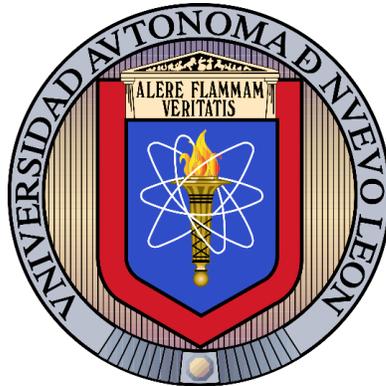


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



EVALUACIÓN *in vivo* DE FACTORES DE VIRULENCIA DE *Candida albicans*
DURANTE LA NEUROCANDIDOSIS NEONATAL MURINA

Por

BIOL. OCTAVIO CASTELÁN JAIME

Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRO EN CIENCIAS con
Orientación en Microbiología Médica

Marzo, 2025

EVALUACIÓN *in vivo* DE FACTORES DE VIRULENCIA DE *Candida albicans*
DURANTE LA NEUROCANDIDOSIS NEONATAL MURINA

Aprobación de la tesis



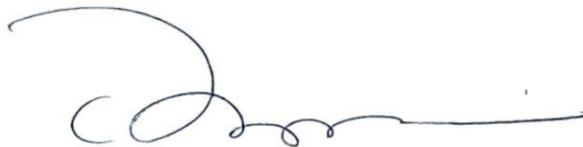
Dr. C. Miguel Ángel Becerril García
Director de Tesis



Dr. C. Orlando Esaú Flores Maldonado
Co-Director de Tesis



Dra. C. Gloria María González González
Comisión de Tesis



Dr. Med. Felipe Arturo Morales Martínez
Sub-Director de Estudios de Posgrado

EVALUACIÓN *in vivo* DE FACTORES DE VIRULENCIA DE *Candida albicans* DURANTE LA NEUROCANDIDOSIS NEONATAL MURINA

BIOL. OCTAVIO CASTELÁN JAIME FUE BECARIO DE LA SECRETARÍA DE CIENCIA, HUMANIDADES, TECNOLOGÍA E INNOVACIÓN (SECIHTI) CON EL NÚMERO DE REGISTRO 1233878

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI), dado que este trabajo de investigación se desarrolló en mayor medida bajo su financiamiento, siendo un valioso apoyo.

Al Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León y sus jefes, Dra. Gloria González González y Dr. Rogelio de Jesús Treviño, cuyo apoyo y visto bueno fue crucial para este trabajo.

Al Dr. Miguel Ángel Becerril Torres, asesor de este trabajo, dado que fue una fuente de experiencia, rigurosidad y guía para conducir y concluir la presente tesis de manera íntegra.

Al Dr. Orlando Flores Maldonado, co-asesor del presente, ya que, gracias a su involucramiento, paciencia y acompañamiento llevaron al continuo avance de este proyecto.

A la Dra. María de Lourdes Garza Rodríguez, por su amable y valioso apoyo en múltiples aspectos de esta tesis, cruciales para su terminación.

Al personal docente investigador del Departamento de Microbiología, por la formación, lo enseñado y lo aportado, es gratamente apreciado.

Mi enfático agradecimiento para la Mtra. Lizeth Sánchez Castro. Gracias Liz, me enseñaste mucho y esto hubiese sido más difícil de no ser por ti.

Gracias a la QBP Liliana Guadalupe Olvera Quijano, Lili, agradezco mucho tu apoyo dado, así como a la Dra. Berenice Villareal Ribota, Bere, gracias por acompañarme hasta los fines de semana en el laboratorio, ambas merecen mucho reconocimiento.

Quiero agradecer al equipo del Centro Regional de Control de Enfermedades infecciosas (CRCEI), gracias a Luis por su amable apoyo siempre, a Karen Solís, Karen Jaso, Lizeth y Josué, gracias por su cálido apoyo siempre y su amistad.

Mi gratitud con Ariel Molina y Pablo Ortiz, excelentes estudiantes y buenos amigos, espero de corazón que lleguen lejos, confío que lo harán, no cambien.

Al Mtro. Aldair Ochoa, amigo y compañero de maestría, Aldo, gracias, fuiste un gran apoyo cuando más lo necesité, mis mejores deseos.

Al Mtro. Daniel Hernández, gran profesional, persona y gran amigo, Danny, mi gymbro, nunca cambies.

A mis estimados investigadores, enfermeros y amigos: Mtra. Fabiola DC, Mtro. Omar, por supuesto al Mtro. Danilo Castro, gracias por ser mi bro en este lugar nuevo para mí, tu amistad fue un gran soporte y es una inspiración. Mi eterna gratitud a la Mtra. Amayrani JP, por sus estrictas observaciones y recomendaciones sobre este trabajo y gracias Amy, por ser mi pequeña familia.

A mi familia, por su enorme apoyo, esto no hubiera sido posible de no ser por ustedes, mis hermanas, y mis padres, donde quiera que vayan, mi agradecimiento siempre porque en la lejanía me dieron ese empujón que necesité.

DEDICATORIA

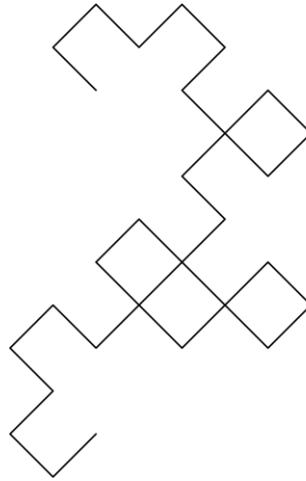
Este esfuerzo lo dedico a aquellos que me hicieron querer levantarme diario para ir y convivir con ustedes: Danny, Aldo, Carlos, Liz, Lili, Bere, Pablo, Ariel.

A aquellos que me hicieron tener ilusión, decisión y el sincero y responsable deseo que esta aventura nunca terminara Fabi, Omar, Jairo, Danilo y Amy.

A aquellos que tuve que dejar pero que nunca dejé, Wevo, Erick, Náutica, Xavier, Marilia y Brayan.

A aquellos que tengo la fortuna de llamar Madre, Padre y Hermanas.

A mi desarrollo y mejoramiento como ser.



And that will force everyone to ask the same question—What should I do with my power? —which is the very question science says it cannot answer.”

“So what will happen?” Ellie said.

Malcolm shrugged. “A change.”

“What kind of change?”

“All major changes are like death,” he said. “You can’t see to the other side until you are there.” And he closed his eyes.

Michael Crichton, Jurassic Park (1990)

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo		Página
1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Infecciones fúngicas como problema de salud pública mundial	1
1.2	<i>Candida albicans</i>	1
1.3	Factores de virulencia de <i>C. albicans</i>	3
1.3.1	Adhesinas y su rol en la colonización	3
1.3.2	Transición morfológica de levadura a hifa	5
1.3.3	Secreción de enzimas hidrolíticas	6
1.4	Cuadros clínicos por <i>C. albicans</i>	10
1.4.1	Candidiasis superficiales y en mucosas (mucocutánea)	10
1.4.2	Candidiasis en sangre (candidemia)	12
1.4.3	Candidiasis invasiva	12
1.5	Factores de riesgo y grupos vulnerables para la candidiasis	13
1.6	Candidiasis neonatal	14
1.7	Neurocandidiasis neonatal	16
2	ANTECEDENTES	18
3	JUSTIFICACIÓN	21
4	HIPÓTESIS	22
5	OBJETIVOS	22

5.1	Objetivo general	22
5.2	Objetivos específicos	22
6	MATERIALES Y MÉTODOS	23
6.1	Animales de experimentación	23
6.2	Descripción de la cepa y cultivo de <i>C. albicans</i>	24
6.3	Inóculos de infección	25
6.4	Infección sistémica en ratones recién nacidos	27
6.5	Purificación de <i>C. albicans</i> a partir del tejido cerebral infectado	27
6.6	Protocolo de extracción de ARN total del purificado de <i>C. albicans</i>	30
6.7	Validación del ARN de <i>C. albicans</i> proveniente de cerebro mediante PCR	31
6.8	Análisis de la expresión de factores de virulencia de <i>C. albicans</i>	31
6.9	Uso de PCR en tiempo real (qPCR) para analizar la expresión de <i>C. albicans</i> en las condiciones de infección letal vs infección no letal	33
6.10	Cálculo de expresión y análisis estadístico	34
7	RESULTADOS	36
7.1	Purificación de <i>C. albicans</i> a partir del tejido cerebral de ratones neonatos infectados con el inóculo letal	36
7.2	Purificación de <i>C. albicans</i> a partir del tejido de animales infectados con el inóculo no letal	38
7.3	Extracción de RNA total a partir del purificado de <i>C. albicans</i>	41
7.4	Modificaciones al protocolo de extracción de ARN (Protocolo modificado)	42

7.5	Verificación del ARN extraído mediante PCR	44
7.6	Análisis de la expresión de factores de virulencia de <i>C. albicans</i> durante la neurocandidiasis	45
8	DISCUSIÓN	50
9	CONCLUSIONES	59
10	PERSPECTIVAS	60
11	BIBLIOGRAFÍA	61

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Esquematación del método semicuantitativo para el conteo de cuadrantes con presencia de tejido en el campo de observación.....	29
Figura 2. Estructuras de <i>C. albicans</i> obtenidas tras la digestión con buffer de lisis 1 del tejido cerebral infectado con el inóculo letal.....	36
Figura 3. Estructuras de <i>C. albicans</i> obtenidas tras la digestión del tejido cerebral infectado con el inóculo letal.....	38
Figura 4. Estructuras de <i>C. albicans</i> obtenidas tras la digestión del tejido infectado con el inóculo no letal usando el buffer de lisis 3.....	38
Figura 5. Estructuras de <i>C. albicans</i> obtenidas tras la digestión del tejido infectado con el inóculo no letal usando el buffer de lisis 4.....	39
Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa del ARN de <i>C. albicans</i>	41
Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa del ARN de <i>C. albicans</i>	43
Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa de los genes específicos de <i>C. albicans</i> <i>ACT1</i> e <i>ITS</i>	44
Figura 9. Cambio en la expresión relativa de genes <i>ALS1-7</i> de <i>C. albicans</i> durante las condiciones experimentales <i>in vivo</i> y su condición basal <i>in vitro</i>	47
Figura 10. Cambio en la expresión relativa de genes <i>SAP1-7</i> y <i>HWP1</i> de <i>C. albicans</i> durante las condiciones experimentales <i>in vivo</i> y su condición basal <i>in vitro</i>	49

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1. Sistema de puntaje para estimar pureza de la muestra por el método semicuantitativo	29
Tabla 2. Secuencia de <i>primers</i> usados para el análisis de expresión.....	32
Tabla 3. Comparativa de los resultados obtenidos por los buffers de lisis para purificar a <i>C. albicans</i> a partir del tejido cerebral de ratones neonatos infectados..	40
Tabla 4. Lecturas de concentración y limpieza obtenidas del ARN de <i>C. albicans</i> extraído.....	43

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Infecciones fúngicas como problema de salud pública mundial

En las últimas décadas se han dado grandes avances en el campo de la salud humana, no obstante, las enfermedades infecciosas siguen siendo una de las principales causas de morbilidad a nivel mundial, la reciente pandemia de COVID-19 fue un claro recordatorio de esto, dado que se convirtió para el año 2021 en la segunda causa de muerte a nivel global según la Organización Mundial de la Salud (OMS) (1), de manera similar, las enfermedades fúngicas han mostrado ser una creciente amenaza para la salud pública (2), ya que para el año 2017 aproximadamente 300 millones de personas estaban siendo afectadas por fungemias graves alrededor del mundo, las cuales causaron más de 1.5 millones de muertes durante ese año, con una tasa de mortalidad que excede el 50% en algunas poblaciones (2,3) esta cifra ha aumentado de manera alarmante ya que para el 2020 se registraron 1.7 millones de muertes causadas por infecciones fúngicas (4) y para el año 2024 los análisis más rigurosos muestran cifras de 3.8 millones de muertes asociadas con estas infecciones con 2.5 millones atribuibles de forma directa a los patógenos fúngicos (5).

1.2 *Candida albicans*

Entre estas infecciones fúngicas, la más reportada a nivel mundial es la micosis ocasionada por el género *Candida*, los cuales son hongos levaduriformes, de este género se conocen unas 200 especies, de estas solo unas pocas (alrededor de 30) producen enfermedad en el ser humano (6), de forma puntual las especies más

prevalentes son *C. albicans*, seguida de *C. glabrata* (*Nakaseomyces glabratus*) y *C. parapsilosis* de acuerdo con estudios epidemiológicos de Australia, Estados Unidos y la Unión Europea (7,8) además a estas se les suma *C. krusei* (*Pichia kudriavzevii*) y *C. tropicalis*, según un estudio epidemiológico de los centros de hematología en Italia (9), estas son responsables de una amplia variedad de infecciones, desde infecciones superficiales de la mucosa hasta infecciones sistémicas que pueden ser potencialmente mortales (10,11). *C. albicans* destaca como la especie más prevalente, siendo la más identificada en los casos de candidiasis reportados a nivel mundial (2) y por ende un alto porcentaje de las micosis en el mundo son causadas por esta especie. A pesar del incremento de infecciones causadas por otras especies, *C. albicans* sigue siendo la especie de *Candida* más aislada en casos de infecciones tanto superficiales como graves según datos epidemiológicos recientes (7–9), con cifras que superan el 45% de prevalencia en los casos de infección sanguínea por *Candida spp* (12).

La alta prevalencia de *C. albicans* se debe a que las infecciones suelen ser endógenas, es decir, este hongo habita de manera natural en el cuerpo humano y forma parte del microbioma, estando presente en más de la mitad de la población (13,14). Además, está presente en diversas especies animales de sangre caliente, como mamíferos y aves, lo que la convierte en una especie de distribución cosmopolita (15,16). Dentro del cuerpo humano, *C. albicans* se encuentra comúnmente en superficies mucosas, incluyendo el tracto gastrointestinal, el genitourinario y el respiratorio (16). En su hábitat, *C. albicans* crece comúnmente como levadura, esta tiene una morfología ovalada o esférica y tiene un tamaño que

varía entre 2 y 6 μm (17). Es un hongo ascomiceto (Ascomycota) diploide que se reproduce por gemación, cuyas levaduras se tiñen de violeta con la tinción de Gram. Una de las características distintivas de *C. albicans* es su capacidad para formar hifas y pseudohifas, siendo un organismo polimórfico o bien pleomórfico, lo que indica su capacidad para cambiar de morfología según las condiciones ambientales (14,16–18). Este cambio morfológico, conocido como filamentación, le permite pasar de una forma de levadura a una hifa de manera reversible, y está directamente relacionado con la virulencia de *C. albicans*, permitiendo su transición de comensal a patógeno (13,14,18).

1.3 Factores de virulencia de *C. albicans*

Los factores de virulencia de *C. albicans* le permiten establecerse, colonizar e invadir los tejidos del hospedero (13,17,19). Los principales y más estudiados son aquellos relacionados con su capacidad de llevar a cabo la transición morfológica de levadura a hifa según el microambiente en el que crece, esta capacidad hace que el hongo sea extremadamente adaptable, esto explica su capacidad de colonizar prácticamente cualquier tejido humano (14,18,20). Este proceso de colonización comienza con el hongo en su forma levaduriforme, y en la mayoría de los casos resulta en una colonización inocua para el hospedero, dado que la levadura es normalmente su forma comensal (11,13).

1.3.1 Adhesinas y su rol en la colonización

Para colonizar, *C. albicans* utiliza principalmente adhesinas, que son proteínas distribuidas en la superficie de su pared celular, estas proteínas facilitan la adhesión del hongo a diversas superficies tanto bióticas como abióticas, lo que explica su

afinidad por contaminar equipos y material médico (13,21,22). La adhesión es uno de los principales factores de virulencia de *C. albicans*, siendo las proteínas Als (Secuencias similares a la aglutinina) las más estudiadas. Se conocen ocho tipos diferentes de Als, desde Als1 hasta Als7 y Als9, además de otras adhesinas como Hwp1 (proteína de pared de hifa) (13,19,22,23).

Estas proteínas permiten al hongo adherirse a numerosos ligandos, en particular, se ha identificado el rol de Als3 en la adhesión a una amplia variedad de moléculas, tales como fibronectina humana, laminina, colágeno, proteína gp96 de shock térmico, receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR), receptor HER2, N-cadherina, E-cadherina, fibrinógeno, caseína, ferritina equina, albúmina sérica bovina (BSA) y la proteína de superficie SspB de *Streptococcus gordonii* (22).

La proteína Als3 desempeña un papel crucial en la virulencia de *C. albicans* al actuar como una invasina, facilitando la penetración de las hifas en las células del hospedador mediante un proceso denominado endocitosis inducida, en este proceso, la célula es provocada a rodear la hifa hasta que esta logra ingresar en su interior, causando así daño celular y muerte (24). Este mecanismo de endocitosis favorece la invasión de órganos, tal es el caso del cerebro, que expresa en la superficie de sus células endoteliales la proteína gp96, a la cual Als3 muestra afinidad, lo cual ha sido corroborado en experimentos *in vitro* (25).

