

# ESTUDIO DEL PERFIL TH17 EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON CANDIDIASIS MUCOCUTÁNEA CRÓNICA DE LA PROVINCIA DE MENDOZA

## Th17 profile in chronic mucocutaneous candidiasis pediatric patients in Mendoza province

Paula Sosa Venturi<sup>1</sup>, Adriana Silvia González<sup>2,3</sup>, Ana María Carolina Marín<sup>4</sup>, Sofía Carla Angiolini<sup>5</sup>, Claudia Elena Sotomayor<sup>6,7</sup>

### RESUMEN

**Introducción.** Las células Th17 producen IL-17A, que desempeña un rol relevante en la inmunidad antifúngica. Los linfocitos Th1 producen principalmente IFN $\gamma$ , responsable de la inmunidad mediada por células. Polimorfismos genéticos asociados a defectos en la diferenciación y proliferación hacia Th17 aumentan la susceptibilidad a la candidiasis mucocutánea crónica (CMC).

**Objetivo.** Contribuir al diagnóstico de CMC en pacientes pediátricos mediante evaluación del perfil linfocitario Th17.

**Diseño y población.** Estudio observacional, transversal, analítico, prospectivo en individuos de 0 a 17 años con CMC. Se incluyeron 22 individuos controles de igual rango etario.

**Método.** Se aislaron células mononucleares de sangre de ambos grupos en estudio, se realizaron cultivos primarios estimulados in vitro con PMA/ionomicina. Se evaluó la frecuencia de linfocitos T CD4+ productores de IL-17A y linfocitos T CD4+ productores de IFN $\gamma$  utilizando anticuerpos monoclonales y Citometría de Flujo. Además, se empleó la técnica de ELISA para la determinación de la concentración de IL-17A en sobrenadante de cultivo y suero.

**Resultados.** Se observó disminución en la frecuencia de linfocitos Th17 con aumento de los linfocitos Th1 en pacientes con CMC. Esta disminución no guardó relación con el diagnóstico referido, recurrencia de los síntomas, ni con la presentación clínica de la CMC. El análisis de la relación Th1/Th17 mostró desequilibrio, con un claro aumento (3,57 veces) en pacientes con CMC. No se observó correlación entre la frecuencia de células Th17 con la concentración de IL-17A.

**Conclusiones.** La citometría de flujo proporciona un método eficiente para identificar deficiencias en las células productoras de IL-17, aportando valiosa información sobre el fenotipo inmune del paciente, la severidad de su disfunción, la progresión de la enfermedad y como herramienta diagnóstica y facilitadora hacia la identificación del defecto molecular y el correcto tratamiento en pacientes con CMC.

**Palabras clave:** dandiasis, CMC, IL-17A, IFN $\gamma$ , síndrome de hiper-IgE, STAT1-GOF, Th17, Th1, citometría de flujo, ELISA.

### ABSTRACT

**Introduction.** Th17 cells produce IL-17A which is relevant for antifungal immunity. On the other hand, Th1 cells mainly produce IFN $\gamma$ , which is responsible for cell-mediated immunity. Genetic polymorphisms associated with defects in differentiation and proliferation of Th17 cells increase susceptibility to chronic mucocutaneous candidiasis (CMC).

**Objective.** Contribute to CMC diagnosis in the pediatric population by evaluating the Th17 profile.

**Design and population.** An observational, cross-sectional, analytical, prospective study in individuals from 0 to 17 years of age with CMC was performed. Twenty-two control patients of the same age range were included.

**Method.** Blood mononuclear cells were isolated from both study groups, primary cultures generated with PMA/ionomycin as stimulant. The frequency of IL-17A and IFN $\gamma$ -producing CD4+ T lymphocytes was evaluated using monoclonal antibodies and Flow Cytometry (FC). In addition, the ELISA technique was used to determine the concentration of cytokines in culture supernatant and serum.

**Results.** A decrease in the frequency of Th17 cells with an increase in Th1 cells was observed in patients with CMC. This decrease was not related to the referred diagnosis, recurrence of symptoms, or the clinical presentation of CMC. Analysis of the Th1/Th17 ratio showed an imbalance, with a clear increase (3.57-fold) in patients with CMC. No correlation was observed between the frequency of Th17 cells and the concentration of IL-17.

**Conclusions.** Flow Cytometry provides an efficient method to identify deficiencies in Th17 cells, providing valuable information on the patient's immune phenotype, the severity of its dysfunction, the progression of the disease; as a diagnosis and facilitator to identify the molecular defect and the correct treatment in CMC's patients.

**Keywords:** candidiasis, CMC, IL-17A, IFN $\gamma$ , hyper-IgE syndrome, STAT1-GOF, Th17, Th1, flow cytometry, ELISA.

Archivos de Alergia e Inmunología Clínica 2022;53(4):145-156

1. Bioquímica. Laboratorio de Histocompatibilidad dependiente del Instituto Coordinador de Ablaciones e Implantes de Mendoza (InCAIMen). Mendoza. Argentina
2. Licenciada en Bioquímica. Sección Inmunología. Servicio de Bioquímica Clínica. Hospital Central de Mendoza. Mendoza. Argentina.
3. Licenciada en Bioquímica. Instituto de Inmunología. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza. Argentina.
4. Bioquímica. Laboratorio de Citometría de Flujo dependiente del Programa Provincial de SIDA e Inmunodeficiencias (PAPSI). Mendoza. Argentina
5. Bioquímica. Becaria Doctoral. Departamento de Bioquímica Clínica. CIBICI-CONICET, Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba. Argentina.
6. Dra. en Ciencias Químicas. Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba. Argentina
7. Investigadora Principal, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, CIBICI-CONICET. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.

Correspondencia: Claudia Elena Sotomayor. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba. Haya de la Torre y Medina Allende, Córdoba. claudia.sotomayor@unc.edu.ar

Los autores declaran no poseer conflictos de intereses.

Recibido: 19/07/2022 | Aceptado: 02/08/2022

## INTRODUCCIÓN

La candidiasis mucocutánea crónica (CMC) es un grupo de trastornos genéticamente heterogéneos que se caracteriza por infecciones crónicas o recurrentes que afectan piel, uñas y membranas mucosas, típicamente causada por el género *Candida*, con *C. albicans* como el agente etiológico más frecuente<sup>1</sup>.

*C. albicans* es un hongo pleomórfico perteneciente a la familia Saccharomycetaceae. En su morfotipo levaduriforme se comporta como un microorganismo saprófito y convive en simbiosis con su huésped. Forma parte del microbioma habitual de la mucosa del tracto digestivo, vaginal y respiratorio sin causar enfermedad<sup>2</sup>. Cambios en el microambiente local y desequilibrios en los mecanismos de control, le permiten al hongo desplegar sus atributos de virulencia e iniciar los cambios morfológicos. La emisión de pseudomicelio y expresión de adhesinas facilitan la adherencia y penetración tisular, y la transición al morfotipo hifal contribuye a la invasión tisular y transformación en microorganismo patógeno<sup>3,4</sup>. Este hongo puede provocar infecciones profundas<sup>5</sup> o superficiales presentando diferentes manifestaciones de acuerdo a su localización<sup>3</sup>. En este último tipo, las formas clínicas de presentación de la enfermedad incluyen candidiasis oral u orofaríngea (OPC) también conocida como muguet, la cual también puede diseminarse hacia esófago, candidiasis intestinal, infección vaginal<sup>6,7</sup> y candidiasis cutáneas, pudiendo manifestarse como intertrigos candidiásicos u onicomicosis<sup>2,8</sup>.

