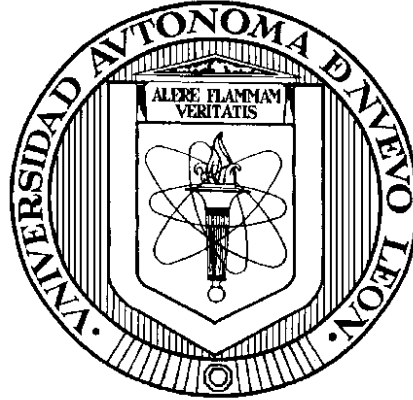


**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA**



**ANÁLISIS CELULAR DE LA RESPUESTA INMUNE CUTÁNEA EN UN  
MODELO MURINO DE CANDIDOSIS NEONATAL**

**Por**

**IBQ. SONIA ALICIA AGUILAR FERNÁNDEZ**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de  
Maestría en ciencias con Orientación en  
Microbiología Médica**

**NOVIEMBRE/2016**

**ANÁLISIS CELULAR DE LA RESPUESTA INMUNE CUTÁNEA EN UN  
MODELO DE CANDIDOSIS NEONATAL**

Aprobación de la Tesis:



---

Dr. C. Miguel Angel Becerril García  
Director de tesis



---

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



---

Dr. C. Romel Hernández Bello  
Comisión de tesis



---

Dra. Med. Raquel Garza Guajardo  
Sub-directora de Estudios de Posgrado

# ANÁLISIS CELULAR DE LA RESPUESTA INMUNE CUTÁNEA EN UN MODELO DE CANDIDOSIS NEONATAL

Presentado por:

I.B.Q. Sonia Alicia Aguilar Fernández

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



---

Dr. C. Miguel Angel Becerril García  
Director de tesis

# **ANÁLISIS CELULAR DE LA RESPUESTA INMUNE CUTÁNEA EN UN MODELO DE CANDIDOSIS NEONATAL**

El presente trabajo conto con el apoyo de PRODEP con el número de registro DSA/103.5/16/10510 y con el apoyo de PAICYT con el número de registro SA23315.

Sonia Alicia Aguilar Fernández fue becaria del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el número de registro 631483.

## DEDICATORIA

A Flora, Ricardo y Leopoldo.

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres Flora Alicia y Ricardo, por su gran apoyo no solo en esta, si no en todas las etapas de mi vida académica, si he llegado hasta aquí es por su maravilloso ejemplo e inmenso amor.

A mi hermano Leopoldo, por alentarme continuar cuando el trayecto se complicó, pero sobre todo por darme perspectiva cuando más me hizo falta.

Al Dr. Miguel Angel Becerril, por su guía y presencia incondicional durante la realización de este proyecto. Gracias por la paciencia infinita, el tiempo invertido y sobre todo por la confianza brindada.

A Sophia, por su excepcional apoyo en el laboratorio, pero sobretodo, por la agradable compañía y verdadera amistad.

A mi cuadro chico del posgrado: Claudia, Daniel, Elda, Erick, Héctor, Roque y Yolanda. Por toda la buena vibra, empatía, consejos y su sincera amistad durante este trayecto que vivimos juntos. Gracias por compartir tan buenos momentos conmigo, los admiro a todos y cada uno de ustedes.

A Carolina y Alexandra, definitivamente esto no hubiera sido lo mismo sin ustedes y todas las aventuras que pasamos juntas. Gracias por escucharme y ayudarme siempre que lo necesite. Las llevaré siempre en mi corazón de pollo.

A la Dra. Gloria González, por confiar en mí en todo momento pero sobre todo por el apoyo incondicional que me brindo en los momentos más difíciles.

Al Dr. Romel Hernández, por los saludos entusiastas de cada mañana, por tomarse el tiempo de escucharme y por el apoyo recibido durante en este proceso de aprendizaje.

A Lizbeth, Álvaro, Rogelio y Byron, por sus consejos, enseñanzas y ayuda desinteresada.

A mis queridas amigas Abigail, Gabriela y Natalie, por escucharme hablar un millón de veces de este proyecto sin quejarse. Gracias por recorrer este camino conmigo desde la distancia.

A Fernando, Gerardo, Orlando y Vanessa, por darle un toque de diversión a cada día de trabajo, por permitirme aprender de cada uno de ustedes y al mismo tiempo dejarme compartirles mis experiencias.

A la maestra Agustina, la maestra Karina, Angelitos y Andrés, por su espíritu servicial y el asesoramiento brindado.

A Erika, Gaby, Adriana, Lucero, Mayra y todo el personal del departamento de Microbiología Médica.

## TABLA DE CONTENIDO

CAPITULO	PAGINA
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 Mortalidad Neonatal	1
1.2 Candidosis	3
1.2.1 Morfología de <i>Candida albicans</i>	4
1.2.2 Factores de virulencia de <i>C. albicans</i>	5
1.2.3 Pared celular de <i>C. albicans</i>	6
1.2.4 Reconocimiento de <i>C. albicans</i>	7
1.3 Respuesta inmune frente a <i>C. albicans</i>	10
1.4 Sistema inmune cutáneo	13
1.5 Sistema inmune neonatal	15
1.6 Células de Langerhans	18
JUSTIFICACIÓN	22
HIPOTESIS	22
OBJETIVOS	23
<b>2. MATERIALES Y METODOS</b>	<b>24</b>
2.1 Animales de experimentación	24
2.2 Condiciones de cultivo de <i>C. albicans</i> y ajuste de los inóculos	25
2.2.1 Propagación de la cepa de referencia	25
2.2.2 Validación de la cepa de referencia	26
2.2.3 Descongelación de la cepa	28
2.2.4 Ajuste del inóculo	29
2.3 Infección cutánea de los animales de experimentación	29
2.3.1 Anestesia	29
2.3.2 Infección epicutánea con <i>C. albicans</i>	30
2.4 Análisis histológico de la piel del área abdominal de los animales inoculados tópicamente con <i>C. albicans</i>	31
2.4.1 Inclusión del tejido	31
2.4.2 Tinción de las laminillas obtenidas	32
2.4.2.1 Desparafinación del tejido	32
2.4.2.2 Tinción con ácido periódico de Shift (PAS)	33
2.5 Ensayo de hipersensibilidad tardía	34
2.6 Obtención de láminas epidérmicas	35
2.7 Actividad de ADPasa de las células de Langerhans	36
2.8 Inmunohistoquímica	37
2.9 Análisis estadístico	38

<b>3. RESULTADOS</b>	<b>39</b>
3.1 Establecimiento del modelo murino de candidosis cutánea neonatal	39
3.1.1 Reducción del estrato corneo de la epidermis de ratones BALB/c	39
3.1.2 Infección de ratones BALB/c	42
3.1.3 Colonización e invasión de la piel de ratones BALB/c por levaduras de <i>C. albicans</i>	44
3.2 Análisis <i>in situ</i> de la migración y activación de las células de Langerhans en la epidermis de ratones BALB/c infectados con <i>C. albicans</i>	55
3.2.1 Análisis morfológico de las células de Langerhans de ratones BALB/c recién nacidos	55
3.2.2 Análisis <i>in situ</i> de la frecuencia de las células de Langerhans de ratones BALB/c infectados con <i>C. albicans</i>	60
3.2.3 Análisis <i>in situ</i> de la activación de las células de Langerhans en ratones BALB/c infectados con <i>C. albicans</i>	67
3.3 Evaluación de respuesta inmune celular	74
<b>4. DISCUSIÓN</b>	<b>79</b>
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>88</b>
<b>6. PERSPECTIVAS</b>	<b>89</b>
<b>7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>	<b>90</b>



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PAGINA
1. Estructura de la pared celular de <i>Candida albicans</i>	7
2. Eventos tempranos de la respuesta inmune cutánea durante la colonización e invasión de <i>C. albicans</i>	13
3. Características morfológicas de la cepa de <i>C. albicans</i> con el número de referencia ATCC 66027	27
4. Reducción del estrato corneo de la piel del área abdominal de ratones BALB/c	41
5. Lesiones generadas durante el protocolo de infección de los animales de experimentación	44
6. <i>Candida albicans</i> coloniza e invade la piel de los ratones adultos	46
7. <i>Candida albicans</i> coloniza e invade la piel de los ratones neonatos	48
8. Morfología de las células de Langerhans de la piel de ratones adultos	56
9. Morfología de las células de Langerhans de la piel de ratones neonatos	59
10. Frecuencia de las células de Langerhans epidérmicas en ratones adultos	61
11. Frecuencia de las células de Langerhans epidérmicas en ratones neonatos	63
12. Células dendríticas CD86 <sup>+</sup> en ratones adultos	68
13. Células dendríticas CD86 <sup>+</sup> en ratones neonatos	70
14. Frecuencia de las células CD86 <sup>+</sup> en láminas epidérmicas de ratones adultos	72
15. Frecuencia de las células CD86 <sup>+</sup> en láminas epidérmicas de ratones neonatos	73
16. Los ratones adultos inducen respuesta celular tras la infección con <i>C. albicans</i>	75
17. Los ratones neonatos no generan respuesta celular tras la infección con $12.5 \times 10^4$ levaduras de <i>C. albicans</i>	76
18. Los ratones neonatos general respuesta celular tras la infección con $12.5 \times 10^6$ levaduras de <i>C. albicans</i>	77
19. Los ratones neonatos general respuesta celular tras la infección con $12.5 \times 10^8$ levaduras de <i>C. albicans</i>	78

## LISTA DE TABLAS

TABLA	PAGINA
1. Microorganismos importantes que presentan sepsis neonatal	3
2. Protocolo para tinción de Gram	27
3. Protocolo de inclusión de la piel del área abdominal de ratones adultos y neonatos	32
4. Protocolo de desparafinación de las laminillas	33
5. Protocolo para tinción de PAS	34
6. Protocolo llevado a cabo para la inmunohistoquímica de las láminas epidérmicas	37
7. Carga fúngica de la piel del área abdominal de ratones adultos infectados con $2 \times 10^8$ levaduras	50
8. Carga fúngica de la piel del área abdominal de ratones neonatos infectados con $12.5 \times 10^4$ , $12.5 \times 10^6$ y $12.5 \times 10^8$ levaduras	51
9. Carga fúngica de la piel del área abdominal de ratones adultos y neonatos a las 24 hpi	52
10. Carga fúngica de la piel del área abdominal de ratones adultos y neonatos a las 48 hpi	53
11. Carga fúngica recuperada de la piel del área abdominal de ratones neonatos infectados con $12.5 \times 10^4$ , $12.5 \times 10^6$ y $12.5 \times 10^8$ levaduras a las 24 hpi	54
12. Carga fúngica recuperada de la piel del área abdominal de ratones neonatos infectados con $12.5 \times 10^4$ , $12.5 \times 10^6$ y $12.5 \times 10^8$ levaduras a las 48 hpi	54
13. La frecuencia de las dendritas y sus ramificaciones cambia debido al proceso de exfoliación en ratones adultos infectados con <i>C. albicans</i>	64
14. La frecuencia de las dendritas en las células de Langerhans se modifica debido al proceso de exfoliación en ratones neonatos infectados con <i>C. albicans</i>	65
15. La frecuencia de las ramificaciones de las dendritas de las células de Langerhans se modifica debido al proceso de exfoliación en ratones neonatos infectados con <i>C. albicans</i>	66

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Adenosindifosfato
ATP	Adenosintrifosfato
BCG	Bacilos de Calmette y Guérin ( <i>Mycobacterium bovis</i> )
CD	Grupo de diferenciación
CDs	Célula (s) dendríticas
CDDs	Célula (s) dendríticas dérmicas
CLs	Célula (s) de Langerhans
CLR	Receptores de Lectina
CPA	Célula presentadora de antígeno
CxCR	Receptor para quimiocina CxC
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FcεR	Receptor para la fracción cristalizable épsilon
FITC	Isiotiocianato de fluoresceína
g	Gramo
h	Hora
hpi	Horas postinfección
IL	Interleucina
INF	Interferón
Lev	Levaduras
MCSF	Factor estimulador de colonias de monocitos
MHC I	Complejo principal de histocompatibilidad clase I
MHC II	Complejo principal de histocompatibilidad clase II
MR	Receptor de manosa
NLR	Receptor tipo Nod
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PAS	Ácido peryódico de Shift
pH	Potencial de hidrogeno
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos
RLR	Receptor tipo Rig
rpm	Revoluciones por minuto
SSF	Solución salina fisiológica
Th	Linfocito T cooperador
TLR	Receptor tipo Toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
UFC	Unidades formadoras de colonia
UV	Ultravioleta

## **CAPITULO 1**

### **INTRODUCCIÓN**

#### **1.1 Mortalidad neonatal.**

De acuerdo con la Organización mundial de la salud (OMS), la mortalidad neonatal hace referencia a las defunciones que se registran durante los primeros 28 días de edad, por cada 1000 nacidos vivos, en un año determinado <sup>1</sup>. Para 1990, a nivel mundial se estimó una mortalidad neonatal de 4,6 millones, sin embargo, para el año 2009 esta había descendido a 3,3 millones <sup>2</sup>. Recientemente, en el 2013 la OMS reportó a nivel mundial una mortalidad neonatal correspondiente a 2.8 millones, cifra que representa cerca del 44% de todas las muertes en menores de 5 años que se registraron tan solo ese año. En México, durante el 2013 se registraron 27,807 defunciones infantiles (niños menores de 5 años), el 60% de las muertes ocurrieron durante el período neonatal<sup>3</sup>. En la actualidad, se sabe que las primeras 4 semanas de vida es el periodo en dónde ocurren el 41% de las defunciones correspondientes a los infantes menores de 5 años, sin embargo, a pesar de que los registros generales de mortalidad neonatal han descendido en los últimos años, esta cifra ha aumentado respecto al 37% que correspondía a esta población en 1990 y probablemente seguirá incrementándose <sup>4</sup>. La primer semana de vida es la que más riesgo representa para los recién nacidos ya que el 75% de los fallecimientos en niños menores de 5 años se produce durante este periodo, y de estos entre el 25% y el 45% se producen en las primeras 24 horas <sup>5</sup>. Las primeras causas de

fallecimientos en recién nacidos son: parto prematuro y/o bajo peso al nacer (29%), asfixia y/o traumatismos (23%) e infecciones graves (25%)<sup>5</sup>, siendo estas últimas las responsables de las más de 1 millón de muertes neonatales que se producen cada año <sup>6</sup>, demostrando la vulnerabilidad de este sector poblacional. Cifras recientes estiman que en países desarrollados como Estados Unidos la incidencia de infecciones neonatales es de 1 a 10 por cada 1000 recién nacidos vivos, mientras que en los países en vías de desarrollo como el nuestro, esta cifra asciende a 21 de cada 1000 recién nacidos vivos. Los neonatos, especialmente los recién nacidos prematuros son altamente susceptibles a contraer diversas infecciones microbianas <sup>7</sup> debido a que existen múltiples factores de riesgo dentro de los cuales destacan: cuidados intensivos prolongados (ventilación mecánica, nutrición parenteral y el uso de sondas y catéteres que tienen vía intravenosa); también existe la transición de un lugar considerado estéril a un entorno lleno de microorganismos tanto comensales como patógenos; y por último un sistema inmune que se encuentra en proceso de desarrollo y maduración al momento de nacer <sup>8</sup>.

Si bien el serotipo, virulencia, carga microbiana y el sitio de infección influyen en el curso que esta lleve en el hospedero, son el sistema inmune y la respuesta inflamatoria los que juegan un papel crítico en el desarrollo de infecciones. En la Tabla 1 se enlistan los agentes patógenos de mayor prevalencia en los neonatos <sup>9</sup>.

<b>Tipo de infección</b>	<b>Microorganismo responsable</b>
<b>Infección bacteriana de aparición temprana: se presenta dentro de las 72 horas del nacimiento.</b>	<i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Listeria monocytogenes</i>
<b>Infección bacteriana de aparición tardía : se presenta 72 horas después del nacimiento</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Enterococcus spp</i> <i>Klebsiella spp</i> <i>Streptococcus agalactiae</i>
<b>Infección viral</b>	<i>Cytomegalovirus</i> <i>Enterovirus</i> <i>virus Herpes simple</i>
<b>Infección Fúngica</b>	<b><i>Candida spp</i></b>

Tabla 1. Microorganismos importantes que presentan sepsis neonatal.

Cabe destacar que dentro de las infecciones fúngicas, el agente etiológico más común es *Candida ssp*.

## 1.2 Candidosis.

La candidosis es la infección por hongos más frecuente en los seres humanos, es una micosis oportunista causada por diversas especies de levaduras del género *Candida*, siendo en su mayoría ocasionadas por la especie *C. albicans*<sup>10</sup>. Esta infección fúngica afecta particularmente la piel y uñas (candidosis cutánea), mucosa (candidosis mucocutánea) y pueden llegar a diseminarse a órganos a través de vía sistémica (candidosis diseminada)<sup>10</sup>. La incidencia de esta micosis oportunista a nivel mundial es de 72.8 casos por cada millón de personas al año, presentando una mortalidad del 33.9%. Siendo los recién

nacidos los que presentan una mayor prevalencia en comparación con los adultos <sup>11</sup>. Se sabe que la mayoría de las candidosis tienen origen endógeno, atribuible principalmente a dos procesos: desequilibrio en la microbiota que favorece el incremento en número de levaduras y enfermedades o procesos que influyen en la respuesta inmune del hospedero, principalmente a nivel de respuesta celular <sup>10</sup>.

### 1.2.1 Morfología de *Candida albicans*.

El género *Candida* es cosmopolita e incluye alrededor de 200 especies, sin embargo solamente 58 son consideradas como oportunistas en animales y seres humanos, de estas, solamente 8 especies son las que sobresalen en infecciones humanas, siendo *C. albicans* la causante del 40-85% de las fungemias causadas con este género <sup>12</sup>.

En cultivo y tejidos las especies de *Candida* proliferan en forma de levaduras ovoides gemantes de 3 a 6 µm de diámetro y sin pigmentación. Este hongo es considerado oportunista ya que se encuentra presente en la microbiota natural del ser humano, presentando gran predilección por la piel y mucosas. Se encuentra colonizando el tracto gastrointestinal (40 – 50%) y en menor medida el tracto respiratorio superior, boca, laringe y faringe en donde habita en equilibrio con otras especies, de tal manera que *C. albicans* coloniza a todos los humanos durante o poco tiempo después del nacimiento <sup>13</sup>, es por esta razón que *Candida* y las levaduras relacionadas son consideradas como microorganismos

oportunistas endógenos y el riesgo de infección siempre se encuentra presente<sup>14</sup>.

La candidiasis superficial (cutánea o de mucosas) surge por un incremento en el número local de células de *Candida* y/o daño a la piel o del epitelio el cual permite la invasión local por las levaduras y pseudohifas. Cuando estas penetran al torrente sanguíneo y el sistema inmune del hospedero no logra contener la proliferación del hongo se desarrolla una candidiasis sistémica<sup>15</sup>.

*C. albicans* es un hongo dimórfico ya que también forma pseudohifas cuando las yemas siguen creciendo pero no se desprenden, formando cadenas de células alargadas que presentan constricciones en los tabiques entre las células<sup>14</sup>. En medios de cultivo *C. albicans* se desarrolla como levadura cuando se encuentra a una temperatura de 30°C, la estructura levaduriforme es la forma en la que *C. albicans* coloniza al hospedero. Cuando el hongo desarrolla pseudomicelio es cuando se torna agente patógeno y causa infección e invasión del hospedero, en cultivo la inducción de pseudohifas se manifiesta a una temperatura de 37°C<sup>12</sup>.

### 1.2.2 Factores de virulencia de *C. albicans*.

Se han descrito diversos factores de virulencia de *C. albicans*, dentro de estos se encuentran las fosfolipasas PL-A, PL-B, PL-C y PL-D las cuales son secretadas por el hongo y facilitan la invasión del endotelio. También se han descrito factores genéticos como el gen PHR1 el cual se encuentra asociado a la síntesis de la pared celular. Así como una gran variedad de adhesinas que facilitan el anclaje



al epitelio y superficies endoteliales, estas se unen a las proteínas de matriz extracelular como la fibronectina, fibrinógeno y el colágeno tipo I y IV. Dentro de estas adhesinas, las responsables de la adhesión a la matriz extracelular del hospedero se encuentran Als1p, Als2p, Als3p, Als4p Als1p/Als5p, Als6p, Hwp1p, Int1p y Mnp1p <sup>16</sup>. Sin embargo, un factor de virulencia sumamente importante es la capacidad de *C. albicans* para sufrir transición morfológica, es decir, el cambio de levadura a pseudohifa, siendo este factor de virulencia el que le permite invadir tejidos y evadir la respuesta inmune <sup>10</sup> de forma que los mecanismos moleculares que influyen en el cambio morfológico de levadura a pseudohifa son cruciales para la invasión del hospedero <sup>13</sup> y es precisamente el estado morfológico de *C. albicans* el que define la composición de la pared celular del hongo <sup>(17,13,18)</sup>.

### 1.2.3 Pared celular de *C. albicans*.

La pared celular es esencial para mantener la viabilidad de las células fúngicas <sup>12</sup>. En general, la pared celular de *C. albicans* contiene carbohidratos y proteínas que no son propias del ser humano. Por lo que esta representa una diana inmunológica perfecta para discriminar entre agentes externos y propios, consecuentemente, la mayoría de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs por sus siglas en ingles) de la pared celular de *C. albicans* los que activan y regulan la respuesta inmunológica del hospedero <sup>13</sup>.

La pared celular de *C. albicans* está compuesta por dos capas, una capa interna y una externa como se muestra en la Figura 1 <sup>13</sup>. La capa externa está compuesta principalmente por mananos mientras que la capa interna contiene  $\beta$ -

(1-3)-glucanos y quitina, las cuales, al ocurrir la transición morfológica de levadura a pseudohifas quedan expuestas en la matriz extracelular y de esta manera pueden ser reconocidos por el sistema inmune del hospedero (13,17,18,19,20).

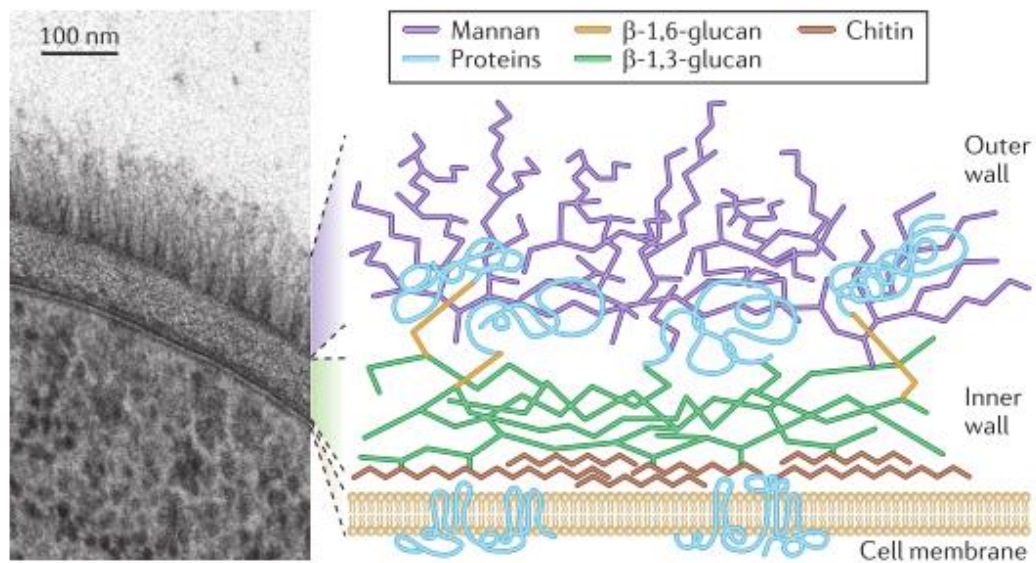


Figura 1. Estructura de la pared celular de *Candida albicans*. Se pueden distinguir 2 capas en la pared celular de *C. albicans*. La capa exterior es rica en mananos que están covalentemente asociadas con glicoproteínas, mientras que la capa interna contiene los polisacáridos estructurales quitina y  $\beta$ -(1-3)-glucano, que le confieren fuerza y dan forma a la célula <sup>13</sup>.