Se ha estudiado menos sobre la capacidad de algunas otras proteínas como factores de virulencia. Un ejemplo es Als1, a la que se le ha encontrado una función similar a Als3, tanto en levaduras como en hifas, ambas proteínas son conocidas por

facilitar la formación de biopelículas (22). La biopelícula es una estructura de resistencia compuesta por ácidos nucleicos y polisacáridos, la cual confiere al patógeno protección en un medio hostil. Estas biopelículas pueden ser fuente de serias contaminaciones, como el caso de los equipos médico-quirúrgicos, en los que sobresale las propiedades de las adhesinas como Als5 que le confiere afinidad por superficies abióticas. Así mismo, interfieren otras proteínas, como Als1 y Als4 que fomentan la agregación entre células. Estas estructuras proporcionan a *C. albicans* una mayor resistencia a los tratamientos antifúngicos a los que usualmente es susceptible (22), aunado a lo anterior, se ha reportado que *C. albicans* es resistente a fluconazol, voriconazol e itraconazol después de la formación de biopelícula (24).

1.3.2 Transición morfológica de levadura a hifa

La filamentación de *C. albicans* dependerá de las condiciones ambientales y nutricionales en las que el hongo se desarrolla, estas condiciones pueden ser la temperatura que encima de los 37 °C induce la formación de hifas, así mismo el pH alcalino (por encima de 7), de igual manera la presencia de suero humano e inclusive las concentraciones altas de CO₂ son suficientes para desencadenar este proceso (13,14,19).

La transición morfológica le otorga a *C. albicans* un conjunto de propiedades que la vuelven especialmente virulenta en comparación con las demás especies, principalmente la capacidad de invadir órganos sanos atravesando los tejidos, así mismo el tigmotropismo el cual se describe como una especie de sentido del tacto que poseen las hifas, le ayuda a moverse de manera más eficiente por los tejidos del hospedero (11,13,18,23). En adición a lo mencionado, el proceso de filamentación

promueve la activación de una compleja red de vías de señalización reguladoras que a su vez activan diversos factores de transcripción (14,18,19). Estos factores de transcripción regulan la expresión de genes asociados con la traducción de adhesinas en la hifa como es el caso de las Als específicas de hifa y la Hwp1, así como la secreción de enzimas hidrolíticas como pueden ser las Aspartil Proteasas Secretadas (Sap) y fosfolipasas (PL), las cuales en su conjunto proveen al hongo de capacidad patogénica como la destrucción de tejidos, adhesión y evasión de la respuesta inmune (14,18).

1.3.3 Secreción de enzimas hidrolíticas

Una vez formado el micelio, las hifas producen en la punta un conjunto de enzimas a medida que crecen, las cuales le ayudan a la penetración del tejido, así como la adquisición de nutrientes, pues durante el proceso invasivo, los tejidos se vuelven una fuente limitada de recursos para el hongo, estas enzimas hidrolíticas pueden ser varias, pero destacan puntualmente las Saps, las PLs, las lipasas y más recientemente se ha investigado el rol de la toxina peptídica candidalisina con cualidades hemolíticas y citotóxicas (13,19,25). Las Saps a menudo son conocidas como uno de los principales factores de virulencia, estas están presentes en todos los aislados de *C. albicans*, su capacidad de digerir proteínas del hospedero es amplia, debido a que existen 10 variedades diferentes (Sap 1-10), de las cuales 8 (Sap1-8) son secretadas por el hongo, al tiempo que Sap 9 y 10 son componentes estructurales de la pared celular de la hifa (18,26).

Su variedad las hace tener una extensa especificidad por componentes celulares y de la matriz extracelular de tejidos humanos, como lo son la albúmina,

hemoglobina, queratina, colágeno, laminina, fibrinógeno y mucina, que son los que se ha logrado estudiar hasta ahora (18). Las Saps no solamente tienen un rol importante en la invasión, sino que su propiedad de degradar un amplio conjunto de proteínas las vuelve un factor que usa *C. albicans* para evadir la respuesta inmune del hospedero, dado que las Saps son capaces de digerir casi todas las inmunoglobulinas, incluyendo la inmunoglobulina A, que es resistente a la mayoría de las proteínas bacterianas (18,26).

Las Saps 1-3 se han asociado más con las infecciones superficiales, en contraste, las Saps 4-6 se les asocia más con la infección de tejidos profundos y la interacción con la respuesta inmune del hospedero, las Saps también parecen tener un rol regulador sobre el cambio morfológico de *C. albicans*, de forma puntual, se estudió como Ume6 que es un regulador importante de la filamentación inhibe la colonización del intestino activando al gen *SAP6* asociado a su proteína homóloga, por lo tanto al crear cepas mutantes carentes de *SAP6*, el hongo logró colonizar de forma más eficiente, por su parte, aquellas mutantes que sobreexpresaron el gen fueron menos eficientes para colonizar (18,25).

Por otro lado Sap8 se ha encontrado que puede cortar glicoproteínas de señalización expresadas por *C. albicans* desencadenando la activación de la vía Cek1-MAPK que es una vía de respuesta al estrés ambiental, la cual causa cambios morfológicos incluida la filamentación (27); en el caso de *SAP7*, la expresión de este gen está directamente relacionado con la supervivencia de *C. albicans*, ayudando a las células del hongo escapar del torrente sanguíneo, por lo que se hipotetiza que Sap7 tiene un rol en la infección sistémica por *C. albicans* (28); por su parte la

expresión de *SAP9* en suero se asocia con un crecimiento invasivo de hifas, Sap9 y 10 están ancladas a la pared celular y la expresión de los genes asociadas con estas (*SAP9* y *SAP10*) se correlaciona con la producción de biopelículas (29). La producción de Saps en *C. albicans* también se le relaciona con la resistencia a fármacos, se ha estudiado que en las cepas que exhiben resistencia a fluconazol tienden a producir mayor cantidad de Saps cuando se les administra el antifúngico (30).

Además de las Saps, *C. albicans* posee otras enzimas las cuales usa para dañar los órganos que invade, tal es el caso de las fosfolipasas que son secretadas por el hongo y que su función es la de romper la membrana celular de los tejidos del hospedero (13,19,25), esto lo logra hidrolizando uno o más enlaces éster en los glicerofosfolípidos que componen las membranas de las células animales (31). Estas enzimas juegan un papel crucial en la invasión de tejidos por *C. albicans*, un hongo patógeno. La fosfolipasa B (PLB) es particularmente importante en la patogenicidad, ya que interrumpe las membranas del huésped y permite que la punta de la hifa entre en el citoplasma (20,31), además de la PLB, *C. albicans* posee otras 3 subclases distintas de fosfolipasas, nombradas dependiendo del enlace éster objetivo: A (PLA, PLA2), B (PLB), C (PLC) y D (PLD) (32).

La expresión de PLs no se relaciona directamente con el cambio morfológico, en estudios experimentales reportados, se halló que las cepas mutantes carentes del gen *PLB1* no tienen problemas para filamentar *in vitro*, sin embargo, sí tuvieron una reducción significativa en la virulencia cuando se probaron en experimentos *in vivo*, por tanto, Las PLs son específicamente necesarias para la virulencia del hongo (20,32,33).

Entre este arsenal de virulencia, de forma más reciente se ha encontrado que *C. albicans* secreta una toxina peptídica, la cual explica las propiedades hemolíticas del hongo, esta toxina se denominó candidalisina, pues es producida exclusivamente por las hifas de *C. albicans* (13,34), es esencial durante las infecciones mucosas y sistémicas (13,31,35). Esta molécula facilita la permeabilidad de las membranas celulares del hospedero, resultando en la salida de la proteína lactato deshidrogenasa y la desestabilización de las membranas celulares, causando poros en la membrana (31,34,36). La candidalisina también es una molécula inmunoestimulante que favorece la afluencia de citocinas en el epitelio durante la infección por *C. albicans* (31,32). En las infecciones orales, las células epiteliales responden directamente a la presencia de candidalisina mediante la activación del receptor que induce al factor de crecimiento epidérmico (EGFR), lo cual es crucial en el proceso de infección. Esta activación desencadena la vía de señalización de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK), que incluye ERK1/2, JNK y p38, llevando a la producción de interleucinas 1 y 36 (IL-1 e IL-36), que son esenciales para la defensa antifúngica en la mucosa oral (31,37).

A pesar de que se ha encontrado un papel importante de la candidalisina para virulencia de *C. albicans*, no es más relevante en este proceso patogénico que otras enzimas, prueba de esto es que la toxina se ha extraído y purificado, administrándose a células *in vitro*, resultando en una citotoxicidad menos eficiente que la observada cuando las mismas células se infectan con *C. albicans* (35), por lo que es más adecuado definir a la virulencia de *C. albicans* como el conjunto de la acción de sus

factores de virulencia, los cuales no son pocos, destacando así la adaptabilidad de este hongo.

1.4 Cuadros clínicos por *C. albicans*

La adaptabilidad de *C. albicans* aunado al conjunto de factores de virulencia que exhibe la hacen capaz de establecerse e invadir diversos tejidos del cuerpo humano, causando múltiples infecciones, a las cuales se les denomina, candidiasis, estas infecciones pueden ser de naturaleza clínica diversa según el sitio infectado, en la mayoría de los casos son superficiales en piel y mucosas, pero pueden complicarse en formas graves como las candidiasis sistémicas (21,38). Las superficies mucocutáneas más afectadas por este hongo están la vaginal (candidiasis vulvovaginal), mucosa oral (candidiasis orofaríngea), esofágica (candidiasis esofágica), llegando inclusive a las uñas (onicomicosis) y en casos más raros, la piel (candidiasis cutánea) (10,11,13).

1.4.1 Candidiasis superficiales y en mucosas (mucocutánea)

Aunque no es usual, la candidiasis puede afectar la piel, el órgano más superficial, la maceración y la humedad de la piel influyen en su aparición, por lo que será más común en las zonas con pliegues, se presenta como placas eritemato-escamosas, con fisuras o erosiones, vesículas y pústulas, la sintomatología más común es el prurito y, en ocasiones, el ardor (11).

Por otro lado, la candidiasis en mucosas, es la más común de todas (10,11,21), puede afectar a individuos sanos como es el caso de la candidiasis vulvovaginal, la cual se da por la proliferación de estas levaduras en la vagina, esta es una afección

muy extendida, un 75% de las mujeres experimenta en algún momento de su vida una candidiasis vulvovaginal y hasta el 50% padece episodios recurrentes de infección (39), estas infecciones si bien no suponen un peligro para la mujer, sí cursan con molestos síntomas que incluyen irritación que suele ser dolorosa, prurito y flujo vaginal anormal, la mayoría de estas infecciones son causadas por *C. albicans* (10).

Si bien las micosis por *C. albicans* pueden afectar a personas sanas, estas son mucho más frecuentes y peligrosas en personas inmunocomprometidas, como aquellas que viven con cáncer, tratamientos inmunosupresores, infección por virus de inmunodeficiencia (VIH), entre otros son más susceptibles a candidiasis en mucosas como candidiasis oral, en la que se desarrolla con periodontitis, así como inflamación en encías (gingivitis) (10,11,40).

Las infecciones de mucosas digestivas como en la candidiasis intestinal pueden ser relativamente comunes en los individuos inmunocomprometidos, dado que *Candida spp.* se encuentra en el intestino del 70% de personas saludables, estas infecciones suelen cursar con síntomas como son inflamación, indigestión, náusea, diarrea y gases (41). Esta afección es generalmente causada por la disbiosis en el microbioma del tracto gastrointestinal derivada de tratamientos antibióticos de larga duración o bien el mal uso de estos tratamientos, lo que, en conjunto con un sistema inmune comprometido, deriva una candidiasis intestinal, la cual de no ser controlada puede atravesar la barrera intestinal infiltrando al patógeno en el torrente sanguíneo causando sepsis (candidemia).

1.4.2 Candidiasis en sangre (candidemia)

La candidemia es una afección grave, a menudo se le menciona por ser la cuarta causa más común de infecciones en sangre (42), se ha estimado que ocurren 400 000 casos de candidemia al año, estas asociadas a la atención médica y con *C. albicans* siendo el agente causal más común de candidemias (38). Esta es una afección grave con mortalidades variables pero siempre altas que van desde el 10% hasta inclusive llegar o superar el 47% según algunos autores (10,21,38,42).

Otra importante vía de entrada del patógeno para causar candidemia es cuando los catéteres venosos centrales, utilizados para la administración de medicamentos o nutrición parenteral, se contaminan, esto pudiendo ocurrir durante la inserción o el mantenimiento del catéter, *C. albicans* puede colonizar la piel circundante, migrar por el lumen del catéter y entrar en el torrente sanguíneo (21,43). Una vez que el hongo entra en el sistema circulatorio, puede desencadenar una respuesta inflamatoria sistémica, manifestándose con fiebre, escalofríos, y, en casos graves, shock séptico (10,11). La diseminación en sangre puede ser un preámbulo de una infección invasiva afectando órganos sanos como pueden ser riñones, hígado, bazo, e incluso el sistema nervioso central (13,44).

1.4.3 Candidiasis invasiva

La candidiasis invasiva es una afección igualmente grave que según sea el órgano afectado puede tener mortalidad de hasta 71%, su tratamiento es complejo, debido a que un paciente puede requerir extender su estancia en el hospital de 2 a 4 semanas e inclusive meses, además de que requiere muchos gastos, que en países

desarrollados pueden ascender a los \$160 000 dólares americanos por paciente, por lo que para los hospitales las infecciones invasivas por *Candida spp* son un fuerte problema económico también (45).

Si bien las tendencias en las infecciones causadas por *C. albicans* se han mostrado estables en gran medida por el avance de otras especies de *Candida*, se considera que la resistencia observada en aislados de sitios no estériles, así como en países en vías de desarrollo ha aumentado, esto no ha hecho más que remarcar la importancia de atender la problemática que suponen las infecciones invasivas por *C. albicans*, como parte de esto, recientemente la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha publicado su lista de patógenos fúngicos de prioridad, en la que *C. albicans* figura como un patógeno fúngico de prioridad crítica, en los cuales centrar los esfuerzos de investigación, diagnósticos y tratamiento (2).

1.5 Factores de riesgo y grupos vulnerables para la candidiasis

Diversos estudios epidemiológicos indican que existen múltiples factores de riesgo que predisponen al desarrollo de candidiasis en humanos. Entre estos factores destaca la inmunosupresión, la cual puede ser causada por enfermedades debilitantes como la diabetes, infecciones como la tuberculosis y el VIH (virus de inmunodeficiencia humana), y padecimientos oncológicos como sarcomas o leucemias (10,11,13). Además, el uso de medicamentos citotóxicos, como la quimioterapia, y supresores del sistema inmunológico, como la corticoterapia, también contribuyen a la inmunosupresión, así como las cirugías que requieren el uso de inmunosupresores, tales como los trasplantes, así como los procedimientos

quirúrgicos y cateterismos, son importantes factores que predisponen a la aparición y complicación de la candidiasis(10,11).

La edad es otro factor crítico, ya que individuos en los extremos de la vida (tercera edad y neonatos) pueden presentar varios de estos factores predisponentes. En el caso de los neonatos, la predisposición para desarrollar candidiasis y su posterior complicación es especialmente alta, sobre todo en aquellos que nacen prematuros (11,44,46). Las infecciones sistémicas por *C. albicans* en neonatos representan un grave problema de salud para este grupo poblacional, dado que se estima que la candidemia se sitúa en tercer lugar entre las etiologías de sepsis de inicio tardío en neonatos (44).

1.6 Candidiasis neonatal

La especial vulnerabilidad en neonatos prematuros se debe a la acumulación de distintos factores predisponentes por las condiciones fisiológicas y anatómicas que su estado de desarrollo (11,46), aunado a lo anterior, su condición los obliga a estar internados en las unidades de cuidados intensivos hospitalarios por largos periodos de tiempo, a la par de someterse a constantes procedimientos médicos para evitar complicaciones de salud, lo cual aumenta más aún su exposición a contraer el patógeno (44,46). Esto los hace 10 veces más propensos a desarrollar candidiasis invasiva en comparación con recién nacidos a término (44,47).

La incidencia de candidiasis invasiva en neonatos es de 5.7 por cada 100 000 nacidos, y aún mayor en neonatos de bajo peso, alcanzando 103.8 por cada 100 000 nacidos vivos según un estudio de cohorte que se llevó a cabo en un espacio de

tiempo del 2004 al 2014 (48). En este mismo estudio se encontró que la especie más prevalente en los neonatos infectados fue *C. albicans*; la mortalidad a los 30 días es considerablemente alta, pero esta correlacionada en su severidad con la región, mientras las regiones de altos ingresos la mortalidad llegó al 18%, en América latina esta ascendió hasta 40% (48), sin embargo otro estudio de tipo cohorte en Taiwán de 18 años de duración encontró que la candidemia neonatal sigue siendo una infección grave con una alta tasa de mortalidad superando el 40%, especialmente en neonatos con comorbilidades crónicas y que si bien, a pesar de los avances en los tratamientos antifúngicos, la mortalidad no ha mejorado significativamente en la última década (49).