En la respuesta inmune antifúngica, las células T CD4 + *helper* 17 (Th17), desempeñan un rol relevante<sup>4,8</sup>. Esta población celular deriva de precursores CD4+ *naive* o vírgenes a través de la señalización de varias citoquinas inductivas incluyendo interleucinas (IL) como IL-6, IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$  e IL-23<sup>9</sup>, mientras que la IL-23 también es requerida para la expansión, mantenimiento y función efectora de este linaje<sup>10</sup>. Los factores de transcripción ROR $\gamma$ t (*retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma*) y STAT3 (*Signal transducer and activator of transcription 3*) están implicados en la diferenciación y la función de las células Th17. Esta población celular produce IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 y GM-CSF, siendo la IL-17A la citoquina referente de este perfil<sup>4</sup>. La IL-17 activa la señalización a través del receptor de IL-17, que induce la secreción de citoquinas proinflamatorias y péptidos antimicrobianos relevantes para la actividad antifúngica local<sup>11</sup>. La importancia de IL-17 en la inmunidad antifúngica protectora se evidenció en modelos animales en ratones y en humanos, donde varios defectos genéticos relacionados con la vía de señalización de IL-17 están asociados a una mayor susceptibilidad a adquirir CMC<sup>12</sup>. Recientemente se demostró que las células T de memoria humana específicas de *Candida* son predominantemente células Th17<sup>13</sup>.

Las células Th1 también son importantes en la defensa antifúngica ya que mediante la liberación de citoquinas activan macrófagos y otros fagocitos potenciando los mecanismos candidicidas<sup>14</sup>. Estas células producen principalmente interferón gamma (IFN $\gamma$ ), citoquina considerada como marcadora de su perfil, e IL-2. Por otra parte, se ha sugerido que la señalización de IFN $\gamma$  dependiente de STAT1 participa en la regulación negativa de las respuestas Th17<sup>15,16</sup>. De este modo, el balance Th1 *vs.* Th17 puede ser utilizado como predictor de un determinado perfil de respuesta en patologías que involucran su función<sup>17</sup>.

Si bien la CMC es común en pacientes con inmunodeficiencias marcadas de células T, la mayor susceptibilidad a las infecciones por *Candida* spp. se debe a defectos inmunitarios en el reconocimiento del hongo y en las respuestas mediadas por células Th17 con diferentes mutaciones genéticas de fondo<sup>4,8,10</sup>. La forma aislada del trastorno, que algunos autores denominan como *chronic mucocutaneous candidiasis disease* (CMCD) se presenta principalmente, o solamente, con candidiasis mucocutánea. Por el contrario, la forma sindrómica del trastorno se caracteriza por presentar infecciones no invasivas por *Candida* acompañado de infecciones recurrentes causadas por otros microorganismos<sup>18,19</sup>.

Polimorfismos genéticos que conducen a defectos en el reconocimiento de *Candida* (CARD9, DECTIN-1), diferenciación y proliferación Th17 (STAT3, STAT1, TYK2, IL-12B, IL-12RB1) o señalización posterior a través de los receptores de IL17 (IL-17RA, IL-17RC, ACT1, IL-17F) aumentan la susceptibilidad a la CMC y proporcionan evidencia de la importancia del perfil Th17 en la inmunidad antifúngica<sup>18,20</sup>.

El síndrome de hiper-IgE (HIES) es causado por mutaciones dominantes negativas en los dominios de unión a ADN o SH2 de STAT3 las cuales conducen a una deficiencia significativa en los Th17, presentando los pacientes, una mayor susceptibilidad a padecer CMC<sup>21</sup>. Las mutaciones con ganancia de función en el gen STAT1 (STAT1-GOF) son la etiología genética más común para CMC. Estas mutaciones conducen a respuestas defectuosas en las células Th1 y Th17. Se ha postulado que el desarrollo deficiente de las células productoras de IL-17 se debe al rol regulador negativo de IFN $\gamma$  vía STAT1 en esta población celular<sup>15,16</sup>.

En el presente trabajo se estudió el fenotipo inmune de 9 pacientes pediátricos con CMC de diferente etiología, concurrentes al Hospital Dr. Humberto Notti, de la ciudad de Mendoza, Argentina. Con el objetivo de contribuir al diagnóstico y seguimiento de estos pacientes, se evaluó la frecuencia de Linajes Th17, Th1, su asociación con las manifestaciones clínicas de la enfermedad, recurrencia de los síntomas y mutaciones identificadas en los pacientes. Se evaluó también la correlación entre los resultados ob-

tenidos para una misma determinación por diferentes metodologías. La importancia de nuestro trabajo radica, por otro lado, en haber podido satisfacer la necesidad de implementar en la provincia una técnica de identificación de defectos del perfil Th17 como herramienta que colabore con el diagnóstico de CMC, para un abordaje temprano de la enfermedad.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### DISEÑO DEL ESTUDIO

Se realizó un estudio observacional, transversal, analítico y prospectivo en 9 pacientes con CMC y 22 individuos controles concurrentes al hospital pediátrico Dr. Humberto Notti de la ciudad de Mendoza reclutados en el período de febrero a mayo del año 2022.

Se incluyeron pacientes en el rango etario comprendido entre 1 a 17 años de edad, de sexo femenino y masculino, diagnosticados con CMC por el servicio de Inmunología del hospital Dr. Humberto Notti. Se excluyeron del estudio a los mayores de 17 años, individuos con inmunodeficiencias adquiridas, endocrinopatías o enfermedades autoinmunes y con diagnóstico negativo para CMC. Como grupo control se utilizaron muestras de individuos apareados en edad y sexo, sin signos clínicos de infección aguda ni antecedentes de enfermedades crónicas.

Todos los pacientes brindaron su aprobación para participar del estudio. Se firmaron formularios de consentimiento y/o asentimiento informado de acuerdo a la edad de cada individuo. El diseño del estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación en Salud del Hospital Dr. Humberto Notti. Acta N° 15/2022.

### TOMA DE MUESTRA

De los pacientes con CMC y los individuos controles se extrajo por venopunción entre 7 a 10 ml de sangre entera, la cual se dividió en dos alícuotas. Una fue anticoagulada con EDTA y utilizada para la recuperación de células mononucleares para estudios de citometría de flujo y la otra, para obtención de suero. Las muestras conteniendo células se procesaron de manera inmediata, mientras que el suero se alícuotó y conservó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta la determinación de citoquinas por el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

## MÉTODOS

### AISLAMIENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA

A partir de la muestra de sangre total anticoagulada se procedió a la purificación de las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) mediante separación por gradiente de densidad utilizando Ficoll Hypaque 1.077 g/

$\text{cm}^3$  (Sigma Aldrich, Darmstadt, Alemania). Una vez aislada la interfase de células mononucleares, se realizaron dos lavados con *phosphate buffered saline* (PBS) y se ajustó la concentración a  $1 \times 10^6$  células/ml en medio RPMI 1640 (Cat#11875093, Gibco Laboratories, New York, USA) mediante recuento en cámara de Neubauer.

### CULTIVO Y ESTIMULACIÓN ANTIGÉNICA IN VITRO

Para este estudio se utilizó PMA (*phorbol 12-myristate 13-acetate*) más Ionomicina (*calcium ionophore*). El PMA en combinación con la ionomicina son agentes activadores farmacológicos de células T y son utilizados para inducir la producción de citoquinas. Las citoquinas pueden ser posteriormente evaluadas en el sobrenadante del cultivo o acumuladas en el citoplasma celular empleando un bloqueante del transporte intracelular (*stop Golgi*) para impedir su secreción, lo cual permite la posterior identificación de células productoras de una determinada citoquina.

A tal fin se fraccionó la suspensión de CMSP en alícuotas de 1 ml cada una para ser utilizada en tres condiciones de cultivo diferente:

- Cultivo 1: control de respuesta basal y muerte celular. CMSP cultivadas en RPMI 1064 suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) (Sigma-Aldrich), en ausencia de estímulo e incubadas durante 5 hs.
- Cultivo 2: CMSP cultivadas en RPMI 1064-10% SBF, en presencia de PMA (Cat#P1585, Sigma-Aldrich) más Ionomicina (Cat#I0634, Sigma-Aldrich) en una concentración de 50 ng/ml y 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , respectivamente, durante 5 hs. Tres horas antes de cosechar las células se adicionó 0,7  $\mu\text{l}$  de stop Golgi (Cat#554724 Becton Dickinson, Nueva Jersey, USA).
- Cultivo 3: CMSP cultivadas en RPMI 1064-10% SBF, en presencia de PMA más Ionomicina en una concentración de 50 ng/ml y 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  respectivamente, durante 5 hs. El sobrenadante de cultivo se recuperó para la posterior determinación de citoquinas por ELISA.

Todos los cultivos se realizaron en condiciones de esterilidad y se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  en atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5%<sup>22</sup>.

