

# ARTÍCULO ORIGINAL

## Lípidos en células vaginales: su relación con la respuesta inflamatoria y patología en mujeres embarazadas

Marisa Arcos<sup>†,1</sup>, Santiago López,<sup>1</sup> Alicia Farinati<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Cátedra de Microbiología y Parasitología

<sup>†</sup> Cátedra de Histología, Biología Celular y Embriología.

Facultad de Medicina, Universidad del Salvador. Tucumán 1845, C1050AAK, Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

### Introducción

Es interesante destacar que muchas veces en el contenido vaginal se comprueba una gran respuesta inflamatoria con la presencia de microorganismos considerados normales en la vagina entre los que figura *Corynebacterium spp*<sup>1</sup> y realmente no hay explicación sobre esta particularidad.

La Inmunidad Innata (II) forma parte del sistema más antiguo y universal para controlar las infecciones en sus comienzos; es decir, en la fase aguda de la infección. Entre sus principales funciones se incluyen la opsonización, la activación de la cascada del Complemento, la fagocitosis, la activación de cascadas proinflamatorias y finalmente la apoptosis.

Además, este Sistema Inmune Innato juega un papel muy importante en la activación y expresión de la respuesta del Sistema Inmune Adaptativo, a través de la inducción de moléculas y citoquinas coestimuladoras.<sup>2</sup>

El mecanismo de acción de la II se basa en los receptores de reconocimiento de patrones (RRP) que identifican secuencias conservadas de los microorganismos (MO) denominadas *patrones moleculares asociados a patógenos* (PAMPs).<sup>3</sup> Estos receptores pueden ser secretados y expresados en las superficies celulares o pueden encontrarse dentro del componente intracelular. Se conoce un grupo importante de RRP cuyos integrantes principales son los Receptores *Toll-Like* (TLRs).<sup>2</sup>

Hasta la fecha se encontraron 11 miembros de la familia TLRs, TLRs 1-11, y sus ligandos, incluyendo productos moleculares de bacterias, hongos, virus y protozoarios. El reconocimiento de los mismos produce una cascada de señalización que desemboca en la expresión de citoquinas proinflamatorias y péptidos antimicrobianos.<sup>3</sup>

Dentro de esta familia, los *TLR 2* y *TLR 4*, entre otros, son los de mayor expresión a nivel del epitelio vaginal.<sup>3</sup> Si bien algunos autores afirman que no se produce expresión de los TLR4 en el epitelio vaginal,<sup>4</sup> otros sostienen que sucede por las diferencias en la ubicación anatómica de donde se toma la muestra.<sup>3</sup> También se encuentran expresados en células amnióticas,<sup>5</sup> células trofoblásticas, macrófagos y neutrófilos de placentas.<sup>6</sup>

La respuesta inmune innata frente a diferentes patógenos puede llegar a afectar la evolución natural del embarazo. Se piensa que complicaciones clínicas del embarazo, tales como preeclampsia, retardo del crecimiento uterino y parto prematuro, puedan estar asociadas a infecciones. Algunos autores observaron que durante el primer trimestre del embarazo no se produjo expresión de TLR 2-4 en el sinciotrofoblasto.<sup>4</sup> La apoptosis mediada por TLR 2 en las células trofoblásticas puede proveer una explicación sobre la fisiopatología de las diferentes complicaciones clínicas del embarazo y su relación con infecciones.<sup>6</sup>

En el contexto de la microflora se ha visto que los ácidos grasos poliinsaturados poseen propiedades antibacterianas y en algunas ocasiones se comportan como probióticos, interviniendo en la constitución de la misma.<sup>7</sup> Recientemente Kankaanpää y col. demostraron en medios de crecimiento, que varios ácidos grasos libres poliinsaturados median la adhesión de probióticos al mucus y células epiteliales.<sup>8</sup> Asimismo, alteraciones de la II llevan al cambio de la flora vaginal normal, constituida fundamentalmente por *Lactobacillus spp*, a una flora atípica con capacidad patogénica, cuya actividad y proliferación provoca la denominada *Vaginosis Bacteriana* (VB) de etiología diversa.<sup>9</sup> De esta manera, una inducción generada por esta microflora patógena provoca una inhibición en la expresión y/o actividad de TLR, disminuyendo la respuesta inmune, facilitando la proliferación de bacterias vaginales atípicas.<sup>9</sup> La VB es una de las patologías más fre-

cuentemente observada en mujeres embarazadas y en edad fértil.