Para efectuar una evaluación adecuada de los pacientes neonatos con candidiasis diseminada, es fundamental comprender los factores de riesgo previamente mencionados y reconocer sus manifestaciones clínicas.

La candidiasis diseminada neonatal presenta síntomas diversos como endoftalmitis, anorexia, fiebre persistente, lesiones cutáneas, hipotensión, mialgias, abscesos renales, nefropatía obstructiva y endocarditis, hasta sepsis y choque séptico (50). La meningitis es la manifestación más relevante en neonatos, la infección puede avanzar afectando el sistema nervioso central con posibles complicaciones severas y potencialmente letales, en tanto que aquellos que sobreviven suelen tener secuelas neurológicas permanentes (51,52).

1.7 Neurocandidiasis neonatal

La invasión de *C. albicans* al sistema nervioso central (SNC), definida a menudo como neurocandidiasis, es una complicación severa de la candidiasis invasiva, esta cursa con meningoencefalitis, abscesos cerebrales y ventriculitis, las secuelas a largo plazo incluyen un deterioro neurológico, parálisis cerebral además de deficiencias audiovisuales y cognitivas (44,52).

La correlación de neurocandidiasis en los neonatos prematuros puede tener varios factores que influyen durante la infección, se ha hipotetizado que esta relación se debe al desarrollo incompleto de sus tejidos, entre ellos la inmadurez de las barreras físicas frente a *Candida spp*, como lo es la barrera hematoencefálica (BHE) (52-55).

La manera en que *C. albicans* puede ingresar al cerebro del neonato es aún tema de discusión e investigación, por un lado se tiene presente que la BHE del neonato prematuro no está completamente desarrollada, una investigación publicada previamente reportó que el hongo tiene cierta afinidad por la proteína de shock térmico gp96 que expresa las células endoteliales del cerebro, esta, en conjunto con un receptor reportado como desconocido conducía a una transcitosis, que es un proceso celular especializado que permite el transporte de macromoléculas a través de una célula desde un lado de la membrana a otro, que en este caso permitiría a *C. albicans* atravesar esta capa de células y llegar al cerebro (54), los hallazgos de este estudio se dieron gracias a experimentos en células endoteliales *in vitro* y una corroboración en experimentos *in vivo* usando cepas

mutantes con ratones adultos, ambas metodologías presentan limitaciones a considerar si se requiere trabajar con la neurocandidiasis neonatal.

Otro estudio independiente al anterior propuso la idea de que el traspaso al cerebro derivó como resultado de un proceso lítico de las células endoteliales, que llevó a muerte celular y a una pérdida en la integridad de la BHE en los ratones utilizados apenas a las 24 h después de la infección, los autores encontraron que *C. albicans* aparece en el cerebro desde antes de la interrupción de la BHE y por tanto se sugirió que la invasión inicial puede ocurrir mediante mecanismos aun desconocidos (56).

También se ha investigado el papel de los defectos congénitos en la respuesta inmune de ciertos individuos que los hace más propensos a desarrollar neurocandidiasis. Esto está directamente asociado con la deficiencia de CARD9, una molécula adaptadora esencial para la protección contra la candidiasis del sistema nervioso central (SNC) en humanos, debido a su papel fundamental en el reclutamiento de neutrófilos(44,52,57). La deficiencia de CARD9 altera tanto este proceso de reclutamiento como la función de los neutrófilos, que son cruciales para la defensa contra infecciones fúngicas en el SNC. Además, estudios *in vivo* han demostrado que los animales privados del gen homólogo *CARD9* presentan una mayor susceptibilidad a infecciones por *C. albicans* (57).

Para explicar cómo *C. albicans* puede invadir el cerebro durante el proceso infeccioso, se han planteado hipótesis que atribuyen esta susceptibilidad a la inmadurez de la BHE en el neonato, o bien, como resultado de defectos congénitos

en el sistema inmune (47,52,58). Sin embargo, como en la mayoría de enfermedades infecciosas el daño causado no solo se da de forma indirecta al patógeno, sino también de manera directa (10), o sea que el daño directo de *C. albicans* por acción de sus múltiples factores de virulencia también debe tenerse en consideración para explorar la patogenia de la neurocandidiasis (11,59), sin embargo, es un tópico que no ha sido tan estudiado, especialmente al trabajar en esta población vulnerable que son los neonatos prematuros.

2 ANTECEDENTES

Lo anteriormente expuesto reafirma la importancia de dilucidar los mecanismos por los cuales se produce dicho daño y cómo *C. albicans* contribuye a esta patogénesis de forma directa o indirecta durante la neurocandidiasis. En general, la neurocandidiasis, incluyendo su clínica, patología, diagnóstico y manejo, especialmente en neonatos y neonatos prematuros, está escasamente descrita en la literatura científica (58). En este sentido, nuestro equipo de trabajo ha desarrollado y estandarizado previamente un modelo de infección en ratones recién nacidos con cero días de edad (menos de 24 horas) con *C. albicans* para emular una infección diseminada en neonatos prematuros humanos por este patógeno, esto se ha logrado a través de inocular el patógeno en el torrente sanguíneo de los ratones neonatos (60).

Se diseñó un modelo *in vivo* de candidiasis diseminada. Primero, se infectaron ratones adultos con un inóculo de 1×10^6 levaduras, lo que resultó en una mortalidad del 100% en un plazo de 12 días. Luego, se intentó inducir la infección sistémica en

ratones neonatos usando un inóculo equivalente al de los adultos. Para ello, se infectaron con 1×10^5 levaduras. En este grupo de neonatos, la mortalidad fue nula, sobreviviendo todos los animales infectados. Sin embargo, al ajustar el inóculo a 5×10^5 levaduras, se observó una mortalidad del 80% en los neonatos. En función de estos resultados, se denominó al inóculo de 1×10^5 como Inóculo No Letal y al de 5×10^5 levaduras como Inóculo Letal (60).

En este mismo estudio, se evidenció que los neonatos infectados presentaban mayor carga e invasión fúngicas en el hígado y el cerebro, mientras que en ratones adultos el riñón era el tejido más afectado. Así se hipotetizó que el nivel de invasión del cerebro en neonatos estuvo en función del tipo de inóculo inyectado, presentando una mayor invasión cerebral en los neonatos infectados con un inóculo No letal, así mismo, se observó que *C. albicans* en tejido cerebral presentó morfologías diferentes en función del inóculo administrado, siendo principalmente hifas en el inóculo Letal (60).

En un estudio posterior, también del grupo de trabajo, se encontró que la infección inducida por el inóculo Letal provocaba una invasión cerebral con altos niveles de necrosis en las células de este órgano, en contraste, la infección con un inóculo No letal había un predominio de apoptosis y en general menos daño al cerebro (61). La causa de las diferencias observadas entre la infección letal y la infección no letal aún no están claras, por lo que resulta relevante estudiar el rol que ejerce el patógeno en este proceso de daño aumentado en el cerebro del neonato.

A pesar de la investigación realizada en los últimos años sobre la susceptibilidad de los neonatos a la neurocandidiasis, son pocos los estudios que evalúan el rol de los factores de virulencia de *C. albicans* en el desarrollo y complicación de la neurocandidiasis neonatal. Uno de los más relevantes es el estudio de Bliss *et al.* (47) en el que se analizaron aislados clínicos de *Candida spp* provenientes de pacientes neonatos colonizados por el hongo sin cuadro de candidiasis invasiva, los aislados se obtuvieron de sitios no estériles como la boca, el ano y la ingle. Se compararon contra aquellos aislados de *Candida spp* que provenían de candidiasis invasiva (sangre, orina y fluido cefalorraquídeo) y se evaluó su virulencia mediante el uso de pruebas de cambio fenotípico, adhesión y citotoxicidad.

Estos investigadores encontraron que el 61 % de los aislamientos invasivos de *C. albicans* y el 42 % de los aislamientos invasivos de *C. parapsilosis*, tenían una mayor virulencia, pues mostraron una mayor citotoxicidad en células epiteliales humanas *in vitro*, además de mostrar mayor adherencia a las células epiteliales, interesantemente, todos los aislamientos de líquido cefalorraquídeo (LCR) de *C. albicans* exhibieron una mayor virulencia, tanto en adhesión, y citotoxicidad, comparado a los resultados obtenidos de los aislados de sangre y orina (47), mostrando la importancia que representa la virulencia del hongo para la complicación de la enfermedad, sin embargo, en el estudio de Bliss *et al.* (19) no se evidenció cuáles son los factores específicos que *C. albicans* sobreexpresa en el cerebro de los neonatos y que la hacen más virulenta en comparación con los aislados de otros órganos. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar

in vivo la expresión de factores de virulencia de *C. albicans* aislada de ratones neonatos con neurocandidiasis.

3 JUSTIFICACIÓN

La candidemia y su complicación en neurocandidiasis son un problema de salud pública durante el periodo neonatal, particularmente para los recién nacidos prematuros, debido a la alta letalidad del 50%, mientras aquellos neonatos que sobreviven a la infección presentan elevado riesgo a tener secuelas graves y permanentes que son incapacitantes para los sobrevivientes. Recientemente la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha catalogado a *C. albicans* como un patógeno fúngico de prioridad crítica al cual se deben dirigir las investigaciones y acciones en salud pública.

A pesar de que los factores de virulencia de *C. albicans* han sido ampliamente estudiados, aún se desconoce el papel que estos ejercen durante la neurocandidiasis neonatal, así como su relación con la mayor susceptibilidad y progresión de esta patología en los recién nacidos. Por lo tanto, es de vital importancia comprender el papel de los factores de virulencia que expresa el microorganismo durante la infección al SNC para tener mayores conocimientos que permitan el desarrollo de tratamientos más adecuados y mejores estrategias de prevención contra la neurocandidiasis neonatal.

4 HIPÓTESIS

C. albicans aislada del cerebro de ratones neonatos con una infección letal exhibe una sobreexpresión de factores de virulencia en comparación con una infección no letal.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

- Evaluar *in vivo* la expresión de los factores de virulencia de *C. albicans* aislada de ratones neonatos con neurocandidiasis.

5.2 Objetivos específicos

- Aislar y Purificar a *C. albicans* del cerebro de ratones neonatos con neurocandidiasis que permita la extracción de su ARN.
- Comparar la expresión génica de factores de virulencia de *C. albicans* purificada del cerebro de ratones neonatos infectados con un inóculo letal contra los infectados con un inóculo no letal.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Animales de experimentación

El presente trabajo de investigación fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación, el Comité de Investigación y el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL), pertenecientes todos a la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), bajo el número de proyecto MB23-00005.

Para llevar a cabo los experimentos, se utilizaron ratones de laboratorio de la cepa BALB/c, los cuales se alojaron en el bioterio del Laboratorio de Microbiología Experimental (LME) del departamento de Microbiología, de la Facultad de Medicina, el LME cuenta con la autorización de SENASICA/SAGARPA para alojar animales de experimentación y llevar a cabo investigaciones científicas, con clave de autorización: AUT-1216-029, en apego a la NOM-062-ZOO-1999 "Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio".

El presente trabajo de investigación utilizó ratones neonatos de menos de 24 horas de nacimiento para la ejecución del proyecto y ratones adultos (5-6 semanas de edad) para formar los pies de cría, así como para lactancia. Los animales fueron alojados en condiciones controladas de temperatura (18-26°C) y humedad (40-70%) en el equipo de alojamiento LAB&BIO (ProBio-Tech), que funciona con presión negativa, proporcionando así un ambiente libre de patógenos. Se procuró un ambiente con mínimo nivel de ruido y con periodos de luz/oscuridad de 12 horas. Para proporcionar bajos niveles de estrés que pudieran afectar el ritmo de trabajo,

los animales fueron monitoreados todos los días; la alimentación se dio bajo condiciones de estándar y de libre acceso al tiempo que los neonatos a través de lactancia de la madre; dos veces por semana se realizó el cambio de lecho, alimento y agua.

6.2 Descripción de la cepa y cultivo de *C. albicans*

La cepa de *C. albicans* empleada para el presente estudio fue la ATCC 66027, almacenada bajo congelación a -70°C en crioviales que contienen medio líquido Sabouraud con 30% de glicerol estéril, dentro de las instalaciones del Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas (CRCEI) del Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, UANL.

Los lotes de trabajo se realizaron primeramente descongelando un vial del lote semilla en baño maría a 37 °C durante 5 minutos, posterior a esto se transfirió el contenido del vial a un tubo cónico de centrífuga de 50mL agregando 15 mL de solución salina fisiológica (SSF) para centrifugarlo a 1,500 revoluciones por minuto (r.p.m.) por 10 minutos, acabado esto, se decantó el sobrenadante, por su parte el *pellet* formado se resuspendió en 2 mL de SSF. Con esto, se inocularon 10 placas de agar dextrosa Sabouraud (SDA) con 50 µL de la solución de levaduras para después incubarlas a 30 °C, a las 48 h se recolectó la biomasa resultante con un isopo estéril, posteriormente se le hicieron 3 lavados con SSF en un tubo cónico de centrífuga de 15 mL, centrifugándolos a 1,500 r.p.m.

Una vez realizados los lavados, las levaduras se resuspendieron en 5 mL de SSF, para después preparar diluciones seriadas 1:10. Con el objeto de evaluar la

viabilidad de las levaduras resultante de este proceso, se tomaron 10 μL de la última dilución seriada con 10 μL de azul de Tripán al 0.4% para realizar un conteo de células viables (levaduras no teñidas) esto en un hemocitómetro. Habiendo comprobado la viabilidad celular, se tomaron crioviales y se les depositaron inóculos de 1×10^6 levaduras, ajustando el volumen final de estos a 1 mL de medio líquido Sabouraud con 30% de glicerol. Estos crioviales se almacenaron a $-70\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su uso.

Cada vez que fuese necesario se procedió a la activación de la cepa, para esto se descongeló un criovial del lote de trabajo, se tomó 50 μL de la suspensión y se procedió a su siembra en SDA e incubación a $30\text{ }^\circ\text{C}$, para mantener activa la cepa, se realizaron pases a una placa nueva cada 48 h. Para los experimentos se usaron únicamente los cultivos en placa que estuvieran entre los pases 4 y 10.

6.3 Inóculos de infección

Los inóculos de infección usados en el presente estudio se realizaron según lo establecido previamente en el grupo de trabajo por Flores-Maldonado *et al.* (2021). Estos consistieron en un inóculo de 30 μL con dos concentraciones de levaduras de *C. albicans*: 5×10^5 levaduras para el inóculo letal y 1×10^5 levaduras para el inóculo no letal.

Para su preparación se tomó, con ayuda de un asa bacteriológica y en condiciones de esterilidad, biomasa de una placa cultivada que tuviera un tiempo de incubación de entre 24 a 48 h, para depositarla en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL con 1 mL de SSF, se homogenizó la solución de levaduras con ayuda de un

agitador vórtex por 10 segundos, posterior a ello se realizaron 2 diluciones seriadas 1:10 para después tomar 10 µL de la segunda dilución y realizar un conteo por duplicado de las levaduras con ayuda de un hemocitómetro, esto para obtener el número estimado de levaduras en el primer tubo mediante la Ecuación 1 de concentración celular:

Ecuación 1

$$\text{Conc. cel.} = (\text{prom. de conteo} \times \text{factor de dilución} \times \text{factor de cámara (10,000)})$$

Una vez obtenido este número se procedió con el cálculo para obtener el inóculo de infección, ya sea que se fuese a preparar un inóculo letal o no letal. Este cálculo consistió en usar la ecuación del principio de equivalencia de las diluciones ($C1 \times V1 = C2 \times V2$) donde:

- C1= Concentración inicial (Conc. Cel. Calculada)
- V1= Volumen inicial (volumen a tomar del concentrado celular)
- C2= Concentración final (deseada)
 - (1.67×10^7) inóculo letal
 - (3.34×10^6) inóculo no letal
- V2= Volumen final deseado (1mL)

Ya preparado el inóculo de infección a usar, se realizó una comprobación de este mediante una cuenta en placa realizando 5 diluciones seriadas 1:10 partiendo del inóculo preparado y se sembraron 2 placas de SDA con 100 µL de cada dilución, extendiendo por toda la placa el volumen tomado, estas se incubaron a 30 °C durante 48 h, para finalmente hacer el conteo de las colonias.

6.4 Infección sistémica en ratones recién nacidos

Para inducir una infección sistémica en los animales de experimentación, se administró una dosis única de los inóculos de infección, ya sea letal o no letal, a ratones neonatos de la cepa BALB/c a través de una inyección en la vena yugular basado en la técnica de inyección descrita por Kienstra *et al* (62) inoculando la dosis con una jeringa de insulina de 1mL con aguja de calibre 31G y longitud de 6 mm, para finalmente regresarlos con sus madres a las cajas de alojamiento por un periodo de 48 h, pasado este tiempo, se sacrificaron mediante decapitación y se les extrajo el cerebro.

