

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Microbiología I



TESIS DOCTORAL

Efecto del estradiol y la progesterona sobre la migración y función de los neutrófilos en el tracto reproductor femenino inferior

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Laura Salinas Muñoz

Director

Miguel Relloso Cereceda

Madrid, 2018

**EFEECTO DEL ESTRADIOL Y LA
PROGESTERONA SOBRE LA MIGRACIÓN
Y FUNCIÓN DE LOS NEUTRÓFILOS EN EL
TRACTO REPRODUCTOR FEMENINO
INFERIOR**



**UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE DE
MADRID**

Facultad de Medicina

**Departamento de
Microbiología I**

Laura Salinas Muñoz

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA I



**EFFECTO DEL ESTRADIOL Y LA
PROGESTERONA SOBRE LA MIGRACIÓN Y
FUNCIÓN DE LOS NEUTRÓFILOS EN EL
TRACTO REPRODUCTOR FEMENINO
INFERIOR**

Memoria para optar al grado de doctor presentada por:

Laura Salinas Muñoz

Director:

Dr. Miguel Relloso Cereceda

*A mis padres y
mi hermana*

Parece que fue ayer cuando comencé esta aventura y han pasado ya casi cuatro años... Echando la vista atrás no puedo evitar acordarme de todas las personas que, de una manera u otra, han permitido que esta tesis se haga realidad. Espero que estas líneas sirvan para transmitir mi agradecimiento y cariño a cada una de ellas.

Quiero comenzar con mi equipo, mi grupo, mis "mousers". Vosotros habéis sido los verdaderos testigos y protagonistas de este trabajo. Gracias por el esfuerzo, las ganas y la ilusión que habéis puesto en esta tesis día tras día, pero sobre todo, gracias de corazón por haberos convertido en mi familia madrileña a lo largo de este tiempo. Miguel, aunque sé que te va a costar leer estas palabras, lo siento, te las has ganado. Al final, pese a todas las bromas, te has convertido en mi "padre" científico. Gracias por acogerme y mimarme desde el primer día, por guiarme en este camino, por contagiarme la pasión que tienes por este trabajo y sobre todo, por ayudarme a creer en mí misma, celebrando mis victorias y apoyándome en mis fracasos, siempre con una palmadita en la espalda que me ha impedido rendirme en los momentos difíciles. Me siento orgullosa de ser tu primera doctoranda y estoy segura de que seré la primera de muchos más. A Raúl, mi mano derecha. Desde que llegaste todo fue mucho más cómodo y fácil para mí. Gracias por encargarte de todo el trabajo duro que a veces no se ve, pero que es la base de todo, y por hacerlo con una sonrisa y una actitud tan positiva, sin una sola queja. Quique, mi compañero de tesis, gracias por involucrarte en este trabajo, sacando tiempo de donde puedes, aunque a veces eso signifique tener que correr por el hospital o quedarte sin comer. Gracias por tus consejos, abrazos y gestos de ánimo cuando más lo he necesitado, me has dado un apoyo muy importante. Carlota, mi veterinaria favorita, gracias por el soporte que nos has dado desde el animalario, por tus ganas de aprender junto a nosotros y por haberte unido a este proyecto de forma desinteresada, aportando un toque de buen humor y alegría al grupo. Por último, gracias a María e Irene. Aunque solo haya compartido los últimos meses con vosotras os agradezco la compañía y la ayuda que me habéis prestado durante este tiempo. María, gracias por aportar una dosis de buen rollo con tu alegría y sonrisa. Irene, gracias por tu actitud impecable y tus ganas infinitas de ayudar y aprender. Me voy muy contenta sabiendo que todo este trabajo queda en tus manos.

A Rafa, para mí un miembro más del equipo desde el principio. Gracias por ayudarme a hacer esta tesis tan bonita por dentro como por fuera. Por todo el tiempo, esfuerzo y dedicación que has puesto en este proyecto, siempre dispuesto a ayudarme a cambio de nada, a entender mis dudas y escuchar mis ideas, dejándome aprender de las tuyas. Por enseñarme a razonar y demostrar cada experimento y por los ánimos y el cariño que me has ofrecido.

A todo el grupo de Inmunobiología Molecular, especialmente a M^{ra} Ángeles Muñoz, por abrirme las puertas de su laboratorio. A todas las personas con las que he tenido el gusto de compartir estos años de trabajo. Gracias a Judit, Marta, Marjorie, Susana, Chusa y Raquel, por ayudarme y echarme una mano en el laboratorio cuando lo he necesitado, como si fuera una más. A Begoña, por transmitirme tu tranquilidad en los momentos de estrés. A Laura M. y Laura H., aunque coincidiéramos poco dentro del laboratorio os habéis convertido en unas buenas amigas fuera de él. A Elena, por el gran cariño que me has demostrado en tan poco tiempo. También a los chicos del Biobanco, especialmente a Irene, siempre dispuesta organizar un buen plan y pasarlo en grande ya sea en Segovia, Ávila o Madrid. A los chicos de Inmuno 2: Dani, Rafa, Pilar, Nacho y especialmente a Carlos, por apoyarme y animarme en muchos momentos con tu alegría granaina. No me olvido de mi compañero de cañas, comidas e innumerables

cafés radioactivos, Santiii. Gracias por el cariño con el que me has tratado siempre, por tus palabras de ánimo y por ayudarme a desconectar con tus momentos “santuario” entre acertijos, chistes malos o alguna historieta freak. Tienes un gran corazón y te deseo mucha suerte en tu recta final.

En general, gracias a todos los servicios y laboratorios del Experimental o liSGM, con los que he podido trabajar más de cerca estos últimos meses. De forma más importante al servicio de Animalario: Paco, Mercedes y compañía, por cuidar y mimar tan bien a nuestros ratones. Al servicio de Farmacogenética: Luis y Mabela, que nos aguantan día tras día cediéndonos parte de su espacio sin ninguna queja. A Laura, Maribel y al grupo de Rafa Correa, especialmente a Jacobo, compañero de estrés de escritura y de risas en el metro de camino a casa, sin el que no hubiera conocido a Lucía, a la que agradezco su dulzura y verdadera amistad. A Alberto y Marian, por el ánimo y la compañía de estos últimos meses. También, con especial cariño a Paloma Sánchez-Mateos, por aceptar ser mi tutora, y a la gente de su laboratorio, por su gran generosidad y apoyo cada vez que lo he necesitado.

Finalmente aprovecho para dar las gracias al liSGM y a la Mutua Madrileña, cuya financiación ha permitido que esta tesis sea posible.

Gracias a Bas Kokke y Rosa Félix, las primeras personas que me animaron en esta aventura. A Bas, por darme la oportunidad de conocer su laboratorio y enseñarme a dar los primeros pasos en él. A Rosa, por ser mi primer contacto con un doctorado y por cuidarme y arroparme durante esa época tan fría y a la vez tan enriquecedora. Siempre os estaré muy agradecida.

A mis amigas de Barbastro: Carla, Diana, Julia, Lauri, Lau, Noe y Paula. Por estar siempre ahí, algunas desde que tengo uso de razón. Por vuestros mensajes de ánimo cuando lo necesito y por hacer que cada momento juntas (fines de semana, navidades, vinos o cumpleaños) sirva para olvidar los problemas de la rutina, volviendo a nuestra casa, sintiéndonos como hace diez años, como si no pasara el tiempo.

A mis chicas de Agüero, con especial cariño a las “INCAS”: Clara, Marta y Paula. Por todo el apoyo que me habéis mostrado con esta tesis, siempre preguntando, animando y deseando que llegue el final para celebrarlo. A vuestro lado solo recuerdo risas y alegría, con muchas ganas de disfrutar, ya sea en Sitges, Huesca, Zaragoza, Madrid o, como no, en nuestro rincón favorito del “mundo entero”.

A las “Biomèdiques”, especialmente a Nuria. Desde el primer día de Universidad te convertiste en una amiga irremplazable. Eres una luchadora y tú más que nadie sabes lo duro que es llegar hasta aquí. Gracias también a Ingrid y Mariona, por haber sido un apoyo tan importante durante nuestros comienzos en esto del pipeteo. Finalmente gracias a ti Anita, la suerte ha hecho que volvamos a encontrarnos después de tanto tiempo. Gracias por sacarme una sonrisa en esta etapa tan estresante, justo cuando más lo necesito.

Al grupo de Inmunólogos y asociados, por hacer que este tiempo en Madrid haya sido tan divertido. En especial a Alba, por ser mi primera compañera dentro y fuera de las clases. A Sara, Jorge, Cris, Ester y los que vinieron después...por las innumerables noches de chocitas, ochos y antorchas. Pero sin duda, gracias a ti, Javi, porque en estos años te has convertido en un gran amigo con el que compartir los buenos y malos momentos. Gracias por estar siempre ahí, dispuesto a escucharme, desahogándonos entre “cañas y tostas”, animándonos el uno al otro en esta etapa que en ciertos momentos ha sido un poco complicada.

De forma muy especial a toda la familia Salinas, que es tan grande y crece tan rápido que me es imposible nombraros uno a uno. Gracias por alegraros por mis logros y por tener siempre una excusa de celebración y reunión en nuestro querido Sobrarbe.

A la familia Muñoz, con gran cariño a las personitas más especiales, mis abuelos, quienes sin duda me han inculcado desde pequeña el amor por el trabajo y las cosas bien hechas. Sé que soy muy afortunada de teneros todavía a mi lado y de poder seguir disfrutando de vuestra larga experiencia y sabiduría. También a Tono, Maribel y Elena, por tratarme con tanta ternura y no tardar ni un minuto en ayudarme cada vez que tengo un problema.

Por último, dedico esta tesis a mis padres y a mi hermana María, los pilares que realmente han sustentado mi ánimo durante este tiempo. Tata, gracias por ser mi ejemplo a seguir, mi segunda mamá, siempre protegiéndome, cuidándome y tranquilizándome con tus consejos. Gracias también por haber conocido a Dani, culpable de muchas carcajadas y buenos momentos en familia. Papá, eres la persona más optimista y valiente que conozco, gracias por darme ese empujón hacia adelante, por buscarle la parte positiva a cualquier situación y por tus mensajes de serenidad cada vez que lo necesito, ahora en forma de poesía. Mamá, contigo se me acaban las palabras...qué te voy a decir a ti, la persona más buena, cariñosa y paciente conmigo. La que aguanta incondicionalmente mis malos humores y días amargos al otro lado del teléfono, con una sonrisa y una paciencia admirable. Gracias porque solo el escuchar tu voz me calma y me da fuerzas para continuar. De corazón, Gracias a los tres, sé que vaya a donde vaya en vosotros siempre estará mi hogar.

Abreviaturas	1
Resumen	5
Abstract	7
Introducción	11
1. Los neutrófilos	13
1.1. Definición	13
1.2. Origen y homeostásis	14
1.3. Migración de neutrófilos	15
1.4. Eliminación de patógenos	22
2. El tracto reproductor femenino	25
2.1. El ciclo reproductor femenino	26
2.2. Sistema inmune en el tracto reproductor femenino	33
Justificación e hipótesis	43
Objetivos	47
Materiales y métodos	51
1. Los ratones	53
2. Modelos de ciclo ovárico	53
2.1. Modelos de ciclo ovárico con hormonas exógenas	53
2.2. Modelo de ciclo ovárico natural	56
3. Inseminación e infección vaginal	57
3.1. Recogida de espermatozoides	58
3.2. Preparación de <i>C. albicans</i>	58

4.	Extracción y análisis del lavado vaginal	59
5.	Transferencia de neutrófilos Wt y <i>Cxcr2</i> ^{-/-}	59
6.	Eliminación de neutrófilos <i>in vivo</i>	60
7.	Tratamiento intravaginal con Heparinasa III	60
8.	Estudio histológico	61
8.1.	Preparación de muestras	61
8.2.	Tinción de inmunofluorescencia	61
8.3.	Microscopía confocal	62
8.4.	Tinción de hematoxilina-eosina	63
9.	Citometría de flujo	64
9.1.	Procesamiento de muestras.....	64
9.2.	Tinción y análisis.....	66
10.	Experimentos <i>ex vivo</i> / <i>in vitro</i>	67
10.1.	Purificación de neutrófilos de ratón	67
10.2.	Tratamiento sobre neutrófilos <i>ex vivo</i>	67
10.3.	Determinación de la actividad candidacidal de los neutrófilos	68
10.4.	Determinación de la actividad fagocítica de los neutrófilos	68
10.5.	Migración a través de transwells	69
10.6.	Purificación de células polimorfonucleares (PMN) humanas	69
10.7.	Migración transepitelial.....	69
11.	Estadística	70

Resultados..... 73

1.	Efecto de las hormonas sexuales femeninas sobre la presencia de neutrófilos en el lavado vaginal y el tracto reproductor femenino.....	75
1.1.	El E2 impide la salida de neutrófilos al lumen vaginal	75
1.2.	El E2 induce una acumulación de neutrófilos en el ectocérvix y en el fórnix ..	77

2.	Efecto de las hormonas sexuales femeninas sobre los mecanismos implicados en la migración transepitelial.....	79
2.1.	Efecto de las hormonas sexuales femeninas sobre el grosor del epitelio del TRF.	79
2.2.	Cxcr2 es esencial en la salida de neutrófilos al lumen vaginal	81
2.3.	Las hormonas sexuales femeninas no modifican la expresión y función de Cxcr2 sobre los neutrófilos.....	83
2.4.	Efecto de las hormonas sexuales femeninas sobre los ligandos de Cxcr2. El E2 disminuye la expresión de Cxcl1 en el epitelio	84
2.5.	Rotura de membrana basal y adhesión al epitelio: Las hormonas sexuales femeninas no modifican la expresión de Mmp9, Cd11b y Sirp α sobre los neutrófilos	86
2.6.	Los neutrófilos no expresan los receptores de hormonas ER α y PR α en el TRF	88
2.7.	Cruce a través de las uniones epiteliales: El E2 disminuye la expresión de Cd47 en el epitelio.....	89
2.8.	Liberación del neutrófilo al lumen vaginal “ <i>detachment</i> ”: El E2 disminuye la expresión de Cd44 en el epitelio	91
2.9.	El receptor de estradiol α (Esr1) regula la migración de los neutrófilos al lumen vaginal	95
2.10.	La expresión de CXCL1, CD47 y CD44 varía a lo largo del ciclo ovárico humano	97
2.11.	Las hormonas sexuales femeninas no modifican la expresión de Cxcl1, Cd47 y Cd44 en otros epitelios: Vejiga e intestino.....	98
3.	Efecto de las hormonas sexuales femeninas sobre la actividad candidacidal de los neutrófilos.	99
3.1.	El E2 retrasa la resolución de la infección con <i>C. albicans</i>	99

3.2.	El E2 disminuye la capacidad candidacidal de los neutrófilos a través de Esr1	101
3.3.	Actividad de los neutrófilos <i>ex vivo</i>	103
3.4.	Búsqueda de factores del ambiente vaginal.....	104
4.	Efecto de la administración consecutiva de E2 y P4 en el modelo de combinación hormonal	106
4.1.	La P4 restaura la migración de neutrófilos en el lumen vaginal	106
4.2.	La P4 recupera la capacidad candidacidal de los neutrófilos	110
5.	Estudio del modelo de ciclo natural	112
5.1.	La expresión de Cd44 varía en el epitelio vaginal a lo largo del ciclo estral .	112
5.2.	Efecto del ciclo estral sobre la carga fúngica de <i>C. albicans</i>	114
	Discusión	117
	Conclusiones	135
	Bibliografía	140
	Anexo	159

Abreviaturas

ADN:	ácido desoxirribonucleico
ANOVA:	análisis de la varianza
ASA:	anticuerpo anti espermatozoide
AU:	unidades arbitrarias
BSA:	albúmina de suero bovino
CD:	clúster de diferenciación
CD62E:	selectina E
CD62L:	selectina L
CMP:	progenitor mielóide común
CXCL:	ligando de quimioquina de tipo CXC
CXCR:	receptor de quimioquina de tipo CXC
DAF:	factor anti adhesivo
DAMPs:	patrones moleculares asociados a daño
DAPI:	4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato
E2:	17 β -estradiol
Ep:	epitelio
ER:	receptor nuclear de estradiol
FBS:	suero fetal bovino
FMLF:	péptido quimioatrayente N-Formyl-Met-Leu-Phe
FSH:	hormona folículo estimulante
Fut3:	fucosyltransferasa 3
G-CSF:	factor estimulador de colonias de granulocitos
GMP:	progenitor de monocítico o granulocítico
GNRH:	hormona liberadora de gonadotropinas
HS:	heparán sulfato
HSC:	células madre hematopoyéticas
IL:	interleuquina

LH:	hormona leuteinizante
LTB4:	leucotrieno B4
Lu:	lumen
LV:	lavado vaginal
M-CSF:	factor estimulador de colonias de macrófagos
MFI:	intensidad media de fluorescencia
MIF:	factor inhibitorio de macrófagos
MMPs:	metaloproteasas de matriz
MÓ:	médula ósea
MPO:	mieloperoxidasa
NET:	trampa extracelular del neutrófilo
NK:	célula asesina natural
NO:	óxido nítrico
P4:	progesterona
PAMPs:	patrones moleculares asociados a patógenos
PBS:	tampón fosfato salino
PMNs:	polimorfonucleares
PR:	receptor nuclear de progesterona
PRRs:	receptores de reconocimiento de patrones
PS:	plasma seminal
PSGL-1:	ligando de selectina P
ROI:	región de interés
ROS:	especies reactivas de oxígeno
RPMI:	medio de cultivo desarrollado en el Roswell Park Memorial Institute
RVVC:	candidiasis vulvovaginal recurrente
SC:	estrato córneo
SD:	desviación estándar
SEM:	media del error estándar
SIRPα:	proteína reguladora de señal α

Abreviaturas

sLe^A:	residuo glicosilado Sialyl-Lewis A
Sp:	espermatozoide
St:	estroma
TEM:	migración transendotelial
TEpM:	migración transepitelial
TER:	resistencia transepitelial
TLR:	receptor de tipo Toll
TRF:	tracto reproductor femenino
UFCs:	unidades formadoras de colonias
VH:	vehículo
VIH:	virus de la inmunodeficiencia humana
VPH:	virus del papiloma humano
VVC:	candidiasis vulvovaginal
VVCR:	candidiasis vulvovaginal recurrente
WT:	<i>wild type</i> , ratones tipo silvestre

La mucosa del tracto reproductor femenino (TRF) debe conciliar las funciones reproductoras con la inmunidad para permitir la fecundación y mantener el embarazo. De esta forma, las hormonas sexuales femeninas no solo preparan el ambiente necesario para la reproducción, sino que también lo coordinan con el sistema inmune. Por ejemplo, a lo largo del ciclo ovárico existen variaciones en el número de neutrófilos en la vagina. Así, durante la fase folicular, los neutrófilos desaparecen del lumen vaginal, a la vez que aumenta la concentración de estradiol (E2). Tras la ovulación, los neutrófilos vuelven a infiltrarse en la vagina a lo largo de la fase lútea, coincidiendo con el pico de progesterona (P4). La hipótesis actual sostiene que las hormonas sexuales femeninas gobiernan este fenómeno, sin embargo, actualmente no se conocen los mecanismos que dirigen esta migración de neutrófilos al lumen vaginal.

En este trabajo demostramos que el E2, a través del receptor Esr1, bloquea la migración transepitelial (TEpM) de neutrófilos en el TRF inferior, concretamente actuando sobre el epitelio del ectocérvix y fórnix, y no sobre los neutrófilos, ya que no poseen receptores de E2 y P4 (Esr1 y Pgr) en el TRF. Además, identificamos varios mecanismos moleculares que podrían estar involucrados en este proceso, como la quimioquina Cxcl1 o las moléculas de adhesión Cd47 y Cd44 del epitelio, las cuales están reguladas por las hormonas sexuales femeninas. De esta manera, el E2 inhibe la expresión estas moléculas para impedir la TEpM de los neutrófilos durante la ovulación, mientras que la P4 aumenta su expresión durante la fase lútea y con ello la salida de neutrófilos al lumen vaginal. Al mismo tiempo, hemos visto que la regulación hormonal de estas moléculas es independiente de estímulo y tiene lugar tanto en condiciones basales como ante una inseminación o una infección con *Candida albicans*.

Por otro lado, hemos descubierto que el E2 y la P4 también tienen un efecto sobre la actividad de los neutrófilos en la vagina. El E2, también a través del receptor Esr1, facilita un

ambiente inmunosupresor inhibiendo la capacidad candidacidal de los neutrófilos, mientras que la P4 presenta un efecto inmunoactivador sobre estas células. Además, la falta de receptores hormonales en los neutrófilos del TRF indica que esta regulación tendría lugar de forma indirecta a través de un factor del ambiente vaginal todavía desconocido.

Finalmente, en el modelo secuencial de hormonas demostramos que la P4 es capaz de revertir los efectos del E2, restaurando la expresión de Cxcl1, Cd47 y Cd44 en el epitelio, la salida de neutrófilos al lumen vaginal y su actividad candidacidal. De forma adicional, el modelo de ciclo natural nos ha permitido validar estos datos en el ciclo real, comprobando que la expresión de Cd44 en el epitelio apical varía a lo largo del ciclo, disminuyendo durante el proestro y el estro (pico de E2) y aumentando durante el metaestro y diestro (pico de P4). Esto correlaciona a Cd44 con una salida de neutrófilos durante el metaestro y diestro y con una disminución de la carga fúngica, lo que subraya el importante papel de los neutrófilos en la candidiasis vaginal. Asimismo, también demostramos que la combinación de E2 y P4 es necesaria para mantener el ciclo de neutrófilos de forma basal (sin estímulos), el cual no se ve alterado tras la infección con *C. albicans*. Por el contrario, la inseminación con espermatozoides aislados inhibe el flujo de neutrófilos al lumen vaginal.

En resumen, este trabajo propone que el E2 retiene e inactiva a los neutrófilos en el TRF, generando un ambiente favorable para la presencia de espermatozoides durante la ovulación que garantiza las funciones reproductoras. Por el contrario, tras la ovulación, la P4 restaura el ciclo de neutrófilos y su actividad, lo que asegura la defensa frente a posibles patógenos oportunistas a lo largo de la fase lútea. Nuestros datos aportan un mecanismo novedoso en la conciliación de las funciones reproductoras e inmunes en el TRF, que podría ser útil en el desarrollo de tratamientos para problemas de gran relevancia clínica como trastornos de fertilidad e infecciones vaginales.

Female reproductive tract (FRT) must conciliate reproduction with immunity to allow fertilization and successfully maintain pregnancy. Female sex hormones not only produce the proper FRT mucosal environment, but also regulate immune components. Thus, neutrophil numbers fluctuate throughout the ovarian cycle in the vagina. During the follicular phase, while estradiol (E2) concentration increases, neutrophils disappear from the vaginal lumen. After ovulation, during the luteal phase, progesterone (P4) levels peak and neutrophils re-infiltrate the vagina. Current hypothesis holds that female sex hormones govern this phenomenon; however, the mechanisms that direct neutrophil migration to the vaginal lumen are still unknown.

In this work, we demonstrate that E2, through the *Esr1* receptor, blocks neutrophil transepithelial migration (TEpM) in the lower FRT by acting on the epithelium of the ectocervix and fornix. Additionally, neutrophils seem to be unaffected by E2, most likely, because they lack E2 and P4 receptors (*Esr1* and *Pgr*) when they are in the FRT. Also, we identify several molecules that could be involved in this process, such as *Cxcl1* chemokine and the epithelial adhesion molecules *Cd47* and *Cd44*, which expression are down-regulated by E2. In this way, *Esr1* inhibits the expression of these molecules to prevent neutrophil TEpM during ovulation, whereas P4 treatment restores their expression during the luteal phase. Finally, we show that insemination or infection with *C. albicans* does not affect the hormonal regulation detected in steady state conditions.

On the other hand, we discover that E2 and P4 also affect neutrophil killing activity in the vagina. E2 inhibits the candidacidal capacity of neutrophils, through the *Esr1* receptor, to facilitate an immunosuppressive environment during ovulation; however, P4 has an immunoactive effect on these cells. In addition, the lack of hormone receptors in the FRT neutrophils suggests that this regulation takes place indirectly through a vaginal environment factor.

Moreover, we show that P4 reverses the E2 effects in the hormonal sequential model, restoring the epithelial expression of *Cxcl1*, *Cd47* and *Cd44*, the neutrophil influx into the vaginal

lumen and its candidacidal activity. We also analyzed the expression of Cd44 in the different phases of the natural cycle model. We discovered that Cd44 expression in the apical epithelium varies throughout the cycle. It decreases during proestrus and estrus (maximum E2 concentration) and increases during metaestrus and diestrus (maximum concentration of P4). These results correlate Cd44 with higher neutrophil numbers during metaestrus and diestrus, and a lower fungal burden, which reveals the important role of neutrophils in vaginal candidiasis. Finally, we found that the combination of E2 and P4 is necessary to maintain the basal neutrophil cycle (without stimuli), which is not altered after infection with *Candida albicans*. In contrast, insemination with isolated spermatozoa inhibits the neutrophil influx into the vaginal lumen.

We propose that E2 produces a neutrophil retention and inactivation in the lower FRT mucosa to protect sperm from neutrophil attack and maintain a favorable environment during ovulation (peak E2) that guarantees reproductive functions. Conversely, P4 restores the neutrophil presence and activity after ovulation, ensuring the defense against opportunistic or sexually transmitted pathogens during the luteal phase. Our data provide a new mechanism in the conciliation of reproductive and immune functions in the FRT, which can be useful in the development of treatments for fertility disorders and vaginal infections.

Introducción

1. Los neutrófilos

1.1 Definición

Los neutrófilos son los leucocitos más abundantes del sistema inmune y juegan un papel fundamental en la defensa del huésped por su capacidad de infiltrarse en los tejidos y por ser microbicidas de amplio espectro (Kolaczowska and Kubes, 2013). Se llaman neutrófilos porque sus gránulos no se tiñen con colorantes ácidos ni básicos, por lo que su citoplasma al microscopio óptico presenta un color rosa claro en la tinción de hematoxilina-eosina (Figura 1A). Dentro del sistema inmune forman parte de la respuesta innata, englobándose en el grupo de los granulocitos (junto con eosinófilos y basófilos), también denominados polimorfonucleares (PMN) debido al aspecto multilobulado de su núcleo (Figura 1B).

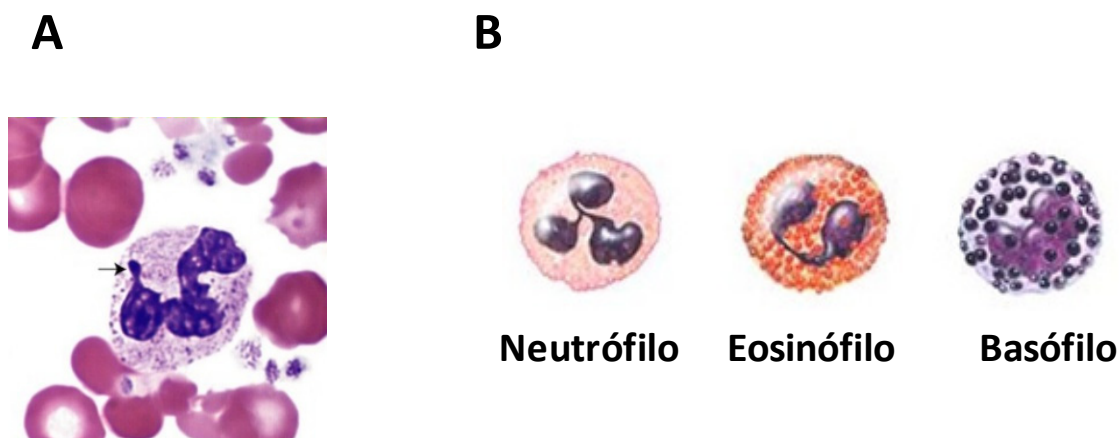


Figura 1: A) Fotografía de microscopía óptica de un neutrófilo en un frotis de sangre teñido con coloración de Wright. B) Representación de los tres tipos de granulocitos con los diferentes colores que presentan sus gránulos al teñirse con hematoxilina-eosina (Terese Winslow, 2007).

1.2 Origen y homeostasis

Los neutrófilos se originan en la médula ósea, donde un tercio de la hematopoyesis está dedicada a la generación de monocitos y granulocitos. Son células mieloides que proceden de células madre hematopoyéticas o HSC activadas bajo señales como el factor estimulador de colonias de macrófagos M-CSF (Mossadegh-Keller et al., 2013). Estas células dan lugar a las células progenitoras comunes o CMPs, que se diferencian en progenitores de granulocitos o monocitos o GMPs (Rosenbauer and Tenen, 2007), dividiéndose en la línea monocítica o en la línea neutrofílica. A partir de ahí, el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) promueve la granulopoyesis (Zhang et al., 1997) dando lugar a los mieloblastos, promielocitos, mielocitos, metamielocitos, células bandeadas y finalmente neutrófilos maduros (Bainton et al., 1971). Tras su generación, los neutrófilos son liberados de la médula ósea mediante el balance de los receptores de quimiocinas CXCR4 y CXCR2. Mientras que CXCR4 favorece su retención en la médula debido al ambiente rico en CXCL12 del estroma medular, CXCR2 facilita la salida de estas células al torrente sanguíneo y su posterior llegada a los tejidos (Amulic et al., 2012). Millones de neutrófilos son producidos cada día y eliminados en los tejidos de manera cíclica acorde con los ciclos de luz y oscuridad (Nicolas-Avila et al., 2017).

Una vez en la sangre, los neutrófilos circulan hasta que detectan alguna señal de peligro que les hace extravasarse a los tejidos para enfrentarse a patógenos o daño estéril y donde una vez resuelta la inflamación serán eliminados por los macrófagos residentes. Por el contrario, si no detectan ningún daño, en poco tiempo sufren un proceso de envejecimiento caracterizado por un aumento de sus moléculas de superficie CXCR4, CD11B y una pérdida de CD62L, que provocará su retorno a la médula ósea o extravasación homeostática y su destrucción por parte de los macrófagos tisulares residentes (Casanova-Acebes et al., 2013). Esta eliminación de neutrófilos “viejos” fluctúa durante el día ya que ocurre bajo el control de los ciclos circadianos (Casanova-Acebes et al., 2013) y se regula mediante la microbiota (Zhang et al., 2015). Aunque siempre se les ha considerado

células de vida corta con una vida media de 12 horas en sangre, se ha demostrado que los neutrófilos pueden sobrevivir hasta 5,4 días en el torrente sanguíneo (Pillay et al., 2010). Además, en los tejidos su vida media puede variar en función de las condiciones inflamatorias, de tal manera que diferentes citoquinas, patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) o factores ambientales pueden aumentar la vida del neutrófilo mediante la inhibición de la apoptosis (Geering et al., 2013). Así, un aumento en la vida de estas células se ha visto relacionado con enfermedades inflamatorias crónicas como el asma (Uddin et al., 2010) o el síndrome coronario agudo (Garlich et al., 2004). Estos hallazgos suponen que los neutrófilos podrían ser una población de células más longeva y heterogénea de lo que se pensaba hasta ahora y por tanto representar un papel más dinámico y complejo en los procesos inflamatorios.

1.3 Migración de los neutrófilos

Actualmente no sabemos todos los factores que condicionan la migración de los neutrófilos, aunque los casos más estudiados son el daño estéril o la infección extracelular. Los neutrófilos abandonan los vasos sanguíneos para entrar en el tejido gracias a gradientes de quimioquinas y moléculas de adhesión expresadas en los tejidos, que son reconocidas por los ligandos y receptores del propio neutrófilo (Kolaczkowska and Kubes, 2013). Los procesos que gobiernan todo este camino son bastante complejos y se puede dividir en varias fases:

1.3.1 Migración transendotelial

La migración de los neutrófilos a través del endotelio (TEM por sus siglas en inglés) es un proceso activo tanto para el neutrófilo como para la célula endotelial (Engelhardt and Wolburg, 2004). Tiene lugar a lo largo de las venas post capilares inflamadas y consta de varios pasos secuenciados: atracción al foco inflamatorio, rodamiento, adhesión firme y por último extravasación al tejido (Kolaczkowska and Kubes, 2013). En la respuesta inmune innata la TEM comienza con la

liberación de PAMPs por parte de los microorganismos invasores o DAMPs provenientes de un daño celular (Medzhitov, 2008), los cuales generan la **atracción** de los neutrófilos al endotelio. En esta atracción también pueden participar quimioquinas como CXCL1, CXCL5 y CXCL8 a través del receptor CXCR1 (Powell et al., 2017; Sadik et al., 2011). Posteriormente se establece el segundo paso de la TEM conocido como **rodamiento** o adhesión de baja afinidad, en la cual se produce un primer acercamiento entre el neutrófilo y la célula endotelial. Estas primeras uniones son de carácter débil y se realizan mediante selectinas (glicoproteínas de tipo I) que se unen a los hidratos de carbono de sus ligandos. En el caso de los neutrófilos, el rodamiento se realiza principalmente por la unión de SELP (selectin P, CD62P) y SELE (selectin E, CD62E) endotelial a su ligando SELPLG (PSGL-1) expresado en el neutrófilo (Marki et al., 2015). Tras un tiempo de rodamiento se produce la **adhesión firme** al endotelio mediada por la unión de las integrinas ITGAL (LFA-1, CD11A/CD18) e ITGAM (MAC-1, CD11B/CD18) a la molécula de adhesión endotelial ICAM-1 (CD54) (Gorina et al., 2014), la cual es capaz de formar *clusters* (agrupamientos del inglés) que remodelan el citoesqueleto celular del endotelio (Yang et al., 2006). Por último, el neutrófilo debe cruzar el endotelio y extravasarse al tejido inflamado. Este último paso de la TEM también es conocido como **transmigración** y puede tener lugar de dos formas distintas: entre las uniones celulares (paracelular) o directamente a través del interior celular (transcelular). La TEM paracelular consiste en la migración del neutrófilo entre los espacios intercelulares o uniones estrechas (Muller, 2011), es la más estudiada y la que ocurre la mayoría de las veces. En este caso el neutrófilo se abre paso a través de los bordes de las células endoteliales, rompiendo las uniones de las proteínas oclusivas como la familia del receptor F11 (F11R, proteínas JAM), la integrina PECAM1 (CD31) o el complejo CDH5 (VE-cad, CD144) (Dejana, 2004). Por el contrario, en la migración transcelular, los neutrófilos cruzan el endotelio atravesando el citoplasma de las células (Carman and Springer, 2008). Esta segunda vía de TEM ha sido menos descrita y ha generado algunas dudas, sin embargo, estudios basados en microscopía intravital han revelado que aproximadamente un 10% de los neutrófilos utilizan esta ruta en condiciones inflamatorias (Woodfin et al., 2011).

1.3.2 Migración intersticial a través del estroma

Tras extravasarse al tejido, el neutrófilo se adhiere a los pericitos que rodean el endotelio y comienza a rodar a través de ellos “crawling abluminal” de forma dependiente de ICAM-1, MAC-1 y LFA-1 (Proebstl et al., 2012). Los macrófagos perivasculares y mastocitos también participan en este proceso secretando quimioatrayentes como MIF o CXCL1 que atraen más neutrófilos y los guían a través del intersticio hacia el sitio de daño o infección (Kim and Luster, 2015; Zec et al., 2016). Los neutrófilos, al igual que el resto de leucocitos, realizan una migración ameboide, donde su citoesqueleto se polariza extendiendo protusiones en la membrana. Este modo de migración les hace moverse a una alta velocidad a través del intersticio (~10 $\mu\text{m}/\text{min}$). Una vez llegan al foco de infección, se ralentizan probablemente para ejercer sus funciones efectoras y atraen a más neutrófilos mediante la secreción de LTB₄ y CXCL2 formando clusters o swarms (Li et al., 2016a).

1.3.3 Migración transepitelial

Finalmente, en las infecciones que tienen lugar en el lumen los neutrófilos deben atravesar el epitelio (migración transepitelial, TEpM de sus siglas en inglés) para encontrarse con el patógeno. Mientras que la TEM está extensamente descrita y estudiada, los mecanismos celulares y moleculares que participan en la TEpM son menos conocidos. La mayoría de estudios sobre la TEpM están realizados en el intestino, aunque también existe literatura sobre la vejiga o el pulmón (Zemans et al., 2009). La TEpM de los neutrófilos es un paso esencial para la defensa y la reparación del daño tisular (Sumagin et al., 2016), sin embargo, un desequilibrio en este proceso es la clave de enfermedades crónicas inflamatorias, donde un gran número de neutrófilos se acumulan en las mucosas generando una inflamación intermitente (Parkos, 2016). Al igual que la TEM, la TEpM se divide en varios pasos consecutivos que se describen a continuación (Figura 2):

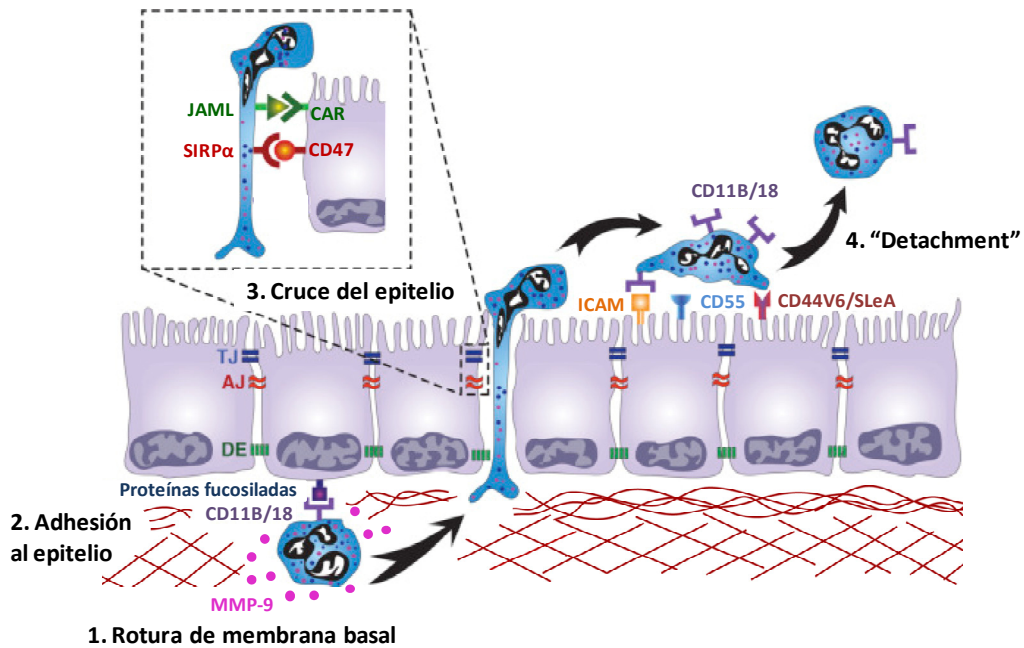


Figura 2: Migración transepitelial de los neutrófilos. La TEpM comienza con la rotura de la membrana basal gracias a MMPs como la MMP9. Posteriormente, el neutrófilo se adhiere a la parte basal del epitelio mediante la unión de la integrina CD11B/CD18 y residuos fucosilados del epitelio. A continuación, cruza el epitelio entre las uniones epiteliales a través del CD47 epitelial y su ligando SIRP α . Finalmente, se libera al lumen gracias a la acción de las moléculas de *detachment* CD55 y CD44. Ilustración modificada de (Parkos, 2016).

1. Rotura de la membrana basal

La membrana basal es una red especializada de matriz extracelular de sostén que se encuentra en la base de las células epiteliales y las separa del estroma (Rowe and Weiss, 2008). Por tanto, para llegar al epitelio, los neutrófilos deben sintetizar y secretar una serie de metaloproteasas (MMPs) que les permitan cortar y degradar los componentes de esta membrana. Una de las MMPs más comunes entre los neutrófilos es la MMP9, la cual degrada colágeno de tipo IV, componente principal de la membrana basal. Así, se ha visto que MMP9 participa en la migración de neutrófilos a través de esta membrana en diferentes órganos como el uroepitelio inflamado (Schiwon et al., 2014) o el daño pulmonar (Keck et al., 2002).

2. Adhesión a la parte basal del epitelio

Para atravesar el epitelio el neutrófilo debe comenzar por anclarse a su parte basolateral. Como se ha comentado anteriormente, en la unión al endotelio vascular los neutrófilos utilizan ambos complejos de integrinas CD11A/CD18 y CD11B/CD18, sin embargo, el primer contacto con el epitelio se produce de forma casi exclusiva por el dímero CD11B/CD18 en intestino y pulmón (Parkos et al., 1991). La identidad de los ligandos de este dímero en el epitelio basolateral todavía no se conoce con detalle, aunque su demostrada afinidad por la heparina hace pensar que los residuos de heparán sulfato de algunos proteoglicanos epiteliales podrían funcionar como sustrato adhesivo para los neutrófilos. Por otro lado, estudios realizados *in vitro* con células intestinales han demostrado que la sola interacción del neutrófilo con el epitelio basolateral produce cambios en la conformación del epitelio, incrementando su permeabilidad con el fin de facilitar la migración transepitelial de los neutrófilos (Chin et al., 2008).

3. Cruce del epitelio a través de las uniones intercelulares

Tras la unión a la zona basal del epitelio, los neutrófilos se mueven a través de los espacios intercelulares, donde para llegar a la parte apical deben sortear las uniones intercelulares que forman los puntos de contacto entre las membranas plasmáticas de las células. Un ejemplo de estas uniones son los desmosomas, complejos formados por desmogleínas y cadherinas unidas a filamentos de keratina (Bornslaeger et al., 1996). Otro tipo de uniones celulares son las uniones estrechas, compuestas por proteínas transmembrana que sellan los espacios intercelulares para evitar la difusión de ciertas moléculas entre las células y por tanto polarizan la parte basal y apical del epitelio. Estas uniones que se hallan cerca de la parte apical del epitelio son las últimas que se encuentran los neutrófilos. Aunque su participación en este proceso todavía no está muy clara se ha visto que la TEpM de los neutrófilos a través del intestino puede modular la expresión de estas uniones, alterando así la estabilidad del epitelio (Sumagin and Parkos, 2015). Además de las uniones celulares, existen

otras moléculas de adhesión que participan en la migración de los neutrófilos entre los espacios intercelulares. Una de las más conocidas es la inmunoglobulina CD47. La implicación de CD47 en la TEpM de los neutrófilos fue descrita por primera vez en 1996, cuando se demostró que la incubación de las células intestinales humanas (T84) con el anticuerpo bloqueante de CD47 (C5/D5) inhibía la trans migración de neutrófilos *in vitro* (Parkos et al., 1996). Años más tarde, se descubrió que este proceso tiene lugar específicamente a través de la interacción del CD47 epitelial con su ligando SIRP α expresado en el neutrófilo (Liu et al., 2002). Además de su papel en la migración de neutrófilos, la interacción de CD47 y SIRP α está implicada en otros procesos inmunes como la fagocitosis mediada por macrófagos, la activación de células dendríticas o la proliferación de células T (Matozaki et al., 2009).

4. *Detachment o liberación celular al lumen*

Tras cruzar las uniones intercelulares, el neutrófilo todavía debe realizar el último paso: desprenderse del epitelio apical y saltar al lumen donde se encuentra el estímulo de llamada. Este fenómeno se ha descrito con más detalle en el epitelio intestinal y se denomina *detachment* (desprendimiento en inglés). La zona apical del epitelio expresa proteínas durante la inflamación que regulan la presencia de neutrófilos y contribuyen tanto a su retención como a su liberación al lumen al igual que ocurre en la parte basal. Un ejemplo es la proteína ICAM-1 (CD54), la cual favorece la adhesión de los neutrófilos a la parte apical del epitelio en condiciones inflamatorias mediante la unión a CD11B/CD18 (Sumagin and Parkos, 2015). Por el contrario, existen otros mediadores que favorecen el *detachment* de los neutrófilos como CD55 y CD44. CD55 (DAF) es una glicoproteína descrita por primera vez en el endotelio y cuya función se asoció a la inhibición de la lisis del sistema de complemento (Lublin and Atkinson, 1989). Sin embargo, el grupo del Dr. Colgan descubrió su participación en el *detachment* de neutrófilos humanos en la mucosa intestinal (Lawrence et al., 2003), justificando así su expresión en el epitelio. Igualmente, la molécula de adhesión CD44 también se ha visto involucrada en el *detachment*. Esta función se describió por primera vez en 2010

mediante un muestreo de anticuerpos bloqueantes sobre la TEPM de neutrófilos en células intestinales humanas *in vitro* (Brazil et al., 2010). En este trabajo se identificó GM35 como un anticuerpo bloqueante del proceso de *detachment* que reconoce a la variante de *splicing* 6 de CD44 (CD44v6) expresada en la parte apical del epitelio inflamado. Además se observó cómo el proceso de *detachment* a través de CD44v6 conllevaba, no sólo la liberación del neutrófilo, sino también el corte del dominio extracelular de CD44v6 al lumen intestinal. Años más tarde, un estudio más profundo determinó que la unión de los neutrófilos a CD44v6 está medida por el residuo glicosilado Sialyl-Lewis A (sLe^a), sintetizado por la enzima Fucosyltransferasa 3 (Fut3) ante una situación inflamatoria (Brazil et al., 2013). Experimentos *in vitro* han demostrado que CD44 puede interaccionar con lamininas, ácido hialurónico y fibrinas, sin embargo, el ligando de esta molécula en el *detachment* todavía se desconoce, aunque su capacidad para reclutar metaloproteasas en la superficie celular ha sugerido que MMP7 o MMP9 podrían intervenir en este proceso (Yu and Stamenkovic, 1999). Además, CD44 también está involucrado en otras funciones como la TEM (Hidalgo et al., 2007), la activación de linfocitos (Haynes et al., 1989) la hematopoyesis o la progresión tumoral (Schmits et al., 1997).

1.4. Eliminación de patógenos

Los neutrófilos son los leucocitos más abundantes de la sangre (50-70% en humanos y 10% en ratón) y son fundamentales para la defensa frente a bacterias y hongos. En la fase inicial de la respuesta antimicrobiana un gran número de neutrófilos son reclutados al foco de infección. Una vez allí, pueden ejercer diferentes líneas de acción antimicrobiana como la liberación de gránulos, la fagocitosis o la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) (Figura 3).

