fue extraído y se sometió a separación por gradientes utilizando

Lymphoprep™ (STEMCELL TM technologies, Germany) y centrifugado a 2000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante fue retirado y el pellet se sometió a choque hipotónico con buffer de lisis amonio-cloruro-potasio (ACK) (NH<sub>4</sub>CL 0.15 M, KHCO<sub>3</sub> 0.01 M y EDTA disódico 0.0001 M) para lisar los hematíes restantes. Las células obtenidas fueron contadas mediante exclusión con azul de trypan y posteriormente fueron resuspendidas en RPMI 1640 suplementado con HEPES (Gibco, Massachusetts, MA, USA) y 10% de SFB.

**5.2.6 Actividad fungicida y fagocítica de PMN.** En una placa de 96 wells se realizó un cocultivo de *C. albicans* ATCC 10231 (5x10<sup>5</sup> levaduras/pozo) y polimorfonucleares (PMN) (2.5x10<sup>5</sup> células/pozo) previamente tratados con péptido LL37-1 a una concentración de 50µM (IC<sub>50</sub> definida mediante ensayo de susceptibilidad antifúngica). El cocultivo se incubó 1 hora a 37°C y después de la incubación se retiró el sobrenadante y se agregó 100µL de agua destilada a cada pozo para lisar los PMN y se midió la viabilidad de las levaduras mediante el protocolo de MTT mencionado anteriormente. El porcentaje de actividad fungicida se determinó mediante la siguiente fórmula:  $100 - (\text{absorbancia de levaduras} / \text{absorbancia de levaduras sin PMN}) * 100$

79

Para la determinación de la actividad fagocítica, se utilizó *C. albicans* 10231 a un índice de multiplicidad de infección de 2 (MOI 2) previamente teñida con blanco de Calcoflúor (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA) y se incubó durante 1 hora a 37°C. Posteriormente se tomaron fotos a 5 campos aleatorios en 10X en el equipo Cytation 3 (Biotek) y se realizó el conteo de células fagocíticas (PMN con levaduras azules en su interior).

**5.2.7 Viabilidad celular de PMN.** Se sembraron 2.5x10<sup>5</sup> PMN por pozo en placa de 96 pozos en presencia de LL37-1 a diferentes concentraciones (25 µM a 100 µM) y se incubó durante 4, 8, 12 y 24 horas a 37°C. Pasada la incubación se agregó 0.5 mg/ml de MTT a cada pozo y se incubó durante 4 horas a 37°C (Dabirian, Sara, *et al*, 2013). Finalizada la incubación se retiró el sobrenadante y se agregó DMSO. La absorbancia se midió a 530 nm, utilizando un espectrofotómetro FC multiscan.

**5.2.8 Estimulación de PMN y NETosis.** Se sembraron 2.5x10<sup>5</sup> PMN en una placa de 24 pozos, previamente recubierta con poly-L-lysine al 0.01% (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA). Los PMN fueron estimulados con forbol 12-miristato 13-acetato 100 nm (PMA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), LL37-1 IC<sub>50</sub> PMA + LL37-1 o se infectaron con pseudohifas de *C. albicans* ATCC 10231 (MOI 1) durante 4 horas. Pasado este tiempo, se recogieron los sobrenadantes y se almacenaron a -80°C para la medición de IFN-γ mediante ensayo de ELISA (Opteia, BD), siguiendo las

recomendaciones del fabricante. Las células fueron fijadas con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 5 minutos a 4°C<sup>80</sup>.

**5.2.9 Inmunofluorescencia.** La inmunotinción de los PMN se realizó según protocolo previamente descrito<sup>81</sup> con modificaciones. Los PMN fijados se sometieron a recuperación antigénica con buffer citrato (pH 6) durante 5 minutos a 350W. Posteriormente, se permeabilizaron con solución de TBS-Tritón al 0.5%. El bloqueo de los sitios inespecíficos se realizó durante 1 hora con 1% de albúmina bovina (BSA) y 10% de SFB en TBS-Tritón al 0.2%. Tras el bloqueo, los PMN se incubaron con anticuerpo primario anti-MPO (1:50, Ab 9535) en solución de bloqueo durante toda la noche. Al siguiente día, se añadió el anticuerpo secundario IgG anti-rabbit con Alexa Fluor 546 (1:1000) durante 1 hora. El ADN se tiñó con DAPI (1:1000) por 5 minutos y la visualización se realizó en el equipo Cytation 3. La NETosis verdadera fue medida contando en 5 campos aleatorios, el número de células con colocación de MPO en el ADN para cada grupo evaluado utilizando el software ImageJ.

**5.2.10 Estimulación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).** Se estableció una monocapa de  $2.5 \times 10^5$  células/pozo de PBMC en placa de 24 pozos y se estimularon con LL37-1 IC<sub>50</sub>. Se estableció un grupo de células infectadas con pseudohifas de *C. albicans* ATCC 10231 y un grupo no infectado, así mismo, se estimularon PBMC con sobrenadante de PMN estimulados con LL37-1 e infectados o no infectados con *C. albicans* ATCC 10231. Tras 24 horas de incubación se recogieron los sobrenadantes y se midieron los niveles de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-10, IL-17a mediante ensayo ELISA, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

**5.2.11 Animales..** Se adquirieron ratones BALB/c hembras (6 a 8 semanas de edad) provenientes del Bioterio de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia (sede, Bogotá D.C.). Los ratones estaban bajo condiciones específicas de ventilación y esterilidad, libres de patógenos. Todos los procedimientos con animales fueron aprobados por el comité de bioética de la Universidad Nacional de Colombia (protocolo número CB-FMVZ-UN-039-2021) y se realizaron de acuerdo con las prácticas definidas por los órganos nacionales e internacionales para el bienestar animal.

**5.2.12 Modelo *in vivo* de Candidiasis Vulvovaginal.** El modelo de candidiasis vulvovaginal se estableció induciendo el estro en los ratones, con la administración subcutánea de 0,5 mg/ml de  $\beta$ -Estradiol 17-valerate (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA), disuelto en aceite de sésamo (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA) 4 días y 1 día antes de la infección vaginal. La infección se realizó por vía intravaginal inoculando  $7.5 \times 10^5$  levaduras de *C. albicans* ATCC 10231 resuspendidas en 20  $\mu$ L de

PBS esterilizado. 24 horas después de la infección se inició el tratamiento con Miconazol (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA) al 1% o 0.1% del péptido análogo LL37-1 disueltos en crema neutra (10% Wax self-nonionic emulsifier, 2% mineral oil, 5% propylene glycol and 84% distilled water, pH 4.5) por vía intravaginal durante 7 días <sup>20</sup>. Al octavo día, los ratones se eutanasiaron mediante la utilización de CO<sub>2</sub>, según lo descrito y recomendado por la Asociación Americana de Medicina Veterinaria en su guía (AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition, American Veterinary Medical Association).

**5.2.13 Evaluación de la carga fúngica.** La evaluación del efecto antifúngico del péptido LL37-1 se analizó a través del recuento de unidades formadoras de colonias (UFCs) del canal vaginal de ratones infectados y tratados o no con el péptido antimicrobiano LL37-1. El canal vaginal de los ratones infectados se extrajo asépticamente tras la eutanasia (8 días después de la infección), se pesaron y homogeneizaron en 1 mL de solución salina tamponada con fosfato (PBS) esterilizada. El homogeneizado se diluyó 10<sup>-1</sup> y un volumen de 100 µL se sembró en medio Mycosel (Becton, Dickinson and Company; Sparks, NV, USA) suplementado con penicilina-estreptomicina al 1%. Las placas de petri se incubaron por 48 h a 35°C y se determinaron las UFCs. La eficiencia del tratamiento se evaluó considerando el número de UFC por gramo de tejido de los animales tratados comparado con el de los animales infectados no tratados.

**5.2.14 Análisis histopatológico.** Se seleccionó al azar el canal vaginal de animales infectados tratados y no tratados con LL37-1 o miconazol para incluir en cassettes de histología con 10% de formalina tamponada. Posteriormente se incluyó el tejido en bloques de parafina, para hacer cortes histológicos de 5 micras en un micrótomó (Microm HM 325, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), las láminas se procesaron utilizando coloración de hematoxilina y eosina (H&E) para la identificación de PMN en el tejido y coloración de Periodic Acid-Schiff (PAS) para evaluar el daño tisular provocado por el péptido y observar las levaduras. Se compararon los grupos tratados con el grupo control no tratado y un grupo no infectado. Para el recuento de células inflamatorias, se contaron células con morfología característica (citoplasma con tonalidad rosada y núcleo lobulado con tonalidad morada) en 5 planos seleccionados al azar. Para la medición del grosor epitelial se tomaron 5 fotos en distintos campos y se midió el grosor de la capa epitelial en el software ImageJ.

