



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Marcelo D'Alessandre Sanches

**Infecção experimental por *Candida* spp.
e tropismo para o sistema nervoso central**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Cilmary Suemi Kurokawa
Coorientadora: Profa. Dra. Thais Fernanda de Campos Fraga da Silva

**Botucatu
2018**

Marcelo D'Alessandre Sanches

Infecção experimental por *Candida* spp.
e tropismo para o sistema nervoso central

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus de
Botucatu, para obtenção do título de
Mestre em Doenças Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Cilmary Suemi Kurokawa
Coorientadora: Profa. Dra. Thais Fernanda de Campos Fraga da Silva

Botucatu
2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: LUCIANA PIZZANI-CRB 8/6772

Sanches, Marcelo D'Alessandre.

Infecção experimental por *Candida* spp. e tropismo para o sistema nervoso central / Marcelo D'Alessandre Sanches. - Botucatu, 2018

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Cilmary Suemi Kurokawa

Coorientador: Thais Fernanda de Campos Fraga da Silva

Capes: 40101096

1. Candidíase. 2. Imunossupressão. 3. Infecção. 4. Resposta imune. 5. Sistema nervoso central - Infecções. 6. Estudos experimentais.

Palavras-chave: Candidíase sistêmica; Imunossupressão; Infecção experimental; Resposta imune periférica; Sistema nervoso central.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE MARCELO D'ALESSANDRE SANCHES, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS, DA FACULDADE DE MEDICINA.

Aos 30 dias do mês de julho do ano de 2018, às 09:00 horas, no(a) Sala 17 da Central de Aulas da FM/Botucatu - Unesp, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Profa. Dra. CILMERY SUEMI KUOKAWA - Orientador(a) do(a) Depto. de Pediatria / FM/Botucatu - Unesp, Prof. Dr. EDUARDO BAGAGLI do(a) Depto. de Microbiologia e Imunologia / IB/Botucatu - Unesp, Profa. Dra. ELIANA PERESI LORDELO do(a) Universidade do Oeste Paulista (Unoeste) / Presidente Prudente, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de MARCELO D'ALESSANDRE SANCHES, intitulada **Infecção experimental por Candida spp. e tropismo para o sistema nervoso central**. Após a exposição, o discente foi arguido oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: _____ *Aprovada*. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão

Profa. Dra. CILMERY SUEMI KUOKAWA



Prof. Dr. EDUARDO BAGAGLI



Profa. Dra. ELIANA PERESI LORDELO



A Deus e a minha família,
dedico-lhes este trabalho como
forma de reconhecimento pela
oportunidade da realização de
um sonho.

Agradecimentos

A minha orientadora Profa. Dra. Cilmary Suemi Kurokawa, por sua confiança e orientação com apontamentos precisos e competentes no desenvolvimento deste trabalho.

A minha coorientadora Profa. Dra. Thais Fernanda de Campos Fraga da Silva, por sua competência e empenho no progresso da pesquisa.

A Profa. Dra. Alexandrina Sartori, pela disponibilidade e postura colaborativa que permearam a evolução do trabalho.

A equipe do Laboratório de Vacinas e Imunomodulação, Luiza Ayumi Nishiyama Mimura, Larissa Ragozo Cardoso de Oliveira, Larissa Lumi Watanabe Ishikawa, Sofia Fernanda Gonçalves Zorzella Pezavento, Juliana Helena dos Santos de Toledo, Patrícia Aparecida Borim, Evelyn da Silva Oliveira, Natália Munhoz Alves, Karen Henriette Pinke e Aline Parisoto Missio, por todo apoio teórico e prático para a realização desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Eduardo Bagagli, do Departamento de Microbiologia e Imunologia (IBB – Unesp), por gentilmente ceder as cepas de *Candida* spp..

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp) e em especial a Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), que possibilitaram a conquista de mais um desafio.

Ao Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem, da Faculdade de Medicina de Botucatu, pelo suporte acadêmico.