1.4.1. Desgranulación o liberación de gránulos

Los neutrófilos se caracterizan por poseer gran variedad de gránulos compuestos de enzimas líticas y factores citotóxicos que son fundamentales para su lucha contra los microorganismos patógenos (Benarafa and Simon, 2017). Estos gránulos se dividen en tres grupos en base a su contenido proteico, su generación en el tiempo y su morfología observada por microscopía electrónica (Baggiolini et al., 1985): los gránulos primarios o azurófilos que se generan en el estadio de de promielocito, como la enzima MPO (mieloperoxidasa), los gránulos secundarios o específicos, generados posteriormente en la etapa de mielocito como las LYZ (lisozimas) o LTF (lactoferrinas) y por último los gránulos terciarios, producidos en la etapa de metamielocitos o células bandeadas, cuya enzima principal es la MMP9 (o gelatinasa b). Además de estos tres tipos de gránulos, los neutrófilos poseen vesículas secretoras de origen endocítico que contienen moléculas inflamatorias, las cuales pueden movilizarse a la membrana plasmática del neutrófilo potenciando la respuesta antimicrobiana (Borregaard et al., 1992). El neutrófilo puede liberar sus gránulos en el interior del fagosoma, a través de un mecanismo dependiente de calcio, o al exterior celular (Lacy, 2006). Además de la eliminación directa del patógeno, la desgranulación comprende variedad de funciones al comienzo de la inflamación aguda como: el reclutamiento de más neutrófilos al foco inflamatorio, la llamada de la respuesta adaptativa o la regulación de la supervivencia del propio neutrófilo (Benarafa and Simon, 2017).

1.4.2. Fagocitosis

La fagocitosis es el proceso por el cual una célula puede engullir o ingerir partículas más grandes de 0,5 μm a través de vacuolas formadas en su membrana llamadas fagosomas. Es un mecanismo esencial para las respuestas inmunes debido a su papel en la eliminación de patógenos, sin embargo, también es importante para mantener la homeostasis tisular y la remodelación celular (Freeman and Grinstein, 2014). Los neutrófilos son los fagocitos más rápidos y potentes, siendo capaces de fagocitar un alto número de bacterias en varios minutos (Kruger et al., 2015). El proceso de fagocitosis comienza con el reconocimiento de los PAMPs por parte de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs de sus siglas en inglés) del propio fagocito. Un ejemplo muy conocido de esta interacción es la que se produce entre los β -glucanos de *C. albicans* y el receptor CLEC7A (lectina tipo C, Dectin1) de los neutrófilos (Li et al., 2011). Tras el reconocimiento, tiene lugar la internalización del patógeno, un proceso mediado a través de lípidos de membrana y reorganizaciones del citoesqueleto que concluye con la formación del fagosoma. A continuación, los gránulos primarios y secundarios se funden con el fagosoma descargando sus contenidos antimicrobianos, que junto con especies reactivas de oxígenos (ROS de sus siglas en inglés) provenientes de enzimas oxidantes como NADPH o MPO eliminan al patógeno.

1.4.3. Formación de trampas extracelulares de neutrófilos: NETs

Pese a su gran potencial fagocítico y la elevada toxicidad de sus gránulos, los neutrófilos se encuentran con dificultades para acabar con ciertos patógenos, que por su gran tamaño o agresividad escapan de estos mecanismos. En estos casos utilizan una estrategia más potente: la formación de NETs. Las NETs se definen como mallas de ADN unidas a gránulos que se liberan al medio extracelular por los neutrófilos activados que inmovilizan y degradan bacterias y hongos (Brinkmann et al., 2004). Desde su descubrimiento en 2004, multitud de estudios han revelado su relación con

diferentes patologías como enfermedades autoinmunes (Delgado-Rizo et al., 2017) o trastornos de fertilidad (Hahn et al., 2012). Aunque en un principio se pensó que la formación de NETs siempre conllevaba el suicidio del neutrófilo, en 2012 se descubrió que en ciertas condiciones los neutrófilos realizan una NETosis vital, en la que el ADN se libera a través de vesículas endocíticas de formas más rápida y sin necesidad de lisar la membrana celular como ocurre en la NETosis suicida (Yipp et al., 2012). Las razones por las cuales un neutrófilo decide hacer NETosis todavía se desconocen con detalle, sin embargo, ensayos *in vivo* realizados con un hongo dimórfico como *Candida albicans* han demostrado que los neutrófilos son capaces de medir el tamaño de los hongos. Así, si el tamaño es reducido como en el caso de la forma conidia, el neutrófilo utiliza la fagocitosis, sin embargo, si el tamaño es mucho mayor como ocurre en la forma hifa, la fagocitosis se inhibe y se desencadena la formación de NETs, por la traslocación de la enzima elastasa al núcleo celular y la posterior descondensación de la cromatina (Branzk et al., 2014).

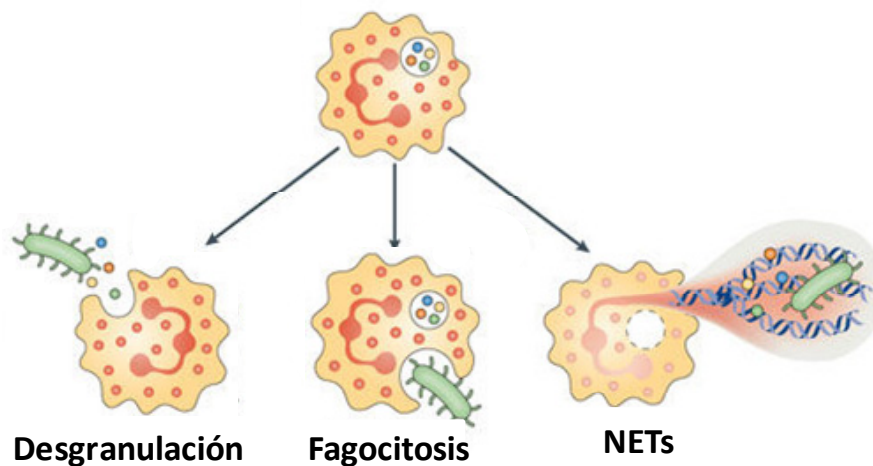


Figura 3: Funciones antimicrobianas de los neutrófilos: Una vez en el foco de infección, los neutrófilos pueden eliminar a los patógenos mediante diferentes mecanismos como la liberación de gránulos, la fagocitosis o la formación de NETs. Imagen modificada de (Kolaczkowska and Kubes, 2013).

2. El tracto reproductor femenino

El tracto reproductor femenino (TRF) es el órgano responsable del mantenimiento de la especie y tiene que permitir un ambiente favorable para la reproducción, facilitando el paso de los espermatozoides (alogénicos) y manteniendo el feto (semialogénico), sin comprometer la defensa frente a posibles patógenos oportunistas o de transmisión sexual (Quayle, 2002). El TRF está compuesto por varias áreas anatómicas que padecen cambios morfológicos a lo largo del ciclo ovárico y se dividen en dos zonas en base a su estructura y función (Figura 4): el **TRF superior** es estéril, engloba el oviducto, el útero y el endocérvix, y su función es albergar las principales funciones reproductoras como la fecundación, la implantación y el desarrollo del feto. Por otro lado, **el TRF inferior** está compuesto por el ectocérvix, el fórnix y la vagina, y no es estéril ya que se encuentra en constante contacto con el exterior. Su función principal es el transporte de espermatozoides hasta el TRF superior y proteger a la mucosa de posibles patógenos a la vez que permite la presencia de microbiota no perjudicial (Wira et al., 2015).

El TRF superior e inferior también poseen diferencias anatómicas acordes con sus funciones. El TRF superior presenta un epitelio simple columnar, mientras que el TRF inferior está cubierto por un epitelio estratificado escamoso compuesto por capas de células epiteliales basales, intermedias y superficiales. El grosor del epitelio escamoso varía a lo largo del ciclo reproductor en ratones, sin embargo en humanos se mantiene estable. La integridad del epitelio depende de las uniones estrechas que se encuentran entre las células epiteliales, las cuales regulan el paso de moléculas entre el lumen y el tejido interior (Wira et al., 2005a). En el TRF superior estas uniones recorren todo el epitelio mientras que en el TRF inferior sólo se encuentran en la capa basal, por tanto, la parte superficial del epitelio tiene una integridad mucho menor que le hace más susceptible a los patógenos (Blaskewiz 2011).

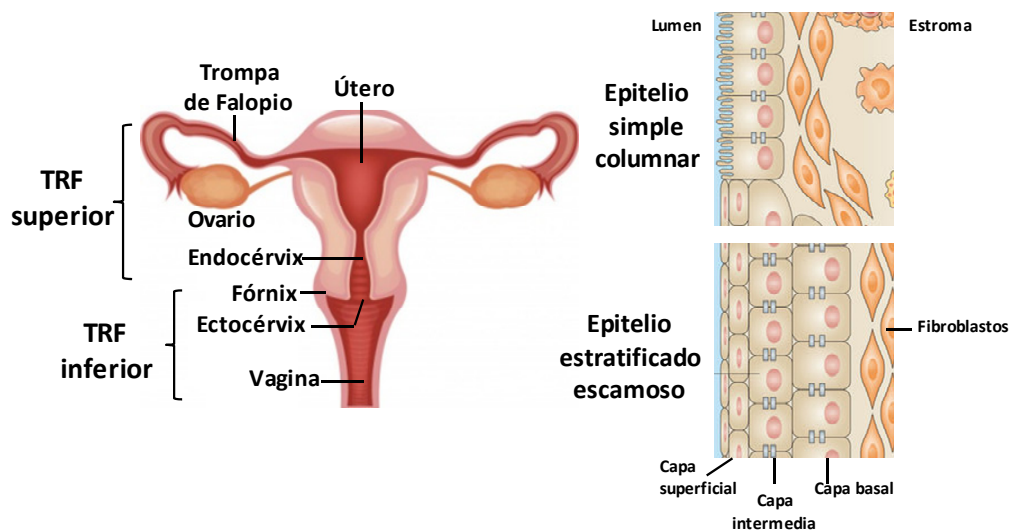


Figura 4: Esquema anatómico e histológico del sistema reproductor femenino humano. El aparato reproductor femenino se divide en dos partes: el TRF superior que consta de ovarios, trompas de Falopio, útero y endocervix y el TRF inferior formado por el fórnix, el ectocervix y la vagina. Además el TRF superior tiene un epitelio simple columnar mientras que el TRF inferior posee un epitelio estratificado escamoso. Ilustración modificada de (Wira et al., 2015).

2.1 Ciclo reproductor femenino

El ciclo sexual femenino es el proceso por el cual se desarrollan los gametos femeninos a la vez que se prepara al útero para un posible embarazo. En él se dan dos ciclos sincronizados en el tiempo: el **ciclo ovárico**, dividido en la fase folicular y la fase lútea, que consiste en la maduración de un folículo, la expulsión del ovocito y la generación del cuerpo lúteo y el **ciclo endometrial**, dividido en la fase proliferativa y secretora, que conlleva cambios morfológicos en el útero que lo adecúan para recibir al ovocito en el caso de que sea fecundado. Si la implantación no se produce, la lámina funcional del endometrio se desprende produciendo el sangrado menstrual y el comienzo de un nuevo ciclo. Este sangrado solo ocurre en algunos primates (humano, gorilas, chimpancés etc), la musaraña elefante y los murciélagos de cola libre y nariz de hoja. Por el contrario, la mayoría de los mamíferos tienen un ciclo reproductor sin menstruación o **ciclo estral** que se divide en 4 fases: proestro, estro, metaestro y diestro. Las diferencias entre ambos ciclos se muestran en la tabla 1.

	CICLO MENSTRUAL	CICLO ESTRAL
Especies	Algunos mamíferos	La mayoría de los mamíferos
Endometrio	Se desprende: menstruación	Se reabsorbe: no hay menstruación
Duración	Humanos: 28 días	Ratones: 4-6 días
Receptividad sexual	Cualquier momento del ciclo	Sólo durante el estro

Tabla 1: Principales diferencias entre el ciclo menstrual y el ciclo estral.

2.1.1 Ciclo hormonal

A pesar de estas diferencias, las variaciones hormonales en los dos casos son muy parecidas (Figura 5). Ambos ciclos están finamente regulados por un conjunto de hormonas a través del **eje hipotálamo-hipófiso-ovárico** por un sistema de retroalimentación (Tresguerres, 2005). La estimulación de las hormonas sexuales femeninas comienza con la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GNRH, GNRH1) en el hipotálamo. Esta hormona llega a la adenohipófisis por la circulación portal y estimula la síntesis de las hormonas gonadotropinas que son la hormona luteinizante (LHCGR, LH) y la hormona folículo estimulante (FSHB, FSH) en las células gonadotropas de la adenohipófisis. La LH y la FSH comienzan a sintetizarse en la fase folicular del ciclo, llegando a su punto máximo durante la ovulación y realizan su acción sobre el ovario: por un lado la FSH estimula el crecimiento de los folículos ováricos y es la responsable de la producción de 17β -estradiol (E2) durante la fase folicular. Por otro lado la LH provoca la rotura del folículo y la liberación del óvulo, induce la formación del cuerpo lúteo y su mantenimiento, con la producción de E2 y progesterona (P4), que a su vez inhiben la producción de LH y FSH durante la fase lútea.

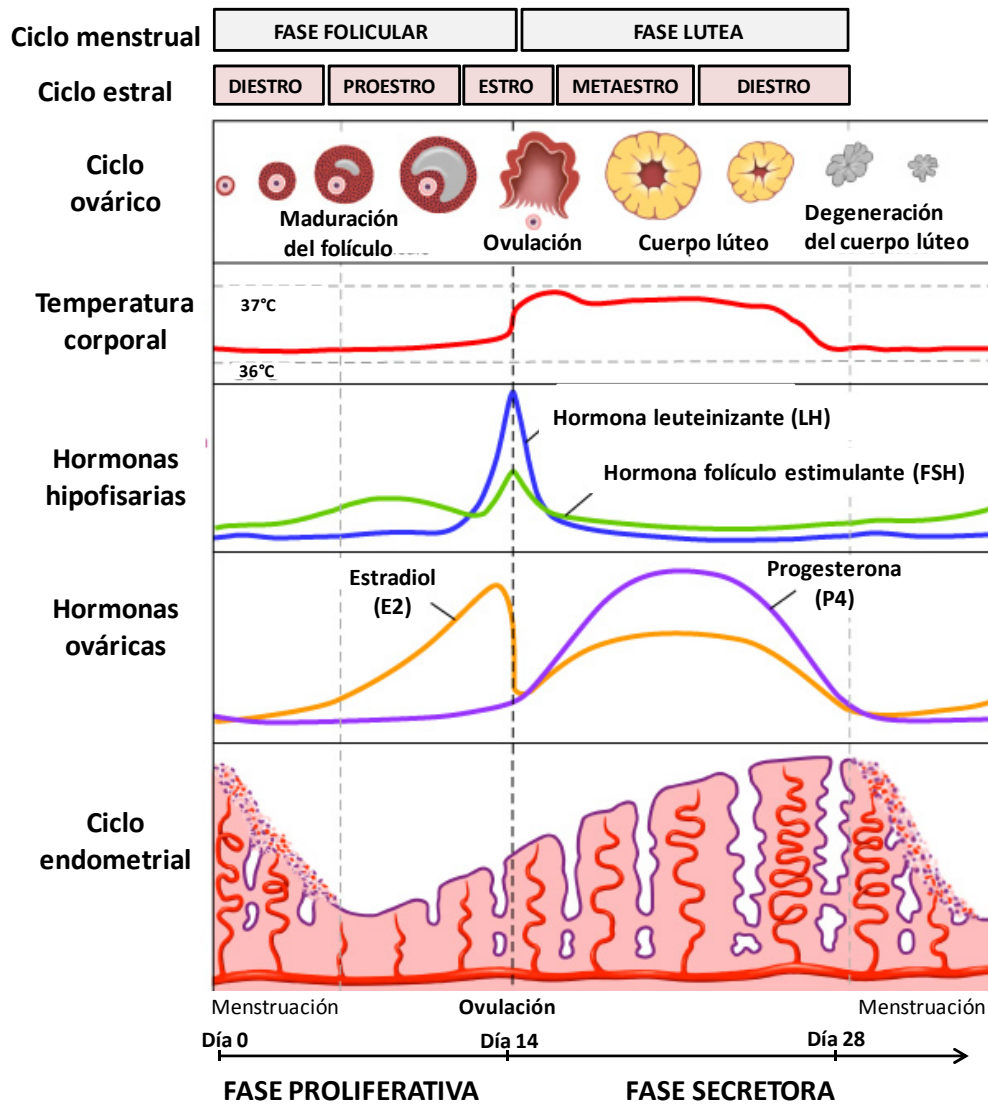


Figura 5: Cascada de eventos y variaciones hormonales del ciclo reproductor femenino. El ciclo reproductor femenino se divide en base a los eventos que ocurren en el ovario y el útero. El ciclo ovárico consta de dos fases: folicular, donde se desarrolla un nuevo folículo, y lútea, donde se produce la producción y posterior degeneración del cuerpo lúteo. El ciclo endometrial, a su vez, consta de dos fases: la fase proliferativa donde crece el endometrio necesario para la posible implantación, y la fase secretora en la que el endometrio se desprende si no se ha producido la fecundación. Además las hormonas del eje hipófisis-ovario (FSH y LH) varían a lo largo del ciclo, experimentando un pico durante la ovulación. El pico de E2 sucede durante la fase preovulatoria, mientras que el pico de P4 ocurre durante la fase lútea acompañado de una concentración moderada de E2. La disminución de E2 y P4 provoca el inicio de la menstruación al final de la fase lútea. Ilustración modificada de (Marieb, 2000).

1. Hormonas ováricas: P4 y E2.

Las hormonas producidas en los ovarios son principalmente E2 y P4, aunque también se producen pequeñas cantidades de estrona, androstendiona y testosterona. Tanto el E2 como la P4 son hormonas esteroideas de naturaleza liposoluble que se forman a partir del colesterol. La **P4** es un esteroide del grupo de las progestágenos que se genera a partir de la pregnolona al comienzo de la cadena de biosíntesis esteroidea. Los niveles plasmáticos de la P4 durante la fase folicular en humanos son menores de 0,5 ng/ml. A partir de la ovulación, el cuerpo lúteo es el productor principal de esta hormona, que puede llegar a 5-20 ng/ml durante la fase lútea (Mao et al., 2005). La P4 es la encargada de inhibir la maduración de otro folículo, espesar el moco cervical para impedir la entrada al útero de agentes extraños (espermatozoides, patógenos, etc.) e incrementar la temperatura corporal. Sin embargo, su función principal es la generación de todos los cambios morfológicos en el útero para albergar al ovocito en el caso de que se produzca la implantación. Si esto no ocurre el cuerpo lúteo se degrada, reduciéndose así la concentración de P4 al final de la fase lútea o diestro, comenzando un nuevo ciclo. Si por el contrario se produce la fecundación, en humanos el cuerpo lúteo seguirá produciendo P4 hasta la semana 10 del embarazo, en la que será sustituido por la placenta.

El **E2** es el estrógeno más potente secretado por el ovario. Se produce a través de la conversión de andrógenos a estrógenos por la enzima aromatasa en la última etapa de la biosíntesis esteroidea. Las hormonas gonadotropinas fomentan la producción creciente de E2 durante la fase folicular del ciclo, que llega a su punto máximo en plasma en la etapa preovulatoria, alcanzando los 100-300 pg/ml. Durante la ovulación, la concentración de E2 cae drásticamente y vuelve a restaurarse moderadamente a lo largo de la fase lútea (25-35 pg/ml), utilizando como fuente el cuerpo lúteo (Mao et al., 2005; Paharkova-Vatchkova et al., 2004). Finalmente, la degradación del cuerpo lúteo provoca la disminución del E2 y con ello el final del ciclo. Entre las funciones reproductoras del E2 destaca el crecimiento del endometrio y el mantenimiento de los ovocitos

durante la fase proliferativa, como también el desarrollo de los caracteres sexuales o el mantenimiento del embarazo. Existen otras fuentes de E2 fuera del sistema reproductor como el tejido adiposo, el cerebro o las paredes arteriales. Además, el E2 ejerce importantes funciones extra reproductoras como la remodelación ósea, la producción de proteínas hepáticas o la protección neuronal frente a agentes oxidantes (Behl et al., 1995; Borjesson et al., 2013).

2. Receptores de P4 y E2

Las hormonas esteroideas son capaces de entrar a las células de forma libre difundiendo en la membrana plasmática debido a su naturaleza lipofílica. Dentro de la célula realizan sus funciones mediante la unión a sus receptores, principalmente nucleares, que funcionan regulando la transcripción de genes. Aunque en su descubrimiento se pensó que los receptores se encontraban en el citoplasma y translocaban al núcleo al interactuar con su ligando (Gorski et al., 1969), hoy en día se acepta que la mayoría de estos receptores se encuentran en los núcleos de forma inactiva. La unión de las hormonas con sus receptores induce cambios conformacionales en su estructura terciaria que facilitan la unión al ADN y su actuación como factores de transcripción, regulando la activación o la inhibición de la expresión de genes (Lasarte et al., 2013b; Scarpin et al., 2009).

El receptor nuclear de P4 (PR) tiene dos isotipos (PR-A y PR-B) que provienen del mismo gen y se diferencian en 165 aminoácidos en su zona N-terminal de la isoforma B que determina su función (Conneely et al., 1989; Kastner et al., 1990). Además, en 2003 se describió el receptor de membrana (PGRMC) en humano y ratón del cual hoy se conocen hasta cinco subtipos (Zhu et al., 2003). Los PGRs pueden interactuar entre ellos o con otros receptores esteroideos. Así, se ha visto que PR-A es capaz de inhibir a PR-B y al receptor de estradiol (ESR1), lo que justifica su actividad antiestrogénica. Los PR se expresan en diferentes órganos además del sistema reproductor como la médula ósea, el sistema nervioso o el hueso (Graham and Clarke, 1997).

El E2 tiene dos tipos de receptores nucleares, ESR1 (ER α) y ESR2 (ER β) que comparten cierta analogía pero provienen de genes distintos y se distribuyen de forma heterogénea (Dechering et al., 2000). Varios estudios han demostrado que ESR1 está altamente expresado en el epitelio y los fibroblastos vaginales, mientras que se han encontrado baja expresión o la completa ausencia de ESR2 (Li et al., 2016b). En el modelo de ratón deficiente para este receptor (*Esr1*^{-/-}) se han visto anulados la proliferación del epitelio vaginal y su cornificación epitelial durante el estro, sugiriendo que este receptor es esencial en este aspecto (Cooke et al., 1998). Además de los receptores nucleares, el E2 también puede interactuar con el receptor de E2 de membrana acoplado a proteína G (GPER1), descrito en 1997 en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 (Carmeci et al., 1997). Este receptor realiza su acción a través de procesos no transcripcionales, por tanto es capaz de llevar a cabo efectos más rápidos. Por último, se ha visto que el E2 también puede ejercer una acción antioxidante a nivel neuronal sin necesidad de receptor (Jie Cui 2013). Los receptores nucleares de E2 se encuentran expresados en multitud de tejidos además del sistema reproductor femenino como el hipotálamo, el intestino, el riñón, el sistema inmune o el hueso (Kuiper et al., 1997).

2.1.2 Ciclo histológico vaginal

Durante el ciclo reproductor femenino existen cambios morfológicos en el epitelio y el contenido del lumen vaginal influenciados por las concentraciones circulantes de las hormonas sexuales (Figura 6). Esta observación fue descrita por primera vez en 1917 por el médico George Papanicolaou, quien correlacionó las variaciones en el patrón citológico e histológico de las muestras vaginales con los eventos del ovario durante el ciclo reproductor en cobayas (Stockard and Papanicolaou, 1917). Más tarde corroboró estos datos en el ciclo menstrual humano analizando frotis vaginales en diferentes estados (fértil, embarazada, postmenopáusicas...etc) (Diamantis and Androutsos, 2008). Aunque el ciclo estral y menstrual difiere en algunos aspectos, nos centraremos

en explicar la histología vaginal del ciclo estral mürido ya que es el modelo experimental que hemos utilizado en este trabajo.

Al comienzo del **proestro** (15-20h) se observa un epitelio estratificado escamoso, compuesto por varias capas de células epiteliales nucleadas sin infiltración de neutrófilos (Schaefer et al., 2014). Conforme va avanzando esta fase, el epitelio prolifera por la acción directa del E2, llegando a duplicar el número de capas durante el **estro** (15-20h). Además, la parte apical del epitelio comienza a cornificarse, iniciando la formación del estrato córneo, capa de células muertas y planas totalmente keratinizadas (Terui, 2000). Esta remodelación tisular está regulada por señales producidas por los fibroblastos del estroma vaginal en respuesta a E2 a través del ESR1 (Buchanan et al., 1998; Nelson et al., 1991). Además, el E2 también induce la secreción de moco y depósitos de glucógeno en la zona apical del epitelio (Farage and Maibach, 2006). Durante el estro se detectan gran cantidad de células epiteliales piramidales en el lumen vaginal que se descaman por el proceso de keratinización. A continuación, durante el **metaestro** (15-20h) la concentración de E2 baja y se reduce el número de capas de células en el epitelio. Comienza la infiltración de neutrófilos al epitelio (Schaefer et al., 2014) y lumen vaginal (Sonoda et al., 1998), que se caracteriza por la presencia de células epiteliales keratinizadas y neutrófilos. Durante el **diestro** (2-3 días) el epitelio es todavía más fino, las células epiteliales adquieren una morfología cúbica nucleada y los neutrófilos son las células más abundantes en el lumen vaginal. Al final del diestro los niveles de E2 comienzan a aumentar de nuevo, el epitelio empieza a proliferar y desaparecen los leucocitos del lumen vaginal con el comienzo de un nuevo proestro.

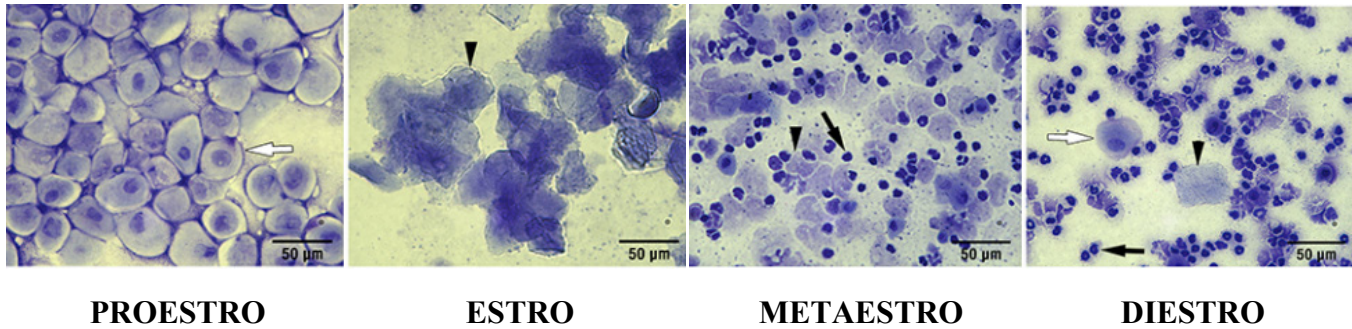


Figura 6: Fotografías de citología vaginal representando cada fase del ciclo estral. El proestro está caracterizado por la infiltración de células epiteliales nucleadas (flecha blanca). El estro contiene células epiteliales cornificadas sin núcleo (triángulo negro), las cuales perduran durante el metaestro con infiltración de polimorfonucleares (flecha negra). Durante el diestro se encuentran los tres tipos celulares con abundancia de polimorfonucleares. Imágenes modificadas de (McLean et al., 2012).

2.2 Sistema inmune en el tracto reproductor femenino

El sistema inmune del TRF tiene que mantener un ambiente favorable para la reproducción sin comprometer la defensa frente a posibles microorganismos patógenos (Quayle, 2002). Por tanto, debe generar tolerancia al espermatozoide, el embrión y el desarrollo del feto sin comprometer la defensa frente a microorganismos oportunistas, patógenos o de transmisión sexual. Actualmente se piensa que las hormonas sexuales femeninas son las encargadas de coordinar los eventos reproductores con la defensa (Wira et al., 2015). Se ha observado que la microbiota vaginal aumenta progresivamente en la fase folicular, llegando a su punto máximo durante la ovulación, coincidiendo con el pico de E2, y disminuye durante la fase lútea a la vez que aumenta la P4 (Eschenbach et al., 2000; Gajer et al., 2012). Además, se ha observado que el tratamiento con E2 aumenta la inefectividad contra *C. albicans* (Fidel et al., 2000; Relloso et al., 2012b), virus simple del herpes genital (Walker et al., 1997), *Chlamydia trachomatis* (Kaushic et al., 2000), *Toxoplasma gondii* (Walker et al., 1997), y *Listeria monocytogenes* (Pung et al., 1985) entre otros. También reduce la capacidad de presentar antígenos de las células dendríticas (Lasarte et al., 2013a; Relloso et al., 2012a) y las células epiteliales vaginales (Wira et al., 2005b). Estos cambios sugieren un estado de permisividad inmune durante la fase ovulatoria (alta concentración E2), que permitiría la

supervivencia de los espermatozoides y su transporte al útero, y posteriormente una restauración del sistema inmune durante la fase lútea (alta concentración P4), que ayudaría a combatir las posibles infecciones ocasionadas durante la ventana de vulnerabilidad de la fase ovulatoria (Dunbar et al., 2012; Wira and Fahey, 2008; Wira et al., 2015).

2.2.1. Células epiteliales

Las células epiteliales son parte del sistema inmune de la mucosa y colaboran en la protección contra los microorganismos a lo largo del TRF (Wira et al., 2005a). Además de presentar una barrera física, el epitelio del TRF produce moléculas antimicrobianas, expresa TLRs capaces de detectar señales de peligro, secreta citoquinas proinflamatorias (Wira et al., 2005a) e incluso presenta antígenos (Wira et al., 2002). Todas estas funciones están reguladas por las hormonas sexuales para coordinarlas con el ciclo reproductor. Por ejemplo: 1.- el E2 es capaz de disminuir la resistencia del epitelio (TER) cervicovaginal, aumentando su permeabilidad en las mujeres premenopáusicas (Gorodeski, 2007), 2.- durante la fase periovulatoria la producción de proteínas antimicrobianas como DEFA1 y DEFB1 (defensina α y β) o PI3 (elafina) disminuye en el TRF inferior para facilitar la supervivencia de los espermatozoides depositados en la vagina y aumenta en el TRF superior para prevenir el ascenso de posibles patógenos. 3.- la producción de proteínas proinflamatorias como IL6 o IL8 disminuye en ambas zonas (Hickey et al., 2013b). 4.- en el TRF humano se ha descrito la expresión de los TLR1-9, que se distribuyen de forma asimétrica: el TLR2 y TLR4 (detección de bacterias) se expresan más en el útero mientras que TLR7, TLR8 y TLR9 se encuentran por igual en ambas zonas y 5.- el E2 también modifica la expresión de TLR2 y TLR6 en la vagina ante una infección con *C. albicans* (Wagner and Johnson, 2012).

2.2.2 Células del sistema inmune

La distribución de leucocitos en el TRF ha generado bastantes discrepancias debido a las variabilidades entre los ciclos ováricos, los métodos analíticos y los anticuerpos utilizados para determinar las poblaciones inmunes (Lee et al., 2015). En humanos los leucocitos ocupan entre un 6-20% de células en el TRF, siendo más abundantes en el TRF superior. Los linfocitos T son las células inmunes mayoritarias en todo el TRF, representando un 30-60%. Al contrario que ocurre en la sangre, el número de CD8 es mayor que el de CD4 (Givan et al., 1997). Aunque existen ligeras variaciones entre las zonas anatómicas, la segunda población más importante son las células NK, seguidas de los macrófagos, granulocitos, células dendríticas y una población mínima de linfocitos B. Mientras que en el TRF inferior estas poblaciones se mantienen estables a lo largo del ciclo reproductor (Patton et al., 2000), en el endometrio, al final de la fase secretora, aumenta la proporción de mastocitos, macrófagos y neutrófilos respecto a los linfocitos debido al contexto inflamatorio de la menstruación (Salamonsen and Woolley, 1999). En roedores no se conocen tantos detalles, aunque estudios inmunohistológicos en ratas han revelado que: 1.- al contrario que en los humanos, el TRF inferior presenta más cantidad de leucocitos que en el TRF superior. 2.- las poblaciones de células del sistema inmune varían a lo largo del ciclo reproductor, siendo más abundantes durante el estro en el útero y en el diestro en la vagina, sugiriendo un mecanismo de protección inmune tras el posible apareamiento producido durante el estro (Kaushic et al., 1998).

1. Ciclo de neutrófilos en el lumen vaginal

En 1917 George Papanicolaou describió por primera vez los cambios citológicos de la vagina a lo largo del ciclo reproductor (Diamantis and Androutsos, 2008). Dentro de estos cambios observó la presencia de leucocitos en el lumen vaginal durante el metaestro y el diestro, y una desaparición durante el proestro y estro (ovulación) (Papadopoulou et al., 2015). Posteriormente, por técnicas inmunohistoquímicas, se observó que estos leucocitos que se infiltraban en el tejido vaginal durante

el metaestro tenían aspecto polimorfonuclear y se correspondían con los neutrófilos (Nellor, 1966). Actualmente la presencia de los neutrófilos durante el ciclo vaginal no se conoce con detalle, por ejemplo, el mecanismo molecular que dirige la migración de los neutrófilos al lumen vaginal apenas está documentado. Se ha descrito la presencia de numerosas citoquinas y quimioquinas en el lavado vaginal (Lindqvist et al., 2009) que podrían intervenir en la atracción de neutrófilos hacia el lumen como CXCL1(KC) (Hickey et al., 2013a, b), y CXCL2 (MIP2), la cual parece tener un papel importante en la salida de neutrófilos a la vagina en ratonas durante el metaestro (Sonoda et al., 1998).

2. Receptores de P4 y E2 sobre el sistema inmune

Las hembras tienen mayor respuesta inmune que los machos. Así, las mujeres padecen menos infecciones, eliminan más rápido los patógenos y responden mejor a las vacunas, sin embargo, sufren más enfermedades autoinmunes (Bouman et al., 2005). Además, prácticamente todas las células inmunes expresan los receptores de E2 y P4 (Chao, 1996). Esto sugiere que las hormonas sexuales podrían jugar un papel en la regulación de la inmunidad. Los neutrófilos, las células protagonistas de este trabajo, expresan los receptores nucleares ESR1, ESR2 y PGR en sangre y médula ósea (Lasarte et al., 2016). Recientemente, también se ha descubierto la expresión de GPER en neutrófilos humanos (Flores, 2015). Probablemente por estos motivos se han descrito una gran variedad de efectos hormonales sobre los neutrófilos: 1.- variación del número de neutrófilos en sangre y vagina durante el ciclo ovárico (Bouman et al., 2001), 2.- en sus funciones antimicrobianas como la quimiotaxis (Miyagi et al., 1992), 3.-en la generación de NETs (Giaglis et al., 2016) o 4.- su capacidad candidacidal (Lasarte et al., 2016). Existe bastante discrepancia respecto al efecto de ambas hormonas en cada una de las funciones, seguramente debido a que se suelen utilizar neutrófilos de sangre o de médula ósea en vez de obtenerlos de los tejidos y a las diferentes concentraciones de hormonas en los ensayos *ex vivo*, ya que el E2 y P4 pueden tener actividad tanto antiinflamatoria como proinflamatoria dependiendo de la concentración utilizada. A pesar de ello, el

E2 parece tener un efecto antiinflamatorio en concentraciones fisiológicas de la ovulación (10^{-10} M), mientras que la P4 puede tener efectos inmunoactivadores durante la fase lútea (10^{-8} M) o por el contrario inmunosupresores durante el embarazo (10^{-7} M).

2.2.3. Respuesta frente a infecciones: *Candida albicans*

Las candidiasis superficiales mucocutáneas (oral, vaginal, esofágica, etc.) son muy comunes, generan muchas consultas médicas, pérdida de productividad y pueden producir complicaciones importantes como esterilidad, alteraciones del embarazo, transmisión de virus, etc. *C. albicans* es la causante principal de la candidiasis vulvovaginal (VVC, de sus siglas en inglés), la cual padecerán 3 de cada 4 mujeres al menos una vez en su vida (entre el 5-8% de forma recurrente). Entre un 20-50% de las mujeres tienen *Candida spp* en su mucosa vaginal de forma asintomática. Aunque no se sabe la causa precisa que genera el desencadenamiento de la infección y sus síntomas, existen muchos factores que predisponen su desarrollo como: un estado de inmunosupresión, cambios hormonales, la toma de antibióticos, anticonceptivos, tratamiento hormonal sustitutorio o diabetes entre otros (Ilkit and Guzel, 2011; Naglik et al., 2014).

Debido a la importancia de la VVC en la salud femenina, se han realizado muchos estudios para entender el papel del sistema inmune en la infección de *C. albicans* (Romani, 2011). Actualmente se conocen variedad de PRRs expresados en el epitelio vaginal o células del sistema inmune innato que son capaces de reconocer proteoglicanos de la pared de *C. albicans* como TLR2/4, CLEC7A (Dectin-1), CLEC6A (Dectin-2), MRC1 (CD206, Receptor de manosa) o CD209 (DC-SIGN) (Netea et al., 2015). Aunque la relevancia de algunos de ellos todavía no está muy clara, se ha descrito que defectos en MRC1 o en CARD9, proteína adaptadora de la vía de CLEC7A, están asociados a susceptibilidad ante infecciones de *C. albicans* (Netea et al., 2015). La interacción del hongo con estos PRRs desemboca en la producción de alarminas S100A8 y S100A9 por parte del epitelio, proteínas de unión al calcio con actividad antimicrobiana que parecen ser esenciales en la

defensa contra *C. albicans* (Yano et al., 2014). La respuesta Th17 es fundamental para unir la respuesta innata y adaptativa, y ha demostrado ser importante en la candidiasis sistémica y vaginal (Lasarte et al., 2013a; Romani, 2011). Por el contrario, el papel de los neutrófilos en la VVC ha generado mucha controversia. La depleción de estas células con anticuerpos ha demostrado que su presencia en el lumen vaginal es irrelevante en la resolución de la infección (Peters et al., 2014; Yano et al., 2012), lo que revela una protección irrelevante de los neutrófilos. En contraposición, otros estudios más recientes han revelado la importancia de la respuesta inmune innata en la regulación de la VVC y el papel fundamental que juegan los neutrófilos (Lasarte et al., 2016; Naglik et al., 2014). Nuestro trabajo pretende aportar más datos para entender el papel de los neutrófilos en la VVC. Además de los factores inmunes no se pueden descartar otras causas que también pueden tener un efecto en el desarrollo de la VVC como el pH vaginal, la composición bacteriana de la microbiota vaginal o la morfología de la candida y su transición de levadura a hifa (Vylkova et al., 2011).

2.2.4. Respuesta frente a espermatozoides

El semen está formado por el plasma seminal (PS) y millones de espermatozoides (sp). En humanos y ratones el eyaculado se deposita en la parte anterior de la vagina, muy cerca del ectocervix (Suarez and Pacey, 2006) y en cuestión de minutos, los espermatozoides comienzan a ascender para atravesar el canal del cérvix. Tras cruzarlo llegan al útero, donde las contracciones musculares permiten que varios miles alcancen el oviducto o trompas de falopio, donde se producirá la fecundación y varios días después la implantación del embrión en el útero. En los mamíferos los espermatozoides se pueden acumular en las criptas del oviducto donde puede sobrevivir hasta cinco días en humanos (Suarez and Pacey, 2006; Wilcox et al., 1995)

Debido a que el espermatozoide es una célula alogénica para la mucosa femenina, ésta lo considera un agente exógeno del que debe defenderse y por tanto generar una respuesta inmune (Brazdova et al., 2016). Las primeras observaciones acerca de la antigenicidad de los

espermatozoides datan de 1932, cuando Baskin detectó anticuerpos anti espermatozoides (ASAs, de sus siglas en inglés) circulantes en mujeres a las que había inyectado semen de sus maridos (Baskin, 1932). Más adelante, en 1950, Wilson observó ASAs aglutinados sobre los espermatozoides en hombres con problemas de fertilidad (Wilson, 1954). Actualmente se conoce la presencia de ASAs en la sangre, la linfa, el PS o el moco cervico-vaginal (Brazdova et al., 2016). Aún así, la correlación entre los anticuerpos contra el espermatozoide y la infertilidad es controvertida (Clarke, 2009 205; Naz, 2011 248). Los espermatozoides se consideran débilmente inmunogénicos porque inducen bajos niveles de IFN- γ (Lasarte et al., 2013a; Witkin and Chaudhry, 1989 210). Por lo tanto, la mayor parte de la investigación sobre factores asociados con la infertilidad/fertilidad se ha realizado sobre las respuestas inmunes y las citoquinas inducidas por el PS (Politch et al., 2007 247; Robertson et al., 2013 255). Por otra parte, se ha establecido una correlación entre eventos que generan respuesta Th17 e infertilidad como: mujeres celíacas (Choi et al., 2011; Fernandez et al., 2011), infecciones fúngicas masculinas y femeninas (Nagy and Sutka, 1992 230; Ulcova-Gallova, 1997 231) o infecciones bacterianas como *Chlamydia* (Blum et al., 1989 229). Además, se ha demostrado que los espermatozoides humanos contienen hasta 80 antígenos, 12 de los cuales están relacionados con infertilidades (Nowicka-Bauer et al., 2016). Por último, también se ha demostrado que los espermatozoides producen una respuesta Th17 como cualquier otro patógeno extracelular (Lasarte et al., 2013a).

Un gran número de neutrófilos son reclutados en el cérvix y el útero tras una inseminación como ocurriría en un proceso inflamatorio (Phillips and Mahler, 1977). El papel de estos neutrófilos es eliminar el exceso de espermatozoides o los restos celulares y posibles patógenos que lo acompañan principalmente mediante fagocitosis (Strzemienski, 1989). Además, ensayos *in vitro* han mostrado que los neutrófilos también forman NETs frente a espermatozoides equinos, los cuales se defienden mediante una enzima con actividad DNAsa del PS que destruye estas NETs (Alghamdi and Foster, 2005), aunque la presencia de NETs en el TRF se ha relacionado con problemas de fertilidad,

preeclampsia y abortos (Hahn et al., 2012). Pese a su carácter antigénico, el espermatozoide no debe ser eliminado para que se permita la reproducción, por lo tanto el PS contiene diferentes citoquinas, hormonas y factores de crecimiento que nutren y protegen a los espermatozoides en su viaje hasta la fecundación del ovocito (Robertson and Sharkey, 2016). El PS se genera en la próstata, la vesícula seminal y el epidídimo y contiene moléculas con la capacidad de señalar a las células del TRF, inhibiendo la respuesta inmune para facilitar la supervivencia de los espermatozoides y garantizar la fecundación (Chow et al., 2003). Una de las moléculas más abundantes del PS es la citoquina antiinflamatoria TGFB1 (TGF- β) (Sharkey et al., 2012), la cual reduce la secreción de citoquinas inflamatorias en el epitelio del TRF y está relacionada con la proliferación de células T reguladoras en cérvix y endometrio, favoreciendo un ambiente tolerogénico para el espermatozoide (Robertson et al., 2013). Además, sabemos que durante el momento de la ovulación los neutrófilos desaparecen del lumen vaginal, aunque el mecanismo que dirige la migración de los neutrófilos es desconocido.

Justificación e hipótesis

Justificación del estudio

La candidiasis vulvovaginal (VVC) es una causa importante de morbilidad que afecta a 3 de cada 4 mujeres al menos una vez en su vida. Los desequilibrios hormonales representan un factor de riesgo, lo cual explica por qué situaciones como el embarazo, el uso de anticonceptivos hormonales e incluso el periodo ovulatorio predisponen a esta infección. *C. albicans* es un hongo patógeno oportunista y el agente causante del 85-90 % de las candidiasis. El uso de antifúngicos ha reducido la prevalencia de *C. albicans*, pero ha aumentado la incidencia de otras especies y la aparición de cepas resistentes, lo que ha generado una carrera multimillonaria con enormes implicaciones financieras.

En 1917 George Papanicolaou describió que durante el ciclo ovárico existen variaciones en la presencia de neutrófilos en el lumen vaginal, que se correlacionan con los eventos en el ovario. Así, durante la ovulación (alta concentración de E2) los neutrófilos desaparecen del lumen vaginal generando una ventana de vulnerabilidad que permite las funciones reproductoras, mientras que durante la fase lútea (alta concentración de P4) los neutrófilos salen al lumen vaginal restaurando la inmunidad. Los neutrófilos son células inmunes responsables de la resolución de las infecciones fúngicas por lo tanto conocer el papel de las hormonas sobre ellos puede resultar de gran relevancia en el diseño de nuevas estrategias para combatir la VVC y los trastornos reproductivos.

Hipótesis

El estradiol y la progesterona regulan la migración y actividad de los neutrófilos en el tracto reproductor femenino durante el ciclo ovárico para conciliar las funciones reproductoras con la inmunidad.

Objetivos

Objetivos

- 1.** Estudiar el efecto del estradiol y la progesterona sobre la presencia de neutrófilos en el lumen vaginal y el tracto reproductor femenino.
- 2.** Determinar los mecanismos involucrados en la migración transepitelial de los neutrófilos en la vagina y la posible influencia de las hormonas sexuales femeninas sobre ellos.
- 3.** Analizar el efecto de las hormonas sexuales femeninas sobre la capacidad candidacidal de los neutrófilos.
- 4.** Estudiar el mecanismo de migración de los neutrófilos en la vagina y su capacidad candidacidal en el modelo secuencial de hormonas y el ciclo estral natural.

Materiales y métodos

1. Ratones

Los procedimientos que involucran el mantenimiento y cuidado de los animales se aprobaron por la Comunidad de Madrid (PROEX 147-14, 276-15 y 259-16). Los modelos de ciclo ovárico se realizaron con ratonas BALB/c (inbred, MHC: H-2d) y C57BL/6 (inbred, MHC: H-2b): Wt, *Cxcr2*^{-/-} (Drechsler et al., 2010) y *Esr1*^{-/-} (B6N(Cg)-^{Esr1tm4.2Ksk}/J JAX stock #026176). Como donantes de espermatozoides se utilizaron machos CD1 (outbred). Los ratones se obtuvieron de los laboratorios Charles River, CNIC y Jackson y se mantuvieron bajo condiciones libres de patógenos específicos (SPF, de sus siglas in inglés) en las instalaciones del animalario del Hospital Gregorio Marañón, del Hospital 12 de Octubre y del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC).

2. Modelos de ciclo ovárico

2.1 Modelo de ciclo ovárico con hormonas exógenas

Para mimetizar las diferentes fases del ciclo ovárico *in vivo* se puso a punto un modelo de tratamiento hormonal controlado en el cual se utilizaron ratonas BALB/c de 4 semanas de edad (13-15 gramos). Se eligieron ratonas jóvenes que no hubieran entrado en ciclo para evitar posibles cambios o alteraciones en los órganos sexuales anteriores al tratamiento.

