

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

Facultad de Ciencias Químicas - Departamento de Bioquímica Clínica
Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología CIBICI-
CONICET-UNC

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

“Contribución de la Activación del
Receptor Dectin-1 en la Inmunidad Innata
frente a *Candida albicans*, en Sistema
Nervioso Central”.

Lic. en Biología Molecular
CECILIA VIGEZZI

Directora de Tesis: Dra. Claudia Elena Sotomayor

Córdoba, Argentina
-2019-

Comisión evaluadora:

Dra. Liliana Cancela

Dr. Fabio Cerbán

Dra. Laura Chiapello

El presente trabajo de tesis fue realizado gracias al apoyo económico del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT-FONCyT), y la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (Secyt-UNC).

RESUMEN

Contribución de la Activación del Receptor Dectin-1 en la Inmunidad Innata frente a *Candida albicans*, en Sistema Nervioso Central.

La candidiasis invasiva es una infección importante por hongos asociada a la atención médica. Es ampliamente reconocida como una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el entorno sanitario, representando un gran impacto socio-económico en la salud pública. Puede ser causada por varias especies de levaduras del género *Candida*, siendo *Candida albicans* la especie más común. La diseminación hematológica de este hongo es un elevado factor de riesgo para el desarrollo de neurocandidiasis, una complicación grave potencialmente mortal. Pese a los grandes avances en las investigaciones sobre las micosis humanas, el conocimiento en la patogénesis de las infecciones fúngicas en SNC es muy limitado. Es ampliamente conocido que el reconocimiento de microorganismos por parte de las células inmunes innatas es un evento crucial para la defensa frente a patógenos fúngicos. Sin embargo, las interacciones entre el hongo y las células residentes de cerebro, así como los mecanismos inflamatorios e inmunomoduladores inducidos durante la infección cerebral, no se comprenden en su totalidad. En este escenario, el rol del receptor Dectin-1 y su interacción con los β -glucanos presentes en la pared *C. albicans* en el desarrollo de la respuesta inmune innata en cerebro, permanecen sin dilucidar.

En este trabajo de tesis caracterizamos la infección sistémica por *C. albicans* y evaluamos la respuesta inmune innata desarrollada en el microambiente local del SNC y el desarrollo de procesos neurodegenerativos asociados a la presencia del hongo. Estudiamos además, la participación de Dectin-1 en estos procesos, utilizando un modelo de infección con una cepa defectiva en la producción de β -glucanos o animales deficientes en ese receptor.

Nuestros resultados demuestran que la rápida colonización cerebral de *C. albicans* se correlaciona con la activación de células gliales y la secreción de citoquinas proinflamatorias. Mientras que en este órgano es posible el control de la infección, el clearance en riñón no puede lograrse, provocando el deterioro en la salud del animal y la mortalidad observada. En ausencia total o parcial de la

vía de señalización de Dectin-1, la infección sistémica es más severa, siendo la carga fúngica renal y la mortalidad significativamente mayores. La rápida respuesta inflamatoria en cerebro de estos animales, podría ser la causa del mayor control fúngico del hongo al comienzo de la infección, mientras que el deterioro neurológico y la mayor neurodegeneración observada en ausencia de Dectin-1, estaría asociado a la incapacidad de eliminar a *C. albicans* de cerebro y a la disfuncionalidad de las células inmunes innatas.

ABSTRACT

Contribution of Receptor Dectin-1 Activation in Innate Immunity response against *Candida albicans*, in the Central Nervous System.

Invasive candidiasis is an important health-care-associated fungal infection. It is widely recognized as a major cause of morbidity and mortality in hospitalized patients, representing a high socio-economic impact on public health. It can be caused by several *Candida* spp, being *Candida albicans* the most common species. Its bloodstream dissemination is a high risk factor for the development of neurocandidiasis, a serious life-threatening complication. Despite the great advances in research on human mycoses, the knowledge on the pathogenesis of fungal infections in the CNS is very limited.

The recognition of microorganisms by innate immune cells is a crucial event for the defense against fungal pathogens. However, the interaction between the fungus and immune cells in brain, as well as the inflammatory and immunomodulatory mechanisms induced during CNS infection, are not fully understood. In this context, the role of Dectin-1 in the development of the local immune response after the recognition of β -glucans present in the wall of *C. albicans*, remains unclear.

In this study, we characterized the systemic infection by *C. albicans* and evaluated the innate immune response developed in the local microenvironment of the CNS and the progress of the neurodegenerative processes associated with the fungus presence, in a model of systemic candidiasis. We also studied the participation of Dectin-1 in these processes, using an infection model with a defective strain in β -glucans production or knockout animals in this receptor.

Our results show a rapid cerebral colonization of *C. albicans*, which correlates with the activation of glial cells and proinflammatory cytokines secretion. While in this organ it is possible to control the infection, clearance in the kidney cannot be achieved, and may be associated with the deterioration in health and the mortality observed. In total or partial absence of Dectin-1 signaling pathway, the systemic infection is more severe, with renal load and mortality being more important. The rapid inflammatory response in the brain of these animals, would explain the

greater fungal control observed of the fungus at the beginning of the infection, while the neurological deterioration and the greater neurodegeneration observed in the absence of Dectin-1, could be associated with the inability to eliminate *C. albicans* of the brain and the dysfunction of the innate immune cells.

INDICE

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	3
Infecciones fúngicas	4
<i>Candida albicans</i>	5
Características generales	5
Factores de virulencia	5
Composición de la pared celular de <i>C. albicans</i>	7
β -glucanos: componente principal de la pared fúngica	9
Candidiasis invasiva	11
Epidemiología	11
Factores de Predisponentes	13
Candidiasis cerebral.....	14
Mecanismos de Tráfico al Cerebro de <i>Candida albicans</i>	16
Inmunidad innata frente a <i>C. albicans</i>	17
Receptores innatos y activación de la respuesta inmune.....	18
Dectin-1	21
Respuesta inmune en Sistema Nervioso Central	24
Microglía.....	25
Astrocitos	28
OBJETIVOS	30
Objetivo General	31
Objetivos Específicos.....	31
MATERIALES Y MÉTODOS	32
Modelo Experimental	33
Animales	33
<i>Candida albicans</i>	33
Condiciones de crecimiento de <i>C. albicans</i>	34
Modelo Murino de Candidiasis Cerebral	34
Infección sistémica.....	34
Obtención de muestras	35
Recuento de Unidades Formadoras de Colonias	36
Estudios Histopatológicos.....	37
Determinación de Parámetros Moleculares	38
Enzimoimmunoensayo (ELISA)	38
Biología Molecular.....	39
Obtención de muestras.....	39
Extracción de ARN	39
Tratamiento con ADNasa y Retrotranscripción (RT)	40

Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qPCR).....	40
Análisis para la cuantificación relativa de genes	41
Técnicas de Inmunomarcación	42
Fijación <i>in vivo</i> por perfusión y obtención de muestras	42
Estudio de la Activación de Células Gliales	44
Microgliosis y Astrogliosis	44
- Inmunofluorescencia en portaobjetos	44
- Inmunofluorescencia en secciones de tejido libre flotante (<i>free floating</i>)	45
- Inmunohistoquímica en secciones de tejido libre flotante (<i>free floating</i>)	45
Expresión de Arginasa-1 y NOS2	46
Estudio de la Degeneración y Muerte Neuronal	47
- Tinción A-Cu-Ag.....	47
- Tinción Fluoro-Jade B (FJB).....	47
- Inmunohistoquímica: detección de apoptosis <i>in situ</i>	48
Análisis Estadístico	49
RESULTADOS.....	50
CAPÍTULO 1	51
Infección sistémica por <i>C. albicans</i> y colonización renal	52
Manifestaciones clínicas y sobrevida.....	52
Invasión renal y características histopatológicas.....	55
Colonización del Sistema Nervioso Central por <i>C. albicans</i>.....	58
Invasión cerebral.....	58
Hallazgos histopatológicos	60
Mediadores inmunes en el microambiente cerebral	64
Activación de células gliales.....	66
Conclusiones capítulo 1	71
CAPÍTULO 2	73
PARTE I	76
Infección sistémica por <i>C. albicans</i> FKS645 y colonización renal	76
Manifestaciones clínicas y sobrevida.....	77
Invasión renal y características histopatológicas.....	79
Colonización del Sistema Nervioso Central por <i>C. albicans</i> FKS645.....	83
Invasión cerebral.....	83
Hallazgos histopatológicos	85
Mediadores inmunes en el microambiente cerebral	86
Activación de células gliales frente a <i>C.albicans</i> FKS645	90
Conclusiones capítulo 2. Parte I	97
PARTE II.....	99

Infección sistémica por <i>C. albicans</i> SC5314 en ratones Dectin-1 KO	99
Manifestaciones clínicas y sobrevida.....	100
Invasión renal y características clínicas e histopatológicas.....	103
Colonización del SNC por <i>C. albicans</i> en ratones Dectin-1 KO	106
Invasión cerebral.....	106
Hallazgos histopatológicos en cerebro	107
Mediadores inmunes en el microambiente cerebral	109
Activación de células gliales	115
Conclusiones capítulo 2. Parte II	122
CAPÍTULO 3.....	124
Activación de Células Gliales.....	127
Infección sistémica en ratones WT con <i>C. albicans</i> SC5314	127
Infección sistémica en ratones Dectin-1 KO con <i>C. albicans</i> SC5314	130
Neurodegeneración.....	133
Neurodegeneración en ratones WT infectados con <i>C. albicans</i> SC5314	135
Neurodegeneración en ratones Dectin-1 KO infectados con <i>C. albicans</i> SC5314	140
Expresión de Arginasa-1/NOS2 en ratones WT vs Dectin-1 KO infectados con <i>C. albicans</i> SC5314	147
Conclusiones capítulo 3	150
DISCUSIÓN	151
Infección sistémica	152
Candidiasis invasiva.....	154
Modelo murino candidiasis diseminada	156
Reconocimiento inmune de <i>C. albicans</i> . Contribución de la interacción β -glucanos/Dectin-1 en la respuesta periférica.	160
<i>C. albicans</i> en SNC.....	170
Reconocimiento y respuesta inmune local frente a <i>C. albicans</i>	173
Reconocimiento inmune de <i>C. albicans</i> . Contribución de la interacción β -glucanos/Dectin-1 en la respuesta cerebral.	176
BIBLIOGRAFÍA	185

ABREVIATURAS

ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ADNc:	Ácido desoxirribonucleico complementario
Als:	Aglutininas fúngicas (del inglés: <i>Agglutinin-Like Sequence</i>)
Arg-1:	Arginasa-1
ARN:	Ácido ribonucleico
ARNm:	Ácido ribonucleico mensajero
ASG:	Agar Sabouraud Glucosado
Bcl10:	del inglés <i>B-cell lymphoma/leukemia 10</i>
BHE:	Barrera hematoencefálica
CARD9:	del inglés <i>Caspase Recruitment Domain Family, member 9</i>
CIM:	Concentración Inhibitoria Mínima
CLR:	Receptor de Lectinas Tipo C (del inglés: <i>C-Type Lectin Receptor</i>)
CMC:	Candidiasis Mucocutánea
DAMP:	del inglés <i>Damage-Associated Molecular Pattern</i>
DC:	Célula Dendrítica
EDTA:	Ácido etildiaminotetraacético
EGC:	Enfermedad Granulomatosa Crónica
ELISA:	Enzimoimmunoanálisis (del inglés: <i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i>)
GFAP:	del inglés <i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>
GS:	1,3-β-D Glucan Sintasa
HBMEC:	Células endoteliales microvasculares de cerebro humano
HE:	Hematoxilina-Eosina
Hwp1:	del inglés <i>Hyphal wall protein 1</i>
IFN-γ:	Interferón-gamma
IHQ:	Inmunohistoquímica
IL-:	Interleuquina
ITAM:	del inglés <i>Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif</i>
iv:	Intravenoso
KO:	del inglés <i>knock-out</i>
Lip:	Lipasa
LPS:	Lipopolisacárido
MALT1:	del inglés <i>Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1</i>
MR:	del inglés <i>Mannose Receptor</i>

MyD88: Factor de Diferenciación Mieloide 88 (del inglés *Myeloid Differentiation factor 88*)

NADPH: del inglés *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*

NETs: Trampas extracelulares de neutrófilos (del inglés *Neutrophil Extracellular Tramps*)

NF- κ B: Factor nuclear kappa B (del inglés: *Nuclear factor κ B*)

NK: Células *Natural Killer*

NLR: Receptor tipo NOD (del inglés *NOD-like Receptor*)

NLRP3: del inglés *Nucleotide oligomerization domain like receptor family, pyrin domain containing 3*

NO: Óxido Nítrico (del inglés: *Nitric Oxide*)

NOS: Óxido Nítrico Sintasa (del inglés: *Nitric Oxide Synthase*)

ON: Toda la noche (del inglés *over night*)

PAMP: del inglés *Pathogen Associated Molecular Patterns*

PAS: del inglés *Periodic Acid-Schiff*

PBS: Buffer fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PFA: Paraformaldehido

pi: Post-infección

PLP: del inglés *phospholipase*

PMN: Polimorfonucleares

PRR: del inglés *Pattern Recognition Receptor*

RLR: Receptor tipo RIG-1 (del inglés *RIG-1-like Receptor*)

ROS: Especies Reactivas del Oxígeno (del inglés: *Reactive Oxygen Species*)

RT: Transcripción Reversa

Sap: Aspartato proteinasa (del inglés *secreted aspartyl proteinases*)

SEM: Error estándar de la media

SN: Sobrenadante

SNC: Sistema Nervioso Central

SR: del inglés *Scavengers Receptors*

Syk: Tirosin Kinasa de Bazo (del inglés *Spleen tyrosine Kinase*)

TA: Temperatura ambiente

TGF β : del inglés *Transforming Growth Factor β*

TGI: tracto gastrointestinal

TLR: Receptor Tipo Toll (del inglés *Toll Like Receptor*)

TNF: Factor de necrosis tumoral alfa (del inglés *tumor necrosis factor alpha*)

UCI: Unidad de Cuidados Intensivos

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

WT: del inglés *Wild Type*

INTRODUCCIÓN

*“Nada en la vida debe ser temido, solamente comprendido.
Ahora es el momento de comprender más, para temer menos”*
Marie Curie

Infecciones fúngicas

Los hongos patógenos afectan a millones de personas anualmente, pudiendo provocar desde una colonización superficial de la piel o mucosas hasta infecciones severas de tejidos profundos. La mayor parte de estos hongos son microorganismos oportunistas, por lo que generalmente no causan enfermedad en individuos sanos. Sin embargo, frente a un desbalance en la homeostasis inmune, pueden volverse patogénicos e infectar al huésped (1,2).

Las infecciones fúngicas sistémicas se asocian a elevadas tasas de mortalidad. Si bien la epidemiología no se conoce con exactitud debido a la falta de protocolos de registro y seguimiento de pacientes a nivel mundial, estudios actuales estiman que provocan más de un millón y medio de muertes por año, similar a los valores hallados para malaria y tuberculosis (1–3).

En las últimas décadas, la frecuencia de infecciones fúngicas nosocomiales (asociadas a la atención médica) ha aumentado drásticamente, debido a las intervenciones médicas modernas, al surgimiento de cepas resistentes a los antifúngicos actuales y al aumento de la población en riesgo por inmunosupresión inducida por enfermedades o fármacos, o por mutaciones génicas naturales (2,4,5).

Debido a la creciente incidencia de esta patología y al cambio epidemiológico observado en los últimos años, es evidente la necesidad de un conocimiento más profundo de los patógenos fúngicos y su interacción con el sistema inmune del huésped en la interface comensal-patógeno, a fin de mejorar los métodos diagnósticos y los tratamientos frente a cada hongo en particular.

En este trabajo se estudian aspectos de la infección sistémica por *Candida albicans*, la respuesta inmune innata desarrollada en cerebro frente a la invasión y la contribución que la señal mediada por el reconocimiento inmune de los β -glucanos de la pared del hongo por el receptor Dectin-1, en la patogenia de la forma sistémica y cerebral de la micosis.

Candida albicans

Características generales

C. albicans es un hongo eucariota diploide, que reside en la piel y mucosas de entre el 30 y 70% de los individuos sanos (6,7). Como comensal, normalmente coloniza la mucosa intestinal, oral, vaginal y piel de manera asintomática, manteniéndose bajo control gracias a los mecanismos inmunes innatos y adaptativos del huésped, y al microbioma bacteriano de la flora normal, que regulan su crecimiento (6,8). Sin embargo, cuando el sistema inmunológico se encuentra debilitado o frente a una disbiosis microbiana, *C. albicans* puede comportarse como patógeno oportunista e infectar un amplio espectro de órganos y tejidos (7,9–11).

Las infecciones por este hongo se clasifican en candidiasis mucocutáneas (CMC) o invasivas. La primera puede presentarse como una colonización orofaríngea, también conocida como candidiasis bucal, o como infecciones en la superficie de la piel, uñas, esófago o mucosa vulvovaginal. Por otro lado, la candidiasis invasiva se caracteriza por la diseminación a través del torrente sanguíneo (candidemia) y por la infección de órganos profundos normalmente estériles, como hígado, bazo, riñón, corazón y cerebro (8,12).

Factores de virulencia

Hace décadas se pensaba que las levaduras participaban de forma pasiva en la patogénesis de dichas infecciones, por lo que la inmunocompetencia del huésped se consideraba la única responsable del desarrollo de las infecciones oportunistas. En la actualidad este concepto ha cambiado, y hoy se sabe que estos microorganismos participan activamente en la fisiopatología del proceso infeccioso, a través de la producción de factores de virulencia y diversas estrategias de evasión (13–15).

Los factores de virulencia le permiten al hongo infectar diversos nichos en el huésped, pudiendo adaptarse a señales ambientales (pH, temperatura, hipoxia, hormonas, presiones parciales elevadas de dióxido de carbono, limitación de nutrientes y de suero), señales de estrés (estrés oxidativo, nitrosativo y osmótico)

y señales provenientes de otros microorganismos residentes (7). Algunas de estas moléculas le permiten al hongo evadir o inhibir la respuesta inmune del huésped, prolongando su supervivencia (10,16,17).

C. albicans expresa una amplia gama de factores de virulencia, tales como la transición morfológica entre levadura e hifa (18), la expresión de adhesinas e invasinas en la superficie celular (19,20), la formación de biofilms (21), el tigmotropismo (crecimiento direccional) (22), y la secreción de enzimas hidrolíticas (23). Además, poseen capacidades físicas que incluyen una rápida adaptación a las fluctuaciones del pH ambiental (24), la flexibilidad y adaptación metabólica (25), los potentes sistemas de adquisición de nutrientes (26) y los mecanismos robustos de respuesta al estrés (27) (Figura 1).

La transición entre levadura e hifa se denomina dimorfismo y se considera uno de los factores de virulencia más importantes para la patogenicidad de *C. albicans*. Este mecanismo estrictamente regulado a nivel génico, posee importantes funciones relacionadas a la transformación del microorganismo de comensal a patógeno. Los estados morfológicos intermedios participan en diferentes etapas de la interacción con su hospedador: la faz levaduriforme, al ser la más pequeña, está involucrada principalmente en la colonización de las superficies mucosas y la diseminación hematógena, la emisión de la pseudohifa se relaciona a la penetración de los tejidos, y la faz hifal a la invasión y daño tisular. Además, los complejos eventos moleculares que acompañan a los cambios fenotípicos del hongo (activación de Egf1 y Bcr1), dan inicio a la expresión o aumento de la transcripción de genes relevantes, que codifican entre otros, para las adhesinas fúngicas (Als3, Hwp1), invasinas (Als3 y Ssa1), producción de enzimas hidrolíticas (lipasas y, proteinasas, fosfatasas) y genes que participan en la formación de biofilm (14–16,28,29). La plasticidad de este hongo también involucra su habilidad de regular su perfil metabólico y la producción de sus factores de virulencia de acuerdo a la disponibilidad de nutrientes requeridos para garantizar su supervivencia y las características del nicho biológico que coloniza. Este concepto evidencia la necesidad de establecer su comportamiento en cada sitio particular susceptible de ser infectado, la respuesta tisular y el impacto de estos procesos en la fisiología del órgano (16,28).



Figura 1. Factores de Virulencia de *Candida albicans*. Principales factores de virulencia de *C. albicans* en humanos [Adaptado de Da Silva Dantas, 2016 (6)].

Composición de la pared celular de *C. albicans*

La pared celular fúngica es una estructura mecánicamente robusta, que contribuye a la estabilidad morfológica y le permite al hongo mantener su integridad celular. Al mismo tiempo, su composición es dinámica y se encuentra altamente regulada por las condiciones ambientales a las que se somete en los diferentes nichos que coloniza (28,30). Participa activamente en los procesos de

adhesión y se la asocia a muchos de los factores de virulencia descritos anteriormente, resultando esencial para la sobrevivencia y patogénesis (16,31,32).

La pared celular de *C. albicans* está compuesta principalmente por polisacáridos, que se disponen en una capa estructural interna constituida por quitina (5%), β -1,3-glucanos (40%) y β -1,6-glucanos (20%), que actúan como andamio molecular, soportando proteínas, lípidos y componentes superficiales. La capa externa está compuesta principalmente por proteínas altamente glicosiladas por polisacáridos de manosa, llamadas mananoproteínas, invasinas, adhesinas y glicosilfosfatidilinositol (*glycosyl phosphatidyl inositol*, GPI), y se la relaciona con la patogenicidad, adherencia y fagocitosis (17,33,34) (Figura 2).

En general, estos componentes son necesarios para la sobrevivencia de la mayoría de las especies de hongos, por lo que han sido conservados a lo largo de la evolución (35). En su conjunto, estas moléculas se denominan patrones moleculares asociados a patógenos o PAMPs (por sus siglas en inglés *Pathogen Associated Molecular Patterns*) y pueden encontrarse en una gran variedad de microorganismos no relacionados.

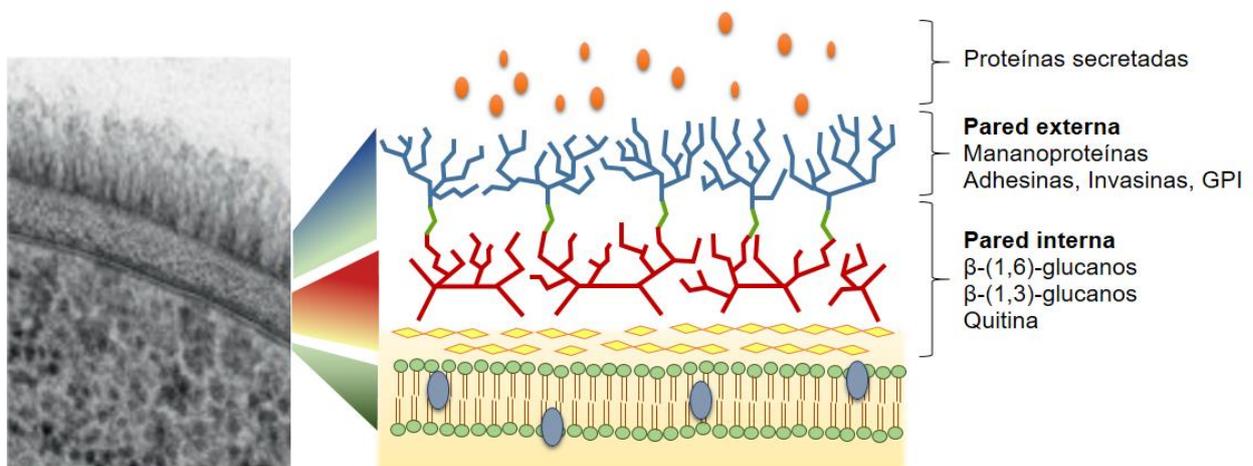


Figura 2. Estructura de la pared celular de *C. albicans*. Principales componentes de la pared celular de *C. albicans* y su distribución. En la capa interna se localizan los principales componentes estructurales, mientras que la capa externa se conforma por moléculas involucradas en la patogenia y virulencia fúngica. Las ramificaciones de β -1,6-glucano flexibles permiten el entrecruzamiento de ambas capas [Adaptado de Gow NA, 2011(36)].

Los PAMPs actúan como ligandos de un conjunto de receptores inmunes innatos, agrupados bajo la denominación de receptores de reconocimiento de

patrones o PRRs (por sus siglas en inglés *Pattern Recognition Receptors*) (37). Esta interacción desencadena una respuesta inmune rápida, que va a depender del conjunto de PRRs activados, lo cual a su vez está definido por los PAPMs fúngicos expuestos, el microambiente donde ocurre el reconocimiento y las células inmunes innatas involucradas (38). Sin embargo, los hongos han desarrollado estrategias para evitar el reconocimiento por parte de las células inmunes, modulando la cantidad de ciertos componentes de la pared celular o la accesibilidad de ellos en la superficie de la célula fúngica.

β -glucanos: componente principal de la pared fúngica

Los β -glucanos son los componentes mayoritarios de la pared celular, sintetizados por el complejo enzimático 1,3- β -D Glucan Sintasa (GS), el cual está conformado por al menos dos componentes, Fksp y Rho1p. La subunidad Rho1p corresponde a un elemento regulatorio relacionado a una gran cantidad de procesos celulares, mientras que la subunidad Fksp contiene el sitio activo de biosíntesis, que cataliza la transferencia de azúcares de moléculas donantes activadas (Glucosa UDP) a moléculas aceptoras específicas (1,3- β -D-glucosil(N)) formando enlaces glucosídicos (39,40).

La subunidad Fksp es codificada por tres genes relacionados, FKS1, FKS2 y FKS3, donde el primero se considera esencial en la mayoría de las especies de *Candida*. FKS2 se expresa cuando FKS1 es deletado o bajo condiciones de estrés, como ausencia de glucosa o altas temperaturas. Los niveles de expresión de FKS3 son bajos en comparación con los otros genes, y no parecen contribuir significativamente en la síntesis de β -glucanos (39).

Dentro del gen FKS1 existen dos regiones altamente conservadas, denominadas *hot-spots*, en las cuales se han encontrado altas tasas de mutaciones. El *hot-spot 1* codifica para 9 aminoácidos desde las posiciones 641 a 649, mientras que el *hot-spot 2*, codifica para 8 aminoácidos, desde el 1357 al 1364. Las sustituciones en Ser645 y Phe641 son las mutaciones más abundantes encontradas en cepas clínicas, y se asocian a alteraciones en la proporción de β -glucanos y cambios en la virulencia con respecto a las cepas parentales (40). Además, se han relacionado con el desarrollo de resistencia al

tratamiento con antifúngicos de la familia de las equinocandinas, cuyo mecanismo de acción es la inhibición de la GS, siendo responsable de una elevada frecuencia de la falla terapéutica (39–41).

El reconocimiento de los β -glucanos por el receptor Dectin-1, es necesario para el desarrollo de una respuesta inmune antifúngica efectiva (42,43). Por este motivo, el enmascaramiento o la menor expresión de estos polisacáridos se considera una estrategia de evasión fúngica, ya que previene una interacción patógeno-huésped eficiente y la activación de los mecanismos de respuesta protectores (44). Además, se ha reportado que la expresión de los β -glucanos difiere según la morfología, encontrándose estructuras cíclicas en las hifas y formas lineales en las levaduras (7), lo que sugiere un reconocimiento diferencial asociado al estado patogénico o comensal del hongo. Asimismo, la organización tridimensional que presenten estos polisacáridos, también va a condicionar la respuesta inmune generada. En este sentido, se ha observado que tanto los β -glucanos solubles como particulados pueden ser reconocidos por Dectin-1 (45), aunque la activación de la cascada de señalización solo ocurre en presencia del polisacárido en forma de partículas (46). Esto sugiere un mecanismo de regulación mediante el cual los receptores inmunes innatos podrían distinguir entre el contacto directo con un patógeno y la detección de partículas microbianas modulando las respuestas según el entorno particular.

Por otro lado, los β -glucanos son considerados potentes inmunomoduladores, pudiendo dirigir las respuestas inmunes del huésped, de acuerdo al microambiente y a las células involucradas durante el reconocimiento. Se ha demostrado que la interacción ligando-receptor en macrófagos (47,48) y células dendríticas (DCs) (49,50) es importante para el desarrollo de una respuesta inmune efectiva, que involucra la secreción de citoquinas proinflamatorias y la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*); sin embargo, estudios *in vitro* realizados sobre microglía de retina murina, indican que el reconocimiento de β -glucanos particulados por Dectin-1 activa las células sin inducir cantidades significativas de citoquinas y quimiocinas, por un mecanismo que implica la inhibición del factor de transcripción NF κ B (51,52).

La mayor evidencia sobre el reconocimiento de β -glucanos proviene de estudios de infecciones sistémicas en ratones, donde se centran en las respuestas inmunes generadas en la periferia frente a hongos patógenos, o bien estudios *ex vivo* o *in vitro*, desafiando a determinadas células de la inmunidad innata con β -glucanos sintéticos o ligandos fúngicos. En pacientes, el estudio se facilita por identificación de mutaciones o polimorfismos genéticos en su receptor o moléculas adaptadoras de su señalización. En la actualidad, el conocimiento sobre la interacción de *C. albicans* en cerebro y los mecanismos involucrados en la respuesta inmune frente a β -glucanos en SNC en modelos *in vivo*, es muy limitado. Un estudio reciente de Drummond y col. (2019) demuestra que un componente del hongo, candidalisinina, induce la secreción de IL-1 β en microglía a través de CARD9, conduciendo a la expresión de la integrina CXCL1, que provoca en última instancia el reclutamiento correcto de neutrófilos (53).

Candidiasis invasiva

Epidemiología

Las infecciones sistémicas causadas por *Candida* spp son consideradas las micosis más comunes (4,54), aunque *Aspergillus* spp y *Cryptococcus* spp también son responsables de provocar fungemias graves, con altos índices de mortalidad asociados (55,56). Dentro de las infecciones nosocomiales, se ubican en cuarto lugar, luego de *Enterococcus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus* (4,54).

Debido al creciente uso de dispositivos médicos propensos a la contaminación fúngica, así como la implementación de terapias inmunosupresoras modernas que debilitan la inmunidad del huésped, la población en riesgo para las micosis invasivas ha aumentado considerablemente en las últimas décadas. Asimismo, el limitado repertorio de drogas antifúngicas, el surgimiento de nuevas especies patógenas y el desarrollo de cepas resistentes a los fármacos actuales, ha llevado a un aumento drástico en la frecuencia de esta patología, reportándose más de 750.000 casos de candidiasis invasiva por año en todo el mundo (3,5,57).

C. albicans es la especie prevalente asociada a la candidiasis diseminada, representando un 50% de los aislados clínicos en todo el mundo (4,54,58). Sin embargo, la epidemiología puede variar considerablemente según la región geográfica, pudiendo encontrarse otras especies como *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* y *C. lusitaniae* (59–62).

En nuestro país, las enfermedades causadas por hongos no son reportadas sistemáticamente, y son escasos los estudios sobre la epidemiología y distribución de especies de *Candida* como agente causal de infecciones sistémicas graves, dificultando el diagnóstico y tratamiento de los pacientes. Datos obtenidos por nuestro grupo en estudios multicéntricos locales de micosis, demuestran que *C. albicans* es el agente etiológico más frecuentemente aislado de sangre de pacientes internados en las UCI (unidad de cuidados intensivos), con una prevalencia de 48,60% (63). La segunda especie identificada en nuestra región es *C. parapsilosis* con una prevalencia de 28,57%, usualmente asociada a la colonización previa de catéteres venosos, a la nutrición parenteral, a prácticas sanitarias deficientes y su elevada capacidad de formar biofilm (63,64). Esta especie figura en segundo lugar como agente de candidemia en Asia y América Latina (65–69).

La candidemia es una patología que presenta elevadas tasas de mortalidad, que oscilan entre un 36 y 63% de los pacientes infectados. Pese a las exhaustivas investigaciones en el desarrollo de fármacos antifúngicos, estas cifras no han variado significativamente, y aún representan un importante problema de salud pública (63,70,71). Los datos obtenidos en nuestro país arrojan una mortalidad del 50% (63,70), poniendo en evidencia la severidad de esta enfermedad y su relevancia médica. Un factor no menor es el elevado gasto económico que significa la internación y el tratamiento, ya que se estiman inversiones de millones de dólares anuales (4,10,72).

Las drogas antifúngicas con acción frente a *Candida* que se utilizan como tratamiento son la Anfotericina B, los triazoles (fluconazol, voriconazol) y principalmente las equinocandinas (anidulafungina, caspofungina y micafungina) (73–76). La mayor eficacia y menor toxicidad han posicionado a las equinocandinas como drogas de primera elección; sin embargo su costo es muy elevado y carecen de actividad frente a algunos hongos oportunistas de importancia clínica. De manera similar a lo que ocurre con otros agentes

patogénicos, *Candida* ha desarrollado diferentes mecanismos de resistencia frente a estos fármacos. Siendo las GS el *target* molecular sobre el cual actúan las equinocandinas, las mutaciones puntuales en el gen FKS1, particularmente en el *hot-spot* 1, están asociadas a la resistencia frente a este antifúngico, presentando valores de CIM (concentración inhibitoria mínima) muy elevados (39,41).

Factores de Predisponentes

Debido a la naturaleza oportunista de *C. albicans*, existen varios factores de riesgo, propios del hospedador o asociados al manejo clínico, que aumentan la susceptibilidad frente a candidiasis invasivas.

El estado inmunológico debilitado del huésped o fallas en los mecanismos homeostáticos de control, favorecen el crecimiento desmedido del hongo y la invasión tisular a partir de fuentes endógenas, como los nichos que coloniza normalmente (14,15,77). La inmunosupresión del paciente puede deberse a defectos genéticos intrínsecos que afecten el reconocimiento o el desarrollo de respuestas efectivas (78–81), o a factores exógenos como el uso de corticoides, quimioterapia, malnutrición, diabetes mellitus y pacientes con inmunodeficiencias adquiridas, como SIDA (4,78,82). Varios estudios han demostrado que la disminución o ausencia de neutrófilos en sangre, es una condición fundamental para la diseminación de *Candida* en la mayoría de los casos, colocando a la neutropenia como un factor de riesgo primario (83–85).

En pacientes sin enfermedades subyacentes inmunosupresoras, la contaminación exógena por *C. albicans* también puede provocar candidiasis diseminada, ligada principalmente al manejo clínico y a las condiciones intrahospitalarias (12,86). En este sentido, los factores predisponentes incluyen el uso de antibióticos de amplio espectro, cirugías gastrointestinales o cardíacas, trasplante de órganos, la utilización de catéteres venosos centrales, el uso de drogas inyectables, nutrición parenteral, hospitalización prolongada, internación en la UCI, quemaduras y también en edades extremas de la vida, como ocurre en neonatos prematuros y ancianos (5,59,82,87–92).

Candidiasis cerebral

Si bien la neurocandidiasis se considera una entidad clínica inusual, la incidencia de micosis oportunistas en SNC ha aumentado considerablemente en los últimos años (93). La presencia de *Candida* en cerebro implica una complicación potencialmente mortal, agravando el pronóstico de pacientes con infección sistémica. El compromiso de este órgano ocurre mayoritariamente en individuos con algún tipo de inmunodeficiencia o en presencia de los factores de riesgo descritos (79,80,94–97), y se asocia a elevadas tasas de mortalidad (96,97). Se encuentra fuertemente asociada a la Enfermedad Granulomatosa Crónica y, como se hará referencia más adelante, a ciertas fallas en receptores de la inmunidad innata.

Además de las complicaciones neuroquirúrgicas, en la mayoría de los casos esta patología se origina como consecuencia de la diseminación hematogena del hongo desde un foco distante de infección primaria (83,90,98,99).

Debido a las limitaciones de los métodos diagnósticos actuales y al transcurso asintomático de la infección cerebral en muchos casos, no existen registros de la frecuencia real de esta enfermedad. En adultos, la relevancia de esta patología se manifiesta en estudios *post-mortem*, donde las autopsias revelan que casi el 50% de los pacientes que mueren por candidiasis invasiva, presentan hongos en el cerebro (83,100,101). En los neonatos prematuros con peso extremadamente bajo al nacer, la incidencia de infecciones sistémicas por *Candida* es preocupante, pudiendo alcanzar un 50% en lactantes con pesos menores a 750g, asociados a altos índices de mortalidad y causando secuelas neurológicas permanentes en los individuos que sobreviven (91,102–105).

La llegada de *C. albicans* al parénquima cerebral provoca diferentes manifestaciones clínicas, que incluyen meningitis, micro y macroabscesos y complicaciones vasculares (106–109). Durante la infección avanzada, la meningitis es frecuente en pacientes con SIDA, con bajo promedio de linfocitos T CD4+ (58). Los procedimientos neuroquirúrgicos también pueden inducir meningitis por *Candida*, y la severidad de la infección se correlaciona con la magnitud del inóculo (106). Pacientes inmunosuprimidos con candidemia e invasión del SNC, pueden presentar microabscesos cerebrales, lo cual se

considera una complicación severa. En estos individuos, el diagnóstico suele establecerse poco antes de morir y en la necropsia puede observarse un elevado número de microabscesos con un tamaño menor a 3mm, diseminados en el parénquima cerebral (110).

La presencia de macroabscesos es menos frecuente y no está necesariamente relacionada con desórdenes inmunológicos. Pueden presentar una única o múltiples formas histológicas y usualmente se encuentran focos de necrosis (106,108). Las lesiones pueden causar pérdida de masa tisular y signos neurológicos asociados al aumento de la presión intracraneal. También se han descrito zonas hemorrágicas y alteraciones vasculares, como aneurismas micóticos. Los diferentes morfotipos de *Candida* pueden visualizarse en las secciones histológicas, hallándose levaduras, pseudohifas e hifas, en grupo o formando masas compactas en el parénquima cerebral. Estas lesiones suelen estar rodeadas por neutrófilos, aunque en casos severos de inmunodeficiencias, se observan hifas de *Candida* invadiendo el parénquima cerebral en ausencia de reacción inflamatoria (108).

Las manifestaciones neurológicas en adultos son principalmente encefalopatías difusas y pérdida de la conciencia; sin embargo, en recién nacidos y particularmente en aquellos neonatos que presentan un peso <1500g, las consecuencias son más graves. El 57% de los sobrevivientes presentan signos de deterioro neurológico con secuelas permanentes, como parálisis cerebral, alteraciones motoras, fallas en el lenguaje, problemas auditivos, ceguera y deterioro cognitivo (99,111).

Entre los factores de riesgo de esta población, se considera la colonización previa de la piel y las mucosas como una fuente importante de infección, adquirida ya sea por transmisión materna como por infección intrahospitalaria en las UCI neonatales (112). Estudios multicéntricos determinan que la mortalidad en la población pediátrica es próxima al 30% y aumenta al 50% en neonatos de muy bajo peso (91,102–105,112–114). Estos reportes también establecen que los indicadores de deterioro neurológico empeoran con el grado de prematurez y el bajo peso (113,115).

El desarrollo de estudios moleculares sistematizados permitirán un entendimiento más profundo de la interacción patógeno-huésped durante la

infección cerebral con *C. albicans*, permitirá un diagnóstico temprano y un adecuado manejo médico, mejorando el pronóstico de los pacientes infectados.

Mecanismos de Tráfico al Cerebro de *Candida albicans*

Para invadir SNC, los hongos deben ser capaces de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE), constituida por células endoteliales, pericitos y astrocitos (116,117). Las células del endotelio microvascular del cerebro humano no presentan fenestraciones, y forman una capa celular continua unida por uniones estrechas, otorgando una elevada selectividad en el transporte de partículas. En el área ventricular, los capilares están formados por células endoteliales fenestradas y no tienen contacto directo con los astrocitos (116,118). La BHE protege al SNC frente a injurias en individuos sanos; sin embargo, en ciertas circunstancias como traumatismo, cirugía o disfunción inmune, los patógenos fúngicos pueden superarlas e invadir cerebro (119).

Pese al creciente conocimiento sobre los factores de virulencia de *C. albicans* y los receptores implicados en la adherencia a células epiteliales, los mecanismos por el que este patógeno atraviesa la BHE no han sido dilucidados completamente. Actualmente, se describen tres posibles mecanismos: (i) a través de una ruta paracelular, cruzando entre las células endoteliales adyacentes, (ii) por invasión transcelular de las células endoteliales y la posterior liberación del lado basolateral, o (iii) indirectamente a través de la migración de monocitos infectados por levaduras a través de la barrera endotelial (mecanismo de caballo de Troya). También es posible el ingreso de patógenos al cerebro a través de una BHE con integridad deteriorada (120,121).

Estudios *in vitro* realizados sobre células endoteliales microvasculares de cerebro humano (HBMEC) demostraron la capacidad de *C. albicans* para adherirse e invadir cerebro, mediante las invasinas fúngicas Als3 y Ssa1 (122), que se unen a un receptor expresado exclusivamente en esas células. Además, utilizando microscopía electrónica de transmisión, se han observado los diferentes morfotipos del hongo unidos a la monocapa o en el interior de las células endoteliales, siendo capaces de transitar las HBMEC sin alterar su integridad (16). No obstante, estudios *in vivo* mediante microscopía intravital, demostraron que en una infección avanzada ocurre la pérdida de la integridad de la BHE, con elevada respuesta inflamatoria (119). Actualmente, existen

fuertes evidencias de que la internalización de *C. albicans* por vacuolas que contienen ICAM-1, proteína de unión a integrinas, es esencial para la transcitosis de levaduras e hifas al parénquima cerebral a través de la BHE (122).

Inmunidad innata frente a *C. albicans*

El sistema inmune innato constituye la primera línea de defensa del huésped frente a una gran variedad de patógenos. Las barreras físicas y los elementos que la componen desempeñan un rol central mediante la activación temprana de mecanismos efectoros, en el reconocimiento de agentes infecciosos y la amplificación de respuestas locales mediante el reclutamiento de poblaciones celulares. Este sistema de reconocimiento innato permite discriminar entre aquellos elementos fúngicos de hongos comensales, frente a los que el sistema inmune debe permanecer tolerante, y aquellos provenientes de agentes patogénicos, frente a los cuales debe ejercer una eficiente protección. El reconocimiento de los PAMPs fúngicos por los PRRs provoca en las células inmunes la inducción de vías intracelulares que promueven su activación, la producción de diferentes mediadores y la inducción de funciones efectoras. La etapa de reconocimiento también es importante en el establecimiento del inicio de la respuesta inmune adaptativa siendo fundamental en la definición de su perfil (15,123,124).

Dentro de las poblaciones celulares de la inmunidad innata los neutrófilos son consideradas una población esenciales durante la respuesta temprana frente a *C. albicans*. Se ha demostrado que su ausencia o la falla en los mecanismos de activación o reclutamiento, provoca a una mayor susceptibilidad frente a infecciones fúngicas invasivas, menor control del crecimiento del hongo y una mortalidad acelerada, tanto en humanos como en modelos animales (85,125).

Estas células son reclutadas rápidamente al sitio de infección, contribuyendo al control fúngico mediante fagocitosis, estallido respiratorio, degranulación, liberación de citoquinas pro y antiinflamatorias, y liberación de trampas extracelulares (NETs) (85,88,92,126,127). Participan especialmente en el inicio de la infección, en las primeras 24-48h, donde una respuesta inmune efectiva es crucial para evitar el progreso de la enfermedad (88,92,127). No

obstante, su activación debe ser estrictamente controlada, a fin de evitar lesiones tisulares severas y procesos inmunopatológicos, resultando perjudicial para la funcionalidad de los órganos involucrados.

Receptores innatos y activación de la respuesta inmune

Las complejas interacciones entre el hongo y su hospedador comienzan en la interface célula-célula. La composición de la pared fúngica puede variar dependiendo del morfotipo levaduriforme o crecimiento micelial, como así también después de la división celular, la morfogénesis o la exposición a drogas antifúngicas. El reconocimiento de los PAMPs fúngicos por parte de los PRRs presentes en células inmunes innatas es un evento esencial para la defensa frente a estos patógenos (128,129).

Los PRRs descritos al presente, pueden agruparse en cuatro grandes familias: TLRs (del inglés *Toll-like receptors*), CLR (del inglés *C-type lectin receptors*), NLRs (del inglés *NOD-like receptors*) y RLRs (del inglés *RIG-I-like receptors*) (130). Los TLRs y los CLR desempeñan un papel central en la respuesta inmune frente a *C. albicans*; algunos estudios demuestran que los NLRs también están involucradas en su reconocimiento, aunque se conoce poco acerca de los elementos del hongo que participan en esta interacción (53,130,131) (Figura 3).

La familia de los TLRs está compuesta por diez miembros de receptores transmembrana en humanos que reconocen diversos ligandos. Según su ubicación, se clasifican en dos grupos: los que se localizan en la membrana plasmática y los encontrados en compartimentos intracelulares como endosomas. El reconocimiento por parte de los TLRs es seguido por la activación de diferentes vías de señalización intracelular, que generalmente involucran la molécula adaptadora MyD88, aunque también pueden utilizar las proteínas TRIF. La cascada finaliza con la activación del factor de transcripción NFκB y factores reguladores del interferón (IRF), que inducen la expresión de genes y la consecuente producción de diferentes citoquinas como IL1β, IL-6 y TNF, quimiocinas y moléculas requeridas para la presentación antigénica y expresión

de moléculas coestimuladoras, importantes en la inducción de la inmunidad adaptativa (15,130,132).

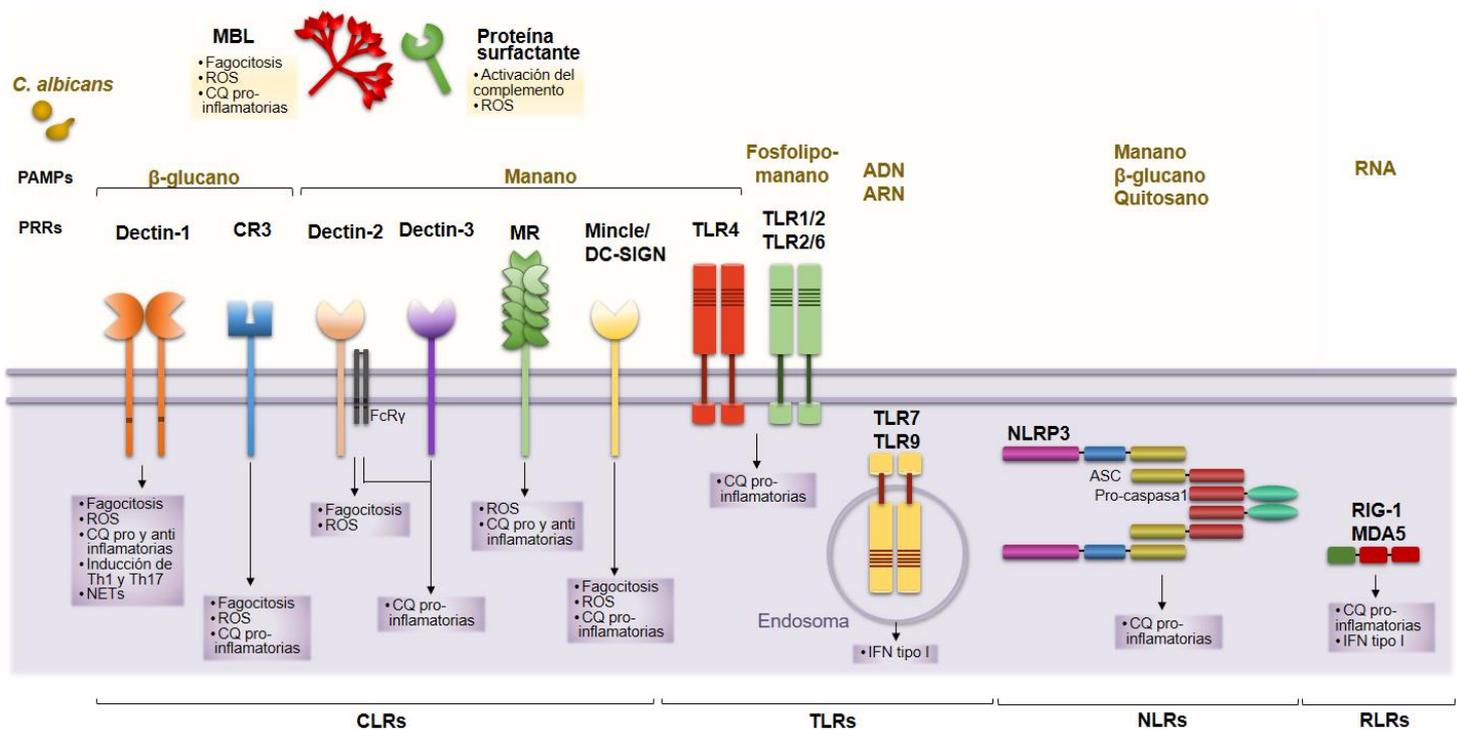


Figura 3. Receptores de Reconocimientos de Patrones involucrados en la interacción con *C. albicans*. PRRs de las familias TLR, CLR, NLR y RLRs y reconocimiento de PAMPs de *C. albicans*. Luego de la unión a sus ligandos, se activan cascadas de señalización para inducir diversas respuestas inmunes, como la fagocitosis, producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y secreción de citoquinas [Adaptado de Goyal, Surabhi, 2018(43)].

Los NLRs se encuentran en el citosol celular y son capaces de responder a un conjunto diverso de estímulos, desde patógenos microbianos a través de los PAMPs, hasta patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), como ATP o cristales de ácido úrico, que son liberados por las células cuando mueren y son reconocidos como señales de peligro para perpetuar la inflamación (133). El receptor más estudiado de esta familia es el NLRP3 (del inglés *NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3*), quien al activarse se ensambla con la proteína adaptadora ASC, formando un complejo multimolecular citoplasmático denominado inflamasoma. Esta estructura recluta y activa a la enzima proteolítica Caspasa-1, provocando en última instancia al clivaje de pro-IL-1 β y pro-IL-18, para liberarlas como citoquinas activas. La transcripción de la pro-IL-1 β está asociada a señales generadas a partir de TLR2/TLR4 y Dectin-1, y la liberación de la IL-1 β a la actividad de los inflamasomas (134). NLRP3 se

encuentra expresado en macrófagos, monocitos, microglía, DCs y células epiteliales (135–137).

Numerosos estudios han demostrado que NLRP3 desempeña un papel importante en la inflamación inducida por *C. albicans* (138). El ligando que produce el ensamble de este inflamasoma aún no se encuentra identificado totalmente. Se ha reportado, tanto en modelos animales como en estudios en pacientes con candidiasis vulvovaginal, que las enzimas SAP2 y SAP6 de *C. albicans* participan en su activación (139,140). En la actualidad, otros NLRs se han relacionado con la respuesta frente a este hongo, así como NLRP10, requerido para controlar la infección diseminada de *C. albicans* y NLRC4 en el estroma de la mucosa para controlar la infección oral (141,142). Un estudio reciente demuestra que una toxina fúngica podría estar involucrada en la regulación transcripcional de IL-1 β y en la activación del inflamasoma por parte de la microglía (53).

Los CLRs son una superfamilia heterogénea de receptores transmembrana y solubles, que se definen por contener dominios conservados de lectina tipo C. Son los PRRs mejor caracterizados en la respuesta frente a patógenos fúngicos y reconocen polímeros de carbohidratos (manano, glucanos, y quitina) presentes en la pared celular de los hongos (43,143–145). Son necesarios para el reconocimiento y la fagocitosis, la inducción de mecanismos efectores antimicrobianos y mediadores inflamatorios, y dirigen y modulan la inmunidad adaptativa, incluidas las respuestas Th17 y Th1 (145).

Los principales miembros de este grupo que participan en la actividad antifúngica son Dectin-1, Dectin-2, Dectin-3, Mincle, CR3, el receptor de manosa (MR) y DC-SIGN (*Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*), que se expresan principalmente en células mieloides. Además, se ha demostrado que CLRs solubles como la lectina de unión a manosa (MBL) y las proteínas surfactantes Ay B (SP-A y SP-D), también desempeñan un papel en la inmunidad antifúngica (146). Los ligandos de Dectin-1 y CR3 son los β -(1,3) glucanos de la pared del hongo, mientras que los demás receptores reconocen estructuras glucídicas como manosa, presentes en la pared de *Candida* (147).

Generalmente los PRRs no actúan en forma independiente, y son frecuentes las respuestas inmunes donde participa más de un receptor, ya sea

perteneciente a la misma familia o no, generando sinergismo, redundancia o respuestas antagónicas (81,132,143,148,149). De hecho, se ha planteado que uno de los principales roles de los TLRs en la inmunidad anti-fúngica, es la modulación de las respuestas dependientes de CLR (134). Algunos estudios muestran que la estimulación simultánea de TLR-2 y Dectin-1 en macrófagos murinos, tiene un efecto sinérgico en la producción de citoquinas proinflamatorias y la fagocitosis, aunque puede regular de manera negativa la inducción de respuestas adaptativas en determinadas condiciones (132,143).

Dectin-1

Dectin-1 es un receptor transmembrana de la familia de los CLR que se expresa principalmente en células mieloides, como macrófagos, monocitos, microglía, neutrófilos, mastocitos, CD8, pero también puede encontrarse en células del epitelio pulmonar y bronquial, entre otras (43,48,51,150,151).

Numerosos estudios han permitido establecer el rol de Dectin-1 en la inmunidad innata frente a *C. albicans* y en el condicionamiento que ejerce su activación en la inmunidad adaptativa. La contribución de este receptor en la inducción de la inmunidad adaptativa es actualmente un área de investigación intensa, debido a su importancia en la resolución eficaz de las infecciones fúngicas. Se ha demostrado que Dectin-1 induce respuestas humorales (131) y estimula las células T citotóxicas tanto en ratones (152) como en humanos (153). La activación de este receptor también se ha relacionado con la inducción de respuestas T CD4⁺, promoviendo la diferenciación de Th1/Th17 (154). Humanos deficientes en Dectin-1 parecen tener respuestas Th17 disminuidas y esto puede estar relacionado con su susceptibilidad a la candidiasis mucosa observada en estos pacientes (81).

Si bien se ha demostrado un rol protector de este receptor en infecciones fúngicas sistémicas por *C. albicans* y *A. fumigatus*, en procesos infecciosos provocados por *Coccidioides immitis* y *Pneumocystis carinii*, la ausencia del receptor sólo tuvo impacto sobre el control de la carga fúngica (15,155,156). En referencia a los dos primeros, su participación es ampliamente discutida, y depende considerablemente del microambiente inflamatorio, el *background*

genético del huésped, la especie y cepa del patógeno fúngico, el tipo de célula huésped activada y el órgano donde se desarrolle la respuesta (81,125,143,157). La diferencia entre la susceptibilidad observada entre los modelos murinos de infección y los pacientes con esta micosis puede deberse a que en contraste a lo que ocurre en los seres humanos, *Candida spp.* no es un organismo comensal en ratones.

El reconocimiento de los β -glucanos de la pared fúngica, induce la dimerización del receptor Dectin-1, seguido de la activación de vías de señalización que conducen a diversas respuestas celulares, como la fagocitosis, la producción de citoquinas, el estallido respiratorio y la activación de inflamomas (143) (Figura 4).

El dominio citoplasmático de Dectin-1 posee una secuencia similar al motivo de activación basado en tirosina (ITAM), constituida por una serie de aminoácidos. Luego de la unión al ligando, este dominio es fosforilado por las quinasas de la familia Src, lo cual induce el reclutamiento de tirosina quinasas, tales como la proteína Syk. Posteriormente, se induce la formación y activación de un complejo multimolecular compuesto por la proteína CARD9, Bcl10 y MALT1, fundamental para la defensa frente a *C. albicans*. La cascada de activación que involucra Syk-CARD9 se considera la vía canónica de este receptor, e induce en última instancia la activación y translocación al núcleo del factor de transcripción NF- κ B (130,143,145). Muchos de los CLRs que participan en el reconocimiento PAMPs fúngicos, convergen en este punto y utilizan esta vía como el mecanismo de defensa principal frente a hongos.

La activación canónica de Dectin-1 induce la liberación de citoquinas proinflamatorias que involucran IL-12, TNF, IL-6, IL-1 β , IL-2, en algunos casos en colaboración con el TLR2 (49,50,158). Asimismo, el reconocimiento de *C. albicans* por este receptor también puede dar lugar a respuestas antiinflamatorias, como la liberación de IL-10 y TGF β (159–161). La vía Dectin-1-Syk-CARD-9 también puede activar IRF5 (*Interferon regulatory factor 5*) para producir IFN- β (interferón- β), inducir la producción de ROS, activar el inflamoma NLRP3 y mediar la fagocitosis independiente de opsonización, dependiente de β -1,3-glucano (43). También puede activar otros factores de transcripción como AP1 y NFAT, involucrados en la expresión de diversos genes inmunes (132).

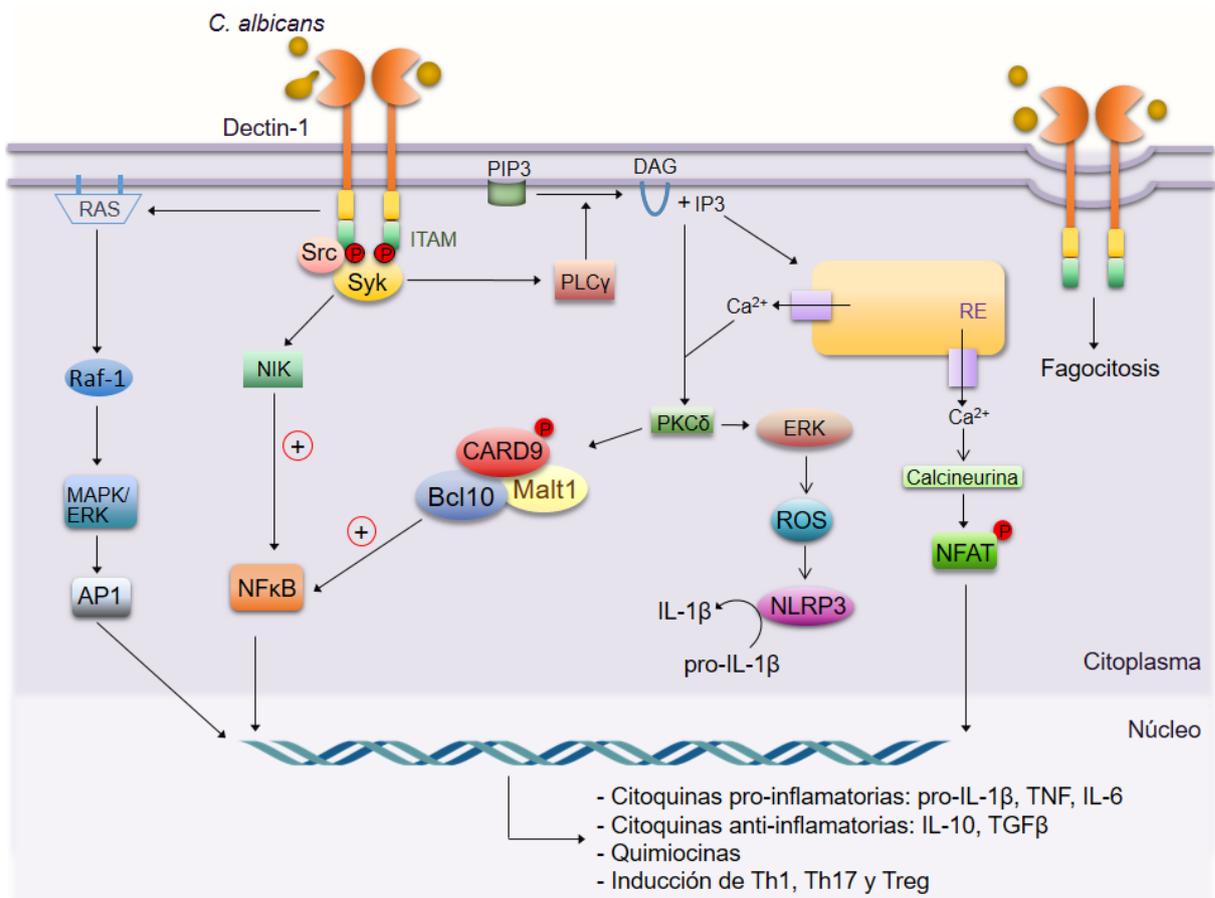


Figura 4. Vía de señalización de Dectin-1. Dectin-1 reconoce selectivamente a β -1,3-glucanos e induce la activación de diversas cascadas de señalización. La formación del complejo CARD9-Bcl10-MALT1 corresponde a la vía de activación canónica más importante, la cual es dependiente de Syk. Este complejo media la activación del factor de transcripción NFκB y la consecuente expresión génica. Otros factores de transcripción son activados por vías alternativas. Dectin-1 también media la fagocitosis y la producción de ROS y del inflammasoma NLRP3 [Adaptado de Gordon Brown, 2013 (151)].

Otra vía no canónica importante, es la que involucra a la proteína Raf-1, y la consecuente activación de la vía de señalización MAPK/ERK, quinasas que inducen respuestas proinflamatorias contra *C. albicans* (132).

Un hito en el conocimiento de la respuesta inmune antifúngica lo constituye sin duda el descubrimiento de polimorfismos o mutaciones genéticas del receptor Dectin-1 y su vías de señalización en individuos susceptibles a la infección por *Candida* spp. La detección de mutaciones puntuales en Dectin-1 (Tyr238X) y en CARD9 (Q925X), condujo a fallas severas en la vía de activación de las células

fagocíticas, producción deficientes de citoquinas y de péptidos antimicrobianos en respuesta a *Candida* en pacientes con CMC crónica (43,78,81). Estudios efectuados con sangre periférica de pacientes con alteraciones en Dectin-1, revelaron una disminución en la producción de IL-17 en cultivo cuando sus linfocitos fueron expuestos a *C. albicans*. Por otra parte, individuos que presentan mutaciones o deficiencia en CARD9, tienen un alto riesgo de desarrollar infecciones fúngicas graves, y se los ha relacionado fuertemente con la diseminación hematógica y la presencia de *C. albicans* en el cerebro (83,162).

Respuesta inmune en Sistema Nervioso Central

Durante décadas, el SNC fue definido experimentalmente como un sitio inmunoprivilegiado, debido a la escasa respuesta inmune observada frente a injertos u otros estímulos, sumado a la ausencia de drenajes linfáticos convencionales y al aislamiento físico otorgado por la BHE (163). Además, la expresión de moléculas fundamentales para el inicio de respuestas inmunes adaptativas, como MHC-II (complejo mayor de histocompatibilidad tipo II), es escasa en condiciones normales y no se han detectado células presentadoras de antígeno profesionales en cerebro de individuos sanos (164). Sin embargo, investigaciones más recientes indican que el cerebro es un órgano inmunocompetente que interactúa activamente con la periferia, y cuyas células residentes se relacionan de manera constante, permitiendo la homeostasis y el correcto funcionamiento del órgano (165,166).

La respuesta inflamatoria en cerebro es fundamental para el mantenimiento de la homeostasis, la reparación tisular y la defensa frente a patógenos e injurias. No obstante, estos mecanismos deben estar estrictamente controlados, a fin de lograr resolver las situaciones, sin causar daño tisular excesivo. La neuroinflamación es un proceso complejo, y tiene aspectos tanto neuroprotectores como neurotóxicos (163,167,168).

El SNC tiene un alto grado de heterogeneidad anatómica y celular, por lo que la respuesta inmune inicial frente a patógenos va a depender de la ruta de acceso de los microorganismos (169). El SNC está compuesto principalmente por tres

tipos de células: neuronas, células gliales y células vasculares, cuya distribución es heterogénea dentro del parénquima cerebral (169,170). Las células gliales o neuroglia, comprenden un conjunto de células con diversas funciones, que incluyen los astrocitos, la microglía, las células ependimarias y los oligodendrocitos. En condiciones homeostáticas, las neuronas y los astrocitos se comunican con la microglía a través de vías parácrinas y autócrinas mediante la expresión de receptores (171). Particularmente las neuronas y los astrocitos desempeñan un rol integral en la regulación fenotípica de las células microgliales, regulando negativamente la microglía y reduciendo la inflamación en el SNC (166). Algunos neurotransmisores tienen efectos moduladores inmunes al suprimir la producción de citoquinas proinflamatorias, mediante la inhibición del factor de transcripción NFκB (172).

Microglía

Las células microgliales comprenden aproximadamente entre el 10-20% de la población glial en el SNC en humanos y se mantienen solamente por auto-replicación (171,173). Si bien se pueden encontrar en todo el parénquima cerebral (174), pueden tener funciones variadas según las regiones donde se encuentran, y desarrollan características únicas basadas en señales moleculares específicas de tejido (175,176).

En condiciones normales se encuentran en reposo, mostrando un perfil homeostático de inmunovigilancia (177). Frente a lesiones cerebrales como resultado de traumas, infecciones o enfermedades neurodegenerativas, son las primeras células en activarse y participan activamente en la respuesta inmune innata cerebral (171,178). Poseen PRRs para el reconocimiento de patógenos, mediante los cuales inducen la producción de citoquinas proinflamatorias como IFN-γ, TNF, IL-1β, IL-18, IL-6 e IL-12, así como la producción de ROS (94,179). La expresión de múltiples receptores de quimiocinas y citoquinas en su superficie, indica su rápida capacidad de respuesta y migración a los sitios de inflamación, coincidente con los procesos de hiperramificación, que aumentan la motilidad y locomoción (178). Al igual que los macrófagos, presentan el marcador CD36 y otros receptores tipo “*scavengers*” (SR), por los que median la

fagocitosis activa de células apoptóticas, microbios y desechos celulares en el SNC. Frente a una injuria, el IFN γ puede inducir la expresión moléculas de MHC II y de moléculas co-estimuladoras como CD54, CD80 y CD86, sugiriendo la participación en el desarrollo de respuestas adaptativas por presentación antigénica a los linfocitos T CD4+. Por otra parte, la microglía activada también induce la producción de las citoquinas antiinflamatorias, tales como IL-10, IL-4, IL-13 y TGF β (51,180,181), que desempeñan papeles importantes en la reparación de tejidos y cicatrización de heridas (182).

Las técnicas inmunohistoquímicas son muy utilizadas actualmente para el estudio de microglía, gracias a la identificación de un marcador microglial específico que permitió desarrollar un protocolo universal para su detección, descubierto por un grupo japonés en 1996 y denominado más tarde como Iba-1 (183–185). Poco se conoce sobre las funciones de esta proteína, pero se ha relacionado con procesos de reorganización del citoesqueleto, mediante la interacción con moléculas de actina (186–188). Iba-1 tiene una gran estabilidad inter-especie, lo cual ha permitido el estudio de SNC en diferentes mamíferos y humanos (189–191). Además, esta proteína se distribuye de manera considerablemente uniforme en el citoplasma y en los procesos de la microglía ramificada, asegurando su visualización en los diferentes estadios de activación (185).

En el SNC de individuos sanos, la morfología de la microglía en reposo presenta procesos ramificados refinados, orientados radialmente desde un pequeño soma elíptico. Tras su estimulación, estas células se activan y adquieren una forma ameboide y fagocítica, con hipertrofia del soma celular, retracción de ramificaciones y regulación positiva o síntesis *de novo* de moléculas de superficie e intracelulares (171).

Si bien la activación microglial es fundamental para mantener la homeostasis en el SNC, durante condiciones inflamatorias crónicas, la activación persistente de estas células puede resultar perjudicial. La continua liberación de citoquinas, quimiocinas y ROS, conducen a la activación de otras células microgliales y astrocitos circundantes, lo que resulta en la progresión de la enfermedad debido a la producción sostenida de sustancias tóxicas para las neuronas (51). A su vez, la liberación de DAMPs por células dañadas, pueden aumentar aún más la inflamación y la activación glial, desencadenando un ciclo inflamatorio de auto

propagación (173,192–195). Por este motivo, en el SNC se establecen complejas interacciones entre la microglía y las demás células residentes de cerebro, que regulan la actividad celular y le permiten adquirir fenotipos pro o antiinflamatorios, dependiendo del estímulo presente (196).

Si bien hallazgos recientes indican que la microglía tiene un linaje distintivo y una firma molecular particular, todavía se la considera el macrófago del SNC (173,181,197). Por este motivo, al igual que los macrófagos periféricos, la activación microglial se puede clasificar en dos fenotipos principales, definidos como "activación clásica" o M1 y "activación alternativa" o M2 (182,198,199). Sin embargo, esta clasificación ha sido muy cuestionada, ya que no refleja la complejidad de los estados intermedios de activación microglial. Asimismo, el concepto M1/M2 se ha propuesto basándose en experimentos *in vitro*, que exponen a células aisladas a estímulos purificados, por lo que es cuestionable que estos datos representen las condiciones reales *in vivo* (181).

Numerosos estudios han demostrado la contribución de la activación microglial en procesos neurodegenerativos (199–202); sin embargo, los mecanismos involucrados en regular la función de estas células y su participación en la reparación neuronal, no se comprenden completamente.

Los mecanismos involucrados en la respuesta inmune frente a *C. albicans* por la microglía en SNC no han sido explorados profundamente al presente. Estudios *in vitro* utilizando células microgliales de retina murina, demostraron que el reconocimiento de β -glucanos particulados a través del receptor Dectin-1 en la superficie celular, atenúa la secreción de citoquinas proinflamatorias, a través de la inhibición de la translocación de NF- κ B mediada por TLR2 (51,52,171). Esto sugiere un mecanismo de control de la inflamación frente al patógeno fúngico, ya sea como mecanismo de evasión del hongo, o como una manera de controlar la inflamación cerebral. Recientemente, se demostró que el reclutamiento de neutrófilos a SNC no se encuentra alterado en ratones deficientes en Dectin-1 infectados con *C. albicans*, aunque su capacidad fagocítica se encuentra disminuida. En consecuencia, la carga fúngica en cerebro de estos animales es mayor que en los ratones WT (53).

Por otro lado, el rol inmunoprotector del receptor Dectin-1 en la superficie de la microglía, se ha sugerido en un estudio *in vivo*, en un modelo de lesión del nervio óptico por aplastamiento, donde observan que la administración de β -

glucanos particulados, promueve la respuesta regenerativa y mejora la recuperación axonal (203).

Actualmente, sin embargo, existe un conocimiento limitado sobre la modulación de los procesos inflamatorios por parte de la microglía en el contexto de la infección por hongos en el SNC, por lo que este trabajo aporta evidencia importante para una mayor comprensión de la neuropatología causada por *C. albicans*.

Astrocitos

Los astrocitos son las células gliales más abundantes, constituyendo entre el 30 y el 50% de las células en el SNC (204,205). Su forma estrellada característica posee un soma central, a partir del cual se extienden sus procesos formando verdaderas redes en el cerebro, que los mantienen en constante comunicación con las demás estructuras celulares (204,206). Junto con la microglía, se consideran componentes principales de la respuesta inmune en cerebro, y sus principales funciones incluyen la secreción de factores de crecimiento, la liberación de citoquinas (IL-6, IL-10, IFN β , TNF) y quimiocinas (como la proteína quimioatrayente de monocitos, MCP-1), y la modulación de la transmisión sináptica, mediante la eliminación de neurotransmisores como el glutamato de la hendidura sináptica (204,207–209).

Los astrocitos responden a todas las formas de daño y enfermedad del SNC al sufrir cambios estructurales, celulares, moleculares y funcionales, en un proceso denominado astrogliosis reactiva. La gran diversidad de alteraciones fenotípicas dependen del microambiente y pueden resultar protectoras o neurotóxicas según el entorno (210,211). Aunque estas respuestas son necesarias para la eliminación de patógenos, también pueden afectar negativamente la función neuronal, deteriorando la neurogénesis y causando neurotoxicidad (169). La activación excesiva y prolongada de los astrocitos durante la infección o inflamación puede dar lugar a cicatrización de los astrocitos, lo cual es en parte responsable del daño tisular a largo plazo (137,206,210,212). Sin embargo, estudios recientes han demostrado que la formación de cicatrices favorece la regeneración axonal en lesiones del SNC

(213). Su marcador específico, GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*), es una proteína componente principal del citoesqueleto de estas células gliales. La distribución homogénea en todo el citoplasma, la presencia en todas las especies de mamíferos estudiados y los cambios en los niveles de expresión luego de la activación celular, han posicionado a esta proteína como un marcador útil para evaluar la reactividad de los astrocitos en modelos animales de injuria y enfermedad, y en muestras patológicas humanas (205,214,215).