### CITOMETRÍA DE FLUJO

#### Inmunomarcación con anticuerpos monoclonales

Luego del cultivo y previo a la marcación con anticuerpos monoclonales, las células se lavaron dos veces con 1 ml de *stain buffer* (Cat#554656, Becton Dickinson) cada vez. Se realizó la inmunomarcación utilizando un Kit comercial: Human *Th1/Th17 Phenotyping kit* (Cat#560752, Becton Dickinson) conteniendo un cóctel de anticuerpos monoclonales (CD4 PerCP-Cy5.5 clon: SK3, IFN- $\gamma$  FITC clon: B27, IL-17A PE clon: N49-653) Las cé-

lulas se fijaron con buffer de fijación (Cat#554655, Becton Dickinson), posteriormente se permeabilizaron (Cat#554723, Becton Dickinson) y finalmente se realizó la marcación con anticuerpos monoclonales de acuerdo a las recomendaciones del fabricante para este Kit. Se utilizaron controles de isotipo para confirmar la especificidad de unión del anticuerpo y descartar interacciones inespecíficas<sup>23</sup>.

#### Adquisición y evaluación de las muestras

Las muestras se adquirieron con un citómetro de flujo FACs CANTO II (Becton Dickinson), considerando un mínimo de 20.000 eventos CD4+. El porcentaje de células positivas para IL-17A e IFN- $\gamma$  se midió dentro de la población CD4+. Los datos se analizaron con el programa FACsDiva (BD FACs Diva v9.0 Software).

#### Estrategia de selección de la población celular (Gate)

En primer lugar se realizó un *gate* morfológico para linfocitos (Li), en donde la población celular de interés se seleccionó por tamaño y complejidad interna (P1) *Forward versus Side Scatter* (FSC vs SSC). Posteriormente, a partir de P1, se seleccionaron aquellas células que expresan CD4+ en su superficie (P2) (**Figura 1**). Sobre esta población de linfocitos CD4+ (100%), se determinó el porcentaje de células que expresaron IL-17A intra-citoplasmáticamente, quedando así definido la población celular Th17 (CD4+IL-17A+); el mismo procedimiento se realizó para evaluar el porcentaje de células con expresión citoplasmática de IFN $\gamma$ , definiendo así el perfil Th1 (CD4+IFN $\gamma$ +).

#### ELISA DE CAPTURA

Con el fin de evaluar la producción de interleuquinas a través de una segunda técnica, el suero de los pacientes y el sobrenadante de cultivo de PBMC, se utilizaron para medir las concentraciones de IL-17A (*Human IL-17A ELISA*, Cat#DY317, RD Systems) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Las concentraciones de proteínas se cuantificaron por extrapolación de la curva estándar<sup>24</sup>.

#### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se analizaron mediante la prueba de la t de Student para datos apareados con el propósito de comparar pacientes con CMC y control sano. Los resultados se expresaron como medias  $\pm$  SEM y el nivel de significación se estableció en un valor de  $p \leq 0,05$ . ANOVA con post test de Bonferroni para poder comparar entre 3 grupos de pacientes. Correlación de Pearson entre dos variables para una misma muestra. Los datos se analizaron con el software GraphPad PRISM 7.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)

## RESULTADOS

### CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES CON CMC PARTICIPANTES DEL ESTUDIO

La CMC corresponde a un grupo heterogéneo de patologías asociado a desórdenes monogénicos o mutaciones puntuales, que comprometen la defensa antifúngica. Los estudios inmunológicos permiten aportar evidencia sobre el fenotipo de los pacientes con CMC y la severidad de la disfunción<sup>23</sup>. Con el objetivo de contribuir al diagnóstico y seguimiento de estos pacientes en la provincia de Mendoza, se procedió a la implementación de la técnica diagnóstica por citometría de flujo, estudiando la población de linfocitos Th17 en una cohorte de 9 pacientes con CMC concurrentes al Hospital Dr. Humberto Notti de Mendoza (**Tabla 1**). El rango etario de los pacientes fue entre 1 y 17 años, 6 de ellos de sexo masculino y 3 femenino. Respecto al diagnóstico y genotipo de los pacientes, 4 de ellos presentaron sintomatología clínica característica y se diagnosticaron como CMC, 2 de ellos hermanos; otros 3 individuos presentaron CMC con una mutación en STAT1-GOF, 2 de ellos hermanos; y los 2 pacientes restantes con HIGES con mutación en STAT3. Se constató la localización de las lesiones a nivel de los tractos mucosos y/o cutáneos, como así también la recurrencia de los síntomas en el transcurso de un año, los años de evolución desde el diagnóstico de la enfermedad, y el tratamiento indicado en cada caso. Además, se incluyeron 22 muestras de pacientes controles sanos apareados en edad y sexo.

### LOS PACIENTES CON CMC PRESENTAN UNA ALTERACIÓN EN LA DIFERENCIACIÓN DE LOS LINFOCITOS HACIA EL PERFIL TH17

Las células Th17 desempeñan un rol clave en la respuesta inmune antifúngica, participando en la inmunidad protectora a nivel de las barreras mucosas y cutáneas<sup>25</sup>. Su efecto biológico es mediado por la liberación de citoquinas, principalmente por la IL-17<sup>26</sup>. La capacidad funcional de esta población celular puede ser determinada *ex vivo* luego de la estimulación de las CMSP con un mitógeno, y anticuerpos monoclonales dirigidos contra moléculas o marcadores expresados en la superficie celular, o en citoplasma. En este trabajo evaluamos la producción intracelular de citoquinas en la subpoblación de Li T CD4+ de pacientes con CMC e individuos controles, mediante la estimulación *in vitro* de CMSP con PMA/ionomicina y posterior identificación por citometría de flujo de (**Figura 1**). Basados en la morfología celular (FSC vs SSC) y en la expresión del marcador de superficie CD4, definimos la población de estudio, sobre la cual se determinó la producción de citoquinas intracelulares (**Figura 1A**). La técnica de CF permite la identificación simultánea de diferentes perfiles in-

**TABLA I.** Datos demográficos, genéticos y clínicos de los pacientes con candidiasis mucocutánea crónica.

Sexo	Edad	Diagnóstico/ Defecto genético	Manifestación clínica			Tratamiento
			Sitios anatómicos afectados	Nº de episodios anuales	Tiempo de evolución desde el diagnóstico	
M	11	CMC	Mucosa oral	3	1 año	Sin tratamiento
F	12	CMC	Mucosa oral	2	5 años	Fluconazol Dosis tratamiento (150 mg/día durante 30 días)
			Mucosa vaginal Cutánea inguinal	2 0 a 1		
F <sup>1</sup>	15	CMC	Mucosa oral Cutánea ungueal	0 a 1 Persistente	15 años	Profilaxis con fluconazol (150 mg/semana)
M <sup>1</sup>	6	CMC	Mucosa oral	10 a 12	6 años	Profilaxis con fluconazol (50 mg/semana)
F <sup>2</sup>	11	STAT1-GOF	Mucosa Oral	7 a 8	2 años	Profilaxis con fluconazol (50mg/semana)
M <sup>2</sup>	12	STAT1-GOF	Mucosa oral	5	3 años	Profilaxis con fluconazol (50 mg/semana)
M	17	STAT1-GOF	Mucosa oral	7 a 8	1 año	Profilaxis con fluconazol (150 mg/semana)
			Cutánea ungueal	1		
			Mucosa esofágica	1		
M	1	CMC+HIGES	Mucosa oral	10 a 12	1 año	Profilaxis con fluconazol (50 mg/semana)
M	7	CMC+HIGES	Mucosa oral	1	3 años	Sin tratamiento

F (Femenino); M (Masculino); HIGES (Síndrome de hiperinmuglobulina E); STAT1 (signal transducer and activator of transcription-1); GOF (gain-of-function); STAT3 (signal transducer and activator of transcription-3). <sup>1,2</sup> Hermanos de una misma familia.

munológicos dependiendo de las proteínas que expresen. De esta manera, en una misma muestra, puede establecerse el perfil Th1 y Th17 determinado por la expresión intracelular de IFN $\gamma$  e IL-17A, respectivamente.