Ao Instituto de Biociências de Botucatu (IBB) e em especial ao Departamento de Microbiologia e Imunologia, pelo suporte técnico.

A Seção Técnica de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu e em especial a Bruna Quirino da Silva Jorgetto, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, por toda atenção e simpatia.

A todos os professores desta instituição, cuja intervenção em diferentes momentos propiciaram sabedoria para buscar sempre o melhor.

Aos membros titulares da Banca do Exame Geral de Qualificação, Profa. Dra. Luciane Alarcão Dias-Melicio e Prof. Dr. Eduardo Bagagli, pela contribuição com o trabalho.

Aos membros titulares e suplentes da Banca de Defesa de Dissertação, Prof. Dr. Eduardo Bagagli, Profa. Dra. Eliana Peresi Lordelo, Profa. Dra. Ligia Maria Suppo de Souza Rugolo e Profa. Dra. Vanessa Soares Lara, por aceitarem o convite e por seus ensinamentos a serem compartilhados.

Aos meus amigos de curso, em especial Cláudia Rosana Trevisani Corrêa e Daniel do Carmo de Camargo, pelos momentos de aprendizagem que passamos juntos.

Ao Centro Paula Souza (CPS), pela concessão do afastamento durante todo o período de realização do Mestrado.

Ao meu amor Juliana de Araujo Cubas da Silva, agradeço como forma de reconhecimento ao carinho, paciência, compreensão, ajuda e incentivo incondicional em todos os momentos deste trabalho de pesquisa.

Aos camundongos, que de maneira involuntária doaram suas vidas para o crescimento e o enriquecimento da Ciência.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para que o conhecimento esteja ao alcance das pessoas.

“Humanity is exalted not because we are so far above other living creatures, but because knowing them well elevates the very concept of life.”

E. O. Wilson

Resumo

SANCHES, M. A. **Infecção experimental por *Candida* spp. e tropismo para o sistema nervoso central**. 2018. 59 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Botucatu, 2018.

O gênero *Candida* inclui fungos comensais que podem causar infecções locais e sistêmicas, com envolvimento frequente de órgãos vitais, incluindo o sistema nervoso central (SNC). *Candida* spp. ocupam o quarto lugar entre as infecções que atingem o SNC. Entre os pacientes em terapia imunossupressora, a incidência de *Candida* não-*albicans* tem aumentado tanto quanto a incidência de *C. albicans*. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi caracterizar as alterações no SNC após infecção sistêmica por espécies de *Candida* não-*albicans* em camundongos imunocompetentes e imunossuprimidos. Camundongos C57BL6, fêmeas adultas, foram infectados por via venosa com leveduras de *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* e imunossuprimidos com prednisolona. As três espécies de *Candida* disseminaram para o SNC de animais imunocompetentes. O efeito do tratamento com prednisolona foi avaliado pela variação do peso corporal, análise microbiológica e histopatológica do SNC, e produção de citocinas de células esplênicas nos 3 e 14 dias após infecção. A imunossupressão resultou na perda de peso corporal, em leucopenia e reduziu a produção de IL-2 no baço. No dia 14 após infecção, a carga fúngica diminuiu no SNC de camundongos imunocompetentes e aumentou nos imunossuprimidos. Intenso infiltrado inflamatório associado a um perfil de células Th1 foi observado em amostras de cérebro de camundongos imunossuprimidos e infectados com *C. krusei*, em comparação com camundongos imunocompetentes infectados. Em conjunto, esses resultados indicam que *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* também são capazes de se disseminarem para o SNC e promoverem inflamação local. Além disso, eles demonstraram que a corticoterapia aumenta a carga fúngica no SNC. É possível que a neuroinflamação desencadeada por *Candida* possa ser ainda mais deletéria quando associada a outras patologias do SNC.

Palavras-chave: candidíase sistêmica; imunossupressão; infecção experimental; resposta imune periférica; sistema nervoso central.

