

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**RESPUESTA INMUNE INNATA ÓRGANO-ESPECIFICA EN UN MODELO  
MURINO DE CANDIDOSIS DISEMINADA NEONATAL**

**POR**

**M.C. ORLANDO ESAU FLORES MALDONADO**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN  
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA MÉDICA**

**JULIO, 2021**

**RESPUESTA INMUNE INNATA ÓRGANO-ESPECIFICA EN UN MODELO  
MURINO DE CANDIDOSIS DISEMINADA NEONATAL**

**Aprobación de la Tesis:**



---

**Dr. C. Miguel Ángel Becerril García**  
**Director de tesis**



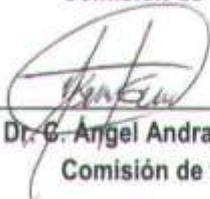
---

**Dra. C. Gloria María González González**  
**Co-Director de tesis**



---

**Dra. C. Alexandra Margarita Montoya Mendoza**  
**Comisión de tesis**



---

**Dr. C. Ángel Andrade Torres**  
**Comisión de tesis**



---

**Dr. C. Rogelio de Jesús Treviño Rangel**  
**Comisión de tesis**



---

**Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez**  
**Subdirector de Estudios de Posgrado**

**RESPUESTA INMUNE INNATA ÓRGANO-ESPECIFICA EN UN MODELO  
MURINO DE CANDIDOSIS DISEMINADA NEONATAL**

PRESENTADO POR:

M.C. ORLANDO ESAU FLORES MALDONADO

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología Experimental y el Centro de Control de Enfermedades Infecciosas, ambos pertenecientes al Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León. La dirección de este proyecto estuvo a cargo del Dr. C. Miguel Ángel Becerril García.



---

Dr. C. Miguel Ángel Becerril García  
Director de tesis

**RESPUESTA INMUNE INNATA ÓRGANO-ESPECIFICA EN UN MODELO  
MURINO DE CANDIDOSIS DISEMINADA NEONATAL**

M.C. ORLANDO ESAU FLORES MALDONADO FUE BECARIO DEL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT) CON EL NÚMERO DE REGISTRO 708151. ESTE TRABAJO FUE APOYADO POR EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA [CONACYT-INFRA-2015-01-251142], Y EL PROGRAMA DE APOYO A LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA [PAICYT SA665-18].

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Miguel Ángel Becerril García

A la Dra. Gloria González González

Al Dr. Luis Donis Maturano

A los doctores Ángel Andrade, Alexandra Montoya, Rogelio Treviño y

Alejandro Sánchez

A Luis Rodríguez y todos los que contribuyeron para la realización de este  
proyecto

Gracias por su apoyo y compartir su conocimiento para lograr esta meta

Al CONACyT por el soporte económico otorgado durante mi formación.

## DEDICATORIA

*A mi familia con cariño y amor.*

*A Ana, mi paralelo ser.*

## TABLA DE CONTENIDO

<b>CAPÍTULO</b>		<b>PÁGINA</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>13</b>
1.1.	<i>Candida albicans</i>	13
1.2.	Candidosis	14
1.2.1.	Candidosis mucocutánea	14
1.2.2.	Candidosis cutánea	14
1.2.3.	Candidosis invasiva	15
1.3.	Epidemiología de la candidosis diseminada	15
1.4.	Candidosis diseminada neonatal	17
1.5.	Inmuno-patogénesis de la candidosis diseminada neonatal	18
<b>2</b>	<b>ANTECEDENTES</b>	<b>21</b>
	JUSTIFICACIÓN	26
	OBJETIVOS	27
<b>3</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>28</b>
3.1.	Animales de experimentación	28
3.2.	Cepa y cultivo de <i>Candida albicans</i>	28
3.3.	Ajuste de inóculo e infección sistémica en los animales de experimentación	29
3.4.	Análisis de la expresión de citocinas	30
3.5.	Cuantificación de citocinas	32
3.6.	Detección fenotípica de poblaciones celulares del sistema inmune y análisis de PRRs	33
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>35</b>
	Expresión y cuantificación de citocinas en órganos de diseminación durante la candidosis diseminada murina	35
4.1.		
4.2.	Detección fenotípica de poblaciones celulares de la respuesta inmune en los órganos de ratones neonatos con candidosis diseminada.	40
4.3.	Detección de los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) en los órganos de diseminación durante la candidosis diseminada.	48

<b>5</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>52</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>64</b>
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>66</b>
<b>8</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>67</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA</b>	<b>PÁGINA</b>
<b>Figura 1. Expresión de citocinas en órganos de diseminación durante la candidosis invasiva neonatal.</b>	<b>37</b>
<b>Figura 2. Producción de citocinas en órganos de diseminación durante la candidosis invasiva neonatal.</b>	<b>39</b>
<b>Figura 3. Diagrama de puntos representativo para la selección de eventos simples, exclusión de dobletes y restos celulares</b>	<b>41</b>
<b>Figura 4. Detección fenotípica de poblaciones celulares del sistema inmune innato en el cerebro de ratones recién nacidos con candidosis diseminada.</b>	<b>42</b>
<b>Figura 5. Detección fenotípica de poblaciones celulares del sistema inmune innato en el cerebro de ratones adultos con candidosis diseminada.</b>	<b>43</b>
<b>Figura 6. Detección fenotípica de poblaciones celulares del sistema inmune innato en el hígado de ratones recién nacidos con candidosis diseminada.</b>	<b>44</b>
<b>Figura 7. Detección fenotípica de poblaciones celulares del sistema inmune innato en el hígado de ratones adultos con candidosis diseminada.</b>	<b>45</b>

---

**Figura 8. Detección fenotípica de poblaciones celulares del sistema inmune innato en el riñón de ratones recién nacidos con candidosis diseminada. 46**

**Figura 9. Detección fenotípica de poblaciones celulares del sistema inmune innato en el riñón de ratones adultos con candidosis diseminada. 47**

**Figura 10. Presencia de receptores de reconocimiento de patrones en el cerebro de ratones recién nacidos y adultos con candidosis diseminada. 49**

**Figura 11. Presencia de receptores de reconocimiento de patrones en el hígado de ratones recién nacidos y adultos con candidosis diseminada. 50**

**Figura 12. Presencia de receptores de reconocimiento de patrones en el riñón de ratones recién nacidos y adultos con candidosis diseminada 51**

---

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	PÁGINA
Tabla 1: Secuencia de oligonucleótidos usados en PCR	<b>31</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

APC: Alofococianina

CD: Clúster de diferenciación

CLR: Receptores de Lectina tipo C

Dpi: Días post-infección

FITC: Fluoresceína-5-isotiocianato

Hpi: Horas post-infección

IL-1 $\beta$ : Interleucina 1 *beta*

IL-6: Interleucina 6

IL-10: Interleucina 10

IFN $\gamma$ : Interferon *gamma*

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad

PAMP: Patrones moleculares asociados a patrones

PE: Ficoeritrina

PercP-Cy5.5: Proteína clorofila peridinina-cianina 5.5

PRRs: Receptores de reconocimiento de patógenos

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

Rn: Recién nacidos

Rpm: Revoluciones por minuto

SSF: Solución Salina Fisiológica

TLR: Receptores tipo Toll

Th: Linfocito T helper

TNF $\alpha$ : Factor de Necrosis Tumoral *alfa*

UFC: Unidades Formadoras de Colonia

## CAPÍTULO 1

### 1. INTRODUCCIÓN

#### 1.1. *Candida albicans*

Es un hongo dimórfico que se desarrolla como célula levaduriforme (célula redonda de 4-10  $\mu\text{m}$ ), o de forma filamentosa; como pseudomicelio (levaduras ensanchadas y adheridas mediante puntos de constricción) y/o hifas (levaduras con una prolongación de su pared celular en forma de tubo sin puntos de constricción) de longitud variable (1-2). *C. albicans* es parte de la microbiota de la piel y las mucosas del humano donde puede crecer y co-existir sin causar una patología (1,3). La transición de un hongo comensal a un patógeno oportunista se asocia con un desequilibrio en el ambiente del hospedero, por ejemplo: humedad elevada; cambios de pH en piel y mucosas; aumento de los niveles de glucosa que favorecen dicha transición de célula levaduriforme a su forma filamentosa (3-5); pacientes con tratamientos inmunosupresores o con antibióticos de amplio espectro por tiempos prolongados; individuos con inmunodeficiencias; recién nacidos prematuros; y el empleo de dispositivos médicos durante la estancia hospitalaria (1-4); que en combinación con los propios factores de virulencia de *C. albicans* como adhesinas, proteasas, y fosfolipasas favorecen la invasión del hongo a las células del hospedero y facilitan su penetración a los tejidos (6-7). Este conjunto de factores le permiten a *C. albicans* ocasionar una infección en el sitio de invasión, conocida como candidosis.

## 1.2. Candidosis

La candidosis exhibe un amplio rango de manifestaciones clínicas dependiendo del sitio de invasión, las cuales se detallan a continuación:

### 1.2.1. Candidosis mucocutánea

#### Candidosis oro-faríngea

Conocida como “algodoncillo”, es común en neonatos debido a la pobre regulación de pH y humedad. Se localiza principalmente en paladar y lengua como una capa blanca de bordes difusos sobre una base eritematosa, cuyo síntoma es el dolor (1).

#### Candidosis gastrointestinal

La infección esofágica es frecuente en individuos tratados con corticoides, antibióticos y pacientes diabéticos. Los síntomas más comunes son dolor retroesternal, disfagia, náuseas y vómitos. En el tracto gastrointestinal *C. albicans* puede causar lesiones ulcerativas, acompañadas de diarrea (1).

#### Candidosis vulvovaginal

Presenta una mayor incidencia durante el embarazo. La mucosa vaginal y la vulva exhiben eritema intenso, acompañado de leucorrea, de aspecto lechoso, y placas pseudomembranosas de color grisáceo. Toda la zona vaginal se inflama y se caracteriza por prurito intenso (1,9).

### 1.2.2. Candidosis cutánea

#### Candidosis intertriginosa

Los pliegues del cuerpo son los más comprometidos, los principales factores predisponentes son el calor, la humedad, la maceración de la piel. Las lesiones se presentan como placas eritematosas y descamación fina (1).

#### Onicomycosis

Afección por el hongo en la uña y la placa ungueal, ocasionando un cambio de color, se vuelve parduzca, engrosada, endurecida y se forman estrías o surcos (1).

#### 1.2.3. Candidosis invasiva

##### Candidemia

Consiste en la presencia de *Candida* en muestras de sangre. Puede ser transitoria o persistente. La candidemia se manifiesta como choque séptico de origen nosocomial (1,10).

##### Candidosis diseminada

Presencia de levaduras de *Candida* en torrente sanguíneo y en múltiples órganos profundos del hospedero, como corazón, pulmón, cerebro, riñón, hígado y bazo. La candidosis diseminada aguda presenta fiebre persistente que no responde a los antibióticos, se asocia al desarrollo de neumonía, meningitis, endoftalmitis, absceso cerebral y endocarditis. Mientras que la candidosis diseminada crónica afecta principalmente a hígado y bazo (1,10,11).

#### 1.3 Epidemiología de la candidosis diseminada

*Candida spp.* es el patógeno más común en infecciones fúngicas sistémicas en la Unidad de Cuidados Intensivos en los Estados Unidos de América y Europa (11-14). La incidencia anual de candidosis diseminada en el mundo es de 72-290 casos por un millón de personas (13). La incidencia de la micosis en Europa es de 0.41-1.09/1000 hospitalizaciones (14,15). Mientras que en Latinoamérica oscila entre el 2.49-3.0/1000 hospitalizaciones (16). En México la tasa de incidencia es de 8.6 casos por cada 100 000 habitantes (8). *C. albicans* sigue siendo aún el principal agente etiológico de las candidemias (17-18).

La candidosis diseminada exhibe elevadas tasas de incidencia en pacientes neonatos, en Estados Unidos de América por cada 100 000 neonatos, 466 adquieren la infección (19); en Europa la incidencia de la micosis fue de 32.6 casos/100 000 nacimientos (20); con respecto a China la incidencia aumentó a 158.9/10 000 admisiones (21); mientras que en Monterrey N.L., México, del año 2007 al 2010 se detectaron 160 casos de candidemia en infantes menores de 1 año (22).

La candidosis diseminada neonatal es una causa de muerte en neonatos, principalmente en los Rn prematuros. En países en vías de desarrollo esta afección se posiciona como la segunda causa de muerte relacionadas con enfermedades infecciosas en neonatos en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatal, la tasa de letalidad de esta micosis en Rn e infantes es mayor si la comparamos con la mortalidad de los adultos (23). Se ha demostrado que un elevado porcentaje de los neonatos que sobreviven a la fungemia presentan alteraciones en el desarrollo neurológico (24).

#### 1.4 Candidosis diseminada neonatal

Los factores de riesgo para el desarrollo de la micosis diseminada en neonatos son: Rn prematuros y/o de bajo peso al nacer, el incremento en la incidencia de esta afección es inversamente proporcional a las semanas de gestación del neonato y del peso al nacer, ya que los Rn con menos semanas de gestación o con peso bajo al nacer presentan 10 veces más riesgo de presentar esta infección durante el primer año de vida del infante (23,25).

La colonización previa en la piel y mucosas de los neonatos es un importante factor de riesgo para el desarrollo de la micosis, la colonización por *C. albicans* en los Rn es adquirida en los primeros días de vida y puede ser por transmisión vertical u horizontal (26).

Además se ha demostrado que una mayor estancia en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatal, así como el uso profiláctico de antibióticos promueve el desarrollo de la micosis neonatal. Adicionalmente, el uso de dispositivos médicos como el catéter venoso central en infantes, es de los principales factores de riesgo que contribuyen al establecimiento de las candidosis diseminada, ya que aproximadamente el 80% de los casos de candidosis diseminada en infantes se debe al uso de catéter venoso (23,27).

Los Rn prematuros exhiben un sistema inmune en proceso de maduración durante el nacimiento, donde la mayoría de sus funciones son distintas en comparación con los adultos (28). La respuesta inmune del neonato se caracteriza por la preferencia de promover una respuesta humoral (Th2) y/o

reguladora (Treg) (29,30) lo que permite y favorece el desarrollo de los tejidos y el establecimiento de la microbiota, sin embargo, permite que los neonatos sean un objetivo ideal para ser infectados por patógenos que requieren una respuesta inmune mediada por células para su eliminación, como *C. albicans*.

La candidosis diseminada neonatal se caracteriza por el desarrollo de sepsis y choque séptico, pero la manifestación clínica de mayor relevancia en los neonatos es la meningitis, la afección a sistema nervioso central puede tener complicaciones graves en el infante (31,32). Previamente se ha demostrado que los neonatos con candidosis diseminada mueren dentro de las primeras 72 horas de la aparición de la infección, mientras que un elevado porcentaje de los neonatos que sobreviven a la micosis presentan deterioro en el desarrollo neurológico. En un estudio de seguimiento de 18-22 meses en infantes que presentaron candidosis diseminada al nacer, se observó que el 73% de los infantes que sobrevivieron a la fungemia presentaron alteraciones en el desarrollo neurológico, parálisis cerebral, ceguera, deficiencia auditiva, y déficits cognitivos (33,34).