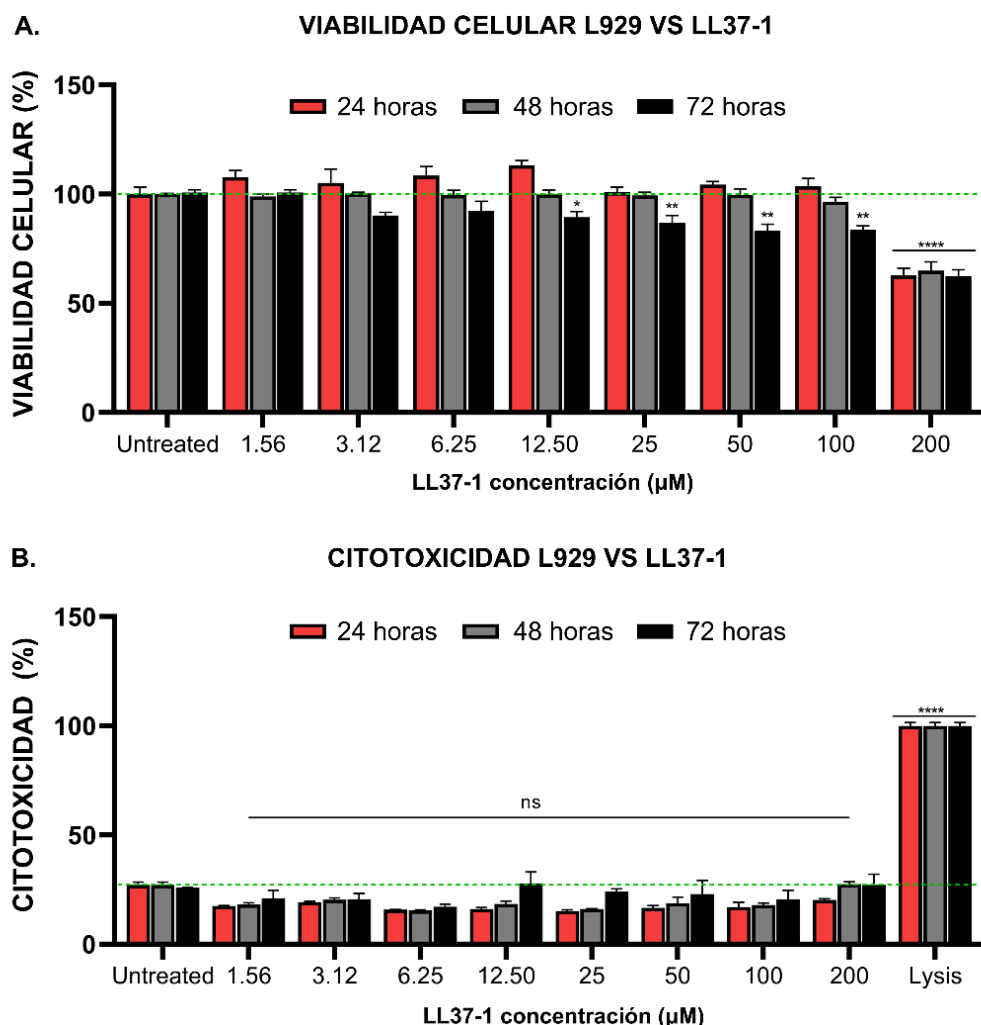
**5.2.15 Inmunohistoquímica de células MPO + en el canal vaginal.** El canal vaginal de animales infectados tratados y no tratados con LL37-1 o miconazol fue embebido en parafina (2 a 3 mm) y fijado en paraformaldehído al 4% durante 2h. Posteriormente, el tejido se seccionó en serie a 8  $\mu$ m de espesor utilizando un microtomo para ser montados en portaobjetos de vidrio. Los portaobjetos se procesaron en el sistema VENTANA BenchMark ULTRA IHC/ISH (Roche, USA) con las siguientes instrucciones: recuperación de antígeno por 4 min a pH 9, incubación con anti-MPO durante 8 min y contratinción con hemateína durante 8 min. Los portaobjetos fueron analizados tomando fotografías aleatorias de 5 campos y midiendo el área de las células positivas en el software ImageJ.

**5.2.16 Medición de citoquinas.** El canal vaginal de animales infectados tratados y no tratados con LL37-1 o miconazol se removió asépticamente y homogeneizó en 1ml de PBS. El sobrenadante se separó centrifugando el homogenizado a 2000 g por 15 minutos, se pasó por un filtro de 0.22 $\mu$ m (Millipore, Bedford, Massachusetts, USA) y se almacenó a -80°C. Las concentraciones de citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-10 e IL-17a se evaluaron por medio del ensayo ELISA (Opteia, BD, Becton, Dickinson and Company; Sparks, NV, USA), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se utilizó como control, tejido vaginal de animales infectados no tratados y no infectados.

**5.2.17 Análisis estadístico.** Los resultados se analizaron utilizando el software GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Inc., San Diego, CA). Las diferencias en los datos de viabilidad y citotoxicidad celular en línea L929, % de colocalización de MPO, conteo de UFC, conteo de células inflamatorias, aumento del grosor epitelial, inmunohistoquímica de células MPO+ y los niveles de citoquinas se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) seguido del post-test de Tukey. Las diferencias en la viabilidad de PMN fue analizada mediante análisis ANOVA seguido de post-test de Dunnett. Las diferencias en la capacidad fagocítica y la actividad fungicida se analizó mediante la prueba *t* de Student. Los resultados se consideraron significativos cuando el  $p < 0,05$ . Todos los experimentos se realizaron al menos 2 veces.

## 6. RESULTADOS

**6.1 El péptido LL37-1 posee una baja toxicidad en células L929.** Para evaluar la toxicidad del péptido LL37-1, tratamos células L929 con diferentes dosis de LL37-1. Posteriormente medimos la viabilidad celular a través de MTT y determinamos la citotoxicidad midiendo los niveles de LDH liberado por las células tratadas. Demostramos que el péptido LL37-1 no altera la viabilidad de las células a dosis inferiores de 100  $\mu\text{M}$  durante 24, 48 y 72 horas (**Figura 5, A**). Además, evidenciamos que el péptido LL37-1 no altera la permeabilidad de la membrana plasmática, dado que los niveles de LDH se mantuvieron al mismo nivel del control no tratado, por lo que la citotoxicidad de las células tratadas con LL37-1 fue considerablemente baja (**Figura 5, B**).

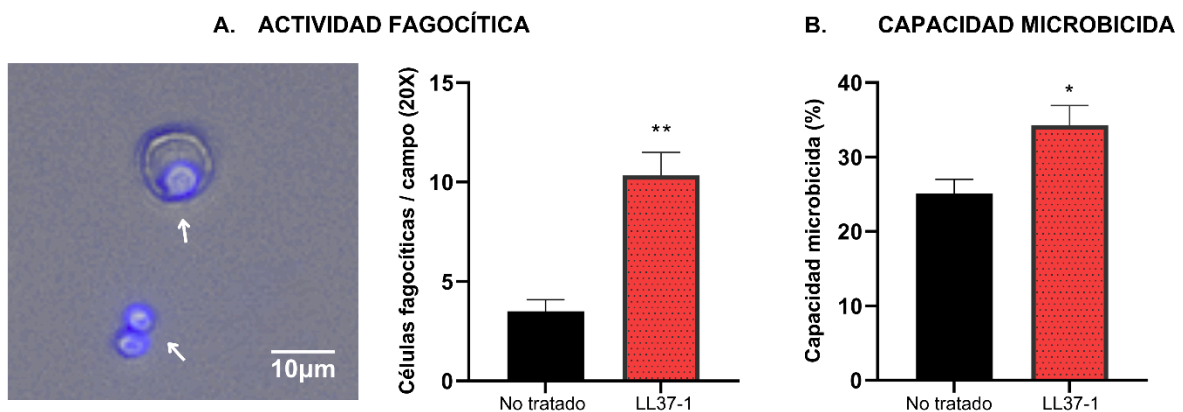


**Figura 5. LL37-1 no genera efectos tóxicos en la línea celular murina.** La toxicidad del péptido LL37-1 en células L929 es baja a concentraciones  $<100 \mu\text{M}$  (A, B). Las células fueron incubadas con diferentes concentraciones de LL37-1 durante 24 horas (negro), 48 horas (gris) y 72 horas (blanco). (A) La viabilidad fue medida colorimétricamente por MTT. (B) La citotoxicidad se determinó midiendo la actividad de LDH. Se indica el porcentaje de viabilidad y citotoxicidad del control sin LL37-1 mediante barra y línea de puntos verdes (A,B). Significancia estadística \*  $P$

<0,05, \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*\*  $P < 0,0001$ , ns (no significance) frente a los controles no tratados, ANOVA seguido de la prueba Tukey.

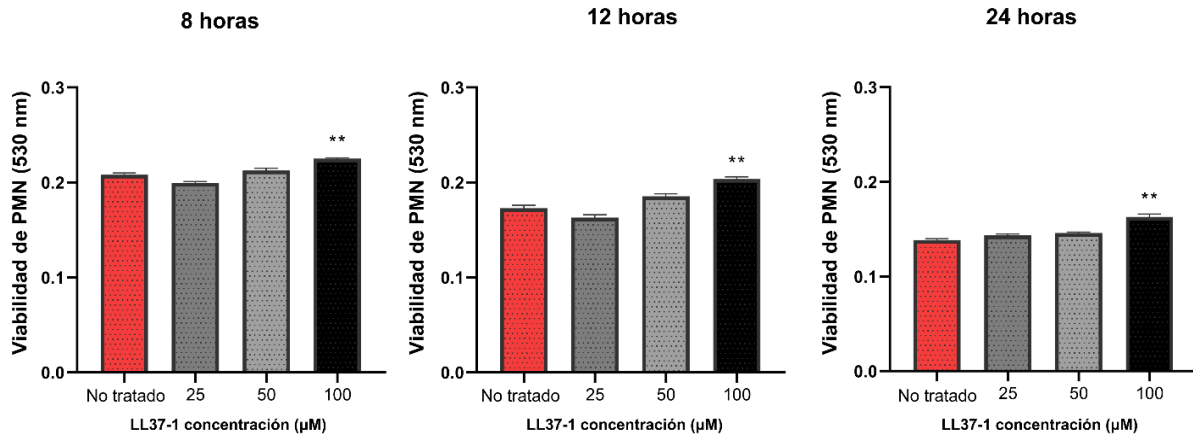
## 6.2 Los PMN estimulados con LL37-1 poseen un mayor potencial antifúngico.

Los neutrófilos han ganado una relevancia importante en la VVC, dado que las pseudohifas de *C. albicans* inducen una migración exacerbada de PMN a la cavidad vaginal, generando un estado inflamatorio crónico<sup>12</sup>. La evidencia demuestra que estos PMN infiltrados no logran reducir la carga fúngica<sup>12</sup>. Previamente se ha demostrado que los PMN aislados de mujeres con RVVC presentan una capacidad fagocítica y microbicida deteriorada<sup>82</sup>. Por tanto, evaluamos la capacidad de LL37-1 para potenciar la capacidad antifúngica de los PMN midiendo la fagocitosis *in vitro* de estas células tras el estímulo con LL37-1. Sorprendentemente encontramos un aumento significativo de levaduras fagocitadas en los PMN tratados con LL37-1, demostrando que este péptido potencia la capacidad fagocítica de estas células (**Figura 6, A**). Además, evaluamos la eficacia de la fagocitosis mediante la medición colorimétrica de la viabilidad de *C. albicans* tras el cocultivo con PMN tratados con LL37-1 a través de MTT, demostrando que la fagocitosis de los PMN estimulados con este péptido es eficiente, dado que logra matar considerablemente mejor las levaduras en comparación con los PMN sin estímulo (**Figura 6, B**). Evaluamos también los efectos de este péptido sobre la viabilidad de PMN humanos mediante MTT durante 8, 12 y 24 horas, demostrando que este péptido aumenta la viabilidad de las células a concentraciones de 100  $\mu\text{M}$  (**Figura 7**).



**Figura 6. LL37-1 potencia la capacidad antifúngica de PMN humanos.** PMN previamente tratados o no tratados con LL37-1  $\text{IC}_{50}$  se co-incubaron con *C. albicans* ATCC 10231 durante 1 hora y se midió la capacidad fagocítica y fungicida (B,C). (A) La actividad fagocítica se expresa como células fagocíticas (PMN gris con levadura azul en su interior) por campo. Significancia estadística \*\*  $P 0,0063$  por estudio  $t$  test de dos colas no pareadas. (B) La capacidad fungicida se evaluó midiendo colorimétricamente la viabilidad de las levaduras con y sin PMN tratados o no tratados. Significancia estadística \*  $P 0,0494$  por two-tailed dos colas no pareadas  $t$  test.

