



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Efecto de la dexametasona sobre la expresión del mRNA para
TLR 2, TLR 4 e IL-6 en diversos órganos de ratones retados
con *Candida albicans*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

MARIANA LÓPEZ MEJÍA



DIRECTOR DE TESIS

DRA. FRANCISCA HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) por el apoyo al proyecto PAPIIT IN-211311, por otorgarme la beca para conclusión de estudios.

Una parte de este trabajo fue desarrollado con recursos del Presupuesto de la Facultad de Medicina asignado a la Dra. Francisca Hernández Hernández del Laboratorio de Micología Médica Molecular, Departamento de Microbiología y Parasitología.

Agradezco:

A la Doctora Francisca Hernandez Hernandez, por su infinita paciencia, su apoyo más allá del laboratorio.

A la Q.F.B Erika Cordova por su asesoría en todo momento, su amistad y por compartir parte de su experiencia.

A la Doctora Guadalupe Reyes y el Doctor Tamayo por todo el apoyo brindado la asesoría y por colaborar en la realización de este trabajo.

A la Bióloga Elva Bazán por su apoyo y asesoría

A la Doctora Blanca Millan E Chiu por darme la oportunidad de pertenecer al equipo del laboratorio de Micología Medica y por la planeación original de este trabajo.

A la Doctora Patricia Manzano

A la Doctora Roció Castañon y el Doctor Rubén López.

A mis compañeros del laboratorio de Micología Medica.

Índice de contenido

RESUMEN	4
MARCO TEÓRICO	
<i>Candida albicans</i>	6
Candidosis	10
Respuesta inmune	12
Inmunidad innata	13
Receptores tipo Toll (TLRs)	18
Inflamación	24
Citocinas	25
IL-6	26
Inmunidad adquirida	27
Corticoides	29
ANTECEDENTES	34
JUSTIFICACIÓN	35
HIPÓTESIS Y OBJETIVO	36
MATERIAL Y MÉTODOS	37
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	61
REFERENCIAS	62
ANEXOS	67

Resumen

La candidosis es la micosis más frecuente en los humanos. Se distribuye en todo el mundo y se presenta asociada a una deficiencia inmunológica, otros factores de riesgo son diabetes mellitus, desnutrición avanzada, terapia asociada a trasplantes o neoplasias, etc. Esta patología puede manifestarse de varias formas clínicas, de las cuales la muco-cutánea, la cutánea y la sistémica son las más frecuentes.

C. albicans es un patógeno oportunista, cuya pared celular está compuesta por proteínas y polisacáridos como quitina, mananos, β -glucanos, y zimosan. Algunos de estos compuestos están asociados a la capacidad de adhesión, resistencia a anti-fúngicos y también interactúan con receptores que inician la respuesta inmune innata del huésped.

En células del sistema inmune y otras, los principales receptores que reconocen patrones moleculares de patógenos son los receptores tipo Toll (Toll-like Receptors, TLRs), una familia de proteínas, que reconocen diversos patrones moleculares específicos de virus, hongos y bacterias; éstos son el primer intermediario de contacto entre el patógeno y el sistema inmune. Los mananos de *C. albicans* son reconocidos por el TLR-4 y las fosfolipomananos por TLR-2. Esta interacción induce la activación de vías de señalización, que conducen a la síntesis y liberación de citocinas pro-inflamatorias (IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α , INF- γ) que ayudan a eliminar al hongo.

La dexametasona (DXM) es un glucocorticoide sintético con un potente efecto anti-inflamatorio. En medicina se usa ampliamente para tratar procesos inflamatorios severos, a pesar de sus efectos colaterales, y para favorecer algunas infecciones experimentales como la candidosis en modelos animales.

Se desconoce el efecto que tiene la dexametasona en la interacción TLRs-*Candida albicans*. Tampoco está claro si la dexametasona tiene alguna influencia en la expresión de los receptores TLR-2 y TLR-4, y la respuesta de las citocinas pro-inflamatorias del sistema inmune.

En consecuencia, el objetivo principal del presente trabajo fue evaluar el efecto de diferentes dosis de DXM sobre la expresión del mRNA de TLR-2 y TLR-4, β -actina e IL-6, en diferentes tejidos de ratones CD1 inoculados intra-peritonealmente con *C. albicans*.

Las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo no indujeron el desarrollo de una candidosis sistémica en el modelo experimental, los órganos de los ratones no mostraron cambios patológicos notables con excepción de distensión intestinal y crecimiento moderado de bazo; finalmente, los retro-cultivos fueron en su mayoría negativos en los grupos inoculados con *C. albicans*.

A pesar de la ausencia de una candidosis sistémica, el estudio molecular sugiere algunos cambios en la expresión de TLR-2, TLR-4 e IL-6, los cuales no fueron concluyentes, debido a diversos problemas del diseño experimental.

MARCO TEÓRICO

El género *Candida* (Berkhout, 1923), es un grupo de microorganismos levaduriformes clasificado en el Reino Fungi, Phylum Ascomycota, Subphylum Saccharomycotina, Clase Saccharomycetes, Orden Saccaromycetales, Género *Candida* (Hibbet 2007). El género incluye una gran diversidad de levaduras heterogéneas de las cuales hay aproximadamente 200 especies, pero solo un número reducido de ellas han mostrado ser patógenas para el humano. En agar dextrosa Sabouraud a 25°C, la levadura crece rápidamente (2 – 3 días), formando colonias uniformemente blancas a cremas, con borde regular, superficie lisa o rugosa dependiendo de la especie, con elevación convexa, de textura cremosa. Microscópicamente las células tienen forma redonda a oval y miden entre 2 y 20 µm (Rippon, 1988). Entre las especies más frecuentes causantes de infección se encuentra en primer lugar *C. albicans*, seguida de *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. krusei*, cuyo orden difiere de acuerdo a la localización de la infección y a los diversos autores. Estas especies son causantes de hasta el 97% de los casos de candidosis invasiva (Pemán, 2012).

Candida albicans

Candida albicans es una levadura unigemante oportunista, polimórfica, que frecuentemente causa enfermedad en el humano. Se presenta como parte de la biota mucocutánea, gastrointestinal y genitourinaria en el humano sano. *C. albicans* (junto con *C. dubliniensis*) es capaz de formar micelio *in vitro*. Cuando se encuentra como patógena en un hospedero, se presenta en forma de pseudohifas, de hifas y de levadura. Es Gram positiva. Microscópicamente las levaduras son globosas, ligeramente ovoides o francamente elongadas (4 – 6 hasta 6 a 10 µm) (Scully, 1994).

En medios como agar harina de maíz o agar harina de arroz es capaz de formar clamidoconidios terminales, de pared gruesa, considerados formas de resistencia, que miden de 8 a 12 μm .

La pared celular de *C. albicans* está formada por una capa interna de polisacáridos estructurales y una externa de manano y proteínas no glicosiladas; está compuesta por 80% de carbohidratos, y 19 % de proteínas, mientras que los lípidos solo están presentes en un 1%. Los polisacáridos que se encuentran en la pared son α -glucanos (1,3) y (1,6), quitina, y manano (unido covalentemente a proteínas.) El glucano unido covalentemente a la quitina se encuentra en las capas basales de la pared aportando estabilidad, mientras que las manano-proteínas se encuentran en las capas externas formando fimbrias. Los lípidos se encuentran formando parte del complejo fosfolipomanano (PLM), formado por oligomanósidos asociados a moléculas lipídicas. Las manoproteínas de la pared de *C. albicans* intervienen en la adhesión del hongo a la superficie de células epiteliales o endoteliales (Gozalbo, 2004).

En *C. albicans* existe una gran proporción de proteínas glicosiladas y estas suelen estar ligadas a manano; estas proteínas junto con los carbohidratos conforman el 90% de la masa molecular de la pared. Las cadenas de manano se encuentran formadas por 1 a 5 unidades y casi exclusivamente en unión (1,2) para estabilizar esta estructura. Las cadenas de manano unidas a N-acetilglucosamina ($\text{M}_8 \text{GlcNaC}_2$) definen la mayoría de los serotipos, del género *Candida* (Figura 1). Así, la pared celular es la estructura que se encuentra en contacto directo con las células del hospedero en consecuencia, la estructura fúngica para la cual se desencadenará una respuesta inmune (Netea, 2008)

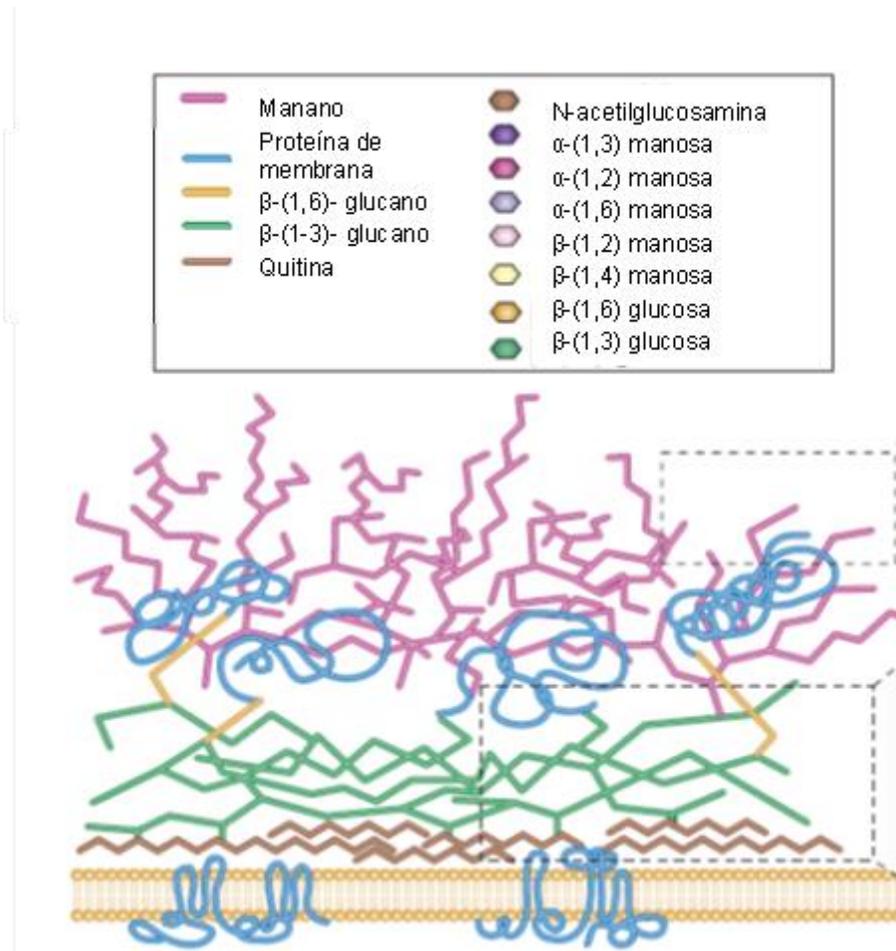


Figura 1. Componentes de pared de *C. albicans* (tomado de Netea 2010).

C. albicans posee diversos factores que han sido asociados a la virulencia de esta levadura; entre ellos se encuentran la presencia de adhesinas (moléculas protéicas que favorecen la adhesión de la levadura a las células epiteliales del hospedero), la secreción de enzimas (principalmente aspartil-proteasas secretadas (SAPs) y fosfolipasas (PLS) y el cambio fenotípico. El cambio fenotípico es una serie de modificaciones que sufre la levadura en diferentes condiciones incluyendo el microambiente del hospedero; puede ser desde el cambio en el aspecto de las colonias (lisas o rugosas), hasta el cambio en la célula, como es la formación de pseudo-hifas e hifas que están asociadas a la invasión de los tejidos. Otros factores de virulencia descritos en los últimos años son la capacidad de *C.*

albicans para formar bio-películas (estructuras formadas por una mezcla de levaduras y sustancias químicas producidas por ellas, además de células del hospedero; estas bio-películas hacen a las levaduras más resistentes a los antifúngicos y producen mayor cantidad de algunas SAPs) y el “quórum sensing” (sistema de señalización entre las células de levadura o entre levaduras y células del hospedero) (Lim, 2012). Todos estos factores actúan sobre las células del hospedero, lo que permite a la levadura defenderse de su microambiente hostil favoreciendo su supervivencia, dando como consecuencia la instalación y evolución de la infección.

Así, para integrar el diagnóstico de candidosis, es necesario contar con varios de los diversos procedimientos como son: frotis o impronta teñidos con Gram, estudio histopatológico del fragmento de tejido infectado, teñido con Hematoxilina-eosina, ácido peryódico de Shiff o Gomori-Grocott, hecho a partir de las lesiones superficiales exudativas o de líquidos corporales como líquido de lavado bronquio-alveolar, esputo, orina, líquido cefalorraquídeo o sangre; cultivo en agar dextrosa Sabouraud, y otros medios, de los especímenes previamente mencionados (Rippon, 1988).

Identificación de especies

Para determinar la especie es necesario realizar pruebas adicionales. A partir del cultivo, se aplican diferentes pruebas fenotípicas y bioquímicas como la formación de tubo germinativo en suero; prueba de termo tolerancia (crecimiento a 45°C), formación de clamidoconidios en agar harina de maíz o agar harina de arroz; también se utilizan medios cromogénos, como el CHROMagar Candida®, aunque con resultados limitados para *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. albicans* y *C. glabrata* junto con otras especies. Una prueba bioquímica definitiva es la asimilación de carbohidratos (auxanograma) que en la mayoría de casos es útil para la identificación de las especies. Actualmente existe un auxanograma automatizado, ampliamente utilizado en los hospitales (Vitek) que proporciona un resultado

en 24 horas. En los últimos años las herramientas moleculares han sido de gran utilidad para evitar el uso de las pruebas bioquímicas o morfológicas que son muy laboriosas. Entre las pruebas moleculares predomina el PCR (reacción en cadena de la polimerasa), secuenciación y el PCR en tiempo real. Un estudio adicional que ha adquirido importancia en los últimos años es la prueba de sensibilidad a antifúngicos, ya que algunos aislados de *C. glabrata* y *C. krusei* son portadores de resistencia a los antifúngicos azólicos (Dignani, 2003).

Candidosis

Candida es una levadura, que se encuentra como comensal en aproximadamente el 30% de la piel y mucosas del tracto gastrointestinal y genitourinario de la población humana sana. La población de levaduras en un individuo está controlada por el sistema inmune competente y por la microbiota con la que convive, especialmente bacterias, las cuales evitan su reproducción ilimitada. Sin embargo, en presencia de factores de oportunismo, se favorece el sobre-crecimiento de estas levaduras que a su vez inducen la infección. Los factores que favorecen una infección son diversos y pueden estar estrechamente ligados al hospedero (factores de oportunismo), a *Candida* spp (factores de virulencia), al microambiente en que interactúan, o a una combinación de ellos (Gozalbo 2004).

Entre los principales factores de oportunismo ligados al hospedero y que se asocian frecuentemente a la candidosis, están la neutropenia, linfopenia, desnutrición, edad prematura o avanzada, uso de esteroides o antibióticos por tiempo prolongado, embarazo, disfunción de órganos (insuficiencia hepática, respiratoria o renal), infección por virus inmunomoduladores (citomegalovirus, virus de hepatitis B o C, virus herpes zoster) o por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), tratamiento con inmunosupresores, radio- o quimio-terapia, enfermedades metabólicas como la diabetes mellitus, etc., (Pemán, 2012).

La candidosis puede afectar desde tejidos superficiales y, en consecuencia, causa cuadros clínicos no graves como la onicomicosis o los intertrigos, hasta condiciones que ponen en peligro la vida como la infección diseminada o candidosis invasiva, que afecta órganos vitales como el cerebro, pulmón o riñón (Pantinga, 2012). Los casos de infección por *Candida* han aumentado en los últimos años, asociados al incremento en los trasplantes o el uso de terapias más agresivas para diversas patologías como el cáncer, y la creciente pandemia del VIH. Así, se han reportado aproximadamente 17 especies diferentes de *Candida* causantes de candidosis invasiva; sin embargo, la especie más común responsable de este tipo de casos sigue siendo *C. albicans* (66%). (Lim, 2012, Pfaller MA, 2004). En México se ha observado una frecuencia de especies muy similar a la de otros países (Manzano, 2002).

El tratamiento de la candidosis depende de la localización y de la gravedad. En términos generales, es frecuente que se deba administrar un tratamiento preventivo en las personas que presentan algún factor de riesgo, pero que aún no desarrollan la candidosis. En estos casos está indicado el uso de antimicóticos como fluconazol.

Los pacientes que tienen diagnóstico de candidosis pero que están clínicamente estables, se recomienda fluconazol, y el tratamiento se continua hasta 2 semanas después del último hemocultivo positivo. Finalmente en los pacientes con diagnóstico de candidosis, pero clínicamente inestables, se suministra anfotericina B, sola o combinada con fluconazol, equinocandinas (caspofungina, micafungina, anidulafungina), voriconazol o fluconazol a altas dosis (800 mg/día), y el tratamiento debe continuarse hasta 14 días después del último hemocultivo positivo. (Bajwa, 2013).

Los índices de mortalidad están en gran parte relacionados con los factores de riesgo del paciente y, también difieren de acuerdo a la especie de *Candida* involucrada en la infección, particularmente en casos de septicemia. Así, en un estudio multicéntrico realizado en China se encontró que la mortalidad más elevada se presentaba en los

pacientes del servicio de hemato-oncología (66.7%) y en la unidad de cuidados intensivos cardiovasculares (57.1%) y la especie asociada a mayor número de muertes fue *C. tropicalis* (44.7%) (Ma, 2013).

La respuesta inmune

Los seres vivos están colonizados durante toda su vida por microorganismos; algunos de ellos son comensales, mientras que otros se comportan como patógenos cuando se asocian a factores de oportunismo. Para que todos estos microorganismos sean reconocidos como propios o extraños, los vertebrados y algunos invertebrados cuentan con mecanismos de vigilancia y de defensa que constituyen el sistema inmune, cuya finalidad es conferir protección o inmunidad contra sustancias y organismos dañinos (Murphy, 2012).

En los vertebrados, el sistema inmune está formado por los órganos linfoides primarios (médula ósea y el timo), los órganos linfoides secundarios (bazo, nódulos linfáticos, apéndice, adenoides, placas de Peyer, amígdalas) y diversos tipos de células inmunológicas distribuidas en todo el organismo (linfocitos, macrófagos, monocitos, células dendríticas, células NK) ayudadas por los neutrófilos, células cebadas, basófilos y eosinófilos, localizadas en la sangre y en otros tejidos (Murphy 2012). La activación de las células del sistema inmune se produce a través de la estimulación de ciertos receptores específicos, codificados genéticamente, que inducen la liberación de mediadores solubles (citocinas). Estas proteínas solubles les sirven para comunicarse, activarse o inhibirse, una vez que han cumplido con su función protectora.