#### 1.5 Inmuno-patogénesis de la candidosis diseminada neonatal

*C. albicans* es parte de la microbiota natural del humano y es comúnmente aislado como microorganismo comensal en el tracto gastrointestinal, genitourinario y piel. Los Rn son colonizados por *C. albicans* inmediatamente después de nacer, la colonización del hongo durante esta etapa de la vida está directamente relacionado con el nacimiento. Los infantes nacidos durante un parto normal son más susceptibles de ser colonizados que los

infantes nacidos por cesárea. Los principales sitios de colonización son el sistema respiratorio y gastrointestinal durante las primeras 2 semanas de vida (35), mientras que la colonización de neonatos nacidos por cesárea sucede primordialmente en la piel después de la segunda semana de vida y está directamente relacionado con el contacto de la piel materna y/o el personal de la salud (35,36). La piel y las mucosas de los neonatos prematuros no están completamente desarrollados lo que probablemente este facilitando la transición del hongo de un microorganismo comensal a uno patógeno, permitiendo la invasión en estos sitios. Es un hecho que la epidermis de Rn <30 semanas de gestación exhibe un menor grosor y presenta una baja cantidad capas celulares y un estrato corneo en desarrollo que la piel de los Rn a término (37). Además, la función de barrera física del tracto gastrointestinal de los neonatos prematuros es deficiente e inmadura al comparar con los adultos, probablemente debido a la aumentada permeabilidad de la mucosa intestinal neonatal, a la baja producción de moco protector y a un menor número de uniones intracelulares, lo que posiblemente hace a los neonatos altamente vulnerables a la invasión por *C. albicans* (38). Posterior a que *C. albicans* irrumpe la piel y mucosa comienza el desarrollo de la candidosis diseminada mediante la llegada de *C. albicans* al sistema circulatorio local de la piel y mucosas. Otro mecanismo para el desarrollo de esta micosis es la inoculación accidental de levaduras directamente al torrente sanguíneo a través del uso de dispositivos médicos, como el catéter venoso central. Una vez en torrente sanguíneo *C. albicans* invade el sistema nervioso central, riñón, hígado, bazo, corazón y retina. En los pacientes neonatos y pediátricos, especialmente los Rn prematuros el

sistema nervioso central es uno de los principales sitios de diseminación del hongo causando meningitis como complicación (23,39,40); sin embargo, se desconocen los mecanismos por los que el sistema nervioso central es de los tejidos principalmente afectados en los neonatos prematuros humanos, así como la afección a otros órganos durante las candidosis diseminada en neonatos. Con respecto a la respuesta inmune que se establece durante la candidosis diseminada en el periodo neonatal son escasos los estudios realizados y se centran en evaluar de manera sistémica la producción de citocinas, especies reactivas oxígeno y un perfil bioquímico durante la infección en neonatos (41), así como el incremento de distintas poblaciones celulares del sistema inmunológico en sangre (42), con el objetivo de buscar marcadores bioquímicos para evaluar el pronóstico de la infección. Por lo que es de vital importancia elucidar los mecanismos de diseminación, patogenia y respuesta inmune en los distintos órganos de diseminación de *C. albicans* durante el periodo neonatal, con el fin de tener un mayor entendimiento de la candidosis diseminada neonatal de una manera órgano-específica.

## CAPÍTULO 2

### 2. ANTECEDENTES

La respuesta inmune contra *C. albicans* en el periodo neonatal es poco entendida debido a los escasos estudios que existen, sin embargo ha sido ampliamente estudiada durante la adultez. En la etapa adulta se conoce que tras el ingreso del hongo al sistema circulatorio del hospedero se activa el sistema del complemento, resultando en la opsonización de *C. albicans* por deposición de C3b y la liberación de C5a y C3a, lo cual favorece el reclutamiento de células inmunes al sitio de invasión (43), la actividad anti-*Candida* que presenta el sistema del complemento ha sido comprobada en ratones deficientes de C3 y C5, los cuales fueron vulnerables a la candidosis diseminada (43,23). La llegada de neutrófilos, macrófagos/monocitos y células dendríticas al sitio de invasión es crucial para el control y eliminación del hongo, así como iniciar la respuesta inmune adaptativa gracias a sus funciones antimicrobianas (44).

Las diferentes subpoblaciones celulares de la respuesta inmune innata como son neutrófilos, macrófagos, células dendríticas y células natural killer “NK” que se reclutan al sitio de la infección, reconocen los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) de *C. albicans* como son los glucanos y los mananos mediante las diversas familias receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) que se expresan en estas células inmunes innatas. Los PRRs involucrados en el reconocimiento de *C. albicans* son los Receptores tipo Toll (TLR) específicamente TLR-2 y 4 que reconocen a los mananos y mananoproteínas, respectivamente. Otra familia importante de receptores

asociados al reconocimiento del hongo son los Receptores de Lectina C (CLR) como es Dectin-1 y 2 que reconocen  $\beta$ -glucanos y mananos, respectivamente. La interacción de los PAMPs con los PRRs promueve la producción de citocinas pro-inflamatorias, quimiocinas, producción de especies reactivas de oxígeno, además favorece internalización y fagocitosis del hongo por las diferentes células del sistema inmune innato (44-46). Los monocitos en torrente sanguíneo y los macrófagos en los tejidos reconocen mananos y glucanos de la pared celular de *Candida* a través de PRRs como TLR2, TLR4, Dectin-1 y Dectin-2 induciendo la producción de citocinas pro-inflamatorias esenciales como TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 que favorece el reclutamiento y activación de neutrófilos (45-47). Los neutrófilos son células cruciales en la defensa contra *Candida* ya que pueden inhibir la transición del hongo de levadura a hifa, además de ello pueden fagocitar al hongo y eliminarlo intracelularmente mediante mecanismos principalmente oxidativos como la producción de especies reactivas de oxígeno (48). A la par de las funciones efectoras de los neutrófilos, los macrófagos de igual manera fagocitan y destruyen intracelularmente al hongo, así como también dan lugar al inicio de la respuesta inmune adaptativa en conjunto con las células dendríticas (49).

La respuesta adaptativa de células T cooperadoras contra *Candida* es diversa y depende de múltiples factores, por ejemplo, la morfología del hongo que es reconocida diferencialmente por las células presentadoras de antígenos, así como el sitio de invasión. La respuesta Th1 se caracteriza por la producción de IFN $\gamma$  y se asocia con el control y la eliminación de la infección sistémica debido a que potencia las actividades fungicidas de

neutrófilos y macrófagos (50,51). De igual manera la respuesta Th17 es crucial para el control de la candidosis invasiva (51,52), mediante la producción de citocinas como IL-17 e IL-22 que inducen el reclutamiento y activación de neutrófilos. Por lo tanto, la respuesta inmune celular Th1 y/o Th17 se asocia a una respuesta protectora contra la candidosis invasiva, mientras que la respuesta inmune Th2 y/o reguladora, caracterizada por la producción de IL-10, favorece la proliferación del hongo y la invasión en el tejido (50,51).

Recientemente, se ha sugerido que la respuesta inmune contra *Candida albicans* posiblemente sea órgano específica, es decir, dependiendo del sitio donde el hongo sea reconocido será la respuesta inmune que se establezca. Por ejemplo, el reconocimiento de *C. albicans* en epidermis a través de las células de Langerhans y su posterior presentación de antígenos induce una respuesta Th17 que se asocia a una protección local a la infección, mientras que el reconocimiento del hongo en epidermis mediante células dendríticas establece una respuesta Th1 asociada a una protección sistémica (53). Con respecto a los órganos de diseminación durante la candidemia, se ha descrito que órganos resistentes a la infección por el hongo como hígado y bazo exhiben un perfil de respuesta Th1 asociado a una protección en los tejidos (54), en contraste con la respuesta Th2 o reguladora que se establece en tejidos susceptibles a la infección como el riñón (54,55). Con respecto a la respuesta inmune neonatal que se establece durante las candidosis diseminada en Rn son pocos los estudios y se desconoce el perfil de respuesta que se establece durante la micosis.

Actualmente son pocos los estudios sobre la respuesta inmune neonatal durante la candidosis neonatal. Previamente, utilizando neutrófilos de sangre de cordón umbilical de recién nacidos prematuros y a término no hubo diferencias en la producción de estallido oxidativo en comparación con neutrófilos adultos cuando son incubados con *C. albicans* y *C. parapsilosis*. Además, no se observaron diferencias en la capacidad de fagocitosis entre los grupos (56). En un modelo de candidosis intrauterino en ovejas, se encontró que el feto presentó infección sistémica con una caracterizada invasión de hifas en epidermis, dermis y pulmón. Así como también se produce una respuesta inflamatoria severa con la producción de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 en respuesta a la infección por el hongo (57).

Flores-Maldonado *et al.* establecieron un modelo murino de candidosis diseminada neonatal utilizando ratones menores de 24 horas de vida (equiparable a trabajar con recién nacidos prematuros humanos), administrando directamente en torrente sanguíneo *C. albicans* emulando la principal fuente de entrada del hongo al hospedero durante la fungemia. Además demostraron que la mortalidad de los animales neonatos es dependiente de la concentración de hongo a administrar, y aunado a ello evaluaron la diseminación del hongo a diferentes tejidos, observando que el hígado y el cerebro eran los órganos mayormente afectados debido al continuo aumento de la carga fúngica y a la presencia de estructuras fúngicas en dichos tejidos durante los días post-infección, particularmente el cerebro de los ratones neonatos mostró una invasión de filamentos de *C. albicans* en contraste a la presencia de levaduras en el hígado de ratones recién nacidos. Por otro lado e interesantemente, al infectar ratones Rn con

una concentración de hongo ajustada con base al peso de los mismos, demostramos que los animales pueden controlar la invasión del hongo en los órganos analizados y resolver la infección permitiendo la supervivencia de los animales neonatos (58). Por lo que el empleo de este modelo experimental nos permitirá conocer a mayor profundidad la respuesta inmune que se establece en cada uno de los órganos de diseminación de *C. albicans* durante el periodo neonatal y posiblemente nos permita elucidar los perfiles de respuesta inmune asociados al control de la invasión y los que favorecen la progresión de la infección en distintos órganos durante la candidosis diseminada neonatal

## **JUSTIFICACIÓN**

La candidosis diseminada exhibe una incidencia anual de 70-280 casos por cada millón de habitantes, los recién nacidos son el grupo mayormente susceptibles esta infección, especialmente, los recién nacidos prematuros.

La respuesta inmunológica durante la candidosis diseminada en la etapa adulta ha sido ampliamente estudiada, sin embargo, es pobremente entendida la respuesta inmune que se establece en distintos órganos de diseminación durante esta micosis en el periodo neonatal.

El emplear un modelo de candidosis diseminada en ratones recién nacidos con menos de 24 horas de vida, nos permitirá conocer más a profundidad la respuesta inmune que se establece en distintos órganos de diseminación durante la candidosis diseminada, así como la búsqueda de biomarcadores para el diagnóstico y/o el pronóstico de la enfermedad durante el periodo neonatal.

## **OBJETIVOS**

### Objetivo general

Analizar las poblaciones celulares del sistema inmune y el microambiente de citocinas en distintos órganos de diseminación durante la candidosis diseminada en ratones BALB/c durante la etapa neonatal temprana y adulta.

### Objetivos específicos

- 1.-Evaluar la expresión de citocinas inflamatorias/antiinflamatorias en distintos órganos durante la candidosis diseminada neonatal.
- 2.-Cuantificar el perfil de citocinas en sitios de diseminación durante la candidosis diseminada neonatal.
- 3.-Detectar fenotípicamente las poblaciones celulares de la respuesta inmune en los órganos de ratones neonatos con candidiasis diseminada.
- 4.-Evaluar la expresión de los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) en los órganos de ratones neonatos con candidiasis diseminada.

## CAPÍTULO 3

### 3. MATERIAL Y METODOS

#### 3.1 Animales de experimentación

El siguiente proyecto fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL), como por el Comité de Investigación y Ética de la Universidad Autónoma de Nuevo León bajo el número de registro MB17-00001. Se utilizaron ratones BALB/c de 0 días de vida y hembras de 6-7 semanas de edad, que se alojaron en condiciones libres de patógenos en el equipo LAB & Bio (ProBio-Tech), que funciona con presión negativa y se ubica dentro del Laboratorio de Microbiología Experimental (LME) del Departamento de Microbiología. Los animales se mantuvieron en condiciones estándares de alimentación (*ad libitum*) temperatura controlada, humedad controlada y bajo las normas establecidas en el Manual de procedimientos, seguridad y bioseguridad del LME (con el siguiente código de documento; LME-MPSBS-997-MAN) y el Procedimiento Normalizado de Operación para el Manejo de Animales de Experimentación (con el siguiente código de documento; LME-PMA-997-PNO), el LME cuenta con el siguiente número de autorización de SANASICA AUT-B-B-1216-029.

#### 3.2 Cepa y cultivo de *C. albicans*

Se utilizó la cepa de *C. albicans* ATCC 66027, que se encuentra bajo resguardo en el Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosa del

Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, UANL. El hongo se encuentra almacenado a -70°C.

Previo a los experimentos se descongeló un vial de *C. albicans* a temperatura de 37°C durante 5 minutos, posteriormente se transfirió el volumen del vial a un tubo cónico de 50 mL y se agregaron 15 mL de Solución Salina Fisiológica (SSF), para posteriormente centrifugar a 1500 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos, a continuación se decantó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 2 mL de SSF, se tomaron 50 µL del homogenizado y fueron sembrados en Agar Mycosel a 37°C, cada 48 horas de incubación se realizó el pase del hongo a un nuevo medio de Agar Mycosel con la ayuda de un aplicador de madera y se incubaron a 37°C, solo los cultivos del hongo que se encontraban entre el pase 4-10, fueron utilizados para los experimentos, cuando se alcanzó este número de pases se descongeló un nuevo vial.

### 3.3 Ajuste de inóculo e infección sistémica en los animales de experimentación

Se colectó el hongo a partir de cultivos entre 24 y 48 horas de incubación (entre los pases 4-10), las levaduras fueron resuspendidas en un tubo cónico que contiene 15 mL de Solución Salina Fisiológica (SSF), se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos, al finalizar se decantó el sobrenadante y el pellet se homogenizó con 15 mL de SSF, se efectuó un segundo lavado, a continuación el sobrenadante se decantó y el pellet se homogenizó en 5 mL de SSF. Enseguida, se realizó una serie de diluciones 1:10 de la suspensión

obtenida y las levaduras fueron contadas mediante la cámara de Nuebauer por duplicado y finalmente se efectuó el cálculo para el ajuste del inóculo.

Para el modelo de infección sistémica, los ratones adultos se infectaron con  $1 \times 10^6$  UFCs de *C. albicans* en 200  $\mu$ L de SSF a través de la vena caudal, mientras que para los ratones recién nacidos se siguió la técnica de administración intravenosa reportada por *Kienstra et al.* (59), Los ratones Rn menores de 24 horas de vida se infectaron con  $1 \times 10^5$  y  $5 \times 10^5$  UFCs de *C. albicans* en 30  $\mu$ L de SSF intravenosamente a través de la vena yugular.

En todos los experimentos realizados se contó con 2 grupos adicionales: grupo control y grupo vehículo. El grupo control consistió en animales que se mantuvieron en condiciones estándares de alojamiento. El grupo vehículo consistió en animales que se les administró solución salina fisiológica (SSF) estéril y libre de pirógenos.

#### 3.4 Análisis de la expresión de citocinas

Ratones adultos y recién nacidos infectados se sacrificaron a las 12 y 24 horas después de la infección, así como los animales del grupo control y vehículo. Inmediatamente después del sacrificio se realizó la obtención aséptica del riñón, bazo, hígado y cerebro, los tejidos fueron colocados en 1mL del reactivo TRIzol (Invitrogen) y congelados a  $-70^{\circ}$  hasta su procesamiento para la obtención del ARN total.

La extracción del ARN total del riñón, hígado, cerebro y bazo se obtuvo con el reactivo TRIzol (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Posterior a la extracción del ARN total, se realizó la cuantificación del ARN

midiendo la densidad óptica a 260 nm en el NanoDrop 2000. La calidad del ARN se verificó por electroforesis en gel de agarosa 2% teñido con bromuro de etidio.

La transcripción inversa del ARN obtenido se realizó empleando 1.5 µg de ARN total mediante el kit SensiFAST (Bioline) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADNc obtenido se utilizó para PCR convencional usando oligonucleotidos específicos de genes murinos para diferentes citocinas; factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, interferón- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), IL-12p35, IL-12p40, IL-4, IL-10 (Tabla 1).