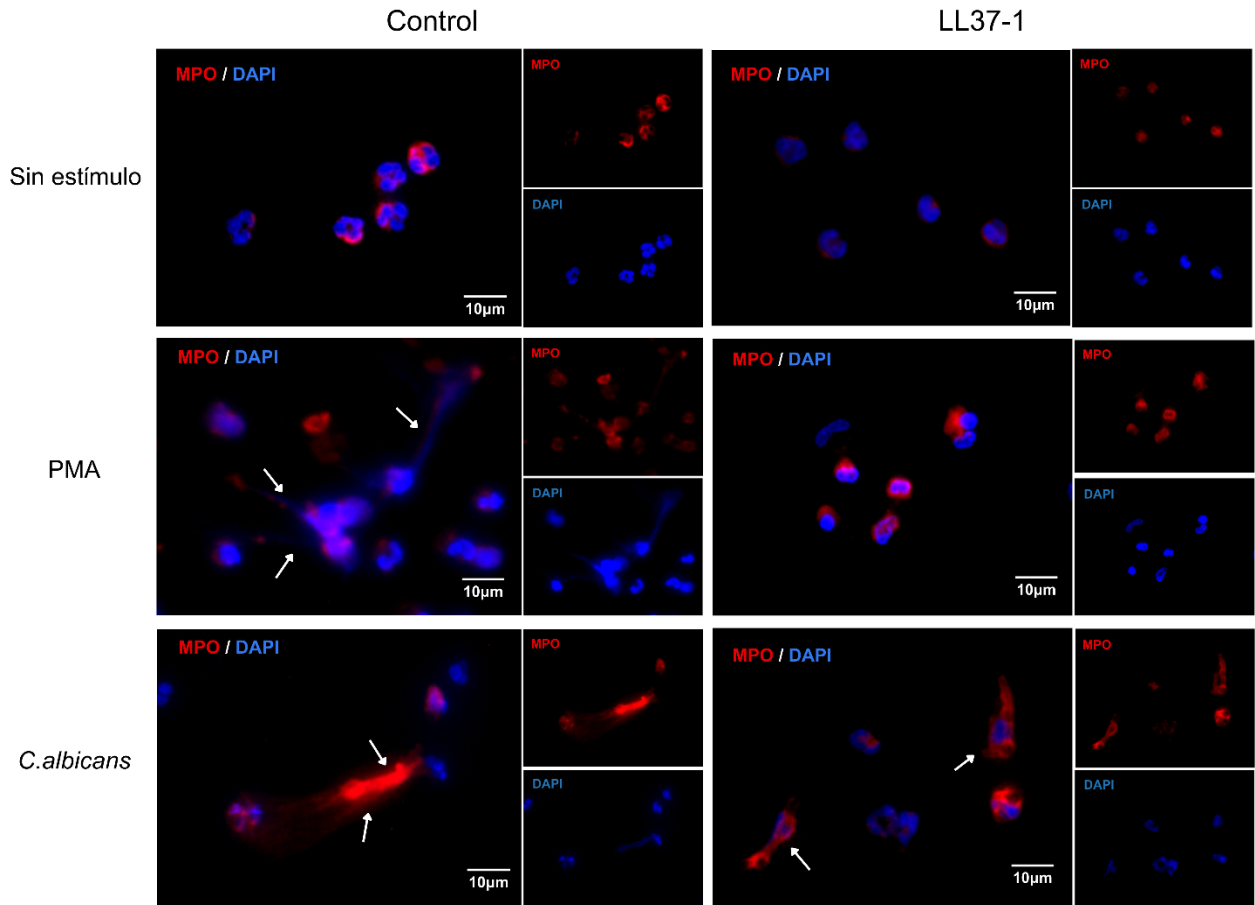
### VIABILIDAD CELULAR PMN vs LL37-1



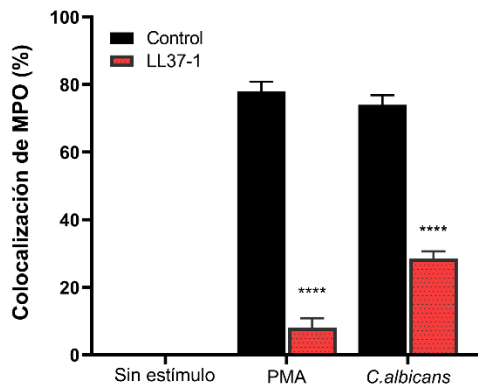
**Figura 7. LL37-1 ejerce un efecto citoprotector en PMN humanos.** La viabilidad de los PMN tratados a diferentes concentraciones de LL37-1 se evaluó mediante MTT en 8,12 y 24 horas. Significancia estadística \*\*  $P < 0,0065$  frente al control no tratado en cada tiempo evaluado. ANOVA seguido de prueba Dunnett.

**6.3 LL37-1 inhibe la NETosis en neutrófilos humanos e induce IFN- $\gamma$ .** Los neutrófilos poseen la capacidad de liberar trampas extracelulares (NETs) que atrapan y destruyen los microorganismos <sup>53</sup>. Se ha evidenciado que las pseudohifas de *C. albicans* inducen la NETosis debido a su tamaño <sup>54</sup>. Poco se sabe del rol de la NETosis en VVC, sin embargo, un estudio reciente demostró que la presencia de células netóticas dentro de la cavidad vaginal es elevada en mujeres con VVC <sup>55</sup>. Además, se ha relacionado la NETosis con una mayor citotoxicidad para células adyacentes, provocando lesiones tisulares <sup>83</sup>. En este estudio evaluamos el rol de LL37-1 en el proceso de NETosis, cuantificando las células netóticas a través de inmunofluorescencia de mieloperoxidasa (MPO), una proteína que se libera al espacio extracelular durante la NETosis junto al ADN <sup>53</sup>. Descubrimos que LL37-1 a diferencia de la catelicidina humana, inhibe la formación de trampas extracelulares frente al estímulo con PMA y en la infección por *C. albicans*, ya que disminuye significativamente el número de células con colocación de MPO con respecto a los controles sin LL37-1 (**Figura 8, A y B**). Curiosamente encontramos que los neutrófilos infectados con *C. albicans* y tratados con LL37-1 logran fagocitar las pseudohifas sin inducir la NETosis. En este contexto, medimos también los niveles de IFN- $\gamma$  en el sobrenadante de las células estimuladas, ya que desde hace varios años se ha demostrado que IFN- $\gamma$  estimula la fagocitosis de *C. albicans* y potencia la capacidad microbicida de PMN y macrófagos <sup>84,85</sup>. En este estudio demostramos que los PMN tratados con LL37-1 producen niveles más altos de IFN- $\gamma$  con respecto a los PMN no tratados (**Figura 8, C**).

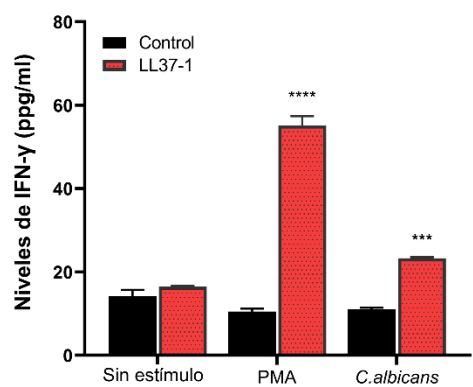
## A. INMUNOFLUORESCENCIA DE MPO



## B. COLOCALIZACIÓN DE MPO



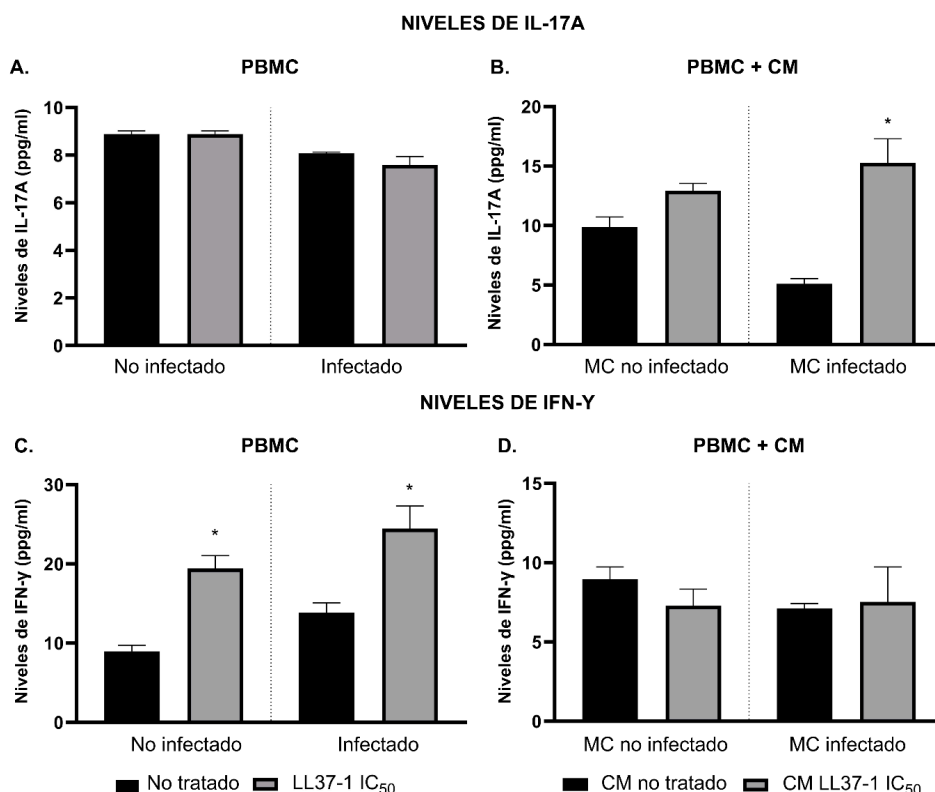
## C. IFN- $\gamma$



**Figura 8: LL37-1 inhibe la NETosis en neutrófilos humanos.** Se estimularon neutrófilos humanos con PMA o pseudohifas de *C. albicans* 10231, cada grupo tratado con LL37-1, utilizando un control sin LL37-1 (A,B,C). La inmunotinción de MPO y DNA revela que hay una disminución de las células netóticas en los grupos tratados con LL37-1 (A,B). (A) En el grupo infectado con *C. albicans* se observa una pseudohifa dentro de la trampa extracelular del neutrófilo no tratado con LL37-1. En los neutrófilos infectados y tratados con el péptido, se evidencia que las células son capaces de envolver las pseudohifas, pero sin llevarse a cabo la colocalización de MPO. (B) Se contaron células con colocalización de MPO en 3 campos aleatorios y se encontró que LL37-1 disminuye significativamente la presencia de estas células en los grupos evaluados. Significancia estadística \*\*\*\*  $P < 0,0001$  frente a los controles sin LL37-1, ANOVA seguido de la prueba Tukey. (C) Los niveles de IFN- $\gamma$  se midieron a través de ELISA y se demostró que LL37-1 aumenta los

niveles de esta citoquina en los 3 grupos evaluados. Significancia estadística \*\*\*  $P < 0,0004$  frente al control respectivo no tratado. ANOVA seguido de prueba Tukey.