La estrecha relación entre los astrocitos y la microglía tanto en condiciones fisiológicas o patológicas, le permite modular su actividad (216). Al ser los principales productores de TGF β y secretar además galectina-1, los astrocitos pueden reducir la activación microglial, disminuyendo la producción de moléculas asociadas a la presentación antigénica, la liberación de citoquinas proinflamatorias, NO, ROS y TNF (207,210). Tanto los astrocitos como la microglía se activan rápidamente en respuesta a altos niveles de actividad neuronal e injuria tisular, pero este proceso difiere según la etapa de desarrollo en la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas y fenómenos neurotóxicos (207). La activación de microglía y astrocitos ocurre con un patrón espacial y temporalmente distinto. La microglía, activada antes que los astrocitos, promueve la activación de estos últimos. Por otro lado, los astrocitos activados no sólo facilitan la activación de la microglía distante, sino que también regulan con un tono inhibitorio las actividades microgliales. Las principales moléculas que contribuyen a su intercomunicación incluyen la IL-1 β , el ATP (trifosfato de adenosina) y el TGF- β (207).

OBJETIVOS

“La utopía está en el horizonte. Camino dos pasos y se aleja dos pasos. Camino diez y el horizonte se corre diez pasos más allá. Entonces ¿para qué sirve la utopía? Para eso, sirve para caminar”

Eduardo Galeano

Las infecciones fúngicas invasivas constituyen un grave problema en la salud a nivel mundial. La presencia de *C. albicans* en SNC agrava el pronóstico en pacientes con candidemia, siendo responsable de un elevado índice de mortalidad. En poblaciones vulnerables como los neonatos, aquellos pacientes que sobreviven a la infección presentan severas secuelas neurológicas. A pesar de los avances en el conocimiento de esta patología en los últimos años, poco se conoce sobre los mecanismos que rigen las interacciones entre el hongo y las células residentes de cerebro, y la respuesta inmune local desarrollada en este nicho frente a *C. albicans*. Se ha demostrado que el receptor de β -glucanos, Dectin-1, es crucial para la defensa antifúngica durante la infección sistémica; sin embargo, su rol en SNC resulta controversial, siendo en algunos casos beneficioso y en otros perjudicial para un control efectivo de los patógenos fúngicos.

Por lo anteriormente expuesto, se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo General

Estudiar la contribución de la activación del receptor Dectin-1 durante la infección sistémica y su participación en la respuesta inmune innata desarrollada en SNC frente a *C. albicans*, evaluando su participación en la inmunopatogenia y en los procesos neurodegenerativos y de muerte neuronal.

Objetivos Específicos

- I. Caracterizar la infección diseminada y estudiar la respuesta inmune innata en cerebro murino durante la infección sistémica por *C. albicans*.
- II. Estudiar el impacto del reconocimiento inmune β -glucanos/Dectin-1 durante la candidiasis diseminada y su rol en el desarrollo de la respuesta inmune innata en cerebro murino durante la infección sistémica por *C. albicans*.
- III. Evaluar la contribución de la activación del receptor Dectin-1 durante la infección cerebral por *C. albicans* en procesos neurotóxicos y de muerte neuronal.

MATERIALES Y MÉTODOS

“La ciencia está hecha de errores, pero de errores útiles de cometer, pues poco a poco conducen a la verdad” Julio Verne

Modelo Experimental

Animales

Se utilizaron ratones machos de entre 8 y 12 semanas de edad. Las cepas empleadas en este trabajo fueron:

- Ratones C57BL/6 (B6) o *wild type* (WT), adquiridos de la Facultad de Ciencias Veterinaria, Universidad Nacional de La Plata.
- Ratones deficientes en el receptor Dectin-1, *Clec7a*^{-/-} (B6.129S6-*Clec7 atm1Gdb/J*) o ratones *Knock-out* (KO), donados gentilmente por el Dr. Gordon Brown (Institute of Infectious Disease and Molecular Medicine, University of Cape Town, Cape Town 7925, South África) (217). La expresión del receptor en estos animales fue nula. En todos los modelos se evaluó la expresión constitutiva de Dectin-1. Todos los animales se endocriaron en el Bioterio del Departamento de Bioquímica Clínica - CIBICI-CONICET, de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, bajo condiciones libres de patógenos específicos y de acuerdo con los requisitos del Comité de Ética Institucional. Los animales se mantuvieron con agua y alimento *ad-libitum*, con ciclos de 12 h luz/oscuridad a 20°C bajo humedad controlada. El mantenimiento de los ratones fue en concordancia con las recomendaciones de la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio publicado por el Concejo Canadiense de Cuidado Animal (OLAW número de certificación A5802-01).

Candida albicans

En el presente estudio se utilizó la cepa de *C. albicans* SC5314 (ATCC MYA-2876), considerada una cepa de referencia. Fue aislada en 1984 de un paciente con candidemia (218,219), y desde entonces ha sido ampliamente utilizada en estudios de todo el mundo.

También se utilizaron cepas de *C. albicans* defectivas en el *hot-spot* 1 del gen *FKS1*. Este codifica para una de las subunidades del complejo beta-1,3-D-glucan sintasa, que cataliza la síntesis de beta-glucanos, componente principal de la pared del hongo. Las mutaciones se generaron a partir de la cepa parental SC5314 por mutagénesis sitio-dirigida o transformación integrativa (39,41,220,221). Se aislaron aquellas cepas con mutaciones dominantes,

mostrando fenotipo de resistencia a equinocandinas, incluso en su forma heterocigota (221). En este trabajo se utilizó la cepa homocigota para la mutación puntual por sustitución de serina por prolina en la posición 645 (*FKS1* S645P), que presenta una menor proporción de β -glucanos con respecto a su parental. Ambas cepas fueron gentilmente cedidas por el Dr. Guillermo García-Effron (Laboratorio de Micología y Diagnóstico Molecular, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas Universidad Nacional del Litoral, Argentina) (39).

Las levaduras se mantuvieron mediante repiques semanales en medio Agar Sabouraud Glucosado (ASG) (Britania, Argentina) con Extracto de Levadura al 7% a temperatura ambiente (TA). Su virulencia se conservó a través de pasajes periódicos en animales y posterior recupero del microorganismo a partir de los hígados infectados (retro-cultivos) (222,223).

Condiciones de crecimiento de *C. albicans*

Antes de cada experimento, las cepas de *Candida* se cultivaron 24h en ASG a 37°C, a fin de asegurar la fase exponencial de crecimiento del hongo. La suspensión de levaduras para la infección se preparó en buffer fosfato (PBS) estéril, se contaron en cámara hemocitométrica de Neubauer y se llevaron a la concentración establecida ($1,25 \cdot 10^6$ levaduras/ml). La viabilidad y la concentración del inóculo se verificaron mediante el plaqueo de la suspensión y posterior recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) (224).

Todos los procedimientos anteriormente descritos fueron realizados bajo campana y en condiciones de esterilidad.

Modelo Murino de Candidiasis Cerebral

Infección sistémica

Durante la candidiasis diseminada, *C. albicans* ingresa al torrente sanguíneo, siendo capaz de colonizar prácticamente todos los órganos y tejidos del cuerpo, incluyendo el sistema nervioso central (SNC). Por este motivo, para desarrollar nuestro modelo murino de infección cerebral, los ratones se inocularon a través

de la vena lateral de la cola, a fin de establecer una infección sistémica, simulando lo que ocurre durante la diseminación hematológica del hongo (candidemia) en la práctica clínica.

Se utilizaron tres grupos experimentales:

- **Grupo WT_{SC5314}**: animales *wild type* (WT) infectados con *C. albicans* SC5314 (cepa parental).
- **Grupo WT_{FKS645}**: animales WT infectados con la cepa modificada genéticamente *C. albicans* (FKS1 S645P).
- **Grupo KO_{SC5314}**: animales deficientes del receptor Dectin-1 (KO) infectados con *C. albicans* SC5314.

Para establecer las condiciones basales de trabajo, se utilizaron también ratones sin infectar (SI) para ambos *background* genéticos:

- **Grupo SI_{WT}**
- **Grupo SI_{KO}**

Los ratones de los grupos infectados se inmovilizaron mediante un *restrainer* y se inyectaron al día 0 del protocolo experimental por vía intravenosa (iv), dilatando la vena de la cola por calor. El inóculo administrado fue de $2,5 \times 10^5$ levaduras viables de *C. albicans* por ratón, resuspendidas en 200 μ l de PBS estéril. Los animales se pesaron a las 0, 4, 12, 24, 48 h o 7 días post-infección (pi), y el índice de peso corporal (IPC) se determinó usando la siguiente fórmula:

$$\text{IPC} = \left[\frac{(\text{PC}_{\text{cinética}} - \text{PC}_{\text{inicial}})}{\text{PC}_{\text{inicial}}} \right] \times 100.$$

Este número es adimensional e indica la cantidad de peso ganado o perdido a cada tiempo con respecto a su peso inicial (225).

Obtención de muestras

Los animales se sacrificaron según la cinética establecida mediante la inhalación del anestésico isofluorano y posterior sangrado a blanco por punción cardíaca. Se obtuvieron muestras de sangre, riñón y cerebro a fin de evaluar no solo la respuesta local en cerebro, sino también el perfil sistémico que se manifiesta durante la infección. Los órganos se disgregaron mecánicamente

utilizando mallas metálicas (tamaño de poro 0,1mm²) con 3ml de PBS estéril y el homogenato de cerebro así obtenido se centrifugó por 5 min a 2500 rpm. El sobrenadante (SN) se guardó a -80°C para posteriores ensayos de ELISA, mientras que el pellet se resuspendió en TRIzol, permitiendo preservar el material génico para realizar luego ensayos de PCR cuantitativa.

La colonización fúngica se determinó por recuento de UFC a partir de sangre entera (fungemia) o en homogenatos de riñón y cerebro.

En otros experimentos, el riñón y el cerebro de ratones infectados de la misma forma se obtuvieron para realizar estudios histopatológicos y ensayos de microscopía de fluorescencia.

La calidad de la infección sistémica por *C. albicans* se valoró por el recuento de UFC en riñón, ya que es considerado el “órgano centinela” debido a su conocido mecanismo de filtración sanguínea, permitiendo monitorear el éxito de la misma (125).

El diseño experimental empleado en este trabajo tiene la aprobación del Comité de Ética y Protocolos Experimentales de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba. CICUAL: EXP-UNC: 0024951/2019.

Recuento de Unidades Formadoras de Colonias

Para evaluar la colonización de *C. albicans* durante la cinética planteada en los diferentes grupos experimentales, se procedió a realizar el recuento de UFC en muestras de sangre, cerebro y riñón.

Los órganos se adquirieron y se pesaron en condiciones de esterilidad, y se obtuvo el homogenato por disgregación mecánica con 3ml de PBS estéril. El volumen de muestra cultivado se determinó por el método de dilución en placa (226). Para riñón se estableció un volumen de siembra de 50µl de la suspensión pura en placas de Petri, mientras que para cerebro y sangre el volumen de muestra plaqueado fue de 100µl. Estos volúmenes contienen entre 30 y 300 UFC/placa, rango considerado estadísticamente representativo y confiable para esta técnica.

En todos los casos, cada muestra se cultivó por duplicado en medio ASG y se incubaron en estufa a 37°C durante 24h, para permitir el desarrollo de las

colonias. La carga fúngica en sangre y homogenatos se informó como el número total de colonias por mililitro (ml) o por gramo (g) de tejido respectivamente.

Debido a que el cerebro se encuentra rodeado por la barrera hematoencefálica y por ende tiene un acceso restringido frente a patógenos, se debió realizar un control para asegurar que las UFC presentes en el homogenato de este tejido se encontraban efectivamente en el parénquima y no eran producto de la carga fúngica presente en la sangre circundante de las meninges. Para esto, 4h después de la infección los animales se perfundieron intracardiamente con 30ml de PBS estéril, a fin de eliminar la sangre circulante. Luego se removieron los órganos como se explicó anteriormente, y la carga fúngica determinada mediante UFC se comparó con las de los animales infectados sin perfundir.

Estudios Histopatológicos

En este trabajo, se desarrollaron diferentes técnicas para la visualización del patógeno y para el estudio de los cambios tisulares asociados a la infección. Los cerebros y riñones de todos los grupos estudiados se obtuvieron como se detalló anteriormente, y se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS por más de 24h.

Se deshidrataron por pasajes en alcohol, luego en xilol y se embebieron en parafina. Los preparados se seccionaron en cortes de 10 μ m de espesor para luego ser teñidos por las siguientes técnicas:

- *Coloración de ácido peryodico de Schiff (PAS)*: determina la presencia de moléculas glucosiladas, como las existentes en la pared de *C. albicans*. Esta técnica se realiza con contra-tinción con hematoxilina (PAS/H), a fin de poder visualizar, además del hongo, los núcleos de las células (227).
- *Tinción Hematoxilina-Eosina (HE)*: mediante la tinción diferencial de núcleos celulares y citoplasma, permite visualizar la distribución celular, la estructura tisular, las características morfológicas, y distinguir infiltrados leucocitarios en un proceso inflamatorio. Los cortes teñidos se analizaron por microscopia óptica y las fotografías se tomaron con Microscopio de Fluorescencia AXIOPLAN, Zeiss con cámara digital DXM 1200, Nikon.

Determinación de Parámetros Moleculares

Enzimoimmunoensayo (ELISA)

A fin de evaluar la cinética de producción local de mediadores proinflamatorios y antiinflamatorios durante la infección sistémica, se procedió a realizar la determinación de la concentración de citoquinas mediante la técnica de ELISA tipo sándwich, a partir del SN de homogenatos de cerebro obtenidos como se explicó previamente. Las moléculas estudiadas fueron las citoquinas proinflamatorias Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF), interleuquina-1 beta (IL-1 β), interleuquina-6 (IL-6), y las citoquinas antiinflamatorias Factor de Crecimiento Transformante beta (TGF β) e interleuquina-10 (IL-10).

Las placas de 96 pocillos (Greiner Bio-One) se sensibilizaron con el anticuerpo de captura diluido en el buffer correspondiente (PBS pH7,2 para anti-TNF, anti-IL-1 β , anti-IL6; carbonato de sodio 0,1 M pH 9,4 para anti-TGF β o fosfato de sodio- 0,2 M pH 6,5 para anti-IL-10) y se incubaron ON a 4°C en cámara húmeda. Luego se realizaron 3 lavados con PBS-Tween 20 al 0,05% y se procedió a realizar el bloqueo con las soluciones correspondientes (PBS-Tween al 5% para TGF β o PBS-SFB al 10% para el resto de las citoquinas) a TA durante 1h, a fin de evitar reacciones inespecíficas. Luego de lavar 3 veces, se sembraron 25 μ l de muestra por pocillo (placas de medio volumen) y se incubaron durante 2h a TA u ON a 4°C. Para realizar la curva de calibración de cada citoquina, se hicieron diluciones seriadas del estándar (proteína recombinante de concentración conocida) en la correspondiente solución de bloqueo, dejando dos pocillos sin reactivo para ser usados como blancos.

TGF β se encuentra en la matriz extracelular formando complejos multimoleculares con otras proteínas (228). Por este motivo, para su determinación, las muestras deben ser activadas antes de la siembra, permitiendo su liberación. Para ello se colocaron 50 μ l de SN en una placa de 96 pocillos y se trataron con 10 μ l de HCl 1N durante 10min a TA. Luego se neutralizó con 10 μ l de NaOH 1,2N/Hepes 0,5M. Las muestras así activadas, se sembraron en placas de ELISA junto con las demás.

Posteriormente, las placas se lavaron 5 veces e incubaron durante 1h a TA con sus respectivos anticuerpos de detección biotinilados, diluidos en solución

de bloqueo. Se realizaron 5 lavados y se incubó durante 30min a TA con el conjugado enzimático SAV-HRP (Streptavidina-Peroxidasa). A continuación las placas se lavaron 7 veces, y se agregó el sustrato de la enzima TMB (Tetrametilbencidina) y H₂O₂. Se dejó reaccionar por 30min o hasta que los blancos comenzaron a mostrar color. La reacción se frenó con H₂SO₄ 2N (12,5μl) y la absorbancia se determinó en un espectrofotómetro (lector de microplacas BIO-DAP modelo 680) a una longitud de onda de 450 nm, utilizando λ=540nm como valor de referencia.

Biología Molecular

Obtención de muestras

Los ratones de todos los grupos experimentales se sacrificaron a las 0, 4, 12, 24 y 48h pi y se les extrajo el cerebro. Se obtuvieron los homogenatos de los mismos como se explicó anteriormente y se centrifugaron a 5000 rpm durante 5min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en TRIzol (Thermo Fisher Scientific) en una proporción de 1ml/cerebro, a fin de preservar el material genético de las células.

Extracción de ARN

Para obtener el ARN, las muestras guardadas en TRIzol se dejaron descongelar a TA durante 5min aproximadamente, para luego ser tratadas con 0,1ml de cloroformo (Taurus, Argentina) por cada 0,5ml de TRIzol. Posteriormente se centrifugaron a 12.000g por 15min a 4°C, obteniendo de esta manera dos fases, quedando el ARN en la fase acuosa (superior). La misma se separó en otro eppendorf y el ARN se precipitó con 0,25ml de alcohol isopropílico (Sintorgan, Argentina). Se centrifugó nuevamente a 10.000rpm por 10'. Finalmente, el pellet obtenido se lavó con etanol (Dorwil, Argentina) 75% en agua, y luego se resuspendió en 30-50μl de agua destilada libre de ARNasa y ADNasa (Invitrogen).

La concentración de ARN se determinó por espectrofotometría, midiéndose la absorbancia de la muestra a 260nm (BioTek, EEUU). Las muestras se mantuvieron a -80 °C hasta su utilización(229).

La integridad del material genético obtenido se analizó corriendo 2 μ g de RNA en un volumen final de 10 μ l a 95V por 20-25min y observando la presencia de bandas definidas en el transiluminador.

Tratamiento con ADNasa y Retrotranscripción (RT)

Para evitar la posible contaminación de la muestra de ARN con vestigios de ADN que pudieran haber quedado del proceso de extracción, se decidió realizar un tratamiento con ADNasa. Para ello se tomaron 2 μ g de ARN y se trataron con 2U de ADNasa (Invitrogen) durante 15 minutos a TA. La reacción se detuvo con 2 μ l de EDTA 25mM y luego se llevaron al termociclador 10 min a 65°C. A partir de las muestras así tratadas se llevó a cabo la reacción de retrotranscripción para obtener el DNA copia (cDNA).

En todos los casos el cDNA se sintetizó a partir de 2 μ g de ARN en un volumen final de 15 μ l. Se estableció la siguiente Mix 1x para las reacciones de RT: 0,25 μ l de oligo (dT) (Biodynamics), 0,625 μ l de inhibidores de ARNasas (Promega), 0,5 μ l de dNTPs (Invitrogen), 1 μ l de la transcriptasa reversa Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) (Promega), 5 μ l de su buffer (buffer 5x M-MLV) y se llevó a volumen final con agua destilada RNasa/ADNasa free. El ciclado térmico se llevó a cabo en un termociclador MPI//02 y fue el siguiente: 5min a 65°C, 1 hora a 42°C y 10min a 70 °C. Las muestras de cDNA se almacenaron a -20°C hasta su utilización (230).

Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qPCR)

El ADNc obtenido a partir de tejidos y células se amplificó por qPCR. Para llevar a cabo la reacción, se preparó la siguiente Mix1x: 7,5 μ l de SYBR® Select Master Mix (Life Technologies), 0,5 μ l de *primer* Fw 1 μ M y 0,5 μ l de *primer* Rv 1 μ M de los genes de interés y se llevó a 10 μ l con agua destilada libre de ADNasa y ARNasa. Se sembraron 5 μ l de cDNA diluidos 1/5 y los 10 μ l de Mix en placas de 96 (Applied biosystems).

En la siguiente tabla se describen los *primers* específicos de ratón utilizados:

Tabla 1.

Gen	Forward Primer (Fw)	Reverse Primer (Rw)	Longitud (pb)
IL-1 β	5'CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG	5'GATCCACACTCTCCAGCTGCA	152
Dectin-1	5' CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG	5' TGCATTAATACGGTGAGACGATGT	100
RPLPO*	5'GGGCATCACCACGAAAATCTC	5'CTGCCGTTGTCAAACACCT	168

*RPLPO: gen de referencia

La reacción se realizó en un termociclador StepOne™ System (Life Technologies), donde el programa utilizado fue: 15seg a 95°C, 30seg a 60°C, 30 seg a 72°C, 40 ciclos. Para la obtención de la curva de disociación las condiciones fueron: 60seg a 95°C, 60seg a 65°C. Los resultados se analizaron con el software StepOne 2.2.2 (Applied biosystems).

Análisis para la cuantificación relativa de genes

La amplificación de genes por PCR en tiempo real permite cuantificar la expresión de un determinado gen de interés. En este caso, se recurrió a la cuantificación relativa, utilizando un gen de referencia que presente una expresión constitutiva. El método aplicado para esto fue el de $\Delta\Delta CT$ (230). En el mismo, se establece un parámetro denominado CT, que se define como el número de ciclo de la reacción de PCR en el cual la señal de fluorescencia supera un umbral arbitrario, determinado en la zona de fase exponencial de la reacción de amplificación. Para cada gen evaluado, los valores de CT se normalizan con los valores de CT correspondientes al gen de referencia en cada muestra, utilizando la siguiente fórmula: $\Delta CT = CT (\text{gen de interés}) - CT (\text{gen de referencia})$. Luego, se obtiene la expresión relativa del gen de interés en una muestra determinada expresando el ΔCT como $2^{-\Delta CT}$. El método también se aplica para determinar la expresión relativa de un gen en dos condiciones o muestras diferentes: $\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{condición A}) - \Delta CT (\text{condición B})$. De la misma manera, la expresión relativa del gen de interés se expresa como $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Técnicas de Inmunomarcación y Degeneración Neuronal

Fijación *in vivo* por perfusión y obtención de muestras

La fijación *ex vivo*, se realiza por inmersión del órgano entero en paraformaldehído (PFA), el cual penetra lentamente desde la superficie hacia el interior, hasta alcanzar la totalidad del tejido. Para los estudios histológicos descritos anteriormente, esta técnica de fijación resulta adecuada, ya que no afecta significativamente las estructuras de interés. Sin embargo, para algunos ensayos más sensibles es necesario que la fijación ocurra inmediatamente, a fin de conservar la estructura del órgano con la mayor integridad posible. En tejidos grandes como el cerebro, el fijador no llega a todas las regiones a la misma velocidad (231,232) y a menudo los cambios producidos en respuesta a la hipoxia pueden comenzar antes de que el tejido se pueda conservar (233).

Para el estudio de células gliales y daño neuronal, el cerebro debe encontrarse altamente conservado y con elevada integridad estructural. Por este motivo, se decidió realizar la fijación *in vivo* por perfusión a través del sistema circulatorio, a fin de que la solución llegase a todo el tejido rápida y uniformemente, preservando la estructura natural de los mismos.

Los animales se anestesiaron por vía intraperitoneal (ip) con 200µl de Ketamina/Xilacina (Ketonal₅₀/Xilacina₂₀ Richmond, Buenos Aires, Argentina) en la proporción establecida por el fabricante, o con hidrato cloral al 6% (400 mg/kg), hasta llegar al plano quirúrgico de anestesia (ausencia total de respuesta a estímulos). En estas condiciones, se expuso el corazón de los ratones, se introdujo una aguja de calibre 27g en el ventrículo izquierdo y luego se realizó el corte de las venas cavas a la altura de la aurícula derecha, permitiendo la salida de la sangre y del líquido inyectado.

Se realizaron dos protocolos de perfusión, resultando indistinto al momento del análisis. En algunos casos se hizo circular un volumen de 20ml de PBS para eliminar la sangre circundante y luego se administraron 30ml de PFA 4%. En otros, en cambio, se hizo circular una solución de lavado que contenía glucosa 0,4%, sucrosa 0,8% y cloruro de sodio 0,8%, seguido de 300 ml de PFA al 4% en buffer borato 0,2 M pH 7,6. En este último protocolo, la solución inicial podría preservar mejor las células de la glía, por lo que este fue el método elegido para la posterior evaluación de daño y muerte neuronal. El procedimiento se realizó a

una velocidad controlada y constante, teniendo en cuenta las presiones fisiológicas de la especie (234,235), para lo cual se utilizó una bomba hidrostática.

Los cerebros permanecieron 12h en el cráneo del ratón antes de ser removidos. Posteriormente, se guardaron en PFA 4% durante 24-48h y luego se colocaron en una solución de sacarosa al 30% hasta su deshidratación. Transcurrido ese tiempo, los órganos se incluyeron en el crioprotector OCT (CRYOPLAST® medio de montaje para congelación. Biopack, Buenos Aires, Argentina) y se congelaron rápidamente con nitrógeno líquido o con spray congelante. Una vez obtenido el taco, se mantuvieron a -80°C hasta el momento de cortarlos.

Se realizaron cortes coronales de 15µm o 50µm de espesor, según el ensayo a realizar, mediante el uso del criostato (SHANDON CRYOTOME E. Thermo Scientific), abarcando las diferentes áreas del cerebro (16,236). Los cortes de todo el órgano se realizaron en serie, destinando las secciones consecutivas a cada una de las técnicas a realizar, lo cual permite tener cortes representativos de cada área estudiada en particular.

Semicuantificación

Para los ensayos de marcación, se eligieron cortes al azar y se seleccionaron aleatoriamente un total de seis u ocho campos de cada sección, a fin de incluir las diferentes áreas del tejido. Para la cuantificación, se tomaron fotos de estas regiones con un aumento de 10x en el microscopio óptico o de fluorescencia, según el ensayo. Entre dos y tres cortes seriados de cerebro se montaron en portaobjetos tratados con hidruro de silicio (Star Frost® Adhesive Knittel Glass), que asegura la fijación de los tejidos mediante atracción electrostática o en vidrios tratados con una solución de gelatina al 1%. También se obtuvieron cortes en suspensión para la realización de inmunofluorescencia (IF) por *free floating*, los cuales se conservaron en una solución crioprotectora constituida por etilenglicol 30%, glicerol 30%, buffer fosfato 0,2M 10% y H₂O destilada 30%. En cualquiera de los casos, las muestras se guardaron en freezer a -20°C hasta su tinción.

Para la tinción A-Cu-Ag, los cortes se almacenaron en fijador hasta su uso, mientras que los destinados a tinción de FJB se mantuvieron en buffer fosfato 0,01 M pH 7,4.

La visualización de los cortes se realizó en microscopio de fluorescencia Leica DMI 8, con cámara monocromática y platina motorizada, utilizando el software Las-X, o en el microscopio óptico Nikon Eclipse TE 2000 U equipado con una video cámara digital para la toma de fotografías, de acuerdo a la técnica de marcación utilizada. Las imágenes se evaluaron mediante el programa FIJI ImageJ, y la cuantificación se expresó como la intensidad media de expresión por área de tejido.

Estudio de la Activación de Células Gliales

Microgliosis y Astrogliosis

Para evaluar la activación de las células gliales se procedió a estudiar por inmunomarcación los cambios producidos en astrocitos (As) y microglía (Mi) luego de la infección. Los ratones de todos los grupos experimentales descritos se sacrificaron a las 4, 24 y 48h y se obtuvieron los cerebros como se explicó anteriormente. La técnica se llevó a cabo indistintamente a partir de cortes montados en portaobjetos o cortes en suspensión.

Las técnicas utilizadas fueron inmunofluorescencia (IF) o inmunohistoquímica (IHQ), según el grado de sensibilidad requerida para cada ensayo, y se describen a continuación:

- Inmunofluorescencia en portaobjetos

Los vidrios se retiraron del freezer y se los dejó reposar durante 5min a TA. Luego se lavaron 2 veces por 5 min con PBS y se permeabilizaron con una solución de 0,3% de tritón y 1% de suero fetal bovino (SFB) en PBS durante 35min. Transcurrido ese tiempo, los cortes se bloquearon con SFB al 1% en PBS por 1h a TA en cámara húmeda.

Para determinar la astrogliosis, se llevó a cabo una IF directa utilizando un anticuerpo anti-GFAP de ratón (ratón anti-ratón), específico para el marcador de

linaje GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*) (Millipore), conjugado con el fluorocromo Alexa Fluor-488 en la dilución correspondiente (1/500), en Tritón al 0,1% y SFB al 1% en PBS. Se incubó *over night* (ON) a 4°C en oscuridad.

Para estudiar microgliosis, en cambio, se realizó una IF indirecta utilizando un anticuerpo primario específico para microglía (185), anti-Iba-1 (cabra anti-ratón) (abcam) (1/200) y, luego de la incubación ON a 4°C, se lavó dos veces con PBS y se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario (anti-cabra) (ThermoFisher), marcado con Alexa Fluor-568 (1/500) por 2h a TA.

Para ambas determinaciones, luego de las incubaciones correspondientes, las muestras se lavaron 3 veces con PBS para eliminar el anticuerpo excedente. A fin de visualizar la estructura nuclear de las células estudiadas, se tiñeron también con DAPI (Diclorhidrato de 4', 6-Diamidino-2-Fenilindol) (Molecular Probes) por 20min a TA, al resguardo de la luz. Durante todos los pasos, es de suma importancia que las muestras permanezcan hidratadas, por lo que se mantuvieron siempre en cámara húmeda. Finalmente los vidrios se lavaron con PBS y se montaron con FluorSave (Calbiochem).

- Inmunofluorescencia en secciones de tejido libre flotante (*free floating*)

Para los cortes en suspensión, se desarrolló el protocolo de IF *free floating*. Los cortes conservados en la solución crioprotectora se lavaron con PBS 3 veces, y se permeabilizaron durante 1h a TA en una solución de peróxido de hidrógeno 10%, metanol 10% y PBS 80%. Luego se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con el Ac primario descrito, en este caso utilizando una dilución mayor (1/500), en PBS-SFB 1%, durante toda la noche a 4°C en agitador. Posteriormente se lavó 3 veces con PBS y se incubó con el Ac secundario en una dilución de 1/1000 durante 2h en agitador a TA. Luego los cortes se lavaron nuevamente y se tiñeron con DAPI. Finalmente se montaron en portaobjetos adecuados y se dejaron secar a TA.

- Inmunohistoquímica en secciones de tejido libre flotante (*free floating*)

Esta técnica se utilizó para revelar la expresión de Iba-1 en cortes de cerebro de ratones a las 4h luego de la infección, los cuales se encontraban almacenados a -20°C en una solución crioprotectora, como se describió. Para realizar la IHQ

en estas muestras, los cortes se incubaron con el anticuerpo primario anti Iba-1, de igual forma que para la técnica de IF explicada anteriormente.

El sistema de revelado ABC-DAB permite amplificar la señal mediante el uso de diaminobencidina (DAB) con un anticuerpo secundario biotinilado. Se preparó la solución ABC (VECTOR laboratorios), que corresponde al complejo Avidina/Biotina. Para esto, se colocaron cuatro gotas del reactivo A y cuatro gotas del reactivo B en una solución de PBS-SFB al 1% y se dejó reposar 20min antes de usar. Se colocó 1ml de esta solución en cada pocillo con los cortes correspondientes y se incubó durante 1h a TA en agitación. Se lavó 3 veces con PBS y se procedió a preparar la solución de revelado, para lo cual se mezclaron 3 partes de solución madre de DAB (100mg de DAB en 150ml de agua) en 10ml de buffer fosfato 0,4 molar. Inmediatamente antes de sumergir los cortes en esta solución, se colocaron 10µl de peróxido de hidrógeno puro. Los cortes de cerebro se incubaron por 10min en el agitador, y luego se sumergieron en PBS hasta su montaje. Una vez colocado en el portaobjetos, se dejaron secar a 37°C durante 24h. Finalmente, se colocó sobre cada corte una gota de xilol durante 5-10min y se los montó con DPX o líquido de montaje (bálsamo de Canadá).

Expresión de Arginasa-1 y NOS2

A fin de evaluar la polarización hacia los distintos perfiles de respuesta frente a la infección, se estudió la expresión de NOS2 y Arginasa-1 (Arg-1), enzimas características del fenotipo M1/M2, respectivamente. En este trabajo se realizó un ensayo preliminar, utilizando dos animales por grupo estudiado. Los ratones WT_{SC5314} y KO_{SC5314} se sacrificaron a las 48h pi y el cerebro se obtuvo por perfusión y fijación *in vivo*. Además se utilizaron animales control sin infectar de ambos *background* genéticos. Se realizaron cortes de 30µm de espesor mediante el uso del criostato y se llevó a cabo el protocolo de IF *free floating* descrito. Se utilizaron anticuerpos primarios anti-NOS2 (conejo anti-ratón) (Santa Cruz Biotechnology) en una dilución de 1/200, revelando con un anticuerpo secundario marcado con Alexa Fluor-633 (1/1000); para la detección de Arg-1, se utilizó un anticuerpo primario anti-Arginasa-1 (ratón anti-ratón) (BD) en una dilución 1/250, y se reveló con un anticuerpo Alexa Fluor 488 (1/1000).

Estudio de la Degeneración y Muerte Neuronal

Para determinar la presencia de procesos neurodegenerativos, se llevaron a cabo dos técnicas inespecíficas complementarias: la Técnica Amino-Cupro-Argentica (A-Cu-Ag) y Fluoro-Jade B (FJB) (237–239). Además, se evaluó la muerte celular por apoptosis mediante la técnica de IHQ utilizando un marcador específico para este proceso. Los ratones de los grupos experimentales WT y KO se perfundieron con fijador *in vivo*, como se describió anteriormente. También se obtuvo el cerebro de los correspondientes controles sin infectar para ambos *background* genéticos. Para estos ensayos, los cortes debieron ser de un espesor de 50µm.

- Tinción A-Cu-Ag

Es una técnica muy sensible para teñir pericarion, dendritas, axones del tallo y sus ramificaciones terminales degeneradas en el cerebro. Las secciones se enjuagaron en agua doblemente destilada y se incubaron en una solución de impregnación previa de nitrato de plata a 50°C. Después de enfriar a temperatura ambiente, se enjuagaron con acetona y se transfirieron a una solución concentrada de diamina de plata durante 40min. Luego se sumergieron en una solución de formaldehído/ácido cítrico durante 25min y transcurrido ese tiempo la reacción se detuvo con ácido acético al 0,5%. El blanqueamiento se realizó en dos pasos para eliminar los depósitos no específicos de plata en el tejido: primero en ferricianuro de potasio al 6%, se lavaron en agua doble destilada y luego se transfirieron a permanganato de potasio al 0,06% durante 20s. Después de lavar las secciones nuevamente, se estabilizó en tiosulfato sódico al 2%, se lavaron, se transfirieron a una solución fijadora durante 1 minuto y luego las secciones se montaron y se colocaron en un calentador deslizante (30°C) hasta que estuvieron completamente secas. Los portaobjetos secos se aclararon por inmersión en xileno durante 10min antes de cubrirlos.

- Tinción Fluoro-Jade B (FJB)

Es un derivado de fluoresceína que tiñe las neuronas que experimentan degeneración. Las secciones del cerebro se montaron en portaobjetos y se

sumergieron en una solución de hidróxido de sodio al 1% (etanol al 80%) durante 5min. Los portaobjetos se colocaron en etanol al 70% durante 2min y luego se enjuagaron con agua destilada 2min adicionales. Posteriormente, se transfirieron a una solución de permanganato de potasio al 0,06% por 10min y se sumergieron nuevamente en agua destilada 2min. La solución de tinción se preparó a partir de una solución madre de FJB al 0,01%, realizada de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La solución stock se diluyó añadiendo ácido acético al 0,1%, dando como resultado una concentración final de colorante de 0,0004%. La solución de trabajo se preparó dentro de los 10min antes de su uso y no se reutilizó. Los portaobjetos se tiñeron durante 20min y luego se enjuagaron en agua destilada (3min). Luego, los vidrios se colocaron en un calentador deslizante (50°C) hasta que estuvieron completamente secos. Posteriormente, se aclararon por inmersión en xileno durante 2min, antes del montaje.

El análisis microscópico de los preparados se efectuó por microscopia óptica y las fotografías se tomaron con Microscopio de Fluorescencia AXIOPLAN, Zeiss con cámara digital DXM 1200, Nikon o con el microscopio de fluorescencia Leica DMI 8, con cámara Leica monocromática, con platina motorizada y con el software Las-X, respectivamente.

- Inmunohistoquímica: detección de apoptosis *in situ*

Para evaluar la apoptosis neuronal, se realizó la técnica de IHQ utilizando anticuerpos para detectar caspasa-3 clivada, un indicador específico de muerte celular programada.

Los ratones WT y KO se infectaron y sacrificaron a las 24 y 48h, como se describió anteriormente, se recuperaron los órganos y se realizaron los cortes en el criostato. La técnica se llevó a cabo en suspensión (*free floating*) como se detalló anteriormente.

Las secciones se incubaron primero durante 1h a TA en una solución de peróxido de hidrógeno al 3% y metanol al 10% en PBS 0,01 M, para extinguir la peroxidasa endógena. Luego las secciones se lavaron en 0,01 M de PBS y se incubaron en una solución de bloqueo de 5% de SFB durante 1 h. Después del bloqueo, las secciones se incubaron durante 48 h a 4°C con un anticuerpo policlonal anti-caspasa-3 clivada (conejo anti-ratón) (Cell Signaling Technology, Inc. Beverly, MA), en una dilución 1/800 en PBS-SFB 1% y se incubó ON a TA

en agitador. A continuación, las secciones se lavaron en PBS 0,01 M y se incubaron durante 2 h en anticuerpo secundario biotinilado (anti conejo) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, Estados Unidos) en una dilución 1/500 en la misma solución y se incubó 2h a TA. Finalmente, las secciones se incubaron durante 5 minutos con una solución que contenía 0,05% de 3-30 -diaminobencidina tetrahidrocloruro y 0,01% de peroxidasa de hidrógeno. Las secciones se montaron en portaobjetos gelatinizados, se deshidrataron y se cubrieron con cubreobjetos.

Análisis Estadístico

Los experimentos se realizaron por triplicado, a menos que se especifique lo contrario. Los datos se expresaron como la media \pm Error Estándar de la Media (SEM). Las diferencias entre los grupos se evaluaron usando: T-Test, ANOVA de una o dos vías, según el experimento, seguido por el post test de múltiples comparaciones de Dunnett o de Bonferroni usando el software Prism (GraphPad, San Diego, CA). Valores de $*p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

RESULTADOS

“La mente que se abre a una nueva idea, jamás volverá a su tamaño original” Albert Einstein

CAPÍTULO 1

“La educación es el arma más poderosa que puedes usar para cambiar el mundo” Nelson Mandela

Caracterización de la infección diseminada y estudio de la respuesta inmune innata en cerebro murino durante la infección sistémica por *C. albicans*.

La infección sistémica con *C. albicans*, se caracteriza principalmente por tres etapas: la diseminación hematogena, la salida del torrente sanguíneo a través del endotelio y la colonización de tejidos profundos (60,240). Numerosos estudios señalan la importancia de los mecanismos inmunes innatos en la respuesta antifúngica y el impacto de este primer contacto con el patógeno en la evolución y condicionamiento del proceso infeccioso (155,162,241–243). Con esta premisa, nuestros estudios estuvieron dirigidos a evaluar los eventos tempranos de la interacción, ocurridos entre las 4 y 48h posteriores a la infección y a tiempos más prolongados como 7 y 15 d.

En el presente trabajo, se utilizó un modelo de infección *in vivo* por inoculación de levaduras viables de *C. albicans* en ratones de la cepa C57BL/6. Una vez establecido el modelo experimental, caracterizamos la progresión de la infección, evaluando parámetros fenotípicos asociados a la evolución del proceso, la colonización fúngica y la respuesta inflamatoria tisular.

Debido a la ausencia de conocimientos respecto a la patogenia de la infección en SNC, nuestro estudio se orientó a evaluar la activación de los mecanismos innatos locales, el estudio del perfil de citoquinas y la activación temprana de células residentes en cerebro durante las primeras 48h posteriores a la infección. A tiempos más prolongados, se estudió la carga fúngica en cerebro y riñón y la sobrevida de los animales. Los resultados obtenidos permitieron definir el comportamiento de la infección en un hospedador normal.

Infección sistémica por *C. albicans* y colonización renal

Manifestaciones clínicas y sobrevida

Con el objetivo de evaluar la progresión de la infección sistémica por *C. albicans*, se utilizaron ratones machos adultos de la cepa C57BL/6 (WT) inyectados por vía intravenosa (vi) con un inóculo infeccioso de $2,5 \cdot 10^5$ levaduras viables de *C. albicans* de la cepa de colección SC5314. Como controles se

incluyeron animales sin infectar (SI). Durante el desarrollo de este trabajo, estos grupos serán identificados como WT_{SC5314} y WT_{SI}, respectivamente. Transcurridas 4, 12, 24, 48h y 7d de la infección, los animales se pesaron y posteriormente se sacrificaron para llevar a cabo los estudios propuestos. Para evaluar la sobrevivencia de los animales durante el transcurso de la micosis, los ratones se monitorearon durante 15d posteriores a la inoculación del hongo.

Los procesos de infección sistémica conducen a la generación de mediadores inflamatorios que producen cambios metabólicos y de comportamiento, como letargo, pérdida de apetito y fiebre. Citoquinas proinflamatorias como IL-1 β o TNF, participan activamente en los mecanismos de inducción de anorexia y disminución de masa corporal (244). Para evaluar las manifestaciones asociadas a la progresión de la patología, se determinó la cinética de variación de peso corporal luego de la inoculación del hongo, y se los comparó con el grupo WT_{SI}. Los resultados se expresaron como el IPC, que indica la variación de peso corporal de los animales en cada tiempo evaluado, con respecto al peso inicial. Se puede observar que los ratones infectados sufren una marcada disminución del IPC en relación al grupo WT_{SI}, principalmente a tiempos prolongados (7d), donde la disminución de la masa corporal es próxima al 15% ($p < 0,001$) (Figura 5A).

El riñón es uno de los órganos más comprometidos durante la diseminación hematogena de *C. albicans* y su compromiso refleja la severidad de la infección (245). En diferentes modelos de candidiasis sistémica, la falla renal constituye un agravante de la patología y es considerada una posible causa de muerte (246,247). En el presente modelo, y a los tiempos estipulados, se obtuvieron muestras de sangre para evaluar los niveles de fungemia, y el riñón para establecer la magnitud de la infección en este órgano.

La carga fúngica en sangre se determinó mediante recuento de UFC por ml. Los resultados revelan una elevada fungemia a las 4h pi con respecto al grupo WT_{SI} ($p < 0,001$), que disminuye en forma gradual hasta su completa desaparición a las 48h pi (WT_{SC5314}4h vs WT_{SC5314}12h $p < 0.005$; WT_{SC5314}12h vs WT_{SC5314}24h $p < 0.001$) (Figura 5 B).

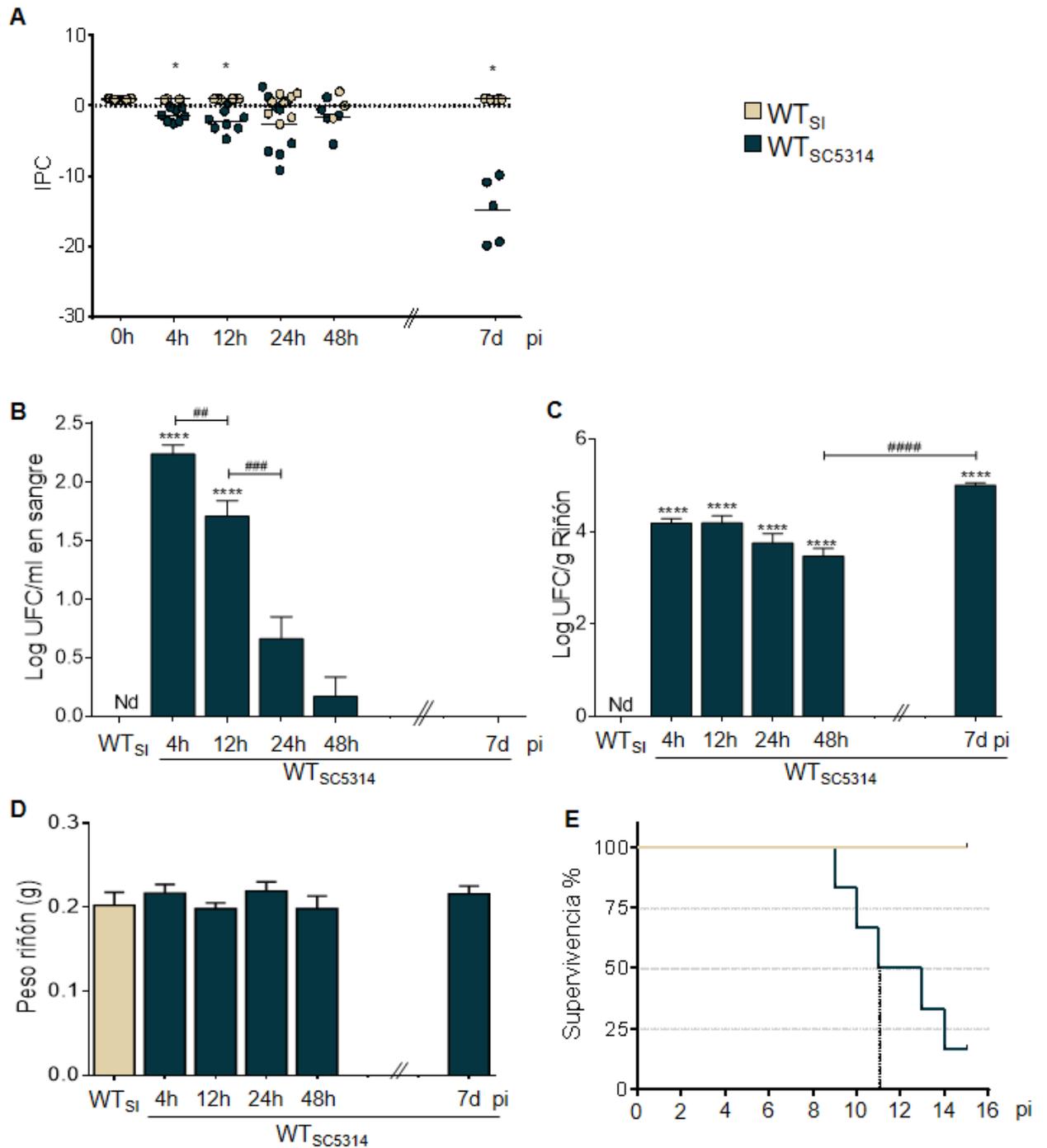


Figura 5. Características de la infección sistémica por *C.albicans* SC5314. Ratones machos adultos de la cepa C57BL/6 se infectaron iv con 2.5×10^6 levaduras viables de *C. albicans* de la cepa SC5314 (WT_{SC5314}). Determinación de la variación del índice de peso corporal (IPC) durante la cinética de infección comparado con animales sin infectar (WT_{SI}) (A). Recuento de UFC en sangre (B) y riñón (C), a las 4, 12, 24, 48 h y 7 días post-infección (pi), informadas por ml o por gramo de tejido, respectivamente. Análisis del peso de los riñones durante la cinética de infección (D). Porcentaje supervivencia de los animales durante 15 días pi (E). WT_{SC5314} vs WT_{SI} *p<0,05; ****p<0,001. Comparación entre grupos de animales infectados: ##p<0,05; ###p<0,01; ####p<0,001. Los valores representan la media \pm SEM. n \geq 4 para cada punto de la cinética.

La cinética observada en sangre coincidió con un aumento progresivo en el recuento de UFC a nivel renal, donde se observaron concentraciones significativas del hongo a partir de las 4h pi (Figura 5C); la carga fúngica en el órgano se mantuvo elevada y constante hasta las 48h pi ($p < 0,05$).

Interesantemente, al evaluar la infección renal a los 7d pi, los niveles de *C. albicans* continúan siendo elevados, presentando valores de UFC incluso mayores que los observados a las 48h pi ($p < 0,0001$) (Figura 5 C). Estos resultados evidencian la dificultad del animal de controlar eficientemente el crecimiento del hongo en este tejido y la persistencia de la infección.

Para determinar si la presencia sostenida de *C. albicans* en riñón provoca la hipertrofia y aumento del peso del órgano, los riñones provenientes de los grupos de animales WT_{SC5314} y WT_{SI} se extrajeron y se pesaron a los tiempos indicados. Se puede observar que luego de la infección, el peso del riñón no experimenta variaciones con respecto a los valores obtenidos en animales normales durante toda la cinética de estudio (Figura 5D).

La evolución y severidad de esta micosis se ve reflejada en el compromiso y daño en determinados órganos que comprometen la sobrevivencia del animal. En el presente modelo experimental se procedió a la evaluación de este parámetro. Durante los 15d posteriores a la infección, los animales se monitorearon diariamente y se registró la muerte de los mismos. Los resultados se expresaron como porcentaje de sobrevivencia. Se puede observar que este parámetro disminuye gradualmente conforme transcurre la evolución del proceso; el 50% de sobrevivencia en este grupo de animales infectado se produjo en el día 11 posterior a la inoculación con *C. albicans* (Figura 5 E). Al finalizar el ensayo, a los 15d pi, solo el 16% de los animales del grupo WT_{SC5314} sobrevivió.

Invasión renal y características histopatológicas

La virulencia de los hongos patógenos se debe a la presencia de múltiples componentes fúngicos que permiten su crecimiento y desarrollo en el huésped.

Para poder invadir tejidos profundos y establecer una infección diseminada, *C. albicans* posee numerosos factores de virulencia altamente adaptados a los diferentes entornos y etapas de la infección (16,17,248,249). Uno de los atributos más importantes de este hongo es su naturaleza polimórfica. Se ha demostrado que la capacidad de transición desde levadura a una morfología de hifa en respuesta a señales externas está implicada en su patogenicidad. Las hifas son consideradas como la forma invasiva del hongo y es el morfotipo que se identifica con mayor frecuencia en el tejido infectado (36,248,250).

En respuesta a la llegada del agente patogénico a un determinado tejido se induce el reclutamiento de células inflamatorias, siendo los neutrófilos fundamentales para el control del crecimiento de *C. albicans* (60,123). Sin embargo, el infiltrado y activación excesivos de los mismos, se asocian al daño tisular e insuficiencia funcional de los órganos afectados en forma severa (60,125). Con el fin de evaluar los cambios tisulares asociados a la infección en este modelo experimental, realizamos estudios histopatológicos en cortes de riñón teñidos con PAS/H, técnica que pone de manifiesto no solo la presencia de los morfotipos fúngicos, sino también los focos de infiltrado inflamatorios desarrollados en respuesta a la presencia del patógeno (Figura 6).

Las microfotografías muestran la estructura normal de un riñón, correspondiente a un animal del grupo WT_{SI}, donde se aprecia la arquitectura típica del órgano y la morfología de los glomérulos (GR) y los túbulos renales (T) (Figura 6 A). A las 48h pi se puede observar la presencia de lesiones hemorrágicas (Figura 6 B, panel superior) e infiltrado inflamatorio (flechas amarillas) en la proximidad de los GR, los cuales muestran su estructura conservada a este tiempo de infección (Figura 6 B, panel superior). En los T, también pueden visualizarse neutrófilos (flechas amarillas) formando microabscesos o rodeando a las hifas de *Candida* (flechas rojas) (Figura 6 B, panel inferior).

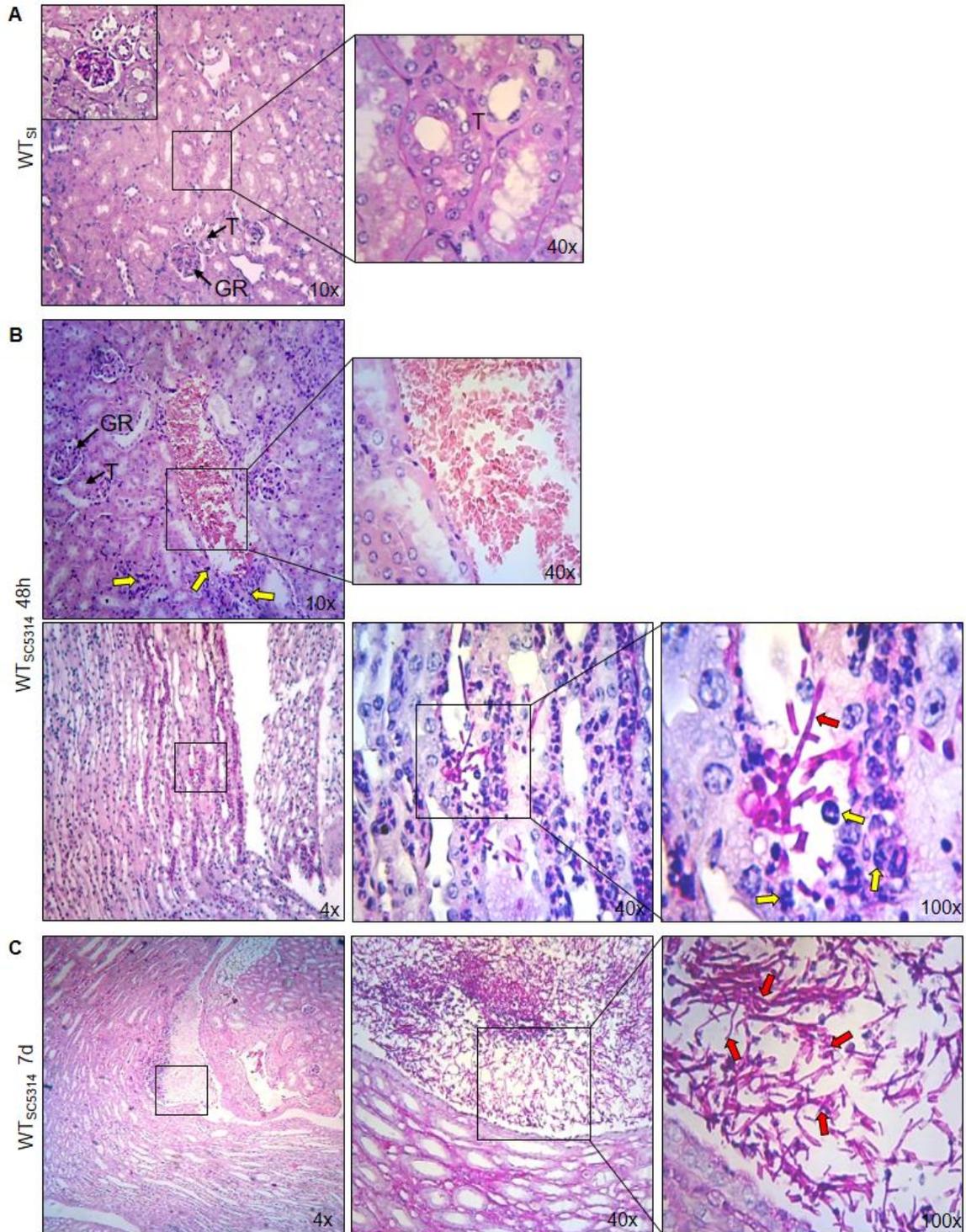


Figura 6. Hallazgos histopatológicos durante la infección renal por *C. albicans*. Imágenes representativas de cortes histológicos de riñón teñidos con PAS/H. Animales del grupo control sin infectar (WT_{SI}) **(A)**. Ratones machos adultos infectados iv con 2.5×10^6 levaduras viables de *C. albicans* SC5314 (WT_{SC5314}) sacrificados 48h post-infección; se observa presencia de focos hemorrágicos e infiltrados inflamatorios (flechas amarillas) (panel superior), presencia de hifas de *C. albicans* (flecha roja) y neutrófilos (flechas amarillas) (panel inferior), localizados principalmente en los túbulos renales **(B)**. Fotografías representativas de animales del grupo WT_{SC5314} a los 7d pi; se observa abundante presencia de hifas de *C. albicans* en la pelvis renal (flechas rojas) **(C)**. GR: glomérulo renal T: túbulo renal.

Al día 7 pi pudo observarse la presencia del morfotipo invasivo de *C. albicans* formando empalizadas o grandes acúmulos en la pelvis renal, evidenciando el sobrecrecimiento fúngico y la pérdida en la arquitectura del órgano, con compromiso de estructuras vitales para su funcionalidad (Figura 6 C).

En su conjunto, los resultados obtenidos indican que, luego de la inoculación endovenosa, *C. albicans* se disemina por el torrente sanguíneo y es capaz de invadir órganos profundos como el riñón. Durante el transcurso de la infección se reclutan células inflamatorias, principalmente neutrófilos, aunque resultan incapaces de controlar el crecimiento del patógeno de manera eficiente. La persistencia del hongo, la marcada invasión tisular, la presencia de zonas hemorrágicas y la activación prolongada de las células inmunes, conducen a un daño renal inexorable. Como consecuencia de la severidad del proceso, la sobrevivencia de los animales se encuentra severamente comprometida durante la evolución de la forma diseminada de esta micosis.

Colonización del Sistema Nervioso Central por *C. albicans*

Invasión cerebral

La presencia de abscesos cerebrales causados por hongos productores de micosis profundas suele ser poco frecuente y generalmente está ligado a factores de riesgo predisponentes (251). Sin embargo, en pacientes que presentan candidiasis diseminada la probabilidad de encontrar hongos en el parénquima cerebral aumenta considerablemente (110,252).

Teniendo en cuenta esta premisa, se evaluó la capacidad de *C. albicans* para colonizar SNC durante el curso de una infección sistémica en el modelo experimental desarrollado. Para esto, ratones del grupo WT_{SC5314} se sacrificaron a tiempos tempranos 4, 12, 24 y 48h pi y más prolongados, 7d pi, con el fin de obtener los cerebros y evaluar parámetros de respuesta local a la infección. La carga fúngica intracerebral se determinó mediante el recuento de UFC. Los resultados revelan una invasión cerebral temprana, pudiendo hallarse niveles elevados de UFC desde las 4h pi ($p < 0,001$) (Figura 7 A). A las 12h pi la carga

fúngica aumenta significativamente ($WT_{SC5314}4h$ vs $WT_{SC5314}12h$ $p<0,05$) y se mantiene elevada a las 48h pi. Luego de una semana de infección, el comportamiento de los animales fue variable; mientras que algunos pudieron efectuar la remoción completa del hongo, otros resultaron ineficientes en este proceso. El clearance promedio a los 7d pi fue de 85,6%.

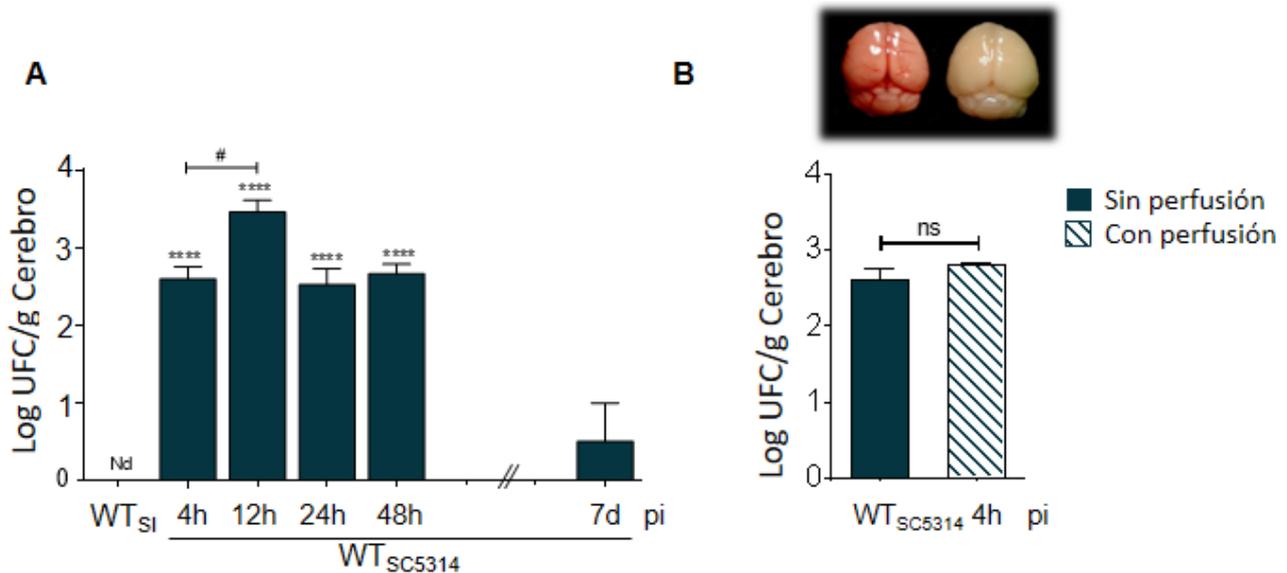


Figura 7. Cinética de colonización del SNC durante la infección sistémica por *C. albicans*. Ratones machos adultos de la cepa C57BL/6 se infectaron iv con 2.5×10^6 levaduras viables de *C. albicans* SC5314 (WTSC5314); a las 4, 12, 24, 48h y 7d pi se determinó la carga fúngica en homogenatos de cerebro mediante el recuento de UFC por gramos de tejido. Animales del grupo control sin infectar (WT_{si}) (A). Recuento de UFC/g de cerebro a las 4h pi en animales perfundidos y no perfundidos *in vivo* ($p=NS$) (B). WTSC5314 vs WT_{si}*** $p<0,001$. Comparación entre grupos de animales infectados: # $p<0,05$. Los valores representan la media \pm SEM. $n \geq 4$ para cada punto de la cinética.

Con el objetivo de establecer si la carga fúngica detectada a las 4h pi en cerebro corresponde a la invasión tisular por *C. albicans* y no a una contaminación hematogena por hongos presentes en la circulación sanguínea de las meninges, se procedió a determinar la carga fúngica intracerebral en un lote de animales perfundidos con PBS, previo a la determinación. Esto permitió eliminar la sangre circundante para realizar posteriormente el recuento de UFC, por lo que los valores obtenidos luego del tratamiento, corresponderán solo a aquellos hongos que se encuentran invadiendo el parénquima cerebral. Se pudo observar que la carga fúngica hallada en el cerebro de ratones perfundidos, no tuvo diferencias significativas con la que se obtuvo en animales sin perfundir

(Figura 7 B). Estos resultados confirman que 4h posteriores a la diseminación hematológica, *C. albicans* es capaz de infectar el tejido cerebral.

Hallazgos histopatológicos

A fin de poder evidenciar la presencia del patógeno en el tejido cerebral infectado, se llevaron a cabo estudios histológicos utilizando la tinción con PAS/H. Se muestra una microfotografía representativa de un animal del grupo WT_{SI}, correspondiente a la estructura normal del cerebro (Figura 8A).

A las 4h pi no pudieron visualizarse formas fúngicas (Figura 8B), mientras que a partir de las 12h pi se pudo observar el morfotipo invasivo del hongo en zonas profundas del parénquima cerebral (Figura 8C, flecha amarilla). A las 24h, se encontraron hifas de *C. albicans* dispersas en el tejido y, mientras que en algunas secciones no se observaron células infiltrantes, en otros cortes la presencia del hongo se asocia a neutrófilos que se encuentran localizados en las proximidades o rodeando al patógeno (Figura 8D). Las flechas negras indican la presencia de neutrófilos (panel medio) y la flecha amarilla señala una hifa del hongo (panel derecho).

A las 48h este fenómeno resulta más evidente y las hifas de *C. albicans* se observan en los acúmulos de células infiltrantes (Figura 8E, flechas amarillas y negras respectivamente). Transcurrida una semana de la infección, no pudieron visualizarse claramente formas fúngicas, aunque sí se observaron focos inflamatorios (Figura 8F, flechas negras).

Finalmente, es importante destacar que a las 4 y 12h pi no se observó infiltrado inflamatorio, indicando que en la respuesta primaria frente al patógeno, estarían participando los mecanismos locales, en los que las células residentes de la glía poseen un rol fundamental.

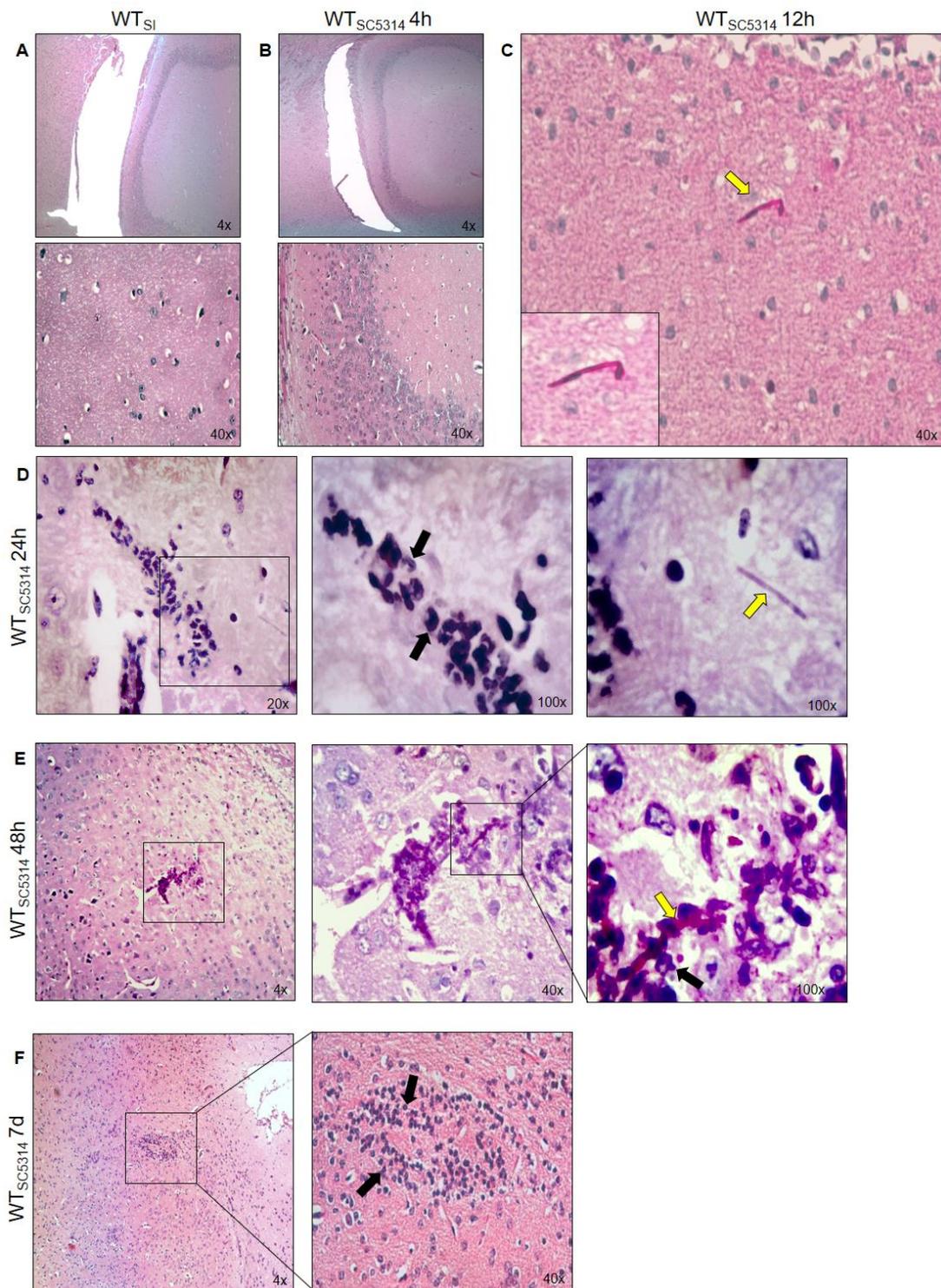


Figura 8. Hallazgos histopatológicos y visualización de *C. albicans* en cerebro durante la infección sistémica. Microfotografías representativas de cortes de cerebro teñidos con la técnica de PAS/H de animales sin infectar (WT_{Si}) (A), y animales infectados iv con 2.5×10^6 levaduras viables de *C. albicans* SC5314 (WT_{SC5314}) a las 4h (B), 12h (C), 24h (D), 48h (E) y 7d pi (F). Los neutrófilos infiltrantes y las hifas del hongo se señalan con flechas amarillas y negras, respectivamente.

A fin de estudiar con más detalle los cambios en la histología del cerebro de ratones infectados y la presencia de células infiltrantes, se realizaron cortes de cerebro y se tiñeron con H-E. La Figura 9 A corresponde al corte histológico del cerebro de un ratón del grupo WT^{si}, donde puede observarse la arquitectura normal del órgano. Tanto a las 4h como a las 12h pi, no pudieron hallarse focos de infiltrado inflamatorio en el parénquima cerebral (Figura 9 B y C, respectivamente).

A partir de las 24h pi se observaron microabscesos tisulares característicos (Figura 9D), que también se visualizaron en los estudios efectuados a las 48h pi (Figura 9E). La observación sistemática de las muestras permitió establecer que el infiltrado no se encontró asociado a regiones o áreas cerebrales determinadas, sino que se hallaron dispersos por todo el tejido, tanto próximos a capilares, en las zonas paraventriculares, cercanos a las meninges o profundos en el parénquima cerebral, en concordancia con lo descrito en pacientes (83). Pese a que el estudio de las UFC al día 7 reveló una marcada disminución de la carga fúngica en cerebro (Figura 7A), el análisis histológico señaló la persistencia de neutrófilos organizados en microabscesos luego de la semana de infección (Figura 9F, flechas negras), indicando que los procesos inflamatorios permanecen activos.

Estos resultados en su conjunto permiten establecer que luego de la diseminación hematogena, el hongo invade rápidamente el parénquima cerebral, donde posiblemente son las células residentes de la glía las primeras en tomar contacto con el hongo, hasta la aparición de células infiltrantes que contribuyen a orquestar una respuesta inflamatoria local más compleja.

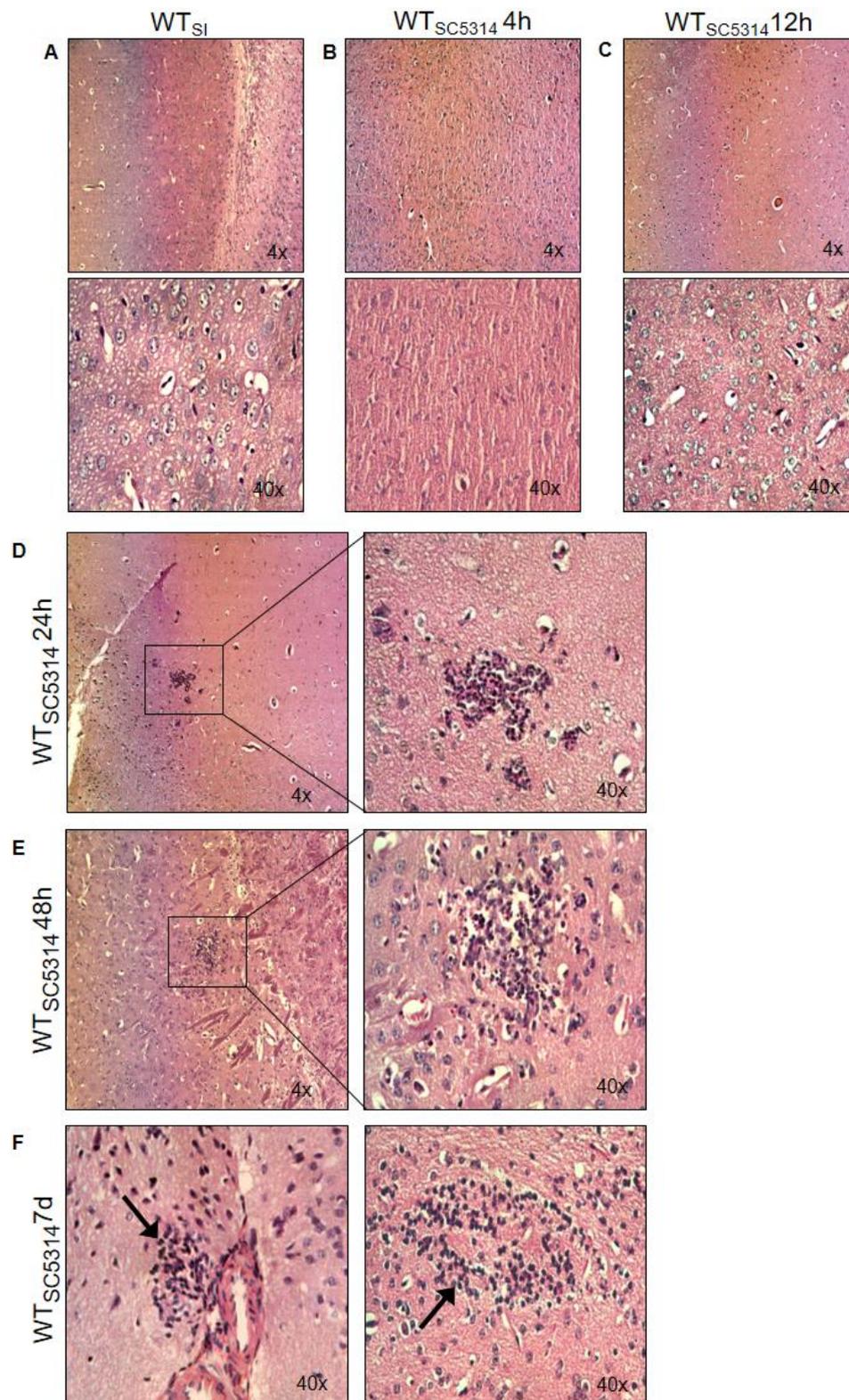


Figura 9. Hallazgos histopatológicos y respuesta inflamatoria en cerebro durante la infección con *C. albicans*. Microfotografías representativas de cortes histológicos de cerebro teñidos con la técnica de HE de animales del grupo de animales sin infectar (WT_{SI}) (A), y animales infectados iv con 2.5×10^6 levaduras viables de *C. albicans* SC5314 (WT_{SC5314}) a las 4h (B), 12h (C), 24h (D) 48h y (E) y 7d (F) pi. Los neutrófilos infiltrantes se señalan a mayor aumento o con flechas.