El término Microbiota Intermedia (MI) se utiliza para caracterizar ciertos disturbios de la II que se manifiestan en los extendidos celulares de las pacientes que la padecen por tener deficiencia de *Lactobacillus* spp, cocos positivos o coco bacilos positivos, células epiteliales parabasales y/o leucocitos, muy similar a lo que ocurre en las vaginitis aeróbicas.<sup>10</sup>

Existe evidencia de que la relación de VB y la acumulación de ácidos grasos insaturados en las células vaginales podría resultar en el bloqueo del TLR 2-4 con el consiguiente bloqueo de la respuesta inmune.<sup>6</sup>

La Vulvovaginitis candidiásica (VVC) causada por *Candida albicans* continúa siendo un problema entre las mujeres en edad fértil y embarazadas.<sup>11</sup> No se conoce con exactitud el rol de los TLRs en la VVC; diferentes estudios en la literatura se contradicen. Si bien se demostró que los TLR 2-4 intervienen en la respuesta inmune a patógenos fúngicos, existe evidencia demostrada que el TLR 2 es capaz de suprimir la respuesta inmune frente a *C. albicans* a través de la inducción de IL 10 y células T supresoras.<sup>12</sup> Debido a esto, se deberían desarrollar nuevas investigaciones para determinar con mayor precisión el rol de la II en la VVC.

El tipo de interacción entre MO y células es importante para el desarrollo de muchas enfermedades endógenas.<sup>13</sup> Es de interés conocer la relación del metabolismo celular con la adherencia bacteriana y, por ende, con la constitución de la microflora y sus posibles modificaciones.

En cuanto a la presencia de lípidos intracelulares (LIC) en células vaginales exfoliadas durante diferentes estados hormonales y condiciones neoplásicas, indican claramente la influencia de las hormonas sexuales, sobre la distribución y tamaño de lípidos intracelulares.<sup>14</sup> Lamentablemente no se ha encontrado bibliografía que relacione los LIC con las distintas patologías endógenas del tracto genital inferior femenino o con la presencia de respuesta inflamatoria en el mismo.

No se conoce si los lípidos intracelulares de las células vaginales contribuyen con la adherencia de los microorganismos de la microbiota vaginal tal como ocurre en la piel de la zona axilar con *Corynebacterium* spp. Bojar y col. demostraron que estos microorganismos interactúan con los lípidos y ello se traduce en el incremento de la adherencia facilitando su colonización.<sup>1</sup>

## Objetivos

1. Estudiar la presencia de lípidos intracelulares (LIC) en las células vaginales de mujeres embarazadas (emb) sin y con infecciones del tracto genital inferior endógenas (ITGIE). Comprobar si existe alguna asociación entre las mismas.

2. Relacionar la presencia de LIC con la respuesta inflamatoria (RI) según las patologías.

## Materiales y métodos

Se estudiaron 115 emb que acudieron a consultorios externos de diferentes hospitales para el control de *Streptococcus agalactiae* entre las semanas 35 y 37 de gestación (H. Rivadavia, H. JPenna y HIGA Eva Perón). A todas ellas se les efectuó examen ginecológico y la aproximación diagnóstica (AD) inicial del exudado vaginal mediante el pH, prueba de aminas, examen microscópico y criterios de Amsel (Tabla 1).

El estudio de los lípidos se efectuó sobre las células vaginales, con extendidos de las paredes laterales de la vagina, mediante citoquímica (CQ) empleando la técnica de negro-sudan (Recuadro 1).

Se estableció un índice lipídico (IL) mediante la relación entre células con lípidos intracelulares (CL) y sin ellos (CS), (CL/CS), a través de microscopía óptica (Foto 1 y 2).

El estudio estadístico se realizó aplicando la prueba del chi cuadrado y Mantel-Haenszel.