Tabla 1: Secuencia de oligonucleótidos usados en PCR

Citocina	Primer forward 5'-3'	Primer reverse 5'-3'	Amplificación (pb)
$\beta$ -actina	TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC	TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG	349
IFN $\gamma$	AGCGGCTGACTGAACTCAGATTGTAG	GTCACAGTTTTTCAGCTGTATAGGG	247
TNF $\alpha$	GGCAGGTCTACTTTGGAGTCATTGC	ACATTCGAGGCTCCAGTGAATTCGG	307
IL-1 $\beta$	TCATGGGATGATGATGATAACCTGCT	CCCATACTTTAGGAAGACACGGATT	503
IL-4	CGAAGAACACCACAGAGAGTGAGCT	GACTCATTGATGGTGCAGCTTATCG	180
IL-6	CTGGTGACAACCACGGCCTTCCCTA	ATGCTTAGGCATAACGCACTAGGTT	600
IL-10	ACCTGGTAGAAGTGATGCCCCAGGCA	CTATGCAGTTGATGAAGATGTCAAA	237
IL-12p35	CCACCCTTGCCCTCCTAAAC	GGCAGCTCCCTCTTGTGTG	288
IL-12p40	GAGGTGGACTGGACTCCCGA	CAAGTTCTTGGGCGGGTCTG	618

La PCR convencional se llevó a cabo utilizando el kit ADN polimerasa MyTaq (Bioline) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, los productos de PCR se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 2% y se tiñeron con bromuro de etidio. Todos los productos de PCR estaban en el tamaño esperado. La  $\beta$ -actina se usó como control interno. Para el

análisis semicuantitativo, se determinaron las intensidades relativas de los productos de PCR amplificados y la expresión relativa de cada citocina se semicuantificó en relación con el gen  $\beta$ -actina.

### 3.5 Cuantificación de citocinas

Ratones adultos y recién nacidos infectados / vehículo se sacrificaron a las 24 y 72 horas después de la infección. Se obtuvieron y pesaron asépticamente hígado, cerebro, riñón y bazo. Posteriormente los órganos se colocaron en 1mL de SSF estéril que contenía un coctel de inhibidores de proteasa (Tabletas ULTRA completas, Mini, sin EDTA; Roche) y fueron macerados mediante un homogeneizador manual (Polytron) durante 30 segundos, los homogenizados fueron centrifugados a 3000 rpm a 4°C, durante 5 minutos, y los sobrenadantes se almacenaron a -80°C hasta la medición de citocinas.

La cuantificación de las citocinas de los sobrenadantes obtenidos se realizó mediante el kit Mouse Th1 / Th2 / Th17 Cytometric Bead Array (BD Biosciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y las muestras fueron adquiridas en el citómetro de flujo BD Accuri C6 (BD Biosciences). Se midieron las siguientes citocinas: TNF $\alpha$ , IL-6, IFN $\gamma$ , IL-17, IL-4, IL-10, IL-2. Los resultados para las curvas estándar de cada citocina y muestras se analizaron utilizando el software FCAP Array v3.0 (BD biosciences). La concentración de cada citocina se determinó en unidades de pg / ml, y luego se recalculó como pg / g de tejido.

### 3.6 Detección fenotípica de poblaciones celulares del sistema inmune y análisis de PRRs

Ratones adultos y recién nacidos infectados / vehículo se sacrificaron a las 24 y 72 horas después de la infección. Se obtuvieron hígado, cerebro y riñón. Las suspensiones de células individuales de cada tejido se obtuvieron utilizando métodos descritos previamente (54). En resumen, los órganos se cortaron finamente y se colocaron a 37°C en una solución de digestión (RPMI 1640 sin suero) que contenía 0,3 mg/ml de Liberase TL y 150 U/ml de DNAsa de grado I durante 30 minutos con agitación intermitente. Posterior a la digestión, los tejidos se maceraron mecánicamente aspirando los restos de tejido con una jeringa con aguja de 18G. El tejido homogenizado se pasó a través de un filtro de 70µm y se enjuagó con RPMI. Los eritrocitos se lisaron con buffer de lisis ACK durante 30 s. Después las células fueron filtradas a través de filtro de 70µm y fueron enjuagadas con 3mL de PBS, la suspensión fue centrifugada a 1500 rpm por 5 min a 4°C. Finalmente el pellet celular se re-suspendió con 500uL de PBS 1% con suero humano y se realizó la cuantificación celular y viabilidad con azul tripan en cámara de neubauer.

Las suspensiones celulares con viabilidad mayor a 80% se utilizaron para las tinciones celulares;  $1 \times 10^6$  células de cada tejido (50-100uL) fueron incubadas a 4 grados Celsius por 20 minutos con los siguientes anticuerpos CD45 anti-ratón, F4/80 anti-ratón FITC, MHC II anti-ratón PerCP-Cy5.5, Gr1 anti-ratón APC, CD11b anti-ratón PE, CD11c anti-ratón A647, CD3 anti-ratón PE, CD49 anti-ratón APC, TLR-2 anti-ratón FITC, TLR-4 anti-ratón FITC,

Dectin 2 anti-ratón FITC, Posterior a la incubación se agregó 800uL de PBS y fueron centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos a 4°C. Finalmente, la células fueron resuspendidas con 200 uL de PBS y fueron adquiridas en el citómetro de flujo BD Accuri C6 (BD Biosciences). Los datos fueron analizados usando el software FlowJo.

## CAPÍTULO 4

### 4. RESULTADOS

4.1 Expresión y cuantificación de citocinas en órganos de diseminación durante la candidosis diseminada murina.

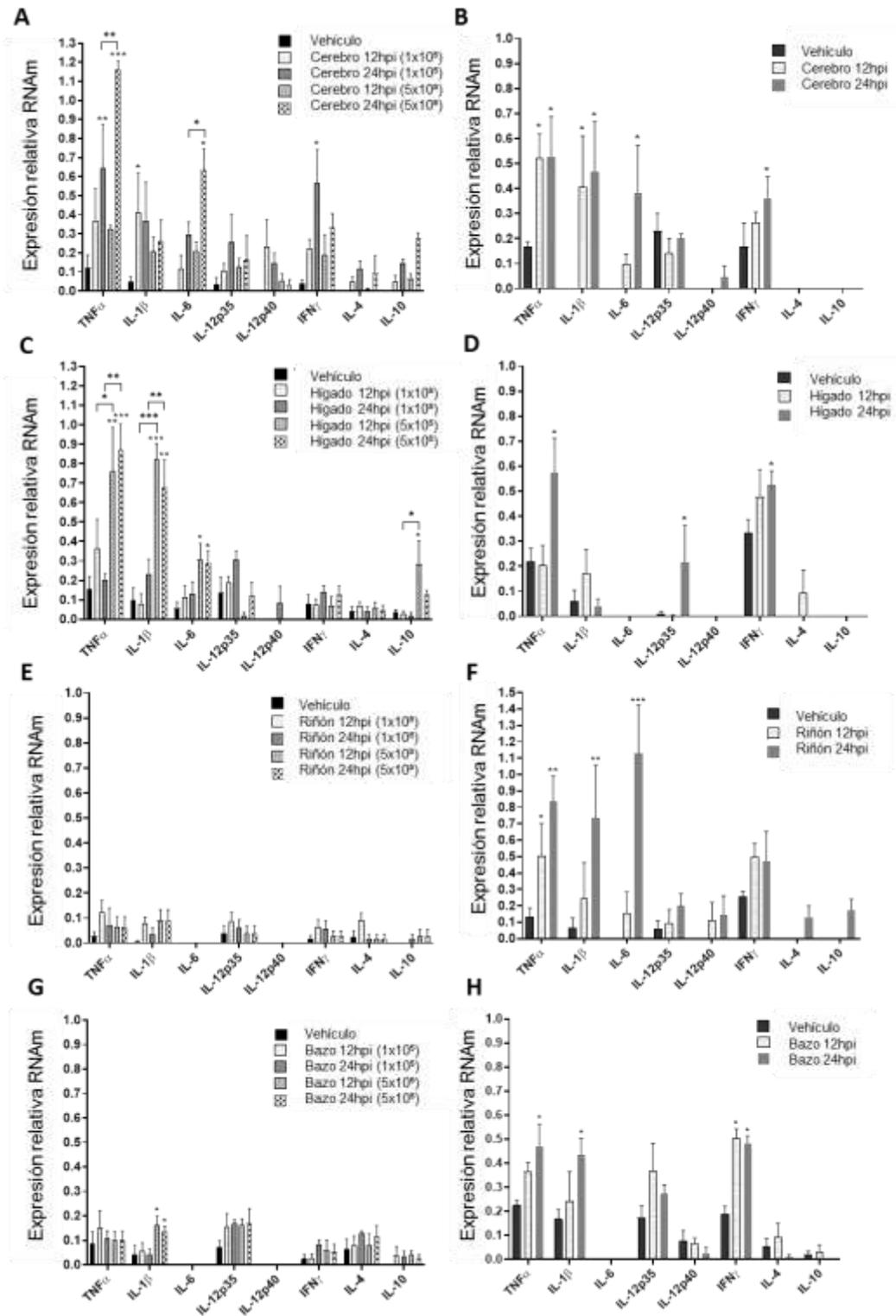
Con el objetivo de evaluar la expresión de citocinas en órganos de diseminación durante la candidosis. Ratones Rn (<24 horas de vida) fueron infectados con  $1 \times 10^5$  y  $5 \times 10^5$  UFCs de *C. albicans*. Además, ratones hembras de 6-8 semanas (adultos) fueron infectadas con  $1 \times 10^6$  UFCs de *C. albicans*. Observamos que el cerebro de ratones Rn inoculados con  $1 \times 10^5$  UFCs (inóculo no-fatal) mostró un incremento moderado en la expresión de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , así como un ligero incremento en la expresión de IFN $\gamma$  con respecto al grupo vehículo a las 24 horas post-infección (hpi) (Figura 1A), mismo comportamiento en la expresión de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IFN $\gamma$  fue observado en el cerebro de animales adultos infectados (Figura 1B). Mientras que el cerebro de los Rn infectados con  $5 \times 10^5$  UFCs (inóculo fatal) exhibió una sobreexpresión de TNF $\alpha$  e IL-6 y la ausencia en la expresión de IFN $\gamma$  a las 24hpi (Figura 1A).

Con respecto al hígado de ratones Rn infectados con  $1 \times 10^5$  UFCs evidenciamos tendencias en la expresión de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 en comparación con el grupo vehículo (Figura 1C), en contraste a la sobreexpresión de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, así como un ligero incremento de IL-10 en el hígado de los ratones Rn infectados con  $5 \times 10^5$  UFCs a las 24 hpi

(Figura 1C), en el hígado de ratones adultos demostramos un moderado incremento en la expresión de TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  a las 24 hpi (Figura 1D).

A diferencia del cerebro y el hígado de ratones neonatos, el riñón y bazo de los ratones Rn infectados con ambas concentraciones no hubo diferencias en la expresión de las citocinas analizadas con respecto al grupo de vehículos (Figura 1E y Figura 1G). En cambio, el bazo de los ratones adultos infectados evidenció un incremento en la expresión de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IFN $\gamma$  a las 24 hpi (Figura 1H), mientras que el riñón de los ratones adultos infectados exhibió una sobreexpresión de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 a las 24 hpi (Figura 1F). Estos resultados nos muestran que tejidos como hígado y cerebro de ratones neonatos infectados intravenosamente con un inóculo fatal, exhiben una sobre-expresión de citocinas como TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, como lo es el riñón en los ratones adultos infectados. Interesantemente, el cerebro e hígado de ratones neonatos infectados sistémicamente con inóculo no fatal, presentan una moderada expresión de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IFN $\gamma$ , lo que posiblemente favorece la resistencia a la invasión fúngica en estos sitios.

Con el objetivo de correlacionar la expresión de citocinas en los órganos de diseminación durante la candidosis, cuantificamos la producción de citocinas en ratones neonatos y adultos infectados, evidenciando que el cerebro de los ratones Rn infectados con  $1 \times 10^5$  UFCs (inóculo no-fatal) mostró un



**Figura 1. Expresión de citocinas en órganos de diseminación durante la candidosis invasiva neonatal.** Análisis de la expresión de ARNm de citocinas a las 12 y 24 horas después de la infección en A) cerebro, C) hígado, E) riñón y G) bazo de ratones recién nacidos infectados con  $1 \times 10^5$  y  $5 \times 10^5$  UFCs de *C. albicans*. Y B) cerebro, D) hígado, F) riñón y H) bazo de ratones adultos infectados con *C. albicans*. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  y \*\*\*  $P < 0.001$

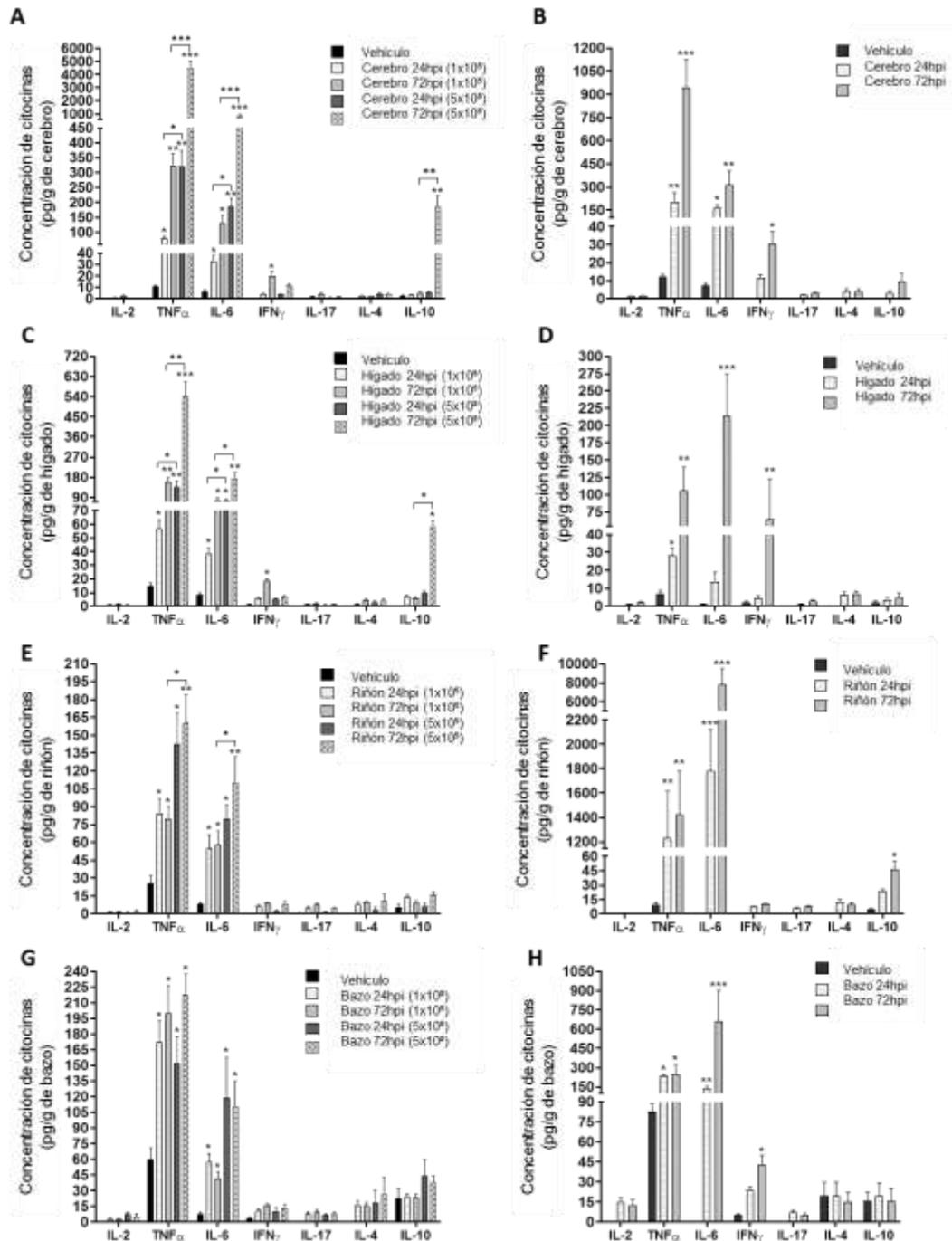
aumento moderado en la producción (5-10 veces) de TNF $\alpha$  e IL-6 a las 24 hpi con respecto al grupo vehículo, mientras que a las 72 hpi la producción de TNF $\alpha$  e IL-6 fue (15-30 veces mayor), además de un aumento en la producción de IFN $\gamma$  (Figura 2A), mismo perfil de citocinas TNF $\alpha$ , IL-6, e IFN $\gamma$  fue observado en el cerebro de los ratones adultos infectados (Figura 2B), en contraste al cerebro de los ratones Rn infectados con  $5 \times 10^5$  UFCs (inóculo fatal) que mostraron una sobreproducción (50-400 veces) de TNF $\alpha$  e IL-6, además de un aumento de IL-10 y la ausencia en la producción de IFN $\gamma$  a las 72 hpi (Figura 2A).