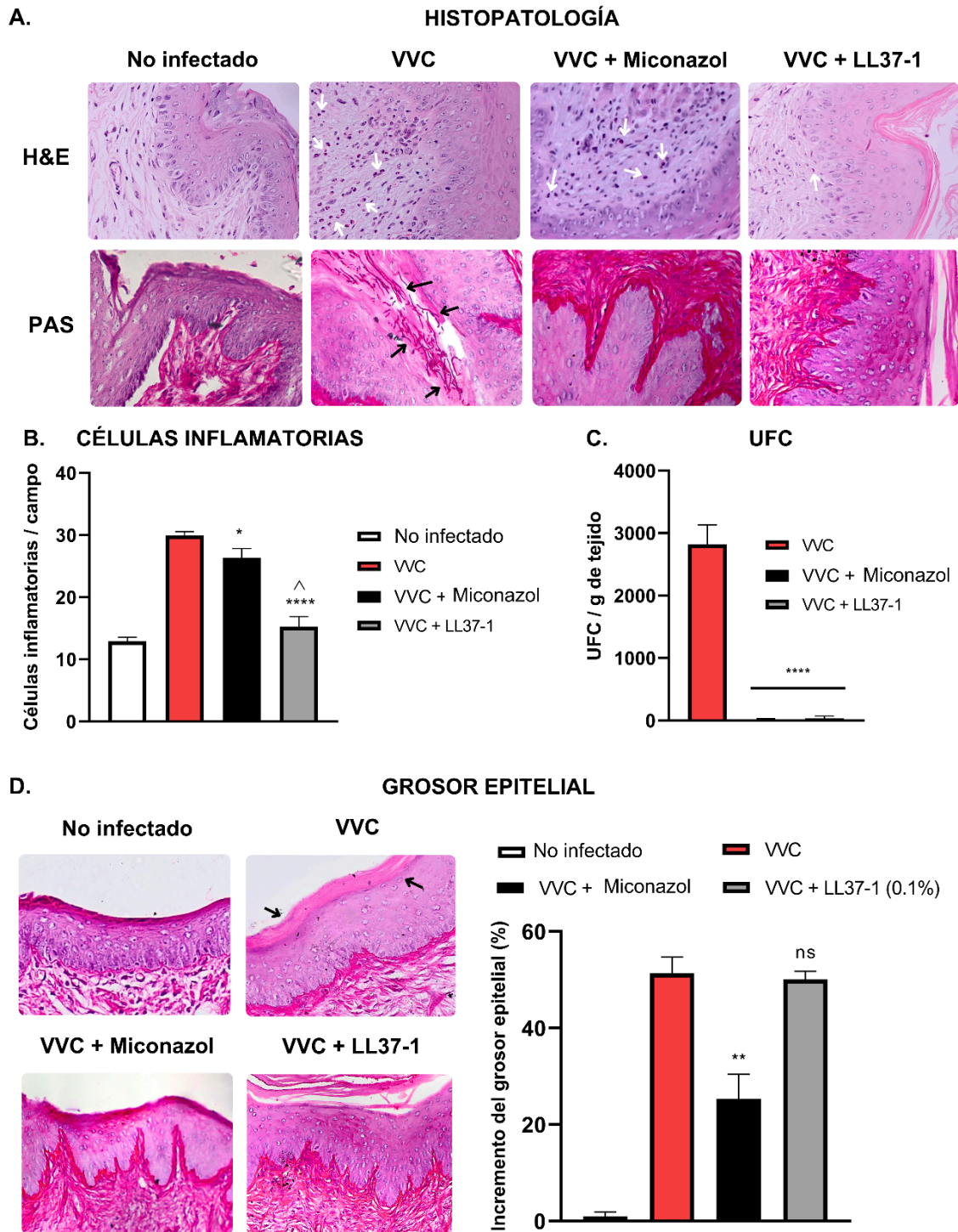
**6.4. LL37-1 regula positivamente IL-71A e IFN- $\gamma$  en PBMC humanos.** La IL-17A es vital para el establecimiento de una respuesta protectora frente a *C. albicans* en la VVC (Pietrella, Donatella *et al*, 2011). Un estudio revela que los polimorfismos genéticos en el receptor TLR2 aumenta la susceptibilidad a RVVC, por tanto, los PBMCs de estas pacientes son ineficientes en la producción de IL-17A e IFN- $\gamma$  (Rosentul, Diana C *et al*, 2014). Nosotros evaluamos la regulación de estas dos citoquinas mediada por LL37-1 en PBMCs infectados o no infectados con *C. albicans*, además tratamos estas células con medio condicionado de PMNs (CM) tratados con LL37-1. Evidenciamos que LL37-1 perse no logra regular la producción de IL-17A en PBMCs (**Figura 9, A**), sin embargo, en los PBMCs tratados con CM de PMN infectados con *C. albicans* se detectaron niveles más altos de IL-17A en comparación con el CM de PMN no infectados (**Figura 9, B**), esto sugiere que los PMN infectados con *C. albicans* y tratados con LL37-1 son capaces de producir sustancias solubles que inducen la producción de IL-17A en PBMCs. Por otra parte, demostramos que LL37-1 induce la producción de IFN- $\gamma$  en PBMCs infectados o no infectados con *C. albicans* (**Figura 9, C**), en cambio el CM de los PMN no logró este efecto (**Figura 9, D**).



**Figura 9. LL37-1 regula positivamente IL-71A e IFN- $\gamma$  en PBMC humanos.** Los PBMCs aislados de sangre periférica previamente tratados o no tratados con LL37-1 se infectaron o no se

infectaron con *C. albicans* 10231. Tras 24 horas de incubación, se recogió el sobrenadante del cultivo para medir IL-17A e IFN- $\gamma$  mediante ELISA (A,C). Se sembraron PMNs tratados o no tratados con LL37-1 e infectados o no infectados con *C.albicans* 10231 y se recogió el sobrenadante, denominado medio condicionado (CM) no tratado y CM tratado con LL37-1 IC<sub>50</sub>. El CM se agregó a PBMCs y se incubaron 24 horas, finalmente se recogió el sobrenadante y se midió IL-17A e IFN- $\gamma$  mediante ELISA (B,D). \*  $P < 0,05$  frente al respectivo control no tratado, ANOVA seguido de prueba Tukey.

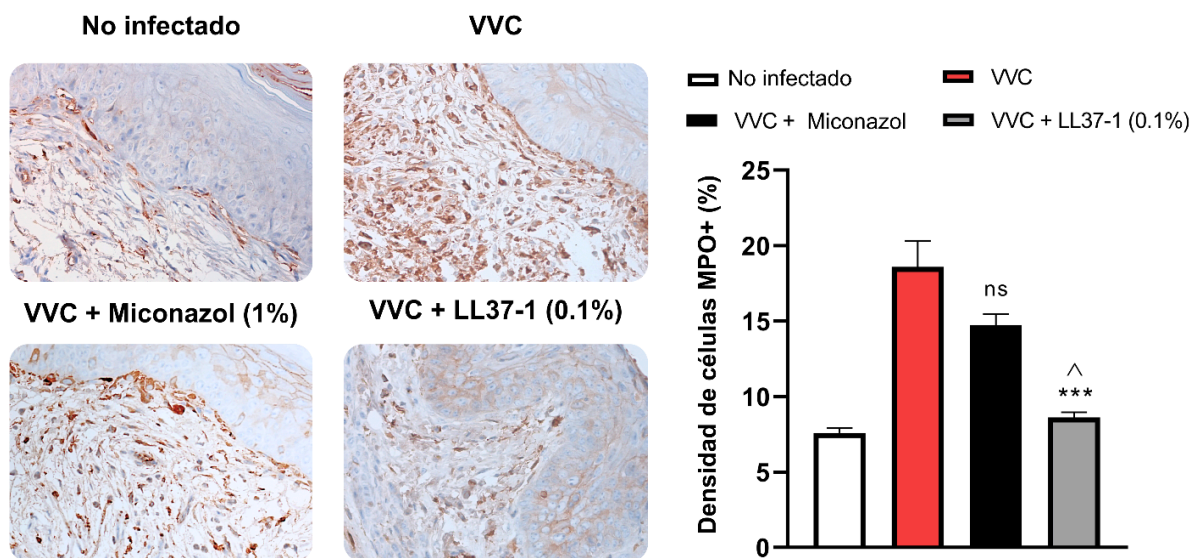
**6.5. LL37-1 resuelve la VVC en un modelo murino.** Se inocularon  $7.5 \times 10^5$  levaduras de *C. albicans* ATCC 10231 en la cavidad vaginal de ratones BALB/c previamente estrogenizados. Después de 24 horas de la inoculación, se trataron los animales con una preparación tópica de LL37-1 al 0.1% o Miconazol al 1% durante 7 días cada 24 horas. Finalizado el tratamiento, se eutanasiaron los animales y se extrajo el canal vaginal para ser macerado y sembrado en agar Mycosel para realizar el conteo de UFC. Nuestro análisis histológico demuestra una fuerte infiltración de células inflamatorias en la cavidad vaginal con VVC no tratada, sin embargo, demostramos que LL37-1 disminuye eficazmente la presencia de estas células en comparación con el canal vaginal de ratones no tratados o tratados con Miconazol (**Figura 10, A y B**). Por otra parte, evidenciamos una disminución significativa de UFC en el grupo tratado con la preparación tópica de LL37-1 al 0.1% y con Miconazol al 1% (**Figura 10, C**). Estudio previos han demostrado que durante la VVC se induce grosor del epitelio vaginal significativo, en este estudio evidenciamos que a pesar de que LL37-1 logra reducir la carga fúngica y la presencia de células inflamatorias, no logra reducir el grosor epitelial en comparación del tratamiento con Miconazol, por lo que vale la pena analizar la interacción de este péptido con células epiteliales para entender mejor este comportamiento (**Figura 10, D**).