Mediadores inmunes en el microambiente cerebral

El SNC es un tejido con poca capacidad regenerativa, por lo que es indispensable proteger al cerebro de una inflamación exacerbada durante una infección o injuria. El inmunoprivilegio a menudo se le atribuye principalmente a la presencia de una barrera física, constituida por la BHE. Sin embargo, cada vez es mayor la evidencia sobre el rol de las células residentes del SNC y el microambiente cerebral para la regulación y mantenimiento de una respuesta inmune controlada (171,253,254).

En el SNC existe una expresión constitutiva de citoquinas antiinflamatorias (TGF β e IL-10) que permiten mantener un microambiente regulador. Sin embargo, en presencia de antígenos desconocidos o patógenos, las células de la glía son capaces de liberar concentraciones significativas de citoquinas proinflamatorias (TNF, IL-1 β e IL-6), poniendo en riesgo el delicado balance entre la eliminación del patógeno y el control de la inflamación (171,255).

Con el propósito de describir los cambios locales ocurridos durante las primeras horas de la infección y evaluar el comportamiento de las células residentes de la glía, en el presente trabajo se evaluó el perfil de citoquinas intracerebrales durante la infección sistémica con *C. albicans*. Para ello, se determinó la concentración de TGF β , IL-10, TNF, IL-1 β e IL-6 mediante la técnica de ELISA, a las 4, 12, 24 y 48h pi (Figura 10). Puede observarse que, tanto a nivel de proteína (panel izquierdo) como en su expresión génica (panel derecho), IL-1 β aumenta significativamente a las 12h pi y se mantiene elevada hasta las 24h pi. A las 48h pi se observa una disminución en la secreción, alcanzando niveles cercanos al basal (Figura 10 A). La secreción de IL-6 sigue una cinética similar a la descrita anteriormente, con una elevada secreción a las 12 h y una disminución significativa a las 48h (Figura 10 B). Por su parte, el estudio de TNF revela una máxima concentración a las 12h, recuperando los niveles basales a las 24h pi (Figura 10 C). En relación a los mediadores antiinflamatorios evaluados, los valores obtenidos para TGF β indican una marcada disminución a tiempos tempranos, 4 y 12h pi, recuperando los niveles basales a las 24h posteriores de la llegada del hongo (Figura 10 D). Debido al rol relevante de esta citoquina en el balance homeostático y en la regulación del nicho, este resultado constituye un interesante hallazgo y presenta marcado interés. Además, durante

la cinética estudiada no se observan picos de secreción de esta citoquina. En relación a los niveles intracerebrales de la otra citoquina antiinflamatoria evaluada, se observó que la concentración de IL-10 no se ve modificada por la infección en ninguno de los tiempos planteados (Figura 10 E).

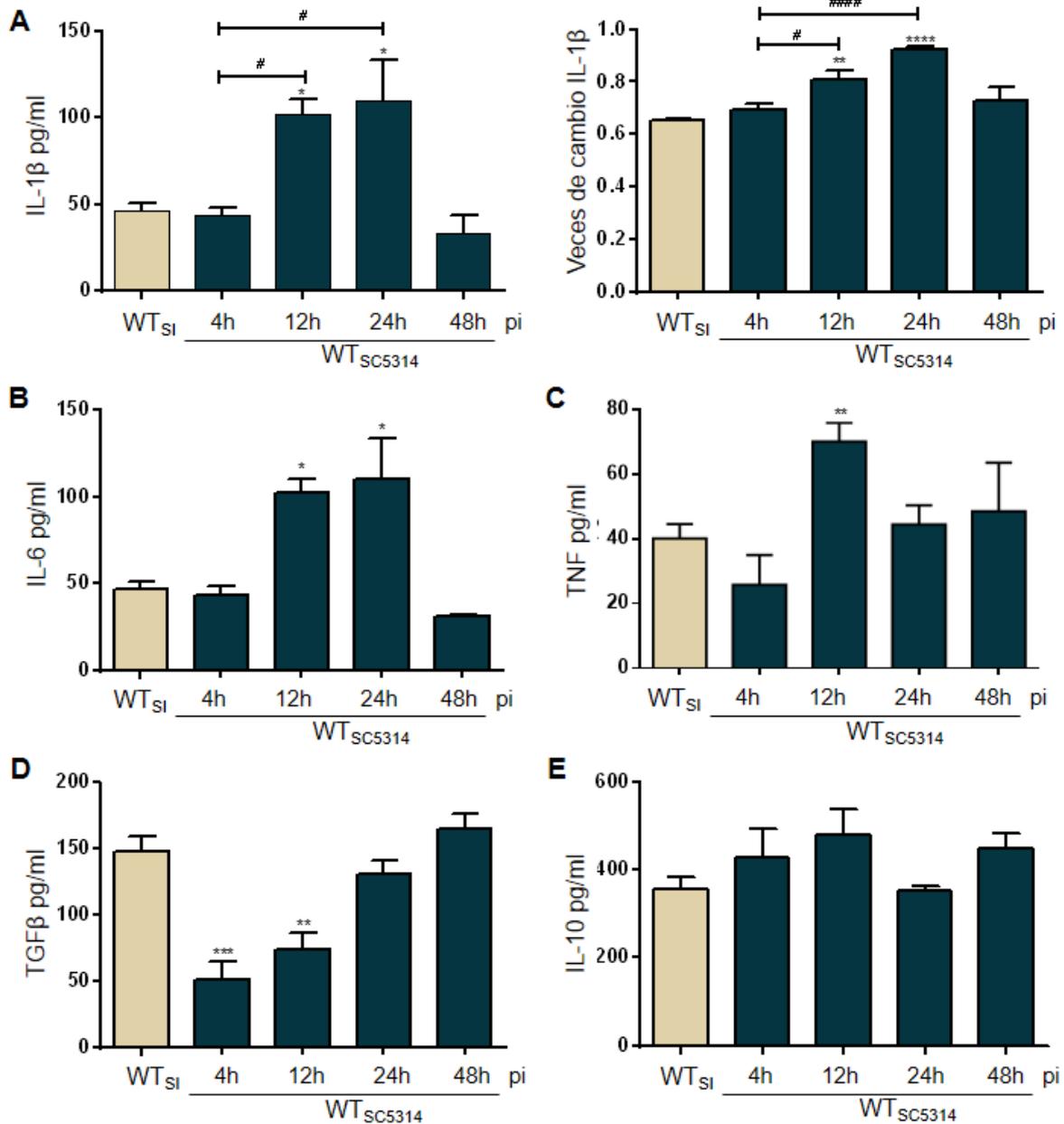


Figura 10. Perfil de citoquinas en cerebro durante la infección con *C. albicans*. Análisis de citoquinas en muestras de homogenato de cerebro en animales sin infectar (WT_{Si}) y en animales infectados (WT_{SC5314}) a las 4, 12, 24 y 48 h post-infección. Determinación de los niveles de proteína (panel izquierdo) y mRNA (panel derecho) de IL-1 β mediante la técnica de ELISA y qPCR, respectivamente (A). Concentración de IL-6 (B), TNF (C), TGF β (D) e IL-10 (E) determinada por la técnica de ELISA. WT_{SC5314} vs WT_{Si} *p<0,05; **p<0,01; ****p<0,001. Comparación entre grupos de infectados: #p<0,05; ####p<0,001. Los valores representan la media \pm SEM. n \geq 4 para cada punto de la cinética.

Los resultados obtenidos indican que, coincidente con la máxima carga fúngica intracerebral producida a las 12h posteriores a la infección sistémica (Figura 7A), se observa el pico máximo de producción de citoquinas proinflamatorias, que no fue modificado significativamente por la presencia del infiltrado inflamatorio detectado a partir las 24h. Interesantemente, el ingreso del hongo al parénquima cerebral a las 4h de la infección sistémica evidenciado por el recuento de UFC, estuvo acompañado por una significativa disminución de TGF β , citoquina considerada clave en la homeostasis del inmunoprivilegio local y en la inmunoregulación del microambiente cerebral. A las 48h posteriores a la infección y aún en presencia de una respuesta tisular organizada, el balance entre mediadores inmunes pro vs antiinflamatorios retorna al equilibrio inicial.

Activación de células gliales

La respuesta inmune innata en el cerebro se atribuye principalmente a la activación de la microglía, aunque muchos estudios publicados indican que los astrocitos también pueden jugar un papel relevante (256,257).

Durante la infección cerebral, las células residentes de SNC sufren cambios tanto estructurales como funcionales. La morfología de la microglía en reposo muestra procesos ramificados finos, orientados radialmente desde un pequeño soma elíptico (171). Tras el reconocimiento del patógeno, la microglía adopta una forma ameboide y fagocítica, con hipertrofia del soma celular, retracción de ramificaciones y *up*-regulación o síntesis *de novo* de moléculas de superficie o intracelulares.

Por otro lado, frente a una infección, los astrocitos se someten a un proceso complejo denominado "astroglisis reactiva", considerado el sello patológico de las lesiones estructurales del SNC. Durante este proceso, los astrocitos sufren un aumento en la expresión de GFAP, hipertrofia, proliferación y superposición pronunciada de procesos, que da como resultado la alteración de los dominios de astrocitos individuales (256–258).

Con el objetivo de evaluar los cambios tempranos en las células residentes producidos luego de la infección cerebral y durante la primera interacción con el hongo, se procedió a realizar técnicas de inmunomarcación con el fin de visualizar los cambios morfológicos asociados a su activación, tanto en los astrocitos como en la microglía. A tal fin, se realizaron cortes histológicos de cerebro de ratones WT_{SI} y de animales WT_{SC5314} a las 4h posteriores a la inoculación de *C.albicans*, y se marcaron con anticuerpos específicos para cada una de las poblaciones de células gliales residentes de tejido.

La activación de la microglía se evaluó mediante la técnica de IHQ, utilizando un anticuerpo específico para esta población, anti-Iba-1. Para detectar la inmunomarcación se utilizó un sistema de amplificación de señal empleando DAB, que permitió una mayor sensibilidad y mejor visualización de las células Iba-1+ y sus cambios morfológicos, que la obtenida cuando la técnica de inmunofluorescencia fue utilizada.

El análisis de la inmunomarcación se efectuó por un lado, haciendo referencia a los cambios morfológicos experimentados por la microglía en estado de activación (190,259), y por otro lado, mediante la semicuantificación del marcador, expresado como la intensidad media de expresión para Iba-1.

En la Figura 11 A se muestran microfotografías representativas de cortes histológicos de cerebro de animales WT_{SI} (panel izquierdo) y de ratones del grupo WT_{SC5314} (panel derecho) obtenidos a las 4h pi. Las imágenes revelan engrosamiento de los procesos de la microglía luego de la infección, coincidente con la morfología ameboide característica de la activación; también se observan zonas donde la inmunomarcación revela células microgliales ramificadas o en reposo. En los cortes histológicos correspondientes al grupo WT_{SI}, la microglía se encuentra en su estado fisiológico con morfología típica de células principalmente en reposo.

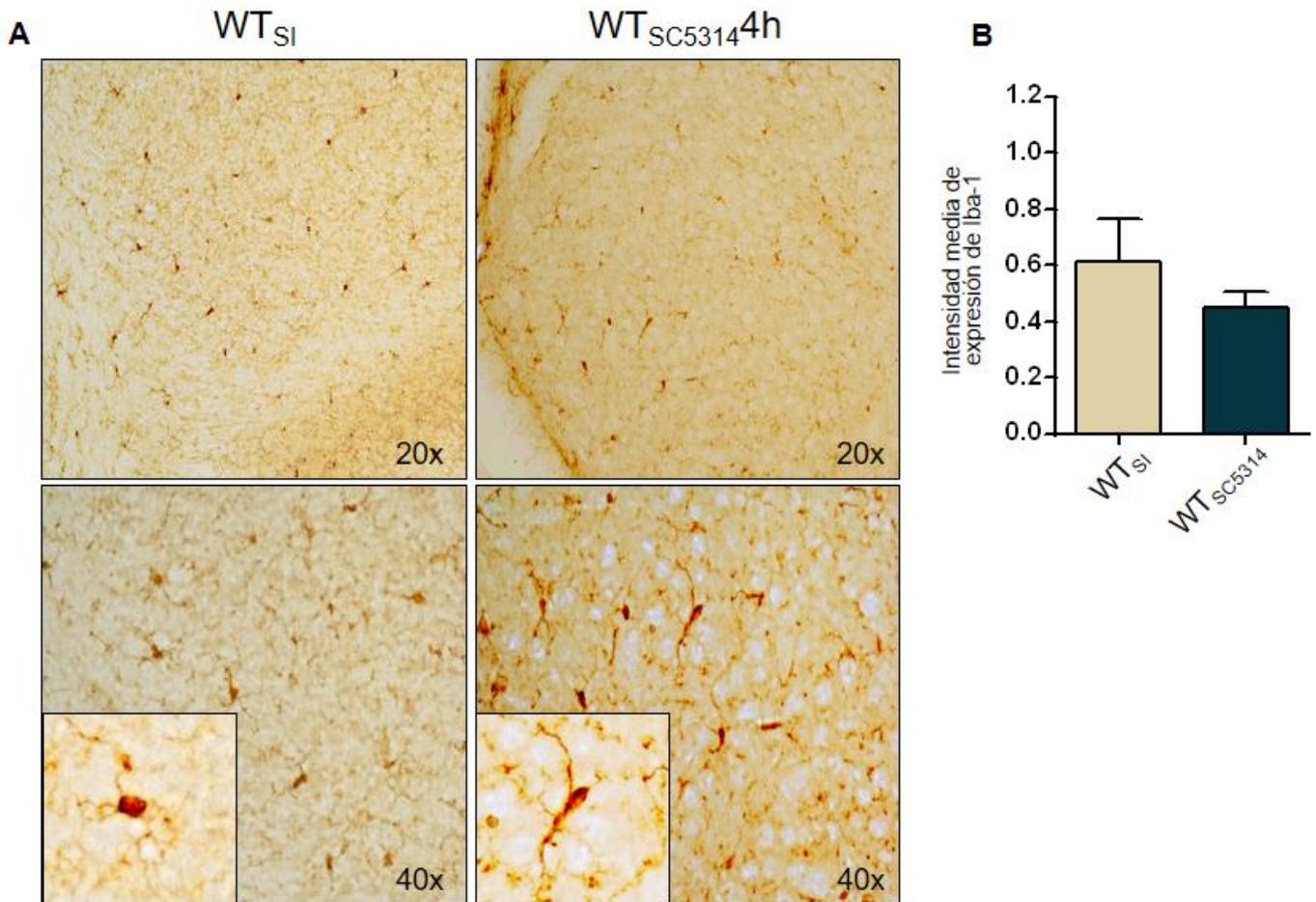


Figura 11. Expresión de Iba-1 en cerebro de ratones WT infectados con *C. albicans*. Imágenes representativas de cortes de cerebro marcados con anticuerpo específico para Iba-1 y revelado con DAB. Análisis morfológico de la microglía de animales WT infectados con la cepa SC5314 (WT_{SC5314}) a las 4h pi (panel derecho) vs ratones sin infectar (WT_{SI}) (panel izquierdo) (A). Cuantificación la media de expresión para el marcador de microglía en diferentes áreas del cerebro, expresado como intensidad media de expresión para Iba-1 (B). Los valores representan la media \pm SEM. n=3 Fotografías obtenidas con un microscopio de fluorescencia LEICA DMI8, con el software Las-X. La semicuantificación de la fluorescencia se realizó con el software ImageJ FIJI. (Ver Materiales y Métodos).

El estudio semicuantitativo de la intensidad de expresión para Iba-1, efectuado sobre distintas zonas del cerebro a fin de determinar la intensidad de expresión total, no permitió observar diferencias significativas entre los grupos de ratones estudiados (figura 11B). La distribución heterogénea de esta población y la ausencia de un tropismo de *C. albicans* por algún área del cerebro en particular, no permiten establecer diferencias en el fenómeno global.

Se evaluó también la activación de astrocitos mediante la técnica de inmunofluorescencia, utilizando un anticuerpo dirigido contra GFAP, marcador

específico de estas células, conjugado con Alexa Fluor-488. Los núcleos celulares se tiñeron con el colorante DAPI (Figura 12).

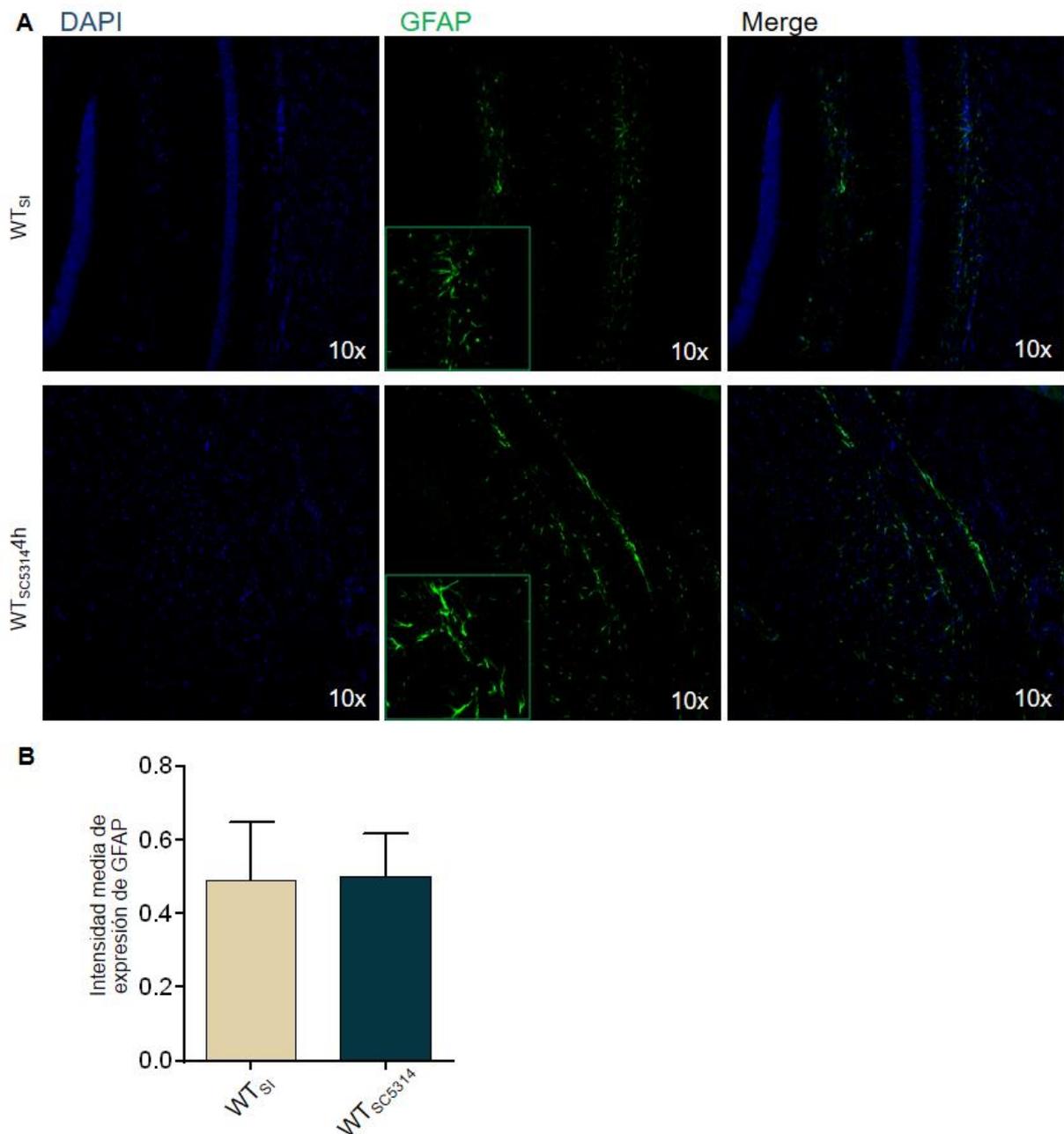


Figura 12. Expresión de GFAP en cerebro de ratones infectados con *C. albicans*. Imágenes representativas de inmunofluorescencia de cortes de cerebro de ratones sin infectar (WT_{si}) (panel superior) vs ratones WT infectados con *C. albicans* SC5314 (WT_{SC5314}) a las 4h luego de la infección (panel inferior) **(A)**. Semicuantificación de la expresión del marcador de astrocitos en diferentes áreas del cerebro, informado como intensidad de media de expresión de GFAP **(B)**. Los valores representan la media ± SEM. n=3. Fotografías obtenidas con un microscopio de fluorescencia LEICA DMI8, con el software Las-X. La semicuantificación de la fluorescencia se realizó con el software ImageJ FIJI. (Ver Materiales y Métodos).

GFAP es una proteína fibrilar, componente principal del citoesqueleto de los astrocitos. Tras su activación, esta proteína aumenta la expresión gradualmente, al mismo tiempo que ocurren cambios morfológicos, como hipertrofia celular, proliferación de astrocitos dispersos y cierta pérdida de los dominios individuales, con superposición de procesos de astrocitos vecinos (214).

La Figura 12 A muestra microfotografías representativas de cortes de cerebro de animales del grupo control WT_{SI} (panel superior) y ratones WT_{SC5314} a las 4h pi (panel inferior). La observación sistemática de los cortes permitió observar cambios característicos de la activación de los astrocitos luego de la infección, caracterizado principalmente por una mayor expresión de la proteína GFAP en algunas áreas del cerebro. Sin embargo, el estudio semicuantitativo de la intensidad de fluorescencia media para este marcador indica que, si bien existe una tendencia a la activación de los astrocitos y en varios cortes la expresión fue mayor, el análisis global no arroja diferencias significativas con respecto al grupo control WT_{SI} (Figura 12B).

Los resultados obtenidos luego de efectuar estos estudios, sugieren que el ingreso del hongo al parénquima cerebral es detectado por las células gliales, promoviendo cambios morfológicos compatibles con su activación.

Conclusiones capítulo 1

Durante la patogenia de la infección sistémica por *C. albicans*:

- La infección sistémica induce una progresiva disminución de peso corporal, siendo muy marcada a los 7d pi. El riñón es infectado durante las etapas tempranas de la diseminación hematogena del hongo (4h), presentando una sostenida y elevada carga fúngica a la semana de infección.
- En respuesta a la elevada carga fúngica en riñón, los ratones desarrollan una robusta respuesta inflamatoria, caracterizada por la presencia de infiltrados de neutrófilos. Sin embargo, esta respuesta no es suficiente para permitir la remoción y el control del hongo. El crecimiento y la invasión tisular por *C. albicans* provocan severos daños en el tejido renal con pérdida de la arquitectura del órgano y compromiso de estructuras relevantes para su función.
- A los 11d posteriores a la infección el 50% de los animales fallecen a consecuencia de la micosis y solo un 16% sobrevive a los 15 días.

Durante la patogenia de la infección cerebral por *C. albicans*:

- La infección cerebral ocurre rápidamente luego de la diseminación sistémica del hongo (4h). El morfotipo invasivo de *C. albicans* se observa desde las 12h posteriores a la infección y en ausencia de infiltrado inflamatorio.
- En respuesta a la elevada penetración de *C. albicans* en el parénquima cerebral, se reclutan células de la inmunidad innata periférica, principalmente neutrófilos (24h), que permiten la remoción del hongo en la mayoría de los animales y el control de la infección en este órgano.
- La infección cerebral induce la secreción local de citoquinas proinflamatorias a partir de las 12h posteriores a la infección; sólo la citoquina antiinflamatoria TGF β experimenta cambios significativos a las 4h. A las 48h posteriores a la infección, los mediadores inmunes evaluados retornan a los valores homeostáticos aún en presencia de infiltrado inflamatorio. Los cambios

observados entre las 4 y 12h posteriores a la infección sugieren una respuesta de las células residentes hacia *C. albicans*.

- A la 4h de la infección las células gliales residentes del tejido cerebral, microglía y astrocitos, experimentan cambios morfológicos que indican su activación.

CAPÍTULO 2

*“Si uno queda atrapado en una idea creyendo que es ‘cierta’
pierde la oportunidad de conocer la verdad” Buda*

Estudio del impacto del reconocimiento inmune β -glucanos/Dectin-1 durante la candidiasis diseminada y su rol en el desarrollo de la respuesta inmune innata en cerebro murino durante la infección sistémica por *C. albicans*.

El reconocimiento de β -glucanos presentes en la pared de los hongos por el receptor Dectin-1, juega un rol crucial en la inmunidad innata antifúngica (155,243,260,261). Tras su activación se induce el estallido respiratorio, la fagocitosis, y la producción de citoquinas y quimiocinas en células clave para la respuesta inmune, como macrófagos y células dendríticas (150,155,262). Sin embargo, también se describió que la habilidad de este receptor para inducir dichas respuestas, depende del tipo de célula involucrada y de la cooperación de otros receptores como los TLRs. Al presente, estas diferencias y particularidades no son completamente comprendidas. Mientras muchas de sus funciones clásicas son descritas en macrófagos periféricos, el mismo comportamiento no sería predecible para los macrófagos del SNC. El grupo de Keshvara y col. reportaron la presencia de Dectin-1 en células de la microglía y aportaron evidencia que indica que los β -glucanos son capaces de activar esta población celular, sin producir concentraciones significativas de citoquinas ni quimiocinas (263). A nivel molecular, el mecanismo propuesto es la inhibición de la señal generada por los TLRs, vía NF κ B (51), lo que determinaría una hipofunción en respuesta a la interacción con los β -glucanos.

Por su parte, los β -glucanos son compuestos ampliamente reconocidos como inmunomoduladores, y son capaces de modificar las respuestas biológicas según las condiciones en las que ocurra la interacción con su receptor. Estos polisacáridos pueden influir de manera positiva en la inmunidad del huésped actuando como potenciadores, o negativamente, suprimiendo la respuesta inmune (264–266).

Teniendo en cuenta esta dualidad respecto al rol biológico de los β -glucanos, la diversidad de respuestas que pueden desencadenarse a partir de su reconocimiento por el receptor Dectin-1, y en conocimiento de que el microambiente condiciona fuertemente el perfil de la respuesta, se decidió estudiar el rol de la activación del receptor Dectin-1 y su impacto en la respuesta antifúngica en cerebro durante la infección sistémica por *C. albicans*.

Su estudio se abordó desde dos perspectivas opuestas y complementarias: en primer lugar haciendo el enfoque desde el ligando (expresión en el patógeno) y en segundo lugar desde su receptor (expresión en el huésped). Con este propósito, en el primer abordaje experimental se utilizó una cepa de *C. albicans* defectiva en la expresión de β -glucanos, *C. albicans* FKS645 (*FKS1* S645P). En el segundo abordaje experimental, se utilizó una cepa de ratón en base genética C57BL/6 deficiente en el receptor Dectin-1 (*CLEC7A*^{-/-}). Los resultados obtenidos se presentan en dos secciones independientes, ya que en su desarrollo, se evaluó la contribución del patógeno o del huésped, y su impacto en la contribución de la infección.

PARTE I

El patógeno: *C. albicans* defectiva en β -glucanos

Los β -glucanos son los polisacáridos estructurales más importantes de la pared celular de *C. albicans*. Su síntesis es catalizada por un complejo enzimático situado en la membrana plasmática, la β -1,3-glucan-sintasa (GS), la cual está constituida por dos subunidades, denominadas FKS1 y FKS2 (267,268). Mutaciones génicas en dominios altamente conservados de estas proteínas provocan una reducción en la actividad de la GS, con la consecuente disminución del porcentaje de β -glucanos en la pared del hongo (41). Además, provoca cambios en la velocidad del crecimiento, puede alterar la morfología e inducir resistencia a algunos antifúngicos (39,41,267).

En este trabajo se utilizó una cepa de *C. albicans* que presenta una mutación puntual por sustitución del aminoácido Serina por Prolina en la posición 645, ubicada en el “*hot-spot* 1” de la región FKS1 del gen *fks1* (S645P), a partir de la cepa parental de *C. albicans* SC5314. Esta cepa presenta menor proporción de β -glucanos en comparación con su contraparte parental. La importancia de esta mutación se evidencia en estudios de aislados clínicos de *C. albicans* que presentan sustituciones de aminoácidos en Fks1 en Ser645, los cuales son resistentes a equinocandinas, tanto en levaduras con mutaciones homocigotas como en heterocigotas (267,269).

Infección sistémica por *C. albicans* FKS645 y colonización renal

Para establecer la infección sistémica en este modelo, ratones machos adultos se inyectaron por vía iv con un inóculo infectivo de $2,5 \cdot 10^5$ levaduras viables de *C. albicans* modificada genéticamente como se describió. El grupo de ratones C57BL/6 infectados con la cepa de *C. albicans* con menor proporción de β -glucanos en su pared, será nombrado durante el desarrollo de este capítulo como grupo WT_{FKS645}.

A fin de describir los parámetros de infección en este modelo, los resultados hallados serán planteados en primera instancia evaluando el comportamiento de los animales del grupo WT_{FKS645}, con respecto al grupo control WT_{SI} (ratones C57BL/6 sin infectar). Posteriormente, con el objetivo de determinar el impacto de la menor proporción de β -glucanos en la pared fúngica durante la candidiasis diseminada, los resultados obtenidos en el grupo WT_{FKS645} serán comparados con su contraparte parental, correspondiente a los animales WT_{SC5314} (ratones C57BL/6 infectados con la cepa de *C. albicans* SC5314).

Manifestaciones clínicas y sobrevida

La infección sistémica en el grupo WT_{FKS645} se evaluó durante la cinética establecida. A las 4, 12, 24, 48h y 7 días pi, los ratones se pesaron y se sacrificaron para obtener sangre y riñón. Para evaluar los parámetros asociadas a la progresión de la patología, se determinó el IPC para cada tiempo establecido y se los comparó con los valores obtenidos en ratones WT_{SI}.

En la Figura 13 A se muestra la cinética de variación del peso corporal de los animales de ambos grupos en el transcurso de la infección. Puede observarse una disminución significativa del IPC a partir de las 4h pi ($p < 0,05$) en comparación con los ratones WT_{SI}, que permanece significativa a las 12 y 24h posteriores a la inoculación del hongo ($p < 0,05$). A tiempos más prolongados (7d), la variación de este parámetro es mayor, con una marcada disminución de la masa corporal cercana al 18% ($p < 0,001$).

Como se mencionó anteriormente, para que se establezca una infección sistémica, es necesaria la diseminación del hongo por el torrente sanguíneo. Por este motivo, se evaluó la carga fúngica en sangre mediante el recuento de UFC por ml. Se puede observar una elevada fungemia a las 4h pi ($p < 0,0001$), que decae gradualmente a lo largo del estudio, logrando el clearance completo del hongo en la circulación a las 48h pi (Figura 13 B). En estudios efectuados a los 7d posteriores a la infección, el microorganismo no fue detectado.

El riñón constituye el principal órgano blanco durante la diseminación hematogena del hongo; es por ello que se evaluó las características de la infección renal con la nueva cepa en estudio (Figura 13 C). Se puede observar

que la cepa de *C. albicans* FKS645 es capaz de invadir rápidamente riñón, encontrándose en niveles significativamente elevados a partir de las 4h pi ($p < 0,001$). El recuento de UFC se mantuvo sostenido a lo largo de toda la cinética estudiada, sugiriendo que el animal es incapaz de eliminar al hongo eficientemente de este órgano luego de una semana de infección (7d $p < 0,001$).

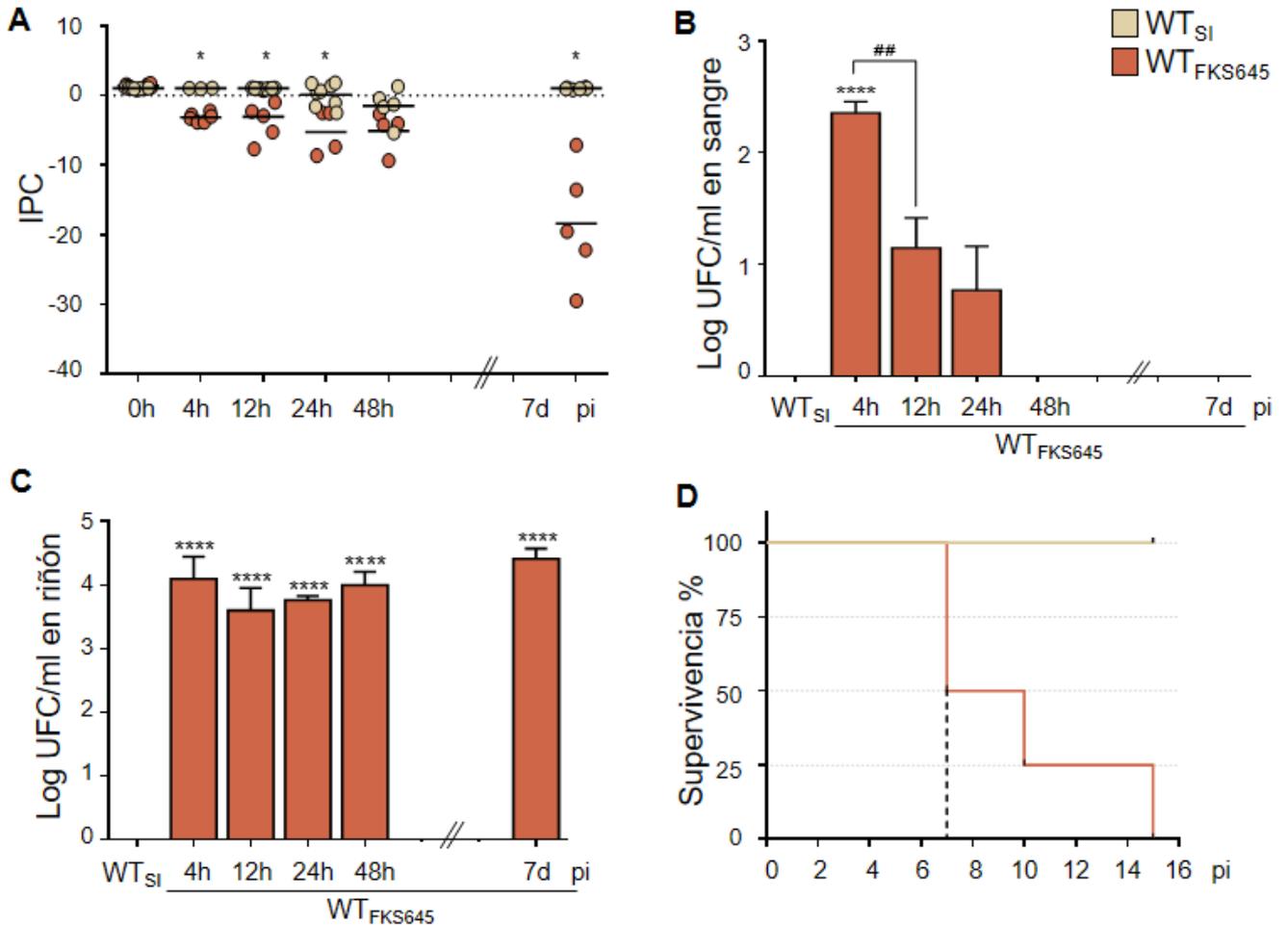


Figura 13. Características de la infección sistémica por *C. albicans* FKS645. Ratones machos adultos de la cepa C57BL/6 se infectaron iv con 2.5×10^6 levaduras viables de *C. albicans* de la cepa mutante FKS645 (WT_{FKS645}). Determinación de la variación del IPC durante la cinética de infección en ratones del grupo WT_{FKS645} comparado con animales sin infectar (WT_{SI}) (A). Recuento de UFC en sangre (B) y riñón (C), a las 4, 12, 24, 48h y 7d pi, informadas por ml o por gramo de tejido, respectivamente. Porcentaje de supervivencia de los animales durante 15 días pi (D). WT_{SI} vs WT_{FKS645} * $p < 0,05$; **** $p < 0,001$. Comparación entre grupos de infectados: ## $p < 0,05$. Los valores representan la media \pm SEM. $n \geq 4$ para cada punto de la cinética.

El impacto de la severidad de la infección con esta nueva cepa de *C. albicans* en estudio, se evaluó determinando la sobrevivencia de los animales infectados durante la progresión de la micosis, para lo cual los ratones se observaron diariamente por un período de 15 días y se registró su muerte. Los datos revelan una rápida disminución en el porcentaje de sobrevivencia, observándose un 50% de muerte en el día 7 pi. Al finalizar este ensayo a los 15d pi, el porcentaje de muerte alcanzó el 100% de los animales (Figura 13D).

Invasión renal y características histopatológicas

La invasión de los tejidos se caracteriza principalmente por la presencia de hifas del hongo y por el reclutamiento de células inflamatorias, siendo los neutrófilos considerados esenciales para la respuesta antifúngica. En estas condiciones, tanto los factores de virulencia propios del hongo, así como una inflamación exacerbada por parte de las células inmunes, pueden inducir daño tisular y provocar insuficiencia funcional de los órganos afectados.

Debido a la elevada carga fúngica hallada a nivel renal y al porcentaje de muerte observado en el grupo WT_{FKS645}, se decidió estudiar los cambios tisulares asociados a la infección con la cepa de *C. albicans* mutante, en cortes histológicos obtenidos a los 7d posteriores a la infección empleando la técnica de PAS/H.

La Figura 14 A muestra microfotografías de riñón del grupo de animales WT_{SI}, donde puede observarse la estructura típica del tejido, con presencia de GR y T con morfología normal (flechas negras). Al evaluar los cortes histológicos del grupo de ratones WT_{FKS645}, se observa una pérdida severa de la estructura tisular, con degeneración tubular y atrofia de los glomérulos. Las fotografías muestran además, abundantes masas de hifas ramificadas que ocupan gran parte de la pelvis renal (flechas amarillas), y se encuentran rodeadas por una abundante cantidad de células infiltrantes (flechas rojas) (Figura 14B).

El hallazgo de un aumento significativo en el peso del riñón a la semana de infección en comparación con el grupo WT_{SI} (media del peso de riñón: WT_{SI} 0,20 vs WT_{FKS645} 0,48) ($p < 0,001$), indica hipertrofia del órgano en respuesta a la cepa de *C. albicans* mutante (no mostrado).

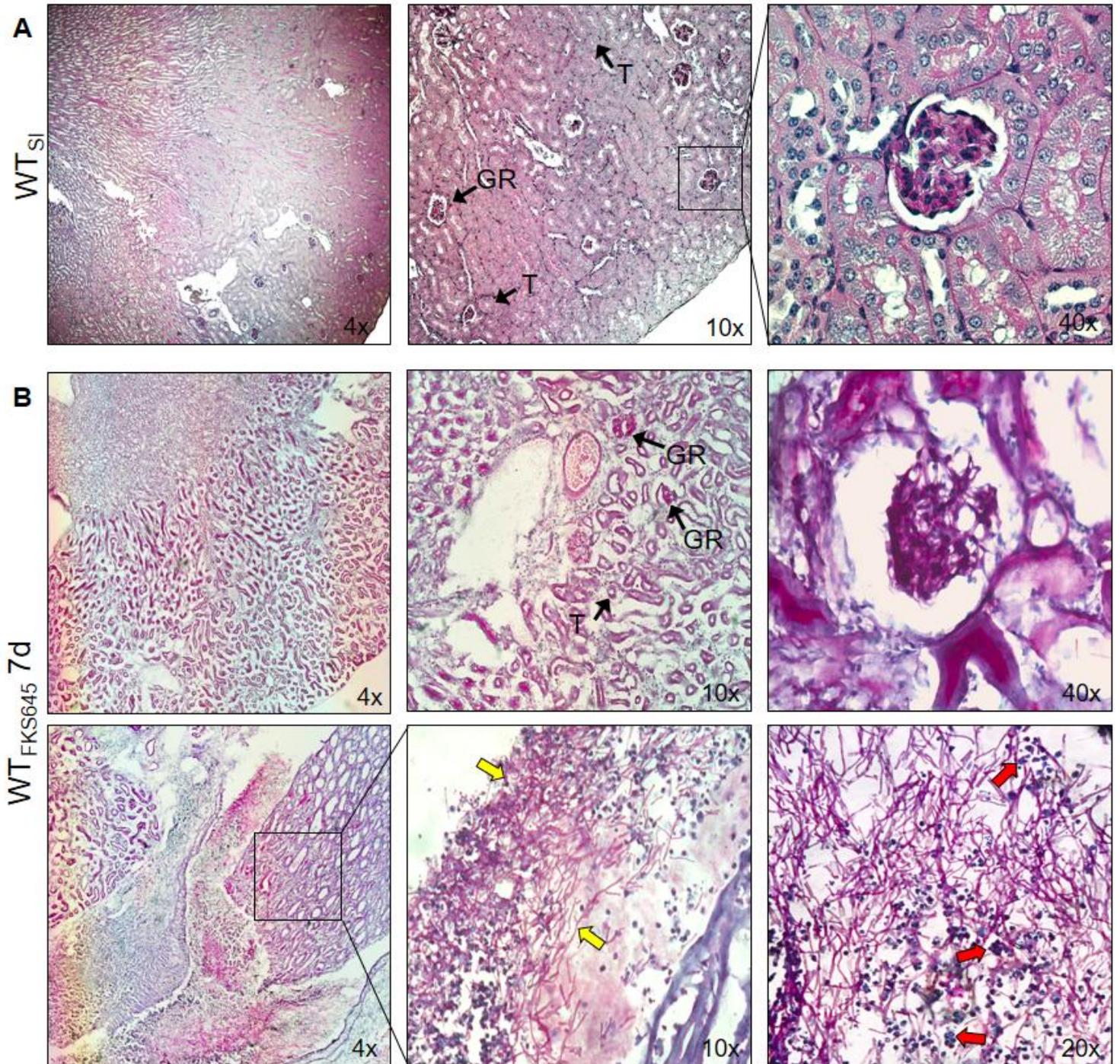


Figura 14. Hallazgos histopatológicos durante la infección renal por *C. albicans* FKS645. Fotografías representativas de cortes histológicos de riñón teñidos con PAS/H. Ratones del grupo control sin infectar (WT_{si}). La amplificación corresponde a un GR (A). Ratones machos adultos infectados iv con 2.5×10^6 levaduras viables de *C. albicans* FKS645 (WT_{FKS645}) sacrificados 7d pi. Se observa pérdida de la arquitectura del órgano, destrucción glomerular (panel superior), presencia de abundantes hifas del hongo en la pelvis renal (flechas amarillas) y células infiltrantes (flechas rojas) (panel inferior) (B). GR: glomérulo renal; T: túbulo renal. Fotografías obtenidas con un microscopio Nikon Eclipse TE 2000 U, equipado con una video cámara digital.

En la Figura 15 se muestra el análisis comparativo de los diferentes parámetros evaluados durante la infección sistémica producida con las cepas de *C. albicans* SC5314 y *C. albicans* FKS645, grupos WT_{SC5314} y WT_{FKS645}.

El estudio de la variación de peso corporal indica que, si bien a las 4h pi los animales infectados con la cepa defectiva en la expresión de β -glucanos presentan un IPC menor ($p < 0,05$), en el resto de los tiempos evaluados no se observaron diferencias significativas en este parámetro (Figura 15 A).

El estudio de las UFC en sangre revela un comportamiento similar entre ambos grupos experimentales. Los resultados muestran una elevada fungemia a las 4h para las dos cepas de hongo utilizadas, que decae gradualmente a lo largo de la cinética evaluada, observándose el clearance del hongo a las 48h pi (Figura 15B).

La comparación de la carga fúngica a nivel renal entre ambos grupos de animales WT_{SC5314} y WT_{FKS645}, no mostró diferencias en el recuento de UFC en las primeras horas de la infección (4 y 12h pi). Sin embargo, los ratones infectados con la cepa mutante presentaron mayores niveles del hongo a las 24h pi ($p < 0,005$), mientras que a los 7d pi el perfil observado fue inverso, encontrándose una carga fúngica significativamente mayor en animales infectados con la cepa de *C. albicans* parental SC5314 ($p < 0,05$) (Figura 15C). No obstante, durante la infección con las distintas cepas del hongo, las UFC se mantienen elevadas durante toda la cinética estudiada, indicando que el ratón es incapaz de controlar la infección y eliminar por completo a *C. albicans* a nivel renal, independientemente de la proporción de β -glucanos presentes en la pared del hongo.

La evolución y severidad de esta micosis desarrollada en los grupos de animales infectados con las diferentes cepas del hongo también fue analizada comparando la sobrevivencia de los dos grupos experimentales. El estudio indica un mayor porcentaje de muerte en el grupo WT_{FKS645}, donde el 50% de los animales infectados muere a los 7d pi, mientras que el tiempo medio de supervivencia en los animales inoculados con la cepa de *C. albicans* SC5314, corresponde a los 11d pi. Al tiempo final del estudio, el 100% de los ratones infectados con la cepa

mutante mueren, mientras que el grupo WT_{SC5314} presenta una sobrevivencia del 16% al día 15 pi (Figura 15D).

La hipertrofia del riñón en animales infectados con la cepa mutante fue más evidente a la semana de infección en comparación con el grupo WT_{SC5314}, donde el peso del órgano resultó ser significativamente mayor en el grupo WT_{FKS645} (media del peso de riñón: WT_{SC5314} 0,22 vs WT_{FKS645} 0,48), con un incremento de 2,2 veces ($p < 0,0001$).

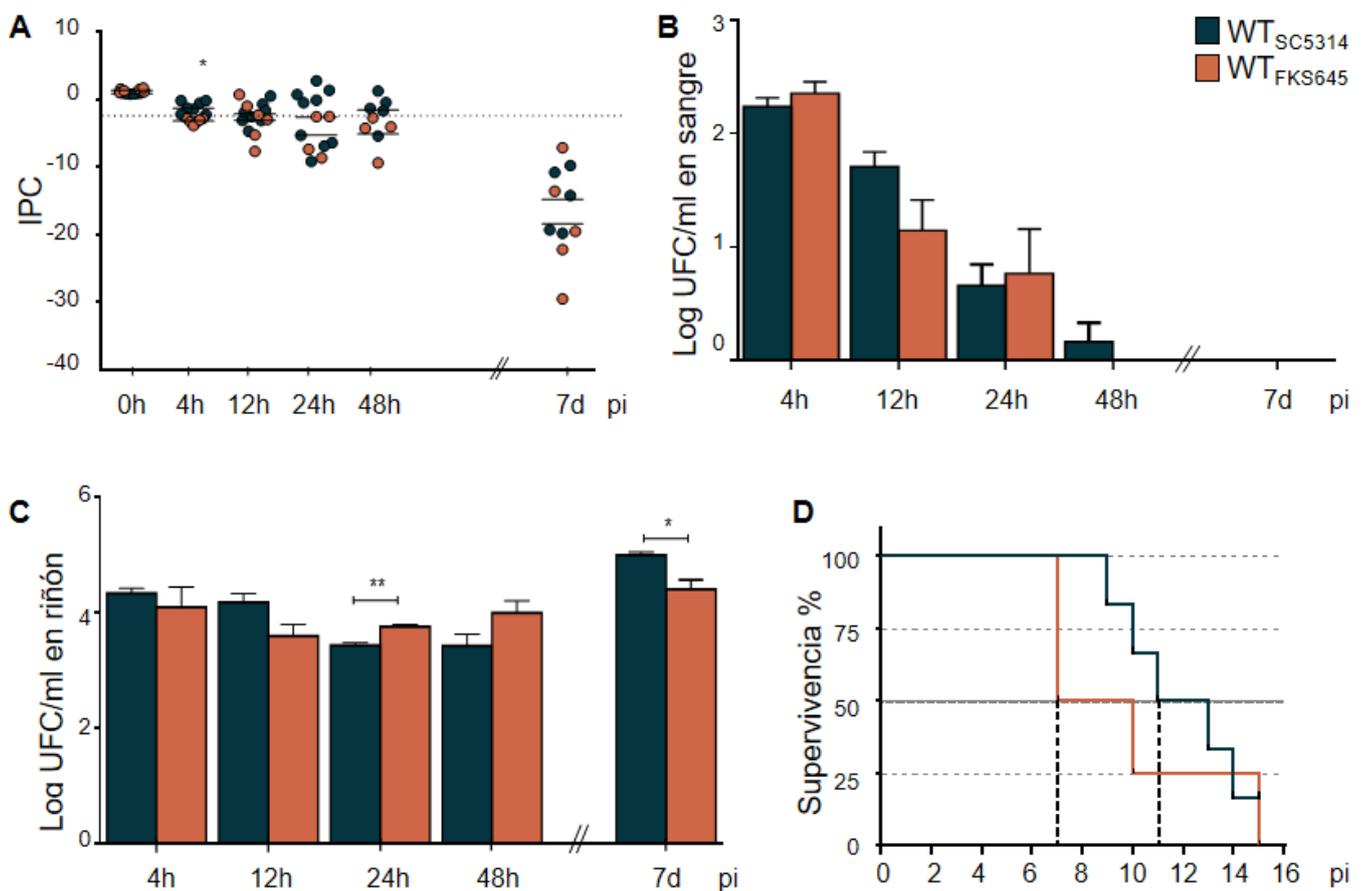


Figura 15. Estudio comparativo entre las características de la infección sistémica con la cepa de *C. albicans* SC5314 y FKS645. Variación del IPC durante la cinética de infección en animales *C. albicans* FKS545 (WT_{FKS645}) comparado con animales infectados con la cepa de *C. albicans* SC5314 (WT_{SC5314}) (A). Recuento de UFC en sangre (B) y riñón (C), a las 4, 12, 24, 48h y 7d pi. Porcentaje de supervivencia de los animales de los grupos experimentales WT_{SC5314} y WT_{FKS645} durante 15 días pi (D). WT_{SC5314} vs WT_{FKS645} * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$. Los valores representan la media \pm SEM. $n \geq 4$ para cada punto de la cinética.

En su conjunto, los resultados obtenidos indican que, la infección provocada por la cepa de *C. albicans* defectiva en la expresión de β -glucanos presenta características similares en relación a la variación del IPC, fungemia y carga fúngica renal, a las obtenidas con la cepa parental. Sin embargo, la evolución del proceso mostró cambios relevantes. El riñón de los animales infectados con *C. albicans* FKS645 presentó severos daños en estructuras claves para la funcionalidad del órgano y una masiva invasión por el hongo. El 50% de los animales falleció 4 días antes que los animales infectados con la cepa *C. albicans* SC5314 y la mortalidad global fue mayor. Estos resultados sugieren que la presencia de cambios en la proporción de β -glucanos presentes en la pared del hongo, condicionan fuertemente la interacción entre el patógeno y el hospedador modificando la evolución del proceso.

Colonización del Sistema Nervioso Central por *C. albicans* FKS645

Invasión cerebral

A fin de determinar si los β -glucanos presentes en la pared de *C. albicans* alteran su capacidad para colonizar SNC, se evaluó la carga fúngica cerebral en animales del grupo WT_{FKS645} durante la cinética de infección establecida.

Se puede observar que la cepa de *C. albicans* FKS645 es capaz de invadir rápidamente cerebro, encontrándose en niveles significativamente elevados a partir de las 4h pi ($p < 0,001$) (Figura 16 A). El recuento de UFC en este órgano aumenta a las 12h pi ($p < 0,001$), manteniéndose en niveles elevados y constantes en el resto de los tiempos evaluados. A los 7d pi se observa todavía un alto número de UFC, sin mostrar cambios significativos respecto a tiempos menores de la cinética, evidenciando la presencia sostenida del hongo a nivel cerebral.

El estudio comparativo de la carga fúngica en cerebro entre los grupos experimentales WT_{SC5314} vs WT_{FKS645}, reveló diferencias significativas tanto a tiempos tempranos como en la infección avanzada (Figura 16 B).

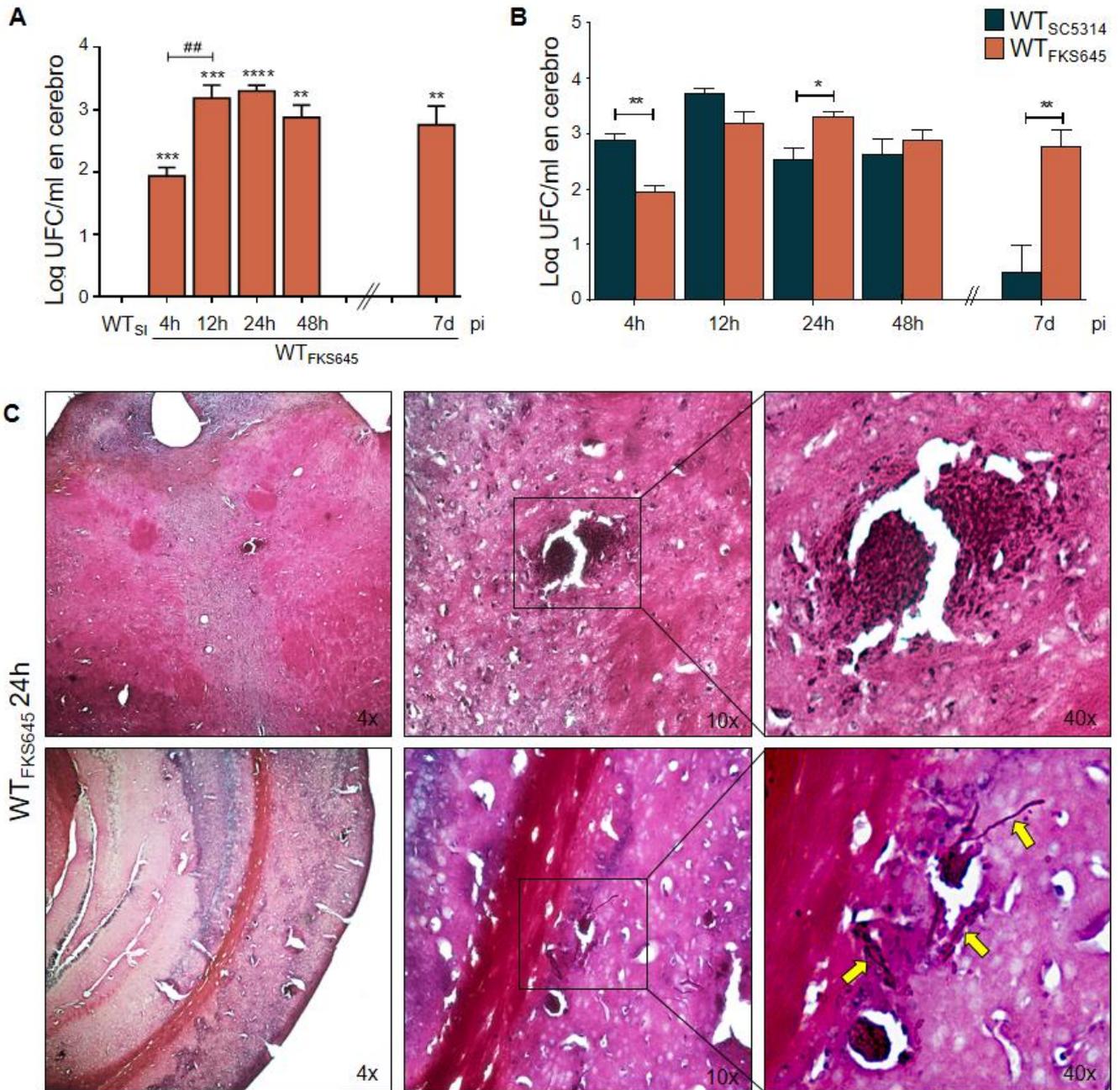


Figura 16. Cinética de colonización del SNC y hallazgos histopatológicos en cerebro frente a *C. albicans* FKS645 Determinación de la carga fúngica en homogenatos de cerebro a las 4, 12, 24, 48h y 7d pi mediante el recuento de UFC en el grupo animales infectados con *C. albicans* FKS645 (WT_{FKS645}) (A). Estudio comparativo de la carga fúngica en cerebro de animales WT_{FKS645} comparado con los animales infectados con la cepa de *C. albicans* SC5314 (WT_{SC5314}) (B). Microfotografías representativas de cortes de cerebro de animales del grupo WT_{FKS645} a las 24h pi teñidos con la técnica de PAS/H. Las hifas se señalan con flechas amarillas. WT_{Si} vs WT_{FKS645} **p<0,05; ***p<0,001; ****p<0,0001. WT_{FKS645} 4h vs WT_{FKS645} 12h ##p<0,001. WT_{SC5314} vs WT_{FKS645} *p<0,05; **p<0.01. Los valores representan la media ± SEM. n ≥ 4 para cada punto de la cinética. Fotografías obtenidas con un microscopio Nikon Eclipse TE 2000 U, equipado con una video cámara digital.

A las 4h pi el recuento de UFC es significativamente menor en cerebro de animales WT_{FKS645} en comparación con el grupo infectado con la cepa parental (WT_{SC5314}) (Figura 16 B). No obstante, a los 7d pi, mientras que los ratones infectados con *C. albicans* SC5314 son capaces de controlar el crecimiento del hongo, la carga fúngica intracerebral encontrada en los animales del grupo WT_{FKS645} es 5,6 veces mayor, sugiriendo que la severidad de la infección cerebral es superior frente a la cepa mutante.

Hallazgos histopatológicos

A fin de poder visualizar el hongo en el tejido cerebral durante la infección, se realizaron estudios histológicos utilizando la técnica de tinción PAS/H (Figura 16 C). Se pueden observar una marcada respuesta inflamatoria tisular a las 24h pi, caracterizada por la presencia de microabscesos (panel superior, ampliación). La evaluación de diferentes áreas del cerebro permitió determinar que las células infiltrantes se distribuyen de manera heterogénea, encontrándose tanto en el parénquima cerebral como alrededor de vasos sanguíneos. El morfotipo invasivo del *C. albicans* FKS645 se puede observar como largas hifas del hongo penetrando en el tejido.

Estos resultados obtenidos a nivel cerebral muestran que aun cuando los parámetros de la infección sistémica evaluados en las etapas iniciales fueron similares e independientes de la cepa utilizada, a nivel cerebral las diferencias entre los grupos fueron evidentes. En cerebro se observó un comportamiento distinto durante la cinética de infección establecida. A tiempos tempranos, donde la respuesta depende de células residentes del tejido, el control fúngico fue mayor en el grupo WT_{FKS645} que en el WT_{SC5314}. Por el contrario, en la infección avanzada, donde participan en la respuesta las células inflamatorias periféricas, el perfil se invirtió, hallándose mayores niveles de hongo en los animales infectados con la cepa defectuosa en la producción de β -glucanos.

Finalmente, la incapacidad de eliminar la infección de este órgano frente a la cepa mutante a los 7d, podría indicar que el reconocimiento de los β -glucanos de la pared fúngica y la respuesta mediada por el receptor Dectin-1 es crucial

para la resolución de la infección a largo plazo, donde no solo intervienen las células gliales residentes, sino también las células infiltrantes de la periférica.

Mediadores inmunes en el microambiente cerebral

Durante el proceso de transformación morfológica de levadura a hifa, *C.albicans* expone los β -glucanos de su pared en forma de “parches”, lo cual facilita el reconocimiento por el receptor Dectin-1, favoreciendo el desarrollo de una respuesta inflamatoria antifúngica (270). Sin embargo, los β -glucanos también son conocidos como potentes inmunomoduladores, y en algunas situaciones pueden atenuar la liberación de citoquinas regulando la inflamación, tal como ocurre en células microgliales (51,263).

En el capítulo 1 se observó que la llegada del infiltrado inflamatorio al tejido cerebral ocurre a partir de las 24h pi, por lo que en las primeras horas de infección, la activación de las células residentes desempeña un rol fundamental en la respuesta inmune local. Con el fin de evaluar la participación de las células gliales en el desarrollo de la respuesta frente al hongo en las etapas iniciales de la infección, se decidió estudiar la producción local de los mediadores inmunes a tiempos tempranos, antes del reclutamiento de los neutrófilos.

A las 4 y 12h pi se evaluó la expresión y secreción de la citoquina IL-1 β por qPCR y ELISA, respectivamente. Además, se estudiaron las citoquinas TGF β , IL-10, TNF, e IL-6 mediante la técnica de ELISA (Figura 17). Los resultados obtenidos muestran que la secreción de IL-1 β en su forma activa, aumenta significativamente a tiempos tempranos ($p < 0,001$) en los animales WT_{FKS645}, con respecto a la expresión basal (Figura 17 A, panel izquierdo). Asimismo, se observa una mayor expresión génica de esta citoquina, tanto a las 4h ($p < 0,01$) como a las 12h pi ($p < 0,001$), en comparación con el animal WT_{SI} (Figura 17 A, panel derecho).

El estudio de la secreción de TNF, otra relevante citoquina proinflamatoria, también muestra un aumento significativo a las 4h pi ($p < 0,05$), siendo mayor a las 12h pi ($p < 0,001$) (Figura 17 B). La cinética de secreción de IL-6 muestra un

perfil opuesto a las citoquinas anteriores, donde los niveles hallados disminuyen significativamente en ambos tiempos, con respecto al WT_{SI} (Figura 17C).

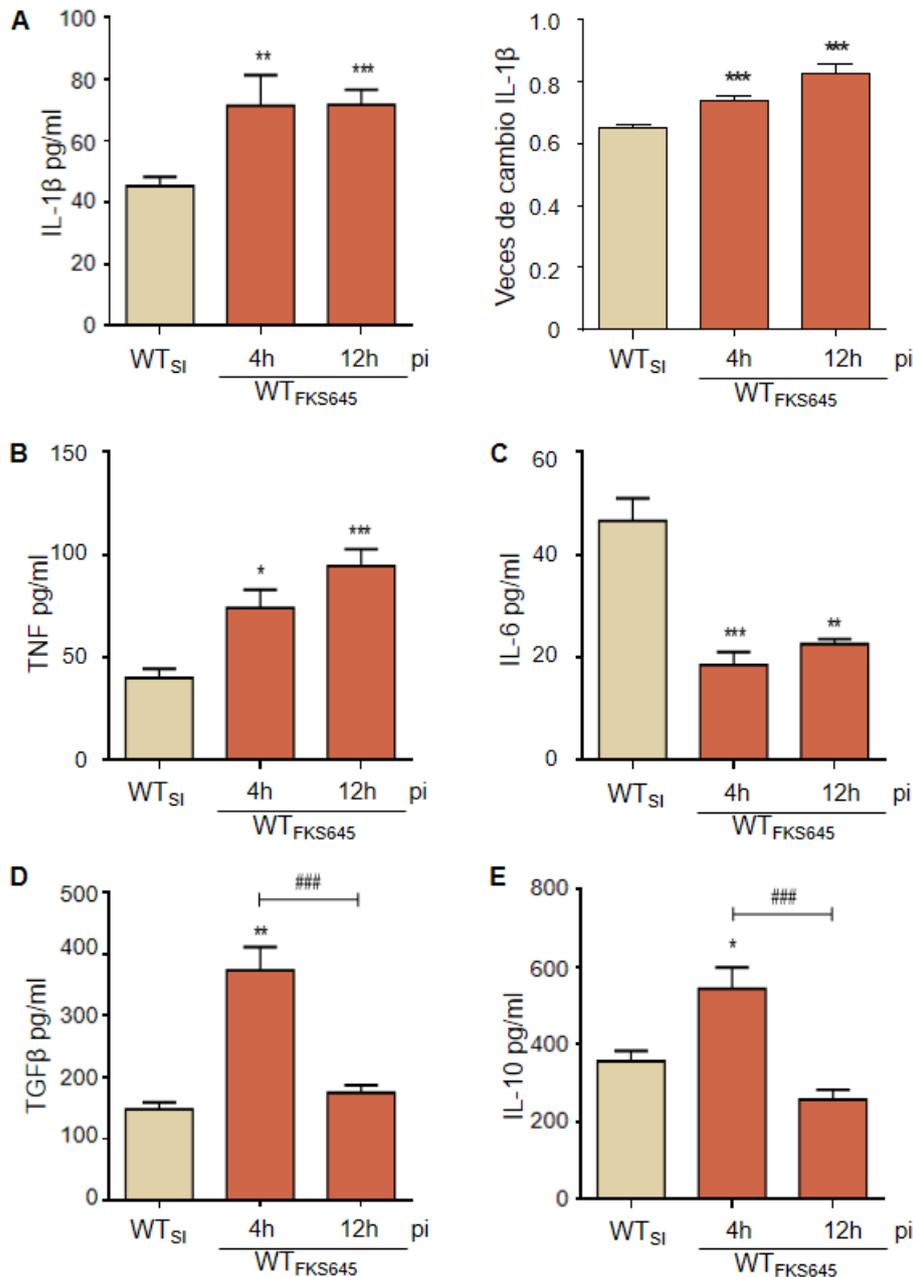


Figura 17. Perfil de citoquinas en cerebro durante la infección con *C. albicans* FKS645. Análisis de citoquinas en muestras de homogenato de cerebro en animales sin infectar (WT_{SI}) y en animales infectados con *C. albicans* FKS645 (WT_{FKS645}) a las 4 y 12 h pi. Determinación de los niveles de proteína (panel izquierdo) y mRNA (panel derecho) de IL-1β mediante la técnica de ELISA y qPCR, respectivamente (A). Estudio de concentración de TNF (B), IL-6 (C), TGF-β (D) e IL-10 (E) utilizando la técnica de ELISA. WT_{SI} vs WT_{FKS645}* p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. Comparación entre grupos de infectados ###p<0,001. Los valores representan la media ± SEM. n ≥ 4 para cada punto de la cinética.

Los niveles de las citoquinas antiinflamatorias evaluadas, TGF β e IL-10, también aumentan significativamente a las 4h pi ($p < 0,05$), pero su concentración desciende rápidamente, llegando a valores similares a los basales a las 12h ($p < 0,05$) (Figura 17 D y E).

La Figura 18 muestra los resultados obtenidos al comparar la cinética de expresión de citoquinas de animales pertenecientes al grupo WT_{FKS645} o a su contraparte parental del grupo WT_{SC5314}. Se puede observar que la secreción de IL-1 β es significativamente mayor en ratones infectados con la cepa mutante a las 4h pi, mientras que a las 12h pi los niveles de esta citoquina aumentan en ratones WT_{SC5314} ($p < 0,05$) (Figura 18 A, panel izquierdo). Sin embargo, la expresión de mRNA de esta proteína no muestran diferencias entre cepas de *C. albicans* en ninguno de los tiempos evaluados (Figura 18 A, panel derecho). El estudio de la concentración intracerebral de TNF, revela también mayores niveles de esta citoquina proinflamatoria en animales del grupo WT_{FKS645} a las 4pi, mientras que a las 12h pi este perfil se observa como una tendencia (Figura 18 B).

El estudio de la cinética de producción de IL-6 muestra una secreción significativamente menor en ratones WT_{FKS645} en comparación con el grupo WT_{SC5314}, tanto a las 4h ($p < 0,01$) como a las 12h pi ($p < 0,0001$) (Figura 18 C). Por el contrario, la concentración de TGF- β es significativamente mayor en animales infectados con la cepa mutante en todos los tiempos estudiados ($p < 0,001$) (Figura 18 D). Los niveles de IL-10 son similares entre cepas de *C. albicans* a las 4h, disminuyendo significativamente a las 12h pi en ratones WT_{FKS645} ($p < 0,05$), con respecto al grupo WT_{SC5314} (Figura 18 E).

Estos resultados demuestran que una menor proporción de β -glucanos en la pared de *C. albicans*, induce durante la infección cerebral, un aumento significativo en la secreción de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β y TNF a las 4h pi, indicando la participación activa de las células residentes en su producción y como respuesta a la presencia del hongo.

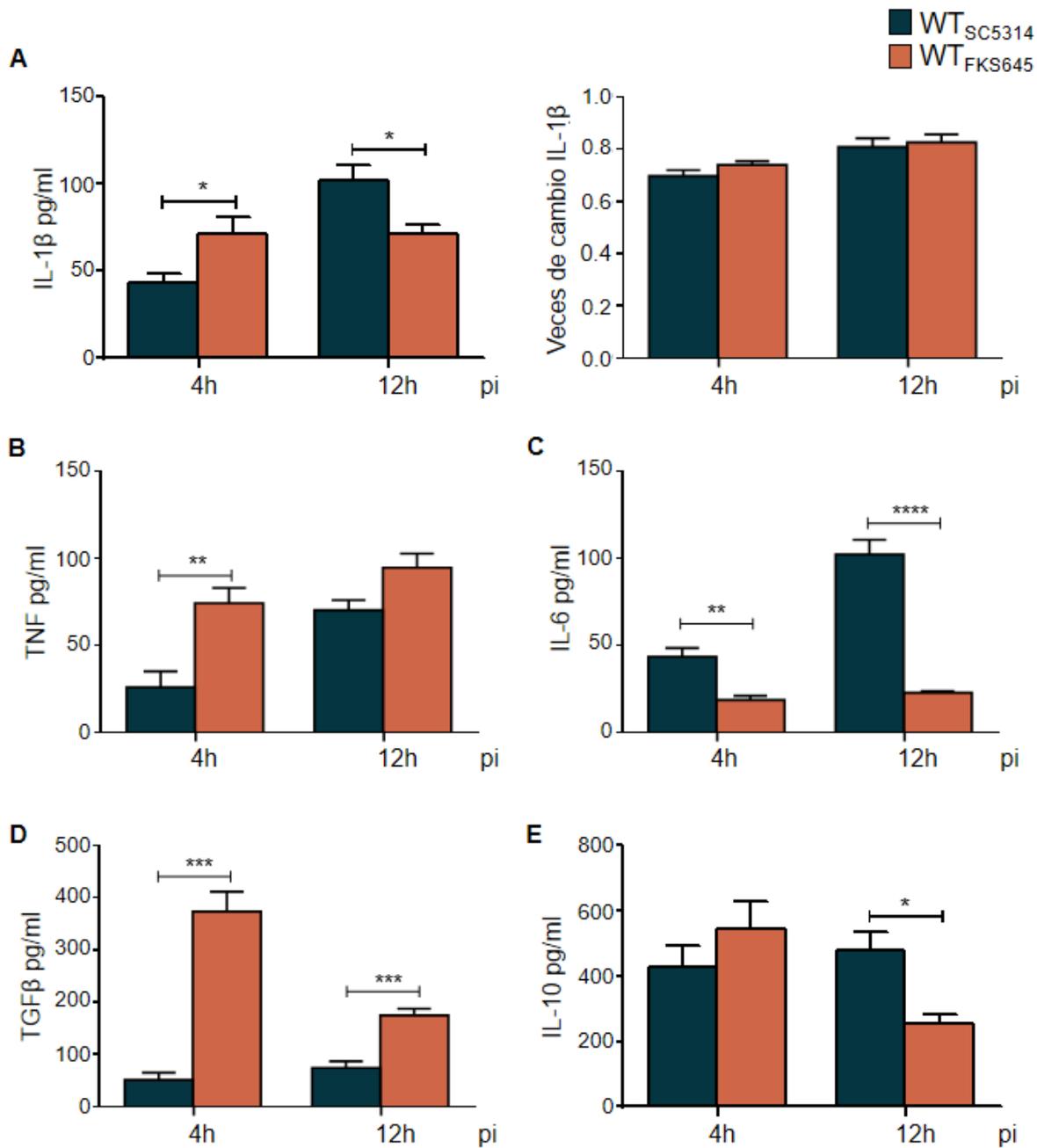


Figura 18. . Estudio comparativo del perfil de citoquinas intracerebrales durante la infección con *C. albicans* FKS645 y SC5314. Determinación de los niveles de proteína (panel izquierdo) y mRNA (panel derecho) de IL-1 β mediante la técnica de ELISA y qPCR, respectivamente, en cerebro de ratones infectados con la cepa de *C. albicans* FKS645 (WT_{FKS645}) o su contraparte SC5314 (WT_{SC5314}) (A). Estudio de la concentración de TNF (B), IL-6 (C), TGF- β (D) e IL-10 (E) por la técnica de ELISA, en ambos grupos experimentales. WT_{SC5314} vs WT_{FKS645} *p< 0,01; **p<0,001; ***p<0,0001. Los valores representan la media \pm SEM. n \geq 4 para cada punto de la cinética.