**Tabla 1.** Criterios de Amsel.<sup>15</sup>

Criterios de Amsel (se requieren tres o más de las siguientes características para realizar el diagnóstico de VB)
1. pH del flujo vaginal >4,5
2. Presencia de una descarga vaginal gris, homogénea y adherente
3. Liberación de olor a pescado al adicionar KOH al 10% al flujo
4. Presencia de <i>clue-cells</i> en la observación al microscopio óptico

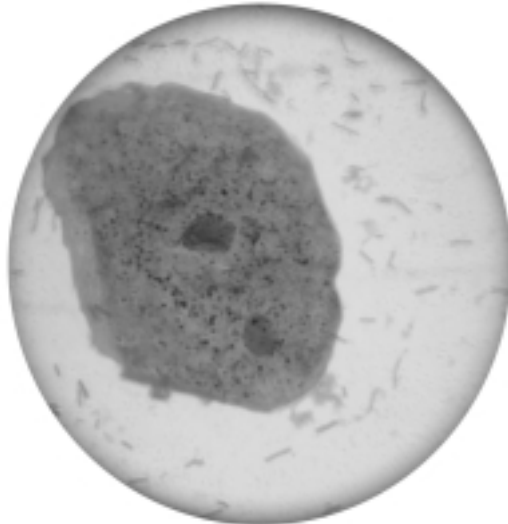
**Recuadro 1.** Pasos para la realización de la técnica histoquímica Negro-Sudan.<sup>16</sup>

### Técnica Histoquímica Negro-Sudan:

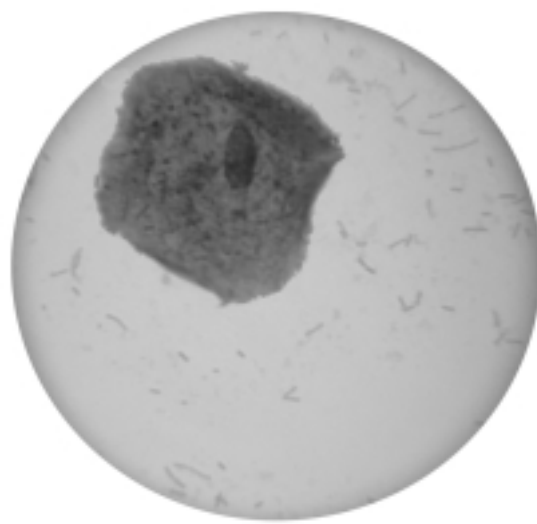
Previo fijación en vapores de formol a 35-40°C por 2 horas, se procede a la tinción con la solución de *Sudan Black B* por 10 minutos, luego se lava con propilenglycol al 85%, seguido de agua destilada. Se coloca el contraste, en este caso se usó safranina al 0.01% por unos instantes y se vuelve a lavar con agua destilada.

Finalmente se procede a la visualización a través del microscopio óptico, donde se observan los gránulos lipídicos en color azul-negrusco en un fondo rosado.

**Foto 1.** Células con lípidos sudanófilos en su interior



**Foto 2.** Única célula con gránulos lipídicos en su interior



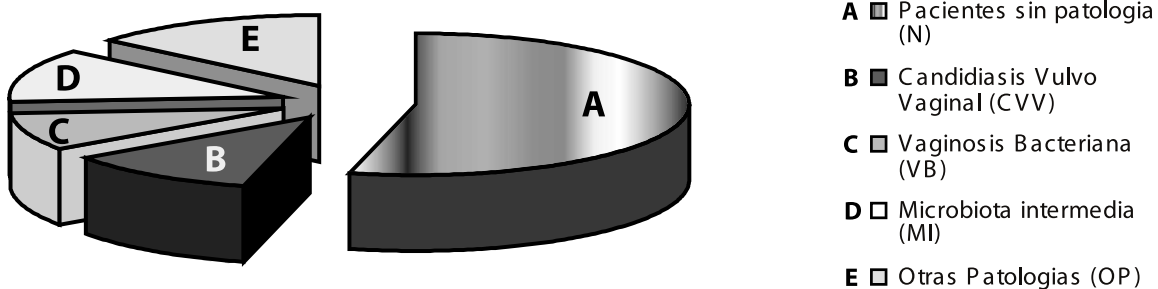
## Resultados

Se incluyeron 62 normales (N); 13 con candidiasis vulvovaginal (CVV); 10 con vaginosis bacteriana (VB); 14 con microbiota intermedia (MI) y 16 con otras infecciones (OP), (Gráfico 1). Se tomó como punto de corte el IL de N. La media del IL N, CVV, VB, MI y OP fue de 0.4, 0.36, 0.51, 0.55 y 0.51, respectivamente. Se encontró diferencia significativa (DS) entre IL N vs MI ( $p$  0.02; OR: 0.19; IC 95%:0.02-