**Figura 10. LL37-1 resuelve la VVC en un modelo murino.** Se observó el tejido vaginal a 40X con coloración de hematoxilina y eosina (H&E) y coloración de PAS. (A) Se evidencia presencia de células inflamatorias en tinción H&E (flechas blancas) e hifas de *C. albicans* 10231 (flechas negras) en tinción de PAS. (B) La presencia de células inflamatorias en el canal vaginal se cuantificó en 5 campos aleatorios en 20X y se expresó en número de células inflamatorias/campo, encontrando que LL37-1 disminuye significativamente el infiltrado de células con respecto a VVC. Significancia estadística \*  $P < 0,0271$ , \*\*\*\*  $P < 0,0001$  frente a VVC,  $\wedge P < 0,0001$  frente a VVC + Miconazol. ANOVA seguido de prueba Tukey. (C) El conteo de UFC demuestra que el tratamiento con miconazol al 1% (VVC + Miconazol) y con LL37-1 al 0.1% (VVC + LL37-1) reduce

significativamente la carga fúngica con respecto al control infectado no tratado (VVC). Significancia estadística \*\*\*\*  $P < 0,0001$  frente al control no tratado. ANOVA seguido de prueba Tukey. (D) El grosor epitelial fue medido en ImageJ y se normalizó al control no infectado como un 0% para evaluar el aumento del grosor epitelial en VVC, VVC + LL37-1 y VVC + Miconazol, encontrando que LL37-1 no disminuye el grosor epitelial con respecto a VVC. Significancia estadística \*\*  $P 0,0019$  frente a VVC, ANOVA seguido de la prueba Tukey.

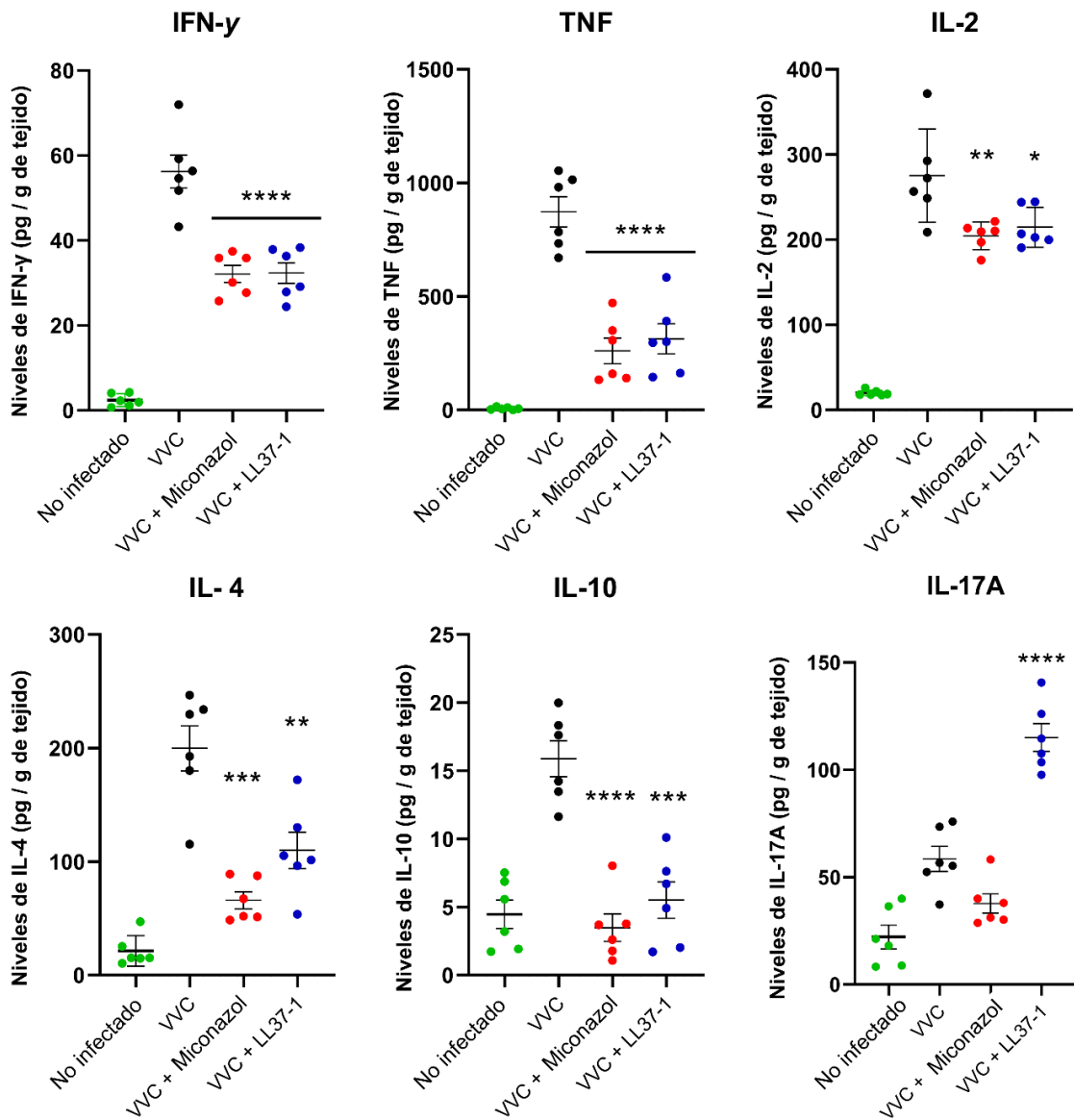
**6.6 LL37-1 modula el estado inflamatorio en VVC.** El estado inflamatorio del canal vaginal en la infección por *C. albicans* se evaluó mediante el conteo de células MPO+ en la cavidad vaginal (**Figura 11**) y la medición de citoquinas proinflamatorias (IFN- $\gamma$ , TNF, IL-2, IL-17A) y antiinflamatorias (IL-4 e IL-10) (**Figura 11**). La presencia de neutrófilos se verificó por medio de inmunohistoquímica tiñendo células MPO+, para ello, se procesaron los tejidos en el sistema automatizado VENTANA BenchMark ULTRA IHC/ISH y se cuantificó el área de células MPO+. Nuestros hallazgos se correlacionan con el conteo de células inflamatorias, confirmando que LL37-1 disminuye de manera significativa la presencia de neutrófilos dentro de la cavidad vaginal (**Figura 11**).



**Figura 11. LL37-1 regula la presencia de células MPO+.** Se realizó tinción de inmunohistoquímica utilizando anticuerpo anti-MPO para verificar la presencia de neutrófilos en el tejido vaginal y se observó a 40X. Se evidencia que LL37-1 disminuye la presencia de células MPO+ significativamente con respecto a VVC. Significancia estadística \*\*\*  $P 0,0004$  frente a VVC,  $\wedge P 0,0089$  frente a VVC + miconazol, ANOVA seguido de la prueba Tukey.

Demostramos que Miconazol y LL37-1 logran resolver la infección y el estado inflamatorio, por tanto, la presencia de citoquinas proinflamatorias disminuye significativamente con respecto al control no tratado. Cabe mencionar que LL37-1 no logra inducir la producción de citoquinas antiinflamatorias, sin embargo, a diferencia

de Miconazol, logra aumentar significativamente los niveles de IL-17A, una citoquina vital en la protección frente a *C. albicans*<sup>19</sup> (Figura 12).



**Figura 12. LL37-1 regula positivamente IL-17A en VVC.** Los niveles de citoquinas en el canal vaginal de ratones con VVC no tratados (puntos negros), tratados con miconazol (puntos rojos) o LL37-1 al 0.1% (puntos azules) y no infectados (puntos verdes) se detectaron mediante ELISA. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.0004$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$  frente al control infectado no tratado (VVC). ANOVA seguido de prueba Tukey.

## 7. DISCUSIÓN

A pesar de la disponibilidad comercial de antifúngicos orales y tópicos para la VVC, esta patología continúa siendo altamente frecuente a nivel mundial. Preocupantemente los casos de RVVC van cada día en aumento<sup>7</sup>, haciendo que el tratamiento de esta enfermedad continúe enfrentando desafíos<sup>86</sup>. Previamente hemos reportado una alta resistencia a los antifúngicos convencionalmente usados en cepas de *C. albicans* aisladas de mujeres portadoras de RVVC<sup>18</sup>. Sin embargo, la resistencia antifúngica es solo uno de los retos que enfrenta el tratamiento de esta patología, dado que en los últimos años se ha reportado que deficiencias en la respuesta inmune dificultan el éxito terapéutico. Curiosamente esta patología afecta a mujeres inmunocompetentes<sup>87</sup> por lo que la investigación de esta enfermedad cada día se centra más en las interacciones de *Candida albicans* con el sistema inmune<sup>6</sup>. Esto hace que sea importante la búsqueda de alternativas terapéuticas que no solo se limiten a erradicar este microorganismo, sino que también logren tratar el estado inflamatorio del tejido vaginal infectado. Dentro de este contexto, hemos caracterizado previamente la capacidad antifúngica del péptido LL37-1, demostrando que este péptido posee un potencial antifúngico promisorio, inhibiendo la proliferación de cepas aisladas de VVC y RVVC altamente resistentes a los azoles<sup>18</sup>. Este péptido análogo de la catelicidina humana LL37 está amidado en la posición C-terminal, por lo que posee una mayor actividad biológica, siendo resistente a la degradación por exoproteasas de *C. albicans*<sup>88</sup>. En este estudio demostramos que LL37-1 no genera efectos tóxicos en células murinas ni en tejido vaginal, por lo que este péptido es un potencial candidato terapéutico para tratar la VVC y RVVC, sin embargo, nuestros hallazgos deben ser verificados en células humanas (**Figura 5**).

Estudios recientes han demostrado que durante la VVC hay un proceso inflamatorio caracterizado por el infiltrado exacerbado de neutrófilos en la cavidad vaginal, sin embargo, se ha evidenciado que estos neutrófilos no son funcionales<sup>12</sup>. Esto ha generado controversia, dado que algunos estudios han reportado que la presencia de sulfato de heparán (HS) inhibe la fagocitosis debido a su interacción con el receptor Mac-1<sup>89</sup>, sin embargo, se ha demostrado también que la presencia de estrógenos promueve la disfunción de los neutrófilos<sup>90</sup>, además, un estudio reciente demostró que los neutrófilos aislados de sangre periférica de mujeres con RVVC poseen una

capacidad fagocítica deteriorada <sup>82</sup>. Por su parte, la catelicidina humana LL37, posee funciones inmunomoduladoras <sup>72</sup>, promoviendo la quimiotaxis de neutrófilos y macrófagos <sup>91</sup>, potenciando la fagocitosis <sup>92</sup> e induciendo la NETosis <sup>93</sup>. Cabe destacar que a este péptido se le ha atribuido una capacidad antiinflamatoria al interactuar con los lipopolisacáridos bacterianos (LPS), impidiendo que se desencadene una respuesta proinflamatoria <sup>94</sup>. Por esta razón, evaluamos la interacción del péptido LL37-1 con PMN aislados de sangre periférica y nuestros hallazgos fueron sorprendentes, dado que a pesar de ser un péptido más corto que la catelicidina humana, LL37-1 potenció significativamente la fagocitosis y muerte de las levaduras de *C. albicans* en PMN (**Figura 6**). Nuestro hallazgo sugiere que durante la VVC, el péptido LL37-1 puede evitar la anergia de los neutrófilos y hacerlos funcionales frente a la infección. Curiosamente un estudio previo reportó que distintas regiones de la catelicidina LL37 pueden interactuar con el receptor Mac-1 de las células fagocíticas, potenciando la fagocitosis <sup>16</sup>, cabe mencionar que LL37-1 conserva varios aminoácidos de la catelicidina humana que le permiten interactuar con Mac-1, lo cual podría explicar nuestros hallazgos. Evidenciamos también que el péptido LL37-1 no altera la viabilidad de los PMN humanos y de hecho, a concentraciones de 100 µM aumenta significativamente la viabilidad de estas células. Esto sugiere que LL37-1 puede ejercer un efecto citoprotector sobre los PMN, haciéndolos más resistentes a la citólisis mediada por pseudohifas de *C. albicans* (**Figura 6, C**).