6.5 Purificación de *C. albicans* a partir del tejido cerebral infectado

Para lograr el propósito de este objetivo, se planteó una estrategia basada en la disgregación del tejido cerebral infectado por medios químicos y mecánicos. Para lo cual, se preparó una solución de digestión (buffer de lisis) para degradar el tejido cerebral sin disminuir la viabilidad de las estructuras de *C. albicans* presentes en el tejido. Para ello se tomó como base lo publicado por Vandeputte *et al* (63) empleando el buffer de lisis 1 formulado con los siguientes detergentes Triton X-100 (2%) y SDS (1%).

Los cerebros de ratones neonatos infectados con el inóculo letal (5×10^5 levaduras) fueron colocados en un tubo cónico de 15 mL con 5 mL de buffer de lisis 1. Los cerebros se disgregaron en el buffer de lisis 1, pasando la solución a través de una jeringa calibre 21G. Una vez que se logró una mezcla homogénea, se dejó reposar en una incubadora con una temperatura de 37° C, durante 20 min.

Para el lavado, se centrifugó a 5,000 r.p.m. por 5 min y el sobrenadante fue descartado cuidadosamente, el precipitado se resuspendió en 5 mL de buffer fosfato salino (PBS, del inglés phosphate buffered saline) con la intención de eliminar los restos tisulares resultantes del proceso, el proceso de lavado y centrifugado se repitió dos veces, dando un total de 3 lavados con PBS. Para examinar los resultados preliminares del proceso, se tomó una alícuota de 10 mL y se observó al microscopio óptico a un aumento de 40X y se analizaron según lo siguiente.

La eficiencia del proceso de purificado del hongo se validó mediante los parámetros de: viabilidad de las células fúngicas, presencia de tejidos y biomasa obtenida del procedimiento de purificación. Primeramente, se estimó la biomasa resultante del método usado, para esto, previamente se pesó el tubo cónico de 15 mL a usar, una vez que se descartó el sobrenadante resultante de los lavados, se pesó el tubo con el precipitado del purificado obtenido, se calculó la diferencia de pesos para obtener una cifra de la biomasa aproximada.

Para evaluar la viabilidad de las células de *C. albicans* obtenidas mediante este proceso de purificación, se tomó una alícuota de 10 μ L del precipitado y se mezcló con 10 μ L de azul Tripán al 0.4% para realizar un conteo de células viables (no teñidas) en un hemocitómetro y posteriormente obtener el porcentaje de células viables en el campo de observación. Para examinar la eficiencia del proceso de forma más precisa, se estableció un sistema de puntaje de cruces semicuantitativo (Tabla 1), el cual consistió en obtener un promedio de cuadrantes con presencia de tejido en las cuatro cuadrículas de conteo del hemocitómetro, de la forma en que se muestra en la Figura 1.

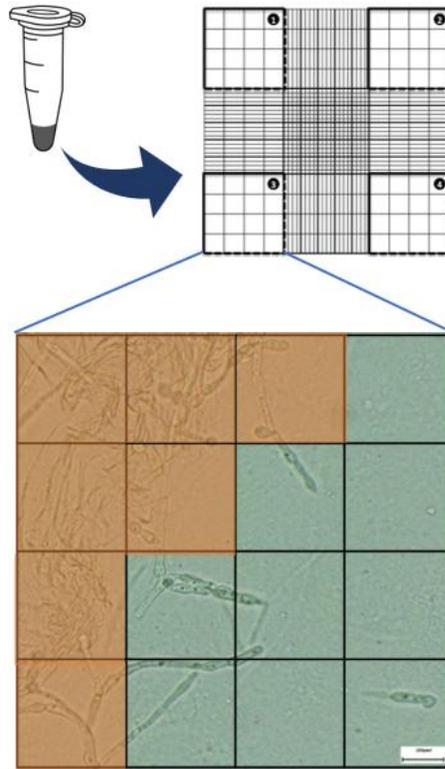


Figura 1. Esquematzación del método semicuantitativo para el conteo de cuadrantes con presencia de tejido en el campo de observación.

Tabla 1. Sistema de puntaje para estimar pureza de la muestra por el método semicuantitativo basado en el promedio de cuadrantes con tejido visible en el campo de observación para obtener una presencia de tejidos escasa (†) o nula (-) como ideal.

Prom. de cuadrantes con tejido visible	Puntaje
10 cuadros o más	†††† (Muy alta)
7-9 cuadros	††† (Alta)
4-6 cuadros	†† (Media)
1-3 cuadros	† (Escasa)

6.6 Protocolo de extracción de ARN total del purificado de *C. albicans*

Para la extracción del ARN total de *C. albicans* a partir del previo purificado obtenido del cerebro infectado se tomaron 10 ratones de menos de 24 h de edad y se les infectó con el inóculo letal o no letal. Tras las 48 h de infección, se sacrificaron y extrajo el cerebro para hacer un *pool* con los 10 cerebros para purificar el hongo mediante el método de purificación estandarizado, con el hongo purificado se procedió a realizarle una extracción de ARN total usando el método de tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo con el reactivo TRI-Reagent (MRC), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para ello, las estructuras de *C. albicans* purificadas se colocaron en un tubo de ensayo enfriado previamente (todo el procedimiento se llevó a cabo en frío), al tubo con la muestra se le agregó 500 μ L de TRI-Reagent, se realizó la lisis celular con un homogeneizador de tejidos Tissue-Tearor (Biospec), durante 1 min. Ya homogenizada la muestra, se traspasó a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL, se agregó 100 μ L de cloroformo, centrifugó a 12,000 r.p.m. por 12 min, para posteriormente extraer la fase acuosa en un tubo de 1.5 mL nuevo, se agregaron 500 μ L de isopropanol y se dejó incubar a -70 °C por toda la noche.

Pasado este tiempo, se centrifugó a 12,000 r.p.m. por 10 min, decantó con cuidado y se agregó 500 μ L de etanol al 75%, para después centrifugarse a la misma velocidad por 5 min, se decantó con cuidado y dejó secar el *pellet* por 30 min, finalmente se resuspendió el pellet en 20 μ L de agua DEPC y se analizó pureza y cantidad en el equipo de espectrofotometría NanoDrop 2000 (Thermo) y corrió la

muestra en una electroforesis en gel de agarosa (1.2%) para determinar integridad del ARN.

6.7 Validación del ARN de *C. albicans* proveniente de cerebro mediante PCR

Habiendo cuantificado y evaluado la integridad del ARN, se realizó una retrotranscripción (RT-PCR) utilizando el kit comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Appliedbiosystems), con 1 500 ng de ARN, según las indicaciones del fabricante, posteriormente se analizó la concentración del ADN complementario (ADNc) obtenido. Ya obtenido, se hizo una PCR, en la que se amplificaron genes de *C. albicans* usando los *primers* específicos para las regiones del espaciador transcrito interno *ITS* (del inglés *Internal transcribed spacer*) 4 y 5, del mismo modo para el gen de Actina 1 (*ACT1*) de *C. albicans*. Como controles, se usó el ADNc de la cepa de *C. albicans* cultivada *in vitro* como control positivo y ADNc de tejido cerebral sano de ratón sin infectar como control negativo.

6.8 Análisis de la expresión de factores de virulencia de *C. albicans*

Para lograr este objetivo, se usaron *primers* específicos para 15 genes que se asocian con la virulencia de *C. albicans*, cuyas secuencias se observan en la Tabla 2, estos oligonucleótidos de la casa comercial Alpha ADN se resuspendieron según las indicaciones del fabricante. Las secuencias se sometieron a un análisis *in silico* en el programa en línea BLAST (NCBI) para corroborar que estas no tuvieran afinidad por el genoma del ratón y así descartar la posibilidad de sitios de unión que dieran lugar a falsos positivos.

Tabla 2. Secuencia de *primers* usados para el análisis de expresión.

Gen	Secuencia forward (5'-3')	Secuencia reverse (3'-5')
ALS1	GACTAGTGAACCAACAAATACCAGA	CCAGAAGAAACAGCAGGTGA
ALS2	CCAAGTATTAACAAAGTTTCAATCACTTAT	TCTCAATCTTAAATTGAACGGCTTAC
ALS3	CCACTTCACAATCCCCATC	CAGCAGTAGTAGTAACAGTAGTAGTTTCATC
ALS4	CCCAGTCTTTCACAAGCAGTAAAT	GTAATGAGTCATCAACAGAAGCC
ALS5	TGACTACTTCCAGATTTATGCCGAG	ATTGATACTGGTTATTATCTGAGGGAGAAA
ALS6	GACTCCACAATCATCTAGTAGCTTGGTTT	CAATTGTCACATCATCTTTTGTTC
ALS7	GAAGAGAAGTACGCTTTGGTCTAGTTGT	TGGCATACTCCAATCATTATTTC
SAP1	TCAATCAATTTACTCTTCCATTTCTAACA	CCAGTAGCATTAAACAGGAGTTTTAATGACA
SAP2	AACAACAACCCACTAGACATCACC	TGACCATTAGTAACTGGGAATGCTTTAGGA
SAP3	CCTTCTCTAAAATTATGGATTGGAAC	TTGATTTACCTTGGGGACCAGTAACATTT
SAP4	TTATTTTTAGATATTGAGCCACAGAAA	GCCAGTGTCAACAATAACGCTAAGTT
SAP5	AGAATTTCCCGTGCATGAGACTGGT	CAAATTTTGGGAAGTGCGGGAAGA
SAP6	CCCGTTTTGAAATTAATATGCTGATGG	GTCGTAAGGAGTTCTGGTAGCTTCG
SAP7	GAAATGCAAAGAGTATTAGAGTTATTAC	GAATGATTTGGTTTACATCATCTTCAACTG
HWP1	CCATGTGATGATTACCCACA	GCTGGAACAGAAGATTACAG
ACT1	GATTTTGTCTGAACGTGGTAACAG	GGAGTTGAAAGTGGTTTGGTCAATAC

Sucesivamente, se realizó un segundo análisis *in silico* para encontrar las temperaturas de alineación óptimas para cada *primer*. Ya con esta información se realizaron PCRs con el fin de comprobar la amplificación de las secuencias de interés usando el kit para PCR My Taq (Meridian Bioscience), para esta etapa se usó exclusivamente ADNc sintetizado de la cepa cultivada *in vitro*.

6.9 Uso de PCR en tiempo real (qPCR) para analizar la expresión de *C. albicans* en las condiciones de infección letal vs infección no letal

Para cuantificar la expresión de los genes asociados con los factores de virulencia de *C. albicans*, se realizaron PCRs en tiempo real utilizando 15 pares de *primers*. Se empleó el método de $2^{-\Delta\Delta ct}$ que requiere una muestra calibradora. Para este análisis de expresión, se compararon tres condiciones distintas: infección letal, infección no letal (como condiciones experimentales) y cepa cultivada *in vitro* (como muestra calibradora o en condiciones basales).

Cada condición se evaluó por triplicado, usando como templado el ADNc sintetizado previamente. Se usó el termociclador Rotor Gene (Quiagen) de 36 pocillos, y se prepararon las reacciones con el kit SensiFAST SYBR No-ROX Kit (Meridian Bioscience) a un volumen final de 20 μ L. Las muestras se introdujeron en el equipo según la temperatura de alineación de los *primers* que se había determinado previamente, para la cuantificación relativa de la expresión de cada gen blanco, se usó el gen de *ACT1* como endógeno para control interno en cada ronda del equipo.

6.10 Cálculo de expresión y análisis estadístico

Se realizó una cuantificación relativa de la expresión génica utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ descrito por Livak y Schmittgen (64). Primero, se calculó el ΔCt para cada muestra restando el valor de Ct del gen endógeno de referencia *ACT1* al Ct del gen blanco (gen de interés):

$$\Delta Ct(muestra) = Ct(muestra) - Ct(endógeno)$$

$$\Delta Ct(calibrador) = Ct(calibrador) - Ct(endógeno)$$

Luego, se determinó el $\Delta\Delta Ct$ comparando el ΔCt de cada muestra con el ΔCt de una muestra calibradora. En este caso, la muestra calibradora corresponde a los valores de Ct obtenidos de la levadura cultivada *in vitro*, definida como la condición basal:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(muestra) - \Delta Ct(calibrador)$$

Finalmente, se aplicó la ecuación $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para obtener la expresión relativa del gen de interés normalizada en comparación con el gen de referencia y relativa a la condición basal:

$$\text{Expresión relativa normalizada} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Después de recopilar todos los valores de expresión génica, estos fueron organizados utilizando el software Prism 8 de GraphPad. Para cada gen y sus triplicados, se aplicó la prueba de normalidad estadística de Shapiro-Wilk, adecuada para tamaños de muestra menores a 30 ($n < 30$).

A continuación, se sometieron los conjuntos de valores de expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) de cada gen de interés a un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, con el

propósito de identificar diferencias significativas entre las condiciones experimentales: infección letal, infección no letal y condición basal. Se estableció un nivel de significancia estadística de $P < 0.05$. Tras detectar diferencias significativas con el ANOVA, se realizó un análisis *post hoc* de Tukey para comparaciones múltiples entre las medias de los grupos. Este análisis permitió identificar diferencias específicas entre las siguientes comparaciones: letal vs. no letal, letal vs. basal y no letal vs. basal, manteniendo un nivel mínimo de significancia de $P < 0.05$.

En los casos en que los datos no cumplieron con los supuestos de normalidad, se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para detectar diferencias entre grupos. Este análisis fue seguido por una prueba *post hoc* de Dunn para realizar comparaciones específicas entre pares de grupos. Todos los resultados estadísticos fueron representados gráficamente utilizando el mismo software Prism 8 de GraphPad.

7 RESULTADOS

7.1 Purificación de *C. albicans* a partir del tejido cerebral de ratones neonatos infectados con el inóculo letal

Al llevar a cabo el procedimiento de digestión con el buffer de lisis 1 en el tejido cerebral infectado con el inóculo letal, se observó que el buffer de lisis 1 (Triton X-100 2% y SDS 1%) no disgregaba completamente el tejido cerebral tras 20 minutos de digestión ya que se observaban detritos tisulares en la suspensión obtenida (Figura 2A). Debido a que esta estrategia no lograba purificar al microorganismo, se decidió aumentar el tiempo de incubación a 45 min, dando como resultado lo observado en la Figura 2B donde se visualizan las estructuras de *C. albicans* más claramente y la presencia de detritos se ve disminuida. Al evaluar lo obtenido con los parámetros establecidos se obtuvo una alta viabilidad de las células fúngicas (del 99% en el conteo con hemocitómetro), así como una biomasa de alrededor de 120 mg, sin embargo, al realizar el conteo de cuadrantes con presencia de tejidos, se obtuvo una alta presencia de estos según lo establecido el sistema de puntajes de la Tabla 1.

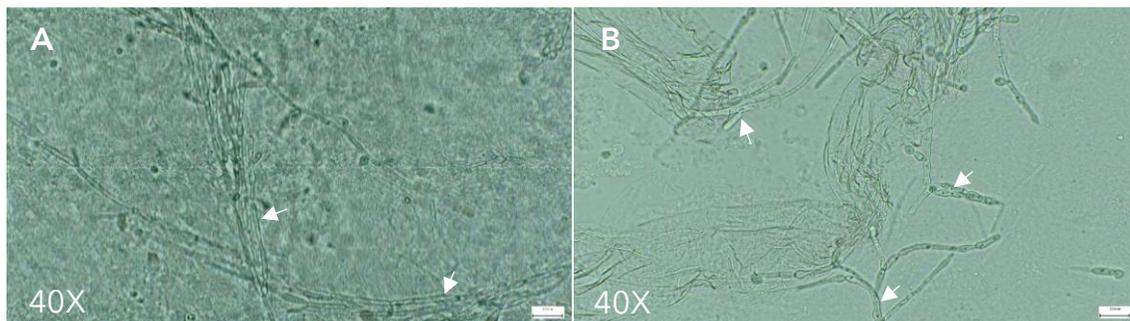


Figura 2. Estructuras de *C. albicans* obtenidas tras la digestión con buffer de lisis 1 del tejido cerebral infectado con el inóculo letal. Cada imagen es representativa de las estructuras obtenidas a partir de la digestión de un *pool* de cerebros de ratones neonatos de <24 h de edad infectados con el inóculo letal, usando el buffer de lisis 1 (Triton X-100 2% y SDS 1%) por 20 (A) y 45 minutos (B). Estructuras de *C. albicans* señaladas por flechas blancas.