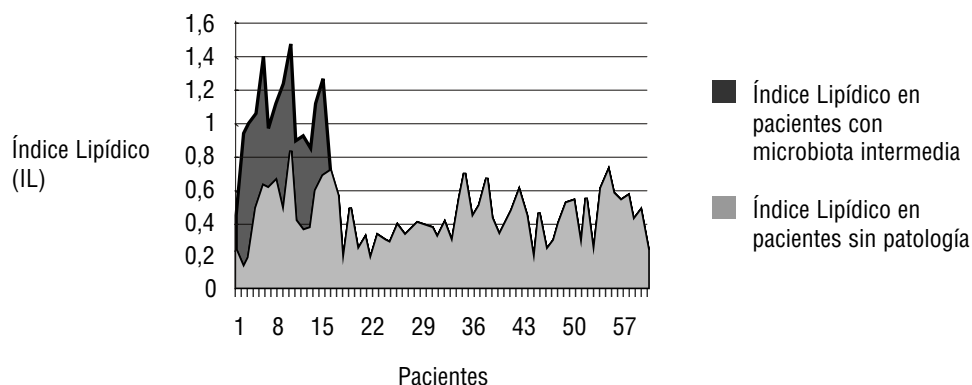
0.98) (Gráfico 2). No se halló DS entre IL N vs CVV ( $p$  0.3) y VB ( $p$  0.11) (Gráfico 8).

Con respecto a la RI no se vio DS en el IL de N, con respecto a las que tienen VB, MI y OP (Gráficos 3, 4 y 5). O sea, no hay relación del IL con la RI. Pero se observaron variaciones significativas ( $P=0.02$ ; OR:0.00; IC 95% 0.00-1.38) en el caso de N vs CVV. Cabe mencionar que en el caso de VB solo un caso presentó RI positiva (Gráficos 6 y 7).

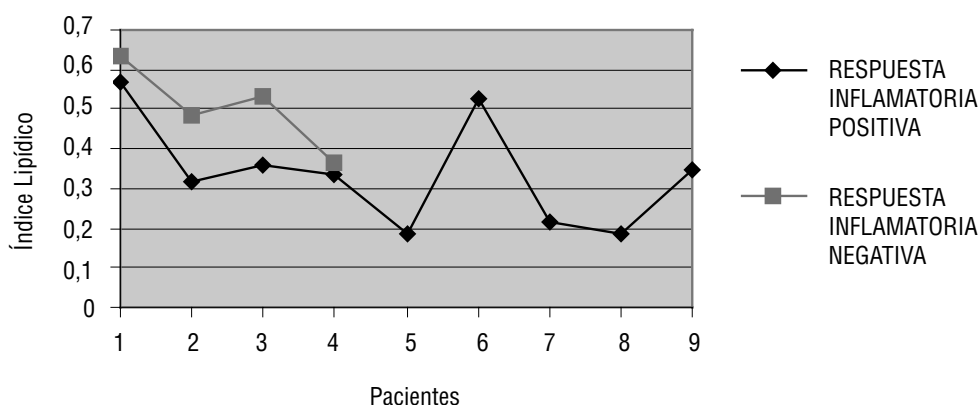
**Gráfico 1.** Distribución de las pacientes según las distintas patologías.



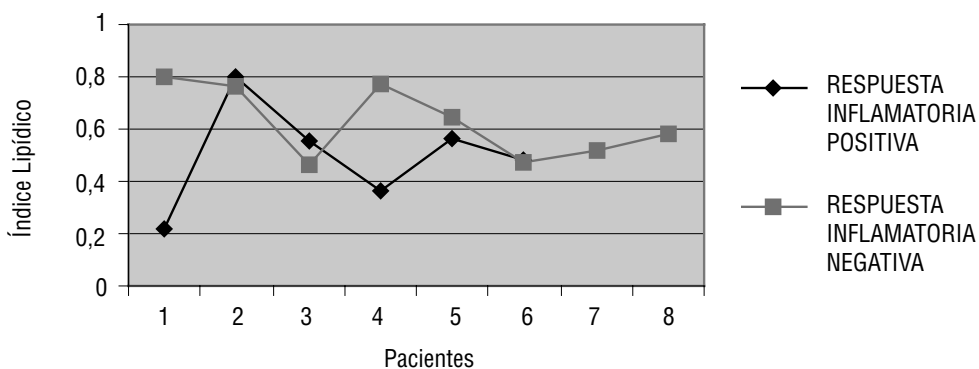
**Gráfico 2.** Relación entre los IL de las pacientes sin patología y las que presentaban microbiota intermedia.