El papel de la NETosis en la VVC ha sido poco estudiado, se sabe que las pseudohifas de *C. albicans* descancendan el proceso de NETosis y se ha demostrado que mujeres portadoras de VVC poseen un número elevado de células netóticas en la cavidad vaginal, sin embargo también se ha reportado que la deficiencia en la capacidad de formar trampas extracelulares está atribuida a una mayor susceptibilidad de desarrollar VVC y RVVC <sup>95</sup>. Cabe mencionar que diversos estudios han relacionado la NETosis con un mayor daño tisular <sup>83</sup>. Por otra parte, la catelicidina humana LL37, es liberada al espacio extracelular especialmente durante la NETosis y potencia la formación de trampas extracelulares <sup>96</sup>. Sin embargo, contrario a lo esperado, el péptido análogo LL37-1 redujo significativamente la capacidad de formar NETosis, manteniendo la morfología de las células cuando se expusieron a PMA o se infectaron con pseudohifas de *C. albicans* (**Figura 7, A y B**). Sorprendentemente los

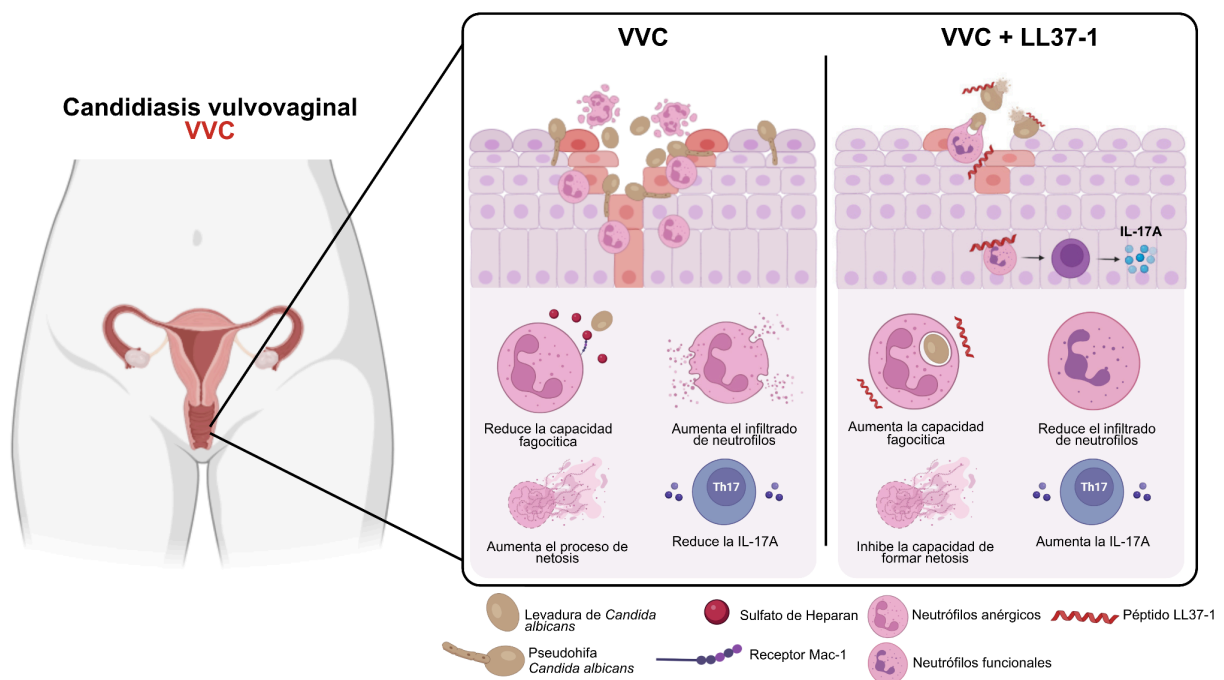
neutrófilos infectados y tratados con LL37-1 lograron fagocitar mejor las pseudohifas de este microorganismo, elevando los niveles de IFN- $\gamma$  (**Figura 7, C**), una citoquina que potencia la capacidad fagocítica de los PMN <sup>84</sup>. Es importante precisar que se ha observado bajos niveles de IFN- $\gamma$  en mujeres portadoras de RVVC <sup>97</sup>.

La evaluación de la dinámica del péptido LL37-1 en el modelo *in vivo* de VVC es fundamental en este estudio. Nuestros hallazgos demuestran que la formulación tópica de LL37-1 durante 7 días de aplicación, logra resolver efectivamente la infección al igual que el miconazol (**Figura 8**). Este hallazgo sugiere que la capacidad antifúngica del péptido previamente reportada <sup>18</sup> se mantiene estable en el organismo y no se ve afectada tras la formulación tópica. A comparación del miconazol, el péptido LL37-1 disminuye significativamente el infiltrado de neutrófilos en la cavidad vaginal (**Figura 8**). Esto comprueba que LL37-1 mejora las funciones de los neutrófilos *in vivo*, provocando un menor reclutamiento de neutrófilos y la resolución de la infección. Nuestro análisis histopatológico revela que LL37-1 no induce daños tisulares adversos, sin embargo, tras la medición del grosor epitelial evidenciamos que este péptido no logra una reducción significativa del grosor del epitelio vaginal con respecto al control no tratado, por tanto, pretendemos estudiar a futuro las interacciones de LL37-1 con células del epitelio vaginal durante la infección por *C.albicans*.

El papel de la respuesta Th17 durante la VVC ha sido controversial desde hace varios años, ya que algunos estudios confirman que la baja presencia de células Th17 en la cavidad vaginal se relaciona con una capacidad deficiente del sistema inmune para resolver la VVC <sup>98</sup>. Otros estudios han demostrado que la respuesta Th17 se relaciona con un mayor reclutamiento de neutrófilos <sup>99</sup>, sin embargo, recientemente un estudio en ratones *knockout* para los mediadores de la IL-17 (IL-17RA<sup>-/-</sup>, IL-22<sup>-/-</sup> e IL-23p19<sup>-/-</sup>) no presentaron cambios en la carga fúngica ni en el infiltrado de neutrófilos con respecto a los ratones *wild-type* <sup>100</sup>. Sin embargo, a pesar de esta controversia, evaluamos la modulación *in vivo* de la respuesta Th17 mediada por LL37-1, puesto que se ha demostrado que la catelicidina humana induce una respuesta Th17 y una elevación de la citoquina IL-17A <sup>101</sup>, encontrando que LL37-1 aumenta significativamente los niveles de IL-17A en la cavidad vaginal con respecto a

los ratones sin tratamiento o tratados con miconazol. Es importante precisar que la medición de citoquinas proinflamatorias (IFN- $\gamma$ , TNF, IL-2, IL-17A) y antiinflamatorias (IL-4 e IL-10) se mantienen bajas en ratones tratados con miconazol y LL37-1, esto se debe a la pronta resolución de la infección con estos tratamientos.

Este estudio demostró que el péptido LL37-1 resuelve la infección y adicionalmente mejora el estado inflamatorio, reduciendo la presencia de neutrófilos en la cavidad vaginal. Esto se correlaciona con nuestros hallazgos *in vitro*, donde LL37-1 mejoró considerablemente la capacidad fagocítica y potenció la actividad microbicida de los PMN, inhibiendo la NETosis y regulando positivamente la producción de IFN- $\gamma$ . Curiosamente *in vivo* no observamos una modulación en los niveles de IFN- $\gamma$ , sin embargo, esto puede deberse a la pronta resolución de la infección, por lo que a futuro evaluaremos la cinética de IFN- $\gamma$  *in vivo*. LL37-1 demostró ser un candidato promisorio para tratar las infecciones vaginales causadas por *C. albicans*. Nuestro estudio abre las puertas al estudio de formulaciones terapéuticas que erradiquen el hongo mientras mejoran la respuesta inmune.



**Figura 13: LL 37-1 es un potente candidato para tratar la VVC.** La VVC se caracteriza por generar un estado inflamatorio grave que no es capaz de resolver la infección, dado el estado de anergia de los PMN. LL 37-1 logra mejorar el estado inflamatorio, erradicando al hongo gracias a su capacidad antimicrobiana y puede potenciar las capacidades antifúngicas de los PMN, haciéndolos funcionales y desencadenando una respuesta protectora de tipo Th17.

## 8. CONCLUSIONES

La VVC es una enfermedad multifactorial poco estudiada y comprendida a pesar de ser la infección fúngica más frecuente. La evidencia demuestra que las deficiencias inmunológicas cumplen un papel importante en la patogenia de esta enfermedad. Por tanto, la VVC no debe ser entendida como una infección fúngica solamente, dado que la VVC es la suma de factores fisiopatológicos que van desde el estado de la microbiota a mutaciones genéticas esenciales para el establecimiento de una respuesta inmune efectiva.

Muy pocos estudios han dirigido la búsqueda de alternativas terapéuticas hacia una terapia que logre interrumpir la interacción de *C. albicans* con el huésped. Por tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antifúngica e inmunomoduladora de LL37-1 durante la VVC. Nuestros resultados fueron sorprendentes, dado que demostramos que este péptido no solo posee la capacidad de formar poros en la membrana de este hongo, sino que también, provoca que la respuesta inmune sea más eficiente a la hora de erradicar este patógeno.