Se evaluó la frecuencia de Li T CD4<sup>+</sup> productoras de IL-17A e IFN $\gamma$  en pacientes con CMC e individuos controles sanos. La **Figura 1B** muestra *dot plots* representativos de cada grupo evaluado. Se observó, que el porcentaje de células productoras de IL-17A, se redujo significativamente en los pacientes con CMC en comparación con los individuos controles (**Figura 1C**), evidenciando una disminución de la población de los Li Th17 en los individuos con la patología. Cuando el perfil Th1 fue evaluado, observamos que el porcentaje de células productoras de IFN $\gamma$  aumentó significativamente en los pacientes con CMC en comparación con controles sanos (**Figura 1D**).

El estudio del porcentaje de linfocitos CD4<sup>+</sup> IL-17A<sup>+</sup> en 20 individuos controles sanos incluidos en esta cohorte, nos permitió establecer el valor muestral de media  $\pm$  SEM igual a 0,89% $\pm$ 0,37% para los Li T CD4<sup>+</sup> IL-17A<sup>+</sup>, con un rango de variación entre 0,52% a 1,26%. Los resultados obtenidos para la población Th17 en los pacientes con CMC mostraron que un 66,6% de los individuos afectados poseen valores por debajo o en el límite inferior del rango establecido.

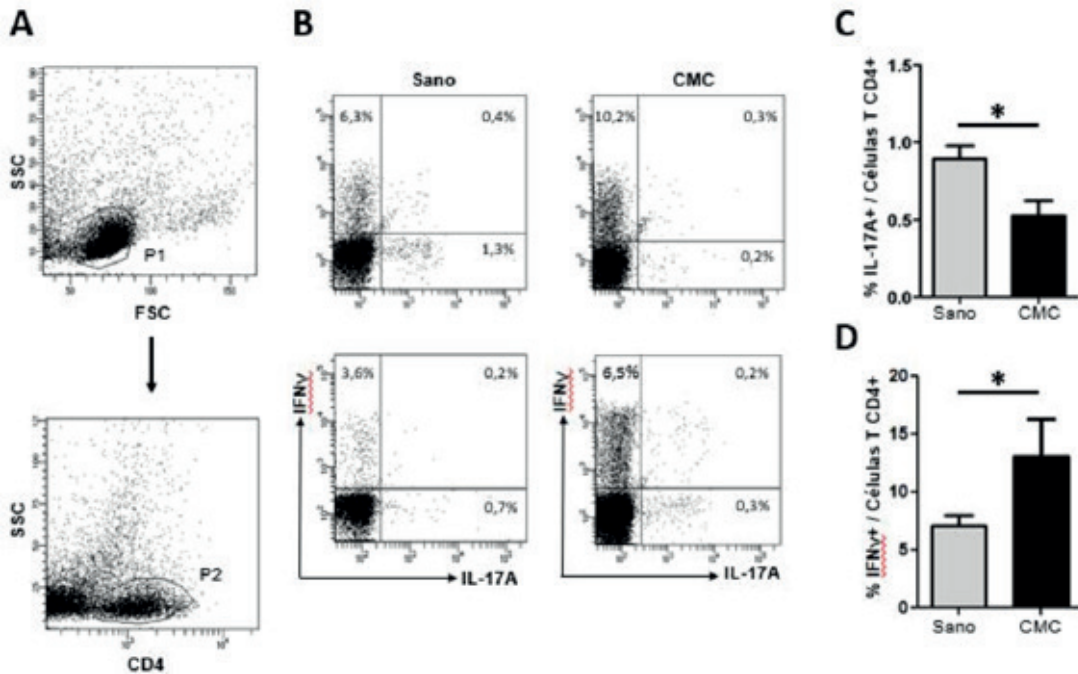
También se determinó el porcentaje de Li T CD4<sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> en 22 individuos controles, estableciéndose el valor de la media  $\pm$  SEM de 7,07% $\pm$ 4,04%, con un rango de variación que osciló entre 3,03% y 11,11%. Se observó que solo el 44,4% de los pacientes con CMC presentan valores por encima de este intervalo.

#### LA FRECUENCIA DE LI TH17 EN LOS PACIENTES CON CMC NO GUARDA RELACIÓN CON LOS SITIOS COMPROMETIDOS, NI CON LA RECURRENCIA DE LOS SÍNTOMAS

Con el propósito de establecer si la disminución de la frecuencia de células productoras de IL-17A guarda alguna relación con las diferentes localizaciones de la infección por *Candida*, se agruparon a los pacientes en dos categorías; Aquellos pacientes con presentación clínica únicamente a nivel mucoso, como muguet o candidiasis vaginal, o aquellos con la presentación de la enfermedad asociada con afectación a nivel cutáneo (**Figura 2A**). Debido a que también se observaron cambios en la frecuencia de células productoras de IFN $\gamma$  en estos pacientes, se analizó la existencia de alguna asociación según las lesiones fueran mucosas o mucocutáneas. La **Figura 2B** muestra la distribución individual en cada paciente con CMC según el sitio comprometido con la infección y la frecuencia de Li Th1; no se observaron diferencias significativas cuando ambos grupos se compararon. Los valores promedios de cada grupo de pacientes, se compararon con los valores de referencia establecidos para individuos controles sanos para ambas poblaciones celulares en estudio; no se observaron diferencias significativas entre los grupos cuando la frecuencia de células productoras de IL-17A fue comparada (**Figura 2C**). Al realizar este análisis sobre la frecuencia de células productoras de IFN $\gamma$ , tampoco se encontraron diferencias significativas (**Figura 2D**).

Las infecciones superficiales causadas por *C. albicans* en pacientes con CMC se caracterizan por presentarse de manera recurrente o persistente a lo largo del tiempo<sup>1</sup>. Con el objetivo de establecer si existe asociación entre la periodi-





**Figura 1.** Producción de IL-17A e IFN $\gamma$  en pacientes con CMC. CMSP de pacientes con CMC e individuos controles, estimuladas in vitro e inmunomarcadas con Ac anti-CD4, Ac anti-IL-17A y Ac anti-IFN $\gamma$ , evaluadas por citometría de flujo. A) Dot plots representativos de la estrategia de gate utilizada, P1 gate morfológico para linfocitos (FCS vs SSC), P2 linfocitos con expresión CD4 de superficie. B) Dot plots representativos que muestran el análisis por citometría de flujo de los porcentajes de linfocitos CD4<sup>+</sup> estimulados (P1 and P2) productores de IL-17A e IFN $\gamma$ . C) Porcentaje de células con expresión de IL-17A en individuos control sano (n=20) y en pacientes con CMC (n=9). D) Porcentaje de células con expresión de IFN $\gamma$  en individuos control sano (n=22) y pacientes con CMC (n=9). C y D) Se utilizó estadístico T test. Media  $\pm$  SEM \*p<0,05.

cidad de los síntomas y el porcentaje de células Th17, se estableció la frecuencia promedio anual de la recurrencia de síntomas de la cohorte en estudio y, en base a eso, los pacientes se clasificaron según presentaran una frecuencia menor o mayor 7 episodios de candidiasis en el transcurso de un año. No se observaron diferencias significativas para este parámetro (**Figura 2E**). Resultados similares se hallaron cuando la frecuencia de células Th1 y la recurrencia de los síntomas fue analizada (**Figura 2F**).