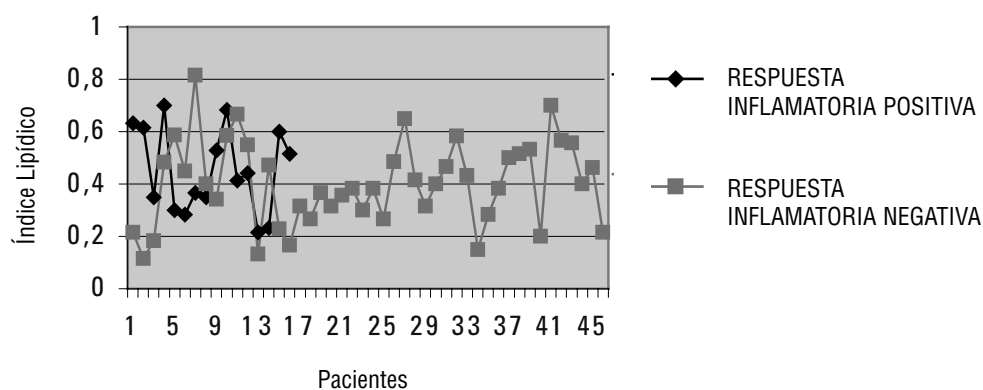
**Gráfico 3.** Relación entre el índice lipídico y respuesta inflamatoria en pacientes con candidiasis vulvovaginal.



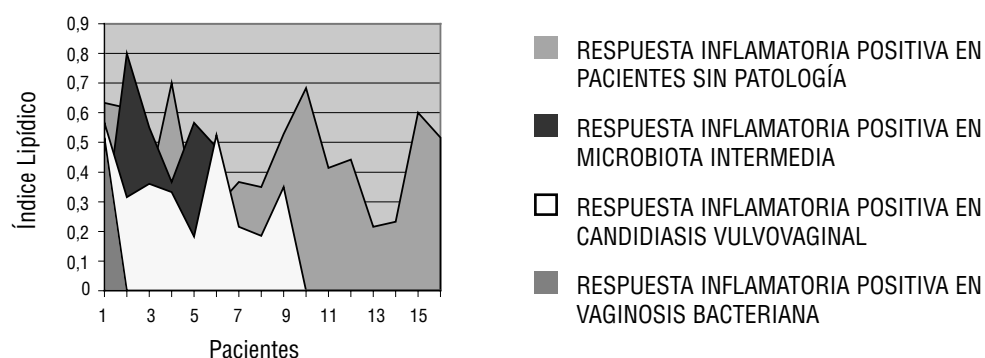
**Gráfico 4.** Relación entre el índice lipídico y respuesta inflamatoria en pacientes con microbiota intermedia.



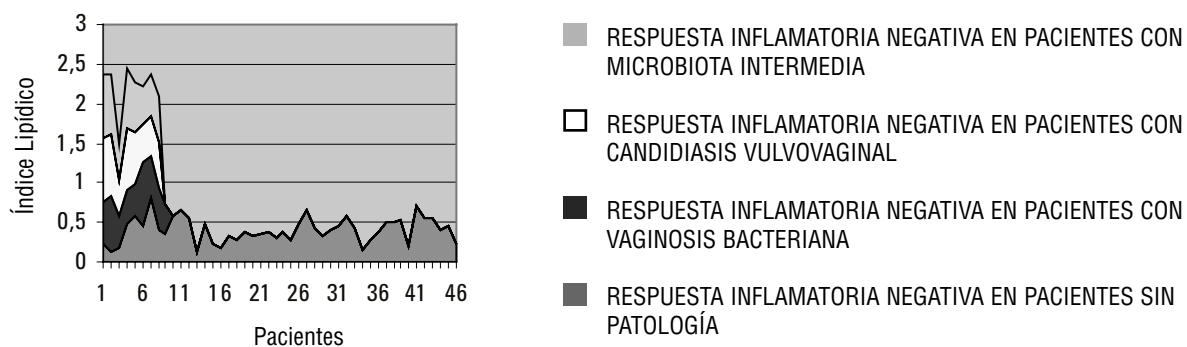
**Gráfico 5.** Relación índice lipídico y respuesta inflamatoria en pacientes sin patología.