#### 1.2.4 Reconocimiento de *C. albicans*.

El sistema inmune innato es la primer línea de defensa ante una infección fúngica y mediante diversos receptores que se encuentran expresados en la membrana de neutrófilos, monocitos, macrófagos, linfocitos T CD4+ y en las células

dendríticas de la piel reconocen la quitina y el  $\beta$ -(1,3)-glucano, e inmediatamente activan vías de señalamiento que tienen como objetivo iniciar una respuesta inflamatoria en contra del microorganismo. Dentro de estos receptores se encuentran 4 grandes familias que contribuyen al reconocimiento de un gran número de microorganismos: los receptores tipo Toll (TLRs), receptores tipo Nod (NLRs), receptores tipo Rig (RLRs), receptores de lectina tipo C (CLRs). En conjunto estas familias de receptores son conocidos como receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PRRs por sus siglas en inglés) y tienen la capacidad de iniciar la respuesta inmune innata y polarizar la respuesta inmune adaptativa posterior el reconocimiento de componentes de la pared celular y de otros componentes moleculares como ácidos nucleicos. Todos estos PRRs inducen mecanismos efectivos para la resolución de una candidosis en hospederos sanos <sup>(17,21,22)</sup>.

Se sabe que dentro de los TLRs, TLR2 y TLR4 participan en el reconocimiento de *C. albicans*. Mientras que TLR2 se une a los fosfolipomananos y  $\beta$ -(1-3)-glucano e induce una respuesta inflamatoria, TLR4 hace lo propio reconociendo a los mananos de la pared celular y estimula la producción de la citocina proinflamatoria TNF $\alpha$  en las células mononucleares humanas y macrófagos murinos, además facilita el reclutamiento de neutrófilos al sitio de infección en donde colaboran para la producción de INF $\gamma$ . Otros PRRs que también están implicados en el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) de *C. albicans* son TLR9, TLR1, y TLR6, se sabe que estos receptores

pueden reconocer ácidos nucleicos, fosfolípidos y mananos respectivamente (23,24,25,26).

El receptor de manosa (MR) es un receptor de lectina tipo C, se encuentra en la superficie de macrófagos y células dendríticas. Se ha descrito que MR reconoce a los oligosacáridos que terminan en manosa, se demostró *in vivo* que el MR reconoce principalmente a las mananas que se encuentran ramificadas en la pared celular de *C. albicans* activando la producción de citocinas proinflamatorias, sin embargo se desconoce si tiene un papel fundamental en la fagocitosis del hongo aunque podría estar involucrada en este proceso (27,28,29).

Dentro de los receptores de lectina tipo C también se encuentra el receptor Dectin-2 que reconoce azúcares que se localizan en la capa exterior de *C. albicans* y que se encuentren unidos a N-manano, de tal manera que parece ser especialmente importante en el reconocimiento de la pseudohifas de este hongo. Dectin-1 es capaz de reconocer al  $\beta$ -(1-3)-glucano presente en la capa interna de la pared celular del hongo y junto con MR activa la vía de señalamiento que tiene como resultado la producción de IL-6, la cual es necesaria para la diferenciación de linfocitos T y generar una respuesta inmunológica celular del tipo Th17 (30,31,32,33,34).

Todos estos receptores, actúan reconociendo y activando vías de señalamiento diseñadas para eliminar al patógeno del hospedero, estos eventos incluyen fagocitosis, activación de factores de transcripción, producción y/o liberación de citocinas y quimiocinas, activación del inflamosoma, expresión del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I y II, así como la producción y/o

liberación de moléculas coestimuladoras y de adhesión que favorecen la activación y diferenciación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. La mayoría de estos PRRs encargados de reconocer a *C. albicans* se expresan en la superficie de las células dendríticas (CDs) y otras células de origen mieloide las cuales son ampliamente reconocidas por formar parte de la línea de defensa propia del sistema inmune innato. Sin embargo, estos PRRs expresados en estas células también inician la activación de la respuesta inmune adaptativa secretando citocinas que polarizan a los linfocitos T cooperadores (Th por sus siglas en inglés). Se sabe que para las infecciones fúngicas las respuestas inmunológicas del tipo Th1 y/o Th17 son cruciales para la eliminación del hongo <sup>(18,19,20,35,36)</sup>.

### 1.3 Respuesta inmune frente a *C. albicans*.

En los individuos sanos existe un número pequeño de levaduras de *C. albicans* que colonizan principalmente la piel y las mucosas y no representan un riesgo para la salud ya que no causan daño en la superficie epitelial y es por ello que no induce una respuesta inmunológica proinflamatoria por parte de los macrófagos, debido a que los PAMPs de *C. albicans* (por ejemplo la quitina) que se requieren para la activación del inflamosoma se encuentran “ocultos” para el sistema inmunológico. Sin embargo, cuando este número de levaduras aumenta y/o se da la transición a pseudohifas, las moléculas en la pared celular de *C. albicans* inducen su endocitosis y penetración al epitelio, generando daño en la superficie

endotelial e induciendo la producción de citocinas, activación del inflamosoma así como el reclutamiento de macrófagos y neutrófilos <sup>13</sup>.

En individuos sanos, las mucosas generalmente se encuentran colonizadas por *C. albicans*, sin embargo, existen diversos factores como: pH neutro-alkalino; temperatura 35-36°C; niveles normales de glucosa, oxígeno y nitrógeno; otros microorganismos propios de la microbiota de piel y mucosas que actúan como antagonistas de *C. albicans* y no permiten su proliferación descontrolada, por lo que el número de levaduras suele ser relativamente bajo y no daña el epitelio, por lo tanto, como resultado no se genera una respuesta inmunológica inducida por parte de citocinas provenientes de los macrófagos y células dendríticas de la piel y/o mucosas. Durante la colonización, los PAMPs de las levaduras de *C. albicans* responsables de la activación del inflamosoma se encuentran en la capa interna de la pared celular, razón por la cual la IL-1- $\beta$  no es secretada y por lo tanto no se genera una respuesta inmune celular. Las levaduras de *C. albicans* pueden activar la vía de señalamiento de las MAP quinasas (MAPK por sus siglas en inglés) mediante la proteína activadora p38 la cual induce la activación de los factores de transcripción JUN y FOS, sin embargo estos factores de transcripción por si solos no pueden activar la secreción de citocinas por medio de las células epiteliales <sup>(37,38)</sup> (Figura 2A).

Cuando el número de levaduras aumenta y/o se produce el cambio morfológico de levadura a pseudohifa, los PAMPs de *C. albicans* que se encuentran en la capa interna del hongo, son expuestos a la matriz extracelular en donde son reconocidos por PRRs y se induce su endocitosis y penetración al tejido,

provocando daño en la superficie endotelial. Por un lado, el reconocimiento por medio de los PRRs induce la producción de citocinas por parte de las células epiteliales y de esta forma se activa una segunda etapa de las MAPK que tiene como resultado la fosforilación y consecuente activación de la fosfatasa MKP1, esta fosfatasa induce la producción de IL-1 $\alpha$  e IL-6 necesarias para la activación de linfocitos Th. Por otro lado, los PRRs activan al inflamosoma y se induce por parte de las células del sistema inmune como macrófagos y CDs la producción de IL-1 $\beta$  la cual ayuda a polarizar a los linfocitos T CD4+ hacia linfocitos Th17, estos últimos producen proteínas e IL-17 que en conjunto activan a los neutrófilos y promueven su reclutamiento al sitio de daño epitelial. Estos linfocitos Th17 también secretan IL-22, citocina crucial para la liberación de defensinas por parte de las células epiteliales <sup>(37,39,40,41)</sup> (Figura 2B).

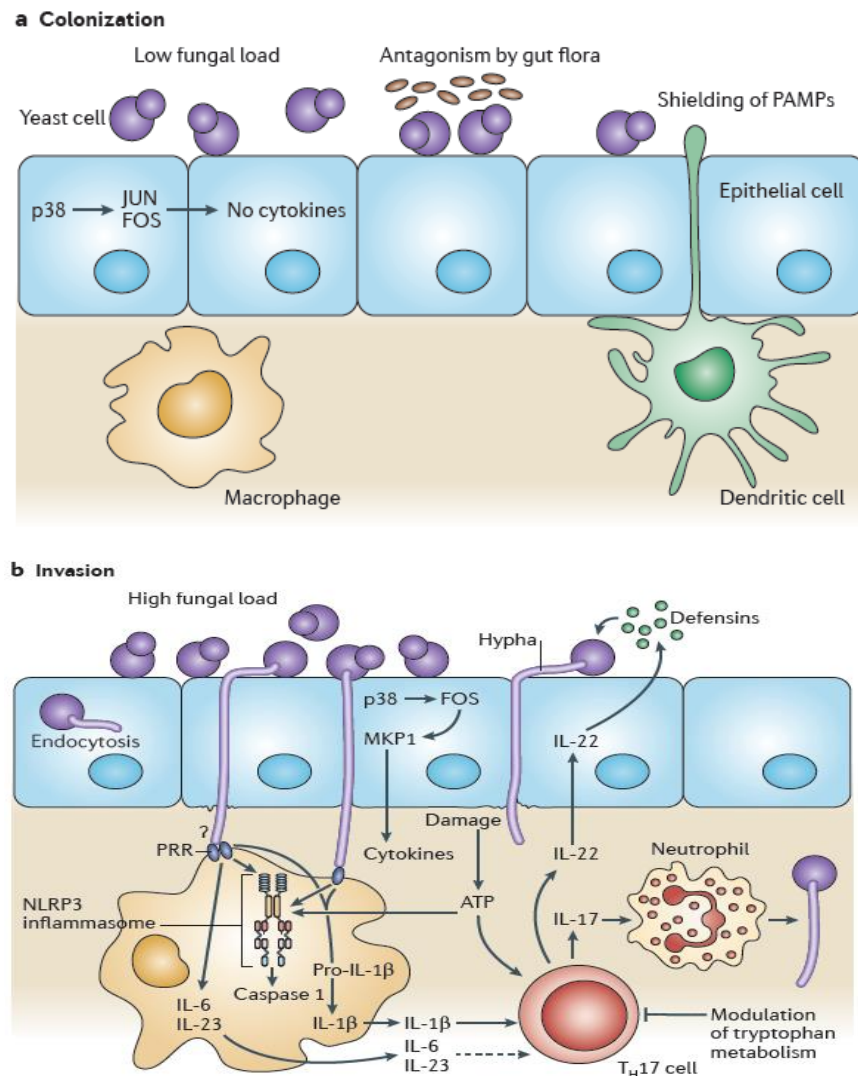


Figura 2. Eventos tempranos de la respuesta inmune cutánea durante la colonización e invasión de *Candida albicans*. A) Colonización de *Candida albicans* en la piel y mucosas. B) Invasión de las mucosas por *Candida albicans*

#### 1.4 Sistema inmune cutáneo.

Uno de los órganos que está formado por una gran cantidad de células epiteliales y células del sistema inmunológico es la piel, la cual es un órgano que cumple con diversas funciones como el proporcionar una barrera física y biológica ante



el ambiente y sus microorganismos, además de ofrecer una respuesta inmunológica ante la exposición a una amplia variedad de antígenos gracias a la existencia de células de defensa presentes en dicho órgano <sup>(20,42)</sup>.

Anatómicamente, la piel comprende 3 compartimientos distintos: la hipodermis, la dermis y la epidermis. La hipodermis es la capa más profunda de la piel, su grosor varía dependiendo de la ubicación y es donde se encuentra tejido conectivo areolar laxo, tejidos conectivos elásticos, adiposos, terminaciones nerviosas y vasos sanguíneos. La dermis está formada por fibras de elastina, fibras de colágeno y fibroblastos, vasos sanguíneos, vasos linfáticos y es en esta capa donde existen células del sistema inmunológico como: mastocitos, macrófagos, células dendríticas dérmicas, células linfoides y células T. Finalmente, la epidermis está conformada principalmente por queratinocitos, los cuales forman una capa externa que se conoce como estrato córneo, debajo de este se encuentran los estratos basal, granuloso, espinoso y lúcido, siendo el estrato espinoso la capa más gruesa de la epidermis, es en este estrato donde se encuentran los melanocitos y queratinocitos junto con una subpoblación de células dendríticas conocidas como células de Langerhans <sup>(42,43,44)</sup>.

Se considera que la dermis y la epidermis son las que proporcionan la mayor parte de la protección contra las infecciones <sup>42</sup> participando en el reconocimiento y presentación de antígenos <sup>45</sup>. Estudios recientes han mostrado que las células de Langerhans (CLs) residentes de la epidermis son la primera línea de defensa del sistema inmune cutáneo, puesto que son las primeras en interaccionar con *C. albicans* durante la invasión, siendo Dectin-1 el receptor de las CLs el

encargado de reconocer el  $\beta$ -(1-3)-glucano del hongo para posteriormente activar la vía de señalamiento MAPK mediante la proteína MyD88 que tiene como resultado la producción de IL-23, IL-1 $\beta$  e IL-6, siendo esta última la interleucina crucial para la diferenciación hacia una respuesta inmunológica Th17 <sup>(19,42,46)</sup>. De manera que ahora se sabe que la respuesta inmunológica frente a *C. albicans* depende de que subpoblación celular sea la que realiza presentación del antígeno y esto depende directamente de en qué capa de la piel sean reconocidos los PAMPs del hongo. Si la presentación de antígeno ocurre mediante las CDs de la dermis, se logra una diferenciación a una respuesta del tipo Th1, la cual brinda protección ante una infección sistémica, sin embargo, si la presentación del antígeno es mediada por las CLs encontradas en la epidermis la respuesta generada será del tipo Th17 y brindará protección local ante una infección cutánea <sup>(42,47,48,49,50)</sup>.

### 1.5 Sistema inmune neonatal.

Durante el período neonatal se tiene alta susceptibilidad a diversas infecciones. En el pasado dicha susceptibilidad se atribuía a la inmadurez del sistema inmune en etapas tempranas de la vida, lo cual estaba relacionado con la baja cantidad de células inmunológicas presentes en los órganos linfoides. Aunado a estas diferencias cuantitativas, algunos estudios en neonatos tanto en seres humanos como en animales de experimentación, han mostrado diferencias fenotípicas en

la misma población celular cuando se comparan células pertenecientes a los neonatos con las células de los adultos <sup>(8,21,51)</sup>.

Debido a lo anterior, el sistema inmune de los neonatos durante mucho años había sido considerado ineficiente, situación que era atribuida principalmente a la inmadurez de los linfocitos T. En una serie de estudios previos se ha demostrado que el número de neutrófilos en neonatos es menor en comparación con los adultos y la función de los neutrófilos mejora conforme el feto y el neonato se desarrolla, sin embargo estos neutrófilos presentan una menor capacidad de migración debido a que expresan bajas cantidades de moléculas de adhesión y son deficientes productores de especies reactivas de oxígeno por lo tanto tienen una menor actividad antimicrobiana. Con respecto a los monocitos y macrófagos se encontró que aunque en adultos y neonatos se encuentran en cantidades similares, en estos últimos la función fagocítica es deficiente razones por las cuales se sugiere una mayor susceptibilidad ante infecciones por parte de los neonatos <sup>52</sup>. También se reportó previamente la débil inducción de CD40 ligando en condiciones de activación y limitada actividad citotóxica en recién nacidos humanos <sup>53</sup>, por otra parte se demostró una baja producción de INF $\gamma$  en neonatos humanos ligada a la inmadurez de macrófagos <sup>(54,55)</sup>. Además de que se reportó que en animales neonatos existen niveles bajos de linfocitos T CD8<sup>+</sup> los cuales producen bajas cantidades de IFN $\gamma$  si se comparan con los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de animales adultos <sup>56</sup>. También se han realizado estudios en donde se analizan algunos PRRs, demostrándose que tanto los adultos como los neonatos presentan una expresión basal similar de TLRs en las células del sistema

inmunológico innato, sin embargo, después de la estimulación, hay una activación menor de TLRs en neonatos si se compara con la de los adultos <sup>57</sup> además comparando adultos con neonatos, existe diferencia significativa en la señalización intracelular después del estímulo, debido a que los neonatos presentan baja producción de MyD88 que resulta en baja capacidad de fosforilación intracelular <sup>58</sup>.

Sin embargo estudios recientes, demuestran si se estimulan bajo ciertas condiciones, los animales neonatos pueden ser competentes de igual forma que los animales adultos para inducir respuestas de células T tanto *in vivo* como *in vitro*, como por ejemplo frente a *Trypanosoma cruzi*, los fetos humanos son capaces de generar una respuesta citotóxica mediada por la producción de INF $\gamma$  y linfocitos T CD8<sup>+</sup> eficiente en contra de este parásito, evidenciando que el sistema inmune fetal es más competente de lo que se había demostrado hasta ese momento<sup>59</sup>. Recién nacidos humanos fueron capaces de desarrollar una respuesta inmunológica de tipo Th1 tras la inmunización con *Mycobacterium bovis*, este tipo de respuesta es la generada por los adultos con lo cual se demostró que los recién nacidos no solamente generan respuestas humorales como se había reportado hasta el momento sino que también son capaces de generar respuestas celulares. En este mismo estudio se comprobó que la vacunación con BCG al momento del nacimiento induce memoria celular en el sistema inmunológico <sup>60</sup>. En ratones neonatos se demostró que las células presentadoras de antígeno son las que definen si se genera tolerancia o inmunización frente a los antígenos presentados <sup>61</sup>. En un estudio donde

utilizaron diferentes concentraciones del retrovirus de la leucemia murina Cas-Br-M, los animales en dónde se utilizó la concentración que se ajustó con base en el número de esplenocitos, fueron capaces de montar una respuesta Th1 y la inducción de Linfocitos citotóxicos, contrario a lo que ocurría en los animales cuando se administraba la dosis correspondiente para el número de esplenocitos presentes en los adultos, en donde el neonato no era capaz de generar una respuesta citotóxica eficiente sino que generaba una respuesta del tipo humoral, la cual no es eficaz para eliminar este tipo de virus <sup>62</sup>.

Por todo lo anterior, es posible que algunos fenómenos atribuidos a la posible inmadurez de los linfocitos estén relacionados con el fenotipo y función de las células relacionadas con la maduración y activación de los linfocitos durante el período neonatal, las cuales son las células presentadoras de antígeno.

#### 1.6 Células de Langerhans.

Las células dendríticas dérmicas y epidérmicas (CDs) son las células clave para la regulación del sistema inmune ya que fungen como mediadoras entre la respuesta innata y la adaptativa determinando si se genera inmunidad o tolerancia en el organismo<sup>63</sup>. Las CDs constituyen un sistema complejo de células presentadoras de antígeno (CPA) profesionales que sobresalen por capacidad de presentación y se ha logrado identificar que estas juegan un doble papel, por un lado amplifican la respuesta innata y por el otro activan la respuesta

adaptativa. Células progenitoras de esta estirpe se dispersan mediante el torrente sanguíneo desde la médula ósea hasta los tejidos no linfoides donde en primera instancia se consideran como células inmaduras con fenotipo CD11b<sup>+</sup>MCSF<sup>-</sup>R<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CX3CR1<sup>-</sup> y células no terminales ya que expresan bajas cantidades de MHC clase II y TLR4, no expresan TLR6, langerina ni DEC205, además presentan poca o nula expresión de moléculas coestimuladoras y de adhesión (64,65).

Dentro de las células presentadoras de antígeno se encuentran las células de Langerhans (CLs), estas células están localizadas en la capa suprabasal de la epidermis, formando una red a lo largo de la epidermis que es considerada una de las primeras líneas de defensa contra microorganismos patógenos de la piel. Estas células fueron descritas por primera vez en 1868 por Paul Langerhans, sin embargo, tuvieron que pasar 12 años para que finalmente se reconocieran como células dendríticas ya que en un inicio se pensaba que formaban parte del sistema nervioso<sup>63</sup>. Se sabe que las CLs se especializan en activar la respuesta inmune innata y a su vez participan en la inducción de la respuesta inmune adaptativa, regulando la inmunidad y tolerancia<sup>66</sup>. De manera similar a la mayoría de las CD, las CLs están equipadas para capturar y procesar antígenos para después migrar de la epidermis a los nódulos linfáticos secundarios y presentar a los linfocitos T (67,68,69).

Hace algunos años, se sugería que en contraste con otras CDs, las CLs provenían de precursores hematopoyéticos que se embeben en la piel desde antes del nacimiento y que podrían derivarse de macrófagos primitivos provenientes del saco vitelino, que migraban a la piel mediante el torrente sanguíneo durante la embriogénesis, sin embargo, estudios *in vivo* recientes sugieren que la mayoría de estas células precursoras son producto de la hematopoyesis que se lleva a cabo durante la vida intrauterina en el hígado fetal (>80%) y en menor proporción del saco vitelino (10%), siendo estos últimos los primeros precursores de origen mieloide en migrar apropiadamente a la piel, posteriormente arriban las células precursoras provenientes del hígado fetal en etapas tardías de la embriogénesis, poco antes del nacimiento <sup>70</sup>.

Las CLs se renuevan continuamente *in situ*, gracias a que existen precursores de estas células que residen en la piel desde antes del nacimiento <sup>(70,71,72)</sup>. Durante esta migración del sitio de hematopoyesis a la piel, las células precursoras sufren cambios fenotípicos necesarios para su establecimiento en la epidermis, sin embargo se sabe que esta residencia es pasajera, ya que bajo estímulos apropiados que pueden ser químicos por ejemplo radiación con luz UV, físicos como las lesiones o biológicos como lo es la presencia de antígenos, estas células dejarán la piel y migrarán a los ganglios linfáticos regionales para estimular a los linfocitos T <sup>73</sup>. Merad y colaboradores demostraron que en condiciones basales, ocurre un recambio celular de las CLs a partir de células precursoras presentes en la piel pero también células provenientes de médula ósea. En estos ensayos, sometieron a un grupo de ratones a radiación con luz

UV y posteriormente a los animales se les sometía a un transplante de médula ósea y concluyeron que las CLs se renuevan localmente pero bajo condiciones que promueven la inflamación en la piel, su reemplazo proviene de células precursoras que se encuentran en la médula ósea y que llegan a la piel por torrente sanguíneo <sup>73</sup>.

Sin embargo a pesar de que estos precursores se encuentran ya en la epidermis antes del nacimiento, al menos en fenotipo no se consideran células terminales, debido a que presenta ciertas diferencias, en comparación con las CLs terminales. Dentro de estas diferencias se encuentra la carencia de ciertas lectinas como Langerina y DEC205, nula expresión de TLR2 y TLR6, baja expresión de MHC II y TLR4, expresión de CD14 y el receptor de scavenger los cuales se pierden durante la transición al estado terminal. A pesar de esto, estudios recientes demostraron que en ratones neonatos, estas células precursoras son capaces de generar una respuesta inmunológica sistémica y de memoria tras la aplicación tópica de haptenos, sin embargo se desconoce si frente a un microorganismo patógeno como *C. albicans* estas células serán capaces de generar una respuesta similar.



## JUSTIFICACIÓN.

Los recién nacidos prematuros son altamente susceptibles a adquirir infecciones, tradicionalmente se ha atribuido este fenómeno a la posible inmadurez de los componentes celulares de la respuesta inmune adquirida, comparando con células de los adultos, sin embargo se ha demostrado que estas células son capaces de realizar su función en condiciones óptimas de estimulación. Dentro de las tres causas principales de muerte de recién nacidos se encuentran las infecciones graves por microorganismos diversos. En particular los hongos del género *Candida spp.* se han convertido en una de las causas más frecuentes de infecciones en recién nacidos tanto prematuros como de término.

Los mecanismo de respuesta inmune innata y adaptativa durante las infecciones causadas por las especies del genero *Candida* se han estudiado ampliamente tanto en seres humanos como en animales adultos de experimentación, sin embargo por cuestiones de ética difícilmente pueden realizarse estudios de investigación *in vivo* en recién nacidos humanos, es por ello que consideramos necesario, establecer un modelo experimental en ratones, para estudiar la respuesta inmune en este grupo de riesgo.