Este estudio abre las puertas a nuevas posibilidades, que permitirán entender el tratamiento de esta patología desde un nuevo enfoque. Sin embargo, queda un largo camino por recorrer, ya que estos experimentos deben ser probados en PMN y PBMC de mujeres portadoras de VVC y RVVC para evaluar el efecto de LL37-1 en células enfermas. En este sentido, nuestros hallazgos resultan prometedores dado que el efecto de este péptido sobre las capacidades antifúngicas de la inmunidad innata *in vitro* e *in vivo* fueron significativas. Además, nuestros ensayos *in vitro* trazan un camino que guiará los análisis futuros.

En este sentido, el péptido LL 37-1 ha demostrado ser un potencial candidato para tratar la VVC y RVCC, dada su baja toxicidad, su bajo costo y la facilidad para ser aplicado a través de cremas y duchas vaginales, además, de su fuerte capacidad antimicrobiana e inmunomoduladora. El camino para la búsqueda de alternativas terapéuticas racionales para tratar esta patología multifactorial, apenas comienza.

## 8. REFERENCIAS

1. Achkar JM, Fries BC. Candida infections of the genitourinary tract. *Clin Microbiol Rev.* 2010 Apr;23(2):253-73.
2. Rathod SD, Buffler PA. Highly-cited estimates of the cumulative incidence and recurrence of vulvovaginal candidiasis are inadequately documented. *BMC Womens Health.* 2014 Mar 10;14(1):43.
3. Benedict K, Singleton AL, Jackson BR, Molinari NAM. Survey of incidence, lifetime prevalence, and treatment of self-reported vulvovaginal candidiasis, United States, 2020. *BMC Womens Health.* 2022 May 10;22(1):147.
4. Zhang X, Essmann M, Burt ET, Larsen B. Estrogen effects on *Candida albicans*: a potential virulence-regulating mechanism. *J Infect Dis.* 2000 Apr;181(4):1441-6.
5. Benedict K, Jackson BR, Chiller T, Beer KD. Estimation of Direct Healthcare Costs of Fungal Diseases in the United States. *Clin Infect Dis.* 2019 May 17;68(11):1791-1797.
6. Ge G, Yang Z, Li D, Zhang N, Chen B, Shi D. Distinct host immune responses in recurrent vulvovaginal candidiasis and vulvovaginal candidiasis. *Front Immunol.* 2022;13:959740.
7. Denning DW. Global incidence and mortality of severe fungal disease. *Lancet Infect Dis.* 2024 Jul;24(7):e428-e438.
8. Workowski KA, Bachmann LH, Chan PA, Johnston CM, Muzny CA, Park I, Reno H, Zenilman JM, Bolan GA. Sexually Transmitted Infections Treatment Guidelines, 2021. *MMWR Recomm Rep.* 2021 Jul 23;70(4):1-187.
9. Farr A, Effendy I, Frey Tirri B, Hof H, Mayser P, Petricevic L, Ruhnke M, Schaller M, Schaefer APA, Sustr V, Willinger B, Mendling W. Guideline: Vulvovaginal candidosis (AWMF 015/072, level S2k). *Mycoses.* 2021 Jun;64(6):583-602.
10. Richardson JP, Mogavero S, Moyes DL, Blagojevic M, Krüger T, Verma AH, Coleman BM, De La Cruz Diaz J, Schulz D, Ponde NO, Carrano G, Kniemeyer O, Wilson D, Bader O, Enoiu SI, Ho J, Kichik N, Gaffen SL, Hube B, Naglik JR. Processing of *Candida albicans* Ece1p Is Critical for Candidalysin Maturation and Fungal Virulence. *mBio.* 2018 Jan 23;9(1):e02178-17.
11. Moyes, David L et al. "Candidalysin is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection." *Nature* vol. 532,7597 (2016): 64-8.
12. Yano, Junko et al. "Novel Mechanism behind the Immunopathogenesis of Vulvovaginal Candidiasis: "Neutrophil Anergy"." *Infection and immunity* vol. 86,3 e00684-17.
13. Yano, Junko et al. "Novel Mechanism behind the Immunopathogenesis of Vulvovaginal Candidiasis: "Neutrophil Anergy"." *Infection and immunity* vol. 86,3 e00684-17.
14. Dürr, Ulrich H N et al. "LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides." *Biochimica et biophysica acta* vol. 1758,9 (2006): 1408-25.
15. Brogden, Kim A. "Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?." *Nature reviews. Microbiology* vol. 3,3 (2005): 238-50.
16. De Yang et al. "LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells." *The Journal of experimental medicine* vol. 192,7 (2000): 1069-74.
17. Zhang, Xianwei et al. "The cationic peptide LL-37 binds Mac-1 (CD11b/CD18) with a low dissociation rate and promotes phagocytosis." *Biochimica et biophysica acta* vol. 1864,5 (2016): 471-8.

18. Rosenfeld, Yosef et al. "Endotoxin (lipopolysaccharide) neutralization by innate immunity host-defense peptides. Peptide properties and plausible modes of action." *The Journal of biological chemistry* vol. 281,3 (2006): 1636-43.
19. Conti, Heather R et al. "IL-17 Receptor Signaling in Oral Epithelial Cells Is Critical for Protection against Oropharyngeal Candidiasis." *Cell host & microbe* vol. 20,5 (2016): 606-617.
20. Rossi, Diego C et al. "Therapeutic use of a cationic antimicrobial peptide from the spider *Acanthoscurria gomesiana* in the control of experimental candidiasis." *BMC microbiology* vol. 12 28. 6 Mar. 2012
21. Muñoz JE, Rossi DCP, Ishida K, et al. Antifungal Activity of the Biphosphinic Cyclopalladate C7a against *Candida albicans* Yeast Forms In Vitro and In Vivo. *Front Microbiol.* 2017;8:771
22. Csato, M et al. "Enhancement of *Candida albicans* killing activity of separated human epidermal cells by alpha-melanocyte stimulating hormone." *The British journal of dermatology* vol. 121,1 (1989): 145-7.
23. d'Enfert C, Kaune AK, Alaban LR, 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 Microbiol Rev.* 2021;45(3).
24. Doron I, Mesko M, Li XV, Kusakabe T, Leonardi I, Shaw DG, et al. Mycobiota-induced IgA antibodies regulate fungal commensalism in the gut and are dysregulated in Crohn's disease. *Nat Microbiol.* 2021;6(12):1493-504.
25. Silva-Dias A, Miranda IM, Branco J, Monteiro-Soares M, Pina-Vaz C, Rodrigues AG. Adhesion, biofilm formation, cell surface hydrophobicity, and antifungal planktonic susceptibility: relationship among *Candida* spp. *Front Microbiol.* 2015;6:205.
26. Scarsini M, Tomasinsig L, Arzese A, D'Este F, Oro D, Skerlavaj B. Antifungal activity of cathelicidin peptides against planktonic and biofilm cultures of *Candida* species isolated from vaginal infections. *Peptides.* 2015;71:211-21.
27. Hoyer LL, Cota E. *Candida albicans* Agglutinin-Like Sequence (Als) Family Vignettes: A Review of Als Protein Structure and Function. *Front Microbiol.* 2016;7:280.
28. 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):e64.
29. Rajendran R, Sherry L, Nile CJ, Sherriff A, Johnson EM, Hanson MF, et al. Biofilm formation is a risk factor for mortality in patients with *Candida albicans* bloodstream infection-Scotland, 2012-2013. *Clin Microbiol Infect.* 2016;22(1):87-93.
30. Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ, et al. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J Dent Res.* 2001;80(3):903-8.
31. Uppuluri P, Acosta Zaldivar M, Anderson MZ, Dunn MJ, Berman J, Lopez Ribot JL, et al. *Candida albicans* Dispersed Cells Are Developmentally Distinct from Biofilm and Planktonic Cells. *mBio.* 2018;9(4).
32. 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.
33. d'Enfert C, Kaune AK, Alaban LR, 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 Microbiol Rev.* 2021;45(3)
34. Doron I, Mesko M, Li XV, Kusakabe T, Leonardi I, Shaw DG, et al. Mycobiota-induced IgA antibodies regulate fungal commensalism in the gut and are dysregulated in Crohn's disease. *Nat Microbiol.* 2021;6(12):1493-504.

35. Hoyer LL, Cota E. *Candida albicans* Agglutinin-Like Sequence (Als) Family Vignettes: A Review of Als Protein Structure and Function. *Front Microbiol.* 2016;7:280.
36. 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):e64.
37. Gow NA, Brown AJ, Odds FC. Fungal morphogenesis and host invasion. *Curr Opin Microbiol.* 2002;5(4):366-71.
38. Sudbery P, Gow N, Berman J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* 2004;12(7):317-24.
39. Pande K, Chen C, Noble SM. Passage through the mammalian gut triggers a phenotypic switch that promotes *Candida albicans* commensalism. *Nat Genet.* 2013;45(9):1088-91.
40. Sasse C, Hasenberg M, Weyler M, Gunzer M, Morschhauser J. White-opaque switching of *Candida albicans* allows immune evasion in an environment-dependent fashion. *Eukaryot Cell.* 2013;12(1):50-8.
41. Sobel JD. Vulvovaginal candidosis. *Lancet.* 2007;369(9577):1961-71.
42. Farr A, Effendy I, Frey Tirri B, Hof H, Mayser P, Petricevic L, et al. Guideline: Vulvovaginal candidosis (AWMF 015/072, level S2k). *Mycoses.* 2021;64(6):583-602.
43. Jang SJ, Lee K, Kwon B, You HJ, Ko G. Vaginal lactobacilli inhibit growth and hyphae formation of *Candida albicans*. *Sci Rep.* 2019;9(1):8121.
44. 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;5:483.
45. Eckert LO, Hawes SE, Stevens CE, Koutsky LA, Eschenbach DA, Holmes KK. Vulvovaginal candidiasis: clinical manifestations, risk factors, management algorithm. *Obstet Gynecol.* 1998;92(5):757-65.
46. Kalia N, Singh J, Kaur M. Immunopathology of Recurrent Vulvovaginal Infections: New Aspects and Research Directions. *Front Immunol.* 2019;10:2034.
47. Richardson JP, Mogavero S, Moyes DL, Blagojevic M, Kruger T, Verma AH, et al. Processing of *Candida albicans* Ece1p Is Critical for Candidalysin Maturation and Fungal Virulence. *mBio.* 2018;9(1).
48. 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.
49. Willems HME, Ahmed SS, Liu J, Xu Z, Peters BM. Vulvovaginal Candidiasis: A Current Understanding and Burning Questions. *J Fungi (Basel).* 2020;6(1).
50. Gow NA, van de Veerdonk FL, Brown AJ, Netea MG. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol.* 2011;10(2):112-22.
51. 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;20(5):606-17.
52. Rosentul DC, Delsing CE, Jaeger M, et al. Gene polymorphisms in pattern recognition receptors and susceptibility to idiopathic recurrent vulvovaginal candidiasis. *Front Microbiol.* 2014;5:483.
53. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004;303(5663):1532-1535.
54. Branzk N, Lubojemska A, Hardison SE, et al. Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat Immunol.* 2014;15(11):1017-1025.