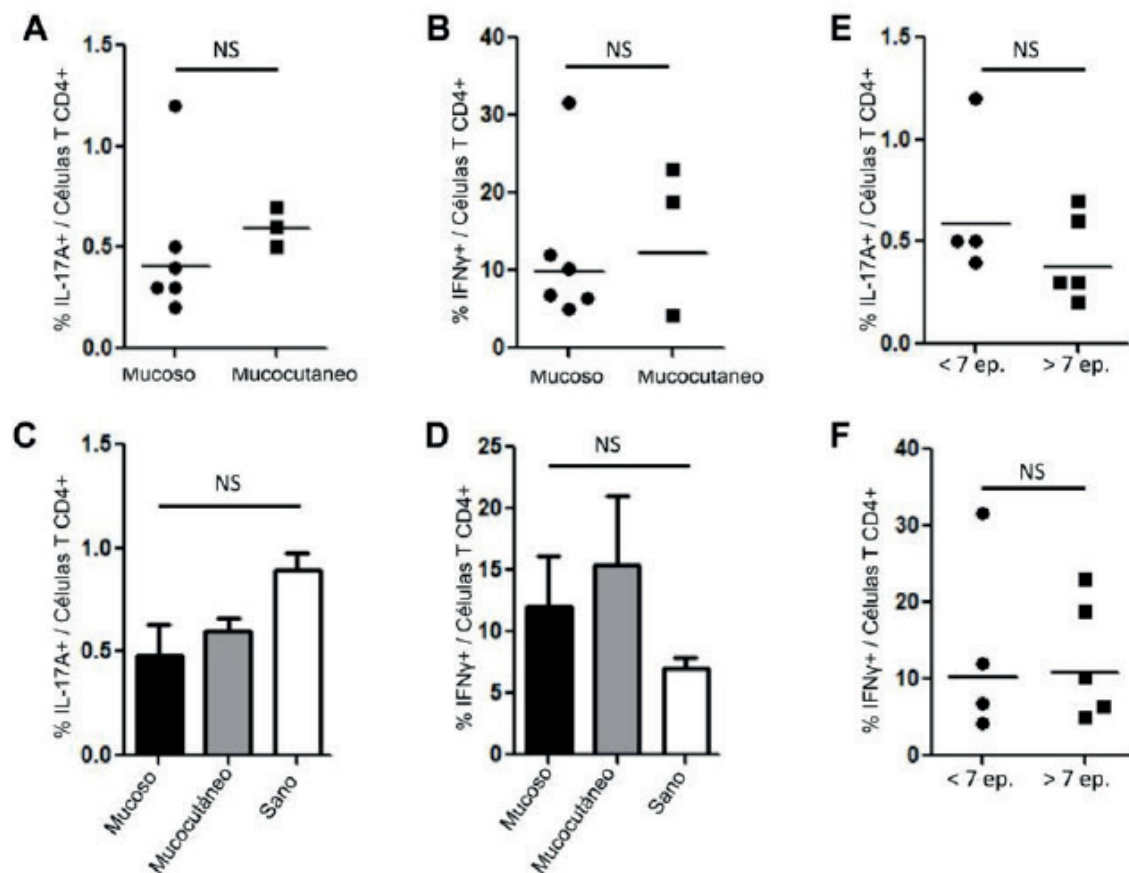
#### LA FRECUENCIA DE LI TH17 ES INDEPENDIENTE DE LA MUTACIÓN MOLECULAR QUE PRESENTE EL PACIENTE

La incidencia real de la enfermedad de CMC se desconoce, y se carece de datos nacionales de referencia. En tal sentido, el grupo de pacientes incluidos en este trabajo representa una muestra sumamente valiosa para el análisis de diferentes parámetros clínicos de la enfermedad y su relación con el fenotipo inmune de cada paciente. Aunque el número de pacientes en nuestra cohorte fue de 9 individuos, y en virtud de la escasez de publicaciones nacionales que pueden ser consultadas, es que se procedió a estudiar la existencia de algún per-

fil particular en el grupo de pacientes. Evaluamos la frecuencia de células productoras de IL-17A, teniendo en cuenta el diagnóstico referido que acompaña a la presentación clínica de CMC como principal síntoma, ya sea se trate de un síndrome de hiper-IgE con mutación en STAT3, pacientes con mutación STAT1-GOF, o pacientes que no tienen una mutación genética confirmada al momento de realizar este estudio. Los resultados obtenidos para cada grupo se compararon entre sí, y con el grupo de individuos controles. No encontramos diferencias significativas entre los grupos de pacientes estudiados (**Figura 3A**). Al realizar este mismo análisis sobre la frecuencia de células productoras de IFN $\gamma$ , observamos un aumento significativo en los pacientes que presentan CMC asociada a HIGES respecto a los individuos controles (**Figura 3B**), sin observar diferencias estadísticas para el resto de los grupos analizados.

#### EXISTE UN MARCADO AUMENTO EN LA RELACIÓN TH1/TH17 EN PACIENTES CON CMC

La variación en el balance entre linfocitos de diferente perfil funcional puede ser indicador de defectos en los mecanismos de respuesta inmune en distintas patologías<sup>27,28</sup>.

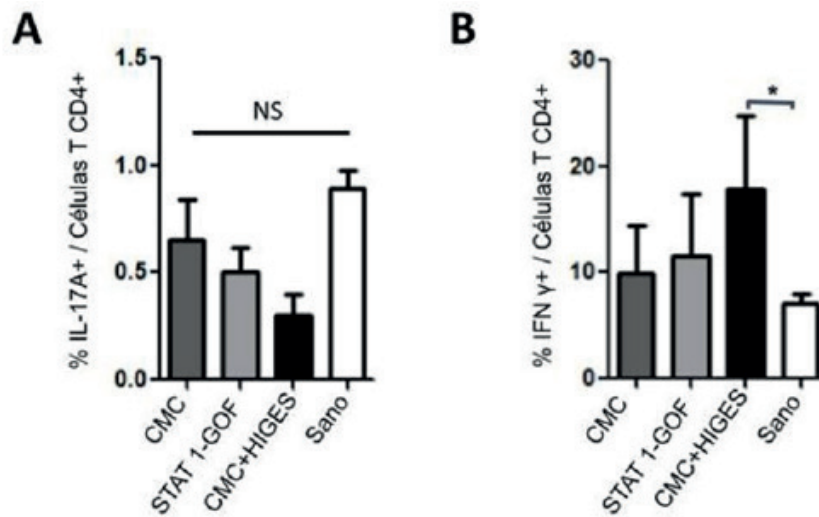


**Figura 2.** Localización y recurrencia de los síntomas en CMC. Células productoras de IL-17A e IFN $\gamma$  de acuerdo a la localización y recurrencia de los síntomas en pacientes con CMC e individuos controles. A) Distribución individual del porcentaje de linfocitos CD4+ con expresión de IL-17A según la localización de síntomas a nivel mucoso o mucocutáneo (n=9). B) Distribución individual del porcentaje de linfocitos CD4+ IFN $\gamma$ + según localización mucoso o mucocutáneo (n=9). C) Medias poblacionales que muestran comparación del porcentaje de linfocitos CD4+ IL-17A+ según la localización de síntomas a nivel mucoso (n=6) o mucocutáneo (n=3) y en pacientes control sano (n=20). D) Medias poblacionales mostrando comparación del porcentaje de linfocitos CD4+ IFN $\gamma$ + para diferente localización de síntomas mucoso (n=6) o mucocutáneo (n=3) y en pacientes control sanos (n=22). E) Distribución individual del % de Li CD4+ IL-17A+ según la frecuencia de presentación de episodios de CMC sea menor o mayor a 7 presentaciones anuales (n=9). F) Distribución individual del % de Li CD4+ IFN $\gamma$ + según la frecuencia de presentación de episodios (ep.) (n=9). A,B,E y F) Se utilizó estadístico T test Media  $\pm$  SEM  $p < 0,05$ . C y D) Se utilizó estadístico de ANOVA con post test de Bonferroni  $p < 0,05$ .

Con este propósito, establecimos el cociente entre los porcentajes de células con perfil Th1, en relación a las células con perfil Th17 (ratio Th1/Th17) en pacientes con CMC. Observamos, que este parámetro fue estadísticamente diferente con respecto al valor obtenido para el grupo control, siendo significativamente mayor (3,57 veces) en los pacientes con la patología (Figura 4A). En el panel B de la figura 4, se muestra la correlación entre el porcentaje de células productoras de IFN $\gamma$  vs. el porcentaje de células productoras de IL-17A, para una misma muestra. No observamos correlación estadísticamente significativa entre el porcentaje de ambas poblaciones celulares en estudio en el grupo de pacientes con CMC, como así tampoco en los individuos sanos (Figura 4B).