Ambas citoquinas potencian la actividad microbicida de la microglía, contribuyendo al control del patógeno. En este sentido, la deficiente producción de β -glucanos, podría condicionar la magnitud de la respuesta inflamatoria local y conducir a una mayor activación de esta población de células residentes, favoreciendo una eliminación más eficiente del hongo en cerebro. Estas observaciones podría explicar el mayor control de la carga fúngica encontrado en cerebro de ratones infectados con la cepa de *C. albicans* FKS645 en ese tiempo, donde la fungemia y la carga renal fueron similares en ambos modelos experimentales. Por otro lado, es interesante también destacar la elevada producción de TGF β en ratones WT_{FKS645}, citoquina considerada altamente inmunoregulatoria.

Lo anteriormente expuesto sugiere que, cambios en la expresión de β -glucanos de la pared fúngica pueden ser capaces de modificar marcadamente el microambiente cerebral. Bajo esta premisa, la interacción temprana entre las células inmunes residentes de cerebro y el hongo, determinaría la respuesta local y podría condicionar la evolución del proceso infeccioso.

Activación de células gliales frente a *C.albicans* FKS645

Los resultados anteriores plantean la importancia del estudio de los eventos ocurridos durante las primeras interacciones entre el patógeno y las células de la glía y los efectos de la proporción de β -glucanos de la pared fúngica en la activación de las células residentes de cerebro.

A fin de visualizar los cambios morfológicos asociados a la activación glial en este modelo, se realizaron técnicas de inmunomarcación para estudiar microglía y astrocitos en cortes de cerebro de ratones WT_{FKS645} a las 4h pi, y se los comparó con el grupo WT_{SI} y WT_{SC5314}.

La microglía se evaluó mediante la técnica de IHQ utilizando el anticuerpo anti Iba-1, específico para esta población celular. Con el objetivo de mejorar la señal y facilitar el estudio en este tiempo, se empleó el sistema de amplificación utilizando DAB. La Figura 19 A (panel izquierdo) corresponde a una microfotografía representativa de cortes de cerebro de ratones WT_{SI}, donde la

microglía se encuentra principalmente ramificada, morfología característica del estado de reposo.

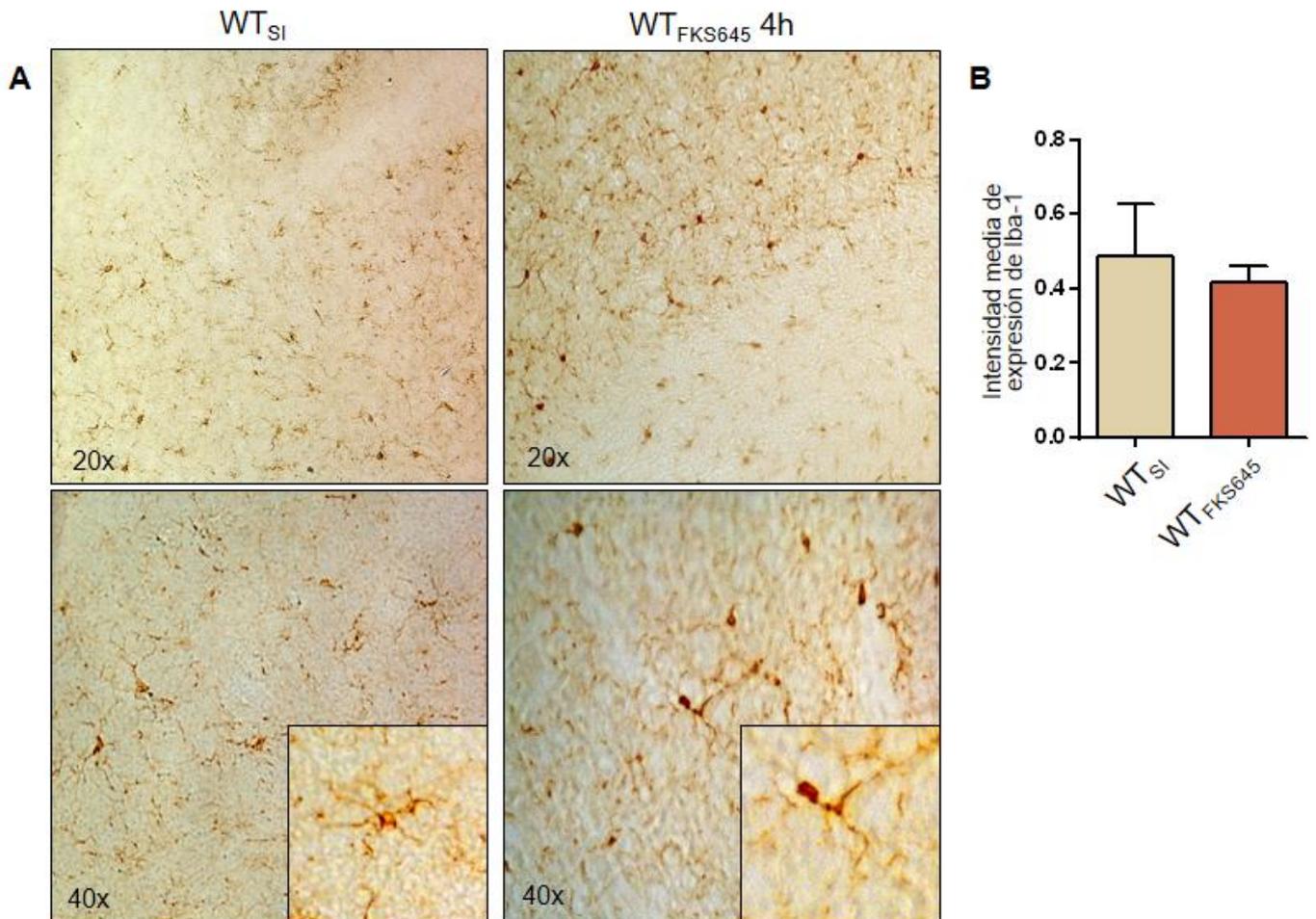


Figura 19. Expresión de Iba-1 en cerebro de ratones infectados con *C. albicans* FKS645. Imágenes representativas de inmunohistoquímica de cortes de cerebro de animales del grupo WT_{Si} (panel izquierdo) y WT_{FKS645} (panel derecho) a las 4h pi, marcados con anticuerpo específico para Iba-1 y revelado con DAB (A). Cuantificación de la expresión para el marcador de microglía en diferentes áreas del cerebro a las 4h pi, expresado como la intensidad media de expresión para Iba-1 (B). Los valores representan la media \pm SEM. Fotografías obtenidas con un microscopio Nikon Eclipse TE 2000 U, equipado con una video cámara digital. Las imágenes se evaluaron mediante el programa FIJI ImageJ.

En animales del grupo WT_{FKS645}, las microfotografías revelan un elevado número de células con morfología ameboide y engrosamiento de los procesos, característica del estado de activación de la microglía (Figura 20 A, panel derecho). El estudio semicuantitativo de la expresión media de Iba-1, efectuado sobre distintas áreas del cerebro con el fin de determinar la expresión total de

este marcador, no permitió observar diferencias significativas entre los grupos de ratones estudiados (Figura 19 B).

En la figura 20 se muestra el análisis comparativo de la activación de la microglía entre el grupo de animales WT_{FKS645} y WT_{SC5314}. Se pueden observar cambios morfológicos típicos de la activación celular experimentados por la microglía luego de la infección, caracterizados por la presencia de células ameboidales, con engrosamiento de dendritas en ambos modelos experimentales (Figura 20 A).

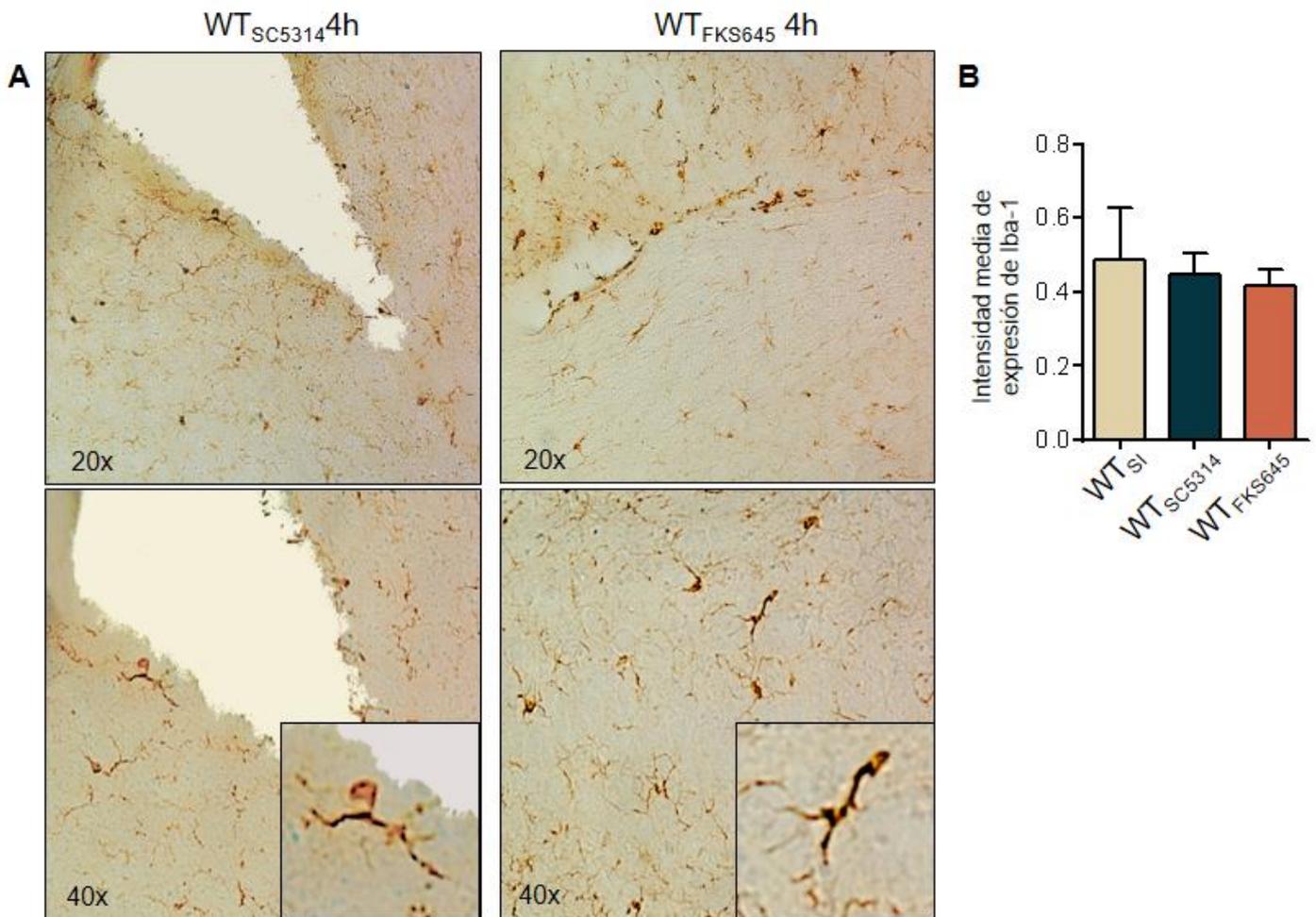


Figura 20. Estudio comparativo de la expresión de Iba-1 en cerebros de animales infectados con *C. albicans* FKS645 o SC5314. Imágenes representativas de la activación de la microglía en cortes de cerebro de ratones WT_{SC5314} (panel izquierdo) o WT_{FKS645} (panel derecho) obtenidos a las 4h pi (A). Semicuantificación de la expresión para el marcador de microglía en diferentes áreas del cerebro a las 4h pi, expresado como la intensidad media de expresión para Iba-1 (B). Los valores representan la media \pm SEM. Fotografías obtenidas con un microscopio Nikon Eclipse TE 2000 U, equipado con una video cámara digital. Las imágenes se evaluaron mediante el programa FIJI ImageJ.

El análisis semicuantitativo de la intensidad de expresión media de células para Iba-1 efectuado en ambos grupos de animales infectados, no revela diferencias significativas en la expresión este marcador, mostrando perfiles similares (Figura 20 B).

Los cambios morfológicos asociados a la activación de astrocitos en cerebro de ratones WT_{FKS645} también se evaluaron a las 4h pi mediante la técnica de IF, utilizando un anticuerpo contra GFAP, marcador específico de estas células, conjugado a con Alexa Fluor-488 y tinción con DAPI para identificar los núcleos celulares.

La observación sistemática de varios cortes permitió evidenciar un aumento en la expresión de GFAP en algunas áreas de cerebro de ratones infectados con la cepa de *C. albicans* FKS645 (Figura 21 A, panel inferior), en comparación con el grupo control WT_{SI} (Figura 21 A, panel superior). En el grupo WT_{FKS645} se visualizaron cambios morfológicos característicos de la astrogliosis, tales como proliferación de astrocitos dispersos en el parénquima cerebral, pérdida de dominios individuales y superposición de procesos con astrocitos vecinos, principalmente en áreas cercanas a los vasos o paraventriculares. Sin embargo, debido a la distribución heterogénea de estas células, la semicuantificación de la intensidad de expresión media de GFAP en el tejido cerebral, no permitió evidenciar cambios significativos cuando los valores obtenidos para ambos grupos fueron comparados (Figura 21 B).

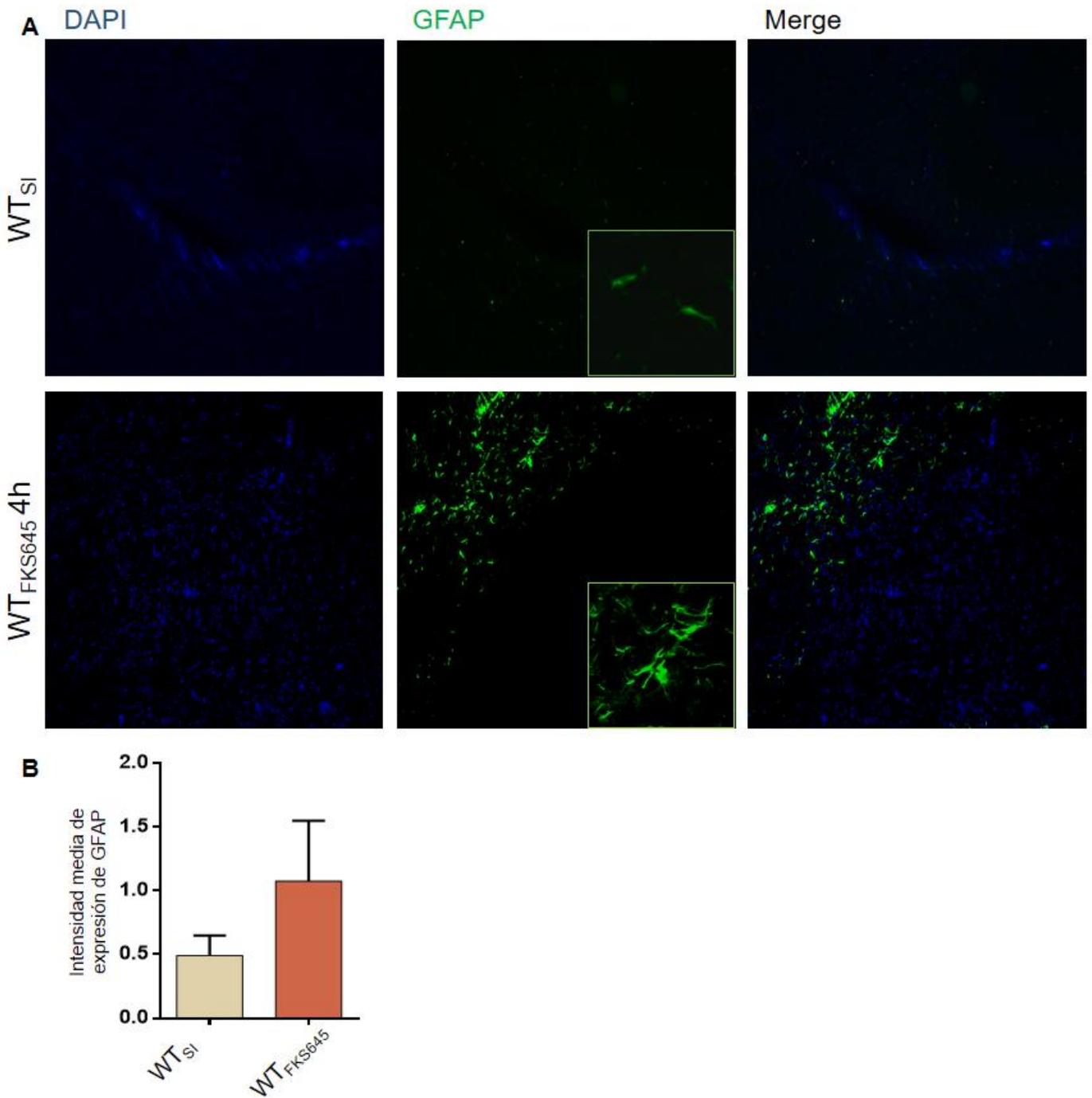


Figura 21. Expresión de GFAP en cerebro de ratones infectados con *C. albicans* FKS645. Imágenes representativas de inmunofluorescencia de cortes de cerebro de animales infectados con la cepa mutante (WT_{FKS645}) (panel inferior) o el control sin infectar (WT_{SI}) (panel superior), revelados con anticuerpo anti-GFAP a las 4h pi. Los núcleos celulares se tiñeron con el colorante DAPI (A). Semiquantificación de la expresión del marcador de astrocitos en diferentes áreas del cerebro, a las 4h luego de la infección. Los resultados se informan como intensidad media de expresión para el marcador GFAP (B). Los valores representan la media \pm SEM. Fotografías obtenidas con un microscopio invertido de fluorescencia LEICA DMi8. La semicuantificación de la fluorescencia se realizó con el software ImageJ FIJI.

Al comparar los cambios observados en activación de astrocitos entre ratones WT_{FKS645} y WT_{SC5314} se observa una expresión de GFAP similar en los cerebros de animales infectados con ambas cepas de *C. albicans* (figura 22 A), mostrando evidentes cambios morfológicos y la sobreexpresión del marcador. Su distribución fue aleatoria en el tejido. Si bien el análisis de la intensidad media de expresión muestra una tendencia al aumento del marcador GFAP en animales del grupo WT_{FKS645} con respecto al grupo WT_{SC5314}, el estudio no muestra diferencias estadísticamente significativas (Figura 22 B).

Los resultados obtenidos a las 4h pi indican que la llegada del hongo a cerebro induce la activación de ambas poblaciones de células gliales, independientemente de la composición de la pared fúngica. No pudo establecerse zonas particulares para la localización de la microglía y astrocitos activados en concordancia con la ausencia de tropismo de *C. albicans* por ningún área del cerebro en particular.

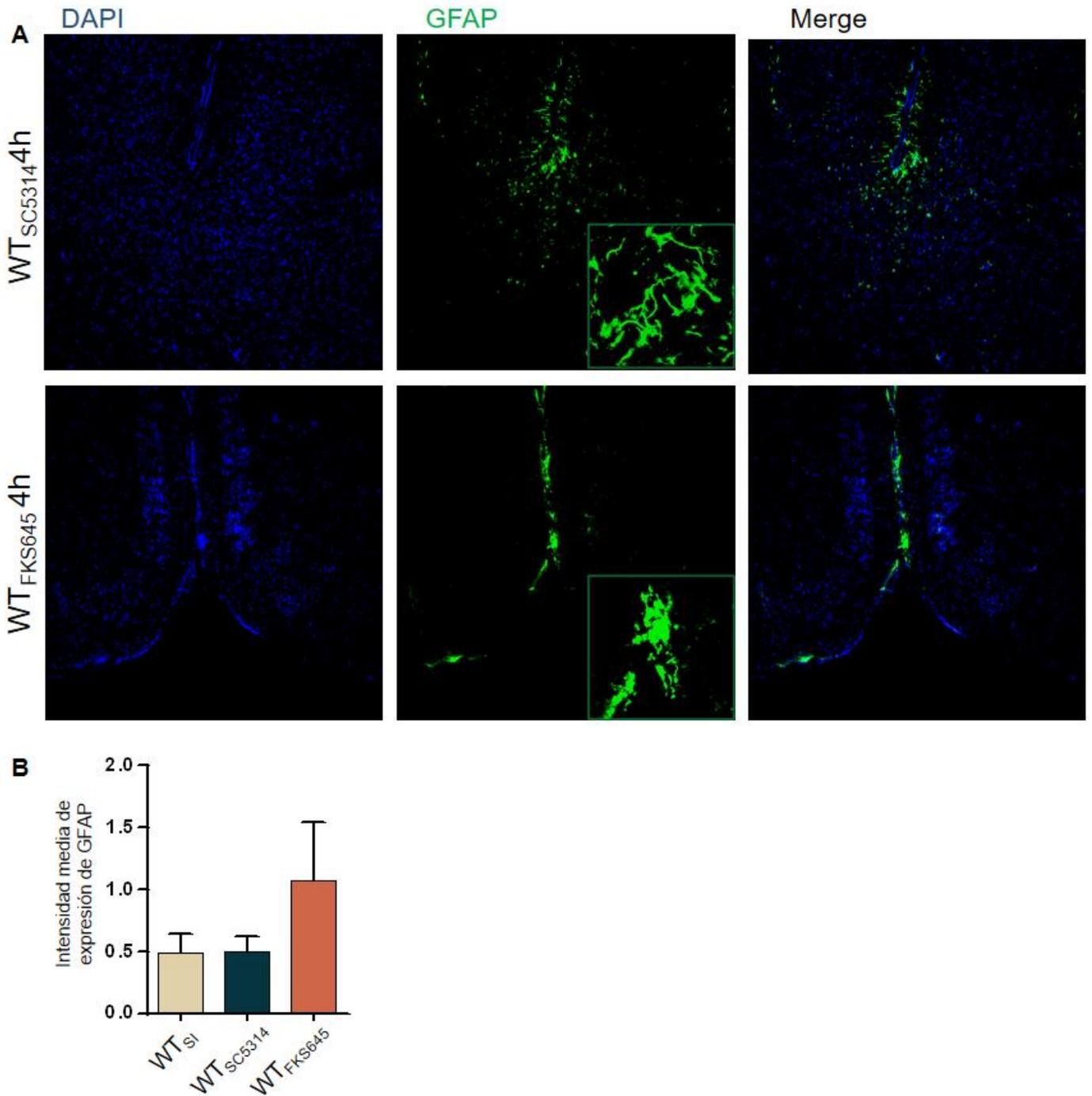


Figura 22. Estudio comparativo de la expresión de GFAP en cerebros de animales infectados con *C. albicans* FKS645 o SC5314. Fotografías representativas de inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo específico para el marcador de astrocitos GFAP, en cortes de cerebro de ratones infectados con la cepa de *C. albicans* SC5314 (panel superior) o con la cepa mutante (WT_{FKS645}) (panel inferior) a las 4h luego de la infección **(A)**. Semicuantificación de la expresión media del marcador de astrocitos en diferentes áreas del cerebro (4h pi), informado como intensidad media de expresión para GFAP **(B)**. Los valores representan la media \pm SEM. Fotografías obtenidas con un microscopio de fluorescencia LEICA DMI8. La semicuantificación de la fluorescencia se realizó con el software ImageJ FIJI.

Conclusiones capítulo 2. Parte I

Durante la patogenia de la infección sistémica por *C. albicans* FKS645:

- La infección sistémica diseminada provoca una marcada disminución de peso corporal, con elevada carga fúngica a nivel renal durante toda la cinética evaluada, y un porcentaje de mortalidad del 50% a la semana de infección.
- En comparación con el grupo infectado con la cepa parental (WT_{SC5314}), el IPC y la fungemia fueron similares durante los tiempos estudiados, y no se observaron grandes diferencias en la colonización renal a las 4h y 12h pi. A la semana de la infección (7d) el 50% de los animales infectados con *C. albicans* FKS645 murió, mientras que ese porcentaje de muerte ocurre a los 11d pi en los ratones inoculados con la cepa SC5314 (11d). La mortalidad global fue mayor.
- A la semana de infección, el daño tisular en riñón del grupo WT_{FKS645} fue severo, con franco deterioro de glomérulos y túbulos renales, y abundantes formas fúngicas invasivas, localizadas principalmente en la pelvis renal. Se observó una robusta respuesta inflamatoria caracterizada por la presencia de neutrófilos (7d pi), que no fue suficiente para el clearance del hongo.

Durante la patogenia de la infección cerebral por *C. albicans* FKS645:

- Luego de la infección sistémica, el hongo invade rápidamente cerebro (4h), observándose niveles significativos de UFC, que aumentan hacia las 12h pi. A las 24h se observaron hifas del hongo invadiendo el parénquima cerebral y una robusta respuesta inflamatoria caracterizada por la presencia de abscesos dispersos en diferentes zonas del cerebro. A una semana de infección la carga fúngica cerebral se mantiene elevada y el hongo puede observarse en el tejido.
- A pesar de que la fungemia y las UFC en riñón fueron similares durante el curso de la infección sistémica con ambas cepas de *C. albicans*, a las 4h la carga fúngica intracerebral fue significativamente menor en animales infectados con *C. albicans* FKS645 que aquellos infectados la cepa parental. En la infección avanzada (7d pi), los animales inoculados con la cepa de hongo defectiva en la expresión de β -glucanos presentan mayor dificultad para eliminar al hongo del cerebro comparados con los animales infectados con *C. albicans* SC5314.

- La infección cerebral con *C. albicans* FKS645 induce un aumento en la secreción de citoquinas proinflamatorias, IL-1 β y TNF, a tiempos tempranos (4 y 12h pi), sugiriendo una respuesta mediada por células residentes del tejido. El análisis comparativo permitió establecer que los niveles de IL-1 β y TNF (4h) fueron mayores cuando la infección se produjo con la cepa *C.albicans* FKS645 respecto al grupo infectado con la cepa parental. La citoquina IL-6 presentó un perfil inverso.
- Durante la infección con *C.albicans* FKS645 los niveles de las citoquinas antiinflamatorias TGF β e IL-10, aumentan significativamente a las 4 h. El análisis comparativo de la expresión de TGF β mostró un aumento en la concentración de esta citoquina cuando la infección fue provocada por la cepa mutante respecto a la infección provocada con la cepa parental (4 y 12h pi).
- A las 4h de la infección diseminada por el hongo, las células gliales residentes de cerebro, microglía y astrocitos, muestran características de activación celular frente a ambas cepas del hongo, no pudieron establecerse diferencias cuantitativas entre la infección provocada por *C. albicans* FKS645 y *C. albicans* SC5314.

PARTE II

El huésped: ratones deficientes en el receptor Dectin-1

El reconocimiento de β -glucanos por las células de la inmunidad innata está mediado principalmente por el receptor Dectin-1, considerado esencial en el desarrollo de una respuesta inmune protectora frente a *C. albicans*.

Dectin-1 puede inducir una amplia gama de efectos celulares, incluyendo fagocitosis, activación del estallido respiratorio mediante la producción de ROS, endocitosis, maduración de DCs y cambios en los patrones de expresión de citoquinas y quimiocinas, tales como TNF, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, CXCL2, CCL3 y GM-CSF(151,155,159,261,271,272), IL-10 (50,272,273) y TGF β (274).

Los resultados obtenidos en los capítulos anteriores sugieren que la proporción de β -glucanos en la pared de *C. albicans* puede condicionar la respuesta inmune, según el nicho donde ocurra el primer encuentro con el hongo. En riñón, el crecimiento del hongo fue difícil de controlar, y la presencia de una robusta reacción inflamatoria ineficiente, provocan un franco deterioro del órgano. En cerebro, la menor proporción de β -glucanos dirige la respuesta inmune hacia un perfil proinflamatorio a tiempos tempranos (4 y 12h), donde participan principalmente las células residentes de tejido. Sin embargo, a tiempos prolongados la deficiencia de estos polisacáridos determina una infección más severa (7d), con mayor porcentaje de muerte e incapacidad para eliminar al hongo de cerebro.

A fin de dilucidar la contribución de Dectin-1 en la respuesta frente a *C. albicans*, para los siguientes ensayos se utilizaron ratones deficientes en este receptor.

Infección sistémica por *C. albicans* SC5314 en ratones Dectin-1 KO

Para describir el modelo de infección sistémica en ausencia de Dectin-1, se utilizó el protocolo descrito anteriormente y se inyectaron por vía iv ratones machos adultos C57BL/6 *Clec7a*^{-/-}, deficientes en Dectin-1 (KO), con un

inoculo infectivo de $2,5 \cdot 10^5$ levaduras viables de *C. albicans* de la cepa de colección SC5314. Durante el desarrollo del trabajo, este grupo será identificado como KO_{SC5314}. Además se utilizaron como controles ratones KO sin infectar, denominados KO_{SI}.

Siguiendo la estrategia planteada en este capítulo para la presentación de los resultados, se realizará primero un análisis comparativo entre animales KO_{SC5314} y KO_{SI}, a fin de determinar si el *background* genético de estos ratones presenta algún efecto *per sé* en la evolución de la infección. Por otro lado, para estudiar los efectos de la vía de señalización de Dectin-1, se planteará el análisis comparativo entre los grupos de ratones WT y KO, infectados con la cepa de *C. albicans* SC5314 (WT_{SC5314} vs KO_{SC5314}).

Manifestaciones clínicas y sobrevida

A fin de establecer los parámetros de la infección sistémica en este modelo, ratones Dectin-1 KO se infectaron como se describió anteriormente. A las 4, 12, 24, 48h y 7 d, los animales se pesaron, se sacrificaron y se obtuvo sangre y riñón, para determinar la carga fúngica.

La variación de peso corporal es una medida importante para definir el progreso de una infección. El estudio de este macro parámetro reveló una rápida pérdida de peso corporal en ratones del grupo KO_{SC5314} en comparación con el grupo de animales KO_{SI}, observándose una marcada disminución del IPC a los 7d pi ($p < 0,05$), que corresponde aproximadamente a un 26% de la masa corporal durante el desarrollo de la infección (Figura 23 A).

Se evaluó también la diseminación hematogena de *C. albicans* mediante recuento de UFC en sangre durante la cinética de infección planteada. La fungemia fue variable y sostenida hasta las 48h y a la semana de infección, no se observan UFC en sangre (Figura 23 B).

El estudio de la colonización renal en este modelo muestra una elevada carga fúngica a partir de las 12h pi ($p < 0,0001$), que se mantiene de manera sostenida a lo largo del estudio. A los 7d pi, *C. albicans* persiste en este órgano en altos niveles, sugiriendo que los ratones KO_{SC5314} son incapaces de eliminar al hongo eficientemente a tiempos prolongados ($p < 0,01$) (Figura 23 C).

Conociendo el impacto que la colonización renal severa posee en la calidad de vida del animal, se evaluó también la supervivencia de los ratones deficientes en Dectin-1 luego de la inoculación del hongo. Los resultados muestran una elevada mortalidad frente a la infección diseminada, con un 50% de muerte a los 6d pi, alcanzando el 100% de muerte a los 8d pi (Figura 23 D).

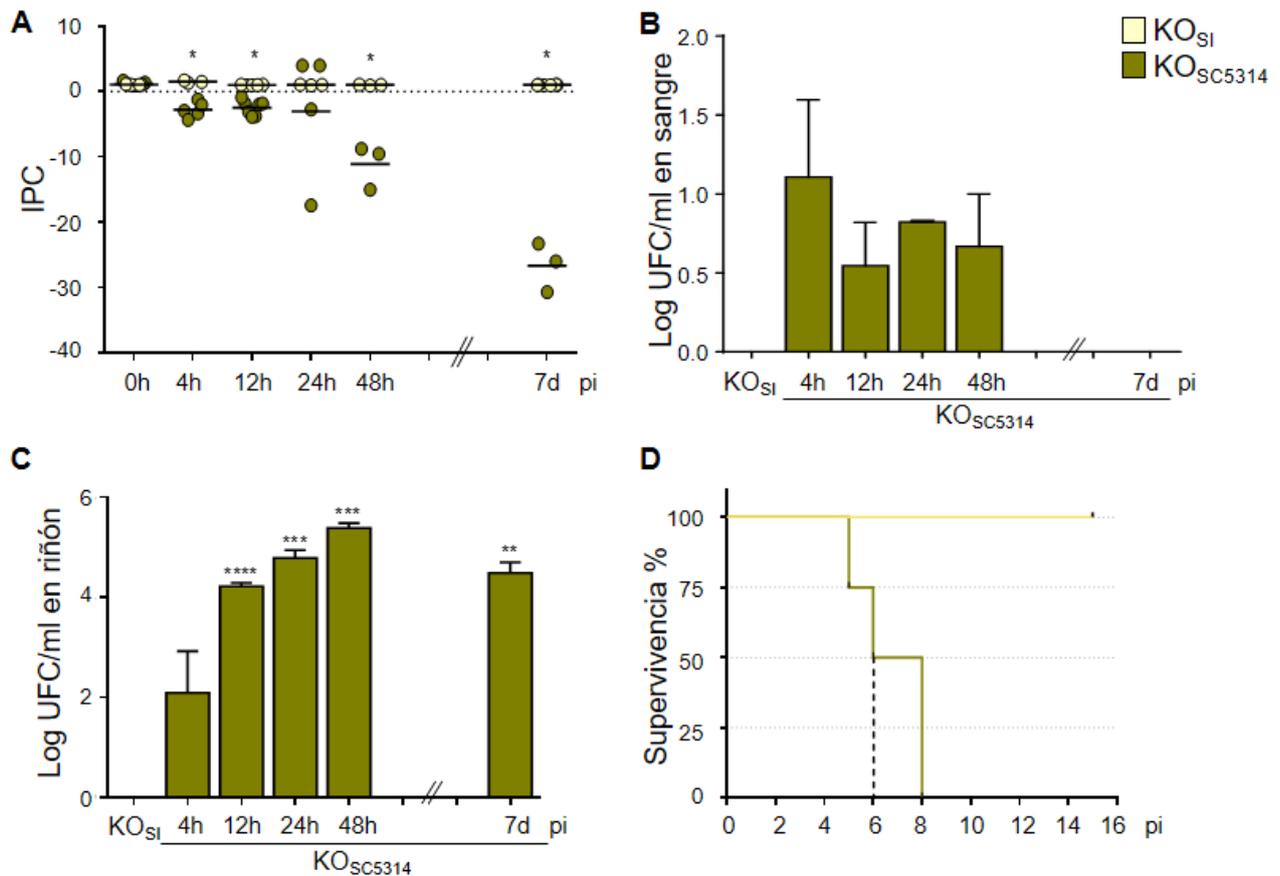


Figura 23. Características de la infección sistémica por *C. albicans* en ratones deficientes en Dectin-1. Ratones machos adultos C57BL/6 deficientes para el receptor de β -glucanos Dectin-1 se infectaron iv con 2.5×10^6 levaduras viables de *C. albicans* de la cepa SC5314 (KO_{SC5314}). Determinación de la variación del IPC entre el grupo de animales sin infectar (KO_{SI}) y KO_{SC5314} (A). Recuento de UFC en sangre (B) y riñón (C), a las 4, 12, 24, 48h y 7d pi, informadas por ml o por gramo de tejido, respectivamente. Estudio del porcentaje de supervivencia de los animales durante 15d luego de la infección (D). KO_{SI} vs KO_{SC5314} *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001. Los valores representan la media \pm SEM. n \geq 3 para cada punto de la cinética.

La Figura 24 muestra el análisis comparativo de la infección sistémica entre animales de los grupos WT_{SC5314} y KO_{SC5314} a lo largo de la cinética planteada. El estudio del IPC revela que, si bien entre las 4 y 24h la pérdida de peso es similar entre los grupos, a las 48h pi los ratones deficientes en Dectin-1 sufren una marcada disminución del peso corporal con respecto a los ratones WT_{SC5314}

($p < 0,01$) que es aún más severa a los 7d pi ($p < 0,0001$) (Figura 24 A). Mientras que en el grupo de animales WT_{SC5314} la disminución del IPC fue cercana al 15%, en los ratones KO_{SC5314} este parámetro mostró una reducción del 26% a la semana de infección.

Se compararon también niveles del hongo en sangre. Los resultados revelan una fungemia mayor a las 4 ($p < 0,001$) y 12h pi ($p < 0,01$) en ratones WT_{SC5314} , con una disminución gradual hacia las 48h, mientras que en los animales deficientes en Dectin-1, las UFC mostraron niveles sostenidos en el tiempo, y la carga fúngica en ambos grupos se equiparó a tiempos prolongados, donde no se observaron diferencias significativas (Figura 24 B).

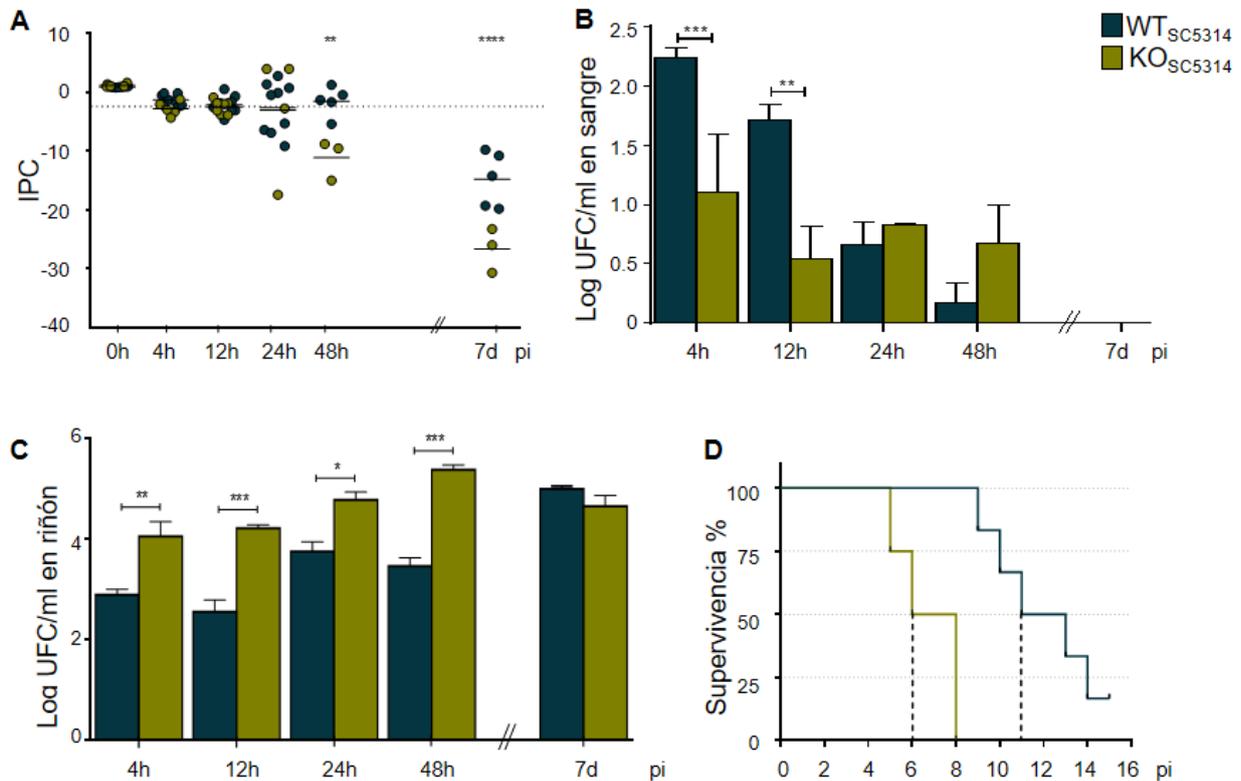


Figura 24. Estudio comparativo entre las características de la infección sistémica en animales WT y Dectin-1 KO. Ratones machos adultos C57BL/6 WT y deficientes en Dectin-1 (KO) se infectaron iv con 2.5×10^6 levaduras viables de *C. albicans* SC5314. Variación del IPC durante la cinética de infección en animales WT_{SC5314} y deficientes en el receptor Dectin-1 (KO_{SC5314}) (A). Recuento de UFC en sangre (B) y riñón (C), a las 4, 12, 24, 48h y 7d pi. Porcentaje de supervivencia de los animales durante 15 días pi (D). WT_{SC5314} vs KO_{SC5314} * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Los valores representan la media \pm SEM. $n \geq 3$ para cada punto de la cinética.

El estudio de la colonización renal de *C. albicans*, muestra mayores niveles del hongo en animales KO_{SC5314} a las 4h ($p < 0,01$), 12h ($p < 0,001$), 24h ($p < 0,5$) y 48h ($p < 0,001$) pi, en un porcentaje de incremento que osciló entre 32 y 54% comparado con la carga fúngica obtenida en los animales WT_{SC5314}, mientras que a los 7d no se observan diferencias entre ambos grupos experimentales (Figura 24 C).

El análisis de la sobrevida indica un mayor porcentaje de muerte en los animales deficientes en Dectin-1, donde el 50% de los ratones infectados muere a los 6d pi, mientras que en los animales WT_{SC5314} este porcentaje de supervivencia se alcanzó a los 11d pi. En el grupo KO_{SC5314} se observa el 100% de muerte a los 8d pi, evidenciando la severidad de la infección en este modelo (Figura 24 D).

Invasión renal y características clínicas e histopatológicas

Además de la marcada disminución de peso observada en los ratones KO_{SC5314}, se pudieron evidenciar otras características clínicas que sugieren la gravedad de la infección en este modelo experimental. A los 7d pi, algunos de los animales deficientes en el receptor Dectin-1 presentaron inmovilidad, letargo, dificultad respiratoria, disminución de la temperatura corporal, afecciones neurológicas con parálisis de las extremidades posteriores, posición encorvada (posible indicio de dolor), movimientos involuntarios y temblores. Además, algunos ratones mostraron ceguera en ambos ojos y hematuria. Las alteraciones descritas son presentadas en el panel A de la Figura 25 y agrupadas de acuerdo a sus características en sistémicas o neurológicas.

Se evidenció también, la hipertrofia del riñón a la semana de infección, donde el peso del órgano fue significativamente mayor en el grupo KO_{SC5314} en comparación con los ratones WT_{SC5314} ($p < 0,01$) (Figura 25 B). El riñón de los animales deficientes en Dectin-1 presentó cambios macroscópicos, asociados a los cambios circulatorios, parenquimales y la presencia del hongo.

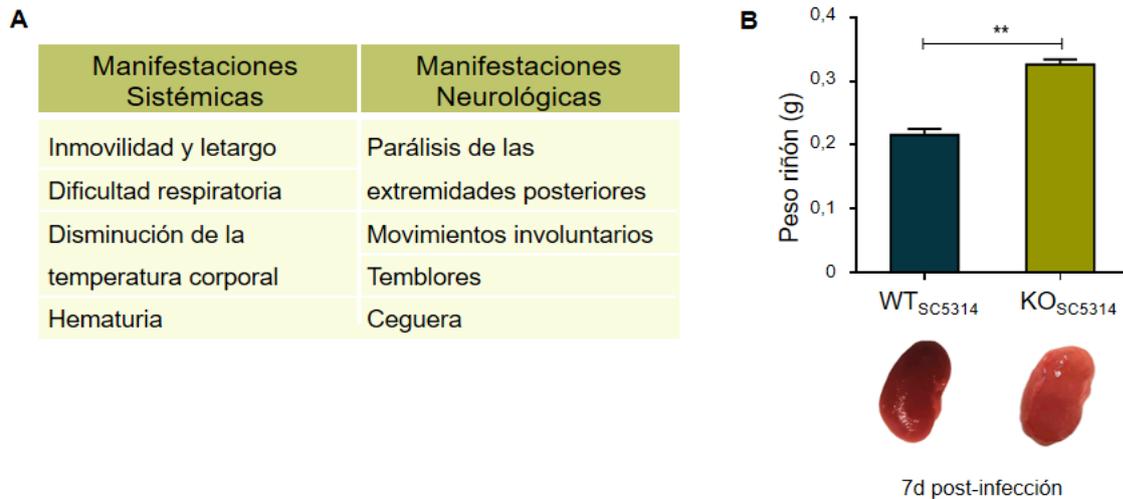


Figura 25. Características clínicas y neurológicas de la infección sistémica por *C. albicans* en ratones deficientes en Dectin-1. Tabla descriptiva de las manifestaciones sistémicas y neurológicas en animales deficientes del receptor Dectin-1 (KO_{SC5314}) a los 7 días luego de la infección con *C. albicans* SC5314 (**A**). Estudio comparativo del peso de los riñones de ambos grupos experimentales (WT_{SC5314} vs KO_{SC5314}) a los 7d pi, expresado en gramos de tejido (panel superior). Análisis macroscópico del riñón de animales WT_{SC5314} vs KO_{SC5314}, sacrificados a los 7d pi (panel inferior) (**B**). WT_{SC5314} vs KO_{SC5314} **p<0,01. Los valores representan la media ± SEM. n ≥ 4 para cada punto de la cinética.

La diseminación hematogena de *C. albicans*, puede presentar complicaciones clínicas en los pacientes infectados, tales como acúmulos de hongos en la pelvis renal, el uréter o la vejiga, obstrucción de las vías urinarias, necrosis papilar y abscesos perinefríticos, afectando el funcionamiento de los tejidos involucrados (275). Como se explicó anteriormente, el riñón es el principal órgano blanco durante la candidiasis sistémica y su invasión ha sido asociada al aumento de morbilidad y mortalidad.

Debido a la elevada carga fúngica hallada a nivel renal luego de una semana de infección y al mayor porcentaje de muerte en animales deficientes en el receptor Dectin-1, se decidió estudiar los cambios histopatológicos en cortes de riñón a los 7d pi, mediante la técnica de PAS/H. La Figura 26 A corresponde a un animal del grupo control KO_{SI} y muestra la histología normal del tejido, donde pueden diferenciarse los GR y T renales con su estructura íntegra. A los 7d pi, los ratones KO_{SC5314} sufren una atrofia estructural del órgano, con pérdida de la morfología normal tanto en GR como T renales (Figura 26 B, panel superior). Además, pueden observarse empalizadas del hongo en la pelvis renal, numerosos neutrófilos dispersos en la proximidad de las hifas y grandes abscesos (Figura 26 B, panel inferior).

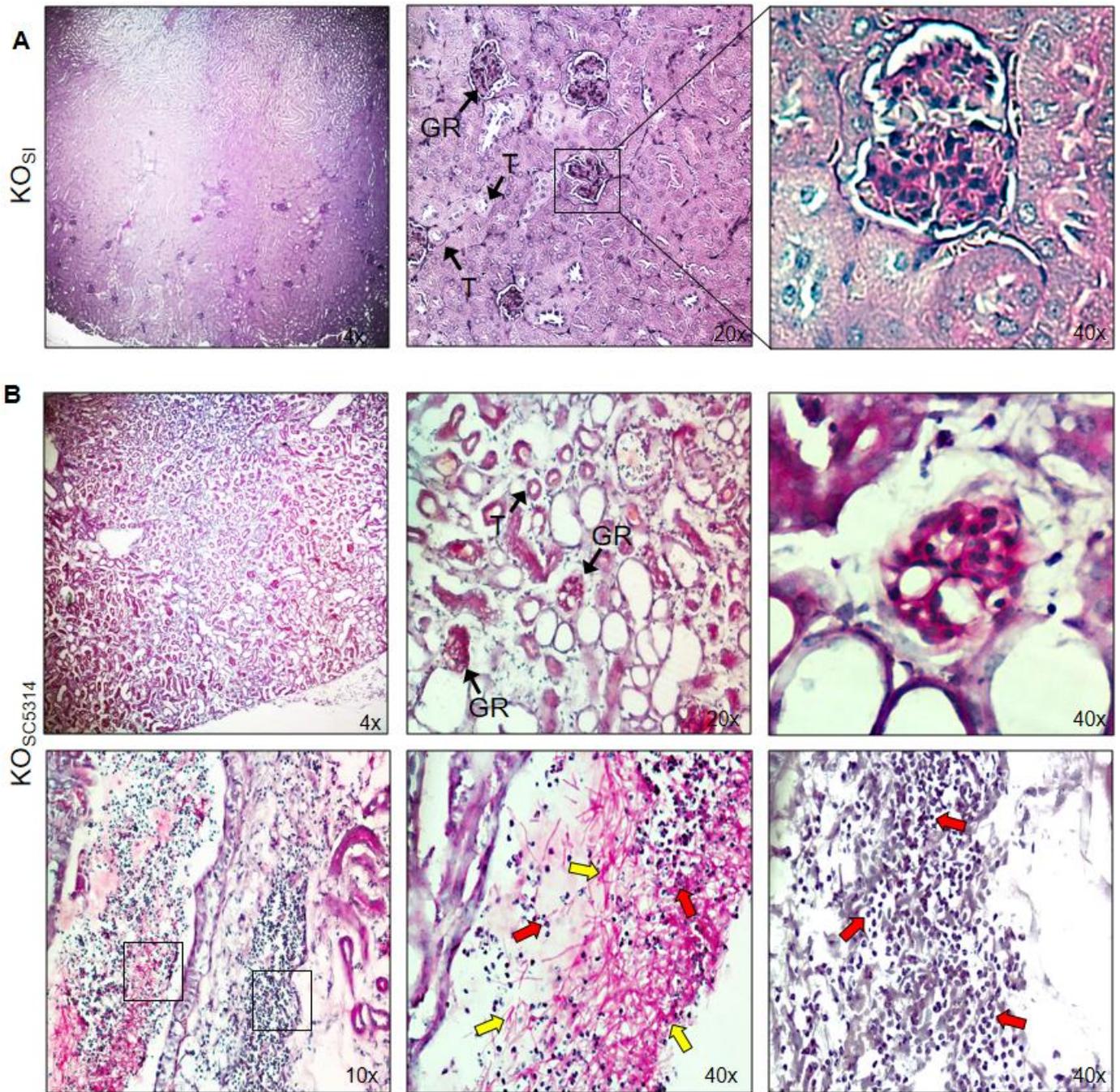


Figura 26. Hallazgos histopatológicos durante la infección renal en ratones deficientes en Dectin-1. Microfotografías representativas de cortes histológicos de riñón de animales deficientes en el receptor Dectin-1 (KO_{sc5314}), teñidos con PAS/H. Ratones del grupo control sin infectar (KO_{si}). Se muestra la estructura glomerular y tubular normal del órgano (A). Ratones KO infectados con la cepa de *C. albicans* SC5314 a los 7d pi (KO_{sc5314}). Se observa la pérdida en la integridad tisular (panel superior) y la presencia de hifas del hongo en la pelvis renal (flechas amarillas) y células infiltrantes (flechas rojas) (panel inferior) (B). GR: glomérulo renal; T: túbulo renal. Fotografías obtenidas con un microscopio Nikon Eclipse TE 2000 U, equipado con una video cámara digital.

La severidad de las manifestaciones clínicas observadas en este modelo, corroboran la importancia de Dectin-1 para el desarrollo de una respuesta inmune eficiente frente a *C. albicans* a nivel sistémico descritas por otros autores (143,276), y aportan nuevas evidencias en relación al background genético de los ratones y a la cepa del hongo utilizada en este estudio. En ausencia de este receptor la patología es más severa, observándose un menor control de la carga fúngica renal, durante la cinética evaluada, que predispone al ratón a una mayor pérdida de peso corporal y una marcada morbilidad y mortalidad.

Colonización del SNC por *C. albicans* en ratones Dectin-1 KO

Invasión cerebral

Los resultados obtenidos en el modelo de infección con la cepa de *C. albicans* FKS645 demostraron que pequeños cambios en la proporción de β -glucanos pueden modificar el curso de la infección cerebral y la respuesta inmune desarrollada en este órgano. A fin de determinar si la ausencia de Dectin-1 presenta características similares a ese modelo, los ratones del grupo KO^{SC5314} se infectaron como se describió anteriormente, y se sacrificaron en los tiempos establecidos para obtener el cerebro. A modo de control, se utilizaron también ratones del grupo KO^{SI}.

Con el objetivo de evaluar si el receptor Dectin-1 desempeña un rol relevante durante la colonización cerebral, se determinó la carga fúngica en este órgano a lo largo de la cinética planteada. Se puede observar que la llegada del hongo a este tejido ocurre rápidamente, pudiendo encontrarse niveles significativos desde las 4h ($p < 0,01$) y 12h ($p < 0,0001$) pi. A las 24h pi ocurre el pico de colonización, donde la carga fúngica alcanza su mayor nivel (12h vs 24h $p < 0,0001$) (Figura 27 A). A los 7d pi las UFC en cerebro aún son elevadas, lo que demuestra la dificultad de los ratones deficientes en Dectin-1 para desarrollar una respuesta eficiente que permita controlar el crecimiento del hongo en este órgano.

El análisis comparativo de las características de la infección cerebral entre los grupos de animales WT_{SC5314} y KO_{SC5314}, revela que la carga fúngica es significativamente menor en ratones deficientes del receptor Dectin-1 durante las primeras horas del proceso, a las 4 (p<0,05) y 12h (p<0,01) pi (Figura 27 B). Sin embargo, a las 24h pi este perfil se invierte (p<0,01), hallándose un mayor recuento de UFC en el grupo KO_{SC5314}. A los 7d pi los niveles de *C. albicans* en estos animales son significativamente más elevados que en los animales WT_{SC5314} (p<0,01) (Figura 27B).

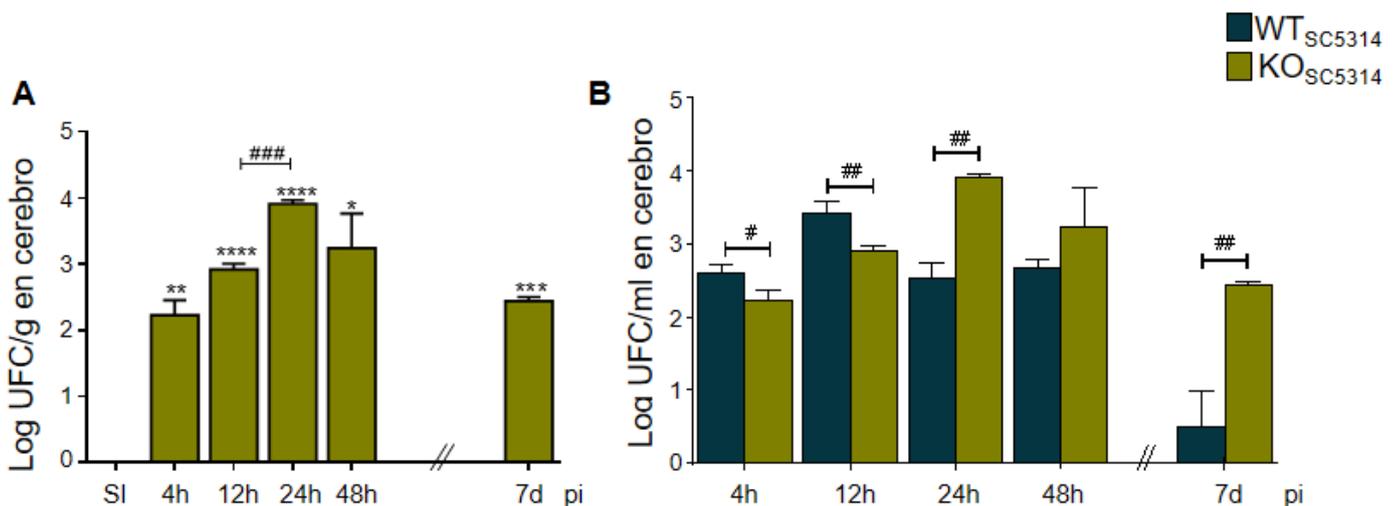


Figura 27. Cinética de colonización del SNC durante la infección sistémica en ratones deficientes en Dectin-1. Ratones machos adultos deficientes en Dectin-1 infectados iv con 2.5×10^6 levaduras viables de *C. albicans* SC5314 (KO_{SC5314}). Determinación de la carga fúngica en homogenatos de cerebro a las 4, 12, 24, 48h y 7d pi, mediante el recuento de UFC, con respecto al grupo control sin infectar (KO_{SI}) (A). Estudio comparativo de la carga fúngica en cerebro de animales C57BL/6 WT y Dectin-1 KO infectados con *C. albicans* SC5314 (2.5×10^6 levaduras) (WT_{SC5314} vs KO_{SC5314}) durante la cinética de infección establecida (B). KO_{SI} vs KO_{SC5314} *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001. Comparación entre grupos infectados: #p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,001. Los valores representan la media \pm SEM. n \geq 4 para cada punto de la cinética.

Hallazgos histopatológicos en cerebro

Para poder visualizar el morfotipo invasivo del hongo y los daños tisulares asociados a la infección, se realizaron estudios histológicos mediante la tinción con la técnica de PAS/H. En la Figura 28 A se puede observar la histología normal del cerebro de un ratón del grupo KO_{SI}. A las 24h pi se hallaron microabscesos, rodeando a las hifas del hongo (flechas amarillas) (Figura 28 B, panel superior).

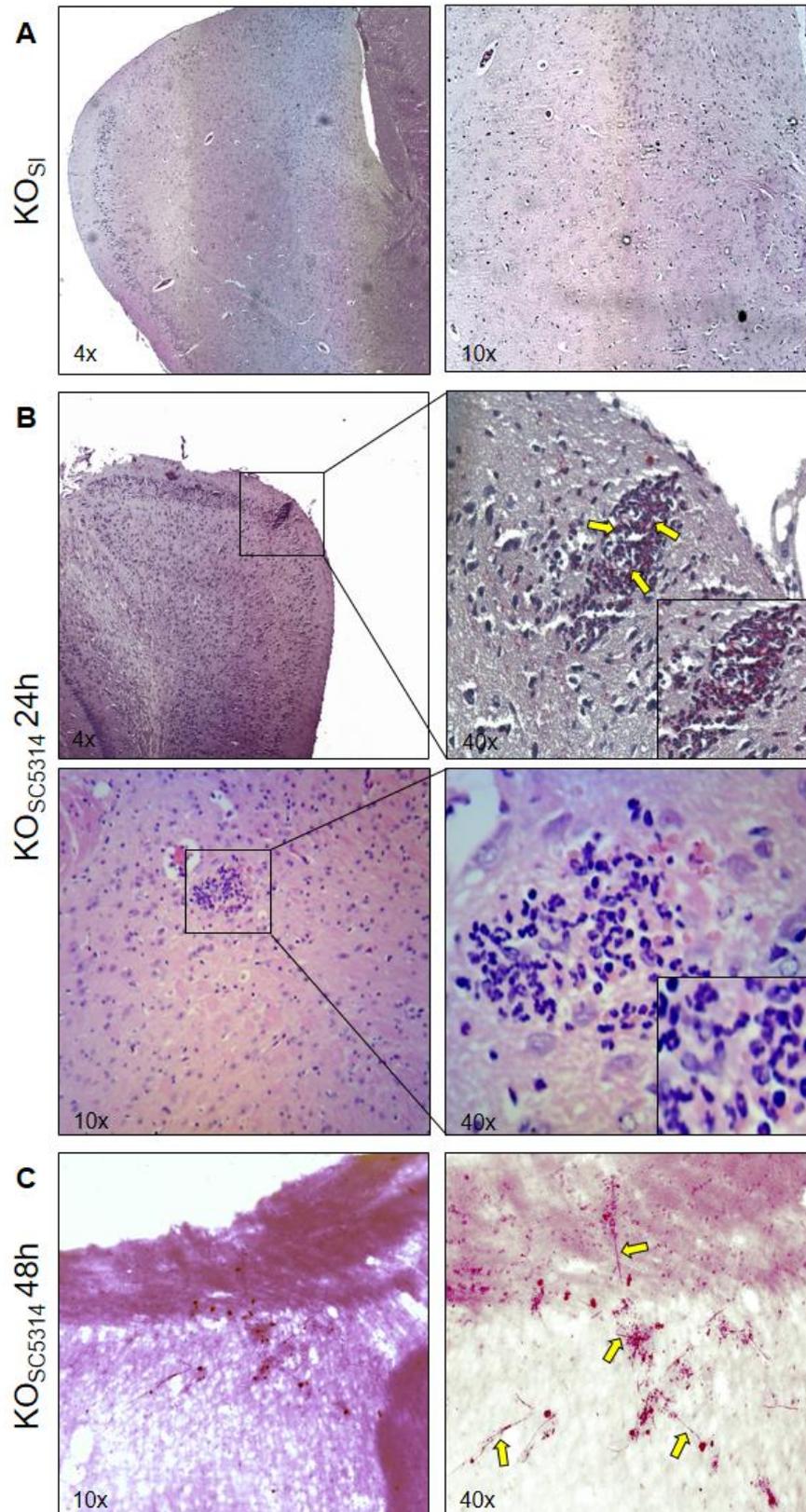


Figura 28. Hallazgos histopatológicos durante la infección cerebral en ratones deficientes en Dectin-1. Microfotografías representativas de cortes de cerebro de ratones deficientes en el receptor Dectin-1 sin infectar (KO_{SI}) (A), o infectado a las 24h (KO_{SC5314}24h) (B) y a las 48h (KO_{SC5314}48h) (C). Se pueden observar las células infiltrantes (recuadros amplificados) y el morfotipo invasivo del hongo (flechas amarillas). Fotografías obtenidas con un microscopio Nikon Eclipse TE 2000 U, equipado con una video cámara digital.

Algunos focos de infiltrado inflamatorio se observaron en las cercanías de los vasos sanguíneos, en ausencia de formas visibles de *C. albicans* (Figura 28 B, panel inferior). A las 48h pi se pudieron identificar hifas del hongo (flechas amarillas) localizadas en el parénquima cerebral, en ausencia de células infiltrantes cercanas (Figura 28 C), y en otras regiones en el interior de microabcesos.

A nivel cerebral, los resultados sugieren que en las primeras horas de la interacción entre el hongo y el huésped, la ausencia de Dectin-1 permite un mayor control en la carga fúngica. Sin embargo, en una infección avanzada donde las células infiltrantes periféricas intervienen en la respuesta inmune antifúngica, el perfil se invierte, hallándose un elevado nivel de hongos en los animales deficientes en el receptor, incluso trascurrida una semana de la inoculación de *C. albicans*.

Se ha descrito que señales inducidas por β -glucanos particulados vía Dectin-1, conduce a una disminución en las funciones de la microglía en cultivo (51,263); por lo tanto, en ausencia de esta señal, la función de esta población sería más eficiente. Nuestros hallazgos durante las primeras horas de la infección estarían de acuerdo con estas observaciones. Por otro lado, en la infección prolongada, la ausencia de este receptor en células infiltrantes, principalmente neutrófilos, podría afectar la funcionalidad de los mismos, dificultando el control de la carga fúngica en cerebro (53)dddr.

Mediadores inmunes en el microambiente cerebral

Los ensayos realizados con la cepa de *C. albicans* FKS645 (mutante) en la primera parte de este capítulo, demostraron un mayor control de la carga fúngica en las primeras etapas de la infección, coincidente con un aumento en la secreción de citoquinas proinflamatorias en los mismos tiempos (Figura 16 B y 18 respectivamente). Una interacción defectuosa con Dectin-1 a raíz de modificaciones en los ligandos expresados en la pared del hongo, condicionaría la señal del receptor luego del reconocimiento fúngico, afectando la respuesta de las células residentes.

En el desarrollo de esta sección, donde los estudios se enfocaron en un huésped deficiente en este receptor, grupo KO_{SC5314}, también se observó una menor carga fúngica a las 4 y 12h pi. Al igual que en la infección con la cepa de *C.albicans* defectiva en la producción de β -glucanos, en ausencia de Dectin-1 se podría estar desarrollando una respuesta inmune inflamatoria exacerbada en las células residentes, favoreciendo de esta manera los mecanismos locales de control y eliminación del hongo observados.

Con el objetivo de evaluar la contribución de Dectin-1 en el desarrollo de la respuesta antifúngica en células gliales durante la invasión cerebral por *C. albicans*, se estudiaron los mediadores inmunes a las 4 y 12h pi, tiempos anteriores a la aparición de los abscesos cerebrales.

Se evaluó la secreción y la expresión génica de IL-1 β en cerebro mediante la técnica de ELISA y qPCR, respectivamente. Se puede observar que en animales del grupo KO_{SC5314}, los niveles de proteína liberada aumentan significativamente luego de la infección, tanto a las 4 ($p < 0,05$) como a las 12h ($p < 0,001$), en comparación con animales KO_{SI} (Figura 29 A, panel izquierdo). Sin embargo, la expresión de mRNA de IL-1 β , no se vio modificado por la presencia de *C. albicans* en ninguno de los tiempos estudiados (Figura 29 A, panel derecho).

Se evaluó también la secreción de la citoquina proinflamatoria TNF, la cual no se vio modificada luego de la infección (Figura 29 B). Sin embargo, la concentración de IL-6 aumentó significativamente luego de la llegada del hongo a cerebro, tanto a las 4 ($p < 0,001$) como a las 12h pi ($p < 0,0001$), con respecto al grupo control KO_{SI} (Figura 29 C). Las citoquinas antiinflamatorias, TGF β e IL-10, tampoco sufrieron cambios en su expresión en los tiempos estudiados (Figura 29 D y E).

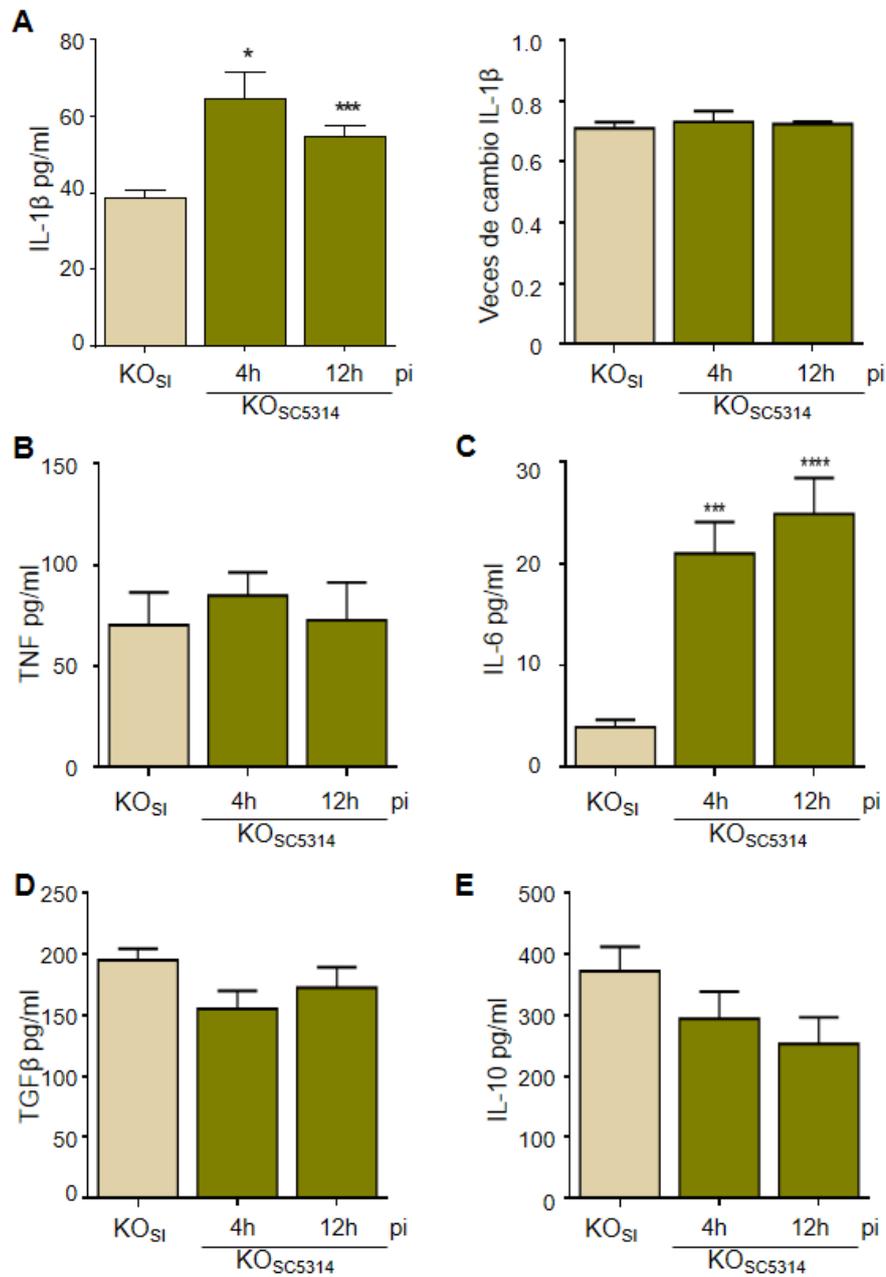


Figura 29. Perfil de citoquinas en cerebro durante la infección sistémica por *C. albicans* SC5314 en ratones deficientes en Dectin-1. Expresión de citoquinas en cerebro de animales Dectin-1KO sin infectar (KO_{S1}) o infectados (KO_{SC5314}) a las 4 y 12 h pi. Determinación de los niveles de proteína (panel izquierdo) y mRNA (panel derecho) de IL-1 β mediante la técnica de ELISA y qPCR, respectivamente (A). Estudio de concentración de TNF (B), IL-6 (C), TGF β (D) e IL-10 (E) utilizando la técnica de ELISA. KO_{S1} vs KO_{SC5314} *p<0,05; ***p<0,001; ****p<0,0001. Los valores representan la media \pm SEM. n \geq 4 para cada punto de la cinética.

Por otro lado, se realizó el análisis comparativo en la expresión de citoquinas entre animales de los grupos WT_{SC5314} y KO_{SC5314}. Al comparar los niveles de IL-1 β presentes en cerebro, se puede observar que la secreción de esta proteína es significativamente mayor a las 4h pi ($p < 0,05$) en aquellos animales que carecen del receptor Dectin-1. A las 12h pi, la concentración de esta citoquina fue más elevada en ratones del grupo WT_{SC5314}, mientras que en los animales deficientes en Dectin-1, se mantuvo constante en el tiempo (Figura 30 A, panel izquierdo). La comparación de los niveles de transcripto de IL-1 β revela una mayor expresión basal en animales KO_{SC5314} ($p < 0,05$), aunque no presentan diferencias entre ambos grupos de animales luego de la infección (Figura 30 A, panel derecho).