Ovariectomía

Para evitar la producción endógena de hormonas se realizó una ovariectomía bilateral bajo condiciones de anestesia inhalatoria con Sevoflurano (Abbvi) siguiendo el protocolo descrito anteriormente (Lasarte et al., 2013a). A continuación, se realizaron dos incisiones a ambos lados de

la parte baja de la espalda y la herida se trató con dos gotas de 1% Lidocaína (B. Braun) como anestésico local. Dentro de la misma zona se realizó un corte en el peritoneo, se hizo una ligación y se extirpó el ovario cortando unos milímetros más abajo de la unión al oviducto. Finalmente, se cosieron las heridas interna y externa (peritoneo y piel) con hilo de sutura de 6/0. Se administró 2 mg/ml de Ibuprofeno en el agua durante las 24 horas siguientes a la operación.

Tratamiento hormonal

Tras dos semanas de recuperación después de la cirugía, se suministró la primera dosis del tratamiento hormonal. En este trabajo se han utilizado dos modelos de ciclo ovárico con tratamiento hormonal exógeno que se describen a continuación:

2.1.1 Modelo de hormona simple

Para conocer el efecto directo de cada hormona se puso a punto un modelo de hormona única representativa de cada fase del ciclo. Las hormonas se diluyeron en 100 µl de aceite de sésamo (Sigma Aldrich) que se administraron por vía subcutánea con una aguja de 25G (0,5x16mm). A las ratonas control (vehículo) se les administró 100 µl de aceite de sésamo.

- Para mimetizar la fase pre ovulatoria (pico de E2) se administraron 0,02 mg de E2 (Calbiochem), concentración en suero 256 ± 75 pg/ml (Reloso et al., 2012a) dentro del rango fisiológico 100-200 pg/ml (Mao et al., 2005; Paharkova-Vatchkova et al., 2004).
- En el caso de la fase lútea o diestro (pico de P4) se inyectó a las ratonas 0,02 mg de P4 (Calbiochem), concentración en suero 5 ng/ml (Lasarte et al., 2016) dentro del rango fisiológico 5-20 ng/ml durante la fase lútea (Mao et al., 2005).

El tratamiento hormonal se repitió cada cuatro días para mantener las concentraciones de hormonas deseadas. En ambos casos se hizo el estudio anatomopatológico del epitelio del tejido

Materiales y métodos

vaginal (AnaPath acreditación ISO 9001:2008) por microscopía para corroborar que las dosis correspondieran a las fases del ciclo indicadas (Figura 7).

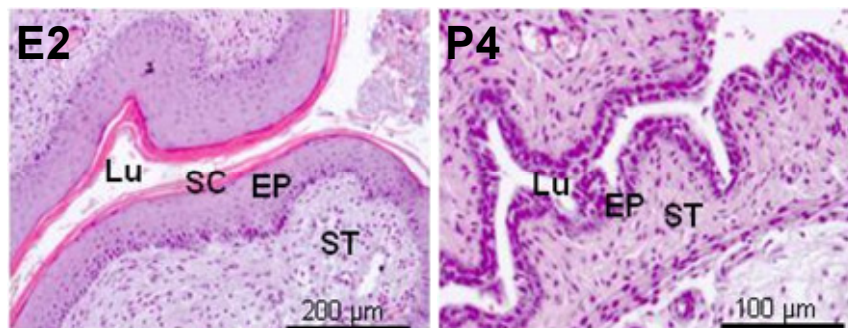


Figura 7: Tinción de hematoxilina-eosina del epitelio vaginal bajo el tratamiento de E2 y P4. Lu: lumen, SC: estrato córneo, EP: epitelio, ST: estroma.

A las ratonas ovariectomizadas y tratadas con hormonas se les inocularon en la vagina los estímulos exógenos (espermatozoides y *C. albicans*) mientras que a las ratonas control (no infectado) se le inoculó solo PBS 3 días después de la primera dosis de tratamiento hormonal. La preparación de estos estímulos se explica más adelante. Los ratones se sacrificaron y las muestras se analizaron a diferentes tiempos como se indica en la figura 8.

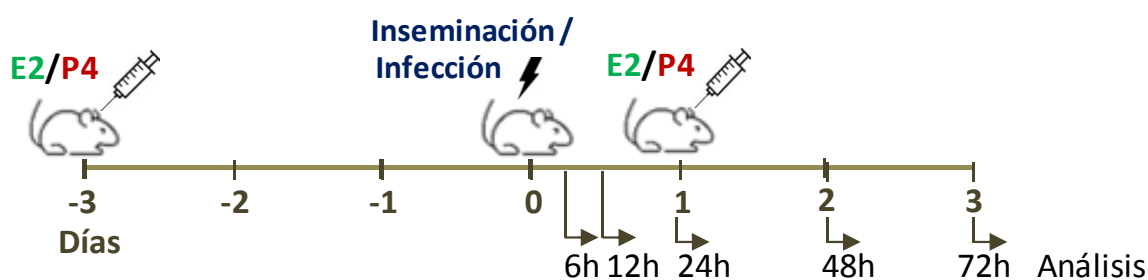


Figura 8. Esquema temporal del modelo de ciclo ovárico de hormona única.

2.1.2 Modelo de combinación de hormonas

Para conocer el efecto de la administración de hormonas de forma consecutiva como ocurre en el ciclo real, se puso a punto el modelo de combinación de hormonas. Para mimetizar el pulso de E2 del proestro se administraron 0,006 mg de E2 (Calbiochem) disuelto en aceite de sésamo. 72 horas después (el mismo día que el estímulo) se administró una segunda dosis de tratamiento hormonal que consistió en 0,02 mg de E2, 0,02 mg de P4 o vehículo (Figura 9).

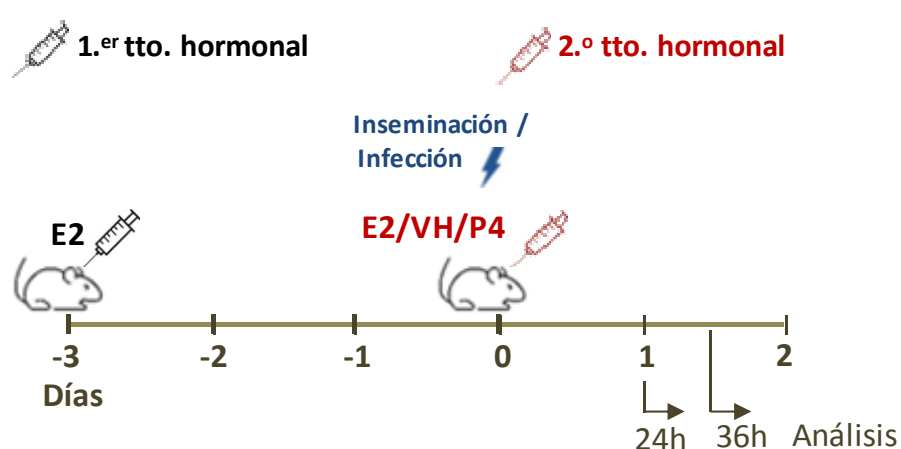


Figura 9. Esquema temporal del modelo de ciclo ovárico de combinación de hormonas.

2.2 Modelo de ciclo ovárico natural

Finalmente, para estudiar los cambios que suceden en el ciclo ovárico real, se puso a punto el modelo de ciclo ovárico natural. En este caso se utilizaron ratonas BALB/c de 6-8 semanas de edad sin ovariectomizar y sin tratamientos hormonales. Para determinar las diferentes fases del ciclo (proestro, estro, metaestro y diestro) se realizaron frotis vaginales recogiendo 10 μ l de secreción vaginal con una pipeta de 20 μ l. Las muestras se extendieron en un porta y se observaron por microscopía óptica de fase. Las ratonas se dividieron según su fase del ciclo en base a los siguientes criterios celulares como se explica en la tabla 2:

FASE DEL CICLO	CARACTERÍSTICAS CELULARES DEL FROTIS VAGINAL
PROESTRO	Células epiteliales nucleadas redondas.
ESTRO	Células epiteliales sin núcleo, pentagonales y queratinizadas.
METAESTRO	Células epiteliales sin núcleo, pentagonales y queratinizadas junto con algunas células polimorfonucleares.
DIESTRO	Muchas células polimorfonucleares.

Tabla 2: Criterios celulares utilizados para clasificar cada fase del ciclo estral.

Una vez clasificadas, se realizó una infección con *C. albicans* o una inseminación siguiendo el protocolo que se explica más adelante. A las ratonas sin infectar se les inoculó 20 μ l de PBS en la vagina. Las ratonas se sacrificaron 12 horas tras la inoculación del estímulo (Figura 10).

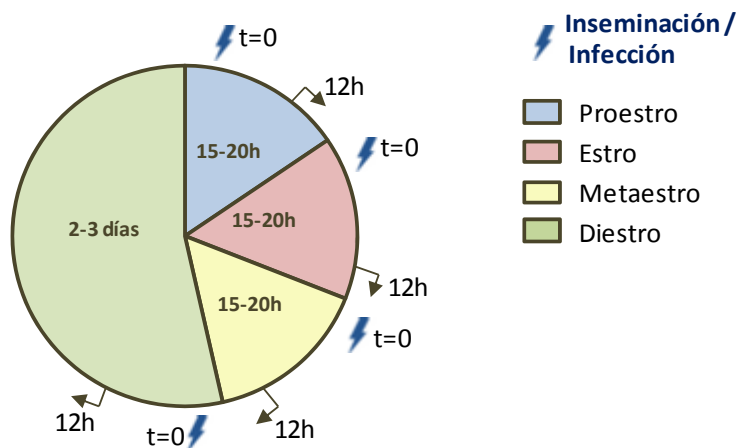


Figura 10. Esquema temporal del modelo de ciclo ovárico natural.

3. Inseminación e infección vaginal

Con el objetivo de estudiar la migración de los neutrófilos en el aparato reproductor femenino, se utilizaron dos estímulos diferentes: *C. albicans* como estímulo patogénico y espermatozoides como estímulo natural en la reproducción, y se compararon con las ratonas tratadas solo con PBS. 72 horas tras el primer tratamiento hormonal se inocularon en la vagina 2×10^6 unidades de *C. albicans* ó 5×10^6 espermatozoides diluidos en 20 μ l de PBS estéril. La inoculación

se realizó con una pipeta de 20 µl insertando la punta 4 mm en la entrada de la vagina con mucho cuidado para no dañar. A las ratonas sin infectar se les inoculó 20 µl de PBS. La preparación de ambos inóculos se explica a continuación:

3.1 Recogida de espermatozoides

Los espermatozoides se obtuvieron de los vasos deferentes de ratones CD1 Crl: CD1 (ICR) adultos (8-10 semanas). Al comienzo, los ratones se sacrificaron por sobredosis de CO₂ para extraer los vasos deferentes. Se realizó una incisión en la parte baja del abdomen, se abrió el peritoneo y se extrajeron los conductos deferentes. Para ello, se realizó un corte en su unión a la vesícula seminal, diseccionando el vaso deferente, separándolo de la arteria espermática interna y finalmente cortando su unión al epidídimo. Los vasos se depositaron en una placa petri con PBS estéril y los espermatozoides se extrajeron cuidadosamente por prensado longitudinal con la ayuda de pinzas de microcirugía estériles. Una vez recogidos, se centrifugaron y se resuspendieron en PBS (20 µl/hembra).

3.2 Preparación de *C. albicans*

Para los experimentos *in vivo* se utilizó la cepa *C. albicans* SC5314 (ATCC-MYA-2876) procedente de un aislado clínico y de uso común en el laboratorio. Se sembraron en placas de Agar Sabouraud dextrosa con cloranfenicol (Conda) y se incubaron a 30°C la noche anterior al experimento. Al día siguiente, se resuspendieron en PBS estéril y se hicieron diluciones seriadas (1:10 y 1:100) para su recuento al microscopio óptico en la cámara de Neubauer. La concentración final del inóculo se ajustó a 1×10^8 candidas/ml.

4. Extracción y análisis del lavado vaginal

La secreción vaginal se recogió mediante cuatro lavados de la cavidad vaginal con 50 μ l de PBS estéril, utilizando una pipeta de 100 μ l insertando la punta 4 mm en la entrada de la vagina con mucho cuidado para no dañar. 50 μ l de la secreción se plaquearon en medio de agar Sabouraud dextrosa con cloranfenicol a diferentes diluciones en agua destilada (original, 1:10 ó 1:100) para determinar la **carga fúngica** o número de UFCs (Unidades formadoras de colonias) de *C. albicans*. Para cuantificar el **número de neutrófilos** las muestras se analizaron y procesaron por citometría de flujo como se explica en el apartado correspondiente. Por último, la **concentración de Cd44 soluble** del lavado vaginal se midió mediante un ensayo inmunoenzimático (Sandwich-ELISA) utilizando el kit de ELISA de Cd44 de ratón (Life Span, Biosciences). El ensayo se llevó a cabo siguiendo el manual de instrucciones. La señal colorimétrica o DO (densidad óptica) se midió por espectrofotometría a una longitud de onda de 450 nm utilizando el lector de placas Strategene Mx500pTM.

5. Transferencia de neutrófilos Wt y *Cxcr2*^{-/-}

Neutrófilos de médula ósea de ratonas C57BL/6 Wt y *Cxcr2*^{-/-} se extrajeron del fémur como se explica más adelante y se purificaron mediante un gradiente de Percoll (Amersham Pharmacia Biotech). Posteriormente, se tiñeron con CFSE o violet-CFSE (Invitrogen) siguiendo las instrucciones de uso. A las ratonas receptoras (C57BL/6 Wt) ovariectomizadas y tratadas con P4 se les inyectó una mezcla de neutrófilos Wt y *Cxcr2*^{-/-} en un ratio 1:3 en la vena de la cola. 12 horas tras la infección vaginal con *C. albicans* se extrajeron muestras de médula ósea, sangre, tejido y lavado vaginal y se cuantificó el número de ambos tipos de neutrófilos por citometría de flujo y microscopía confocal.

6. Eliminación de neutrófilos *in vivo*

Para estudiar la función de los neutrófilos en el modelo de infección vaginal con *C. albicans* se utilizó el anticuerpo bloqueante de neutrófilos contra Ly6g (clon 1A8, Bio X Cell). Este anticuerpo reconoce la proteína de membrana y marcador principal de neutrófilos Ly6g y los elimina del organismo cuando se administra de forma intravenosa en las primeras 24 horas, con un efecto de duración de hasta 72 horas (Daley et al., 2008). 200 µg del anticuerpo Ly6g-1A8 o el isotipo control (Bio-X-Cell) disueltos en 100 µl de PBS estéril se inyectaron por vía intravenosa (intraocular) 24 horas antes de la inoculación vaginal con *C. albicans* (Lasarte et al., 2016; Peters et al., 2014). La depleción de neutrófilos se confirmó por citometría de flujo en sangre, tejido y lavado vaginal.

7. Tratamiento intravaginal con Heparinasa III

Para conocer la función del Heparán Sulfato (HS) sobre la actividad de los neutrófilos en el lumen vaginal realizamos un tratamiento con Heparinasa III (Sigma) *in vivo*, enzima que degrada los residuos de HS. Para ello, infectamos a ratonas tratadas con E2 con *C. albicans* y 8 horas después de la infección les administramos 5 unidades de Heparinasa III en la vagina diluidas en 20 µl de buffer de heparinasa III (20 mM Tris-HCl, 4 mM CaCl₂, 0,1 mg/ml BSA) (Procedimiento y concentraciones según (Johnson et al., 2009)). En las ratonas no tratadas se administraron únicamente 20 µl de buffer de heparinasa III. Las ratonas se sacrificaron y el lavado vaginal se analizó 24 horas tras la infección.

8. Estudio histológico

8.1 Preparación de muestras

8.1.1 Extracción del tracto reproductor femenino (TRF)

Las ratonas se sacrificaron por dislocación cervical, se les practicó un lavado vaginal para eliminar el contenido del lumen y a continuación se realizó una incisión horizontal tanto en la piel como en el peritoneo en la parte baja del abdomen. Con la ayuda de pinzas y tijeras microquirúrgicas se extirpó el TRF en una sola pieza, desde final del útero hasta la vagina.

8.1.2 Congelación y criocorte del tejido

Tras su extirpación, el TRF se sumergió en moldes con medio de congelación Tissue-Tek OCT (Sakura). Los tejidos se congelaron directamente en nieve carbónica y a continuación se guardaron a -80°C hasta su utilización. Las muestras se cortaron longitudinalmente en secciones de $8\ \mu\text{m}$ utilizando el Criostato HM 505 n (MICROM) y se secaron a temperatura ambiente durante 1 hora.

8.2 Tinción de inmunofluorescencia

8.2.1 Tejidos

Las muestras se fijaron y permeabilizaron con 100% Acetona (VWR chemicals) durante 15 minutos. Las tinciones de inmunofluorescencia se realizaron a temperatura ambiente en cámara húmeda y en condiciones de oscuridad. Las muestras se bloquearon con $2\ \mu\text{g/ml}$ IgG de ratón, 10% FBS y 10% BSA. Todos los anticuerpos (tabla 1) se incubaron durante 1 hora y se utilizaron a una concentración entre $1\text{-}5\ \mu\text{g/ml}$. Para los anticuerpos primarios no marcados se añadió un anticuerpo secundario y se incubó en las mismas condiciones. Las muestras se tiñeron con DAPI

Dihydrochloride (Calbiochem) para ver los núcleos celulares y se lavaron en agua destilada durante varios segundos para retirar el exceso de sales del PBS. Finalmente las preparaciones se montaron con medio de montaje fluorescente (Dako).

8.2.2 Cultivos celulares

Las células se crecieron sobre soportes previamente tratados con polilisina. Antes de comenzar la tinción, las células se fijaron con formaldehído (2%). El marcaje de los anticuerpos tuvo lugar en cámara húmeda y oscuridad en las mismas condiciones que se explican en los tejidos.

8.3 Microscopía confocal

La toma de las imágenes se realizó con el microscopio de fluorescencia confocal SPE (Leica Microsystems). Para estudiar el TRF y la cuantificación de la expresión proteica las imágenes se capturaron con un objetivo de inmersión de glicerol ACS-APO 20x apertura numérica 0,60, manteniendo la adquisición de los parámetros durante todo el proceso entre las diferentes muestras como se describió anteriormente (Samaniego et al., 2013). La intensidad media de fluorescencia (MFI) se evaluó en múltiples regiones de interés (ROIs, 10-15 por campo) de forma aleatoria en cada área específica del TRF (Lasarte et al., 2016). Cada molécula o marcador se midió en zonas concretas del epitelio. Así, la expresión de Cd47 se analizó en la parte media del epitelio mientras que la expresión de Cd44 se midió en la parte apical. El gradiente de Cxcl1 se analizó en forma de ratio comparando la expresión del epitelio con el estroma siguiendo el protocolo descrito anteriormente (Hua et al., 2008). La cuantificación de la expresión de proteínas sobre los neutrófilos se realizó mediante la segmentación de estas células (Ly6g+) y el análisis de la MFI de dichas proteínas dentro de las células segmentadas. Todas las cuantificaciones incluyendo los perfiles de línea se llevaron a cabo con el software FIJI (NIH). El conteo de neutrófilos en el epitelio y en la región subepitelial (100 μm desde la lámina basal) se realizó manualmente en campos tomados con el objetivo de 20x.

NOMBRE	CLON	ESPECIE	CASA
Anti-Cd11b	M1/70	Rata	eBioscience
Anti-CD44	IM7.8.1	Rata	Miltenyi
Anti-Cd47	REA170	Humano	Miltenyi
Anti-Cd55	REA300	Humano	Miltenyi
Anti-Ecad	DECMA-1	Rata	Biolegend
Anti-Cxcl1	Policlonal	Conejo	Abcam
Anti-Cxcl2	Policlonal	Conejo	Abd Serotec
Anti-Cxcl5	Policlonal	Conejo	eBioscience
Anti-Cxcr2	Policlonal	Conejo	Santa Cruz
Anti-Cxcr4	Policlonal	Conejo	Abcam
Anti-Era	Policlonal	Conejo	Santa Cruz
Anti-Ly6g	1 A8	Rata	eBioscience
Anti-Mmp9	Policlonal	Cabra	R&D
Anti-Pra	Policlonal	Conejo	Santa Cruz
Anti-Sirpa-FITC	P84	Rata	Biolegend

Tabla 3: Anticuerpos utilizados en microscopía confocal.

8.4 Tinción hematoxilina-eosina.

Antes de comenzar la tinción, las muestras se fijaron en alcohol 96% durante 1 minuto. Posteriormente se sumergieron en hematoxilina de Karacci durante 20 minutos y eosina alcohólica durante 30 segundos. Finalmente, se deshidrataron con alcohol 96% y 100% y se montaron para su posterior análisis en el microscopio.

9. Citometría de flujo

9.1 Procesamiento de muestras

9.1.1 Tracto reproductor femenino

El TRF se extrajo y se recolectó en 200 μ l de PBS. Posteriormente se troceó intensamente de forma mecánica mediante el uso de pinzas y tijeras de cirugía. Una vez obtenida una buena suspensión, se realizó una disgregación enzimática utilizando un “kit” comercial de disociación de tumores (Miltenyi), el cual separa las células mediante la degradación de la matriz extracelular sin dañar su estructura. Para ello, se incubó cada muestra con la mezcla enzimática durante 1 hora a 37°C según instrucciones del fabricante. Posteriormente, las muestras se pasaron por un tamiz de 70 μ m, se resuspendieron en 10 ml de PBS y se centrifugaron a 333g durante 10 minutos a 4°C. Tras retirar el sobrenadante, cada muestra se resuspendió en 50 μ l de medio de tinción de citometría (2 μ g/ml IgG de ratón, 10%FBS en RPMI).

9.1.2 Lavado vaginal

Los lavados vaginales se extrajeron como se explicó anteriormente y se centrifugaron a 333g durante 10 minutos a 4°C. Tras retirar el sobrenadante se resuspendieron en 200 μ l de medio de tinción de citometría (2 μ g/ml IgG de ratón, 10%FBS en RPMI). En cada tinción se utilizaron 50 μ l de cada muestra. El cálculo de células totales se realizó mediante el uso de Flow-Count fluorospheres (Beckman Coulter) según las instrucciones del fabricante.

9.1.3 Sangre

Entre 50 y 100 μ l de sangre se extrajeron de la vena submaxilar y se recolectaron en 20 μ l de EDTA 0,5M en PBS para evitar la coagulación. 50 μ l de cada muestra se centrifugaron a 333g durante 10 min a temperatura ambiente y se trataron con el buffer de lisis de eritrocitos ACK (Ammonium-Chloride-Potassium: 150mM NH_4Cl , 10mM KHCO_3 , 0,1 Mm Na_2EDTA) durante 2 ó 3 minutos. Posteriormente, se añadió 1 ml de PBS y se volvieron a centrifugar. Finalmente, se resuspendieron en 50 μ l de medio de tinción de citometría (2 μ g/ml IgG de ratón, 10%FBS en RPMI).

9.1.4 Médula ósea

Las células de médula ósea se extrajeron del fémur haciendo lavado del interior del hueso y se disgregaron mecánicamente como se explica más adelante. Posteriormente se centrifugaron y se resuspendieron en 100 μ l de medio de tinción de citometría.

9.1.5 Muestras epiteliales de cérvix humano

Los procedimientos que involucran la toma de muestras humanas y su procesamiento se aprobaron por el CEIC del Hospital Gregorio Marañón (CEIC JV1.1/07-2014). En el caso de las muestras humanas se utilizaron exudados cervicales de mujeres sanas, sin evidencia de infección activa, sin toma de anticonceptivos, con un historial de menstruación mensual regular y sin factores de infertilidad diagnosticados, que dieron su consentimiento tras acudir a las consultas por revisión rutinaria al servicio de ginecología del Hospital Gregorio Marañón. Las muestras se recogieron durante el pico de estradiol o fase folicular tardía (días 10 a 15 del ciclo) y el pico de progesterona o fase lútea (días de ciclo 16 a 25). El moco exocervical se recogió con un cepillo (Gynobrush heinz) y la muestra se diluyó en 1 ml de PBS y se almacenó inmediatamente a 4°C. Las muestras se lavaron con 4 ml de PBS y se resuspendieron en 500 μ l de medio de tinción de citometría. En cada tinción se utilizaron 50 μ l de cada muestra.

9.2. Tinción y análisis

A cada muestra se le añadió, según titulación experimental, 1-5 μg /ml de anticuerpos marcados o no marcados con fluorocromos (Tabla 4) y se incubaron 20 minutos a 4°C y en oscuridad. Para los anticuerpos primarios no marcados se añadió un anticuerpo secundario y se incubó en las mismas condiciones. Todas las incubaciones se realizaron en presencia de 2 μg /ml de IgG de ratón para bloquear los receptores Fc. El mismo isotipo control se añadió siempre como control negativo. Las células muertas se excluyeron utilizando el marcador de muerte celular 7-AAD (7-Aminoactinomycin D, Sigma). En el caso de tinciones intracelulares se utilizó el kit de fijación y permeabilización Cytotfix/Cytoperm™ (BD Biosciences). Para las tinciones intranucleares se utilizó el kit de fijación y permeabilización nuclear Fox P3 Staining buffer set (eBiosciences). Las células se pasaron a través del citómetro de flujo Gallios (Beckman Coulter). Los resultados se analizaron utilizando el software Flow-Jo (Tree Star, Inc).

NOMBRE	CLON	ESPECIE	CASA
Anti-Ly6g-Alexa fluor 488	1A8	Rata	BioLegend
Anti-F4/80-PE	BM8	Rata	eBioscience
Anti-Cd11b-APC	M1/70	Rata	eBioscience
Anti-Prα purificado	Policlonal	Conejo	Santa Cruz
Anti-Era purificado	Policlonal	Conejo	Santa Cruz
Anti-Cxcl1 purificado	Policlonal	Conejo	Abcam
Anti-Cxcr2 purificado	Policlonal	Conejo	Santa Cruz
Anti-Cxcr4 purificado	Policlonal	Conejo	Abcam
Anti-E-cadherina-647	DECMA-1	Rata	Biolegend
Anti-CD44-PE	IM7.8.1	Rata	Miltenyi
Anti-Cd47-PE	REA170	Humano	Miltenyi
Anti-Sirpα-FITC	P84	Rata	Biolegend
Anti conejo IgG-FITC		Burro	Jackson
Anti cabra IgG-647		Burro	Jackson

Tabla 4: Anticuerpos utilizados en citometría de flujo.

10. Experimentos *ex vivo*/*in vitro*

10.1 Purificación de neutrófilos de ratón

Los neutrófilos de ratón se obtuvieron de la médula ósea. Para ello se extrajeron los fémures de cada ratón y las células de la médula ósea purgando los huesos con medio RPMI 1640 (jeringa de 10 ml y aguja de 25G (0,5 x 16mm)). Posteriormente las células se disgregaron con de una aguja de un calibre mayor (21G (0,8 x 40mm)). Para estudiar la actividad de los neutrófilos *ex vivo* se utilizaron hembras BALB/c ovariectomizadas y tratadas con E2 o P4 como se explicó anteriormente. Para el estudio de la actividad de neutrófilos tratados *ex vivo* se utilizaron ratones BALB/c adultos convencionales. En ambos casos los neutrófilos se purificaron mediante el kit Anti-Ly6g microbeads (Miltenyi), siguiendo las instrucciones del fabricante y se plaquearon en placas de 96 pocillos a una concentración de 2×10^6 células/ml en medio completo RPMI 1640 (10% FBS, 1 mM piruvato de sodio, 1% aminoácidos esenciales y no esenciales, 2 mM L-glutamina, 50 μ M 2-mercaptoethanol y 15mM HEPES). Por el contrario, los neutrófilos de ratón utilizados en los experimentos de transferencia (Wt y *Cxcr2*^{-/-}) se purificaron mediante un gradiente de Percoll debido a que esta técnica requiere de una menor manipulación y no utiliza anticuerpos unidos a *micro beads* como los *kits* de purificación comerciales, que puedan alterar el comportamiento de los neutrófilos en el experimento de transferencia *in vivo*.

10.2 Tratamiento sobre neutrófilos *ex vivo*

10.2.1 E2 y P4

Para estudiar el efecto de las hormonas sobre los neutrófilos *ex vivo* se prepararon ambas hormonas a concentraciones fisiológicas (E2: 10^{-10} M y P4: 10^{-8} M) disolviendo 10 mg de cada hormona en Etanol 100% y realizando diluciones seriadas en medio RPMI 10% FBS.

10.2.2 Cxcl1

Para estudiar el efecto de la quimioquina Cxcl1 sobre la actividad candidacidal, los neutrófilos obtenidos de médula ósea de ratones convencionales se trataron con diferentes concentraciones de Cxcl1 (Immunotools) durante 1 hora a 37°C, 5% CO₂.

10.3 Determinación de la actividad candidacidal de los neutrófilos

En los experimentos de actividad candidacidal *in vitro* se utilizó la cepa de *C. albicans* mutante no filamentosa *efg1Δ/cph1Δ* (Sonneborn et al., 1999). Esta cepa se sembró en placas de Agar Sabouraud dextrosa con cloranfenicol e incubada a 30°C la noche anterior al experimento. 2x10⁶ neutrófilos se cocultivaron con 2x10⁶ unidades de *C. albicans* en un volumen de 200 μl a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad relativa. Tres horas después, los neutrófilos se lisaron con 0,1% Tritón 100X (Sigma) y las candidas se levantaron agitando con intensidad repetidas veces la muestra con la pipeta. Con el contenido del pocillo se realizaron diluciones seriadas (1:25 y 1:10) en agua destilada. 50 μl de la dilución final se plaquearon en medio YED (Yeast Extract Dextrose) y se incubaron a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad relativa. 48 horas después se realizó el recuento de UFC de *C. albicans*.

10.4 Determinación de la actividad fagocítica de los neutrófilos

Neutrófilos de ratonas condicionadas con E2 ó P4 se purificaron y cocultivaron con *C. albicans* (*efg1Δ/cph1Δ*) en un ratio 1:1 sobre placas de vidrio (Ibidi) cubiertas con fibronectina 5 μg/ml. Después de 10 minutos de incubación a 37°C y 5% CO₂ se capturaron imágenes en campo claro durante 3 horas a intervalos de 1 minuto con una cámara sCMOS (Orca Flash 4.0 LT, Hamamatsu) acoplada a un microscopio invertido (DMi8, Leica-Microsystems) usando un objetivo 40x ACS-APO NA 1.30.

10.5 Migración a través de transwells

Para comprobar la capacidad migratoria de los neutrófilos, se realizaron ensayos de migración hacia las quimiocinas Cxcl1, Cxcl2 y Cxcl12 (Immunotools). Los neutrófilos se colocaron en la parte superior de un transwell de 3 μm de diámetro (Costar) y en la parte inferior de la cámara se colocó la quimiocina a 50 ng/ml. Tras 1 hora a 37°C las células migradas se contaron por citometría de flujo en el citómetro Cytomix FC 500 (Beckman-Coulter).

10.6 Purificación de células polimorfonucleares (PMNs)

humanas

Las PMNs se obtuvieron de sangre completa de donantes sanos. Para ello 10 ml de sangre se recogieron en EDTA y se procesaron en la primera hora tras la recogida. La purificación de PMNs se realizó utilizando la técnica de gradientes de Percoll. El rendimiento de este protocolo fue de aproximadamente $1,5 \times 10^6$ PMNs/ml de sangre completa. La viabilidad y la pureza de los PMNs se analizaron por citometría de flujo. Para conocer la viabilidad se utilizó el marcador de muerte 7-AAD y para la pureza el marcador de PMNs anti CD16 y de linfocitos anti CD3. Ambas resultaron tener valores muy altos (97 y 99% respectivamente (Figura 11B)).

10.7 Migración transepitelial

En los experimentos de migración transepitelial, se estudió la migración de neutrófilos humanos sobre una monocapa de células epiteliales vaginales de línea VK2 /E6E7 (ATCC®CRL-2616TM). Estas células son de la mucosa vaginal de una mujer en edad pre menopáusica. La monocapa de VK2 se creció de forma inversa sobre la parte de abajo de soportes permeables (transwells) recubiertos de colágeno, con un área de superficie de $0,33 \text{ cm}^2$ y un poro de 5 μm (Costar). Para ello, se le dio la vuelta al transwell y se depositó una gota de $1,5 \times 10^5$ de células en 50 μl de medio VK2 (Keratinocyte-Serum Free medium

(Gibco), 0,1 ng/ml proteína humana recombinante EGF (Immunotools), 0,05 mg/ml extracto de pituitaria bovina (Gibco) y 0,4mM CaCl₂). Las células se incubaron overnight (16 horas) a 37°C y 5%CO₂. Al día siguiente, se le dio la vuelta a los transwells y se depositaron en placas de 24 pocillos con 600 µl de medio VK2. En el interior del transwell se añadieron 100 µl de medio. Las células se mantuvieron a 37°C, 5%CO₂ durante 8 días. El medio se cambió cada 3 días. Cuando las células llegaron a confluencia, aproximadamente día 8 de cultivo, se confirmó la monocapa por microscopía óptica y por impermeabilidad al PBS. Las células se trataron con 10µg/ml del anticuerpo bloqueante de CD44 SLe^A (GM35, donado por C. A. Parkos, University of Michigan, Medical School, MI, USA) o el anticuerpo isotipo control (IgG1, BD Pharmingen), 20 minutos a temperatura ambiente. En el pocillo se añadió el péptido quimiotáctico de neutrófilos FMLF (Abcam) a una concentración de 100 nM. Posteriormente, se añadieron 1x10⁶ PMNs en la parte superior del transwell y se dejaron migrar a 37°C, 5 %CO₂. Tras una hora se recogieron las células migradas y se contaron por citometría de flujo.

11. Estadística

El test utilizado para determinar la significación entre grupos en cada experimento se describe en la leyenda de cada figura. Los cálculos para obtener la significación de los resultados se hicieron con el programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc, USA). ANOVA (tratamiento contra tiempo) se hizo con el IBM SPSS Statistics para Windows, Version 21.0. Armonk, NY: IBM Corp. Se consideró estadísticamente significativo *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.

Resultados

1. EFECTO DE LAS HORMONAS SEXUALES FEMENINAS SOBRE LA PRESENCIA DE NEUTRÓFILOS EN EL LAVADO VAGINAL Y EL TRACTO REPRODUCTOR FEMENINO

1.1. El E2 impide la salida de neutrófilos al lumen vaginal

Para demostrar nuestra hipótesis, pusimos en marcha un modelo utilizando ratonas ovariectomizadas y tratadas con un solo tipo de aporte hormonal exógeno que mimetizara las dos fases del ciclo ovárico: el tratamiento con E2 como fase folicular o pre ovulatoria y con P4 como fase lútea. Para validarlo analizamos el número de neutrófilos en el lumen vaginal de las ratonas tratadas hormonalmente y a las que inseminamos o infectamos con *C. albicans*. En el caso de la inseminación observamos que la ratonas tratadas con P4 mostraron un aumento de neutrófilos (~15 veces) a 6 horas; sin embargo, en las ratonas tratadas con E2, la inducción de neutrófilos fue imperceptible (Figura 11A). En concordancia con estos datos, tras la infección con *C. albicans* también se observó un aumento de neutrófilos en las ratonas tratadas con P4 (~25 veces) a 6 horas. De nuevo, bajo el tratamiento de E2, se observó una ausencia de neutrófilos en el lumen vaginal (Figura 11B). Estos datos reproducen la ventana de tolerancia inmune descrita inducida por el estradiol durante la ovulación (Lasarte et al., 2016; Wira et al., 2015), y, por tanto, validan nuestro modelo experimental.

La ausencia de neutrófilos en el lumen vaginal provocada por el E2 puede deberse a dos razones: un fallo en el reclutamiento de neutrófilos de los vasos al estroma (migración transendotelial o TEM) o un impedimento en la salida de neutrófilos del estroma hacia el lumen vaginal (migración transepitelial o TEpM). Para estudiar estas posibilidades, analizamos los neutrófilos del TRF por

citometría de flujo 6 horas tras la inoculación del estímulo, ya que es el tiempo al que vemos mayores diferencias en la salida de neutrófilos al lumen vaginal entre tratamientos hormonales. Así, observamos que la población de neutrófilos encontrada en el tejido de las ratonas tratadas con E2 era mucho mayor que la encontrada en el caso de P4 (~5 veces). Además, la presencia de neutrófilos del tejido se relacionó inversamente con la del lumen vaginal en ambos tratamientos. Estos datos sugieren que el E2 está bloqueando la migración transepitelial de los neutrófilos, impidiendo su salida desde el tejido hacia el lumen (Figura 11C).

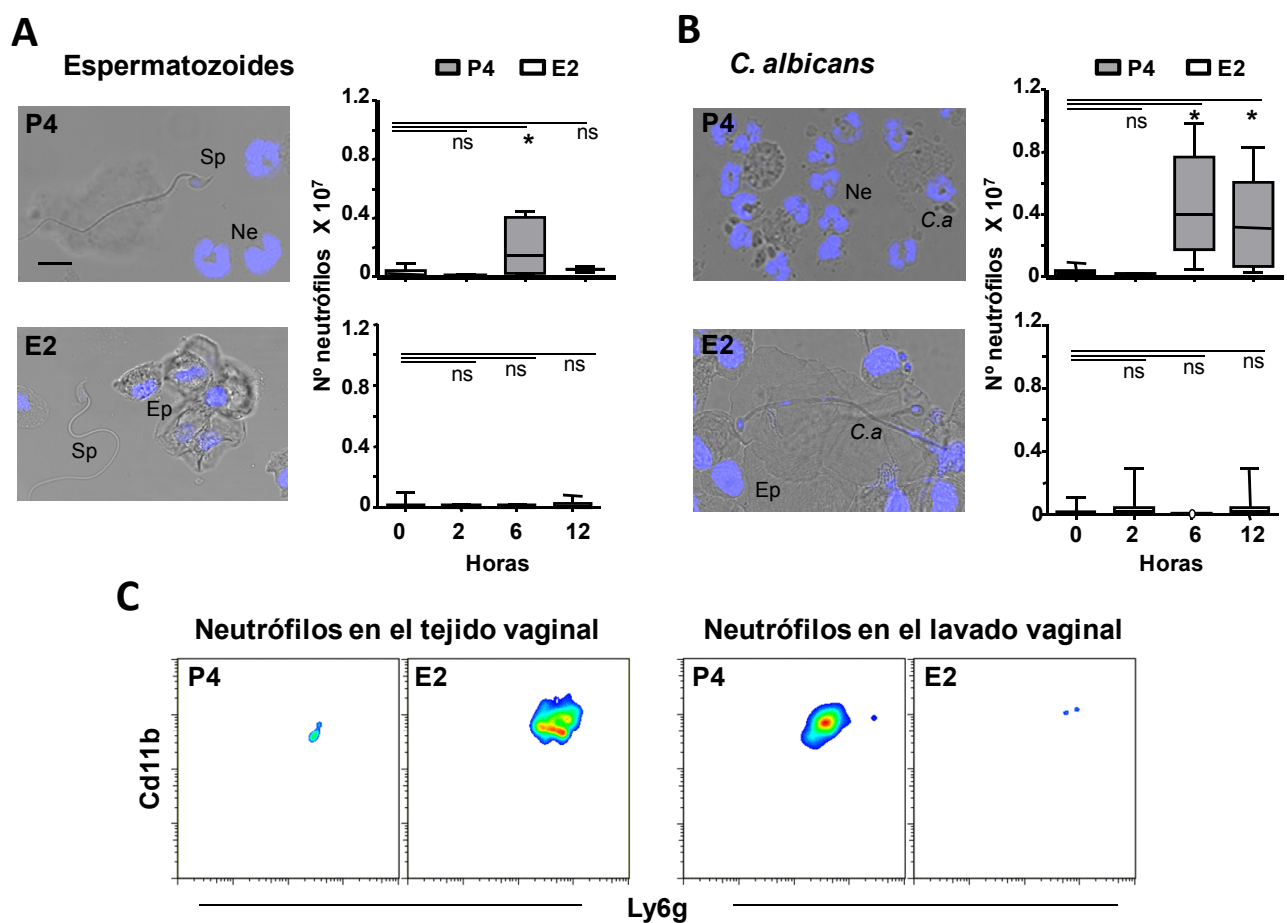


Figura 11: Neutrófilos en el lumen y tejido vaginal. Las ratonas fueron ovariectomizadas, tratadas con hormonas e A) inseminadas o B) infectadas con *C. albicans* en la vagina. Se muestra foto de contraste de fase 6 horas tras el estímulo y la cuantificación del número de neutrófilos en el lavado vaginal por citometría de flujo. Los datos se expresan como gráfica de cajas percentil 90-10 (n=8-10). C) Plot representativo de citometría de flujo de los neutrófilos en el tejido y lavado vaginal 6 horas tras una infección con *C. albicans* (n=5). **Estadística:** Test Mann-Whitney *p < 0,05, ns: no significativo. Escala: 10µm. Sp: espermatozoides, Ep:célula epitelial, Ne:Neutrófilo, C.a:*C.albicans*, E2:estradiol, P4:progesterona.

1.2. El E2 induce una acumulación de neutrófilos en el ectocérvix y en el fórnix.

Para determinar en qué zonas se estaba produciendo la retención de neutrófilos realizamos un estudio histológico por microscopía confocal y cuantificamos el número de neutrófilos en el epitelio y el estroma subepitelial (franja de ~100 μm por debajo de la lámina basal). Además, dividimos el TRF en sus cinco áreas anatómicas para hacer el estudio más preciso: útero y endocérvix, que forman parte del TRF superior, y ectocérvix, fórnix y vagina, que componen el TRF inferior (Figura 12A). La densidad de neutrófilos que encontramos fue mayor en el ectocérvix y fórnix en las ratonas tratadas con E2 en comparación con las tratadas con P4, donde la acumulación fue muy baja, seguramente porque los neutrófilos ya han salido al lumen vaginal (Figura 11A y 11B). Además, este fenómeno tuvo lugar ante una inseminación tanto en el estroma subepitelial (ectocérvix ~3 veces y fórnix ~14 veces) como en la parte apical del epitelio (ectocérvix ~6 veces y fórnix ~164 veces). En el caso de la infección con *C. albicans* también observamos un cúmulo de neutrófilos tanto en el estroma (ectocérvix ~2 veces y fórnix ~5 veces) como en la parte apical del epitelio (ectocérvix ~3 veces y fórnix ~157 veces). Esta acumulación de neutrófilos en ectocérvix y fórnix bajo el tratamiento de E2 podría explicar la ausencia de neutrófilos en el lumen vaginal encontrada en la Figura 11A y B. Por el contrario, la densidad de neutrófilos en la vagina fue mucho menor y apenas mostró diferencias entre tratamientos bajo ningún estímulo (~0,5 veces). Por último, en el útero y el endocérvix no encontramos neutrófilos (Figura 12B y C), por lo que se deduce que el tipo de estímulo utilizado no es capaz de generar una respuesta de neutrófilos en el TRF superior cuando se inocula en la vagina. En resumen, el tratamiento con P4 facilita la salida de neutrófilos al lumen vaginal, mientras que el E2 provoca su acumulación en el ectocérvix y el fórnix. Además, esta acumulación es dependiente del tratamiento hormonal pero independiente del estímulo, ya que la respuesta ante espermatozoides o *C.albicans* es muy similar.

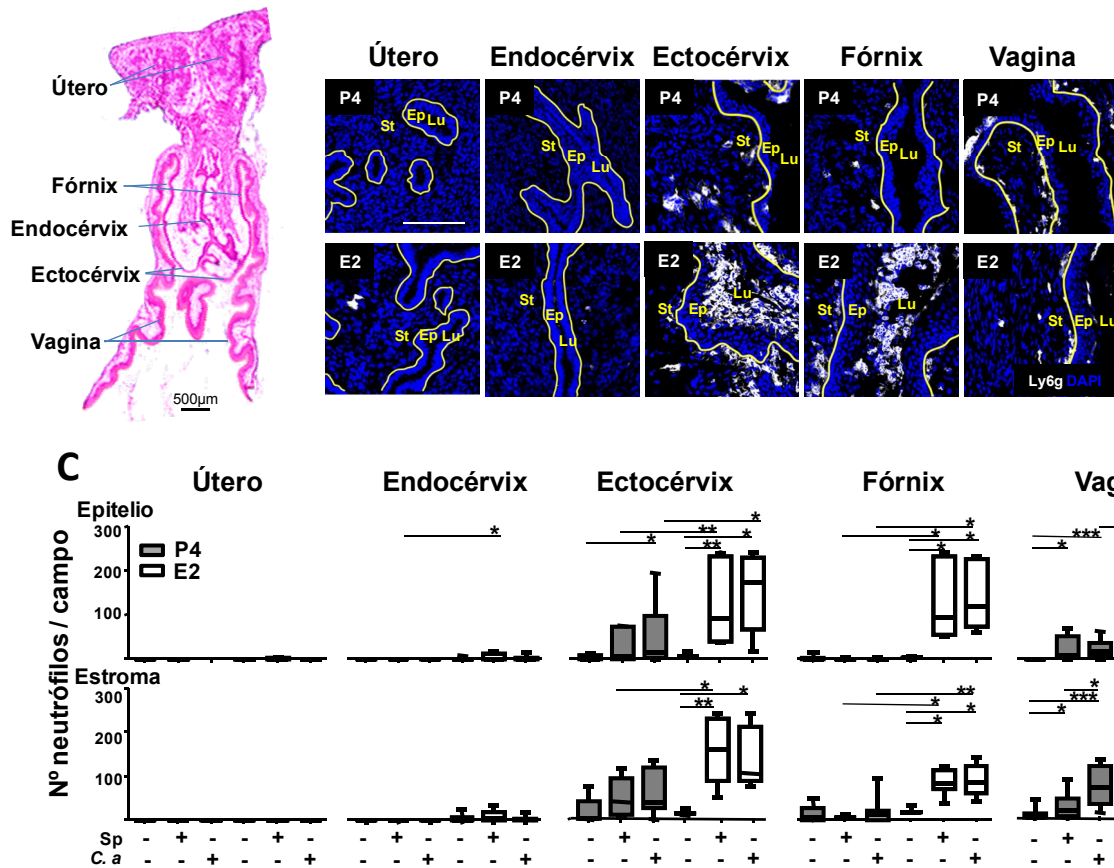


Figura 12: Neutr3filos en el TRF. Las ratonas fueron ovariectomizadas, tratadas con hormonas e inseminadas o infectadas con *C. albicans* (6 horas). A) Secci3n longitudinal del TRF teñida con hematoxilina-eosina indicando sus 3reas anatómicas. B) Neutr3filos (Ly6g⁺ en blanco) en cada una de las 3reas anatómicas indicadas. C) Cuantificaci3n del n3mero de neutr3filos/campo en cada 3rea en epitelio y estroma. Los datos fueron recogidos de al menos 3 secciones diferentes en cada 3rea y se expresan como gr3fica de cajas percentil 90-10 (n=5). Escala=200 μm. La l3nea amarilla indica la l3mina propia. Estadística: Test Mann-Whitney *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001. Sp: espermatozoides, C.a:*C. albicans*, E2: estradiol, P4: progesterona, St: estroma, Ep:epitelio, Lu:lumen.