El hígado de ratones Rn infectados con  $1 \times 10^5$  UFCs exhibió un aumento en la producción (5-8 veces) de TNF $\alpha$  e IL-6 a las 24 hpi con respecto al grupo vehículo, mientras que a las 72 hpi la producción de TNF $\alpha$  e IL-6 fue de 10-20 veces mayor, además de un aumento en la producción de IFN $\gamma$  (Figura 2C), evidenciando el mismo comportamiento de citocinas en el hígado de animales adultos infectados (Figura 2D). En contraste con la sobreproducción (20-55 veces) de TNF $\alpha$  e IL-6 a las 72 hpi, además del aumento en la producción de IL-10 y la ausencia de IFN $\gamma$  en el hígado de ratones Rn infectados con  $5 \times 10^5$  UFCs (Figura 2C).

En el riñón y bazo de los ratones Rn infectados con ambos inóculos, observamos un ligero aumento de 4-8 veces mayor de TNF $\alpha$  e IL-6 a las 72 hpi (Figura 2E y Figura 2G). Con respecto a la producción de citocinas en el bazo de los ratones adultos infectados evidenciamos un aumento en la producción de TNF $\alpha$ , IL-6 e IFN $\gamma$  a las 72 hpi (Figura 2H). Finalmente, el riñón de ratones adultos infectados exhibieron una sobreproducción de

TNF $\alpha$  e IL-6 (100-700 veces mayor) a las 72 hpi, además de un aumento en IL-10 y la ausencia de IFN $\gamma$  (Figura 2F).

Estos resultados muestran que el cerebro y el



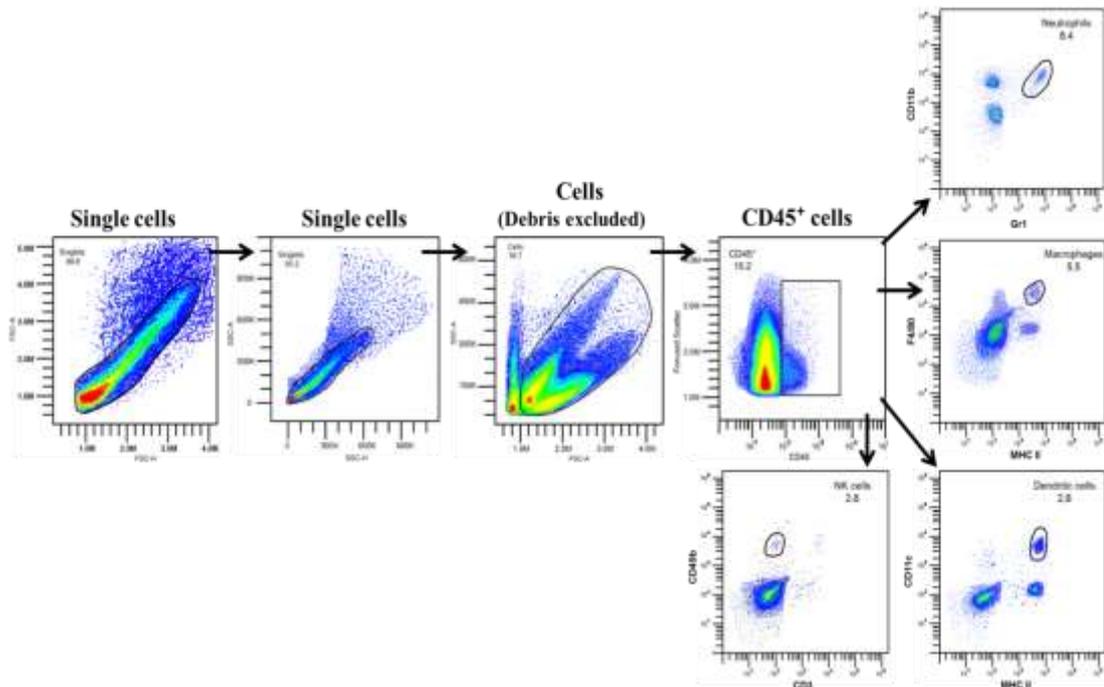
**Figura 2. Producción de citocinas en órganos diseminación durante la candidosis invasiva neonatal.** Cuantificación de citocinas 24 y 72 horas después de la infección en A) cerebro, C) hígado, E) riñón y G) bazo de ratones recién nacidos infectados con  $1 \times 10^5$  y  $5 \times 10^5$  UFCs de *C. albicans*. Y B) cerebro, D) hígado, F) riñón y H) bazo de ratones adultos infectados con *C. albicans*. \* P < 0.05, \*\* P < 0.01 y \*\*\* P < 0.001

y el hígado de ratones recién nacidos inoculados con  $1 \times 10^5$  UFCs (inóculo no-fatal) tienen una expresión y producción moderada de citocinas proinflamatorias que en combinación con el aumento de IFN $\gamma$ , posiblemente favorecen la resistencia a la invasión por *C. albicans*, como se observa en el cerebro, el hígado y el bazo de ratones adultos infectados. Mientras, el cerebro y el hígado de los ratones recién nacidos infectados con  $5 \times 10^5$  UFCs (inóculo fatal) muestran la sobreexpresión y sobreproducción de citocinas proinflamatorias que en combinación con el aumento de IL-10 y ausencia de IFN $\gamma$ , posiblemente favorezca la susceptibilidad a la invasión por el hongo, mismo comportamiento hiper-inflamatorio se observó en el riñón de los ratones adultos. Por lo que la respuesta de las citocinas durante la infección invasiva es específica del órgano en ambos modelos experimentales neonatales y adultos.

4.2.-Detección fenotípica de poblaciones celulares de la respuesta inmune en los órganos de ratones neonatos con candidiasis diseminada.

Con el objetivo de identificar las poblaciones celulares que se encuentran presentes en los órganos de diseminación durante la candidosis diseminada, obtuvimos las suspensiones celulares de cerebro, hígado y riñón de ratones neonatos y adultos. Caracterizamos a los leucocitos infiltrantes como células CD45<sup>+</sup> en los tejidos a los días 1 y 3 post-infección, y definimos la identidad de los leucocitos como neutrófilos (CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup>); macrófagos (F4/80<sup>+</sup> MHCII<sup>+</sup>); células dendríticas (CD11c<sup>+</sup> MHCII<sup>+</sup>); y Células Natural Killer (NK) (CD3<sup>-</sup> CD49b<sup>+</sup>). En la figura 3 se muestra un ejemplo de la selección de

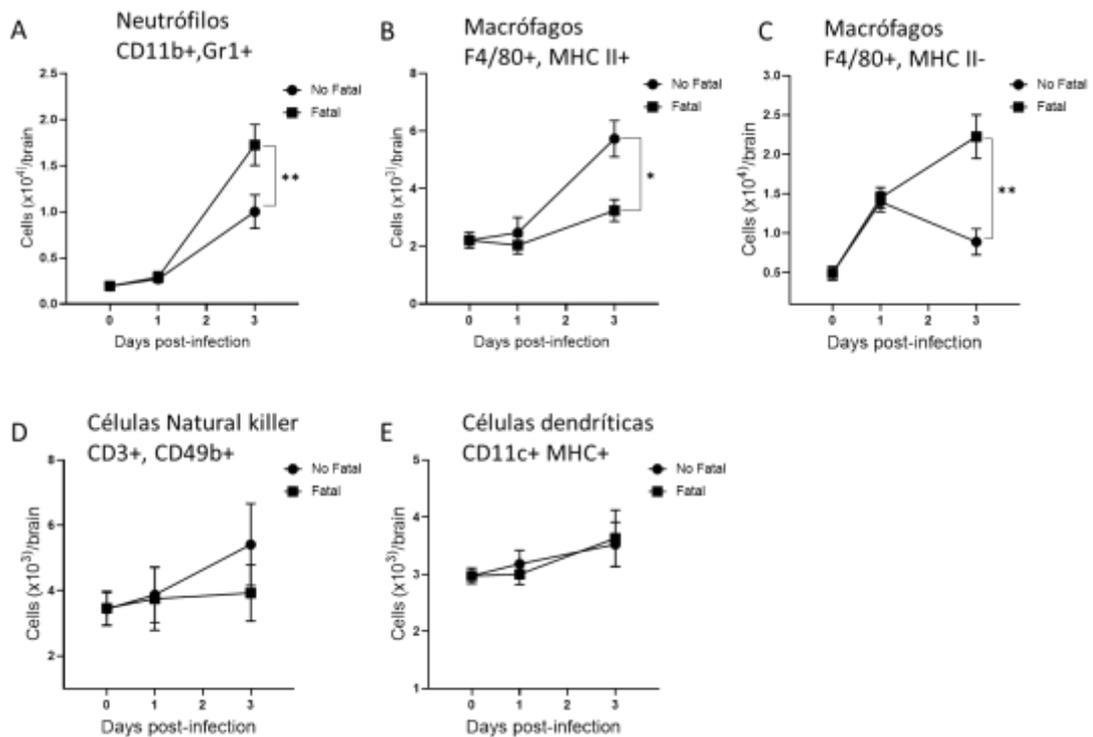
regiones utilizadas para la exclusión de dobletes, restos celulares y la selección de regiones para cada fenotipo celular utilizado.



**Figura 3. Diagrama de puntos representativo para la selección de eventos simples, exclusión de dobletes y restos celulares.** Análisis poblacional de neutrófilos (CD45+,CD11b+,Gr1+), macrófagos (CD45+,MHCII+,F4/80+), células dendríticas (CD45+,CD11c+,MHCII+) y Células Natural Killer (NK) (CD45+,CD3-,CD49b+) en suspensión celular de cerebro de ratones con candidosis diseminada.

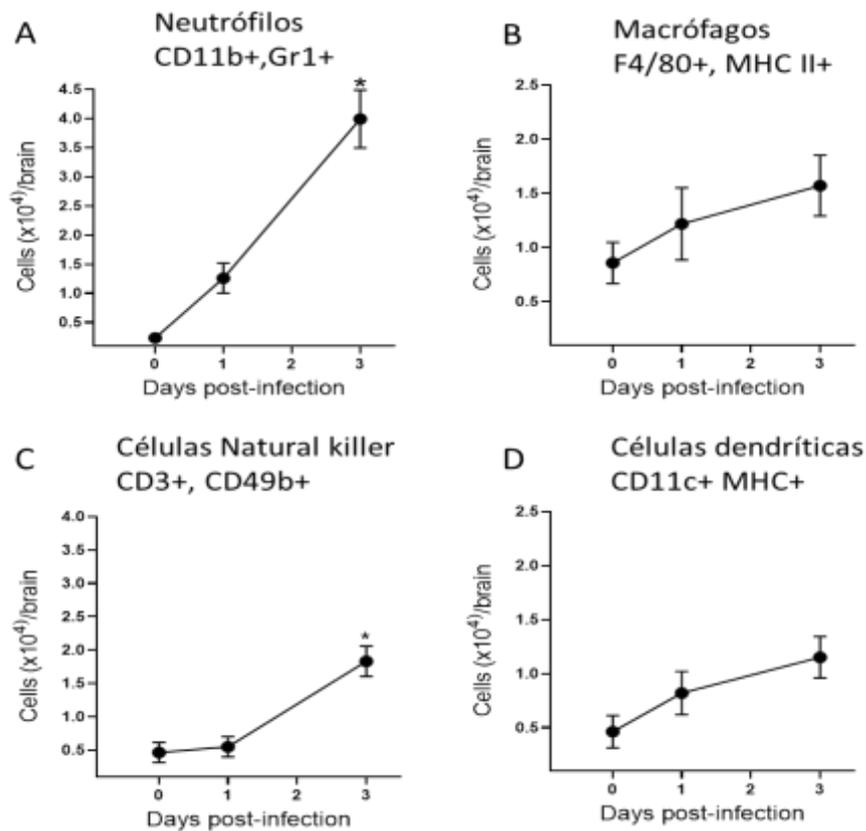
En el cerebro de ratones neonatos infectados con el inóculo  $5 \times 10^5$  (Fatal), observamos un marcado incremento en el porcentaje y el número de neutrófilos al día 3 post-infección, en comparación al cerebro de ratones neonatos infectados con el inóculo  $1 \times 10^5$  (No Fatal) que evidenció un ligero incremento de neutrófilos (Figura 4A), con respecto a la detección de macrófagos  $F4/80^+ MHCII^+$  en el cerebro de ratones neonatos infectados con el inóculo no fatal se observó un incremento significativo en el número de macrófagos al día 3 de infección en comparación con el cerebro de ratones infectados con el inóculo fatal (Figura 4B). Interesantemente, durante la

detección fenotípica de los macrófagos encontramos una población celular que predominaba en mayor porcentaje y cantidad que los macrófagos F4/80<sup>+</sup> MHCII<sup>+</sup>, esta población celular exhibía el siguiente fenotipo F4/80<sup>+</sup> MHCII<sup>-</sup> que posiblemente sean macrófagos “no activados” los cuales se encontraban en mayor porcentaje y numero en el cerebro de ratones infectados con el inoculo fatal (Figura 4C). Durante el análisis de células NK CD3<sup>+</sup>CD49<sup>+</sup> en el cerebro de ratones neonatos infectados no hubo diferencias en el número de células NK durante los días de infección, solo tendencias al incremento de células NK en el cerebro de ratones infectados con el inoculo no fatal (Figura 4D). Finalmente, no hubo diferencias en el número de células dendríticas CD11c<sup>+</sup> MHCII<sup>+</sup> durante los días de infección en el cerebro de ratones neonatos infectados con ambos inóculos (Figura 4E).



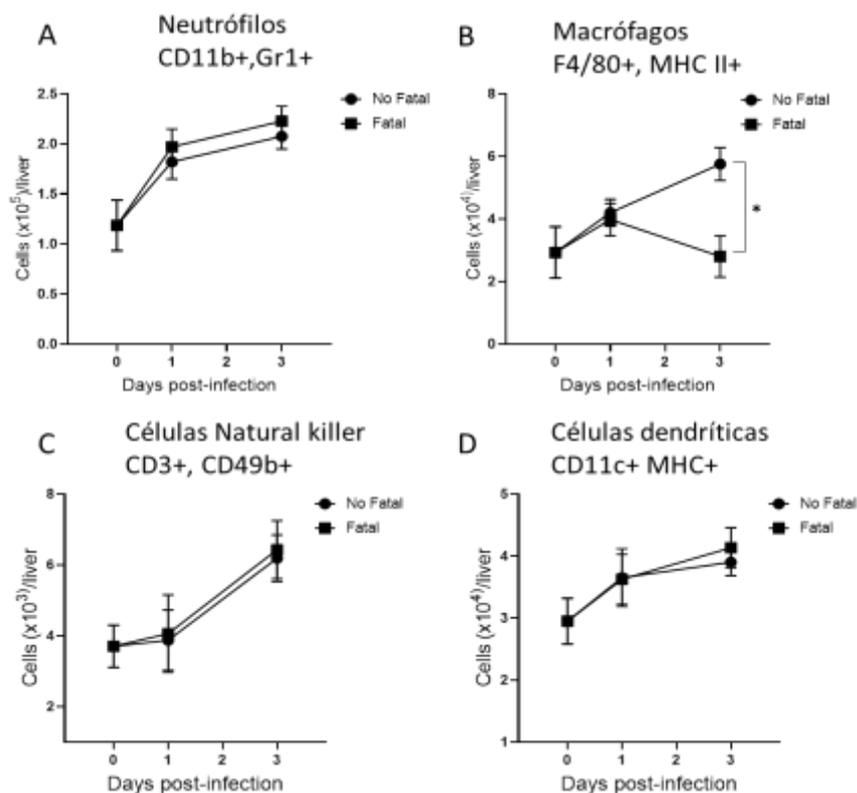
**Figura 4. Detección fenotípica de poblaciones celulares del sistema inmune innato en el cerebro de ratones recién nacidos con candidosis diseminada.** Análisis de la presencia de A) neutrófilos CD11b+Gr1+, B) macrófagos F4/80+MHCII+, C) macrófagos F4/80+MHCII-, D) células NK CD3+CD49b+ y E) células dendríticas CD11c+MHCII+ en el cerebro de ratones neonatos infectados con  $5 \times 10^5$  ufc de *C. albicans* (inoculo fatal) y  $1 \times 10^5$  ufc de *C. albicans* (inoculo no fatal) a los días 1 y 3 de infección. \* P <0.05, \*\* P <0.01 y \*\*\* P <0.001

El cerebro de ratones adultos infectados exhibió un incremento en el número de neutrófilos y células NK al día 3 de infección (Figura 5A y 5C), mientras el análisis de macrófagos y células dendríticas se evidenció una tendencia de incremento durante los días de infección (Figura 5B y 5D).