La respuesta inmune de los vertebrados es el conjunto de mecanismos inducidos en las células para mantener: 1) al hospedero libre de patógenos y sustancias nocivas a ellos, y 2) en equilibrio la microbiota que los colonizan.

Para producir una respuesta inmune, todas las células deben de funcionar de manera jerárquica, ordenada y sincronizada. Esta respuesta normalmente funciona en estado basal;

sin embargo, en presencia de microorganismos y sustancias externas, su actividad se incrementa de manera significativa. Cuando funciona de manera fisiológica, la respuesta inmune mantiene la homeostasis corporal, la salud y la vida, pero cuando no es así, produce enfermedades autoinmunes.

En los vertebrados, si la piel y las mucosas son atravesadas por microorganismos como virus, hongos o bacterias, se activa una respuesta inmune que, en una primera etapa, produce una reacción inflamatoria en la que participan células con actividad fagocítica como los macrófagos, neutrófilos y células dendríticas, en el organismo infectado.

La respuesta inmune de los vertebrados puede ser innata o adaptativa. La respuesta innata es la primera en activarse, mientras que la respuesta adaptativa se desencadena posteriormente si la primera no fue capaz de eliminar a los agentes nocivos. Cada una de estas respuestas tiene sus propias funciones, aunque actúan de manera sincronizada para mantener la homeostasis del cuerpo y eliminar sustancias y microorganismos dañinos (Murphy, 2012). Las dos respuestas ofrecen protección, aunque en el caso de la respuesta innata es inmediata, sin generar memoria inmunológica, mientras que en el caso de la respuesta adaptativa, confiere protección inmediata y a largo plazo, porque genera células de memoria. La mayoría de los agentes infecciosos inducen una respuesta innata, que tiene como finalidad desencadenar una respuesta inflamatoria, que atrae al sitio de la infección a las células efectoras que los eliminan o restringen su diseminación en el cuerpo.

a) Respuesta inmune innata

La respuesta inmune está presente desde el nacimiento y permanece a lo largo de la vida de los individuos. Depende de una serie de mecanismos inespecíficos que distingue entre componentes del hospedero y los de una amplia clase de patógenos, para eliminarlos. Es la primera línea de defensa en los vertebrados que actúa rápida y eficazmente contra diferentes agentes infecciosos que han ingresado al organismo, ya que los reconoce y

elimina a la vez. Depende de la presencia, funcionamiento y activación de un cierto número de células, receptores de membrana y proteínas solubles, cuya expresión está determinada genéticamente. Además, los efectos que la respuesta inmune innata produce son rápidos y de corta duración (minutos a días), sin dejar memoria inmunológica en el organismo donde se activó.

En los vertebrados, los principales órganos en los que se lleva a cabo la respuesta inmune innata son la piel y las mucosas, donde diferentes mecanismos fisiológicos se ponen en marcha y en los que participan: macrófagos, células dendríticas, células epiteliales, células NK, neutrófilos y microorganismos comensales, receptores transmembranales, proteínas solubles como: lectinas tipo C, pentraxinas, péptidos antimicrobianos, proteínas del sistema complemento, elastasas, hidrolasas ácidas, lactoferrina y el aumento de la temperatura corporal es inducido por éstos y el hígado, durante una infección como mecanismo de defensa del sistema inmune innato.

Piel y mucosas

La piel y las mucosas de los tractos respiratorio, digestivo y genito-urinario son las barreras físicas externas de los mamíferos que los separan del mundo exterior y donde se encuentran los microorganismos. Junto con las bacterias comensales o microbiota constituyen la primera defensa que deben atravesar los patógenos para causar una infección.

La piel ,produce ácidos grasos que son bactericidas y fungistáticos, mientras que el epitelio de las mucosas, representa una barrera mecánica y produce diversas sustancias microbicidas inhibitoras del crecimiento o la colonización de los microorganismos tales como: el moco, que contiene glucoproteínas llamadas mucinas, que atrapan y evitan la adhesión de los patógenos. En el caso de las vías respiratorias, el epitelio además posee cilios que desplazan hacia afuera a los agentes patógenos atrapados en el moco. Por su

parte, la mucosa bucal, las lágrimas y las células de Paneth, en las criptas del intestino delgado, producen enzimas como la lisozima y la fosfolipasa A2 secretora, que rompen la pared celular de las bacterias. La mucosa gastrointestinal alta, produce un pH menor de 7 en el estómago, enzimas digestivas, sales biliares, liso-lípidos y ácidos grasos, con potente actividad antimicrobiana; la microbiota vaginal produce ácido láctico que es bactericida.

Así, la supervivencia de la microbiota en los mamíferos ,está regulada por el balance que existe entre su eliminación y su permanencia, por la respuesta inmune innata y por la respuesta inmune adaptativa. La microbiota también estimula a las células del epitelio para que produzcan péptidos antimicrobianos.

Pentraxinas

Las pentraxinas son una familia de proteínas que tienen una estructura formada por 5 unidades idénticas. Las más conocidas e importantes son las proteínas de fase aguda (proteína C reactiva, fibrinógeno, lectina de unión a manosa, proteína amiloide sérica y los surfactantes A y D) que se producen en el hígado, por inducción de la IL-1, TNF- α e IL-6 liberadas por los macrófagos, durante la respuesta inflamatoria. Las proteínas de fase aguda se liberan a la sangre, donde reconocen los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) como la fosfocolina de diferentes bacterias y lipopolisacáridos de la pared celular de hongos, opsonizándolos y activando al sistema complemento. Las más importantes de estas proteínas son la proteína C reactiva y la proteína de unión a manosa, que reconoce este carbohidrato en las bacterias.

Péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos, son una de las formas más antiguas de defensa contra los microorganismos, ya que estos péptidos catiónicos pequeños forman un poro que rompe la membrana de bacterias, hongos y algunos virus. Se producen de forma inactiva y deben de

romperse proteolíticamente para generar el péptido catiónico con la estructura anfipática que daña la membrana de los microorganismos. Estas familias de péptidos son producidas y secretadas por diversos seres vivos, tales como peces, insectos, plantas, anfibios y mamíferos. Las cathelicidinas, histatinas y defensinas son los péptidos antimicrobianos más importantes en los mamíferos, producidos por las células epiteliales de las mucosas y los fagocitos (en los tejidos).

Lectinas tipo C

Las lectinas tipo C son otro elemento bactericida de la respuesta inmune innata. Estas proteínas que se unen principalmente a microorganismos Gram (+) poseen un dominio de unión a carbohidratos que requiere calcio. Las células de Paneth secretan las lectinas tipo C en forma inactiva y su activación se lleva a cabo por proteasas, utilizando un mecanismo parecido al del sistema complemento.

El sistema complemento

El sistema complemento es otro de los mecanismos de la inmunidad innata que, en los vertebrados, ayuda a eliminar, de manera inespecífica, a los patógenos que los han infectado. Está compuesto por al menos 35 proteínas solubles, 9 de las cuales, llamadas C1 a C9; se encuentran en forma inactiva y su activación se produce de forma secuencial y ordenada por enzimas para lisar a las bacterias. Las proteínas del C' se producen en el hígado y se activan de manera fisiológica a bajos niveles; sólo aumentan considerablemente su producción y función por la presencia actual (vía alterna y vía de las lectinas) o anterior de los patógenos (vía clásica).

La activación del sistema del complemento produce la lisis de algunas de sus proteínas para formar enzimas, fragmentos pequeños solubles de ellas (con diferentes y potentes actividades biológicas) y una estructura en forma de poro (complejo de ataque a la

membrana, MAC), con actividad lítica sobre los microorganismos. Así, las proteínas del sistema C' al unirse a los microorganismos, facilitan su eliminación inespecífica a través de: i) formación de poros sobre su membrana, ii) opsonización, al unirse a las proteínas del sistema o a los anticuerpos producidos durante la respuesta inmune previa y iii) activación de la respuesta inflamatoria, mediada por los fragmentos solubles pequeños.

Los fagocitos

Los monocitos, macrófagos, células dendríticas y granulocitos como los neutrófilos, son los fagocitos profesionales del sistema inmune innato; constituyen un mecanismo de defensa muy antiguo, ya que se encuentran en vertebrados e invertebrados. Los fagocitos se originan en la médula ósea y pasan a la sangre, donde permanecen los neutrófilos y monocitos, mientras que los macrófagos y células dendríticas se distribuyen en el tejido conectivo de todo el organismo, por debajo de los epitelios. La función principal de los fagocitos es reconocer a los microorganismos –que han cruzado las barreras epiteliales y se han reproducido– para ingerirlos, digerirlos y eliminarlos. Otra función importante que desempeñan, es la inducción de la siguiente fase de la respuesta inmune innata (la respuesta inflamatoria) mediante la producción y liberación de citocinas al medio. (Inmunología básica y clínica 2003)

Para llevar a cabo estas funciones, los fagocitos utilizan diferentes tipos de receptores y moléculas solubles para reconocer los PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos) de los agentes infecciosos, activarse y eliminarlos. Los receptores que utilizan para reconocer a los patógenos son: a) receptores del complemento (CRs) que promueven la fagocitosis de los microorganismos y ayudan a las células B a producir anticuerpos específicos para el patógeno . b) Receptores parecidos a lectina tipo C (receptor de manosa, que reconoce ligandos manosilados presentes en bacterias, hongos y virus, o receptores de dectina-1 y 2, que reconocen los glucanos unidos β 1-3, presentes en hongos. c) Receptores

de señalización, que incluyen receptores quimiotácticos, que conducen a los fagocitos a los sitios donde hay infección, y d) Receptores (TLR, NLR, GLH) que inducen la producción de moléculas efectoras (citocinas), promotoras de la respuesta inmune innata inducida (respuesta inflamatoria). De todos ellos, sólo los TLRs serán tratados en esta tesis.

Además de estos receptores, los fagocitos cuentan con los receptores basurero (scavengers, que reconocen polímeros aniónicos y lipoproteínas acetiladas de baja densidad), el receptor formil-metionina-leucina-fenilalanina (fMLP) que reconoce la N-formil-metionina de las bacterias; este receptor también promueve la quimiotaxis de los fagocitos y que ellos produzcan potentes sustancias que matan a los patógenos como el anión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo ($\cdot OH$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) de las especies reactivas de oxígeno (ROS), el óxido nítrico (NO), y los radicales hipoclorito ($\cdot OCl$) e hipobromito ($\cdot OBr$) (Kuby 2007)

Cuando los microorganismos atraviesan los epitelios, pueden ser fagocitados por endocitosis mediada por receptores o macropinocitosis. Si se encuentran con las proteínas del sistema complemento, éstas se les adhieren y los marcan para que sean rápidamente reconocidos por los fagocitos. Al reconocer la marca sobre los microorganismos (especialmente C3b) los fagocitos los ingieren, digieren y eliminan. Si no tienen marcaje los agentes infecciosos, entonces son reconocidos por los receptores TLR, NLR y GLH que, al activarse, amplifican la línea de defensa. En el caso de que los agentes infecciosos no sean eliminados, los fagocitos presentan sus antígenos a los linfocitos T e inician la respuesta inmune adaptativa.

Receptores tipo Toll (TLRs)

El reconocimiento de los patógenos por los fagocitos del sistema inmune se da principalmente por medio de receptores membranales que se encuentran codificados en la línea germinal. Estos receptores reconocen diversas moléculas comunes que expresan los

microorganismos, conocidas como PAMPs; a los receptores que reconocen estos PAMPs se les denomina receptores de reconocimiento de patrones (PRRs). Los PRRs se encuentran en organismos tan diversos como las plantas, los insectos y vertebrados, por lo que son un sistema de defensa evolutivamente antiguo. En los mamíferos, se expresan de forma constitutiva principalmente en macrófagos, células dendríticas, ciertas células epiteliales y linfocitos B, ya sea sobre la membrana plasmática o dentro de los endosomas (citósolicos). Estos receptores perciben el medio y mantienen la homeostasis entre comensales, patógenos y hospedero, induciendo la respuesta inmune innata, y de ser necesario, también la respuesta inmune adaptativa, ante la presencia de microorganismos patógenos (Iwasaki 2010). Los PRRs conocidos como receptores tipo Toll (TLRs), receptores parecidos a NOD (NLRs) y helicinas parecidas a RIG-I (GLHs) forman parte del sistema inmune innato de los mamíferos; unos son membranales y otros son citoplásmicos.

Esta serie de receptores al ser activados, inducen la síntesis de varios tipos de moléculas con diversas actividades biológicas, entre ellos interferones, quimiocinas y citocinas; promueven la fagocitosis, la maduración de células dendríticas y macrófagos, preparándolos para la interacción con los linfocitos T, uno de los primeros pasos de la respuesta inmune adaptativa. La respuesta inmune innata y la adaptativa actúan en el mismo plano temporal, logrando una respuesta eficaz (Janeway, 2006).

El nombre Toll corresponde a una proteína producida por un gen identificado inicialmente en embriones de *Drosophila melanogaster*, que controla el desarrollo del polo “dorso-ventral” durante el desarrollo embrionario de la mosca. Después se observó que, en la mosca adulta, la proteína Toll participa en la producción de péptidos antimicrobianos que, detectan y eliminan agentes bacterianos y fúngicos en el insecto (Lemaitre, 1996). Una serie de receptores encontrados en vertebrados e invertebrados, muestra similitud con la proteína Toll, por lo que se les ha llamado receptores tipo Toll (TLRs). Funcionan en forma de homo y hetero-dímeros, y forman parte de una familia de proteínas que tienen una

función importante en la respuesta inmune innata y, posteriormente, en la respuesta inmune adaptativa. Hasta ahora se han identificado 10 TLRs en humanos y 13 en el ratón. Cada uno de los TLRs existentes reconocen diferentes PAMPs de virus, bacterias y hongos, como se muestra en la Tabla 1.

<u>TLR</u>	<u>PAMP</u>	<u>Patógeno</u>
TLR-4	LPS	Bacterias Gram -
TLR-6/TLR-2	Diacilpolipéptidos	<i>Mycoplasma sp</i>
TLR-1/TLR-2	Triacillipopéptidos	Bacterias
TLR-6/TLR-2	Ácido lipoteicoico	<i>Streptococcus. Sp</i>
	LTA	
TLR-2	Péptidoglicanos	Bacterias gram
	PG	positivas
TLR-2	Porinas	<i>Neisseria sp</i>
TLR-2	Lipoarabinomanano	Micobacterias
TLR-5	Flagelina	Bacterias
TLR-9	DNA rico en CpG	Bacterias y virus del herpes
TLR-6/TLR-2	Zimosan	Levaduras
TLR-2	Fosfolipomanano	<i>C. albicans</i>
TLR-4	Manano	<i>C. albicans</i>
TLR-2/TLR-4	Glucuronoxilomanano	<i>Cryptococcus neoformans</i>
TLR-2	Tgpi-mutin	<i>Trypanosoma sp.</i>
TLR-4	Glicoinositolfosfolipido	<i>Trypanosoma sp</i>
TLR-9	Hemozoína	<i>Plasmodium sp</i>
TLR-11	Molécula tipo profilina	<i>T. gondii</i>
TLR-9	DNA	Virus
TLR-3	RNA de cadena doble	Virus
TLR-7/TLR-8	RNA de cadena simple	Virus
TLR-4	Hsp (60, 70)	Hopederio
TLR-4	Fibrinógenos	Hospederio

Tabla 1. Moléculas reconocidas por los diferentes TLRs (Iwasaki 2004)

Los TLRs son proteínas transmembranales, cuya región externa posee de 18 a 25 copias de una repetición rica en leucinas (LRR), formando una estructura con forma de herradura que, ya sea por la parte interna o externa, reconoce moléculas específicas de los patógenos. La región citoplásmica del receptor contiene un dominio llamado TIR (receptor Toll/interleucina-1), que se encarga de activar la vía de señalización del factor nuclear potenciador de la fracción B de kappa (NFκB), productora de citocinas pro-inflamatorias. Figura 2.

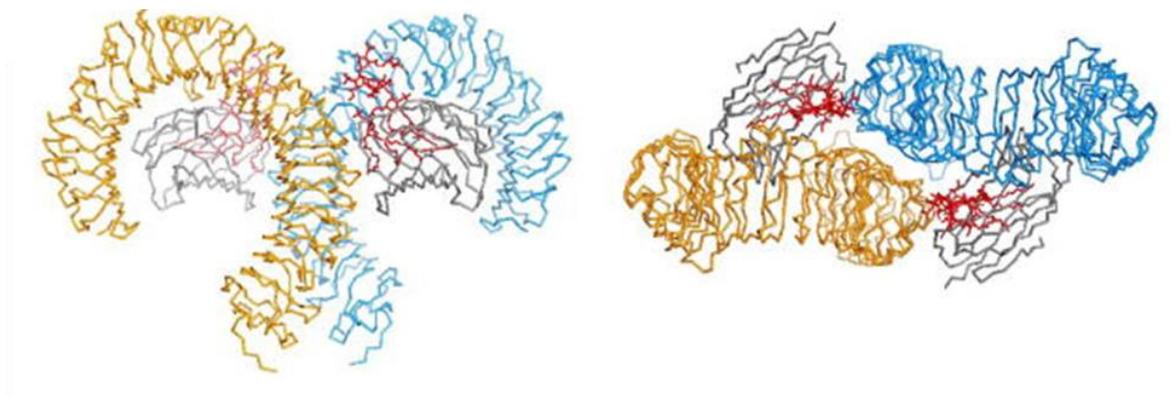


Figura 2. Estructura dimérica en color azul y amarillo (hetero-dímero) de TLR-4 y su cambio conformacional en presencia de su ligando mostrado en rojo (Lipopolisacárido).

Imagen tomada de (Sukhithasri 2013).

Una vez unido el receptor TLR al patógeno, se dimeriza y, en su región citoplásmica, se produce un cambio conformacional, que hace que se únan los dominios TIR de ambos receptores, se activen proteínas acopladoras como MyD88 y se inicie la vía de señalización que estimula la respuesta inflamatoria, con producción de citocinas que participan en la maduración de leucocitos, macrófagos y células dendríticas. Figura 3.