## HIPOTÉISIS.

Las células presentadoras de antígeno periféricas neonatales son pobres inductoras de la respuesta inmune celular a *Candida albicans*.

## OBJETIVOS.

### 1. Objetivo General.

Establecer un modelo murino de candidosis cutánea que permita el estudio *in vivo* de la respuesta inmune neonatal temprana.

### 2. Objetivos Específicos.

- Evaluar si *Candida albicans* es capaz de colonizar e invadir la piel de los ratones neonatos.
  
- Analizar *in situ* la migración y activación de las células de Langerhans en epidermis de ratones neonatos, infectados con *Candida albicans*.
  
- Evaluar si los ratones neonatos son capaces de generar una respuesta celular *in vivo* a *Candida albicans*.

## CAPITULO 2

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1 Animales de experimentación.

El protocolo experimental de este proyecto fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) así como por el Comité de Investigación y Ética de la Universidad Autónoma de Nuevo León bajo el número de registro MB15-004. Se utilizaron ratones de la cepa BALB/c, para los ensayos en animales adultos se usaron hembras de 4 semanas de edad y para los ensayos en animales recién nacidos se utilizaron ratones menores a 24h de edad. Todos los animales fueron alojados en un rack Lab&Bio (Probiotech) con presión negativa, control de la temperatura (18 - 22°C), control de humedad (50-60%) y bajo condiciones de esterilidad, brindándoles alimento, agua y lecho estéril. Se utilizaron grupos de 5 ratones para cada condición experimental: control (sin tratamientos), vehículo (exfoliación y solución salina fisiológica (SSF) estéril al 0.89%) e infección (exfoliación y aplicación del inóculo de *Candida albicans*). La eutanasia de los ratones adultos se realizó mediante dislocación cervical mientras que la de los ratones neonatos fue por decapitación.

## 2.2 Condiciones de cultivo de *Candida albicans* y ajuste de los inóculos.

Todos los experimentos se realizaron con la cepa de *Candida albicans* ATCC con número de catálogo 66027. La cepa se encontraba liofilizada, por lo que se hidrataron las células siguiendo las indicaciones de la hoja técnica: administración de 1mL de agua destilada estéril, homogenizar manualmente durante 1 min e incubar toda la noche a 25°C.

### 2.2.1 Propagación de la cepa de referencia.

Para la propagación de la cepa y generación de lotes de trabajo se sembraron 10 placas con agar Sabouraud y se dejaron incubar a 30°C durante 48h, cada placa se incubó con 100µL del homogenizado de la cepa hidratada. Para la cosecha de la biomasa obtenida, se depositaron 15mL de SSF estéril en un tubo falcón de 50mL, posteriormente con la ayuda de hisopos estériles se removió la biomasa obtenida en las 10 placas. Se realizaron 3 lavados centrifugando el tubo de cosecha durante 10min a 1500 rpm. Para el conteo de las levaduras de la solución obtenida se realizaron 8 diluciones seriadas a partir de 10µL de la solución madre, utilizando una cámara de Neubauer se realizó el conteo total de células.

Una vez que se calculó el total de levaduras obtenidas en la solución madre, mediante una regla de tres simple calculamos el volumen necesario de solución madre para obtener una solución con una concentración de levaduras de  $1 \times 10^6$ /mL. Finalmente para la creación del lote de trabajo, se tomó el volumen

calculado y se depositó en un criovial, se ajustó la solución a un volumen final de 1mL utilizando una solución de medio Sabouraud líquido con glicerol al 30% y todos los crioviales obtenidos se almacenaron en un ultracongelador a -20°C hasta su uso.

### 2.2.2 Verificación de la cepa de referencia.

A la par de la propagación, se verificó la cepa de referencia mediante la prueba de inducción de tubo germinal y tinción de Gram. Para estas pruebas se utilizó una porción de biomasa de una de las 10 placas sembradas para la propagación de la cepa.

Para la inducción de tubo germinal, mediante punción venosa se extrajeron 5mL de sangre periférica de un donador sano. La sangre fue almacenada en un tubo sin aditivos (BD vacutainer con tapa rosca roja) y se dejó en reposo durante 15min hasta la formación de un coagulo, posteriormente se centrifugo el tubo durante 15min a 3000 rpm para la obtención del suero. Del suero obtenido se utilizaron 500  $\mu$ L, los cuales fueron depositados en un tubo eppendorf de 1mL y se adiciono una azada de biomasa de la cepa de referencia, posteriormente se incubó el tubo a 37°C durante 3h. Pasado este tiempo se realizó la homogenización de la suspensión durante 5 segundos con ayuda de un vórtex, se tomaron 10 $\mu$ L y se depositaron en un potaobjetos y finalmente se cubrió la solución con un cubreobjetos para observar en el microscopio con el objetivo de 100x la inducción de tubo germinal (Figura 3A).

Para la tinción de Gram, se coloca una gota de SSF estéril sobre un portaobjetos limpio, después se tomó biomasa de la placa de cultivo con un asa desechable y se realizó un frotis en el portaobjetos, con ayuda de un aplicador de madera se realizó la extensión de la biomasa y se dejó secar durante 15min. Para la tinción, se siguió el protocolo de la Tabla 2.

<b>Etapas</b>	<b>Solución</b>	<b>Tiempo</b>
Tinción	Cristal Violeta	1 min
Mordiente	Lugol	1 min
Decoloración	Alcohol-Acetona (50:50)	30 seg
Tinción de contraste	Safranina	1 min

Tabla 2. Protocolo para tinción de Gram. Se realizaron lavados con agua de la llave entre cada etapa.

Una vez que finalizó la tinción de Gram, se observaron las células al microscopio, utilizando el objetivo de 100x (Figura 3B).

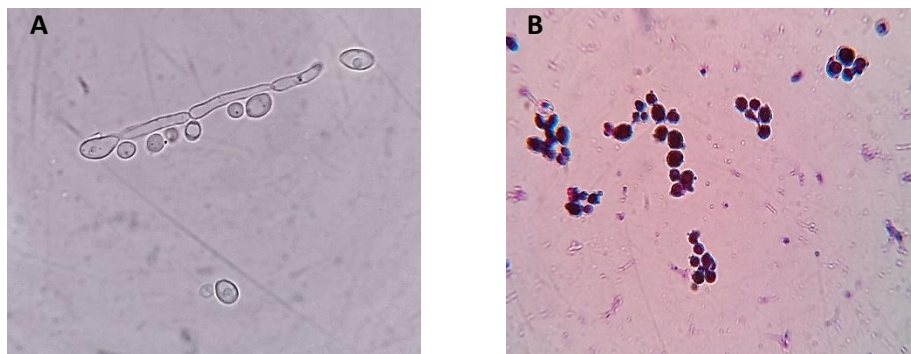


Figura 3. Características morfológicas de la cepa de *Candida albicans* con el número de referencia ATCC 66027. A) Inducción de pseudohifas en suero humano, característica de *C. albicans*. B) Tinción de Gram en donde se evidencia la presencia de estructuras levaduriformes.

### 2.2.3 Descongelación de la cepa.

Para la descongelación de las células se colocó un criovial del lote de trabajo en agua con una temperatura de 37°C durante 5min en agitación constante. Posteriormente se depositó el volumen del criovial a un tubo falcón de 50mL y se adicionaron 14mL de SSF estéril. Después se realizaron dos lavados centrifugando el tubo falcón durante 10min a 1500 rpm, decantando el sobrenadante obtenido después de la centrifugación, administrándose 15mL de SSF estéril antes de centrifugar nuevamente. Finalmente terminada la última centrifugación, se decantó el sobrenadante, se resuspendió el pellet obtenido en 3mL de SSF estéril y se homogenizo con la ayuda de un vórtex durante 10seg. Para el conteo de las levaduras se utilizó una cámara de Neubauer siguiendo el procedimiento antes descrito, sin embargo, para revisar la viabilidad de las levaduras, se realizaron las diluciones seriadas adicionando 10µL de azul de tripan al 0.4% a cada dilución. De tal manera que al observar las levaduras el microscopio las levaduras muertas se observaron en color azul y no se tomaron en cuenta para el ajuste de la concentración final de  $1 \times 10^6$ /mL levaduras.

Para la reactivación de las células se sembraron 3 placas con agar Sabouraud, depositando en cada caja 1mL de la suspensión descongelada. Las placas se dejaron incubando a 30°C durante 48h, pasado este tiempo, con ayuda de un aplicador de madera se realizaron pasajes de las células obtenidas a nuevas placas con agar Sabouraud. Durante este proyecto no se dejó que las células superaran los 15 pases, cuando se alcanzaba este número de pasajes, se descongelaba un nuevo criovial del lote de trabajo.

#### 2.2.4 Ajuste del inóculo.

Para los ratones adultos se utilizó una única concentración de levaduras la cual consistió en una suspensión de  $2 \times 10^8$  células contenidas en 50 $\mu$ L de acuerdo al modelo de infección cutánea establecido por Kaplan et al <sup>74</sup>. Para los ratones neonatos se realizó un ajuste con base a la concentración utilizada en los ratones adultos considerando el peso promedio de los ratones neonatos (1-3 gr,  $\bar{x}$ = 1.5 gr). De manera que se decidió aplicar de manera tópica 20 $\mu$ L, utilizando 3 cantidades distintas, una baja de  $12.5 \times 10^4$  lev, una intermedia de  $12.5 \times 10^6$  lev y una alta de  $12.5 \times 10^8$  lev.

### 2.3 Infección cutánea de los animales de experimentación.

#### 2.3.1 Anestesia.

Tanto los ratones adultos como los neonatos fueron anestesiados con una solución que contenía una mezcla de Ketamina y Xilacina. A cada animal se le administró de manera intraperitoneal 6 $\mu$ L de una solución stock, por cada gramo de peso. Dicha solución stock, contenía 25mg de Ketamina y 2.75mg de Xilacina aforados a un volumen de 1.5mL. Después de aproximadamente 3min los ratones no presentaban movimiento, se corroboró la efectividad de la anestesia mediante presión manual en las patas traseras. Se continuó con el protocolo de infección hasta que los animales no presentaran reacción alguna ante la presión manual.



### 2.3.2 Infección epicutánea con *Candida albicans*.

Para realizar la infección de los ratones adultos, se rasuro la piel de la zona del abdomen, se exfolio la epidermis expuesta con 15 pases de una lija de 220 granos para retirar aproximadamente el 50% del estrato corneo, se aplicó de manera tópica el inóculo previamente ajustado a  $2 \times 10^8$  lev en  $50 \mu\text{L}$ , se dejó secar por completo el inóculo aplicado antes de colocar a los animales nuevamente en su caja de alojamiento.

Para realizar la infección en los ratones neonatos, después de la anestesia se realizó la exfoliación de la piel del área abdominal con 20 pases de una lija de 220 granos para retirar aproximadamente del 50% del estrato corneo, se aplicó de manera tópica en la zona abdominal el inóculo correspondiente a cada grupo experimental, el ajuste del inóculo consistió en  $20 \mu\text{L}$  que contenían 3 cantidades diferentes de levaduras:  $12.5 \times 10^4$  lev,  $12.5 \times 10^6$  lev o  $12.5 \times 10^8$  lev.

En todos los experimentos realizados tanto para los ratones adultos como para los ratones neonatos se contó con 2 grupos adicionales: grupo control y grupo vehículo. Los grupos control consistieron en animales que no fueron anestesiados, exfoliados ni infectados. Los grupos vehículo consistieron en animales anestesiados, exfoliados y se les administró SSF estéril, en lugar del inóculo con *Candida albicans*.

## 2.4 Análisis histológico de la piel del área abdominal de los animales inoculados tópicamente con *Candida albicans*.

Posterior a la eutanasia de los animales de todos los grupos experimentales tanto de ratones adultos como neonatos, respectivamente se obtuvieron aproximadamente 2cm<sup>2</sup> y 0.5cm<sup>2</sup> de piel del área abdominal. La piel obtenida fue fijada inmediatamente en paraformaldehído al 4% durante 48h. Concluido este tiempo se realizó inclusión del tejido obtenido en bloques de parafina y se realizaron cortes de 5µm de grosor con micrótopo en el departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la UANL.

### 2.4.1 Inclusión del tejido.

La inclusión del tejido consistió en 3 etapas: deshidratación, aclaramiento e inclusión en parafina. Para la formación de los bloques de parafina se usó Parafina Paraplast Plus de la casa comercial Mc Cormick Scientific y se utilizaron moldes de acero inoxidable de 15x15x5mm. Antes de realizar el protocolo de inclusión se realizaron 3 lavados con SSF estéril para eliminar el exceso de paraformaldehído. El protocolo de inclusión se encuentra detallado en la Tabla 3.

<b>Etapa</b>	<b>Solución</b>	<b>Tiempo</b>
Deshidratación	Etanol 70%	12 h
	Etanol 70%	12 h
	Etanol 95%	1 h
	Etanol 95%	1 h
	Etanol 100%	2 h
Aclaramiento	Etanol 100% - Xileno 100% (1:1)	1 h
	Xileno 100%	1 h
Inclusión	Parafina	1 h
	Parafina	1 h
	Parafina	Formación del bloque

Tabla 3. Protocolo de inclusión de la piel del área abdominal de ratones adultos y neonatos.

#### 2.4.2 Tinción de las laminillas obtenidas.

Para realizar la tinción de las laminillas obtenidas es necesario desparafinar el tejido antes de hacer la tinción y el montaje de las muestras.

##### 2.4.2.1 Desparafinación del tejido.

Para la desparafinar las laminillas obtenidas, se siguió el procedimiento descrito en la Tabla 4.

<b>Etapas</b>	<b>Solución</b>	<b>Tiempo</b>
Desparafinación	Xileno 100%	10 min
	Xileno 100%	10 min
Hidratación	Etanol 100%	10 min
	Etanol 100%	10 min
	Etanol 96%	10 min
	Etanol 80%	10 min
	Agua destilada	10 min

Tabla 4. Protocolo de desparafinación de las laminillas.

#### 2.4.2.2 Tinción con ácido peryódico de Shift (PAS)

La tinción de PAS tiñe carbohidratos, como glucógeno, proteoglicano y glucoproteínas que normalmente se encuentran en la pared celular de *C. albicans*, razón por la cual esta tinción nos permite visualizar la presencia o ausencia de levaduras en el tejido. De manera que inmediatamente después de la desparafinación de las laminillas se procedió a teñirlas. Para la tinción se utilizó el kit comercial PrepStain (Tripath Imagin) y se siguió el protocolo descrito en la hoja de seguridad, detallado en la Tabla 5.

<b>Etapa</b>	<b>Solución</b>	<b>Tiempo</b>
Tinción	Agua destilada	Enjuagar
	Ácido peryódico	5 min
	Agua de la llave	3 min
	Agua destilada	Enjuagar
	Reactivo de Shift	15 min
	Agua de la llave	3 min
	Agua destilada	Enjuagar
	Hematoxilina Gil III	2 min
	Agua de la llave	3min
	Deshidratación	Etanol 70%
Etanol 70%		1 min
Etanol 96%		1 min
Etanol 96%		1 min
Etanol 100%		1 min
Etanol 100%		1 min
Xileno 100%		5 min
Xileno 100%		5 min

Tabla 5. Protocolo para la tinción de PAS.

Finalizada la tinción se montaron las muestras con glicerol al 70% y se observaron en el microscopio con los objetivos de 40x y 100x.

## 2.5 Ensayo de Hipersensibilidad Tardía.

Para este ensayo se siguió el protocolo de infección anteriormente descrito en la sección 2.3 de este capítulo. A la par se contaron con dos grupos adicionales tanto para los ratones adultos como para los ratones neonatos: grupo control que consistió en ratones no infectados y el grupo vehículo, ratones a los que se les aplicó SSF estéril en el abdomen en lugar del inoculo ajustado.

Cuatro semanas después la infección se realizó el reto, el cual consistió en la administración de 10µl de una suspensión de  $1 \times 10^7$  levaduras muertas por calor

en la parte dorsal de la oreja de todos los ratones de todos los grupos experimentales: ratones problema, ratones control, ratones vehículo.

Previo a la administración de las levaduras se midió el grosor de las orejas de todos los ratones de los grupos con un micrómetro digital (Mitutoyo). 24h y 48h después de la administración de la suspensión de reto se midió nuevamente el grosor de las orejas. Con los datos obtenidos se determinó el incremento en el grosor y se reportaron las diferencias en mm.

## 2.6 Obtención de láminas epidérmicas.

Se obtuvo la piel del área abdominal de los ratones después del sacrificio. Para los ratones adultos se obtuvo un área aproximada de  $2\text{cm}^2$  y para los ratones neonatos de  $0.5\text{cm}^2$ . A la piel obtenida se le quitó la grasa subcutánea de manera mecánica con el filo de un bisturí estéril y posteriormente se incubó la piel en ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0.5M con pH de 7.4 durante 2h a  $37^\circ\text{C}$ . La dermis se colocó orientada hacia abajo, para favorecer el contacto del tejido con el EDTA. Finalmente se separó la epidermis por medio de tracción mecánica con la ayuda del lomo de un bisturí.

Las láminas epidérmicas obtenidas se cortaron en cuadros pequeños de aproximadamente  $5\text{mm}^2$  y se lavaron 3 veces con SSF estéril para eliminar el exceso de EDTA. Después de este procedimiento las láminas se fijaron durante 24h con paraformaldehído al 4% para la evaluación de la morfología celular y

determinación de la actividad de ATPasa en las células de Langerhans, o bien, durante 20min con acetona fría para las inmunohistoquímicas.

## 2.7 Actividad de ATPasa de las células de Langerhans.

Las láminas epidérmicas obtenidas se lavaron 3 veces con SSF estéril para eliminar el paraformaldehído utilizado para fijar el tejido. Se preparó la solución de reacción justo antes del procedimiento experimental y se incubaron las láminas durante 2h a 37°C. La mezcla de reacción se prepara con 21 ml del buffer Trizmal más 0.005g del sustrato para la enzima ATP, además se adiciona gota a gota 5mL de sulfuro de magnesio (0.25g de  $MgSO_4$  disuelto previamente en 5mL de agua destilada) y al final, gota a gota 5mL de nitrato de plomo (0.1g de  $PbNO_3$  disuelto previamente en 5mL de agua destilada).

Pasado el tiempo de incubación, se realizan 3 lavados con SSF estéril y se revela la reacción con sulfuro de amonio al 50%. La reacción se detiene con SSF estéril y 3 lavados con agua destilada. Finalmente, las láminas reveladas se montaron con glicerol al 70% y se observaron en el microscopio con los objetivos de 40x y 100x.

## 2.8 Inmunohistoquímica.

Las láminas epidérmicas se lavaron 3 veces con SSF estéril, para eliminar la acetona utilizada para fijar el tejido. Como anticuerpo primario se utilizó CD86 (BioLegend). El anticuerpo secundario utilizado fue IgG anti-rata biotinilado y la solución R.T.U. Horseradish Peroxidase Streptavidin de Vector Laboratories. Para revelar se usó el cromógeno azul-gris (Peroxidase Substrate SK4700) de Vector Laboratories. Como control de isotipo del sistema se utilizó IgG de rata [1µg/mL]. El protocolo que se realizó se encuentra detallado en la Tabla 6.

<b>Etapas</b>	<b>Solución</b>	<b>Tiempo</b>
Bloqueo peroxidasa endógena	Peróxido de hidrógeno 3%	1 h
Bloqueo uniones inespecíficas	Suero humano en PBS (1:300)	1 h
	Lavar con PBS	5 min (3x)
Incubación Ab primario	Anticuerpo primario (1:800)	1 h
	Lavar con PBS	5 min (3x)
Amplificación con biotina	Anticuerpo secundario (1:500)	45 min
	Lavar con PBS	5 min (3x)
	Estreptavidina	25 min
Revelado	Lavar con PBS	5 min (3x)
	Cromógeno azul-gris	8 – 20 min

Tabla 6. Protocolo llevado a cabo para la inmunohistoquímica de las láminas epidérmicas.

Finalizado el revelado, las láminas epidérmicas se montaron en un portaobjetos con glicerol al 70% y se analizaron en el microscopio con los objetivos de 40x y 100x.



## 2.9 Análisis estadístico.

Los datos obtenidos en este estudio se analizaron con el programa GraphPadPrism 6. Los valores están expresados como la media +/- y desviación estándar de los resultados, el análisis estadístico se realizó la prueba t-student para los datos obtenidos del ensayo de UFCs e Hipersensibilidad Tardía. La significancia fue aceptada para valores de  $P < 0.05$ .

## **CAPITULO 3**

### **RESULTA DOS**

#### **3.1 Establecimiento del modelo murino de candidosis cutánea neonatal.**

##### **3.1.1 Reducción del estrato corneo de epidermis de ratones BALB/c.**

Para determinar el número de pases que se realizarían con la lija de 220 granos sobre la epidermis del abdomen en el proceso de exfoliación tanto de los ratones adultos como de los neonatos, se realizaron experimentos con diferente número de pases en el abdomen de los animales. En la Figura 4 se muestran imágenes representativas de los resultados de estos experimentos.

El panel superior corresponde a los cortes histológicos transversales de la piel exfoliada del área abdominal de los ratones adultos. Se observa en la Figura 4A el grosor propio del estrato corneo para un animal adulto de 4 semanas de edad. La Figura 4B corresponde a la piel del abdomen que se obtiene después de realizar 15 pases con la lija. Las Figuras 4C y 4D corresponden al estado de la piel que se obtiene tras 20 y 30 pases con la lija, respectivamente, podemos observar que en ambos casos ya no se aprecia el estrato corneo ya que el número de pases realizados lo desprende por completo.

En el panel inferior se muestran las imágenes correspondientes a los cortes histológicos transversales de la piel del área abdominal exfoliada de los ratones

neonatos, en la Figura 4E podemos observar el grosor del estrato corneo de un ratón de 0 días de edad, en la Figura 4F se aprecia el estado de la piel abdominal de los animales después de realizar el proceso de exfoliación con 15 pases, se observó que con este número de pases el estrato corneo permanece con un grosor similar al del control. En la Figura 4G, tras realizar la exfoliación con 20 pases observamos mayor reducción del estrato corneo. En la Figura 4H se muestra el estrato corneo después de 30 pases, con este número de pases se logra disminuir este estrato casi en su totalidad. En los ratones neonatos, con 15 pases no fue posible una reducción de aproximadamente el 50%. En los ratones adultos la exfoliación de más de 15 pases genera la reducción del estrato corneo casi en su totalidad, en los ratones neonatos con 30 pases el estrato corneo también se reduce casi en su totalidad y esto nos dificultaría obtener láminas epidérmicas para los ensayos posteriores. Debido a los resultados obtenidos, decidimos utilizar la exfoliación de 15 pases para los ratones adultos y 20 pases para neonatos.