55. Zambrano F, Melo A, Rivera-Concha R, Schulz M, Uribe P, Fonseca-Salamanca F, Ossa X, Taubert A, Hermosilla C, Sánchez R. High Presence of NETotic Cells and Neutrophil Extracellular Traps in Vaginal Discharges of Women with Vaginitis: An Exploratory Study. *Cells*. 2022; 11(20):3185.
56. Pappas, Peter G et al. "Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America." *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* vol. 62,4 (2016): e1-50.
57. Nyirjesy P, Brookhart C, Lazenby G, Schwebke J, Sobel JD. Vulvovaginal Candidiasis: A Review of the Evidence for the 2021 Centers for Disease Control and Prevention of Sexually Transmitted Infections Treatment Guidelines. *Clin Infect Dis*. 2022 Apr 13;74(Suppl\_2):S162-S168.
58. Pappas, Peter G et al. "Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America." *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* vol. 48,5 (2009): 503-35.
59. Donders, Gilbert et al. "Management of recurrent vulvovaginal candidosis: Narrative review of the literature and European expert panel opinion." *Frontiers in cellular and infection microbiology* vol. 12 934353. 9 Sep. 2022.
60. Pappas PG, Lionakis MS, Arendrup MC, Ostrosky-Zeichner L, Kullberg BJ. Invasive candidiasis. *Nat Rev Dis Primers*. 2018;4:18026.
61. Rossi DC, Munoz JE, Carvalho DD, Belmonte R, Faintuch B, Borelli P, et al. Therapeutic use of a cationic antimicrobial peptide from the spider *Acanthoscurria gomesiana* in the control of experimental candidiasis. *BMC Microbiol*. 2012;12:28.
62. Munoz JE, Rossi DCP, Ishida K, Spadari CC, Melhem MSC, Garcia DM, et al. Antifungal Activity of the Biphosphinic Cyclopalladate C7a against *Candida albicans* Yeast Forms In Vitro and In Vivo. *Front Microbiol*. 2017;8:771.
63. Larrick JW, Hirata M, Balint RF, Lee J, Zhong J, Wright SC. Human CAP18: a novel antimicrobial lipopolysaccharide-binding protein. *Infect Immun*. 1995;63(4):1291-1297.
64. Larrick JW, Hirata M, Balint RF, Lee J, Zhong J, Wright SC. Human CAP18: a novel antimicrobial lipopolysaccharide-binding protein. *Infect Immun*. 1995;63(4):1291-1297.
65. Oren Z, Lerman JC, Gudmundsson GH, Agerberth B, Shai Y. Structure and organization of the human antimicrobial peptide LL-37 in phospholipid membranes: relevance to the molecular basis for its non-cell-selective activity. *Biochem J*. 1999;341 ( Pt 3)(Pt 3):501-513.
66. Durr UH, Sudheendra US, Ramamoorthy A. LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1758(9):1408-25.
67. Burton, Matthew F, and Patrick G Steel. "The chemistry and biology of LL-37." *Natural product reports* vol. 26,12 (2009): 1572-84.
68. Hsu, Chun-Min et al. "Candida albicans Sfp1 Is Involved in the Cell Wall and Endoplasmic Reticulum Stress Responses Induced by Human Antimicrobial Peptide LL-37." *International journal of molecular sciences* vol. 22,19 10633. 30 Sep. 2021
69. Tsai, Pei-Wen et al. "Human antimicrobial peptide LL-37 inhibits adhesion of *Candida albicans* by interacting with yeast cell-wall carbohydrates." *PloS one* vol. 6,3 e17755. 14 Mar. 2011
70. Scheenstra MR, van den Belt M, Tjeerdsma-van Bokhoven JLM, et al. Cathelicidins PMAP-36, LL-37 and CATH-2 are similar peptides with different modes of action. *Sci Rep*. 2019;9(1):4780.

71. Luo, Yu et al. "The Naturally Occurring Host Defense Peptide, LL-37, and Its Truncated Mimetics KE-18 and KR-12 Have Selected Biocidal and Antibiofilm Activities Against *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli* In vitro." *Frontiers in microbiology* vol. 8 544. 31 Mar. 2017
72. Yang, Binbin et al. "Significance of LL-37 on Immunomodulation and Disease Outcome." *BioMed research international* vol. 2020 8349712. 16 May. 2020
73. De Yang et al. "LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells." *The Journal of experimental medicine* vol. 192,7 (2000): 1069-74.
74. Scott, Monisha G et al. "The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* vol. 169,7 (2002): 3883-91.
75. Cao, Yujie et al. "LL-37 promotes neutrophil extracellular trap formation in chronic rhinosinusitis with nasal polyps." *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* vol. 49,7 (2019): 990-999.
76. Kim, Sae-Hae et al. "Antimicrobial peptide LL-37 promotes antigen-specific immune responses in mice by enhancing Th17-skewed mucosal and systemic immunities." *European journal of immunology* vol. 45,5 (2015): 1402-13.
77. Tsai PW, Yang CY, Chang HT, Lan CY. Human antimicrobial peptide LL-37 inhibits adhesion of *Candida albicans* by interacting with yeast cell-wall carbohydrates. *PLoS One*. 2011;6(3):e17755.
78. Rodríguez, Esaú E et al. "Comparing the copper binding features of alpha and beta synucleins." *Journal of inorganic biochemistry* vol. 229 (2022): 111715.
79. Gazendam, Roel P et al. "Human Neutrophils Use Different Mechanisms To Kill *Aspergillus fumigatus* Conidia and Hyphae: Evidence from Phagocyte Defects." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* vol. 196,3 (2016): 1272-83.
80. Unger, Lucas et al. "Candida albicans induces neutrophil extracellular traps and leucotoxic hypercitrullination via candidalysin." *EMBO reports* vol. 24,11 (2023): e57571.
81. Peña Agudelo, Jorge A et al. "Mitochondrial Peptide Humanin Facilitates Chemoresistance in Glioblastoma Cells." *Cancers* vol. 15,16 4061. 11 Aug. 2023
82. Consuegra-Asprilla JM, Rodríguez-Echeverri C, Posada DH, Gómez BL, González Á. Patients with recurrent vulvovaginal candidiasis exhibit a decrease in both the fungicidal activity of neutrophils and the proliferation of peripheral blood mononuclear cells. *Mycoses*. 2024;67(4):e13720.
83. Saffarzadeh M, Juenemann C, Queisser MA, et al. Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. *PLoS One*. 2012;7(2):e32366.
84. Gozalbo, Daniel et al. "Role of IFN-gamma in immune responses to *Candida albicans* infections." *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* vol. 19,8 1279-90. 1 Jun. 2014
85. Stevenhagen A, van Furth R. Interferon-gamma activates the oxidative killing of *Candida albicans* by human granulocytes. *Clin Exp Immunol*. 1993;91(1):170-175.
86. Satora M, Grunwald A, Zaremba B, Frankowska K, Żak K, Tarkowski R, Kułak K. Treatment of Vulvovaginal Candidiasis—An Overview of Guidelines and the Latest Treatment Methods. *Journal of Clinical Medicine*. 2023; 12(16):5376.
87. Willems, Hubertine M E et al. "Vulvovaginal Candidiasis: A Current Understanding and Burning Questions." *Journal of fungi (Basel, Switzerland)* vol. 6,1 27. 25 Feb. 2020

88. Nuijens T., Piva E., Kruijtz J.A.W., Rijkers D.T.S., Liskamp R.M.J., Quaedflieg P.J.L.M. Enzymatic C-terminal amidation of amino acids and peptides. *Tetrahedron Lett.* 2012;53:3777–3779.
89. Coombe, D R, and W C Kett. “Heparan sulfate-protein interactions: therapeutic potential through structure-function insights.” *Cellular and molecular life sciences : CMLS* vol. 62,4 (2005): 410-24.
90. Sanderson, R D, and M Bernfield. “Molecular polymorphism of a cell surface proteoglycan: distinct structures on simple and stratified epithelia.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 85,24 (1988): 9562-6.
91. Boink MA, Roffel S, Nazmi K, Bolscher JGM, Veerman ECI, Gibbs S. Saliva-Derived Host Defense Peptides Histatin1 and LL-37 Increase Secretion of Antimicrobial Skin and Oral Mucosa Chemokine CCL20 in an IL-1 $\alpha$ -Independent Manner. *J Immunol Res.* 2017;2017:3078194.
92. Wan, Min et al. “Antimicrobial peptide LL-37 promotes bacterial phagocytosis by human macrophages.” *Journal of leukocyte biology* vol. 95,6 (2014): 971-81.
93. Radic, Marko, and Sylviane Muller. “LL-37, a Multi-Faceted Amphipathic Peptide Involved in NETosis.” *Cells* vol. 11,15 2463. 8 Aug. 2022
94. Hu Z, Murakami T, Suzuki K, et al. Antimicrobial cathelicidin peptide LL-37 inhibits the pyroptosis of macrophages and improves the survival of polybacterial septic mice. *Int Immunol.* 2016;28(5):245-253.
95. Yano J, Fidel PL Jr. Impaired neutrophil extracellular trap-forming capacity contributes to susceptibility to chronic vaginitis in a mouse model of vulvovaginal candidiasis. *Infect Immun.* 2024;92(3):e0035023.
96. Radic M, Muller S. LL-37, a Multi-Faceted Amphipathic Peptide Involved in NETosis. *Cells.* 2022;11(15):2463.
97. Rosentul DC, Delsing CE, Jaeger M, et al. Gene polymorphisms in pattern recognition receptors and susceptibility to idiopathic recurrent vulvovaginal candidiasis. *Front Microbiol.* 2014;5:483.
98. Li J, Casanova JL, Puel A. Mucocutaneous IL-17 immunity in mice and humans: host defense vs. excessive inflammation. *Mucosal Immunol* 2018; 11:581–9.
99. Xan de Veerdonk FL, Gresnigt MS, Kullberg BJ. et al. Th17 responses and host defense against microorganisms: an overview. *BMB Rep* 2009;42:776–87.
100. Peters BM, Coleman BM, Willems HME, et al. The Interleukin (IL) 17R/IL-22R Signaling Axis Is Dispensable for Vulvovaginal Candidiasis Regardless of Estrogen Status. *J Infect Dis.* 2020;221(9):1554-1563.
101. Miura, Shunsuke et al. “Cathelicidin Antimicrobial Peptide LL37 Induces Toll-Like Receptor 8 and Amplifies IL-36 $\gamma$  and IL-17C in Human Keratinocytes.” *The Journal of investigative dermatology* vol. 143,5 (2023): 832-841.e4.