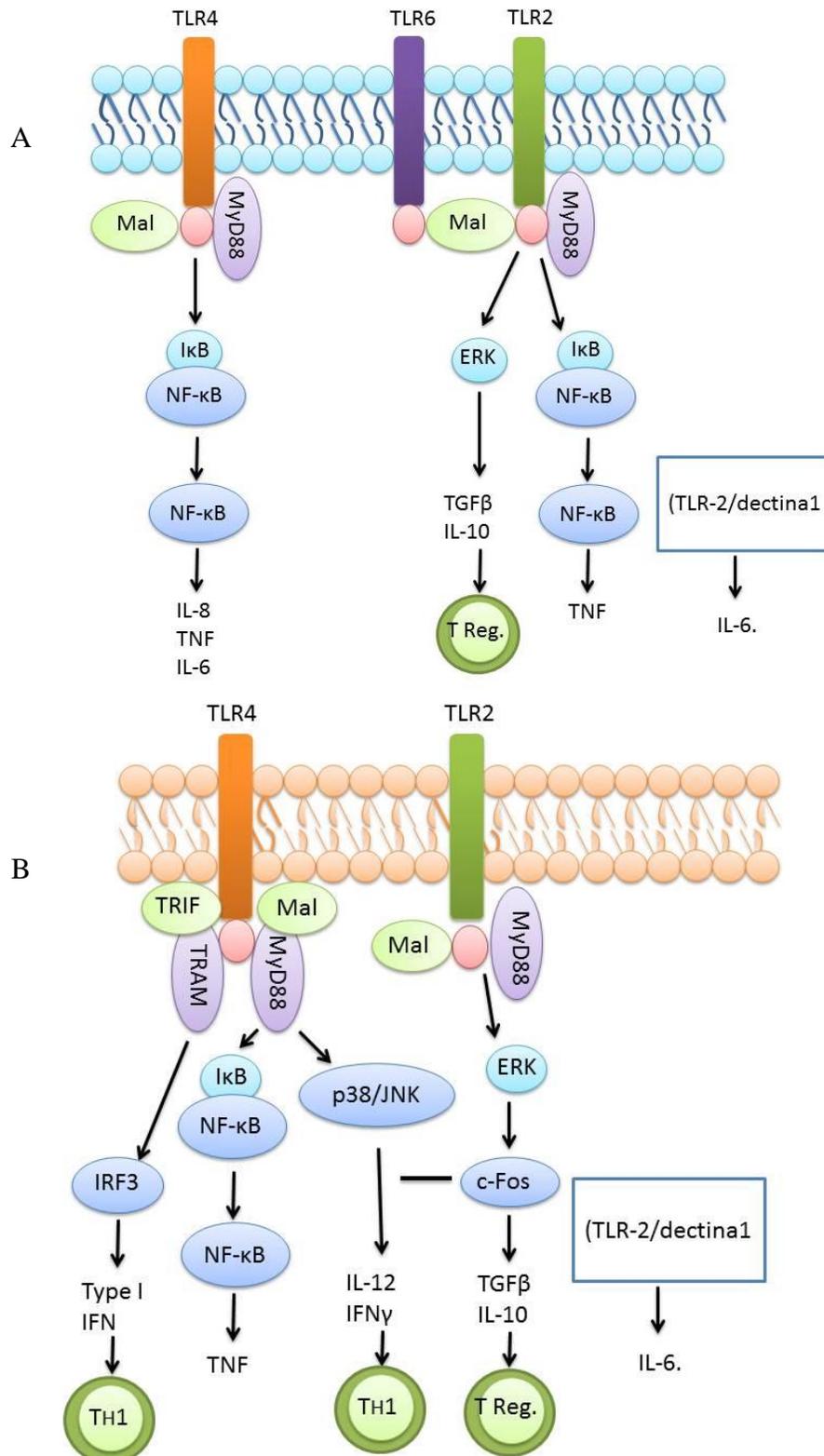


Figura 3. Cascada de señalización de TLRs. **A:** Membrana de células dendríticas. **B:** Membrana de monocitos (Modificado de Netea 2010).

TLR-2

Este receptor de membrana, se asocia al reconocimiento de varios ligandos, incluyendo el ácido lipoteicoico de las bacterias Gram positivas y, de lipopéptidos o diacil- y triacil-lipoproteínas propias de las bacterias Gram negativas; este receptor forma homodímeros o heterodímeros con los receptores TLR-1 y TLR-6. Además reconoce el zimosan presente en los hongos. Se expresa en macrófagos, células dendríticas, basófilos, células cebadas y eosinófilos.

La activación de este receptor desencadena una cascada de señalización que conlleva a la maduración de las células dendríticas, producción de citocinas proinflamatorias, factores de crecimiento, y expresión de quimiocinas. Cuando reconoce ácidos grasos de cadena larga y β -glucanos de la pared celular, requiere de TLR-6 y de los co-receptores CD36 (que reconocen los ácidos grasos de cadena larga) y Dectina-1 (que reconoce los β -glucanos).

TLR-4

Este receptor de membrana, junto con los correceptores CD14 y MD-2 reconoce a los LPS, característicos de bacterias Gram negativas. TLR-4 se une indirectamente a los LPS bacterianos, a través de CD-2. Responde de igual manera a factores de estrés; reconoce miembros de la familia de las proteínas de choque térmico (HSP) y, en menor medida que TLR-2, reconoce componentes fúngicos. Se expresa en las células dendríticas y los macrófagos, donde induce la secreción de TNF- α ; también lo poseen las células cebadas y eosinófilos. (Caso, 2008)

Inflamación

La inflamación es una respuesta inmediata al daño de tejidos y células. Es una respuesta inespecífica, primordialmente vascular y celular, caracterizada por edema, calor, dolor y enrojecimiento en el lugar donde se produjo el daño tisular, causado por estímulos químicos, físicos o biológicos. En ella se activan células dendríticas, macrófagos, neutrófilos y células epiteliales, que tienen como finalidad liberar proteínas solubles y citocinas, con las que atraen a más células defensivas, para limitar el daño tisular, eliminar los agentes dañinos y reparar del tejido afectado. Este daño puede deberse a la acción de las células del sistema inmune, ya sea de la respuesta innata o adaptativa.

La respuesta inflamatoria puede ser de 2 tipos: pro y anti-inflamatoria. En la respuesta pro-inflamatoria, las células dendríticas, las células NK y los macrófagos, se activan para producir citocinas pro-inflamatorias (INF- γ , IL-12, IL-2, IL-6), que son necesarias para eliminar o limitar al patógeno. Una vez que éste ha sido eliminado o controlado, los macrófagos y linfocitos comienzan a producir las citocinas anti-inflamatorias IL-4, IL-5 e IL-10 para limitar el daño tisular producido durante la infección y ayudar a su reparación (Murphy, 2012).

Un proceso inflamatorio induce el aumento de permeabilidad tisular, por medio de la producción de histamina, lo cual permite la infiltración de leucocitos en la zona dañada; se caracteriza por un aumento de irrigación sanguínea en la zona afectada, y por lo tanto, un aumento en la temperatura, debido a la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos. Una vez que han actuado estos componentes, inicia la reparación del daño producido en el tejido, a todo el proceso se le conoce como inflamación aguda.

La inflamación crónica es un proceso prolongado y desregulado; casi siempre es precedido por la inflamación aguda y conduce a un daño en el tejido y a su reparación tardía, la cual genera fibrosis, e incluso puede llevar a la pérdida de función del tejido. La acción de endocitosis de los fagocitos que participan en un proceso inflamatorio, aumenta

la liberación de especies reactivas de oxígeno, el aumento en la permeabilidad tisular, permite que fracciones del antígeno sigan desencadenado una respuesta, y estos factores generan daño celular.

Citocinas

Las citocinas son proteínas pequeñas con un peso molecular de 8000 a 40 000 Daltons; son sintetizadas y secretadas por todas las células nucleadas, las cuales a su vez, tienen la capacidad de responder al estímulo que producen dichas citocinas. Además de las células propias del sistema inmune, se ha visto que otros tipos celulares producen citocinas; es el caso de los fibroblastos, los queratinocitos, las células epiteliales, las células endoteliales, las células del estroma de la médula ósea y los astrocitos. Las citocinas son mediadores solubles de la respuesta inmune que sirven de mensajeros entre las diversas células del sistema, desarrollando múltiples actividades biológicas. Se clasifican en familias, de acuerdo a su principal actividad biológica. Existe la familia de los factores estimulantes de colonias, la familia de los interferones, la familia de las interleucinas, la familia de las quimiocinas y la familia del factor de necrosis tumoral.

Las citocinas se expresan de forma constitutiva en cantidades pequeñas y aumentan su expresión, sólo en respuesta a estímulos específicos, tales como, otras citocinas, factores de estrés como son la luz ultravioleta, el choque térmico, los lipopolisacáridos bacterianos, CpG y la presencia de patógenos. Estas condiciones activan a los receptores TLRs que desencadenan la ruta de señalización mediada por las proteínas cinasas activadas por mitógeno, las cuales fosforilan factores de transcripción, que permiten la expresión de ciertos genes, que codifican para la síntesis de citocinas.

Se han descrito alrededor de 37 citocinas con el nombre interleucina seguido de un número; otras citocinas como el Factor de Necrosis Tumoral (TNF) han mantenido su nombre de acuerdo a su actividad biológica.

Las citocinas desarrollan diferentes funciones; algunas promueven la inflamación, por lo que son llamadas citocinas pro-inflamatorias; otras son llamadas anti-inflamatorias porque suprimen la actividad de las citocinas pro-inflamatorias. Así, citocinas como IL-4, IL-10, e IL-13, estimulan la síntesis de linfocitos B y, son anti-inflamatorias, porque suprimen la expresión de INF- γ , IL-2, IL-1 y TNF- α

Las citocinas, no son específicas y actúan según el proceso biológico en que se vean implicadas. Una sola citocina puede ser multifuncional, y de igual manera, citocinas distintas pueden tener la misma función biológica.

Un claro ejemplo de la multifuncionalidad de las citocinas, son IL-1 e IL-6; estas citocinas son producidas principalmente por monocitos, macrófagos y células dendríticas. IL-6 se identificó originalmente como proveniente de linfocitos T, e induce la producción de anticuerpos en las células B. Las citocinas con efectos similares suelen ser potenciadoras entre sí; IL-1 y TNF- α actúan como inductores de IL-6, que a su vez, induce la expresión de TNF- α (Kerr 2001).

Interleucina-6

La interleucina 6 (IL-6) es una glicoproteína pleiotrópica de alrededor de 26 kDa de peso. Tiene acción pro-inflamatoria, promueve la diferenciación de neutrófilos y, en algunos tumores, puede actuar como atenuante de crecimiento. Entre los tipos celulares que responden a IL-6, se encuentran las células T y B, las células neurales, células cardíacas y los hepatocitos.

Se conocen varias iso-formas de IL-6, y todas ellas son biológicamente activas. Se han secuenciado y clonado genes para IL-6 en ratón, rata y seres humanos. En ratones y ratas, la IL-6 posee 211 aminoácidos y, su secuencia de nucleótidos es 93% homóloga a la de seres humanos, aunque a nivel de aminoácidos, la homología es de solo 42%. Se ha

demostrado que la IL-6 proveniente de seres humanos es capaz de estimular células de ratón; sin embargo la IL-6 de ratón no es funcional en células humanas.

Las células que producen IL-6 bajo diversos estímulos incluyen células T y B, monocitos, macrófagos, fibroblastos, y células vasculares endoteliales.

La IL-6 es reconocida por su propio receptor, que consiste de cadenas peptídicas (IL-6R y gp130). Es necesaria para inducir la secreción de inmunoglobulinas, participa en la hematopoyesis, promueve la diferenciación de megacariocitos, la síntesis de proteínas de fase aguda, la diferenciación de neutrófilos, macrófagos y la producción de osteoblastos. En la fase aguda de la respuesta inflamatoria, los macrófagos producen IL-6, IL-1 y TNF- α que promueven la secreción de diversas proteínas hepáticas como la proteína C reactiva, lectina de unión a manosa, SP-A, SP-D y proteína sérica amiloide, albúmina, fibrinógeno. IL-6 induce la síntesis de glucocorticoides, los cuales regulan negativamente la síntesis de IL-6 (Heinrich, 2003).

Las señales producidas por los TLRs pueden inducir la producción de IL-6, que a su vez, promueve la diferenciación de los linfocitos Th17 y la producción de IL-12, que genera una respuesta tipo Th1, con producción de INF- γ e IL-2. Esto, ha sido demostrado in vivo administrando agonistas de TLR-9 y TLR-2. TLR-4 responde a LPS, el cual es uno de los compuestos comúnmente utilizados para estimular la producción de IL-6.

b) Respuesta inmune adaptativa

Este tipo de respuesta es específica y, sólo se desencadena, si el agente infeccioso no ha sido eliminado, por lo que constituye una segunda línea de defensa. Requiere de más tiempo de activación para manifestar sus efectos (más de 2 semanas) y, generar una memoria inmunológica. Su reactivación produce una respuesta más rápida y eficiente que en una primera activación.

La respuesta inmune adaptativa, es una compleja red de interacciones entre los fagocitos de la inmunidad innata, y los linfocitos T o B. Cada uno libera mediadores solubles (citocinas) necesarios para la activación, desarrollo y control de dicha respuesta, cuya finalidad es producir células T efectoras (inmunidad celular) o anticuerpos (inmunidad humoral).

Para generar una respuesta inmune adaptativa, es necesaria la interacción del agente infeccioso con el sistema inmune del hospedero (reto inmunológico), en la que las células dendríticas y los macrófagos (de la inmunidad innata) ingieren a los agentes infecciosos, y los digieren. Una fracción de sus antígenos conocida como determinante antigénico unida a las moléculas clase I o clase II, del complejo mayor de histocompatibilidad, es portada sobre su membrana y presentada a los linfocitos Th vírgenes para ser reconocida.

Al interactuar los linfocitos T vírgenes con los determinantes antigénicos de los agentes infecciosos, se activan, proliferan y diferencian en linfocitos Th1 o Th2 con funciones efectoras específicas. Los linfocitos Th1 producen principalmente las citocinas INF- γ , IL-12, IL-2, e IL-6, necesarias para activar a otros linfocitos vírgenes, macrófagos, células dendríticas, linfocitos T citotóxicos o las células NK (natural killer), para que eliminen a las células que han sido infectadas por los microorganismos. Por su parte, los linfocitos Th2, producen principalmente IL-4 e IL-5, que son necesarias para que los linfocitos B se conviertan en células plasmáticas y produzcan los anticuerpos específicos para el agente infeccioso que los indujo.

Por otro lado, los linfocitos B pueden ser ayudados o no, por las células presentadoras de antígeno para activarse y diferenciarse en células plasmáticas, productoras de anticuerpos específicos. Los linfocitos B, con la ayuda de las IL-4 e IL-5, se pueden diferenciar a células plasmáticas productoras de anticuerpos, que neutralizan, inmovilizan o ayudan a eliminar a los agentes infecciosos o sus toxinas, ya sea por fagocitosis o por la

activación del sistema complemento. Algunas de las células plasmáticas, permanecen en el cuerpo como células de memoria.

En resumen, la función principal de la respuesta inmune adquirida es producir y activar a: 1) otros linfocitos T efectores, que eliminan a los patógenos al inducir la apoptosis de las células infectadas; 2) los linfocitos B, para que produzcan y liberen anticuerpos, que promueven la fagocitosis de los patógenos, en ambos casos; algunas de estas células efectoras quedarán como células de memoria.

Corticoesteroides

Los corticoesteroides son un grupo de compuestos hormonales sintetizados a partir del colesterol, producidos por la corteza suprarrenal y el hígado de los vertebrados. Existen dos grupos químicos, los mineralocorticoides, que se encargan de regular la concentración de los minerales corporales, y los glucocorticoides, que intervienen en la gluconeogénesis y el metabolismo de las proteínas, movilización de ácidos grasos y aumento de la contracción muscular. Los glucocorticoesteroides, se emplean principalmente como anti-inflamatorios, anti-alérgicos, anti-neoplásicos e inmunosupresores. Los corticoesteroides interactúan con receptores citoplásmicos específicos, para regular la expresión génica, mantener la homeostasis de los minerales, como el sodio y potasio, y mantener los niveles de glucosa. Los receptores de estas moléculas son miembros de la súper-familia de receptores nucleares para hormonas esteroideas, hormonas tiroideas, vitamina D y retinoides. Estas familias comparten dos dominios, uno de ellos denominado dedos de zinc, que interactúa directamente con fragmentos de DNA y el otro que reconoce al ligando.

Los corticoesteroides, actúan sobre receptores específicos citoplasmáticos, los cuales, en su forma inactiva, se encuentran unidos a la HSP-90, HSP-70 y a la inmunofilina. La unión receptor-corticoesteroide induce un cambio conformacional en el receptor que separa a la HSP-90 y le permite traslocarse al núcleo; el complejo receptor-

corticoesteroide se une a genes específicos y actúa como factor de transcripción. Este factor de transcripción, activa genes que codifican para el receptor $I\kappa B\alpha$, que mantiene inerte a $NF\kappa B$. Esta inactivación del $NF\kappa B$, inhibe la producción de las citocinas IL-1 e IL-12, responsable de su inmunosupresión. Otra causa de la actividad inmunosupresora de los glucocorticoides, se basa en su capacidad para inducir apoptosis en los linfocitos T.

La dexametasona, es un glucocorticoide sintético cuyo nombre químico es 9-fluoro-11 β , 17, 21-trihidroxi-16 α -metilpregna-1,4-dieno-3,20-diona. Desde 1958 (Walton,1958) se produce de forma sintética para uso terapéutico, con la finalidad de atenuar el proceso inflamatorio; se absorbe por varias vías (subcutánea, oral, e intravenosa) y, se elimina por vía renal; su vida media es de 190 h en plasma y, es reconocida por receptores específicos para corticoesteroides.

La respuesta inmune frente a *Candida albicans*

La estructura de la pared celular de *Candida* está formada por quitina, β -glucano, y mano-proteínas. La estructura polisacáridica de la pared celular de *C. albicans*, es reconocida por dos clases de PRRs unidos a membranas: los receptores tipo Toll (TLRs) y los receptores de lectina tipo C (CLRs). Los primeros PRRs descubiertos, que reconocen a *C. albicans*, fueron TLR-2 que reconoce a los fosfolipomananos, mientras que TLR-4 reconoce a los mananos unidos al oxígeno (Netea 2006). En contraste, otros TLRs como TLR-1 y TLR-6, juegan un papel secundario y no parecen ser esenciales para la defensa antifúngica durante la candidosis. Los β -glucanos, son reconocidos por Dectina-1; el manano unido en posición N es reconocido por el receptor de manano propio de macrófagos (MMR) (Netea 2006); Dectina-2 reconoce α - mananos y las estructuras formadas por manosas. Otro receptor importante para el reconocimiento de *C. albicans* es, el DC-SIGN (receptor de células dendríticas), que reconoce el manano. La galectina-3

reconoce los β - manósidos de *C. albicans*. La lectina de unión a manosa (MLB), media la opsonización y captación de *Candida* por medio de la unión a manano y al receptor C1q de la superficie del fagocito. Además del reconocimiento de los PAMPs fúngicos por los receptores de membrana, se ha demostrado que varios PRRs reconocen intracelularmente a *C. albicans*. Se sabe que TLR-9 reconoce el ADN de *C. albicans* e induce la producción de citocinas en células dendríticas (Van de Veerdonk, 2008).