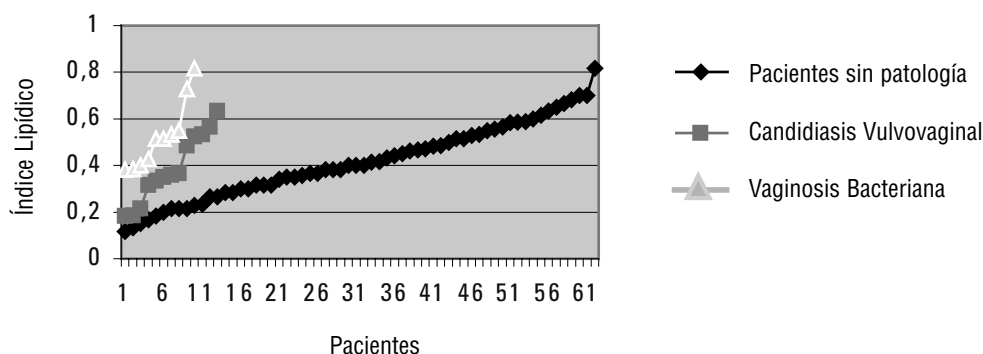
**Gráfico 6.** Relación entre la respuesta inflamatoria y los índices lipídicos en las diferentes patologías.



**Gráfico 7.** Relación entre respuesta inflamatoria negativa vs índice lipídico en las diferentes patologías.



**Gráfico 8.** Relación entre los índice lipídico de pacientes sin patología, pacientes con candidiasis vulvovaginal y pacientes con vaginosis bacteriana.



## Discusión

Hemos mencionado las características y función de los TLR en la II. En cuanto al tracto genital femenino, diferentes autores pudieron identificar los TLRs específicos de la región.

En la actualidad se desconoce el mecanismo por el cual diferentes organismos que forman parte de la flora habitual del TGI son capaces de producir patología, pero el análisis de la ausencia o disfunción de los TLRs podría ser un punto de partida interesante para tratar de dilucidar este problema.

Diversos autores han mencionado que los ácidos grasos poliinsaturados provenientes de la dieta influyen en las funciones de la membrana de las células epiteliales, modificando su grosor, fluidez e interacciones con las proteínas. Estos ácidos grasos han demostrado propiedades antibacterianas, pudiendo comprometer la acción de los probióticos. Bojar y col. describieron que los lípidos de las células de la piel de la axila contribuyen al proceso de adhesión y colonización de *Corynebacterium aerobios*. Lamentablemente, se desconoce si este mecanismo se reproduce en el contexto de las células vaginales. Existe evidencia de la relación de VB y la acumulación de ácidos grasos insaturados en las células vaginales, lo que podría resultar en el bloqueo de TLR 2 y 4 con el consiguiente bloqueo de la respuesta inmune, generando de esta forma la falta de reconocimiento de los patrones moleculares asociados a los patógenos (PAMPs) y la consecuente falta de respuesta inmune frente a los mismos.<sup>2-5</sup>

En este trabajo debe señalarse el hallazgo de un IL elevado en MI, situación clínica para la que se describe una participación de la inmunidad relacionada a los TLRs. Estos resultados apoyarían la relación entre los LIC y ciertos componentes del sistema inmune.

En cuanto a la RI, por el momento hemos visto que no guarda relación con los IL, pero sí observamos variaciones significativas en el IL de N vs CVV, por lo tanto, sugerimos seguir investigando sobre el tema.

Con respecto a la técnica empleada, debemos mencionar que la citoquímica se caracteriza por ser de fácil realización, es económica y no requiere equipamiento especial para ser llevada a cabo. La aplicación de estas técnicas podría significar la inclusión de las mismas en patologías infecciosas del tracto genital inferior femenino. La citoquímica abre un nuevo camino en la investigación tanto de los mecanismos fisiopatológicos de las ITGIE como de posibles alternativas terapéuticas.

## Conclusión

Como hemos discutido anteriormente, no se sabe con certeza cuál es la fisiopatología de las ITGIE, que son patologías bastante frecuentes en las mujeres en edad fértil.

Fuimos mencionando a lo largo del trabajo que la II juega un rol fundamental en la génesis de las mismas, aunque sus mecanismos no estén muy claros. Diversos autores han relacionado los distintos TLR con el reconocimiento de diversos MO patógenos. No se conoce con exactitud la relación entre LIC-TLR, pero la misma debe ser investigada en el futuro, ya que se vio que en la axila los lípidos constituyen un paso importante para su posterior colonización por *Corynebacterium spp.* En las células vaginales esta afirmación no pudo demostrarse, pero en este trabajo vimos un aumento de LIC en pacientes con MI, patología dependiente de la II.