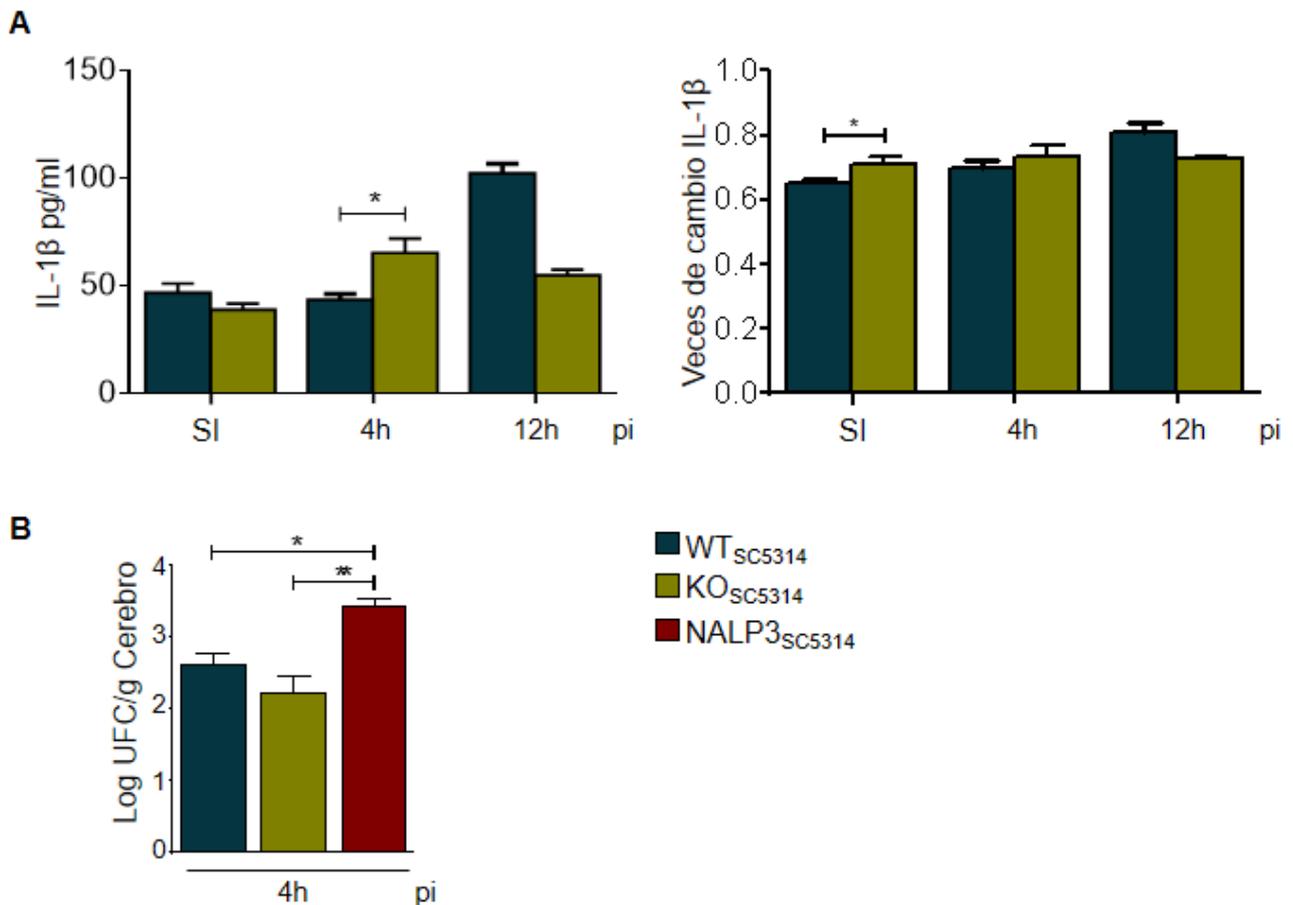


Figura 30. Estudio comparativo de la expresión y secreción de IL-1 β entre animales WT y deficientes en Dectin-1 infectados con *C. albicans* SC5314. Determinación de los niveles de proteína (panel izquierdo) y mRNA (panel derecho) de IL-1 β en animales WT (WT_{SC5314}) o deficientes en el receptor Dectin-1 (KO_{SC5314}) a las 4 y 12h post-infección (A). Recuento de UFC en cerebro de ratones deficientes del receptor NLRP3 inoculados iv con 2.5×10^6 levaduras viables de *C. albicans* SC5314, a las 4h post-infección comparado con los grupos WT_{SC5314} y KO_{SC5314} (B). Comparación entre grupos infectados: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Los valores representan la media \pm SEM. $n \geq 4$ para cada punto de la cinética.

A fin de evaluar la relevancia de la IL-1 β en el control de la carga fúngica cerebral durante la interacción primaria con el hongo, se utilizó un lote de ratones C57BL/6 deficientes en NLRP3, inflamasoma involucrado en el clivaje del pro péptido de IL-1 β para su liberación como citoquina activa (277). Los animales se infectaron por vía iv con la cepa de *C.albicans* SC5314 y se sacrificaron a las 4h pi, para evaluar la carga fúngica intracerebral (grupo NLRP3_{SC5314}). La Figura 30 B muestra que los animales NLRP3_{SC5314} presentan una mayor carga fúngica a las 4h pi con un incremento de 1,32 veces comparado con los ratones WT_{SC5314} (WT_{SC5314} vs NLRP3_{SC5314} p<0,05). También se observa un aumento de 1,54 en el número de UFC en cerebro respecto a los animales KO_{SC5314} infectados con la misma cepa del hongo (KO_{SC5314} vs NLRP3_{SC5314} p<0,05).

Estos resultados sugieren que la secreción de IL-1 β sería necesaria para el control del crecimiento *C. albicans* en este nicho, durante el primer contacto entre las células gliales residentes con el hongo.

El estudio de la secreción de TNF revela mayores niveles de esta citoquina en ratones KO_{SC5314} a las 4h pi, en comparación con los animales WT_{SC5314} (p<0,01), manteniéndose elevada hacia las 12h pi, aunque en este tiempo ya no presenta diferencias significativas entre los grupos evaluados (Figura 31 A).

La secreción de IL-6 es marcadamente menor en animales deficientes en Dectin-1, tanto a nivel basal (p<0,0001) como a las 4h (p<0,001) y 12h (p<0,0001) pi, comparado con los ratones WT_{SC5314} (Figura 31 B). Interesantemente, la secreción de TGF β , considerado un potente inmunoregulador, se encuentra aumentada en los ratones Dectin-1 KO en todos los tiempos evaluados durante la infección, incluso en condiciones basales, como puede observarse cuando se comparan los niveles constitutivos de esta citoquina en ambas cepas de animales (WT_{SI} vs KO_{SI} p<0,05) (Figura 31 C).

En ambos grupos de ratones, el nivel constitutivo de IL-10 es similar. A las 12h pi se observa una menor secreción de esta citoquina en ratones deficientes del receptor estudiado (p<0,05) (Figura 31 D).

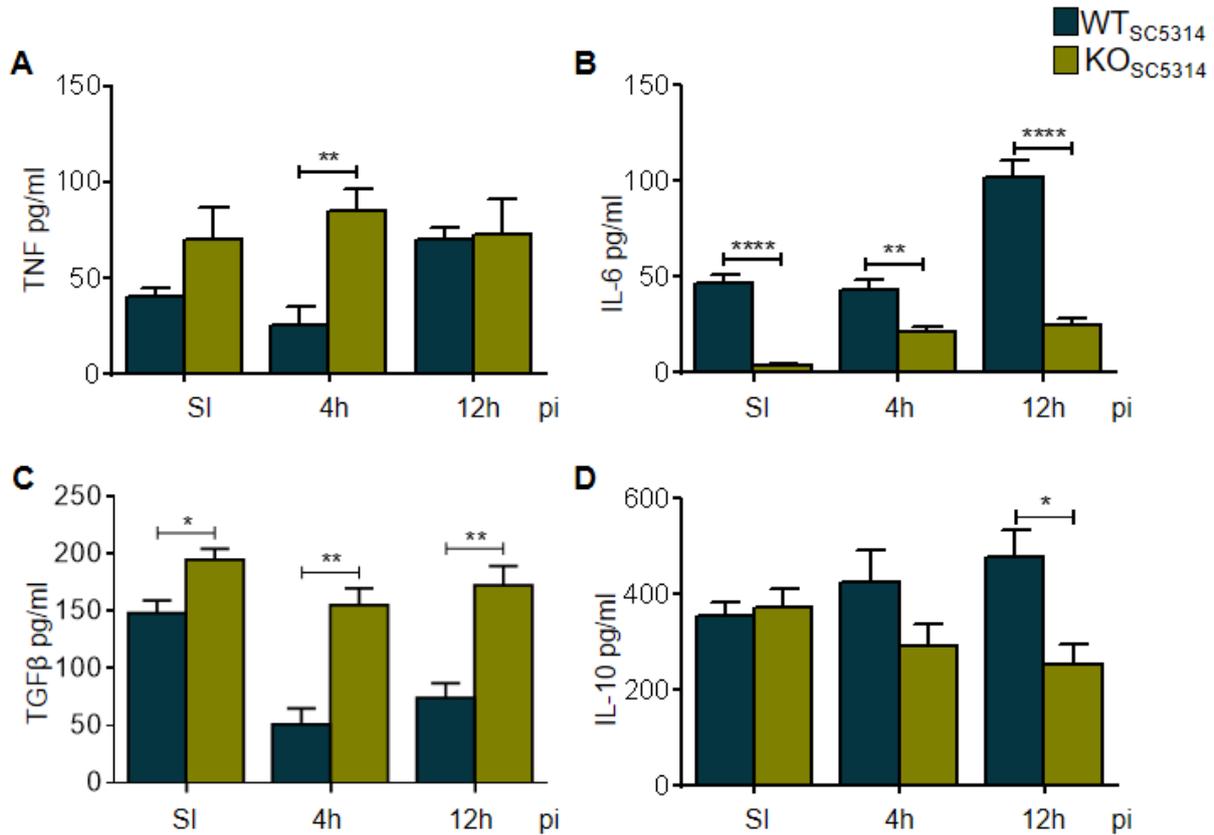


Figura 31. Estudio comparativo del perfil de citoquinas intracerebrales durante la infección sistémica con *C. albicans* en animales WT_{SC5314} vs KO_{SC5314}. Análisis de la concentración de TNF (A), IL-6 (B), TGFβ (C) e IL-10 (D) mediante la técnica de ELISA. Comparación entre grupos infectados: *p<0,05; **p<0,01; ****p<0,0001. Los valores representan la media ± SEM. n ≥ 4 para cada punto de la cinética.

En conjunto, estos resultados sugieren que en un primer contacto con el hongo, las células residentes de cerebro son capaces de inducir una mayor secreción de las citoquinas proinflamatorias TNF e IL-1β en ausencia del receptor Dectin-1. Esta respuesta inmune más robusta podría estar vinculada a la menor carga fúngica observada en ratones KO_{SC5314} a tiempos tempranos. La menor secreción de IL-6 refuerza el concepto de la importancia de la vía de señalización de Dectin-1 en la inducción de esta citoquina, mientras que los elevados niveles de TGFβ sugieren un microambiente regulado.

Un resultado importante de enfatizar derivado de estos experimentos es que estos hallazgos coinciden con lo observado durante la infección cerebral por la cepa de *C. albicans* defectuosa en la producción de β-glucanos, ligando del receptor en estudio, lo que refuerza el concepto de la importancia de la señal dependiente de Dectin-1 en las primeras etapas de la interacción con el patógeno fúngico.

Activación de células gliales

El mayor control de la carga fúngica en cerebro de animales KO_{SC5314} asociado a la elevada secreción de citoquinas proinflamatorias a tiempos tempranos, plantean la necesidad de evaluar el estado de activación de las células gliales en la primeras etapas de interacción con el hongo, en ausencia del receptor Dectin-1.

Para poder evidenciar los cambios que sufren las células residentes de cerebro luego de la invasión por el hongo (4h), se realizaron técnicas de inmunomarcación para visualizar microglía y astrocitos en cortes histológicos de ratones del grupo KO_{SC5314} y los resultados obtenidos se compararon con la expresión observada en animales KO_{SI} y WT_{SC5314}.

Las células microgliales se evaluaron mediante IHQ utilizando el anticuerpo específico anti Iba-1, revelando con DAB por su elevada sensibilidad (Figura 32).

Se puede observar la morfología normal de estas células en estado de reposo en cortes de cerebro de animales KO_{SI}, donde se encuentran principalmente procesos finos ramificados, distribuidos de manera heterogénea por diferentes áreas del tejido (Figura 32 A, panel izquierdo). A las 4h pi pudieron visualizarse células microgliales con cambios morfológicos característicos de la activación celular, tales como engrosamiento de las dendritas y formas ameboidales, localizadas en diferentes áreas del cerebro (figura 32 A, panel derecho).

El análisis semicuantitativo muestra un aumento significativo en la media de expresión para el marcador Iba-1 en el grupo KO_{SC5314} con respecto al control KO_{SI}, evidenciando la magnitud de este fenómeno luego de la interacción temprana con el hongo y el estado de activación ($p < 0,0001$) (Figura 32 B).

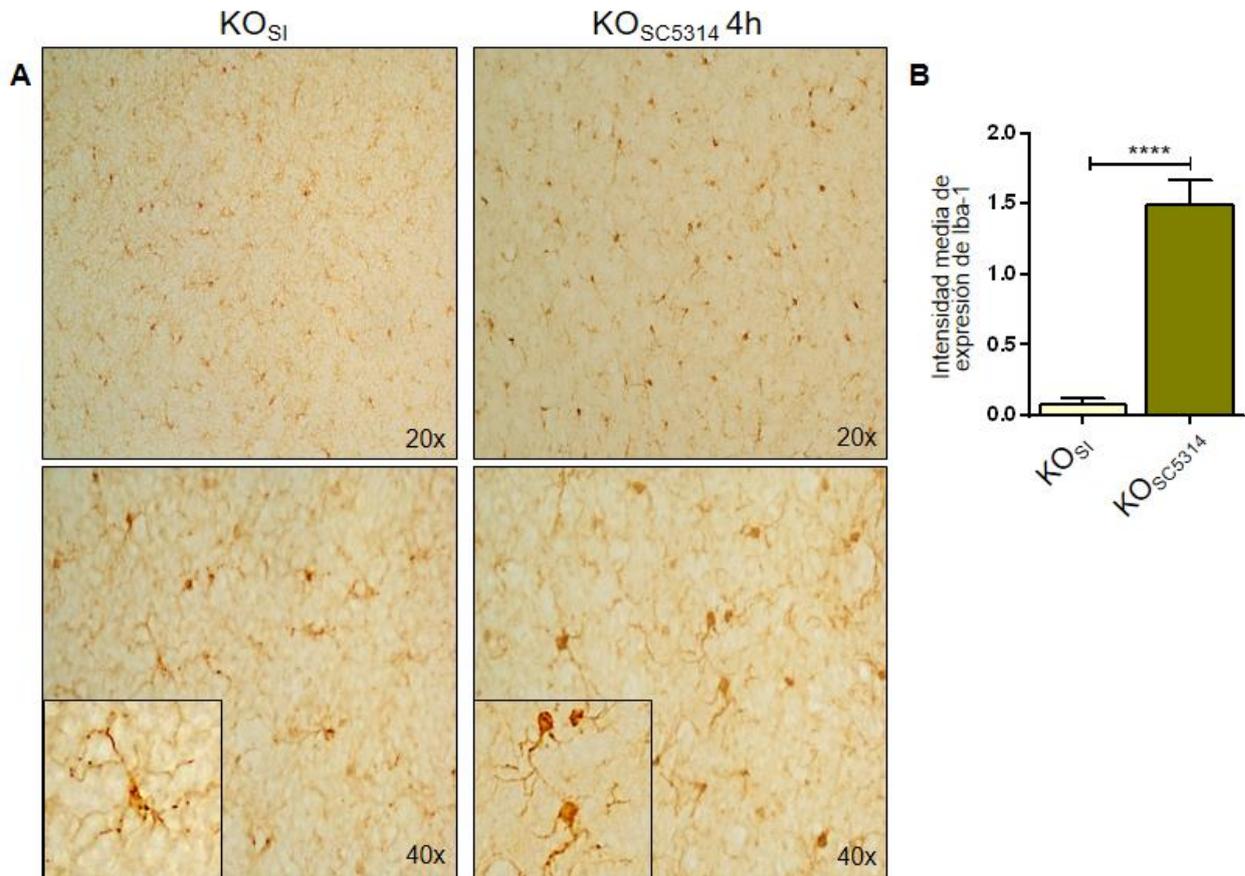


Figura 32. Expresión de Iba-1 en cerebro de ratones deficientes en Dectin-1. Imágenes representativas de inmunohistoquímica de cortes de cerebro de animales deficientes en el receptor Dectin-1, sin infectar (KO_{SI}) (panel izquierdo) o a las 4h post-infección (KO_{SC5314}) (panel derecho), marcados con anticuerpo específico para microglía anti Iba-1 y revelado con DAB (A). Semiquantificación de la expresión del marcador de microglía en diferentes áreas del cerebro a las 4h pi, expresado como la intensidad media de expresión para Iba-1 (B). Los valores representan la media \pm SEM. $n \geq 3$. KO_{SI} vs KO_{SC5314} **** $p < 0,0001$. Fotografías obtenidas con un microscopio Nikon Eclipse TE 2000 U, equipado con una video cámara digital. Las imágenes se evaluaron mediante el programa FIJI ImageJ.

La Figura 33 A muestra imágenes representativas de cortes de cerebro de animales WT_{SC5314} y KO_{SC5314}, donde pueden observarse células de microglía con morfología de activación en ambos grupos experimentales. En la amplificación del recuadro, se pueden observar células microgliales ameboidales, con engrosamiento del soma y de las dendritas.

El análisis semicuantitativo demostró una expresión basal de Iba-1 significativamente mayor en el grupo WT en comparación con los ratones deficientes en Dectin-1, previo a la inoculación del hongo (WT_{SI} vs KO_{SI}) ($p < 0,01$). Mientras que la intensidad media de expresión en animales deficientes en el receptor fue de 0,08, en ratones WT fue de 0,6 (Figura 33 B).

Al evaluar la expresión de Iba-1 en ambos grupos experimentales, se observó que los ratones deficientes en el receptor Dectin-1 presentan una intensidad media de expresión del marcador de microglía tres veces mayor respecto a los animales del grupo WT_{SC5314} ($p < 0,001$), evidenciando claramente la activación de esta población celular (Figura 33 B).

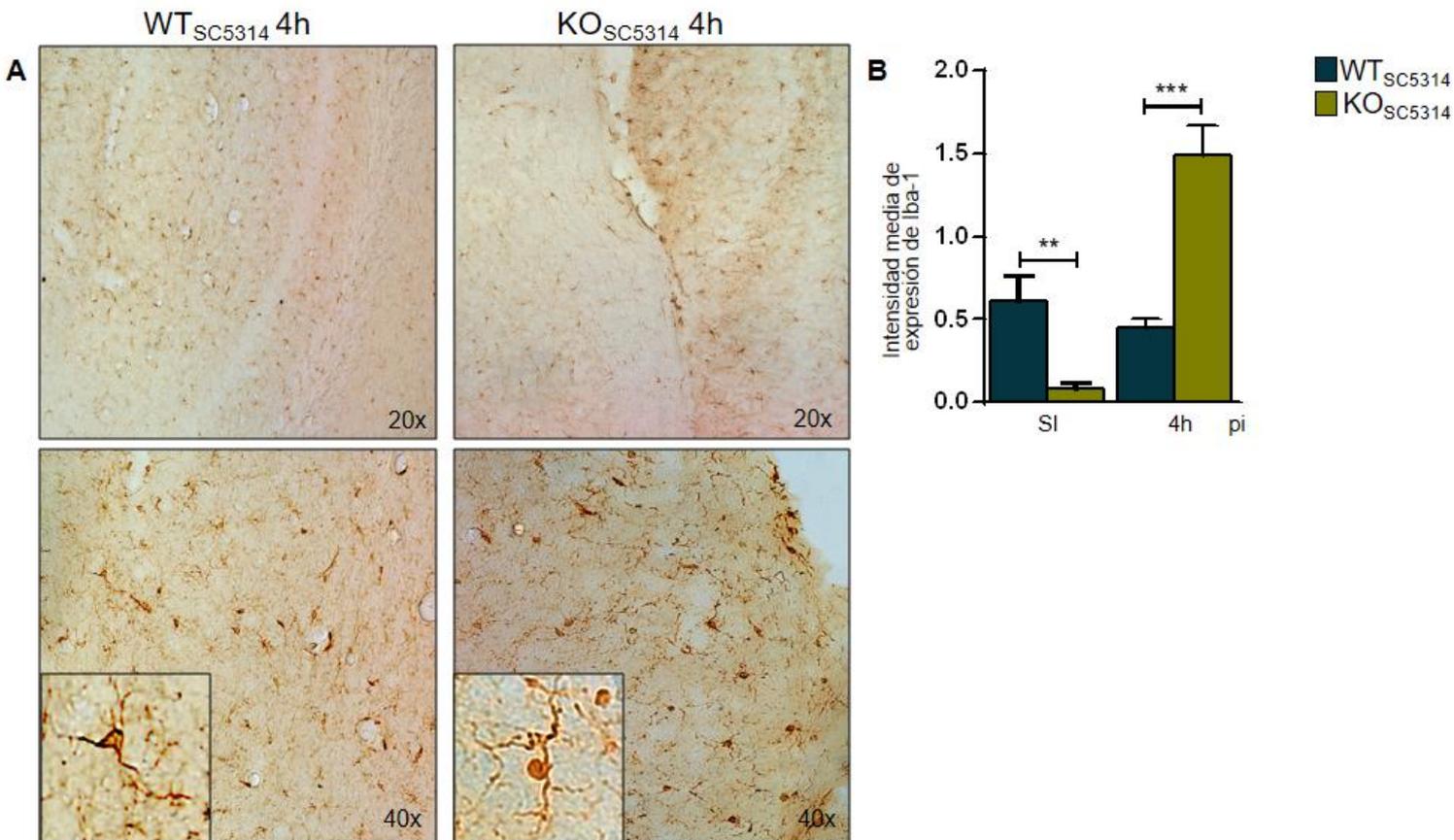


Figura 33. Estudio comparativo de la expresión de Iba-1 entre ratones WT_{SC5314} vs KO_{SC5314}. Imágenes representativas de cortes de cerebro de ratones WT_{SC5314} (panel izquierdo) o KO_{SC5314} (panel derecho), marcados mediante la técnica de inmunohistoquímica a las 4h post-infección, utilizando el anticuerpo específico para microglía anti-Iba-1 y revelado con DAB (A). Semicuantificación de la expresión del marcador de microglía en diferentes áreas del cerebro a las 4h pi, expresado como la intensidad media de expresión para Iba-1 (B). WT_{SC5314} vs KO_{SC5314} *** $p < 0,001$. Los valores representan la media \pm SEM. $n \geq 3$. Fotografías obtenidas con un microscopio Nikon Eclipse TE 2000 U, equipado con una video cámara digital. Las imágenes se evaluaron mediante el programa FIJI ImageJ.

En los animales deficientes en Dectin-1 también se evaluaron los cambios experimentados en la población de astrocitos a las 4h de la infección con *C. albicans* SC5314 (Figura 34).

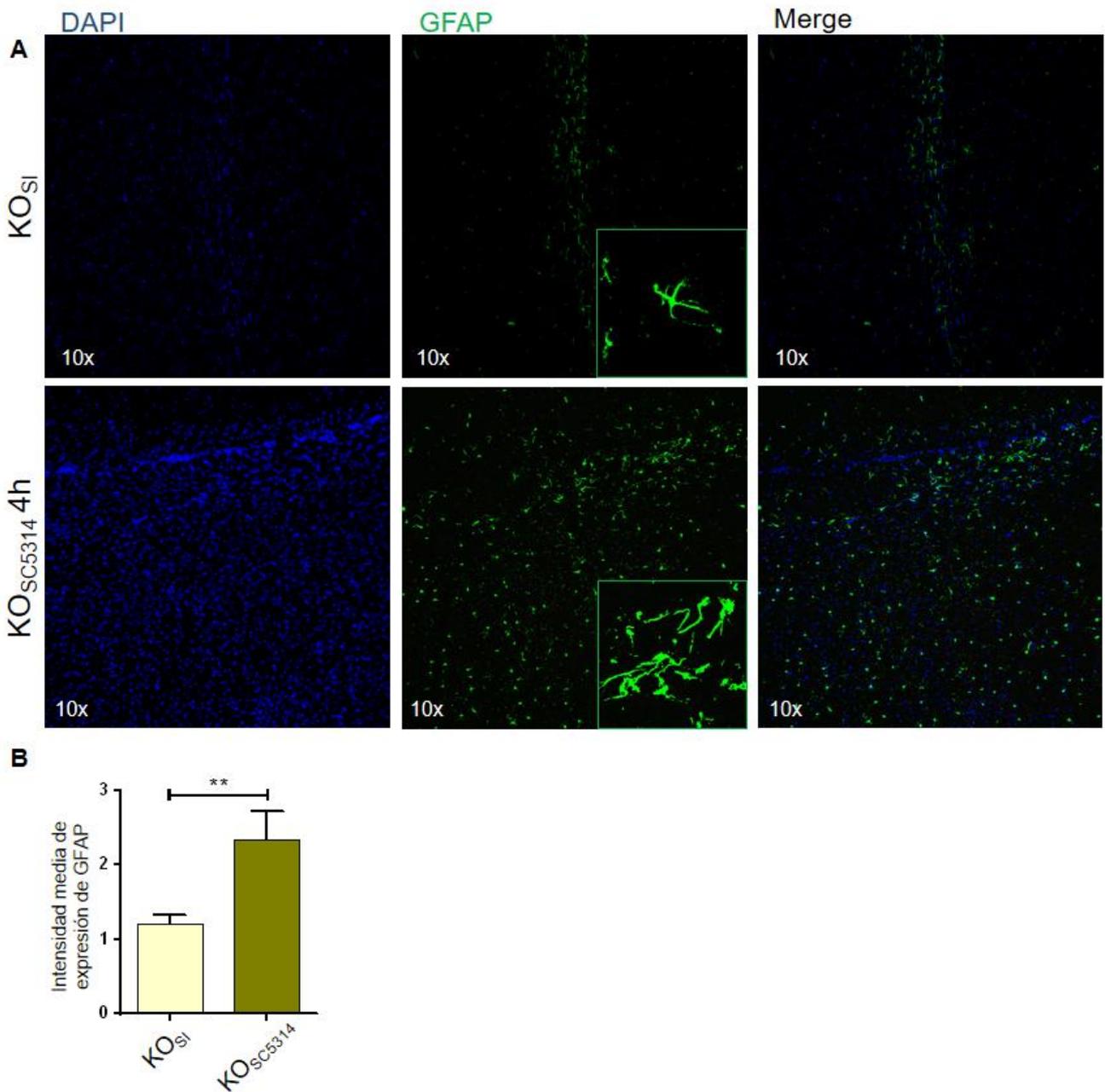


Figura 34. Expresión de GFAP en cerebro de ratones deficientes en Dectin-1. Imágenes representativas de inmunofluorescencia de cortes de cerebro de animales deficientes en el receptor Dectin-1 sin infectar (KO_{S1}) (panel superior) o infectado (4h) (KO_{SC5314}) (panel inferior), revelados con anticuerpo específico para astrocitos anti-GFAP (A). Semicuantificación de la intensidad media de expresión de GFAP en diferentes áreas del cerebro, a las 4h luego de la infección. Los núcleos celulares se tiñeron con el colorante DAPI. Los recuadros corresponden a la magnificación de estructuras en las figuras correspondientes. KO_{S1} vs KO_{SC5314} **p<0,01. Los valores representan la media ± SEM. n = 3. Fotografías obtenidas con un microscopio invertido de fluorescencia LEICA DMI8. La cuantificación de la fluorescencia se realizó mediante el software ImageJ FIJI.

La activación temprana de estas células se estudió mediante la técnica de IF, utilizando anticuerpos contra la proteína estructural GFAP, marcador específico de astrocitos. Se utilizó además el colorante DAPI a fin de visualizar los núcleos celulares. La Figura 34 A (panel superior) muestra la expresión basal de GFAP, correspondiente a un ratón de la cepa en estudio y en ausencia de infección, grupo KO_{SI}. Luego de 4h pi, pueden visualizarse cambios característicos de la activación de los astrocitos en animales KO_{SC5314}, principalmente la proliferación y distribución heterogénea por el tejido, aunque también se observaron áreas con superposición de procesos que imposibilita la diferenciación entre células, y un aumento en la expresión de la proteína estructural GFAP (Figura 34 A, panel inferior).

El análisis semicuantitativo revela que la infección con *C. albicans* induce una marcada astrogliosis en los animales KO_{SC5314}, comparado con la expresión observada en el grupo de animales KO_{SI} ($p < 0,01$) (Figura 34 B).

La observación sistemática de varios cortes histológicos de cerebro permitió revelar una mayor frecuencia en la expresión de GFAP en animales deficientes del receptor Dectin-1 (panel inferior), en comparación con los ratones del grupo WT_{SC5314} (panel superior) a las 4h luego de la infección (Figura 35 A).

La semicuantificación de la intensidad media de expresión para el marcador GFAP en distintas áreas del cerebro, revela una mayor activación de astrocitos en ratones del grupo KO_{SC5314} ($p < 0,01$) (Figura 35 B), siendo 1,3 veces mayor en este grupo que en los animales infectados que expresan el receptor. La expresión basal de GFAP fue significativamente mayor en animales KO_{SI} en comparación con el grupo WT_{SI} (Figura 35 B).

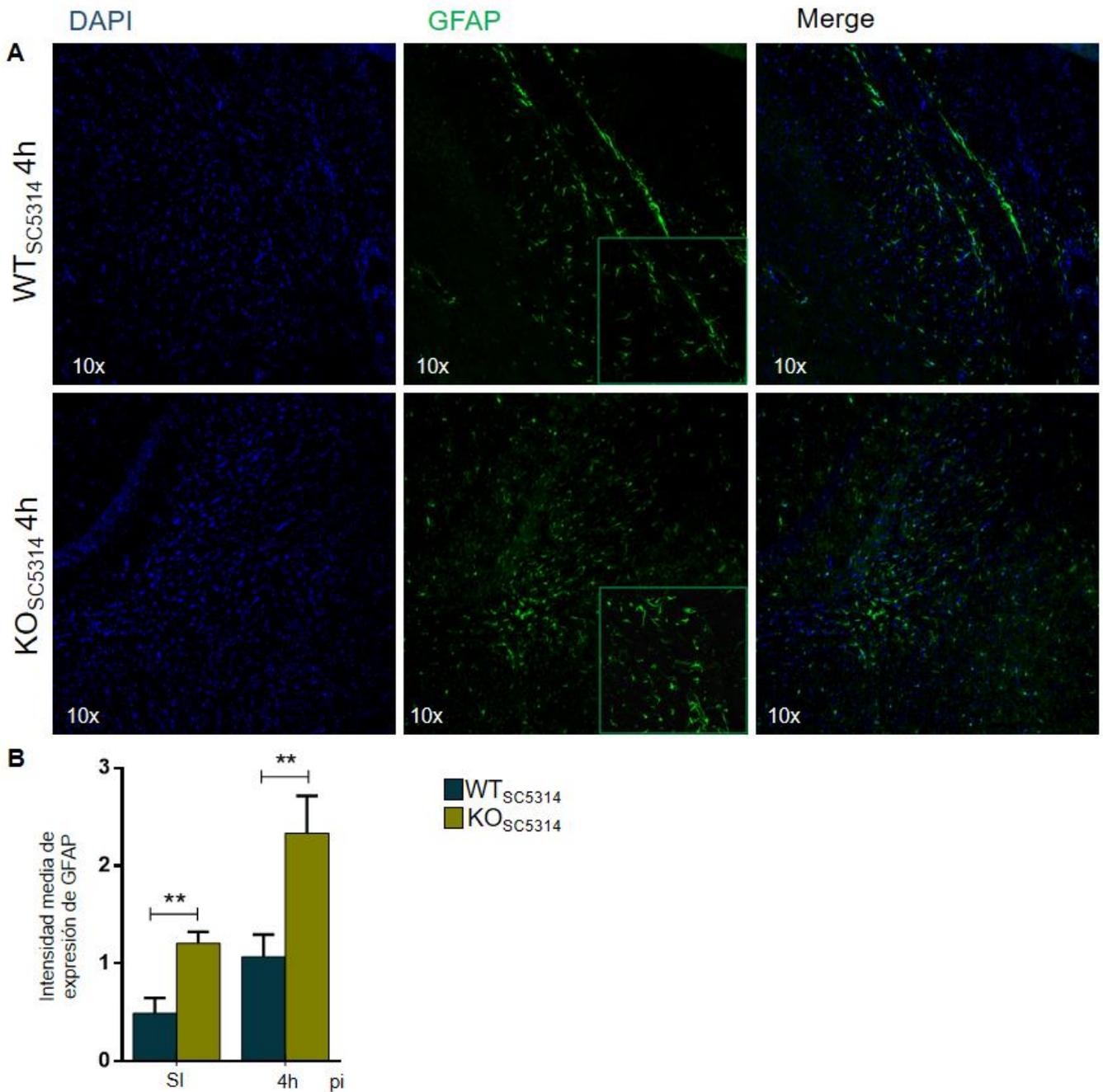


Figura 35. Estudio comparativo de la expresión de GFAP entre cerebro de ratones WT_{SC5314} y KO_{SC5314}. Imágenes representativas de inmunofluorescencia de cortes de cerebro de animales deficientes en Dectin-1 (KO_{SC5314}) (panel inferior) o ratones WT (WT_{SC5314}) (panel superior), a las 4h post-infección, revelados con anticuerpo anti-GFAP, específico para astrocitos (A). Semicuantificación de la intensidad media de expresión del marcador de astrocitos GFAP en diferentes áreas del cerebro (4h pi) (B). El colorante DAPI tiñe los núcleos celulares. Los recuadros corresponden a la magnificación de un área de las figuras correspondientes. WT_{SC5314} vs KO_{SC5314} **p<0,01. Los valores representan la media ± SEM. n =3. Fotografías obtenidas con un microscopio invertido de fluorescencia LEICA DMI8. La semicuantificación de la fluorescencia se realizó con el software ImageJ FIJI.

En su conjunto, estos resultados sugieren que, 4h posteriores a la diseminación hematógica de *C.albicans*, el hongo infecta el parénquima cerebral provocando la activación temprana de células gliales en ratones deficientes en Dectin-1 caracterizada por la presencia de microgliosis y astrogliosis. Estas observaciones, asociadas a una menor carga fúngica intracerebral y mayor producción de citoquinas proinflamatorias, IL-1 β y TNF, observada en este modelo, sugiere que la ausencia del receptor en este nicho particular, permite una activación temprana de las células residentes, que resulta más eficiente que en animales WT, donde la respuesta inflamatoria se encuentra regulada negativamente en el primer contacto con el patógeno fúngico.

Conclusiones capítulo 2. Parte II

Durante la patogenia de la infección sistémica por *C. albicans* SC5314 en animales deficientes en el receptor Dectin-1:

- Luego de la infección sistémica, el peso corporal de los animales disminuye rápidamente, coincidente con un aumento en la carga fúngica a nivel renal y una elevada mortalidad que llega al 50% a los 6d pi. El 100% de los animales mueren a los 8d pi.
- El IPC es significativamente menor en ratones deficientes en Dectin-1 a las 48h y 7d, en comparación con los valores obtenidos en los animales WT infectados con *C. albicans* SC5314. La infección renal mostró una carga fúngica notablemente mayor a las 4, 12, 24 y 48h pi en los animales Dectin-1 KO, con respecto a los ratones que poseen el receptor. A los 6 días pi el 50% de los animales Dectin-1 KO infectados murió, observándose un descenso precoz comparado con los animales WT (11d). La mortalidad global fue mayor.
- A los 7d pi se observó un franco daño en el riñón, con marcado deterioro estructural y abundantes cúmulos de hifas, localizadas principalmente en la pelvis renal. Se observó presencia de infiltrado inflamatorio aunque no fue suficiente para controlar el crecimiento del hongo.

Durante la patogenia de la infección cerebral en animales deficientes en el receptor Dectin-1:

- Tras la inoculación sistémica de *C. albicans*, el hongo infecta rápidamente cerebro, pudiendo hallarse en concentraciones significativas a partir de las 4h pi, con un pico a las 24h pi. A la semana de infección, los animales del grupo KO_{SC5314} no son capaces de eliminar al hongo del cerebro.
- En comparación con los animales WT, la carga fúngica fue menor en ratones deficientes a las primeras horas pi (4 y 12), mientras que en tiempos más prolongados (24h y 7d) el perfil se invirtió.
- A las 24h y 48h pi pudieron observarse hifas del hongo en el parénquima cerebral, rodeados por neutrófilos que se encuentran formando abscesos en

diferentes regiones del tejido. También se encontraron algunos hongos con morfología invasiva en ausencia de células infiltrantes.

- La colonización cerebral de *C. albicans* en ratones KO_{SC5314} induce la secreción de la citoquina IL-1 β e IL-6, en comparación con animales deficientes en Dectin-1 sin infectar. Las demás citoquinas evaluadas no mostraron diferencias significativas con respecto a la expresión basal.
- El análisis comparativo permitió establecer mayores niveles de citoquinas proinflamatorias, IL-1 β y TNF, a tiempos tempranos (4 pi), correspondiente a la respuesta mediada por células residentes, con respecto al grupo WT_{SC5314}.
- La secreción de la citoquina antiinflamatoria TGF β , fue mayor en condiciones basales en ratones deficientes en Dectin-1 y aumentó significativamente luego de la infección (4 y 12h pi), en comparación con el grupo WT_{SC5314}. Los niveles de IL-6 fueron significativamente menores en animales KO en todos los tiempos evaluados, mientras que la IL-10 mostró una menor secreción a las 12h pi en ratones deficientes en Dectin-1.
- Las células microgliales residentes de cerebro muestran características de activación celular en ratones KO_{SC5314}, con respecto al control KO_{SI}. A las 4h pi, y tanto el marcador de microglía Iba-1, como el de astrocitos GFAP, aumentan significativamente frente al hongo.
- En comparación con los ratones WT, la activación de microglía y astrocitos fue significativamente mayor en el grupo KO_{SC5314} a las 4h pi.

CAPÍTULO 3

El talento es el hombre en libertad, nace en cualquier persona que se sienta capaz de volar con sus ideas” Luis A. Spinetta

Evaluar la contribución de la activación del receptor Dectin-1 durante la infección cerebral por *C. albicans* en procesos neurotóxicos y de muerte neuronal.

Durante la mayor parte del siglo pasado, el SNC se consideraba tradicionalmente como un órgano inmunológicamente privilegiado, definido experimentalmente por la presencia de una barrera tisular local y un microambiente inmunosupresor (163). Sin embargo, durante la última década este concepto ha sido ampliamente cuestionado. De hecho, hoy se sabe que es un sitio de vigilancia activa, donde existe una comunicación bidireccional continua entre el SNC y el sistema inmune (278), siendo capaz de generar una respuesta inflamatoria bien definida frente a lesiones infecciosas y traumáticas (163,279).

El SNC puede ser infectado por una amplia gama de microorganismos, incluyendo bacterias, virus, parásitos y hongos. Sin bien las infecciones fúngicas cerebrales son entidades raras en la clínica, representan una amenaza especial para los pacientes inmunocomprometidos (93,280). En la actualidad, muchos de los mecanismos inmunológicos que controlan la infección del SNC no se comprenden en su totalidad, especialmente en infecciones causadas por hongos. Las respuestas inmunes frente a patógenos en cerebro en las etapas tempranas de la infección, están mediadas principalmente por microglía y astrocitos, células residentes de SNC (169,257).

Frente a una infección, la microglía se activa y migra al sitio de la lesión, donde es capaz de secretar citoquinas, quimiocinas, ROS, y fagocitar activamente células apoptóticas, microbios y restos celulares (51). Por su parte, los astrocitos activados contribuyen a los procesos inflamatorios a través de la expresión de proteínas del complemento y la liberación de otros factores inmunológicos (281,282).

El desarrollo de respuestas inmunes en cerebro ante cualquier tipo de lesión es fundamental para mantener la homeostasis en el SNC, ya sea en el control de infecciones así como en los mecanismos de reparación tisular. Sin embargo, existe un fino equilibrio entre los efectos beneficiosos y perjudiciales durante los procesos inflamatorios, donde la activación celular sostenida puede provocar daños en las células neuronales circundantes (51). Resulta necesario entonces,

que existan mecanismos inmunomoduladores que limiten la respuesta inflamatoria en este órgano. Los β -glucanos son polisacáridos ampliamente reconocidos como inmunomoduladores, y se ha demostrado que, mediante la unión al receptor Dectin-1, pueden atenuar la producción de citoquinas por la microglía, mediante un mecanismo que involucra TLR2, por inhibición de la activación del factor de transcripción NF κ B (51).

En los capítulos anteriores se pudo determinar que la rápida llegada de *C. albicans* a cerebro en animales WT_{SC5314}, induce procesos de activación de las células residentes, pudiendo observarse niveles significativos de citoquinas en este órgano a tiempos tempranos (4 y 12h pi). Además, los resultados obtenidos mostraron una respuesta inmune más robusta en animales infectados con la cepa defectiva en la producción de β -glucanos y más aún en ausencia total de Dectin-1, coincidente con el menor recuento de UFC en las primeras etapas de interacción con el patógeno (animales WT_{FKS645} y KO_{SC5314}). No obstante, en estos modelos experimentales, los animales no fueron capaces de controlar eficientemente al hongo en la infección avanzada, encontrándose niveles elevados de *C. albicans* incluso a la semana de infección. Estos ratones mostraron un mayor porcentaje de muerte con respecto al observado durante la infección con la cepa *C. albicans* SC5314 en un huésped normal (WT_{SC5314}).

Por todo lo expuesto, en este capítulo se decidió evaluar el estado de activación de las células gliales en etapas más avanzadas de la infección por *C. albicans*, estudiando el impacto la respuesta local en los procesos de degeneración y muerte neuronal. Por sus características, estos procesos requieren de un tiempo de inducción para su manifestación en el tejido, que oscila entre 24 y 48h posteriores a la aparición de la noxa o mecanismo de injuria. A fin de evaluar la contribución del rol del receptor Dectin-1 en estos eventos, se trabajó con animales que expresan el receptor (WT) y animales deficientes en el mismo (KO), los cuales se infectaron con *C. albicans* SC5314. A las 24 y 48h pi se evaluó el estado de la activación de las células residentes y los procesos de daño y degeneración neuronal.

Activación de Células Gliales

Infeción sistémica en ratones WT con *C. albicans* SC5314

Con el objetivo de determinar el estado de activación de las células gliales en huéspedes normales luego de la infección con *C. albicans* SC5314, ratones del grupo WT_{SC5314} se infectaron como se describió anteriormente y se sacrificaron a las 24 y 48h pi. Para evaluar el estado de activación basal, los ensayos se realizaron además en animales del grupo control WT_{SI}. Los ratones se perfundieron *in vivo* (materiales y métodos) a fin de preservar las estructuras celulares, y se obtuvo el cerebro para realizar cortes histológicos. Las poblaciones celulares se identificaron utilizando anticuerpos específicos para microglía, anti Iba-1, y para astrocitos, anti-GFAP, empleando técnicas de inmunofluorescencia.

En la figura 36 se muestran imágenes representativas de cortes de cerebro de animales WT_{SI} (panel izquierdo), WT_{SC5314} infectados a las 24h (panel medio) y a las 48h pi (panel derecho).

La activación de células microgliales pudo observarse tanto a las 24 como a las 48h pi, evidenciada por el aumento en el número de estas células en algunas regiones cerebrales, y la presencia de microglía con forma ameboidal y engrosamiento de los procesos, mientras que en los animales WT_{SI} la morfología observada fue típica de células en reposo.

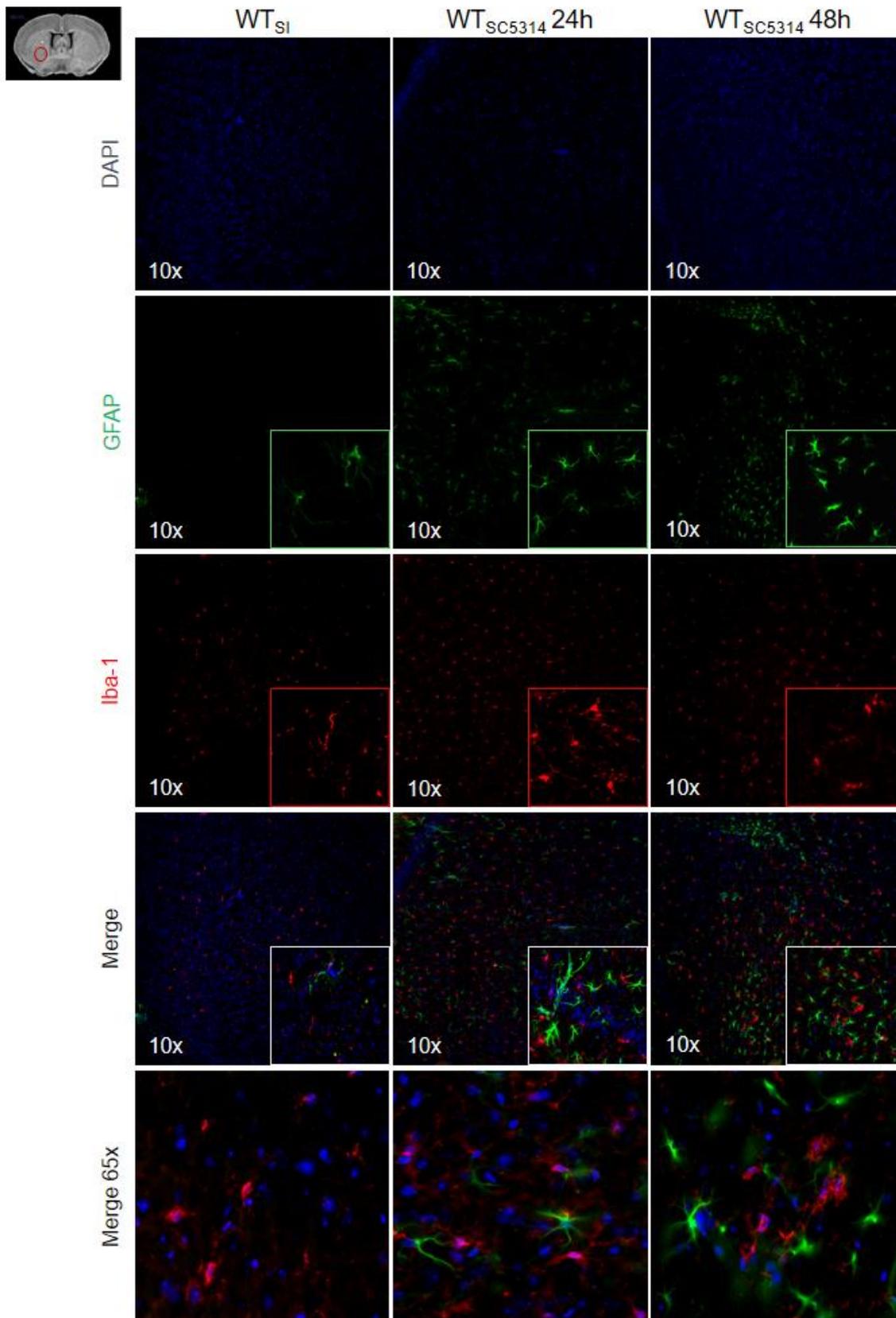


Figura 36. Expresión de Iba-1 y GFAP en cerebro de ratones WT. Imágenes representativas de inmunofluorescencia de cortes de cerebro de animales sin infectar (WT_{SI}) (panel izquierdo) o infectados (WT_{SC5314}) a las 24h (panel medio) y 48h (panel derecho), revelados con anticuerpo anti-GFAP (verde) y anti-Iba1 (rojo), específicos para astrocitos y microglía respectivamente. Los núcleos celulares se tiñeron con el colorante DAPI (azul). Los recuadros representan la magnificación de áreas de las figuras correspondientes. Fotografías obtenidas con un microscopio invertido de fluorescencia LEICA DMI8.

Los astrocitos también sufrieron cambios propios de la activación celular a las 24 y 48h de la inoculación de *C. albicans*. Puede visualizarse un aumento en el número de estas células en varias áreas del parénquima cerebral, acompañado del aumento en la expresión de la proteína estructural GFAP y áreas con superposición de procesos, que impide la diferenciación entre células individuales (Figura 36).

El análisis semicuantitativo de la intensidad media de expresión de Iba-1 a partir de microfotografías de diferentes áreas cerebrales, muestra un pico de microgliosis a las 24h pi ($p < 0,05$), con un incremento de una magnitud 10 veces mayor que la encontrada en el animal normal. La expresión del receptor Iba-1 mostró una pronunciada disminución a las 48h pi, permaneciendo elevada con respecto al grupo WT_{SI} ($p < 0,01$) (Figura 37 A). Por su parte, la semicuantificación de la intensidad media de células positivas para GFAP revela que la astrogliosis aumenta significativamente a las 24h pi ($p < 0,05$), en comparación con los animales WT_{SI}, con un incremento relativo de 3 veces. La expresión de este marcador se mantuvo constante a las 48h posteriores a la inoculación del (Figura 37 B).

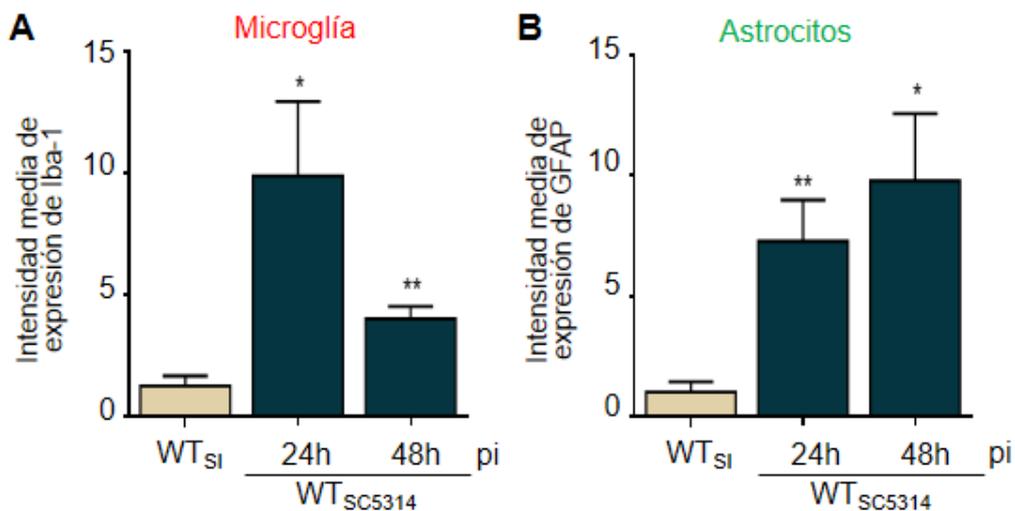


Figura 37. Semicuantificación de la expresión de Iba-1 y GFAP en cerebro de ratones WT. Activación de microglía (A) y astrocitos (B) en diferentes áreas del cerebro a las 24h y 48h luego de la infección con *C. albicans* SC5314 en animales WT, expresado como la intensidad media de expresión para el marcador Iba-1 o GFAP, respectivamente. WT_{SI} vs WT_{SC5314} * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Los valores representan la media \pm SEM. $n = 3$ animales. La semicuantificación de la expresión se realizó con el software ImageJ FIJI.

Infección sistémica en ratones Dectin-1 KO con *C. albicans*

SC5314

Los resultados anteriores demuestran que en un huésped normal, en el período comprendido entre las 24 y 48h posteriores a la llegada del hongo al cerebro, se induce la activación de las células gliales residentes de este órgano. Con el objetivo de establecer la contribución del receptor Dectin-1 en estos eventos, se evaluó la astrogliosis y microgliosis en cortes de cerebro de animales deficientes en dicho receptor luego de la inoculación sistémica con *C. albicans*. Para ello, ratones del grupo KO_{SC5314} se infectaron como se describió anteriormente y se sacrificaron a las 24 y 48h pi. Los ensayos se realizaron además en animales del grupo control KO_{SI}. Los resultados obtenidos se compararon con este último grupo, a fin de establecer las condiciones basales de expresión en este *background* genético (Figura 38).

La observación sistemática de cortes histológicos en diferentes áreas del cerebro a las 24h pi, permitió visualizar células de microglía con morfología de activación, caracterizadas principalmente por la hipertrofia del soma celular y el acortamiento de las dendritas (Figura 38, panel medio). A las 48h pi, la activación de estas células fue más evidente, pudiendo distinguirse formas claramente ameboidales y un mayor número de células en las diferentes áreas del cerebro evaluadas (Figura 38, panel derecho).

La identificación de células GFAP+ revela también astrocitos activados tanto a las 24 (panel medio) como a las 48h pi (panel derecho), comparado con la escasa marca observada en animales del grupo KO_{SI} (panel izquierdo). Principalmente se evidenció un aumento en el número de estas células, con marcada superposición de procesos (Figura 38).

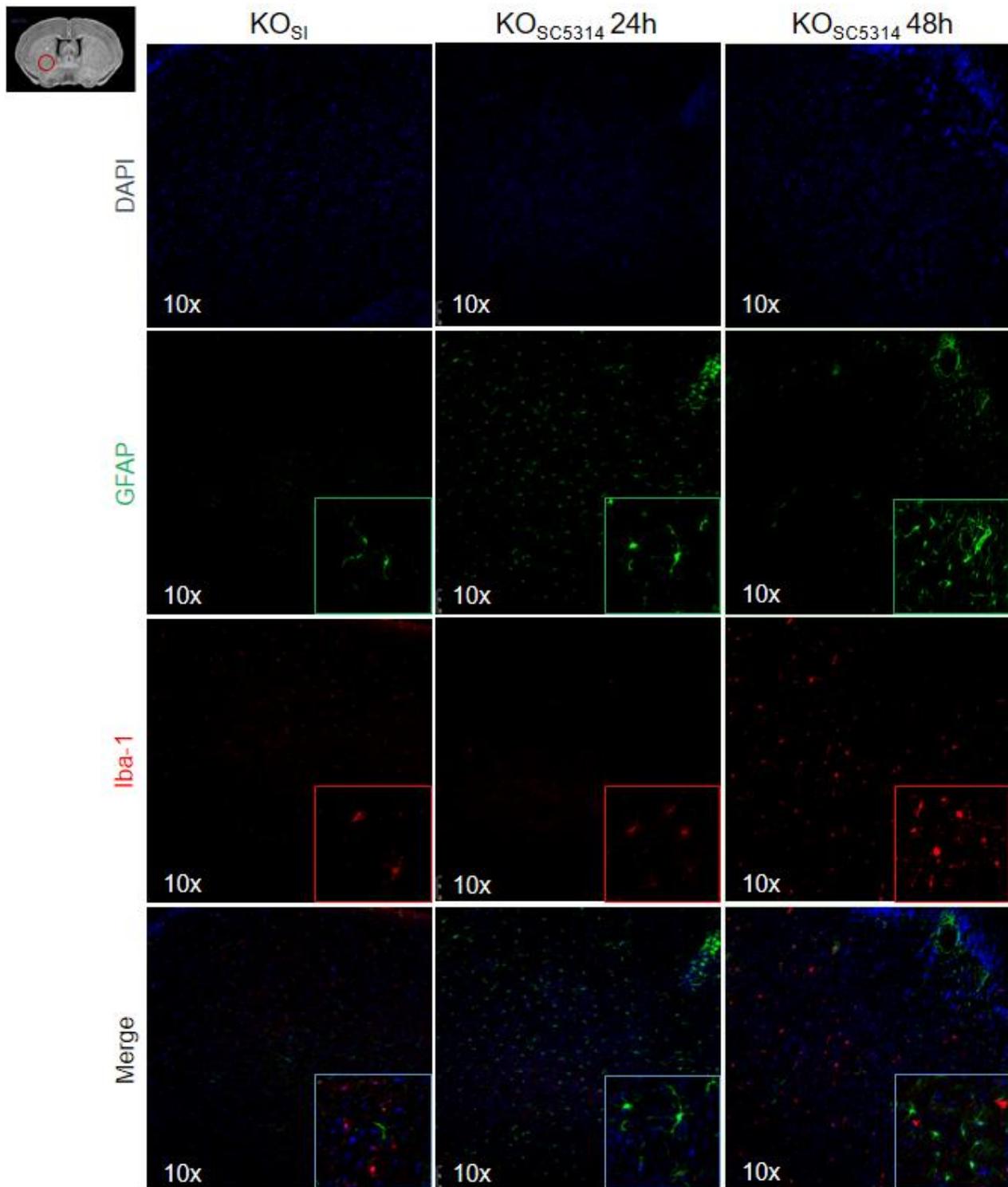


Figura 38. Expresión de Iba-1 y GFAP en cerebro de ratones deficientes en Dectin-1. Imágenes representativas de inmunofluorescencia de cortes de cerebro de animales deficientes en el receptor Dectin-1, sin infectar (WT_{SI}) (panel izquierdo) o infectados (WT_{SC5314}) a las 24h (panel medio) y 48h (panel derecho). Los astrocitos se revelaron con un anticuerpo específico para GFAP (verde), mientras que la microglía se visualiza con un anticuerpo anti Iba1 (rojo). Los núcleos celulares se tiñeron con DAPI (azul). Los recuadros representan la magnificación de áreas de las figuras correspondientes. Fotografías obtenidas con un microscopio invertido de fluorescencia LEICA DMi8.

El análisis semicuantitativo de la intensidad media de expresión para el marcador Iba-1, reveló una marcada microgliosis a las 48h pi ($p < 0,0001$), con respecto a la expresión basal, observada en animales del grupo KO_{SI} (Figura 39 A). Por su parte, la semicuantificación de la activación de astrocitos, muestra un aumento significativo en la expresión del marcador GFAP a las 24h pi ($p < 0,0001$), que se mantiene elevado a las 48h pi ($p < 0,05$), en comparación con el grupo control KO_{SI} (Figura 39 B).

El estudio comparativo entre los grupos WT_{SI} y KO_{SI} indica que la expresión constitutiva del marcador Iba-1 es diferente entre ambos grupos de animales, observándose una intensidad media de expresión de Iba-1 significativamente menor en animales deficientes del receptor ($p < 0,01$) (figura 39 C). A las 24h pi, la activación de la microglía es mayor en animales WT_{SC5314}, con una magnitud de 10 veces superior a los ratones del grupo KO_{SC5314} ($p < 0,001$). A las 48h pi, la intensidad media de expresión de Iba-1 en ambos grupos experimentales presenta valores similares (figura 39 C).

El análisis comparativo del marcador GFAP previo a la inoculación del hongo, muestra que la expresión constitutiva es similar en ambas cepas de animales. Posterior a la infección, no se observaron diferencias significativas en la intensidad media de expresión de esta proteína entre animales WT_{SC5314} y KO_{SC5314} en los estudios efectuados a las 24h, mientras que a las 48h la expresión de GFAP fue menor en los animales carentes del receptor ($p < 0,05$) (Figura 39 D).

Estos resultados demuestran que la presencia de *C. albicans* en cerebro induce la activación de las células residentes de este órgano, microglía y astrocitos, de manera significativa y sostenida en el tiempo. En ausencia del receptor Dectin-1, el hongo es capaz de activar las células gliales, pero en una magnitud considerablemente menor que en un animal normal.

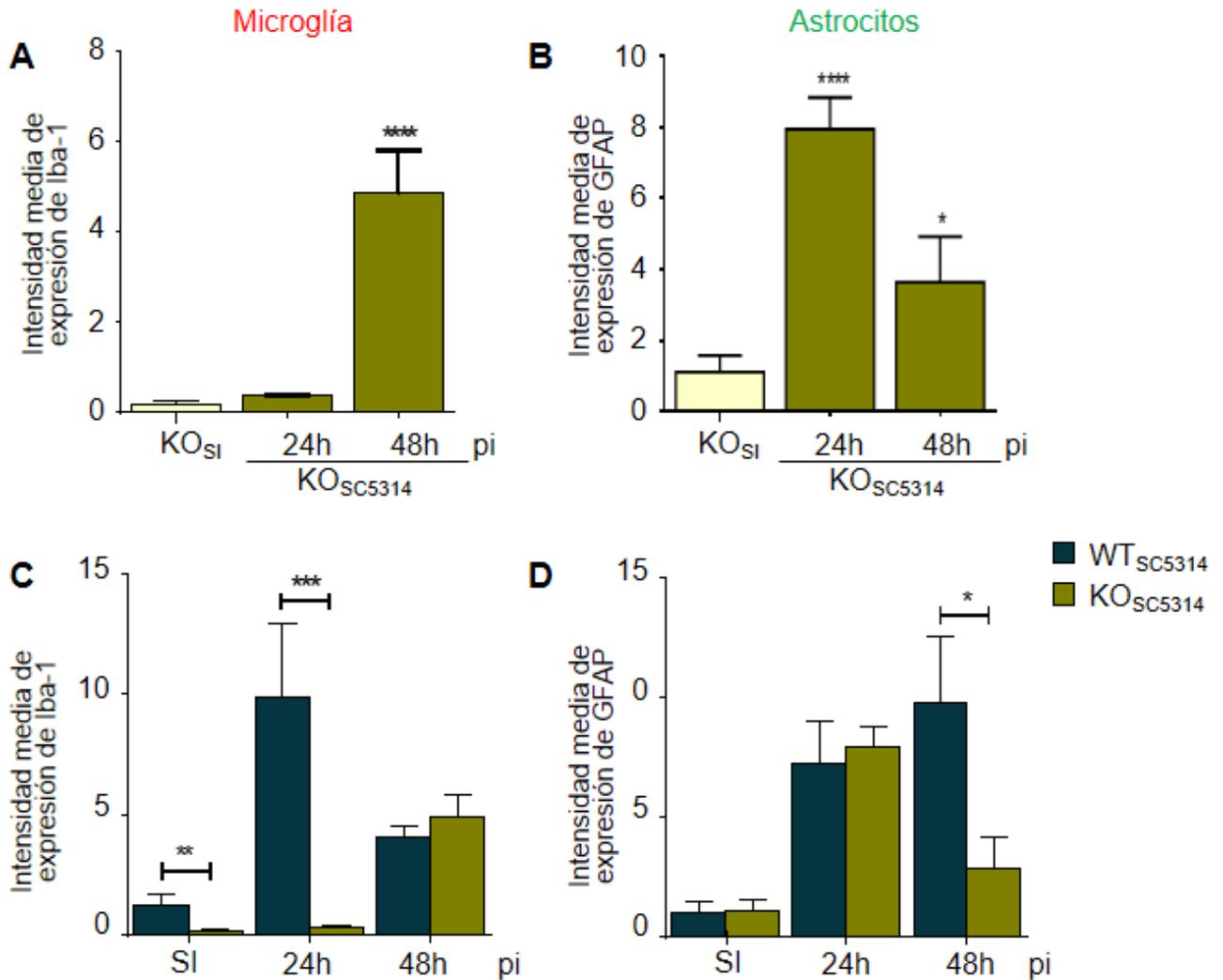


Figura 39. Semicuantificación de la expresión de Iba-1 y GFAP en cerebro de ratones WT y Dectin-1 KO. Activación de microglía (A) y astrocitos (B) en cortes de cerebro de ratones deficientes en el receptor Dectin-1 sin infectar (WT_{Sl}) o infectado (WT_{SC5314}) a las 24 y 48h con la cepa de *C. albicans* SC5314. Estudio comparativo de microglíosis (C) y astroglíosis (D) entre animales WT y Dectin-1 KO, a los mismos tiempos. La semicuantificación se expresa como la intensidad media de expresión para el marcador Iba-1 o GFAP, respectivamente. KO_{Sl} vs KO_{SC5314} *p<0,05; ****p<0,0001. WT_{SC5314} vs KO_{SC5314} *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. Los valores representan la media ± SEM. n = 3. La semicuantificación de la expresión se realizó con el software ImageJ FIJI.

Neurodegeneración

La activación de la microglía ha sido implicada en procesos neurotóxicos, mediante la liberación de factores nocivos que incluyen aniones superóxido, óxido nítrico y citoquinas inflamatorias, induciendo o exacerbando la degeneración neuronal. Sin embargo, evidencias actuales han demostrado que estas células tienen actividad neuroprotectora, mediante mecanismos que

involucran la eliminación de neurotoxinas del espacio extracelular, y la producción de moléculas neurotróficas y neuroprotectoras, que promueven la supervivencia neuronal en casos de lesión cerebral (283–285). En un estudio de Baldwin *et al.*, demuestran que el tratamiento con β -glucanos particulados, permite la regeneración axonal mediante la neuroinflamación desencadenada por la activación del receptor Dectin-1 en la superficie de la microglía residente (203).

Asimismo, los astrocitos también expresan una gran variedad de receptores involucrados en la inmunidad innata y pueden responder frente a una lesión en SNC (286). Al igual que la microglía, estudios recientes han proporcionado evidencia de que la astrogliosis reactiva puede ejercer efectos beneficiosos y perjudiciales dependiendo del contexto. A su vez, la respuesta va a estar definida por mediadores moleculares provenientes de células presentes en el microambiente local, incluyendo neuronas, microglía, células de linaje oligodendrocítico, endotelio, leucocitos y otros astrocitos, en respuesta a lesiones del SNC (212,287,288).

En una astrogliosis severa, puede ocurrir una proliferación excesiva de estas células, con la consecuente formación de cicatrices. Si bien estas estructuras eran consideradas dañinas para el tejido cerebral, existen en la actualidad numerosos hallazgos que indican un efecto beneficioso de las mismas, principalmente debido a la expresión de moléculas de superficie y producción de diversos factores neurotróficos y citoquinas por los astrocitos reactivos que las componen (212,286). Además, se los considera importantes para restringir la inflamación y proteger a las neuronas y oligodendrocitos, ayudando a limitar la degeneración del tejido y preservar su función después de la lesión del SNC (289).

Con el objetivo de evaluar el daño neuronal inducido luego de la infección cerebral con *C. albicans*, ratones C57BL6 WT se infectaron como se describió anteriormente y se sacrificaron a las 24 y 48h por perfusión *in vivo*, a fin de mantener la integridad estructural y evitar procesos de muerte neuronal durante la obtención de la muestra. Para estudiar el rol de Dectin-1 en procesos de neurodegeneración, se utilizaron además ratones deficientes en este receptor infectados de la misma manera. Se obtuvieron cortes de cerebro y se realizó la

tinción A-Cu-Ag como se explica en materiales y métodos, la cual es altamente sensible para teñir pericarion, dendritas, axones y ramificaciones terminales degeneradas en el cerebro.

Neurodegeneración en ratones WT infectados con *C. albicans* SC5314

A fin de poder observar simultáneamente los procesos de degeneración neuronal junto a las estructuras celulares del tejido cerebral, los cortes histológicos de animales infectados con *C. albicans* SC5314 a las 24h pi, se tiñeron con la técnica de plata y una contratinción con el colorante HE. A bajo aumento, se puede apreciar la estructura del órgano, con una elevada frecuencia de daño por campo, con numerosos focos positivo para plata dispersos aleatoriamente (Figura 40 A y B, flechas amarillas). A mayor aumento, se observan somas de neuronas motoras y fibras densas aglomeradas (Figura 40 C y D, flechas amarillas).

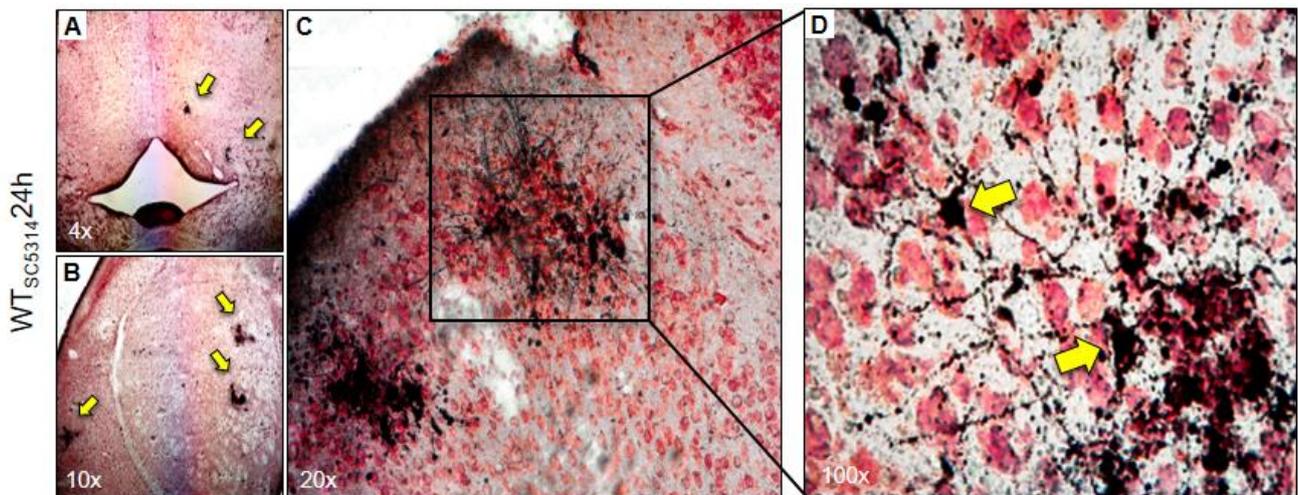


Figura 40. Degeneración neuronal en animales WT infectados con *C. albicans* SC5314. Imágenes representativas de cortes de cerebro de ratones WT teñidos con la técnica A-Cu-Ag y contratinción con el colorante HE, a las 24h luego de la infección. Las microfotografías corresponden a diferentes aumentos microscópicos (A-D). Las flechas indican estructuras positivas para plata. Fotografías obtenidas con un microscopio Nikon Eclipse TE 2000 U, equipado con una video cámara digital.

La observación sistemática de los cortes histológicos provenientes de estos animales (24h pi), permitió visualizar focos argirófilos correspondientes a estructuras celulares degeneradas, distribuidos aleatoriamente en diferentes regiones del cerebro (Figura 41).