Además de los PRRs, se ha propuesto que los receptores de reconocimiento de daño, activan la respuesta inmune del hospedero, reconociendo señales endógenas de peligro. Los receptores activados por proteasas (PAR), receptores acoplados a proteína G, son receptores sensores de daño, los cuales son activados por proteasas del hospedero como son elastasa y catepsina G de los neutrófilos o, por proteasas secretadas por *C. albicans*.

Diferentes estirpes celulares intervienen en la defensa ante *C.albicans*; el epitelio de las mucosas es la primera línea de defensa contra las especies de *Candida*. Estudios recientes han ampliado el conocimiento sobre el papel activo de las células epiteliales en desencadenar la respuesta inmune. Las células epiteliales expresan la mayoría de los TLRs con excepción de TLR-5 y TLR-7, para reconocer a los microorganismos invasores. Después del reconocimiento de las especies invasoras de *Candida*, las células epiteliales secretan péptidos antimicrobianos como las β -defensinas y la catelicidina (LL-37), para eliminar o controlar directamente la infección fúngica (Li M, 2011).

Además, las células epiteliales de boca y vagina pueden inhibir el crecimiento de *Candida* de una forma contacto-dependiente. Aunque las citocinas pro-inflamatorias producidas por las células epiteliales no tienen efectos antifúngicos directos (Lilly, 2006), sirven como señales para que las células inflamatorias de la mucosa estimulen su función antifúngica.

La citocinas producidas por las células inmunes, también juegan un papel importante en la inmunidad epitelial contra *Candida*. Se ha demostrado que IL-22, citocina

clave producida por el subgrupo de linfocitos Th-22, sinérgicamente induce la producción de hBD2, S100A7, CXCL-10, junto con TNF- α en los queratinocitos. La combinación de IL-22 y TNF- α , aumentan el efecto protector de la integridad epidérmica contra la infección por *C. albicans* (Eyerich 2011).

Se considera que los fagocitos son el tipo celular más efectivo para controlar y eliminar la infección por *Candida*. Entre los fagocitos, los polimorfonucleares (PMNs) juegan un papel crítico en la defensa del hospedero contra la candidosis de mucosas y diseminada. Varias citocinas pro-inflamatorias, como IL-6, IL-8 y TNF- α son responsables del reclutamiento de polimorfonucleares en el sitio de infección. Recientemente se demostró que IL-17 es crucial para estimular la granulopoesis y el reclutamiento de neutrófilos en el sitio de infección (Schwarzenberg, 1998). La respuesta Th-17 (IL-17 y receptor IL-17) ,es protectora en la respuesta antifúngica de mucosas en humanos. Además de eliminar directamente a *C. albicans*, se ha demostrado que los PMNs, son el único tipo celular sanguíneo, que puede inhibir la formación del tubo germinativo de esta levadura. Los neutrófilos, inhiben el crecimiento de *C. albicans*, liberando trampas extracelulares de neutrófilos (NEDs), que contienen el péptido antifúngico calprotectina. El papel de los monocitos y macrófagos, en la candidosis diseminada no está bien definido.

Como células profesionales presentadoras de antígeno, las células dendríticas (DCs) residen y vigilan la superficie de la piel y las mucosas, y fagocitan a *Candida* cuando los tejidos son invadidos. Las levaduras de *Candida*, son internalizadas por las DCs vía MR y DC-SIGN, conduciendo al procesamiento y presentación de antígenos específicos, vía moléculas de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Las DCs discriminan entre la fase levaduriforme e hifal, e inducen la diferenciación de células T cooperadoras. La fagocitosis de levaduras genera una respuesta del tipo Th1, mientras que la fagocitosis de hifas favorece la respuesta tipo Th2. Por lo tanto, las células dendríticas

representan un puente entre la respuesta antifúngica innata y adaptativa, reconociendo las diferentes morfologías de *Candida* (d' Ostiani, 2000).

Varios factores sanguíneos solubles contribuyen a la inmunidad del hospedero contra *Candida*. El sistema complemento puede activarse a través de la vía clásica, la vía alterna o la vía de la lectina. Las tres vías pueden ser activadas por *Candida*. Las células opsonizadas de *Candida* pueden ser mejor ingeridas por los fagocitos, a través de la interacción entre CR3 y C3b, cuyo complejo se deposita en la superficie de *Candida* o, entre el receptor Fc y el anticuerpo anti-*Candida*. En contraste, la gruesa pared celular fúngica, evita los mecanismos de eliminación mediados por el complejo de ataque a la membrana.

Además del papel mediado por la fagocitosis, se ha identificado un papel crucial de la anafilatoxina C5a, que aumenta la producción de IL-6 e IL-1 β en los monocitos de sangre periférica (PBMCs) (Cheng, 2012).

ANTECEDENTES

Hay evidencias experimentales que muestran la participación de la DXM en la inhibición de la respuesta inmune, favoreciendo la candidosis sistémica experimental murina. Herzyk et al (1997), evaluaron la evolución clínica y de laboratorio de la candidosis murina, al inmunosuprimir ratones con DXM (50/mg/kg de peso) vía intra-peritoneal dos días antes y dos días después de la infección con *C. albicans* (-2 i +2). Los ratones fueron sacrificados a los 6 días post-infección para su estudio. Los autores determinaron que la DXM al inmunosuprimir a los ratones, era un esteroide ideal para propiciar la infección con *C. albicans*.

Por otro lado, Wells et al (2007) evaluaron diversos factores de riesgo (hipoxia traumatismo posquirúrgico, infección con *Escherichia coli.*, inmunosupresión, LPS), que están asociados al desarrollo de una infección sistémica con *C. glabrata* en ratonas taconic. Estos investigadores determinaron que la DXM es el segundo factor de riesgo más importante. La dexametasona vía intraperitoneal durante 4 días generó candidosis sistémica en 58% de las ratonas.

Se sabe que los corticoesteroides modulan la expresión de algunos TLR`s, los estrógenos y la progesterona; algunos corticoesteroides sintéticos modifican la expresión de TLR-2 TLR-4 TLR-3, de igual manera inhiben la síntesis de citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, IL-12) (Homma 2004, Leigh 2010, Hermoso 2004).

JUSTIFICACIÓN

A pesar del efecto inmunosupresor conocido de la dexametasona, no está claro si este esteroide tiene alguna influencia en la expresión de TLR-2, TLR-4 y en la respuesta pro-inflamatoria de las células del sistema inmune.

En las últimas décadas ha aumentado la frecuencia de las infecciones por hongos oportunistas, particularmente por *C. albicans*, a causa de la epidemia por el virus de la inmunodeficiencia humana y también por el uso terapéutico o abuso en la administración de medicamentos anti-inflamatorios, entre ellos la dexametasona. De ahí el interés de conocer los efectos que tienen sustancias antiinflamatorias como la dexametasona en la regulación de la respuesta inmune innata.

HIPÓTESIS

La administración seriada de la dexametasona podría alterar la expresión de TLR-2, TLR-4 e IL-6 en ratones infectados con *C. albicans*.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la expresión de TLR-2, TLR-4 e IL-6 en bazo, hígado, riñón y pulmón de ratones tratados con dexametasona e inoculados con *Candida albicans*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Establecer las condiciones óptimas para realizar las siguientes técnicas:
 - a. Retrocultivos
 - b. Extracción de RNA total de diversos órganos: pulmón, hígado, riñón y bazo, los cuales son usados en el presente estudio.
 - c. Transcripción inversa (RT)
 - d. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)
 - e. Cuantificación de RNA
 - f. Preparación de geles de agarosa para visualizar RNA y fragmentos de ADN
- 2) Evaluar la expresión basal de TLR-2 y TLR-4 en ratones CD1 sanos (sin estímulo).
- 3) Evaluar la expresión de TLR-2 y TLR-4 en ratones tratados con dexametasona.
- 4) Evaluar la expresión de TLR-2 y TLR-4 en ratones tratados con dexametasona e inoculados con *C. albicans*.
- 5) Evaluar la expresión de IL-6 en los tres grupos anteriores de ratones.
- 6) Comparar los datos obtenidos y observar si existe correlación entre los grupos tratados y no tratados con dexametasona

MATERIAL

15 Ratones CD1 (ICR, Institut of Cancer Research), machos, de 25-30 g, adquiridos en Harlan Laboratories (México).

Cepa de *C. albicans* ATCC90028 (FM-904) (Dogan, 2007)

Fosfato sódico de Dexametasona (DXM), presentación inyectable, 2 mg/ml.

METODOLOGÍA

Inmunosupresión del modelo murino

Se preparó una solución de fosfato sódico de dexametasona conteniendo 1mg/ml de agua destilada estéril (Herzyk et al, 1997). A partir de esta solución se utilizó un volumen equivalente a 50 mg/Kg de peso, dosis que fue administrada a 12 ratones por vía intra-peritoneal iniciando el día 0, de acuerdo con los esquemas mostrados en la **Tabla 2**.

Preparación del inóculo de *C. albicans*, inoculación y sacrificio de ratones

Con las cepa *C. albicans* ATCC90028 crecida en ADS (Agar dextrosa Sabouraud) durante 48 h a 37°C, se preparó una suspensión conteniendo 1×10^9 UFC. Nueve ratones fueron inoculados con 100 μ l de esta suspensión, vía intra-peritoneal. De acuerdo a los esquemas de inoculación y tiempos mostrados en la **Tabla 2**, los ratones fueron sacrificados para después extraer el riñón, el hígado, el bazo y el pulmón.

Retrocultivo

Para verificar la viabilidad y potencial infectividad de *C. albicans*, de cada órgano se hizo un macerado con solución salina isotónica estéril, del cual 10 μ l fueron inoculados en placas con ADS, por duplicado. Estas placas fueron incubadas 48 h a 37°C y las colonias levaduriformes crecidas fueron contadas.

Tabla 2. Esquema de administración de DXM e inoculación con *C. albicans* en ratones CD1 (ICR, Harlan).

Ratones (lotes de 3)	DXM (24 h entre dosis (modificado de Herzyk et al, 1997)	Cepa de <i>C. albicans</i> Dosis/vía	Sacrificio
Control	NO	NO	Día 0
Grupo I	2 dosis	NO	4 h posterior a la segunda dosis de DXM
Grupo II	2 dosis	Inoculación junto con segunda dosis de DXM	4 h PI
Grupo III	3 dosis		48 h PI
Grupo IV	4 dosis		96 h PI

DXM = dexametasona; PI= post-inoculación con *C. albicans*.

Extracción de órganos

El riñón, bazo, hígado y pulmón fueron colocados en agua tratada con DEPC (dietilpirocarbonato, substancia utilizada para inhibir RNAsas, Fedorcsak and L. Ehrenberg, 1966) para evitar la degradación del ácido ribonucleico del tejido, y fueron cortados finamente con una hoja de bisturí estéril dentro de cajas Petri. Para la siguiente etapa experimental se consideraron 200 mg de tejido de cada órgano; 100 mg fueron procesados para la siguiente etapa y 100 mg fueron conservados a -20° como reserva.

Extracción de RNA

Para extraer el RNA de hígado y riñón, se siguió el procedimiento recomendado por los fabricantes de TriZol® con algunas modificaciones; se realizaron cortes finos y se colocó el tejido en 1 ml de TriZol®; al tejido homogenizado se le adicionaron 200 μ l de cloroformo frío. Esta masa tisular fue centrifugada a 12,000 rpm (Centrifuge eppendorf 5415 D) por 15 min, se recuperaron 500 μ l de la fase acuosa, se agregaron 500 μ l de isopropanol frío, se dejó reposar 48 h a -20°C , se centrifugó a 12,000 rpm; se eliminó el sobrenadante y al sedimento se agregaron 200 μ l de etanol al 80% (preparado con agua-DEPC); se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min; se eliminó el sobrenadante y el sedimento que contenía el RNA se dejó secar a temperatura ambiente en condiciones estériles. El RNA fue re-suspendido en agua DEPC y conservado a -20°C para posteriormente ser utilizado en la técnica de transcripción inversa seguida de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

Para la extracción de RNA a partir de pulmón, cada fragmento de 100 mg fue finamente cortado y colocado en agua tratada con DEPC (dietilpirocarbonato). Este tejido fue secado y después macerado en presencia de nitrógeno líquido, para ser homogenizado en 1 ml de TriZol®; el resto del procedimiento fue similar al de hígado y riñón.

En el caso del bazo, los 100 mg de tejido fueron cortados finamente, y colocados en un buffer de lisis para eritrocitos, preparado con agua-DEPC; después de 15 min a temperatura ambiente, el material fue centrifugado a 10,000 rpm por 10 minutos y el

sobrenadante fue homogenizado en 1 ml de TriZol®, para ser procesado de manera similar a los otros órganos.

Para verificar la calidad del RNA, las muestras fueron preparadas con el siguiente contenido: 2 µl de RNA, 1.5 µl de MOPS (10X), 2.4 µl de formaldehído, 7.5 µl de formamida, 2.5 µl de buffer de carga para RNA y 0.5 µl de bromuro de etidio. Esta mezcla fue incubada 5 min a 70°C, y después 5 min en hielo; después fue corrida en un gel de agarosa al 1%, el cual fue visualizado en un transiluminador UV. Se realizó registro fotográfico.

Cuantificación de RNA

Para utilizar el RNA obtenido, éste fue cuantificado utilizando agua-DEPC como blanco y como vehículo, con un factor de dilución de 1:500; la lectura se realizó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 y 280 nm.

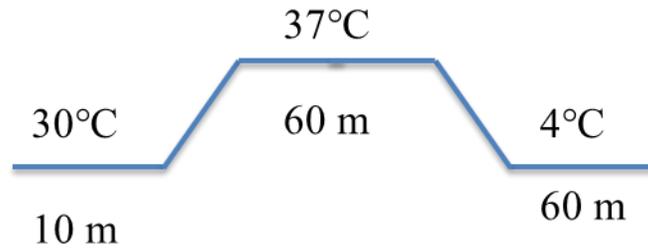
Para determinar la cantidad de este ácido nucleico en las diferentes muestras se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{D.O a 260} \times 500 (\text{factor de dilución}) \times 40 (\text{mg/ml de RNA equivalente a 1 D. O.}) \div 1000 = \mu\text{g}/\mu\text{l}.$$

Retro-transcripción (RT)

Para la transformación de RNA en DNA complementario (cDNA), la mezcla de reacción de RT contenía en un volumen final de 6.5 µl: 2 µg de RNA, Buffer RT 1X, DTT 10 Mm, dNTP's 5 mM, Oligo DT 10ng y 200 U de la reversa transcriptasa M-MLV (Moloney-murine leukemia virus reverse transcriptase, Invitrogen, California USA).

La reacción se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones de temperatura:



Terminada la reacción, el producto fue almacenado a -20°C hasta ser utilizado para la técnica de PCR.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para amplificar el gen de β actina, de TLR-2 y de TLR-4, la secuencia de los primers fue tomada de Jin, et al, 2007:

Como gen control de expresión se utilizó el de β actina, cuya secuencia de los primers fue:

Sentido 5' GCT ACA GCT TCA CCA CAG 3'; anti-sentido 5' GGT CTT TAC GGA TTG CAA CGT C 3'. Tamaño del fragmento: 288pb.

Primers para TLR-2:

Sentido 5' 'TTT GCT CCT GCG AAC TCC TA 3'; anti-sentido 5'GCT TTC TTG GGC TTC CTC TT 3'. Tamaño de fragmento: 295 pb

Primers para el gen de TLR-4:

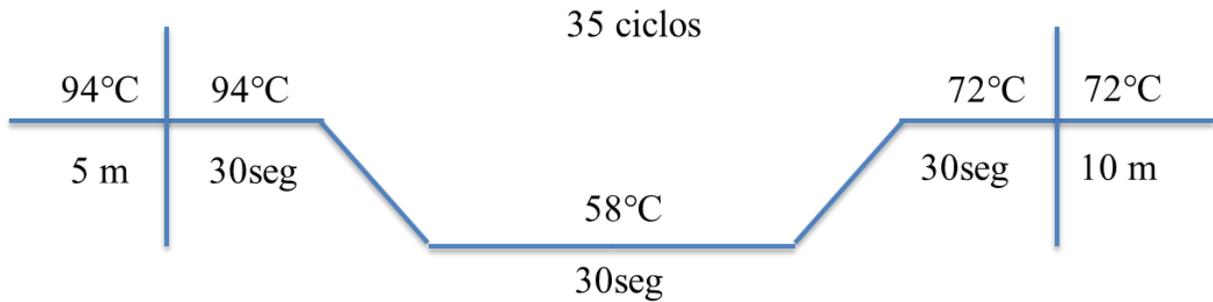
Sentido 5' GGG TCA AGG AAC AGA AGC A 3'; anti sentido 5' TGA AGG CAG AGG TGA AAG C 3'. Tamaño de fragmento: 349 pb

Para IL-6 la secuencia de los primers fue tomada de Zhong, et al, 2009:

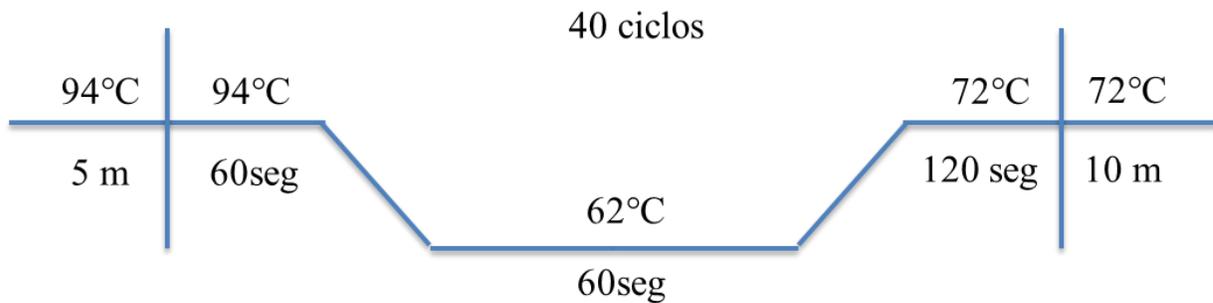
Sentido 5'CAT CCA GTT GCC TTC CTT GGG A3', anti sentido 5'CAT TGG GAA ATT GGG GTA GGA AG3'. Tamaño del fragmento 463 pb.