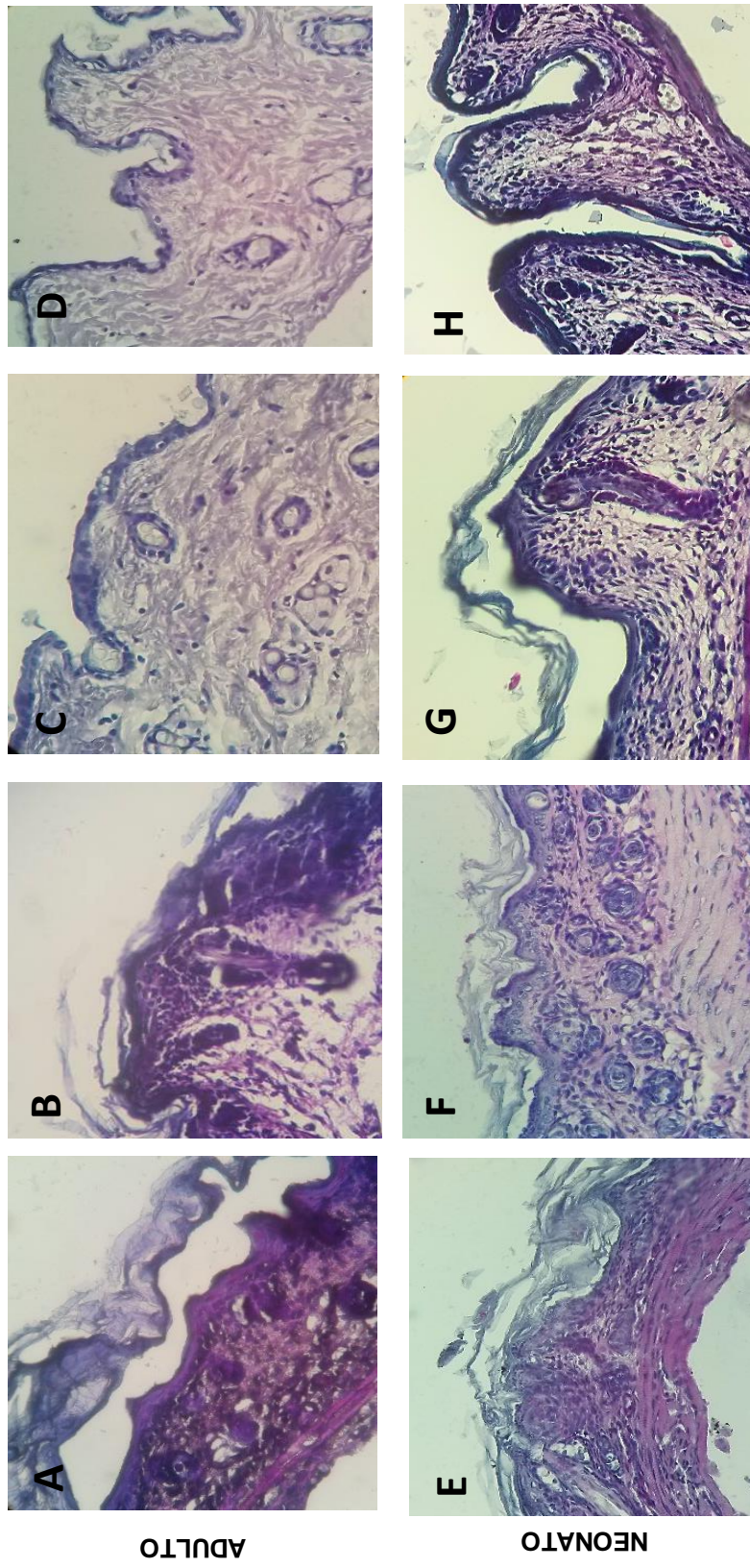


Figura 4. Reducción del estrato corneo de la piel del área abdominal de ratones BALB/c. Tinción de PAS de cortes histológicos obtenidos de la piel del abdomen de ratones adultos y neonatos. Piel abdominal de ratón adulto con: A) Sin exfoliar, B) Exfoliado 15 pases, C) Exfoliado 20 pases, D) Exfoliado 30 pases. Piel abdominal de ratón neonato con: E) Sin exfoliar, F) Exfoliado 15 pases, G) Exfoliado 20 pases, H) Exfoliado 30 pases. Imágenes representativas de 2 experimentos independientes. Cada experimento contó con 3 ratones por condición experimental. Las fotografías fueron tomadas con el objetivo de 40x.

### 3.1.2 Infección de ratones BALB/c.

Para infectar los ratones adultos, se aplicaron de manera tópica 50µL que contenían  $2 \times 10^8$  levaduras de *C. albicans*. En el panel superior de la Figura 5 se muestran las lesiones generadas en la piel del área abdominal de los ratones adultos a las 24h y 48h posteriores al proceso de exfoliación e infección (hpi). En la Figura 5A observamos la piel de un ratón adulto del grupo control, es decir sin procedimiento alguno. En la Figura 5B se muestra la piel de un ratón que perteneció al grupo vehículo, es decir, del grupo al que se le realizó la exfoliación con 15 pases y aplicación tópica de SSF estéril. La piel del área abdominal de todos los ratones de este grupo presentó ligero eritema. En la Figura 5C se aprecia la piel del área abdominal de un ratón que pertenece al grupo problema 24hpi con 15 pases y aplicación tópica *C. albicans*. La piel de este grupo generó escamas que no se encontraron en el grupo vehículo ni control. La Figura 5D corresponde a la piel del abdomen de un ratón del grupo problema 48hpi con 15 pases. Pudimos apreciar la presencia de escamas a este tiempo postinfección, algunas de estas escamas se desprendían con facilidad del abdomen de los animales, sin embargo la piel no sangró a pesar de presentar eritema intenso.

Para realizar la infección en los ratones neonatos se aplicaron 20µL de manera tópica y se utilizaron 3 cantidades de levaduras distintas:  $12.5 \times 10^4$  lev,  $12.5 \times 10^6$  lev y  $12.5 \times 10^8$  lev. El panel inferior de la Figura 5 corresponde a las lesiones generadas en los ratones neonatos como resultado del proceso de infección. En la Figura 5E se muestra un ratón neonato del grupo control. La Figura 5F corresponde a un ratón neonato del grupo vehículo a las 24hpi con 20 pases. No

hay diferencia visual en cuanto a la coloración y textura de la piel en comparación con la del grupo control. En la Figura 5G se observa a un ratón neonato que perteneció al grupo problema de la cantidad  $12.5 \times 10^6$  lev, a las 24hpi. En comparación con el grupo control, la piel del área abdominal no presento cambios en coloración ni textura. En la Figura 5F podemos ver a un ratón neonato que perteneció al grupo problema de la cantidad  $12.5 \times 10^6$  lev, 48hpi. En comparación con el grupo control y vehículo, no existieron diferencias en la coloración ni textura de la piel.

En general los ratones neonatos, visualmente no presentaron lesiones tan severas como las que se pudieron observar en los ratones adultos, esto podría deberse a que la tonalidad rojiza de la piel de los ratones neonatos, enmascara las lesiones generadas y no permite observarlas a simple vista.

De tal manera que para las cantidades  $12.5 \times 10^4$  lev y  $12.5 \times 10^8$  lev, los resultados fueron similares a los observados con la cantidad de  $12.5 \times 10^6$  lev: los ratones neonatos de los grupos control, vehículo y problema, no presentaron diferencia visual entre ellos, ni en la tonalidad ni en la textura de la piel del área abdominal.

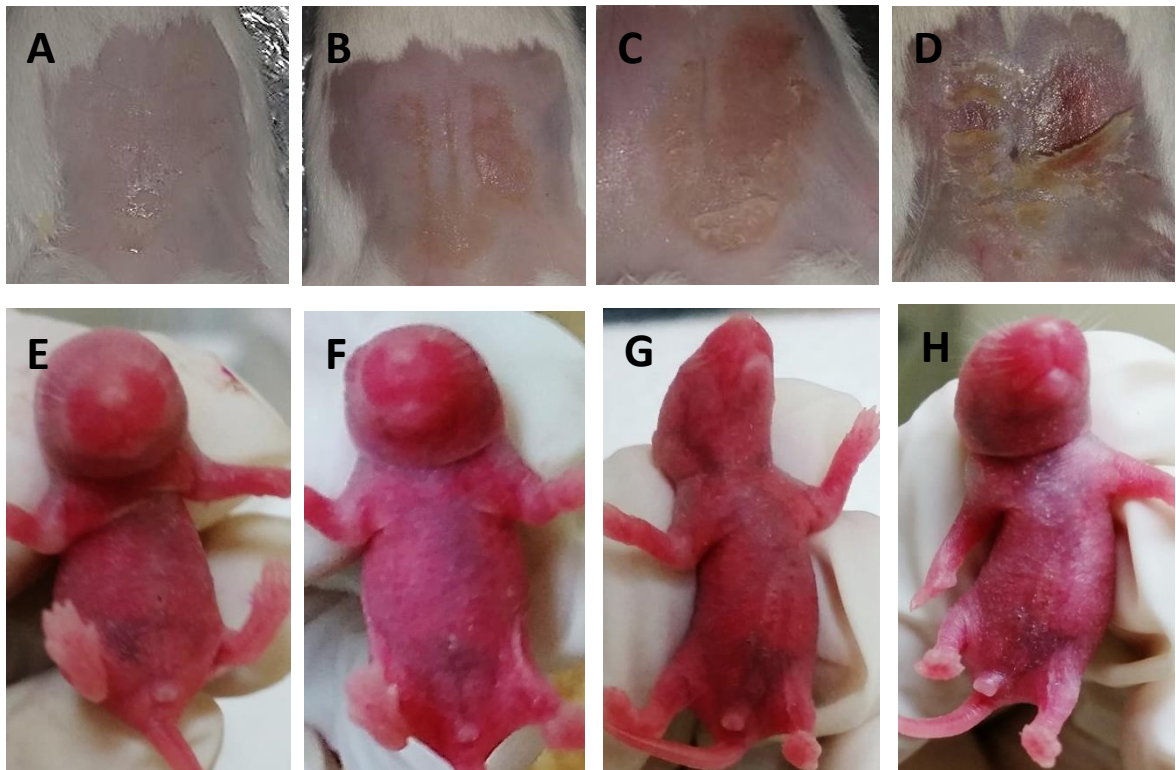


Figura 5. Lesiones generadas durante el protocolo de infección de los animales de experimentación. Panel superior: ratones BALB/c adultos. A) Control. B) Vehículo 24 hpi. C) Problema 24 hpi. D) Problema 48 hpi. Panel inferior: ratones BALB/c neonatos. E) Control. F) Vehículo 24 hpi. G) Problema 24 hpi. H) Problema 48 hpi. Fotografías representativas de 3 experimentos independientes. Cada experimento conto con 5 ratones por condición experimental.

### 3.1.3 Colonización e invasión de la piel de ratones BALB/c por levaduras de *Candida albicans*

Para evidenciar la infección cutánea con *Candida albicans* en ratones neonatos y adultos se realizaron cortes histológicos de la piel inoculada con levaduras. A las laminillas obtenidas se les realizó tinción de Ácido periódico de Shift (PAS) para evidenciar el grado de colonización e invasión en el tejido.

En la Figura 6 se muestran los resultados de los experimentos con los ratones adultos. La Figura 6A corresponde al grupo control, podemos apreciar la piel en su estado natural. La Figura 6B ejemplifica al grupo vehículo. Se puede observar que tras la exfoliación el estrato corneo sufre desprendimiento de la epidermis. Las Figuras 6C y 6D nos muestran la piel de animales adultos a las 24hpi. En la Figura 6C podemos observar la presencia de levaduras embebidas en la zona apical del estrato corneo y pseudohifas penetrando la epidermis, mientras que en la Figura 6D apreciamos que las pseudohifas no se limitan únicamente a la epidermis, podemos identificarlas también en la dermis. Las Figuras 6E y 6F corresponden a la piel de animales adultos a las 48hpi. En la Figura 6E las levaduras observadas se encuentran embebidas en la parte superior del estrato corneo, las pseudohifas se encuentran invadiendo la epidermis, en una disposición similar a las apreciadas a las 24hpi. Sin embargo en la Figura 6F se pueden apreciar estructuras levaduriformes y pseudohifas invadiendo la parte basal de la dermis.



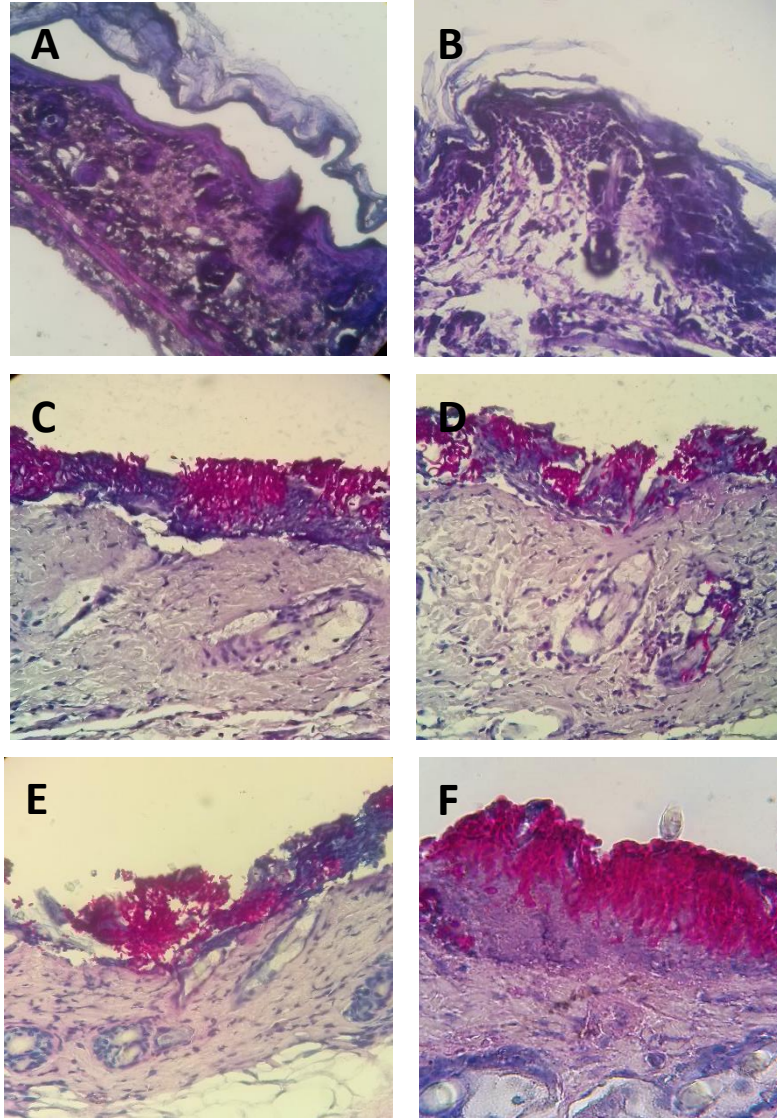


Figura 6. *Candida albicans* coloniza e invade la piel de los ratones adultos. Tinción de PAS en cortes histológicos obtenidos de la piel del abdomen de ratones adultos. A) Grupo control. B) Grupo vehículo. C) y D) Grupo problema, 24 hpi. E) y F) Grupo problema, 48 hpi. Imágenes representativas de 3 experimentos independientes. Cada experimento se realizó con 5 ratones por condición experimental. Fotografías tomadas con el objetivo de 40x.

En la Figura 7 muestro resultados de los experimentos con los ratones neonatos. La Figura 7A es representativa del grupo control, muestra el estado natural de la piel de los ratones neonatos. La Figura 7B corresponde al grupo vehículo, se observa solo reducción de estrato corneo. En las Figuras 7C y 7D apreciamos el grupo problema para la cantidad de  $12.5 \times 10^4$  lev a las 24 hpi. En ambas fotografías podemos ver que las levaduras se restringen a la zona apical del estrato corneo, en ningún campo analizado observamos pseudohifas. La Figura 7E corresponde al grupo problema para la cantidad de  $12.5 \times 10^4$  lev a las 48 hpi. La inducción de pseudohifas se limita al estrato corneo de la piel de los ratones neonatos. Las Figuras 7F y 7G son representativas del grupo problema de la cantidad de  $12.5 \times 10^6$  lev a las 24 hpi. Podemos apreciar que a este momento postinfección en algunas zonas del abdomen predomina la presencia de levaduras restringidas en el estrato corneo como se ve en la Figura 7F, mientras que en otras zonas del abdomen como se muestra en la Figura 7G, ya se observan pseudohifas invadiendo la epidermis. La Figura 7H muestra los resultados del grupo problema para la cantidad de  $12.5 \times 10^6$  lev a las 48 hpi. Se puede apreciar que la inducción de pseudohifas ya penetra los estratos granuloso y basal de la epidermis. En las Figuras 7I y 7J observamos los cortes histológicos del grupo problema de la cantidad de  $12.5 \times 10^8$  lev a las 24 hpi. Las levaduras e inducción de pseudohifas en ambas fotografías invaden la epidermis de los ratones neonatos. La Figura 7K corresponde al grupo problema para la cantidad de  $12.5 \times 10^8$  lev a las 48 hpi. Podemos ver que las pseudohifas se encuentran en dermis reticular. Con estos resultados demostramos que *C. albicans* es capaz de invadir las capas de la piel de los ratones neonatos.

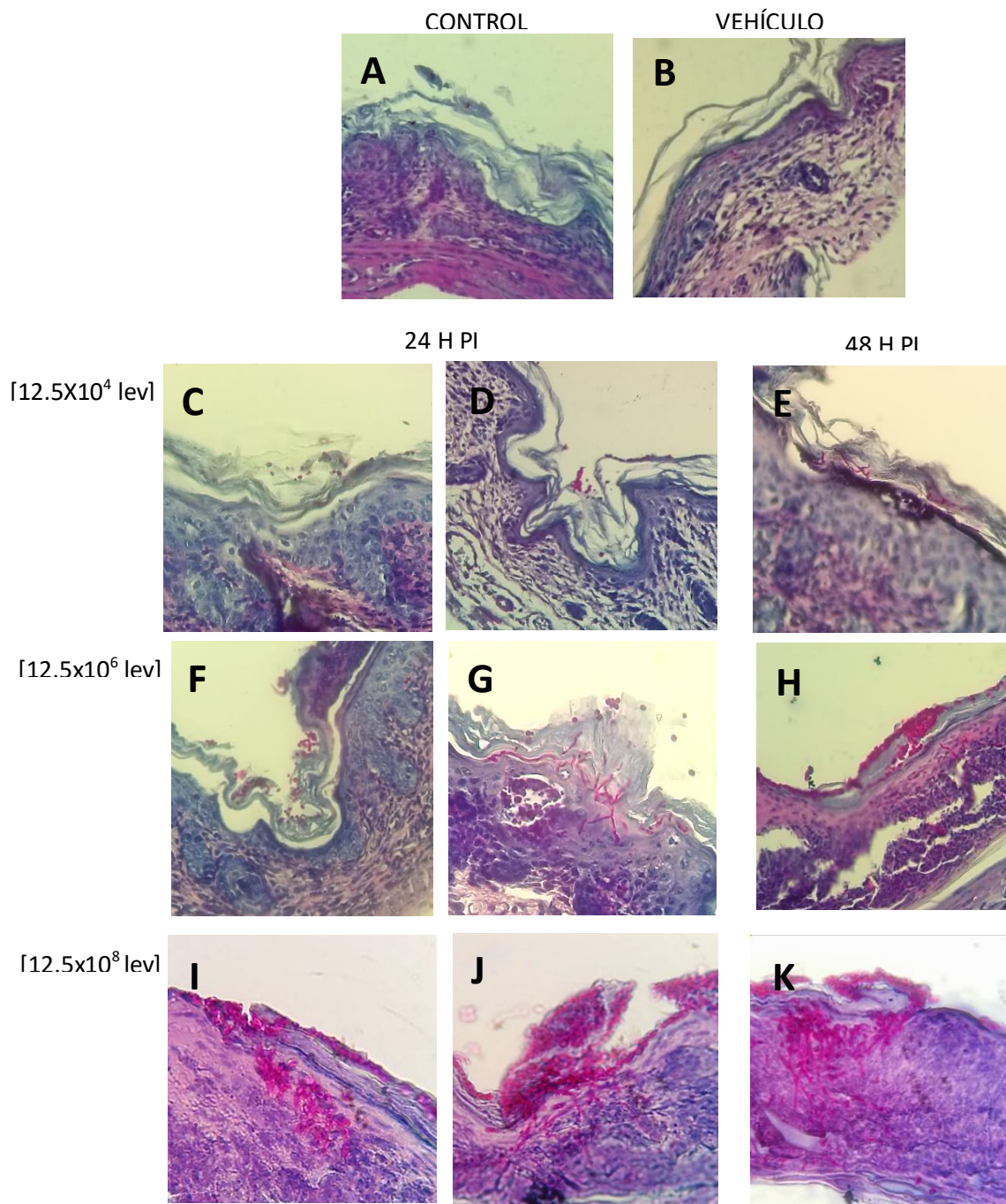


Figura 7. *Candida albicans* coloniza e invade la piel de los ratones neonatos. Tinción de PAS en cortes histológicos obtenidos de la piel del abdomen de los ratones neonatos. A) Grupo control. B) Grupo vehículo. C) y D) Grupo problema, 12.5x10<sup>4</sup> lev, 24 hpi. E) Grupo problema, 12.5x10<sup>4</sup> lev, 48 hpi. F) y G) Grupo problema, 12.5x10<sup>6</sup> lev, 24 hpi. H) Grupo problema, 12.5x10<sup>6</sup> lev, 48 hpi. I) y J) Grupo problema, 12.5x10<sup>8</sup> lev, 24 hpi. E) Grupo problema, 12.5x10<sup>8</sup> lev, 48 hpi. Imágenes representativas de 3 experimentos independientes. Cada experimento se realizó con 5 ratones por condición experimental. Fotografías tomadas con el objetivo de 40x.

Después de observar que *C. albicans* era capaz de establecerse en la piel de los ratones adultos y neonatos se decidió determinar la carga fúngica mediante la determinación de unidades formadoras de colonias (UFC) en los distintos grupos experimentales.

Se decidió aplicar yodo de manera superficial a un grupo de ratones adultos y a otro de ratones neonatos, con el fin de eliminar aquellas levaduras que no penetran el tejido y obtener una cuenta de aquellas estructuras que se encuentran invadiendo la piel de los animales. Mientras que la finalidad de los grupos sin yodo era el obtener la cuenta de la carga fúngica total.

En la Tabla 7 se detallan los resultados de la carga fúngica de los animales adultos. La carga fúngica fue de cero para los grupos control y vehículo, por lo que no se muestran en la tabla. Aunque en los cortes histológicos se apreció un incremento en el número de estructuras fúngicas con el paso del tiempo, la estadística no fue significativa para el grado de colonización e invasión a los tiempos postinfección analizados.

UFC/gr de piel en ratones adultos				
	24h PI	48h PI	P value	SIG
<b>COLONIZACIÓN</b>	20.4x10 <sup>6</sup> (2.7 - 273.4 x10 <sup>6</sup> )	125.8x10 <sup>6</sup> (21.6 -318.3 x10 <sup>6</sup> )	0.3736	ns
<b>INVASIÓN</b>	5.9x10 <sup>6</sup> (3 - 37 x10 <sup>6</sup> )	4.5x10 <sup>6</sup> (4.1 - 10.5 x10 <sup>6</sup> )	0.0879	ns

Tabla 7. Carga fúngica de la piel del área abdominal de ratones adultos infectados con  $2 \times 10^8$  lev. Entre paréntesis se muestran los rangos obtenidos de UFC/gr. Se realizaron 3 experimentos de manera independiente. Cada experimento contó con 5 ratones por condición experimental. Se utilizó la prueba estadística t-student para comparar entre los diferentes grupos. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ , ns: no significativo.

En la Tabla 8 se detallan los resultados obtenidos de la carga fúngica de los ratones neonatos. La carga fúngica fue de cero para los grupos control y vehículo, por lo que no se muestran en la tabla. Los resultados estadísticamente significativos fueron los correspondientes a la colonización cuando se aplicaron  $12.5 \times 10^6$  lev a los animales, se correlacionaron con los cortes histológicos en donde utilizamos esta cantidad de levaduras se observó una gran cantidad de estas incrustadas en el estrato corneo de la piel del abdomen de los ratones neonatos. Los datos de la invasión que resultaron estadísticamente significativos, fueron los pertenecientes a la aplicación de  $12.5 \times 10^4$  lev, estos resultados se correlacionaron directamente con los cortes histológicos, en donde obtuvimos ausencia de pseudohifas en el tejido de la piel del abdomen de los ratones neonatos cuando se utilizó esta cantidad de levaduras.