Abstract

SANCHES, M. A. **Experimental infection by *Candida* spp. and tropism to the central nervous system.** 2018. 59 p. Thesis (Master) – Botucatu Medical School, São Paulo State University (Unesp), Botucatu, 2018.

The genus *Candida* includes commensal fungi that can cause local and systemic infections, with frequent involvement of vital organs, include central nervous system (CNS). *Candida* spp. occupy the fourth place among infections in the CNS. Among patients on immunosuppressive therapy, the incidence of *Candida non-albicans* has increased as much as the incidence of *C. albicans*. In this context, the objective of this work was to characterize the changes in the CNS after a systemic infection by non-*albicans* *Candida* species in immunocompetent and immunosuppressed mice. Adult female C57BL/6 mice were intravenously infected with *C. glabrata*, *C. krusei* and *C. parapsilosis* yeasts and were immunosuppressed with prednisolone. All *Candida* spp. disseminated to the brain and spinal cord samples from immunocompetent animals. The effect of prednisolone treatment was evaluated by body weight variation, microbiological and histopathological analysis of the CNS, and spleen cells cytokine production on days 3 and 14 post-infection. The immunosuppression resulted in body weight loss, in leukopenia and reduced IL-2 production in the spleen. At day 14 post-infection, CNS fungal load decreased in the immunocompetent mice and increased in the immunosuppressed ones. Inflammatory infiltration associated to a Th1 cells profile was higher in brain samples of *C. krusei* immunosuppressed compared with immunocompetent infected mice. Altogether, these results indicate that *C. glabrata*, *C. krusei* and *C. parapsilosis* are also able to disseminate, reach the CNS and promote local inflammation. In addition, they clearly show that corticotherapy increases fungal load in the CNS. It is possible that the neuroinflammation triggered by *Candida* can be even more deleterious in other CNS pathologies.

Key words: systemic candidiasis; immunosuppression; experimental infection; peripheral immune response; central nervous system.

Lista de abreviaturas e siglas

Aids	acquired immune deficiency syndrome
Als	agglutinin-like sequence
BBB	blood-brain barrier
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
<i>C. guilliermondii</i>	<i>Candida guilliermondii</i>
<i>C. krusei</i>	<i>Candida krusei</i>
<i>C. parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>C. tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
CEUA	comissão de ética no uso de animais
DCs	dendritic cells
et al.	colaboradores
gp	glycoprotein
HBMECs	human brain microvascular endothelial cells
HIV	human immunodeficiency virus
HK- <i>Candida</i>	heat-killed <i>Candida</i>
IL	interleukin
NF- κ B	nuclear factor kappa-beta
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns
q-PCR	quantitative real-time polymerase chain reaction
SNC	sistema nervoso central
spp.	species
Th	T helper
TLRs	toll-like receptors
Treg	regulatory T
UFC	unidades formadoras de colônias
UTI	unidade de tratamento intensivo

Sumário

CAPÍTULO I	11
1 REVISÃO DA LITERATURA	12
1.1 Aspectos gerais do gênero <i>Candida</i>	12
1.2 Distribuição geográfica e epidemiologia	16
1.3 Infecções caudas por espécies de <i>Candida não-albicans</i>	18
1.4 Efeito de imunossuppressores associados com <i>Candida</i>	20
1.5 Relação entre <i>Candida</i> e SNC	21
1.6 Justificativa	24
2 OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo geral	25
2.2 Objetivos específicos	25
2.2.1 Protocolo experimental I	26
2.2.2 Protocolo experimental II	27
3 REFERÊNCIAS	28
CAPÍTULO II	39
4 ARTIGO CIENTÍFICO	40
CONCLUSÕES	56
ANEXO	58
ANEXO A – CERTIFICADO Nº 1206/2017-CEUA	59

CAPÍTULO I

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Aspectos gerais do gênero *Candida*