#### LA FRECUENCIA DE CÉLULAS PRODUCTORAS DE IL-17A, NO MOSTRÓ CORRELACIÓN CON LA SECRECIÓN DE IL-17A

El estudio de las poblaciones inmunes productoras de una determinada citoquina por la técnica de citometría de flujo requiere una infraestructura compleja y por ello no es una metodología disponible en todos los laboratorios de análisis clínicos; en tanto, las técnicas que permiten evaluar la concentración de una citoquina en sobrenadante de cultivo o suero son más accesibles. Con el fin de comparar dos metodologías que permitan evaluar el perfil de respuesta Th17 en los pacientes con CMC, se determinó para un mismo individuo la expresión de células productoras de IL-17A en CMSP por citometría de flu-



**Figura 3.** Mutaciones moleculares que acompañan a la CMC. Células productoras de IL-17A e IFN $\gamma$  teniendo en cuenta el diagnóstico referido que acompaña a la manifestación clínica de candidiasis y en pacientes control sano. A) Media poblacional que muestra la comparación del porcentaje de linfocitos CD4+ IL-17A+ entre el grupo de pacientes sin mutación genética confirmada al momento de realizar este estudio (CMC), pacientes con Síndrome de Hiper IgE (HIGES), pacientes con mutación en STAT1 con ganancia de función (STAT1-GOF) (n=9) entre sí y con pacientes control sano (n=20). B) Media poblacional mostrando la comparación entre el porcentaje de linfocitos CD4+ IFN $\gamma$ + para los diferentes diagnósticos que acompañan a CMC (n=9) y en pacientes control sanos (n=22). A y B) Se utilizó estadístico de ANOVA con post test de Bonferroni p<0,05.

jo (%CD4+ IL-17A+) y se correlacionó con la concentración de IL-17A (pg/ml) en sobrenadante de cultivo utilizando la técnica de ELISA (Figura 5). El análisis efectuado permitió establecer que no existe correlación en los resultados obtenidos por ambas técnicas para un mismo paciente con CMC.

Finalmente, y con el mismo propósito antes mencionado, se consideró implementar la determinación de la concentración sérica de IL-17A (pg/ml) utilizando la técnica de ELISA. Se procedió a realizar la determinación en una muestra representativa de individuos de nuestra cohorte (n=6) y en individuos controles (n=6), la concentración de esta citoquina resultó no detectable por la metodología utilizada. Estos resultados están en concordancia con lo reportado para pacientes con otras formas de infección por este hongo<sup>7</sup>.

## DISCUSIÓN

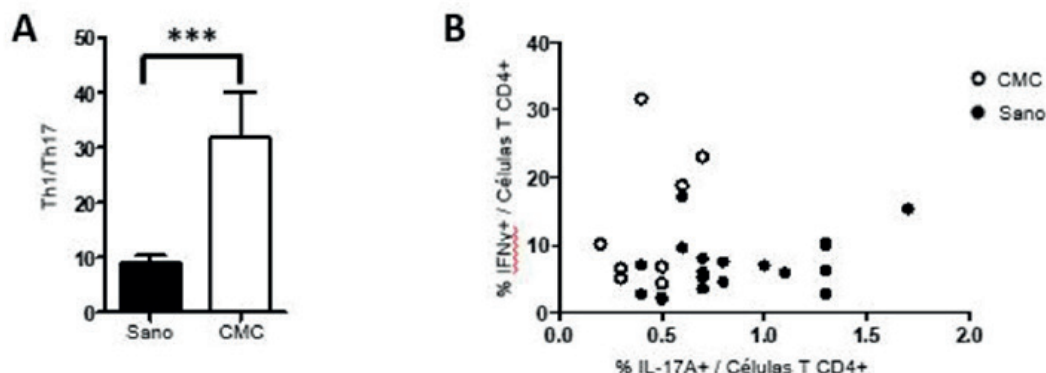
La CMC es una enfermedad que afecta a la población pediátrica, con una mayor incidencia en la primera infancia. Generalmente se manifiesta asociada a fallas o disfunciones inmunes congénitas en los mecanismos de respuesta antifúngicos<sup>1,18,19</sup>. En nuestro país, no existen datos de la incidencia de esta patología, hecho posiblemente asociado a la falta de registros públicos y a la complejidad de

realizar un diagnóstico inmunológico y genético que permita su correcta identificación. Por otro lado, Argentina cuenta con escasos laboratorios con posibilidades de realizar este tipo de estudios, lo cual determina la gran relevancia del desarrollo y puesta a punto de metodologías sensibles, como herramientas que colaboren con el diagnóstico de CMC, para un abordaje temprano de la enfermedad.

Este trabajo se centró en el estudio de la población de Li Th17 en 9 pacientes pediátricos con CMC de diferente etiología, concurrentes al Hospital Dr. Humberto Notti, de Mendoza. El objetivo fue contribuir al diagnóstico, orientar sobre la severidad de la enfermedad y el seguimiento de su evolución. En esta cohorte, se evaluó la frecuencia de las poblaciones de linfocitos Th17 y Th1 de en sangre periférica, el balance entre las mismas expresado como la relación Th17/Th1 y la existencia de posibles asociaciones con características clínicas de la CMC. Se incluyeron también 22 individuos controles. Las poblaciones celulares se evaluaron por citometría de flujo, y la concentración de IL-17A por la técnica de ELISA.

Nuestros resultados mostraron que la frecuencia de células Th17 estuvo significativamente disminuida en pacientes con CMC, en comparación con los individuos controles. De esta manera, se aporta al diagnóstico clínico evidencia sobre la característica de la disfunción inmune presente en estos pacientes. Estos resultados están de acuerdo





**Figura 4.** Balance en poblaciones linfocitarias Th1 y Th17. Relación entre LiTh1 y Th17 en pacientes con CMC e individuos controles. A) Valor promedio de la relación entre las poblaciones celulares Th1/Th17 de individuos controles y en pacientes con CMC. Se utilizó estadístico T test Media  $\pm$  SEM  $p < 0,05$ . B) Correlación de Pearson entre los porcentajes de células CD4+ con expresión de INF $\gamma$  e IL-17A para una misma muestra en pacientes con CMC ( $r=0,387$ ;  $p=0,343$ ) y pacientes controles ( $r=0,383$ ;  $p=0,087$ ).

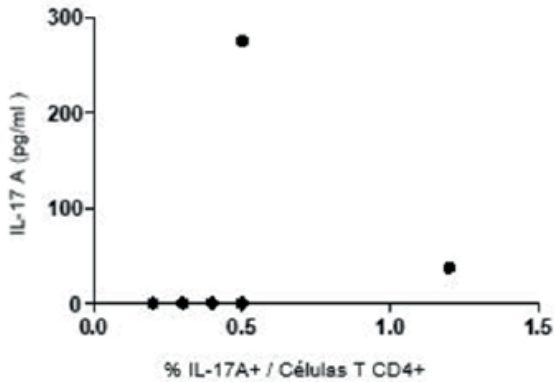
con lo reportado por otros autores<sup>29,30</sup> y reafirman que las fallas o defectos en la población Th17 contribuyen a la falta y/o alteración de respuesta inmune frente a la infección por *Candida* ssp.<sup>31</sup> Los mecanismos por los cuales ocurre esta disminución aún no se comprenden por completo y continúan siendo tema de estudio. Trabajos en modelos animales de infecciones mucosas por *Candida* en ratones normales, o con deleciones en algunos elementos que conducen a la diferenciación y a las vías intracelulares dependiente de IL-17, aportan evidencia en este sentido<sup>32,33</sup>. En pacientes con la enfermedad y mutaciones puntuales identificadas, la característica de la disfunción fue establecida<sup>34,35</sup>. En nuestro estudio, el 66,6% de los pacientes presentó valores de linfocitos Th17 por debajo del rango determinado en los individuos controles. En este sentido, la determinación de este parámetro inmunológico podrían ser de utilidad como marcador de enfermedad, contribuyendo así con el diagnóstico de CMC. Actualmente, en nuestro país la identificación este tipo de deficiencias solo se realiza en el Hospital de Pediatría Prof. Dr. Juan P. Garrahan, por lo tanto, la implementación de esta metodología diagnóstica en un hospital de referencia en la región de Cuyo constituye un aporte significativo para la precoz identificación de estos pacientes y su temprano tratamiento.