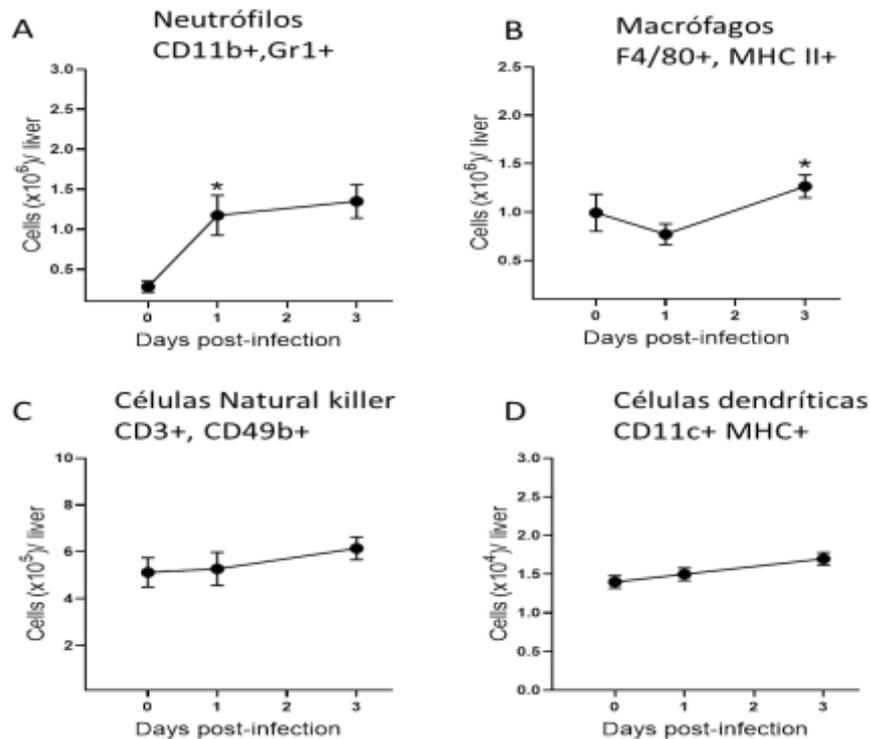
**Figura 5. Detección fenotípica de poblaciones celulares del sistema inmune innato en el cerebro de ratones adultos con candidosis diseminada.** Análisis de la presencia de A) neutrófilos CD11b+Gr1+, B) macrófagos F4/80+MHCII+, C) células NK CD3+CD49b+ y D) células dendríticas CD11c+MHCII+ en el cerebro de ratones adultos infectados con  $1 \times 10^6$  ufc de *C. albicans* a los días 1 y 3 de infección. \* P <0.05, \*\* P <0.01 y \*\*\* P <0.001

Con respecto al análisis de las poblaciones celulares del sistema inmune en el hígado de ratones neonatos infectados mostramos solo tendencias de un incremento en el número de neutrófilos CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup> en ambos inóculos durante los días de infección (Figura 6A). Mientras que encontramos un incremento en el número de macrófagos F4/80<sup>+</sup> MHCII<sup>+</sup> en el hígado de ratones neonatos infectados con el inóculo no fatal en comparación con el inóculo fatal al día 3 de infección (Figura 6B). A diferencia del cerebro de los animales neonatos infectados, en el hígado no detectamos la población celular F4/80<sup>+</sup> MHCII<sup>-</sup> (Datos no mostrados). Al hacer el análisis del número de células NK y células dendríticas en el hígado de ratones neonatos infectados con ambos inóculos no hubo diferencias en el número de estas células, solo tendencias al incremento durante los días de infección (Figura 6C y 6D).



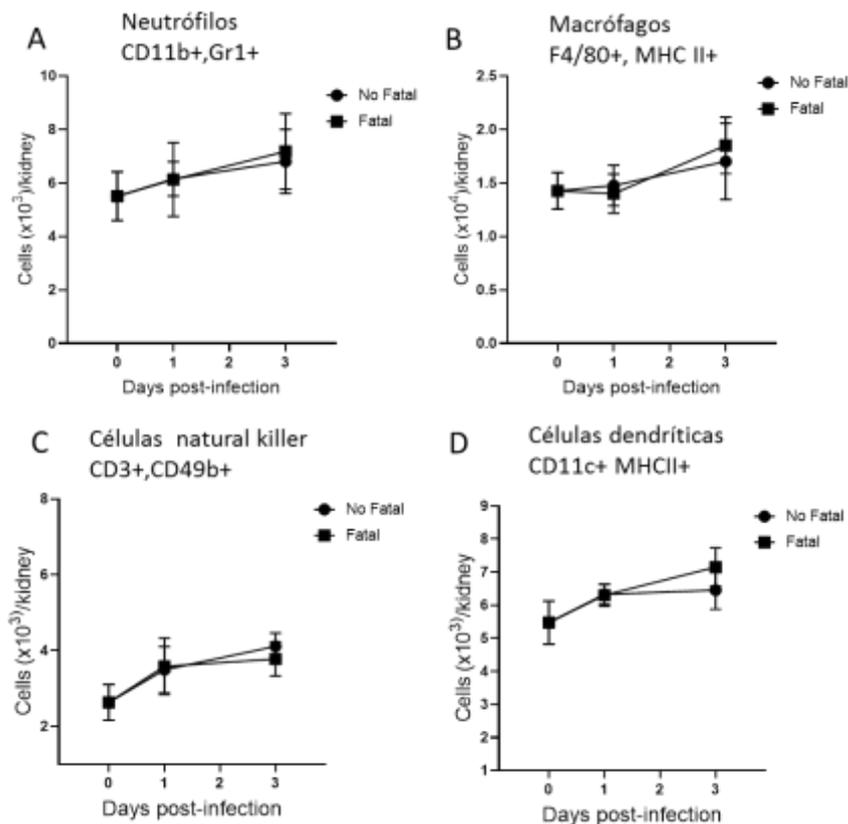
**Figura 6. Detección fenotípica de poblaciones celulares del sistema inmune innato en el hígado de ratones recién nacidos con candidosis diseminada.** Análisis de la presencia de A) neutrófilos CD11b+Gr1+, B) macrófagos F4/80+MHCII+, C) células NK CD3+CD49b+ y D) células dendríticas CD11c+MHCII+ en el hígado de ratones neonatos infectados con  $5 \times 10^5$  ufc de *C. albicans* (inoculo fatal) y  $1 \times 10^5$  ufc de *C. albicans* (inoculo no fatal) a los días 1 y 3 de infección. \* P <0.05, \*\* P <0.01 y \*\*\* P <0.001

En el hígado de ratones adultos con candidosis diseminada evidenciamos un incremento en el número de neutrófilos y macrófagos durante el día 1 y 3 de infección (Figura 7A y 7B), mientras que no se observaron diferencias en el número de células NK y células dendríticas durante la infección (Figura 7C y 7D).



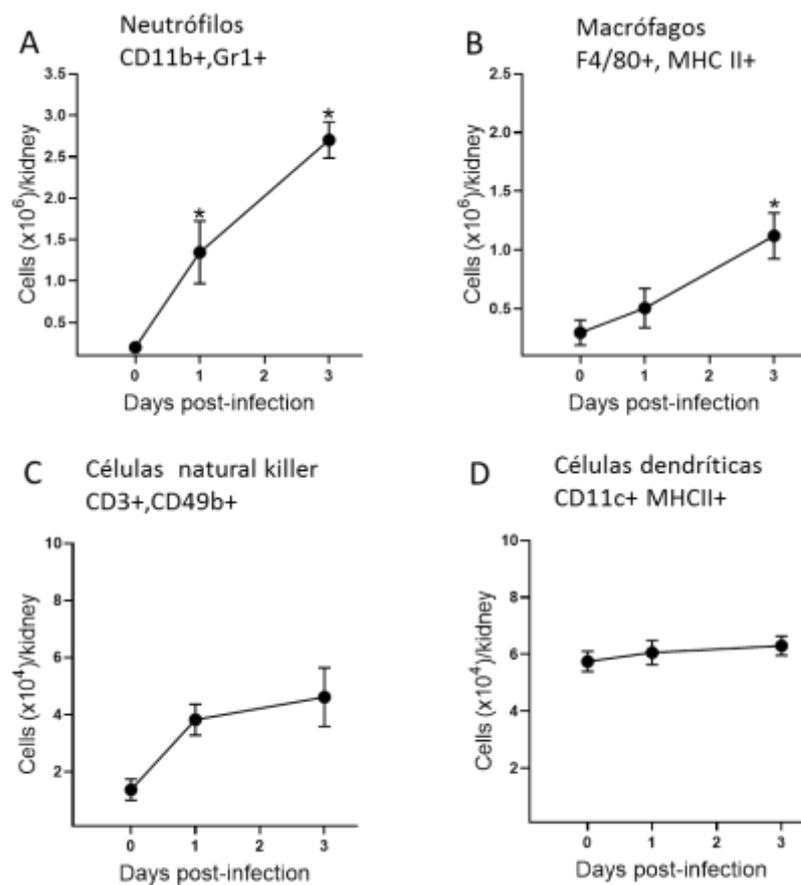
**Figura 7. Detección fenotípica de poblaciones celulares del sistema inmune innato en el hígado de ratones adultos con candidosis diseminada.** Análisis de la presencia de A) neutrófilos CD11b+Gr1+, B) macrófagos F4/80+MHCII+, C) células NK CD3+CD49b+ y D) células dendríticas CD11c+MHCII+ en el hígado de ratones adultos infectados con  $1 \times 10^6$  ufc de *C. albicans* a los días 1 y 3 de infección. \* P <0.05, \*\* P <0.01 y \*\*\* P <0.001

En contraste al cerebro e hígado de los ratones recién nacidos, en el riñón de los neonatos infectados con ambos inóculos no se encontraron diferencias en el número de neutrófilos, macrófagos, células NK y células dendríticas (Figura 8A-D) durante los días de infección. Mientras que en el riñón de los ratones adultos infectados se evidenció un incremento drástico en el número de neutrófilos a partir del día 1 de infección y un incremento en el número de macrófagos en el día 3 de infección (Figura 9A-B), al hacer el análisis de células NK y células dendríticas no se observaron diferencias en el número de células durante la infección (Figura 9C-D).



**Figura 8. Detección fenotípica de poblaciones celulares del sistema inmune innato en el riñón de ratones recién nacidos con candidosis diseminada.** Análisis de la presencia de A) neutrófilos CD11b+Gr1+, B) macrófagos F4/80+MHCII+, C) células NK CD3+CD49b+ y D) células dendríticas CD11c+MHCII+ en el riñón de ratones recién nacidos infectados con  $5 \times 10^5$  ufc de *C. albicans* (inoculo fatal) y  $1 \times 10^5$  ufc de *C. albicans* (inoculo no fatal) a los días 1 y 3 de infección. \* P < 0.05, \*\* P < 0.01 y \*\*\* P < 0.001

Estos resultados muestran que la presencia de las estirpes celulares del sistema inmune innato es distinta en cada tejido durante candidosis diseminada, además difiere entre neonatos y adultos. Aunado a ello evidenciamos que la presencia de cada población celular es temporal en cada tejido. Por lo que probablemente la presencia diferencial de leucocitos determina el resultado específico de cada órgano de la infección.



**Figura 9. Detección fenotípica de poblaciones celulares del sistema inmune innato en el riñón de ratones adultos con candidosis diseminada.** Análisis de la presencia de A) neutrófilos CD11b+Gr1+, B) macrófagos F4/80+MHCII+, C) células NK CD3+CD49b+ y D) células dendríticas CD11c+MHCII+ en el riñón de ratones adultos infectados con  $1 \times 10^6$  ufc de *C. albicans* a los días 1 y 3 de infección. \* P < 0.05, \*\* P < 0.01 y \*\*\* P < 0.001

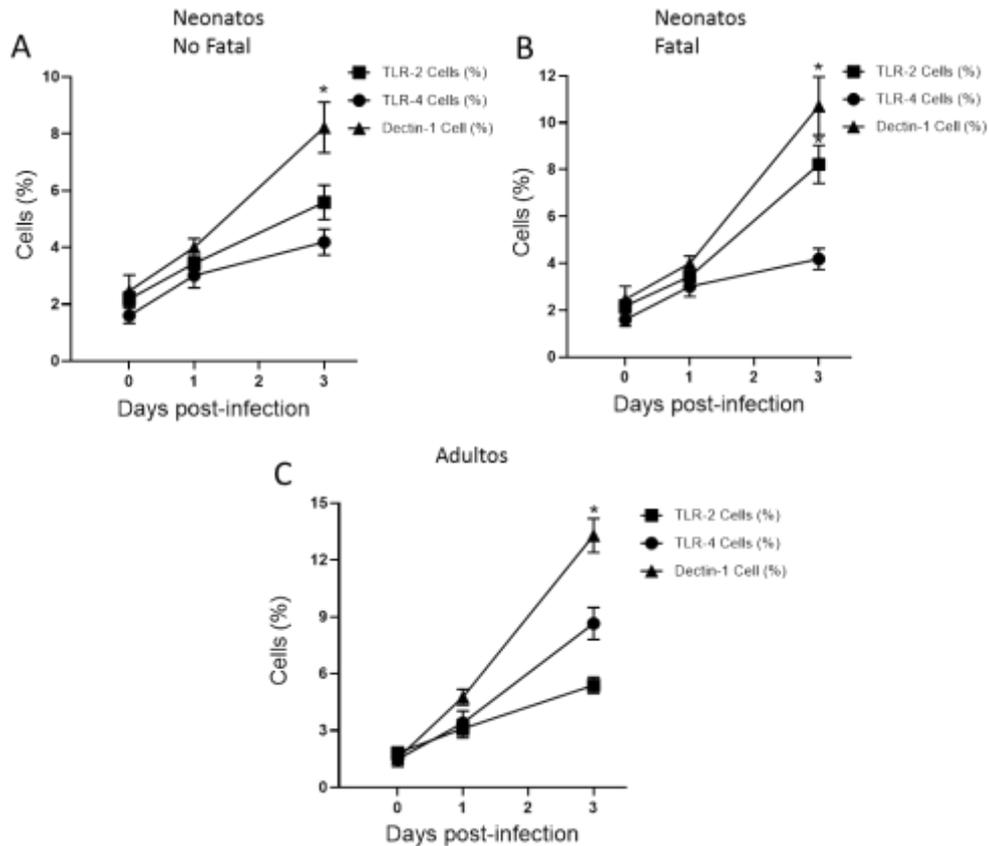
4.3 Detección de los receptores reconocimiento de patrones (PRRs) en los órganos de diseminación durante la candidosis diseminada.

Con el objetivo buscar la presencia de algunos receptores involucrados en el reconocimiento de *C. albicans* en los órganos de diseminación durante la candidosis diseminada, obtuvimos las suspensiones celulares de los tejidos previamente analizados para buscar la presencia de TLR-2, TLR-4 y Dectin-1.

Observamos un incremento en la presencia de Dectin-1 en el cerebro de ratones neonatos y adultos infectados con *C. albicans* al día 3 de infección (Figura 10A-C). Con respecto al análisis de los receptores TLRs, se evidenció un incremento en la presencia de TLR-2 en el cerebro de ratones neonatos infectados con el inóculo fatal al día 3 de infección (Figura 10B), mientras que no hubo diferencias en el porcentaje de TLR-2 en el cerebro de ratones neonatos infectados con el inóculo no fatal y ratones adultos (Figura 10A y 10C), en cuanto a TLR-4 no encontramos diferencias en el porcentaje durante los días de infección en el cerebro de ratones neonatos infectados con ambos inóculos (Figura 10A-B), a diferencia de las tendencias al incremento de TLR-4 en el cerebro de ratones adultos infectados (Figura 10C).