O gênero *Candida* abrange fungos pleomórficos que vivem como comensais no trato gastrointestinal e geniturinário dos seres humanos. Em certas circunstâncias, como alterações na microbiota e perda da integridade das barreiras epiteliais, pode ocorrer crescimento excessivo ou a translocação do fungo através do intestino (FRIDKIN; JARVIS, 1996; EGGIMANN et al., 2003). Assim, esses fungos podem se transformar de microrganismos comensais a patógenos, com envolvimento frequente de órgãos vitais como o cérebro, o fígado e os rins (VAN DE VEERDONK et al., 2010; SCHWARTZ et al., 2018). As espécies de *Candida* estão entre os fungos patogênicos dos seres humanos mais frequentes e importantes em todo o mundo, causando um amplo espectro de infecções, variando desde candidíase cutânea e das mucosas a candidemia sistêmica da corrente sanguínea, problemas desafiadores pela alta mortalidade dos pacientes (MARCHETTI et al., 2004; WISPLINGHOFF et al., 2004; PFALLER; DIEKEMA, 2007; RUAN; HSUEH, 2009; PAPON et al., 2013; GUINEA, 2014; REBOLI, 2014; CHEN et al., 2015; GUPTA et al., 2015; DOI et al., 2016), sendo também, estes fungos, recuperados da urina causando candidúria (YASHAVANTH et al., 2013). As espécies de *Candida* são leveduras pertencentes à ordem *Saccharomycetales*, da classe *Ascomycetes*. A morfologia de levedura é observada em abundância durante a fase comensal, enquanto as hifas, células que se alongam e se ramificam em unidades fúngicas separadas, e/ou pseudo-hifas, células que permanecem ligadas a célula original, caracterizam as formas virulentas (BROWN; GOW, 1999; SILVA et al., 2011).

Dentre os fatores de virulência de *Candida* spp. a secreção de enzimas hidrolíticas facilita a aderência e a invasão do tecido, e leva a danos celulares no sistema imunológico, contribuindo assim para a disseminação do fungo (NÉMETH et al., 2013). Outro fator de virulência é a formação de biofilme, caracterizado pelo crescimento e agrupamento de microrganismos associados a superfícies diversas e protegidos por uma matriz extracelular composta por polissacarídeos, que confere resistência aos antifúngicos e protege as leveduras da ação do sistema imunológico do hospedeiro (RAMAGE et al., 2012; TREVIÑO-RANGEL et al., 2015).

Nos tecidos, o reconhecimento do fungo pelas células da imunidade inata

ocorre por diferentes receptores de reconhecimento de PAMPs como, por exemplo, os TLRs (NETEA et al., 2006). A morfologia do fungo interfere diretamente no reconhecimento de PAMPs e, conseqüentemente, na indução de diferentes respostas imunológicas. Em DCs, o reconhecimento de leveduras ocorre via TLR-4 e resulta na indução de resposta adaptativa do tipo Th1 (FÈ D'OSTIANI et al., 2000), enquanto a interação com as hifas ocorre via TLR-2 e resulta na indução de uma resposta adaptativa do tipo Th2 (NETEA et al., 2002; KUNDU; NOVERR, 2011). A polarização da resposta do tipo Th2 é importante no início da infecção para garantir a disseminação do fungo. No decorrer da infecção, moléculas fúngicas como β -glucanas e α -mananas são liberadas em abundância no tecido e reconhecidas por receptores dectina-1 e dectina-2, presentes em DCs e macrófagos, determinando a indução e expansão de células Th17 (SAIJO; IWAKURA, 2011). A imunidade inata é um importante mecanismo de defesa contra fungos patogênicos em micoses sistêmicas e o desequilíbrio na produção de citocinas pró e anti-inflamatórias, causadas por monócitos e macrófagos, durante a infecção pode determinar a progressão da doença, a morte dos microrganismos e a natureza da resposta imune adaptativa (KUROKAWA et al., 2007).