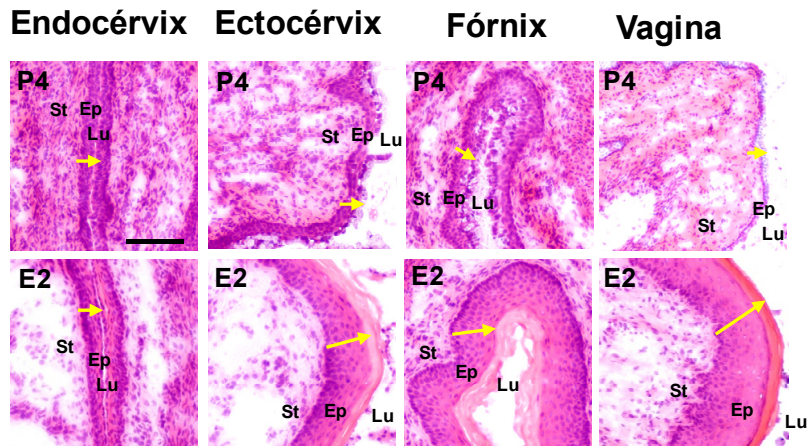
2. EFECTO DE LAS HORMONAS SEXUALES FEMENINAS SOBRE LOS MECANISMOS IMPLICADOS EN LA MIGRACIÓN TRANSEPITELIAL

Como acabamos de mostrar, el E2 bloqueó la TEpM de los neutrófilos al lumen vaginal, reteniéndolos en el estroma y el epitelio apical del ectocérvix y fórnix. Con el objetivo de conocer a través de qué factores podía estar realizando esta acción, decidimos hacer un análisis detallado sobre diferentes mecanismos que podrían participar en este proceso. El estudio se enfocó tanto al epitelio como al neutrófilo, siempre bajo la comparación del efecto de los tratamientos hormonales.

2.1. Efecto de las hormonas sexuales femeninas sobre el grosor del epitelio del TRF

Está ampliamente estudiado que el E2 induce el crecimiento y cornificación del epitelio del TRF (Anderson et al., 2014). Por este motivo, hipotetizamos que la retención de neutrófilos podría deberse a un aumento del grosor de esta barrera física en el ectocérvix y en el fórnix. Así, medimos el grosor del epitelio en todas las áreas del TRF bajo ambos tratamientos hormonales y observamos que el epitelio era más grueso en el tratamiento con E2 que en el de P4 en ectocérvix (~3 veces), fórnix (~2 veces) y vagina (~5 veces) (Figura 13A y B). Aunque este incremento en el grosor epitelial podría ser una de las causas que retrasan la migración de neutrófilos, observamos que el efecto proliferativo del E2 fue menor en ectocérvix y fórnix, zonas de paso de los neutrófilos (Figura 12B). Además, la mayoría de neutrófilos consiguieron llegar a la zona apical del epitelio en el ectocérvix y fórnix (Figura 12C). Estos datos sugieren que el aumento de grosor podría afectar a la migración de los neutrófilos en el epitelio vaginal, pero debe haber otros mecanismos que participan en la inhibición de la salida de neutrófilos al lumen a través del ectocérvix y fórnix.

A



B

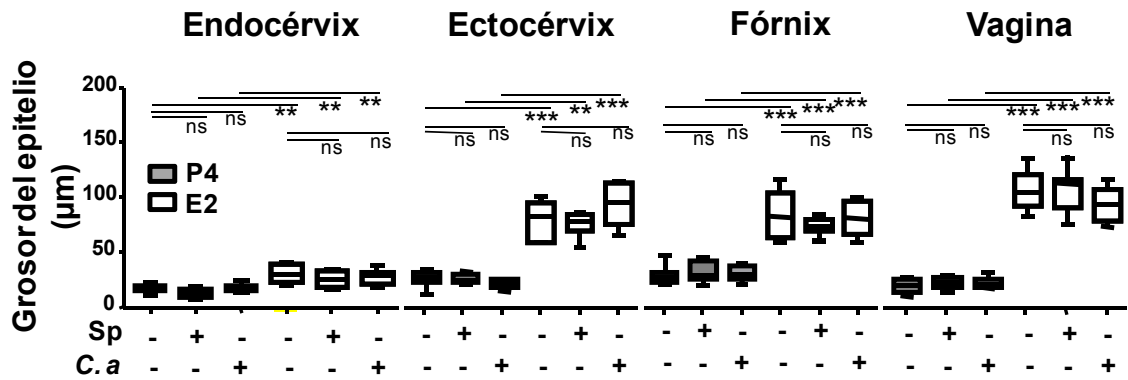


Figura 13: Grosor del epitelio. Las ratonas fueron ovariectomizadas, tratadas con hormonas e inseminadas o infectadas con *C. albicans* (6 horas). A) Áreas anatómicas del TRF teñidas con hematoxilina eosina. B) Grosor epitelial de cada área anatómica. Los datos fueron recogidos de al menos 3 secciones diferentes en cada área y se expresan como gráfica de cajas percentil 90-10 de la MFI (n=3). La flecha amarilla indica la zona de medida del grosor del epitelio. Estadística: Test Mann-Whitney **p < 0,01, ***p < 0,001, ns: no significativo. Sp: espermatozoides, C.a: *C. albicans*.

2.2. Cxcr2 es esencial en la salida de neutrófilos al lumen vaginal

Puesto que el efecto barrera del epitelio no parece ser el único implicado en el bloqueo de la TEpM por parte del E2, decidimos estudiar mecanismos moleculares más precisos que pudieran estar siendo afectados por el tratamiento hormonal. Cxcr2 es un receptor de quimioquinas de la familia CXC de la subfamilia de los receptores de proteínas G acopladas de 7 segmentos transmembrana, que está implicado en el reclutamiento y migración de neutrófilos. Además, algunos de sus ligandos (Cxcl1, Cxcl2 y Cxcl5) han sido identificados en secreciones vaginales (Hickey et al., 2013b; Lindqvist et al., 2009). Para comprobar si este receptor es necesario en la salida de neutrófilos al lumen vaginal, purificamos neutrófilos de médula ósea de ratones Wt y *Cxcr2*^{-/-} (Figura 14A) y analizamos su actividad quimiotáctica hacia Cxcl1 y Cxcl12 (ligando de Cxcr4) como control. Los neutrófilos Wt migraron hacia ambas quimioquinas, en cambio, los neutrófilos *Cxcr2*^{-/-} sólo migraron hacia Cxcl12 (Figura 14B). A continuación, teñimos los neutrófilos Wt y *Cxcr2*^{-/-} con diferentes colorantes vitales y los inyectamos en ratonas Wt de forma intravenosa en un ratio 1: 3. El ratio se mantuvo en sangre tras la inyección y 12 horas tras la infección con *C. albicans* en sangre, médula ósea y tejido vaginal, sin embargo, el ratio se invirtió en el lumen vaginal, indicando una drástica reducción en la salida de neutrófilos (~90%) en ausencia de *Cxcr2*^{-/-} (Figura 14C-F). Estos datos demuestran que Cxcr2 es esencial en la migración transepitelial de los neutrófilos al lumen vaginal ante una infección con *C. albicans*.

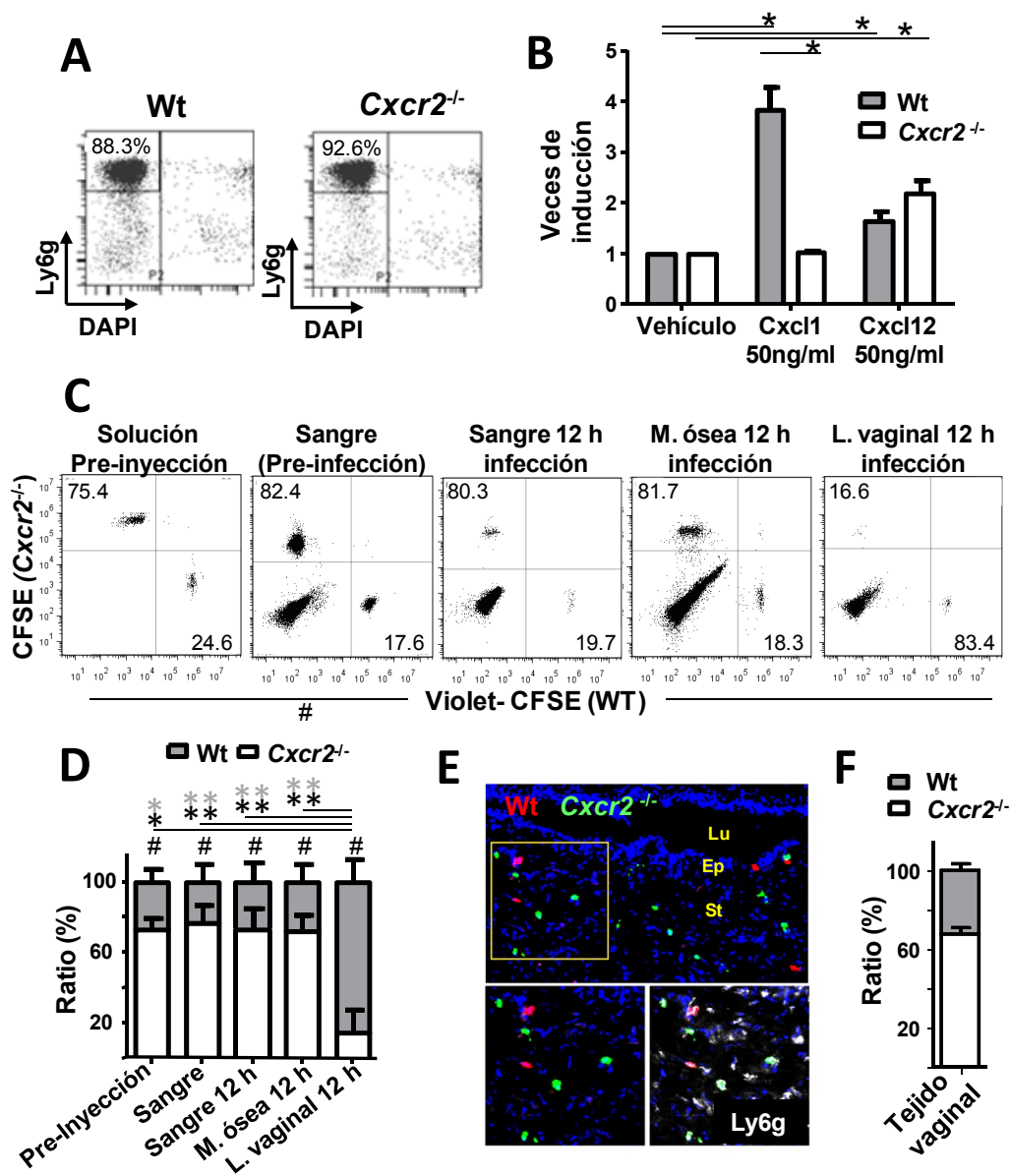


Figura 14: Cxcr2 es necesario en la salida de neutrófilos al lumen vaginal. A) Porcentaje de pureza y viabilidad de los neutrófilos de médula ósea de ratones C57BL/6 Wt y C57BL/6 Cxcr2^{-/-}. B) Ensayo de migración *ex vivo* de neutrófilos Wt y Cxcr2^{-/-}. Ratonas Wt fueron pre inyectadas con una mezcla de neutrófilos (25% violet-CFSE Wt y 75% CFSE Cxcr2^{-/-}) e infectadas con *C. albicans*. C) Análisis del número de neutrófilos en las ratonas receptoras Wt antes y después de la preinyección 12 horas tras la infección con *C. albicans*. D) Porcentaje de neutrófilos Wt y Cxcr2^{-/-}. E) Secciones vaginales analizadas por microscopía confocal (neutrófilos Wt, rojo; neutrófilos Cxcr2^{-/-}, verde). F) Porcentaje de neutrófilos Wt y Cxcr2^{-/-} en el tejido vaginal. Los datos se recogieron de dos experimentos independientes y se muestran como media +SEM (n=6). Estadística: Test Mann-Whitney # p<0,05 y test Wilcoxon *p<0,05, **p < 0,01 *negro Cxcr2 y *gris Wt.

2.3. Las hormonas sexuales femeninas no modifican la expresión y función de Cxcr2 sobre los neutrófilos

Tras conocer que Cxcr2 es un receptor esencial para la migración de neutrófilos, decidimos analizar la influencia de las hormonas sexuales femeninas sobre la función y expresión de esta molécula. Purificamos neutrófilos de medula ósea y analizamos la expresión de Cxcr2 en neutrófilos tratados con concentraciones fisiológicas de P4 (10^{-8} M) y E2 (10^{-10} M), tanto *in vitro* como en el TRF de las ratonas tratadas *in vivo*. En ambos casos se observó que no había diferencias en la expresión de Cxcr2 en los neutrófilos (Figura 15A y B). Además, estudiamos si las hormonas tenían algún efecto sobre la función de este receptor en un ensayo de migración de neutrófilos tratados *in vitro*, y observamos que los tratamientos hormonales tampoco influyeron en su capacidad de migración, ni hacia Cxcl1, ni hacia Cxcl2 (Figura 15C). Con todos estos datos concluimos que el efecto del E2 en la inhibición de la migración de los neutrófilos no se debe a un efecto sobre la expresión ni función de Cxcr2 en los neutrófilos.

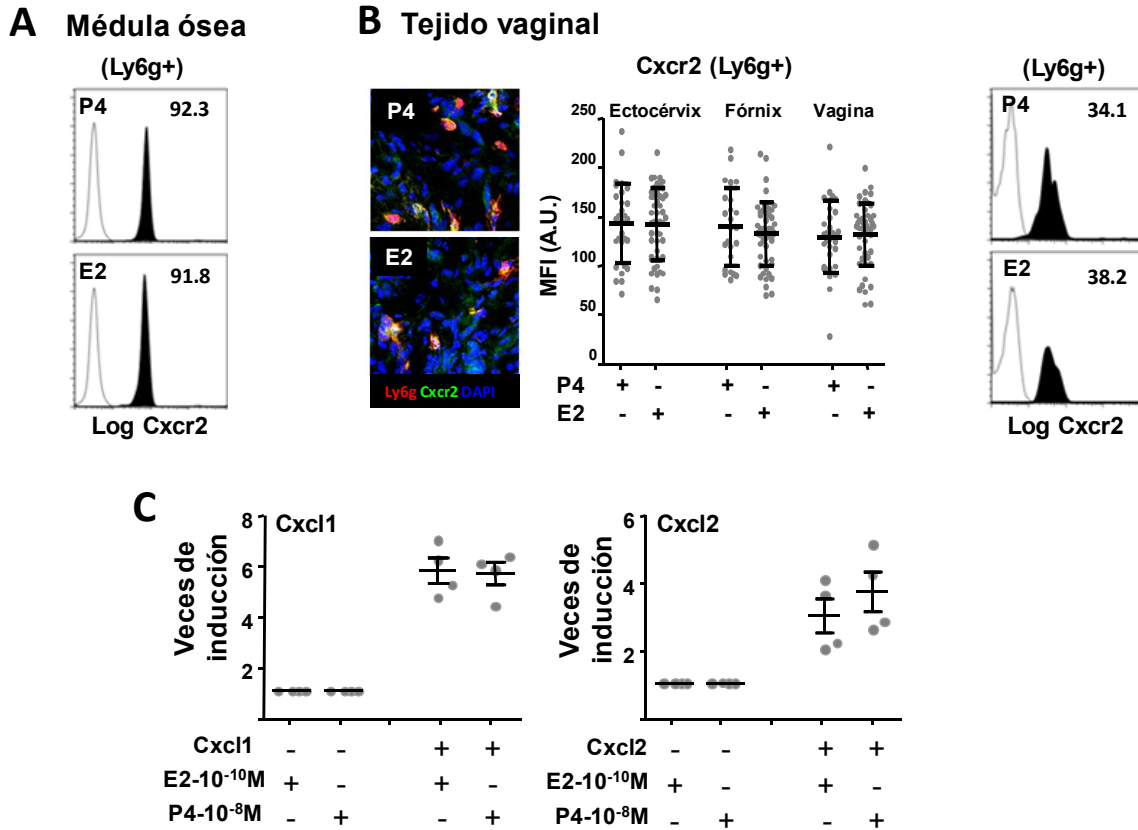


Figura 15: Efecto de las hormonas sobre Cxcr2. A) Plot representativo de citometría de flujo de la expresión de Cxcr2 en neutrófilos purificados de médula ósea y tratados con hormonas *ex vivo*. El número representa el MFI. B) Las ratonas fueron ovariectomizadas, tratadas con hormonas e infectadas con *C. albicans* (6 horas). Imágenes y cuantificación de la expresión de Cxcr2 en neutrófilos (Ly6g+) del TRF por microscopía confocal y citometría de flujo (el número representa el MFI). Los datos fueron recogidos de al menos 3 secciones diferentes en cada área y se expresan como MFI, cada punto representa un neutrófilo (n=6). C) Ensayo de migración de neutrófilos *ex vivo* purificados de médula ósea y tratados con hormonas. Los datos se recogieron de cuatro experimentos independientes y se expresan como media \pm SEM (n=4).

2.4. Efecto de las hormonas sexuales femeninas sobre los ligandos de Cxcr2: El E2 disminuye la expresión de Cxcl1 en el epitelio

Ya que las hormonas no parecen afectar ni a la expresión y ni a la función de Cxcr2 en los neutrófilos, decidimos analizar la expresión de algunos de sus ligandos detectados en el lavado vaginal (Cxcl1, Cxcl2 y Cxcl5) (Hickey et al., 2013b; Lindqvist et al., 2009). Así, por citometría, observamos que las células epiteliales del TRF de las ratonas tratadas con P4 *in vivo* mostraron mayor expresión de Cxcl1 que las tratadas con E2 (Figura 16A). En un estudio más preciso de cada área anatómica observamos que Cxcl1 se expresó mayoritariamente en el epitelio del ectocervix,

fórnix y vagina en las ratonas tratadas con P4, mientras que en las tratadas con E2 la cantidad de Cxcl1 epitelial fue mucho menor (Figura 16B y C). Debido a que las quimioquinas forman gradientes para guiar a los neutrófilos, cuantificamos la expresión de Cxcl1 tanto en el epitelio como en el estroma subepitelial, y calculamos el ratio (epitelio: estroma) entre ambas medidas. La diferencia de expresión fue de ~6 veces en el ectocérvix, ~5 veces en el fórnix y ~4 veces en la vagina en el tratamiento con P4, mientras que en el tratamiento con E2 el ratio epitelio: estroma fue de ~2 veces para todas las partes anatómicas. Finalmente, detectamos la misma proporción y cantidad de Cxcl1 en presencia o no de espermatozoides y *C. albicans* (Figura 16D); por tanto, parece que la expresión de esta quimioquina es un efecto dependiente del tratamiento hormonal e independiente del estímulo. En resumen, estos datos sugieren que el gradiente de Cxcl1 podría ser uno de los mecanismos afectados por el E2 con el fin de impedir la salida de neutrófilos a la luz vaginal a través del ectocérvix y del fórnix.

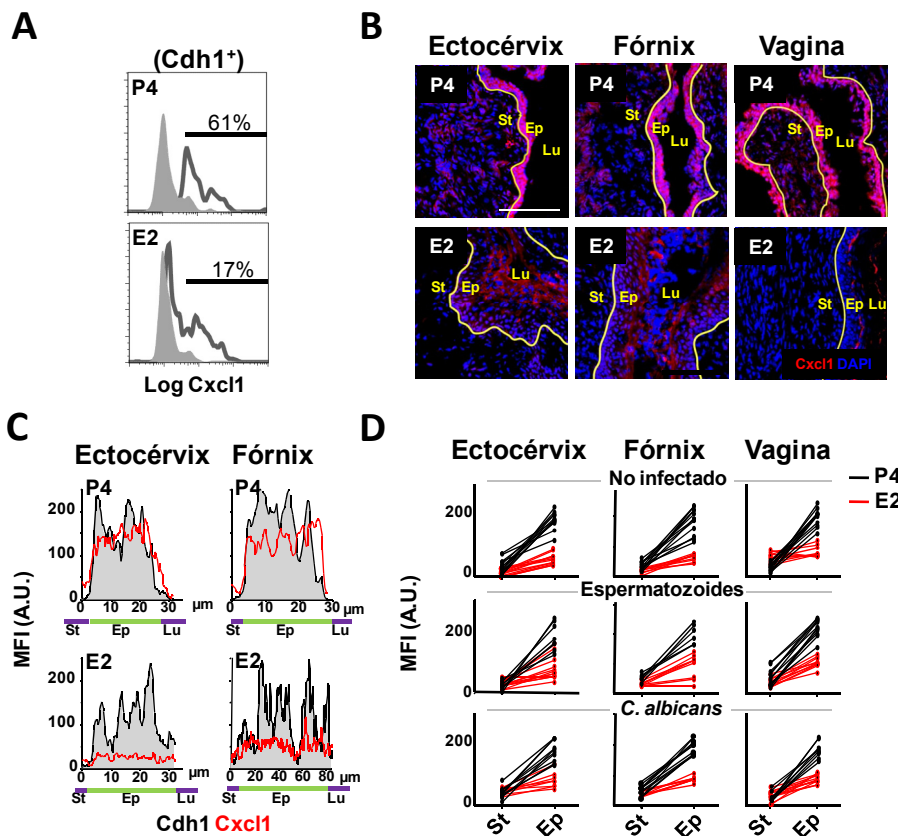


Figura 16: Expresión de Cxcl1 en el TRF. Las ratonas fueron ovariectomizadas e inseminadas o infectadas con *C. albicans* (6 horas). A) Plot representativo de citometría de flujo de la expresión de Cxcl1 en las células epiteliales (Cdh1+) del TRF de ratonas tratadas con hormonas. Los números expresan el porcentaje de células positivas. B) Áreas anatómicas indicadas del TRF teñidas con Cxcl1 (rojo). Escala=200 μ m. La línea amarilla indica la lámina propia. C) Expresión (MFI) del perfil de línea de Cxcl1 en una sección del epitelio (Cdh1+). D) Cuantificación del gradiente de Cxcl1 en estroma y epitelio. Los datos fueron recogidos de al menos 3 secciones diferentes en cada área (n=6) y se expresan como MFI en cada zona. St:estroma, Ep:epitelio, Lu:lumen.

Paralelamente, cuantificamos el gradiente de Cxcl2 y Cxcl5. Aunque ambas quimioquinas se expresan en el epitelio del TRF, no detectamos diferencias significativas entre los tratamientos hormonales (Figura 17A y B); por tanto, el efecto del E2 parece afectar solo a la expresión de Cxcl1.

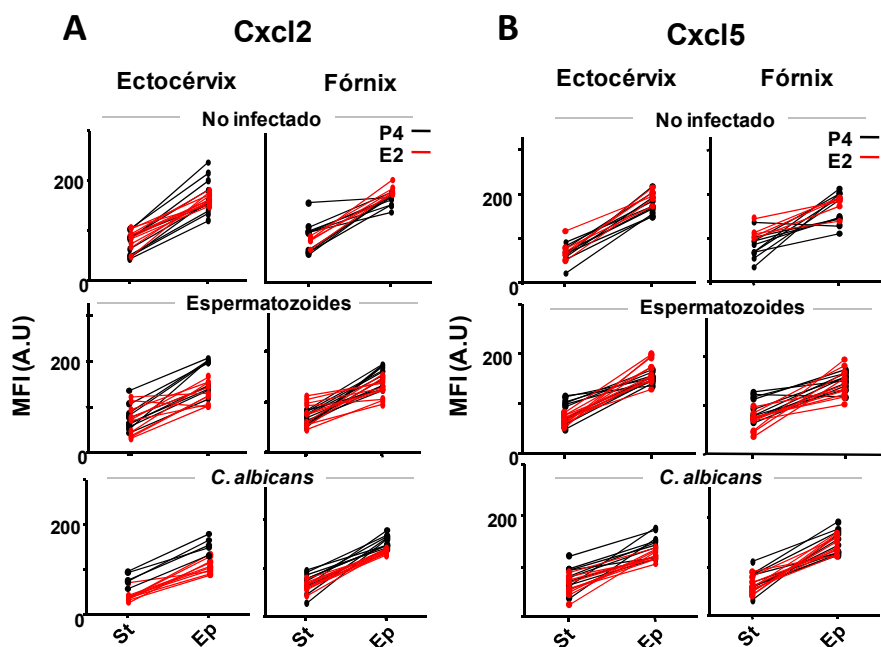


Figura 17: Expresión de Cxcl2 y Cxcl5 en el TRF. Las ratonas fueron ovariectomizadas e inseminadas o infectadas con *C. albicans* (6 horas). Cuantificación del gradiente de A) Cxcl2 y B) Cxcl5 en el estroma y el epitelio. Los datos fueron recogidos de al menos 3 secciones diferentes en cada área (n=6) y se expresan como MFI en cada zona.

2.5. Rotura de membrana basal y adhesión al epitelio: Las hormonas sexuales femeninas no modifican la expresión de Mmp9, Cd11b y Sirp α sobre los neutrófilos

Como mostramos en la figura 12B, el E2 retiene a los neutrófilos en el epitelio, tanto en la parte basal como en la apical. Por ello, pensamos que el E2 podría estar interrumpiendo en alguno de los pasos de la TEpM del neutrófilo (Figura 2). El primero consiste en la rotura de la membrana basal para acercarse al epitelio. Esta membrana es una capa de sostén formada por matriz extracelular de colágeno, lamininas, proteoglicanos y glicoproteínas que recubre la parte basal del epitelio y lo separa del tejido conectivo (Yurchenco, 2011). Para cruzar la membrana basal, los neutrófilos secretan metaloproteasas como MMP9 que degrada el colágeno IV (Zec et al., 2016). Por lo tanto, analizamos la expresión de Mmp9 en los neutrófilos del TRF *in vivo* y observamos que no había diferencias importantes entre los tratamientos hormonales (Figura 18A). Así, descartamos el efecto del E2 sobre la expresión de Mmp9.

Una vez cruzada la membrana, el siguiente paso consiste en el anclaje de los neutrófilos a la parte basal del epitelio. En este primer contacto con el epitelio es muy importante la integrina de los neutrófilos CD11B/CD18, la cual se ha visto implicada en la adhesión al epitelio mediante residuos de fucosa en modelos de migración al pulmón, vejiga o intestino (Brazil and Parkos, 2016). Por esta razón, analizamos la expresión de Cd11b en los neutrófilos *in vivo* por microscopía y *ex vivo* por citometría de flujo, y vimos que, en general, no había diferencias entre los tratamientos hormonales (Figura 18B y C). Por este motivo, descartamos un efecto del E2 sobre la expresión de Cd11b. Posteriormente, el neutrófilo cruza las uniones parabasales del epitelio a través de la unión de Cd47 del epitelio a su ligando en el neutrófilo Sirp α . Analizamos la expresión de Sirp α en los neutrófilos *ex vivo* e *in vivo* y observamos que los tratamientos hormonales no afectan a su expresión (Figura 18C y D). Las variaciones de expresión que encontramos en las medidas en los neutrófilos de tejido por microscopía confocal (menos de 2 veces de inducción) las consideramos irrelevantes, debido a que esta técnica es semicuantitativa, ya que su intervalo de incertidumbre solo permite considerar grandes diferencias entre las variables. Por eso mismo, analizamos también los neutrófilos tratados *in vivo* por citometría de flujo, donde no detectamos variaciones en la expresión de las moléculas de interés. En resumen, los tratamientos hormonales no afectan a la expresión *in vivo* de Mmp9, Cd11b y Sirp α en los neutrófilos, lo cual sugiere que la acumulación de neutrófilos en la parte basal del epitelio no está relacionada con alteraciones en moléculas pertenecientes al neutrófilo. Debido a esto nos cuestionamos si los neutrófilos se ven afectados por los tratamientos hormonales.

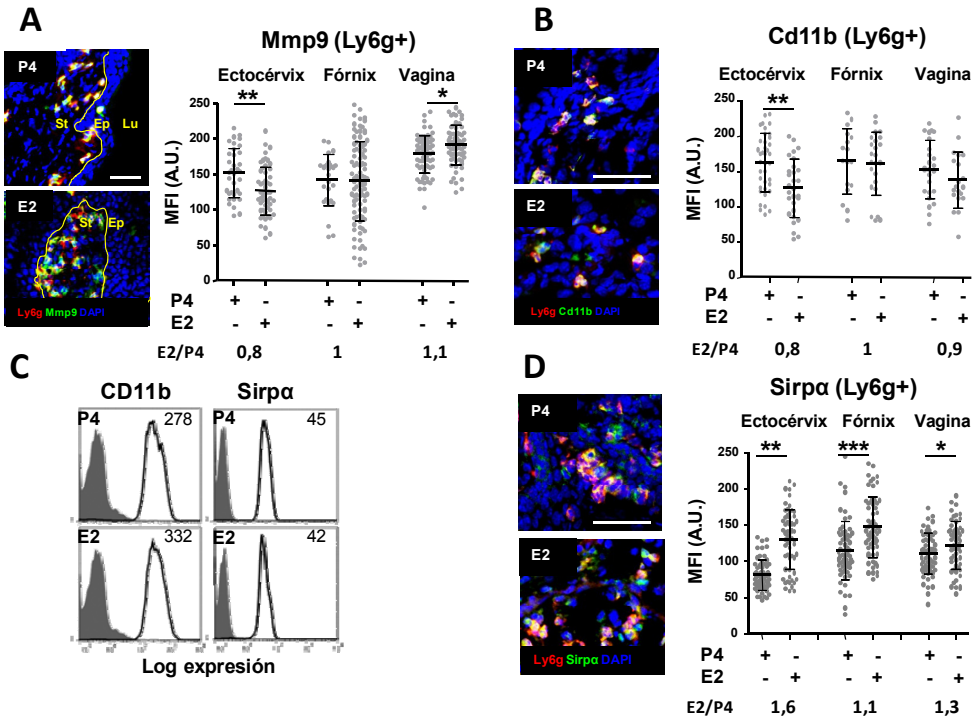


Figura 18: Expresión de Mmp9, Cd11b y Sirpa en neutrófilos. Las ratonas fueron ovariectomizadas, tratadas con hormonas e infectadas con *C. albicans* (6 horas). Imágenes y cuantificación de la expresión de A) Mmp9, B) Cd11b y C) Plot representativo de citometría de flujo de la expresión de Cd11b y Sirpa en neutrófilos (Ly6g+) del TRF. D) Sirpa en neutrófilos en el TRF. Los números indican las veces de inducción E2/P4. Los datos fueron recogidos de al menos 3 secciones diferentes en cada área y se expresan como MFI. Cada punto representa un neutrófilo (n=6). Escala: 50 μ m. La línea amarilla indica la lámina propia.

2.6. Los neutrófilos no expresan los receptores de hormonas ER α y PR α en el TRF

Hasta ahora hemos visto que el E2 no altera la expresión de moléculas del neutrófilo: Cxcr2, Mmp9, Cd11b o Sirp α . En consecuencia, hipotetizamos que los neutrófilos podrían no responder a los tratamientos hormonales, lo que nos llevó a analizar la expresión de los receptores nucleares de E2 y P4 en neutrófilos del ectocervix y fornix. Está extensamente descrito que los neutrófilos de medula ósea y los circulantes expresan ER α y PR α (Figura 19A) (Hsieh et al., 2007; Hua et al., 2008; Lasarte et al., 2016). Sin embargo, cuando analizamos el tejido *in vivo* no detectamos expresión de receptores en los neutrófilos ni por citometría ni por microscopía, lo cual contrasta con la expresión que se observa en el epitelio y el estroma en ectocervix y fornix (Figura 19B). Esto sugiere que el E2 y la P4 podrían regular la TEpM actuando directamente sobre el epitelio, pero no sobre los neutrófilos, ya que carecen de los receptores hormonales en el TRF.

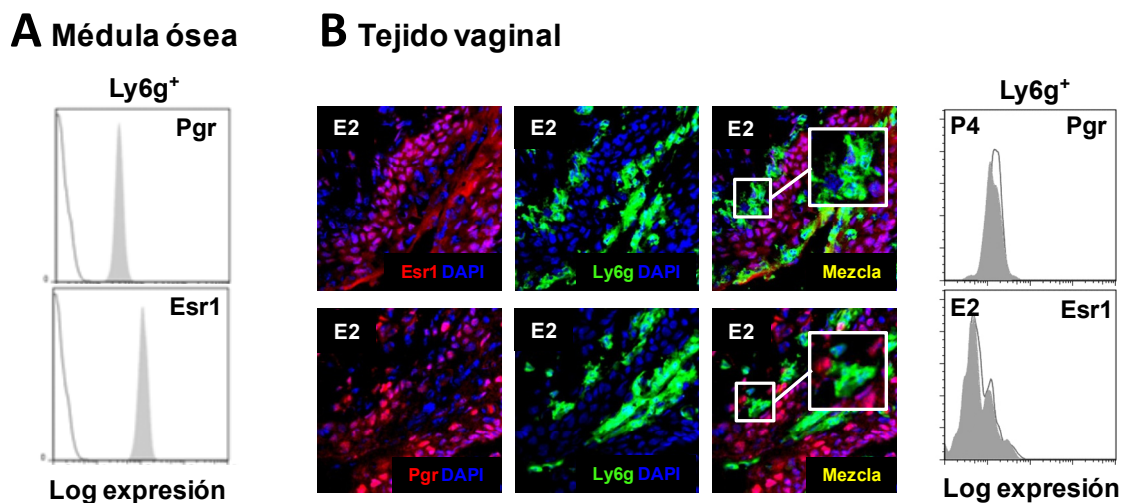


Figura 19: Expresión de los receptores de P4 (Pgr) y E2 (Esr1) en neutrófilos. A) Plot representativo de citometría de flujo de la expresión de los receptores de hormonas en neutrófilos purificados de médula ósea. B) Las ratonas fueron ovariectomizadas, tratadas con E2 e infectadas con *C. albicans* (6 horas). Imágenes de microscopía confocal de la expresión de Pgr y Esr1 (rojo) en neutrófilos (verde) en el fórnix. Análisis de la expresión de Pgr y Esr1 en neutrófilos del TRF (Ly6g⁺) por citometría de flujo. Los datos se expresan en MFI (n=6).

2.7. Cruce a través de las uniones epiteliales: El E2 disminuye la expresión de Cd47 en el epitelio

Debido a que las hormonas parecen no afectar a los neutrófilos, decidimos analizar su efecto sobre las moléculas que regulan la TEpM en el epitelio. Tras el primer contacto con el epitelio, el neutrófilo debe hacerse paso entre las uniones parabasales de las células epiteliales para poder atravesarlo y llegar al lumen. Una de las moléculas epiteliales que participa en este proceso es CD47 (Liu et al., 2001). Está demostrado que la interrupción de la unión entre CD47 y su ligando (Sirpα) expresado en los neutrófilos, retrasa su migración a través del epitelio intestinal (Liu et al., 2002). Así pues, analizamos la expresión de Cd47 por citometría de flujo en células epiteliales del TRF completo, donde encontramos una menor expresión de Cd47 en los tejidos tratados con E2 respecto a los tratados con P4 (Figura 20A). Además, por microscopía confocal encontramos una menor expresión de Cd47 en las ratonas tratadas con E2 en el epitelio del ectocérvix (~3 veces), el fórnix (~2 veces) y la vagina (~6 veces) (Figura 20B y C), lo cual coincide con una mayor acumulación de

neutrófilos en el subepitelio en las dos primeras zonas. También observamos la misma reducción en la expresión de Cd47 en presencia de espermatozoides y *C. albicans* (Figura 20D), por tanto, la expresión de Cd47 es independiente de estímulo y totalmente dependiente del tratamiento hormonal. Nuestros datos sugieren que el E2 puede estar frenando la migración de neutrófilos mediante la bajada de expresión de CD47 por parte del epitelio, pero no altera a la expresión de su ligando Sirpa en el neutrófilo. De este modo, las hormonas alterarían la migración de los neutrófilos modificando molecularmente el epitelio del ectocérvix y el fórnix.

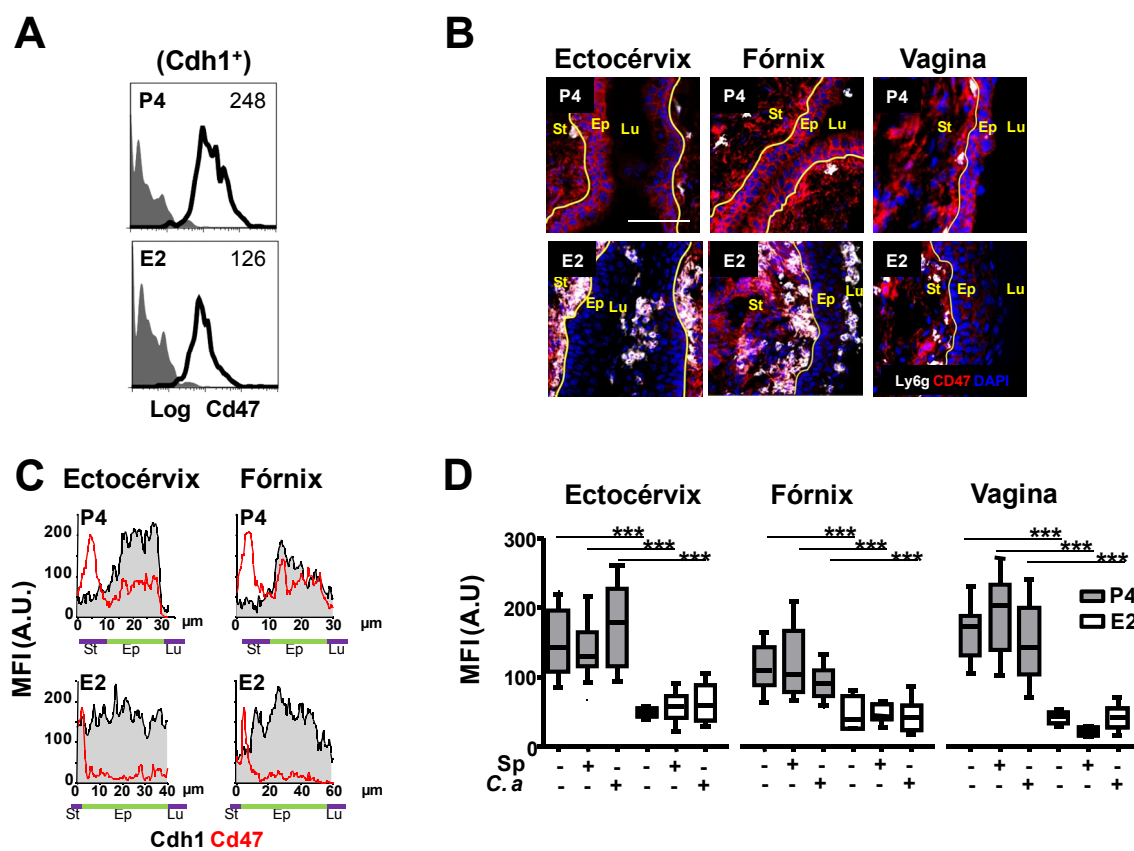


Figura 20: Expresión de Cd47 en el TRF. Las ratonas fueron ovariectomizadas e inseminadas o infectadas con *C. albicans* (6 horas). A) Plot representativo de citometría de flujo de la expresión de Cd47 en las células epiteliales (Cdh1⁺) del TRF de ratonas tratadas con hormonas. El número representa el MFI. B) Áreas anatómicas indicadas del TRF teñidas con Cd47 (rojo) y Ly6g (blanco). Escala: 200 μ m. La línea amarilla indica la lámina propia. C) Expresión (MFI) del perfil de línea de Cd47 en una sección del epitelio (Cdh1⁺). D) Cuantificación de Cd47 en el epitelio. Los datos fueron recogidos de al menos 3 secciones diferentes en cada área (n=6) y se expresan como gráfica de cajas percentil 90-10 de la MFI. Sp: espermatozoides, C.a.: *C. albicans*. Estadística: Test Mann-Whitney ***p < 0,001.

2.8. Liberación del neutrófilo al lumen vaginal “*detachment*”: El E2 disminuye la expresión de Cd44 en el epitelio

Una vez atravesado el epitelio, los neutrófilos emergen a la parte apical y se sitúan frente al lumen. Allí deben realizar el último paso de la migración, que consiste en el salto o liberación desde el epitelio hacia la luz (Brazil and Parkos, 2016; Parkos, 2016). Este fenómeno, conocido como *detachment*, ha sido descrito extensamente en el epitelio intestinal (Barclay et al., 1969; Brazil et al., 2010). Actualmente se conocen dos moléculas que participan en este proceso: CD55 y CD44v6. Ambas moléculas son glicoproteínas expresadas en la parte apical del epitelio, que favorecen la desadhesión de los neutrófilos del epitelio y su liberación al lumen (Brazil et al., 2010). Aunque bajo el tratamiento con E2 una parte de los neutrófilos están retenidos en la parte subepitelial, la mayoría de neutrófilos se acumulan en la zona apical. Por tanto, hipotetizamos que el tratamiento con E2 podría impedir la salida de los neutrófilos al lumen, inhibiendo el proceso de *detachment*. Para valorar el papel de CD44 en la desadhesión de los neutrófilos en la vagina, exploramos la expresión de CD44 en las células epiteliales vaginales VK2. Observamos que se expresaba en la zona apical, colocalizando con el anticuerpo bloqueante GM35 (Figura 21A), que reconoce el epítipo glicano Syalil Lewis A (sLe^a), residuo esencial en el proceso de salida de neutrófilos al lumen intestinal (Brazil et al., 2013). Además, pusimos a punto un modelo de TEpM *in vitro* con las células VK2 en monocapa en transwell, y analizamos la migración de neutrófilos humanos (97% pureza, 99% viabilidad) (Figura 21B) a través de éstas. Así, observamos que el anticuerpo bloqueante GM35 en tratamiento apical reduce la migración transepitelial de los neutrófilos (~6 veces) a través de las células vaginales (Figura 21C). En consecuencia, concluimos que CD44 puede tener un papel fundamental en la TEpM de los neutrófilos en la vagina.

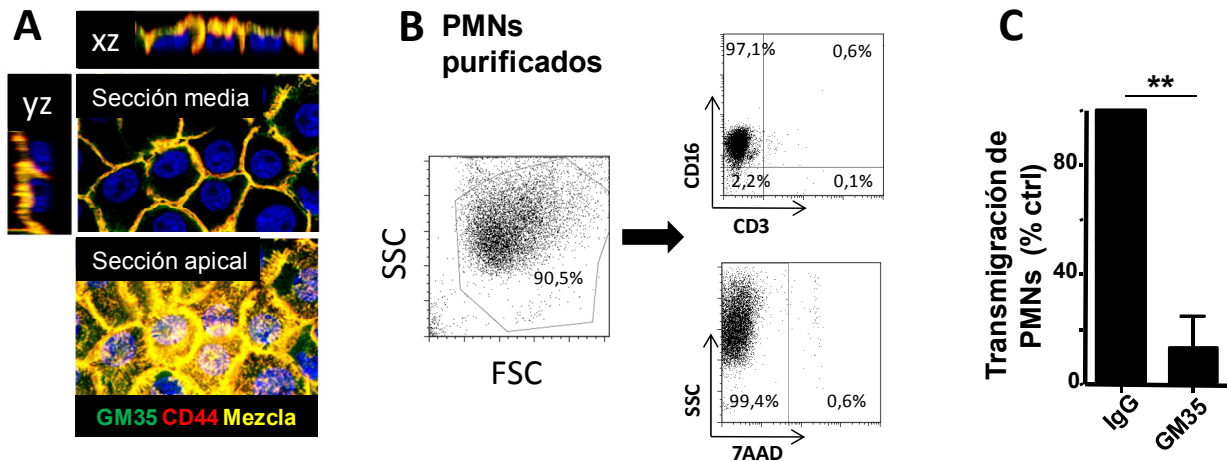


Figura 21: Expresión de CD44 en células vaginales y su papel en la migración transepitelial de PMNs. A) Imágenes de microscopía confocal de la monocapa de células VK2 co-teñida con GM35 (verde) y CD44 (rojo). B) Pureza y viabilidad de los PMNs humanos purificados de sangre. C) Porcentaje respecto al control de los PMNs que migran en respuesta a fMLF. Monocapas confluentes de VK2 fueron pre tratadas en su zona apical con el anticuerpo control de isotipo ó el anticuerpo GM35 antes de añadir los PMNs por la superficie basolateral. Se muestra un experimento representativo de 3. Los datos se muestran como media +SD. Estadística: Test t de Student no pareado con corrección de Welch's $**p < 0.01$.

Posteriormente, analizamos la expresión de Cd44 en las células epiteliales del TRF en modelo de ratón *in vivo*, y vimos que las ratonas tratadas con P4 expresaban más Cd44 que las tratadas con E2 (Figura 22A). También observamos que la expresión de Cd44 en el TRF de las ratonas tratadas con P4 se detectaba en la zona apical del epitelio de ectocérvix, fórnix y vagina, disminuyendo (~9, 6 y 10 veces respectivamente) en las ratonas tratadas con E2 (Figura 22B y C). Finalmente, detectamos una reducción similar en la expresión de Cd44 en presencia de espermatozoides y de *C. albicans* (Figura 22D); por tanto, la expresión de Cd44 en el epitelio del TRF es dependiente del tratamiento hormonal e independiente de estímulo. Por otro lado, el *detachment* de neutrófilos conlleva la liberación del dominio extracelular de CD44 al lumen (Brazil et al., 2013; Brazil and Parkos, 2016). Por este motivo, cuantificamos el Cd44 soluble por ELISA en los fluidos procedentes del lavado vaginal, donde encontramos mayor secreción de Cd44 soluble en el lumen vaginal de las ratonas tratadas con P4 que en las tratadas con E2 (Figura 22E). Nuestros datos sugieren que CD44 ejerce el mismo mecanismo de *detachment* en el TRF que el descrito en la migración intestinal. Además, este

mecanismo se reproduce en células vaginales tanto *in vitro* como *in vivo* y está regulado por las hormonas sexuales femeninas.