UFC/gr de piel en ratones neonatos					
concentración\ tiempo	24h PI	48h PI	P value	SIG	
COLONIZACIÓN	12.5x10 <sup>4</sup>	79x10 <sup>3</sup> (31.5 - 86.3 x10 <sup>3</sup> )	154.3x10 <sup>3</sup> (114.3 - 325.5 x10 <sup>3</sup> )	0.2475	ns
	12.5x10 <sup>6</sup>	86x10 <sup>4</sup> (60 - 140 x10 <sup>4</sup> )	82x10 <sup>4</sup> (75 - 109 x10 <sup>4</sup> )	0.0176	*
	12.5x10 <sup>8</sup>	130x10 <sup>6</sup> (18.7 -166 x10 <sup>6</sup> )	255.8x10 <sup>6</sup> (21 - 372.8 x10 <sup>6</sup> )	0.201	ns
INVASIÓN	12.5x10 <sup>4</sup>	20.5x10 <sup>3</sup> (17 - 29.3 x10 <sup>3</sup> )	34.3x10 <sup>3</sup> (26.2 - 39.8 x10 <sup>3</sup> )	0.0151	*
	12.5x10 <sup>6</sup>	171.5x10 <sup>3</sup> (120.8 - 300 x10 <sup>3</sup> )	217.4x10 <sup>3</sup> (136.8 - 532 x10 <sup>3</sup> )	0.331	ns
	12.5x10 <sup>8</sup>	15x10 <sup>6</sup> (2 - 24.7 x10 <sup>6</sup> )	2.6x10 <sup>6</sup> (2 - 3.5 x10 <sup>6</sup> )	0.22	ns

Tabla 8. Carga fúngica de la piel del área abdominal de ratones neonatos infectados con 12.5x10<sup>4</sup> lev, 12.5x10<sup>6</sup> lev y 12.5x10<sup>8</sup> lev. Entre paréntesis se muestran los rangos obtenidos de UFC/gr. Se realizaron 3 experimentos de manera independiente. Cada experimento contó con 5 ratones por condición experimental. Se utilizó la prueba estadística t-student para comparar entre los diferentes grupos. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ , ns: no significativo.

La Tabla 9 corresponde a las comparaciones realizadas entre nuestros animales adultos con los animales neonatos a las 24 hpi. Podemos ver que la cantidad de levaduras recuperadas tanto con el protocolo de colonización como con el de invasión es significativamente diferente entre estos dos grupos, a excepción de la cantidad de levaduras de 12.5x10<sup>8</sup> lev, en donde para ningún caso (colonización o invasión) se obtuvo diferencia significativa, esto debido a que la cantidad de levadura administrada no difiere mucho entre adultos y neonatos.

UFC/gr de piel en ratones BALB/c a las 24 HPI					
concentración\ tiempo	Neonatos	Adultos	P value	SIG	
<b>COLONIZACIÓN</b>	12.5x10 <sup>4</sup>	79x10 <sup>3</sup> (31.5 - 86.3 x10 <sup>3</sup> )	20.4x10 <sup>6</sup> (2.7 - 273.4 x10 <sup>6</sup> )	< 0.0001	****
	12.5x10 <sup>6</sup>	86x10 <sup>4</sup> (60 - 140 x10 <sup>4</sup> )	20.4x10 <sup>6</sup> (2.7 - 273.4 x10 <sup>6</sup> )	< 0.0001	****
	12.5x10 <sup>8</sup>	130x10 <sup>6</sup> (18.7 - 16 x10 <sup>6</sup> )	20.4x10 <sup>6</sup> (2.7 - 273.4 x10 <sup>6</sup> )	0.4111	ns
<b>INVASIÓN</b>	12.5x10 <sup>4</sup>	20.5x10 <sup>3</sup> (17 - 29.3 x10 <sup>3</sup> )	5.9x10 <sup>6</sup> (3 - 37 x10 <sup>6</sup> )	< 0.0001	****
	12.5x10 <sup>6</sup>	171.5x10 <sup>3</sup> (120.8 - 300 x10 <sup>3</sup> )	5.9x10 <sup>6</sup> (3 - 37 x10 <sup>6</sup> )	< 0.0001	****
	12.5x10 <sup>8</sup>	15x10 <sup>6</sup> (2 - 24.7 x10 <sup>6</sup> )	5.9x10 <sup>6</sup> (3 - 37 x10 <sup>6</sup> )	0.5778	ns

Tabla 9. Carga fúngica de la piel del área abdominal de ratones adultos y neonatos a las 24 hpi. Entre paréntesis se muestran los rangos obtenidos de UFC/gr. Se realizaron 3 experimentos de manera independiente. Cada experimento contó con 5 ratones por condición experimental. Se utilizó la prueba estadística t-student para comparar entre los diferentes grupos. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ , ns: no significativo.

En la tabla 10 se muestran las comparaciones realizadas entre animales adultos y neonatos a las 48 hpi. En el mismo contexto que la comparación realizada a las 24 hpi, se observa que la cantidad de levaduras recuperadas con ambos protocolos (colonización e invasión) es significativamente diferente entre animales adultos y neonatos, a excepción de la cantidad de levaduras de  $12.5 \times 10^8$  lev, en donde no se obtuvo diferencia significativa probablemente debido a que la cantidad de levadura administrada no difiere mucho entre sí.

UFC/gr de piel en ratones BALB/c a las 48 HPI					
concentración\ tiempo	Neonatos	Adultos	P value	SIG	
<b>COLONIZACIÓN</b>	12.5x10 <sup>4</sup>	154.3x10 <sup>3</sup> (114.3 - 325.5 x10 <sup>3</sup> )	125.8x10 <sup>6</sup> (21.6 -318.3 x10 <sup>6</sup> )	< 0.0001	****
	12.5x10 <sup>6</sup>	82x10 <sup>5</sup> (75 - 1099 x10 <sup>4</sup> )	125.8x10 <sup>6</sup> (21.6 -318.3 x10 <sup>6</sup> )	0.0003	***
	12.5x10 <sup>8</sup>	255.8x10 <sup>6</sup> (21 - 372.8 x10 <sup>6</sup> )	125.8x10 <sup>6</sup> (21.6 -318.3 x10 <sup>6</sup> )	0.8275	ns
<b>INVASIÓN</b>	12.5x10 <sup>4</sup>	34.3x10 <sup>3</sup> (26.2 - 39.8 x10 <sup>3</sup> )	4.5x10 <sup>6</sup> (4.1 - 10.5 x10 <sup>6</sup> )	< 0.0001	****
	12.5x10 <sup>6</sup>	217.4x10 <sup>3</sup> (136.8 - 532 x10 <sup>3</sup> )	4.5x10 <sup>6</sup> (4.1 - 10.5 x10 <sup>6</sup> )	0.003	**
	12.5x10 <sup>8</sup>	2.6x10 <sup>6</sup> (2 - 3.5 x10 <sup>6</sup> )	4.5x10 <sup>6</sup> (4.1 - 10.5 x10 <sup>6</sup> )	0.0334	*

Tabla 10. Carga fúngica de la piel del área abdominal de ratones adultos y neonatos a las 48 hpi. Entre paréntesis se muestran los rangos obtenidos de UFC/gr. Se realizaron 3 experimentos de manera independiente. Cada experimento contó con 5 ratones por condición experimental. Se utilizó la prueba estadística t-student para comparar entre los diferentes grupos. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ , ns: no significativo.

Después de realizar comparaciones entre los animales adultos y los animales neonatos, nos interesaba ver si existía diferencia entre las concentraciones administradas a los ratones neonatos. En las tablas 11 y 12 se detallan esos resultados. En la Tabla 11 podemos observar los resultados obtenidos para la carga fúngica a las 24 hpi. Se puede observar que existe diferencia significativa entre cada una de las concentraciones aplicadas.



UFC/gr de piel en ratones neonatos BALB/c a las 24 HPI			
		12.5x10 <sup>6</sup>	12.5x10 <sup>8</sup>
<b>COLONIZACIÓN</b>	12.5x10 <sup>4</sup>	*	****
	12.5x10 <sup>6</sup>	----	****
<b>INVASIÓN</b>	12.5x10 <sup>4</sup>	**	****
	12.5x10 <sup>6</sup>	----	***

Tabla 11. Carga fúngica recuperada a las 24 hpi de la piel del área abdominal de ratones neonatos infectados con 12.5x10<sup>4</sup> lev, 12.5x10<sup>6</sup> lev y 12.5x10<sup>8</sup> lev. Entre paréntesis se muestran los rangos obtenidos de UFC/gr. Se realizaron 3 experimentos de manera independiente. Cada experimento contó con 5 ratones por condición experimental. Se utilizó la prueba estadística t-student para comparar entre los diferentes grupos. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ , ns: no significativo.

En la Tabla 12 se detallan los resultados obtenidos para la comparación entre las diferentes concentraciones utilizadas en los ratones neonatos a las 48 hpi. Existe diferencia significativa entre las concentraciones utilizadas, a excepción de comparación realizada entre las cantidades de 12.5x10<sup>6</sup>lev y 12.5x10<sup>8</sup> lev para el protocolo de invasión. Esto puede ser debido a que la las levaduras proliferaron de tal manera que las pseudohifas alcanzaron niveles similares en el tejido.

UFC/gr de piel en ratones neonatos BALB/c a las 48 HPI			
		12.5x10 <sup>6</sup>	12.5x10 <sup>8</sup>
<b>COLONIZACIÓN</b>	12.5x10 <sup>4</sup>	**	****
	12.5x10 <sup>6</sup>	----	***
<b>INVASIÓN</b>	12.5x10 <sup>4</sup>	**	***
	12.5x10 <sup>6</sup>	----	ns

Tabla 12. Carga fúngica recuperada a las 48 hpi de la piel del área abdominal de ratones neonatos infectados con 12.5x10<sup>4</sup> lev, 12.5x10<sup>6</sup> lev y 12.5x10<sup>8</sup> lev. Entre paréntesis se muestran los rangos obtenidos de UFC/gr. Se realizaron 3 experimentos de manera independiente. Cada experimento contó con 5 ratones por condición experimental. Se utilizó la prueba estadística t-student para

comparar entre los diferentes grupos. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ , ns: no significativo.

Con estos datos demostramos que al recuperar levaduras vivas de la piel del área abdominal tanto de ratones adultos como ratones neonatos, *C. albicans* se mantiene viable durante los tiempos de postinfección analizados.

3.2 Análisis *in situ* de la migración y activación de las células de Langerhans en la epidermis de ratones BALB/c infectados con *C. albicans*.

3.2.1 Análisis morfológico de las células de Langerhans de ratones BALB/c recién nacidos.

Posterior al establecimiento de la infección en los animales, se analizaron láminas epidérmicas de la piel de ratones adultos y neonatos, para evaluar la morfología de las CL (células de Langerhans) a las 24 hpi y 48 hpi.

En la Figura 8 se muestran imágenes representativas de los resultados de los experimentos con ratones adultos. La Figura 8A corresponde al grupo control, podemos apreciar la morfología típica de las CL en un ratón de 4 semanas de edad: cada célula posee múltiples dendritas con ramificaciones y el soma definido. En la Figura 8B observamos las CL tras el proceso de exfoliación. En comparación con el grupo control, podemos ver que en algunas células el soma

va perdiendo su estructura definida, además las dendritas son más cortas y con menos ramificaciones. La Figura 8C es representativa de los animales adultos a las 24hpi, las dendritas de las CL son más cortas en comparación con el grupo control. En cuanto al soma, visualmente no se aprecian diferencias entre los animales de este grupo y los animales del grupo control. En la Figura 8D se muestran los resultados de los animales adultos a las 48hpi. A este tiempo postinfección, el soma de las células no conserva una estructura definida, las dendritas son más cortas y las ramificaciones por dendrita parecen disminuir en comparación con el grupo control.

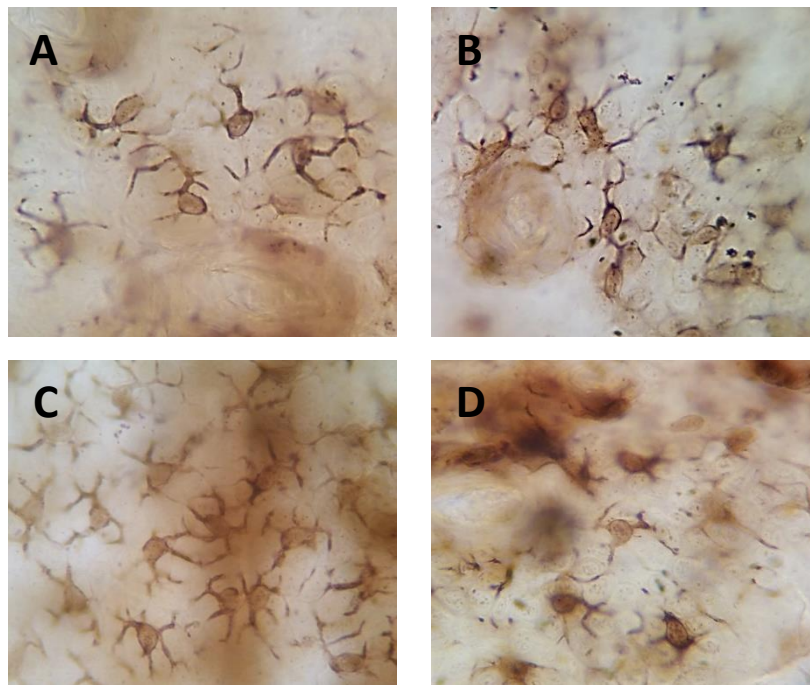


Figura 8. Morfología de las células de Langerhans de la piel de ratones adultos. Reacción de ADPasa en láminas epidérmicas obtenidas de la piel del abdomen de ratones adultos. A) Grupo control. B) Grupo vehículo. C) Grupo problema, 24 hpi. D) Grupo problema, 48 hpi. Imágenes representativas de 3 experimentos independientes. Cada experimento con se realizó con 5 ratones por condición experimental. Fotografías tomadas con el objetivo de 100x.

La Figura 9 corresponde a los resultados de los experimentos con los ratones neonatos. La Figura 9A muestra la morfología de las CL del grupo control. Podemos apreciar que el soma de estas células presenta una estructura alargada y definida, además de que las dendritas de cada célula son cortas y sin ramificaciones. La Figura 9B es la que corresponde al grupo vehículo, podemos observar que tras la exfoliación, el soma de las CL pierde la estructura alargada y adquiere una morfología esférica. Las dendritas son cortas y sin ramificaciones, similar a las características de las del grupo control. En la Figura 9C apreciamos las CL del grupo problema donde se aplicaron  $12.5 \times 10^4$  lev a las 24 hpi. El soma de estas células tiene una estructura definida y esférica, similar a la que se presenta en el grupo vehículo, sin embargo, las dendritas de estas células son más alargadas y cada dendrita posee ramificaciones. La Figura 9D corresponde al grupo problema de  $12.5 \times 10^4$  lev a las 48 hpi. El soma de estas células mantiene la estructura esférica y las dendritas son más cortas en comparación a las 24 hpi de manera que estas dendritas presentan una longitud similar a las células del grupo control. La Figura 9E es representativa del grupo problema de la aplicación de  $12.5 \times 10^6$  lev a las 24 hpi. El soma de estas células tiene una estructura más definida en comparación con el de las células de los grupos control y vehículo. Las dendritas de las células de este grupo son más largas en comparación con los grupos control y vehículo, además cada célula posee múltiples dendritas las cuales presentan ramificaciones. En la Figura 9F se muestran las células del grupo problema de  $12.5 \times 10^6$  lev a las 48 hpi. Podemos observar que el soma de las células de este grupo mantiene la estructura esférica que se aprecia en las células del mismo grupo a las 24 hpi. Las dendritas, en comparación con los

grupos control y vehículo son más alargadas y cada dendrita posee ramificaciones. La Figura 9G muestra la morfología de las células del grupo problema de la aplicación de  $12.5 \times 10^8$  lev a las 24 hpi. El soma de las células es definido y no presenta la morfología alargada que tienen las células del grupo control. Cada célula tiene más dendritas en comparación con los animales de los grupos control y vehículo, además cada dendrita presenta ramificaciones. La Figura 9H corresponde al grupo problema de  $12.5 \times 10^8$  lev a las 48 hpi. Se puede apreciar que el soma de estas células se mantiene definido y esférico. Las dendritas son alargadas y ramificadas, lo cual es diferente a lo que se observa en las células del grupo control.

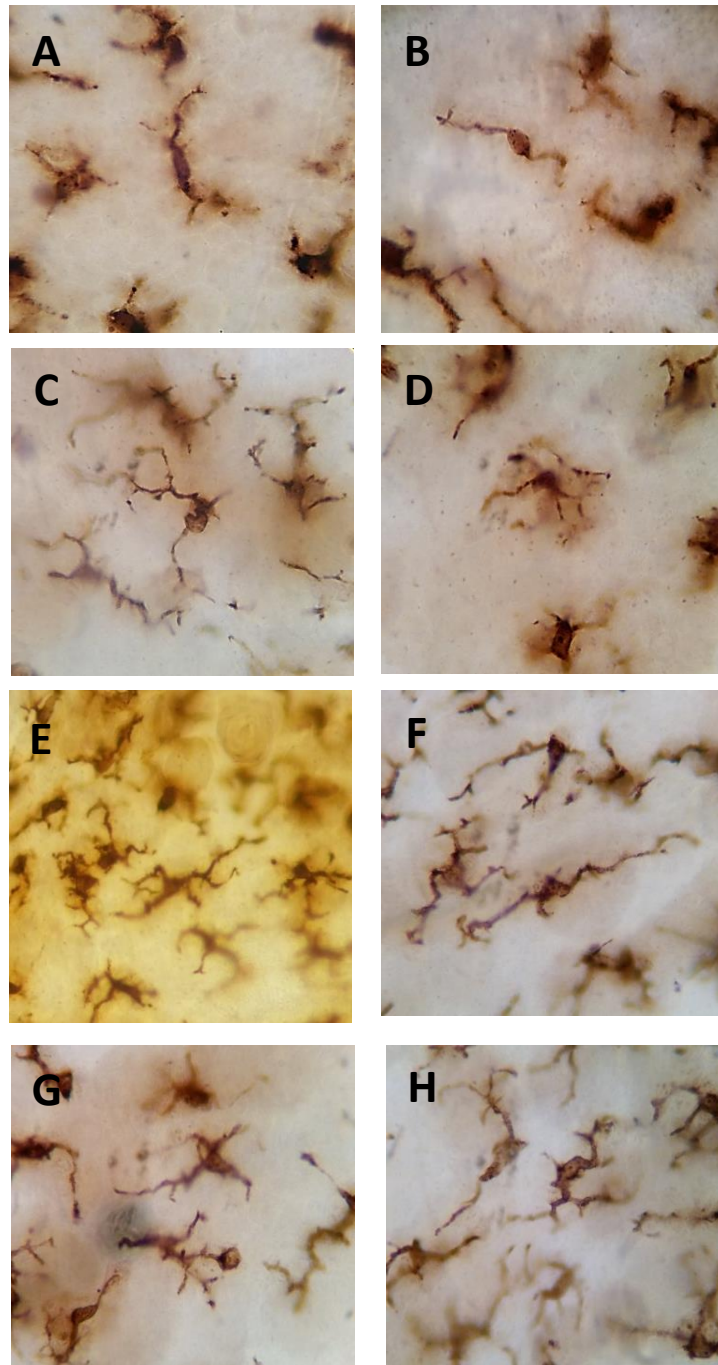


Figura 9. Morfología de las células de Langerhans de la piel de ratones neonatos. Reacción de ADPasa en láminas epidérmicas obtenidas de la piel del abdomen de ratones neonatos. A) Grupo control. B) Grupo vehículo. C) Grupo problema,  $12.5 \times 10^4$ , 24 hpi. D) Grupo problema,  $12.5 \times 10^4$ , 48 hpi. E) Grupo problema,  $12.5 \times 10^6$ , 24 hpi. F) Grupo problema,  $12.5 \times 10^6$ , 48 hpi. G) Grupo problema,  $12.5 \times 10^8$ , 24 hpi. H) Grupo problema,  $12.5 \times 10^8$ , 48 hpi. Imágenes representativas de 3 experimentos independientes. Cada experimento conto con 5 ratones por condición experimental. Fotografías tomadas con el objetivo de 100x.

Con estos resultados podemos decir que tanto en los ratones adultos como en los neonatos, la morfología de las CL se modifica tras la exfoliación e infección con *C. albicans* a los tiempos de postinfección analizados.

### 3.2.2 Análisis *in situ* de la frecuencia de las células de Langerhans de ratones BALB/c infectados con *Candida albicans*.

Mientras realizábamos el análisis de la morfología de las CL observamos que el número de CL no parecía mantenerse uniforme a los tiempos de postinfección estudiados. Para determinar si existía variación o no en el número de células, decidimos realizar un análisis de la frecuencia de las mismas. Para dicho análisis se contaron todas las células ADPasa positivas de 10 campos al azar, por cada condición experimental en cada uno de los experimentos que se realizaron y se calculó el promedio del número de células presentes en cada campo.

La Figura 10 muestra los resultados de la frecuencia de las CL en los ratones adultos. Podemos observar que en comparación con el grupo control existe diferencia significativa entre cada condición experimental utilizada, en donde se puede apreciar claramente que el número de células disminuye de manera drástica en comparación con nuestro control. Comparando el grupo vehículo con los grupos problema a los dos tiempos analizados, podemos observar que únicamente existe diferencia significativa con el grupo problema de las 48h posteriores a la infección, en donde el número de células disminuye. Finalmente

podemos apreciar que existe diferencia significativa entre nuestro grupo problema de las 24h a las 48h posteriores a la infección, donde las células disminuyen para las 48h.

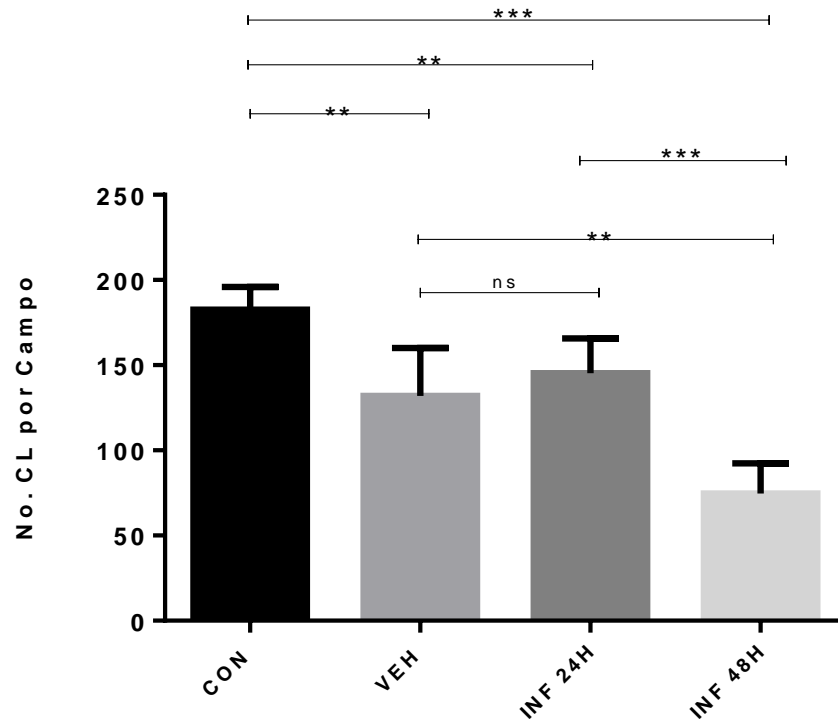


Figura 10. Frecuencia de las células de Langerhans epidérmicas en ratones adultos. Se analizaron 10 campos de cada condición experimental en cada experimento que se llevó a cabo. CON, grupo control. VEH, grupo vehículo. INF 24H, grupo problema a las 24 hpi. INF 48H, grupo problema a las 48 hpi. Se realizaron 3 experimentos de manera independiente y cada uno contó con 5 ratones por condición experimental. Se utilizó la prueba estadística t-student para comparar entre los diferentes grupos. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ , ns: no significativo.