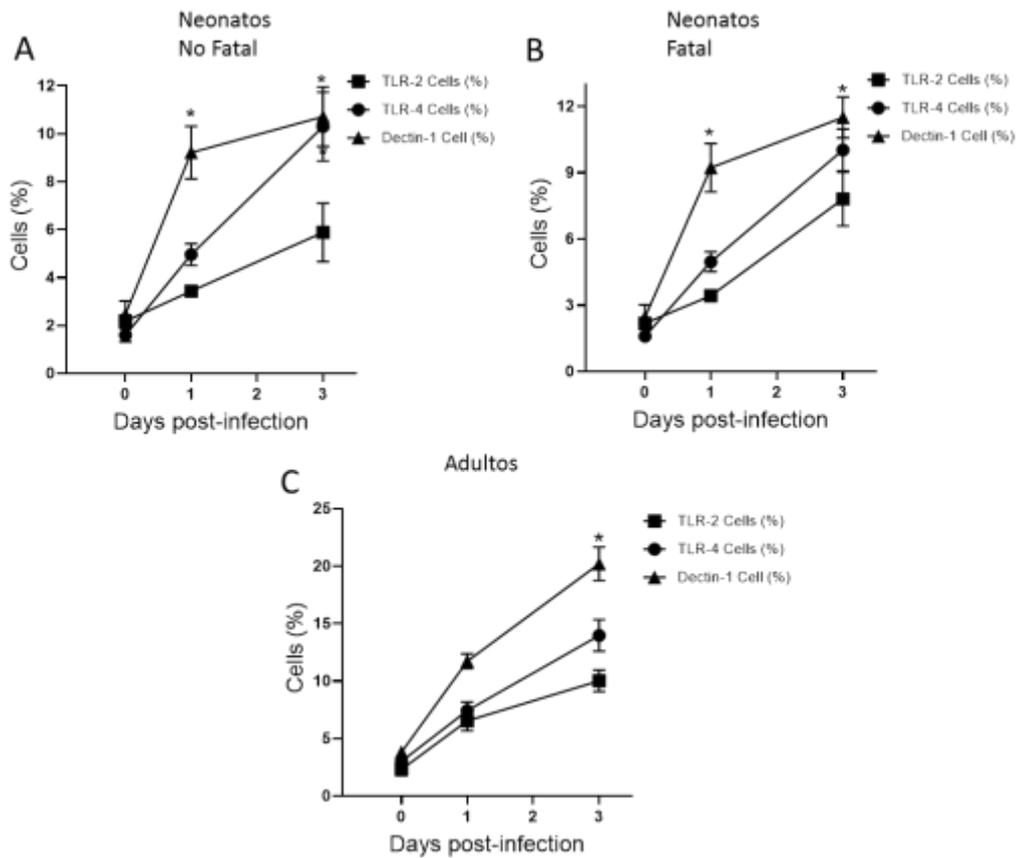
En el hígado de ratones con candidosis diseminada, demostramos un incremento en la frecuencia de Dectin-1 a partir del día 1 de infección en el hígado de ratones neonatos y adultos infectados con *C. albicans* (Figura 11A-C), así como también se observó un incremento de TLR-4 en el día 3 de

infección en el hígado de ratones neonatos y adultos con candidosis diseminada (Figura 11A-C).



**Figura 10. Presencia de receptores de reconocimiento de patrones en el cerebro de ratones recién nacidos y adultos con candidosis diseminada.** Análisis de la presencia de TLR-2, TLR-4 y Dectin-1 en el cerebro de A) ratones recién nacidos infectados con el inoculo no fatal, B) ratones recién nacidos infectados con el inoculo fatal y C) ratones adultos infectados con *C. albicans* a los días 1 y 3 de infección. \* P <0.05, \*\* P <0.01 y \*\*\* P <0.001

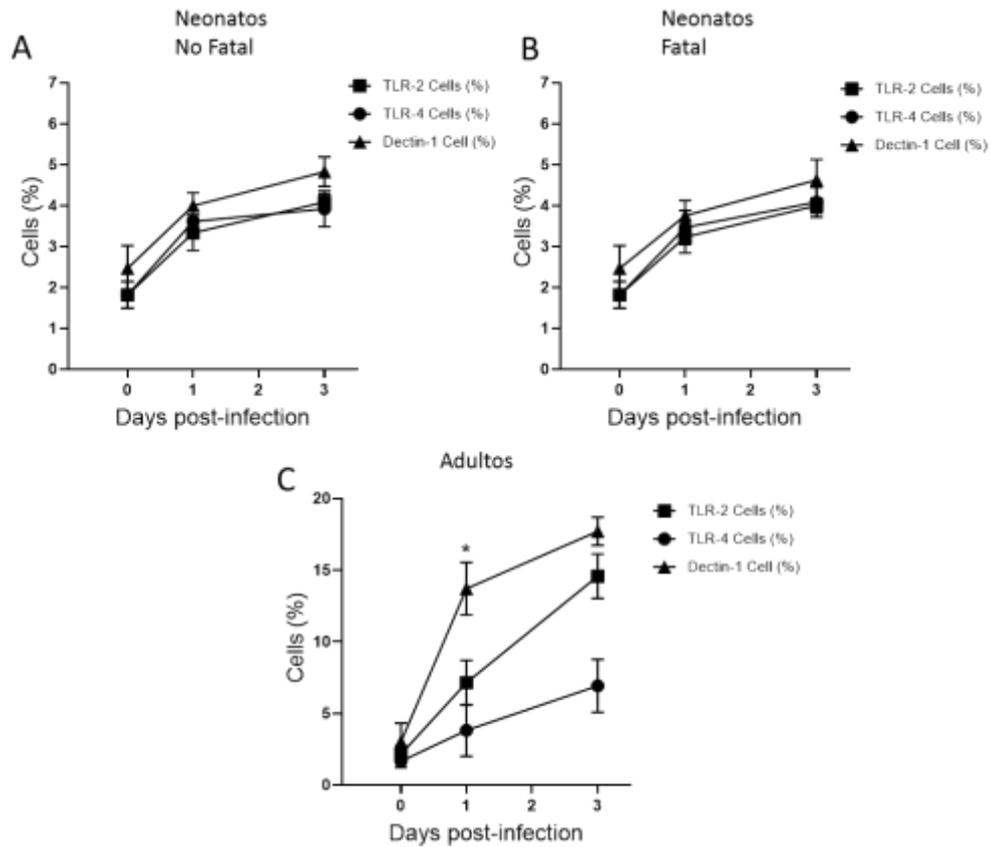
Finalmente, En el riñón de ratones neonatos no se evidenciaron diferencias en la presencia de los receptores Dectin-1, TLR-2 y TLR-4 durante los días 1 y 3 de infección en ambos grupos de animales neonatos infectados (Figura 12A-B). Mientras que en el riñón de ratones adultos infectados se observó un incremento en la presencia de Dectin-1 y TLR-2 al día 1 y 3 de infección, y solo tendencias de incremento en TLR-4 (Figura 12C).



**Figura 11. Presencia de receptores de reconocimiento de patrones en el hígado de ratones recién nacidos y adultos con candidosis diseminada.** Análisis de la presencia de TLR-2, TLR-4 y Dectin-1 en el hígado de A) ratones recién nacidos infectados con el inóculo no fatal, B) ratones recién nacidos infectados con el inóculo fatal y C) ratones adultos infectados con *C. albicans* a los días 1 y 3 de infección. \* P < 0.05, \*\* P < 0.01 y \*\*\* P < 0.001

Estos resultados muestran que la presencia de Dectin-1, TLR-2 y TLR-4 es distinta en los órganos de diseminación de *C. albicans* durante la candidosis diseminada en ratones neonatos y adultos, además el incremento en la presencia de algunos receptores posiblemente es dependiente de la

morfología de *C. albicans* que predomina en el tejido de invasión.



**Figura 12. Presencia de receptores de reconocimiento de patrones en el riñón de ratones recién nacidos y adultos con candidosis diseminada.** Análisis de la presencia de TLR-2, TLR-4 y Dectin-1 en el riñón de A) ratones recién nacidos infectados con el inoculo no fatal, B) ratones recién nacidos infectados con el inoculo fatal y C) ratones adultos infectados con *C. albicans* a los días 1 y 3 de infección. \* P < 0.05, \*\* P < 0.01 y \*\*\* P < 0.001

## CAPÍTULO 5

### 5. DISCUSIÓN

A pesar de la disponibilidad de agentes antifúngicos, la candidiasis invasiva neonatal sigue siendo una de las principales causas de muerte relacionadas con infecciones nosocomiales en Rn prematuros. Por lo que es de gran importancia comprender la interacción *Candida*-neonato. Los modelos experimentales de candidosis neonatal que han sido reportados previamente en la literatura son de gran importancia para proveer un mayor conocimiento de la fisiopatología de la infección neonatal, así como alternativas en el tratamiento (60-61). Recientemente, Flores-Maldonado *et al.* desarrollaron un modelo neonatal de infección intravenosa con *C. albicans* utilizando ratones de 0 días de edad con el fin de emular a los recién nacidos prematuros humanos, como principal grupo de riesgo a esta micosis, observaron que el hígado y cerebro fueron los órganos con mayor invasión fúngica en los animales recién nacidos, mientras que en los animales adultos fue el riñón. Además demostraron que ajustando la cantidad de levaduras a administrar a los ratones recién nacidos estos pueden responder adecuadamente controlando la invasión y daño del hongo en distintos tejidos, lo que favorece a su sobrevivencia frente a esta infección invasiva. Finalmente, evidenciaron que la presencia de infiltrado celular es distinta en cada órgano de diseminación y dependiente del inóculo administrado a los animales recién nacidos (58). Recientemente se ha descrito que la respuesta inmune frente a la candidosis diseminada en modelos murinos empleando

ratones adultos es órgano específica y dependiendo del sitio de diseminación será la respuesta que se establezca, ya sea para el control o progresión de la infección (54). Actualmente, se desconoce el perfil respuesta inmune que se establece en los órganos de diseminación durante la candidosis invasiva neonatal en recién nacidos. Por lo que en este trabajo evaluamos la respuesta inmune innata que se establece en órganos de diseminación en ratones Rn con candidosis invasiva, con el objetivo de tener un mayor entendimiento sobre la respuesta inmune y la patogénesis frente a esta afección durante el periodo neonatal.

Previamente se ha demostrado que la respuesta inmune protectora contra *C. albicans* depende de citocinas como IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , INF $\gamma$  e IL-17, importantes para el control de la infección, además se ha observado que ratones deficientes de alguna de estas citocinas son más susceptible a la infección sistémica (62-64). Por lo que evaluamos la expresión y cuantificación de citocinas en los distintos órganos de diseminación durante la candidosis invasiva. Observando un ligero aumento en la concentración de TNF $\alpha$  e IL-6 en el riñón y el bazo de ratones recién nacidos infectados con ambos inóculos, posiblemente debido a una pobre diseminación e invasión de *C. albicans* en estos tejidos demostrado previamente (58). Mientras que en el cerebro e hígado de ratones neonatos infectados con el inóculo no-fatal se evidenció una producción moderada de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, así como un ligero aumento en los niveles de INF $\gamma$ , similar al perfil de citocinas encontrado en el cerebro, bazo e hígado de ratones adultos infectados. Previamente se ha demostrado que ratones adultos de 4-8

semanas de edad infectados vía intravenosa con *C. albicans* pueden controlar la invasión del hongo en tejidos como cerebro, bazo e hígado y eliminar a *C. albicans* durante la primera semana de infección (54,58). Además, en tejidos como cerebro y bazo de ratones adultos con candidosis diseminada se ha observado un incremento en la expresión de IL-6 e IFN $\gamma$  (65). Por lo que posiblemente una ligera producción de citocinas proinflamatorias como son TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, acompañada de un aumento en los niveles de IFN $\gamma$  parece estar asociado con el control y la resolución de la infección en tejidos de diseminación por *C. albicans* en ratones neonatos y adultos. Las citocinas pro-inflamatorias como TNF $\alpha$ , IL-1 e IL-6 son los principales mediadores de la respuesta inflamatoria y tienen un papel crítico en la respuesta local a través de la activación celular, sin embargo, su función depende de los niveles de estas citocinas en el hospedero. Por ejemplo, los niveles bajos o intermedios de TNF $\alpha$ , IL-1 e IL-6 juegan un papel protector local al reclutar macrófagos y neutrófilos en el sitio de la infección. Además, el TNF $\alpha$  induce en macrófagos la producción de especies reactivas de oxígeno que tienen efectos microbicidas, y en las células natural killer NK la producción de IFN $\gamma$  (66,67).

Estudios previos han demostrado que los recién nacidos humanos y murinos exhiben una producción disminuida de IFN $\gamma$  en comparación con su contraparte adulta (68,69). Sin embargo, en ratones recién nacidos se ha demostrado que con la inoculación de dosis bajas del virus de la leucemia murina y agonistas de TLR, los recién nacidos son capaces de inducir una respuesta de citocinas tipo 1 con un incremento en los niveles de TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  (70). Similar a lo encontrado en nuestro estudio donde utilizando un

inoculo de *C. albicans* ajustado al peso de los ratones recién nacidos son capaces de producir IFN $\gamma$ .

En contraste a lo observado en el perfil de citocinas de los ratones recién nacidos infectados con el inóculo no fatal. En el cerebro e hígado de ratones neonatos infectados con el inóculo fatal de *C. albicans* evidenciamos una sobre-expresión y sobre-producción de citocinas proinflamatorias como TNF $\alpha$ , IL-1 e IL-6, así como un aumento en la concentración de IL-10, este perfil de citocinas fue encontrado en el riñón de ratones adultos infectados. Previamente se demostró que el cerebro e hígado de ratones neonatos infectados con el inóculo fatal de *C. albicans* son los tejidos con mayor carga fúngica e invasión por estructuras fúngicas, mientras que en ratones adultos es el riñón (58). Adicionalmente, se ha demostrado que los ratones adultos con candidosis sistémica mueren por sepsis e insuficiencia renal, debido a la producción continua de mediadores pro-inflamatorios e inmunosupresores vinculados al desarrollo de respuestas reguladora, que se basa en la secreción de IL-4 e IL-10 (55). En las candidosis, la respuesta reguladora se ha correlacionado con una mayor susceptibilidad a la micosis, debido a que la IL-10 suprime la actividad antifúngica en las células mononucleares (71,72). Por lo que posiblemente la presencia de IL-10 en los tejidos durante la candidosis favorece a la invasión fúngica,

Previamente se ha demostrado que los altos niveles de TNF $\alpha$ , IL-1 e IL-6 exhibe efectos sistémicos severos conocidos como hiper respuesta inflamatoria que se asocia con insuficiencia orgánica y shock séptico, lo que

puede conducir al deterioro del hospedero y finalmente a la muerte (66,67). En este estudio, hemos demostrado que los animales recién nacidos infectados con un inóculo fatal exhiben una hiperproducción de citocinas conocida como tormenta de citocinas proinflamatorias que posiblemente favorece el daño tisular y la muerte de animales neonatales durante la candidiasis. Los estudios en ratones humanos y recién nacidos sugieren que la hiperproducción o liberación abrumadora de citocinas proinflamatorias contribuye a la mortalidad y la morbilidad en la infección postnatal (73). Por lo que nuestros resultados y estudios previos sugieren que el perfil de respuesta de las citocinas producidas por los recién nacidos posiblemente dependen de la cantidad de estímulo y / o microorganismos.

El microambiente de citocinas que se establece durante las candidemias tiene un papel importante en el reclutamiento y activación de las distintas estirpes celulares de las respuestas inmunes innatas en los sitios de afección, por ejemplo, neutrófilos y macrófagos son fagocitos eficientes de la forma de levadura de *C. albicans* y ocasionan la muerte del hongo a través de la producción de ROS, además, la degranulación de neutrófilos y la formación de trampas extracelulares de neutrófilos han demostrado efectos anti-*Candida* y evitan la filamentación fúngica (43,44). Con respecto a las células dendríticas su función principal es la detección y presentación de antígenos de *C. albicans* para la inducción de una respuesta inmune adaptativa (43). En los últimos años se ha evidenciado la dinámica temporal y espacial de distintas poblaciones celulares del sistema inmune durante la candidosis y se demostrado que es dependiente del tejido afectado (54). Por

lo que decidimos detectar fenotípicamente las poblaciones celulares del sistema inmune innato en órganos de diseminación en ratones neonatos y adultos con candidosis invasiva.