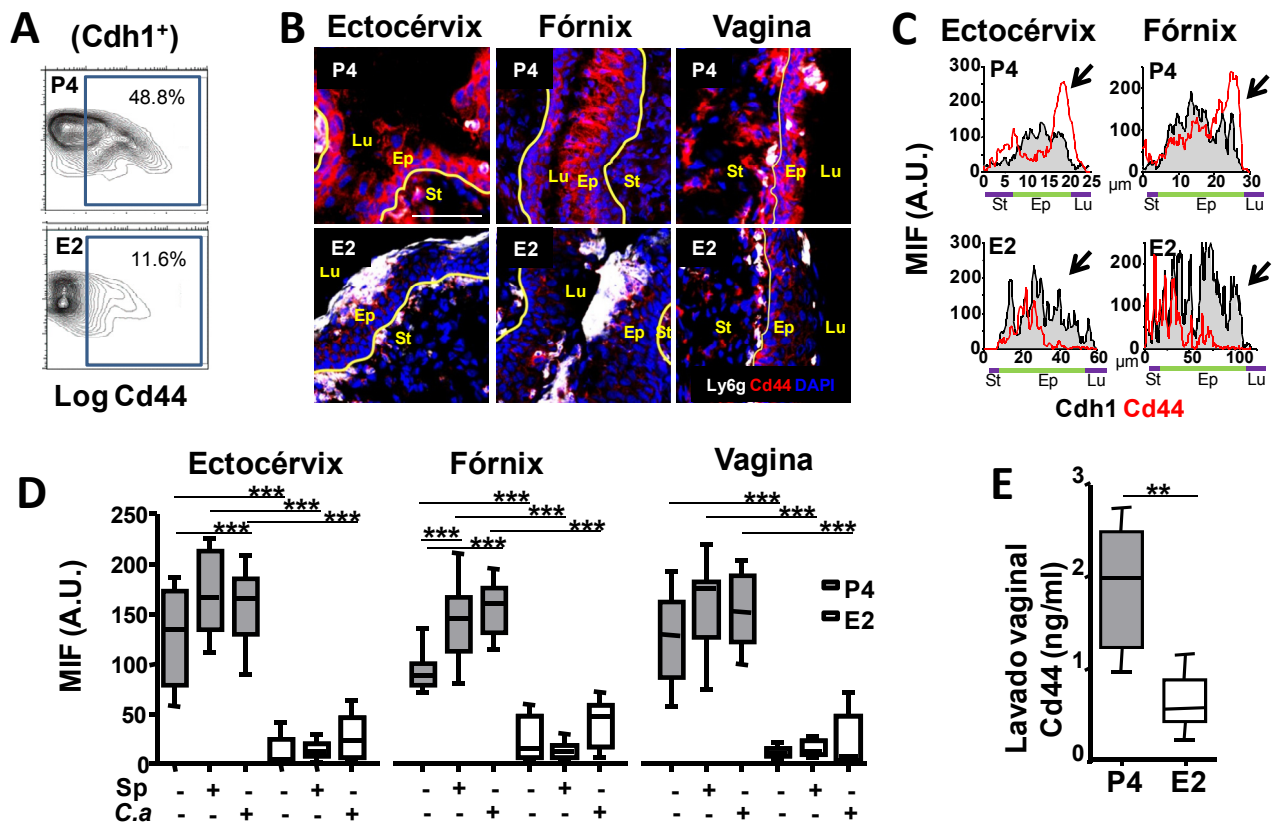


Figura 22: Expresión de Cd44 en el TRF. Las ratonas fueron ovariectomizadas e inseminadas o infectadas con *C. albicans* (6 horas). A) Plot representativo de citometría de flujo de la expresión de Cd44 en las células epiteliales (Cdh1⁺) del TRF de ratonas tratadas con hormonas. Los números expresan el porcentaje de células positivas. B) Áreas anatómicas indicadas del TRF teñidas con Cd44 (rojo) y Ly6g (blanco). Escala: 200 μ m. La línea amarilla indica la lámina propia. C) Expresión (MFI) del perfil de línea de Cd44 en una sección del epitelio (Cdh1⁺). D) Cuantificación de Cd44 en el epitelio. Los datos fueron recogidos de al menos 3 secciones diferentes en cada área y se expresan como gráfica de cajas percentil 90-10 de la MFI (n=6). E) Concentración de Cd44 soluble determinada por ELISA en el lavado vaginal de ratonas tratadas con hormonas e infectadas con *C. albicans*. Los datos se recogieron de dos experimentos independientes y se muestran como gráfica de cajas percentil 90-10 (n=8). Estadística: Test Mann-Whitney **p < 0,01 ***p < 0,001 Sp: espermatozoides, C.a: *C. albicans*

Por último, se cuantificó la expresión de DAF ó Cd55, la otra proteína implicada en el proceso de *detachment*, y observamos que su expresión no estaba regulada por los tratamientos hormonales (Figura 23). En resumen, nuestros datos sugieren que el E2 disminuye la expresión de Cd44 en el epitelio del TRF inferior, lo cual generaría una retención de neutrófilos en la parte apical del epitelio e impediría la liberación de estas células al lumen.

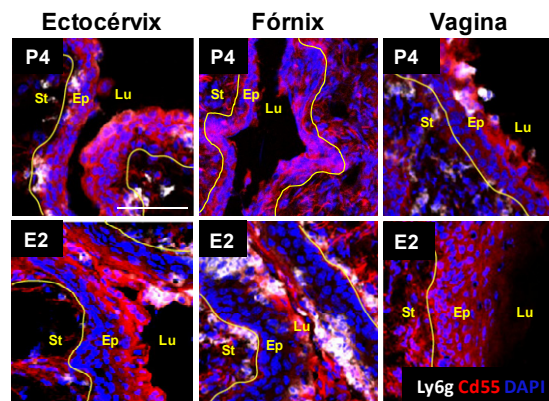


Figura 23: Expresión de Cd55 en el TRF. Las ratonas fueron ovariectomizadas, tratadas con hormonas e infectadas con *C. albicans* (6 horas). Áreas anatómicas indicadas del TRF teñidas con Cd55 (rojo) y Ly6g (blanco). Escala: 200 μ m. La línea amarilla indica la lámina propia.

2.9 El receptor de estradiol α (*Esr1*) regula la migración de los neutrófilos al lumen vaginal

Como se mostró previamente, *Esr1* se expresa en el epitelio y el estroma del TRF (Figura 19B). Para demostrar si el E2 inhibe la migración de neutrófilos a través de este receptor, realizamos una infección vaginal con *C. albicans* en ratonas *Wt* y *Esr1*^{-/-} tratadas con E2, donde observamos que las ratonas *Esr1*^{-/-} presentaron una inducción de neutrófilos (~16 veces) respecto a las *Wt* (Figura 24A). Además, el ectocérvix y el fórnix de las ratonas *Esr1*^{-/-} mostraron una reducción de neutrófilos tanto en el estroma (ectocérvix ~7 veces, fórnix ~15 veces) como en el epitelio (ectocérvix ~30 veces, fórnix ~5 veces) respecto al *Wt* (Figura 24B). Estos datos sugieren que *Esr1* es necesario en el bloqueo de la TEpM de neutrófilos hacia lumen vaginal que produce el E2.

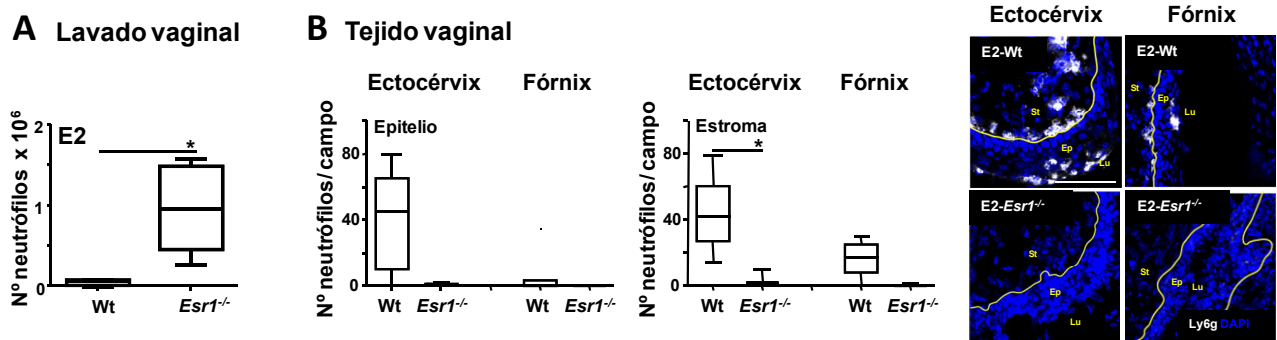


Figura 24: Neutrófilos en el lumen vaginal y el TRF de ratonas de fenotipo salvaje (Wt) y deficientes para el gen *Esr1*. Las ratonas fueron ovariectomizadas, tratadas con E2 e infectadas con *C. albicans* (6 horas). A) Cuantificación del número de neutrófilos en el lavado vaginal por citometría de flujo. B) Cuantificación del número de neutrófilos/campo en cada área en epitelio y estroma. Neutrófilos (Ly6g+ en blanco) en cada una de las áreas anatómicas indicadas. Los datos fueron recogidos de al menos 3 secciones diferentes en cada área y se expresan como gráfica de cajas percentil 90-10 (n=5). Escala: 200 μ m. La línea amarilla indica la lámina propia. Estadística: Test Mann-Whitney *p < 0,05. St:estroma, Ep:epitelio, Lu:lumen.

Para comprobar si el efecto del estradiol sobre la expresión de Cxcl1, Cd47 y Cd44 es a través de *Esr1*, comparamos su expresión en las ratonas *Esr1*^{-/-} respecto a las Wt tratadas con E2 en el ectocérvix y fórnix. Cxcl1 se expresó más (~3 veces) en las ratonas *Esr1*^{-/-} que en las WT en el estroma y el epitelio del TRF (Figura 25A). De forma similar, la expresión de Cd47 aumentó (~ 4 veces en ectocérvix y ~5 veces en fórnix) en el epitelio de las ratonas *Esr1*^{-/-} (Figura 25B). Por último, analizamos la expresión de Cd44 en la parte apical del epitelio y vimos que las ratonas *Esr1*^{-/-} mostraron un aumento (~ 18 veces en ectocérvix y ~6 veces en fórnix) respecto a las Wt. Además, la concentración de Cd44 soluble en el lumen vaginal de las ratonas *Esr1*^{-/-} fue 3 veces mayor que en las Wt (Figura 25C). Estos datos demuestran que *Esr1* es necesario en la disminución de la expresión de las moléculas de la TEpM por parte del E2, y correlaciona con el número de neutrófilos encontrados en el lavado vaginal en la figura anterior.

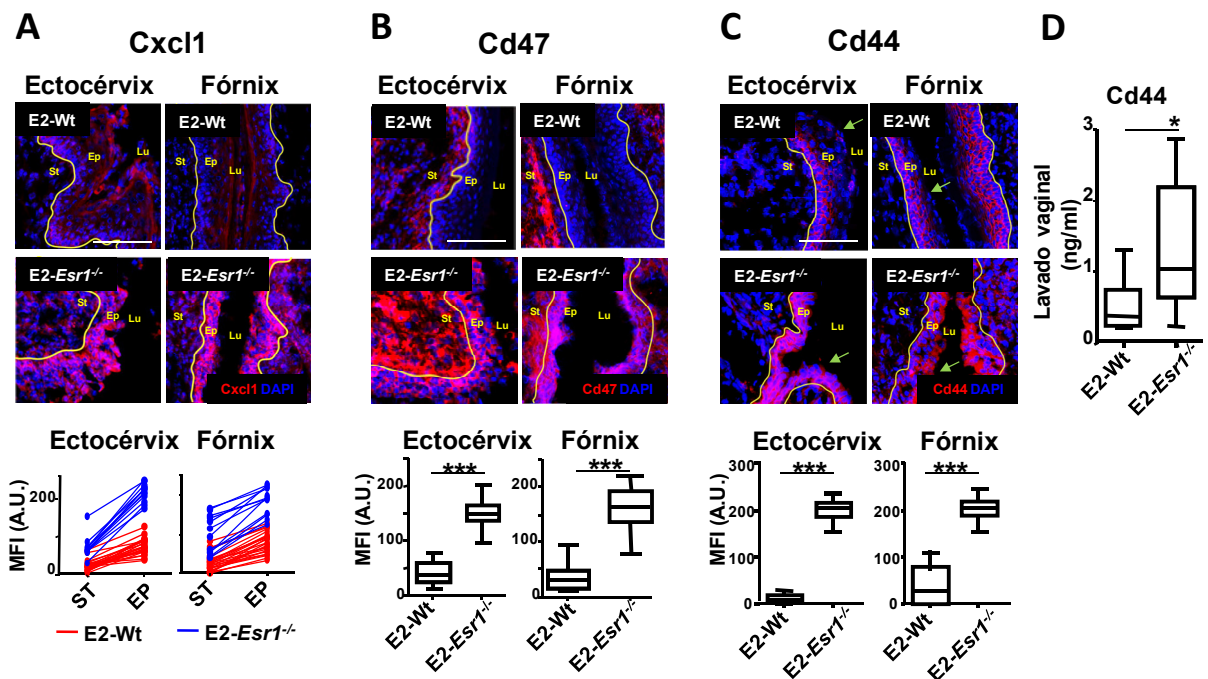


Figura 25: Expresión de Cxcl1, Cd47 y Cd44 en el TRF de ratonas de fenotipo salvaje (Wt) y deficientes para el gen *Esr1*. Las ratonas fueron ovariectomizadas, tratadas con E2 e infectadas con *C. albicans* (6 horas). Imágenes de microscopía confocal y cuantificación de A) Cxcl1, B) Cd47 y C) Cd44 (rojo) en ectocérvix y fórnix. Los datos fueron recogidos de al menos 3 secciones diferentes en cada área y se expresan como gráfica de cajas percentil 90-10 de la MFI (n=5). Escala=200 μ m. La línea amarilla indica la lámina propia. D) Concentración de Cd44 soluble determinada por ELISA en el lavado vaginal. Los datos se recogieron de dos experimentos independientes y se muestran como gráfica de cajas percentil 90-10 (n=5). Estadística: Test Mann-Whitney *p < 0,05, ***p < 0,001.

2.10 La expresión de CXCL1, CD47 y CD44 varía a lo largo del ciclo ovárico humano

Para comprobar si la variación de la expresión de CXCL1, CD47 y CD44 observada en el modelo de ratón es extrapolable a humanos, recolectamos muestras de exudados cervicales de mujeres sanas, clasificándolas según la fase de su ciclo ovárico: fase folicular durante los días 11-15 del ciclo (pico máximo de E2) y fase lútea durante los días 16-22 del ciclo (pico máximo de P4). Observamos que las tres moléculas se expresaron menos en la fase folicular respecto a la fase lútea. La expresión de CXCL1 se redujo un ~50%, mientras que la expresión de CD47 y CD44 disminuyó un ~40% (Figura 27). Por tanto, la expresión de CXCL1, CD47 y CD44 se ve afectada tanto en el modelo de ratón como a lo largo del ciclo reproductor femenino humano.

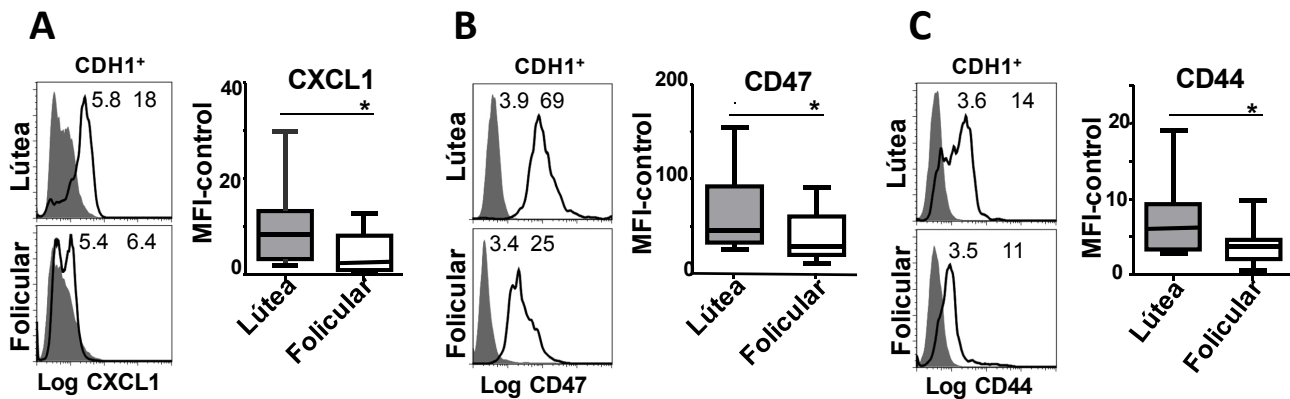


Figura 26: Expresión de CXCL1, CD47 y CD44 en células epiteliales de cérvix humano. Muestras de exudados cervicales de mujeres sanas en fase lútea (día 16-22) o folicular (día 11-15) se analizaron por citometría de flujo. Histograma representativo y cuantificación de la expresión de A) CXCL1, B) CD47 y C) CD44 en las células epiteliales (Cdh1+). Los números representan el MFI de cada pico respectivamente. Los datos son la resta del MFI de la muestra menos el MFI del isotipo control y se representan como gráfica de cajas percentil 90-10 de la MFI (n=30). Estadística: Test Mann-Whitney *p < 0,05.

2.11 Las hormonas sexuales femeninas no modifican la expresión de Cxcl1, Cd47 y Cd44 en otros epitelios: Vejiga e intestino

Las hormonas tienen un efecto sistémico sobre todo el organismo, por lo que nos preguntamos si el E2 y la P4 podían estar modificando la expresión de Cxcl1, Cd47 y Cd44 en el epitelio de otros órganos además del TRF. Para ello, analizamos su expresión en el epitelio de la vejiga y el intestino en ratonas tratadas con E2 o P4. Mientras que todas las moléculas se expresaron en el epitelio de la vejiga de forma basal, solo Cd47 y Cxcl1 lo hicieron en el intestino. La expresión de Cd44 en el epitelio intestinal se induce ante un proceso inflamatorio (Brazil et al., 2013), motivo por el que probablemente no la detectamos en condiciones basales. Pese a estas diferencias, en ningún caso se observó un efecto del E2 y la P4 sobre estas moléculas en el epitelio de vejiga e intestino (Figura 26A, B y C). Estos datos ponen en evidencia que el E2 disminuye la expresión de Cxcl1, Cd47 y Cd44 de forma específica en el epitelio del TRF inferior y no tiene ningún efecto sobre órganos de otros sistemas como el intestino o la vejiga.

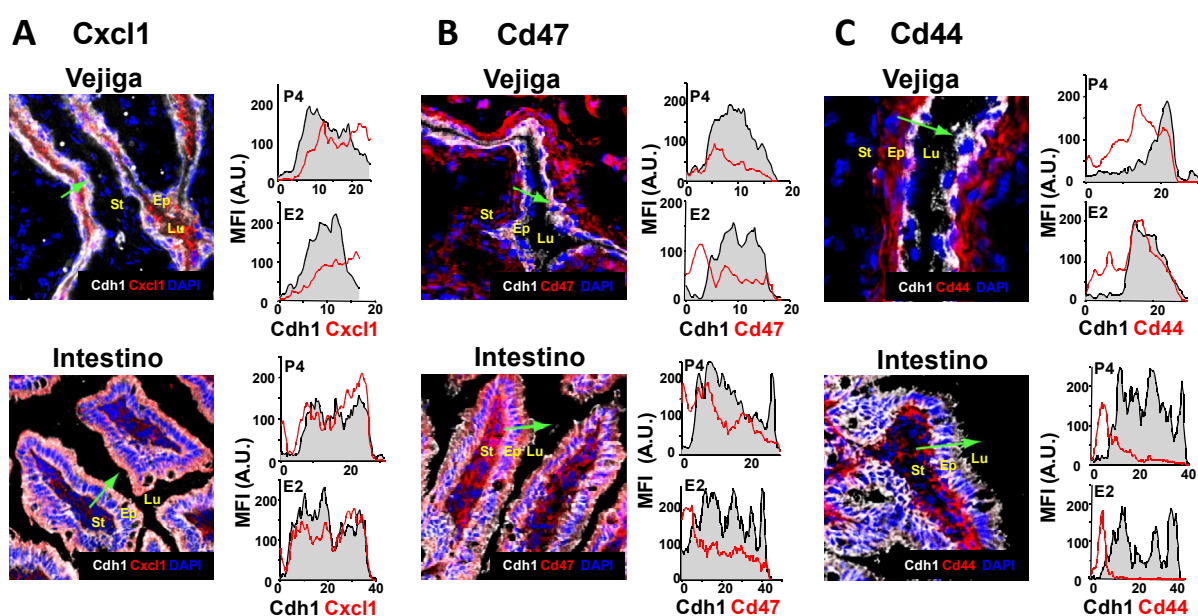


Figura 27: Expresión de Cxcl1, Cd47 y Cd44 en vejiga e intestino. Las ratonas fueron ovariectomizadas y tratadas con hormonas. Imágenes de microscopía confocal de ratonas tratadas con P4 y expresión (MFI) del perfil de línea en una sección del epitelio (Cdh1+) indicada con la flecha verde de A) Cxcl1, B) Cd47 y C) Cd44 en vejiga e intestino.

3. EFECTO DE LAS HORMONAS SEXUALES FEMENINAS SOBRE LA ACTIVIDAD CANDIDACIDAL DE LOS NEUTRÓFILOS

Nuestro estudio sobre la migración de los neutrófilos detectó una acumulación de los neutrófilos en la parte apical del epitelio, posiblemente debido a la inhibición del proceso de *detachment* por parte del E2. Según nuestra hipótesis, este mecanismo serviría para frenar la salida de neutrófilos al lumen vaginal, generando un ambiente inmunosupresor que favorecería la supervivencia de los espermatozoides durante la ovulación. Sin embargo, en las imágenes del TRF inferior tratado con E2 (Figura 12B), el epitelio del ectocérvix y fórnix se encuentra recubierto de neutrófilos en la parte exterior, y parece lógico pensar que desde esta posición (prácticamente tocando el lumen), los neutrófilos podrían alcanzar a los espermatozoides y eliminarlos. Para valorar la actividad de estos neutrófilos en la vagina y el posible efecto de las hormonas sobre ellos, llevamos a cabo una serie de experimentos *in vivo* e *in vitro* utilizando *C. albicans* como sensor de la capacidad de los neutrófilos para eliminar agentes exógenos.

3.1. El E2 retrasa la resolución de la infección con *C. albicans*

Con el objetivo de valorar la actividad de los neutrófilos, estudiamos el curso de la infección vaginal con *C. albicans* a lo largo del tiempo bajo los tratamientos hormonales, cuantificando el número de neutrófilos y de *C. albicans*. En las ratonas tratadas con P4 observamos una inducción de neutrófilos a 6 horas tras la infección (~25 veces), mientras que con E2 el pico de neutrófilos (~26 veces) se retrasó hasta las 48 horas (Figura 1A y 28A). Por tanto, el tratamiento hormonal tiene un efecto directo sobre la cinética del influjo de neutrófilos a la vagina (análisis de variancia [ANOVA] $P = 0,019$) tras la infección con *C. albicans*. En consecuencia, la carga fúngica también disminuyó drásticamente (reducción ~80%) 6 horas después de la infección en las ratonas tratadas con P4, aunque el E2 fue incapaz de limpiar la infección incluso tras la infiltración de neutrófilos (Figura

28B). Estos datos muestran que el E2 retrasa la resolución de la infección respecto a la P4, por tanto, el tratamiento hormonal también tiene un efecto directo sobre la actividad candidacidal en la vagina (análisis de variancia [ANOVA] $P = 0,015$).

Además, observamos que el aumento de neutrófilos en el lumen vaginal se corresponde con una disminución en la carga fúngica en las ratonas tratadas con P4 a las 6 horas, lo que sugiere que estas células son las responsables de la eliminación de la infección. En cambio, en el caso de las ratonas tratadas con E2 el número de UFC se mantiene alto a lo largo del tiempo, incluso a las 72 horas, momento en el cual los neutrófilos alcanzan su pico máximo en la vagina. En resumen, los neutrófilos podrían ser esenciales en la resolución de la infección bajo el tratamiento de P4, sin embargo, no tienen ningún efecto sobre la infección en ratonas tratadas con E2.

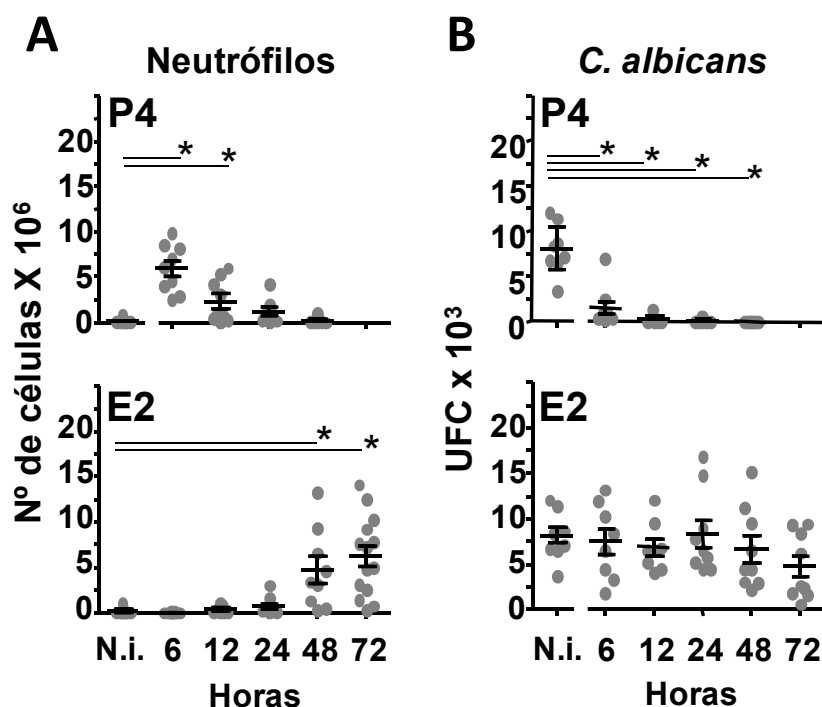


Figura 28: Neutrófilos y carga fúngica en el lavado vaginal. Las ratonas fueron ovariectomizadas, tratadas con hormonas e infectadas con *C. albicans*. A) Número de neutrófilos en el lavado vaginal. B) Número de UFC de *C. albicans* en el lavado vaginal (n=8-14). Los datos se muestran como media \pm SEM. Cada punto representa un ratón. Estadística: Test Mann-Whitney * $p < 0,05$. N.i.: no infectados

3.2. El E2 disminuye la capacidad candidacidal de los neutrófilos a través de Esr1

Para estudiar el papel de los neutrófilos en la eliminación de la infección de *C.albicans* en la vagina, eliminamos los neutrófilos *in vivo* mediante la inyección intravenosa del anticuerpo anti-Ly6g (clon 1 A8). Para validar el tratamiento con este anticuerpo, analizamos la sangre, el tejido y el lavado vaginal de las ratonas, donde no encontramos neutrófilos el día de la infección con *C. albicans* (Figura 29A). En las ratonas tratadas con P4, la ausencia de neutrófilos en el lumen vaginal impidió la eliminación de los hongos 12 horas después de la infección (Figura 29B), lo cual demuestra que los neutrófilos son esenciales para resolver la infección vaginal de *C. albicans* bajo este tratamiento. Por el contrario, durante el tratamiento con E2, la eliminación de neutrófilos no modificó el número de UFC en la vagina ni a 6 ni a 24 horas tras la infección, concluyendo que los neutrófilos que vemos adheridos al epitelio a 6 horas y en el lumen vaginal a 24 horas no juegan ningún papel en la respuesta contra *C.albicans*. Nuestros datos demuestran que el tratamiento con P4 favorece la actividad candidacidal de los neutrófilos, mientras que el tratamiento con E2 posee un efecto inhibitorio sobre estas células. Además, los ratones deficientes para el receptor alfa de estradiol (*Esr1*) fueron capaces de reducir (~6 veces) la infección (Figura 29C), lo que coincidió con una inducción de neutrófilos en la vagina (Figura 24A). Estos datos indican que el E2 tiene un papel relevante en el control de la actividad microbicida de los neutrófilos a través de su receptor alfa nuclear.

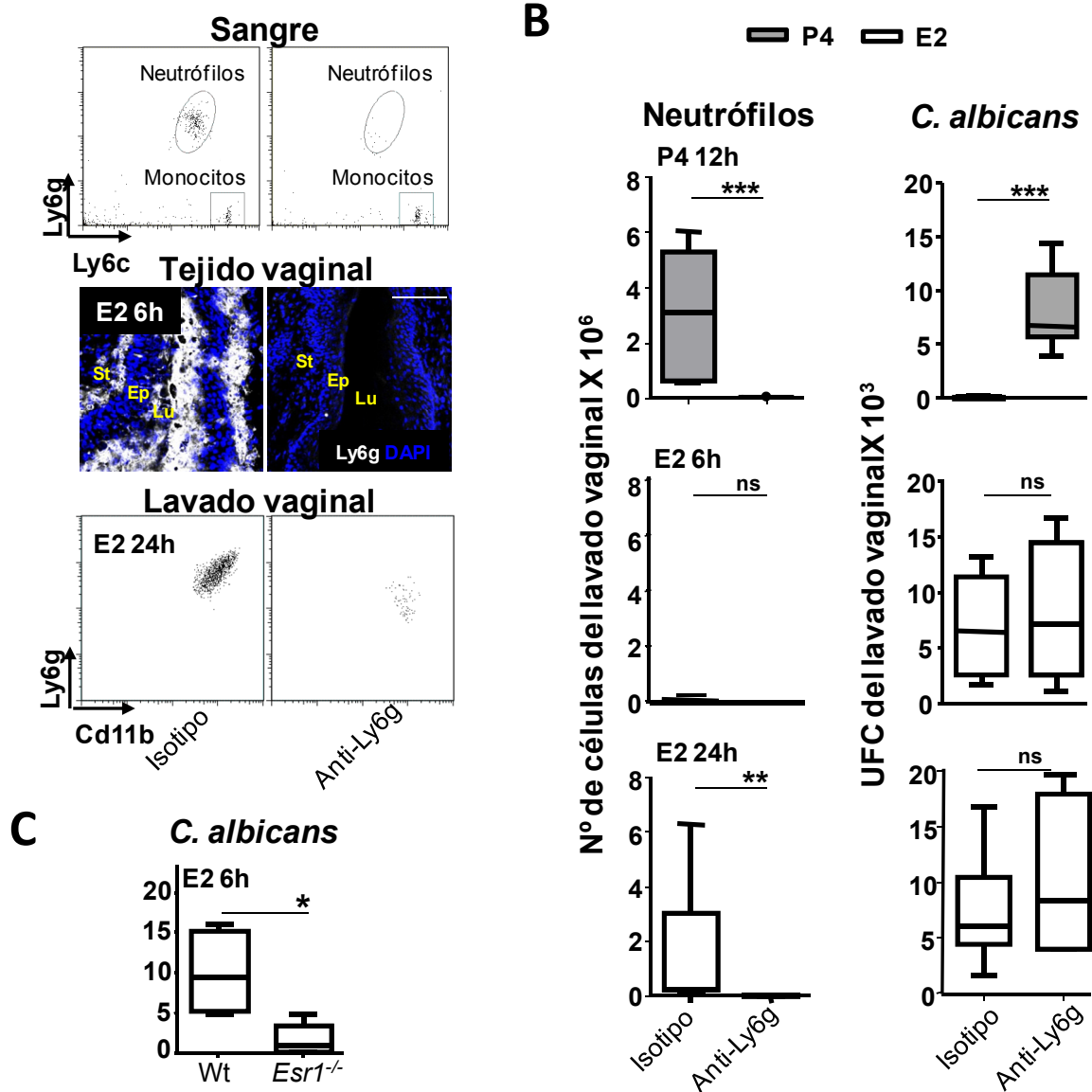


Figura 29: Eliminación de neutrófilos. Las ratonas fueron ovariectomizadas, tratadas con hormonas e infectadas con *C. albicans*. 24 horas antes de la infección se administró el anticuerpo Anti-Ly6g para depletar los neutrófilos. A) Comprobación de la eliminación de neutrófilos en sangre, tejido y lavado vaginal por citometría de flujo y microscopía confocal. B) Análisis de citometría de flujo del número de neutrófilos y UFC de *C. albicans* en ratonas tratadas con el anticuerpo Anti-Ly6g o el isotipo control (n=6-8). C) Número de UFC de *C. albicans* en el lavado vaginal a las 6 horas de infección en ratonas de fenotipo salvaje (Wt) y deficientes para el gen *Esr1* (n=5). Estadística: Test Mann-Whitney *p < 0,05. **p < 0,01 ***p < 0,001, ns: no significativo.

3.3. Actividad de los neutrófilos *ex vivo*

Como se ha visto anteriormente, los neutrófilos poseen receptor de E2 en la médula ósea, pero carecen de ellos en el tejido vaginal (Figura 19B). Este hecho nos llevó a hipotetizar que el efecto de *Esr1* sobre la actividad candidacidal de estas células en la vagina no debería suceder en el tejido, y podría tener un efecto durante su diferenciación en la médula ósea. Así, los neutrófilos vendrían precondicionados desde su origen antes de llegar al tejido, encontrándose en distintos estados de activación. Para comprobar esta hipótesis, estudiamos la actividad fagocítica y candidacidal de neutrófilos purificados de médula ósea de ratonas ovariectomizadas y tratadas con P4 ó E2 *in vivo*. En el ensayo de fagocitosis observamos por video microscopía a tiempo real la actividad fagocítica de los neutrófilos frente a *C. albicans* durante 3 horas (Figura 30A). Los neutrófilos de ambos grupos de ratonas fagocitaron un número similar de cándidas (P4: 2,9 cándidas/neutrófilo, E2: 3,1 cándidas/neutrófilo). Además, tampoco se observaron diferencias en su actividad candidacidal (Figura 30B), donde los neutrófilos de ambos tratamientos hormonales redujeron significativamente el número de UFC por igual (~65%). Estos datos demuestran que los neutrófilos no vienen condicionados de médula ósea y, por tanto, existen otros factores que regulan su actividad en la vagina. Para saber si los neutrófilos presentaban diferencias en su actividad candidacidal fuera del ambiente vaginal, purificamos estas células del lumen vaginal de ratonas tratadas con hormonas e infectadas con *C. albicans*. Los resultados mostraron que ambos tipos de neutrófilos redujeron por igual (~50%) el número de UFC (Figura 30C), sugiriendo que el efecto hormonal que regula la actividad de los neutrófilos se revierte cuando separamos estas células del ambiente vaginal; con lo cual, existe un factor en dicho ambiente que condiciona su actividad.

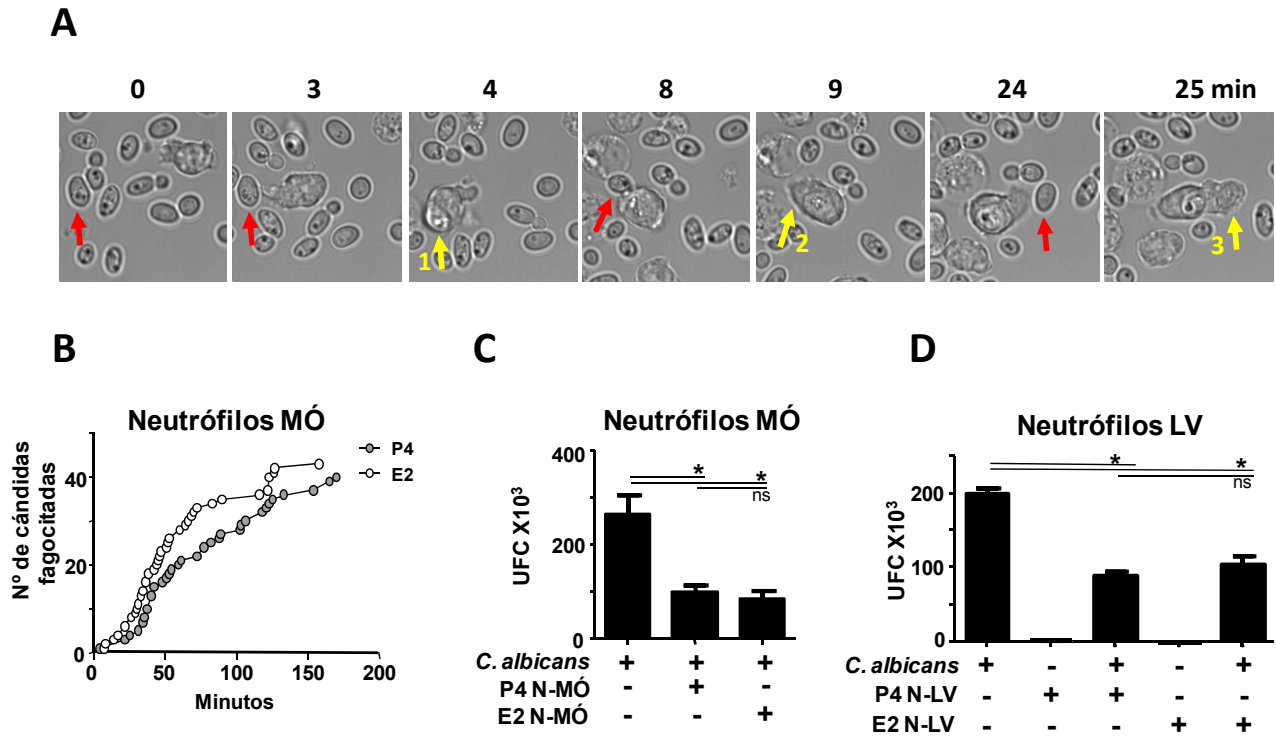


Figura 30: Ensayos con neutrófilos *ex vivo*. Neutrófilos de médula ósea de ratonas ovariectomizadas y tratadas y no tratadas con hormonas fueron purificados. A) Imágenes del ensayo de fagocitosis a diferentes tiempos mostrando el contacto (flecha roja) y la fagocitosis (flecha amarilla) de cada cándida por un mismo neutrófilo. B) Cuantificación del número total de cándidas fagocitadas por 14 neutrófilos en 3 horas. C) Ensayo candidacidal. D) Ratonas ovariectomizadas, tratadas con hormonas e infectadas con *C. albicans*. E) Neutrófilos purificados del lavado vaginal en un ensayo de candidacidal. Los datos se recogieron por triplicado y se muestra la media +SD de un experimento representativo de 4. Estadística: Test Mann-Whitney * $p < 0,05$. ns: no significativo. MÓ: Médula ósea, LV: Lavado Vaginal.

3.4. Búsqueda de los factores del ambiente vaginal que afecten a los neutrófilos

Recientemente se ha demostrado que el complejo Cxcl1/Sindacano-1 (*Sdc1*) liberado por Mmp7 produce la activación de los neutrófilos en el epitelio pulmonar inflamado (Gill et al., 2016). Puesto que nuestras ratonas tratadas con P4 presentaron una alta expresión de Cxcl1 en el epitelio del TRF en comparación con las ratonas tratadas con E2 (Figura 16), pensamos que Cxcl1 podría ser el factor que estaría activando a los neutrófilos en su salida al lumen vaginal bajo el tratamiento de P4. Para corroborar nuestra hipótesis, analizamos la actividad candidacidal de neutrófilos de médula ósea tratados con diferentes concentraciones de Cxcl1 múrido recombinante (Figura 31A).

Nuestro ensayo no mostró diferencias entre los neutrófilos tratados con Cxcl1 a diferentes concentraciones ni respecto a los no tratados, reduciendo en todas las condiciones el número de UFCs en un ~65%. Estos datos sugieren que Cxcl1 no tendría ningún efecto sobre la activación de los neutrófilos en la vagina en las condiciones usadas.

El heparán sulfato (HS) es un proteoglicano presente en la membrana plasmática y la matriz extracelular de los tejidos animales (Sarrazin et al., 2011). Recientemente se ha descrito que en la vagina ejerce un papel inhibitorio sobre la actividad candidacidal de los neutrófilos durante la VVC (Yano et al., 2017). Para averiguar si el E2 disminuye la capacidad candidacidal de los neutrófilos a través de este proteoglicano, realizamos una infección con *C. albicans* a ratonas tratadas con E2 y les administramos 5 unidades de Heparinasa III (enzima degradativa de HS). 24 horas tras la infección, analizamos el lavado vaginal y observamos que no hubo diferencias ni en el número de neutrófilos ni en el de UFC de *C. albicans* (Figura 31B y C). Por tanto, parece que el E2 no regula la actividad de los neutrófilos a través del HS en nuestras condiciones experimentales.

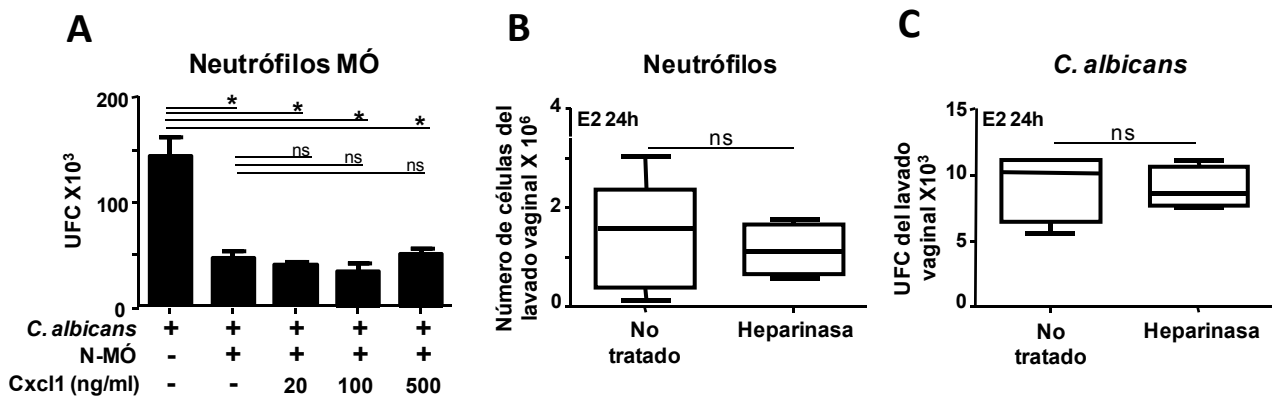


Figura 31: Factores del ambiente vaginal. A) Neutrófilos purificados de médula ósea, tratados con Cxcl1 *ex vivo* en un ensayo candidacidal. Las ratonas fueron ovariectomizadas, tratadas con E2 e infectadas con *C. albicans* (24 horas). 8 horas tras la infección se les administró Heparinasa III en la vagina. B) Número de neutrófilos en el lavado vaginal. C) Número de UFC de *C. albicans* en el lavado vaginal (n=5). Los datos se muestran como gráfica de cajas percentil 90-10. Estadística: Test Mann-Whitney; *p < 0,05 ns: no significativo.

4. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN CONSECUTIVA DE E2 Y P4 EN EL MODELO DE COMBINACIÓN HORMONAL

Hasta ahora hemos estudiado el efecto que tiene cada hormona por separado sobre los neutrófilos en el TRF. Sin embargo, en el ciclo femenino, ambas hormonas (E2 y P4) fluctúan secuencialmente de forma cíclica. Así, tras el pico de E2 de la fase pre ovulatoria, aparece un pico de P4 que se mantiene durante la fase lútea (Figura 5). Para conocer el efecto consecutivo del E2 y la P4 pusimos a punto el modelo de combinación de hormonas.

4.1. La P4 restaura la migración de neutrófilos en el lumen vaginal

24 horas tras el estímulo, analizamos el lavado vaginal de las ratonas tratadas hormonalmente y observamos que las ratonas sometidas a un tratamiento con dos dosis de E2 (EE) no presentaban neutrófilos en el lumen vaginal bajo ningún estímulo (Figura 32A), posiblemente debido al efecto de retención del E2 que mostramos anteriormente (Figura 11 y 28). Por el contrario, las ratonas a las que sólo se les administró una única dosis inicial de E2, y, posteriormente, el vehículo sin hormona (EV), mostraron un aumento significativo de neutrófilos (~16 veces) tras la infección con *C. albicans*, que resultó todavía mayor cuando se administró P4 tras el tratamiento con E2 (EP, ~32 veces). La tendencia de estos datos sugiere que la falta de E2 reestablece la salida de neutrófilos y que la P4 revierte el efecto anti migratorio del E2. Por otro lado y sorprendentemente, vimos que las ratonas sin infectar se comportaron de forma similar a las ratonas infectadas con *C. albicans* bajo los tres tipos de condiciones hormonales. Así, en el caso EV y EP, observamos un aumento de neutrófilos en el lumen vaginal respecto al EE (EV~8 veces, EP~11 veces) sin necesidad de estímulo. Estos datos ponen en evidencia que el ciclo de neutrófilos en la vagina tiene lugar en condiciones basales y es independiente de la infección de *C. albicans*. Por último, y de forma inesperada, la inseminación redujo el número de neutrófilos en comparación con las ratonas sin

infectar (EV (~3 veces) y EP (~3 veces)), lo cual sugiere que los espermatozoides podrían tener un efecto inhibitorio hasta ahora desconocido en la salida basal de neutrófilos al lumen vaginal.

A continuación, analizamos el número de neutrófilos en el ectocérvix y el fórnix, ya que son zonas de paso preferentes de los neutrófilos hacia el lumen vaginal en el modelo de hormona simple (Figura 12). Observamos una mayor acumulación de neutrófilos en el epitelio de las ratonas tratadas con EP respecto a las tratadas con EE, tanto en ectocérvix como en fórnix. Además, esta diferencia fue más notable en las ratonas sin infectar (~43 veces en ectocérvix y ~15 veces en fórnix) o ante el estímulo de espermatozoides (~54 veces en ectocérvix y ~50 veces en fórnix) que en el caso de la infección con *C. albicans*, donde las diferencias entre EP y EE se redujeron (~3 veces en ectocérvix y ~2 veces en fórnix). Por el contrario, las diferencias entre los tratamientos en el estroma fueron menores que en el epitelio, aunque se detectaron más neutrófilos en las ratonas sin infectar (~7 veces en ectocérvix y ~2 veces en fórnix) o tras la inseminación (~3 veces en ectocérvix y ~5 veces en fórnix) que en las infectadas con *C. albicans*, las cuales no mostraron diferencias entre tratamientos hormonales (Figura 32B). Esta menor diferencia ante la infección con *C. albicans* podría deberse al efecto de reclutamiento de neutrófilos que tiene este patógeno, como ya se observó en el modelo de hormona simple (Figura 2), o, por otro lado, a una salida de neutrófilos al lumen vaginal más rápida tras la administración de EP, observada en el análisis del lumen vaginal (Figura 19A). Por último, el aumento de neutrófilos observados en el epitelio del ectocérvix y el fórnix tras la inseminación, correlaciona con la ausencia de los mismos en el lumen vaginal (Figura 19A), por lo que los espermatozoides podrían estar bloqueando la salida de neutrófilos desde la parte apical del epitelio hasta el lumen. En resumen, al comparar estos datos con los observados en el tratamiento de hormona simple, donde la acumulación de neutrófilos es mucho mayor en el tratamiento con E2 que en el de P4 (Figura 12), observamos que la segunda dosis de E2, administrada junto con el estímulo, disminuye el reclutamiento de neutrófilos que sucede en la administración única de E2, razón por la cual no se detectarían tantos neutrófilos en el tejido en las ratonas tratadas con EE (Figuras 8 y 9 de

Material y métodos). Por el contrario, la P4 restauraría la salida de neutrófilos al lumen, pero de forma más lenta que en el modelo de hormona simple (donde sólo tarda 6 horas en sacarlos del tejido) (Figuras 11 y 12).