La mezcla de reacción contenía: Buffer PCR 1X, MgCl_2 0.72mM, dNTP's 0.2 mM, primers 0.34 μM , Taq Polimerasa 1.5 U (Fermentas® International Inc.), 5 μl de producto de RT. Volumen final. 25 μl .

Las condiciones de temperatura utilizadas para la amplificación de β actina, TLR-2 y TLR-4 fueron:



Las condiciones de temperatura utilizadas para la amplificación de IL-6 fueron:



Electroforesis

Los productos de PCR fueron depositados en un gel de agarosa al 1.5%, teñidos con bromuro de etidio, y migrados en TAE 1X, con un voltaje constante de 80 volts durante una hora y fueron visualizados en un transiluminador. Se realizó un registro fotográfico.

Análisis densitométrico

Las imágenes de los geles fueron también capturadas en un foto-documentador EDAS 290 (Kodak System, Rochester NY) y analizadas para la cuantificación de ADN correspondientes a las bandas, de acuerdo al valor en pixeles con el programa 1D image analysis software del equipo EDAS 290 de Kodak.

De acuerdo con el manual Kodak, el valor de densidad integrada IDV se determina según el número de pixeles registrados en la banda correspondiente al fragmento amplificado menos el fondo, como lo indica la siguiente fórmula:

$$IDV = \sum (\text{valor de cada pixel} - \text{fondo})$$

Los valores obtenidos de los fragmentos amplificados fueron comparados con los valores de las bandas del marcador de peso molecular (100 bp DNA ladder, Invitrogen®).

Análisis estadístico

Para asignarle un valor a los resultados obtenidos entre los diferentes grupos experimentales, se consideraron los valores basales de cada molécula. Para determinar la significancia estadística, se aplicó la prueba de Anova de una sola vía, y posteriormente la prueba de Dunnett.

RESULTADOS

Aspecto general de los ratones y retro-cultivos

Para evidenciar el estado clínico de los diferentes grupos de ratones, control y tratados con DXM y con *C. albicans*, después de ser sacrificados se les hizo una incisión en la línea media abdominal y se revisaron todos los órganos, particularmente los cuatro de nuestro interés. A partir de cada órgano se realizaron retro-cultivos por duplicado.

Grupo control No se observó alteración alguna. Sus órganos fueron normales.

Grupo I. Este grupo recibió 2 dosis de DXM (sin inoculación con *C. albicans*). El comportamiento físico de los ratones parecía normal; el bazo e intestino mostraron aumento de volumen, y en el peritoneo se observó acumulación de grasa. **Figura 4.** El retro-cultivo fue negativo.

Grupo II. Estos ratones se mostraron aparentemente normales. Un ratón de este grupo (1/3), mostró un retro-cultivo positivo en bazo y pulmón; se encontraron 9 y 108 UFC a partir de bazo; 4 y 8 UFC a partir de pulmón. **Figura 5.**

Grupo III. Los ratones y sus órganos fueron aparentemente sanos. Los retro-cultivos fueron negativos.

Grupo IV. Sus órganos mostraron un aspecto normal y los retro-cultivos fueron negativos.

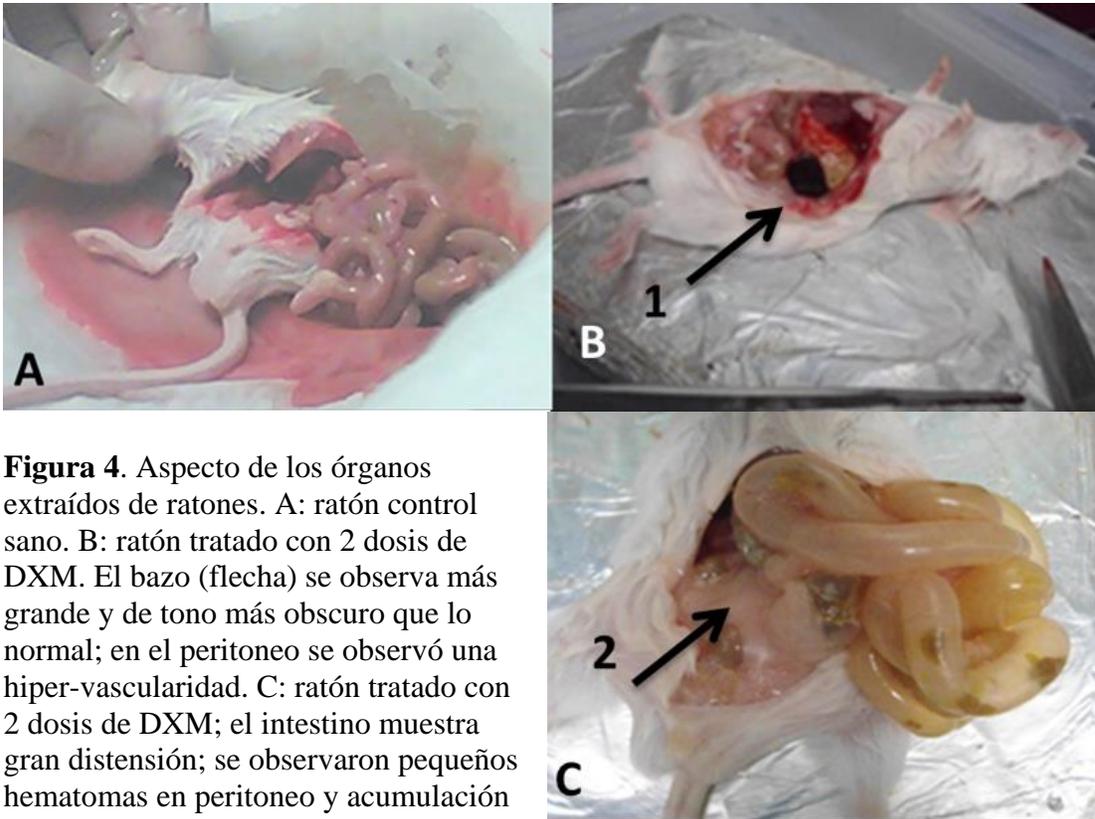


Figura 4. Aspecto de los órganos extraídos de ratones. A: ratón control sano. B: ratón tratado con 2 dosis de DXM. El bazo (flecha) se observa más grande y de tono más oscuro que lo normal; en el peritoneo se observó una hiper-vascularidad. C: ratón tratado con 2 dosis de DXM; el intestino muestra gran distensión; se observaron pequeños hematomas en peritoneo y acumulación de tejido graso (flecha) alrededor de todos los órganos.

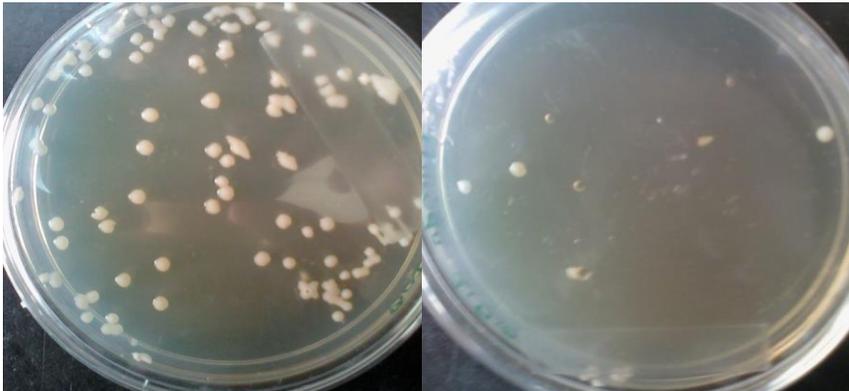


Figura 5. Colonias levaduriformes obtenidas en el retrocultivo de bazo (izquierda) y pulmón (derecha) de un ratón tratado con DXM e inoculado con *C. albicans*.

En el laboratorio de Micología Médica, el modelo murino de candidosis sistémica ha sido reproducido en diversas ocasiones. Sin embargo, en los últimos 2 años, a pesar de haber utilizado prácticamente las mismas condiciones, no ha sido posible reproducir esta micosis oportunista. El presente trabajo inicialmente tenía como objetivo determinar la expresión de TLR-2 y TLR-4 en ratones infectados con *C. albicans*. Después de varios intentos modificando las condiciones experimentales como: cepas de ratón (Taconic hembras y machos, CD1 del bioterio de Facultad de Medicina, CD1 de Harlan), cepas de levadura (FM-905 y ATCC90028), cantidad de inóculo (1×10^6 a 1×10^9), diferentes esquemas de inmunosupresión y tipo de inmunosupresor (hidrocortisona y dexametasona), los resultados no fueron los esperados.

Extracción y visualización de RNA

Se realizaron diversos ensayos de la técnica de extracción de RNA para cada uno de los órganos. **Figura 6.** Con excepción del riñón en que el RNA fue poco visible en el gel de agarosa, en todos los órganos se observaron las diversas sub-unidades de este ácido nucleico, y de buena calidad para realizar el procedimiento de RT-PCR.

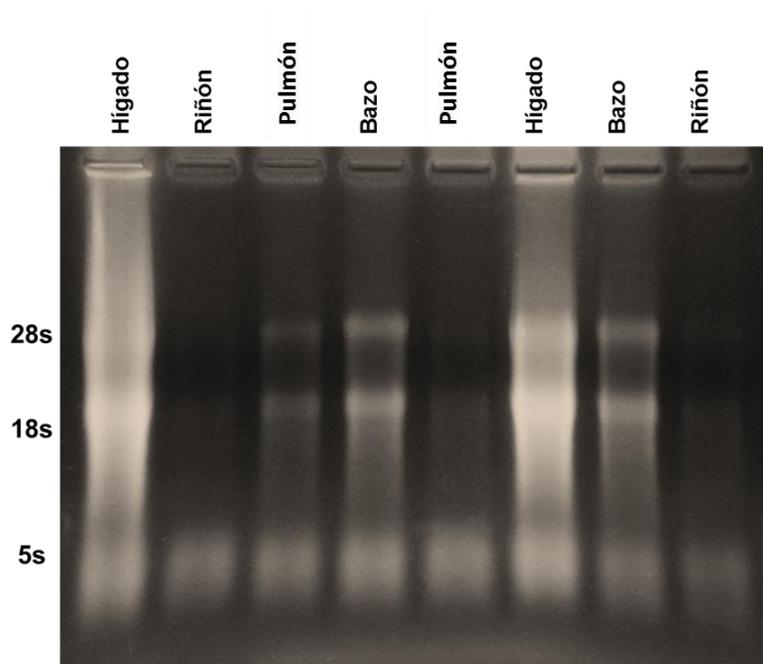


Figura 6. RNA obtenido de diferentes órganos y utilizado para el análisis de expresión de TLR-2, TLR-4, IL-6 y β actina, mediante RT-PCR. Se depositaron 5 μ l de RNA total en un

gel desnaturizante (formaldehído al 6% y MOPS 1X) de agarosa al 1%. El RNA fue migrado contra un buffer de MOPS 1X.

Cuantificación de RNA

Del RNA total obtenido se realizó cuantificación por espectrofotometría. Los valores se muestran en el Anexo 1. El rendimiento de la técnica de extracción utilizada fue en promedio de 2.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ por cada una de las muestras. Por la cantidad promedio de RNA obtenido, los órganos con mayor rendimiento fueron hígado y riñón; de bazo se obtuvieron cantidades más bajas pero constantes.

RT-PCR

Gen de β actina

En la **Figura 7** se muestran los geles conteniendo el fragmento del gen para β -actina amplificado a partir del cDNA de los órganos de ratones con los diferentes tratamientos. Se observa que la expresión de este gen es bastante uniforme entre los órganos de ratones de todos los grupos. Para el análisis densitométrico se tomaron los fragmentos de β actina del grupo control como expresión basal y fue la referencia para comparar con los grupos tratados. De cada una de las bandas generadas por RT- PCR para el gen de β actina en los diferentes grupos de ratones, se consideró la densidad de las tres muestras de cada órgano, se obtuvo el promedio y éste fue comparado con el valor del promedio del órgano control. Se observan ligeras variaciones que pueden deberse a errores en la técnica.

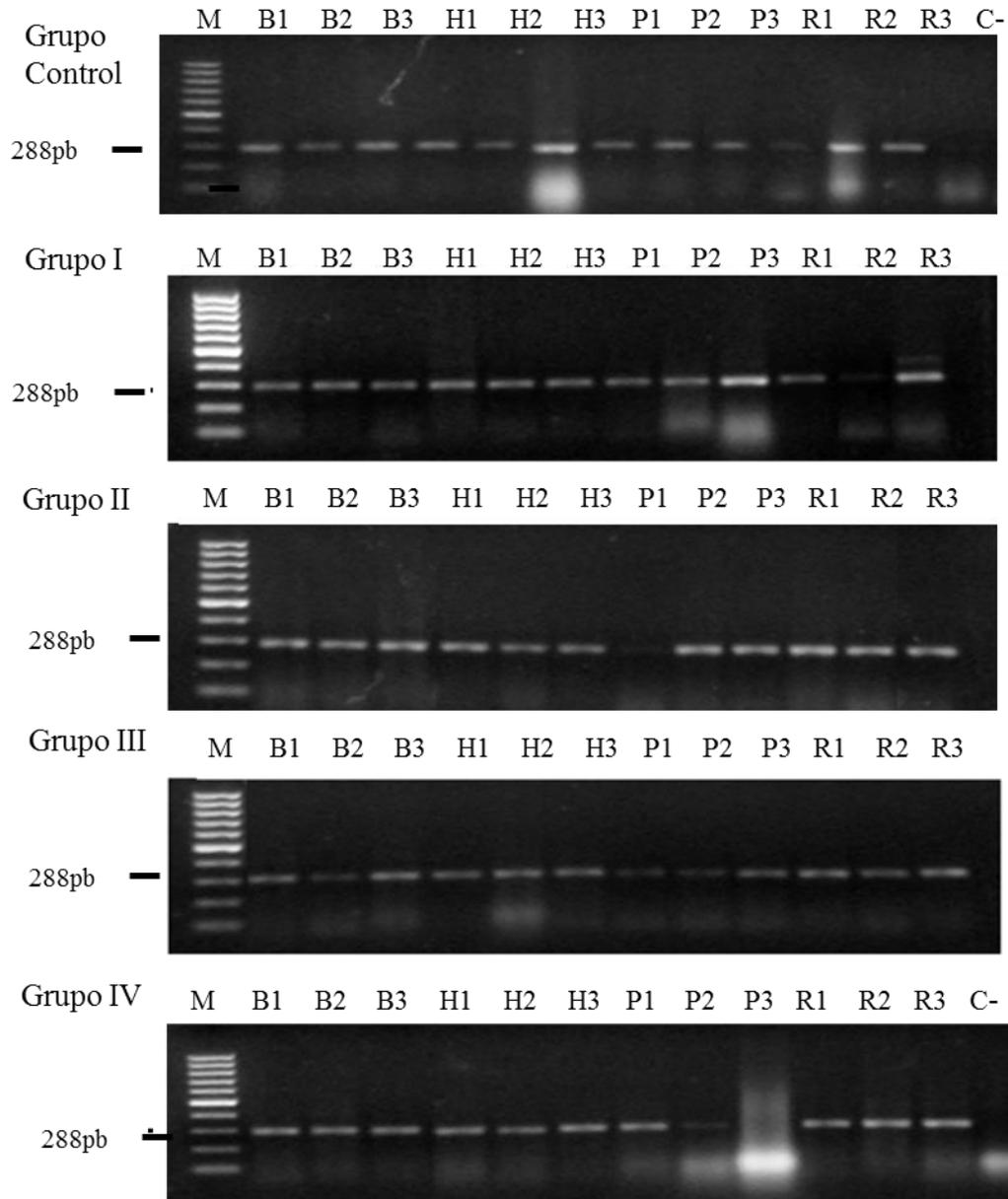


Figura 7. Productos de RT-PCR para el gen de β actina depositados en un gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio, migrados contra un buffer TAE 1X. Ratones control, sin tratamiento. Grupo I): Ratones tratados con 2 dosis de DXM. Grupo II): Ratones tratados con dos dosis de DXM y retados con *C. albicans*. Grupo III): Ratones tratados con 3 dosis de DXM y retados con *C. albicans*. Grupo IV): Ratones tratados con 4 dosis de DXM y retados con *C. albicans*. M: marcador de peso molecular (100 pb); B: bazo; H: hígado; P: pulmón; R: riñón; C-: control negativo de PCR (se hizo un control negativo por cada 24 reacciones).