En la Figura 11 se muestran los resultados de la frecuencia de las CL en los ratones neonatos. Podemos observar que entre los grupos control y vehículo no existe diferencia significativa. Comparando el grupo vehículo con el resto de las condiciones experimentales, podemos ver existe diferencia significativa entre este grupo y el grupo problema de la aplicación  $12.5 \times 10^4$  lev, en donde tanto a las 24 hpi como a las 48 hpi el número de células tiende a disminuir. Comparando el grupo vehículo con el grupo problema donde se aplicaron  $12.5 \times 10^6$  lev, se observó que a las 24 hpi el número de células aumenta significativamente y para las 48 hpi, el número de células disminuye y no presenta diferencia significativa respecto al grupo vehículo. De manera interesante, realizando la comparación del grupo vehículo con el grupo de  $12.5 \times 10^8$  lev, sucede una situación similar a lo ocurrido con el grupo anterior, para las 24 hpi el número de células aumenta drásticamente, sin embargo, para las 48 hpi el número de células se reestablece a niveles similares a los obtenidos en el grupo vehículo. No existe diferencia significativa entre los dos tiempos postinfección analizados para el grupo de  $12.5 \times 10^4$  lev. Se presentó una situación similar para los grupos problema de la aplicación de  $12.5 \times 10^6$  lev y  $12.5 \times 10^8$  lev, en donde a las 24 hpi el número de células aumenta y para las 48 hpi tiende a disminuir.

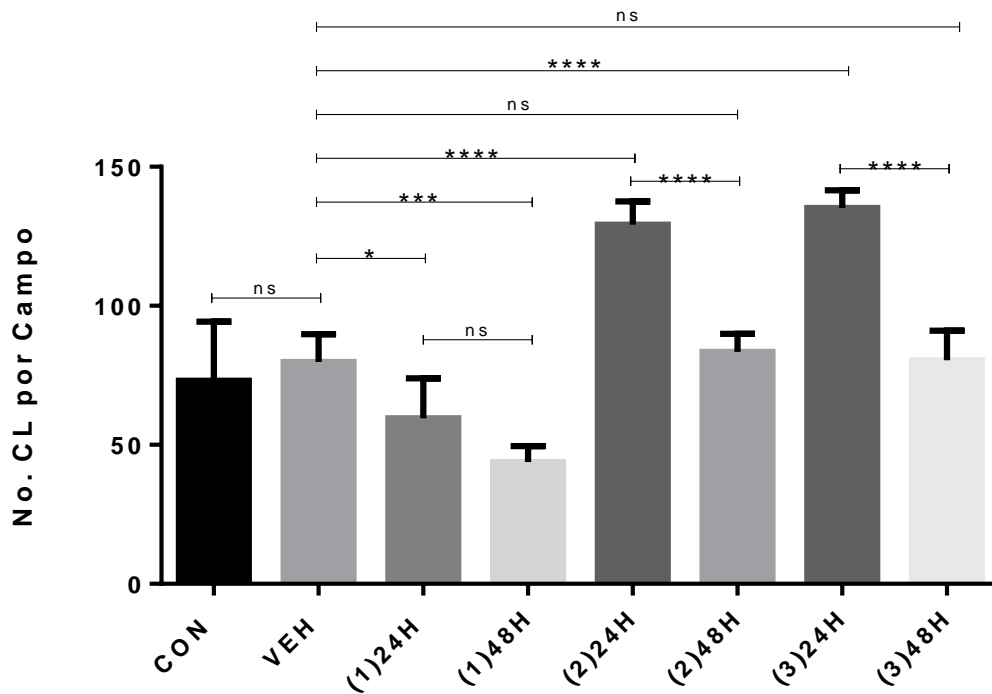


Figura 11. Frecuencia de las células de Langerhans epidérmicas en ratones neonatos. Se analizaron 10 campos de cada condición experimental en cada experimento que se llevó a cabo. CON, grupo control. VEH, grupo vehículo. (1)24H, grupo problema  $12.5 \times 10^4$  a las 24 hpi. (1) 48H, grupo problema  $12.5 \times 10^4$  a las 48 hpi. (2) 24H, grupo problema  $12.5 \times 10^6$  a las 24 hpi. (2) 48H, grupo problema  $12.5 \times 10^6$  a las 48 hpi. (3) 24H, grupo problema  $12.5 \times 10^8$  a las 24 hpi. (3) 48H, grupo problema  $12.5 \times 10^8$  a las 48 hpi. Se realizaron 3 experimentos de manera independiente y cada uno contó con 5 ratones por condición experimental. Se utilizó la prueba estadística t-student para comparar entre los diferentes grupos. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ , ns: no significativo.

Después del análisis de la frecuencia de las CL en la epidermis de ratones adultos y neonatos, analizamos el número de dendritas por célula así como sus ramificaciones, para ver si estas variaban conforme el tiempo y la concentración de levaduras utilizada para la infección. Para este análisis, contamos cada una de las dendritas de 20 células tomadas al azar, de 10 campos por cada condición experimental en cada uno de los experimentos realizados. Se calculó el promedio

y se realizó la prueba t-student comparando las condiciones experimentales entre sí.

En la Tabla 13 se detallan los datos correspondientes a los animales adultos. Tanto para la frecuencia de las dendritas como para la cuenta de las ramificaciones, comparando las diferentes condiciones experimentales con el control, observamos diferencias significativas, sin embargo, no se encontró diferencia en comparación con el grupo vehículo en ninguno de los casos. Es por esta razón que se concluye que el aumento en las dendritas y sus ramificaciones, se debe directamente al proceso de exfoliación y no a la infección.

<b>A</b>				<b>B</b>			
Número de dendritas por célula				Número de ramificaciones por dendrita			
	VEH	INF 24H	INF 48H		VEH	INF 24H	INF 48H
<b>CONTROL</b>	**	*	**	<b>CONTROL</b>	****	***	***
<b>VEHÍCULO</b>	----	ns	ns	<b>VEHÍCULO</b>	----	ns	ns
<b>INF 24H</b>	----	----	ns	<b>INF 24H</b>	----	----	ns

Tabla 13. La frecuencia de las dendritas y sus ramificaciones cambia debido al proceso de exfoliación en ratones adultos infectados con *C. albicans*. Infección realizada con  $2 \times 10^8$  lev. A) Número de dendritas por célula. B) Número de ramificaciones por dendrita. Se realizaron 3 experimentos de manera independiente y cada uno contó con 5 ratones por condición experimental. Se utilizó la prueba estadística t-student para comparar entre los diferentes grupos. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ , ns: no significativo.

La Tabla 14 corresponde a los datos obtenidos de la frecuencia de las dendritas de las CL epidérmicas de ratones neonatos. Podemos observar diferencias significativas cuando se comparan los grupos experimentales con el control, a excepción de la infección realizada con la aplicación de  $12.5 \times 10^8$  lev a las 48 hpi, donde no se observaron diferencias. Comparando el grupo vehículo con los demás grupos experimentales, no se observaron diferencias significativas.

		Número de dendritas por célula					
	VEHÍCULO	(1) 24H	(1) 48H	(2) 24H	(2) 48H	(3) 24H	(3) 48H
<b>CONTROL</b>	**	**	***	**	**	*	ns
<b>VEHICULO</b>	---	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<b>(1) 24H</b>	---	---	ns	ns	---	---	---
<b>(1) 48H</b>	---	---	---	---	ns	---	ns
<b>(2) 24H</b>	---	---	---	---	---	---	ns

Tabla 14. La frecuencia de las dendritas en las células de Langerhans se modifica debido al proceso de exfoliación en ratones neonatos infectados con *C. albicans*. (1) Ratones neonatos infectados con  $12.5 \times 10^4$  lev. (2) Ratones neonatos infectados con  $12.5 \times 10^6$  lev. (3) Ratones neonatos infectados con  $12.5 \times 10^8$  lev. Se realizaron 3 experimentos de manera independiente y cada uno contó con 5 ratones por condición experimental. Se utilizó la prueba estadística t-student para comparar entre los diferentes grupos. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ , ns: no significativo.

La Tabla 15 representa los datos obtenidos del número de ramificaciones que presentaron las dendritas de las CL epidérmicas de ratones neonatos. Podemos observar que no hubo diferencias significativas cuando se comparan los grupos experimentales con el control. Por otro lado, tampoco se obtuvo

diferencia significativa comparando el grupo vehículo con el resto de los grupos experimentales.

Número de ramificaciones por dendrita							
	VEHÍCULO	(1) 24H	(1) 48H	(2) 24H	(2) 48H	(3) 24H	(3) 48H
<b>CONTROL</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<b>VEHÍCULO</b>	----	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<b>(1) 24H</b>	----	----	ns	ns	----	----	----
<b>(1) 48H</b>	----	----	----	----	ns	----	ns
<b>(2) 24H</b>	----	----	----	----	----	----	ns

Tabla 15. La frecuencia de las ramificaciones de las dendritas de las células de Langerhans, se modifica debido al proceso de exfoliación en ratones neonatos infectados con *C. albicans*. (1) Ratones neonatos infectados con  $12.5 \times 10^4$  lev. (2) Ratones neonatos infectados con  $12.5 \times 10^6$  lev. (3) Ratones neonatos infectados con  $12.5 \times 10^8$  lev. Se realizaron 3 experimentos de manera independiente y cada uno contó con 5 ratones por condición experimental. Se utilizó la prueba estadística t-student para comparar entre los diferentes grupos. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ , ns: no significativo.

Debido a estos resultados, podemos concluir que al igual que como ocurre con los ratones adultos, el aumento en las dendritas y sus ramificaciones, es causado por el proceso de exfoliación y no por la infección.

### 3.2.3 Análisis *in situ* de la activación de las células de Langerhans en ratones BALB/c infectados con *C. albicans*.

Una de las moléculas relacionadas con la activación de las CL es CD86, por esta razón se analizó la presencia de esta molécula en células dendríticas de láminas epidérmicas obtenidas de la piel del abdomen de ratones adultos y neonatos infectados con *C. albicans*.

En la Figura 12 se muestran los resultados obtenidos para los animales adultos. La Figura 12A corresponde a los animales del grupo control, la Figura 12B al grupo vehículo, La Figura 12C muestra al grupo problema a las 24 hpi mientras que en la Figura 12D se observan los resultados del grupo problema a las 48 hpi. Podemos apreciar que se encontraron células dendríticas positivas para CD86 en todas las condiciones experimentales, cabe destacar que estas células se correlacionan con la morfología de las células positivas para la reacción de ADPasa, por lo que se sugiere que podría tratarse de la misma población celular, es decir, de las células de Langerhans.

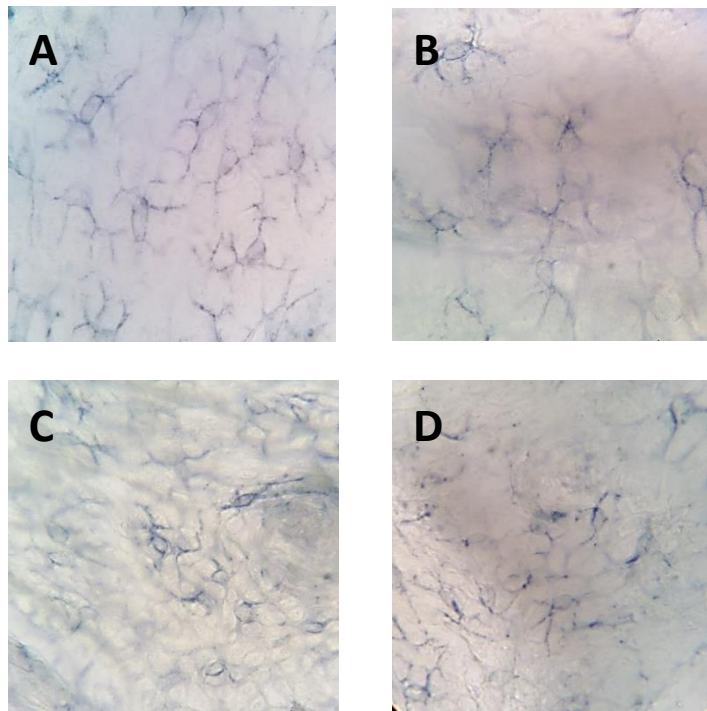


Figura 12. Células dendríticas CD86<sup>+</sup> en ratones adultos. Inmunohistoquímica para la molécula CD86<sup>+</sup> en láminas epidérmicas obtenidas de la piel del abdomen de ratones adultos. A) Grupo control. B) Grupo vehículo. C) Grupo problema, 24 hpi. D) Grupo problema, 48 hpi. Imágenes representativas de 3 experimentos independientes. Cada experimento conto con 5 ratones por condición experimental. Fotografías tomadas con el objetivo de 100x.

La Figura 13 corresponde a los resultados de los experimentos de los ratones neonatos. De manera interesante, se observaron células positivas para CD86 en todos los grupos experimentales. En la Figura 13A, correspondiente al grupo control, apreciamos una célula CD86<sup>+</sup> al centro de la imagen. La Figura 13B muestra los resultados obtenidos para el grupo vehículo, tras el proceso de exfoliación aumenta el número de células positivas para CD86 en comparación con el grupo control. Las Figuras 13C y 13D corresponden al grupo problema de  $12.5 \times 10^4$  lev a las 24 hpi y 48 hpi respectivamente, podemos apreciar que en

ambas condiciones experimentales existen pocas células con marcas positivas para CD86, similar a lo encontrado en el grupo control. Las Figuras 13E y 13F muestran los resultados obtenidos del grupo problema de  $12.5 \times 10^6$  lev a las 24 hpi y 48 hpi respectivamente, en comparación con los grupos control y vehículo el número de células CD86<sup>+</sup> es mayor en estas condiciones experimentales. Finalmente las Figuras 13G y 13H corresponden al grupo problema de  $12.5 \times 10^8$  lev a las 24 hpi y 48 hpi, podemos observar que bajo estas condiciones experimentales, existen más células positivas para CD86 en comparación con el grupo control y el grupo vehículo.

Al igual que con los ratones adultos, la morfología que presentan estas células dendríticas se correlaciona con la morfología apreciada para las células positivas para la reacción de ADPasa, sugiriendo que estas células muy probablemente sean células de Langerhans.



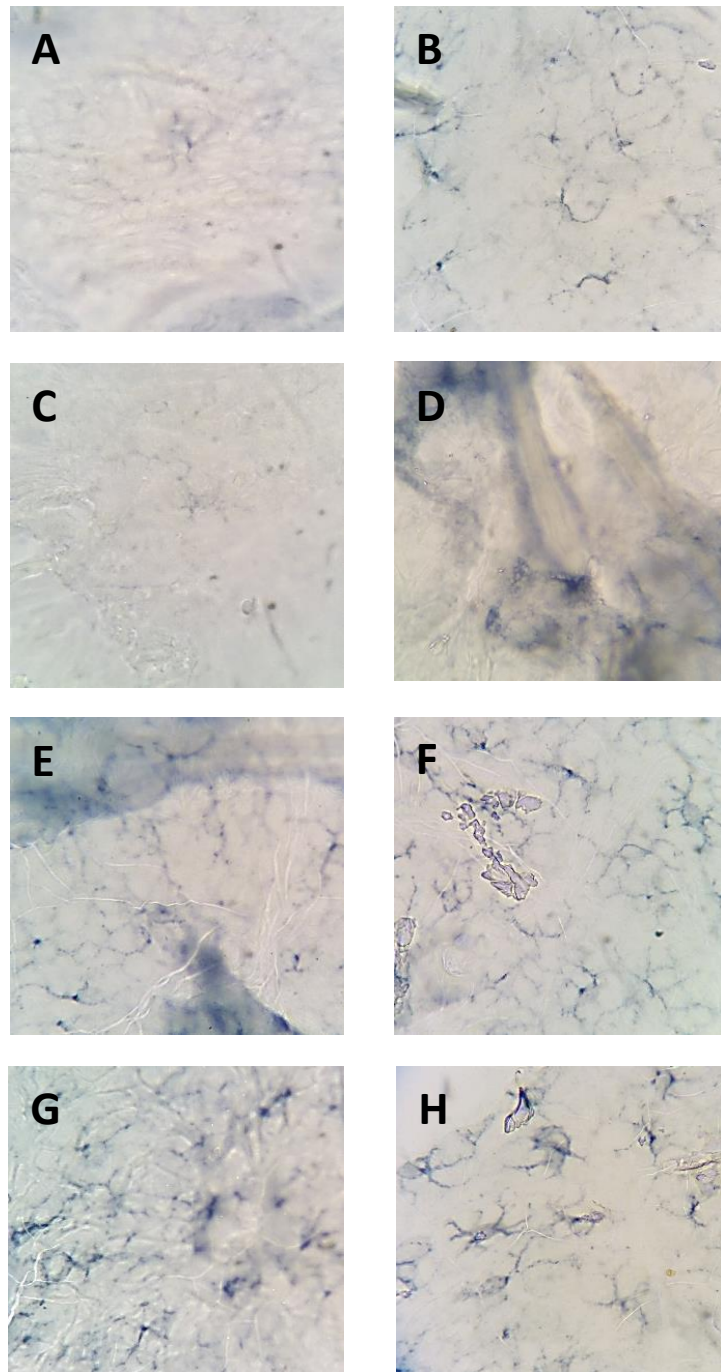


Figura 13. Células dendríticas CD86<sup>+</sup> en ratones neonatos. Inmunohistoquímica realizada en láminas epidérmicas obtenidas de la piel del abdomen de ratones neonatos. A) Grupo control. B) Grupo vehículo. C) Grupo problema,  $12.5 \times 10^4$ , 24 hpi. D) Grupo problema,  $12.5 \times 10^4$  lev, 48 hpi. E) Grupo problema,  $12.5 \times 10^6$  lev, 24 hpi. F) Grupo problema  $12.5 \times 10^6$  lev, 48 hpi. G) Grupo problema,  $12.5 \times 10^8$  lev, 24 hpi. H) Grupo problema  $12.5 \times 10^8$  lev, 48 hpi. Imágenes representativas de 3 experimentos independientes. Cada experimento conto con 5 ratones por condición experimental. Fotografías tomadas con el objetivo de 100x.

Para determinar si la frecuencia celular de estas células positivas para CD86 también presenta cambios relacionados con la concentración de levaduras aplicada y diferencias entre los tiempos de estudio analizados, como ocurre con las células de Langerhans observadas en la reacción de ADPasa, realizamos un análisis de la frecuencia celular por campo.

La Figura 14 corresponde a los datos encontrados para los animales adultos. Podemos apreciar que en comparación con el grupo control, ninguna condición experimental es diferente de manera significativa. Sin embargo, comparando con el grupo vehículo, tanto a las 24 hpi como a las 48 hpi se muestran cambios significativos, en donde el número de células aumenta a las 24 hpi para después disminuir drásticamente a las 48 hpi. Cabe destacar que también existe diferencia significativa entre los tiempos de estudio analizados, como podemos apreciar en las últimas dos barras de la gráfica mostrada.

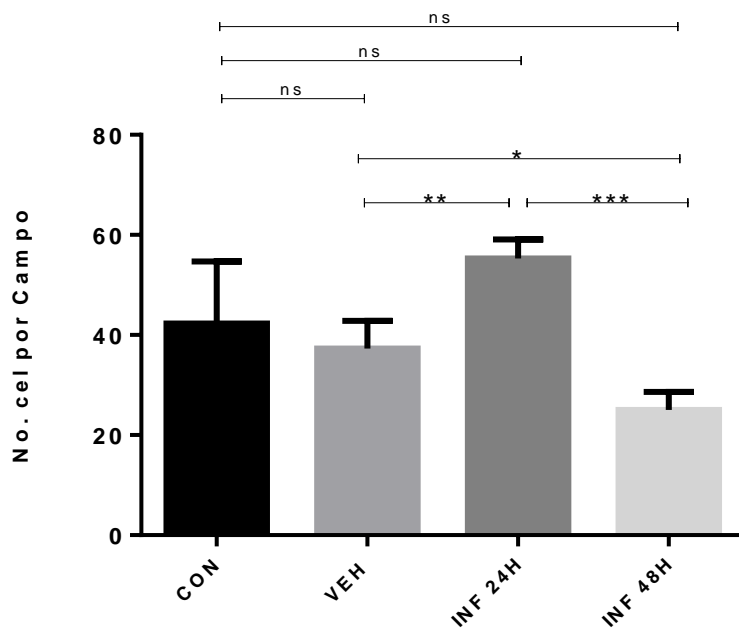


Figura 14. Frecuencia de las células CD86<sup>+</sup> en láminas epidérmicas de ratones adultos. Se analizaron 10 campos por cada condición experimental, en cada experimento que se llevó a cabo. CON, grupo control. VEH, grupo vehículo. INF 24H, grupo problema a las 24 hpi. INF 48H, grupo problema a las 48 hpi. Se realizaron 3 experimentos de manera independiente y cada uno contó con 5 ratones por condición experimental. Se utilizó la prueba estadística t-student para comparar entre los diferentes grupos. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ , ns: no significativo.

La Figura 15 nos muestra los datos obtenidos en la población neonatal. Podemos observar que existe una diferencia significativa entre el grupo control y el grupo vehículo. Comparando el grupo vehículo con el grupo experimental de la aplicación de  $12.5 \times 10^4$  lev podemos observar que existe diferencia significativa, en este grupo las células tienden a disminuir a las 24 hpi, posteriormente el número de células positivas aumenta para las 48 hpi. Si comparamos el grupo vehículo con el grupo problema de la aplicación de  $12.5 \times 10^6$  lev observamos que ocurre un incremento significativo de las células positivas para CD86 para las 24

hpi, sin embargo ocurre una disminución de este número de células para las 48 hpi, en donde se puede apreciar que no se observa diferencia significativa en comparación con el grupo vehículo. Finalmente, no se observó diferencia significativa ente el grupo problema de  $12.5 \times 10^8$  lev a las 24 hpi y grupo vehículo. Sin embargo a las 48 hpi se aprecia una disminución significativa en el número de células CD86<sup>+</sup> en comparación con el grupo vehículo.

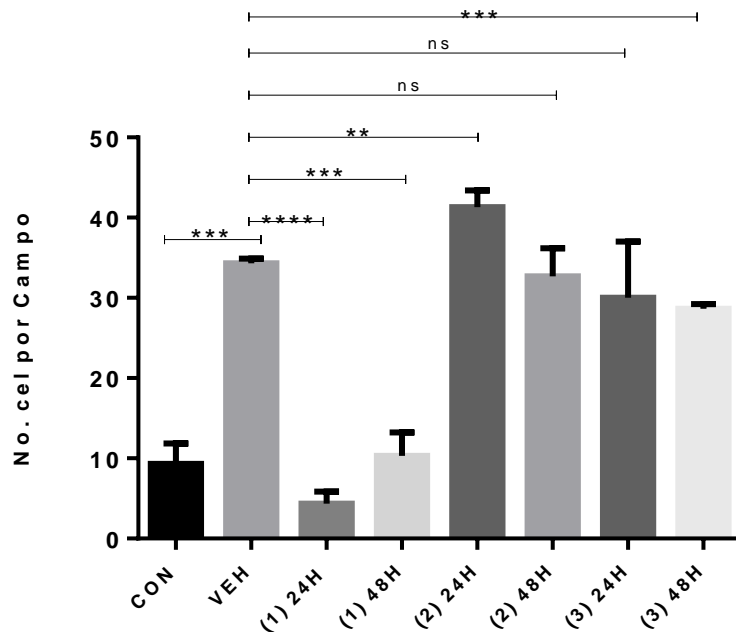


Figura 15. Frecuencia de las células CD86<sup>+</sup> epidérmicas en ratones neonatos. Se analizaron 10 campos de cada condición experimental en cada experimento que se llevó a cabo. CON, grupo control. VEH, grupo vehículo. (1)24H, grupo problema  $12.5 \times 10^4$  lev a las 24 hpi. (1)48H, grupo problema  $12.5 \times 10^4$  a las 48 hpi. (2)24H, grupo problema  $12.5 \times 10^6$  lev a las 24 hpi. (2)48H, grupo problema  $12.5 \times 10^6$  lev a las 48 hpi. (3)24H, grupo problema  $12.5 \times 10^8$  lev a las 24 hpi. (3)48H, grupo problema  $12.5 \times 10^8$  lev a las 48 hpi. Se realizaron 3 experimentos de manera independiente y cada uno contó con 5 ratones por condición experimental. Se utilizó la prueba estadística t-student para comparar entre los

diferentes grupos. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ , ns: no significativo.