Para comprobar si la P4 restaura la TEpM de neutrófilos mediante el mecanismo descrito en los tratamientos de hormona simple, analizamos la expresión de Cxcl1, Cd47 y Cd44 en el ectocérvix y el fórnix de las ratonas tratadas con EE y EP. La figura 32C muestra como las ratonas EP tienen una mayor expresión de Cxcl1, Cd47 y Cd44 en el epitelio respecto a las ratonas EE, por tanto, pensamos que la P4 podría fomentar la salida de neutrófilos al lumen vaginal mediante la recuperación de la expresión de estas moléculas. Aunque aún no tenemos un estudio muestral suficiente para sacar conclusiones significativas, la expresión de Cxcl1, Cd47 y Cd44 parece dependiente de hormona e independiente del estímulo, al igual que en el modelo de hormona simple (Figuras 16D, 20D y 22D), lo que sugiere que ninguna de estas moléculas estaría implicada en la inhibición de la salida de neutrófilos al lumen observada bajo el estímulo de espermatozoides.

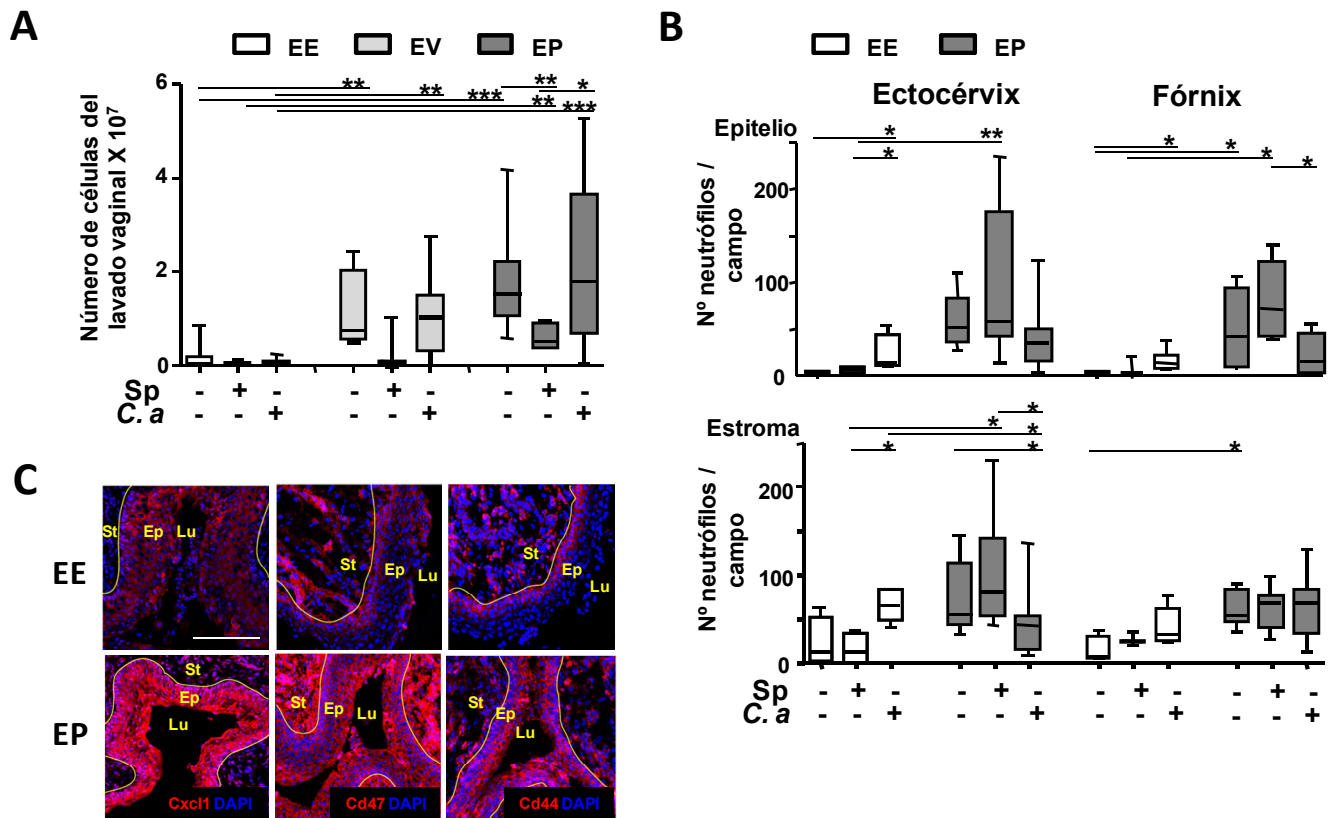


Figura 32: Migración de neutrófilos en el modelo de combinación de hormonas. Ratonas ovariectomizadas fueron tratadas con E2 e inseminadas o infectadas con *C. albicans*. Simultáneamente al estímulo, se administró una segunda dosis de tratamiento hormonal (E2, VH o P4) para mimetizar el ciclo ovárico. Las ratonas se sacrificaron 24 horas tras el estímulo. A) Análisis del número total de neutrófilos en el lavado vaginal. B) Cuantificación del número de neutrófilos / campo en el epitelio y el estroma de cada área anatómica del TRF. Los datos fueron recogidos de al menos 3 secciones diferentes en cada área y se expresan como gráfica de cajas percentil 90-10 de la MFI (n=5). C) Imágenes de microscopía confocal del ectocérvix mostrando la expresión de Cxcl1, Cd47 y Cd44 (rojo). La línea amarilla indica la lámina propia. Escala: 200 μ m. Estadística: Test Mann-Whitney *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001. Sp: espermatozoides, C.a: *C. albicans*

4.2. La P4 recupera la capacidad candidacidal de los neutrófilos

Los neutrófilos de ratonas tratadas con E2 no son capaces de eliminar la infección vaginal de *C. albicans* (Figura 29B). Para saber si la P4 es capaz de revertir también este efecto, analizamos el número de UFC en las ratonas EE, EV y EP. En este estudio escogimos un tiempo más largo (36 horas tras la infección), donde la salida y el número de neutrófilos en el lumen vaginal es similar en todos los tratamientos, ya que queríamos que el efecto en el número de UFC fuera debido a la capacidad candidacidal del propio neutrófilo, y no a un efecto diferencial en la migración. Así, observamos que 36 horas tras la infección, el número de neutrófilos en el lumen vaginal se igualó en las tres condiciones hormonales, sin embargo, esto no sucedió en el número de UFC. En el tratamiento de dos dosis de E2 (EE) se observó un número de UFC elevado, que se redujo notablemente (~3 veces) al administrar el vehículo en la segunda dosis (EV), y todavía más cuando se administró P4 (EP) en la segunda dosis (10 veces) (Figura 33A). Además, la administración de P4 mostró grandes diferencias respecto al vehículo (~3 veces), lo cual sugiere que la P4 es capaz de revertir el efecto inmunosupresor que ejerce el E2 en una infección de *C. albicans*.

A continuación, para probar si los neutrófilos son los responsables de la eliminación de las candidas en cada uno de los tratamientos hormonales, eliminamos los neutrófilos de las ratonas antes de la infección, y vimos cómo las ratonas tratadas con EE no mostraron diferencias tras la depleción de los neutrófilos. Por el contrario, las ratonas EP sin neutrófilos aumentaron el número de UFC de forma significativa (~4 veces) respecto a las ratonas EP con neutrófilos (Figura 33B). En resumen, estos datos demuestran que la dosis repetida de E2 (EE) fomenta el estado inactivo de los neutrófilos, mientras que la P4 tiene un efecto inmunoactivador en su capacidad candidacidal, siendo capaz de revertir el efecto inmunosupresor que ejerce el E2 sobre estas células.

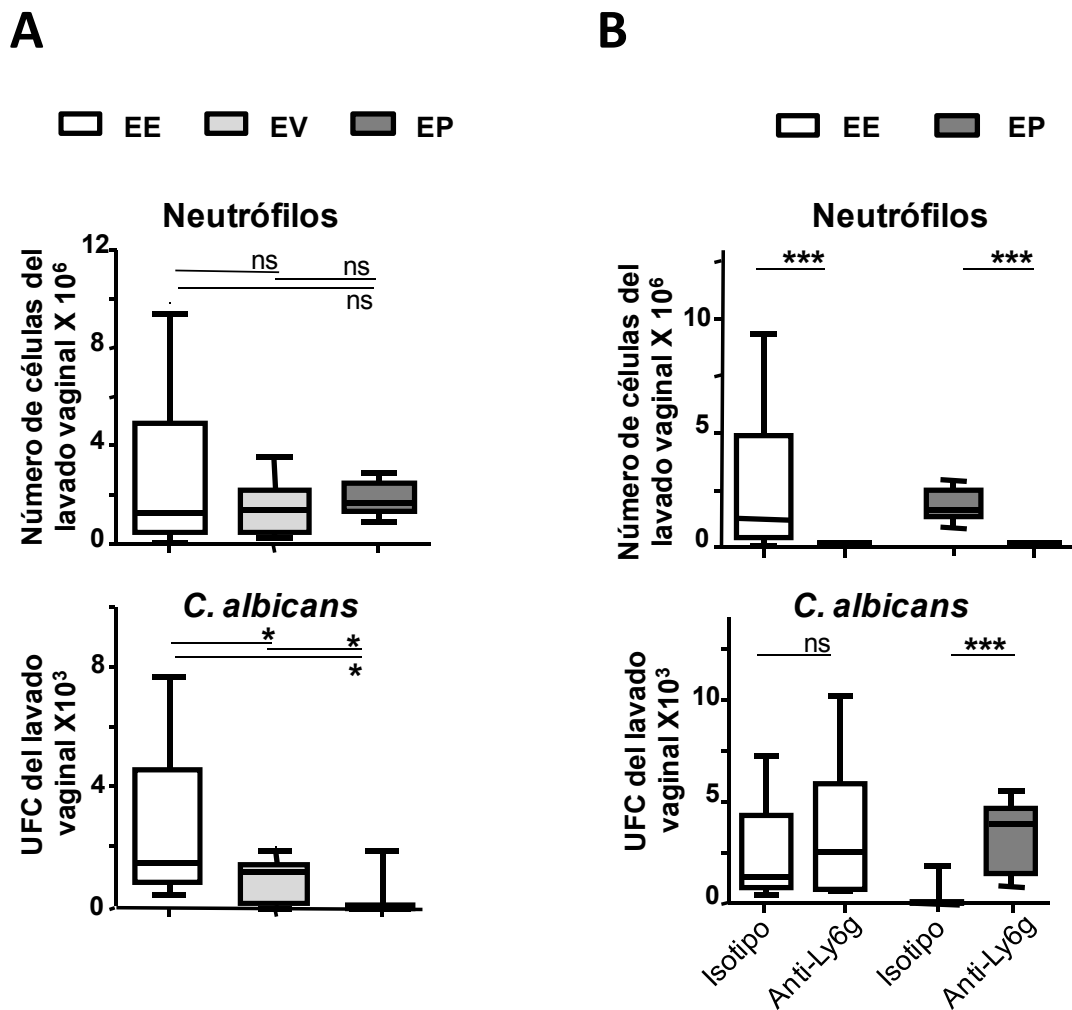


Figura 33: Carga fúngica y depleción de neutrófilos en el modelo de combinación de hormonas. Ratonas ovariectomizadas fueron tratadas con E2 e inseminadas o infectadas con *C. albicans*. Simultáneamente al estímulo se administró una segunda dosis de tratamiento hormonal (E2, VH o P4) para mimetizar el ciclo ovárico. Las ratonas se sacrificaron 36 horas tras el estímulo. A) Análisis del número total de neutrófilos y UFC de *C. albicans* en el lavado vaginal en ratonas tratadas con diferentes combinaciones de hormonas e infectadas con *C. albicans*. B) 24h antes de la infección con *C. albicans* se administró el anticuerpo Anti-Ly6g para depletar los neutrófilos y el isotipo control. Se analizó el número total de neutrófilos y UFC de *C. albicans* en el lavado vaginal. Los datos se muestran como gráfica de cajas percentil 90-10 de la MFI (n=6-8). Estadística: Test Mann-Whitney *p < 0,05, ***p < 0,001, ns: no significativo.

5. ESTUDIO DEL MODELO DE CICLO NATURAL

Finalmente, para comprobar si los mecanismos moleculares estudiados tienen lugar en el ciclo estral, pusimos a punto el modelo de ciclo natural. En este caso las ratonas se clasificaron en las diferentes fases de su ciclo reproductor natural (proestro, estro, metaestro y diestro) en base a la citología de sus frotis vaginales. Además, para comparar la respuesta a los diferentes estímulos, se realizó una inseminación o una infección vaginal con *C. albicans*. 12 horas tras el estímulo, se sacrificaron las ratonas y se analizaron las muestras (esquema en la Figura 9, “material y métodos”).

5.1 La expresión de Cd44 varía en el epitelio vaginal a lo largo del ciclo estral

Al analizar el contenido de neutrófilos en el lumen vaginal de las ratonas sin infectar, observamos que las ratonas en proestro y estro no presentaron neutrófilos, lo cual contrasta con el aumento de neutrófilos encontrado en las fases de metaestro y diestro (Figura 34A). Estos datos se corresponden con lo descrito en cada fase del ciclo (Sasaki et al., 2009; Stockard and Papanicolaou, 1917), y por tanto, validan nuestro modelo experimental. Además, tras la infección con *C. albicans* se obtuvo un número similar de neutrófilos en el lavado vaginal respecto a las ratonas sin infectar en todas las fases. Esto coincide con lo descrito en el modelo de combinación hormonal (Figura 32A) y sugiere que *C. albicans* no altera la TEpM basal de neutrófilos a la vagina, siendo incapaz de provocar una respuesta adicional de neutrófilos que se infiltran en el lumen vaginal. Tal y como observamos también en el modelo de combinación hormonal, el estímulo con espermatozoides provocó una disminución drástica en la TEpM basal de neutrófilos al lumen de ~4 veces durante el metaestro y ~8 veces durante el diestro, resultado que vuelve a evidenciar el efecto inhibitorio de la migración de neutrófilos que podrían poseer los espermatozoides. En resumen, todos estos datos corroboran la similitud que tiene nuestro modelo de hormonas exógenas con el ciclo natural, lo que ratifica los procedimientos realizados en la puesta a punto de este modelo.

A continuación, estudiamos la presencia de neutrófilos en el ectocérvix y el fórnix, donde detectamos una ausencia de neutrófilos en las fases de proestro y estro y una acumulación notable en metaestro y diestro en condiciones basales (Figura 34B). Además, esta acumulación se observó en dos zonas (estroma subepitelial y en el epitelio apical), al igual que vimos en los modelos de administración de hormonas exógenas (Figura 12B, 31B). Estas variaciones de neutrófilos en el tejido junto con los cambios observados en el epitelio (grueso y con estrato córneo en proestro, y estro y más fino en metaestro y diestro), vuelven a validar nuestra clasificación de las diferentes fases del ciclo estral, ya que concuerdan de nuevo con lo ya descrito (Sasaki et al., 2009; Stockard and Papanicolaou, 1917). Además del contenido de neutrófilos, quisimos ver la expresión de Cxcl1, Cd47 y Cd44 en el ectocérvix y el fórnix en el modelo de ciclo natural. Hasta ahora hemos explorado la expresión de Cd44 y hemos observado una marcada expresión en el epitelio del ectocérvix en metaestro y diestro, que desaparece por completo de las capas más superficiales del epitelio durante el proestro y el estro, conservándose únicamente en la capa basal o capa germinativa (Figura 34B). Este patrón de expresión de Cd44 encaja con el observado en los demás modelos y se ajusta a nuestra hipótesis, donde proponemos que el E2 (hormona característica del proestro y estro) disminuiría la expresión de Cd44, mientras que la P4 (hormona característica del metaestro y diestro) restauraría la expresión de esta molécula, favoreciendo el *detachment* y la salida de neutrófilos al lumen vaginal.

5.2 Efecto del ciclo estral sobre la carga fúngica de *C. albicans*

Para estudiar la capacidad microbicida de los neutrófilos en las distintas fases del ciclo ovárico, realizamos una infección vaginal con *C. albicans* y analizamos la carga fúngica 12 horas después. Así, vimos que durante el proestro el número de UFC de *C. albicans* encontrado en la vagina fue bastante elevado. Sin embargo, este número resultó mucho menor cuando la infección se realizó en estro (~2 veces) o metaestro (~4 veces), desapareciendo casi por completo cuando la infección se realizó en diestro (~15 veces) (Figura 34C). En líneas generales, el número de UFC se correlaciona de forma inversa con el número de neutrófilos encontrados en el lumen vaginal durante las diferentes etapas del ciclo (Figura 21A), lo cual sugiere que los neutrófilos son importantes en la resolución de la infección durante el ciclo estral. La ausencia de neutrófilos durante el proestro y estro convertiría estas fases en los momentos más susceptibles ante una infección con *C. albicans*, mientras que su salida al lumen durante el metaestro y diestro provocaría un periodo con una mayor resistencia inmune ante este patógeno.

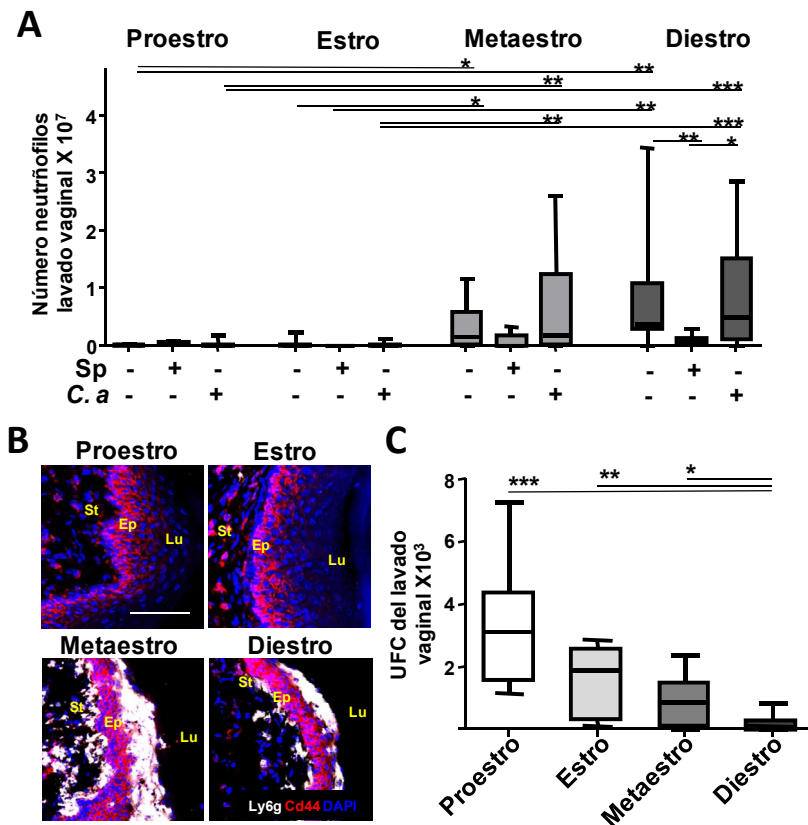


Figura 34: Modelo de ciclo natural. Ratonas de 6-8 semanas de edad y ciclo estable, fueron clasificadas según la fase de su ciclo estral por frotis vaginal y posteriormente fueron inseminadas o infectadas con *C. albicans* (12 horas). A) Análisis del número de neutrófilos en el lavado vaginal. B) Imágenes de microscopía confocal del ectocervix en cada fase indicada del ciclo reproductor mostrando los neutrófilos (blanco) y la expresión Cd44 (rojo). Escala: 200 μ m. C) Análisis del número total de UFC de *C. albicans* en el lavado vaginal. Los datos se muestran como gráfica de cajas percentil 90-10 (n=6-8). Estadística: Test Mann-Whitney *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001. Sp:espermatozoides, C.a:*C. albicans*

Discusión

En 1917 George Papanicolaou describió variaciones en la morfología de las células epiteliales y el número de leucocitos en la vagina ligadas al ciclo ovárico (Stockard and Papanicolaou, 1917). Posteriormente, observó que durante la fase folicular los neutrófilos desaparecen del lumen vaginal a la vez que aumenta la concentración de E2. Tras la ovulación, los neutrófilos vuelven a infiltrarse en la vagina a lo largo de la fase lútea, coincidiendo con el pico de P4. La hipótesis actual sostiene que las hormonas sexuales femeninas podrían gobernar este fenómeno, sin embargo, aunque ya ha pasado un siglo desde este hallazgo, poco se sabe sobre los mecanismos que dirigen esta migración de neutrófilos al lumen vaginal. Con el objetivo de conocer los detalles de este mecanismo y la influencia de las hormonas sexuales femeninas en este proceso, hemos puesto a punto tres modelos murinos de ciclo ovárico y además hemos estudiado la respuesta a espermatozoides o a patógenos como *C. albicans*. Gracias a esta tecnología hemos descubierto varios mecanismos moleculares como la quimioquina Cxcl1 y las moléculas de adhesión Cd47 y Cd44, cuya expresión en el epitelio se encuentra regulada por las hormonas sexuales femeninas a lo largo del ciclo ovárico y que podrían tener un papel relevante en la migración de neutrófilos a la vagina. Nosotros proponemos que el E2 apagaría la expresión de estas moléculas durante la ovulación, evitando la migración de los neutrófilos al lumen vaginal. Por el contrario, la P4 aumentaría la expresión de estas moléculas, restaurando el flujo de neutrófilos al lumen vaginal para recuperar la inmunidad durante la fase lútea. Además, también sugerimos que las hormonas podrían tener un efecto indirecto sobre la actividad de los neutrófilos, así el E2 facilitaría un ambiente inmunosupresor, mientras que la P4 tendría un efecto inmunoactivador recuperando la actividad de estas células. Todos estos fenómenos generarían un ambiente favorable para la presencia de espermatozoides en el TRF durante la ovulación (pico de E2), que garantizaría las funciones reproductoras. Por otro lado, tras la ovulación, la P4 recuperaría las funciones inmunes, asegurando la defensa frente a posibles patógenos oportunistas o de transmisión sexual a lo largo de la fase lútea.

1. Papel de las hormonas sexuales femeninas en la migración transepitelial de los neutrófilos

El TRF tiene que coordinar la respuesta inmune con las funciones reproductoras sin comprometer la defensa frente a microorganismos patógenos que acechan la mucosa vaginal. Para desempeñar esta tarea, las hormonas coordinan la reproducción con la inmunidad para generar un ambiente vulnerable durante la ovulación, y así facilitar la presencia y viaje de los espermatozoides (alógenicos) hasta el óvulo para que ocurra la fecundación y el desarrollo del feto (semialogénico). Esta “ventana de vulnerabilidad” ha sido descrita (Wira et al., 2015) como un momento óptimo para la reproducción, aunque también proporciona una oportunidad para que ciertos patógenos como el VIH (Wira and Fahey, 2008) o el VPH entren e infecten el TRF. En nuestro modelo de infección vaginal con ratonas ovariectomizadas hemos podido ver cómo esta vulnerabilidad se desarrolla bajo el tratamiento de E2, lo que concuerda con trabajos anteriores (Fidel et al., 2000; Lasarte et al., 2016). Además hemos observado que esta “ventana de vulnerabilidad” se genera gracias a la acción del E2 sobre el epitelio, lo que genera, entre otros eventos (Wira and Fahey, 2008), el bloqueo de la migración de los neutrófilos a través del epitelio y sus actividades efectoras. Todos estos datos podrían explicar por qué la toma de anticonceptivos y terapias hormonales de remplazo basadas en E2 predisponen a las mujeres a padecer infecciones vaginales.

Los neutrófilos protegen al TRF de posibles patógenos oportunistas provenientes de desequilibrios en la microbiota o infecciones de transmisión sexual. Nuestros datos muestran cómo el E2 (concentración pre ovulatoria) provoca una retención de neutrófilos en el tejido vaginal, posiblemente mediante la disminución de la expresión de moléculas epiteliales que participan a diferentes niveles de la TEpM. Por un lado, el E2 interrumpe el gradiente (estroma: epitelio) de la quimioquina Cxcl1, lo cual “distraería” al neutrófilo en su camino hacia el epitelio tras su extravasación y por tanto ralentiza la llegada de los neutrófilos al lumen (Lasarte et al., 2016). Paralelamente, también hemos visto que el E2 disminuye la expresión de Cd47 en la parte basal del

epitelio. De esta manera, la ausencia de esta molécula dificultaría al neutrófilo moverse entre las uniones epiteliales, lo que explicaría las acumulaciones de neutrófilos observadas en el espacio subepitelial. Así, el E2 ajustaría la expresión de Cd47 en el epitelio basal para modular la velocidad de los neutrófilos (Parkos et al., 1996). Pese a estos inconvenientes, muchos de los neutrófilos consiguen cruzar y llegar a la parte apical del epitelio, seguramente debido a que Cd47 no desaparece por completo. Una vez en la parte apical, los neutrófilos quedan retenidos, lo que coincide con una drástica disminución de Cd44 en esta zona del epitelio. Cd44 se encuentra implicada en la liberación de los neutrófilos al lumen o *detachment* (Brazil et al., 2010). Además, nuestro ensayo de TEpM *in vitro* demuestra que Cd44 es esencial en la migración de neutrófilos a través del epitelio vaginal. Por tanto, la desaparición de esta molécula en la parte apical del epitelio del ectocérvix y del fórnix impediría este proceso, lo que provocaría las acumulaciones de neutrófilos observadas en estas zonas. En resumen, el E2 utilizaría una estrategia combinada en diferentes pasos de la TEpM para impedir la migración de neutrófilos en la vagina. Así, la suma de sus efectos sobre estos tres puntos clave en la migración aseguraría la ausencia de neutrófilos en el lumen vaginal durante la fase ovulatoria. Por el contrario, en el modelo de combinación hormonal hemos demostrado que la P4 restablece la migración de neutrófilos al lumen vaginal, coincidiendo con una recuperación del gradiente de Cxcl1 y la expresión de Cd47 y Cd44 en el epitelio, que posiblemente sería la responsable de la restauración del flujo de neutrófilos a la luz vaginal.

Nuestro modelo de infección vaginal con hormonas simples sugiere que durante la fase folicular los neutrófilos quedarían retenidos en el epitelio apical del ectocérvix y fórnix ante una inseminación o un estímulo infeccioso. Desde allí, estas células estarían preparadas para invadir rápidamente el lumen vaginal al final de la ovulación y restaurar la inmunidad ausente durante este tiempo. A parte de su papel de defensa, estas acumulaciones de neutrófilos podrían ejercer otras funciones homeostáticas desde estas zonas del epitelio como la reparación del daño tisular (Sumagin et al., 2016) producido tras el posible apareamiento durante el estro o la rotura del estrato córneo, al

igual que sucede en la degradación del endometrio durante la menstruación (Lathbury and Salamonsen, 2000).

De forma adicional, hemos visto que el E2 inhibe la migración de neutrófilos a través del receptor de estradiol α (Esr1), expresado en el estroma y el epitelio del tejido vaginal. Por el contrario, la falta de expresión de Esr1 y Pgr en los neutrófilos del TRF (Lee et al., 2015) pone en evidencia la importancia del epitelio en todo este proceso y el papel indirecto de los neutrófilos en su retención en la parte basal y apical. Además, esto explicaría por qué las moléculas de la TEPM del propio neutrófilo (Cxcr2, Mmp9, Cd11b y Sirp α), al contrario que las moléculas del epitelio (Cxcl1, Cd47 y Cd44), no responden a los tratamientos hormonales. Esta regulación queda reflejada en el ratón *Cxcr2*^{-/-}, donde hemos visto que las hormonas coordinan el eje de quimioquinas Cxcr2-Cxcl1 mediante la modificación de la expresión del ligando (Cxcl1) en el tejido vaginal, pero sin alterar la expresión del receptor Cxcr2 presente en el neutrófilo.

Varios órganos como el intestino, la vejiga y los pulmones tienen una presencia basal de neutrófilos que aumenta en caso de infección o daño. Por este motivo, expresan constitutivamente bajas concentraciones de CXCL1 y CD47 en el epitelio (Liu et al., 2001; Swee et al., 2008). Las señales inflamatorias aumentan la expresión de CXCL1 (Becker et al., 1994), CD47 (Liu et al., 2001) y CD44v6, que sólo se observa en estas condiciones (Brazil et al., 2013) para favorecer la TEPM de neutrófilos, evitando así el daño que estas células podrían ocasionar en los tejidos. Sin embargo, en el TRF la infiltración de neutrófilos debe estar sincronizada con el ciclo ovárico. Nuestros datos apoyan la idea de que las hormonas sexuales actúan sobre la TEPM de neutrófilos de forma basal e independientemente de la inseminación o la infección, dando prioridad a las funciones reproductoras frente a la inmunidad durante la ovulación. Así, la expresión de estas moléculas no dependería de estímulos infecciosos sino de la fase del ciclo reproductor. Este mecanismo, aún poniendo en riesgo la mucosa femenina durante la ovulación, favorecería la reproducción para preservar la especie y la dotación génica individual.

Actualmente sabemos muy poco sobre la TEpM en el TRF humano, aunque se ha descrito la presencia de CXCL1 en las secreciones y el tejido vaginal (Cotreau et al., 2007; Deruaz and Luster, 2015) y de CD44 en el epitelio cervical (Dall et al., 1994). La expresión específica de CD47 en el TRF humano es desconocida; sin embargo, su función como señal de reconocimiento de lo “propio” (Oldenborg et al., 2000) la convierte en una molécula ubicua que se expresa en la mayoría de poblaciones celulares (Reinhold et al., 1995). Nuestros datos corroboran que CXCL1, CD47 y CD44 se expresan en el epitelio del cérvix humano y que además esta expresión varía a lo largo del ciclo menstrual, al igual que observamos en el modelo de ratón. Por lo tanto, pese a las diferencias histológicas entre ambas especies, este podría ser un mecanismo interespecífico donde las hormonas sexuales gobernarían la expresión de estas moléculas, y en consecuencia, la salida de neutrófilos al lumen vaginal.

2. Reclutamiento basal de neutrófilos al tejido vaginal

Los neutrófilos se extravasan a diferentes tejidos para su eliminación en condiciones homeostáticas (Casanova-Acebes et al., 2013; Furze and Rankin, 2008). En el TRF la TEpM de los neutrófilos también ocurre de forma basal sin necesidad de estímulos inflamatorios. Así lo observamos en el modelo de ciclo natural, donde el metaestro y diestro presentan una infiltración de neutrófilos en el lumen vaginal en condiciones basales, acorde con lo ya descrito (Sonoda et al., 1998). Curiosamente, esta migración se interrumpe en nuestro modelo de hormona simple, donde es necesario generar un estímulo para que los neutrófilos se extravasen a la vagina. De forma controvertida, el modelo de combinación hormonal muestra que en las ratonas sometidas a dosis continuas de E2 no hay apenas infiltración de neutrófilos; sin embargo, la retirada del E2 provoca un reclutamiento y salida de neutrófilos al lumen de forma basal, que se acelera con la administración de

P4. Estos datos suponen que la acción prolongada de E2 inhibiría la extravasación y la salida de neutrófilos al lumen, con lo cual, se necesitan fluctuaciones en la concentración de E2 y su alternancia con la P4 para regular la entrada y salida de neutrófilos a la vagina en condiciones basales.

El estrato córneo (SC), capa de queratinocitos de la superficie del epitelio vaginal típica del estro, podría jugar un papel importante en la llamada de neutrófilos, como ocurre en la inflamación estéril que se produce en pacientes con psoriasis, donde se ha visto que los queratinocitos de la epidermis, en su proceso de diferenciación, atraen a los neutrófilos a través de IL-1, IL-8 y la subunidad del complemento C3 (Fincham et al., 1988). Estos neutrófilos, atrapados bajo el estrato córneo, inducen la hiperproliferación de los queratinocitos y contribuyen al desarrollo de las lesiones psoriáticas (Terui, 2000). En base a estos estudios podríamos pensar que la diferenciación del estrato córneo llamaría a los neutrófilos en el TRF. Así, en las fases finales de proliferación de esta capa, los queratinocitos más especializados expresarían moléculas que atraerían a los neutrófilos para finalizar el proceso de diferenciación. Esto coincidiría con la disminución drástica de E2 tras la ovulación y el posterior aumento de la P4, la cual mediante la restauración de las moléculas de la TEpM (Cxcl1, Cd47 y Cd44) facilitaría el cruce de los neutrófilos a través del epitelio. Al finalizar este cruce los neutrófilos contribuirían a la rotura del SC, lo que conllevaría el final del estro y el comienzo de un nuevo metaestro.

3. Respuesta de neutrófilos frente a los espermatozoides

Los espermatozoides son células antigénicas capaces de generar una respuesta inmune innata y adaptativa (Brazdova et al., 2016; Lasarte et al., 2013a; Lasarte et al., 2016). En este trabajo hemos visto que, bajo el tratamiento de P4, los espermatozoides desencadenan una migración de neutrófilos al cérvix, lo cual concuerda con lo descrito anteriormente (Lasarte et al., 2016; Phillips et al., 1977). Lo sorprendente de este hecho es que la respuesta temprana (6 horas) tras la inseminación mostró una inducción parecida a la respuesta contra *C. albicans*, sugiriendo que los espermatozoides por sí solos y a tiempos cortos presentan una respuesta similar a un microorganismo patógeno como un hongo. Esta alta capacidad reclutadora podría representar un problema para la reproducción, motivo por el cual el plasma seminal que acompaña a los espermatozoides ejercería funciones inmunosupresoras para proteger al gameto del sistema inmune femenino (Robertson and Sharkey, 2016). Por el contrario y de forma inesperada, observamos que los espermatozoides inhibieron la salida basal de neutrófilos en el modelo de combinación de hormonas y ciclo natural bajo todos los tratamientos y fases. Este hecho contradice lo visto anteriormente en el modelo de hormona simple y evidencia un mecanismo hasta ahora desconocido mediante el cual los espermatozoides por sí solos podrían retener las funciones de defensa sin ayuda del plasma seminal. Observando las diferencias entre los modelos podríamos suponer que la interacción de E2 y P4 es importante para que se produzca esta inhibición; no obstante, nuevos estudios son necesarios para elucidar las claves de este mecanismo y sus consecuencias clínicas.

4. Papel de los neutrófilos en la candidiasis vaginal.

A pesar de la importancia de los neutrófilos en las infecciones fúngicas, su papel en la protección de la candidiasis vaginal es controvertido. El grupo de Fidel demostró que la inoculación intravaginal de *C. albicans* en mujeres voluntarias sanas (14 en fase folicular y 5 en fase lútea) promueve una infiltración de neutrófilos a la vagina, que lejos de resolver la infección, se correlacionó con el agravamiento de sus síntomas (Fidel et al., 2004). Además, tras depletar los neutrófilos en ratonas tratadas con E2, mostró que la ausencia de estas células no tenía ninguna relevancia en el curso de la infección, sugiriendo que los neutrófilos no tienen un papel protector en la candidiasis vaginal. Sus datos apoyan la teoría de que el factor clave en la gravedad de la infección con *C. albicans* es el cambio en el estadio morfológico de la cándida de conidia a hifa (Peters et al., 2014). Nuestros datos obtenidos en el modelo de hormonas exógenas corroboran en parte los datos de Fidel, ya que observamos que los neutrófilos de las ratonas tratadas con E2 no presentan actividad candidacidal; a pesar de ello, hemos demostrado que los neutrófilos de las ratonas tratadas con P4 sí presentan un papel importante en la infección fúngica. Además, esta hormona es capaz de recuperar la capacidad candidacidal de los neutrófilos cuando se administra tras el E2 en el modelo de combinación hormonal, probablemente debido a su efecto anti estrogénico (Mauvais-Jarvis et al., 1987). Por último, hemos visto que las ratonas infectadas durante el metaestro y diestro (fases con una alta cantidad de neutrófilos en el lumen vaginal) limpian la infección de *C. albicans* en cuestión de horas, lo cual sugiere que los neutrófilos vaginales durante el ciclo natural poseen un papel protector contra *C. albicans*. Todos estos hallazgos nos llevan a pensar que, probablemente, los datos del grupo de Fidel referentes a la escasa actividad candidacidal de los neutrófilos estarían enmascarados por una escasa muestra de mujeres en fase lútea y por el efecto inmunosupresor del E2. Este grupo usa dosis de hasta 100 veces la concentración fisiológica de E2 en sus modelos (Fidel et al., 2000), que como se ha demostrado recientemente, podría reducir la eficacia de los neutrófilos en el reconocimiento de *C. albicans* a través del ambiente vaginal. En el trabajo de Yano et al. se

demuestra cómo los neutrófilos mantienen su capacidad de matar *ex vivo* cuando se les separa del ambiente vaginal (Yano et al., 2017). Curiosamente, se observa cómo las ratonas de cepas susceptibles a E2 (C3H/HeN y C57BL/6) presentan un factor en el medio vaginal que inhibe la capacidad candidacidal de los neutrófilos, cosa que no se observa en las ratonas resistentes a E2 (CD1). Este factor serían los residuos de heparán sulfato (HS), abundantes en el lumen vaginal, que impedirían el contacto entre el neutrófilo y el hongo a través del bloqueo de Cd11b. Nuestros ensayos de actividad candidacidal y fagocitosis demuestran que, efectivamente, los neutrófilos de ratonas tratadas con E2 y P4 matan igual cuando los aislamos del ambiente vaginal (*ex vivo*), lo cual concuerda con lo visto por Yano et al., donde la actividad intrínseca del neutrófilo no se encuentra alterada (Yano et al., 2017). Aunque no hemos podido demostrar que el HS tenga un efecto en nuestro modelo *in vivo*, no se puede descartar este u otros factores que puedan reducir la capacidad candidacidal de los neutrófilos bajo el control del E2. Por último, hemos demostrado que el E2 inhibe la capacidad candidacidal de los neutrófilos a través del receptor Esr1, al igual que observamos en el proceso de migración, lo cual refuerza la hipótesis de la existencia de un factor procedente del epitelio vaginal que inhiba las función candidacidal de los neutrófilos.

5. Modelos de ciclo ovárico

Pese a que este trabajo se ha realizado a través de tres modelos de ciclo ovárico distintos, debemos tener en cuenta las limitaciones que conlleva utilizar un modelo en roedores. Debido a la imposibilidad de poner en marcha toda esta metodología en humanos, los modelos hechos en ratón son de alta utilidad; no obstante, tienen un ciclo reproductor diferente al del humano. Por lo tanto, hay que tener en cuenta la dificultad a la hora de extrapolar los datos de un ciclo estral a un ciclo menstrual. Una de las principales diferencias radica en la estructura del SC. Las mujeres poseen un estrato córneo sin apenas queratina y permeable (Anderson et al., 2014), mientras que las ratonas

poseen un estrato córneo grueso y totalmente queratinizado, más parecido a la piel, que funciona de barrera impermeable durante el estro (Goldman et al., 2007). Esta diferencia estructural podría interferir en nuestra hipótesis acerca de la llamada de neutrófilos a través de la diferenciación queratinocítica del SC o al papel de los neutrófilos en esta zona. Además, el grosor del epitelio del TRF inferior no varía a lo largo del ciclo menstrual como ocurre con el ciclo estral (Wira et al., 2015), lo cual podría ser otro factor a tener en cuenta en el estudio del efecto hormonal sobre las moléculas implicadas en la TEPM. Pese a ello, gracias a las muestras de exudado cervical de mujeres sanas, hemos visto cómo la expresión de CXCL1, CD47 y CD44 se modifica a lo largo del ciclo ovárico, sugiriendo que tal vez este mecanismo también podría tener lugar en humanos. No obstante, la relación de la expresión de estas moléculas con la presencia de neutrófilos en el TRF humano requiere de técnicas más agresivas y complejas que dificultan este estudio.

Otra de las diferencias que se observan entre el modelo roedor y el humano es que la mucosa vaginal del ratón no tiene *C. albicans* de forma natural en la microbiota y además es difícilmente infectable por este hongo (Cassone and Sobel, 2016). Esto requiere de dosis fúngicas muy altas para conseguir que las ratonas se infecten, o utilizar estrategias que aumenten la susceptibilidad a candida como, por ejemplo, la administración de E2 u otras drogas inmunosupresoras (Conti et al., 2014). Es por ello que el modelo actual de infección vaginal murino está basado en un tratamiento con E2 (Fidel et al., 2000) (Yano and Fidel, 2011), el cual facilita el curso de la infección en ratonas ya que, entre otras cosas, bloquea la producción de la respuesta Th17 (Lasarte et al., 2013a). Sin embargo, como hemos explicado anteriormente, el efecto del E2 podría enmascarar la acción real que tienen los neutrófilos en la vagina y su papel en la candidiasis en las distintas etapas del ciclo ovárico.

Por otro lado, el modelo de ratón nos ofrece otras ventajas como la manipulación del ciclo hormonal y la modificación genética que nos permite el estudio preciso de la depleción de moléculas concretas como los que hemos utilizado en este trabajo (*Cxcr2^{-/-}* o el *Esr1^{-/-}*). Además, gracias a los modelos de ratonas ovariectomizadas y hormonas exógenas, hemos conseguido demostrar el efecto

real que tiene cada hormona sobre el epitelio y la migración de neutrófilos, demostrando las hipótesis actuales que correlacionan el número de neutrófilos con las concentraciones hormonales o las fases del ciclo en modelos naturales (Bouman et al., 2001; Nowak et al., 2016). Además, cabe destacar que pese a ser modelos artificiales y en algunos casos contradictorios, el uso de tratamientos con hormona simple y el combinado nos ha permitido entender la necesidad de la alternación de las hormonas para coordinar la defensa y la reproducción y poder explicar los mecanismos moleculares que tienen lugar durante en el ciclo reproductor natural. Por otro lado, el estudio de las hormonas sobre el TRF durante el ciclo ovárico natural tiene la enorme dificultad de controlar los tiempos de cada fase del ciclo estral y la dificultad en la clasificación de cada ratona en cada fase antes y después de una infección o inseminación debido a las grandes variaciones individuales de la duración de los ciclos (de 4 a 6 días en el ratón), lo que dificulta la investigación de mecanismos moleculares más precisos. Finalmente, el estudio de la respuesta al semen en el modelo múrido también presenta ciertos inconvenientes debido a la dificultad técnica que representa conseguir semen completo de ratón (Tecirlioglu et al., 2002). Es por ello que en la inseminación utilizamos espermatozoides aislados del conducto deferente, lo cual nos ha permitido estudiar el efecto antigénico específico de estas células, que aunque no se enmarque en un contexto de inseminación natural ha generado resultados sorprendentes y novedosos.

6. Perspectivas de futuro

Nuestros resultados subrayan la necesidad de profundizar más en el modelo de ciclo natural, que pese a presentar limitaciones técnicas puede arrojar información real sobre algunos mecanismos descritos en este trabajo. Uno de los estudios más necesarios sería conocer los mecanismos que utiliza el espermatozoide para inhibir la salida de neutrófilos al lumen vaginal, ya que podría ser una herramienta útil para combatir trastornos de fertilidad y esterilidades

inmunológicas cada vez más frecuentes en la clínica. Para ello sería importante hacer un estudio más exhaustivo sobre la inseminación en las fases de metaestro y diestro, analizando el reclutamiento y la presencia de neutrófilos en el TRF para ver en qué punto y mediante qué mecanismos se inhibe la migración de neutrófilos al lumen.

Además, también sería interesante analizar la función protectora de los neutrófilos en infecciones vaginales, ya que como se ha explicado anteriormente es muy controvertida (Fidel et al., 2004; Milligan, 1999; Peters et al., 2014). Por este motivo sería conveniente poner a punto un nuevo modelo de infección vaginal con otro tipo de microorganismo patógeno, por ejemplo, la bacteria *Gardnerella vaginalis*, una de las principales causantes de la vaginosis bacteriana (Gilbert et al., 2013). Este tipo de estudios nos permitiría comparar la respuesta entre diferentes microorganismos patógenos y el papel de los neutrófilos en infecciones vaginales distintas, comprobando si el tipo de estímulo tiene alguna repercusión en la actividad neutrofílica e incluso también en los mecanismos de la TEpM. Otra estrategia para conocer el papel de los neutrófilos en estos procesos sería depletarlos en el ciclo natural, al igual que hemos hecho en el modelo ovariectomizado. Sin embargo, la repercusión de este procedimiento en el ciclo natural no está muy clara. Sasaki demostró que la eliminación de neutrófilos durante el proestro y el estro produce una detención del ciclo en diestro, que se relaciona con una alteración en la concentración de hormonas sexuales en sangre (Sasaki et al., 2009), sugiriendo que los neutrófilos son esenciales para la progresión del ciclo. Por el contrario, en un estudio más reciente se demostró que la eliminación de neutrófilos no afecta al transcurso del ciclo (Schaefer et al., 2014). Esta controversia podría radicar en el tipo de anticuerpo bloqueante utilizado: en el trabajo de Sasaki se administró el clon RB6-8C5 que reconoce la molécula Gr1, presente en neutrófilos pero también en monocitos, por otra parte, en el trabajo de Schaefer se utilizó el clon 1A8, utilizado también en este trabajo, que reconoce la molécula Ly6G específica de neutrófilos.

7. Ventana de vulnerabilidad en el tracto reproductor inferior

La mucosa del TRF se encuentra bajo una influencia hormonal cíclica para generar un ambiente propicio que facilite la reproducción. El TRF superior debe prepararse para el paso del espermia (alogénico), la fecundación, el transporte del blastocisto (semi-alogénico) y la implantación, mientras que el TRF inferior debe tolerar la presencia de espermatozoides durante la ovulación (Suarez and Pacey, 2006). Para garantizar estas funciones las hormonas sexuales crean una "ventana de condiciones permisivas" de 7 a 10 días desde la ovulación (~días 14-21 en el ciclo ovárico humano), lo que también compromete la protección contra patógenos (Wira and Fahey, 2008; Wira et al., 2015). Entre los mecanismos inmunes incluidos dentro de estas condiciones permisivas se encuentra la disminución de la actividad citotóxica de las células CD8 en el TRF superior o la inhibición de la producción de IgA, IgG y defensinas en el TRF inferior. Además también se ha observado una supresión en las funciones de las células dendríticas o las NK a lo largo de todo el TRF. En consecuencia, con todos estos datos, nuestro trabajo demuestra que el E2 (fase pre ovulatoria) inhibe y retiene a los neutrófilos en el tejido, evitando su salida al lumen vaginal para permitir la supervivencia del espermatozoide. Por el contrario, la P4 restaura la infiltración de neutrófilos y su actividad después de la ovulación (Lasarte et al., 2016). Nuestros datos aportan un nuevo mecanismo referente a los neutrófilos implicado en la "ventana de vulnerabilidad" del TRF inferior, que junto con los ya descritos contribuirían a generar un ambiente vulnerable en el lumen vaginal tras la ovulación, desde el pico de E2 hasta el pico de P4 (día ~ 12-17 en el ciclo ovárico humano).