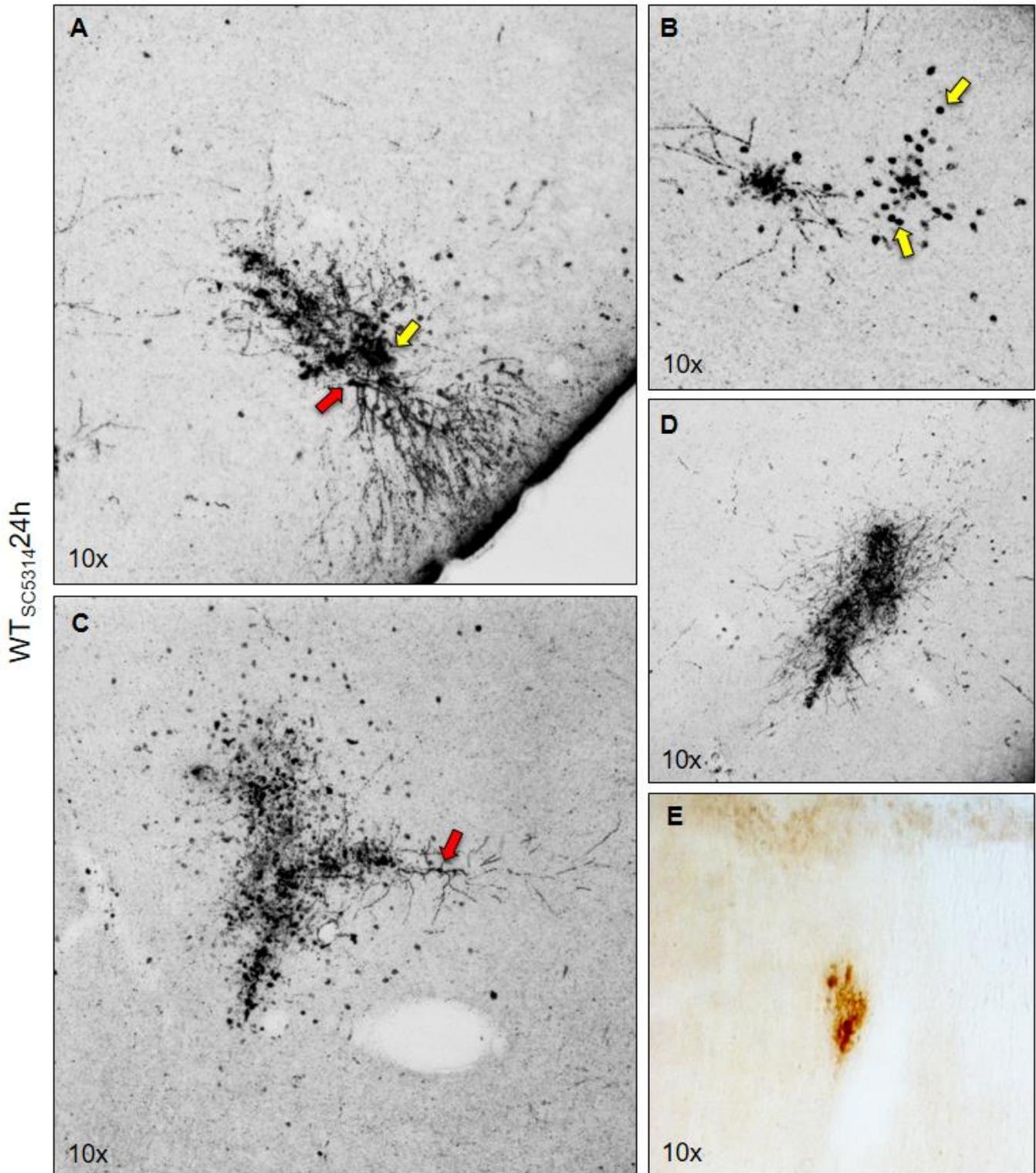


Figura 41. Degeneración y apoptosis neuronal en animales WT infectados con *C. albicans* SC5314. Fotografías representativas de cortes de cerebro de ratones WT infectados con *C. albicans* SC5314 (WT_{SC5314}) a las 24h pi, teñidos con la técnica de A-Cu-Ag (A-D) o inmunohistoquímica específica para caspasa-3 clivada, específica para apoptosis celular (E). Las flechas indican estructuras celulares degeneradas, descritas en el texto. Fotografías obtenidas con un microscopio de fluorescencia Leica DMI 8, con cámara monocromática, utilizando el software Las-X, o en el microscopio Nikon Eclipse TE 2000 U con una video cámara digital.

En la corteza cerebral se observan neuronas motoras con degeneración axonal (Figura 41 A, flecha roja), rodeadas de fibras dendríticas densas y depósitos granulares apoptóticos, que hacen imposible distinguir procesos individuales (Figura 41 A, flecha amarilla). Si bien no se hallaron depósitos granulares gruesos correspondientes al soma neuronal degenerado, se pueden observar depósitos granulares terminales bien definidos (Figura 41 B, flechas amarillas). Además, pudieron visualizarse neuronas estrelladas degeneradas, rodeadas también por gránulos argirófilos (Figura 41 C, flecha roja). En general, se hallaron abundantes focos densamente teñidos, dispersos por diferentes zonas del parénquima cerebral (Figura 41 D). Para confirmar la presencia de apoptosis, se realizó una inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo anti caspasa-3 escindida, marcador específico de este tipo de muerte celular. Se pudieron observar focos positivos en diversas áreas del cerebro (Figura 41 E), ilustrándose en la figura con una imagen representativa.

A las 48h pi se observan resultados similares a los descriptos para las 24h pi, encontrándose depósitos granulares, neuronas corticales degeneradas y focos con superposición de procesos (Figura 42 A, B y C, respectivamente).

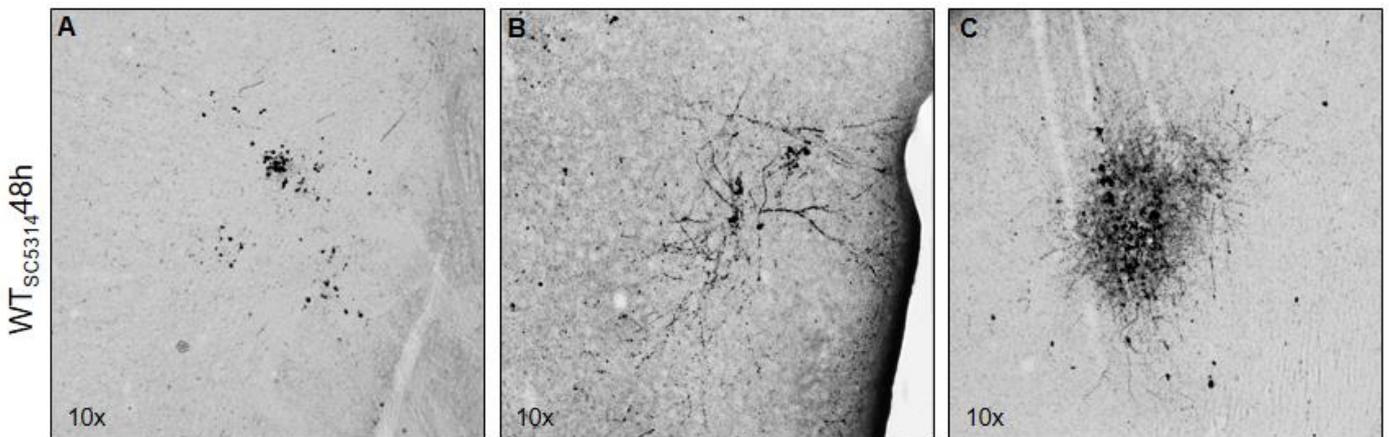


Figura 42. Degeneración neuronal en animales WT infectados con *C. albicans* SC5314. Imágenes representativas de cortes histológicos de diferentes regiones de cerebro en ratones WT teñidos con la técnica A-Cu-Ag, a las 48h post-infección (A, B, C). Fotografías obtenidas con un microscopio de fluorescencia Leica DMI 8, con cámara monocromática, utilizando el software Las-X.

Como se explicó anteriormente, la tinción A-Cu-Ag es una técnica inespecífica, por lo que el daño neuronal debe corroborarse con otras metodologías complementarias. Por este motivo, se realizó la tinción con la técnica de FluoroJade en cortes de cerebro consecutivos, a fin de marcar las neuronas en proceso neurodegenerativo (figura 43).

La figura 43 A corresponde a un corte de cerebro de ratón WT_{SC5314} a las 48h pi, con doble tinción de plata y HE.

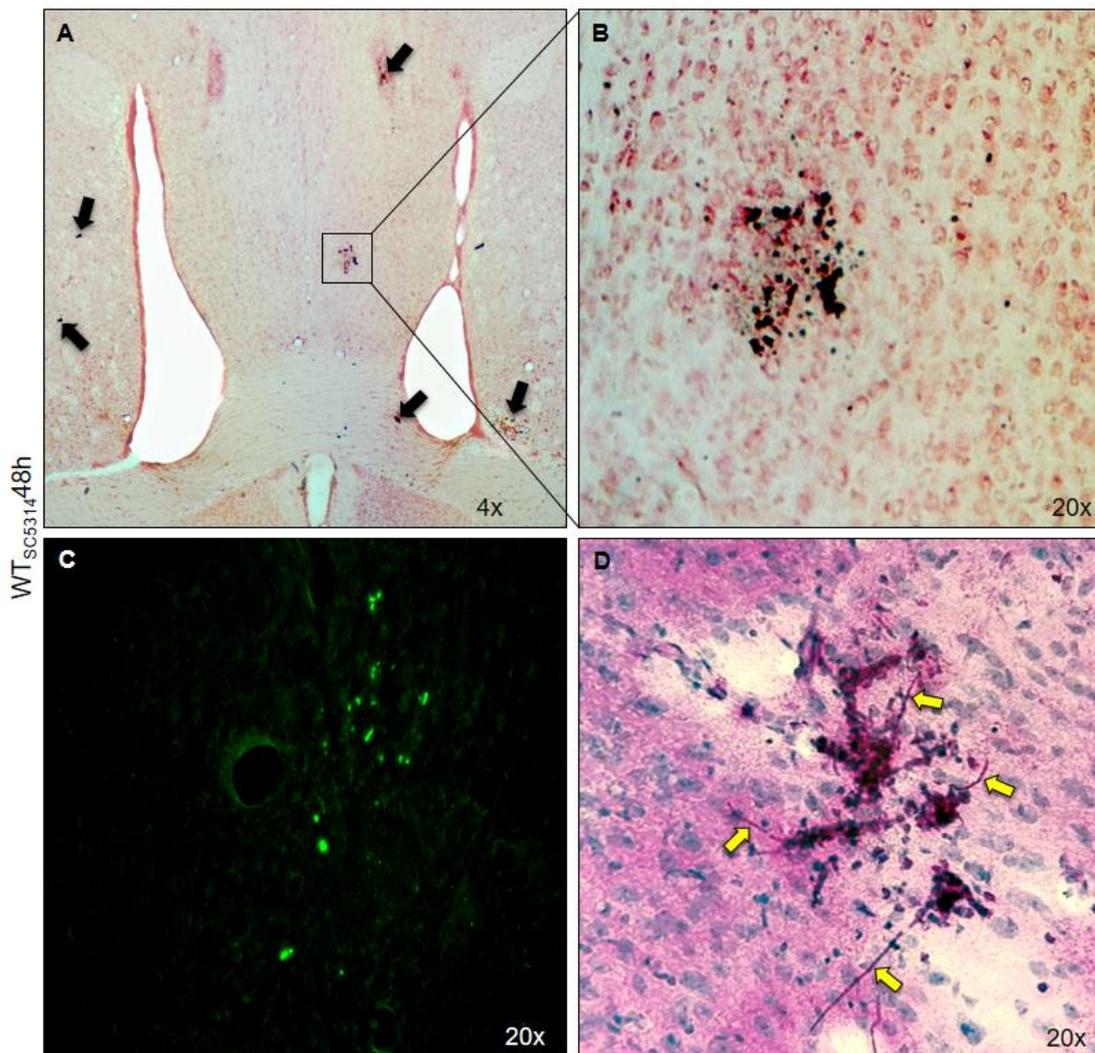


Figura 43. Degeneración neuronal y visualización de *C. albicans* en animales WT. Fotografías representativas de cortes de cerebro de ratones WT (WT_{SC5314}) teñidos con la técnica de A-Cu-Ag y HE, a las 48h post-infección (A y B). Imagen correspondiente al corte consecutivo del corte anterior, teñido con la técnica de FJB (C). Fotografía representativa de corte de cerebro con doble tinción, A-Cu-Ag y PAS (D). Las flechas negras indican focos argirófilos y las flechas amarillas, hifas del hongo. Fotografías obtenidas con un microscopio Nikon Eclipse TE 2000 U, equipado con una video cámara digital.

Pueden observarse focos argirófilos distribuidos aleatoriamente en el parénquima cerebral (flechas negras), caracterizados principalmente por depósitos granulares. Una microfotografía a mayor aumento de uno de los focos argirófilos (figura 43 B) permite demostrar que esta área coincide con la marca hallada en cortes de cerebro teñidos con FJB (figura 43 C), observados como cuerpos celulares apoptóticos densamente teñidos, que revelan condensación nuclear.

Finalmente, para evaluar si la presencia del patógeno está asociada a los daños neuronales observados, se realizó una tinción de PAS sobre cortes de cerebro de animales de 48h pi, previamente teñidos con la técnica de plata. La Figura 43 D muestra los resultados obtenidos, donde puede observarse la colocalización de focos argirófilos con las hifas de *C. albicans* (flechas amarillas). Este hallazgo resulta relevante en el marco de este estudio, puesto que permite establecer en un mismo sitio particular del tejido, al agente patogénico y a la injuria tisular.

La observación sistemática de las diferentes áreas del cerebro permitió establecer que la degeneración neuronal no estuvo asociada a ninguna región particular, coincidente con la ausencia de tropismo característica de *C. albicans*.

A fin de establecer un parámetro que permita definir la magnitud del daño tisular presente durante la infección cerebral se realizó el estudio semicuantitativo del porcentaje de área de degeneración neuronal con respecto al área total del corte a los tiempos evaluados (Figura 44). El análisis no reveló diferencias significativas al comparar el grupo de animales WT_{SC5314} a las 24h y a las 48h luego de la infección. En animales WT_{SI} no se observaron focos positivos para plata en ninguna región evaluada.

Estos resultados demuestran que, en un animal normal, la infección sistémica con *C. albicans* SC5314, induce un severo daño neuronal y muerte apoptótica en el tejido cerebral, que en algunos casos coincide con la presencia del morfotipo invasivo del hongo.

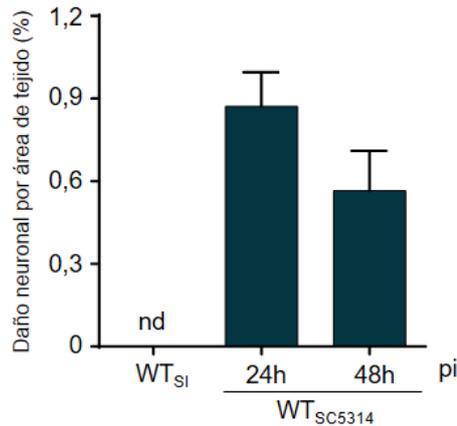


Figura 44. Cuantificación del área de degeneración neuronal en animales WT frente *C. albicans* SC5314. Determinación del área de daño neuronal por área de tejido cerebral en ratones WT sin infectar (WT_{SI}) o infectados con la cepa SC5314 (WT_{SC5314}), sacrificados a las 24 y 48h luego de la inoculación del hongo y revelados con la técnica de plata. nd: no determinado. n=3 animales por grupo. La semicuantificación del área se realizó con el software ImageJ FIJI.

Neurodegeneración en ratones Dectin-1 KO infectados con *C. albicans* SC5314

Para evaluar la contribución de Dectin-1 y establecer el impacto de su ausencia en los procesos de degeneración y muerte neuronal observados durante la infección, los ratones deficientes en este receptor se inocularon con la cepa de *C. albicans* SC5314 como se describió, y se sacrificaron a los tiempos estipulados para estos estudios. A las 24h pi se pueden observar depósitos granulares gruesos correspondientes a somas neuronales degenerados (figura 45 A, flechas rojas), rodeados por depósitos granulares terminales, distribuidos en cúmulos al azar en diferentes áreas del cerebro (figura 45 A, flechas amarillas). Estos focos argirófilos, de mayor o menor tamaño, pudieron distinguirse en la mayoría de los campos evaluados, mostrando una marcada diferencia con lo observado en los ratones WT_{SC5314} para el mismo tiempo de infección. Por otro lado, tanto en zonas corticales como en el tejido cerebral profundo, se pueden encontrar focos con una fuerte reacción argirófila, donde la densidad de las fibras impide distinguir los procesos y cuerpos celulares individuales (figura 45 B). Además, en la corteza cerebral se revelaron varios patrones degenerativos, neuronas piramidales con somas definidos (figura 45 C, flecha roja), con contornos suaves, impregnación homogénea de los cuerpos celulares y ramas dendríticas en tirabuzón (Figura 45 C, flecha amarilla), rodeadas por neuronas similares a las apoptóticas.

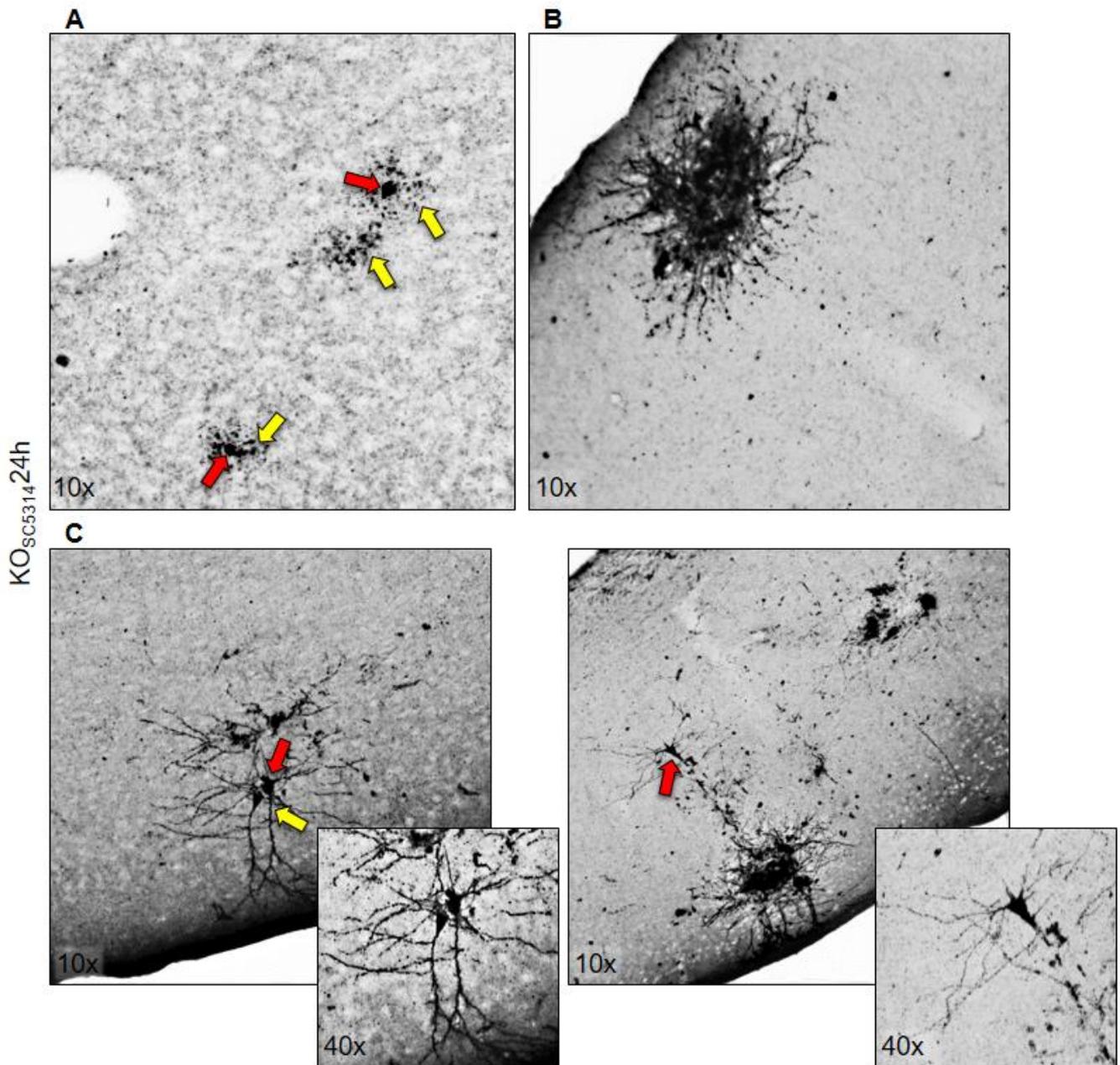


Figura 45. Degeneración neuronal en animales Dectin-1 KO infectados con *C. albicans* SC5314. Fotografías representativas de cortes de cerebro de animales deficientes en el receptor Dectin-1 (KO_{SC5314}), teñidos con la técnica A-Cu-Ag, a las 24h post-infección (A-C). Las flechas indican estructuras celulares degeneradas, descritas en el texto. Fotografías obtenidas con un con un microscopio de fluorescencia Leica DMI 8, con cámara monocromática, utilizando el software Las-X.

La presencia de apoptosis en ratones KO_{SC5314} a las 24h pi, se confirmó por inmunohistoquímica en cortes consecutivos de cerebro mediante la marcación específica para caspasa-3 clivada. Se pudieron observar focos positivos para

este marcador distribuidos en el tejido, coincidentes con las estructuras teñidas con plata (Figura 46, A y B respectivamente).

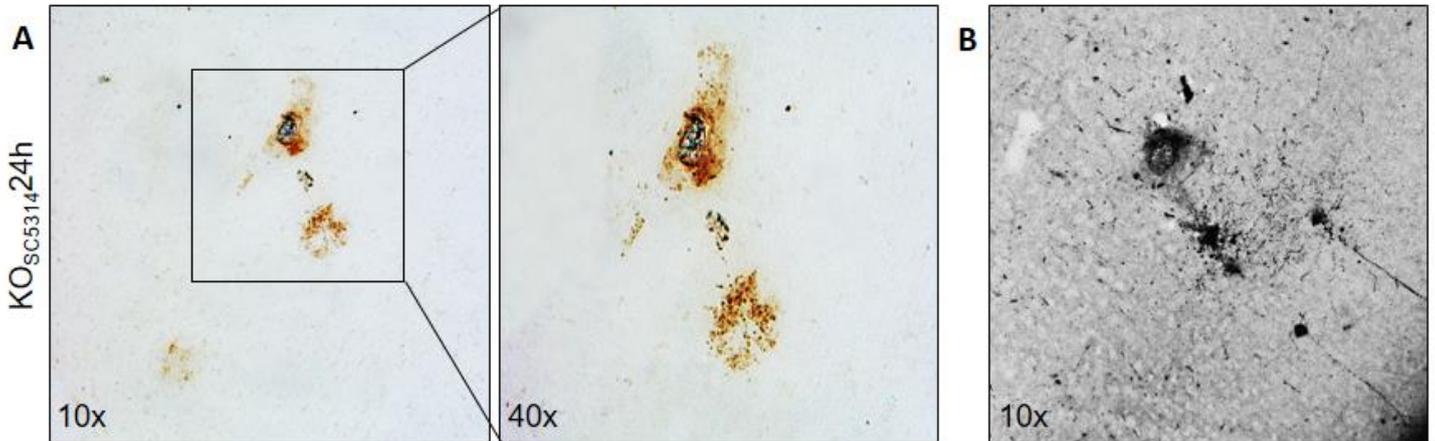


Figura 46. Degeneración y apoptosis neuronal en animales Dectin-1 KO infectados con *C. albicans* SC5314. Fotografías representativas de cortes de cerebro consecutivos de animales deficientes en el receptor Dectin-1 (KO_{SC5314}) a las 24h post-infección, teñidos por inmunohistoquímica con anticuerpos anti caspasa-3 clivada, específica para apoptosis celular (A), o por la técnica A-Cu-Ag (B). Fotografías obtenidas con un con un microscopio de fluorescencia Leica DMI 8, con cámara monocromática, utilizando el software Las-X, o en el microscopio Nikon Eclipse TE 2000 U con una video cámara digital.

Los ratones KO_{SC5314} sacrificados a las 48h pi también mostraron daño neuronal severo, donde el 100% de los campos evaluados presentó algún patrón degenerativo. La imágenes obtenidas a partir de cortes de cerebro de estos animales, revelan grandes focos argirófilos intensamente marcados (Figura 47). En algunas zonas, la elevada densidad de las fibras impide distinguir procesos individuales (flechas rojas), aunque en otros casos es posible identificar núcleos neuronales degenerados (flechas amarillas). En el área cortical, se pueden observar axones enteros de neuronas piramidales totalmente degenerados, que presentan forma de tirabuzón (flechas naranjas). Se visualizaron también una gran cantidad de cúmulos de neuronas estrelladas positivas para plata, distribuidas aleatoriamente por diversas áreas del cerebro, principalmente en el tejido profundo (flechas verdes).

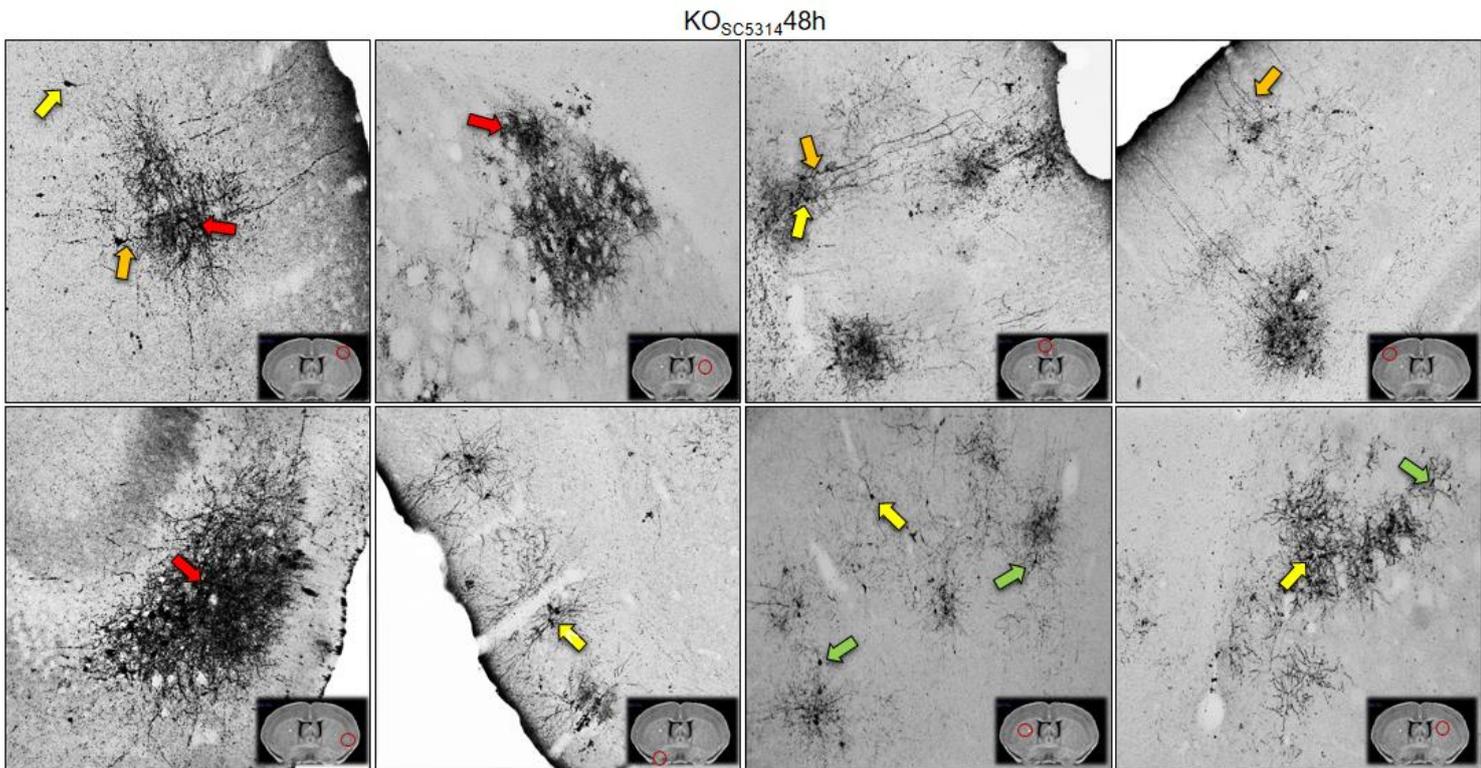


Figura 47. Degeneración neuronal en animales Dectin-1 KO infectados con *C. albicans* SC5314. Fotografías representativas de cortes de cerebro de ratones deficientes en el receptor Dectin-1 (KO_{SC5314}), sacrificados a las 48h post-infección y teñidos con la técnica A-Cu-Ag. Las flechas indican estructuras celulares degeneradas, descritas en el texto. Fotografías obtenidas con un con un microscopio de fluorescencia Leica DMI 8, con cámara monocromática, utilizando el software Las-X.

Si bien los hallazgos encontrados en los animales deficientes en Dectin-1 sugerían un daño neuronal más severo a las 48h con respecto a las 24h pi, no se observaron diferencias significativas del porcentaje de área de degeneración neuronal en ambos tiempos estudiados cuando se realizó la semicuantificación, evidenciando la precoz y sostenida injuria producida a nivel cerebral durante la diseminación hematológica del *C. albicans* (Figura 48).

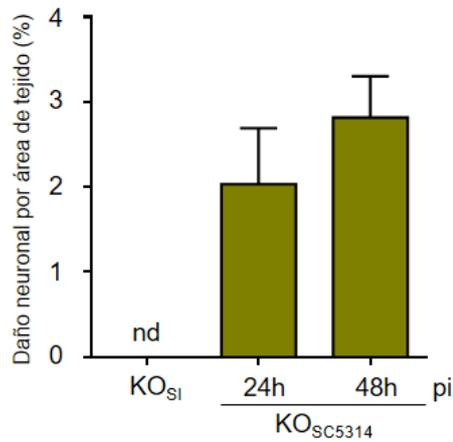


Figura 48. Cuantificación del área de degeneración neuronal en animales Dectin-1 KO frente *C. albicans* SC5314. Determinación del área de daño neuronal por área de tejido cerebral en ratones deficientes en el receptor Dectin-1 sin infectar (KO_{SI}) o infectados con la cepa SC5314 (KO_{SC5314}), sacrificados a las 24 y 48h post-infección y revelados con la técnica de plata. nd: no determinado. n=3 animales por grupo. La semicuantificación del área se realizó con el software ImageJ FIJI.

Los procesos neurodegenerativos se corroboraron utilizando, en paralelo, la técnica de FJB sobre cortes de cerebro consecutivos de animales KO_{SC5314} a las 48h pi, tiempo en el que se observó una tinción argirófila más marcada (Figura 49).

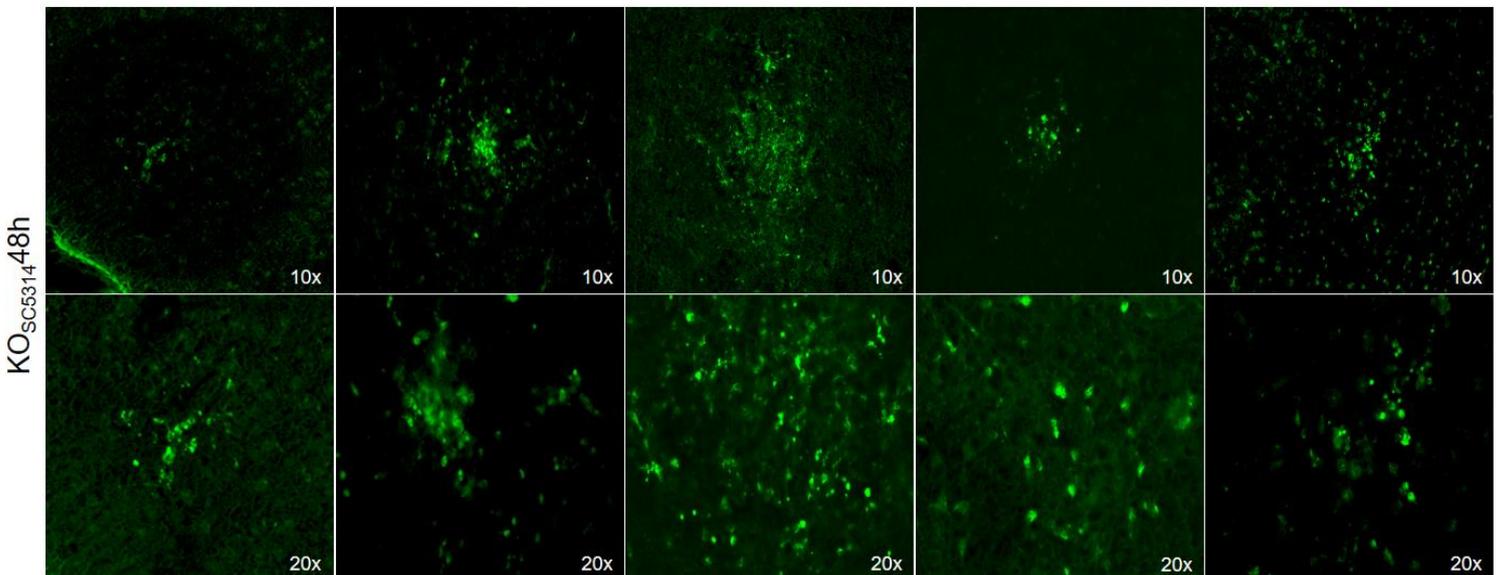


Figura 49. Daño neuronal en cerebro de ratones Dectin-1 KO infectados con *C. albicans*. Imágenes representativas de varias secciones de cerebro de animales deficientes en el receptor Dectin-1 (KO_{SC5314}), teñidos con la técnica de FJB a las 48h post-infección. En el panel superior se observan fotografías con un aumento de 10x, mientras que en el panel inferior se presentan sus respectivos aumentos a 20x, en cada columna respectivamente. Fotografías obtenidas con un microscopio de fluorescencia Leica DMI 8, con cámara monocromática, utilizando el software Las-X.

El análisis de varias secciones del cerebro y diferentes regiones en cada corte, permitió evidenciar numerosos focos positivos, donde se observan cuerpos de células nerviosas degeneradas, distribuidas al azar por todo el tejido (figura 49). Si bien no pudieron realizarse estudios cuantitativos debido a las limitaciones propias de la técnica, la cantidad e intensidad de áreas marcadas presentan una magnitud mayor en estos animales, con respecto al grupo WT_{SC5314} en el mismo tiempo.

La apoptosis celular fue confirmada por inmunohistoquímica para la expresión de caspasa-3 clivada en cortes de cerebro de animales KO_{SC5314} a las 48h pi. Se pudieron observar focos intensamente teñidos para este marcador de apoptosis, dispersos en el tejido cerebral. Aquí se observa una microfotografía representativa de un área con marca positiva (figura 50).

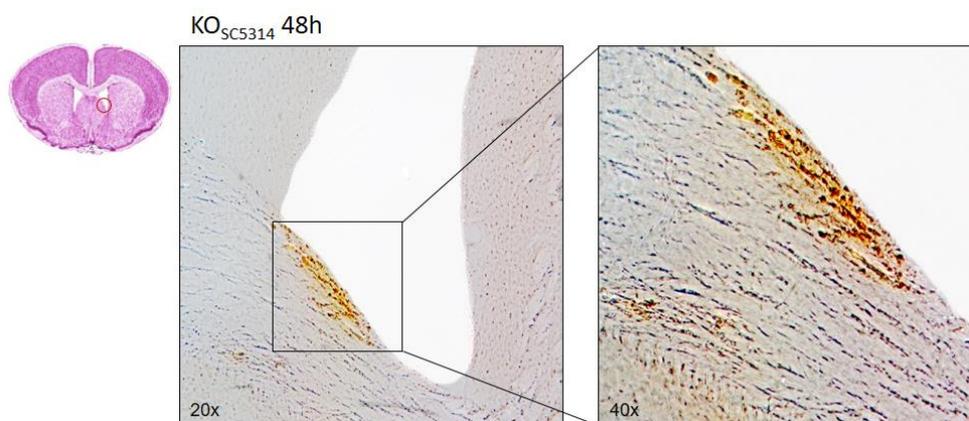


Figura 50. Muerte neuronal por apoptosis en cerebro de ratones Dectin-1 KO infectados con *C. albicans*. Microfotografía representativa del corte de cerebro de ratón deficiente en el receptor Dectin-1 (KO_{SC5314}), revelado con anticuerpo específico para caspasa-3 clivada, marcador de apoptosis celular, a las 48h luego de la infección. Fotografías obtenidas con un con un microscopio Nikon Eclipse TE 2000 U, con una video cámara digital integrada.

Finalmente, a fin de establecer el impacto de la ausencia del receptor Dectin-1 en los procesos neurodegenerativos evaluados durante la patogenia de la candidiasis cerebral, se realizó un análisis comparativo del daño neuronal hallado en los ensayos anteriores para la técnica A-Cu-Ag. La cuantificación del porcentaje de área relativa de daño revela que los procesos neurodegenerativos son marcadamente mayores en animales KO_{SC5314}, tanto a las 24 como a las 48h

pi, en comparación con el grupo WT_{SC5314} (figura 51 A). Estos resultados coinciden con la mayor carga fúngica observada durante la infección avanzada en estos animales, descrita en el capítulo, 2 parte II (figura 51 B).

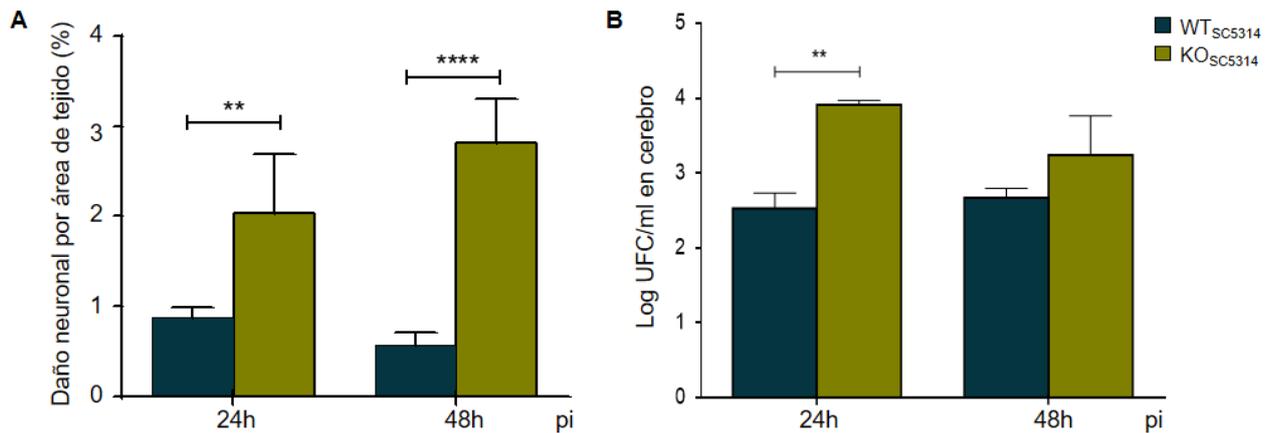


Figura 51. Estudio comparativo del daño neuronal y crecimiento fúngico en cerebro entre ratones WT y Dectin-1 KO. Semicuantificación del área de daño neuronal por área de tejido cerebral en cortes de cerebro de ratones WT (WT_{SC5314}) vs deficientes en el receptor Dectin-1 (KO_{SC5314}), teñidos con la técnica A-Cu-Ag a las 24 y 48h luego de la infección con *C. albicans* SC5314 (A). Estudio comparativo de la carga fúngica en cerebro de animales del grupo WT_{SC5314} vs KO_{SC5314}, a las 24 y 48h pi (B). Los valores representan la media \pm SEM. $n \geq 3$. WT_{SC5314} vs KO_{SC5314} ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$. La semicuantificación del área se realizó con el software ImageJ FIJI.

Estos resultados demuestran que la ausencia del receptor Dectin-1 frente a la infección cerebral por *C. albicans*, induce procesos neurodegenerativos más marcados que en el animal normal. La frecuencia de focos indicadores de daño y muerte neuronal, fue mayor en ratones Dectin-1 KO en todos los tiempos evaluados, coincidente con la mayor carga fúngica hallada en estos animales en los mismos puntos de la cinética.

Expresión de Arginasa-1/NOS2 en ratones WT vs Dectin-1 KO infectados con *C. albicans* SC5314

Los efectos beneficiosos o perjudiciales de la neuroinflamación en el contexto de las infecciones fúngicas cerebrales aún no han sido definidos. Tanto la microglía como los macrófagos, son células altamente plásticas que pueden transitar rápidamente entre diferentes estados de activación, cuyos extremos pueden clasificarse en aspectos generales como: activación clásica o M1, involucrada en procesos inflamatorios y citotóxicos, o activación alternativa o M2, que participa en la reparación y regeneración, con propiedades antiinflamatorias (181,256). La polarización M1/M2 puede definirse a partir del metabolismo de la arginina, a través de dos vías enzimáticas distintas y antagónicas, la de óxido nítrico sintasa (NOS), característica de M1, y la de arginasa-1, correspondiente a M2 (290,291).

Debido a la marcada diferencia en los procesos neurodegenerativos observados en animales WT y KO, consideramos necesario evaluar la polarización de la respuesta inmune innata frente a *C. albicans*, a fin de definir una relación entre estos eventos. Realizamos ensayos preliminares para determinar la expresión de Arg-1 y NOS2 mediante la técnica de IF.

En la figura 52 se muestran imágenes representativas de cortes de cerebro de animales WT_{SC5314} (panel superior) y KO_{SC5314} (panel inferior), a las 48h pi. Se puede observar que tanto la expresión de NOS2 (columna izquierda) como la de Arg-1 (columna media), es mayor en ratones WT en comparación con los animales deficientes en el receptor. Teniendo en cuenta la morfología de las células NOS2+, podemos sugerir que la microglía adquiere un perfil principalmente M1, mientras que las células infiltrantes, probablemente monocitos/macrófagos, presentan polarización prevalente a M2. La expresión de estas enzimas no pudo visualizarse en cortes de cerebro de ratones sin infectar, en ninguno de los *background* genéticos (resultados no mostrados).

Estos resultados muestran indicios de un microambiente altamente regulado durante la infección en los animales WT, donde existe una elevada respuesta inflamatoria mediada por las células residentes, que coincide con el

reclutamiento de células periféricas con características antiinflamatorias, que convergen en una respuesta eficiente para lograr la eliminación del patógeno y el control del daño neuronal. En ausencia de Dectin-1, y a las 48h de la infección, la expresión de NOS2 en la microglía es menor, así como la regulación dependiente de las células infiltrantes. Estos resultados en su conjunto podrían explicar el menor control de crecimiento fúngico y la mayor neurodegeneración observada en los animales Dectin-1 KO durante la infección cerebral.

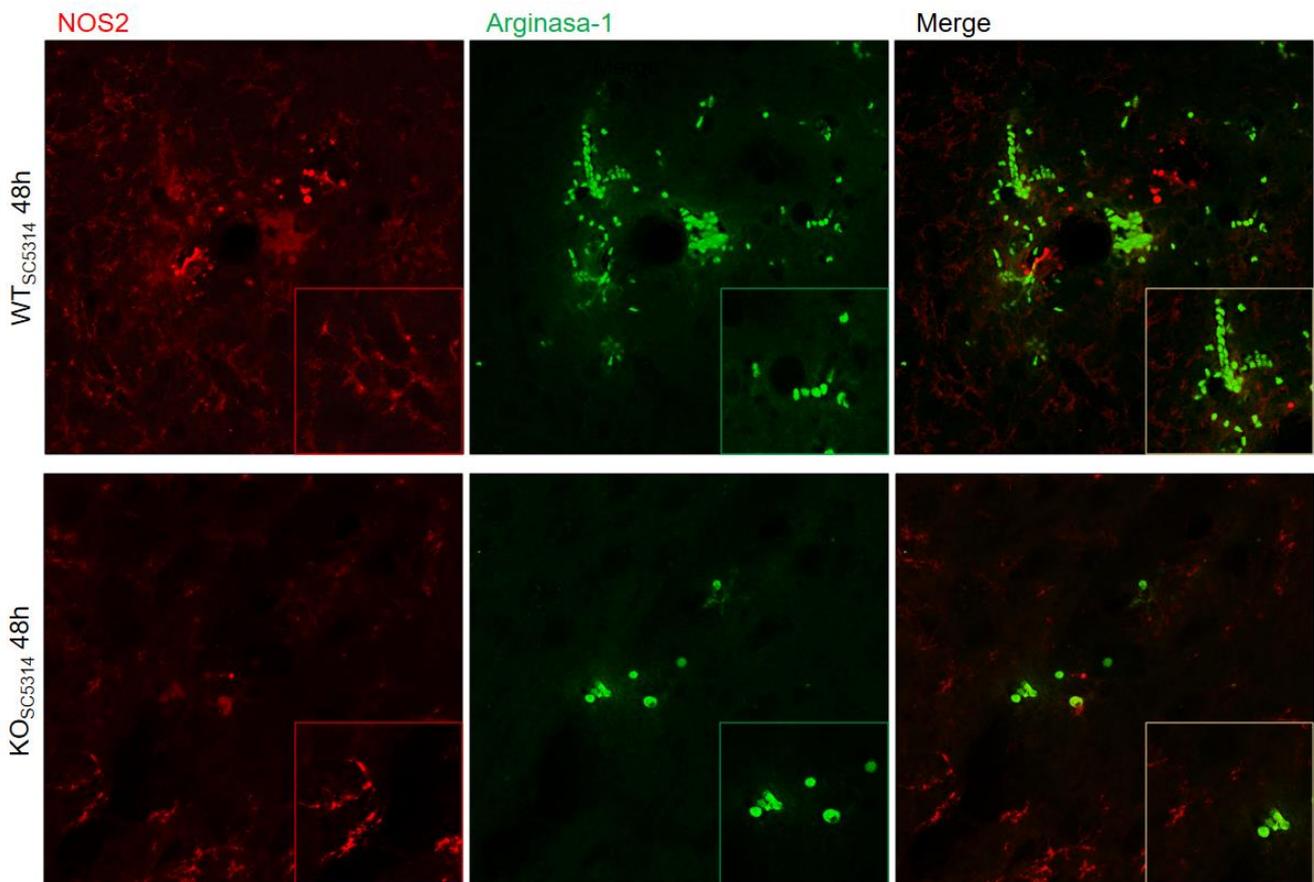


Figura 52. Estudio comparativo de la expresión de NOS2 y Arg-1 en cerebro de ratones WT y Dectin-1 KO. Imágenes representativas de inmunofluorescencia de cortes de cerebro de animales WT_{SC5314} (panel superior) y KO_{SC5314} (panel inferior) a las 48h post-infección, revelados con anticuerpo anti-NOS2 (rojo) y anti-Arg-1 (verde). Los recuadros representan la magnificación de áreas de las figuras correspondientes, y las fotos del panel inferior corresponden a un zoom de la imagen original. Fotografías obtenidas con un microscopio confocal Olympus-FV1200 y procesadas con el programa ImageJ FIJI.

Un análisis cuantitativo, así como el estudio de la cinética de activación, serían necesarios para definir la polarización de la respuesta inmune durante el progreso de la infección cerebral con *C. albicans*. Asimismo, el análisis de las

células involucradas en cada perfil de respuesta, aportaría información importante a estos hallazgos.

La tabla 2 resume los resultados obtenidos en este capítulo, y permite comparar la respuesta generada en ratones WT_{SC5314} y KO_{SC5314} en respuesta a *C. albicans* en SNC.

Tabla 2. Estudio comparativo de los parámetros evaluados entre animales WT y deficientes en el receptor Dectin-1

Animales	Iba-1 +		GFAP+		A-Cu-Ag		FJB		Caspasa-3		UFC		M1/M2	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	Arg1	NOS2
WT _{SC5314}	+++	++	+++	+++	++	++	nd	++	++	++	++	+++	+++	+++
KO _{SC5314}	-	++	+++	++	+++	++++	nd	++++	++	+++	+++	+++	+	++

Conclusiones capítulo 3

Activación de células gliales durante la infección sistémica por *C. albicans*:

- En las etapas avanzadas de la infección (24h y 48h) tanto la microglía como los astrocitos sufren cambios morfológicos característicos de la activación celular en animales WT_{SC5314}.
- La activación de las células gliales en estos animales se corroboró por el aumento en la expresión de Iba-1 y GFAP, correspondiente a microglía y astrocitos respectivamente.
- La infección también indujo la activación de células residentes de cerebro en ratones KO_{SC5314} durante la cinética estudiada, demostrada por los cambios morfológicos y la cuantificación del porcentaje de células positivas para Iba-1 y GFAP.
- La activación de las células gliales es significativamente menor en ratones deficientes en Dectin-1, con respecto al grupo WT_{SC5314}, incluso a nivel basal.

Procesos neurodegenerativos y de muerte celular:

- La infección sistémica indujo daño neuronal durante la cinética estudiada en ratones WT_{SC5314}, observando focos argirófilos en diversas áreas del cerebro. La apoptosis se confirmó mediante tinción con anticuerpo anti-caspasa-3 clivada.
- Las estructuras positivas para plata coinciden con las marcas obtenidas mediante la técnica de FJB, metodología confirmatoria para el daño neuronal.
- Pudieron hallarse focos argirófilos colocalizando con hifas de *C. albicans* en el parénquima cerebral.
- En ratones KO_{SC5314} se observaron grandes áreas de neurodegeneración y muerte neuronal luego de la infección, confirmado por la técnica de A-Cu-Ag, FJB y caspasa-3 clivada en cortes consecutivos (24h y 48h).
- El daño neuronal es significativamente mayor en ratones deficientes en Dectin-1 en comparación con el grupo WT_{SC5314}, durante los tiempos evaluados.
- La elevada neurodegeneración en estos ratones coincide con la mayor carga fúngica hallada en ausencia de Dectin-1 a tiempos prolongados.

DISCUSIÓN

“No existe la verdad, solo la interpretación”
Nietzsche

Infección sistémica

La incidencia de infecciones sistémicas causadas por hongos ha aumentado considerablemente en los últimos años, principalmente como consecuencia del creciente uso de dispositivos biomédicos implantados y catéteres venosos centrales en el manejo del paciente, así como el aumento de la población inmunosuprimida y la mayor esperanza de vida en edades extremas (5).

Bongomin y col. (2017) recopilan datos sobre la incidencia global de micosis invasivas graves, demostrando que las enfermedades fúngicas provocan la muerte de más de 1,5 millones y afectan a más de mil millones de personas por año en todo el mundo (3). Los patógenos fúngicos oportunistas se han convertido en una de las principales causas de mortalidad humana en pacientes hospitalizados, representando un desafío para la salud pública con gran importancia clínica y socioeconómica.

Un estudio reciente de Riera y col. (2018), reúnen datos epidemiológicos sobre la incidencia y prevalencia de enfermedades fúngicas en Argentina, revelando que al menos un 2,01% de la población total sufre un episodio de micosis grave cada año, con una morbilidad y mortalidad considerables (70). En Argentina, el pronóstico de esta patología es complicado, y se estima que alrededor del 50% de los individuos internados muere durante la infección (70). Datos epidemiológicos locales obtenidos por nuestro grupo, arrojan un índice de mortalidad para candidemia que alcanza un 36 % en la ciudad de Córdoba (63).

Si bien el uso de fármacos antifúngicos ha permitido un mejor pronóstico en la recuperación de pacientes con micosis sistémicas, la elevada incidencia de especies emergentes como potenciales patógenos humanos, sumado a la creciente aparición de cepas resistentes a las drogas actuales, aumenta las tasas de fallo terapéutico en individuos hospitalizados (71,292–294). Pese a las exhaustivas investigaciones durante los últimos 15 años en el desarrollo de fármacos antifúngicos, en la actualidad solo se dispone de tres clases de drogas aprobadas para el tratamiento de estas infecciones. El hallazgo de medicamentos eficientes y con baja toxicidad, se dificulta por las estrechas relaciones evolutivas entre estos patógenos eucariotas y sus hospedadores humanos (294).

El tratamiento frecuentemente empírico, profiláctico y prolongado de agentes antifúngicos, el número limitado de fármacos y su carácter principalmente fungistático en lugar de fungicida, facilita la selección de cepas resistentes y ha conducido a la adquisición gradual de resistencia antifúngica en hongos inicialmente sensibles (292). El grupo de Van Wijngaerden y col., publicó en 2018 un estudio sobre la incidencia y la distribución de especies asociadas a la candidemia en un período de 12 años (2004-2015), donde demostraron que la exposición previa a fluconazol y equinocandinas se asocia con un cambio en la epidemiología de los pacientes, mostrando candidemias causadas por especies menos susceptibles y un aumento en la frecuencia de esas infecciones (293). Revie y col. (2018) por otra parte, identifican los numerosos mecanismos de adaptación que llevan a la sensibilidad reducida frente a las drogas antifúngicas actuales (294). Usualmente, los mecanismos de resistencia involucran adaptaciones metabólicas y la alteración en la expresión génica, como los cambios o sobreexpresión de la diana terapéutica, la regulación positiva de los transportadores de fármacos y la activación de las respuestas al estrés.

En este escenario, la candidiasis diseminada emerge como una enfermedad severa de elevada mortalidad, difícil tratamiento y numerosos interrogantes a explorar. Su agente etiológico más frecuente, *C. albicans*, está dotado de diversos atributos de virulencia y posee la capacidad de infectar diferentes nichos en su hospedador. A estas características particulares, debe sumarse la capacidad de regular su perfil transcripcional de genes de acuerdo al sitio que coloniza, encontrándose en continua relación con los mecanismos locales de respuesta, las poblaciones celulares reclutadas y la biología del órgano infectado en cada contexto. Del resultado de estas complejas interacciones, depende la resolución del proceso infeccioso y, en el balance de la respuesta local, el daño tisular colateral emerge como consecuencia del equilibrio prevalente entre una respuesta protectora y una respuesta exacerbada, cuya magnitud puede comprometer estructuras vitales para la funcionalidad del órgano donde se produce el encuentro.

El presente trabajo aborda el estudio de este fenómeno, explorando en la interacción patógeno/huésped, la contribución de la señal generada por el reconocimiento de los β -glucanos expresados en la pared del hongo, y el

receptor innato Dectin-1 en la inmunopatogenia de esta micosis durante el curso de la infección diseminada y, en particular, en la infección del SNC.

Candidiasis invasiva

Casadevall y Pirofski definieron la patogénesis microbiana como el resultado de una interacción entre el huésped y el microorganismo (295). En este contexto *C. albicans* es clasificada como un patógeno particular, que se adapta de forma única al hospedador humano, y que puede existir tanto como comensal inocuo, o como patógeno oportunista en individuos inmunocomprometidos e inmunocompetentes (10). Como parte de la microbiota humana comensal, *C. albicans* coloniza de manera asintomática la piel y la mucosa del tracto gastrointestinal (TGI), la cavidad oral y el tracto reproductivo de un alto porcentaje de individuos sanos. Su crecimiento está estrictamente controlado por el sistema inmune del huésped y los mecanismos regulatorios que proporciona la microbiota normal. Cambios en este balance determinan el sobrecrecimiento del hongo (11) y *C. albicans* puede infectar las superficies donde habita normalmente de manera asintomática, o causar infecciones sistémicas severas, con compromiso multiorgánico. Este hongo puede colonizar virtualmente cualquier tejido, exhibiendo diversas manifestaciones clínicas según el sitio afectado; no obstante la preferencia por un órgano en particular depende en gran medida de la vía de infección, las características intrínsecas del patógeno y las enfermedades subyacentes del paciente(296).

En una extensa revisión Knauer y col. (1976), recolectan datos de estudios *post-mortem* en un período de 12 años y reportan que el 54% de los pacientes con cultivos positivos para *C. albicans* presentaban candidiasis invasiva caracterizada por lesiones profundas en los órganos, involucrando generalmente al riñón (80%), cerebro (52%) y corazón (48%), enfatizando que cualquier tejido puede resultar susceptible su infección (98). En un estudio más reciente, Kontoyiannis y col. (2013) a partir de autopsias de pacientes de un centro de tratamiento oncológico en un período de 20 años (1989-2008) (84) reportan un aumento de candidiasis sistémica y la presencia de *C. albicans* en distintos sitios anatómicos como pulmón (79%), sangre (37%), TGI (35%), riñón (34%), hígado (20%) y bazo (19%). La presencia del hongo en cerebro no fue evaluada en esta serie de casos (10,84). Otros reportes señalan que los pacientes con neutropenia

persistente son los más propensos a la invasión renal y cardíaca en comparación con los pacientes no neutropénicos (84).

Una población particularmente en riesgo la constituyen los neonatos. La candidiasis invasiva afecta al 5-10% de recién nacidos prematuros con peso extremadamente bajo al nacer (<1Kg), causando altos índices de mortalidad y morbilidad en los individuos afectados, que alcanza el 50% en lactantes con peso menor a 750g (91,102–105). La incidencia de esta patología aumentó en la década del 80 y 90, con la mejora en la supervivencia de los niños prematuros y la mayor frecuencia en el uso de catéteres de vía central para su cuidado, facilitando de este modo el acceso del patógeno y la formación de biofilm en los dispositivos de sostén (113,297,298). Otro factor de riesgo importante en esta población es el uso de antibióticos de amplio espectro, que disminuyen la presión competitiva ejercida por las bacterias comensales, permitiendo el sobrecrecimiento de *Candida* (113,298).

Si bien ha habido avances en las terapias antifúngicas, los datos obtenidos en adultos no pueden ser extrapolados a esta población. En la actualidad, los antifúngicos recomendados para candidiasis neonatal son anfotericina B, fluconazol y micafungina (299); sin embargo, aún no existen fármacos autorizados por la FDA para el uso profiláctico en recién nacidos prematuros de alto riesgo (300). Las indicaciones y dosificación neonatal deben considerar el compromiso renal y, de acuerdo a las guías internacionales de tratamiento, se debe presuponer la infección del SNC en recién nacidos con candidiasis diseminada, ya que la incidencia supera el 15% de los casos y el diagnóstico a partir de líquido cefalorraquídeo, imágenes o hemocultivos es poco fiable (102,111).

Los recién nacidos con candidiasis invasiva con frecuencia presentan características que sugieren sepsis, como letargo o apnea, intolerancia a la alimentación, inestabilidad cardiorrespiratoria e hiperbilirrubinemia (90). Los neonatos que sobreviven a la candidiasis invasiva, con frecuencia presentan deterioro neurológico a largo plazo, incluyendo parálisis cerebral, deficiencia auditiva, ceguera, déficit cognitivo y leucomalacia periventricular (muerte de tejido cerebral alrededor de los ventrículos). Dentro del SNC, *Candida* puede causar meningoencefalitis, abscesos cerebrales y ventriculitis con hidrocefalia obstructiva (99,111).

La mayor predisposición de los niños prematuros a la forma cerebral de esta micosis se debe a la inmadurez en el desarrollo de las barreras físicas frente a *Candida* spp, donde la BHE no constituye la excepción (102). Bliss y col. (2012) observaron características de virulencia mejoradas en la mayoría de los aislamientos clínicos provenientes de neonatos con candidiasis invasiva, demostrando la importancia de los factores de virulencia de las cepas para determinar el riesgo de infección. Todos los aislamientos de líquido cefalorraquídeo de *C. albicans* tuvieron una mayor virulencia, en comparación con los aislamientos de sangre (301).

A pesar de la elevada incidencia de candidiasis cerebral asociada a graves secuelas neurológicas y a las altas tasas de mortalidad en las poblaciones de alto riesgo, el conocimiento sobre los mecanismos que rigen las interacciones entre el hongo y las células del huésped, así como el desarrollo de una respuesta inmune eficaz y sus consecuencias, aún permanece sin ser comprendidas en su totalidad. El desarrollo del presente trabajo aporta valiosa evidencia sobre la cinética y progresión de los eventos inmunes que subyacen a la infección cerebral, la magnitud y tipo de injuria tisular y la contribución que la señal dependiente del reconocimiento de los β -glucanos por el receptor Dectin-1, posee en este fenómeno.

Modelo murino candidiasis diseminada

El uso de animales de laboratorio para el estudio de infecciones por *Candida* data de finales del siglo XIX (302) y representa una herramienta fundamental en las investigaciones biomédicas. La posibilidad de inducir candidiasis sistémica en modelos de ratón ha sido esencial para comprender los mecanismos de patogenicidad y virulencia de las distintas cepas de *Candida* (303,304), así como explorar la respuesta inmune antifúngica desarrollada en el huésped frente al hongo y los factores predisponentes y agravantes de esta patología (125,217,305,306). Los estudios *in vivo* también han contribuido al desarrollo de métodos diagnósticos más rápidos y certeros, y terapias antifúngicas más efectivas (307). En la actualidad, estos modelos permiten manipulaciones genéticas o farmacológicas que imitan a los huéspedes susceptibles,

aproximándose a las condiciones clínicas reales de la enfermedad (308). El desarrollo de modelos murinos en animales WT aporta evidencia sobre el desarrollo de la patología en un huésped normal, y el uso de animales con deficiencias en componentes o elementos del sistema inmune permite generar conocimiento sobre su rol en los mecanismos de respuesta desencadenados durante la infección.

Numerosos son los grupos de investigación que optan por el modelo de infección endovenoso por la vena de la cola para inducir candidiasis diseminada, debido a la reproducibilidad (309,310) y a la gran similitud que presenta con la diseminación hematógena del hongo y las manifestaciones clínicas observadas en humanos (125,240,241,304,305,307,311,312). En este modelo, la diseminación hematógena de *C. albicans* progresa particularmente a la invasión en los riñones, y los eventos críticos que determinan la infección progresiva de este órgano se producen dentro de las primeras horas y días luego de la inoculación (246,310,313). El riñón constituye entonces el órgano de elección para monitorear la progresión de la infección sistémica y la evolución y severidad de la infección en los modelos murinos, en estrecha correlación con lo descrito en humanos (314).

En este trabajo desarrollamos un modelo de infección sistémica que emula la clínica de los pacientes con candidiasis diseminada, a fin de poder aportar nuevas evidencias sobre la patogenia de esta enfermedad. Infectamos ratones machos adultos C57BL/6 por vía endovenosa, con un inóculo de 2.5×10^6 levaduras viables de *C. albicans* de la cepa SC5314 por ratón. Antecedentes de nuestro grupo, mostraron que el comportamiento durante la infección sistémica es diferente en machos y hembras. Por este motivo, en este trabajo se utilizaron solo ratones machos, a fin de evitar variabilidad dependiente del sexo. Para evaluar las diferentes etapas del proceso infeccioso a nivel sistémico, efectuamos el estudio cinético de los eventos ocurridos durante las primeras 48h luego de la inoculación de *C. albicans*, tiempo crucial en el montaje de una respuesta inflamatoria eficiente; por otro lado, los efectos de la candidiasis a largo plazo se estudiaron a los 7 y 15 días.

Después de una infección, el organismo reacciona con un ajuste metabólico que incluye anorexia y pérdida de peso con el fin de afrontar el costo energético requerido para el desarrollo de una respuesta inmune eficiente. La sincronización

de eventos de las vías de inflamación y metabólica, garantiza la redistribución de los recursos de manera eficiente. En nuestro modelo, la progresión de la candidiasis estuvo asociada a una severa disminución de peso corporal posterior a la inoculación del hongo que continuó siendo marcada a los 7d pi, evidenciando la persistencia del impacto de los cambios metabólicos más allá del período inicial de la infección. La pérdida de masa corporal en los animales WT_{SC5314} a este tiempo fue del 15% (Figura 5A). La carga fúngica en sangre fue elevada al tiempo inicial evaluado, disminuyendo gradualmente hacia las 48h de la infección (Figura 5B). La invasión renal ocurrió muy temprano, encontrándose a las 4h pi un elevado número de UFC en este órgano, en concordancia con la marcada fungemia inicial y el predominio de la colonización renal tanto en modelos murinos como en pacientes (246,310,313). Los niveles de UFC se mantuvieron aumentados y constantes durante las 48h siguientes a la inoculación del hongo (Figura 5C). El impacto de la invasión renal fue claramente manifiesto por los hallazgos histopatológicos observados a este tiempo, caracterizados por lesiones hemorrágicas y microabscesos en proximidad a los glomérulos y túbulos renales que mostraron su morfología conservada (Figura 6). Pese al rápido reclutamiento de los neutrófilos y su establecido rol efector en la eliminación del hongo, la carga fúngica renal no mostró cambios significativos a las 48h. Estas células se localizaron alrededor de las hifas del hongo, y fueron halladas preferentemente en la región de los túbulos renales. A tiempos avanzados de la infección (7d), el sobrecrecimiento fúngicos e caracterizó por la presencia de abundantes hifas de *C.albicans*, conformando grandes empalizadas en la zona de la pelvis renal, y escasa presencia de neutrófilos cercanos. A este tiempo, la elevada colonización renal y la dificultad para lograr un clearance exitoso por parte de los mecanismos efectores del control del hongo, se tradujo en la pérdida de estructuras anatómicas vinculadas a la funcionalidad renal comprometiendo la supervivencia del animal. Durante el curso de la candidemia en este huésped normal, solo en 16% de los animales C57BL/6 infectados con *C. albicans* SC5314 sobrevivieron a los 15 días de la infección (Figura 5E).

El crecimiento fúngico en empalizada o grandes acúmulos genera un microambiente protegido para el microorganismo y de difícil acceso a las

células del sistema inmune. Peters y col. (2014) a través del uso de cepas de *C. albicans* con deleciones en reguladores transcripcionales que participan en la transición de levadura a hifa (*bcr1Δ/Δ*, *efg1Δ/Δ*, *cph1Δ/Δ* y *efg1Δ/Δ cph1Δ/Δ*), revelaron el rol crucial de la señalización originada por el cambio de morfotipo en las vías de Egf1 y Bcr1 durante la invasión y el curso de la CVV murina (315). Estos reguladores transcripcionales controlan la expresión de genes asociados al crecimiento hifal (HWP, ECE1, HYR1) y la producción de proteinasas de la hifa como Sap 4-6 (316). La producción activa de factores de virulencia como Sap y Lip durante la infección por *C.albicans* ha sido bien documentada. Estudios de nuestro grupo, aportan evidencia sobre la capacidad de Lip de *C.albicans* para inducir injuria tisular y apoptosis de hepatocitos y macrófagos (317,318). Por lo tanto, el sobrecimiento fúngico no solo es deletéreo para el huésped por la invasión y ocupación de regiones anatómicas vinculadas a la función del órgano (renal en este caso), sino por la liberación continua de factores de virulencia con capacidad de dañar células parenquimales e inmunes (317,318).

Lionakis y col. (2011) estudiaron el reclutamiento leucocitario y la evolución en la infección en distintos órganos en un modelo murino de candidiasis sistémica en hembras C57BL/6 infectadas con *C.albicans* SC5314 (125). El control de la infección en hígado y el bazo estuvo asociado a un elevado reclutamiento de neutrófilos Ly6c^{int} CD11b⁺ a las 24h posteriores a la infección. A nivel renal, el número de neutrófilos reclutado en ese tiempo fue 15 veces menor al observado en bazo. El pico máximo en riñón presentó una cinética retrasada, y a tiempos más avanzados de la infección sólo este órgano continuó acumulando leucocitos Ly6c^{int} CD11b⁺. La formación de grandes abscesos fue exclusiva de riñón y se observó, a partir de las 24h la presencia de abundante cantidad de filamentos de *Candida*, lo cual no ocurrió en bazo e hígado. La acumulación de neutrófilos predominó en todos los órganos evaluados, que se observaron rodeando los focos de hifas invasivas. Los autores postulan que las primeras 24h son críticas en el proceso y que el menor reclutamiento al riñón de una célula clave con potente actividad candidicida como el neutrófilo, le permite al hongo iniciar sus cambios morfogénicos y la invasión tisular. En este escenario, el control del hongo sería menos eficiente por dos causas: la primera, las hifas son más resistentes a los procesos de muerte, y la segunda, su longitud dificulta la fagocitosis por parte de los neutrófilos, promueve su degranulación, y

la liberación de compuestos tóxicos favoreciendo la injuria tisular (319). La evolución de la patología renal en este modelo es similar a la encontrada en nuestro estudio en ratones machos. Sin embargo, la severidad de la infección fue mayor en las hembras, donde el mismo inóculo ($2,5 \times 10^5$) provocó la muerte del 100 % de los animales al día 10 post infección, mientras que nuestros estudios de sobrevivencia al día 15, mostraron un porcentaje del 16%.

MacCallum (2009) describe los mecanismos subyacentes a la generación de una respuesta del huésped a *C. albicans*, que resulta perjudicial para los tejidos, en particular los riñones (320). La incapacidad para eliminar al hongo constituye un estímulo para la continua expansión de los neutrófilos amplificando la respuesta inmunopatogénica. En periodos avanzados, la acumulación persistente y el estado de agotamiento de los neutrófilos, favorecen la sobrevivencia del patógeno (321). Las fallas en la remoción del hongo también pueden relacionarse con otras causas que deterioran la función de los neutrófilos, como la alta osmolaridad y el contenido de urea de los túbulos renales (322). En este contexto la condición física de *Candida* para causar la invasión, se encuentra facilitada en un claro desbalance de la interacción con su huésped, favoreciendo al hongo (316).

Reconocimiento inmune de *C. albicans*. Contribución de la interacción β -glucanos/Dectin-1 en la respuesta periférica.

Desde que Medzhitov y Janeway propusieron el concepto de reconocimiento de patrones en 1997 (323), se han identificado una gran cantidad de receptores (PRR) que interactúan con los llamados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). La importancia en la participación de estos receptores en enfermedades fúngicas, se evidencia en humanos y ratones con mutaciones en PRRs o en alguno de los componentes de sus vías descendentes, con la elevada predisposición a sufrir infecciones mucosas y sistémicas graves, incluidas las del SNC (324). En una revisión del grupo de Holland (2014) describen como factores de riesgo intrínsecos, a determinados defectos genéticos innatos en las células efectoras antifúngicas o en moléculas de señalización, que resultan en mayor susceptibilidad frente a hongos oportunistas en diferentes órganos. Algunas de ellas involucran mutaciones en NADPH

oxidasa (EGC) o deficiencia en MPO, que llevan a fallas en la fagocitosis, trastornos en la señalización de citoquinas como IL-17 o defectos en la vía Dectin-1/CARD9 (78).

En 2001, Gordon D. Brown y Siamon Gordon describieron por primera vez a Dectin-1 como un nuevo receptor para β -glucanos, componentes esenciales de la pared fúngica, presente en macrófagos (45), definiéndolo años más tarde como el polisacárido responsable de la activación inducida por zymosán, dilucidando un enigma de más de cinco décadas (48). El reconocimiento de β -glucanos en la pared de los hongos desencadena una serie de respuestas antifúngicas celulares tales como estallido respiratorio, fagocitosis, trampas extracelulares de neutrófilos, producción de diversas citoquinas, e influye en el desarrollo de la inmunidad adaptativa (145,155,325).

La activación intracelular del receptor Dectin-1 es muy compleja e involucra diferentes cascadas de señalización con funciones sinérgicas o independientes, según las moléculas que participan. La vía canónica involucra el reclutamiento de la quinasa Syk, el ensamblaje del complejo CARD9-MALT1-Bcl10 y la translocación nuclear del factor de transcripción NF κ B (143). Por otro lado, la fagocitosis mediada por este receptor es independiente de Syk, así como la secreción de IL-10 y la producción de ROS (143). La secreción de IL-1 β requiere la participación del inflammasoma NLRP3 y caspasa-1, en cuya activación también participa Dectin-1 (326). Una vía no canónica alternativa independiente de Syk, involucra a Raf-1 (327), aunque ambas se integran a nivel de la activación de NF- κ B, contribuyendo a mejorar las respuestas de Th1 y Th17, esenciales para la defensa frente a *C. albicans*.

Sobre células efectoras encargadas del *clearance* del hongo, como neutrófilos y macrófagos, funciones claves como la fagocitosis y los mecanismos candidicidas, se ven afectados durante las interacciones defectuosas entre este RRP y su ligando, con un impacto directo en el control de la carga fúngica y la invasión tisular. En células como macrófagos y CD, la activación de Dectin-1 lleva a la secreción de citoquinas, que involucran IL-10, TNF, IL-2, IL-6, IL-1 β y TGF β (50,158). De este modo, el balance entre citoquinas pro y antiinflamatorias condicionan la evolución del proceso en estrecha correlación con las poblaciones activadas durante el reconocimiento del patógeno, su participación en la

respuesta tisular, la interacción con las poblaciones inmunes reclutadas y la biología del órgano infectado.

A fin de dilucidar el rol de la interacción β -glucano/Dectin-1 en la progresión de la infección sistémica y su impacto en la invasión cerebral, utilizamos dos estrategias experimentales complementarias. En primera instancia, profundizamos nuestro estudio sobre las características de la infección cuando el PAMP fúngico experimenta modificaciones respecto al PAMP salvaje, y su impacto en la interacción ligando-receptor. Para ello, la candidiasis sistémica se indujo con una cepa de *C. albicans* mutante en el gen FKS1 (*FKS1* S645P), que presenta una menor proporción de β -glucanos en su pared, en animales C57/BL/6 con expresión normal del receptor Dectin-1 (*CLEC7A*^{+/+}) (grupo WT_{FKS645}). Por otro lado, a fin de evaluar el impacto de la delección completa de esta vía de señalización, infectamos animales deficientes en el receptor Dectin-1 (*CLEC7A*^{-/-}) con *C. albicans* SC5314, cepa salvaje con expresión normal de β -glucanos de su pared (grupo KO_{SC5314}). Se evaluaron parámetros macroscópicos y sistémicos para definir la infección periférica a tiempos tempranos y durante la infección prolongada, a fin de establecer diferencias en el curso de la micosis con respecto al huésped normal (grupo WT_{SC5314}).