La frecuencia de células productoras de INF $\gamma$ , hallada en los pacientes de esta cohorte, fue superior en el grupo de individuos con CMC en comparación con los controles, evidenciando un predominio del perfil Th1 en detrimento del perfil Th17. Cerboni y cols.<sup>17</sup> sostienen que este fenómeno ocurre como un mecanismo compensatorio de respuesta frente a la disfunción, y que está determinado por la plasticidad de las células T *helper* en búsqueda de desarrollar una respuesta inmune efectiva frente a la infección

por *Candida* ssp. De esta manera, se desencadena una respuesta inmune protectora de tipo Th1, aunque finalmente resulta insuficiente para contrarrestar la infección. Por otra parte, Park y cols.<sup>36</sup> también señalan que, debido a la falta de una respuesta antifúngica eficiente y al hecho de que el mecanismo de retroalimentación negativa que regula la expansión de las células Th1 con el fin de mantener la homeostasis, también se ve alterado, la respuesta Th1 se encuentra potenciada. Sin embargo, nuestros resultados muestran que solo un 44,4% de los pacientes con CMC presentaron valores por encima del rango de referencia de nuestra cohorte para células productoras de INF $\gamma$ .

Los efectos biológicos de los Li Th17 son mediados por citoquinas liberadas por estas células, y dentro de ellas la IL-17A desempeña un rol relevante<sup>11,12</sup>. En este trabajo evaluamos su concentración en sobrenadante de cultivo. No encontramos correlación entre los resultados obtenidos para IL-17A (ELISA) y la población de Li productores de IL-17A determinados por citometría de flujo. Aunque la técnica de ELISA es una metodología más económica y asequible a varios laboratorios clínicos, cuenta con un nivel de sensibilidad que resulta insuficiente para la medición de este tipo de citoquinas. Aquí reportamos valores detectables solo para algunas muestras de sobrenadante de cultivo, e incluso su concentración resultó indetectable en todas las muestras de suero analizadas<sup>7</sup>. Estas observaciones denotan la importancia de la realización de los cultivos celular primarios y la estimulación linfocitaria *in vitro* para aumentar la sensibilidad de la medición<sup>22</sup>, resaltando la importancia del estudio funcional de la población Th17, utilizando citometría de flujo, como tecnología de vanguardia para el estudio de este tipo de patologías.

La CMC puede presentar diferente etiología. Pacientes con HIES y mutación en STAT1-GOF desarrollan CMC



**Figura 5.** Estudio de correlación entre las determinaciones de Citometría de Flujo y ELISA. Correlación de Pearson para pacientes con CMC entre la frecuencia de células productoras de IL-17A (% LiCD4+IL-17A+) obtenidos por citometría de flujo, en comparación con la secreción de IL-17A (pg/ml) obtenidos por ELISA en sobrenadante de cultivo ( $r=0,107$ ;  $p=0,42$ ).

como un fenotipo infeccioso importante que es categorizado como CMC sindrómico. Por el contrario, en la CMCD, las manifestaciones mucocutáneas características del fenotipo se dan en ausencia de otros signos clínicos prominentes, y asociado también con defectos genéticos que tiene un impacto directo en la señalización de IL-17<sup>18</sup>. La incidencia real de la enfermedad se desconoce, sin embargo, las cifras para HIES en Argentina es de 1 en 1.000.000 recién nacidos vivos, con una relación de prevalencia de hombres respecto de las mujeres de 2:1<sup>37</sup>. No obstante, y a pesar de que el número de pacientes que pudieron ser reclutados fueron 9, la cohorte en estudio representa el espectro de estas tres formas de CMC. En ella, se observó que la prevalencia de la enfermedad respecto al sexo fue 2:1, hombre respecto de mujeres y en el caso particular de CMC-HIES, los dos pacientes fueron varones. Nuestro estudio arrojó resultados que concuerdan con lo publicado por otros autores<sup>29,30</sup>, encontrando disminución de la frecuencia de células Th17, aunque esta disminución fue independiente de si el paciente presentó una mutación molecular o fuera clasificado como CMC. El vínculo común entre todos estos trastornos es una deficiencia en la función efectora de la población Th17. Mientras que en la CMC aislada el pronóstico es bueno, la morbilidad está relacionada con la cronicidad y persistencia de las infecciones por *Candida* en piel, uñas y membranas mucosas; por lo que comprender mejor la biología Th17 con el fin de modular su función, mediante la implementación de diferentes tratamientos, podría ser de gran utilidad para disminuir sus consecuencias<sup>38</sup>.

Nosotros observamos que la disminución en la frecuencia de linfocitos Th17 en los pacientes con CMC no guarda relación con los sitios comprometidos ni con la recurrencia de los síntomas. No obstante, observamos una ten-

dencia de disminución más marcada en la frecuencia de células productoras de IL-17A en pacientes con HIES con respecto a los controles, y de manera similar pero no tan pronunciada en los pacientes con la mutación de STAT1-GOF. Solo se detectaron diferencias estadísticamente significativas respecto a los individuos controles para el aumento de las células Th1 en pacientes con HIES. Posiblemente, la inclusión de un mayor número de casos permitirá establecer de manera más certera el fenotipo inmune asociado a cada presentación de la CMC.

Respecto al balance entre las poblaciones Th1/Th17, los resultados indicaron que existe un claro desequilibrio entre los perfiles de células Th1 respecto de las Th17 células<sup>18,27,28</sup>. El desequilibrio entre estas poblaciones podría ser un marcador importante para el diagnóstico, y para predecir el grado de la disfunción inmune del paciente, constituyendo también un parámetro a tener en cuenta durante el monitoreo del tratamiento<sup>39,40</sup>. Aunque no observamos la existencia de correlación entre ambos perfiles celulares en un mismo individuo, indicando que no existe un aumento proporcional de células productoras de IFN $\gamma$  que resulte en detrimento de la disminución de la población Th17, se pudo observar una clara tendencia de agrupación de los pacientes con CMC en los niveles más bajos para el porcentaje de linfocitos Th17, independientemente del valor individual de frecuencia de Li Th1 que presente. Para los individuos controles, observamos valores más bajos de frecuencia de células productoras de IFN $\gamma$ , acompañados de valores variables de IL-17A.

La técnica de CF proporciona un método rápido, aunque complejo, para identificar deficiencias en las células productoras de IL-17, lo cual podría usarse como guía para el diagnóstico de mutaciones genéticas específicas, lo que facilita un enfoque y un tratamiento más personalizado, teniendo en cuenta las nuevas oportunidades terapéuticas, evitando las complicaciones dadas por la cronicidad de la infección por *Candida*. Sería de gran importancia poder realizar más estudios como el presente en otros centros hospitalarios de nuestro país, que posibilite incluir un mayor número de pacientes con CMC, que permitan extender las observaciones reportadas en este trabajo, no solo con el fin de establecer la incidencia real de la CMC en nuestro medio, sino además para tener un mejor conocimiento de las inmunidad anti *Candida* mediada por la IL-17.

## AGRADECIMIENTO

Agradecemos al Laboratorio de Citometría de Flujo dependiente del Programa Provincial de SIDA e Inmunodeficiencias (PAPSI) por el apoyo económico, y a los miembros de este laboratorio por la colaboración permanente. Y a los miembros del Servicio de Inmunología del Hospital Pediátrico Dr. H. Notti.