En conjunto, nuestros hallazgos son cruciales para entender cómo el TRF concilia las funciones reproductoras con la inmunidad y dan respuesta a un mecanismo todavía desconocido que es de vital importancia a la hora de generar estrategias para combatir enfermedades relacionadas con la salud femenina. En base a nuestros datos proponemos que el uso de terapias hormonales basadas en E2 o dirigidas al bloqueo de las moléculas de la TEpM podría ser eficaz en el tratamiento de infertilidades debidas a desregulaciones del sistema inmunitario. Por el contrario, la administración de P4 en solitario o en combinación con terapias anti fúngicas ya existentes podría resultar de gran utilidad en la lucha contra la candidiasis vaginal recurrente.

Conclusiones

1- Las hormonas sexuales femeninas regulan la migración transepitelial de los neutrófilos en el tracto reproductor femenino inferior. La P4 permite la salida de neutrófilos al lumen vaginal mientras que el E2 la impide, acumulando a los neutrófilos en el estroma y el epitelio del ectocérvix y el fórnix.

2- El eje de quimioquinas Cxcr2-Cxcl1 es crucial en la migración transepitelial de los neutrófilos al lumen vaginal.

3- El E2 inhibe la expresión de las moléculas que participan en la migración transepitelial de los neutrófilos en el epitelio (Cxcl1, Cd47 y Cd44). Además esta regulación es independiente de inseminación o infección.

4- La progesterona y el estradiol no tienen efecto sobre la expresión de las moléculas de los neutrófilos involucradas en la migración transepitelial (Cxcr2, Mmp9, Cd11b y Sirp α), posiblemente debido a la falta de receptores hormonales (Esr1 y Pgr) en estas células.

5- La expresión de Cxcl1, Cd47 y Cd44 en el epitelio cervical varía a lo largo del ciclo ovárico humano, disminuyendo durante la fase folicular y aumentando durante la fase lútea.

6- La progesterona y el estradiol no tienen efecto sobre la expresión de Cxcl1, Cd47 y Cd44 en el epitelio de la vejiga y el intestino.

7- Los neutrófilos son esenciales en la resolución de la infección vaginal de *C. albicans* bajo el tratamiento de progesterona. Sin embargo, el estradiol inhibe la capacidad candidacidal de los neutrófilos, posiblemente a través de un factor del microambiente vaginal.

8- La progesterona, administrada tras el estradiol en el modelo secuencial de hormonas, posee un efecto anti estrogénico, restaurando la salida de neutrófilos al lumen vaginal y recuperando su actividad candidacidal.

9- La expresión de Cd44 en el TRF inferior varía a lo largo del ciclo estral, aumentando durante el metaestro y el diestro en la parte apical del epitelio, lo que coincide con la salida de neutrófilos al lumen vaginal y la resolución de la infección de *C. albicans*.

10- La infección en el modelo secuencial de hormonas y el ciclo natural no altera la salida basal de los neutrófilos, mientras que la inseminación lo interrumpe inhibiendo la salida de neutrófilos al lumen vaginal.

Bibliografía

- Alghamdi, A.S., and Foster, D.N. (2005). Seminal DNase frees spermatozoa entangled in neutrophil extracellular traps. *Biol Reprod* 73, 1174-1181.
- Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, G.L., Metzler, K.D., and Zychlinsky, A. (2012). Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu Rev Immunol* 30, 459-489.
- Anderson, D.J., Marathe, J., and Pudney, J. (2014). The structure of the human vaginal stratum corneum and its role in immune defense. *Am J Reprod Immunol* 71, 618-623.
- Baggiolini, M., Horisberger, U., Gennaro, R., and Dewald, B. (1985). Identification of three types of granules in neutrophils of ruminants. Ultrastructure of circulating and maturing cells. *Lab Invest* 52, 151-158.
- Bainton, D.F., Ulliyot, J.L., and Farquhar, M.G. (1971). The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. *J Exp Med* 134, 907-934.
- Barclay, A., Friedman, E.C., and Fidel, Y. (1969). A comparative study of WISC and WAIS performances and score patterns among institutionalized retardates. *J Ment Defic Res* 13, 99-105.
- Baskin, M.J. (1932). Temporary sterilization by the injection of human spermatozoa. A preliminary report. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 24, 892-897.
- Becker, S., Quay, J., Koren, H.S., and Haskill, J.S. (1994). Constitutive and stimulated MCP-1, GRO alpha, beta, and gamma expression in human airway epithelium and bronchoalveolar macrophages. *Am J Physiol* 266, L278-286.
- Behl, C., Widmann, M., Trapp, T., and Holsboer, F. (1995). 17-beta estradiol protects neurons from oxidative stress-induced cell death in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 216, 473-482.
- Benarafa, C., and Simon, H.U. (2017). Role of granule proteases in the life and death of neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 482, 473-481.
- Blum, M., Pery, J., and Blum, I. (1989). Antisperm antibodies in young oral contraceptive users. *Adv Contracept* 5, 41-46.
- Borjesson, A.E., Lagerquist, M.K., Windahl, S.H., and Ohlsson, C. (2013). The role of estrogen receptor alpha in the regulation of bone and growth plate cartilage. *Cell Mol Life Sci* 70, 4023-4037.
- Bornslaeger, E.A., Corcoran, C.M., Stappenbeck, T.S., and Green, K.J. (1996). Breaking the connection: displacement of the desmosomal plaque protein desmoplakin from cell-cell interfaces disrupts anchorage of intermediate filament bundles and alters intercellular junction assembly. *J Cell Biol* 134, 985-1001.
- Borregaard, N., Kjeldsen, L., Rygaard, K., Bastholm, L., Nielsen, M.H., Sengelov, H., Bjerrum, O.W., and Johnsen, A.H. (1992). Stimulus-dependent secretion of plasma proteins from human neutrophils. *J Clin Invest* 90, 86-96.

Bouman, A., Heineman, M.J., and Faas, M.M. (2005). Sex hormones and the immune response in humans. *Hum Reprod Update* 11, 411-423.

Bouman, A., Moes, H., Heineman, M.J., de Leij, L.F., and Faas, M.M. (2001). The immune response during the luteal phase of the ovarian cycle: increasing sensitivity of human monocytes to endotoxin. *Fertil Steril* 76, 555-559.

Branzk, N., Lubojemska, A., Hardison, S.E., Wang, Q., Gutierrez, M.G., Brown, G.D., and Papayannopoulos, V. (2014). Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat Immunol* 15, 1017-1025.

Brazdova, A., Senechal, H., Peltre, G., and Poncet, P. (2016). Immune Aspects of Female Infertility. *Int J Fertil Steril* 10, 1-10.

Brazil, J.C., Lee, W.Y., Kolegraff, K.N., Nusrat, A., Parkos, C.A., and Louis, N.A. (2010). Neutrophil migration across intestinal epithelium: evidence for a role of CD44 in regulating detachment of migrating cells from the luminal surface. *J Immunol* 185, 7026-7036.

Brazil, J.C., Liu, R., Sumagin, R., Kolegraff, K.N., Nusrat, A., Cummings, R.D., Parkos, C.A., and Louis, N.A. (2013). α 3/4 Fucosyltransferase 3-dependent synthesis of Sialyl Lewis A on CD44 variant containing exon 6 mediates polymorphonuclear leukocyte detachment from intestinal epithelium during transepithelial migration. *J Immunol* 191, 4804-4817.

Brazil, J.C., and Parkos, C.A. (2016). Pathobiology of neutrophil-epithelial interactions. *Immunol Rev* 273, 94-111.

Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D.S., Weinrauch, Y., and Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303, 1532-1535.

Buchanan, D.L., Kurita, T., Taylor, J.A., Lubahn, D.B., Cunha, G.R., and Cooke, P.S. (1998). Role of stromal and epithelial estrogen receptors in vaginal epithelial proliferation, stratification, and cornification. *Endocrinology* 139, 4345-4352.

Carman, C.V., and Springer, T.A. (2008). Trans-cellular migration: cell-cell contacts get intimate. *Curr Opin Cell Biol* 20, 533-540.

Carmeci, C., Thompson, D.A., Ring, H.Z., Francke, U., and Weigel, R.J. (1997). Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer. *Genomics* 45, 607-617.

Casanova-Acebes, M., Pitaval, C., Weiss, L.A., Nombela-Arrieta, C., Chevre, R., N, A.G., Kunisaki, Y., Zhang, D., van Rooijen, N., Silberstein, L.E., *et al.* (2013). Rhythmic modulation of the hematopoietic niche through neutrophil clearance. *Cell* 153, 1025-1035.

Cassone, A., and Sobel, J.D. (2016). Experimental Models of Vaginal Candidiasis and Their Relevance to Human Candidiasis. *Infect Immun* 84, 1255-1261.

Clarke, G.N. (2009). Etiology of sperm immunity in women. *Fertil Steril* 91, 639-643.

Conneely, O.M., Kettelberger, D.M., Tsai, M.J., Schrader, W.T., and O'Malley, B.W. (1989). The chicken progesterone receptor A and B isoforms are products of an alternate translation initiation event. *J Biol Chem* 264, 14062-14064.

Conti, H.R., Huppler, A.R., Whibley, N., and Gaffen, S.L. (2014). Animal models for candidiasis. *Curr Protoc Immunol* 105, 19.16.11-17.

Cooke, P.S., Buchanan, D.L., Lubahn, D.B., and Cunha, G.R. (1998). Mechanism of estrogen action: lessons from the estrogen receptor-alpha knockout mouse. *Biol Reprod* 59, 470-475.

Cotreau, M.M., Chennathukuzhi, V.M., Harris, H.A., Han, L., Dorner, A.J., Apsehoff, G., Varadarajan, U., Hatstat, E., Zakaria, M., Strahs, A.L., *et al.* (2007). A study of 17beta-estradiol-regulated genes in the vagina of postmenopausal women with vaginal atrophy. *Maturitas* 58, 366-376.

Chao, T.C. (1996). Female sex hormones and the immune system. *Changeng Yi Xue Za Zhi* 19, 95-106.

Chin, A.C., Lee, W.Y., Nusrat, A., Vergnolle, N., and Parkos, C.A. (2008). Neutrophil-mediated activation of epithelial protease-activated receptors-1 and -2 regulates barrier function and transepithelial migration. *J Immunol* 181, 5702-5710.

Choi, J.M., Lebwohl, B., Wang, J., Lee, S.K., Murray, J.A., Sauer, M.V., and Green, P.H. (2011). Increased prevalence of celiac disease in patients with unexplained infertility in the United States. *J Reprod Med* 56, 199-203.

Chow, P.H., Jiang, H.Y., Poon, H.K., Lee, K.H., and O, W.S. (2003). Embryos sired by males without accessory sex glands induce failure of uterine support: a study of VEGF, MMP and TGF expression in the golden hamster. *Anat Embryol (Berl)* 206, 203-213.

Daley, J.M., Thomay, A.A., Connolly, M.D., Reichner, J.S., and Albina, J.E. (2008). Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. *J Leukoc Biol* 83, 64-70.

Dall, P., Heider, K.H., Hekele, A., von Minckwitz, G., Kaufmann, M., Ponta, H., and Herrlich, P. (1994). Surface protein expression and messenger RNA-splicing analysis of CD44 in uterine cervical cancer and normal cervical epithelium. *Cancer Res* 54, 3337-3341.

Dechering, K., Boersma, C., and Mosselman, S. (2000). Estrogen receptors alpha and beta: two receptors of a kind? *Curr Med Chem* 7, 561-576.

Dejana, E. (2004). Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 261-270.

Delgado-Rizo, V., Martinez-Guzman, M.A., Iniguez-Gutierrez, L., Garcia-Orozco, A., Alvarado-Navarro, A., and Fafutis-Morris, M. (2017). Neutrophil Extracellular Traps and Its Implications in Inflammation: An Overview. *Front Immunol* 8, 81.

Deruaz, M., and Luster, A.D. (2015). Chemokine-mediated immune responses in the female genital tract mucosa. *Immunol Cell Biol* 93, 347-354.

Diamantis, A., and Androutsos, G. (2008). Highlights from the history of hormonal cytology. *Hormones (Athens)* 7, 184-186.

Drechsler, M., Megens, R.T., van Zandvoort, M., Weber, C., and Soehnlein, O. (2010). Hyperlipidemia-triggered neutrophilia promotes early atherosclerosis. *Circulation* 122, 1837-1845.

Dunbar, B., Patel, M., Fahey, J., and Wira, C. (2012). Endocrine control of mucosal immunity in the female reproductive tract: impact of environmental disruptors. *Mol Cell Endocrinol* 354, 85-93.

Engelhardt, B., and Wolburg, H. (2004). Mini-review: Transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house? *Eur J Immunol* 34, 2955-2963.

Eschenbach, D.A., Thwin, S.S., Patton, D.L., Hooton, T.M., Stapleton, A.E., Agnew, K., Winter, C., Meier, A., and Stamm, W.E. (2000). Influence of the normal menstrual cycle on vaginal tissue, discharge, and microflora. *Clin Infect Dis* 30, 901-907.

Farage, M., and Maibach, H. (2006). Lifetime changes in the vulva and vagina. *Arch Gynecol Obstet* 273, 195-202.

Fernandez, S., Molina, I.J., Romero, P., Gonzalez, R., Pena, J., Sanchez, F., Reynoso, F.R., Perez-Navero, J.L., Estevez, O., Ortega, C., and Santamaria, M. (2011). Characterization of gliadin-specific Th17 cells from the mucosa of celiac disease patients. *Am J Gastroenterol* 106, 528-538.

Fidel, P.L., Jr., Barousse, M., Espinosa, T., Ficarra, M., Sturtevant, J., Martin, D.H., Quayle, A.J., and Dunlap, K. (2004). An intravaginal live *Candida* challenge in humans leads to new hypotheses for the immunopathogenesis of vulvovaginal candidiasis. *Infect Immun* 72, 2939-2946.

Fidel, P.L., Jr., Cutright, J., and Steele, C. (2000). Effects of reproductive hormones on experimental vaginal candidiasis. *Infect Immun* 68, 651-657.

Fincham, N.J., Camp, R.D., Gearing, A.J., Bird, C.R., and Cunningham, F.M. (1988). Neutrophil chemoattractant and IL-1-like activity in samples from psoriatic skin lesions. Further characterization. *J Immunol* 140, 4294-4299.

Flores, R. (2015). The G protein-coupled estrogen receptor GPR30 controls immune function by regulating neutrophil extracellular trap formation. *FASEB J* 29.

Freeman, S.A., and Grinstein, S. (2014). Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton. *Immunol Rev* 262, 193-215.

Furze, R.C., and Rankin, S.M. (2008). The role of the bone marrow in neutrophil clearance under homeostatic conditions in the mouse. *FASEB J* 22, 3111-3119.

Gajer, P., Brotman, R.M., Bai, G., Sakamoto, J., Schutte, U.M., Zhong, X., Koenig, S.S., Fu, L., Ma, Z.S., Zhou, X., *et al.* (2012). Temporal dynamics of the human vaginal microbiota. *Sci Transl Med* 4, 132ra152.

Garlichs, C.D., Eskafi, S., Cicha, I., Schmeisser, A., Walzog, B., Raaz, D., Stumpf, C., Yilmaz, A., Bremer, J., Ludwig, J., and Daniel, W.G. (2004). Delay of neutrophil apoptosis in acute coronary syndromes. *J Leukoc Biol* 75, 828-835.

Geering, B., Stoeckle, C., Conus, S., and Simon, H.U. (2013). Living and dying for inflammation: neutrophils, eosinophils, basophils. *Trends Immunol* 34, 398-409.

Giaglis, S., Stoikou, M., Sur Chowdhury, C., Schaefer, G., Grimolizzi, F., Rossi, S.W., Hoesli, I.M., Lapaire, O., Hasler, P., and Hahn, S. (2016). Multimodal Regulation of NET Formation in Pregnancy: Progesterone Antagonizes the Pro-NETotic Effect of Estrogen and G-CSF. *Front Immunol* 7, 565.

Gilbert, N.M., Lewis, W.G., and Lewis, A.L. (2013). Clinical features of bacterial vaginosis in a murine model of vaginal infection with *Gardnerella vaginalis*. *PLoS One* 8, e59539.

Gill, S.E., Nadler, S.T., Li, Q., Frevert, C.W., Park, P.W., Chen, P., and Parks, W.C. (2016). Shedding of Syndecan-1/CXCL1 Complexes by Matrix Metalloproteinase 7 Functions as an Epithelial Checkpoint of Neutrophil Activation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 55, 243-251.

Givan, A.L., White, H.D., Stern, J.E., Colby, E., Gosselin, E.J., Guyre, P.M., and Wira, C.R. (1997). Flow cytometric analysis of leukocytes in the human female reproductive tract: comparison of fallopian tube, uterus, cervix, and vagina. *Am J Reprod Immunol* 38, 350-359.

Goldman, J.M., Murr, A.S., and Cooper, R.L. (2007). The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 80, 84-97.

Gorina, R., Lyck, R., Vestweber, D., and Engelhardt, B. (2014). beta2 integrin-mediated crawling on endothelial ICAM-1 and ICAM-2 is a prerequisite for transcellular neutrophil diapedesis across the inflamed blood-brain barrier. *J Immunol* 192, 324-337.

Gorodeski, G.I. (2007). Estrogen modulation of epithelial permeability in cervical-vaginal cells of premenopausal and postmenopausal women. *Menopause* 14, 1012-1019.

Gorski, J., Shyamala, G., and Toft, D. (1969). Interrelationships of nuclear and cytoplasmic estrogen receptors. *Curr Top Dev Biol* 4, 149-167.

Graham, J.D., and Clarke, C.L. (1997). Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev* 18, 502-519.

Hahn, S., Giaglis, S., Hoesli, I., and Hasler, P. (2012). Neutrophil NETs in reproduction: from infertility to preeclampsia and the possibility of fetal loss. *Front Immunol* 3, 362.

Haynes, B.F., Telen, M.J., Hale, L.P., and Denning, S.M. (1989). CD44--a molecule involved in leukocyte adherence and T-cell activation. *Immunol Today* 10, 423-428.

Hickey, D.K., Fahey, J.V., and Wira, C.R. (2013a). Estrogen receptor alpha antagonists mediate changes in CCL20 and CXCL1 secretions in the murine female reproductive tract. *Am J Reprod Immunol* 69, 159-167.

Hickey, D.K., Fahey, J.V., and Wira, C.R. (2013b). Mouse estrous cycle regulation of vaginal versus uterine cytokines, chemokines, alpha-/beta-defensins and TLRs. *Innate Immun* 19, 121-131.

Hidalgo, A., Peired, A.J., Wild, M., Vestweber, D., and Frenette, P.S. (2007). Complete identification of E-selectin ligands on neutrophils reveals distinct functions of PSGL-1, ESL-1, and CD44. *Immunity* 26, 477-489.

Hsieh, Y.C., Frink, M., Thobe, B.M., Hsu, J.T., Choudhry, M.A., Schwacha, M.G., Bland, K.I., and Chaudry, I.H. (2007). 17Beta-estradiol downregulates Kupffer cell TLR4-dependent p38 MAPK pathway and normalizes inflammatory cytokine production following trauma-hemorrhage. *Mol Immunol* 44, 2165-2172.

Hua, S., Kallen, C.B., Dhar, R., Baquero, M.T., Mason, C.E., Russell, B.A., Shah, P.K., Liu, J., Khramtsov, A., Tretiakova, M.S., *et al.* (2008). Genomic analysis of estrogen cascade reveals histone variant H2A.Z associated with breast cancer progression. *Mol Syst Biol* 4, 188.

Ilkit, M., and Guzel, A.B. (2011). The epidemiology, pathogenesis, and diagnosis of vulvovaginal candidosis: a mycological perspective. *Crit Rev Microbiol* 37, 250-261.

Johnson, K.M., Kines, R.C., Roberts, J.N., Lowy, D.R., Schiller, J.T., and Day, P.M. (2009). Role of heparan sulfate in attachment to and infection of the murine female genital tract by human papillomavirus. *J Virol* 83, 2067-2074.

Kastner, P., Krust, A., Turcotte, B., Stropp, U., Tora, L., Gronemeyer, H., and Chambon, P. (1990). Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J* 9, 1603-1614.

Kaushic, C., Frauendorf, E., Rossoll, R.M., Richardson, J.M., and Wira, C.R. (1998). Influence of the estrous cycle on the presence and distribution of immune cells in the rat reproductive tract. *Am J Reprod Immunol* 39, 209-216.

Kaushic, C., Zhou, F., Murdin, A.D., and Wira, C.R. (2000). Effects of estradiol and progesterone on susceptibility and early immune responses to *Chlamydia trachomatis* infection in the female reproductive tract. *Infect Immun* 68, 4207-4216.

Keck, T., Balcom, J.H.t., Fernandez-del Castillo, C., Antoniu, B.A., and Warshaw, A.L. (2002). Matrix metalloproteinase-9 promotes neutrophil migration and alveolar capillary leakage in pancreatitis-associated lung injury in the rat. *Gastroenterology* 122, 188-201.

Kim, N.D., and Luster, A.D. (2015). The role of tissue resident cells in neutrophil recruitment. *Trends Immunol* 36, 547-555.

Kolaczowska, E., and Kubes, P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* 13, 159-175.

Kruger, P., Saffarzadeh, M., Weber, A.N., Rieber, N., Radsak, M., von Bernuth, H., Benarafa, C., Roos, D., Skokowa, J., and Hartl, D. (2015). Neutrophils: Between host defence, immune modulation, and tissue injury. *PLoS pathogens* 11, e1004651.

Kuiper, G.G., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Haggblad, J., Nilsson, S., and Gustafsson, J.A. (1997). Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138, 863-870.

Lacy, P. (2006). Mechanisms of degranulation in neutrophils. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2, 98-108.

Lasarte, S., Elsner, D., Guia-Gonzalez, M., Ramos-Medina, R., Sanchez-Ramon, S., Esponda, P., Munoz-Fernandez, M.A., and Relloso, M. (2013a). Female sex hormones regulate the Th17 immune response to sperm and *Candida albicans*. *Hum Reprod*.

Lasarte, S., Elsner, D., Sanchez-Elsner, T., Fernandez-Pineda, A., Lopez-Fernandez, L.A., Corbi, A.L., Munoz-Fernandez, M.A., and Relloso, M. (2013b). Estradiol downregulates NF-kappaB translocation by Ikbkg transcriptional repression in dendritic cells. *Genes Immun* 14, 462-469.

Lasarte, S., Samaniego, R., Salinas-Munoz, L., Guia-Gonzalez, M.A., Weiss, L.A., Mercader, E., Ceballos-Garcia, E., Navarro-Gonzalez, T., Moreno-Ochoa, L., Perez-Millan, F., *et al.* (2016). Sex Hormones Coordinate Neutrophil Immunity in the Vagina by Controlling Chemokine Gradients. *J Infect Dis* 213, 476-484.

Lathbury, L.J., and Salamonsen, L.A. (2000). In-vitro studies of the potential role of neutrophils in the process of menstruation. *Mol Hum Reprod* 6, 899-906.

Lawrence, D.W., Bruyninckx, W.J., Louis, N.A., Lublin, D.M., Stahl, G.L., Parkos, C.A., and Colgan, S.P. (2003). Antiadhesive role of apical decay-accelerating factor (CD55) in human neutrophil transmigration across mucosal epithelia. *J Exp Med* 198, 999-1010.

Lee, S.K., Kim, C.J., Kim, D.J., and Kang, J.H. (2015). Immune cells in the female reproductive tract. *Immune Netw* 15, 16-26.

Li, J.L., Lim, C.H., Tay, F.W., Goh, C.C., Devi, S., Malleret, B., Lee, B., Bakocevic, N., Chong, S.Z., Evrard, M., *et al.* (2016a). Neutrophils Self-Regulate Immune Complex-Mediated Cutaneous Inflammation through CXCL2. *J Invest Dermatol* 136, 416-424.

Li, T., Ma, Y., Zhang, H., Yan, P., Huo, L., Hu, Y., Chen, X., Zhang, M., and Liu, Z. (2016b). Differential Regulation of Morphology and Estrogen Receptor-Alpha Expression in the Vagina of

Ovariectomized Adult Virgin Rats by Estrogen Replacement: A Histological Study. *Int J Endocrinol* 2016, 1093512.

Li, X., Utomo, A., Cullere, X., Choi, M.M., Milner, D.A., Jr., Venkatesh, D., Yun, S.H., and Mayadas, T.N. (2011). The beta-glucan receptor Dectin-1 activates the integrin Mac-1 in neutrophils via Vav protein signaling to promote *Candida albicans* clearance. *Cell Host Microbe* 10, 603-615.

Lindqvist, M., Navabi, N., Jansson, M., Samuelson, E., Sjolting, A., Orndal, C., and Harandi, A.M. (2009). Local cytokine and inflammatory responses to candidate vaginal adjuvants in mice. *Vaccine* 28, 270-278.

Liu, Y., Buhring, H.J., Zen, K., Burst, S.L., Schnell, F.J., Williams, I.R., and Parkos, C.A. (2002). Signal regulatory protein (SIRPalpha), a cellular ligand for CD47, regulates neutrophil transmigration. *J Biol Chem* 277, 10028-10036.

Liu, Y., Merlin, D., Burst, S.L., Pochet, M., Madara, J.L., and Parkos, C.A. (2001). The role of CD47 in neutrophil transmigration. Increased rate of migration correlates with increased cell surface expression of CD47. *J Biol Chem* 276, 40156-40166.

Lublin, D.M., and Atkinson, J.P. (1989). Decay-accelerating factor: biochemistry, molecular biology, and function. *Annu Rev Immunol* 7, 35-58.

Mao, A., Paharkova-Vatchkova, V., Hardy, J., Miller, M.M., and Kovats, S. (2005). Estrogen selectively promotes the differentiation of dendritic cells with characteristics of Langerhans cells. *J Immunol* 175, 5146-5151.

Marieb, E.N., ed. (2000). *Human Anatomy and Physiology*, 5 edn.

Marki, A., Esko, J.D., Pries, A.R., and Ley, K. (2015). Role of the endothelial surface layer in neutrophil recruitment. *J Leukoc Biol* 98, 503-515.

Matozaki, T., Murata, Y., Okazawa, H., and Ohnishi, H. (2009). Functions and molecular mechanisms of the CD47-SIRPalpha signalling pathway. *Trends Cell Biol* 19, 72-80.

Mauvais-Jarvis, P., Kuttann, F., and Gompel, A. (1987). Antiestrogen action of progesterone in breast tissue. *Horm Res* 28, 212-218.

McLean, A.C., Valenzuela, N., Fai, S., and Bennett, S.A. (2012). Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification. *J Vis Exp*, e4389.

Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454, 428-435.

Milligan, G.N. (1999). Neutrophils aid in protection of the vaginal mucosae of immune mice against challenge with herpes simplex virus type 2. *J Virol* 73, 6380-6386.

- Miyagi, M., Aoyama, H., Morishita, M., and Iwamoto, Y. (1992). Effects of sex hormones on chemotaxis of human peripheral polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *J Periodontol* 63, 28-32.
- Mossadegh-Keller, N., Sarrazin, S., Kandalla, P.K., Espinosa, L., Stanley, E.R., Nutt, S.L., Moore, J., and Sieweke, M.H. (2013). M-CSF instructs myeloid lineage fate in single haematopoietic stem cells. *Nature* 497, 239-243.
- Muller, W.A. (2011). Mechanisms of leukocyte transendothelial migration. *Annu Rev Pathol* 6, 323-344.
- Naglik, J.R., Richardson, J.P., and Moyes, D.L. (2014). *Candida albicans* pathogenicity and epithelial immunity. *PLoS pathogens* 10, e1004257.
- Nagy, B., and Sutka, P. (1992). Demonstration of antibodies against *Candida guilliermondii* var. *guilliermondii* in asymptomatic infertile men. *Mycoses* 35, 247-250.
- Naz, R.K. (2011). Antisperm contraceptive vaccines: where we are and where we are going? *Am J Reprod Immunol* 66, 5-12.
- Nelson, K.G., Takahashi, T., Bossert, N.L., Walmer, D.K., and McLachlan, J.A. (1991). Epidermal growth factor replaces estrogen in the stimulation of female genital-tract growth and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 21-25.
- Nellor, J.E. (1966). Leucocyte-like cells of the vagina and uterus, and their modification during the normal estrous cycle and by progestin and estrogen treatment. *The Anatomical Record* 155, 591-601.
- Netea, M.G., Joosten, L.A., van der Meer, J.W., Kullberg, B.J., and van de Veerdonk, F.L. (2015). Immune defence against *Candida* fungal infections. *Nat Rev Immunol* 15, 630-642.
- Nicolas-Avila, J.A., Adrover, J.M., and Hidalgo, A. (2017). Neutrophils in Homeostasis, Immunity, and Cancer. *Immunity* 46, 15-28.
- Nowak, J., Borkowska, B., and Pawlowski, B. (2016). Leukocyte changes across menstruation, ovulation, and mid-luteal phase and association with sex hormone variation. *Am J Hum Biol* 28, 721-728.
- Nowicka-Bauer, K., Kamieniczna, M., Cibulka, J., Ulcova-Gallova, Z., and Kurpisz, M. (2016). Proteomic identification of sperm antigens using serum samples from individuals with and without antisperm antibodies. *Andrologia* 48, 693-701.
- Oldenborg, P.A., Zheleznyak, A., Fang, Y.F., Lagenaur, C.F., Gresham, H.D., and Lindberg, F.P. (2000). Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science* 288, 2051-2054.

Paharkova-Vatchkova, V., Maldonado, R., and Kovats, S. (2004). Estrogen preferentially promotes the differentiation of CD11c⁺ CD11b(intermediate) dendritic cells from bone marrow precursors. *J Immunol* 172, 1426-1436.

Papadopoulou, A.S., Serneels, L., Achsel, T., Mandemakers, W., Callaerts-Vegh, Z., Dooley, J., Lau, P., Ayoubi, T., Radaelli, E., Spinazzi, M., *et al.* (2015). Deficiency of the miR-29a/b-1 cluster leads to ataxic features and cerebellar alterations in mice. *Neurobiol Dis* 73, 275-288.

Parkos, C.A. (2016). Neutrophil-Epithelial Interactions: A Double-Edged Sword. *Am J Pathol* 186, 1404-1416.

Parkos, C.A., Colgan, S.P., Liang, T.W., Nusrat, A., Bacarra, A.E., Carnes, D.K., and Madara, J.L. (1996). CD47 mediates post-adhesive events required for neutrophil migration across polarized intestinal epithelia. *J Cell Biol* 132, 437-450.

Parkos, C.A., Delp, C., Arnaout, M.A., and Madara, J.L. (1991). Neutrophil migration across a cultured intestinal epithelium. Dependence on a CD11b/CD18-mediated event and enhanced efficiency in physiological direction. *J Clin Invest* 88, 1605-1612.

Patton, D.L., Thwin, S.S., Meier, A., Hooton, T.M., Stapleton, A.E., and Eschenbach, D.A. (2000). Epithelial cell layer thickness and immune cell populations in the normal human vagina at different stages of the menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol* 183, 967-973.

Peters, B.M., Palmer, G.E., Nash, A.K., Lilly, E.A., Fidel, P.L., Jr., and Noverr, M.C. (2014). Fungal morphogenetic pathways are required for the hallmark inflammatory response during *Candida albicans* vaginitis. *Infect Immun* 82, 532-543.

Phillips, D.M., and Mahler, S. (1977). Leukocyte emigration and migration in the vagina following mating in the rabbit. *Anat Rec* 189, 45-59.

Phillips, J.F., Goodwin, D.W., Thomason, S.B., and Dempsey, P.J. (1977). The volume of the uterus in normal and abnormal pregnancy. *J Clin Ultrasound* 5, 107-110.

Pillay, J., den Braber, I., Vrisekoop, N., Kwast, L.M., de Boer, R.J., Borghans, J.A., Tesselaar, K., and Koenderman, L. (2010). In vivo labeling with ²H₂O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood* 116, 625-627.

Politch, J.A., Tucker, L., Bowman, F.P., and Anderson, D.J. (2007). Concentrations and significance of cytokines and other immunologic factors in semen of healthy fertile men. *Hum Reprod* 22, 2928-2935.

Powell, D., Tauzin, S., Hind, L.E., Deng, Q., Beebe, D.J., and Huttenlocher, A. (2017). Chemokine Signaling and the Regulation of Bidirectional Leukocyte Migration in Interstitial Tissues. *Cell Rep* 19, 1572-1585.

Proebstl, D., Voisin, M.B., Woodfin, A., Whiteford, J., D'Acquisto, F., Jones, G.E., Rowe, D., and Nourshargh, S. (2012). Pericytes support neutrophil subendothelial cell crawling and breaching of venular walls in vivo. *J Exp Med* 209, 1219-1234.

Pung, O.J., Tucker, A.N., Vore, S.J., and Luster, M.I. (1985). Influence of estrogen on host resistance: increased susceptibility of mice to *Listeria monocytogenes* correlates with depressed production of interleukin 2. *Infect Immun* *50*, 91-96.

Quayle, A.J. (2002). The innate and early immune response to pathogen challenge in the female genital tract and the pivotal role of epithelial cells. *J Reprod Immunol* *57*, 61-79.

Reinhold, M.I., Lindberg, F.P., Plas, D., Reynolds, S., Peters, M.G., and Brown, E.J. (1995). In vivo expression of alternatively spliced forms of integrin-associated protein (CD47). *J Cell Sci* *108* (Pt 11), 3419-3425.

Relloso, M., Aragonese-Fenoll, L., Lasarte, S., Bourgeois, C., Romera, G., Kuchler, K., Corbi, A.L., Munoz-Fernandez, M.A., Nombela, C., Rodriguez-Fernandez, J.L., and Diez-Orejas, R. (2012a). Estradiol impairs the Th17 immune response against *Candida albicans*. *J Leukoc Biol* *91*, 159-165.

Relloso, S., Arechavala, A., Guelfand, L., Maldonado, I., Walker, L., Agorio, I., Reyes, S., Giusiano, G., Rojas, F., Flores, V., *et al.* (2012b). [Onychomycosis: multicentre epidemiological, clinical and mycological study]. *Rev Iberoam Micol* *29*, 157-163.

Robertson, S.A., Prins, J.R., Sharkey, D.J., and Moldenhauer, L.M. (2013). Seminal fluid and the generation of regulatory T cells for embryo implantation. *Am J Reprod Immunol* *69*, 315-330.

Robertson, S.A., and Sharkey, D.J. (2016). Seminal fluid and fertility in women. *Fertil Steril* *106*, 511-519.

Romani, L. (2011). Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol* *11*, 275-288.

Rosenbauer, F., and Tenen, D.G. (2007). Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation. *Nat Rev Immunol* *7*, 105-117.

Rowe, R.G., and Weiss, S.J. (2008). Breaching the basement membrane: who, when and how? *Trends Cell Biol* *18*, 560-574.

Sadik, C.D., Kim, N.D., and Luster, A.D. (2011). Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends Immunol* *32*, 452-460.

Salamonsen, L.A., and Woolley, D.E. (1999). Menstruation: induction by matrix metalloproteinases and inflammatory cells. *J Reprod Immunol* *44*, 1-27.

Samaniego, R., Estechea, A., Relloso, M., Longo, N., J, L.E., Longo-Imedio, I., J, A.A., M, A.D.P., Puig-Kroger, A., and Sanchez-Mateos, P. (2013). Mesenchymal Contribution to Recruitment, Infiltration, and Positioning of Leukocytes in Human Melanoma Tissues. *J Invest Dermatol*.

Sarrazin, S., Lamanna, W.C., and Esko, J.D. (2011). Heparan sulfate proteoglycans. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3.

Sasaki, S., Nagata, K., and Kobayashi, Y. (2009). Regulation of the estrous cycle by neutrophil infiltration into the vagina. *Biochem Biophys Res Commun* 382, 35-40.

Scarpin, K.M., Graham, J.D., Mote, P.A., and Clarke, C.L. (2009). Progesterone action in human tissues: regulation by progesterone receptor (PR) isoform expression, nuclear positioning and coregulator expression. *Nucl Recept Signal* 7, e009.

Schaefer, K., Brown, N., Kaye, P.M., and Lacey, C.J. (2014). Cervico-vaginal immunoglobulin G levels increase post-ovulation independently of neutrophils. *PLoS One* 9, e114824.

Schiwon, M., Weisheit, C., Franken, L., Gutweiler, S., Dixit, A., Meyer-Schwesinger, C., Pohl, J.M., Maurice, N.J., Thiebes, S., Lorenz, K., *et al.* (2014). Crosstalk between sentinel and helper macrophages permits neutrophil migration into infected uroepithelium. *Cell* 156, 456-468.

Schmits, R., Filmus, J., Gerwin, N., Senaldi, G., Kiefer, F., Kundig, T., Wakeham, A., Shahinian, A., Catzavelos, C., Rak, J., *et al.* (1997). CD44 regulates hematopoietic progenitor distribution, granuloma formation, and tumorigenicity. *Blood* 90, 2217-2233.

Sharkey, D.J., Macpherson, A.M., Tremellen, K.P., Mottershead, D.G., Gilchrist, R.B., and Robertson, S.A. (2012). TGF-beta mediates proinflammatory seminal fluid signaling in human cervical epithelial cells. *J Immunol* 189, 1024-1035.

Sonneborn, A., Bockmuhl, D.P., and Ernst, J.F. (1999). Chlamydospore formation in *Candida albicans* requires the Efg1p morphogenetic regulator. *Infect Immun* 67, 5514-5517.

Sonoda, Y., Mukaida, N., Wang, J.B., Shimada-Hiratsuka, M., Naito, M., Kasahara, T., Harada, A., Inoue, M., and Matsushima, K. (1998). Physiologic regulation of postovulatory neutrophil migration into vagina in mice by a C-X-C chemokine(s). *J Immunol* 160, 6159-6165.

Stockard, C.R., and Papanicolaou, G.N. (1917). A Rhythmical "Heat Period" in the Guinea-Pig. *Science* 46, 42-44.

Strzemienski, P.J. (1989). Effect of bovine seminal plasma on neutrophil phagocytosis of bull spermatozoa. *J Reprod Fertil* 87, 519-528.

Suarez, S.S., and Pacey, A.A. (2006). Sperm transport in the female reproductive tract. *Hum Reprod Update* 12, 23-37.

Sumagin, R., Brazil, J.C., Nava, P., Nishio, H., Alam, A., Luissint, A.C., Weber, D.A., Neish, A.S., Nusrat, A., and Parkos, C.A. (2016). Neutrophil interactions with epithelial-expressed ICAM-1 enhances intestinal mucosal wound healing. *Mucosal Immunol* 9, 1151-1162.

Sumagin, R., and Parkos, C.A. (2015). Epithelial adhesion molecules and the regulation of intestinal homeostasis during neutrophil transepithelial migration. *Tissue Barriers* 3, e969100.

- Swee, M., Wilson, C.L., Wang, Y., McGuire, J.K., and Parks, W.C. (2008). Matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) controls neutrophil egress by generating chemokine gradients. *J Leukoc Biol* 83, 1404-1412.
- Tecirlioglu, R.T., Hayes, E.S., and Trounson, A.O. (2002). Semen collection from mice: electroejaculation. *Reprod Fertil Dev* 14, 363-371.
- Terui, T. (2000). Inflammatory and immune reactions associated with stratum corneum and neutrophils in sterile pustular dermatoses. *Tohoku J Exp Med* 190, 239-248.
- Tresguerres, J.A.F. (2005). Fisiología del eje hipotálamo-hipófiso-ovárico. *Fisiología Humana*, 1007-1015.
- Uddin, M., Nong, G., Ward, J., Seumois, G., Prince, L.R., Wilson, S.J., Cornelius, V., Dent, G., and Djukanovic, R. (2010). Prosurvival activity for airway neutrophils in severe asthma. *Thorax* 65, 684-689.
- Ulcova-Gallova, Z. (1997). Ten-year experience with antispermatozoal activity in ovulatory cervical mucus and local hydrocortisone treatment. *Am J Reprod Immunol* 38, 231-234.
- Vylkova, S., Carman, A.J., Danhof, H.A., Collette, J.R., Zhou, H., and Lorenz, M.C. (2011). The fungal pathogen *Candida albicans* autoinduces hyphal morphogenesis by raising extracellular pH. *MBio* 2, e00055-00011.
- Wagner, R.D., and Johnson, S.J. (2012). Probiotic lactobacillus and estrogen effects on vaginal epithelial gene expression responses to *Candida albicans*. *J Biomed Sci* 19, 58.
- Walker, W., Roberts, C.W., Ferguson, D.J., Jebbari, H., and Alexander, J. (1997). Innate immunity to *Toxoplasma gondii* is influenced by gender and is associated with differences in interleukin-12 and gamma interferon production. *Infect Immun* 65, 1119-1121.
- Wilcox, A.J., Weinberg, C.R., and Baird, D.D. (1995). Timing of sexual intercourse in relation to ovulation. Effects on the probability of conception, survival of the pregnancy, and sex of the baby. *N Engl J Med* 333, 1517-1521.
- Wilson, L. (1954). Sperm agglutinins in human semen and blood. *Proc Soc Exp Biol Med* 85, 652-655.
- Wira, C.R., and Fahey, J.V. (2008). A new strategy to understand how HIV infects women: identification of a window of vulnerability during the menstrual cycle. *Aids* 22, 1909-1917.
- Wira, C.R., Fahey, J.V., Sentman, C.L., Pioli, P.A., and Shen, L. (2005a). Innate and adaptive immunity in female genital tract: cellular responses and interactions. *Immunol Rev* 206, 306-335.

Wira, C.R., Grant-Tschudy, K.S., and Crane-Godreau, M.A. (2005b). Epithelial cells in the female reproductive tract: a central role as sentinels of immune protection. *Am J Reprod Immunol* 53, 65-76.

Wira, C.R., Roche, M.A., and Rossoll, R.M. (2002). Antigen presentation by vaginal cells: role of TGFbeta as a mediator of estradiol inhibition of antigen presentation. *Endocrinology* 143, 2872-2879.

Wira, C.R., Rodriguez-Garcia, M., and Patel, M.V. (2015). The role of sex hormones in immune protection of the female reproductive tract. *Nat Rev Immunol* 15, 217-230.

Witkin, S.S., and Chaudhry, A. (1989). Circulating interferon-gamma in women sensitized to sperm: new mechanisms of infertility. *Fertil Steril* 52, 867-869.

Woodfin, A., Voisin, M.B., Beyrau, M., Colom, B., Caille, D., Diapouli, F.M., Nash, G.B., Chavakis, T., Albelda, S.M., Rainger, G.E., *et al.* (2011). The junctional adhesion molecule JAM-C regulates polarized transendothelial migration of neutrophils in vivo. *Nat Immunol* 12, 761-769.

Yang, L., Kowalski, J.R., Yacono, P., Bajmoczy, M., Shaw, S.K., Froio, R.M., Golan, D.E., Thomas, S.M., and Luscinskas, F.W. (2006). Endothelial cell cortactin coordinates intercellular adhesion molecule-1 clustering and actin cytoskeleton remodeling during polymorphonuclear leukocyte adhesion and transmigration. *J Immunol* 177, 6440-6449.

Yano, J., and Fidel, P.L., Jr. (2011). Protocols for vaginal inoculation and sample collection in the experimental mouse model of *Candida* vaginitis. *J Vis Exp*.

Yano, J., Kolls, J.K., Happel, K.I., Wormley, F., Wozniak, K.L., and Fidel, P.L., Jr. (2012). The acute neutrophil response mediated by S100 alarmins during vaginal *Candida* infections is independent of the Th17-pathway. *PLoS One* 7, e46311.

Yano, J., Noverr, M.C., and Fidel, P.L., Jr. (2017). Vaginal Heparan Sulfate Linked to Neutrophil Dysfunction in the Acute Inflammatory Response Associated with Experimental Vulvovaginal Candidiasis. *MBio* 8.

Yano, J., Palmer, G.E., Eberle, K.E., Peters, B.M., Vogl, T., McKenzie, A.N., and Fidel, P.L., Jr. (2014). Vaginal epithelial cell-derived S100 alarmins induced by *Candida albicans* via pattern recognition receptor interactions are sufficient but not necessary for the acute neutrophil response during experimental vaginal candidiasis. *Infect Immun* 82, 783-792.

Yipp, B.G., Petri, B., Salina, D., Jenne, C.N., Scott, B.N., Zbytnuik, L.D., Pittman, K., Asaduzzaman, M., Wu, K., Meijndert, H.C., *et al.* (2012). Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat Med* 18, 1386-1393.

Yu, Q., and Stamenkovic, I. (1999). Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. *Genes Dev* 13, 35-48.

Yurchenco, P.D. (2011). Basement membranes: cell scaffoldings and signaling platforms. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3.

Zec, K., Volke, J., Vijitha, N., Thiebes, S., Gunzer, M., Kurts, C., and Engel, D.R. (2016). Neutrophil Migration into the Infected Uroepithelium Is Regulated by the Crosstalk between Resident and Helper Macrophages. *Pathogens* 5.

Zemans, R.L., Colgan, S.P., and Downey, G.P. (2009). Transepithelial migration of neutrophils: mechanisms and implications for acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 40, 519-535.

Zhang, D., Chen, G., Manwani, D., Mortha, A., Xu, C., Faith, J.J., Burk, R.D., Kunisaki, Y., Jang, J.E., Scheiermann, C., *et al.* (2015). Neutrophil ageing is regulated by the microbiome. *Nature* 525, 528-532.

Zhang, D.E., Zhang, P., Wang, N.D., Hetherington, C.J., Darlington, G.J., and Tenen, D.G. (1997). Absence of granulocyte colony-stimulating factor signaling and neutrophil development in CCAAT enhancer binding protein alpha-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 569-574.

Zhu, Y., Bond, J., and Thomas, P. (2003). Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progesterin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2237-2242.