b-actina

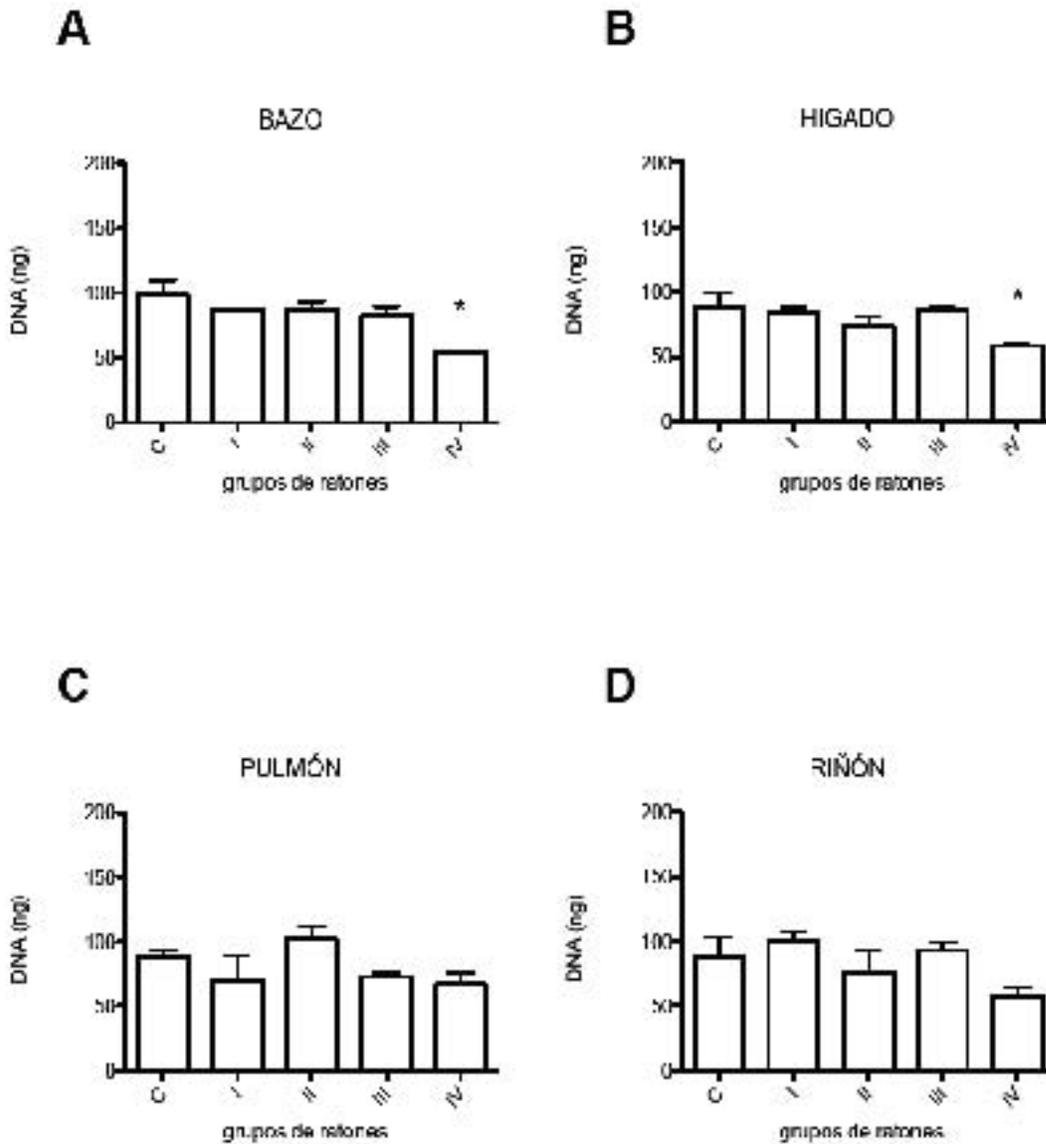
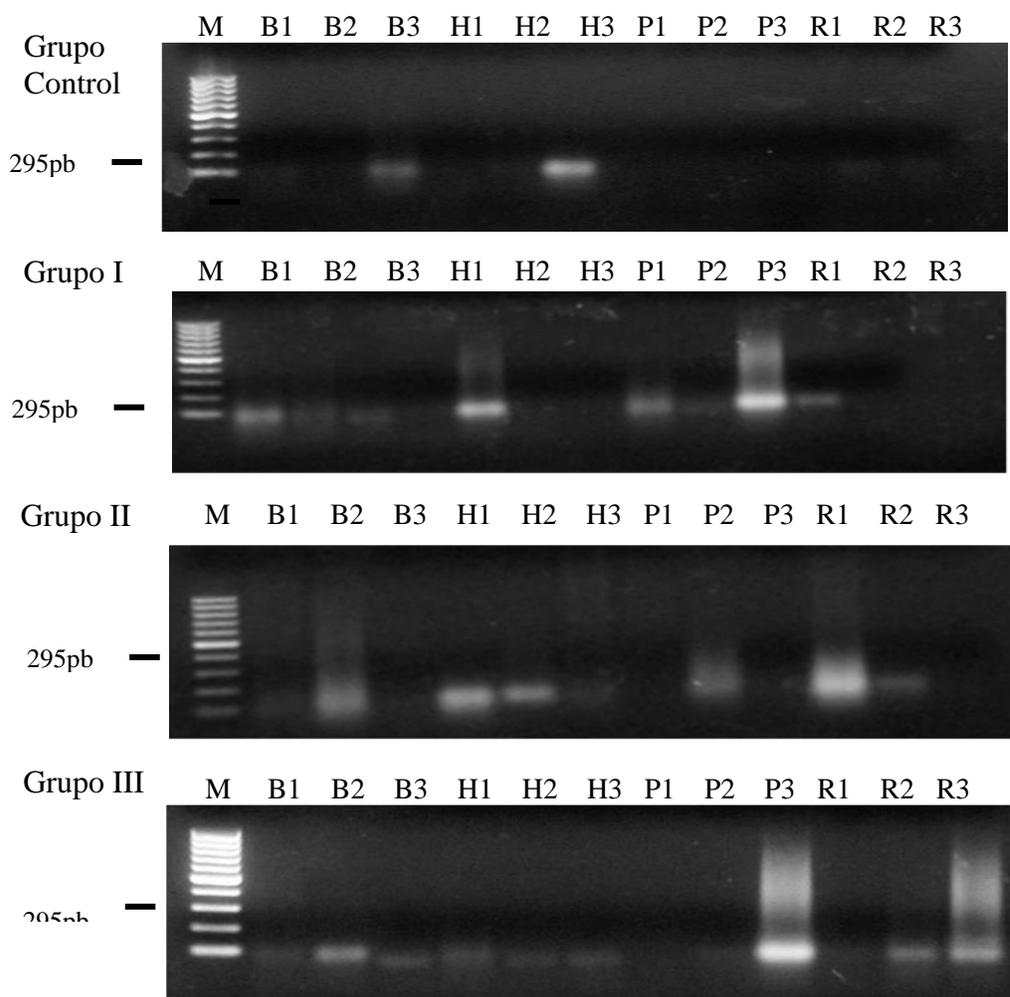


Figura 8. Densitometría del fragmento de β -actina amplificado de cada órgano y de cada grupo con diferentes tratamientos, expresado en nanogramos (ng) de DNA. C: ratones sin tratamiento. I: ratones tratados con 2 dosis de DXM. II: ratones tratados con dos dosis de DXM y retados con *C. albicans*. III: ratones tratados con 3 dosis de DXM y retados con *C. albicans*. IV: ratones tratados con 4 dosis de DXM y retados con *C. albicans*.

Gen deTLR-2

En la **Figura 9** se muestran los fragmentos del gen para TLR-2 amplificado a partir del RNA de los órganos de ratones con los diferentes tratamientos. Se observa que la expresión de este gen no es visible en el gel de agarosa. Sin embargo el programa sí detectó fragmentos para cuantificar y arrojó los valores mostrados en la **Figura 10**. La expresión basal es uniforme en hígado, riñón y pulmón, y con un ligero aumento no significativo en bazo. Debido a que las bandas solo fueron observables mediante el programa de análisis, los resultados obtenidos no son concluyentes.



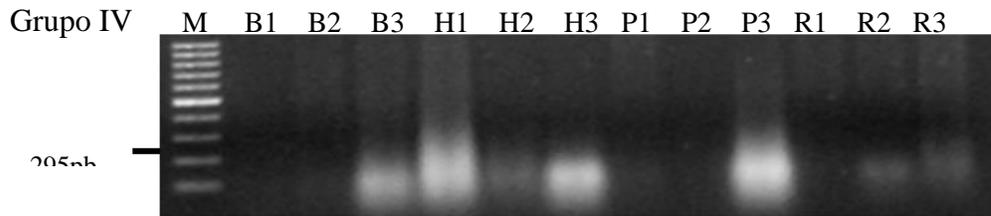


Figura 9. Productos de RT-PCR para el gen de TLR-2 depositados en un gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio, migrados contra un buffer TAE 1X. Ratones control, sin tratamiento. Grupo I): Ratones tratados con 2 dosis de DXM. Grupo II): Ratones tratados con dos dosis de DXM y retados con *C. albicans*. Grupo III): Ratones tratados con 3 dosis de DXM y retados con *C. albicans*. Grupo IV): Ratones tratados con 4 dosis de DXM y retados con *C. albicans*. M: marcador de peso molecular (100 pb); B: bazo; H: hígado; P: pulmón; R: riñón; C-: control negativo de PCR (se hizo un control negativo por cada 24 reacciones).

TLR-2

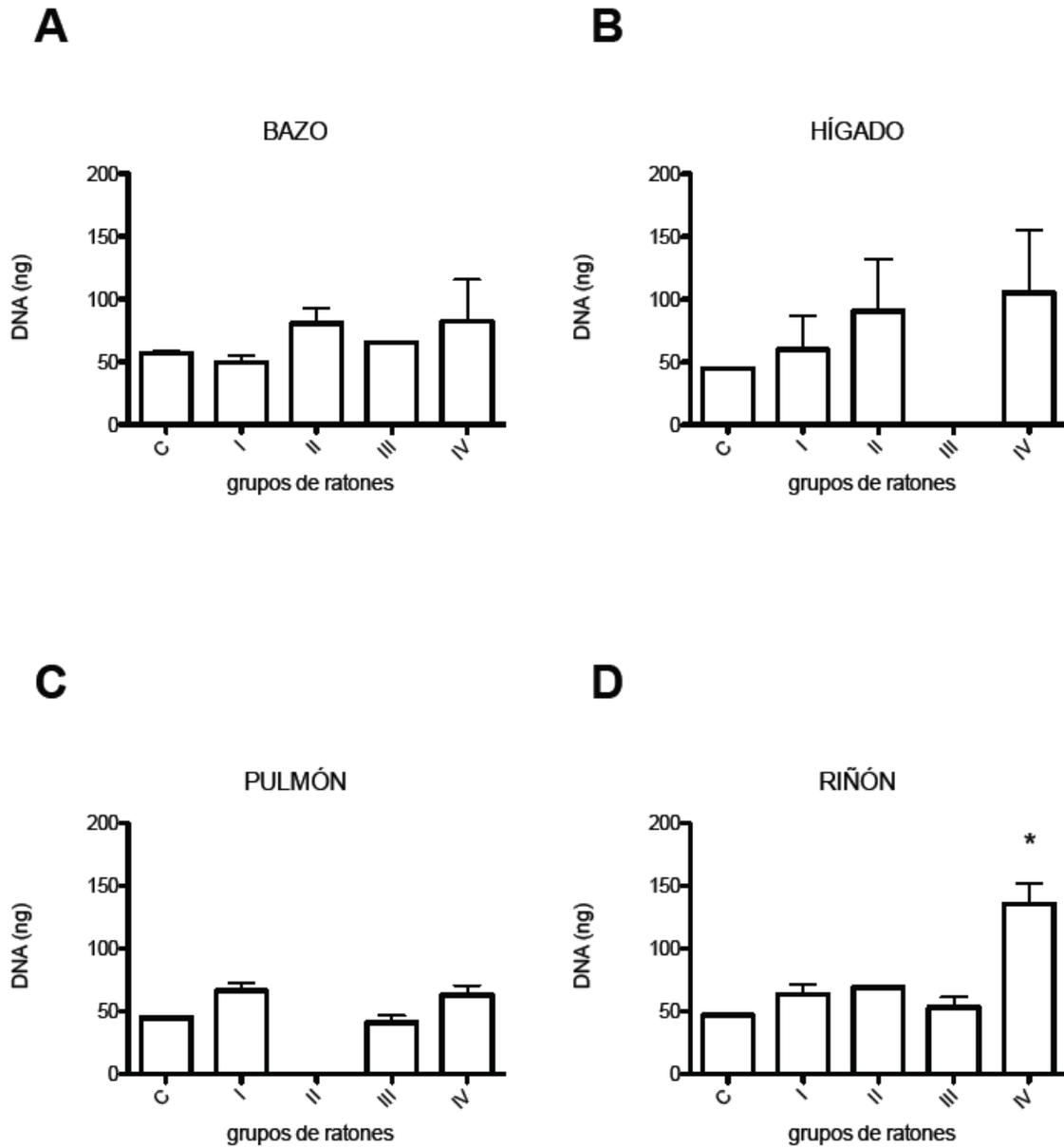
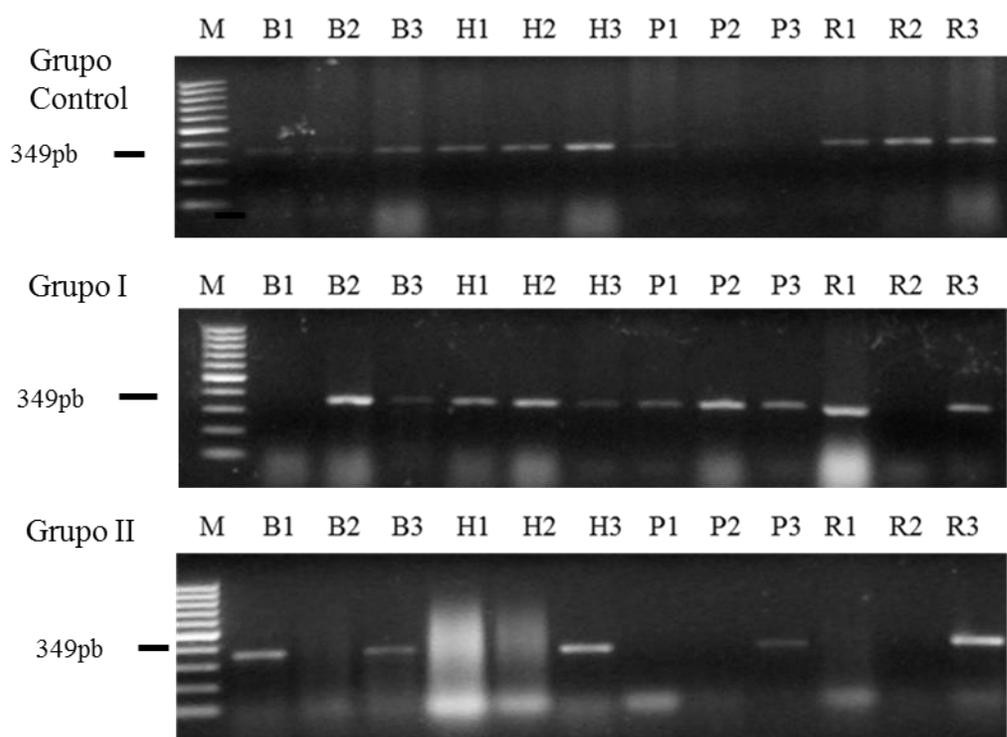


Figura 10 Análisis densitométrico obtenido de cada uno de los fragmentos generados por RT-PCR para el gen de TLR-2 en los diferentes grupos de ratones. C: ratones sin tratamiento. I: ratones tratados con 2 dosis de DXM. II: ratones tratados con dos dosis de DXM y retados con *C. albicans*. III: ratones tratados con 3 dosis de DXM y retados con *C. albicans*. IV: ratones tratados con 4 dosis de DXM y retados con *C. albicans*.

Gen de TLR 4

En la **Figura 11** se muestran los fragmentos del gen para TLR-4 amplificados a partir de los órganos de ratones con los diferentes tratamientos. Se observa que la expresión de este gen muestra una tendencia a disminuir en las muestras provenientes de órganos de ratones del grupo III (tratados con 3 dosis de dexametasona y retados con *C.albicans*). En el análisis densitométrico mostrado en la **Figura 12** se confirma la observación hecha en los gels: la expresión de este gen disminuye en la mayoría de órganos que corresponden a ratones de los grupos III y IV. Esta disminución fue significativa en hígado, bazo y riñón del grupo III. No fue posible detectar expresión de TLR-4 en el grupo IV (4 dosis de dexametasona y retados con *C. albicans*), debido a esto no arroja conclusiones la expresión que muestra este gen.



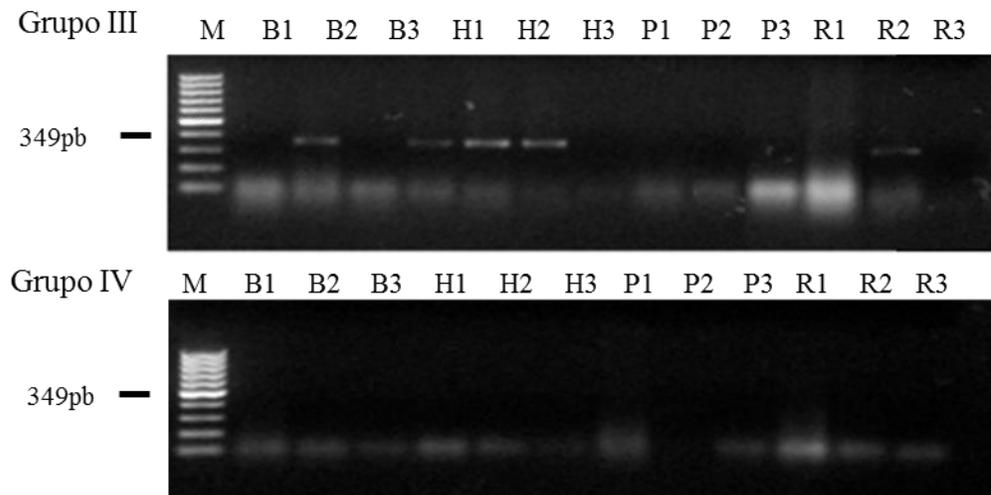


Figura 11. Productos de RT-PCR para el gen de TLR-4 depositados en un gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio, migrados contra un buffer TAE 1X. Ratones control, sin tratamiento. Grupo I): Ratones tratados con 2 dosis de DXM. Grupo II): Ratones tratados con dos dosis de DXM y retados con *C. albicans*. Grupo III): Ratones tratados con 3 dosis de DXM y retados con *C. albicans*. Grupo IV): Ratones tratados con 4 dosis de DXM y retados con *C. albicans*. M: marcador de peso molecular (100 pb); B: bazo; H: hígado; P: pulmón; R: riñón; C-: control negativo de PCR (se hizo un control negativo por cada 24 reacciones).