## BIBLIOGRAFÍA

- Green L, Dolen WK. Chronic Candidiasis in Children. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2017 May;17(5):31. doi: 10.1007/s11882-017-0699-9.
- Lopes JP, Lionakis MS. Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. *Virulence.* 2022 Dec;13(1):89-121. doi: 10.1080/21505594.2021.2019950.
- Sotomayor CE, Miró MS, Masih DT. Cap. 28 Respuesta inmune a infecciones fúngicas. En: *Microbiología Biomédica*, editores: Basualdo, Coto, De Torres. 2° ed. CABA. Ed. Atlante. 2018.
- Miró, MS; Vigezzi, C; et al. Receptores Innatos e IL-17 en la respuesta inmune frente a hongos patógenos humanos. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba.* 2016; 73(3):188-96.
- Riera FO, Caeiro JP, Angiolini SC, et al. Invasive Candidiasis: Update and Current Challenges in the Management of This Mycosis in South America. *Antibiotics (Basel).* 2022 Jun 30;11(7):877. doi: 10.3390/antibiotics11070877.
- Miró MS, Rodríguez E, Icelly PA, et al. Recurrent vulvovaginal candidiasis: an old disease with new challenges. *Revista Iberoamericana de Micología.* 2017;33(4):1130-406.
- Miró MS, Caeiro JP, Rodríguez E, et al. *Candida albicans* Modulates Murine and Human Beta Defensin-1 during Vaginitis. *J Fungi* 2022, 8(1), 20; <https://doi.org/10.3390/jof8010020>
- Gaffen SL, Moutsopoulos NM. Regulation of host-microbe interactions at oral mucosal barriers by type 17 immunity. *Sci Immunol.* 2020 Jan 3;5(43):eaau4594. doi: 10.1126/sciimmunol.aau4594.
- Caza T, Landas S. Functional and Phenotypic Plasticity of CD4(+) T Cell Subsets. *Biomed Res Int* 2015;2015:521957. doi: 10.1155/2015/521957.
- Annunziato F, Romagnani S. Do studies in humans better depict Th17 cells? *Blood.* 2009 Sep 10;114(11):2213-9. doi: 10.1182/blood-2009-03-209189.
- Song X, Gao H, Qian Y. Th17 differentiation and their proinflammation function. *Adv Exp Med Biol.* 2014;841:99-151. doi: 10.1007/978-94-017-9487-9\_5.
- Mengesha BG, Conti HR. The Role of IL-17 in Protection against Mucosal *Candida* Infections. *J Fungi (Basel).* 2017 Sep 27;3(4):52. doi: 10.3390/jof3040052.
- Acosta-Rodríguez EV, Rivino L, Geginat J et al. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol.* 2007 Jun;8(6):639-46. doi: 10.1038/ni1467.
- Saravia J, Chapman NM, Chi H. Helper T cell differentiation. *Cell Mol Immunol.* 2019 Jul;16(7):634-643. doi: 10.1038/s41423-019-0220-6.
- Okada S, Asano T, Moriya K, et al. Human STAT1 Gain-of-Function Heterozygous Mutations: Chronic Mucocutaneous Candidiasis and Type I Interferonopathy. *J Clin Immunol.* 2020 Nov;40(8):1065-1081. doi: 10.1007/s10875-020-00847
- van de Veerdonk FL, Plantinga TS, Hoischen A, et al. STAT1 mutations in autosomal dominant chronic mucocutaneous candidiasis. *N Engl J Med* 2011 Jul 7;365(1):54-61. doi: 10.1056/NEJMoa1100102.
- Cerboni S, Gehrman U, Preite S, Mitra S. Cytokine-regulated Th17 plasticity in human health and diseases. *Immunology* 2021 May;163(1):3-18. doi: 10.1111/imm.13280.
- Okada S, Puel A, Casanova JL, et al. Chronic mucocutaneous candidiasis disease associated with inborn errors of IL-17 immunity. *Clin Transl Immunology.* 2016 Dec 2;5(12):e114. doi: 10.1038/cti.2016.71.
- Puel A, Cypowij S, Maródi L, Abel L, Picard C, Casanova JL. Inborn errors of human IL-17 immunity underlie chronic mucocutaneous candidiasis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2012 Dec;12(6):616-22. doi: 10.1097/ACI.0b013e328358cc0b.
- Glocker EO, Hennigs A, Nabavi M, et al. A homozygous CARD9 mutation in a family with susceptibility to fungal infections. *N Engl J Med* 2009 Oct 29;361(18):1727-35. doi: 10.1056/NEJMoa0810719.
- Conti HR, Baker O, Freeman AF, et al. New mechanism of oral immunity to mucosal candidiasis in hyper-IgE syndrome. *Mucosal Immunol* 2011 Jul;4(4):448-55. doi: 10.1038/mi.2011.5.
- Renna MS, Figueredo CM, Rodríguez-Galán MC, et al. *Candida albicans* up-regulates the Fas-L expression in liver Natural Killer and Natural Killer T cells. *Immunobiology* 2015 Nov;220(11):1210-8. doi:10.1016/j.imbio.2015.06.014.
- Freer G, Rindi L. Intracellular cytokine detection by fluorescence-activated flow cytometry: basic principles and recent advances. *Methods* 2013 May 15;61(1):30-8. doi: 10.1016/j.ymeth.2013.03.035.
- Babaloo Z, Oskoei MR, Kohansal MH, Barac A, Ahmadpour E. Serum profile of IL-1 $\beta$  and IL-17 cytokines in patients with visceral leishmaniasis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2020 Apr;69:101431. doi: 10.1016/j.cimid.2020.101431.
- Honda K, Littman DR. The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease. *Nature.* 2016 Jul 7;535(7610):75-84. doi:10.1038/nature18848.
- Bacher P, Hohnstein T, Beerbaum E, et al. Human Anti-fungal Th17 Immunity and Pathology Rely on Cross-Reactivity against *Candida albicans*. *Cell.* 2019 Mar 7;176(6):1340-55.e15. doi: 10.1016/j.cell.2019.01.041.
- Nurjadi D, Kain M, Marcinek P, Gaile M, Heeg K, Zanger P. Ratio of T-Helper Type 1 (Th1) to Th17 Cytokines in Whole Blood Is Associated With Human  $\beta$ -Defensin 3 Expression in Skin and Persistent *Staphylococcus aureus* Nasal Carriage. *J Infect Dis.* 2016 Dec 1;214(11):1744-1751. doi: 10.1093/infdis/jiw440.
- Bazzazi H, Aghaei M, Memarian A, Asgarian-Omran H, Behnampour N, Yazdani Y. Th1-Th17 Ratio as a New Insight in Rheumatoid Arthritis Disease. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2018 Feb;17(1):68-7
- McDonald DR. TH17 deficiency in human disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2012 Jun;129(6):1429-35; quiz 1436-7. doi: 10.1016/j.jaci.2012.03.034.
- Eyerich K, Foerster S, Rombold S, Seidl HP, Behrendt H, Hofmann H, Ring J, Traidl-Hoffmann C. Patients with chronic mucocutaneous candidiasis exhibit reduced production of Th17-associated cytokines IL-17 and IL-22. *J Invest Dermatol.* 2008 Nov;128(11):2640-2645. doi: 10.1038/jid.2008.139. Epub 2008 Jul 10. PMID: 18615114.
- Xu S, Cao X. Interleukin-17 and its expanding biological functions. *Cell Mol Immunol.* 2010 May;7(3):164-74. doi: 10.1038/cmi.2010.21.
- 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) 20:606–17. doi: 10.1016/j.chom.2016.10.001
- Conti HR, Gaffen SL. IL-17-mediated immunity to the opportunistic fungal pathogen *Candida albicans*. *J Immunol (2015)* 195:780–8. doi: 10.4049/jimmunol.1500909
- Puel A, Cypowij S, Bustamante J, Wright JF, Liu L, Lim HK, et al. Chronic mucocutaneous candidiasis in humans with inborn errors of interleukin-17 immunity. *Science* (2011) 332:65–8. doi: 10.1126/science.1200439
- Shamriz O, Tal Y, Talmon A, Nahum A. Chronic Mucocutaneous Candidiasis in Early Life: Insights Into Immune Mechanisms and Novel Targeted Therapies. *Front Immunol* 2020 Oct 16;11:593289. doi: 10.3389/fimmu.2020.593289.
- Park H, Li Z, Yang XO, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol.* 2005 Nov;6(11):1133-41. doi: 10.1038/ni1261.

37. Orphanet. Noviembre 2022 [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC\\_Exp.php?lng=es&Expert=2314](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=es&Expert=2314)
38. Marazzi MG, Bondi E, Giannattasio A, Strozzi M, Savio-li C. Intracranial aneurysm associated with chronic mucocuta-neous candidiasis. *Eur J Pediatr* 2008 Apr;167(4):461-3. doi: 10.1007/s00431-007-0490-3.
39. Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med*. 2007 Aug 6;204(8):1849-61. doi: 10.1084/jem.20070663.
40. Lee YK, Turner H, Maynard CL, et al. Late developmen-tal plasticity in the T helper 17 lineage. *Immunity*. 2009 Jan 16;30(1):92-107. doi: 10.1016/j.immuni.2008.11.005.