Anexo

Sex Hormones Coordinate Neutrophil Immunity in the Vagina by Controlling Chemokine Gradients

Sandra Lasarte,¹ Rafael Samaniego,² Laura Salinas-Muñoz,¹ Mauriel A. Guia-Gonzalez,¹ Linnea A. Weiss,³ Enrique Mercader,¹ Elena Ceballos-García,^{1,4} Teresa Navarro-González,⁴ Laura Moreno-Ochoa,⁴ Federico Perez-Millan,⁴ Marjorie Pion,⁵ Paloma Sanchez-Mateos,⁶ Andres Hidalgo,³ Maria A. Muñoz-Fernandez,^{5,7} and Miguel Relloso¹

¹Laboratorio Inmunobiología Molecular, Grupo Fisiopatología Comparada, ²Unidad de Microscopía Confocal, Hospital General Universitario Gregorio Marañón (HGUGM) and Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón (IISGM), ³Area of Cell and Developmental Biology, Fundación Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), ⁴Servicio de Ginecología, ⁵Laboratorio Inmunobiología Molecular, ⁶Laboratorio de Inmuno-oncología, Hospital General Universitario Gregorio Marañón (HGUGM) and Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón (IISGM), Madrid, and ⁷Networking Research Center on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), Spain

Estradiol-based contraceptives and hormonal replacement therapy predispose women to *Candida albicans* infections. Moreover, during the ovulatory phase (high estradiol), neutrophil numbers decrease in the vaginal lumen and increase during the luteal phase (high progesterone). Vaginal secretions contain chemokines that drive neutrophil migration into the lumen. However, their expression during the ovarian cycle or in response to hormonal treatments are controversial and their role in vaginal defense remains unknown.

To investigate the transepithelial migration of neutrophils, we used adoptive transfer of *Cxcr2*^{-/-} neutrophils and chemokine immunofluorescence quantitative analysis in response to *C. albicans* vaginal infection in the presence of hormones.

Our data show that the Cxcl1/Cxcr2 axis drives neutrophil transepithelial migration into the vagina. Progesterone promotes the Cxcl1 gradient to favor neutrophil migration. Estradiol disrupts the Cxcl1 gradient and favors neutrophil arrest in the vaginal stroma; as a result, the vagina becomes more vulnerable to pathogens.

Keywords. *C. albicans*; Cxcl1; estradiol; neutrophils; progesterone.

Candida albicans is the causative agent of 85% to 90% of vulvovaginal candidiasis cases [1]. Several factors, including oral contraceptives, antibiotics, pregnancy, and hormone replacement therapy, predispose women to candidiasis [2, 3]. Neutrophils play major roles in vaginal defense against bacterial and fungal pathogens [4]. They are recruited and extravasated by proinflammatory mediators [5, 6] and chemoattractants [7, 8] released by tissue-resident sentinel cells [9] and inflammatory cells [10] that guide them toward infectious or lesion foci [10–12]. Female sex hormones must control

neutrophil influx to allow the sperm to fertilize, while at the same time preventing growth of vaginal pathogens [13]. Thus, neutrophil numbers decrease in the vaginal lumen during the follicular phase, characterized by increased estradiol (E2) levels, disappear at the ovulatory phase (maximum peak of E2), and increase during the luteal phase when progesterone (P4) levels peak [14]. Furthermore, during ovulation, there is an asymptomatic increase in the quantity of vaginal microbiota that decreases during the luteal phase [15]. These findings suggest that high levels of E2 during ovulation may inhibit neutrophil-mediated immunity. Accordingly, E2-based contraception or hormonal replacement therapy increases susceptibility to infections [16], although it is not clear how this process occurs.

Vaginal secretions contain chemokines that can drive neutrophil migration into the vaginal lumen [13, 17], but their expression during the ovarian cycle or in response to hormonal treatments are controversial [14, 18]

Received 9 February 2015; accepted 23 July 2015.

Correspondence: Miguel Relloso, PhD, HGUGM-IISGM, Division of Immunology, C/ Dr Esquerdo 46, 28007 Madrid, Spain (miguel.rellosoc@salud.madrid.org).

The Journal of Infectious Diseases®

© The Author 2015. Published by Oxford University Press on behalf of the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For Permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com.
DOI: 10.1093/infdis/jiv402

and their role in vaginal defense remain unknown. To elucidate the in vivo forces driving neutrophil influx through the female reproductive mucosa, we set up a vaginal model of *C. albicans* infection in mice treated with sex hormones. We demonstrated that the Cxcl1/Cxcr2 axis drives neutrophils into the vaginal lumen. E2 disrupts the Cxcl1 gradient and neutrophils arrest in the stroma; therefore, the vagina becomes unprotected to pathogens.

MATERIALS AND METHODS

Mice

The Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Gregorio Marañón (IiSGM) Animal Care and Use Committee approved all the procedures. Female BALB/c (Charles River Laboratories, France) and C57BL/6 Wt and *Cxcr2*^{-/-} [19] mice were maintained under specific pathogen-free conditions in the Animal Facility of IiSGM, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), and Hospital 12 de Octubre.

Candida albicans

The SC5314 *C. albicans* (ATCC MYA-2876) strain was grown on Sabouraud dextrose chloramphenicol agar plates (Conda, Spain) overnight at 30°C prior to the experiments [20].

In Vivo Hormonal Treatment, Vaginal Inoculation, Lavage, and Fungal Burden

Four-week-old mice (13–15 g) were bilaterally ovariectomized [20] and injected subcutaneously with 0.01 mg 17β-E2 (Calbiochem, Germany) dissolved in 50 μL sesame oil (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) to produce about 250 pg/mL in serum (Supplementary Figure 1A) and the characteristic epithelial cells of the high estradiol ovarian cycle phase in the vaginal lavage (Supplementary Figure 1B). P4 (Calbiochem, Germany) was also prepared in 50 μL sesame oil containing 0.1 mg, and we detected about 5 ng/mL in serum (Supplementary Figure 1A) and detected neutrophils in the vaginal lavage as it is expected in the high progesterone phase of the ovarian cycle (Supplementary Figure 1B). Hormone treatment every 4 days was sufficient to maintain physiological hormone concentrations [20–23]. Seventy-two hours after first hormonal treatment, 2×10^6 *C. albicans* in 20 μL phosphate-buffered saline (PBS) were inoculated into the vagina. Vaginal secretions were collected by flushing the vagina with PBS [23]. Vaginal secretions were 10-fold serially diluted and plated on yeast-extract dextrose medium agar to assay the *C. albicans* fungal burden (colony-forming units) [20].

Neutrophil Purification

Bone marrow cells were flushed out from femurs and tibias. Neutrophils were isolated by anti-Ly-6G kit (MiltenyiBiotec, Germany) following manufacturer's instructions. Cells were plated on 24-well plate on complete Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 without phenol red medium (10% heat-inactivated fetal calf serum, 1 mM sodium pyruvate, 1% amino

acids, 2 mM L-glutamine, 50 μM 2-mercaptoethanol, and 15 mM HEPES) [23].

In Vivo Neutrophil Depletion

Mice were injected intraperitoneally with 200 μg rat antimouse Ly6g-1A8 or rat isotype control antibodies (Bio-X-Cell) in 0.1 mL sterile PBS to deplete neutrophils [24]. *C. albicans* vaginal inoculation was performed 24 hours after of the first antibody injection. Neutrophil depletion was confirmed by flow cytometry in the blood and vaginal lavage fluid.

In Vitro Hormonal Treatment

Media was complemented with 17β-E2 or P4 (Calbiochem, Germany) dissolved in ethanol (vehicle) at physiological range concentrations: E2-estrus 10^{-10} M, E2-metaestrus 10^{-11} M, and P4 10^{-8} M for 12 to 15 hours to adjust to the estrus stage duration in mice [23].

Flow Cytometry

Cellular phenotypic analysis was carried out by indirect immunofluorescence with the following antibodies: Gr-1-RB6-8C5 and Ly6g-1A8 (eBioscience, San Diego, California), Cd11b (eBioscience), and F480 (Biolegend, San Diego, California). All incubations were in the presence of 50 μg/mL mouse immunoglobulin G, the same isotype control antibody was always included as a negative control and dead cells were excluded by 7-amino-actinomycin D staining (Sigma). Total expression of Cxcr2 and Cxcr4 was performed with polyclonal antibodies (Santa Cruz, Dallas, Texas) with the BD Cytotfix/Cytoperm Fixation/Permeabilization kit (BD Biosciences, San Jose, California). Flow cytometry was performed with a Gallios device (Beckman Coulter, Brea, California) and data were analyzed using Flowjo software (Tree Star, Inc, Ashland, Oregon). Cells were counted using Flow-Count fluorospheres (Beckman Coulter) following the manufacturer's instructions.

Neutrophil Transfer Experiments

Bone marrow neutrophils isolated from wild-type (Wt) and *Cxcr2*^{-/-} by 3-layer Percoll gradient (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) [25] were stained with carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) and violet-CFSE (Invitrogen, Carlsbad, California) following the manufacturer's indications. C57BL/6 Wt-recipient mice were ovariectomized and injected intravenously with a 1:3 mixture of Wt and *Cxcr2*^{-/-} neutrophils. After the injection, the exogenous neutrophil content in the blood was analyzed. Blood, bone marrow from femurs, vaginal lavage, and vaginal tissue were collected 12 hours after the *Candida* inoculation.

Vaginal Epithelial Cells Enrichment and Conditioned Media Production

Vaginas were slit longitudinally and incubated at 4°C in 0.5% trypsin (Biochorm, UK) for 1 hour and then at room temperature for 1 hour. Samples were vortexed and washed, and the

epithelial cells-enriched supernatant was collected [26]. Cells were cultured with hormones for 6 days to produce conditioned media [27]. Media was incubated with anti-Cxcl1 and isotype antibody (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota) and protein G sepharose to clear the anti-Cxcl1.

Confocal Microscopy

Tissues were embedded in Tissue-Tek OCT (Sakura, Netherlands). Eight-micrometer sections were stained [28] and image analysis was performed using a SP2 confocal microscope (Leica, Germany). Multiple random 20× fields were acquired and cell density was quantified for fluorescence intensity quantification. Chemokines gradient quantification was assessed on cold 4% paraformaldehyde in PBS and EtOH 70% fixed frozen sections with the following antibodies: Cxcl1 (ab86436 rabbit polyclonal, Abcam, Cambridge, Massachusetts), Cxcl2 (AAM48 rabbit polyclonal, AbD Serotec, Raleigh, North Carolina), and Cxcl12 (Clone 79014, eBioscience). ImageJ software was used to compare the mean fluorescence intensity obtained in regions of interest depicted within the epithelium with those depicted at the adjacent subepithelial stroma [27].

Antibodies

Ly6g (clone 1A8, ebioscience), F4/80 (Rabbit polyclonal, Santa Cruz), Cxcr2 (Rabbit polyclonal, Santa Cruz) and Cxcr4 (Rabbit polyclonal, abcam).

Ex Vivo Transwell Chemotactic Assays

Neutrophils were added to the upper part of the transwell chambers (3-μm pore, Costar) and allowed to migrate for 1 hour at 37°C toward chemokine-containing media or cell-conditioned media. Migrated cells were assessed at the lower chamber by flow cytometry [27].

Statistical Analysis

The test used to determine significance between the treatments in each experiment can be found in the figure legends. Data are a combination of 2 to 4 separate experiments per point. Two-way analysis of variance (treatment vs time) was performed by IBM SPSS Statistics for Windows (Version 21.0., IBM Corp, Armonk, New York). GraphPad Prism5 (GraphPad Software, Inc, La Jolla, California) was used to determine statistical significance. A *P* value <.05 was considered significant.

RESULTS

E2 Prevents Neutrophil Recruitment Into the Lower Female Reproductive Tract

To study the role of sex hormones in neutrophil influx into the vaginal lumen, we set up a model of *C. albicans* vaginal infection on hormone-treated mice. We initially sought to identify the cells in the vaginal lavage and detected a population of neutrophils

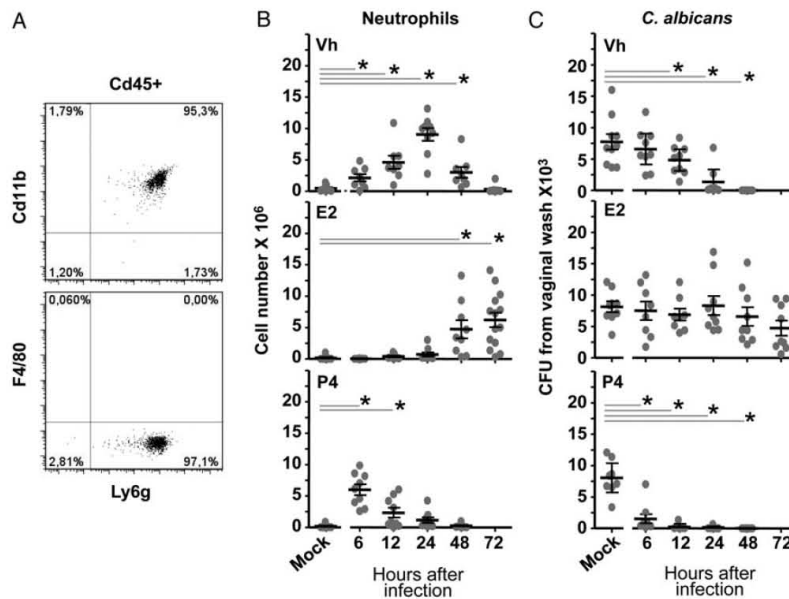


Figure 1. Neutrophils in the vaginal lumen. Ovariectomized mice were hormone-treated and inoculated with *Candida* in the vagina. *A*, Representative flow cytometry plots of the vaginal lavage Cd45⁺ cells. *B*, Number of neutrophils in the vaginal lavage. *C*, Fungal burden (CFU) in the vaginal lavage. Data are expressed as mean ± SEM. Each circle represents a mouse. **P* < .05 (Mann-Whitney test). Abbreviations: CFU, colony-forming units; E2, estradiol; P4, progesterone; SEM, standard error of the mean; Vh, vehicle.

(Cd45⁺, Ly6g⁺, Cd11b⁺ and F4/80⁻) after fungal infection (Figure 1A). We detected an increase in neutrophil numbers (approximately 30-fold) in the vaginal lavage of vehicle-treated mice 24 hours after the infection compared with mock-infected vehicle-treated mice; P4-treated mice showed an earlier peak of neutrophils (approximately 25-fold) after infection (Figure 1B), indicating that P4 accelerates neutrophil recruitment. Remarkably, neutrophil infiltration (approximately 26-fold) was dramatically delayed (48 hours) in E2-treated mice. Therefore, the hormonal treatments have a direct effect on the kinetics of neutrophil influx (analysis of variance [ANOVA] $P = .019$) after the fungal inoculation. We also tested the in vivo fungal burden in *C. albicans*-infected mice and found that vehicle-treated mice significantly lowered the fungal burden 12 hours after infection (approximately 50% reduction) and almost cleared it by 24 hours (approximately 85% reduction). P4-treated mice almost cleared the fungal burden 6 hours after infection (approximately 80% reduction), but E2-treated mice were unable to clear the fungal infection even after the neutrophil infiltration (Figure 1C).

Therefore, the hormonal treatments have a direct effect on the clearing of fungal infection (ANOVA $P = .015$). Moreover, we found that E2-treated neutrophils displayed impaired candidacidal activity ex vivo (Figure 2A)—these observations explain why E2-treated neutrophils had no effect on vaginal fungal burden, suggesting a nonprotective role [24]. However, P4-treated neutrophils had a robust candidacidal activity in vivo (Figure 1C) and ex vivo (Figure 2A), and depletion of neutrophils impaired the vaginal fungal clearance (Figure 2B and 2C). Furthermore, P4-treatment restored the E2-treated neutrophils candidacidal activity at the luteal phase physiological hormonal concentrations (Figure 2A). Therefore, E2-treatment induces susceptibility and P4-treatment protection to vaginal infection, which is neutrophil-dependent.

E2 levels are maximal during the follicular phase and P4 during the luteal phase of the ovarian cycle. In order to mimic the ovarian cycle sequence, we pretreated mice with E2, and 24 hours after infection we treated them with vehicle, E2, or Pg and analyzed neutrophil numbers in vaginal lavage (Figure 3A).

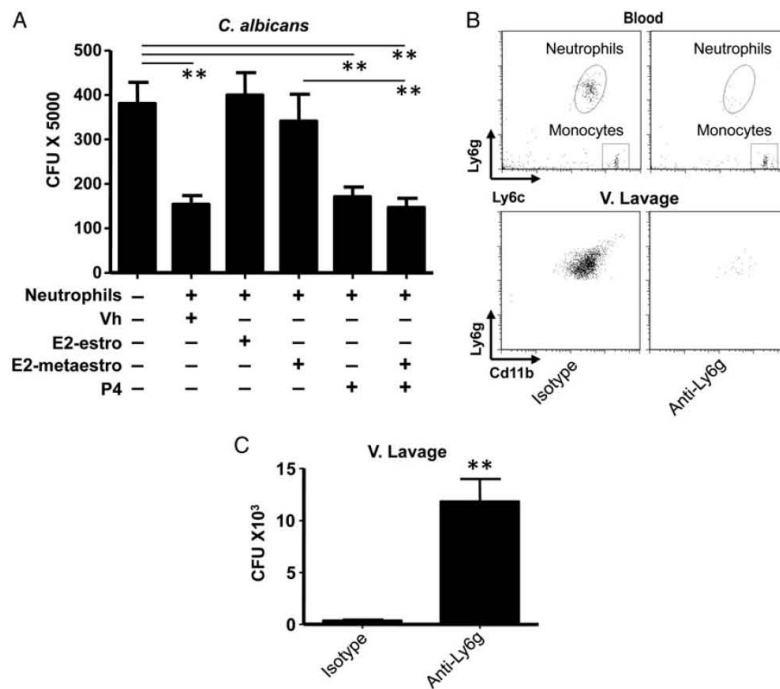


Figure 2. A, Bone marrow neutrophils were isolated and treated (12–15 hours) with vehicle or estradiol-estrus (10^{-10} M), estradiol-metaestrus 10^{-11} M, or progesterone (10^{-8} M), and challenged with *C. albicans*. Fungal burden (CFU) after 3 hours of coculture. B and C, Bilaterally ovariectomized mice received progesterone-treatment subcutaneously and rat antimouse Ly6g or isotype control antibody intraperitoneally 24 hours prior to *C. albicans* inoculation to deplete the neutrophils. Representative flow cytometry plots of the blood and vaginal lavage Cd45⁺ cells and fungal burden (CFU) in the vaginal lavage 12 hours after the infection. Data are expressed as mean \pm SEM ($n = 5$). * $P < .05$ (Mann–Whitney test). Abbreviations: CFU, colony-forming units; E2, estradiol; P4, progesterone; SEM, standard error of the mean; V. Lavage, vaginal lavage; Vh, vehicle.

P4-treatment increased the number of neutrophils (approximately 7-fold) in vaginal lavage, compared with E2-treatment, and significantly reduced fungal burden (approximately 60% reduction) 12 hours after hormonal injection (Figure 3B). These data reproduce the window of vulnerability in which females are more susceptible to infection after ovulation [29]. Furthermore, P4-treatment restored the E2-treated neutrophils candidacidal activity, which is in agreement with our ex vivo candidacidal test data on hormones-treated neutrophils (Figure 2A).

E2 Induces Accumulation of Neutrophils in the Subepithelial Stroma and P4 Promotes Their Influx to the Vaginal Lumen

Inhibition of neutrophil influx to the vaginal lumen in E2-treated mice could be due to a diminished recruitment from the vascular beds into the stromal layer, or to an impeded transmucosal migration. To sort out these possibilities, we challenged

hormone-treated mice with *C. albicans* and stained neutrophils in vaginal sections. We detected an increase of neutrophil density (approximately 80-fold) in the stroma of vaginas from vehicle- and P4-treated mice. E2-treated mice also showed accumulations of neutrophils in the stroma together with densely packed clusters

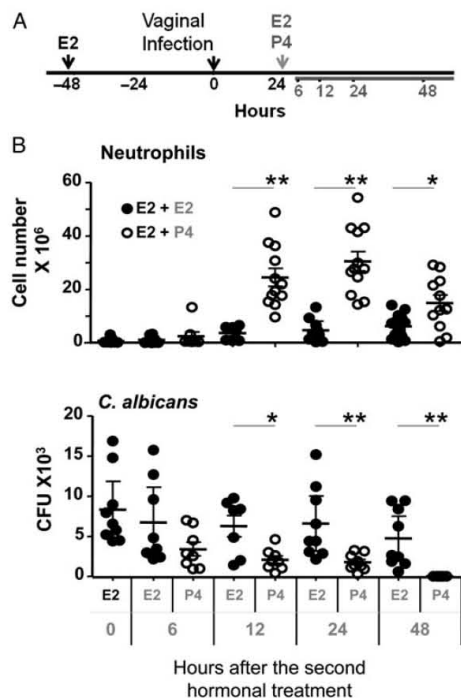


Figure 3. Neutrophils in the vaginal lumen. Ovariectomized mice were estradiol-treated and inoculated with *C. albicans* in the vagina. After the infection mice were treated with estradiol or progesterone to mimic the ovarian cycle. *A*, Experimental scheme. *B*, Number of neutrophils and fungal burden (CFU) in the vaginal lavage. Black symbols represent hormone pretreatment, grey symbols represent hormone treatment 24 hours after infection. Estradiol-treated (filled symbols) and estradiol + progesterone-treated (open symbols). Data are expressed as mean \pm SEM. Each circle represents a mouse. * $P < .05$ and ** $P < .01$ (Mann-Whitney test). Abbreviations: CFU, colony-forming units; E2, estradiol; P4, progesterone; SEM, standard error of the mean.

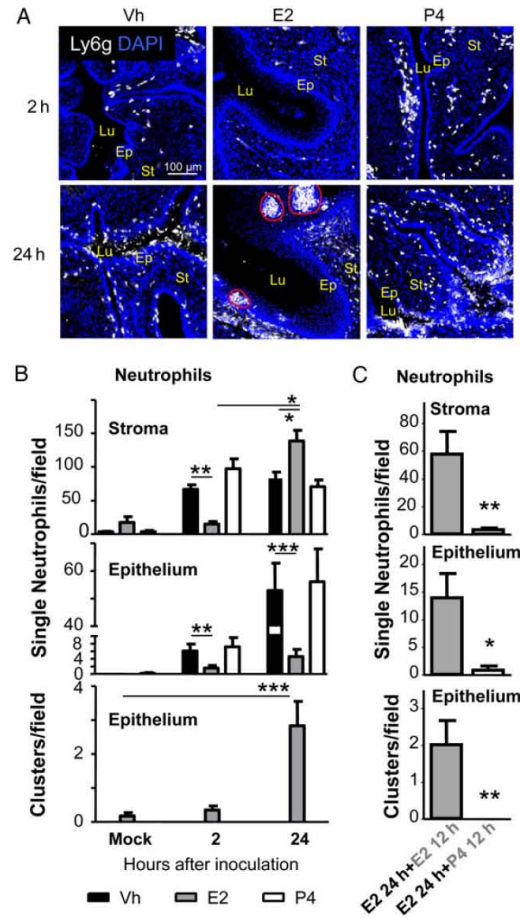


Figure 4. Neutrophils in the vaginal tissue. Hormone-treated ovariectomized mice were inoculated with *C. albicans*. *A*, Vaginal sections were Ly6g-stained (white dots). Red circles indicate neutrophil accumulations. *B*, Single cells/field in the vaginal epithelium and stroma, and clusters of more than 100 neutrophils in the epithelium. *C*, Estradiol-treated mice inoculated with *C. albicans* in the vagina, 24 hours after the infection mice were treated with estradiol or progesterone to mimic the ovarian cycle. Black legends represent hormone pretreatment, gray legends represent hormone treatment 24 hours after infection for 12 hours. Data were calculated in at least 3 different sections of each vagina ($n = 5$) and are expressed as mean \pm SEM. * $P < .05$; ** $P < .01$; and *** $P < .0001$ (Mann-Whitney test). Abbreviations: E2, estradiol; Ep, epithelium; Lu, lumen; P4, progesterone; SEM, standard error of the mean; St, stroma; Vh, vehicle.

of neutrophils around the epithelium (Figure 4A and 4B). These clusters were constituted by neutrophils and some macrophages (Supplementary Figure 2A), and resembled swarm-like structures [30]. In contrast, vehicle- and P4-treated mice showed only numerous single neutrophils in the vaginal epithelium.

To further investigate the role of P4 on neutrophil kinetics, we treated ovariectomized mice with E2, challenged them with *C. albicans*, and treated them with hormones. P4-treatment was able to overcome the effect of E2 as shown by the reduction of neutrophil number (approximately 20-fold) in the stroma, epithelium, and clusters of neutrophils (Figure 4C and Supplementary Figure 2B). These data were in agreement with the increase of neutrophils in the vaginal lavage of the P4-treated mice (Figure 3B).

Cxcr2 Is Necessary for Neutrophil Transepithelial Migration Into the Vaginal Lumen

To identify the mechanisms by which E2 prevents neutrophil migration into the vaginal lumen, we tested the contribution of Cxcr2, a chemokine receptor that drives neutrophil recruitment from the circulation [5] and interstitial migration [11, 12].

Additionally, its ligands (Cxcl1 and Cxcl2) have been identified in vaginal secretions [17, 18]. We purified bone marrow neutrophils from Wt and *Cxcr2*^{-/-} mice (Supplementary Figure 2C) and tested their ex vivo chemotactic response toward Cxcl1 and the Cxcr4-ligand Cxcl12, as a control (Supplementary Figure 2D). Wt neutrophils migrated toward both chemokines, while *Cxcr2*^{-/-} neutrophils migrate toward Cxcl12 but failed to migrate to Cxcl1. We next stained Wt and *Cxcr2*^{-/-} neutrophils with different dyes and injected them into recipient mice in a 1:3 ratio. We detected the same input ratio in the blood after the injection and also 12 hours after vaginal inoculation in the blood, bone marrow, and vaginal stroma. Importantly, we detected an inverse ratio in the vaginal lavage, indicating a drastic reduction in migration in the absence of *Cxcr2*^{-/-} (approximately 90%) (Figure 5A–D). Thus, *Cxcr2* plays a key role in the migration of neutrophils across the vaginal epithelium in response to fungal infection.

To explore whether the negative effects of E2 on neutrophil migration were due to an impeded capacity to perform chemotaxis, we purified neutrophils from bone marrow and tested the influence of sex hormones on total Cxcr4 and Cxcr2 expression

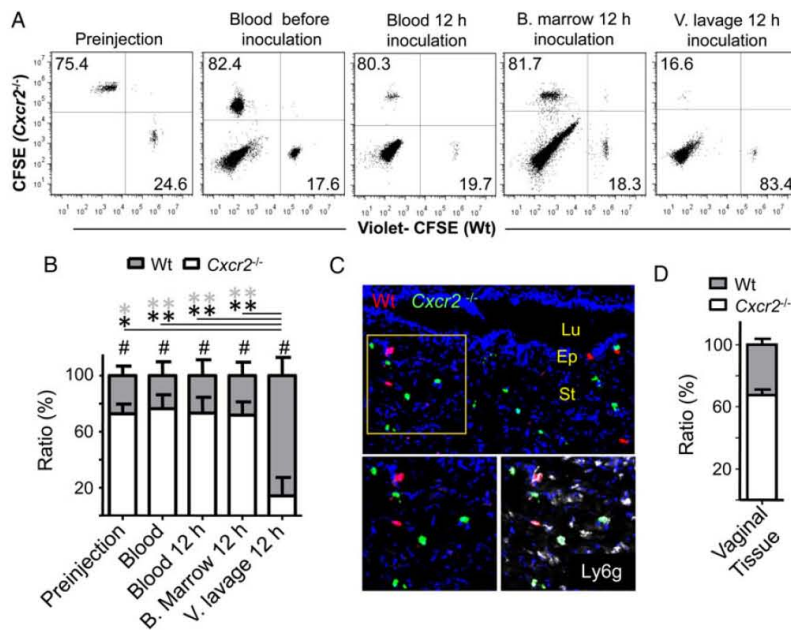


Figure 5. *Cxcr2* is necessary for neutrophil vaginal transepithelial migration. *A*, Wild-type (Wt) C57BL/6 recipient mice were injected with the preinjection mixture of neutrophil (25% violet-CFSE C57BL/6 Wt and 75% CFSE C57BL/6 *Cxcr2*^{-/-}), before the injection blood was assayed and 12 hours after the inoculation with *Candida* samples were collected. Numbers in the flow cytometry plots are the percentages of positive cells in the gate between Wt and *Cxcr2*^{-/-}. *B*, Average of the percentage of Wt and *Cxcr2*^{-/-} cells. **P* < .05 (by Mann–Whitney test). ***P* < .05; ****P* < .005 (by Wilcoxon). Gray star, Wt; black star, *Cxcr2*^{-/-}. *C*, Vaginal sections analyzed by confocal microscopy. Red neutrophils from Wt and green from *Cxcr2*^{-/-} mice. *D*, Average of the percentage of Wt and *Cxcr2*^{-/-} cells in the vaginal sections. Data are from 2 independent experiments (*n* = 6). Abbreviations: B. marrow, bone marrow; CFSE, carboxy-fluorescein succinimidyl ester; Ep, epithelium; Lu, lumen; St, stroma; V. lavage, vaginal lavage.

and on chemotactic response to Cxcl1, Cxcl2, and Cxcl12; however, we did not find significant effects (Supplementary Figure 3A and 3B). Furthermore, we stained vaginal sections from hormone-treated mice and did not detect differences on Cxcr2 expression in stromal Ly6g⁺ neutrophils by confocal microscopy and flow cytometry (Supplementary Figure 4A and 4B). Interestingly, we did not detect Cxcr4 staining by confocal or flow cytometry in vaginal neutrophils, although blood neutrophils expressed Cxcr4 (Supplementary Figure 4C). These

data therefore rule out the implication of the Cxcl12/Cxcr4 axis in vaginal transepithelial migration. We thus conclude that E2 and P4 do not have a direct effect on neutrophil-borne Cxcr2 expression or function.

Female Sex Hormones Control Cxcl1 Gradients in the Vagina

Having identified Cxcr2 as a central chemokine receptor during neutrophil recruitment to the vaginal lumen, we explored the Cxcr2-ligands (Cxcl1, Cxcl2, and Cxcl5) for E2-induced

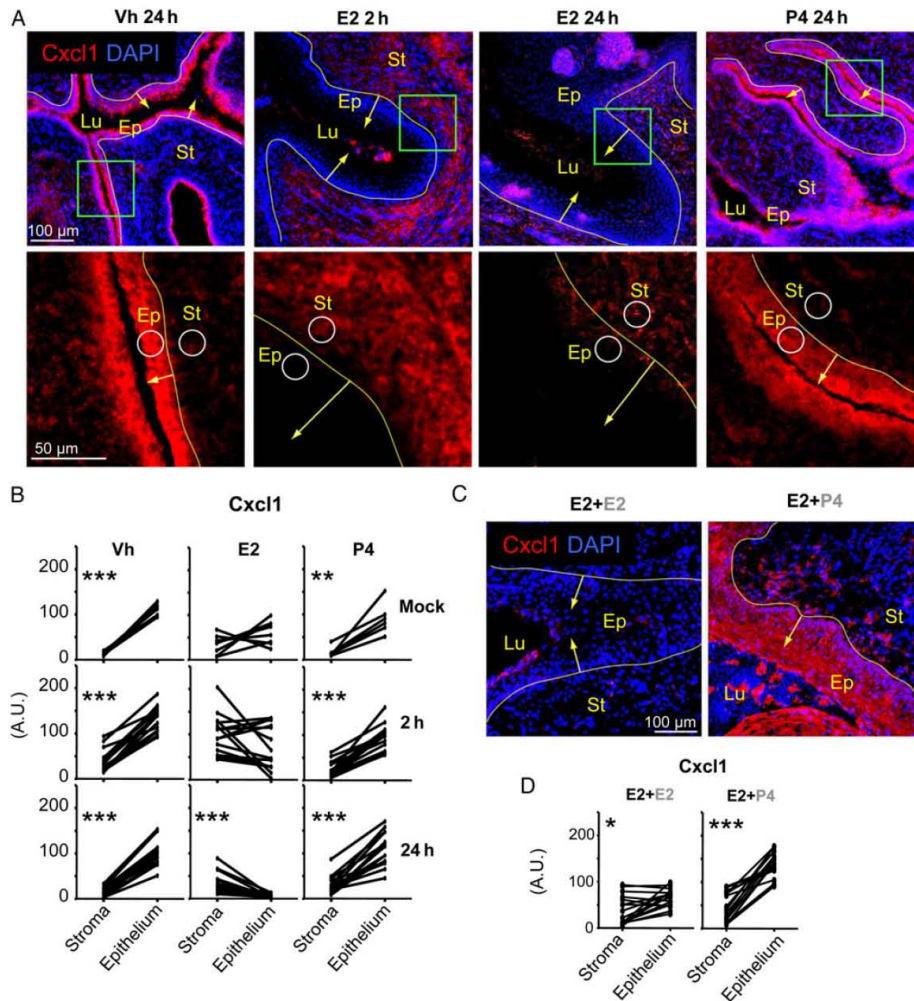


Figure 6. Cxcl1 gradient in the lower female reproductive tract. *A*, Hormone-treated mice vaginal sections from infected mice. *B*, Expression of Cxcl1/field (white circles) in the vagina. *C*, Estradiol-treated mice and *C. albicans* inoculated in the vagina. After the infection (24 hours), mice were treated with estradiol or progesterone for 12 hours. Estradiol-treated and estradiol + progesterone-treated mice vaginal sections. *D*, Expression of Cxcl1 in the vaginal stroma and epithelium. Data were calculated in at least 3 different points in 3 different sections of each vagina (n = 5). **P* < .05; ***P* < .01; and ****P* < .0001 (Mann–Whitney test). Abbreviations: A.U., arbitrary units; E2, estradiol; Ep, epithelium; Lu, lumen; P4, progesterone; St, stroma; Vh, vehicle.

alterations in gradient expression. We focused on Cxcl1 and Cxcl2 because they have been identified in vaginal secretions [17, 18]. To quantify the *in vivo* gradient of chemokines, we measured the intensity of the staining in adjacent regions of stroma and epithelium. In the absence of infection, we detected strong Cxcl1 expression in the vaginal epithelium in vehicle- and P4-treated mice, but not in E2-treated animals in which the epithelium showed a weak staining (Figures 6B and Supplementary Figure 5A). Moreover, after *C. albicans* inoculation, vehicle- and P4-treated mice showed stronger Cxcl1 staining in the vaginal epithelium than in the stroma (approximately 6-fold). In contrast, E2-treated mice showed similar or even higher expression in the stroma than in the epithelium (Figure 6A and 6B). We also detected that 12 hours of P4-treatment to previously E2-treated animals increased (approximately 3-fold) Cxcl1 staining in the vaginal epithelium relative to the stroma (Figure 6C and 6D). In conclusion, E2 treatment disrupts the Cxcl1 gradient during steady state conditions, and inflammation in the vagina whereas P4 restored it. In contrast, Cxcl2 expression was undetectable in the vagina, and Cxcl12 expression was stronger in the epithelium than the stroma in all cases (Supplementary Figure 5B and 5C), indicating that E2 does not induce general silencing of chemokines in the epithelium. Our data show that the production of Cxcl1 by vaginal epithelial cells drives neutrophil transepithelial infiltration through tightly established gradients, and that E2 blocks migration by disrupting or reverting Cxcl1 gradients.

To further confirm the *in vivo* data, we isolated vaginal epithelial cells and cultured them with vehicle, E2, and P4 to produce conditioned media, and assayed *ex vivo* neutrophil chemotaxis. Vehicle- and P4-treated conditioned media induced neutrophil chemotaxis (approximately 3-fold), whereas E2-treated media lost its chemotactic response (Figure 7A). Furthermore, Cxcl1

depletion from conditioned medium abolished neutrophil chemotaxis (Figure 7B). These results confirm that maintaining appropriate sex hormone-driven production and gradients of Cxcl1 by epithelial cells allows neutrophil migration toward the vaginal lumen.

DISCUSSION

We demonstrate that the Cxcl1/Cxcr2 axis drives neutrophil transepithelial migration into the vaginal lumen through a stroma-to-epithelium Cxcl1 gradient. E2 disrupts the Cxcl1 gradient, and neutrophils arrest in the stroma. P4, in contrast, restores Cxcl1 gradient to allow neutrophil migration into the lumen. Our data may provide an explanation as to why E2-based contraceptives and hormonal replacement therapy predispose women to vaginal candidiasis.

The female reproductive tract mucosa must reconcile the presence of commensal microbiota and the transit of exogenous spermatozoa with the elimination of sexually transmitted pathogens. Female sex hormones regulate the ovulation and also have strong influence on the mucosal immune system [31]. We and others have reported that estradiol lowers the immune response to pathogens [20, 28, 32] and sperm [31]. During ovulation, under steady state conditions, neutrophils disappear from the vaginal lumen to prevent sperm from immune attack; whereas during the luteal phase, neutrophils invade the vaginal lumen [14, 15] and generate a noxious environment for sperm and pathogens. For example, it has been observed that depositions of sperm in the presence of neutrophils induce neutrophil extracellular traps to avoid sperm dissemination [33]. Our data add a new piece to the puzzle by showing that E2-treatment impairs neutrophil influx into the vaginal lumen, not only in steady-state conditions but also in response to *C. albicans*, whereas P4 favors neutrophil migration.

Several chemokines, cytokines, and alarmins have been detected in the vaginal secretions [14, 17, 34–38], but their exact role driving neutrophils into the vaginal lumen and expression during the ovarian cycle remains controversial. Some authors reported an upregulation of Cxcl1 expression during ovulation [31], while others reported no significant differences [14]. To shed light on this controversy, we used ovariectomized mice and exogenous hormones. Within the limitation of our model, we showed that E2-treatment disrupts Cxcl1 gradients and curbs neutrophil accumulation in the vaginal stroma. These findings are in agreement with the observation that E2 administration to postmenopausal women decreases Cxcl1 in the vaginal fluids [39] and increases susceptibility to infections [11, 12]. P4-treatment restores Cxcl1 gradient to recruit neutrophils into the lumen, to clear the sperm [23], or to suppress pathogens.

Despite the importance of neutrophils for fungal defense, their role in protecting from vaginal candidiasis is controversial. Fidel et al, using intravaginal challenge in volunteers [40] and an

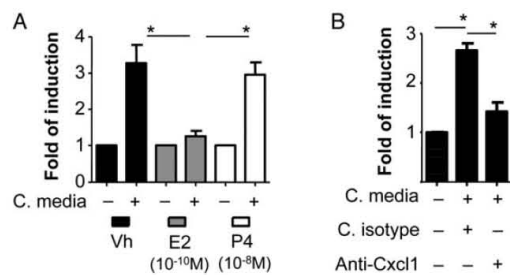


Figure 7. Cxcl1 chemokine drives neutrophil migration. *A*, *Ex vivo* epithelial cells from vaginas were isolated and treated with hormones. Conditioned media (C. media) were assayed for neutrophil chemotaxis. *B*, Bone marrow neutrophil chemotaxis to C. media depleted with anti-Cxcl1 antibody and control isotype. Data are represented as fold induction + SD. A representative experiment of 3 independent tests is shown. * $P < .05$ (Mann–Whitney test). Abbreviations: C. isotype, control isotype; E2, estradiol; P4, progesterone; Vh, vehicle.

E2-treated vaginal candidiasis mouse model [24], showed that neutrophil depletion has no effect on fungal burden and concluded that neutrophil migration into the vagina lumen not only has a nonprotective role but actually appeared to contribute to symptomatology. Their data support the long-standing belief that the ability to switch between yeast and hyphal forms is the major virulence factor of *C. albicans* [24]. Our in vivo and in vitro E2-treated infection data are in agreement with previous results because neutrophils were not able to clear the infection. However, neutrophils from P4-treated mice were very efficient at clearing the infection and reducing inflammation; furthermore, neutrophils have a strong in vivo protective role. Thus, we uncover a mechanism that favors reproduction during ovulation (high E2) when sperm must be spared from immune attack by arresting neutrophils in the subepithelial stroma, and at the same time induces a window of vulnerability [29]. During the luteal phase, P4 favors neutrophil invasion to control the vaginal microbiota [18], clears the sperm associated with microbes [41], and reduces the chances of infection. Thus, sex hormones orchestrate tolerance and immunity in female mucosal tissue by regulating chemokine gradients. In the case of a hormonal imbalance, *C. albicans* could use the diminished presence of neutrophil reaction to grow and promote infection.

Our data suggest that high levels of E2 not only prepare the female reproductive tract for sperm transport [42], but also arrest neutrophils to prevent a spermicidal attack. The Cxcl1/Cxcr2 axis drives neutrophil transepithelial migration in the colon and the lung [11, 12], it could represent a general mechanism that has been maintained during evolution to preserve immunity, tissue repair, and homeostasis. However, the female mucosa must delicately regulate Cxcl1 gradients to reconcile control against infections and reproductive functions. Clinically, this means that E2-based treatments or deregulations of P4 expression may compromise vaginal immunity, making it more vulnerable to pathogens.

Supplementary Data

Supplementary materials are available at *The Journal of Infectious Diseases* online (<http://jid.oxfordjournals.org>). Supplementary materials consist of data provided by the author that are published to benefit the reader. The posted materials are not copyedited. The contents of all supplementary data are the sole responsibility of the authors. Questions or messages regarding errors should be addressed to the author.

Notes

Acknowledgments. The authors thank the units of flow cytometry, cell culture, and statistical analysis. We are grateful to F. Sanchez-Cobos (IISGM), N. Lopez (IISGM), M. Grau (i+12), D. Parreño, and M. J. Coronado (IISPH) for expert help and support.

Financial support. M. R. received grants from the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (PI13/00269), Fundacion Mutua Madrileña, and holds a Miguel Servet II contract (CPII14/00009). L. S.-M. holds an IISGM intramural contract. P. S.-M. holds ISCIII PI13/01454 and A. H. holds contracts

RYC-2007-00697, SAF2012-31142, and SAF2013-49662-EXP. M. A. M.-F. holds contracts RD12/0017/0037 and PI13/02016.

Potential conflicts of interest. All authors: No reported conflicts.

All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

References

- Ilkit M, Guzel AB. The epidemiology, pathogenesis, and diagnosis of vulvovaginal candidosis: a mycological perspective. *Crit Rev Microbiol* 2011; 37:250–61.
- Rivers CA, Adaramola OO, Schwebke JR. Prevalence of bacterial vaginosis and vulvovaginal candidiasis mixed infection in a southeastern American STD clinic. *Sex Transm Dis* 2011; 38:672–4.
- Fischer G, Bradford J. Vulvovaginal candidiasis in postmenopausal women: the role of hormone replacement therapy. *J Low Genit Tract Dis* 2011; 15:263–7.
- Milligan GN. Neutrophils aid in protection of the vaginal mucosae of immune mice against challenge with herpes simplex virus type 2. *J Virol* 1999; 73:6380–6.
- Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2013; 13:159–75.
- Liu Y, Mei J, Gonzales L, et al. IL-17A and TNF-alpha exert synergistic effects on expression of CXCL5 by alveolar type II cells in vivo and in vitro. *J Immunol* 2011; 186:3197–205.
- Williams MR, Azcutia V, Newton G, Alcaide P, Lusinskas FW. Emerging mechanisms of neutrophil recruitment across endothelium. *Trends Immunol* 2011; 32:461–9.
- Sadik CD, Kim ND, Luster AD. Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends Immunol* 2011; 32:452–60.
- Chou RC, Kim ND, Sadik CD, et al. Lipid-cytokine-chemokine cascade drives neutrophil recruitment in a murine model of inflammatory arthritis. *Immunity* 2010; 33:266–78.
- Schiwon M, Weisheit C, Franken L, et al. Crosstalk between sentinel and helper macrophages permits neutrophil migration into infected uroepithelium. *Cell* 2014; 156:456–68.
- Li Q, Park PW, Wilson CL, Parks WC. Matrilysin shedding of syndecan-1 regulates chemokine mobilization and transepithelial efflux of neutrophils in acute lung injury. *Cell* 2002; 111:635–46.
- Swee M, Wilson CL, Wang Y, McGuire JK, Parks WC. Matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) controls neutrophil egress by generating chemokine gradients. *J Leukoc Biol* 2008; 83:1404–12.
- Wira CR, Rodriguez-Garcia M, Patel MV. The role of sex hormones in immune protection of the female reproductive tract. *Nat Rev Immunol* 2015; 15:217–30.
- Sonoda Y, Mukaida N, Wang JB, et al. Physiologic regulation of postovulatory neutrophil migration into vagina in mice by a C-X-C chemokine(s). *J Immunol* 1998; 160:6159–65.
- Gajer P, Brotman RM, Bai G, et al. Temporal dynamics of the human vaginal microbiota. *Sci Transl Med* 2012; 4:132ra52.
- Ghosh M, Rodriguez-Garcia M, Wira CR. The immune system in menopause: pros and cons of hormone therapy. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2014; 142:171–5.
- Lindqvist M, Navabi N, Jansson M, et al. Local cytokine and inflammatory responses to candidate vaginal adjuvants in mice. *Vaccine* 2009; 28:270–8.
- Hickey DK, Fahey JV, Wira CR. Mouse estrous cycle regulation of vaginal versus uterine cytokines, chemokines, alpha-/beta-defensins and TLRs. *Innate Immun* 2013; 19:121–31.
- Drechsler M, Megens RT, van Zandvoort M, Weber C, Soehnlein O. Hyperlipidemia-triggered neutrophilia promotes early atherosclerosis. *Circulation* 2010; 122:1837–45.
- Relloso M, Aragonese-Fenoll L, Lasarte S, et al. Estradiol impairs the Th17 immune response against *Candida albicans*. *J Leukoc Biol* 2012; 91:159–65.
- Fidel PL Jr, Cutright J, Steele C. Effects of reproductive hormones on experimental vaginal candidiasis. *Infect Immun* 2000; 68:651–7.

Neutrophil numbers fluctuate throughout the ovarian cycle in the vagina. During the follicular phase, while estradiol (E₂) concentration increases, neutrophils disappear from the vaginal lumen. After ovulation, during the luteal phase, progesterone (P₄) levels peak and neutrophils re-infiltrate the vagina. Current hypothesis holds that female sex hormones govern this phenomenon; however, the mechanisms that direct neutrophil migration to the vaginal lumen are still unknown.

In this work, we show that E₂ produces a neutrophil retention and inactivation in the lower FRT mucosa that protects sperm from neutrophil attack and maintains a favorable environment during ovulation (peak E₂). Conversely, P₄ restores the neutrophil presence and activity after ovulation, ensuring the defense against opportunistic or sexually transmitted pathogens during the luteal phase. Our data provide a new mechanism in the conciliation of reproductive and immune functions in the FRT, which can be useful in the development of treatments for fertility disorders and vaginal infections.