### 3.3 Evaluación de respuesta inmune celular.

Para analizar la capacidad de las CPA cutáneas neonatales para inducir una respuesta celular, se realizó una prueba de hipersensibilidad tardía. Para ello los ratones neonatos se infectaron de forma epicutánea en la zona abdominal con  $12.5 \times 10^4$ ,  $12.5 \times 10^6$  y  $12.5 \times 10^8$  levaduras de *C. albicans* a los 0 días de nacimiento, a esta fase se le conoce como sensibilización, 4 semanas después se retó a los animales en la oreja, inoculando  $1 \times 10^4$  levaduras muertas por calor y se realizaron mediciones del grosor de las orejas, antes del reto así como 24h y 48h después. El incremento en el grosor de las orejas nos indicará la inducción de una respuesta celular.

En la figura 16 se muestran los resultados del ensayo de hipersensibilidad tardía en los ratones adultos. Como podemos observar, existe diferencia significativa entre el grupo de ratones sensibilizados y los grupos control y vehículo. Como se esperaba, si se comparan los ratones del grupo vehículo con los ratones sensibilizados, estos últimos generan una respuesta celular con diferencia significativa tanto a las 24 h como a las 48 h postinfección.

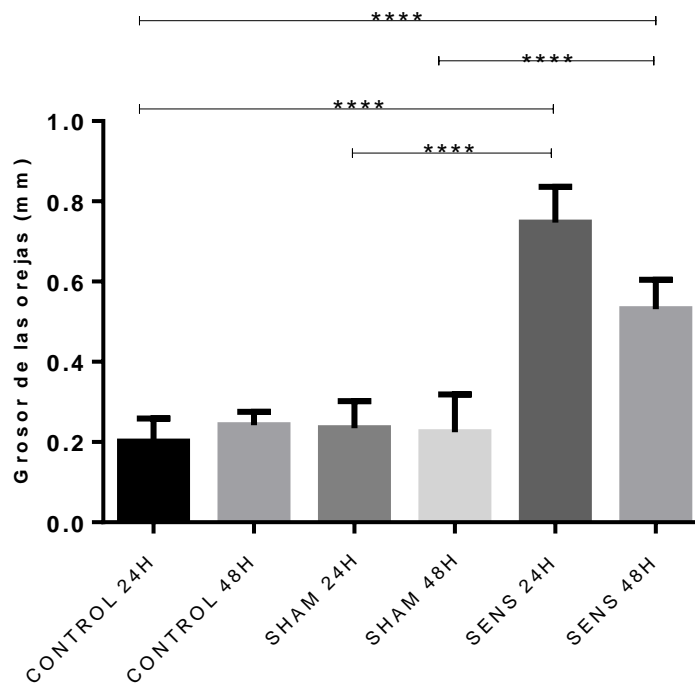


Figura 16. Los ratones adultos inducen respuesta celular tras la infección con *C. albicans*. Se utilizaron hembras BALB/c de 4 semanas de edad, se contó con 5 ratones por condición experimental. Control, grupo control: ratones sin exfoliación, sin sensibilización, con reto. Sham (grupo vehículo): ratones exfoliados, sensibilización con SSF estéril, con reto. Sens, grupo problema: ratones exfoliados, sensibilizados con  $2 \times 10^8$  levaduras de *C. albicans*, con reto. Se realizaron 3 experimentos de manera independiente. Se utilizó la prueba estadística t-student para comparar entre los diferentes grupos. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ , ns: no significativo.

En la figura 17 se muestran los resultados de los ensayos de hipersensibilidad tardía en los ratones neonatos sensibilizados con la concentración de  $12.5 \times 10^4$  lev. Como se observa en la gráfica, no existen diferencias significativas entre los grupos, lo que indica que los ratones neonatos sensibilizados con esta concentración, no son capaces de inducir una respuesta celular frente a *C. albicans*.

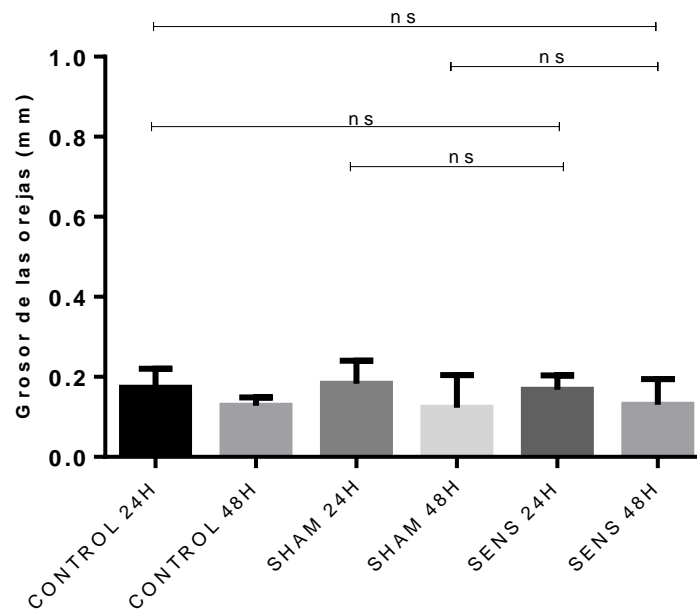


Figura 17. Los ratones neonatos no general respuesta celular tras la infección con  $12.5 \times 10^4$  levaduras de *C. albicans*. Control, grupo control: ratones sin exfoliación, sin sensibilización, con reto. Sham, grupo vehículo: ratones exfoliados, sensibilización con SSF estéril, con reto. Sens, grupo problema: ratones exfoliados, sensibilizados con  $12.5 \times 10^4$  levaduras de *C. albicans*, con reto. Se realizaron 3 experimentos de manera independiente, cada experimento conto como 5 ratones por condición. Se utilizó la prueba estadística t-student para comparar entre los diferentes grupos. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ , ns: no significativo.

La Figura 18 nos muestra los datos obtenidos en los ensayos de hipersensibilidad tardía en los ratones neonatos sensibilizados con la concentración de  $12.5 \times 10^6$  lev. Como se aprecia en la gráfica, 4 semanas después de la fase de sensibilización nos fue posible observar un aumento significativo en el grosor de las orejas de los ratones neonatos, lo cual nos indica que estos, son capaces de inducir una respuesta celular frente a *C. albicans* tanto a las 24 h como a las 48 h posteriores al reto de infección.

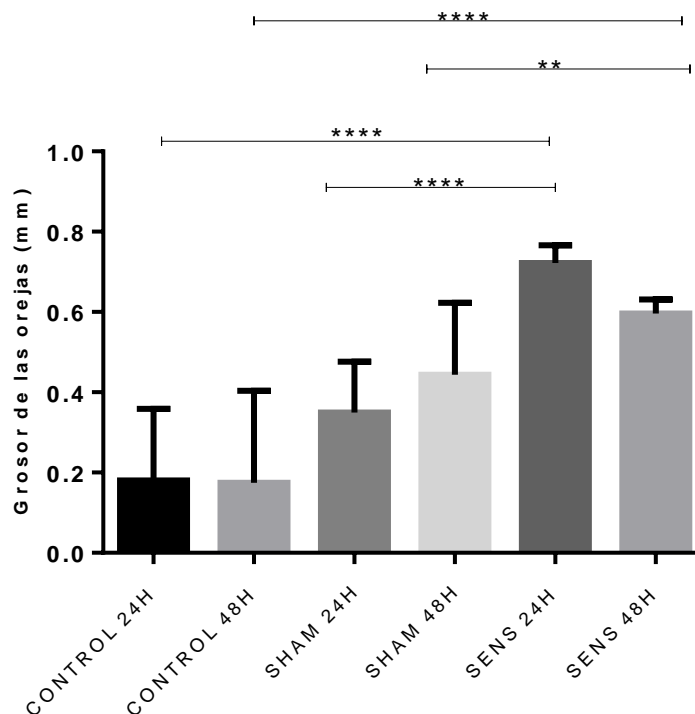


Figura 18. Los ratones neonatos general respuesta celular tras la infección con  $12.5 \times 10^6$  levaduras de *C. albicans*. Control, grupo control: ratones sin exfoliación, sin sensibilización, con reto. Sham, grupo vehículo: ratones exfoliados, sensibilización con SSF estéril, con reto. Sens, grupo problema: ratones exfoliados, sensibilizados con  $12.5 \times 10^6$  levaduras de *C. albicans*, con reto. Se realizaron 3 experimentos de manera independiente, cada experimento conto como 5 ratones por condición. Se utilizó la prueba estadística t-student para comparar entre los diferentes grupos. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ , ns: no significativo.

La Figura 19 corresponde a los resultados de los ensayos de hipersensibilidad tardía en los ratones neonatos sensibilizados con la concentración de  $12.5 \times 10^8$  lev. Existe un incremento significativo en el grosor de las orejas de los animales sensibilizados, comparándolos con los grupos control y vehículo, lo cual nos



indica la generación de una respuesta celular durante la fase de reto tanto a las 24 h como a las 48 h posteriores.

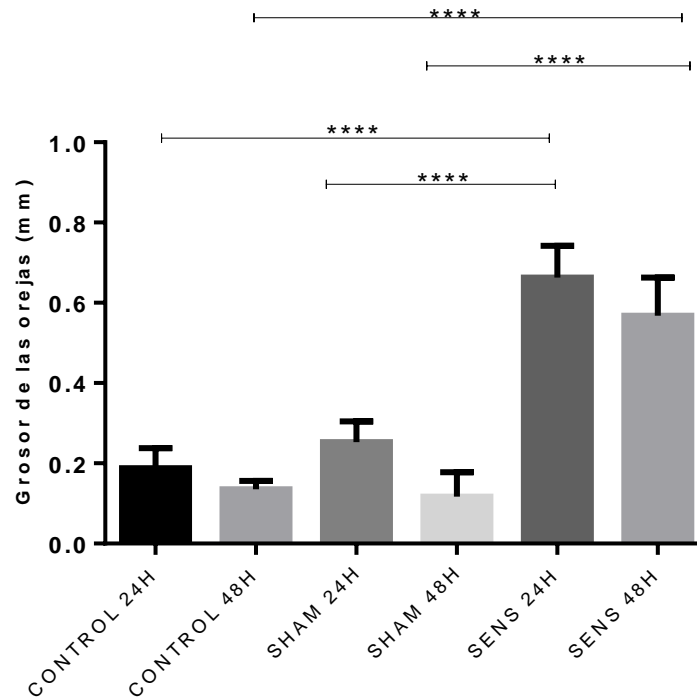


Figura 19. Los ratones neonatos generan respuesta celular tras la infección con  $12.5 \times 10^8$  levaduras de *C. albicans*. Control, grupo control: ratones sin exfoliación, sin sensibilización, con reto. Sham, grupo vehículo: ratones exfoliados, sensibilización con SSF estéril, con reto. Sens, grupo problema: ratones exfoliados, sensibilizados con  $12.5 \times 10^8$  levaduras de *C. albicans*, con reto. Se realizaron 3 experimentos de manera independiente, cada experimento conto como 5 ratones por condición. Se utilizó la prueba estadística t-student para comparar entre los diferentes grupos. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ , ns: no significativo.

Con estos datos se demuestra que los ratones neonatos son capaces de inducir una respuesta celular, sistémica y de memoria tras la aplicación *C. albicans* y de manera interesante, observamos que esta inducción de respuesta celular es dependiente de la concentración utilizada.

## CAPITULO 4

### DISCUSIÓN

Se sabe que los recién nacidos prematuros son altamente susceptibles a adquirir infecciones por diversos microorganismos, en tiempos pasados esta susceptibilidad se relacionaba con la inmadurez de los linfocitos T <sup>(55,53)</sup>, sin embargo, actualmente se cree que esta podría estar relacionada con la inmadurez de las células encargadas de la activación de los linfocitos, como son las células presentadoras de antígeno <sup>(61, 62, 75)</sup>. Si bien, los mecanismos de la respuesta inmune han sido ampliamente estudiados en animales adultos, actualmente no existen estudios tan detallados de la población neonatal.

En el presente trabajo se tomó como referencia el modelo murino establecido por Kaplan <sup>74</sup> y se realizaron las modificaciones pertinentes para adaptarlo a los animales recién nacidos. De tal manera que en este estudio obtuvimos resultados similares a lo obtenido por dicho autor y mencionado por Gow <sup>76</sup>, en relación a la disminución del grosor del estrato corneo de ratones neonatos.

En el estrato corneo, *C. albicans* se encontró como levadura, mientras que en la dermis predominaron las estructuras filamentosas, esta transición de levadura a pseudohifa es necesaria para que se establezca la infección en la piel de los animales infectados <sup>17</sup>. Se ha descrito con anterioridad que la invasión en ratones adultos, ocurre cuando las hifas penetran profundamente en la mucosa <sup>77</sup> y células epiteliales orales <sup>78</sup>. Las levaduras son la estructura que facilita la

diseminación del hongo hacia el torrente sanguíneo en donde se adhieren a las células del endotelio mientras que las estructuras filamentosas o pseudohifas facilitan la infección sistémica <sup>79</sup>, sin embargo, en este proyecto el grado de invasión de los ratones no fue de severidad, ya que la infección tanto en los ratones adultos como en los neonatos no evoluciono hacia la muerte de los animales (Datos no mostrados).

A pesar de que en los cortes histológicos analizados provenientes de la piel de los ratones adultos se observaba una aparente diferencia entre las estructuras levaduriformes y filamentosas, al analizar detalladamente la cuenta obtenida de los ensayos de UFCs, no encontramos diferencia significativa entre la colonización e invasión. En los ratones neonatos, se encontró diferencia significativa en la colonización cuando se administró la cantidad de  $12.5 \times 10^6$  lev, lo cual se correlaciona con la gran cantidad de levaduras observadas en los cortes histológicos. Para los análisis de invasión se obtuvo diferencia significativa cuando se utilizó la cantidad de  $12.5 \times 10^4$  lev, correlacionándose con la ausencia de pseudohifas en los cortes histológicos de la piel del área abdominal de los ratones.

Además realizando la comparación entre animales adultos y neonatos, se obtuvo diferencia significativa para las cantidades de  $12.5 \times 10^4$  lev y  $12.5 \times 10^6$  lev utilizadas en los neonatos con respecto a los adultos. De manera interesante para la cantidad de  $12.5 \times 10^8$  lev no se presentó diferencia significativa para el protocolo de colonización, esto probablemente se deba a que ambas concentraciones están dentro mismo logaritmo, por lo que la división de

levaduras en el tejido e inducción de pseudohifas resulta similar. Cabe destacar que en la comparación realizada entre las diferentes cantidades utilizadas para los ratones neonatos, tampoco se obtuvo diferencia significativa entre las cantidades  $12.5 \times 10^6$  lev y  $12.5 \times 10^8$  lev para el protocolo de invasión. Esto pueda deberse a que la cantidad de pseudohifas presentes en el tejido es similar, aunado a esto, se sabe que al momento de realizar la homogenización del tejido con la finalidad de obtener las estructuras filamentosas incrustadas en la piel, difícilmente se podrán separar los tabiques de las pseudohifas de manera individual, por lo que la recuperación de UFC resulta en números similares.

Se sabe que la piel es un órgano que proporciona una barrera física contra los microorganismos comensales, como *Candida albicans*. La epidermis está conformada en su mayor parte por queratinocitos y células de Langerhans, siendo estas últimas una población de células presentadoras de antígeno residentes en esta capa <sup>80</sup>. De manera interesante, en las gráficas de frecuencia se observó disminución en el número de células positivas para ADPasa tanto en los ratones adultos como en los ratones neonatos a las 24 horas postinfección, podemos sugerir que las células de Langerhans neonatales podrían estar emigrando de la piel del área abdominal a órganos linfáticos secundarios, desde las 24 h posteriores nacimiento, sin embargo habrá que demostrar su presencia en los órganos linfoides secundarios que drenan al sitio de infección. Debido a que en estudios previos se ha demostrado que las CL de ratones adultos son capaces de transportar agentes químicos como FITC desde la epidermis hasta

los ganglios linfáticos más cercanos cuando es aplicado de manera tópica sobre la piel <sup>81</sup>, además se sabe que cuando las CLs de ratones adultos adquieren antígenos en la epidermis, maduran y migran a los nódulos linfáticos más cercanos <sup>(82,83,70)</sup> observando que la actividad de ADPasa de las CL disminuye cuando estas maduran y emigran de la epidermis hacia órganos linfáticos secundarios <sup>84</sup>.

Además, existen estudios en donde se ha determinado de manera *in vivo* la migración de CLs hacia la epidermis después de una inyección intradérmica de células precursoras de CLs derivadas de médula ósea. En este modelo se empleó cinta adhesiva para generar daño en la epidermis de ratones adultos lo cual produjo inflamación de la piel y la subsecuente emigración de las CLs y CDs de la piel. De tal manera que se pudieron observar en los vasos linfáticos las CLs y CDDs que emigraron de la piel y aunado a esto el número de CLs y CDDs aumento en los nódulos linfáticos. Este mismo estudio demostró que en la epidermis el número de células precursoras de CLs provenientes de médula o sea era 500 veces mayor a las que se habían administrado en los animales. De manera similar a la morfología que nosotros pudimos observar en las células positivas para ADPasa en las láminas epidérmicas de los ratones neonatos de nuestro modelo, las células que recién habían arribado a la epidermis tenían una o dos dendritas, sin embargo, la morfología cambiaba después de un periodo de 2-4 días y adquirirían apariencia de célula dendrítica. Después de este periodo de 2-4 días las células eran positivas para la expresión de MHC II, sin embargo, no expresaban Langerina, receptor de manosa ni el receptor FcεR. En contraste,

todas las células que ingresaron a la epidermis expresaban CD11c y CCR6, sugiriendo que se trataba de CLs <sup>72</sup>.

Por otro lado se sabe que las CL tienen propiedades que las distinguen de otras subpoblaciones de células dendríticas, como es: regular la homeostasis y mantener un balance entre la proliferación y la muerte celular local así como el arribo de células precursoras derivadas de médula ósea <sup>(85,73)</sup> se ha comprobado que las CL de animales adultos pueden sufrir división celular en la piel tras diversos estímulos químicos, físicos y/o biológicos <sup>(73,86)</sup>. En un modelo murino de dermatitis atópica se demostró que los queratinocitos activan vías de señalamiento que tienen como resultado la proliferación de las CLs <sup>87</sup>. Por esta razón, se sugiere que el aumento del número de células encontradas en los animales neonatos con las concentraciones de  $12.5 \times 10^6$  y  $12.5 \times 10^8$  lev a las 24 hpi probablemente se deba a la división celular y/o al arribo de células precursoras tras la infección con *C. albicans*.

En el presente estudio se observó que el porcentaje de las CLs en ratones adultos comienza a disminuir hasta las 48 hpi, estos resultados difieren con lo que se ha descrito hasta el momento, donde estudios previos demuestran que tras la aplicación tópica de haptenos, el porcentaje de CLs comenzaba a disminuir dentro de un periodo comprendido entre las 12-18 hpi <sup>88</sup>. Recientemente se ha demostrado que tras la aplicación tópica de haptenos el porcentaje de las CL en ratones neonatos disminuye (Bercerril García et. al, artículo en proceso), sin embargo, este es el primer estudio en donde se logra demostrar este fenómeno

de las CL en ratones recién nacidos tras la aplicación tópica de un microorganismo.

CD86 es una molécula coestimuladora que se expresa constitutivamente en las células presentadoras de antígeno (macrófagos, linfocitos B y CD8) y se sabe que en condiciones basales se encuentran CD86 positivas para esta molécula tanto en la epidermis de ratones adultos como de ratones neonatos<sup>89</sup>. Se tienen estudios previos en donde ratones transgénicos adultos, que sobreexpresan de manera constitutiva CD86 generaron respuesta celular exagerada en comparación con animales no transgénicos en una prueba de hipersensibilidad tardía tras la aplicación de haptenos<sup>90</sup>. En el presente estudio encontramos células positivas para esta molécula en condiciones basales, tanto en ratones adultos como en ratones neonatos. La morfología observada en las células CD86<sup>+</sup> en la epidermis de ratones adultos es típica de una célula dendrítica, posee soma definido y múltiples dendritas. Para las 24h hpi el número de células CD86<sup>+</sup> aumenta significativamente con respecto al control, sin embargo, para las 48 hpi el número de células disminuye drásticamente. Para los ratones neonatos, a niveles basales pudimos encontrar muy pocas células CD86<sup>+</sup>, sin embargo, después del proceso de exfoliación e infección en número de células positivas aumenta a las 24 hpi para las concentraciones de  $12.5 \times 10^6$  lev y  $12.5 \times 10^8$  lev, este número de células disminuye para las 48 hpi alcanzando niveles similares al grupo vehículo. De manera interesante con la cantidad de  $12.5 \times 10^4$  lev el número de células CD86<sup>+</sup> se mantuvo por debajo de los niveles basales, esto

podría deberse a la posible emigración de las células de la piel a órganos linfáticos secundarios. Considerando que estos resultados de frecuencia se correlacionan con los datos obtenidos en los experimentos para la reacción de ADPasa de las células de Langerhans y además observando la morfología que las células positivas presentan, creemos que es muy probable que estas células CD86<sup>+</sup> y las células positivas en la reacción de ADPasa pertenezcan a la misma población celular, sería muy interesante profundizar en este análisis para poder demostrarlo.

En los ensayos de hipersensibilidad tardía, los ratones adultos indujeron una respuesta celular, consistente con lo que se ha reportado hasta el momento, de manera *in vitro*, la estructura filamentosa del hongo induce una respuesta Th17<sup>33</sup> e *in vivo* promueve la diferenciación a una respuesta celular de tipo Th1<sup>(74,91,92)</sup>, consistente con estos reportes, en este estudio la respuesta celular únicamente fue generada por los ratones neonatos a los que se les aplicaron las cantidades de  $12.5 \times 10^6$  lev y  $12.5 \times 10^8$  lev, es decir, aquellos ratones en los que se observó la presencia de pseudohifas en los cortes histológicos. La cantidad de  $12.5 \times 10^4$  lev, en los cortes histológicos analizados no mostro inducción de pseudohifas razón por la cual pueda deberse la ausencia de respuesta celular en este grupo, además como se mencionó en la introducción, cuando se da la transición de lavadura a hifa, diversos PRRs pueden reconocer los PAMPs del hongo y activar vías de señalamiento que tienen como resultado la inducción de una respuesta inmunológica frente al microorganismo, con esta cantidad de levaduras utilizada



muy probablemente el epitelio no haya resultado tan dañado y la cantidad de levaduras sea lo suficientemente baja como para que no se haya generado el reconocimiento de *C. albicans* como microorganismo patógeno.

Existen diversos estudios en donde se ha demostrado que *C. albicans* induce respuesta inmunológica del tipo celular, como por ejemplo, en ensayos previos se ha demostrado que en la candidosis vulvovaginal causada por *C. albicans* se genera una respuesta de tipo celular Th1 la cual brinda protección ante las candidosis mucocutáneas. En este estudio se logró identificar a las CD8 como las responsables de la inmunoregulación de la respuesta generada, ya que en la inmunohistoquímica realizada en nódulos linfáticos cercanos al sitio de infección reveló reorganización celular, en donde las CD8 se concentraban en la zona T durante el curso de la candidosis vulvovaginal, consistente con una respuesta inmunológica mediada por células T <sup>93</sup>.

Se sabe que existen al menos 3 subpoblaciones de CDDs: las células de Langerhans, células dendríticas dérmicas que son positivas para Langerina y las células dendríticas dérmicas. Utilizando un modelo de infección con *C. albicans* se demostró que la presentación de antígenos mediada por las CLs es necesaria para generar una respuesta antígeno-específica de tipo Th17. En contraste con estos datos, se encontró que las CDDs positivas para Langerina se requieren para la inducción de una respuesta citotóxica además de promover la diferenciación hacia una respuesta celular de tipo Th1. Además estas células positivas para Langerina inhiben la capacidad de las CLs para promover respuesta celular de tipo Th1 <sup>94</sup>.