Dado que los resultados obtenidos por el buffer de lisis 1 no cumplieron con los parámetros establecidos para purificar de manera óptima a *C. albicans* del cerebro de los ratones infectados, se optó por descartar este buffer y modificar la formulación. Estos consistieron en complementar la formulación inicial adicionando DNasa1 (Roche) a una concentración de (0.1 mg/mL) con la finalidad de degradar la matriz extracelular cerebral (Buffer de lisis 2), así mismo se formuló un tercer buffer de lisis el cual se complementó según lo publicado por Vandeputte *et al* (63) y Gao *et al* (65) agregando además de la DNasa, NaCl (100nM), Tris HCl ph8 (50 mM) y EDTA (1mM) (Buffer de lisis 3). Ambos buffers se probaron en un segundo y posteriormente, un tercer experimento, para los cuales se usó la misma secuencia de digestión del tejido, con un tiempo de incubación de 45 min.

Al valorar los resultados obtenidos en los diferentes procesos de digestión se determinó que el buffer de lisis 2 (Figura 3A) disminuyó la cantidad de detritos de tejido visibles en el campo de observación, pero sin lograr un puntaje deseado como se constata en la Tabla 3. Misma donde se puede observar que el buffer de lisis 3 fue el más eficiente para eliminar los restos de tejido que contaminaban la muestra dando un puntaje de nula presencia de tejidos. En la Figura 3B se aprecia la ausencia de detritos en el campo de observación, por lo que con base en estos resultados se decidió trabajar con el buffer de lisis 3 para purificar las estructuras de *C. albicans* del cerebro infectado con el inóculo letal.

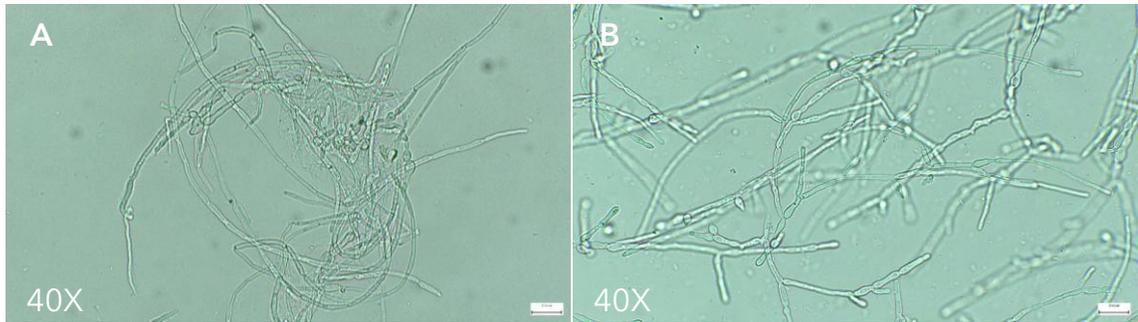


Figura 3. Estructuras de *C. albicans* obtenidas tras la digestión del tejido cerebral infectado con el inóculo letal. Cada imagen es representativa de las estructuras obtenidas a partir de la digestión de un *pool* de cerebros de ratones neonatos de <24 h de edad infectados con el inóculo letal, usando el buffer de lisis 2 por 45 min (A) y buffer de lisis 3 por 45 minutos (B) ambas digestiones se incubaron a 37°C.

7.2 Purificación de *C. albicans* a partir del tejido de animales infectados con el inóculo no letal

Al repetir el procedimiento de digestión anterior, pero con los cerebros de murinos neonatos infectados con un inóculo no letal (1×10^5), se recuperó una cantidad menor de estructuras de *C. albicans* en comparación con el inóculo letal como se observa en la Figura 4, por lo que se descartó el uso de este buffer para trabajar con el inóculo no letal y nuevamente se modificó en un cuarto buffer (Buffer de lisis 4)



Figura 4. Estructuras de *C. albicans* obtenidas tras la digestión del tejido infectado con el inóculo no letal usando el buffer de lisis 3. Microscopías muestran el resultado obtenido a partir de la digestión de un *pool* cerebros de ratones neonatos de <24 h de edad infectados con el inóculo no letal en las mismas condiciones que se hizo con el inóculo letal.

Las modificaciones del buffer consistieron en disminuir la concentración de Triton X100 al 1%, eliminando también el EDTA, el Tris y el NaCl, únicamente dejando el homogeneizado de los cerebros en Triton X100 (1%) junto con DNasa 1 (0.1 mg/mL) y Liberasa TL (0.1mg/mL) incubándose 45 min a 37°C para maximizar la digestión de la matriz extracelular del cerebro.

De igual manera, se incluyó un paso posterior, este consistió en resuspender el precipitado resultante de la digestión anterior, en 1mL de SDS a una concentración de 0.01% y pasarlo por la jeringa hasta disolver el *pellet*, posterior, se centrifugó a 6,000 r.p.m.; esto se repitió una vez más, dando en total 2 lavados con SDS, finalmente se procedió con los lavados de PBS, obteniéndose como resultado grandes aglomeraciones del hongo en el cerebro como las vistas en la Figura 5 compuestas principalmente por levaduras.

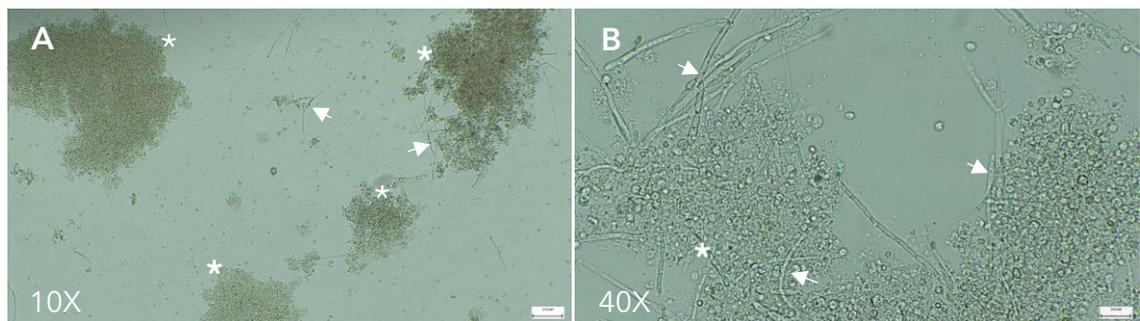


Figura 5. Estructuras de *C. albicans* obtenidas tras la digestión del tejido infectado con el inóculo no letal usando el buffer de lisis 4. Microscopías muestran el resultado obtenido a partir de la digestión de un *pool* cerebros de ratones neonatos de <24 h de edad infectados con el inóculo no letal después de 45 min de digestión a 37°C, alícuotas observadas a un aumento de 10X (A) y 40X (B). Las flechas señalan estructuras de hifas y los asteriscos señalan zonas de conglomerados de levaduras.

La muestra purificada presentó un aumento en el parámetro de biomasa recuperada comparándose con lo obtenido con el buffer de lisis 3 con el inóculo letal, así como un ligero aumento en la presencia de detritos en la muestra, sin embargo,

esta se cuantifico como escasa según el puntaje obtenido como se puede constatar en la Tabla 3, aunado a lo anterior, la viabilidad de las células también fue más alta comparada con el resultado obtenido con el inoculo letal. Dados los resultados obtenidos, se decidió utilizar el buffer de lisis 4 para disgregar los cerebros infectados con el inóculo no letal.

En la Tabla 3 se resumen los resultados obtenidos con los 4 buffers de lisis formulados y probados, comprobándose que el buffer de lisis 4 es la mejor formulación para purificar a *C. albicans* a partir del cerebro de los ratones que son infectados con el inóculo no letal, al tiempo que para los infectados con el inóculo letal se mantuvo el uso del buffer de lisis 3 para purificar las estructuras de *C. albicans*.

Tabla 3. Comparativa de los resultados obtenidos por los buffers de lisis para purificar a *C. albicans* a partir del tejido cerebral de ratones neonatos infectados. Se realizaron *pools* con los cerebros de ratones neonatos infectados, infectándolos con el inóculo letal o el inóculo no letal para posteriormente disgregarlos en 5 mL de buffer de lisis por 45 minutos a 37°C; según los resultados obtenidos se procedió con las subsecuentes modificaciones en su composición.

Buffer de lisis (45min)	Composición	Viabilidad de las células	Presencia de tejidos	Biomasa total
Buffer de lisis 1	Triton X-100 (2%), SDS (1%)	99%	+++ (alta)	120 mg
Buffer de lisis 2	Triton X-100 (2%), SDS (1%) + DNasa 1 (0.1 mg/mL)	98%	++ (media)	97 mg
Buffer de lisis 3	Triton X-100 (2%), SDS (1%) + DNasa 1 + NaCl (100nM), Tris HCl (ph8), EDTA (1mM)	97%	- (nula)	86 mg
Buffer de lisis 4	Triton X-100 (1%), SDS (0.01%), DNasa 1 (0.1 mg/mL), Liberasa TL (0.1mg/mL)	99%	† (escasa)	98 mg

7.3 Extracción de RNA total a partir del purificado de *C. albicans*

El ARN total del hongo purificado fue extraído utilizando el método de tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo también conocido como método basado en Trizol, previamente en el equipo de trabajo se logró extraer ARN total de levaduras de *C. albicans* cultivadas *in vitro* con la técnica mencionada, pero al procesar las muestra de *C. albicans* obtenidas del tejido cerebral, este método resultó ineficaz, debido a los bajos valores de concentración (<100 ng/ μ L) aunado a esto, mostró importante degradación al correr la muestra en el gel de agarosa como se observa en la Figura 6 en la que se observa una baja resolución de las bandas correspondientes a las subunidades de ARN ribosomal 28s y 18s de *C. albicans*.

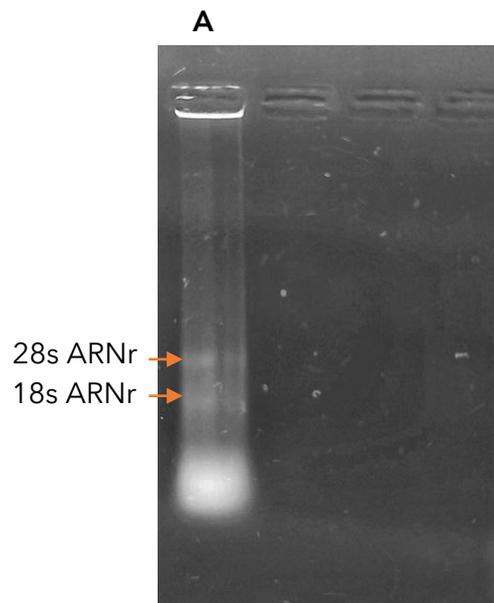


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa del ARN de *C. albicans*. Imagen representativa de la extracción de ARN realizada al purificado de *C. albicans* a partir del disgregado cerebral de ratones neonatos infectados con el inóculo letal (10 individuos) (carril A), usando el método basado en Trizol.

7.4 Modificaciones al protocolo de extracción de ARN (Protocolo modificado)

Debido a las bajas concentraciones de ARN obtenidas y degradación del material génico, se implementaron las siguientes modificaciones con respecto a la técnica original, para lo cual, el *pellet* del hongo purificado, se trasladó a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL y se agregó 250 μ L de TRI-Reagent con adición de glucógeno de grado ARN (Invitrogen) a una concentración de 250 μ g/mL, se centrifugó a 6,000 r.p.m. por 5 min, ya formado el pellet de estructuras fúngicas, se congeló en hielo seco por 5 min, ya congelada la muestra, esta se homogeneizó usando una herramienta Dremel 3000 con una broca de titanio inoxidable durante 1 min, una vez concluido se repitió este proceso (centrifugar, congelar y homogeneizar) dos veces, esto para dañar la pared celular del hongo.

Concluido esto, se agregó a la muestra más TRI-Reagent hasta completar 500 μ L, se agitó en el agitador vórtex por 1 min para después incubarse por 3 min en frío, se agregó 350 μ L de cloroformo y se volvió a agitar en vórtex por 1 min, se dejó incubar por 3 min y se procedió a centrifugar a 12,000 r.p.m. por 15 min, una vez que se separaron las fases, se extrajo unos 200 μ L de la fase acuosa y se le agregaron 500 μ L de isopropanol frío dejándose incubar la muestra a -80 °C o cercana dentro de hielo seco durante toda la noche. El posterior paso de lavado y resuspensión se realizó de la misma forma que en la metodología inicial de extracción de ARN.

Al cuantificar el ARN resultante en NanoDrop por este nuevo método, se obtuvieron altos valores de concentración del ARN, como se muestran en la Tabla 4, al resuspender el pellet obtenido del proceso con ambos inóculos en 50 μ L de agua

DEPC y compararlo con los resultados obtenidos de la extracción de *C. albicans* en condiciones *in vitro* con el método basado en Trizol. Así mismo al realizar la electroforesis de la muestra, esta mostró una baja degradación, viéndose claramente las bandas correspondientes a las subunidades de ARN ribosomal 28s y 18s de *C. albicans*, como se puede observar en la imagen representativa de la Figura 7.

Tabla 4. Lecturas de concentración y limpieza obtenidas del ARN de *C. albicans* extraído. Cifras resultantes de análisis en el equipo NanoDrop 2000, el ARN fue resuspendido en 50 μ L de agua DEPC.

Tipo de muestra	Volumen resuspendido	Concentración (ng/ μ L)	Relación 260/280	Relación 260/230
<i>In vivo</i> (No letal)	50 μ L	287.4	1.89	0.82
<i>In vivo</i> (Letal)	50 μ L	179.6	1.63	2.15
<i>In vitro</i> (Levadura)	50 μ L	645.9	1.95	1.16

Nota: la muestra *in vitro* (levadura) se realizó con el método clásico basado en Trizol mientras que las *in vivo* con el método modificado de extracción de ARN.

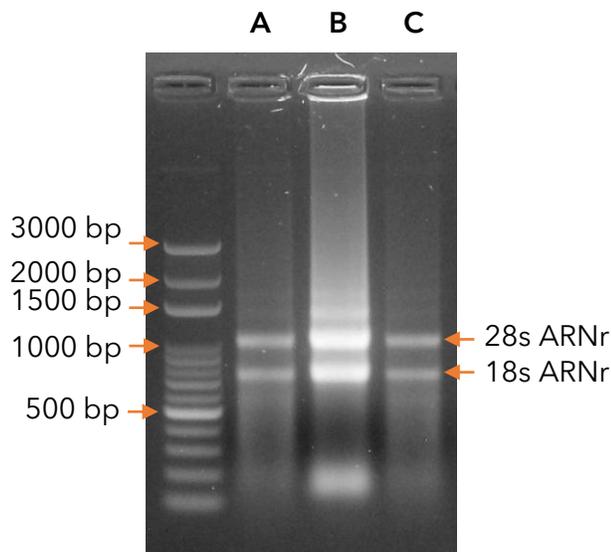


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa del ARN de *C. albicans*. Extracción de ARN realizada al purificado de *C. albicans* a partir del disgregado cerebral de ratones neonatos infectados con el inóculo no letal (10 individuos) (carril A) junto a una extracción realizada a partir de cultivo *in vitro* (carril B) y la replicación del procedimiento (carril C).

7.5 Verificación del ARN extraído mediante PCR

Con el ARN extraído se obtuvo ADNc por RT-PCR, este sirvió de templado para realizar una PCR para genes específicos de *C. albicans* usando *primers* para las regiones del espaciador transcrito interno (*ITS*, del inglés *Internal transcribed spacer*) 4 y 5, así como para el gen de Actina 1 (*ACT1*) de *C. albicans*. De esto, se obtuvieron productos de PCR positivos para ambos genes en las muestras experimentales como se observa en la imagen representativa de la Figura 8 usando como templado el ADNc del purificado de la infección letal (carriles B y F) similar al resultado observado en el control positivo para el que se usó ADNc de *C. albicans* cultivada *in vitro* (carriles C y G), por el contrario, en el control negativo que constó de ADNc de ratón sano (carriles A y D) no se observó amplificación.

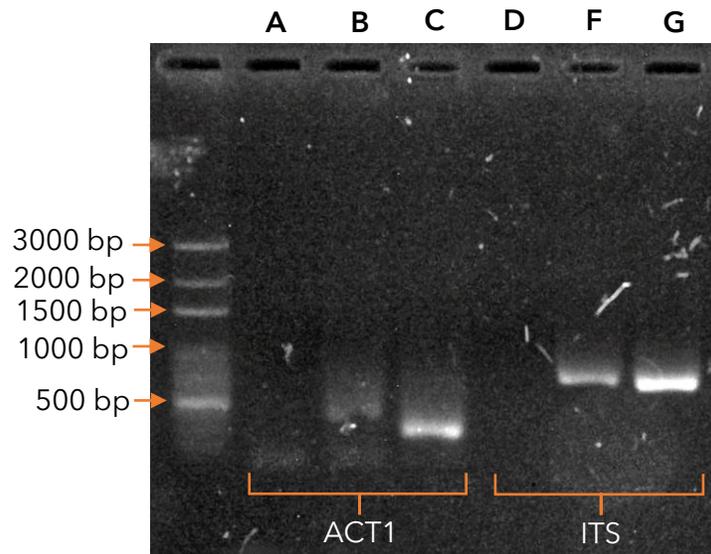


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa de los genes específicos de *C. albicans* *ACT1* e *ITS*. Se observan los productos de PCR utilizando como templados ADNc obtenidos mediante RT-PCRs del ARN extraído de tejido sano de ratón (carriles A y D), la *C. albicans* purificada previamente (carriles B y F) y la cepa cultivada *in vitro* (carriles C y G).