En nuestro estudio encontramos que la inoculación de la cepa de *C. albicans* SC5314 y su contraparte mutante FKS645 en animales machos C57BL/6, tuvieron un comportamiento similar a nivel sistémico. La infección provocó una disminución marcada del peso corporal a partir de las 4h posteriores a la inoculación del hongo y se mantuvo acentuada a la semana de la infección (figura 5A y 13A, respectivamente); la pérdida de masa corporal a este tiempo de infección fue del 18% comparado con el 16% observado en los animales WT_{SC5314}, indicando que la variación de este parámetro fue independiente de la cepa utilizada (Figura15A). La fungemia en ambos modelos experimentales fue similar (Figura 15B), al igual que la colonización renal durante las primeras horas. La carga fúngica en riñón se mantuvo elevada frente a ambas cepas durante todos los tiempos evaluados (Figura 15C). Sin embargo, las manifestaciones tisulares experimentaron cambios de interés. La hipertrofia del riñón en los ratones infectados con la cepa mutante fue más evidente a la semana de

infección, con un incremento de 2,2 veces respecto al peso del riñón en los animales infectados con la cepa salvaje. El sobrecrecimiento de *C. albicans* FKS645 se caracterizó por la presencia de abundantes hifas invadiendo la corteza y la medula renal, marcada atrofia de los túbulos y glomérulos y una robusta respuesta inflamatoria caracterizada por la presencia de abscesos y elevada concentración de células infiltrantes en el parénquima renal y en contacto con el hongo. La respuesta tisular fue comparativamente mayor que la observada con la cepa salvaje, sin embargo pese a la elevada presencia de neutrófilos, las hifas del hongo halladas principalmente en la pelvis renal, no pudieron ser eliminadas. La severidad y progresión de la candidemia provocada por la cepa *C. albicans* FKS645 en los animales C57BL/6, presentó un índice de mortalidad 50% mayor que cuando la cepa utilizada para la infección fue *C. albicans* SC5314 (7d vs 11d) y la mortalidad global a los 15d fue del 100%, mientras que el grupo WT_{SC5314} presentó una sobrevida del 16% (Figura 15D).

En nuestro modelo, y a pesar de la inflamación tisular y el franco infiltrado neutrofílico, la respuesta innata resultó ineficiente para el control del hongo. Diferentes estudios señalan la variación de la respuesta de los neutrófilos en relación al morfotipo del hongo y a la virulencia de la cepa (321,328). Neutrófilos recuperados de ratones infectados con la cepa agerminativa e hipovirulenta *C. albicans* PCA-2, produjeron principalmente IL-12, mientras que los neutrófilos recuperado de animales inoculados con la cepa virulenta CA-6 secretaron importantes concentraciones de la citoquina antiinflamatoria IL-10 (321,328). En este mismo sentido, también se demostró que el perfil de respuesta de estas células varía en relación al morfotipo del hongo; neutrófilos expuestos *in vitro* a levaduras de *Candida* producen IL-12, mientras que en contacto con la hifa liberan principalmente IL-10 (329). Estos hallazgos demuestran que durante procesos invasivos severos donde los atributos de virulencia del hongo se encuentran exacerbados, *C. albicans* posee la capacidad de modular la actividad de las células efectoras y condicionar el microambiente local a un perfil alternativo de respuesta, favoreciendo de esta manera su establecimiento y permanencia.

En este trabajo, se utilizó una cepa de *C. albicans* que presenta una mutación puntual homocigota en el aminoácido 645 del *hot-spot* 1 del gen *FKS1* (FKS S645P), obtenido a partir de la cepa parental SC5314. Ben-Ami y col., demostraron que esta cepa, al igual que muestras clínicas con mutaciones

similares, presentaban una CIM elevada para caspofungina (41), y una disminución media del 51% en la velocidad catalítica máxima de la enzima glucan-sintasa. Perlin y col., reportaron que tales mutaciones pueden disminuir la sensibilidad de la equinocandina en mil veces o más, y que las cepas mutantes requieren un marcado aumento del fármaco para reducir la carga fúngica en modelos animales de infección (330).

Ben-Ami y col. evaluaron la evolución de la candidiasis diseminada en hembras BALBC, inoculadas con 5×10^5 blastosporos de las cepas CLY16996 (FKS1-S645F), CLY16997 (FKS1-S645P), y la cepa CLY16998 clonal para la expresión de FKS1. A las 48h de la infección la carga fúngica renal y la presencia de hifas fue significativamente menor en los ratones infectados con cepas *fks1*mutantes que los animales infectados con la cepa WT, y su impacto en la supervivencia de los animales estuvo en concordancia con este hallazgo. El estudio de la composición de la pared fúngica de estas cepas demostró que la mutación S645P condujo a una mayor expresión de quitina en esta cepa respecto a la mutante S645F y a la cepa parental (41). Un estudio desarrollado sobre cepas con alto contenido de quitina demostró que poseen una tasa de crecimiento reducida y la capacidad de filamentación disminuida, por lo que son consideradas hipovirulentas (41). En forma contrapuesta a estos resultados, la cepa mutante en *fks1* S645P utilizada en nuestro estudio, produjo una temprana infección renal, abundante presencia de hifas y una mayor mortalidad comparado a la infección con la cepa parental. A diferencia del modelo utilizado por Ben-Ami y col., el background genético de los ratones empleados en nuestro estudio fue C57BL/6, el sexo diferente y el inóculo mayor.

El reconocimiento inmune innato y la eficiente activación de las poblaciones efectoras frente al hongo anteceden a una respuesta antifúngica exitosa. En este sentido, Beyda y col. (2015) observaron una menor respuesta inflamatoria en macrófagos expuestos a aislados clínicos con mutación en FKS, obtenidos de pacientes con candidemia persistente, comparado con aislados de pacientes no persistentes, sugiriendo que ciertas cepas de *C. glabrata* pueden exhibir una mayor propensión a la inmunoevasión y el desarrollo de resistencia antifúngica. Este estudio *in vitro* y otros efectuados con macrófagos RAW reporteros de muestran la importancia de una señal defectiva gatillada por el patógeno y su impacto sobre el reconocimiento de un CLR particular. En acuerdo con estas

evidencias, nuestro trabajo extiende estas observaciones a un escenario real y complejo, estableciendo las implicancias de esta interacción *in vivo*.

El enmascaramiento de los componentes de la pared es una estrategia común empleada por los hongos con el fin de evadir el reconocimiento de los CLRs y modular la respuesta antifúngica. En este contexto, se ha demostrado que *Histoplasma capsulatum*, evita la interacción con Dectin-1 a través de la eliminación enzimática de los β -glucanos de la pared celular (44). *C. neoformans* remodela activamente su pared celular en respuesta al entorno del huésped, tanto en tamaño como en composición, para evitar la detección inmune (331–335). Además, condiciones del microambiente como la hipoxia, pueden promover la evasión inmune al desencadenar el enmascaramiento de β -glucanos en la superficie de *C. albicans*, alterando el reconocimiento vía Dectin-1, lo cual le permite modular las respuestas inmunes locales y promover la colonización fúngica. Este fenómeno conduce a una fagocitosis reducida por parte de macrófagos y a la menor producción de IL-10 y TNF por las células mononucleares de sangre periférica (336).

Los resultados obtenidos permiten aportar conocimiento sobre el impacto de una interacción defectiva la dupla PAMP-RRP, como consecuencia de cambios en la señal gatillada por el patógeno y sus efectos en la inmunopatogenia y severidad de la candidiasis diseminada. El perfil de respuesta observado en estas condiciones, donde la interacción ligando/receptor es defectiva (grupo WT_{FKS645}) presenta una patología exacerbada respecto a la interacción natural (grupo WT_{SC5314}), en la que tanto el patógeno como el huésped expresan condiciones normales de expresión del RRP y del PAMP en estudio.

Estudios en ratones deficientes en Dectin-1, han demostrado un rol protector durante la infección con patógenos fúngicos de importancia clínica, tales como *C. albicans* (155) y *A. fumigatus* (156). Sin embargo, el rol de este receptor es controversial, pudiendo presentar características redundantes o contradictorias según el proceso evaluado. Varios estudios han ayudado a establecer el papel de Dectin-1 en la inmunidad tanto innata como adaptativa, y han resaltado cómo la dependencia de Dectin-1 puede variar con las condiciones externas, como el *background* genético del huésped, el patógeno fúngico y los

tipos de célula involucradas (263,337,338). A pesar de esto, los modelos animales, pero fundamentalmente el hallazgo de mutaciones en los RRP y o en sus moléculas de señalización en individuos con mayor susceptibilidad para estas infecciones, han sido de gran importancia para determinar las perturbaciones inmunológicas que conducen a la enfermedad fúngica mucosa y sistémica, e intentar comprender los mecanismos que determinan un control de la infección o una respuesta inmune desenfrenada.

Ferwerda y col. (2009) identificaron una mutación en el gen que codifica para el receptor Dectin-1 humano, resultando en una expresión escasa o nula de la molécula. La mutación Y238X estuvo asociada con una frecuencia elevada de candidiasis vulvovaginal recurrente u onicomicosis en los miembros de una misma familia. Ensayos *in vitro* efectuados con células mononucleares de sangre periférica de estos individuos presentaban fallas en el reconocimiento de los β -glucanos de la pared de *C. albicans*, provocando una disminución en la secreción de citoquinas, principalmente IL-17, TNF e IL-6. En contraste, la fagocitosis y muerte de los hongos fueron normales (81), sugiriendo una función redundante que puede restablecerse mediante opsonización (155). En el mismo año fue descrita la deficiencia en la molécula adaptadora de la señal intracitoplasmática generada por el reconocimiento de Dectin-1 y otros CLR. La deficiencia de CARD9 humana se asocia con el desarrollo espontáneo de infecciones fúngicas persistentes y graves que se localizan principalmente en la piel y el tejido subcutáneo, las superficies mucosas o el SNC. Esta deficiencia fue descrita por primera vez por Glocker y col. (2009) en una gran familia consanguínea iraní compuesta por 43 miembros. La mutación Q295X, estuvo asociada a la aparición de múltiples casos de CMC crónica y en ciertos individuos una mayor susceptibilidad a la forma diseminada y a la forma cerebral de la micosis (162). Desde entonces, se han identificado otras mutaciones en *CARD9* asociadas con infecciones mucosas y sistémicas, causadas por diferentes de hongos (94,95,339–349). Estos reportes demuestran inequívocamente la dependencia crítica de CARD9 en la inmunidad antifúngica humana.

Plantinga y col. estudiaron la incidencia de candidiasis diseminada en pacientes receptores de trasplantes de médula ósea y con un polimorfismo en Dectin-1 (Y238X). Esta mutación en pacientes inmunocompetentes predispone

el desarrollo de candidiasis mucocutánea; sin embargo, en pacientes inmunocomprometidos, como los sometidos a tratamientos intensivos de tumores hematológicos malignos, se asocia con la mayor susceptibilidad a la invasión sistémica por *C. albicans* (350). Si bien esta mutación no es considerada causa predisponente para la candidiasis sistémica, podría constituir un factor de alto riesgo en pacientes críticos cuando la infección se establece debido a intervenciones quirúrgicas, tratamientos subyacentes u infecciones concomitantes. Asimismo, la mutación Y238X ha sido asociada a la mayor predisposición a la aspergilosis invasiva en pacientes inmunocompetentes (351).

Por otra parte, Goodridge y col. (2011) demostraron que la activación de Dectin-1 depende de la estructura tridimensional de sus ligandos. A pesar de que este receptor reconoce β -glucanos solubles, la cascada de señalización intracelular se activa por la interacción con ligandos particulados, induciendo la fosforilación de la quinasa Syk, la fagocitosis, la producción de TNF y de ROS. A diferencia de otros RRP como los TLR, Dectin-1 discrimina entre los ligandos solubles y partículas mediante la formación de una “sinapsis fagocítica”, que agrupa varios receptores induciendo su activación solo cuando es necesaria (46). Esto determina la importancia de tener en cuenta los ligandos utilizados en los diferentes estudios, para la correcta interpretación de los resultados.

Taylor y col. (2007) usando ratones 129Sv, reportaron que Dectin-1 es esencial para controlar la infección sistémica con *C. albicans* SC5314 (217). En contraste, el grupo de Iwakura (2007) demostró que la respuesta mediada por Dectin-1 no es requerida para el control de este patógeno en un modelo de infección sistémica en ratones C57BL/6 infectado con la cepa de *C. albicans* ATCC18804 (352). Marakalala y col. (2013), utilizando modelos de infección *in vivo*, demostraron que la contribución Dectin-1 en el control de infecciones sistémicas por *C. albicans* está asociado a las características de la cepa fúngica, y a la adaptación variable que las cepas del hongo experimentan en el huésped, hechos que no pueden ser recapitulados *in vitro*. Cambios en la composición, naturaleza y arquitectura de la pared de *C. albicans* se encuentran relacionados a este fenómeno. Por otra parte Carvalho y col. reportaron que Dectin-1 es necesario para el control eficiente de la candidiasis gastrointestinal y vaginal en

ratones C57BL/6, mientras que animales BALB/c deficientes en el receptor fueron más resistentes. Este estudio demuestra la importancia del background genético del huésped en la respuesta local. De este modo, las diferencias reportadas en la literatura evidencian las controversias descritas para este receptor en los modelos murinos de infección por *Candida*, y establecen la necesidad de explorar y definir el entorno específico en el que se va a desarrollar un estudio particular, con el fin de complementar la información existente en relación a la inmunopatogenia de la candidiasis diseminada y aportar nueva evidencia sobre la contribución del reconocimiento de β -glucanos por Dectin-1 en la forma cerebral de esta micosis.

En este trabajo utilizamos animales Dectin-1 KO, en background genético C57BL/6 generados por el grupo de Gordon D. Brown y cedidos para el presente estudio. Estos ratones fueron viables, mostraron una expresión nula del receptor, no presentaron anomalías y los recuentos de leucocitos periféricos fueron normales (155).

La inoculación endovenosa de *C.albicans* SC5314 en ratones deficientes en el receptor Dectin-1 muestra un perfil similar a la infección desarrollada que su contraparte WT. Mientras que durante las primeras 24h de la infección la pérdida de peso fue similar en ambos grupos, a tiempos mayores la variación de este parámetro fue marcada, observándose una reducción del 26% de la masa corporal en ratones Dectin-1 KO (Figura 24 A). La fungemia presentó niveles menores que la observada en los animales del grupo WT_{SC5314} durante las primeras 12h pi y una carga fúngica elevada y conservada hacia las 48h pi. La infección renal temprana presentó un perfil inverso al observado durante la diseminación hematológica en animales KO_{SC5314}, sugiriendo que la menor presencia del hongo en sangre está asociada con la rápida invasión renal (Figura 24 B y C). La severidad del compromiso renal se evidenció por la elevada carga fúngica, la marcada hipertrofia del órgano y la presencia de hematuria a la semana de infección en la mayoría de los ratones evaluados. El daño tisular y la pérdida de arquitectura de estructuras claves para la función renal correlacionan con la invasión y el abundante crecimiento de hongo (Figura 25 y 26).

La contribución del reconocimiento de Dectin-1 en los neutrófilos ha sido explorada *in vitro e in vitro*. Neutrófilos en cultivo expuestos a *C. albicans* demostraron que la ausencia de Dectin-1 lleva a la pérdida de reconocimiento de β -glucanos y a una respuesta de ROS atenuada frente a la levadura; este efecto no pudo ser revertido por el uso de opsoninas, evidenciando su importancia en las funciones efectoras de esta población celular (217). En un estudio del grupo de Brown, utilizando ratones 129/Sv y un modelo de infección intraperitoneal con 1×10^6 partículas de zymosán o 1×10^5 de *C. albicans*, demostraron que ratones Dectin-1 KO presentan menor reclutamiento temprano de neutrófilos y monocitos inflamatorios al peritoneo (4h), así como menor migración de macrófagos residentes. El menor reclutamiento de células inflamatorias se asoció a defectos en la producción de citoquinas específicas y factores de crecimiento en la lesión inflamatoria, como en la producción de IL-6, las quimiocinas CCL2 y CCL3, y GM-CSF.

En nuestro modelo, la persistente presencia de neutrófilos reclutados al sitio de la infección en los animales del grupo KO_{SC5314} y la ausencia de un receptor clave para su actividad fagocítica y candidicida, determinan la incapacidad de estas células de efectuar el clearance del microorganismo y contribuyen a exacerbar el daño tisular. En animales C57BL/6 Dectin-1 KO, el progreso de la infección diseminada se vio acompañado de severas manifestaciones clínicas sistémicas y neurológicas, evidenciando el deterioro en la salud del animal. Estos parámetros en su conjunto, pueden explicar la elevada mortalidad que observada en estos animales al día 8pi en el que este parámetro fue 100 %.

En concordancia con nuestros hallazgos, el uso de ratones hembra 129/Sv Dectin-1 KO infectados iv con una dosis subletal (1×10^4) o una dosis letal (1×10^5) de *C. albicans* SC5314, provocó una infección severa con elevada mortalidad y un fuerte compromiso gastrointestinal. La elevada diseminación sistémica de *C. albicans* se evidenció incluso a las 24h pi, concordante con el deficiente reconocimiento y control innato del patógeno fúngico. En este modelo no se detectaron diferencias significativas en la producción de citoquinas, y la colonización renal al finalizar el ensayo (28d pi) fue mayor en animales deficientes en Dectin-1, con predominio en la región pélvica y extensión hacia los túbulos renales, mientras que en los animales WT el hongo fue eliminado

exitosamente. Las hifas fúngicas se extendieron a través del epitelio tubular hacia el intersticio y estaban rodeadas por una inflamación neutrofílica aguda, característica de la candidiasis invasiva(155).

Estudios efectuados con *C. glabrata*, en un modelo murino (C57BL/6) de infección sistémica, demostraron que ratones deficientes en Dectin-1 eran más susceptibles a desarrollar la enfermedad. Este CLR fue necesario para el reconocimiento inmune de células mieloides, para la destrucción del hongo y el desarrollo de una respuesta inmune adaptativa mediada por células Th1 y Th17. En estos animales la respuesta inflamatoria fue deficiente, con escaso reclutamiento de neutrófilos y liberación de citoquinas (157).

En el presente trabajo el uso de animales WT y los modelos de infección utilizando las cepas de *C.albicans* SC5314 y FKS645 y animales Dectin1-KO, permiten evidenciar las características de la infección sistémica y la progresión y severidad creciente de la patología, conforme la señal β glucano/Dectin-1 se ve deteriorada. La ausencia total o parcial de este receptor intensifica la severidad de la enfermedad, caracterizada por una mayor invasión fúngica renal y deterioro de la arquitectura del riñón, con agravados síntomas clínicos manifiestos.

***C. albicans* en SNC**

Si bien las infecciones en el SNC generalmente se atribuyen a bacterias y virus, cada vez es más la evidencia de patógenos fúngicos responsables de la colonización cerebral, aunque la epidemiología y la distribución de especies en este nicho, aún no han sido establecidas. Debido a las limitaciones de los métodos diagnósticos actuales, la mayoría de los datos epidemiológicos sobre invasión de SNC corresponden a estudios *post-mortem* en individuos con infecciones fúngicas sistémicas (101).

Aunque el principal órgano diana de *C. albicans* es riñón, este hongo puede hallarse con frecuencia en SNC durante las infecciones agudas, mayormente en pacientes inmunocomprometidos. De hecho, se ha demostrado que el 50% de los pacientes con candidiasis diseminada, presentan invasión fúngica en cerebro, asociada con una tasa de mortalidad que alcanza el 90% de los casos

(96,97). Las infecciones fúngicas del SNC son difíciles de tratar, requieren de terapias prolongadas y con frecuencia resultan en secuelas neurológicas o muerte, si no son diagnosticadas y tratadas rápidamente.

A fin de contribuir al entendimiento de los procesos involucrados durante la infección fúngica en SNC y describir la patogénesis de la candidiasis en este sitio anatómico en un huésped normal, en este trabajo estudiamos la progresión de la invasión cerebral a partir de la diseminación hematológica de *C. albicans* SC5314 en ratones C57BL/6 WT (grupo WT_{SC5314}). Pudimos identificar una rápida invasión cerebral en el 100% de los animales desde tiempos muy tempranos (4h), la que fue corroborada por los estudios de perfusión *in vivo* no observándose diferencias significativas luego del tratamiento (Figura 7). La máxima carga fúngica cerebral en estos animales se observó a las 12h luego de la infección, tiempo al cual los estudios histológicos revelaron claramente la presencia del hongo en el parénquima cerebral. La observación sistemática de los cortes tisulares nos permitió establecer la ausencia de células infiltrantes durante las primeras horas de la infección (4-12h) implicando a las células residentes de cerebro en la respuesta temprana al hongo.

En las siguientes 24 y 48h pi, la carga fúngica permaneció elevada en cerebro, con niveles menores a los observados a las 12h, sugiriendo el comienzo de un clearance exitoso. Los estudios histopatológicos revelaron la presencia de infiltrado inflamatorio caracterizado principalmente por neutrófilos, que se organizaron en microabscesos cerebrales rodeando a las hifas de *C. albicans* (Figura 8). La mayoría de los animales pudieron eliminar completamente al hongo de cerebro luego de una semana de la infección, y los que no lograron un clearance total, fueron capaces de controlar su crecimiento de manera eficiente. Con una cuantificación nula de UFC en el tejido, algunos ratones presentaron focos inflamatorios persistentes, en ausencia de formas fúngicas evidentes.

Acorde a nuestros resultados, Lionakis y col. (2011) identificaron la presencia de neutrófilos y monocitos/macrófagos periféricos en cerebro a partir de las 24 h de la inoculación sistémica con *C. albicans* SC5314 en ratones hembra. Estas células formaron pequeños abscesos multifocales, dispersos predominantemente en la materia gris, y colocalizaron con las hifas del hongo (125). También demostraron que el proceso inflamatorio no fue progresivo ni

destrutivo en el cerebro, observándose la estructura del órgano intacta una vez resuelta la infección, y escasa o ausencia total de células infiltrantes a los 7d de la inoculación del hongo. En estos animales la carga fúngica aumentó hasta los 4 días, pero hubo un clearance total cuando transcurrió una semana.

El uso de la microscopía intravital de alta resolución en el área de la neurociencia, se ha convertido en una importante herramienta para definir los procesos involucrados en las enfermedades infecciosas en tiempo real (120,353). En el año 2013, Navarathna y col., utilizaron esta técnica para estudiar la infección cerebral por *C. albicans* en ratones. Observaron una rápida entrada al parénquima cerebral, solo 30 minutos después de la inoculación iv, que ocurrió inicialmente sin rotura grave de la BHE; sin embargo, a los 3 días de la infección la acumulación de levaduras e hifas del hongo fue significativa y los signos de daño en la barrera endotelial se asociaron con una elevada respuesta inflamatoria. El aumento en la permeabilidad vascular fue atribuido a la presencia de leucocitos (119).

Para invadir SNC, *C. albicans* debe ser capaz de atravesar la BHE, barrera anatómica y funcional que regula el transporte de cualquier sustancia al cerebro en individuos sanos. Jong y col. (2001), utilizaron un modelo *in vitro* de la BHE humana para investigar las interacciones entre *C. albicans* y las células endoteliales microvasculares de cerebro humano (HBMEC), y demostraron por primera vez que este hongo es capaz de adherirse, invadir y efectuar la transcitosis a través de la monocapa celular sin afectar su integridad (121). Más adelante, se demostró que la invasión de células endoteliales cerebrales por *C. albicans* está mediada por las invasinas fúngicas Als3 y Ssa1 (122), que se unen a un receptor expresado exclusivamente en células del endotelio cerebral y promueven el desplazamiento a través de las mismas (122). Estas células recubren los capilares del cerebro constituyendo la BHE y se encuentran distribuidas por todo el tejido, por lo que *C. albicans* podría acceder a distintas áreas del parénquima cerebral sin impedimento alguno. Otros estudios han demostrado que la activación microglial y las citoquinas liberadas, como el TNF, también son capaces de interrumpir las uniones estrechas de la BHE y permitir el paso de infiltrado inflamatorio durante la colonización cerebral (354).

Un estudio de Nakayama y col. (2010) examina lesiones del SNC a partir de autopsias de pacientes con candidiasis sistémica (355). Los autores reportan que las lesiones se forman principalmente en la capa profunda de la corteza cerebral en la región supratentorial, aunque algunos individuos mostraron lesiones simultáneas en el tronco encefálico y en cerebelo. Previamente, otro estudio había informado que las lesiones por candidiasis en SNC ocurrían con frecuencia en la unión corticomedular (107). No obstante, aunque aún no se ha dilucidado la relación entre la estructura normal de los vasos sanguíneos con la localización del hongo, se plantea la posibilidad de que la arquitectura vascular específica del tejido y los cambios en el flujo sanguíneo son factores esenciales involucrados en la colonización por *Candida*, así como en la formación y distribución de los focos del hongo (355). La ausencia de un tropismo definido para *C. albicans* dificulta el estudio histológico de marcadores específicos en un área particular del cerebro como ocurre en otras infecciones. En estas circunstancias los cambios ocurridos como consecuencia de la interacción patógeno/huésped durante la infección natural, podrían estar siendo enmascarados por esta heterogeneidad en la distribución, dando valores globales irrelevantes.

Reconocimiento y respuesta inmune local frente a *C. albicans*

Pese a la elevada incidencia de la candidiasis cerebral en pacientes de alto riesgo y considerando la gravedad de la infección, el conocimiento sobre los mecanismos que rigen esta patología en SNC no han sido dilucidados totalmente. El SNC es un nicho particular, que presenta un microambiente estrictamente controlado. Frente a una infección o injuria, el balance entre una respuesta inmune inflamatoria y antiinflamatoria es crucial para la resolución del problema, evitando el daño tisular. Romani y col. (2011) establecen la importancia del balance entre la eliminación del patógeno y el control de la inflamación en el desarrollo de una respuesta inmune antifúngica eficiente, evitando el daño colateral excesivo (11). Esto es particularmente relevante en cerebro, donde una respuesta inflamatoria exacerbada tiene consecuencias severas, debido a las características fisiológicas y anatómicas de este órgano y a la escasa capacidad de las neuronas para regenerarse. Es evidente la

necesidad de comprender los mecanismos que rigen el reconocimiento de *C. albicans* por las células inmunes del cerebro y los procesos inflamatorios involucrados en el control fúngico, así como la protección o muerte neuronal.

En este trabajo desarrollamos un modelo de infección sistémica que emula la clínica de los pacientes con candidiasis diseminada, a fin de poder aportar nuevas evidencias sobre la patogenia de la infección cerebral y ampliar el conocimiento sobre las interacciones entre el hongo y el sistema inmune del huésped en las diferentes etapas del proceso infeccioso. Como estrategia de trabajo, enfocamos el estudio de la infección temprana por un lado a las 4 y 12h pi, con el fin de evaluar la participación de las células residentes de cerebro, y por otro lado a las 24 y 48h pi, tiempo en el cual las células periféricas son reclutadas. Además, complementando los eventos periféricos evaluados, estudiamos algunos parámetros de la infección prolongada, a los 7 y 15 días.

Pese a la elevada carga fúngica encontrada en cerebro de ratones WT_{SC5314} a las 4h luego de la infección, en ese tiempo no hubo producción de citoquinas proinflamatorias en cerebro, encontrándose una secreción de IL-1 β , TNF e IL-6, en un nivel similar al basal (Figura 10). A las 12h de la infección, se observó un aumento significativo de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF. Debido a que en este tiempo no se hallaron células periféricas infiltrantes, estos resultados otorgan a las células gliales un rol protagónico en el desarrollo de la respuesta inmune inicial frente a *C. albicans* en este nicho. La marcada disminución de TGF β en los primeros tiempos (4 y 12h), podría indicar la necesidad de desarrollar una respuesta inflamatoria rápida y contundente, que resulte eficiente para el control inmediato del patógeno.

Numerosos estudios han confirmado el rol de TGF β en el control de la activación microglial (356–358). Norden y col. (2014) demostraron que la administración intracerebral de un inhibidor de la vía de señalización de TGF β en ratones estimulados sistémicamente con LPS, prolongaba la enfermedad inflamatoria, induciendo altos niveles de IL-1 β y TNF (358). Por otra parte el aumento en la secreción de IL-6 observada en respuesta a *C. albicans* resulta de elevado interés. Esta citoquina puede ser liberada por las células del cerebro, incluyendo microglía, astrocitos y neuronas (359), y desempeña un papel en el

secuestro de hierro libre intracelular, una importante fuente nutricional para el crecimiento microbiano dentro de los fagocitos (360). Chai y col. (2011) demostraron que ratones KO para IL-6 eran más susceptibles a la aspergilosis invasiva que los animales WT (361).

Conforme avanza el proceso infeccioso, la presencia de neutrófilos en el parénquima cerebral se hace evidente. Koutsouras y col. (2017), exponen que el reconocimiento *in vitro* de hongos por receptores de la inmunidad innata presentes en la microglía inducen la secreción de citoquinas, tales como TNF, IL-1 β , IL-6 e IL-12, además de potenciar la fagocitosis y la producción de ROS (171). Por otra parte, se ha informado que algunas citoquinas proinflamatorias, como IL-6, IL-8 y TNF, son responsables del reclutamiento de neutrófilos al sitio de infección (362–364). La secreción de citoquinas proinflamatorias en respuesta a la interacción temprana con *C. albicans*, podría estar involucrada en el reclutamiento de neutrófilos observada en los animales WT_{SC5314}. De hecho, la presencia de estas células infiltrantes se evidenció poco después del aumento de citoquinas, mediante estudios histológicos (figura 7 y 8). No obstante, la llegada de neutrófilos no indujo un aumento considerable de citoquinas, y los niveles de citoquinas proinflamatorias hallados a las 24 y 48h luego de la inoculación, se mantuvieron o incluso disminuyeron rápidamente, mientras que el TGF β recuperó su concentración basal. A las 48h, la homeostasis en el tejido había logrado reestablecerse, alcanzando los niveles constitutivos para estas citoquinas. Estos resultados demuestran el estricto control de la inflamación en este nicho altamente regulado, siendo suficiente la rápida respuesta inmune generada en el primer contacto entre el hongo y las células residentes de cerebro, para inducir el reclutamiento de neutrófilos efectores y controlar el crecimiento del hongo a nivel local, evitando un daño tisular exacerbado.

La microglía y los astrocitos son las poblaciones residentes encargadas de sensor la presencia de estímulos y noxas en el cerebro. Su distribución y temprana activación condiciona el perfil y la evolución de las respuestas locales. En este trabajo, encontramos que, a pesar de la ausencia de respuesta mediada por citoquinas a las 4h de la infección, *C. albicans* indujo una rápida activación glial, definida por los cambios morfológicos experimentados por las células residentes de cerebro. La presencia de engrosamiento de los procesos y la forma

ameboidal evidenciada por la expresión de Iba-1 se observó en los animales infectados (Figura 11). Si bien no pudo establecerse diferencias en la cuantificación de la expresión respecto a la expresión basal en acuerdo con la dificultad planteada para el estudio de marcadores histológicos y la falta de tropismo de *C. albicans* por una región particular, la expresión del marcador en la microglía activada, sugiere que estas células podrían estar respondiendo al hongo por mecanismos alternativos, como la fagocitosis (365,366). Los astrocitos también mostraron aumento en la expresión del marcador GFAP, evidenciando su capacidad de detectar la presencia del hongo. De manera similar a lo descrito para la microglía, la cuantificación de intensidad de fluorescencia no mostro diferencia con el animal sin infectar (figura 12).

Reconocimiento inmune de *C. albicans*. Contribución de la interacción β -glucanos/Dectin-1 en la respuesta cerebral.

La contribución del reconocimiento de los β -glucanos por el receptor Dectin-1 en la patogenia de la forma cerebral de la micosis, aún no ha sido claramente establecida. Numerosos estudios adjudican un rol a este receptor o a moléculas involucradas en su señalización, en la susceptibilidad a micosis sistémicas, predisponiendo al huésped a la invasión del SNC.

La primera evidencia sobre susceptibilidad a la infección cerebral por *C. albicans* y fallas genéticas en los pacientes fue reportada por Glocker y col. quienes identificaron una mutación puntual homocigota en la molécula CARD9 (162). Drummond y col. (2015) observaron que el reclutamiento defectuoso de neutrófilos a cerebro en pacientes deficientes en CARD9, presentaban una mayor carga fúngica en SNC (94). Resultados similares se obtuvieron en modelos animales, donde la deficiencia de dicha molécula adaptadora derivó en un menor reclutamiento de neutrófilos y menor control fúngico (94). La elevada incidencia de candidiasis cerebral en pacientes con mutaciones con pérdida de función de CARD9, plantea la posibilidad de que este receptor participe durante la colonización del SNC. De hecho se ha demostrado que la participación de CARD9 *downstream* de Dectin-1 en respuesta a polisacáridos fúngicos, es necesaria para la producción de citoquinas por parte de la microglía y requerido para el reclutamiento de neutrófilos (94).

Para evaluar la contribución del reconocimiento inmune β -glucanos/Dectin-1 en la patogenia de la micosis en SNC, estudiamos las características de invasión fúngica en cerebro durante la infección sistémica con *C. albicans* FKS645 (grupo WT_{FKS645}) y en ratones deficientes en el receptor infectados con *C. albicans* SC5314 (grupo KO_{SC5314}), y la respuesta inmune innata desarrollada en este órgano durante las primeras horas de la infección.

Al igual que en el grupo de animales WT, en los animales del grupo WT_{FKS645} y KO_{SC5314} la invasión cerebral ocurrió rápidamente, observándose una elevada carga fúngica desde las 4h luego de la infección. Interesantemente en ambos modelos experimentales observamos que a pesar de encontrar niveles similares de fungemia, la ausencia parcial o total de la señalización vía Dectin-1, se asoció a una menor carga fúngica en cerebro. Esta diferencia se produjo a las 4h en los animales infectados con *C. albicans* FKS645 (Figura 16 B) y a las 4 y 12h en los animales deficientes en Dectin-1 (Figura 27 B). A fin de determinar los mecanismos involucrados en el control inicial del hongo, evaluamos la respuesta inmune inducida tras la interacción patógeno-huésped, considerando a las células gliales como las protagonistas en estos eventos tempranos.

La infección de los animales con la cepa de *C. albicans* con menor proporción de β -glucanos, indujo una respuesta inflamatoria inmediata, caracterizada por el aumento de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β y TNF a las 4 y 12h (Figura 17). Asimismo, la ausencia total de Dectin-1, provocó una elevada secreción temprana de IL-1 β e IL-6, con respecto a su control basal. En comparación con el grupo WT, la secreción de las citoquinas proinflamatorias, IL-1 β y TNF, fue más rápida, observándose mayores niveles a las 4h pi (Figura 30 y 31). En este trabajo se demostró también que ratones deficiente en el inflamasoma NLRP3, responsable de la maduración y liberación IL-1 β presentan dificultad en el control de la carga fúngica intracerebral (Figura 30). Este evidencia está de acuerdo con trabajos que muestran que una defectuosa producción de IL-1 β se asociada a una mayor susceptibilidad a la candidiasis superficial y sistémica (326,367–369). Nuestros resultados en su conjunto indican que la elevada secreción temprana de esta citoquina, podría explicar el mayor control de crecimiento del hongo observado en los ratones infectados con la cepa FKS645 y animales Dectin-1 KO. En ambos grupos de animales, la ausencia

parcial o total de la señal mediada por este CLR favorece un perfil proinflamatorio en el período comprendido entre las primeras 12h luego de infección donde las células residentes de la glía desempeñan un rol protagónico.

Los β -glucanos son considerados importantes inmunomoduladores, aunque el conocimiento sobre su capacidad antiinflamatoria en SNC es escaso y se limita a ensayos *in vitro*. Jung y col. (2007) demostraron que estos polisacáridos podían reducir la secreción de TNF en cultivos de microglía estimuladas con LPS, a partir de la supresión de NF κ B en la línea celular BV2 (370). Shah y col. (2008) trabajando con cultivos primarios o líneas de microglía, demostraron que la activación de estas células frente a β -glucanos particulados inducía una respuesta única, diferente a la observada en los macrófagos periféricos. Luego de la interacción se indujo la fagocitosis de las partículas y la producción de ROS, sin embargo la secreción de citoquinas resultó atenuada (52). Estos autores también demostraron el receptor Dectin-1 suprime la translocación al núcleo de NF κ B, atenuando la secreción de citoquinas mediada por TLR2 (51). Esta evidencia *in vitro* estaría en estrecha correlación con nuestros hallazgos *in vivo* en los animales WT_{FKS645} y KO_{SC5314} en los que la escasa o nula activación del receptor Dectin-1, podría explicar la mayor respuesta inflamatoria observada durante el primer contacto con el hongo luego de la invasión cerebral.

En relación al perfil de los otros mediadores inmunes evaluados a nivel local durante la infección en ambos modelos experimentales, la secreción de IL-6 fue significativamente menor en los animales WT_{FKS645} y KO_{SC5314} comparado con ratones WT (Figura 18 y 31), evidenciando la importancia de la señal dependiente de Dectin-1 en las células residentes para su producción. Interesantemente, mientras que la infección cerebral con *C. albicans* SC5314 provocó una importante disminución de los niveles de TGF β a las 4h pi, a este mismo tiempo *C. albicans* FKS indujo un abrupto incremento de esta citoquina demostrando que cambios en la composición de la pared del hongo modifican significativamente la producción local de los mediadores inmunes. La señal defectiva en el reconocimiento β -glucanos/Dectin-1 condiciona fuertemente la

producción de este mediador antiinflamatorio, y afecta el balance del microambiente local. En ausencia total de la señal de este CLR, los niveles constitutivos de TGF β estuvieron elevados y continuaron aumentados durante la infección.

Transcurridas 24 y 48h de la inoculación, observamos hifas invasivas de *C. albicans* acompañadas de una robusta respuesta inflamatoria y elevado daño tisular, con presencia de zonas necróticas y abscesos cerebrales dispersos en el parénquima. Pese a la presencia de los neutrófilos, el control del hongo no fue efectivo, y la carga fúngica inicialmente controlada (primeras 12h), aumentó significativamente a lo largo de la cinética evaluada. Estos resultados podrían indicar que, aunque el reclutamiento de neutrófilos no parece modificarse en gran medida, la ausencia o defectos en la señalización de Dectin-1, podría alterar la capacidad fungicida de estas células (53). En este mismo sentido, Kennedy y col. (2007) reportaron que el receptor Dectin-1 promueve la actividad fungicida en neutrófilos humanos mediante la inducción de la fagocitosis, producción de ROS y fusión de los gránulos a los fagosomas, favoreciendo la muerte de *C. albicans* (371). Li y col. (2011) demuestran en experimentos *in vitro*, que el reconocimiento de β -glucanos por Dectin-1 en neutrófilos, es necesario para el clearance de *C. albicans* al favorecer la activación de integrinas y moléculas citoplasmáticas involucradas en el desarrollo de las respuestas citotóxicas de estas células (372).

A pesar del aumento en los niveles de citoquinas proinflamatorias involucradas en el control del crecimiento fúngico en las primeras 12h de la infección, el reclutamiento de neutrófilos y la respuesta inflamatoria tisular desarrollada en los animales con defecto parcial o total en el reconocimiento β -glucanos/Dectin-1 no pudieron controlar el crecimiento de *C. albicans*. A la semana de infección se encontró una elevada carga fúngica, acompañada de signos clínicos severos que indican un fuerte deterioro de la salud del animal.

Los astrocitos y la microglía de ratones infectados con la cepa defectiva en la proporción de β -glucanos, mostraron cambios morfológicos evidenciados por la expresión de los marcadores específicos GFAP e Iba-1 (Figura 19 y 21), sin embargo no pudieron observarse diferencias cuantitativas con los animales WT a las 4h luego de la infección. No obstante, cuando la ausencia de la señal

mediada por Dectin-1 fue total, una franca microgliosis y astrogliosis pudo ser observada marcadamente (Figura 33 y 35). Estos resultados en su conjunto demuestran la importancia de este CLR en el control de la activación temprana de estas poblaciones residentes, en la reactividad glial y en la evolución del proceso local.

En la actualidad se sabe que la mayoría de los PRRs muestran algún grado de redundancia en determinados microambientes. Los datos obtenidos a partir de investigaciones en ratón sugieren que tanto los TLRs como los CLRs son importantes en la generación de respuestas antifúngicas (148). Los distintos CLRs como Dectin-1 (81,162), Dectin-2, Dectin-3 y Mincle señalizan a través de CARD9, lo que explica que pacientes con deficiencia en esta molécula presentan infecciones fúngicas más severas. La naturaleza redundante de estos receptores, puede explicar el fenotipo leve en individuos defectuosos en un solo CLR, enmascarando la participación de receptores individuales (143,149). En nuestro estudio el hallazgo de diferencias evidentes en la activación de células gliales, generación de respuesta inmune y control fúngico frente a la falla de un solo receptor, revela la importancia de Dectin-1 en este sitio anatómico frente a *C. albicans*.

Procesos neurodegenerativos

En la actualidad, existen numerosos estudios sobre las enfermedades neurodegenerativas asociadas a virus, bacterias y parásitos, pero la patogénesis cerebral desencadenada por las infecciones fúngicas, es un campo que aún no ha sido explorado en profundidad. Comprender los mecanismos y la patogenia de las enfermedades neurodegenerativas asociadas a hongos, permitirá el desarrollo de estrategias para detectar enfermedades neurológicas en etapas tempranas y antes de la aparición de síntomas manifiestos e irreversibles.

Este trabajo aporta evidencia importante sobre las manifestaciones neurológicas asociado a la colonización cerebral por *C. albicans*. Este es el primer estudio que explora el daño neuronal establecido en el contexto de una infección fúngica en SNC.

Para estudiar los procesos neurodegenerativos que pudieran ponerse en marcha en respuesta al hongo, fue necesario evaluar un punto de la cinética más avanzado, a fin de poder visualizar las consecuencias del progreso de la infección. Por este motivo, los ensayos se realizaron a las 24 y 48h luego de la inoculación sistémica, donde la carga fúngica cerebral en animales WT permanece elevada y constante, y los procesos de daño tisular pueden manifestarse a nivel cerebral. Pudimos observar que la infección con *C. albicans* en ratones WT indujo una franca activación de astrocitos y microglía (Figura 36). El pico de microgliosis se observó a las 24h y la astrogliosis evolucionó de manera progresiva y creciente hacia las 48 h luego de la inoculación del hongo.

Tanto los astrocitos como la microglía se activan rápidamente en respuesta a lesiones cerebrales o injuria, aunque su activación ocurre con un patrón espacial y temporalmente distinto (207). La primera población en activarse es la microglía, promoviendo la activación de los astrocitos. Estos a su vez, no solo facilitan la activación de la microglía distante, sino que también modulan las respuestas de las células microgliales cercanas. Las principales moléculas que contribuyen a su intercomunicación incluyen la IL-1 β , el ATP y el TGF- β (207). En nuestro modelo, la infección de animales C56BL/6 con *C. albicans* provocó una franca reactividad del componente glial y un marcado reclutamiento de neutrófilos, en el que la activación de las diferentes poblaciones en respuesta al hongo y a los mediadores inmunes liberados, convergen en la generación de un microambiente inflamatorio capaz de promover la injuria tisular.

El daño neuronal en el SNC generalmente provoca pérdidas funcionales permanentes, debido a la baja capacidad de regeneración axonal. A fin de evaluar los efectos de la inflamación cerebral sobre las neuronas en el contexto de la infección por *C. albicans*, realizamos ensayos para la visualización de procesos neurodegenerativos, mediante técnicas inespecíficas y complementarias, A-Cu-Ag y FluoroJade. Además, la inmunomarcación con caspasa-3 clivada fue utilizada para evidenciar células apoptóticas en el tejido cerebral. La utilización simultánea de las tres técnicas en cortes consecutivos de cerebro, nos permite asegurar que los resultados hallados corresponden fehacientemente a daño neuronal (Figura 41 y 42). Pudimos observar evidentes signos de degeneración y apoptosis neuronal a las 24 y 48h luego de la infección

en animales WT. Un hallazgo relevante fue la observación de hifas del hongo colocalizadas con focos argirófilos permitiendo establecer en un sitio particular del tejido al agente patógeno y al daño neuronal (Figura 43).

La inducción de apoptosis asociada a la infección por *C.albicans* ha sido reportada por nuestro grupo (224,317,318,373). La apoptosis de células parenquimales fue descrita a nivel hepático durante el curso de la infección diseminada por el hongo. Este estudio evidenció la muerte de los hepatocitos mediante un mecanismo inmune que involucra el reclutamiento de linfocitos efectores y favorece la supervivencia del hongo en un claro fenómeno de evasión inmune (224,373). También reportamos que factores de virulencia como las Lip de *C. albicans* tiene la capacidad de inducir apoptosis de macrófagos *in vitro* y que la magnitud del daño sobre esta población es dependiente de su estatus de activación (317,318). En estudios *in vitro* con fibroblastos gingivales humanos cultivados con *C. albicans*, el agregado de inhibidores de Lip y Sap redujo el daño celular (374).

Las características histopatológicas halladas son coherentes con el daño neuronal severo observado en los tiempos en que la carga fúngica fue elevada. Las respuestas inmunes mediadas por las células residentes activadas o por los neutrófilos reclutados, también podrían desencadenar procesos perjudiciales para las neuronas. Si bien los animales resuelven la infección, la exposición al hongo podría dejar secuelas permanentes, aunque el clearance sea relativamente rápido y efectivo. El estudio de los procesos neurodegenerativos o cambios comportamentales a largo plazo, sería necesario para confirmar tal premisa.

El daño a las redes neuronales en el SNC generalmente resulta en déficits funcionales permanentes. Numerosos son los estudios que demuestran las consecuencias de la infección en prematuros y lactantes de bajo peso. Los neonatos que sobreviven a la candidiasis invasiva, con frecuencia presentan severo deterioro neurológico y cognitivo (99,111). Nuestro trabajo aporta nueva y valiosa evidencia sobre los mecanismos de degeneración y muerte neuronal que subyacen a la invasión cerebral por *C.albicans* y los fenómenos locales intervinientes.

Debido a las severas manifestaciones neurológicas observadas en ratones deficientes en Dectin-1, decidimos evaluar si la ausencia del receptor tenía consecuencias más drásticas en los procesos neurodegenerativos. Observamos que, mientras que los astrocitos se encontraban activados a las 24 y 48h, la microglia se observó a las 48h pi (Figura 39). Al comparar el perfil de activación del componente glial con el obtenido en los animales WT, las células residentes mostraron un perfil general de activación inferior en ausencia de Dectin-1 a este tiempo de infección. Estos resultados podrían explicar el menor control del crecimiento fúngico por parte de las células residentes, que favorecen el crecimiento del hongo y la progresión de la infección. Coincidente con los síntomas clínicos observados en este modelo (Figura 25), el daño y muerte neuronal fueron notoriamente mayores en ausencia de la señal dependiente del reconocimiento de β -glucanos por el receptor Dectin-1 (Figura 45-51).

Estos resultados sugieren que la neurodegeneración observada en los animales deficientes en Dectin-1 es consecuencia, al menos en parte, del crecimiento descontrolado del hongo, probablemente por una menor activación glial, la que promueve una respuesta deficiente frente a *C. albicans*.

Es sabido que la ausencia de CARD9 puede llevar a un reclutamiento de neutrófilos tardío en SNC. Considerando que es una molécula involucrada en la cascada de señalización de Dectin-1, se podría sugerir una falla similar en nuestro modelo. Por otra parte, los neutrófilos deficientes en Dectin-1 presentan una capacidad disminuida para reconocer y fagocitar las partículas de β -glucanos en la pared de *C. albicans*. En este sentido, la severidad de la infección observada en este modelo, podría deberse a la presencia persistente y elevada del hongo en este nicho, donde los neutrófilos reclutados serían ineficientes en su clearance (53). Por otro lado, recientemente Branzk y col. (2017) demostraron que la fagocitosis mediada por Dectin-1 en neutrófilos limita la translocación nuclear de la elastasa, enzima involucrada en la NETosis (375). Aunque se ha demostrado que las NETs desempeñan un papel importante durante la infección, también pueden tener efectos perjudiciales en el tejido circundante. Urban y col. (2009) observaron que estas trampas extracelulares eran importantes en la defensa frente a *C. albicans* (376), pero cuando su producción o degradación no está controlada, tienen un potencial patógeno y participan en numerosas

enfermedades y la neurodegeneración (377). En este escenario, la ausencia del receptor Dectin-1 en nuestro modelo, podría contribuir a la falla en la modulación de la actividad de los neutrófilos.

Finalmente y en búsqueda de una mejor comprensión sobre los complejos mecanismos desencadenados durante la invasión cerebral por *C. albicans* evaluamos el balance M1 vs M2 en animales WT y en animales deficientes en el receptor Dectin-1. Al tiempo en el que los procesos de degeneración neuronal y apoptosis fueron más evidentes la identificación funcional de ambos perfiles se efectuó basados en la expresión de NOS2 y Arg-1. En el cerebro de ratones WT_{SC5314} observamos una alta frecuencia de microglía NOS2+ y numerosos focos positivos para Arg-1, a las 48h de la infección. La morfología y localización de Arg-1 sugiere que los monocitos/macrófagos infiltrantes podrían ser los responsables de esta respuesta. En los animales KO_{SC5314} la presencia de microglía NOS2+ se observó disminuida y la frecuencia de células infiltrantes asociadas al perfil M2 también fue menor (Figura 52).

Si bien en este estudio no se aborda la caracterización fenotípica del perfil M1 y M2, los resultados obtenidos evidencian la presencia de un microambiente altamente regulado durante la infección en los animales WT. El perfil de reactividad y la cinética de activación de las poblaciones gliales, la presencia de células efectoras con capacidad candidicida y el reclutamiento de células periféricas con características antiinflamatorias, convergen en el microambiente cerebral en respuesta a la invasión del hongo. En este contexto el crecimiento fúngico y la injuria neuronal asociadas a la infección ocurren en un microambiente regulado, minimizando la magnitud del daño. Por el contrario, cuando la infección cerebral se produce en ausencia de la señal de Dectin-1, la activación de las poblaciones residentes y el perfil de las células reclutas determina un control defectuoso de la respuesta local favoreciendo claramente el crecimiento fúngico en detrimento de su hospedador.

BIBLIOGRAFÍA

1. Drummond RA, Gaffen SL, Hise AG, Brown GD. Innate Defense against Fungal Pathogens. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2015 Jun 1;5(6):a019620–a019620. Available from: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a019620>
2. Brown GD, Denning DW, Levitz SM. Tackling Human Fungal Infections. *Science* (80-) [Internet]. 2012 May 11;336(6082):647–647. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1222236>
3. Bongomin F, Gago S, Oladele R, Denning D. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases—Estimate Precision. *J Fungi* [Internet]. 2017 Oct 18;3(4):57. Available from: <http://www.mdpi.com/2309-608X/3/4/57>
4. Perlrath J, Choi B, Spellberg B. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Med Mycol* [Internet]. 2007 Jan;45(4):321–46. Available from: <https://academic.oup.com/mmy/article-lookup/doi/10.1080/13693780701218689>
5. Brown GD, Denning DW, Gow NAR, Levitz SM, Netea MG, White TC. Hidden Killers: Human Fungal Infections. *Sci Transl Med* [Internet]. 2012 Dec 19;4(165):165rv13–165rv13. Available from: <http://stm.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/scitranslmed.3004404>
6. 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* [Internet]. 2016 Dec;34:111–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527416301230>
7. Hall RA. Dressed to impress: impact of environmental adaptation on the *Candida albicans* cell wall. *Mol Microbiol* [Internet]. 2015 Jul;97(1):7–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25846717>
8. Robinson RT, Huppler AR. The Goldilocks model of immune symbiosis with *Mycobacteria* and *Candida* colonizers. *Cytokine* [Internet]. 2017;97:49–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28570933>
9. Wisplinghoff H, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Inflammatory response and clinical course of adult patients with nosocomial bloodstream infections caused by *Candida* spp. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2006 Feb;12(2):170–7. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X14634029>
10. Jabra-Rizk MA, Kong EF, Tsui C, Nguyen MH, Clancy CJ, Fidel PL, et al. *Candida albicans* Pathogenesis: Fitting within the Host-Microbe Damage Response Framework. Maurelli AT, editor. *Infect Immun* [Internet]. 2016 Oct;84(10):2724–39. Available from: <http://iai.asm.org/lookup/doi/10.1128/IAI.00469-16>
11. Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2011 Apr 11 [cited 2019 Feb 10];11(4):275–88. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21394104>
12. Mendes Giannini MJS, Bernardi T, Scorzoni L, Fusco-Almeida AM, Sardi JCO. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol* [Internet]. 2013 Jan 1;62(1):10–24. Available from: <http://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.045054-0>
13. Tamura NK, Negri MFN, Bonassoli LA, Svidzinski TIE. [Virulence factors for *Candida* spp recovered from intravascular catheters and hospital workers hands]. *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. 40(1):91–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17486265>
14. Miro MS, Vigezzi C, Rodriguez E, Icely PA, Caeiro JP, Riera F, et al. [Innate receptors and IL-17 in the immune response against human pathogenic fungi]. *Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba* [Internet]. 2016;73(3):188–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27805556>
15. Sotomayor CE, Miró MS MD. Respuesta Inmune a Infecciones fúngicas. In: S.R.L A, editor. *Microbiología Biomédica*. 2017. p. 101–11.
16. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence* [Internet]. 2013 Feb 15;4(2):119–28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23302789>
17. Hernández-Chávez MJ, Pérez-García LA, Niño-Vega GA, Mora-Montes HM. Fungal

- Strategies to Evade the Host Immune Recognition. *J fungi* (Basel, Switzerland) [Internet]. 2017 Sep 23;3(4). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29371567>
18. Berman J, Sudbery PE. *Candida Albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2002 Dec;3(12):918–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12459722>
 19. Garcia MC, Lee JT, Ramsook CB, Alsteens D, Dufrêne YF, Lipke PN. A role for amyloid in cell aggregation and biofilm formation. *PLoS One* [Internet]. 2011 Mar 8;6(3):e17632. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21408122>
 20. Verstrepen KJ, Klis FM. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Mol Microbiol* [Internet]. 2006 Apr;60(1):5–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16556216>
 21. Fanning S, Mitchell AP. Fungal biofilms. *PLoS Pathog* [Internet]. 2012;8(4):e1002585. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22496639>
 22. Brand A, Shanks S, Duncan VMS, Yang M, Mackenzie K, Gow NAR. Hyphal orientation of *Candida albicans* is regulated by a calcium-dependent mechanism. *Curr Biol* [Internet]. 2007 Feb 20;17(4):347–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17275302>
 23. Wächtler B, Citiulo F, Jablonowski N, Förster S, Dalle F, Schaller M, et al. *Candida albicans*-epithelial interactions: dissecting the roles of active penetration, induced endocytosis and host factors on the infection process. *PLoS One* [Internet]. 2012;7(5):e36952. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22606314>
 24. Davis DA. How human pathogenic fungi sense and adapt to pH: the link to virulence. *Curr Opin Microbiol* [Internet]. 2009 Aug;12(4):365–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19632143>
 25. Brock M. Fungal metabolism in host niches. *Curr Opin Microbiol* [Internet]. 2009 Aug;12(4):371–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19535285>
 26. Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* [Internet]. 2003 Sep;67(3):400–28, table of contents. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12966142>
 27. Haynes K, Quinn J, Brown AJP, Gow NAR. Stress Responses in *Candida*. In: *Candida and Candidiasis, Second Edition* [Internet]. American Society of Microbiology; 2012 [cited 2018 Oct 21]. p. 225–42. Available from: <http://www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555817176.ch15>
 28. Kumamoto CA. Niche-specific gene expression during *C. albicans* infection. *Curr Opin Microbiol* [Internet]. 2008 Aug;11(4):325–30. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527408000659>
 29. Noble SM, Gianetti BA, Witchley JN. *Candida albicans* cell-type switching and functional plasticity in the mammalian host. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2017 Feb 21;15(2):96–108. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrmicro.2016.157>
 30. Gow NAR, Latge J-P, Munro CA. The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. In: *The Fungal Kingdom* [Internet]. American Society of Microbiology; 2017 [cited 2018 Nov 4]. p. 267–92. Available from: <http://www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555819583.chap12>
 31. Poulain D. *Candida albicans*, plasticity and pathogenesis. *Crit Rev Microbiol* [Internet]. 2015 Apr 3;41(2):208–17. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/1040841X.2013.813904>
 32. Chaffin WL. *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* [Internet]. 2008 Sep [cited 2018 Oct 29];72(3):495–544. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18772287>
 33. Gow NA, Hube B. Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. *Curr Opin Microbiol* [Internet]. 2012 Aug;15(4):406–12. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527412000483>
 34. Grubb SEW, Murdoch C, Sudbery PE, Saville SP, Lopez-Ribot JL, Thornhill MH. *Candida albicans*-endothelial cell interactions: a key step in the pathogenesis of systemic candidiasis. *Infect Immun* [Internet]. 2008 Oct;76(10):4370–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18573891>
 35. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2007 Jan;81(1):1–5. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1189/jlb.0306164>
 36. Gow NAR, van de Veerdonk FL, Brown AJP, Netea MG. *Candida albicans*

- morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2011 Dec 12;10(2):112–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22158429>
37. Jouault T, Sarazin A, Martinez-Esparza M, Fradin C, Sendid B, Poulain D. Host responses to a versatile commensal: PAMPs and PRRs interplay leading to tolerance or infection by *Candida albicans*. *Cell Microbiol* [Internet]. 2009 Jul;11(7):1007–15. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1462-5822.2009.01318.x>
 38. van de Veerdonk FL, Kullberg BJ, van der Meer JW, Gow NA, Netea MG. Host–microbe interactions: innate pattern recognition of fungal pathogens. *Curr Opin Microbiol* [Internet]. 2008 Aug;11(4):305–12. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S136952740800074X>
 39. Garcia-Effron G, Park S, Perlin DS. Correlating Echinocandin MIC and Kinetic Inhibition of fks1 Mutant Glucan Synthases for *Candida albicans*: Implications for Interpretive Breakpoints. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2009 Jan 1;53(1):112–22. Available from: <http://aac.asm.org/cgi/doi/10.1128/AAC.01162-08>
 40. Perlin DS. Mechanisms of echinocandin antifungal drug resistance. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2015 Sep;1354:1–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26190298>
 41. Ben-Ami R, Garcia-Effron G, Lewis RE, Gamarra S, Leventakos K, Perlin DS, et al. Fitness and Virulence Costs of *Candida albicans* FKS1 Hot Spot Mutations Associated With Echinocandin Resistance. *J Infect Dis* [Internet]. 2011 Aug 15;204(4):626–35. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1093/infdis/jir351>
 42. Brown GD, Gordon S. Immune recognition of fungal β -glucans. *Cell Microbiol* [Internet]. 2005 Mar 9;7(4):471–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1462-5822.2005.00505.x>
 43. Goyal S, Castrillón-Betancur JC, Klaile E, Slevogt H. The Interaction of Human Pathogenic Fungi With C-Type Lectin Receptors. *Front Immunol* [Internet]. 2018;9:1261. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29915598>
 44. Garfoot AL, Shen Q, Wüthrich M, Klein BS, Rappleye CA. The Eng1 β -Glucanase Enhances *Histoplasma* Virulence by Reducing β -Glucan Exposure. *MBio* [Internet]. 2016 May 4;7(2). Available from: <http://mbio.asm.org/lookup/doi/10.1128/mBio.01388-15>
 45. Brown GD, Gordon S. Immune recognition: A new receptor for β -glucans. *Nature* [Internet]. 2001 Sep 6;413(6851):36–7. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/35092620>
 46. Goodridge HS, Reyes CN, Becker CA, Katsumoto TR, Ma J, Wolf AJ, et al. Activation of the innate immune receptor Dectin-1 upon formation of a 'phagocytic synapse.' *Nature* [Internet]. 2011 Apr 28;472(7344):471–5. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature10071>
 47. Willment J, Marshall AJ, Reid D, Williams D, Wong S, Gordon S, et al. The human β -glucan receptor is widely expressed and functionally equivalent to murine Dectin-1 on primary cells. *Eur J Immunol* [Internet]. 2005 May;35(5):1539–47. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/eji.200425725>
 48. Brown GD, Taylor PR, Reid DM, Willment JA, Williams DL, Martinez-Pomares L, et al. Dectin-1 Is A Major β -Glucan Receptor On Macrophages. *J Exp Med* [Internet]. 2002 Aug 5;196(3):407–12. Available from: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20020470>
 49. Gantner BN, Simmons RM, Canavera SJ, Akira S, Underhill DM. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med* [Internet]. 2003 May 5;197(9):1107–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12719479>
 50. Rogers NC, Slack EC, Edwards AD, Nolte MA, Schulz O, Schweighoffer E, et al. Syk-Dependent Cytokine Induction by Dectin-1 Reveals a Novel Pattern Recognition Pathway for C Type Lectins. *Immunity* [Internet]. 2005 Apr;22(4):507–17. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761305000956>
 51. Shah VB, Williams DL, Keshvara L. beta-Glucan attenuates TLR2- and TLR4-mediated cytokine production by microglia. *Neurosci Lett* [Internet]. 2009 Jul 24;458(3):111–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19393720>
 52. Shah VB, Huang Y, Keshvara R, Ozment-Skelton T, Williams DL, Keshvara L. β -Glucan Activates Microglia without Inducing Cytokine Production in Dectin-1-Dependent Manner. *J Immunol* [Internet]. 2008 Mar 1;180(5):2777–85. Available from: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.180.5.2777>

53. Drummond RA, Swamydas M, Oikonomou V, Zhai B, Dambuza IM, Schaefer BC, et al. CARD9+ microglia promote antifungal immunity via IL-1 β - and CXCL1-mediated neutrophil recruitment. *Nat Immunol* [Internet]. 2019 May 17;20(5):559–70. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41590-019-0377-2>
54. Chin V, Lee T, Rusliza B, Chong P. Dissecting *Candida albicans* Infection from the Perspective of *C. albicans* Virulence and Omics Approaches on Host–Pathogen Interaction: A Review. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2016 Oct 18;17(10):1643. Available from: <http://www.mdpi.com/1422-0067/17/10/1643>
55. Mora-Montes HM, Gacser A. Editorial: Recent Advances in the Study of the Host-Fungus Interaction. *Front Microbiol* [Internet]. 2016 Oct 26;7. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.01694/full>
56. Torres-Narbona M, Guinea J, Muñoz P, Bouza E. [Zygomycetes and zygomycosis in the new era of antifungal therapies]. *Rev Esp Quimioter* [Internet]. 2007 Dec;20(4):375–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18563211>
57. Cleveland AA, Farley MM, Harrison LH, Stein B, Hollick R, Lockhart SR, et al. Changes in incidence and antifungal drug resistance in candidemia: results from population-based laboratory surveillance in Atlanta and Baltimore, 2008-2011. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2012 Nov 15;55(10):1352–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22893576>
58. Arendrup MC. *Candida* and candidaemia. Susceptibility and epidemiology. *Dan Med J* [Internet]. 2013 Nov;60(11):B4698. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24192246>
59. Pfaller MA. Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs, and modes of transmission. *Clin Infect Dis* [Internet]. 1996 May;22 Suppl 2:S89-94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8722834>
60. Pappas PG, Lionakis MS, Arendrup MC, Ostrosky-Zeichner L, Kullberg BJ. Invasive candidiasis. *Nat Rev Dis Prim* [Internet]. 2018 May 11;4:18026. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrdp201826>
61. Orasch C, Mertz D, Garbino J, van Delden C, Emonet S, Schrenzel J, et al. Fluconazole non-susceptible breakthrough candidemia after prolonged low-dose prophylaxis: a prospective FUNGINOS study. *J Infect* [Internet]. 2018 May;76(5):489–95. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016344531830029X>
62. Guinea J. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2014 Jun;20:5–10. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X14603268>
63. Cecilia Vigezzi, Paula Alejandra Icely, Catiana Dudiuk, Emilse Rodríguez, María Soledad Miró, Graciela del Valle Castillo, Ana Isabel Azcurra, Claudio Abiega, Juan Pablo Caeiro, Fernando Oscar Riera, Guillermo García-Effrón CES. Frequency, virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis* species complex isolated from patients with candidemia in the central region of Argentina. *Enviado*. 2019;
64. Trofa D, Gácser A, Nosanchuk JD. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2008 Oct;21(4):606–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18854483>
65. Pfaller MA, Andes DR, Diekema DJ, Horn DL, Reboli AC, Rotstein C, et al. Epidemiology and outcomes of invasive candidiasis due to non-*albicans* species of *Candida* in 2,496 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH) registry 2004-2008. *PLoS One* [Internet]. 2014;9(7):e101510. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24991967>
66. da Matta DA, Souza ACR, Colombo AL. Revisiting Species Distribution and Antifungal Susceptibility of *Candida* Bloodstream Isolates from Latin American Medical Centers. *J fungi (Basel, Switzerland)* [Internet]. 2017 May 17;3(2). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29371542>
67. Sifuentes-Osornio J, Corzo-León DE, Ponce-de-León LA. Epidemiology of Invasive Fungal Infections in Latin America. *Curr Fungal Infect Rep* [Internet]. 2012 Mar;6(1):23–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22363832>
68. Nucci M, Queiroz-Telles F, Alvarado-Matute T, Tiraboschi IN, Cortes J, Zurita J, et al. Epidemiology of Candidemia in Latin America: A Laboratory-Based Survey. Andes DR, editor. *PLoS One* [Internet]. 2013 Mar 19 [cited 2018 Dec 19];8(3):e59373. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0059373>
69. Lockhart SR, Messer SA, Pfaller MA, Diekema DJ. Geographic distribution and antifungal susceptibility of the newly described species *Candida orthopsilosis* and

- Candida metapsilosis in comparison to the closely related species Candida parapsilosis. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2008 Aug;46(8):2659–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18562582>
70. Riera FO, Caeiro JP, Denning DW. Burden of Serious Fungal Infections in Argentina. *J fungi* (Basel, Switzerland) [Internet]. 2018 Apr 24;4(2). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29695056>
 71. Morrell M, Fraser VJ, Kollef MH. Delaying the Empiric Treatment of Candida Bloodstream Infection until Positive Blood Culture Results Are Obtained: a Potential Risk Factor for Hospital Mortality. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2005 Sep 1;49(9):3640–5. Available from: <http://aac.asm.org/cgi/doi/10.1128/AAC.49.9.3640-3645.2005>
 72. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2007 Jan 1;20(1):133–63. Available from: <http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.00029-06>
 73. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, et al. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2015 Dec 16;cid933. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1093/cid/civ933>
 74. Nucci M, Thompson-Moya L, Guzman-Blanco M, Tiraboschi IN, Cortes JA, Echevarría J, et al. Recommendations for the management of candidemia in adults in Latin America. *Rev Iberoam Micol* [Internet]. 2013 Jul;30(3):179–88. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S113014061300051X>
 75. Mora-Duarte J, Betts R, Rotstein C, Colombo AL, Thompson-Moya L, Smietana J, et al. Comparison of Caspofungin and Amphotericin B for Invasive Candidiasis. *N Engl J Med* [Internet]. 2002 Dec 19;347(25):2020–9. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa021585>
 76. Reboli AC, Rotstein C, Pappas PG, Chapman SW, Kett DH, Kumar D, et al. Anidulafungin versus Fluconazole for Invasive Candidiasis. *N Engl J Med* [Internet]. 2007 Jun 14;356(24):2472–82. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa066906>
 77. McCarty TP, Pappas PG. Invasive Candidiasis. *Infect Dis Clin North Am* [Internet]. 2016 Mar;30(1):103–24. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891552015001142>
 78. Lionakis MS, Netea MG, Holland SM. Mendelian genetics of human susceptibility to fungal infection. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2014 Jun 2 [cited 2019 Mar 5];4(6). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24890837>
 79. Drummond RA, Lionakis MS. Candidiasis of the Central Nervous System in Neonates and Children With Primary Immunodeficiencies. *Curr Fungal Infect Rep* [Internet]. 2018 Jun 8 [cited 2018 Nov 7];12(2):92–7. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12281-018-0316-y>
 80. Drummond RA, Franco LM, Lionakis MS. Human CARD9: A Critical Molecule of Fungal Immune Surveillance. *Front Immunol* [Internet]. 2018;9:1836. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30127791>
 81. Ferwerda B, Ferwerda G, Plantinga TS, Willment JA, van Spriël AB, Venselaar H, et al. Human dectin-1 deficiency and mucocutaneous fungal infections. *N Engl J Med* [Internet]. 2009 Oct 29;361(18):1760–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19864674>
 82. Wenzel RP. Nosocomial Candidemia: Risk Factors and Attributable Mortality. *Clin Infect Dis* [Internet]. 1995 Jun 1;20(6):1531–4. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1093/clinids/20.6.1531>
 83. Panackal AA, Williamson PR. Fungal Infections of the Central Nervous System. *Continuum (Minneapolis)* [Internet]. 2015 Dec;21(6 Neuroinfectious Disease):1662–78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26633781>
 84. Lewis RE, Cahyame-Zuniga L, Leventakos K, Chamilos G, Ben-Ami R, Tamboli P, et al. Epidemiology and sites of involvement of invasive fungal infections in patients with haematological malignancies: a 20-year autopsy study. *Mycoses* [Internet]. 2013 Nov;56(6):638–45. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/myc.12081>
 85. Desai J V., Lionakis MS. The Role of Neutrophils in Host Defense Against Invasive Fungal Infections. *Curr Clin Microbiol Reports* [Internet]. 2018 Sep 22 [cited 2019 Mar 6];5(3):181–9. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s40588-018-0098-6>
 86. Ingham CJ, Boonstra S, Levels S, de Lange M, Meis JF, Schneeberger PM. Rapid

- Susceptibility Testing and Microcolony Analysis of *Candida* spp. Cultured and Imaged on Porous Aluminum Oxide. Chauhan N, editor. PLoS One [Internet]. 2012 Mar 16;7(3):e33818. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0033818>
87. Fridkin SK, Jarvis WR. Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 1996 Oct 1 [cited 2018 Nov 5];9(4):499–511. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8894349>
 88. Netea MG, Joosten LAB, van der Meer JWM, Kullberg B-J, van de Veerdonk FL. Immune defence against *Candida* fungal infections. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2015 Oct 21 [cited 2019 Mar 2];15(10):630–42. Available from: <http://www.nature.com/articles/nri3897>
 89. Waggoner-Fountain LA, Walker MW, Hollis RJ, Pfaller MA, Ferguson JE, Wenzel RP, et al. Vertical and horizontal transmission of unique *Candida* species to premature newborns. *Clin Infect Dis* [Internet]. 1996 May;22(5):803–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8722935>
 90. Benjamin DK, Garges H, Steinbach WJ. *Candida* bloodstream infection in neonates. *Semin Perinatol* [Internet]. 2003 Oct;27(5):375–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14626501>
 91. Saiman L, Ludington E, Pfaller M, Rangel-Frausto S, Wiblin RT, Dawson J, et al. Risk factors for candidemia in Neonatal Intensive Care Unit patients. The National Epidemiology of Mycosis Survey study group. *Pediatr Infect Dis J* [Internet]. 2000 Apr;19(4):319–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10783022>
 92. Uzun O, Ascioğlu S, Anaissie EJ, Rex JH. Risk Factors and Predictors of Outcome in Patients with Cancer and Breakthrough Candidemia. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2001 Jun 15;32(12):1713–7. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/320757>
 93. Gavito-Higuera J, Mullins CB, Ramos-Duran L, Olivas Chacon CI, Hakim N, Palacios E. Fungal Infections of the Central Nervous System: A Pictorial Review. *J Clin Imaging Sci* [Internet]. 2016 [cited 2018 Nov 7];6(1):24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27403402>
 94. Drummond RA, Collar AL, Swamydas M, Rodriguez CA, Lim JK, Mendez LM, et al. CARD9-Dependent Neutrophil Recruitment Protects against Fungal Invasion of the Central Nervous System. May RC, editor. *PLOS Pathog* [Internet]. 2015 Dec 17;11(12):e1005293. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1005293>
 95. Gavino C, Cotter A, Lichtenstein D, Lejtenyi D, Fortin C, Legault C, et al. CARD9 Deficiency and Spontaneous Central Nervous System Candidiasis: Complete Clinical Remission With GM-CSF Therapy. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2014 Jul 1;59(1):81–4. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1093/cid/ciu215>
 96. Sánchez-Portocarrero J, Pérez-Cecilia E, Corral O, Romero-Vivas J, Picazo JJ. The central nervous system and infection by *Candida* species. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2000 Jul 1 [cited 2019 Mar 1];37(3):169–79. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0732889300001401?via%3Dihub>
 97. Navarathna DH, Roberts DD, Munasinghe J, Lizak MJ. Imaging *Candida* Infections in the Host. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2016 [cited 2019 Mar 1];1356:69–78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26519066>
 98. Parker JC, McCloskey JJ, Knauer KA. Pathobiologic Features of Human Candidiasis: A Common Deep Mycosis of the Brain, Heart and Kidney in the Altered Host. *Am J Clin Pathol* [Internet]. 1976 Jun 1;65(6):991–1000. Available from: <https://academic.oup.com/ajcp/article-lookup/doi/10.1093/ajcp/65.6.991>
 99. Chapman RL, Faix RG. Persistently positive cultures and outcome in invasive neonatal candidiasis. *Pediatr Infect Dis J* [Internet]. 2000 Sep;19(9):822–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11001103>
 100. Parker JC, McCloskey JJ, Lee RS. Human cerebral candidosis — A postmortem evaluation of 19 patients. *Hum Pathol* [Internet]. 1981 Jan;12(1):23–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0046817781802389>
 101. Gholami-Shabani M, Zamani S, Moosa H, Shams-Ghahfarokhi M, Jamzivar F, Razzaghi-Abyaneh M. Recent Advances in Fungal Infections of the Central Nervous System: From Etiology to Diagnosis and Management. *Microbiol Cent Nerv Syst Infect* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2019 Mar 7];215–59. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128138069000123>
 102. Kelly MS, Benjamin DK, Smith PB. The Epidemiology and Diagnosis of Invasive Candidiasis Among Premature Infants. *Clin Perinatol* [Internet]. 2015 Mar;42(1):105–17.

- Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0095510814001171>
103. Pappas PG, Rex JH, Lee J, Hamill RJ, Larsen RA, Powderly W, et al. A Prospective Observational Study of Candidemia: Epidemiology, Therapy, and Influences on Mortality in Hospitalized Adult and Pediatric Patients. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2003 Sep 1;37(5):634–43. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/376906>
 104. Tragiannidis A, Fegeler W, Rellensmann G, Debus V, Müller V, Hoernig-Franz I, et al. Candidaemia in a European Paediatric University Hospital: a 10-year observational study. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2012 Feb;18(2):E27–30. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X14613525>
 105. Vasileiou E, Apsemidou A, Vyzantiadis T-A, Tragiannidis A. Invasive candidiasis and candidemia in pediatric and neonatal patients: A review of current guidelines. *Curr Med Mycol* [Internet]. 2018 Nov 25; Available from: <http://publish.kne-publishing.com/index.php/CMM/article/view/173>
 106. O'Brien D, Stevens NT, Lim CH, O'Brien DF, Smyth E, Fitzpatrick F, et al. Candida infection of the central nervous system following neurosurgery: a 12-year review. *Acta Neurochir (Wien)* [Internet]. 2011 Jun 23 [cited 2019 Mar 31];153(6):1347–50. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00701-011-0990-9>
 107. Pendlebury WW, Perl DP, Munoz DG. Multiple microabscesses in the central nervous system: a clinicopathologic study. *J Neuropathol Exp Neurol* [Internet]. 1989 May [cited 2019 Mar 1];48(3):290–300. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2649643>
 108. Parker JC, McCloskey JJ, Lee RS. The emergence of candidosis. The dominant postmortem cerebral mycosis. *Am J Clin Pathol* [Internet]. 1978 Jul [cited 2019 Mar 31];70(1):31–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/567939>
 109. Walsh T, Katragkou A, Chen T, Salvatore C, Roilides E. Invasive Candidiasis in Infants and Children: Recent Advances in Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *J Fungi* [Internet]. 2019 Jan 24;5(1):11. Available from: <http://www.mdpi.com/2309-608X/5/1/11>
 110. Black JT. Cerebral candidiasis: case report of brain abscess secondary to *Candida albicans*, and review of literature. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* [Internet]. 1970 Dec;33(6):864–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5531906>
 111. Benjamin DK, Poole C, Steinbach WJ, Rowen JL, Walsh TJ. Neonatal candidemia and end-organ damage: a critical appraisal of the literature using meta-analytic techniques. *Pediatrics* [Internet]. 2003 Sep;112(3 Pt 1):634–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12949295>
 112. Fu J, Ding Y, Jiang Y, Mo S, Xu S, Qin P. Persistent candidemia in very low birth weight neonates: risk factors and clinical significance. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2018 Dec 12;18(1):558. Available from: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-018-3487-9>
 113. Benjamin DK, Stoll BJ, Gantz MG, Walsh MC, Sanchez PJ, Das A, et al. Neonatal Candidiasis: Epidemiology, Risk Factors, and Clinical Judgment. *Pediatrics* [Internet]. 2010 Oct 1;126(4):e865–73. Available from: <http://pediatrics.aappublications.org/cgi/doi/10.1542/peds.2009-3412>
 114. Kaufman D. Fungal infection in the very low birthweight infant. *Curr Opin Infect Dis* [Internet]. 2004 Jun;17(3):253–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15166830>
 115. Adams-Chapman I, Bann CM, Das A, Goldberg RN, Stoll BJ, Walsh MC, et al. Neurodevelopmental Outcome of Extremely Low Birth Weight Infants with Candida Infection. *J Pediatr* [Internet]. 2013 Oct;163(4):961-967.e3. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002234761300499X>
 116. Liebner S, Dijkhuizen RM, Reiss Y, Plate KH, Agalliu D, Constantin G. Functional morphology of the blood–brain barrier in health and disease. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2018 Mar 6;135(3):311–36. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00401-018-1815-1>
 117. Abbott NJ, Patabendige AAK, Dolman DEM, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood–brain barrier. *Neurobiol Dis* [Internet]. 2010 Jan;37(1):13–25. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969996109002083>
 118. Zhou Y, Peng Z, Seven ES, Leblanc RM. Crossing the blood-brain barrier with nanoparticles. *J Control Release* [Internet]. 2018 Jan;270:290–303. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365917310829>
 119. Navarathna DHMLP, Munasinghe J, Lizak MJ, Nayak D, McGavern DB, Roberts DD.

- MRI confirms loss of blood-brain barrier integrity in a mouse model of disseminated candidiasis. *NMR Biomed* [Internet]. 2013 Sep;26(9):1125–34. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/nbm.2926>
120. Shi M, Mody CH. Fungal Infection in the Brain: What We Learned from Intravital Imaging. *Front Immunol* [Internet]. 2016 Aug 2;7. Available from: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fimmu.2016.00292/abstract>
 121. Jong AY, Stins MF, Huang SH, Chen SH, Kim KS. Traversal of *Candida albicans* across human blood-brain barrier in vitro. *Infect Immun* [Internet]. 2001 Jul;69(7):4536–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11401997>
 122. Liu Y, Mittal R, Solis N V., Prasadarao N V., Filler SG. Mechanisms of *Candida albicans* Trafficking to the Brain. Cowen LE, editor. *PLoS Pathog* [Internet]. 2011 Oct 6 [cited 2018 Nov 15];7(10):e1002305. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1002305>
 123. McDonald DR, Levy O. Innate Immunity. *Clin Immunol* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2018 Nov 8];39-53.e1. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978070206896600003X>
 124. Thaiss CA, Zmora N, Levy M, Elinav E. The microbiome and innate immunity. *Nature* [Internet]. 2016 Jul 7 [cited 2018 Nov 8];535(7610):65–74. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature18847>
 125. Lionakis MS, Lim JK, Lee C-CR, Murphy PM. Organ-Specific Innate Immune Responses in a Mouse Model of Invasive Candidiasis. *J Innate Immun* [Internet]. 2011;3(2):180–99. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/321157>
 126. Urban CF, Nett JE. Neutrophil extracellular traps in fungal infection. *Semin Cell Dev Biol* [Internet]. 2018 Apr; Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1084952117301751>
 127. Lionakis MS, Netea MG. *Candida* and Host Determinants of Susceptibility to Invasive Candidiasis. Heitman J, editor. *PLoS Pathog* [Internet]. 2013 Jan 3;9(1):e1003079. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1003079>
 128. García-Carnero LC, Pérez-García LA, Martínez-Álvarez JA, Reyes-Martínez JE, Mora-Montes H. Current trends to control fungal pathogens: exploiting our knowledge in the host–pathogen interaction. *Infect Drug Resist* [Internet]. 2018 Jul 3 [cited 2018 Nov 8];Volume 11:903–13. Available from: <https://www.dovepress.com/current-trends-to-control-fungal-pathogens-exploiting-our-knowledge-in-peer-reviewed-article-IDR>
 129. Roh JS, Sohn DH. Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases. *Immune Netw* [Internet]. 2018 Aug;18(4):e27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30181915>
 130. Zheng N-X, Wang Y, Hu D-D, Yan L, Jiang Y-Y. The role of pattern recognition receptors in the innate recognition of *Candida albicans*. *Virulence* [Internet]. 2015;6(4):347–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25714264>
 131. Kumar H, Kumagai Y, Tsuchida T, Koenig PA, Satoh T, Guo Z, et al. Involvement of the NLRP3 inflammasome in innate and humoral adaptive immune responses to fungal beta-glucan. *J Immunol* [Internet]. 2009 Dec 15;183(12):8061–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20007575>
 132. Drummond RA, Gaffen SL, Hise AG, Brown GD. Innate Defense against Fungal Pathogens. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2014 Nov 10;5(6). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25384766>
 133. Broz P, Dixit VM. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2016;16(7):407–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27291964>
 134. Netea MG, Gow NAR, Munro CA, Bates S, Collins C, Ferwerda G, et al. Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *J Clin Invest* [Internet]. 2006 Jun;116(6):1642–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16710478>
 135. van de Veerdonk FL, Joosten LAB, Netea MG. The interplay between inflammasome activation and antifungal host defense. *Immunol Rev* [Internet]. 2015 May;265(1):172–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25879292>
 136. Qin Y, Zhang L, Xu Z, Zhang J, Jiang Y-Y, Cao Y, et al. Innate immune cell response upon *Candida albicans* infection. *Virulence* [Internet]. 2016;7(5):512–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27078171>
 137. Gustin A, Kirchmeyer M, Koncina E, Felten P, Losciuto S, Heurtaux T, et al. NLRP3 Inflammasome Is Expressed and Functional in Mouse Brain Microglia but Not in

- Astrocytes. Kufer TA, editor. PLoS One [Internet]. 2015 Jun 19 [cited 2019 Apr 1];10(6):e0130624. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0130624>
138. van der Graaf CAA, Netea MG, Franke B, Girardin SE, van der Meer JWM, Kullberg BJ. Nucleotide oligomerization domain 2 (Nod2) is not involved in the pattern recognition of *Candida albicans*. *Clin Vaccine Immunol* [Internet]. 2006 Mar;13(3):423–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16522788>
 139. Pietrella D, Pandey N, Gabrielli E, Pericolini E, Perito S, Kasper L, et al. Secreted aspartic proteases of *Candida albicans* activate the NLRP3 inflammasome. *Eur J Immunol* [Internet]. 2013 Mar;43(3):679–92. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/eji.201242691>
 140. Roselletti E, Perito S, Gabrielli E, Mencacci A, Pericolini E, Sabbatini S, et al. NLRP3 inflammasome is a key player in human vulvovaginal disease caused by *Candida albicans*. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Dec 19;7(1):17877. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-17649-8>
 141. Joly S, Eisenbarth SC, Olivier AK, Williams A, Kaplan DH, Cassel SL, et al. Cutting edge: Nlrp10 is essential for protective antifungal adaptive immunity against *Candida albicans*. *J Immunol* [Internet]. 2012 Nov 15;189(10):4713–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23071280>
 142. Tomalka J, Ganesan S, Azodi E, Patel K, Majmudar P, Hall BA, et al. A novel role for the NLRC4 inflammasome in mucosal defenses against the fungal pathogen *Candida albicans*. *PLoS Pathog* [Internet]. 2011 Dec;7(12):e1002379. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22174673>
 143. Drummond RA, Saijo S, Iwakura Y, Brown GD. The role of Syk/CARD9 coupled C-type lectins in antifungal immunity. *Eur J Immunol* [Internet]. 2011 Feb;41(2):276–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21267996>
 144. Brown GD, Willment JA, Whitehead L. C-type lectins in immunity and homeostasis. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2018 Jun 26 [cited 2019 Mar 12];18(6):374–89. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41577-018-0004-8>
 145. Hardison SE, Brown GD. C-type lectin receptors orchestrate antifungal immunity. *Nat Immunol* [Internet]. 2012 Sep;13(9):817–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22910394>
 146. Patin EC, Thompson A, Orr SJ. Pattern recognition receptors in fungal immunity. *Semin Cell Dev Biol* [Internet]. 2018 Mar; Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1084952117305414>
 147. Brown GD, Crocker PR. Lectin Receptors Expressed on Myeloid Cells. *Microbiol Spectr* [Internet]. 2016;4(5). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27780012>
 148. 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* [Internet]. 2008 Jan;6(1):67–78. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrmicro1815>
 149. Zhu L-L, Zhao X-Q, Jiang C, You Y, Chen X-P, Jiang Y-Y, et al. C-Type Lectin Receptors Dectin-3 and Dectin-2 Form a Heterodimeric Pattern-Recognition Receptor for Host Defense against Fungal Infection. *Immunity* [Internet]. 2013 Aug;39(2):324–34. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761313002987>
 150. Dennehy KM, Brown GD. The role of the β -glucan receptor Dectin-1 in control of fungal infection. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2007 Aug;82(2):253–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1189/jlb.1206753>
 151. Plato A, Willment JA, Brown GD. C-Type Lectin-Like Receptors of the Dectin-1 Cluster: Ligands and Signaling Pathways. *Int Rev Immunol* [Internet]. 2013 Apr 16;32(2):134–56. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/08830185.2013.777065>
 152. LeibundGut-Landmann S, Osorio F, Brown GD, Reis e Sousa C. Stimulation of dendritic cells via the dectin-1/Syk pathway allows priming of cytotoxic T-cell responses. *Blood* [Internet]. 2008 Dec 15;112(13):4971–80. Available from: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2008-05-158469>
 153. Ni L, Gayet I, Zurawski S, Duluc D, Flamar A-L, Li X-H, et al. Concomitant Activation and Antigen Uptake via Human Dectin-1 Results in Potent Antigen-Specific CD8+ T Cell Responses. *J Immunol* [Internet]. 2010 Sep 15;185(6):3504–13. Available from: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1000999>
 154. LeibundGut-Landmann S, Groß O, Robinson MJ, Osorio F, Slack EC, Tsoni SV, et al. Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nat Immunol* [Internet]. 2007 Jun 22;8(6):630–8. Available from: <http://www.nature.com/articles/ni1460>

155. Taylor PR, Tsoni SV, Willment JA, Dennehy KM, Rosas M, Findon H, et al. Dectin-1 is required for beta-glucan recognition and control of fungal infection. *Nat Immunol* [Internet]. 2007 Jan;8(1):31–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17159984>
156. Werner JL, Metz AE, Horn D, Schoeb TR, Hewitt MM, Schwiebert LM, et al. Requisite Role for the Dectin-1 -Glucan Receptor in Pulmonary Defense against *Aspergillus fumigatus*. *J Immunol* [Internet]. 2009 Apr 15;182(8):4938–46. Available from: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.0804250>
157. Chen SM, Shen H, Zhang T, Huang X, Liu XQ, Guo SY, et al. Dectin-1 plays an important role in host defense against systemic *Candida glabrata* infection. *Virulence* [Internet]. 2017 Nov 17;8(8):1643–56. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21505594.2017.1346756>
158. Reid DM, Gow NA, Brown GD. Pattern recognition: recent insights from Dectin-1. *Curr Opin Immunol* [Internet]. 2009 Feb;21(1):30–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0952791509000090>
159. Gow NAR, Netea MG, Munro CA, Ferwerda G, Bates S, Mora-Montes HM, et al. Immune recognition of *Candida albicans* beta-glucan by dectin-1. *J Infect Dis* [Internet]. 2007 Nov 15;196(10):1565–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18008237>
160. Da Silva CA, Chalouni C, Williams A, Hartl D, Lee CG, Elias JA. Chitin is a size-dependent regulator of macrophage TNF and IL-10 production. *J Immunol* [Internet]. 2009 Mar 15;182(6):3573–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19265136>
161. Smeekens SP, Gresnigt MS, Becker KL, Cheng S-C, Netea SA, Jacobs L, et al. An anti-inflammatory property of *Candida albicans* β -glucan: Induction of high levels of interleukin-1 receptor antagonist via a Dectin-1/CR3 independent mechanism. *Cytokine* [Internet]. 2015 Feb;71(2):215–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25461401>
162. Glocker E-O, Hennigs A, Nabavi M, Schäffer AA, Woellner C, Salzer U, et al. A homozygous CARD9 mutation in a family with susceptibility to fungal infections. *N Engl J Med* [Internet]. 2009 Oct 29;361(18):1727–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19864672>
163. Carson MJ, Doose JM, Melchior B, Schmid CD, Ploix CC. CNS immune privilege: hiding in plain sight. *Immunol Rev* [Internet]. 2006 Oct;213:48–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16972896>
164. Pachter JS, de Vries HE, Fabry Z. The blood-brain barrier and its role in immune privilege in the central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* [Internet]. 2003 Jun;62(6):593–604. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12834104>
165. Ransohoff RM, Kivisäkk P, Kidd G. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2003 Jul;3(7):569–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12876559>
166. Perry VH, Teeling J. Microglia and macrophages of the central nervous system: the contribution of microglia priming and systemic inflammation to chronic neurodegeneration. *Semin Immunopathol* [Internet]. 2013 Sep 4;35(5):601–12. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00281-013-0382-8>
167. Lobo-Silva D, Carriche GM, Castro AG, Roque S, Saraiva M. Balancing the immune response in the brain: IL-10 and its regulation. *J Neuroinflammation* [Internet]. 2016;13(1):297. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27881137>
168. Stoll G, Jander S, Schroeter M. Detrimental and beneficial effects of injury-induced inflammation and cytokine expression in the nervous system. *Adv Exp Med Biol* [Internet]. 2002;513:87–113. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12575818>
169. Klein RS, Garber C, Howard N. Infectious immunity in the central nervous system and brain function. *Nat Immunol* [Internet]. 2017;18(2):132–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28092376>
170. Ransohoff RM, Cardona AE. The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. *Nature* [Internet]. 2010 Nov 11;468(7321):253–62. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature09615>
171. Koutsouras GW, Ramos RL, Martinez LR. Role of microglia in fungal infections of the central nervous system. *Virulence* [Internet]. 2017;8(6):705–18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27858519>

172. Lee M, Schwab C, Mcgeer PL. Astrocytes are GABAergic cells that modulate microglial activity. *Glia* [Internet]. 2011 Jan;59(1):152–65. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/glia.21087>
173. Cherry JD, Olschowka JA, O'Banion M. Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *J Neuroinflammation* [Internet]. 2014;11(1):98. Available from: <http://jneuroinflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/1742-2094-11-98>
174. Hanisch U-K. Functional diversity of microglia – how heterogeneous are they to begin with? *Front Cell Neurosci* [Internet]. 2013;7. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2013.00065/abstract>
175. Doorn KJ, Brevià JJP, Drukarch B, Boddeke HW, Huitinga I, Lucassen PJ, et al. Brain region-specific gene expression profiles in freshly isolated rat microglia. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 2015 Mar 12;9. Available from: http://www.frontiersin.org/Cellular_Neuroscience/10.3389/fncel.2015.00084/abstract
176. Wohleb ES. Neuron-Microglia Interactions in Mental Health Disorders: “For Better, and For Worse”. *Front Immunol* [Internet]. 2016;7:544. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27965671>
177. Nimmerjahn A. Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo. *Science* (80-) [Internet]. 2005 May 27;308(5726):1314–8. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1110647>
178. Kettenmann H, Hanisch U-K, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of Microglia. *Physiol Rev* [Internet]. 2011 Apr;91(2):461–553. Available from: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.00011.2010>
179. Olson JK, Miller SD. Microglia Initiate Central Nervous System Innate and Adaptive Immune Responses through Multiple TLRs. *J Immunol* [Internet]. 2004 Sep 15;173(6):3916–24. Available from: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.173.6.3916>
180. van Rossum D, Hanisch U-K. Microglia. *Metab Brain Dis* [Internet]. 2004 Dec;19(3–4):393–411. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15554430>
181. Ransohoff RM. A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? *Nat Neurosci* [Internet]. 2016 Aug 1;19(8):987–91. Available from: <http://www.nature.com/articles/nn.4338>
182. Mayer AMS, Murphy J, MacAdam D, Osterbauer C, Baseer I, Hall ML, et al. Classical and Alternative Activation of *Cyanobacterium Oscillatoria* sp. Lipopolysaccharide-Treated Rat Microglia in vitro. *Toxicol Sci* [Internet]. 2016 Feb;149(2):484–95. Available from: <https://academic.oup.com/toxsci/article-lookup/doi/10.1093/toxsci/kfv251>
183. Imai Y, Ibata I, Ito D, Ohsawa K, Kohsaka S. A Novel Geneiba1 in the Major Histocompatibility Complex Class III Region Encoding an EF Hand Protein Expressed in a Monocytic Lineage. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 1996 Jul;224(3):855–62. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X96911122>
184. Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y, Kohsaka S. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Brain Res Mol Brain Res* [Internet]. 1998 Jun 1;57(1):1–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9630473>
185. Korzhevskii DE, Kirik O V. Brain Microglia and Microglial Markers. *Neurosci Behav Physiol* [Internet]. 2016 Mar 25;46(3):284–90. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11055-016-0231-z>
186. Ohsawa K, Imai Y, Kanazawa H, Sasaki Y, Kohsaka S. Involvement of Iba1 in membrane ruffling and phagocytosis of macrophages/microglia. *J Cell Sci* [Internet]. 2000 Sep;113 (Pt 1):3073–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10934045>
187. Ohsawa K, Imai Y, Sasaki Y, Kohsaka S. Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbriin and enhances its actin-bundling activity. *J Neurochem* [Internet]. 2004 Feb;88(4):844–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14756805>
188. Sasaki Y, Ohsawa K, Kanazawa H, Kohsaka S, Imai Y. Iba1 Is an Actin-Cross-Linking Protein in Macrophages/Microglia. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2001 Aug;286(2):292–7. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X01953884>
189. Khozhaï LI, Otellin VA. [Reactive microglial changes in rat neocortex and hippocampus after exposure to acute perinatal hypoxia]. *Morfologija* [Internet]. 2013;143(1):23–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23805610>
190. Boche D, Perry VH, Nicoll JAR. Review: Activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol* [Internet]. 2013

- Feb;39(1):3–18. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/nan.12011>
191. Sobin C, Montoya MGF, Parisi N, Schaub T, Cervantes M, Armijos RX. Microglial disruption in young mice with early chronic lead exposure. *Toxicol Lett* [Internet]. 2013 Jun;220(1):44–52. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378427413001513>
 192. Rao JS, Kellom M, Kim H-W, Rapoport SI, Reese EA. Neuroinflammation and Synaptic Loss. *Neurochem Res* [Internet]. 2012 May 7;37(5):903–10. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11064-012-0708-2>
 193. Amor S, Puentes F, Baker D, van der Valk P. Inflammation in neurodegenerative diseases. *Immunology* [Internet]. 2010 Feb;129(2):154–69. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2567.2009.03225.x>
 194. Hein AM, O'Banion MK. Neuroinflammation and Memory: The Role of Prostaglandins. *Mol Neurobiol* [Internet]. 2009 Aug 14;40(1):15–32. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12035-009-8066-z>
 195. Kohman RA, Rhodes JS. Neurogenesis, inflammation and behavior. *Brain Behav Immun* [Internet]. 2013 Jan;27:22–32. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889159112004308>
 196. Kabba JA, Xu Y, Christian H, Ruan W, Chenai K, Xiang Y, et al. Microglia: Housekeeper of the Central Nervous System. *Cell Mol Neurobiol* [Internet]. 2018 Jan 22;38(1):53–71. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10571-017-0504-2>
 197. Loane DJ, Kumar A. Microglia in the TBI brain: The good, the bad, and the dysregulated. *Exp Neurol* [Internet]. 2016 Jan;275:316–27. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014488615300790>
 198. Prinz M, Priller J. Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. *Nat Rev Neurosci* [Internet]. 2014 May 9;15(5):300–12. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrn3722>
 199. Tang Y, Le W. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol* [Internet]. 2016 Mar 20;53(2):1181–94. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12035-014-9070-5>
 200. Perry VH, Holmes C. Microglial priming in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* [Internet]. 2014 Apr 18;10(4):217–24. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrneurol.2014.38>
 201. Varnum MM, Ikezu T. The Classification of Microglial Activation Phenotypes on Neurodegeneration and Regeneration in Alzheimer's Disease Brain. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* [Internet]. 2012 Aug 19;60(4):251–66. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00005-012-0181-2>
 202. von Bernhardi R, Eugenín-von Bernhardi L, Eugenín J. Microglial cell dysregulation in brain aging and neurodegeneration. *Front Aging Neurosci* [Internet]. 2015;7. Available from: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fnagi.2015.00124/abstract>
 203. Baldwin KT, Carbajal KS, Segal BM, Giger RJ. Neuroinflammation triggered by β -glucan/dectin-1 signaling enables CNS axon regeneration. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2015 Feb 24;112(8):2581–6. Available from: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1423221112>
 204. Sun H, Liang R, Yang B, Zhou Y, Liu M, Fang F, et al. Aquaporin-4 mediates communication between astrocyte and microglia: Implications of neuroinflammation in experimental Parkinson's disease. *Neuroscience* [Internet]. 2016 Mar;317:65–75. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306452216000221>
 205. Liddelow SA, Barres BA. Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity* [Internet]. 2017 Jun;46(6):957–67. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761317302340>
 206. Domingues HS, Portugal CC, Socodato R, Relvas JB. Oligodendrocyte, Astrocyte, and Microglia Crosstalk in Myelin Development, Damage, and Repair. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2016 Jun 28;4. Available from: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fcell.2016.00071/abstract>
 207. Liu W, Tang Y, Feng J. Cross talk between activation of microglia and astrocytes in pathological conditions in the central nervous system. *Life Sci* [Internet]. 2011 Aug;89(5–6):141–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0024320511002578>
 208. Lu X, Ma L, Ruan L, Kong Y, Mou H, Zhang Z, et al. Resveratrol differentially modulates inflammatory responses of microglia and astrocytes. *J Neuroinflammation* [Internet]. 2010 Aug 17 [cited 2019 Apr 2];7(1):46. Available from:

- <http://jneuroinflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/1742-2094-7-46>
209. Radford RA, Morsch M, Rayner SL, Cole NJ, Pountney DL, Chung RS. The established and emerging roles of astrocytes and microglia in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 2015 Oct 27;9. Available from: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fncel.2015.00414/abstract>
 210. Opydo-Chanek M, Dąbrowski Z. Response of astrocytes and microglia/macrophages to brain injury after bone marrow stromal cell transplantation: A quantitative study. *Neurosci Lett* [Internet]. 2011 Jan;487(2):163–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304394010013418>
 211. Pierozan P, Biasibetti H, Schmitz F, Ávila H, Parisi MM, Barbe-Tuana F, et al. Quinolinic acid neurotoxicity: Differential roles of astrocytes and microglia via FGF-2-mediated signaling in redox-linked cytoskeletal changes. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* [Internet]. 2016 Dec;1863(12):3001–14. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167488916302348>
 212. Sofroniew M V. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci* [Internet]. 2009 Dec;32(12):638–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19782411>
 213. Anderson MA, Burda JE, Ren Y, Ao Y, O'Shea TM, Kawaguchi R, et al. Astrocyte scar formation aids central nervous system axon regeneration. *Nature* [Internet]. 2016 Apr 30;532(7598):195–200. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature17623>
 214. Sofroniew M V. Astroglia. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2014 Nov 7;7(2):a020420. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25380660>
 215. Eng LF, Vanderhaeghen JJ, Bignami A, Gerstl B. An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res* [Internet]. 1971 May;28(2):351–4. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0006899371906688>
 216. Mallard C, Davidson JO, Tan S, Green CR, Bennet L, Robertson NJ, et al. Astrocytes and microglia in acute cerebral injury underlying cerebral palsy associated with preterm birth. *Pediatr Res* [Internet]. 2014 Jan 31;75(1–2):234–40. Available from: <http://www.nature.com/articles/pr2013188>
 217. Taylor PR, Tsoni SV, Willment JA, Dennehy KM, Rosas M, Findon H, et al. Dectin-1 is required for β -glucan recognition and control of fungal infection. *Nat Immunol* [Internet]. 2007 Jan 10;8(1):31–8. Available from: <http://www.nature.com/articles/ni1408>
 218. Bartelli TF, Bruno D do CF, Briones MRS. Whole-Genome Sequences and Annotation of the Opportunistic Pathogen *Candida albicans* Strain SC5314 Grown under Two Different Environmental Conditions. *Genome Announc* [Internet]. 2018 Feb 1;6(5). Available from: <http://genomea.asm.org/lookup/doi/10.1128/genomeA.01475-17>
 219. Gillum AM, Tsay EY, Kirsch DR. Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. *Mol Gen Genet* [Internet]. 1984 [cited 2018 Oct 23];198(2):179–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6394964>
 220. Park S, Kelly R, Kahn JN, Robles J, Hsu M-J, Register E, et al. Specific Substitutions in the Echinocandin Target Fks1p Account for Reduced Susceptibility of Rare Laboratory and Clinical *Candida* sp. Isolates. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2005 Aug 1;49(8):3264–73. Available from: <http://aac.asm.org/cgi/doi/10.1128/AAC.49.8.3264-3273.2005>
 221. Balashov S V., Park S, Perlin DS. Assessing Resistance to the Echinocandin Antifungal Drug Caspofungin in *Candida albicans* by Profiling Mutations in FKS1. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2006 Jun 1;50(6):2058–63. Available from: <http://aac.asm.org/cgi/doi/10.1128/AAC.01653-05>
 222. Rodriguez-Galán MC, Correa SG, Iribarren P, Sotomayor CE. Phenotypic and functional changes on phagocytic cells recruited at the site of *Candida albicans* infection after chronic varied stress exposure. *Med Mycol* [Internet]. 2002 Oct [cited 2018 Oct 23];40(5):485–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12462528>
 223. Rodriguez-Galán MC, Correa SG, Cejas H, Sotomayor CE. Impaired Activity of Phagocytic Cells in *Candida albicans* Infection after Exposure to Chronic Varied Stress. *Neuroimmunomodulation* [Internet]. 2001;9(4):193–202. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/49026>
 224. Renna MS, Correa SG, Porporatto C, Figueredo CM, Aoki MP, Paraje MG, et al. Hepatocellular apoptosis during *Candida albicans* colonization: involvement of TNF- and infiltrating Fas-L positive lymphocytes. *Int Immunol* [Internet]. 2006 Sep 27;18(12):1719–28. Available from: <https://academic.oup.com/intimm/article->

- lookup/doi/10.1093/intimm/dxl106
225. Rodríguez-Galán MC, Porporatto C, Sotomayor CE, Cano R, Cejas H, Correa SG. Immune–metabolic balance in stressed rats during *Candida albicans* infection. *Stress* [Internet]. 2010 Sep 28;13(5):373–83. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10253891003667870>
 226. Larone DH. *Medically Important Fungi: A Guide to Identification*, Fifth Edition [Internet]. American Society of Microbiology; 2011 [cited 2018 Oct 23]. Available from: <http://www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555816605>
 227. Miró MS, Rodríguez E, Vigezzi C, Icely PA, García LN, Peinetti N, et al. Contribution of TLR2 pathway in the pathogenesis of vulvovaginal candidiasis. *Pathog Dis* [Internet]. 2017 Sep 29;75(7). Available from: <https://academic.oup.com/femspd/article/doi/10.1093/femspd/ftx096/4098498>
 228. Rifkin DB. Latent Transforming Growth Factor- β (TGF- β) Binding Proteins: Orchestrators of TGF- β Availability. *J Biol Chem* [Internet]. 2005 Mar 4;280(9):7409–12. Available from: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.R400029200>
 229. Gladiator A, Wangler N, Trautwein-Weidner K, LeibundGut-Landmann S. Cutting Edge: IL-17-Secreting Innate Lymphoid Cells Are Essential for Host Defense against Fungal Infection. *J Immunol* [Internet]. 2013 Jan 15;190(2):521–5. Available from: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1202924>
 230. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc* [Internet]. 2008 Jun 1 [cited 2018 Oct 23];3(6):1101–8. Available from: <http://www.nature.com/articles/nprot.2008.73>
 231. Jonkers BW, Sterk JC, Wouterlood FG. Transcardial perfusion fixation of the CNS by means of a compressed-air-driven device. *J Neurosci Methods* [Internet]. 1984 Dec;12(2):141–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6527553>
 232. Kasukurthi R, Brenner MJ, Moore AM, Moradzadeh A, Ray WZ, Santosa KB, et al. Transcardial perfusion versus immersion fixation for assessment of peripheral nerve regeneration. *J Neurosci Methods* [Internet]. 2009 Nov;184(2):303–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165027009004658>
 233. ZWIENENBERG M, GONG Q-Z, LEE LL, BERMAN RF, LYETH BG. ICP Monitoring in the Rat: Comparison of Monitoring in the Ventricle, Brain Parenchyma, and Cisterna Magna. *J Neurotrauma* [Internet]. 1999 Nov;16(11):1095–102. Available from: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/neu.1999.16.1095>
 234. Ikeda K, Nara Y, Yamori Y. Indirect systolic and mean blood pressure determination by a new tail cuff method in spontaneously hypertensive rats. *Lab Anim* [Internet]. 1991 Jan 23;25(1):26–9. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1258/002367791780808176>
 235. Omatsu-Kanbe M, Yoshioka K, Fukunaga R, Sagawa H, Matsuura H. A simple antegrade perfusion method for isolating viable single cardiomyocytes from neonatal to aged mice. *Physiol Rep* [Internet]. 2018 May;6(9):e13688. Available from: <http://doi.wiley.com/10.14814/phy2.13688>
 236. Chuang N, Mori S, Yamamoto A, Jiang H, Ye X, Xu X, et al. An MRI-based atlas and database of the developing mouse brain. *Neuroimage* [Internet]. 2011 Jan;54(1):80–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1053811910010165>
 237. Rivarola ME, de Olmos S, Albrieu-Llinás G, Tauro LB, Gorosito-Serrán M, Konigheim BS, et al. Neuronal Degeneration in Mice Induced by an Epidemic Strain of Saint Louis Encephalitis Virus Isolated in Argentina. *Front Microbiol* [Internet]. 2018 Jun 7;9. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.01181/full>
 238. Schmued LC, Albertson C, Slikker W. Fluoro-Jade: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration. *Brain Res* [Internet]. 1997 Mar 14;751(1):37–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9098566>
 239. Schmued LC, Hopkins KJ. Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res* [Internet]. 2000 Aug 25;874(2):123–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10960596>
 240. Chin V-K, Foong K-J, Maha A, Rusliza B, Norhafizah M, Chong P. Multi-Step Pathogenesis and Induction of Local Immune Response by Systemic *Candida Albicans* Infection in an Intravenous Challenge Mouse Model. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2014 Aug 22;15(8):14848–67. Available from: <http://www.mdpi.com/1422-0067/15/8/14848>
 241. Shi J, Li S, Gao A, Zhu K, Zhang H. Tetrandrine enhances the antifungal activity of fluconazole in a murine model of disseminated candidiasis. *Phytomedicine* [Internet].

- 2018 Jul;46:21–31. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0944711318301867>
242. Kumar V, van de Veerdonk FL, Netea MG. Antifungal immune responses: emerging host–pathogen interactions and translational implications. *Genome Med* [Internet]. 2018 Dec 25;10(1):39. Available from:
<https://genomemedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13073-018-0553-2>
 243. Brown GD, Willment JA, Whitehead L. C-type lectins in immunity and homeostasis. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2018 Jun 26;18(6):374–89. Available from:
<http://www.nature.com/articles/s41577-018-0004-8>
 244. Sarraf P, Frederich RC, Turner EM, Ma G, Jaskowiak NT, Rivet DJ, et al. Multiple cytokines and acute inflammation raise mouse leptin levels: potential role in inflammatory anorexia. *J Exp Med* [Internet]. 1997 Jan 6;185(1):171–5. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8996253>
 245. Oude Lashof AML, Sobel JD, Ruhnke M, Pappas PG, Viscoli C, Schlamm HT, et al. Safety and tolerability of voriconazole in patients with baseline renal insufficiency and candidemia. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2012 Jun;56(6):3133–7. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22450974>
 246. Spellberg B, Ibrahim AS, Edwards Jr. JE, Filler SG. Mice with Disseminated Candidiasis Die of Progressive Sepsis. *J Infect Dis* [Internet]. 2005 Jul 15;192(2):336–43. Available from:
<https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/430952>
 247. Del Fresno C, Saz-Leal P, Enamorado M, Wculek SK, Martínez-Cano S, Blanco-Menéndez N, et al. DNCR-1 in dendritic cells limits tissue damage by dampening neutrophil recruitment. *Science* [Internet]. 2018;362(6412):351–6. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30337411>
 248. Felk A, Kretschmar M, Albrecht A, Schaller M, Beinbauer S, Nichterlein T, et al. *Candida albicans* hyphal formation and the expression of the Efg1-regulated proteinases Sap4 to Sap6 are required for the invasion of parenchymal organs. *Infect Immun* [Internet]. 2002 Jul;70(7):3689–700. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12065511>
 249. Teodoro GR, Gontijo AVL, Salvador MJ, Tanaka MH, Brighenti FL, Delbem ACB, et al. Effects of Acetone Fraction From *Buchenavia tomentosa* Aqueous Extract and Gallic Acid on *Candida albicans* Biofilms and Virulence Factors. *Front Microbiol* [Internet]. 2018 Apr 5;9. Available from:
<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.00647/full>
 250. Nantel A, Dignard D, Bachewich C, Marcus D, Marcil A, Bouin A-P, et al. Transcription Profiling of *Candida albicans* Cells Undergoing the Yeast-to-Hyphal Transition. Pringle J, editor. *Mol Biol Cell* [Internet]. 2002 Oct;13(10):3452–65. Available from:
<http://www.molbiolcell.org/doi/10.1091/mbc.e02-05-0272>
 251. Raman Sharma R. Fungal infections of the nervous system: Current perspective and controversies in management. *Int J Surg* [Internet]. 2010;8(8):591–601. Available from:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1743919110004085>
 252. Schwartz S, Kontoyiannis DP, Harrison T, Ruhnke M. Advances in the diagnosis and treatment of fungal infections of the CNS. *Lancet Neurol* [Internet]. 2018 Apr;17(4):362–72. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1474442218300309>
 253. González JM, Toro J, Asociado P. The neuroglia in the immune response of the nervous central system [Internet]. Vol. 23, *Acta Neurol Colomb*. 2007 [cited 2018 Nov 16]. Available from:
https://www.acnweb.org/acta/2007_23_1_25.pdf
 254. Galea I, Bechmann I, Perry VH. What is immune privilege (not)? *Trends Immunol* [Internet]. 2007 Jan;28(1):12–8. Available from:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471490606003267>
 255. Dobolyi A, Vincze C, Pál G, Lovas G. The Neuroprotective Functions of Transforming Growth Factor Beta Proteins. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2012 Jul 3;13(7):8219–58. Available from:
<http://www.mdpi.com/1422-0067/13/7/8219>
 256. Colton CA. Heterogeneity of Microglial Activation in the Innate Immune Response in the Brain. *J Neuroimmune Pharmacol* [Internet]. 2009 Dec 5;4(4):399–418. Available from:
<http://link.springer.com/10.1007/s11481-009-9164-4>
 257. Streit WJ, Kincaid-Colton CA. The brain's immune system. *Sci Am* [Internet]. 1995 Nov;273(5):54–5, 58–61. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8966536>
 258. Sofroniew M V., Vinters H V. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2010 Jan 10;119(1):7–35. Available from:
<http://link.springer.com/10.1007/s00401-009-0619-8>
 259. Karperien A, Ahammer H, Jelinek HF. Quantitating the subtleties of microglial morphology with fractal analysis. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 2013;7. Available from:

- <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2013.00003/abstract>
260. Brown GD, Herre J, Williams DL, Willment JA, Marshall ASJ, Gordon S. Dectin-1 Mediates the Biological Effects of β -Glucans. *J Exp Med* [Internet]. 2003 May 5;197(9):1119–24. Available from: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20021890>
261. Drummond RA, Brown GD. The role of Dectin-1 in the host defence against fungal infections. *Curr Opin Microbiol* [Internet]. 2011 Aug;14(4):392–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527411000853>
262. Gross O, Gewies A, Finger K, Schäfer M, Sparwasser T, Peschel C, et al. Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity. *Nature* [Internet]. 2006 Aug 12;442(7103):651–6. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature04926>
263. Shah VB, Huang Y, Keshwara R, Ozment-Skelton T, Williams DL, Keshvara L. Beta-glucan activates microglia without inducing cytokine production in Dectin-1-dependent manner. *J Immunol* [Internet]. 2008 Mar 1;180(5):2777–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18292498>
264. Novak M, Vetvicka V. β -Glucans, History, and the Present: Immunomodulatory Aspects and Mechanisms of Action. *J Immunotoxicol* [Internet]. 2008 Jan 9;5(1):47–57. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15476910802019045>
265. Camilli G, Eren E, Williams DL, Aimaniananda V, Meunier E, Quintin J. Impaired phagocytosis directs human monocyte activation in response to fungal derived β -glucan particles. *Eur J Immunol* [Internet]. 2018 May;48(5):757–70. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/eji.201747224>
266. Barreto-Bergter E, Figueiredo RT. Fungal glycans and the innate immune recognition. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2014 Oct 14;4. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2014.00145/abstract>
267. Pontón J. [The fungal cell wall and the mechanism of action of anidulafungin]. *Rev Iberoam Micol* [Internet]. 2008 Jun;25(2):78–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18473501>
268. Niimi K, Monk BC, Hirai A, Hatakenaka K, Umeyama T, Lamping E, et al. Clinically significant micafungin resistance in *Candida albicans* involves modification of a glucan synthase catalytic subunit GSC1 (FKS1) allele followed by loss of heterozygosity. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2010 May 1;65(5):842–52. Available from: <https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/dkq073>
269. Slater JL, Howard SJ, Sharp A, Goodwin J, Gregson LM, Alastruey-Izquierdo A, et al. Disseminated Candidiasis Caused by *Candida albicans* with Amino Acid Substitutions in Fks1 at Position Ser645 Cannot Be Successfully Treated with Micafungin. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2011 Jul;55(7):3075–83. Available from: <http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.01686-10>
270. Gantner BN, Simmons RM, Underhill DM. Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. *EMBO J* [Internet]. 2005 Mar 23;24(6):1277–86. Available from: <http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1038/sj.emboj.7600594>
271. Yang L, Wu H, Qiu W, Guo L, Du X, Yu Q, et al. Pulsatilla decoction inhibits *Candida albicans* proliferation and adhesion in a mouse model of vulvovaginal candidiasis via the Dectin-1 signaling pathway. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2018 Sep [cited 2019 Feb 15];223:51–62. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874117343064>
272. Wagener M, Hoving JC, Ndlovu H, Marakalala MJ. Dectin-1-Syk-CARD9 Signaling Pathway in TB Immunity. *Front Immunol* [Internet]. 2018 Feb 13 [cited 2019 Feb 15];9:225. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.00225/full>
273. Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2010 Mar 15;10(3):170–81. Available from: <http://www.nature.com/articles/nri2711>
274. Dillon S. Yeast zymosan, a stimulus for TLR2 and dectin-1, induces regulatory antigen-presenting cells and immunological tolerance. *J Clin Invest* [Internet]. 2006 Mar 23;116(4):916–28. Available from: <http://www.jci.org/cgi/doi/10.1172/JCI27203>
275. Cle A. Fungal infections and the kidney* KL Gupta [Internet]. Vol. 11, *J Nephrol*. 2001 [cited 2018 Dec 11]. Available from: <http://medind.nic.in/iav/t01/i4/iavt01i4p147.pdf>
276. Lord AK, Vyas JM. Host Defenses to Fungal Pathogens. *Clin Immunol* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2019 Feb 15];413-424.e1. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780702068966000296>

277. Rogiers O, Frising UC, Kucharíková S, Jabra-Rizk MA, van Loo G, Van Dijck P, et al. Candidalysin Crucially Contributes to Nlrp3 Inflammasome Activation by *Candida albicans* Hyphae. Lorenz M, editor. *MBio* [Internet]. 2019 Jan 8;10(1). Available from: <http://mbio.asm.org/lookup/doi/10.1128/mBio.02221-18>
278. Shrestha R, Millington O, Brewer J, Bushell T. Is Central Nervous System an Immune-Privileged Site? *Kathmandu Univ Med J* [Internet]. 2014 Sep 11 [cited 2018 Dec 18];11(1). Available from: <http://www.nepjol.info/index.php/KUMJ/article/view/11055>
279. Louveau A, Harris TH, Kipnis J. Revisiting the Mechanisms of CNS Immune Privilege. *Trends Immunol* [Internet]. 2015 Oct;36(10):569–77. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471490615001982>
280. Carson MJ, Doose JM, Melchior B, Schmid CD, Ploix CC. CNS immune privilege: hiding in plain sight. *Immunol Rev* [Internet]. 2006 Oct;213(1):48–65. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-065X.2006.00441.x>
281. Drummond R. Neuro-Immune Mechanisms of Anti-Cryptococcal Protection. *J Fungi* [Internet]. 2017 Dec 25;4(1):4. Available from: <http://www.mdpi.com/2309-608X/4/1/4>
282. Dong Y, Benveniste EN. Immune function of astrocytes. *Glia* [Internet]. 2001 Nov;36(2):180–90. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/glia.1107>
283. Streit WJ. Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia* [Internet]. 2002 Nov;40(2):133–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/glia.10154>
284. Stoll G, Jander S, Schroeter M. Cytokines in CNS disorders: neurotoxicity versus neuroprotection. In: *Advances in Dementia Research* [Internet]. Vienna: Springer Vienna; 2000. p. 81–9. Available from: http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-3-7091-6781-6_11
285. Nakajima K, Kohsaka S. Microglia: Neuroprotective and Neurotrophic Cells in the Central Nervous System. *Curr Drug Target -Cardiovascular Hematol Disord* [Internet]. 2004 Mar 1;4(1):65–84. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1568-0061&volume=4&issue=1&spage=65>
286. Ridet JL, Privat A, Malhotra SK, Gage FH. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci* [Internet]. 1997 Dec;20(12):570–7. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166223697011399>
287. Farina C, Aloisi F, Meinl E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol* [Internet]. 2007 Mar;28(3):138–45. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471490607000245>
288. Sofroniew M V. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci* [Internet]. 2009 Dec;32(12):638–47. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166223609001532>
289. Sofroniew M V. Reactive Astrocytes in Neural Repair and Protection. *Neurosci* [Internet]. 2005 Oct 29;11(5):400–7. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1073858405278321>
290. Wang N, Liang H, Zen K. Molecular Mechanisms That Influence the Macrophage M1–M2 Polarization Balance. *Front Immunol* [Internet]. 2014 Nov 28;5. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2014.00614/abstract>
291. Jablonski KA, Amici SA, Webb LM, Ruiz-Rosado J de D, Popovich PG, Partida-Sanchez S, et al. Novel Markers to Delineate Murine M1 and M2 Macrophages. Olszewski MA, editor. *PLoS One* [Internet]. 2015 Dec 23;10(12):e0145342. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0145342>
292. Kołaczowska A, Kołaczowski M. Drug resistance mechanisms and their regulation in non-*albicans* *Candida* species. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2016 Jun;71(6):1438–50. Available from: <https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/dkv445>
293. Goemaere B, Becker P, Van Wijngaerden E, Maertens J, Spriet I, Hendrickx M, et al. Increasing candidaemia incidence from 2004 to 2015 with a shift in epidemiology in patients preexposed to antifungals. *Mycoses* [Internet]. 2018 Feb [cited 2019 Mar 1];61(2):127–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29024057>
294. Revie NM, Iyer KR, Robbins N, Cowen LE. Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. *Curr Opin Microbiol* [Internet]. 2018 Oct;45:70–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527417300875>
295. Casadevall A, Pirofski LA. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect Immun* [Internet]. 1999 Aug;67(8):3703–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10417127>

296. Mavor AL, Thewes S, Hube B. Systemic fungal infections caused by *Candida* species: epidemiology, infection process and virulence attributes. *Curr Drug Targets* [Internet]. 2005 Dec;6(8):863–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16375670>
297. Arsenault AB, Bliss JM. Neonatal Candidiasis: New Insights into an Old Problem at a Unique Host-Pathogen Interface. *Curr Fungal Infect Rep* [Internet]. 2015 Dec 7;9(4):246–52. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12281-015-0238-x>
298. Yu Y, Du L, Yuan T, Zheng J, Chen A, Chen L, et al. Risk Factors and Clinical Analysis for Invasive Fungal Infection in Neonatal Intensive Care Unit Patients. *Am J Perinatol* [Internet]. 2012 Dec 31;30(07):589–94. Available from: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0032-1329688>
299. Botero-Calderon L, Benjamin DK, Cohen-Wolkowicz M. Advances in the treatment of invasive neonatal candidiasis. *Expert Opin Pharmacother* [Internet]. 2015 May 3 [cited 2019 Mar 9];16(7):1035–48. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/14656566.2015.1031108>
300. Dumitrescu MP, Benjamin DK. *Candida* Prophylaxis. *Infect Dis Pharmacol* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2019 Mar 9];63–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323543910000060>
301. Bliss JM, Wong AY, Bhak G, Laforce-Nesbitt SS, Taylor S, Tan S, et al. *Candida* Virulence Properties and Adverse Clinical Outcomes in Neonatal Candidiasis. *J Pediatr* [Internet]. 2012 Sep;161(3):441-447.e2. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022347612002545>
302. Joly V, Yeni P. Rodent Models of *Candida* Sepsis. In: *Handbook of Animal Models of Infection* [Internet]. Elsevier; 1999. p. 649–55. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780127753904502165>
303. Schulz B, Weber K, Schmidt A, Borg-von Zepelin M, Ruhnke M. Difference in virulence between fluconazole-susceptible and fluconazole-resistant *Candida albicans* in a mouse model. *Mycoses* [Internet]. 2011 Sep;54(5):e522–30. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1439-0507.2010.01970.x>
304. Frenkel M, Mandelblat M, Alastruey-Izquierdo A, Mendlovic S, Semis R, Segal E. Pathogenicity of *Candida albicans* isolates from bloodstream and mucosal candidiasis assessed in mice and *Galleria mellonella*. *J Mycol Med* [Internet]. 2016 Mar;26(1):1–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1156523316000020>
305. Segal E, Frenkel M. Experimental In Vivo Models of Candidiasis. *J Fungi* [Internet]. 2018 Feb 6;4(1):21. Available from: <http://www.mdpi.com/2309-608X/4/1/21>
306. Kobayashi-Sakamoto M, Tamai R, Isogai E, Kiyoura Y. Gastrointestinal colonisation and systemic spread of *Candida albicans* in mice treated with antibiotics and prednisolone. *Microb Pathog* [Internet]. 2018 Apr;117:191–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0882401017308781>
307. Mohamed HA, Radwan RR, Raafat AI, Ali AE-H. Antifungal activity of oral (Tragacanth/acrylic acid) Amphotericin B carrier for systemic candidiasis: in vitro and in vivo study. *Drug Deliv Transl Res* [Internet]. 2018 Feb 27;8(1):191–203. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s13346-017-0452-x>
308. Szabo EK, MacCallum DM. The contribution of mouse models to our understanding of systemic candidiasis. *FEMS Microbiol Lett* [Internet]. 2011 Jul;320(1):1–8. Available from: <https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.2011.02262.x>
309. MacCallum DM, Odds FC. Temporal events in the intravenous challenge model for experimental *Candida albicans* infections in female mice. *Mycoses* [Internet]. 2005 May [cited 2019 Mar 7];48(3):151–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15842329>
310. MacCallum DM. Massive induction of innate immune response to *Candida albicans* in the kidney in a murine intravenous challenge model. *FEMS Yeast Res* [Internet]. 2009 Nov;9(7):1111–22. Available from: <https://academic.oup.com/femsyr/article-lookup/doi/10.1111/j.1567-1364.2009.00576.x>
311. Chowdhury M, Ryan L, Cherabuddi K, Freeman K, Weaver D, Pelletier J, et al. Antifungal Potential of Host Defense Peptide Mimetics in a Mouse Model of Disseminated Candidiasis. *J Fungi* [Internet]. 2018 Feb 27;4(1):30. Available from: <http://www.mdpi.com/2309-608X/4/1/30>
312. Semis R, Mendlovic S, Polacheck I, Segal E. Activity of an Intralipid formulation of nystatin in murine systemic candidiasis. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2011 Oct;38(4):336–40. Available from:

- <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924857911002196>
313. MacCallum DM, Odds FC. Temporal events in the intravenous challenge model for experimental *Candida albicans* infections in female mice. *Mycoses* [Internet]. 2005 May;48(3):151–61. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1439-0507.2005.01121.x>
 314. Conti HR, Huppler AR, Whibley N, Gaffen SL. Animal Models for Candidiasis. In: *Current Protocols in Immunology* [Internet]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2014. p. 19.6.1-19.6.17. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/0471142735.im1906s105>
 315. Peters BM, Palmer GE, Nash AK, Lilly EA, Fidel PL, Noverr MC. Fungal Morphogenetic Pathways Are Required for the Hallmark Inflammatory Response during *Candida albicans* Vaginitis. Deepe GS, editor. *Infect Immun* [Internet]. 2014 Feb;82(2):532–43. Available from: <http://iai.asm.org/lookup/doi/10.1128/IAI.01417-13>
 316. Naglik J, Albrecht A, Bader O, Hube B. *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. *Cell Microbiol* [Internet]. 2004 Oct;6(10):915–26. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1462-5822.2004.00439.x>
 317. Paraje MG, Correa SG, Renna MS, Theumer M, Sotomayor CE. *Candida albicans*-secreted lipase induces injury and steatosis in immune and parenchymal cells. *Can J Microbiol* [Internet]. 2008 Aug;54(8):647–59. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18772927>
 318. Paraje MG, Correa SG, Albesa I, Sotomayor CE. Lipase of *Candida albicans* induces activation of NADPH oxidase and L-arginine pathways on resting and activated macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2009 Dec 11;390(2):263–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19799868>
 319. Diamond RD, Krzesicki R, Jao W. Damage to Pseudohyphal Forms of *Candida albicans* by Neutrophils in the Absence of Serum In Vitro. *J Clin Invest* [Internet]. 1978 Feb 1;61(2):349–59. Available from: <http://www.jci.org/articles/view/108945>
 320. MacCallum DM. Massive induction of innate immune response to *Candida albicans* in the kidney in a murine intravenous challenge model. *FEMS Yeast Res* [Internet]. 2009 Nov [cited 2019 Mar 7];9(7):1111–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19845042>
 321. 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* [Internet]. 1997 Mar 1 [cited 2019 Mar 9];158(5):2356–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9036985>
 322. Gargan RA, Hamilton-Miller JM, Brumfitt W. Effect of pH and osmolality on in vitro phagocytosis and killing by neutrophils in urine. *Infect Immun* [Internet]. 1993 Jan;61(1):8–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8418067>
 323. Medzhitov R, Janeway CA. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* [Internet]. 1997 Oct 31;91(3):295–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9363937>
 324. Drummond RA, Lionakis MS. Mechanistic Insights into the Role of C-Type Lectin Receptor/CARD9 Signaling in Human Antifungal Immunity. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2016 Apr 5;6. Available from: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fcimb.2016.00039/abstract>
 325. Goodridge HS, Wolf AJ, Underhill DM. β -glucan recognition by the innate immune system. *Immunol Rev* [Internet]. 2009 Jul;230(1):38–50. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-065X.2009.00793.x>
 326. Hise AG, Tomalka J, Ganesan S, Patel K, Hall BA, Brown GD, et al. An Essential Role for the NLRP3 Inflammasome in Host Defense against the Human Fungal Pathogen *Candida albicans*. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2009 May;5(5):487–97. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1931312809001437>
 327. Gringhuis SI, den Dunnen J, Litjens M, van der Vlist M, Wevers B, Bruijns SCM, et al. Dectin-1 directs T helper cell differentiation by controlling noncanonical NF- κ B activation through Raf-1 and Syk. *Nat Immunol* [Internet]. 2009 Feb 4;10(2):203–13. Available from: <http://www.nature.com/articles/ni.1692>
 328. 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* [Internet]. 2002 Sep 15;169(6):3180–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12218136>
 329. 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. *J Immunol* [Internet]. 1997 Jun 1;158(11):5349–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9164955>
330. Perlin DS. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. *Drug Resist Updat* [Internet]. 2007 Jun;10(3):121–30. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1368764607000404>
 331. Kress Y, Feldmesser M, Casadevall A. Dynamic changes in the morphology of *Cryptococcus neoformans* during murine pulmonary infection. *Microbiology* [Internet]. 2001 Aug 1;147(8):2355–65. Available from: <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-147-8-2355>
 332. O'Meara TR, Holmer SM, Selvig K, Dietrich F, Alspaugh JA. *Cryptococcus neoformans* Rim101 Is Associated with Cell Wall Remodeling and Evasion of the Host Immune Responses. Pirofski L, editor. *MBio* [Internet]. 2013 Jan 15;4(1). Available from: <https://mbio.asm.org/lookup/doi/10.1128/mBio.00522-12>
 333. O'Meara TR, Xu W, Selvig KM, O'Meara MJ, Mitchell AP, Alspaugh JA. The *Cryptococcus neoformans* Rim101 Transcription Factor Directly Regulates Genes Required for Adaptation to the Host. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2014 Feb 15;34(4):673–84. Available from: <http://mcb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MCB.01359-13>
 334. Ost KS, Esher SK, Leopold Wager CM, Walker L, Wagener J, Munro C, et al. Rim Pathway-Mediated Alterations in the Fungal Cell Wall Influence Immune Recognition and Inflammation. Lorenz M, editor. *MBio* [Internet]. 2017 Mar 8;8(1). Available from: <http://mbio.asm.org/lookup/doi/10.1128/mBio.02290-16>
 335. Esher SK, Zaragoza O, Alspaugh JA. Cryptococcal pathogenic mechanisms: a dangerous trip from the environment to the brain. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2018 Apr 16;113(7). Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762018000700204&lng=en&tlng=en
 336. Pradhan A, Avelar GM, Bain JM, Childers DS, Larcombe DE, Netea MG, et al. Hypoxia Promotes Immune Evasion by Triggering β -Glucan Masking on the *Candida albicans* Cell Surface via Mitochondrial and cAMP-Protein Kinase A Signaling. Alspaugh JA, editor. *MBio* [Internet]. 2018 Nov 6;9(6). Available from: <http://mbio.asm.org/lookup/doi/10.1128/mBio.01318-18>
 337. Marakalala MJ, Vautier S, Potrykus J, Walker LA, Shepardson KM, Hopke A, et al. Differential Adaptation of *Candida albicans* In Vivo Modulates Immune Recognition by Dectin-1. Klein BS, editor. *PLoS Pathog* [Internet]. 2013 Apr 18 [cited 2018 Nov 19];9(4):e1003315. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1003315>
 338. Castillo L, MacCallum DM, Brown AJP, Gow NAR, Odds FC. Differential Regulation of Kidney and Spleen Cytokine Responses in Mice Challenged with Pathology-Standardized Doses of *Candida albicans* Mannosylation Mutants. Deepe GS, editor. *Infect Immun* [Internet]. 2011 Jan;79(1):146–52. Available from: <http://iai.asm.org/lookup/doi/10.1128/IAI.01004-10>
 339. Lanternier F, Mahdavian SA, Barbati E, Chaussade H, Koumar Y, Levy R, et al. Inherited CARD9 deficiency in otherwise healthy children and adults with *Candida* species-induced meningoencephalitis, colitis, or both. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2015 Jun;135(6):1558-1568.e2. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091674915000111>
 340. Liang P, Wang X, Wang R, Wan Z, Han W, Li R. CARD9 Deficiencies Linked to Impaired Neutrophil Functions Against *Phialophora verrucosa*. *Mycopathologia* [Internet]. 2015 Jun 20;179(5–6):347–57. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11046-015-9877-2>
 341. Yan XX, Yu CP, Fu XA, Bao FF, Du DH, Wang C, et al. CARD9 mutation linked to *Corynespora cassiicola* infection in a Chinese patient. *Br J Dermatol* [Internet]. 2016 Jan;174(1):176–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/bjd.14082>
 342. Drewniak A, Gazendam RP, Tool ATJ, van Houdt M, Jansen MH, van Hamme JL, et al. Invasive fungal infection and impaired neutrophil killing in human CARD9 deficiency. *Blood* [Internet]. 2013 Mar 28;121(13):2385–92. Available from: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2012-08-450551>
 343. Lanternier F, Pathan S, Vincent QB, Liu L, Cypowyj S, Prando C, et al. Deep Dermatophytosis and Inherited CARD9 Deficiency. *N Engl J Med* [Internet]. 2013 Oct 31;369(18):1704–14. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1208487>
 344. Lanternier F, Barbati E, Meinzer U, Liu L, Pedergnana V, Migaud M, et al. Inherited CARD9 Deficiency in 2 Unrelated Patients With Invasive *Exophiala* Infection. *J Infect Dis*

- [Internet]. 2015 Apr 15;211(8):1241–50. Available from:
<https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1093/infdis/jiu412>
345. Wang X, Wang W, Lin Z, Wang X, Li T, Yu J, et al. CARD9 mutations linked to subcutaneous phaeohyphomycosis and TH17 cell deficiencies. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2014 Mar;133(3):905-908.e3. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091674913014814>
 346. Gavino C, Hamel N, Zeng J Bin, Legault C, Guiot M-C, Chankowsky J, et al. Impaired RASGRF1/ERK-mediated GM-CSF response characterizes CARD9 deficiency in French-Canadians. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2016 Apr;137(4):1178-1188.e7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091674915013548>
 347. Grumach AS, de Queiroz-Telles F, Migaud M, Lanternier F, Filho NR, Palma SMU, et al. A Homozygous CARD9 Mutation in a Brazilian Patient with Deep Dermatophytosis. *J Clin Immunol* [Internet]. 2015 Jul 5;35(5):486–90. Available from:
<http://link.springer.com/10.1007/s10875-015-0170-4>
 348. Herbst M, Gazendam R, Reimnitz D, Sawalle-Belohradsky J, Groll A, Schlegel P-G, et al. Chronic *Candida albicans* Meningitis in a 4-Year-Old Girl with a Homozygous Mutation in the CARD9 Gene (Q295X). *Pediatr Infect Dis J* [Internet]. 2015 Sep;34(9):999–1002. Available from:
<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00006454-201509000-00020>
 349. Jachiet M, Lanternier F, Rybojad M, Bagot M, Ibrahim L, Casanova J-L, et al. Posaconazole Treatment of Extensive Skin and Nail Dermatophytosis Due to Autosomal Recessive Deficiency of CARD9. *JAMA Dermatology* [Internet]. 2015 Feb 1;151(2):192. Available from:
<http://archderm.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jamadermatol.2014.2154>
 350. Plantinga TS, van der Velden WJFM, Ferwerda B, van Spruiel AB, Adema G, Feuth T, et al. Early Stop Polymorphism in Human DECTIN-1 Is Associated with Increased *Candida* Colonization in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2009 Sep;49(5):724–32. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/604714>
 351. Cunha C, Di Ianni M, Bozza S, Giovannini G, Zagarella S, Zelante T, et al. Dectin-1 Y238X polymorphism associates with susceptibility to invasive aspergillosis in hematopoietic transplantation through impairment of both recipient- and donor-dependent mechanisms of antifungal immunity. *Blood* [Internet]. 2010 Dec 9 [cited 2019 Apr 16];116(24):5394–402. Available from:
<http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2010-04-279307>
 352. Saijo S, Fujikado N, Furuta T, Chung S, Kotaki H, Seki K, et al. Dectin-1 is required for host defense against *Pneumocystis carinii* but not against *Candida albicans*. *Nat Immunol* [Internet]. 2007 Jan 10;8(1):39–46. Available from:
<http://www.nature.com/articles/ni1425>
 353. Yang G, Pan F, Parkhurst CN, Grutzendler J, Gan W-B. Thinned-skull cranial window technique for long-term imaging of the cortex in live mice. *Nat Protoc* [Internet]. 2010 Feb 14;5(2):201–8. Available from: <http://www.nature.com/articles/nprot.2009.222>
 354. da Fonseca ACC, Matias D, Garcia C, Amaral R, Geraldo LH, Freitas C, et al. The impact of microglial activation on blood-brain barrier in brain diseases. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 2014 Nov 3 [cited 2019 Mar 21];8:362. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25404894>
 355. Nakayama H, Shibuya K, Kimura M, Ueda M, Iwabuchi S. Histopathological study of candidal infection in the central nervous system. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi* [Internet]. 2010;51(1):31–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20185869>
 356. Suzumura A, Sawada M, Yamamoto H, Marunouchi T. Transforming growth factor-beta suppresses activation and proliferation of microglia in vitro. *J Immunol* [Internet]. 1993 Aug 15 [cited 2019 Apr 9];151(4):2150–8. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8345199>
 357. Qian L, Wei S-J, Zhang D, Hu X, Xu Z, Wilson B, et al. Potent anti-inflammatory and neuroprotective effects of TGF-beta1 are mediated through the inhibition of ERK and p47phox-Ser345 phosphorylation and translocation in microglia. *J Immunol* [Internet]. 2008 Jul 1;181(1):660–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18566433>
 358. Butovsky O, Jedrychowski MP, Moore CS, Cialic R, Lanser AJ, Gabriely G, et al. Identification of a unique TGF-β-dependent molecular and functional signature in microglia. *Nat Neurosci* [Internet]. 2014 Jan 8;17(1):131–43. Available from:

- <http://www.nature.com/articles/nn.3599>
359. Cenci E, Mencacci A, Casagrande A, Mosci P, Bistoni F, Romani L. Impaired Antifungal Effector Activity but Not Inflammatory Cell Recruitment in Interleukin-6–Deficient Mice with Invasive Pulmonary Aspergillosis. *J Infect Dis* [Internet]. 2001 Sep;184(5):610–7. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/322793>
360. Erta M, Quintana A, Hidalgo J. Interleukin-6, a Major Cytokine in the Central Nervous System. *Int J Biol Sci* [Internet]. 2012;8(9):1254–66. Available from: <http://www.ijbs.com/v08p1254.htm>
361. Chai LYA, Vonk AG, Kullberg BJ, Verweij PE, Verschueren I, van der Meer JWM, et al. *Aspergillus fumigatus* cell wall components differentially modulate host TLR2 and TLR4 responses. *Microbes Infect* [Internet]. 2011 Feb;13(2):151–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1286457910002649>
362. 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* [Internet]. 1999 Dec;37(6):419–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647123>
363. Balish E, Wagner RD, Vazquez-Torres A, Jones-Carson J, Pierson C, Warner T. Mucosal and systemic candidiasis in IL-8R α -/- BALB/c mice. *J Leukoc Biol* [Internet]. 1999 Jul;66(1):144–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10411002>
364. Netea MG, van Tits LJ, Curfs JH, Amiot F, Meis JF, van der Meer JW, et al. Increased susceptibility of TNF- α lymphotoxin- α double knockout mice to systemic candidiasis through impaired recruitment of neutrophils and phagocytosis of *Candida albicans*. *J Immunol* [Internet]. 1999 Aug 1;163(3):1498–505. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10415052>
365. Sierra A, Abiega O, Shahraz A, Neumann H. Janus-faced microglia: beneficial and detrimental consequences of microglial phagocytosis. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 2013;7. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2013.00006/abstract>
366. Maneu V, Yáñez A, Murciano C, Molina A, Gil ML, Gozalbo D. Dectin-1 mediates in vitro phagocytosis of *Candida albicans* yeast cells by retinal microglia: Figure 1. *FEMS Immunol Med Microbiol* [Internet]. 2011 Oct;63(1):148–50. Available from: <https://academic.oup.com/femspd/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-695X.2011.00829.x>
367. Bruno VM, Shetty AC, Yano J, Fidel PL, Noverr MC, Peters BM. Transcriptomic Analysis of Vulvovaginal Candidiasis Identifies a Role for the NLRP3 Inflammasome. Kryan D, Berman J, editors. *MBio* [Internet]. 2015 Apr 21;6(2). Available from: <https://mbio.asm.org/lookup/doi/10.1128/mBio.00182-15>
368. Gross O, Poeck H, Bscheider M, Dostert C, Hanneschläger N, Endres S, et al. Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence. *Nature* [Internet]. 2009 May 1;459(7245):433–6. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature07965>
369. Joly S, Ma N, Sadler JJ, Soll DR, Cassel SL, Sutterwala FS. Cutting Edge: *Candida albicans* Hyphae Formation Triggers Activation of the Nlrp3 Inflammasome. *J Immunol* [Internet]. 2009 Sep 15;183(6):3578–81. Available from: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.0901323>
370. JUNG KH, KIM M-J, HA E, KIM HK, KIM YO, KANG SA, et al. The Suppressive Effect of β -Glucan on the Production of Tumor Necrosis Factor- α in BV2 Microglial Cells. *Biosci Biotechnol Biochem* [Internet]. 2007 May 23 [cited 2018 Nov 19];71(5):1360–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17485824>
371. Kennedy AD, Willment JA, Dorward DW, Williams DL, Brown GD, DeLeo FR. Dectin-1 promotes fungicidal activity of human neutrophils. *Eur J Immunol* [Internet]. 2007 Feb;37(2):467–78. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/eji.200636653>
372. Li X, Utomo A, Cullere X, Choi MM, Milner DA, Venkatesh D, et al. The β -Glucan Receptor Dectin-1 Activates the Integrin Mac-1 in Neutrophils via Vav Protein Signaling to Promote *Candida albicans* Clearance. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2011 Dec;10(6):603–15. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S193131281100360X>
373. Renna MS, Figueredo CM, Rodríguez-Galán MC, Icely PA, Peralta Ramos JM, Correa SG, et al. Abrogation of spontaneous liver tolerance during immune response to *Candida albicans*: contribution of NKT and hepatic mononuclear cells. *Int Immunol* [Internet]. 2012 May;24(5):315–25. Available from: <https://academic.oup.com/intimm/article-lookup/doi/10.1093/intimm/dxs001>

374. Castillo GDV, Blanc SL de, Sotomayor CE, Azcurra AI. Study of virulence factor of *Candida* species in oral lesions and its association with potentially malignant and malignant lesions. *Arch Oral Biol* [Internet]. 2018 Jul;91:35–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29656214>
375. Branzk N, Lubojemska A, Hardison SE, Wang Q, Gutierrez MG, Brown GD, et al. Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat Immunol* [Internet]. 2014 Nov 14;15(11):1017–25. Available from: <http://www.nature.com/articles/ni.2987>
376. Urban CF, Ermert D, Schmid M, Abu-Abed U, Goosmann C, Nacken W, et al. Neutrophil Extracellular Traps Contain Calprotectin, a Cytosolic Protein Complex Involved in Host Defense against *Candida albicans*. Levitz SM, editor. *PLoS Pathog* [Internet]. 2009 Oct 30;5(10):e1000639. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1000639>
377. Sørensen OE, Borregaard N. Neutrophil extracellular traps — the dark side of neutrophils. *J Clin Invest* [Internet]. 2016 May 2;126(5):1612–20. Available from: <https://www.jci.org/articles/view/84538>