Sería interesante seguir investigando para demostrar la relación TLR-LIC. No sólo para comprender la causa de estas patologías, sino también como posible blanco terapéutico en el futuro.

## Conclusion

The real mechanisms of endogenous lower genital tract infections (LGTI) in sexually active women are till unknown. However it is possible the participation of innate immunity expressed at vaginal level. The intracellular lipids (IL) should be play an impor-

tant role because we demonstrate significant modifications in women with altered or intermediate flora that is a disorder of bacterial and cytokines of vaginal fluid. In women with bacterial vaginosis (BV) and CVV the difference was not significant, but it is important to study more cases. The relation of inflammatory response and IL was no significant in all scenery. Respect to relation of IL with TLRs would be studied in the future because the effect of lipids on the adherence of microorganisms to cells and the relation of TLRs with adherence was previously demonstrated in other sites, but no in the vaginal tract.

## Bibliografía

1. Bojar RA, Tue CJ, Holland KT. The effect of lipids on the adherence of axillary aerobic coryneform bacteria. *Lett Appl Microbiol* 2004;38:470-475.
2. Janssens S, Beyaert R. Role of Toll-like receptors in pathogen recognition. *Clin Microbiol Rev* 2003;16:637-646.
3. Pivarcsi A, Nagy I, Koreck A, et al. Microbial compounds induce the expression of pro-inflammatory cytokines, chemokines and human beta-defensin-2 in vaginal epithelial cells. *Microbes Infect* 2005;7:1117-1127.
4. Fichorova RN, Cronin AO, Lien E, Anderson DJ, Ingalls RR. Response to *Neisseria gonorrhoeae* by cervicovaginal epithelial cells occurs in the absence of toll-like receptor 4-mediated signaling. *J Immunol* 2002;168:2424-2432.
5. Aflatoonian R, Fazeli A. Toll-like receptors in female reproductive tract and their menstrual cycle dependent expression. *J Reprod Immunol* 2007.
6. Abrahams VM, Mor G. Toll-like receptors and their role in the trophoblast. *Placenta* 2005;26:540-547.
7. Kankaanpää PE, Salminen SJ, Isolauri E, Lee YK. The influence of polyunsaturated fatty acids on probiotic growth and adhesion. *FEMS Microbiol Lett* 2001;194:149-153.
8. Kankaanpää P, Yang B, Kallio H, Isolauri E, Salminen S. Effects of polyunsaturated fatty acids in growth medium on lipid composition and on physicochemical surface properties of lactobacilli. *Appl Environ Microbiol* 2004;70:129-136.
9. Witkin SS, Linhares IM, Giraldo P, Ledger WJ. An altered immunity hypothesis for the development of symptomatic bacterial vaginosis. *Clin Infect Dis* 2007;44:554-557.
10. Donder GG, Vereecken A, Bosmans E, Dekeersmaecker A, Salembier G, Spitz B. Definition of a type of abnormal vaginal flora that is distinct from bacterial vaginosis: aerobic vaginitis. *Bjog* 2002;109:34-43.
11. LeBlanc DM, Barousse MM, Fidel PL, Jr. Role for dendritic cells in immunoregulation during experimental vaginal candidiasis. *Infect Immun* 2006;74:3213-3221.
12. Blasi E, Mucci A, Neglia R, et al. Biological importance of the two Toll-like receptors, TLR2 and TLR4, in macrophage response to infection with *Candida albicans*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005;44:69-79.
13. Hay P, Czeizel AE. Asymptomatic trichomonas and candida colonization and pregnancy outcome. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2007; 21:403-409.
14. Lahiri T, Chowdhury JR. Lipid patterns in vaginal cells exfoliated from different physiologic conditions. *Acta Cytol* 1981;25:572-577.
15. Navarrete P DM, Castro E, Zemelman Z. Evaluación de los criterios de Nugent y Amsel para el diagnóstico de vaginosis bacteriana. *Rev Méd Chile* 2000;128:767-771.
16. Sheehan DC HB. Theory and Practice of Histo-technology, 2da ed. The C.V. Mosby Company, St. Louis, 1980; pp204-205.