Esto confirmó que el ARN obtenido a partir del purificado de cerebros infectados proviene de *C. albicans* y que el método de extracción empleado es adecuado para obtener cantidades suficientes de ARN fúngico.

7.6 Análisis de la expresión de factores de virulencia de *C. albicans* durante la neurocandidiasis

Al procesar en el software los datos obtenidos por qPCR de los 15 genes de *C. albicans*, con excepción de los datos obtenidos de los genes *SAP6* y *HWP1*, todos los demás mostraron una distribución normal. Al someter los conjuntos de datos obtenidos por cada gen a la prueba ANOVA y el *post hoc* de Tuckey, se encontró diferencias significativas en la expresión de genes entre las condiciones experimentales, tanto diferencias entre condiciones *in vitro* (levadura) con condiciones *in vivo* (inóculo letal y no letal), así como diferencias entre los inóculos.

De manera puntual, para los niveles de expresión correspondientes a los genes *ALS* (Figura 9), se observaron diferencias entre las condiciones experimentales con la condición basal *in vitro*, *ALS1* (Figura 9A) mostró la mayor expresión de entre todos los genes, siendo esta sobreexpresión únicamente evidente en la muestra perteneciente a la infección no letal, mientras que no hubo diferencia entre la expresión de la condición basal y la obtenida de del cerebro infectado con el inóculo letal. Caso contrario se vio con *ALS2* (Figura 9B) se evidenció una subexpresión significativa con el inóculo no letal en comparación con el letal y la expresión basal de la levadura *in vitro*.

El gen *ALS3* no mostró una diferencia significativa entre las condiciones experimentales y la basal, sin embargo, (Figura 9C) el mayor valor de expresión lo tuvo la muestra de la infección letal. Por otro lado, *ALS4* (Figura 9D), con una sobreexpresión significativa en la muestra del inóculo no letal, que contrasta con el inóculo letal que no mostró diferencias con la condición basal *in vitro*, resultados similares se encontraron en los genes *ALS5* (Figura 9E) y *ALS6* (Figura 9F), siendo este último el gen que mostró el mayor valor de expresión por detrás de *ALS1*. Por su parte *ALS7* (Figura 9G) mostró diferencias significativas entre la expresión *in vivo* con la expresión *in vitro*, pero no entre ambas condiciones experimentales *in vivo* (letal y no letal).

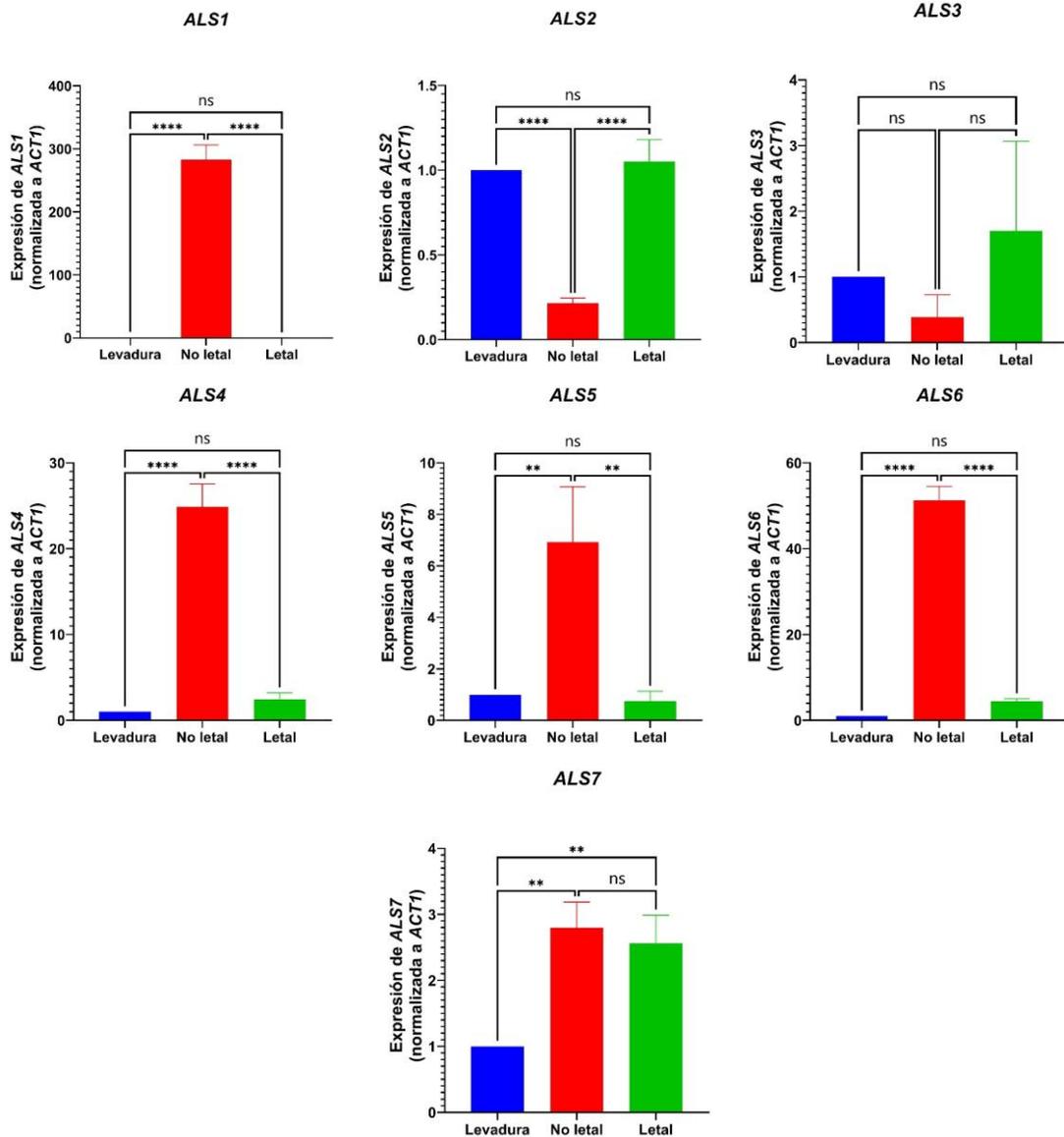


Figura 9. Cambio en la expresión relativa de genes ALS1-7 de *C. albicans* durante las condiciones experimentales *in vivo* y su condición basal *in vitro*. Se extrajeron purificados de *C. albicans* del cerebro de ratones neonatos infectados mediante inóculo no letal e inóculo letal a las 48 horas post-infección. La expresión de genes fue cuantificada mediante qPCR y normalizada con respecto a la expresión del gen endógeno *ACT1* utilizando el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ los datos son representativos de la media y desviación estándar. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía y posteriormente una prueba de Tukey para comparar cada grupo experimental entre sí y con la condición basal. ** P < 0.01, **** P < 0.0001 y ns (no significativo).

Para los genes que codifican las Sap, mostrados en la Figura 10 junto con el gen *HWP1* de la proteína de pared de hifa, los resultados mostraron una menor diferencia entre las muestras. En *SAP1* (Figura 10A) no se evidenció diferencias significativas entre ninguna de las condiciones, se observó un ligero aumento en la expresión del gen en la condición de infección no letal; en tanto que *SAP2* (Figura 10B) se observó una sobreexpresión en la infección no letal, al tiempo que no hubo una diferencia significativa entre la condición basal con la infección causada por el inóculo letal, así mismo con *SAP3* (Figura 10C) se vio la sobreexpresión del gen en condición de infección no letal, por el contrario la muestra del inóculo letal mostró subexpresión con respecto a la expresión basal *in vitro*.

SAP4 (Figura 10D) y *SAP5* (Figura 10E) mostraron una tendencia similar a *SAP2*, sin embargo, *SAP4* sí obtuvo una diferencia estadística entre los valores de la infección no letal con respecto a las otras dos condiciones (letal y levadura), en contraste, con *SAP5* no fue así, pues los valores de expresión que obtuvo este gen son mayores que los obtenidos por *SAP4*. En el caso de *SAP6* (Figura 10F) no se observó diferencias estadísticas, pero los valores más altos de expresión se vieron en la condición de infección letal, por su parte *SAP7* (Figura 10G) obtuvo el valor más alto en la infección no letal, pero sin obtener una significancia estadística. Finalmente, *HWP1* (Figura 10H) mostró una subexpresión más sutil en el contexto de una infección no letal en comparación con la expresión de las otras dos condiciones.

Estos resultados evidencian que hay una sobreexpresión de genes asociados con factores de virulencia de *C. albicans* a las 48 horas de infección durante una infección no letal por este patógeno.

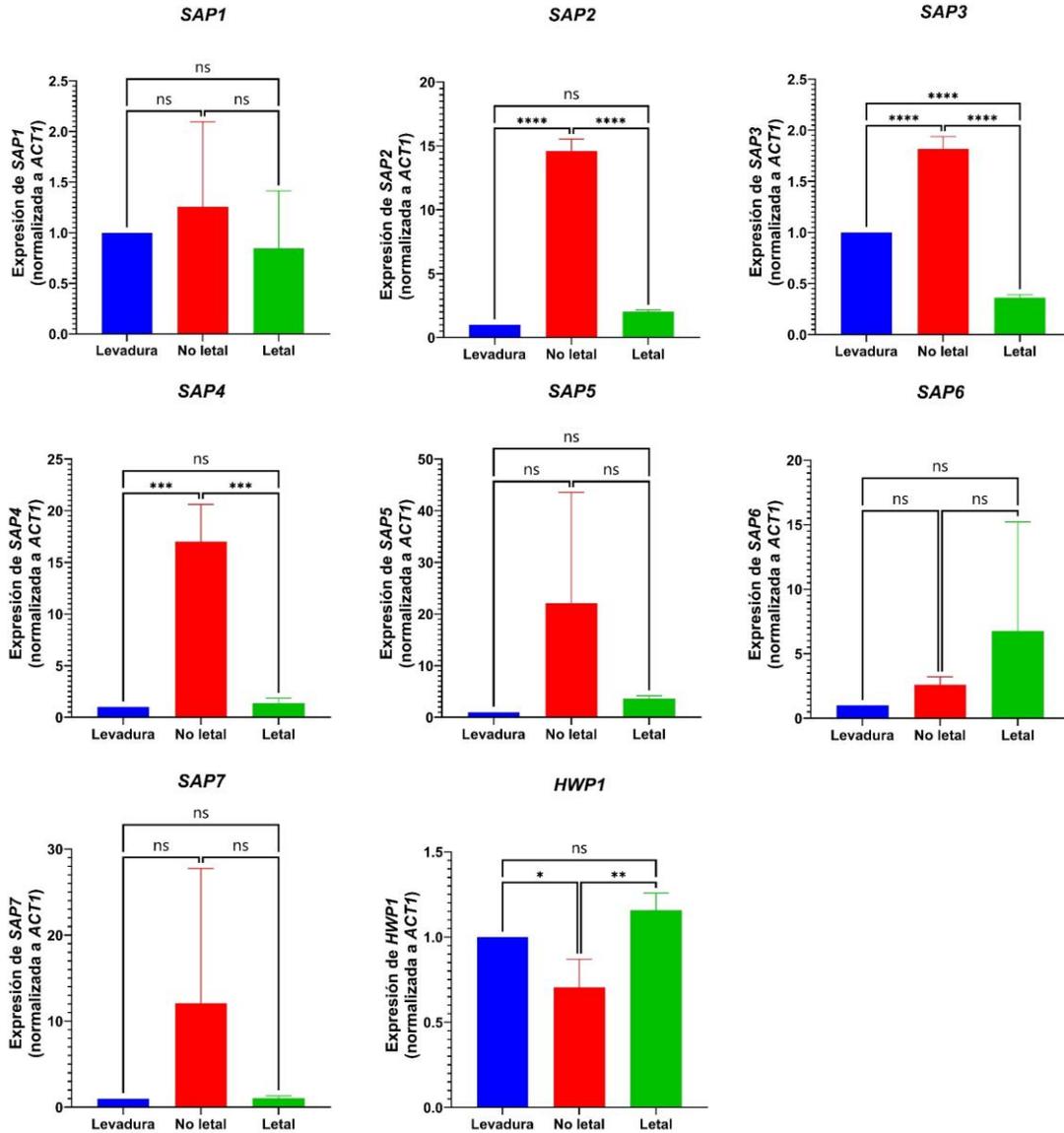


Figura 10. Cambio en la expresión relativa de genes SAP1-7 y HWP1 de *C. albicans* durante las condiciones experimentales *in vivo* y su condición basal *in vitro*. Se extrajeron purificados de *C. albicans* del cerebro de ratones neonatos infectados mediante inóculo no letal e inóculo letal a las 48 horas post-infección. La expresión de genes fue cuantificada mediante qPCR y normalizada con respecto a la expresión del gen endógeno *ACT1* utilizando el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ los datos son representativos de la media y desviación estándar. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía y posteriormente una prueba de Tukey para comparar cada grupo experimental entre sí y con la condición basal. * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001, **** P < 0.0001 y ns (no significativo).

8 DISCUSIÓN

La extracción de ácidos nucleicos de organismos patógenos a partir de muestras obtenidas *in vivo* presenta importantes retos, particularmente para el caso de los hongos patógenos como *C. albicans*, se ha reportado que su perfil transcripcional puede ser dramáticamente diferente en el *in vitro* en comparación con el *in vivo* (66). Resaltando la relevancia de estudiarlo en este ámbito, no obstante obtener ARN del patógeno que sea de buena calidad, ha sido calificado en la literatura como un desafío debido a que el contenido de ARN que pertenece al hongo en un muestra obtenida directamente del *in vivo* es mínima en comparación con el ARN del hospedero (66,67). En este estudio, se purificó el hongo del cerebro infectado para maximizar el material fúngico y reducir la contaminación del ARN de *C. albicans* con el del hospedero. De manera particular, la extracción de ARN de *C. albicans* es complicada debido a su gruesa pared celular, que dificulta la lisis de la célula fúngica (68), aunado a ello las hifas poseen una capa adicional de quitina en la pared celular, compuesta por manoproteínas y beta-glucanos (β -glucanos), lo que la hace más gruesa que la de las levaduras. Además, las hifas son difíciles de empastillar (68,69), lo que explica la ausencia de un protocolo estándar para la extracción de ácidos nucleicos en *C. albicans* (66–69).

En el presente estudio se obtuvo una lisis celular eficiente, lo cual es fundamental para la obtención de ARN de alta calidad. Además, mostró buenos resultados en la integridad del ARN al evitar el uso prolongado de enzimas u otros químicos que dañan la pared celular, ya que estos no son ideales debido a la vida media del ARN mensajero, que como máximo alcanza los 168 minutos (67,70). El

método mecánico en frío desarrollado en este estudio lisó eficientemente las células de *C. albicans* en la muestra *in vivo*. Este método preserva el perfil transcripcional, evita contaminación con ARN del hospedero y previene la degradación sin usar químicos ni calor, ideal para estudios genómicos y transcriptómicos.

En el experimento de expresión, los genes *ALS* mostraron una sobreexpresión significativa durante la infección no letal en comparación con el estado basal y la infección letal, de los cuales *ALS1* mostró la mayor expresión relativa; la proteína homóloga (Als1) facilita el contacto célula a célula durante la reproducción sexual (71). Se asocia con la adhesión a superficies como el polidimetilsiloxano presente en el silicón, aumentando la expresión de *ALS1* al contacto con estos materiales. De igual forma, se ha reportado mayor producción de Als1 en modelos *in vivo* que la expresión *in vitro* (22), lo cual coincide con los resultados de este estudio.

Als1 y Als3 se consideran las adhesinas más importantes de *C. albicans*, esta última proteína, si bien es la más asociada con la virulencia, adhesión y biopelícula. Se ha reportado que la expresión de *ALS1* regula y reprime la expresión del gen *EFG1*, el cual es responsable de desencadenar una de las vías para la filamentación (72,73). Es posible que la expresión de *ALS1* durante la infección no letal esté inhibiendo la filamentación del hongo y por ende no se observa la misma cantidad de hifas invadiendo el cerebro.

El gen *ALS3* es relevante porque se asocia con la virulencia de *C. albicans*, conocida como la adhesina más abundante (19,22,74). Se ha reportado que una mayor expresión de *ALS3* se relaciona con un peor pronóstico y una mayor capacidad

de formar biopelículas *in vitro* (24). Se ha relacionado directamente a Als3 con la infección al cerebro, por su afinidad a la proteína de shock térmico gp96 expresada en la superficie del endotelio cerebral ayudando al hongo a entrar mediante endocitosis (54). Recientemente se descubrió que Als3 es crucial para la respuesta inmune contra *C. albicans*, la proteína Als3 es necesaria para montar una defensa eficiente. Los ratones infectados con cepas sin Als3 mostraron una mayor carga fúngica en los riñones, pero menor en el cerebro, además, Als3 se vinculó con mayor inflamación (23).