Observamos que en el riñón de los ratones neonatos infectados con ambos inóculos no hubo un aumento en el número de neutrófilos durante los días de infección, posiblemente debido a la escasa invasión fúngica previamente demostrada en el riñón de ratones neonatos (58). Lo anterior contrasta con el drástico incremento en el número de neutrófilos desde las primeras 24 hpi, el cual se mantuvo en aumento durante los días de infección en el riñón de ratones adultos infectados. En el hígado de ratones adultos infectados se observó un aumento moderado en el número de neutrófilos a las 24 hpi y se mantuvo constante hasta las 72 hpi. Mientras que el cerebro de ratones adultos con candidosis diseminada la acumulación de neutrófilos se observó hasta las 72 hpi y fue 10 veces menor en comparación al riñón de los ratones adultos infectados. Interesantemente, el cerebro de ratones neonatos infectados con el inóculo fatal de *C. albicans* exhibió un incremento en el número de neutrófilos a las 72 hpi, en comparación al cerebro de ratones recién nacidos infectados con el inóculo no fatal donde la presencia de neutrófilos fue mínima durante la infección. Se ha reportado que los neutrófilos son los principales leucocitos infiltrantes en tejidos infectados por *C. albicans* y son esenciales en las respuestas anti-*Candida* (43,44), sin embargo una acumulación masiva y persistente de los neutrófilos en el riñón de ratones adultos infectados con *C. albicans* contribuye a la destrucción del tejido y a la falla orgánica (54). Similar a lo observado en este estudio

empleando ratones adultos. Además, previamente se demostró que el cerebro de ratones neonatos infectados con el inóculo fatal fue uno de los tejidos con mayor invasión fúngica e infiltrado celular asociado a un proceso inflamatorio severo (58). Por lo que posiblemente la cantidad de neutrófilos infiltrantes en tejido tiene un papel importante en el control o progresión a la infección fúngica.

Distintas subpoblaciones de neutrófilos han sido descritas en humanos y ratones con efectos inflamatorios y microbicidas, como también con efectos inmunosupresores e incapaces de presentar efectos antimicrobianos (74,75). De la misma manera se han reportado subpoblaciones de neutrófilos en ratones infectados con distintas cepas de *C. albicans* y se ha demostrado que neutrófilos de ratones infectados con cepas no virulentas (incapaces de germinar) de *C. albicans* producen IL-12, mientras que neutrófilos de ratones infectados con cepas virulentas de *C. albicans* producen IL-10 (76,77). En este estudio observamos que en órganos mayormente susceptibles a la infección en ratones neonatos (cerebro) y adultos (riñón) hay una acumulación masiva de neutrófilos y la presencia de un perfil de citocinas hiper-inflamatorio acompañado de IL-10. Sin embargo, queda por elucidar la presencia de las distintas subpoblaciones de neutrófilos y el efecto de la presencia de IL-10 en el daño y susceptibilidad del tejido a la candidosis invasiva.

A diferencia de lo evidenciado en los órganos analizados en ratones adultos donde el neutrófilo es la estirpe celular con mayor predominio de todos los leucocitos analizados en este estudio. En el cerebro e hígado de ratones

recién nacidos infectados con el inóculo no fatal de *C. albicans* demostramos que los macrófagos son la población celular con mayor predominio durante la infección y la cantidad de células durante la infección es específica del órgano. La función de monocitos y macrófagos en la respuesta inmune anti-*Candida* ha sido demostrada *in vivo* e *in vitro*, estas células son fagocitos eficientes de la morfología de levaduras de *C. albicans*, evitando la germinación del hongo permitiendo un control a la invasión, así como también pueden eliminar a las levaduras durante las primeras horas de infección (78-81). Previamente demostramos que la morfología con mayor predominio en el cerebro e hígado de ratones neonatos infectados con el inóculo no fatal fue la forma de levadura, en contraste con el inóculo fatal donde las hifas y pseudohifas fueron las morfologías que predominaron (58). Sin embargo, queda por demostrar el papel de los macrófagos en cerebro e hígado de ratones recién nacidos infectados con el inóculo no fatal para controlar la invasión fúngica.

Estudios experimentales utilizando ratones adultos han demostrado que la presencia de macrófagos residentes de tejido antes de la infección con *C. albicans* y el reclutamiento de monocitos/macrófagos durante las primeras horas de infección es crucial para el control y resolución de la micosis (54,81). Además, se ha demostrado que macrófagos residentes de cerebro e hígado, específicamente, microglia y células de kupffer son fagocitos eficientes de *C. albicans* y evitan la transición morfológica del hongo (54,79,80,82). La actividad anti-*Candida* de los macrófagos depende principalmente de IFN $\gamma$  y la ausencia de esta citocina favorece a la

progresión de la invasión (83,84). La función de IFN $\gamma$  en los macrófagos es potenciar sus efectos microbicidas como es la fagocitosis y la producción de especies reactivas de oxígeno (84). Durante el periodo neonatal los macrófagos exhiben diferencias funcionales y fenotípicas distintas a su contraparte los macrófagos de adultos como por ejemplo una menor capacidad de fagocitosis y producción de intermediarios de oxígeno, así como una menor expresión de marcadores como MHC II, TLR-4, lo que se ha asociado a un mayor riesgo a infecciones microbianas al recién nacido (85,86). Además se ha demostrado que los macrófagos derivados de cordón umbilical son hiporeactivos a la activación por IFN $\gamma$ . Pero exhiben una expresión equivalente de receptores de IFN $\gamma$  y una capacidad similar para fagocitar y matar *C. albicans* (87,88). En este trabajo demostramos que los macrófagos fueron la estirpe celular con mayor predominio en cerebro e hígado de ratones neonatos infectados con el inóculo no fatal, además evidenciamos el incremento en la presencia de IFN $\gamma$  en estos tejidos.

Estas diferencias cuantitativas en la acumulación de neutrófilos y macrófagos, así como en la estirpe celular que predomina entre los distintos órganos de diseminación de *C. albicans* en ratones neonatos y adultos puede proporcionar información sobre la importancia de cada estirpe celular del sistema inmune innato en el control de la infección o en la progresión de un microambiente hiperinflamatorio que contribuye a la inmunopatología de la micosis de manera órgano-específica.

El inicio de una respuesta inmune contra *C. albicans* inicia mediante el reconocimiento de los componentes de la pared celular del hongo a través

de los PRRs, esta interacción antígeno-receptor desencadena una señalización intracelular que termina la producción de citocinas y activación de distintas estirpes celulares del sistema inmune innato (44,45). En este estudio evaluamos la presencia de TLR-2, TLR-4 y Dectin-1 en distintos órganos de diseminación durante la candidosis diseminada murina, observamos que Dectin-1 fue el receptor que se encontró en mayor presencia en la mayoría de los órganos de diseminación en ratones neonatos y adultos durante los días de infección. Se ha demostrado que Dectin-1 y Dectin-2 son los principales receptores de lectina tipo C involucrados en el reconocimiento de glucanos y mananos de *C. albicans* componentes de la pared celular del hongo en mayor abundancia (44). Dectin-1 reconoce a  $\beta$ -glucanos principalmente en la forma levaduriforme de *C. albicans* y esta interacción receptor-glucanos promueve un perfil de citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 (45). Adicionalmente, se ha demostrado que el reconocimiento de  $\beta$ -glucanos a través de Dectin-1 en piel y mucosas contribuye en el microambiente de un perfil de respuesta Th17 (53). En este estudio solo se evaluó la presencia de Dectin-1 en distintos órganos de diseminación durante la candidosis, queda por evaluar el papel de este receptor en órganos profundos durante la micosis, así como la búsqueda de otros receptores de lectina tipo C durante la candidosis neonatal.

A diferencia de lo observado con Dectin-1, la detección de los TLRs en órganos de diseminación evidenció diferencias dependiendo del tejido. Encontramos un incremento en la presencia de TLR-4 en hígado de ratones recién nacidos y adultos durante la infección, así como también en el cerebro

de ratones adultos infectados. Previamente se ha demostrado que TLR-4 reconoce a los mananos de la pared celular de *C. albicans* (44-46), además se ha evidenciado que TLR-4 reconoce únicamente la forma de levadura del hongo, y este reconocimiento favorece a la inducción de una respuesta de citocinas asociadas a una respuesta celular Th1 como es IL-12 e IFN $\gamma$  (45). En nuestro estudio observamos que los órganos de ratones neonatos y adultos con un incremento en la presencia de TLR-4 se asocian a un control de la invasión por *C. albicans*, además la forma levaduriforme del hongo era la que mayormente predominaba, e interesantemente en estos tejidos el perfil de citocinas encontrado fue TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IFN $\gamma$ . Sin embargo queda por demostrar si TLR-4 es crucial en dicho control de la invasión y en el perfil de citocinas asociado al control de la candidosis murina neonatal.

En contraste a TLR-4, el receptor TLR-2 fue encontrado en mayor abundancia en tejidos con una invasión masiva por estructuras filamentosas de *C. albicans* como fue el cerebro de ratones recién nacidos infectados con el inoculo fatal y el riñón de ratones adultos infectados. Se ha demostrado que TLR-2 reconoce a mananos y fosfolipomananos principalmente de la forma de pseudohifa e hifas de *C. albicans*, además en modelos experimentales utilizando animales adultos se ha evidenciado que TLR-2 favorece a la susceptibilidad de la candidosis diseminada. Ya que ratones deficientes de TLR-2 son resistentes a la micosis, además el reconocimiento de *C. albicans* a través de TLR-2 favorece a la inducción de una respuesta permisiva a la infección como es la producción de IL-10 y la ausencia de IFN $\gamma$  (89,90). Previamente demostramos que el cerebro de ratones neonatos infectados con el inoculo fatal y riñón de ratones adultos presentan un

incremento en la cantidad de IL-10, así como una susceptibilidad a la invasión fúngica. Sin embargo queda por demostrar si TLR-2 tiene un papel crucial en la susceptibilidad a la infección en el cerebro de ratones recién nacidos con candidosis.

Estos resultados demuestran una respuesta inmune innata diferencial que puede ser efectiva o inefectiva para el control de *C. albicans* dependiendo del órgano afectado en el mismo animal, además evidenciamos una cinética temporal y espacial de la respuesta inmune innata en distintos órganos de diseminación durante la candidosis. Estos hallazgos pueden ser importantes para el entendimiento de la patogénesis de *Candida* y además proveer información adicional para mejorar el pronóstico y tratamiento de la micosis de una manera órgano-específica.

## CAPÍTULO 6

### CONCLUSIONES

- El cerebro e hígado de ratones recién nacidos infectados con el inóculo no fatal y de ratones adultos exhibieron una moderada expresión y producción de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IFN $\gamma$ .
- El cerebro e hígado de ratones recién nacidos infectados con el inóculo fatal y el riñón de ratones adultos mostraron una sobre-expresión e hiper-producción de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6. Así como un incremento en la producción de IL-10.
- El cerebro e hígado de ratones recién nacidos infectados con el inóculo no fatal y de ratones adultos evidenciaron un incremento moderado en el número de macrófagos y neutrófilos, siendo los macrófagos la estirpe celular con mayor abundancia durante la infección.
- El cerebro e hígado de ratones recién nacidos infectados con el inóculo fatal y el riñón de ratones adultos presentaron un incremento masivo y progresivo de neutrófilos durante los días de infección.
- El cerebro de ratones recién nacidos infectados con el inóculo fatal evidenció un incremento en el número de macrófagos F4/80<sup>+</sup>, MHCII<sup>-</sup>.
- Dectin-1 fue el PRR con mayor abundancia en los órganos de diseminación durante la candidosis murina.
- TLR-4 se encontró aumentado en órganos resistentes a la invasión fúngica (hígado y cerebro) en ratones recién nacidos infectados con el inóculo no fatal y adultos.

- TLR-2 se observó con mayor presencia en órganos susceptibles a la invasión fúngica como el cerebro de ratones recién nacidos infectados con el inóculo fatal y el riñón de ratones adultos.

## CAPÍTULO 7

### PERSPECTIVAS

- Analizar los mecanismos de diseminación de *C. albicans* a cerebro e hígado de ratones recién nacidos durante la candidosis.
  
- Evaluar factores de virulencia de *C. albicans* en órganos de diseminación de ratones neonatos.
  
- Analizar el daño celular temprano y tardío en órganos de diseminación durante la candidosis.
  
- Evaluar la activación de macrófagos residentes de tejido en cerebro de ratones neonatos con candidosis diseminada.
  
- Evaluar el perfil de respuesta inmune que se mantiene en la etapa adulta de ratones neonatos infectados con el inóculo no fatal.

## CAPITULO 8

### BIBLIOGRAFÍA

1. Bonifaz, J. Alexandro. *Micología Médica Básica*. 4<sup>a</sup> cuarta edición. McGraw-Hill; 2012.
2. Noble SM, Gianetti BA, Witchley JN. *Candida albicans* cell-type switching and functional plasticity in the mammalian host. *Nat Rev Microbiol*. 2017 Feb;15(2):96–108.
3. Da Silva Dantas A, Lee KK, Raziunaite I, Schaefer K, Wagener J, Yadav B, et al. Cell biology of *Candida albicans*-host interactions. *Curr Opin Microbiol*. 2016 Dec;34:111–8.
4. Gow NAR, van de Veerdonk FL, Brown AJP, Netea MG. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol*. 2012 Feb;10(2):112–22.
5. Romani L, Bistoni F, Puccetti P. Adaptation of *Candida albicans* to the host environment: the role of morphogenesis in virulence and survival in mammalian hosts. *Curr Opin Microbiol*. 2003 Aug;6(4):338–43.
6. Schaller M, Borelli C, Korting HC, Hube B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses*. 2005 Nov;48(6):365–77.
7. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*. 2013 Feb 15;4(2):119–28.
8. Corzo-León DE, Armstrong-James D, Denning DW. Burden of serious fungal infections in Mexico. *Mycoses*. 2015 Oct 1;58:34–44.
9. Cassone A. Vulvovaginal *Candida albicans* infections: pathogenesis, immunity and vaccine prospects. *BJOG Int J Obstet Gynaecol*. 2015 May;122(6):785–94.
10. van de Veerdonk FL, Kullberg B-J, Netea MG. Pathogenesis of invasive candidiasis. *Curr Opin Crit Care*. 2010 Oct;16(5):453–9.

11. McCarty TP, Pappas PG. Invasive Candidiasis. *Infect Dis Clin North Am*. 2016 Mar;30(1):103–24.
12. Kullberg BJ, Arendrup MC. Invasive Candidiasis. *N Engl J Med*. 2015 Oct 8;373(15):1445–56.
13. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of Invasive Mycoses in North America. *Crit Rev Microbiol*. 2010 Feb 1;36(1):1–53.
14. Pemán J, Cantón E, Quindós G, Eraso E, Alcoba J, Guinea J, et al. Epidemiology, species distribution and in vitro antifungal susceptibility of fungaemia in a Spanish multicentre prospective survey. *J Antimicrob Chemother*. 2012 May 1;67(5):1181–7.
15. Arendrup MC, Bruun B, Christensen JJ, Fursted K, Johansen HK, Kjaeldgaard P, et al. National surveillance of fungemia in Denmark (2004 to 2009). *J Clin Microbiol*. 2011 Jan;49(1):325–34.
16. Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouér SA, Arthington-Skaggs B, da Matta DA, et al. Epidemiology of Candidemia in Brazil: a Nationwide Sentinel Surveillance of Candidemia in Eleven Medical Centers. *J Clin Microbiol*. 2006 Aug;44(8):2816–23.
17. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of Invasive Mycoses in North America. *Crit Rev Microbiol*. 2010 Feb 1;36(1):1–53.
18. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. *Clin Microbiol Rev*. 2007 Jan;20(1):133–63.
19. Kao AS, Brandt ME, Pruitt WR, Conn LA, Perkins BA, Stephens DS, et al. The epidemiology of candidemia in two United States cities: results of a population-based active surveillance. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 1999 Nov;29(5):1164–70.
20. Rodriguez D, Almirante B, Park BJ, Cuenca-Estrella M, Planes AM, Sanchez F, et al. Candidemia in neonatal intensive care units: Barcelona, Spain. *Pediatr Infect Dis J*. 2006 Mar;25(3):224–9.