TLR-4

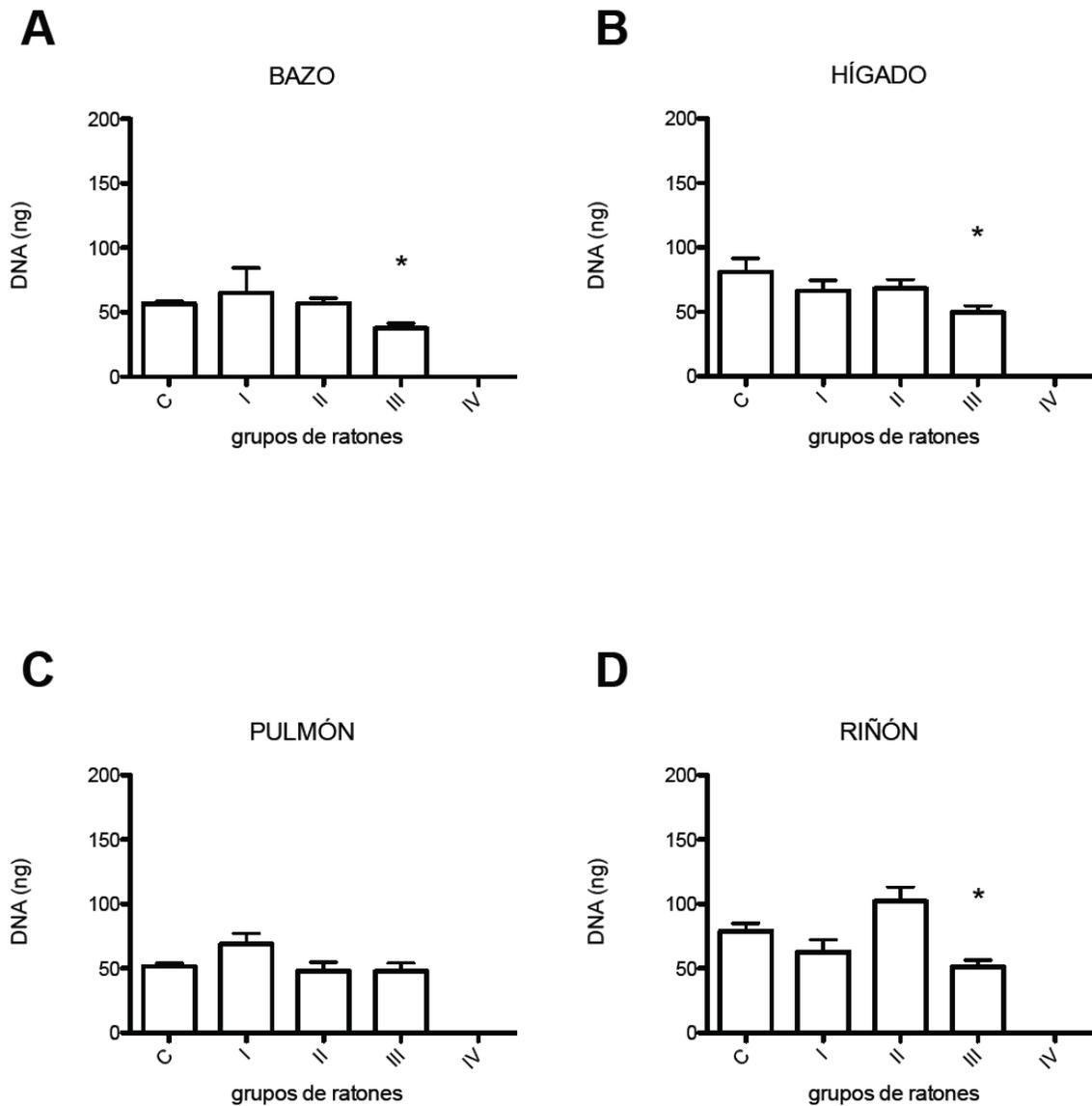
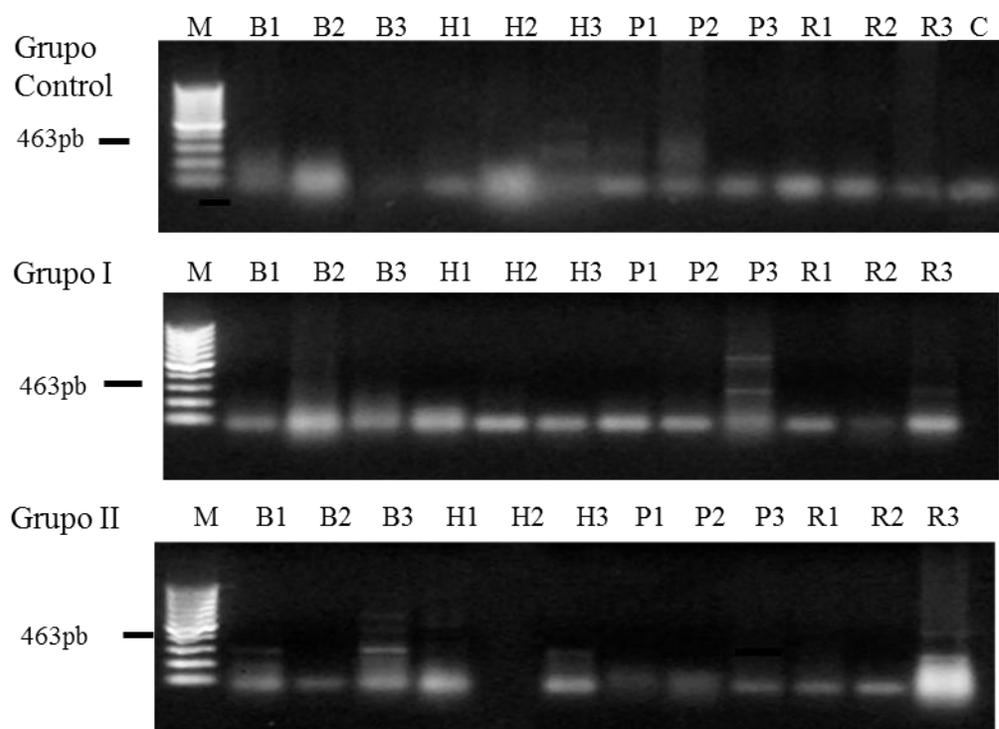


Figura 12 Análisis densitométrico obtenido de cada uno de los fragmentos generados por RT-PCR para el gen de TLR-4 en los diferentes grupos de ratones. C: ratones sin tratamiento. I: ratones tratados con 2 dosis de DXM. II: ratones tratados con dos dosis de DXM y retados con *C. albicans*. III: ratones tratados con 3 dosis de DXM y retados con *C. albicans*. IV: ratones tratados con 4 dosis de DXM y retados con *C. albicans*.

Gen de IL-6

En la **Figura 13** se muestran los geles conteniendo el fragmento del gen para IL-6 amplificado a partir del RNA de los órganos de ratones con los diferentes tratamientos. Se observa que la expresión de este gen es apenas visible en los diferentes geles. En el análisis densitométrico (**Figura 14**) se observa una tendencia a disminuir en hígado, pulmón y riñón. No se detecta expresión de este gen en bazo del grupo I y en pulmón del grupo III. Se observó también un aumento significativo en bazo de los grupos II y III.



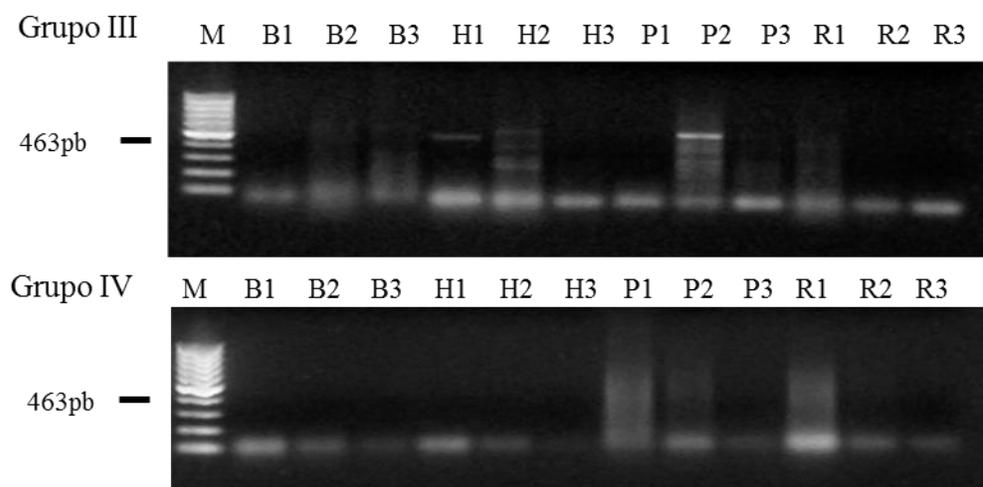


Figura 13. Productos de RT-PCR para el gen de IL-6 depositados en un gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio, migrados contra un buffer TAE 1X. Ratones control, sin tratamiento. Grupo I): Ratones tratados con 2 dosis de DXM. Grupo II): Ratones tratados con dos dosis de DXM y retados con *C. albicans*. Grupo III): Ratones tratados con 3 dosis de DXM y retados con *C. albicans*. Grupo IV): Ratones tratados con 4 dosis de DXM y retados con *C. albicans*. M: marcador de peso molecular (100 pb); B: bazo; H: hígado; P: pulmón; R: riñón; C-: control negativo de PCR (se hizo un control negativo por cada 24 reacciones).

IL-6

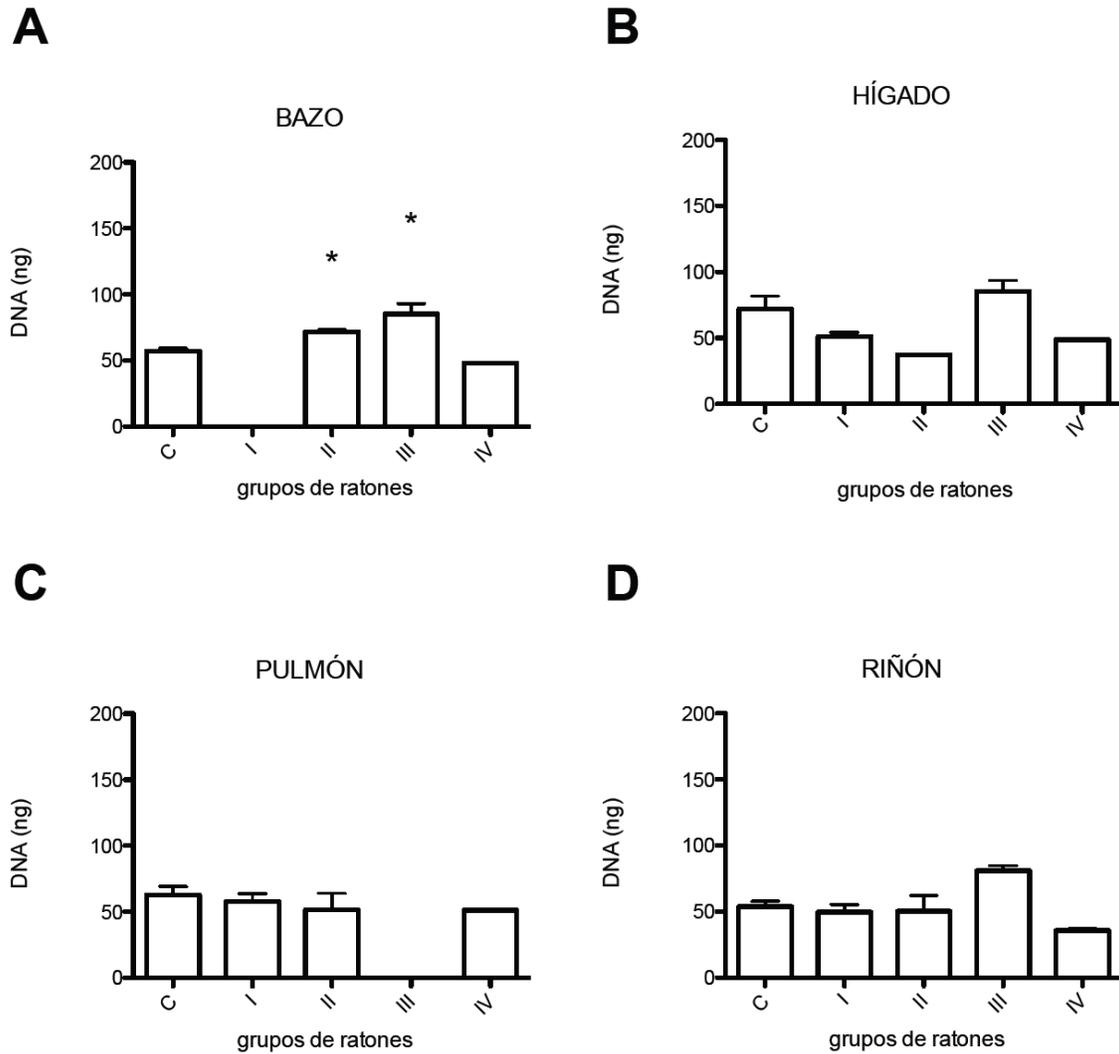


Figura 14 Análisis densitométrico obtenido de los fragmentos generados por RT-PCR para el gen de **IL-6** en los diferentes grupos de ratones con tratamiento. C: ratones sin tratamiento. I: ratones tratados con 2 dosis de DXM. II: ratones tratados con 2 dosis de DXM y retados con *C. albicans*. III: ratones tratados con 3 dosis de DXM y retados con *C. albicans*. IV: ratones tratados con 4 dosis de DXM y retados con *C. albicans*.

DISCUSIÓN

Se ha descrito que existe un reconocimiento inmunológico diferencial entre el estado levaduriforme e hifal de *C. albicans*. Durante la fase levaduriforme, se genera una reacción inflamatoria con producción de las citocinas pro-inflamatorias IFN- γ y TNF- α , para atraer a las células capaces de fagocitar al microorganismo y eliminarlo. Sin embargo, después de la transformación de levadura a hifa, la expresión de estas citocinas disminuye y se incrementa la producción de la citocina anti-inflamatoria IL-10 (van der Graaf, 2005). Por otro lado, se ha observado que los glucocorticoides contribuyen a disminuir la expresión de otra citosina pro-inflamatoria, la IL-6 (Heinrich, 2003).

En el presente estudio se eligió el esquema de inmusupresión basado en el probable tiempo de contacto entre *C. albicans* y las moléculas de reconocimiento como TLR-2 y TLR-4, y en el tiempo en que se ha reportado aparecen datos de candidosis (3-5 días). Se hizo un reto inmunológico, usando levaduras vivas de *C. albicans*, asociado a la administración de DXM en ratones CD1, para estudiar los cambios en la expresión del mRNA de TLR-2 y TLR-4, la citocina pro-inflamatoria IL-6, utilizando la metodología de RT-PCR, con la β -actina como gen control.

Considerando que no hay antecedentes experimentales para determinar cambios de expresión en los receptores y molécula planteados, los tiempos de sacrificio fueron tomados en base a cambios de expresión en genes para receptores a esteroides en tejido de rata estimulados con las hormonas específicas (Cerbón et al, comunicación personal).

Existe evidencia de que las levaduras vivas pueden ser más antigénicas para estimular la expresión de los TLRs e inducir la síntesis de mRNA de IL-6 en los diferentes órganos de los ratones, ya que contienen más antígenos para ser reconocidos por el sistema inmune (Cheng, 2012).

Aunque en ninguno de los ratones tratados se encontraron evidencias de infección sistémica, y sólo en uno se observó la presencia de levaduras o hifas en los órganos estudiados, probablemente debido a problemas metodológicos, es difícil llegar a una conclusión; sin embargo, como primera aproximación este trabajo permitió estandarizar las técnicas y ayudó a identificar los problemas que presenta la inducción de candidosis sistémica murina.

Es posible que la dosis o la calidad de la dexametasona utilizada haya sido insuficiente para disminuir la competencia inmunológica de los ratones, a un nivel que indujera una infección sistémica, aunque el resultado es congruente con lo reportado por Maraki (1999), donde un tratamiento con DXM en ratones no produce diseminación de *Candida* hacia los tejidos internos.

C. albicans como parte de la microbiota interactúa con múltiples bacterias y células del hospedero. En modelos murinos se ha demostrado que tanto TLR-2 como TLR-4 y la Dectina-1 son los principales receptores que reconocen a *C. albicans* por los fagocitos. La combinación TLR-2/Dectina-1 es la principal inductora de la síntesis de TNF- α , IL-6 e IL-1 β en estas células, provocada principalmente por los β -glucanos y los mananos de la pared celular de la levadura (Ifrim, 2013; Netea, 2002).

Sería de gran utilidad contar con un grupo tratado únicamente con *C. albicans*, o en su defecto probar alguna cepa de ratones susceptible a la infección con *C. albicans* como son los C57BL6.

La función de TLR-4 es importante como inductor de la síntesis de citocinas pro-inflamatorias cuando este receptor es estimulado por los LPS bacterianos (*Neisseria meningitidis* y *M. Tuberculosis*), pero no por *C. albicans* y los ratones TLR4^{-/-} y C3H/HeJ son más susceptibles a la infección con esta levadura. En el caso de candidiasis, se ha observado que la función principal del TLR-4 es inducir la producción de las quimiocinas KC y MIP-2 para atraer a neutrófilos (Netea, 2002). Adicionalmente, es posible que otros TLRs (TLR4/TLR4, TLR2/TLR6) también participen en la inducción de IL-6 u otras citocinas pro-inflamatorias con *C. albicans*, dependiendo de las vías de señalización y los genes que activen, pero su estudio no formó parte de este trabajo. Es importante ampliar y continuar con este estudio.

Debido a que se consideran muchos órganos y a que los receptores se encuentran en membrana y citoplasma se podría considerar otro gen control, como es gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa.

El comportamiento del sistema inmune depende de diversos factores que involucran tanto a las células del hospedero como a los diversos microorganismos que componen la

microbiota. La composición externa de los microorganismos, sus mecanismos de defensa, la presencia de células con capacidad defensiva en el hospedero, sus receptores y moléculas solubles, etc., junto con las múltiples interrelaciones que ellos tienen cotidianamente definen la vida y la supervivencia de unos y otros o los procesos de salud-enfermedad (Ifrim, 2013).

CONCLUSIONES

- 1.- Las dosis de dexametasona administradas en los ratones no produjeron infección sistémica por *C. albicans* en el modelo murino
2. Aparentemente, la administración de DMX afecta la respuesta inmune durante la infección con *Candida* pero los resultados no son concluyentes debido a que no se observan cantidades significativas de DNA en los amplificadores. El análisis con software permite observar algunas diferencias que por el momento no son conducentes a una conclusión.

PERSPECTIVAS

- 1.- Es importante revisar el protocolo para infección murina sistémica con *Candida*.
2. Es necesario incluir en el análisis un grupo de ratones que sean infectados pero no expuestos al glucocorticoide DXM. De esta forma será posible comparar los efectos de la inmunosupresión en la infección sistémica murina.
3. Debe revisarse la metodología de RT-PCR estandarizando la técnica para el gen control. Ha habido algunos reportes en los cuales la actina no es la mejor opción como gen constitutivo para el análisis de la expresión de genes. Alternativamente, podrían considerarse usar genes ribosomales o gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa como control de la expresión.
- 4.- Extraer linfocitos del bazo de esos mismos ratones y cultivarlos (5×10^6) durante 24 y 48 horas para medir IL-6 por ELISA en el medio.