Recientemente se ha demostrado que se requiere de una respuesta inmunológica de tipo Th17 para que la infección mucocutánea con *C. albicans* pueda resolverse. Utilizando cepas mutantes de *C. albicans* en un modelo murino se comparó la respuesta mediada por células T entre animales adultos infectados con una cepa que se mantenía como levadura durante el periodo de infección y animales adultos infectados con una cepa que generaba pseudohifas. De manera interesante se encontró que únicamente la estructura levaduriforme inducía respuesta de tipo Th17 mediada por una vía de señalamiento que requería la expresión de Dectin-1 e IL-6 por parte de las células de Langerhans, mientras que la estructura filamentosa del hongo indujo una respuesta de tipo Th1, sin la generación de una respuesta inmunológica de tipo Th17 cuando se tenía ausencia de Dectin-1. De manera interesante, la respuesta de tipo Th15 brindaba protección a la infección cutánea mientras que la respuesta de tipo Th1 proveía protección ante infección sistémica. Con este estudio se demostró que es la morfología de *C. albicans* la que impulsa la diferenciación de respuesta inmunológica dependiente de células T <sup>74</sup>.

## CAPITULO 5

### CONCLUSIONES

- En el modelo de infección cutánea neonatal, *C. albicans* es capaz de establecerse en la piel del área abdominal, colonizando e invadiendo a los ratones neonatos en correlación con la concentración aplicada.
- En los neonatos el grado de colonización e invasión se correlaciona directamente con la presencia de levaduras y/o pseudohifas observadas en los cortes histológicos. Mientras que para los animales adultos, el grado de colonización e invasión no difiere entre las 24 hpi y las 48hpi.
- El número de células de Langerhans varía entre las condiciones experimentales analizadas tanto para ratones adultos como para ratones neonatos, al no encontrar diferencia con los ratones del grupo vehículo, podemos concluir que esta variación se genera por la infección con *C. albicans*. Sin embargo, al no observar diferencia significativa entre los grupos problema y el grupo vehículo de los ratones adultos ni de los ratones neonatos, podemos concluir que el aumento en el número de dendritas y sus ramificaciones se debe al proceso de exfoliación y no a la infección *per se*.

- Los ratones neonatos inducen una respuesta inmunológica celular tras la aplicación de *C. albicans*, la cual, de manera interesante es dependiente de la concentración.

## CAPITULO 6

### PERSPECTIVAS

- Analizar marcadores relacionados con el reconocimiento de *C. albicans in situ* en la piel de los ratones neonatos, como: MHC clase II, Dectin-1, Dectin-2, TLR4, TLR6 y receptores de manosa.
- Evaluar el papel de las células dendríticas dérmicas y mastocitos en el reconocimiento e inducción de respuesta a *C. albicans* en ratones recién nacidos.
- Determinar el perfil de citocinas secretadas en la piel y ganglios linfáticos regionales de ratones recién nacidos tras la infección de *C. albicans*.
- Analizar el papel de los linfocitos T neonatales en los órganos linfoides regionales al sitio de infección con *C. albicans*.

## CAPITULO 7

### BIBLIOGRAFÍA

1. Oestergaard MZ, Inoue M, Yoshida S, et al. Neonatal mortality levels for 193 countries in 2009 with trends since 1990: A systematic analysis of progress, projections, and priorities. *PLoS Med.* 2011;8(8). doi:10.1371/journal.pmed.1001080.
2. Shiffman J. Issue attention in global health: the case of newborn survival. *Lancet.* 2010;375(9730):2045-2049. doi:10.1016/S0140-6736(10)60710-6.
3. UNICEF. Datos Recientes Revelan Un Rápido Descenso Sin Precedentes En Las Tasas De Mortalidad Infantil. *Gr Commun Roche.* 2014:1-3.
4. Lawn JE, Cousens S, Zupan J. Neonatal Survival 1 4 million neonatal deaths : When ? Where ? Why ? *Lancet.* 2005:9-18. doi:10.1016/S0140-6736(05)71048-5.
5. WHO. Media centre Newborns : reducing mortality. *WHO, Media Centre, Newborns reducing mortality, Fact sheet.* 2016;(January):4-6.
6. Fernández Cantón S, Martínez H, María A, Viguri Uribe R. Evolución reciente de la mortalidad neonatal y postneonatal en México, 1990-2011. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 2013;70(3):265-267.
7. Manet R, Poveda A, Rivero V, Ropero E. Nosocomial infection in newborns admitted in a neonatal intensive care service. *Medisan.* 2010;14(4):483-489.
8. Strunk T, Currie A, Richmond P, Simmer K, Burgner D. Innate immunity in human newborn infants: prematurity means more than immaturity. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2011;24(1):25-31. doi:10.3109/14767058.2010.482605.
9. Ghazal P, Dickinson P, Smith CL. Early life response to infection. *Curr Opin Infect Dis.* 2013;26:213-218. doi:10.1097/QCO.0b013e32835fb8bf.
10. *Micología Médica Básica.* 4ª cuarta. McGraw-Hill; 2012.
11. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(1):133-163. doi:10.1128/CMR.00029-06.
12. Bonifaz Trujillo A. *Micología Médica Básica.* 5ta Edició. (Bernal Perez M, ed.); 2015.
13. Gow NAR, van de Veerdonk FL, Brown AJP, Netea MG. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from

- colonization. *Nat Rev Microbiol.* 2012;10(2):112-122. doi:10.1038/nrmicro2711.
14. Brooks G, Carrol K, Butel J, Morse S, Timothy M. *Microbiología Médica*. 25ava Edic. (García Carbajar N, ed.).
  15. Koh AY. Murine models of *Candida* gastrointestinal colonization and dissemination. *Eukaryot Cell.* 2013;12(11):1416-1422. doi:10.1128/EC.00196-13.
  16. Castrillón Rivera L, Palma Ramos A, Padilla Desgarnnes C. Factores de virulencia en *Candida* ssp. *Dermatología M.* 2005;49:12-27.
  17. Netea MG, Brown GD, Kullberg BJ, Gow N a R. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nat Rev Microbiol.* 2008;6(1):67-78. doi:10.1038/nrmicro1815.
  18. Plato A, Hardison SE, Brown GD. Pattern recognition receptors in antifungal immunity. *Semin Immunopathol.* 2015;37(2):97-106. doi:10.1007/s00281-014-0462-4.
  19. Hernández-Santos N, Gaffen SL. Th17 cells in immunity to *Candida albicans*. *Cell Host Microbe.* 2012;11(5):425-435. doi:10.1016/j.chom.2012.04.008.
  20. Conti HR, Gaffen SL. Host responses to *Candida albicans*: Th17 cells and mucosal candidiasis. *Microbes Infect.* 2010;12(7):518-527. doi:10.1016/j.micinf.2010.03.013.
  21. Simon AK, Hollander GA, McMichael A. Evolution of the immune system in humans from infancy to old age. *Proc R Soc B.* 2015;282(1821):20143085. doi:10.1098/rspb.2014.3085.
  22. Adkins B. T-cell function in newborn mice and humans. *Immunol Today.* 1999;20(7):330-335. doi:10.1016/S0167-5699(99)01473-5.
  23. Cheng S-C, Joosten LAB, Kullberg B-J, Netea MG. Interplay between *Candida albicans* and the Mammalian Innate Host Defense. *Infect Immun.* 2012;80(4):1304-1313. doi:10.1128/IAI.06146-11.
  24. Graaf CAA van der, Netea MG, Verschuere I, Meer JWM van der, Kullberg BJ. Differential Cytokine Production and Toll-Like Receptor Signaling Pathways by *Candida albicans* Blastospores and Hyphae. *Infect Immun.* 2005;73(11):7458-7464. doi:10.1128/IAI.73.11.7458-7464.2005.
  25. Netea MG, Graaf CAA Van der, Vonk AG, Ineke Verschuere, Meer JWM Van der, Kullberg BJ. The Role of Toll-like Receptor (TLR) 2 and TLR4 in the Host Defense against Disseminated Candidiasis. *J Infect Dis.* 2002;185(10):1483-1489. doi:10.1086/340511.
  26. Netea MG, Suttmuller R, Hermann C, et al. Toll-Like Receptor 2 Suppresses Immunity against *Candida albicans* through Induction of IL-10 and

- Regulatory T Cells. *J Immunol.* 2004;172(6):3712-3718. doi:10.4049/jimmunol.172.6.3712.
27. Stahl PD, Ezekowitz R a. The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Curr Opin Immunol.* 1998;10(1):50-55. doi:10.1016/S0952-7915(98)80031-9.
  28. Le Cabec V, Emorine LJ, Toesca I, Cougoule C, Maridonneau-Parini I. The human macrophage mannose receptor is not a professional phagocytic receptor. *J Leukoc Biol.* 2005;77(6):934-943. doi:10.1189/jlb.1204705.
  29. Heinsbroek SEM, Taylor PR, Martinez FO, Martinez-Pomares L, Brown GD, Gordon S. Stage-specific sampling by pattern recognition receptors during *Candida albicans* phagocytosis. *PLoS Pathog.* 2008;4(11). doi:10.1371/journal.ppat.1000218.
  30. van de Veerdonk FL, Marijnissen RJ, Kullberg BJ, et al. The Macrophage Mannose Receptor Induces IL-17 in Response to *Candida albicans*. *Cell Host Microbe.* 2009;5(4):329-340. doi:10.1016/j.chom.2009.02.006.
  31. Brown GD. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(1):33-43. doi:10.1038/nri1745.
  32. Saijo S, Ikeda S, Yamabe K, et al. Dectin-2 recognition of  $\alpha$ -mannans and induction of Th17 cell differentiation is essential for host defense against *Candida albicans*. *Immunity.* 2010;32(5):681-691. doi:10.1016/j.immuni.2010.05.001.
  33. Cheng S-C, van de Veerdonk FL, Lenardon M, et al. The dectin-1/inflammasome pathway is responsible for the induction of protective T-helper 17 responses that discriminate between yeasts and hyphae of *Candida albicans*. *J Leukoc Biol.* 2011;90(2):357-366. doi:10.1189/jlb.1210702.
  34. Robinson MJ, Osorio F, Rosas M, et al. Dectin-2 is a Syk-coupled pattern recognition receptor crucial for Th17 responses to fungal infection. *J Exp Med.* 2009;206(9):2037-2051. doi:jem.20082818 [pii]r10.1084/jem.20082818 [doi].
  35. Meller S, Di Domizio J, Voo KS, et al. TH17 cells promote microbial killing and innate immune sensing of DNA via interleukin 26. *Nat Immunol.* 2015;26(July):1-8. doi:10.1038/ni.3211.
  36. Steele C, Wormley Jr FL. Immunology of fungal infections: lessons learned from animal models. *Curr Opin Microbiol.* 2012;15(4):413-419. doi:10.1016/j.mib.2012.05.017.
  37. Dalle F, Wächtler B, L'Ollivier C, et al. Cellular interactions of *Candida albicans* with human oral epithelial cells and enterocytes. *Cell Microbiol.* 2010;12(2):248-271. doi:10.1111/j.1462-5822.2009.01394.x.
  38. Moyes DL, Runglall M, Murciano C, et al. A biphasic innate immune MAPK

- response discriminates between the yeast and hyphal forms of *Candida albicans* in epithelial cells. *Cell Host Microbe*. 2010;8(3):225-235. doi:10.1016/j.chom.2010.08.002.
39. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006;441(7090):235-238. doi:10.1038/nature04753.
  40. McGeachy MJ, Cua DJ. Th17 Cell Differentiation: The Long and Winding Road. *Immunity*. 2008;28(4):445-453. doi:10.1016/j.immuni.2008.03.001.
  41. Joly Ma, N., Sadler, J. J., Soll, D. R., Cassel, S. L., Sutterwala, F. S. S. Cutting Edge: *Candida albicans* hyphae formation triggers activation of the Nlrp3 inflammasome. *J Immunol*. 2009;183(6):3578-3581. doi:10.4049/jimmunol.0901323.
  42. Heath WR, Carbone FR. The skin-resident and migratory immune system in steady state and memory: innate lymphocytes, dendritic cells and T cells. *Nat Immunol*. 2013;14(10):978-985. doi:10.1038/ni.2680.
  43. Grice, Elizabeth A. (Genetics and Molecular Biology Branch, National Human Genome Research Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, 20892–4442 U., Segre JA. The skin microbiome. *Nat Rev Microbiol*. 2013;9(4):244-253. doi:10.1038/nrmicro2537.The.
  44. Belkaid Y, Naik S, Bouladoux N, Wilhelm C, Molloy M. Recognition of peptidoglycan from the microbiota by Nod1 enhances systemic innate immunity. *Nat Med*. 2012;16(2):228-231. doi:10.1038/nm.2087.
  45. Toebak MJ, Gibbs S, Bruynzeel DP, Scheper RJ, Rustemeyer T. Dendritic cells: Biology of the skin. *Contact Dermatitis*. 2009;60(1):2-20. doi:10.1111/j.1600-0536.2008.01443.x.
  46. Haley K, Igyártó BZ, Ortner D, et al. Langerhans cells require MyD88-dependent signals for *Candida albicans* response but not for contact hypersensitivity or migration. *J Immunol*. 2012;188:4334-4339. doi:10.4049/jimmunol.1102759.
  47. Tay SS, Roediger B, Tong PL, Tikoo S, Weninger W. The Skin-Resident Immune Network. *Curr Dermatol Rep*. 2014;3:13-22. doi:10.1007/s13671-013-0063-9.
  48. Ali MA, Thrower SL, Stephanie J, et al. Topical steroid therapy induces pro-tolerogenic changes in Langerhans cells in human skin. 2015:411-422. doi:10.1111/imm.12518.
  49. Seneschal J, Clark RA, Gehad A, Baecher-Allan CM, Kupper TS. Human Epidermal Langerhans Cells Maintain Immune Homeostasis in Skin by Activating Skin Resident Regulatory T Cells. *Immunity*. 2012;36(5):873-884. doi:10.1016/j.immuni.2012.03.018.
  50. van der Aar AMG, Picavet DI, Muller FJ, et al. Langerhans cells favor skin



- flora tolerance through limited presentation of bacterial antigens and induction of regulatory T cells. *J Invest Dermatol.* 2013;133(5):1240-1249. doi:10.1038/jid.2012.500.
51. Hayward AR, Lawton AR. Induction of Plasma Cell Differentiation of Human Fetal Lymphocytes : Evidence for Functional Immaturity of T and B Cells Information about subscribing to The Journal of Immunology is online at : F E T A L L Y M P H O C Y T E S : E V I D E N C E F O R F U N . *J Immunol.* 1977;119(4):1213-1217.
  52. Filias A, Theodorou GL, Mouzopoulou S, Varvarigou AA, Mantagos S, Karakantza M. Phagocytic ability of neutrophils and monocytes in neonates. *BMC Pediatr.* 2011;11:29. doi:10.1186/1471-2431-11-29.
  53. Durandy A, De Saint Basile G, Lisowska-GrosPierre B, et al. Undetectable CD40 ligand expression on T cells and low B cell responsiveness to CD40 binding agonists in human newborns. *J Immunol.* 1995;154:1560-1568.
  54. Lewis D, Larsen A, Wilson C. Reduced interferon-gamma mRNA levels in human neonates: Evidence for an intrinsic T cell deficiency independent of other genes involved in T cell activation. *J Exp Med.* 1986;163:1018-1023. doi:10.1084/jem.20142182.
  55. Taylor S, Bryson YJ. Impaired production of gamma-interferon by newborn cells in vitro is due to a functionally immature macrophage. *J Immunol.* 1985;134(3):1493-1497.
  56. Wasik TJ, Jagodzinski PP, Hyjek EM, et al. Diminished \*HIV\*-specific \*CTL\* activity is associated with lower type 1 and enhanced type 2 responses to \*HIV\*-specific peptides during perinatal \*HIV\* infection. *J Immunol.* 1997;158(12):6029-6036.
  57. Dasari P, Zola H, Nicholson IC. Expression of Toll-like receptors by neonatal leukocytes. *Pediatr Allergy Immunol.* 2011;22(2):221-228. doi:10.1111/j.1399-3038.2010.01091.x.
  58. Sadeghi K, Berger A, Langgartner M, et al. Immaturity of Infection Control in Preterm and Term Newborns Is Associated with Impaired Toll-Like Receptor Signaling. *J Infect Dis.* 2007;195(2):296-302. doi:10.1086/509892.
  59. Hermann E, Truyens C, Alonso-Vega C, et al. Human fetuses are able to mount an adultlike CD8 T-cell response. *Blood.* 2002;100(6):2153-2158.
  60. Marchant A, Goetghebuer T, Ota MO, et al. Newborns develop a Th1-type immune response to Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin vaccination. *J Immunol.* 1999;163(4):2249-2255.
  61. Ridge P, Ephraim F, Polly M. Neonatal Tolerance Revisited : Turning on Newborn T Cells with Dendritic Cells. *Science (80- ).* 1996;271(26):20-23.
  62. Sarzotti M, Robbins DS, Hoffman PM. Induction of protective CTL

- Responses in newborn mice by a murine retrovirus. *Science* (80- ). 1996;271(30):6-8.
63. Romani N, Clausen BE, Stoitzner P. Langerhans cells and more : langerin-expressing dendritic cell subsets in the skin. *Immunol Rev.* 2010;234(1):120-141. doi:10.1111/j.0105-2896.2009.00886.x.Langerhans.
  64. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998;392(March):245-252. doi:10.1038/32588.
  65. Steinman RM. The Dendritic Cell System And Its Role In Immunogenicity. *Annu Rev Immunology.* 1991;9:271-296.
  66. Capucha T, Mizraji G, Segev H, et al. Distinct Murine Mucosal Langerhans Cell Subsets Develop from Pre-dendritic Cells and Monocytes. *Immunity.* 2015;43(2):369-381. doi:10.1016/j.immuni.2015.06.017.
  67. Merad M, Romani N, Randolph G. Langerhans cells at the interface of medicine, science, and industry. *J Invest Dermatol.* 2008;128(2):251-255. doi:10.1038/sj.jid.5701229.
  68. Romani N, Brunner PM, Stingl G. Changing Views of the Role of Langerhans Cells. *J Invest Dermatol.* 2012;132(3):872-881. doi:10.1038/jid.2011.437.
  69. Feng X, Igyarto BZ, Kaplan DH, et al. Correction for Gaiser et al., Cancer-associated epithelial cell adhesion molecule (EpCAM; CD326) enables epidermal Langerhans cell motility and migration in vivo. *Proc Natl Acad Sci.* 2016;113(14):E2095-E2095. doi:10.1073/pnas.1604056113.
  70. Hoeffel G, Wang Y, Greter M, et al. Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. *J Exp Med.* 2012;209(6):1167-1181. doi:10.1084/jem.20120340.
  71. Merad M. The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting. *Annu Rev Immunology.* 2013;(9). doi:10.1146/annurev-immunol-020711-074950.The.
  72. Holzmann S, Tripp CH, Schmuth M, et al. A model system using tape stripping for characterization of langerhans cell-precursors in vivo. *J Invest Dermatol.* 2004;122(5):1165-1174. doi:10.1111/j.0022-202X.2004.22520.x.
  73. Merad M, Manz MG, Karsunky H, et al. Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nat Immunol.* 2002;3(12):1135-1141. doi:10.1038/ni852.
  74. Kaplan D, Kashem SW, Igyarto BZ, et al. *Candida albicans* morphology and dendritic cell subsets determine T helper cell differentiation. *Immunity.* 2015;42(2):356-366. doi:10.1016/j.immuni.2015.01.008.Candida.

75. Forsthuber T, Yip HC, Lehmann P V. Induction of Th1 and Th2 Immunity in Neonatal Mice. *Science* (80- ). 1996;271(5256):1728-1730.
76. Gow N a. R, van de Veerdonk FL, Brown AJP, Netea MG. Candida albicans morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol.* 2011;10(2):112-122. doi:10.1038/nrmicro2711.
77. Zhu W, Filler SG. Interactions of Candida albicans with epithelial cells. *Cell Microbiol.* 2010;12(3):273-282. doi:10.1111/j.1462-5822.2009.01412.x.
78. Naglik J, Moyes D, Wächtler B, Hube B. Candida albicans interactions with epithelial cells and mucosal immunity. *Microbes Infect.* 2012;13:963-976. doi:10.1016/j.micinf.2011.06.009.Candida.
79. Jacobsen ID, Wilson D, Wächtler B, Brunke S, Naglik JR, Hube B. Candida albicans dimorphism as a therapeutic target. *Talk Democr.* 2012;10(1):85-93. doi:10.1586/eri.11.152.
80. Kaplan DH. In vivo Function of Langerhans Cells and Dermal DC. *Trends Immunol.* 2010;31(12):446-451. doi:10.1016/j.it.2010.08.006.In.
81. Macatonia S, Knight S, Edwards AJ, Griffiths S, Fryer P. Localization of antigen on lymph node dendritic cells after exposure to the contact sensitizer fluorescein isothiocyanate. *J Exp Med.* 1987;166(December):1654-1667.
82. Kripke ML, Munn CG, Jeevan A, Tang JM, Bucana C. Evidence that cutaneous antigen-presenting cells migrate to regional lymph nodes during contact sensitization. *J Immunol.* 1990;145(9):2833-2838. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2212665>.
83. Bobr A, Igyarto BZ, Haley KM, Li MO, Flavell RA, Kaplan DH. Autocrine / paracrine TGF-  $\beta$  1 inhibits Langerhans cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012. doi:10.1073/pnas.1119178109/-/DCSupplemental.[www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1119178109](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1119178109).
84. Kobayashi M, Asano H, Fujita Y, Hoshino T. Development of ATPase-positive, immature Langerhans cells in the fetal mouse epidermis and their maturation during the early postnatal period. *Cell Tissue Res.* 1987;248(0302-766X (Print)):315-322.
85. Elbe A, Tschachler E, Steiner G, Binder A, Wolff K, Stingl G. Maturation steps of bone marrow-derived dendritic murine epidermal cells. Phenotypic and functional studies on Langerhans cells and Thy-1+ dendritic epidermal cells in the perinatal period. *J Immunol.* 1989;143(0022-1767 (Print)):2431-2438.
86. Ginhoux F, Merad M. Ontogeny and homeostasis of Langerhans cells. *Immunol Cell Biol.* 2010;88(4):387-392. doi:10.1038/icb.2010.38.
87. Chorro L, Sarde A, Li M, et al. Langerhans cell (LC) proliferation mediates

- neonatal development, homeostasis, and inflammation-associated expansion of the epidermal LC network. *J Exp Med*. 2009;206(13):3089-3100. doi:10.1084/jem.20091586.
88. Doi S, Kobayashi M, Sugiura Y, Sakamoto T, Torii S. Heterogeneous reactivity of murine epidermal Langerhans cells after application of FITC: a histochemical evaluation. *Arch Histol Cytol*. 1999.
  89. Coyle a J, Gutierrez-Ramos JC. The expanding B7 superfamily: increasing complexity in costimulatory signals regulating T cell function. *Nat Immunol*. 2001;2(3):203-209. doi:10.1038/85251.
  90. Gaspari AA, Burns R, Nasir A, Ramirez D, Barth RK, Haidaris CG. CD86 (B7-2), but not CD80 (B7-1), expression in the epidermis of transgenic mice enhances the immunogenicity of primary cutaneous *Candida albicans* infections. *Infect Immun*. 1998;66(9):4440-4449.
  91. d'Ostiani CF, Del Sero G, Bacci A, et al. Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus *Candida albicans*. Implications for initiation of T helper cell immunity in vitro and in vivo. *J Exp Med*. 2000;191(10):1661-1674. doi:10.1084/jem.191.10.1661.
  92. Graaf CAA Van Der, Netea MG, Meer JWM Van Der, Kullberg BJ, Verschueren I. Differential Cytokine Production and Toll-Like Receptor Signaling Pathways by *Candida albicans* Blastospores and Hyphae. *Society*. 2005;73(11):7458-7464. doi:10.1128/IAI.73.11.7458.
  93. LeBlanc DM, Barousse MM, Fidel PL. Role for dendritic cells in immunoregulation during experimental vaginal candidiasis. *Infect Immun*. 2006;74(6):3213-3221. doi:10.1128/IAI.01824-05.
  94. Igyártá BZ, Haley K, Ortner D, Bobr A, Gerami-nejad M. Skin-Resident murine dendritic cells subsets promote distinct and opposing antigen-specific T helper responses. *Immunity*. 2012;35(2):260-272. doi:10.1016/j.immuni.2011.06.005.Skin-Resident.