21. Xia H, Wu H, Xia S, Zhu X, Chen C, Qiu G, et al. Invasive Candidiasis in preterm neonates in China: a retrospective study from 11 NICUS during 2009-2011. *Pediatr Infect Dis J*. 2014 Jan;33(1):106–9.
22. González GM, Elizondo M, Ayala J. Trends in Species Distribution and Susceptibility of Bloodstream Isolates of *Candida* Collected in Monterrey, Mexico, to Seven Antifungal Agents: Results of a 3-Year (2004 to 2007) Surveillance Study. *J Clin Microbiol*. 2008 Sep;46(9):2902–5.
23. Flores-Maldonado, O. E., Becerril-García, M. A., Treviño-Rangel, R. J., Rodríguez-Gámez, L. A. & González, G. M. Neonatal invasive candidiasis: A poorly understood entity. *Medicina Universitaria* 21, 19-25 (2019).
24. Benjamin DK, Stoll BJ, Fanaroff AA, McDonald SA, Oh W, Higgins RD, et al. Neonatal Candidiasis Among Extremely Low Birth Weight Infants: Risk Factors, Mortality Rates, and Neurodevelopmental Outcomes at 18 to 22 Months. *Pediatrics*. 2006 Jan 1;117(1):84–92.
25. Kelly MS, Benjamin DK, Smith PB. The epidemiology and diagnosis of invasive candidiasis among premature infants. *Clin Perinatol*. 2015 Mar;42(1):105–117.
26. Saiman L, Ludington E, Dawson JD, Patterson JE, Rangel-Frausto S, Wiblin RT, et al. Risk factors for *Candida* species colonization of neonatal intensive care unit patients. *Pediatr Infect Dis J*. 2001 Dec;20(12):1119–24.
27. Hocevar SN, Edwards JR, Horan TC, Morrell GC, Iwamoto M, Lessa FC. Device-Associated Infections among Neonatal Intensive Care Unit Patients: Incidence and Associated Pathogens Reported to the National Healthcare Safety Network, 2006–2008. *Infect Control Amp Hosp Epidemiol*. 2012 Dec;33(12):1200–6.
28. Basha S, Surendran N, Pichichero M. Immune responses in neonates. *Expert Rev Clin Immunol*. 2014 Sep;10(9):1171–84.
29. Adkins B, Leclerc C, Marshall-Clarke S. Neonatal adaptive immunity comes of age. *Nat Rev Immunol*. 2004 Jul;4(7):553–64.
30. Scharschmidt TC, Vasquez KS, Truong H-A, Gearty SV, Pauli ML, Nosbaum A, et al. A Wave of Regulatory T Cells into Neonatal Skin Mediates Tolerance to Commensal Microbes. *Immunity*. 2015 Nov 17;43(5):1011–21.

31. Tang H-J, Liu W-L, Lin H-L, Lai C-C. Clinical manifestations and prognostic factors of central line-associated candidemia. *Am J Infect Control*. 2014 Nov;42(11):1238–40.
32. Tragiannidis A, Tsoulas C, Groll AH. Invasive candidiasis and candidaemia in neonates and children: update on current guidelines. *Mycoses*. 2015 Enero;58(1):10–21.
33. Stoll BJ, Hansen NI, Adams-Chapman I, Fanaroff AA, Hintz SR, Vohr B, et al. Neurodevelopmental and Growth Impairment Among Extremely Low-Birth-Weight Infants With Neonatal Infection. *JAMA*. 2004 Nov 17;292(19):2357–65.
34. Zaoutis TE, Heydon K, Localio R, Walsh TJ, Feudtner C. Outcomes Attributable to Neonatal Candidiasis. *Clin Infect Dis*. 2007 May 1;44(9):1187–93.
35. Manzoni P, Farina D, Galletto P, Leonessa M, Priolo C, Arisio R, et al. Type and number of sites colonized by fungi and risk of progression to invasive fungal infection in preterm neonates in neonatal intensive care unit. *J Perinat Med*. 2007;35(3):220–6.
36. Saiman L, Ludington E, Dawson JD, Patterson JE, Rangel-Frausto S, Wiblin RT, et al. Risk factors for *Candida* species colonization of neonatal intensive care unit patients. *Pediatr Infect Dis J*. 2001 Dec;20(12):1119–24.
37. Evans NJ, Rutter N. Development of the epidermis in the newborn. *Biol Neonate*. 1986;49(2):74–80.
38. Neu J. Gastrointestinal development and meeting the nutritional needs of premature infants. *Am J Clin Nutr*. 2007 Feb;85(2):629S–634S.
39. Steinbach WJ, Roilides E, Berman D, Hoffman JA, Groll AH, Bin-Hussain I, et al. Results from a prospective, international, epidemiologic study of invasive candidiasis in children and neonates. *Pediatr Infect Dis J*. 2012 Dec;31(12):1252–7.
40. Tang H-J, Liu W-L, Lin H-L, Lai C-C. Clinical manifestations and prognostic factors of central line-associated candidemia. *Am J Infect Control*. 2014 Nov;42(11):1238–40.

43. Duggan S, Leonhardt I, Hünninger K, Kurzai O. Host response to *Candida albicans* bloodstream infection and sepsis. *Virulence*. 2015 May 19;6(4):316–26.
44. Netea MG, Joosten LAB, van der Meer JWM, Kullberg B-J, van de Veerdonk FL. Immune defence against *Candida* fungal infections. *Nat Rev Immunol*. 2015 Oct;15(10):630–42.
45. Netea MG, Brown GD, Kullberg BJ, Gow NAR. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nat Rev Microbiol*. 2008 Jan;6(1):67–78.
46. Graaf CAA van der, Netea MG, Verschueren I, Meer JWM van der, Kullberg BJ. Differential Cytokine Production and Toll-Like Receptor Signaling Pathways by *Candida albicans* Blastospores and Hyphae. *Infect Immun*. 2005 Nov 1;73(11):7458–64.
47. Cheng S-C, Joosten LAB, Kullberg B-J, Netea MG. Interplay between *Candida albicans* and the Mammalian Innate Host Defense. *Infect Immun*. 2012 Apr 1;80(4):1304–13.
48. Kullberg BJ, Netea MG, Vonk AG, van der Meer JW. Modulation of neutrophil function in host defense against disseminated *Candida albicans* infection in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1999 Dec;26(3-4):299-307.
49. Newman SL, Holly A. *Candida albicans* is phagocytosed, killed, and processed for antigen presentation by human dendritic cells. *Infect Immun*. 2001 Nov;69(11):6813-22.
50. Romani L. Immunity to *Candida albicans*: Th1, Th2 cells and beyond. *Curr Opin Microbiol*. 1999 Aug;2(4):363-7.
51. Richardson JP, Moyes DL. Adaptive immune responses to *Candida albicans* infection. *Virulence*. 2015;6(4):327-37.
52. Hernández-Santos N, Huppler AR, Peterson AC, Khader SA, McKenna KC, Gaffen SL. Th17 cells confer long-term adaptive immunity to oral mucosal *Candida albicans* infections. *Mucosal Immunol*. 2013 Sep;6(5):900-10.

53. Kashem SW, Kaplan DH. Skin Immunity to *Candida albicans*. *Trends Immunol.* 2016 Jul;37(7):440-450. doi: 10.1016/j.it.2016.04.007.
54. Murphy PM, Lim JK, Lee C-CR, Lionakis MS. Organ-Specific Innate Immune Responses in a Mouse Model of Invasive Candidiasis. *J Innate Immun.* 2011 Feb;3(2):180–99.
55. Spellberg B, Ibrahim AS, Edwards JE Jr, Filler SG. Mice with disseminated candidiasis die of progressive sepsis. *J Infect Dis.* 2005 Jul 15;192(2):336-43.
56. Destin KG, Linden JR, Laforce-Nesbitt SS, Bliss JM. Oxidative burst and phagocytosis of neonatal neutrophils confronting *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*. *Early Hum Dev.* 2009 Aug;85(8):531–5.
57. Payne MS, Kemp MW, Kallapur SG, Kannan PS, Saito M, Miura Y, et al. Intrauterine *Candida albicans* infection elicits severe inflammation in fetal sheep. *Pediatr Res.* 2014 Jun;75(6):716–22.
58. Flores-Maldonado OE. Establecimiento de un modelo murino de candidosis diseminada neonatal. Maestría thesis, Universidad Autónoma de Nuevo León. (2017),
59. Kienstra KA, Freysdottir D, Gonzales NM, Hirschi KK (2007) Murine neonatal intravascular injections: modeling newborn disease. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science.* JAALAS 46: 50–54.
60. Pope LM, Cole GT, Guentzel MN, Berry LJ. Systemic and gastrointestinal candidiasis of infant mice after intragastric challenge. *Infect Immun.* 1979 Aug;25(2):702–7.
61. Tsai NY, Laforce-Nesbitt SS, Tucker R, Bliss JM. A Murine Model for Disseminated Candidiasis in Neonates. *Pediatr Res.* 2011 Mar;69(3):189–93.
62. Vonk AG, Netea MG, van Krieken JH, Iwakura Y, van der Meer JWM, Kullberg BJ. Endogenous Interleukin (IL)–1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  Are Crucial for Host Defense against Disseminated Candidiasis. *The Journal of Infectious Diseases.* 2006;193(10):1419-26. doi: 10.1086/503363.
63. van Enckevort FH, Netea MG, Hermus AR, Sweep CG, Meis JF, Van der Meer JW, et al. Increased susceptibility to systemic candidiasis in interleukin-6

deficient mice. *Med Mycol.* 1999;37(6):419-26. Epub 2000/01/27. doi: 10.1046/j.1365-280x.1999.00247.x.

64. Netea MG, van Tits LJH, Curfs JHAJ, Amiot F, Meis JFGM, van der Meer JWM, et al. Increased Susceptibility of TNF- $\alpha$  Lymphotoxin- $\alpha$  Double Knockout Mice to Systemic Candidiasis Through Impaired Recruitment of Neutrophils and Phagocytosis of *Candida albicans*. *The Journal of Immunology.* 1999;163(3):1498-505.
65. Chin, V. K., Foong, K. J., Maha, A., Rusliza, B., Norhafizah, M., & Chong, P. P. (2014). Early expression of local cytokines during systemic *Candida albicans* infection in a murine intravenous challenge model. *Biomedical reports*, 2(6), 869–874. <https://doi.org/10.3892/br.2014.365>
66. Zhang J-M, Baccei ML. Chapter 2 - PATHOPHYSIOLOGY OF PAIN. In: Smith HS, editor. *Current Therapy in Pain*. Philadelphia: W.B. Saunders; 2009. p. 4-8.
67. Schulte W, Bernhagen J, Bucala R. Cytokines in Sepsis: Potent Immunoregulators and Potential Therapeutic Targets—An Updated View. *Mediators of Inflammation.* 2013;2013:165974. doi: 10.1155/2013/165974.
68. Wilson CB, Westall J, Johnston L, Lewis DB, Dower SK, Alpert AR. Decreased production of interferon-gamma by human neonatal cells. Intrinsic and regulatory deficiencies. *The Journal of Clinical Investigation.* 1986;77(3):860-7. doi: 10.1172/JCI112383.
69. Adkins B. Development of Neonatal Th1/Th2 Function. *International Reviews of Immunology.* 2000;19(2-3):157-71. doi: 10.3109/08830180009088503.
70. Sarzotti M, Robbins DS, Hoffman PM. Induction of protective CTL responses in newborn mice by a murine retrovirus. *Science.* 1996;271(5256):1726-8. Epub 1996/03/22. doi: 10.1126/science.271.5256.1726.
71. Roilides E, Anastasiou-Katsiardani A, Dimitriadou-Georgiadou A, Kadiltsoglou I, Tsaparidou S, Panteliadis C, et al. Suppressive Effects of Interleukin-10 on Human Mononuclear Phagocyte Function against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Infectious Diseases.* 1998;178(6):1734-42. doi: 10.1086/314479.

72. Vazquez-Torres A, Jones-Carson J, Wagner RD, Warner T, Balish E. Early resistance of interleukin-10 knockout mice to acute systemic candidiasis. *Infect Immun*. 1999;67(2):670-4. doi: 10.1128/IAI.67.2.670-674.1999.
73. Zhao J, Kim KD, Yang X, Auh S, Fu YX, Tang H. Hyper innate responses in neonates lead to increased morbidity and mortality after infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 May 27;105(21):7528-33.
74. Tsuda Y, Takahashi H, Kobayashi M, Hanafusa T, Herndon DN, Suzuki F. Three different neutrophil subsets exhibited in mice with different susceptibilities to infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Immunity*. 2004;21:215–226.
75. Mencacci A, Montagnoli C, Bacci A, Cenci E, Pitzurra L, Spreca A, et al. CD80+Gr-1+ myeloid cells inhibit development of antifungal Th1 immunity in mice with candidiasis. *J Immunol*. 2002;169:3180–3190.
76. Romani L, Mencacci A, Cenci E, Del Sero G, Bistoni F, Puccetti P. An immunoregulatory role for neutrophils in CD4+ T helper subset selection in mice with candidiasis. *J Immunol*. 1997;158:2356–2362.
77. Romani L, Mencacci A, Cenci E, Spaccapelo R, Del Sero G, Nicoletti I, et al. Neutrophil production of IL-12 and IL-10 in candidiasis and efficacy of IL-12 therapy in neutropenic mice.
78. Schuit KE. Phagocytosis and intracellular killing of pathogenic yeasts by human monocytes and neutrophils. *Infect Immun*. 1979;24:932–938.
79. Serbina NV, Jia T, Hohl TM, Pamer EG. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:421–452.
80. Getts DR, Terry RL, Getts MT, Müller M, Rana S, Shrestha B, et al. Ly6c+ ‘inflammatory monocytes’ are microglial precursors recruited in a pathogenic manner in West Nile virus encephalitis. *J Exp Med*. 2008;205:2319–2337.
81. Ngo LY, Kasahara S, Kumasaka DK, Knoblaugh SE, Jhingran A, Hohl TM. Inflammatory monocytes mediate early and organ-specific innate defense during systemic candidiasis. *J Infect Dis*. 2014;209(1):109-119. doi:10.1093/infdis/jit41

82. Redmond HP, Shou J, Gallagher HJ, Kelly CJ, Daly JM. Macrophage-dependent candidacidal mechanisms in the murine system. Comparison of murine Kupffer cell and peritoneal macrophage candidacidal mechanisms.
83. Maródi L, Johnston RB Jr. Enhancement of macrophage candidacidal activity by interferon-gamma. *Immunodeficiency*. 1993;4(1-4):181-5. PMID: 8167696.
84. Gozalbo D, Maneu V, Gil ML. Role of IFN-gamma in immune responses to *Candida albicans* infections. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2014 Jun 1;19:1279-90. doi: 10.2741/4281. PMID: 24896350.
85. Strunk T, Currie A, Richmond P, Simmer K, Burgner D. Innate immunity in human newborn infants: prematurity means more than immaturity. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2011 Jan;24(1):25-31
86. Basha S, Surendran N, Pichichero M. Immune responses in neonates. *Expert Rev Clin Immunol*. 2014;10(9):1171-1184. doi:10.1586/1744666X.2014.942288
87. Maródi L, Káposzta R, Campbell DE, Polin RA, Csongor J, Johnston RB Jr. Candidacidal mechanisms in the human neonate. Impaired IFN-gamma activation of macrophages in newborn infants. *J Immunol*. 1994 Dec 15;153(12):5643-9. PMID: 7989763.
88. Dreschers S, Saupp P, Hornef M, Prehn A, Platen C, Morschhäuser J, Orlikowsky TW. Reduced PICD in Monocytes Mounts Altered Neonate Immune Response to *Candida albicans*. *PLoS One*. 2016 Nov 21;11(11):e0166648.
89. Netea MG, Suttmuller R, Hermann C, Van der Graaf CA, Van der Meer JW, van Krieken JH, Hartung T, Adema G, Kullberg BJ. Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. *J Immunol*. 2004 Mar 15;172(6):3712-8.
90. van der Graaf CA, Netea MG, Verschueren I, van der Meer JW, Kullberg BJ. Differential cytokine production and Toll-like receptor signaling pathways by *Candida albicans* blastoconidia and hyphae. *Infect Immun*. 2005 Nov;73(11):7458-64.