REFERENCIAS

1. Aderem, A, R.J. Ulevitch, R.J, Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 2000;406:782–786.
2. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nature Review Immunology*. 2004;7:499-511.
3. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell*, 783-802. 2006;124:4:783-801.
4. Bajwa SJ, Kulshrestha A. Fungal infections in intensive care unit: challenges in diagnosis and management. *Annals of Medical and Health Sciences Research* 2013; 3: 238-244.
5. Barton, B. E., The biological effects of interleukin 6, *Medicinal. Research. Reviews.*, 1996;16: 87–109.
6. Bellocchio Silvia et al, The contribution of the Toll-like/IL1 Receptor Superfamily to Innate and Adaptative Immunity to Fungal Pathogens In vivo. *The journal of immunology*, 2004 172:5:3059-3069.
7. Bendel CM, Wiesner SM, Garni RM, Cebelinski E, Wells CL. Cecal colonization and systemic spread of *Candida albicans* in mice treated with antibiotics and dexamethasone. *Pediatric Research*. 2002, 51: 90-5.
8. Castillo Luis, M Donna, Callum Mac, Differential Regulation of kidney and spleen cytokine responses in mice challenged with pathology-standarized Doses of *Candida albicans* Mannosylation Mutans, *Infection and immunity* 2011 146-152 79:1
9. Charles A Janeway, Jr Paul Travers, Mark Walport, and Mark J Shlomchik, *Immunobiology The Immune System in Health and Disease*, 5th edición Garland Science, 2006.
10. Cheng Shih-Chin, Interplay between *Candida albicans* and the mammalian innate host defense, *Infection and immunity*, 2012: 80:4 1304-131
11. Daniel P. Stites; Abba I. Terr; Tristram G. Parslow. *Inmunología básica y clínica* 10th edición Manual Moderno 2003 pp 13-201
12. Dignani MC, Solomkin JS, Anaissie EJ Capítulo de libro: *Candida*. En *Clinical Mycology*. Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA; Churchill Livingstone, 2003, Philadelphia; pp 195-239
13. Eyerich S, et al. Il-22 and TNF-alpha represent a key cytokine combination for epidermal integrity during infection with *Candida albicans*, *European Journal of Immunology*, 2011:1894:1901.

14. Fedorcsak I, L. Ehrenberg. Effects of diethyl pyrocarbonate and methyl methanesulfonato on nucleic acids and nucleases. *Acta Chemica Scandinavica* 1966; 20:107.
15. Ghannoum M, Burns G, Abu Elteen K: Growth of *Candida albicans* in dexamethasone-supplemented media. *Sabouraudia*, 1985;23:313–315.
16. Ghannoum MA, Mudher S, Burns G: Incorporation of dexamethasone by *Candida albicans*. *Microbios*, 1985;42:103–109.
17. H Yuthika. ,Lakshman Samaranayake Samaranayake P.. Experimental Oral Candidiasis in Animals models. *Clinical Microbiology Review*.2001 14:2:398-429
18. Heinrich C Peter, Behrmann Iris, Haan Serge, Hermanns M Heike, Müller-Newen Gerhard, Schaper Fred, Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation, *The Biochemical Journal*, 2003; 374:Pt 1: 1–20.
19. Henández Hernández F. et al. Frecuencia de micosis en pacientes inmunosuprimidos de un hospital regional de la ciudad de Mexico, *Salud pública de México*, 2003;45:6 455-460.
20. Hermoso A. Marcela, Matsuguchi Tetsuya, Smoak Kathleen, Cidlowski A.John, Glucocorticoids and Tumor Necrosis Factor Alpha Cooperatively Regulate Toll-Like Receptor 2 Gene Expression, *Molecular And Cellular Biology*; 2004: 24:11:4743–4756
21. Herzyk Danuta J et al(1997). Single Organism Model of host defense against infection: Novel Immunotoxicology approach to evaluate immunomodulatory drugs. *Toxicologic Pathology*, 25:4:351-362.
22. Hibbet DS, Binder M, Bischoff JF, etal. A higher-level phylogenetic classification of the fungi. *Mycological Research* 2007; 111:509-547
23. Homma Toshiki, Kato Atsushi, Hashimoto Noriko, Batchelor Jonathan, Yoshikawa Mamoru, Imai Shosuke, Wakiguchi Hiroshi, Saito Hirohisa, Matsumoto Kenji, Corticosteroid and Cytokines Synergistically Enhance Toll-LikeReceptor 2 Expression in Respiratory Epithelial Cells, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*; 2004:31:463–469.
24. Ifrim C. Daniela, Joosten Leo, *Candida albicans* primes TLR cytokine Responses through a dectin-1/Raf-Mediated pathway, *The journal of immunology* 2013: 190: 4129–4135..
25. Iwasaki Akiko et al, Regulation of Adaptative Immunity by the innate immune system. *Science*, 327: 5963:291-295.
26. Iwasaki Akiko, Medzhitov Ruslan, Toll-like receptor control of the adaptive immune responses, *Nature Immunology*,2004; 5:10: 987–995.
27. Janeway A. Charles, Jr, Travers Paul, Walport Mark, Shlomchik J Marks, *Immunobiology The immune system in Health and Disease*, New York, Garland Science,
28. Javier Pemán, Miguel Salavert. Epidemiología general de la enfermedad fúngica invasora. *Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica* 2012; 30:90-98

29. Jin X, Wang L, Wu HS, Zhang L, Wang CY, Tian Y, Zhang JH, N-acetylcysteine inhibits activation of toll-like receptor 2 and 4 gene expression in the liver and lung after partial hepatic ischemia-reperfusion injury in mice. *Hepatobiliary Pancreatic Diseases International*; 2007;6:284–289.
30. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology*. 2010;11:5:373-84.
31. Kumamoto A Carol, Inflammation and gastrointestinal candida colonization, *Current opinion in microbiology*,2011;14:4: 386-391.
32. Kerr Ron, Stirling D., Ludlam C. A., Interleukin 6 and haemostasis, *British Journal of Haematology*,2001; 115:1: 3–12.
33. Lilly EA, Leigh JE, Joseph SH, Fidel PL, jr. Candida –induced oral epithelial cells responses. *Mycopathologia*, 2006;162:25-32.
34. Lim CSY, Rosli R, Seow HF, Chong PP. Candida and invasive candidiasis: back to basics. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 2012; 31:21-31
35. Leigh A. Jones, Shrook Kreem, Muhannad Shweash, Andrew Paul, James Alexander, Craig W. Roberts, Differential Modulation of TLR3- and TLR4-Mediated Dendritic Cell Maturation and Function by Progesterone, *The Journal of Immunology*; 2010, 185: 4525–4534.
36. Craig W. Roberts, Differential Modulation of TLR3- and TLR4-Mediated Dendritic Cell Maturation and Function by Progesterone, *The Journal of Immunology*; 2010, 185: 4525–4534
37. Ma CF, Li FQ, et al. BMC Surveillance study of species distribution, antifungal susceptibility and mortality of nosocomial candidemia in a tertiary care hospital in China *Infectious Diseases* 2013;13:337
38. Ma Chun-fang, Li Fang-qiu, Shi Li-ning, Hu Yu-an, Wang Ying, Huang Mei, Kong Qian-qian, et al, Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. 2004; 42:4419-4431
39. Maraki S, Hajjiannou I, Anatoliotakis N, Plataki M, Chiatzinilolaou I, Zoras O, Tselentis Y, Samonis G. Ceftriaxone and dexamethasone affecting yeast gut flora in experimental mice. *Journal of Chemotherapy*. 1999, 11: 363-6.
40. Mihai G. Netea, Chantal A. A Differential cytokine production and toll-like receptor signaling pathways by *Candida albicans* blastoconidia and hyphae. *Infection and immunity*, 2005;185:10:7458-7464.
41. Mihai G. Netea, Chantal A. A Differential Cytokine Production and Toll-Like Receptor Signaling Pathways by *Candida albicans* Blastoconidia and Hyphae. *Infection and Immunity*, 2005: 7458-7464.
42. Netea Mihai et al. Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *Journal of Clinical Investigation*, 2006;116:1642:1650.

43. Nadège Décanis; Katia Savignac; Mahmoud Rouabhia, Farnesol promotes epithelial cell defense against *Candida albicans* through Toll-like receptor 2 expression, interleukin-6 and human beta-defensin 2 production, *Cytokine* 2009, 45:2:132-40.
44. Netea G Mihai, Brown D Gordon, Neil Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors, *The journal of clinical investigation* 116: 6 2006 1642-1650.
45. Netea G Mihai, Brown D Gordon, Kullberg Jan Bart, A. R. Gow. Neil An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nature* 2008, 6:1:67:78.
46. Netea G Mihai, Brown D Gordon, Kullberg J an Bart, Neil A. Gow. R. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system, *Nature Reviews Microbiology* 2008, 6:1:67-78
47. Netea GM, Van der Graaf CA, Vonk AG, Verschueren I, Van der Meer JWM, Kullberg BJ. The Role of the Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis. *The Journal of Infectious Diseases*. 2002, 185:1483-9
48. Netea MG, Suttmuller R, Hermann C, Van der Graaf CA, Van der Meer JW, van Krieken JH, Hartung T, Adema G, Kullberg BJ, Toll like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 regulatory T cells. *The american association of immunologists*. 2004:172:6:3712-8.
49. d' Ostiani CF, et al. Dendritic cells discriminate between yeast and hyphae of fungus *Candida albicans*. Implications for initiation of T helper cell immunity in vitro and in vivo, *Journal of Experimental Medicine* 2000, 191:166-1674.
50. Pantinga S Theo, Johnson D Melissa, K Scott William, et al. Human genetic susceptibility to *Candida* infections. *Medical Mycology* 2012; 50:785-794.
51. Paul L. Fidel Jr, Jose A. Vazquez, Jack D. Sobel *Candida glabrata*: Review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clinical Microbiology Reviews*, 1999, 12:1:80-96.
52. Pemán Javier, Salavert Miguel. Epidemiología general de la enfermedad fúngica invasora. *Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica* 2012; 30:2:90-98.
53. Peter Staib, Marianne Kretschmar, Thomas Nichterlein, Gerwald Köhler, Sonja Michel, Herbert Hof, Jörg Hacker, Joachim Morschhäuser Host-induced, stage-specific virulence gene activation in *Candida albicans* during infection. *Molecular Microbiology*, 1999, 32:3:533-546.
54. Raouf Bahri; Dalila Saidane-Mosbahi, Mahmoud Rouabhia, Normal human gingival epithelial cells sense *C. parapsilosis* by toll-like receptors and modulate its pathogenesis through antimicrobial peptides and proinflammatory cytokines. *Mediators of inflammation*; 2010: 940383.
55. Raouf Bahri; Dalila Saidane-Mosbahi; Mahmoud Rouabhia, *Candida famata* modulates toll-like receptor, beta-defensin, and proinflammatory cytokine expression by normal human epithelial cells, *Journal of cellular physiology* 2010, 222:1:209-18.

56. Rippon JW, Capítulo de libro: Candidiasis and the pathogenic yeasts. En Medical Mycology. Editor Martin Wonsiewicz. The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. W.B. Saunders Company, 1988, Philadelphia. pp 532-581.
57. Roeder, A., Kirschning, C.J., Rupec, R.A., Schaler, M., Weindl, G., Korting, H.C., Toll-like receptors as key mediators in innate antifungal immunity. Medical Mycology, 2004;42: 485-498.
58. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd Ed, 1989. N. Y., USA.
59. Schwarzenberg P. et al. IL-17 stimulates granulopoiesis in mice: use of an alternate, novel gene therapy- derived method for in vivo evaluation of cytokines. Journal of Immunology, 1998;161:6383:6389.
60. Scully C., M. El-Kabir. Candida and Oral Candidosis: A Review: Critical Reviews in Oral Biology and Medicine, 1994;5:2:125-157.
61. Sukhithasri V., Nisha N., Lalitha Biswas, Kumar Anil, Biswas Raja, Innate immune recognition of microbial cell wall components and microbial strategies to evade such recognitions, Microbiological Research, 2013;168:7: 396-406.
62. T. Kawai, S. Akira, TLR signaling, Cell Death and Differentiation, 2006;13:5: 816–825.
63. Tanabe O, Akira S, Kamiya T, Wong GG, Hirano T, Kishimoto T. Genomic structure of the murine IL-6 gene. High degree conservation of potential regulatory sequences between mouse and human. Journal Immunology. 1988, 141: 3875-81.
64. Thierry Jouault, Ibata-Ombetta Stella, Takeuchi Osamu, Trinel Pierre-André, Sacchetti Paola, Lefebvre Philippe, Akira Shizuo, Poulain Daniel, Candida albicans phospholipomannan is sensed through toll like receptors. The journal of infectious diseases, 2003;188:1: 165-172.
65. Thomas J. Kindt, Richard A. Goldsby, Barbara A Osborne, Inmunología de Kuby, 6th edición McGraw-Hill Interamericana, 2007.
66. Van de Veer donk F, et al Redundant role of TLR9 for Candida host defense. Immunobiology 2008;213:613-620.
67. Van der Graaf CA, Netea G Mihai, Differential cytokine production and Toll-like Receptor signaling pathways by Candida albicans Blastospores and Hyphae, Infection and immunity, 2005;73:11:7458-7464.
68. Walton, C. H., et. al, Clinical experience with dexamethasone. Canadian Medical Association Journal, 1959;81:9:724-726.
69. Wang Dapeng, Muller Nora, Glucocorticoids engaged different signal transduction pathways to induce apoptosis in thymocytes and mature T cells Journal of immunology 2006;176: 1695- 1702.
70. Yuthika H. Samaranayake, Lakshman P. Samaranayake. Experimental Oral Candidiasis in Animals models. Clinical Microbiology Review. 2001 14:2:398-429.
71. Yuthika H. Samaranayake, lakshman P. Samaranayake: Experimental Oral Candidiasis in Animal Models, 2001;14:2: 98–429

Anexo 1

Órgano	Tratamiento	RNA ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
Bazo	1 Control	4.00
Bazo	2 Control	0.40
Bazo	3 Control	0.19
Bazo	1 Dxm (2 dosis)	2.48
Bazo	2 Dxm (2 dosis)	3.34
Bazo	3 Dxm (2 dosis)	3.18
Bazo	1 Dxm (2 dosis) +4h pi <i>C.albicans</i>	0.90
Bazo	2 Dxm (2 dosis)+ 4h pi <i>C.albicans</i>	1.20
Bazo	3 Dxm (2 dosis)+ 4h pi <i>C.albicans</i>	2.78
Bazo	1 Dxm (3 dosis) +48h pi <i>C.albicans</i>	2.01
Bazo	2 Dxm (3 dosis)+ 48h pi <i>C.albicans</i>	1.16
Bazo	3 Dxm (3 dosis)+ 48h pi <i>C.albicans</i>	1.44
Bazo	1 Dxm (4 dosis) +5 días pi <i>C.albicans</i>	0.60
Bazo	2 Dxm (4 dosis)+ 5 días pi <i>C.albicans</i>	2.44
Bazo	3 Dxm (4 dosis)+ 5 días pi <i>C.albicans</i>	3.00
	Promedio de RNA obtenido	1.94
Hígado	1 Control	1.09
Hígado	2 Control	2.02
Hígado	3 Control	4.48
Hígado	1 Dxm (2 dosis)	1.94
Hígado	2 Dxm (2 dosis)	1.28
Hígado	3 Dxm (2 dosis)	4.00
Hígado	1 Dxm (2 dosis) +4h pi <i>C.albicans</i>	3.80
Hígado	2 Dxm (2 dosis)+ 4h pi <i>C.albicans</i>	2.14
Hígado	3 Dxm (2 dosis)+ 4h pi <i>C.albicans</i>	4.37
Hígado	1 Dxm (3 dosis) +48h pi <i>C.albicans</i>	1.38
Hígado	2 Dxm (3 dosis)+ 48h pi <i>C.albicans</i>	2.20
Hígado	3 Dxm (3 dosis)+ 48h pi <i>C.albicans</i>	4.98
Hígado	1 Dxm (4 dosis) +5 días pi <i>C.albicans</i>	5.00
Hígado	2 Dxm (4 dosis)+ 5 días pi <i>C.albicans</i>	6.90
Hígado	3 Dxm (4 dosis)+ 5 días pi <i>C.albicans</i>	2.20
	Promedio de RNA obtenido :	3.185
Riñón	1 Control	1.00
Riñón	2 Control	0.58
Riñón	3 Control	4.00
Riñón	1 Dxm (2 dosis)	1.13

Riñón	2 Dxm (2 dosis)	2.70
Riñón	3 Dxm (2 dosis)	3.00
Riñón	1 Dxm (2 dosis) +4h pi <i>C.albicans</i>	1.58
Riñón	2 Dxm (2 dosis)+ 4h pi <i>C.albicans</i>	2.72
Riñón	3 Dxm (2 dosis)+ 4h pi <i>C.albicans</i>	2.57
Riñón	1 Dxm (3 dosis) +48h pi <i>C.albicans</i>	2.38
Riñón	2 Dxm (3 dosis)+ 48h pi <i>C.albicans</i>	2.44
Riñón	3 Dxm (3 dosis)+ 48h pi <i>C.albicans</i>	0.14
Riñón	1 Dxm (4 dosis) +3 días pi <i>C.albicans</i>	3.64
Riñón	2 Dxm (4 dosis)+ 3 días pi <i>C.albicans</i>	5.78
Riñón	3 Dxm (4 dosis)+ 3 días pi <i>C.albicans</i>	3.36
Promedio de RNA obtenido :		2.46

Órgano	Tratamiento	RNA ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
Pulmón	1 Control	0.56
Pulmón	2 Control	0.42
Pulmón	3 Control	0.53
Pulmón	1 Dxm (2 dosis)	1.86
Pulmón	2 Dxm (2 dosis)	0.39
Pulmón	3 Dxm (2 dosis)	5.46
Pulmón	1 Dxm (2 dosis) +4h pi <i>C.albicans</i>	0.44
Pulmón	2 Dxm (2 dosis)+ 4h pi <i>C.albicans</i>	1.98
Pulmón	3 Dxm (2 dosis)+ 4h pi <i>C.albicans</i>	0.80
Pulmón	1 Dxm (3 dosis) +48h pi <i>C.albicans</i>	1.03
Pulmón	2 Dxm (3 dosis)+ 48h pi <i>C.albicans</i>	0.58
Pulmón	3 Dxm (3 dosis)+ 48h pi <i>C.albicans</i>	1.38
Pulmón	1 Dxm (4 dosis) +5 días pi <i>C.albicans</i>	1.16
Pulmón	2 Dxm (4 dosis)+ 5 días pi <i>C.albicans</i>	0.91
Pulmón	3 Dxm (4 dosis)+ 5 días pi <i>C.albicans</i>	1.00
Promedio de RNA obtenido :		1.23

Anexo 1. Concentración de RNA obtenida de diferentes órganos de ratones CD1 (ICR) con sus respectivos tratamientos calculado de acuerdo a densidad óptica ratio 260/280 nm