Se podría sugerir que la relativa mayor expresión de *ALS3* durante la infección con el inóculo letal coincide con el alto nivel de inflamación en este órgano, demostrado ya en estudios previos del equipo de trabajo en comparación la infección no letal (61), así como la diferencia en la morfología, considerando que esta proteína está asociada con la forma de hifa (19,23). La baja expresión de *ALS3* se podría interpretar como una baja capacidad de adhesión en la cepa, pero también a que la expresión puede variar en el tiempo, sin ser constante. Previamente el equipo de trabajo demostró que al entrar *C. albicans* en el torrente sanguíneo de ratones neonatos, llega al cerebro a las 3 hpi (61), por lo que la expresión de a las 48 hpi podría no reflejar el comportamiento de este gen durante la invasión al cerebro si se considera el altamente dinámico transcriptoma de *C. albicans* (75).

Por otro lado, el gen *ALS2* no ha sido tan estudiado como otros genes. Se sabe que forma parte de la pared celular teniendo un rol esencial en la biogénesis de esta (76). Las mutantes carentes de este gen ralentizan su capacidad de filamentar *in vitro* y muestran una reducción de la adhesión en células de endotelio, además de alterar

la formación de biopelícula en condiciones *in vitro* (77). La expresión de *ALS2* fue mayor en la infección letal y dado que las hifas constituyen una mayor superficie de pared celular que las levaduras, esta podría ser la razón de esto. Hay poca información sobre la función de *ALS2* en la infección *in vivo*, esta es una de las pocas ocasiones en que se ha estudiado en un modelo *in vivo*.

Si bien *Als4* es una adhesina, las mutantes sin este gen no redujeron la adhesión de *C. albicans* (78) ni tiene un impacto en la virulencia (77). Se cree cumple funciones similares a *Als2*, pues son muy similares. La diferencia en la morfología exhibida en ambos inóculos coincide con estudios que encontraron una mayor presencia de *ALS4* en la superficie de las levaduras de *C. albicans*, contrario a las hifas (78). Por su parte, *Als5* se ha asociado con la adhesión en poliestireno utilizando *S. cerevisiae* como modelo para sobreexpresarlo (22). Este gen se observó sobreexpresado durante la infección no letal. Interesantemente, *Als1* y *Als5* son proteínas muy similares en más de un 85% y comparten ligandos (22). Es posible que *ALS5*, junto con *ALS6* y *ALS7*, son expresados por *C. albicans* en su forma de levadura, y no exclusivamente en la hifa como *ALS3* (31). Esto podría explicar la alta expresión de los genes *ALS5-7* en el purificado de la infección no letal, donde predominantemente se observaron levaduras.

En cuanto a *ALS6* y *ALS7* no se les ha documentado una función crucial para la adhesión de *C. albicans*, se ha reportado que la delección de sus genes causó un ligero aumento en la adhesión del hongo (22,79), y la ausencia de un efecto evidente en la virulencia de *C. albicans* en un modelo *in vivo* (80), sugiriendo que una baja expresión se traduce en un fenotipo más adherente, algo que pudiera suceder con la

infección letal, sin embargo, es más parsimonioso atribuir la diferencia en los niveles de expresión con la morfología que presentaba *C. albicans* en cada infección, dado que el rol de estas proteínas es aun mayormente desconocido (79).

HWP1 se expresó principalmente durante la infección letal, aunque no de forma significativa, lo que podría estar relacionado con la presencia de hifas, ya que Hwp1 es una proteína específica de estas. Es crucial para la formación de biopelículas en *C. albicans*, debido a que promueve la adhesión entre células fúngicas (32,81,82). Sus funciones son cruciales en el proceso invasivo, facilitando una fuerte adhesión a la matriz extracelular. Hwp1 sirve como sustrato para la transglutaminasa, uniéndolo covalentemente a las proteínas de la matriz extracelular de las células epiteliales (32,81). La expresión observada puede indicar la formación de biopelícula según modelos *in vivo* (20).

La sobreexpresión de genes relacionados con adhesinas en *C. albicans* durante la infección no letal puede estar ligada a la formación activa de biopelícula, especialmente *ALS1*, *ALS5* y *ALS6* (71,81,82). Proteínas que están presentes en la levadura y se asocian con la agregación, fenómeno observado en micrografías del cerebro infectado con la infección letal, para lo cual Als1 y Als5 juegan un papel crucial en la formación de estos conglomerados. Estas agrupaciones, conocidas como “bolas fúngicas” son comunes en pacientes con candidiasis diseminada (83) y también se encuentran en el cerebro de pacientes con neurocandidiasis (84).

La producción de enzimas hidrolíticas como las Saps se considera un indicador importante de la virulencia de *C. albicans*. En el presente estudio se

identificó una sobreexpresión durante la infección inducida por el inóculo no letal. En particular, *SAP1* mostró un aumento notable en su expresión durante la infección no letal, a pesar de no tener diferencias significativas. Lo mismo con *SAP2* y *SAP3*, lo que podría relacionarse con el estado morfológico de *C. albicans* durante ambas infecciones, ya que las proteínas Sap1, 2 y 3 son más abundantes en la levadura que en la hifa (32,85). Aunado, un estudio de candidiasis oral en ratones reportó un nivel de expresión constante de los genes *SAP1*, 2 y 5 a lo largo de cinco días (32,86), interesantemente, *SAP2* y *SAP5*, son de los genes de más expresados de este grupo en el presente estudio, pero únicamente durante la infección no letal.

Paralelo a esto, otro estudio encontró que los aislados provenientes de pacientes con candidiasis oral mostraron mayor expresión de *SAP2* que aquellos aislados de individuos sanos, concluyendo que *SAP2* es el gen más expresado desde etapas tempranas de la infección y mayormente en cepas virulentas, sugiriendo que la expresión de *SAP2* es un indicador de virulencia (26), esto es, una primera aproximación, contradictorio comparado con el presente estudio, sería de esperarse que el aislado de un infección letal fuese más virulento y por ende exhibiera mayor expresión de *SAP1-5*, sin embargo, es el aislado de infección no letal el que exhibe este perfil de expresión, por lo que debe haber más factores en juego que estén influyendo en esto.

Un factor importante es la evolución de la infección. El estudio encontró *SAP1* y *SAP3* en menor expresión y con menos diferencias, lo que puede estar relacionado con su asociación a infecciones superficiales en mucosas (18). Otro factor importante que influye en la expresión de estas enzimas es el medio ambiente y la captación de

nutrientes. En el caso de las Saps, su activación y expresión están relacionadas con la disponibilidad de proteínas solubles, sobre esto, un estudio reciente mostró que al proporcionar BSA como única fuente de nitrógeno, *C. albicans* aumentó la producción de Sap1-3, a mayor disponibilidad de proteínas solubles en el medio, mayor producción de Saps (87). Así mismo el pH ácido induce la producción de estas enzimas, se ha reportado este aumento cuando *C. albicans* interactúa con macrófagos u otras células fagocíticas, hipotetizando que es una respuesta a la fagocitosis (87,88), esto pudiese estar relacionado con los niveles más altos de Saps observados durante la infección no letal, relacionado con que a las 48 hpi, la infección no letal es más aguda, justo antes de que ceda por sí sola, en un momento en el que la reacción inmune representa un desafío significativo al hongo y este responde produciendo Saps.

En el caso de Sap 4-6, las cuales *C. albicans* secreta mayormente en la forma de hifa (32,86), los resultados obtenidos por los genes *SAP4* y *5* muestran una sobreexpresión en la infección no letal, lo cual es inesperado, por su rol en la virulencia. *SAP5* se relaciona con la colonización y la formación de biopelícula (86), *SAP6* se le relaciona con el daño a tejidos (88), lo que podría ser un indicativo de la virulencia exhibida durante la infección letal, dado que *SAP6* fue la única que se mostró más expresada durante la infección letal, Sap6 es una proteína que se ha detectado en la hifa de *C. albicans* en condiciones de pH neutro (32,85,88), relevante, dado que el cerebro es un ambiente que es ligeramente alcalino, con un pH casi neutro (89).

Un estudio que uso un modelo in vivo de candidiasis invasiva en riñones de ratones BALB/c usó mutantes carentes de *SAP4-6* y encontraron que no hubo diferencias en la virulencia comparada con la infección con cepas silvestres, los autores concluyeron que la delección de los genes *SAP4-6* no implica una reducción significativa de la virulencia de *C. albicans* (90), sugiriendo un papel menos importante para estas enzimas, pero hipotetizando que *C. albicans* puede compensar la pérdida en la producción de una enzima con otra, por lo que estas tendrían funciones no exclusivas.

SAP7 es relevante, ya que su expresión solo ha sido detectada en modelos *in vivo*, indicando que su expresión ocurre en etapas avanzadas de la infección (18,28). Se le asocia con la candidiasis invasiva, dado que es uno de los genes más expresados al exponerse a suero humano, lo que indica su papel en la captación de nutrientes sanguíneos y en la interacción con células endoteliales (28). Los autores de un estudio hipotetizaron que la producción de la enzima Sap7 permite a *C. albicans* escapar del torrente sanguíneo e invadir órganos (18,28). En la infección no letal, *SAP7* mostró un mayor nivel de expresión, aunque en menor medida, lo cual podría relacionarse con el estado de estrés en un ambiente limitado en nutrientes y la interacción del hongo con el endotelio en el sistema nervioso central.

La expresión de los genes *SAP* sigue un patrón progresivo durante la infección de mucosas, iniciando con *SAP1* y *SAP2*, seguidos de *SAP8*, luego *SAP6* y finalmente *SAP3* (87). Este patrón se ha observado tanto en experimentos *in vitro* como *in vivo*, con expresión constante de *SAP1* y *SAP2* desde el inicio y posterior expresión de los demás genes (86). Esto representa una limitación en el presente estudio, ya que la

expresión obtenida en el análisis por qPCR es representativa a las 48 hpi., pudiendo haberse registrado niveles mayores de expresión en las primeras horas de la infección según el patrón previamente discutido. Sin embargo, la presencia de estos genes a las 48 h es algo sin precedentes, especialmente en el contexto de la neurocandidiasis neonatal.

9 CONCLUSIONES

- I. Este estudio estandarizó un método de lisis enzimático para aislar y purificar a *C. albicans* del cerebro de ratones neonatos con neurocandidiasis.
- II. Se desarrolló y estandarizó un método para la extracción de ARN de *C. albicans* proveniente del cerebro de ratones con neurocandidiasis.
- III. Al comparar la expresión génica de factores de virulencia de *C. albicans* entre ratones infectados con un inóculo letal y uno no letal, se observó que no hubo una sobreexpresión significativa de factores de virulencia en la infección letal a las 48 horas post infección.
- IV. *C. albicans* aislada de ratones infectados con el inóculo no letal exhibió una mayor sobreexpresión de ciertos factores de virulencia, substancialmente los genes relacionados con adhesinas e involucradas en la formación de biopelícula y agregación en levaduras como *ALS1*, *ALS4*, *ALS5* y *ALS6*. Así mismo una sobreexpresión en los genes *SAP2*, *SAP3*, *SAP4*, *SAP5* que se asocian con mayor virulencia, colonización, evasión de la respuesta inmune y mayor expresión de *SAP7* que se asocia con invasión profunda e interacción con endotelios.

10 PERSPECTIVAS

- I. Estudiar la expresión de los factores de virulencia a tiempos más tempranos de la infección, con el fin de establecer una cinética de expresión de estos a lo largo del desarrollo de ambas infecciones, debido a que la expresión de estos genes es dinámica, entenderla ayudará a esclarecer que aspecto de la virulencia de *C. albicans* es más urgente a tratar según el tiempo de infección.
- II. Estudiar la carga de proteínas Als y Saps asociadas con los factores de virulencia estudiados para evaluar como la disponibilidad de estas se relaciona con la virulencia observada en el modelo *in vivo* y la correlación con el perfil de expresión observado en el presente estudio.
- III. Evaluar el papel de los factores de virulencia más expresados en el daño cerebral y muerte celular mediante el uso de cepas mutantes de *C. albicans* carentes de dichos genes.

11 BIBLIOGRAFÍA

1. The top 10 causes of death [Internet]. [citado 13 de diciembre de 2024]. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
2. WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action [Internet]. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 2022 [citado 9 de marzo de 2023] p. 48. Report No.: ISBN: 978-92-4-006024-1. Disponible en: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240060241>
3. Stop neglecting fungi. *Nat Microbiol.* 25 de julio de 2017;2(8):1-2.
4. Kainz K, Bauer MA, Madeo F, Carmona-Gutierrez D. Fungal infections in humans: the silent crisis. *Microb Cell.* 7(6):143-5.
5. Denning DW. Global incidence and mortality of severe fungal disease. *Lancet Infect Dis.* julio de 2024;24(7):e428-38.
6. Brandt ME, Lockhart SR. Recent Taxonomic Developments with *Candida* and Other Opportunistic Yeasts. *Curr Fungal Infect Rep.* 1 de septiembre de 2012;6(3):170-7.
7. Mareković I, Pleško S, Rezo Vranješ V, Herljević Z, Kuliš T, Jandrlić M. Epidemiology of Candidemia: Three-Year Results from a Croatian Tertiary Care Hospital. *J Fungi.* abril de 2021;7(4):267.
8. Adam KM, Osthoff M, Lamoth F, Conen A, Erard V, Boggian K, et al. Trends of the Epidemiology of Candidemia in Switzerland: A 15-Year FUNGINOS Survey. *Open Forum Infect Dis.* 1 de octubre de 2021;8(10):ofab471.
9. Posteraro B, De Carolis E, Criscuolo M, Ballanti S, De Angelis G, Del Principe MI, et al. Candidaemia in haematological malignancy patients from a SEIFEM study: Epidemiological patterns according to antifungal prophylaxis. *Mycoses.* 2020;63(9):900-10.
10. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Medical microbiology.* Ninth edition. Edinburgh ; New York: Elsevier; 2021. 855 p.
11. Bonifaz Trujillo A. *Micología Médica Básica.* quinta. México, D. F.: McGraw-Hill Interamericana Editores; 2015.
12. Epidemiology, risk factors, treatment and outcome of *Candida* bloodstream infections because of *Candida albicans* and *Candida non-albicans* in two district general hospitals in the United Kingdom. [citado 27 de enero de 2025]; Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ijcp.13655>

13. Lopes JP, Lionakis MS. Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. *Virulence*. 31 de diciembre de 2022;13(1):89-121.
14. Chow EWL, Pang LM, Wang Y. From Jekyll to Hyde: The Yeast–Hyphal Transition of *Candida albicans*. *Pathogens*. julio de 2021;10(7):859.
15. Shepherd MG, Poulter RT, Sullivan PA. *Candida albicans*: biology, genetics, and pathogenicity. *Annu Rev Microbiol*. 1985;39:579-614.
16. Dadar M, Tiwari R, Karthik K, Chakraborty S, Shahali Y, Dhama K. *Candida albicans* - Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control – An update. *Microb Pathog*. 1 de abril de 2018;117:128-38.
17. Dp LJ. The *Candida* Genus Complex: Biology, Evolution, Pathogenicity Virulence and One Health Aspects, Beyond the *Candida albicans* Paradigm. A Comprehensive Review. *Viol Immunol J*. 8 de noviembre de 2023;7(4):1-38.
18. Chen H, Zhou X, Ren B, Cheng L. The regulation of hyphae growth in *Candida albicans*. *Virulence*. 31 de diciembre de 2020;11(1):337-48.
19. Talapko J, Juzbašić M, Matijević T, Pustijanac E, Bekić S, Kotris I, et al. *Candida albicans*—The Virulence Factors and Clinical Manifestations of Infection. *J Fungi*. febrero de 2021;7(2):79.
20. Arita GS, Faria DR, Capoci IRG, Kioshima ES, Bonfim-Mendonça PS, Svidzinski TIE. Cell wall associated proteins involved in filamentation with impact on the virulence of *Candida albicans*. *Microbiol Res*. 1 de mayo de 2022;258:126996.
21. Pappas PG, Lionakis MS, Arendrup MC, Ostrosky-Zeichner L, Kullberg BJ. Invasive candidiasis. *Nat Rev Dis Primer*. 11 de mayo de 2018;4(1):1-20.
22. Hoyer LL, Cota E. *Candida albicans* Agglutinin-Like Sequence (Als) Family Vignettes: A Review of Als Protein Structure and Function. *Front Microbiol* [Internet]. 15 de marzo de 2016 [citado 27 de mayo de 2024];7. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2016.00280/full>
23. Zhou T, Solis NV, Marshall M, Yao Q, Garleb R, Yang M, et al. Hyphal Als proteins act as CR3 ligands to promote immune responses against *Candida albicans*. *Nat Commun*. 9 de mayo de 2024;15:3926.
24. Deng K, Jiang W, Jiang Y, Deng Q, Cao J, Yang W, et al. ALS3 Expression as an Indicator for *Candida albicans* Biofilm Formation and Drug Resistance. *Front Microbiol* [Internet]. 29 de abril de 2021 [citado 21 de octubre de 2024];12. Disponible en:

<https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2021.655242/full>

25. Wibawa T. The role of virulence factors in *Candida albicans* pathogenicity. *J Med Sci Berk Ilmu Kedokt* [Internet]. 5 de junio de 2016 [citado 7 de enero de 2025];48(1). Disponible en: <https://jurnal.ugm.ac.id/bik/article/view/11519>
26. Tavanti A, Pardini G, Campa D, Davini P, Lupetti A, Senesi S. Differential Expression of Secretory Aspartyl Proteinase Genes (SAP1-10) in Oral *Candida albicans* Isolates with Distinct Karyotypes. *J Clin Microbiol*. octubre de 2004;42(10):4726-34.
27. Carvalho-Pereira J, Vaz C, Carneiro C, Pais C, Sampaio P. Genetic variability of *Candida albicans* Sap8 propeptide in isolates from different types of infection. *BioMed Res Int*. 2015;2015:148343.
28. Staniszevska M, Bondaryk M, Malewski T, Kurzatkowski W. Quantitative expression of *Candida albicans* aspartyl proteinase genes SAP7, SAP8, SAP9, SAP10 in human serum in vitro. *Pol J Microbiol*. 1 de enero de 2014;63(1):15-20.
29. Kadry AA, El-Ganiny AM, El-Baz AM. Relationship between Sap prevalence and biofilm formation among resistant clinical isolates of *Candida albicans*. *Afr Health Sci*. 29 de noviembre de 2018;18(4):1166-74.
30. Costa CR, Jesuino RSA, de Aquino Lemos J, de Fátima Lisboa Fernandes O, Hasimoto e Souza LK, Passos XS, et al. Effects of antifungal agents in sap activity of *Candida albicans* isolates. *Mycopathologia*. febrero de 2010;169(2):91-8.
31. Macias-Paz IU, Pérez-Hernández S, Tavera-Tapia A, Luna-Arias JP, Guerra-Cárdenas JE, Reyna-Beltrán E. *Candida albicans* the main opportunistic pathogenic fungus in humans. *Rev Argent Microbiol*. 1 de abril de 2023;55(2):189-98.
32. Padder SA, Ramzan A, Tahir I, Rehman R ul, Shah AH. Metabolic flexibility and extensive adaptability governing multiple drug resistance and enhanced virulence in *Candida albicans*. *Crit Rev Microbiol*. 2 de enero de 2022;48(1):1-20.
33. Leidich SD, Ibrahim AS, Fu Y, Koul A, Jessup C, Vitullo J, et al. Cloning and disruption of caPLB1, a phospholipase B gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans*. *J Biol Chem*. 2 de octubre de 1998;273(40):26078-86.
34. Mogavero S, Höfs S, Lauer AN, Müller R, Brunke S, Allert S, et al. Candidalysin Is the Hemolytic Factor of *Candida albicans*. *Toxins*. diciembre de 2022;14(12):874.
35. Mogavero S, Sauer FM, Brunke S, Allert S, Schulz D, Wisgott S, et al. Candidalysin delivery to the invasion pocket is critical for host epithelial damage induced by *Candida albicans*. *Cell Microbiol*. 2021;23(10):e13378.

36. Richardson JP, Mogavero S, Moyes DL, Blagojevic M, Krüger T, Verma AH, et al. Processing of *Candida albicans* Ece1p Is Critical for Candidalysin Maturation and Fungal Virulence. *mBio*. 23 de enero de 2018;9(1):e02178-17.
37. Ho J, Yang X, Nikou SA, Kichik N, Donkin A, Ponde NO, et al. Candidalysin activates innate epithelial immune responses via epidermal growth factor receptor. *Nat Commun*. 24 de mayo de 2019;10(1):2297.
38. Anderson FM, Visser ND, Amses KR, Hodgins-Davis A, Weber AM, Metzner KM, et al. *Candida albicans* selection for human commensalism results in substantial within-host diversity without decreasing fitness for invasive disease. *PLOS Biol*. 19 de mayo de 2023;21(5):e3001822.
39. Anh DN, Hung DN, Tien TV, Dinh VN, Son VT, Luong NV, et al. Prevalence, species distribution and antifungal susceptibility of *Candida albicans* causing vaginal discharge among symptomatic non-pregnant women of reproductive age at a tertiary care hospital, Vietnam. *BMC Infect Dis*. 3 de junio de 2021;21(1):523.
40. Kumamoto CA, Gresnigt MS, Hube B. The gut, the bad and the harmless: *Candida albicans* as a commensal and opportunistic pathogen in the intestine. *Curr Opin Microbiol*. 1 de agosto de 2020;56:7-15.
41. Erdogan A, Rao SSC. Small Intestinal Fungal Overgrowth. *Curr Gastroenterol Rep*. 19 de marzo de 2015;17(4):16.
42. Kullberg BJ, Arendrup MC. Invasive Candidiasis. *N Engl J Med*. 8 de octubre de 2015;373(15):1445-56.
43. He B, Yang Q. Updates in Laboratory Identification of Invasive Fungal Infection in Neonates. *Microorganisms*. abril de 2023;11(4):1001.
44. Vigezzi C, Riera FO, Rodriguez E, Icely PA, Miró MS, Figueredo CM, et al. Candidiasis invasora: un enfoque a la infección en el sistema nervioso central. *Rev Argent Microbiol*. 1 de abril de 2021;53(2):171-8.
45. Kotey FC, Dayie NT, Tetteh-Uarcoo PB, Donkor ES. *Candida* Bloodstream Infections: Changes in Epidemiology and Increase in Drug Resistance. *Infect Dis Res Treat*. 1 de enero de 2021;14:11786337211026927.
46. Vasileiou E, Apsemidou A, Vyzantiadis TA, Tragiannidis A. Invasive candidiasis and candidemia in pediatric and neonatal patients: A review of current guidelines. *Curr Med Mycol*. 1 de septiembre de 2018;4(3):28-33.
47. Bliss JM, Wong AY, Bhak G, Laforce-Nesbitt SS, Taylor S, Tan S, et al. *Candida* Virulence Properties and Adverse Clinical Outcomes in Neonatal Candidiasis. *J Pediatr*. 1 de septiembre de 2012;161(3):441-447.e2.

48. Lausch KR, Schultz Dungu KH, Callesen MT, Schrøder H, Rosthøj S, Poulsen A, et al. Pediatric Candidemia Epidemiology and Morbidities: A Nationwide Cohort. *Pediatr Infect Dis J.* mayo de 2019;38(5):464-9.
49. Chen YN, Hsu JF, Chu SM, Lai MY, Lin C, Huang HR, et al. Clinical and Microbiological Characteristics of Neonates with Candidemia and Impacts of Therapeutic Strategies on the Outcomes. *J Fungi.* mayo de 2022;8(5):465.
50. Walsh TJ, Katragkou A, Chen T, Salvatore CM, Roilides E. Invasive Candidiasis in Infants and Children: Recent Advances in Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *J Fungi Basel Switz.* 24 de enero de 2019;5(1):11.
51. Zaoutis TE, Heydon K, Localio R, Walsh TJ, Feudtner C. Outcomes attributable to neonatal candidiasis. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 1 de mayo de 2007;44(9):1187-93.
52. Drummond RA, Lionakis MS. Candidiasis of the Central Nervous System in Neonates and Children with Primary Immunodeficiencies. *Curr Fungal Infect Rep.* junio de 2018;12(2):92-7.
53. Jong AY, Stins MF, Huang SH, Chen SH, Kim KS. Traversal of *Candida albicans* across human blood-brain barrier in vitro. *Infect Immun.* julio de 2001;69(7):4536-44.
54. Liu Y, Mittal R, Solis NV, Prasadarao NV, Filler SG. Mechanisms of *Candida albicans* Trafficking to the Brain. *PLOS Pathog.* 6 de octubre de 2011;7(10):e1002305.
55. da Fonseca ACC, Matias D, Garcia C, Amaral R, Geraldo LH, Freitas C, et al. The impact of microglial activation on blood-brain barrier in brain diseases. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 2014 [citado 5 de julio de 2023];8. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2014.00362>
56. Navarathna DHMLP, Munasinghe J, Lizak MJ, Nayak D, McGavern DB, Roberts DD. MRI confirms loss of blood-brain barrier integrity in a mouse model of disseminated candidiasis. *NMR Biomed.* 2013;26(9):1125-34.
57. Whibley N, Jaycox JR, Reid D, Garg AV, Taylor JA, Clancy CJ, et al. Delinking CARD9 and IL-17: CARD9 Protects against *Candida tropicalis* Infection through a TNF- α -Dependent, IL-17-Independent Mechanism. *J Immunol.* 15 de octubre de 2015;195(8):3781-92.
58. Chaussade H, Cazals X, Desoubieux G, Jouvion G, Bougnoux ME, Lefort A, et al. Central nervous system candidiasis beyond neonates: Lessons from a nationwide study. *Med Mycol.* 1 de marzo de 2021;59(3):266-77.

59. MacAlpine J, Lionakis MS. Host-microbe interaction paradigms in acute and recurrent vulvovaginal candidiasis. *Cell Host Microbe*. 9 de octubre de 2024;32(10):1654-67.
60. Flores-Maldonado OE, González GM, Andrade-Torres Á, Treviño-Rangel R, Donis-Maturano L, Silva-Sánchez A, et al. Distinct innate immune responses between sublethal and lethal models of disseminated candidiasis in newborn BALB/c mice. *Microb Pathog*. 1 de septiembre de 2021;158:105061.
61. Flores-Maldonado O, González GM, Enríquez-Bañuelos JF, Andrade Á, Treviño-Rangel R, Becerril-García MA. *Candida albicans* causes brain regional invasion and necrosis, and activation of microglia during lethal neonatal neurocandidiasis. *Microbes Infect*. 1 de julio de 2023;25(6):105119.
62. Kienstra KA, Freysdottir D, Gonzales NM, Hirschi KK. Murine neonatal intravascular injections: modeling newborn disease. *J Am Assoc Lab Anim Sci JAALAS*. noviembre de 2007;46(6):50-4.
63. Vandeputte P, Ischer F, Sanglard D, Coste AT. In Vivo Systematic Analysis of *Candida albicans* Zn2-Cys6 Transcription Factors Mutants for Mice Organ Colonization. *PLOS ONE*. 31 de octubre de 2011;6(10):e26962.
64. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif*. diciembre de 2001;25(4):402-8.
65. Gao J, Chow EWL, Wang H, Xu X, Cai C, Song Y, et al. LncRNA DINOR is a virulence factor and global regulator of stress responses in *Candida auris*. *Nat Microbiol*. julio de 2021;6(7):842-51.
66. Amorim-Vaz S, Tran VDT, Pradervand S, Pagni M, Coste AT, Sanglard D. RNA Enrichment Method for Quantitative Transcriptional Analysis of Pathogens In Vivo Applied to the Fungus *Candida albicans*. *mBio*. 22 de septiembre de 2015;6(5):10.1128/mbio.00942-15.
67. Cortés-Maldonado L, Marcial-Quino J, Gómez-Manzo S, Fierro F, Tomasini A. A method for the extraction of high quality fungal RNA suitable for RNA-seq. *J Microbiol Methods*. 1 de marzo de 2020;170:105855.
68. Rodríguez A, Vanechoutte M. Comparison of the efficiency of different cell lysis methods and different commercial methods for RNA extraction from *Candida albicans* stored in RNAlater. *BMC Microbiol*. 14 de mayo de 2019;19(1):94.
69. Cravener MV, Mitchell AP. *Candida albicans* Culture, Cell Harvesting, and Total RNA Extraction. *Bio-Protoc*. 5 de noviembre de 2020;10(21):e3803.

70. Kebaara BW, Nielsen LE, Nickerson KW, Atkin AL. Determination of mRNA half-lives in *Candida albicans* using thiolutin as a transcription inhibitor. *Genome.* agosto de 2006;49(8):894-9.
71. Klotz SA, Gaur NK, De Armond R, Sheppard D, Khardori N, Edwards JE, et al. *Candida albicans* Als proteins mediate aggregation with bacteria and yeasts. *Med Mycol.* junio de 2007;45(4):363-70.
72. Fu Y, Ibrahim AS, Sheppard DC, Chen YC, French SW, Cutler JE, et al. *Candida albicans* Als1p: an adhesin that is a downstream effector of the EFG1 filamentation pathway. *Mol Microbiol.* 2002;44(1):61-72.
73. Razavi T, Falahati M, Teimourian S, Farahyar S, Babaei V, Majdabadi N, et al. Investigating the expression of ALS2 and ALS9 genes along with allele frequency of ALS9 in patients with vulvovaginal candidiasis. *Infect Genet Evol.* 1 de agosto de 2020;82:104253.
74. Liu Y, Filler SG. *Candida albicans* Als3, a Multifunctional Adhesin and Invasin. *Eukaryot Cell.* 4 de febrero de 2011;10(2):168-73.
75. Walker LA, MacCallum DM, Bertram G, Gow NAR, Odds FC, Brown AJP. Genome-wide analysis of *Candida albicans* gene expression patterns during infection of the mammalian kidney. *Fungal Genet Biol.* 1 de febrero de 2009;46(2):210-9.
76. Oh SH, Coleman DA, Zhao X, Hoyer LL. Development and validation of monoclonal antibodies specific for *Candida albicans* Als2, Als9-1, and Als9-2. *PLOS ONE.* 8 de julio de 2022;17(7):e0269681.
77. Zhao X, Oh SH, Yeater KM, Hoyer LL. Analysis of the *Candida albicans* Als2p and Als4p adhesins suggests the potential for compensatory function within the Als family. *Microbiology.* 2005;151(5):1619-30.
78. Coleman DA, Oh SH, Manfra-Maretta SL, Hoyer LL. A Monoclonal Antibody Specific for *Candida albicans* Als4 Demonstrates Overlapping Localization of Als Family Proteins on the Fungal Cell Surface and Highlights Differences between Als Localization in vitro and in vivo. *Fems Immunol Med Microbiol.* abril de 2012;64(3):321-33.
79. Zhao X, Oh SH, Hoyer LL. Deletion of ALS5, ALS6 or ALS7 increases adhesion of *Candida albicans* to human vascular endothelial and buccal epithelial cells. *Med Mycol.* agosto de 2007;45(5):429-34.
80. Rishiq A, Liu M, Mandelboim O. Enhancing immunity against *Candida albicans* infections through TIGIT knockout. *mBio.* 7 de agosto de 2024;15(9):e01165-24.
81. Nobile CJ, Mitchell AP. Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. *Cell Microbiol.* septiembre de 2006;8(9):1382-91.

82. Soll DR. Candida Biofilms: Is Adhesion Sexy? *Curr Biol.* 26 de agosto de 2008;18(16):R717-20.
83. Staniszevska M, Bondaryk M, Siennicka K, Kurzatkowski W. Ultrastructure of *Candida albicans* pleomorphic forms: phase-contrast microscopy, scanning and transmission electron microscopy. *Pol J Microbiol.* 2012;61(2):129-35.
84. Górska K, Blaszkowska J, Dzikowiec M. Neuroinfections caused by fungi. *Infection.* 1 de agosto de 2018;46(4):443-59.
85. White TC, Agabian N. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases: isoenzyme pattern is determined by cell type, and levels are determined by environmental factors. *J Bacteriol.* septiembre de 1995;177(18):5215-21.
86. Ripeau JS, Fiorillo M, Aumont F, Belhumeur P, de Repentigny L. Evidence for differential expression of *Candida albicans* virulence genes during oral infection in intact and human immunodeficiency virus type 1-transgenic mice. *J Infect Dis.* 15 de abril de 2002;185(8):1094-102.
87. Barbosa PF, Gonçalves DS, Ramos LS, Mello TP, Braga-Silva LA, Pinto MR, et al. Saps1–3 Antigens in *Candida albicans*: Differential Modulation Following Exposure to Soluble Proteins, Mammalian Cells, and Infection in Mice. *Infect Dis Rep.* 28 de junio de 2024;16(4):572-86.
88. Felk A, Kretschmar M, Albrecht A, Schaller M, Beinhauer S, Nichterlein T, et al. *Candida albicans* hyphal formation and the expression of the Efg1-regulated proteinases Sap4 to Sap6 are required for the invasion of parenchymal organs. *Infect Immun.* julio de 2002;70(7):3689-700.
89. Seifter JL, Chang HY. Disorders of Acid-Base Balance: New Perspectives. *Kidney Dis.* enero de 2017;2(4):170-86.
90. Correia A, Lermann U, Teixeira L, Cerca F, Botelho S, Gil da Costa RM, et al. Limited Role of Secreted Aspartyl Proteinases Sap1 to Sap6 in *Candida albicans* Virulence and Host Immune Response in Murine Hematogenously Disseminated Candidiasis. *Infect Immun.* noviembre de 2010;78(11):4839-49.