Há uma diversidade de espécies de *Candida* relacionadas a infecções humanas, apesar da espécie *C. albicans* ser predominante (ARENDRUP, 2013). Cada espécie apresenta características específicas que determinam diferenças na disseminação do fungo pelo organismo e na indução de resposta imunológica. Essas características estão relacionadas tanto à morfologia quanto à fisiologia de cada espécie, e muitas delas conferem a capacidade de evasão da resposta imunológica (KASPER et al., 2015).

O mecanismo de infecção da espécie *C. glabrata* evoluiu de forma independente das outras espécies por exigências metabólicas de um ambiente mais estável. Os complexos proteicos do fungo anexam-se as células do hospedeiro e a espécie *C. glabrata*, comensal ou patógeno, com características especializadas para humanos, pode persistir nos órgãos por um período longo sem sintomas clínicos (BRUNKE; HUBE, 2013). A espécie *C. glabrata* é um fungo comensal humano protegida da fagocitose mediada por macrófagos (NEVITT; THIELE, 2011; ROMÃO et al., 2017). Ela pode sobreviver em macrófagos sem causar danos, pois embora fagocitada de forma eficiente, induz baixa resposta pró-inflamatória de citocinas como estratégia de evasão imunológica (Figura 1) (KASPER et al., 2015).

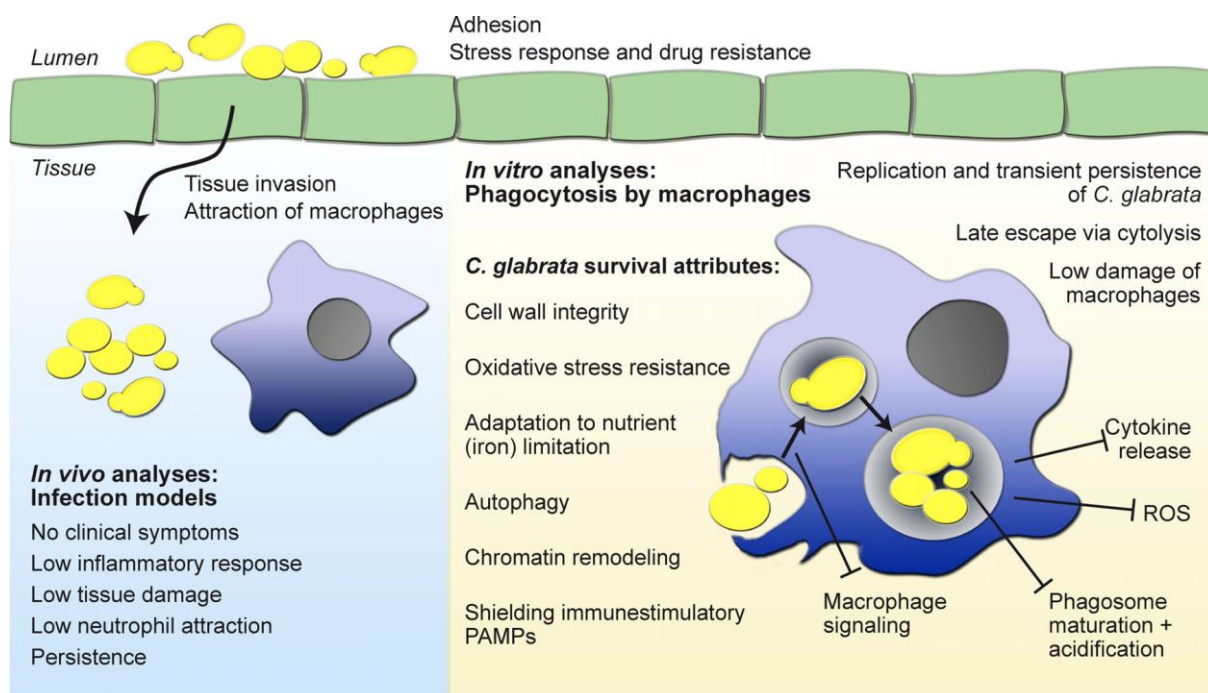


Figura 1 – Esquema das estratégias de infecção por *C. glabrata*. A espécie *C. glabrata* é um fungo comensal nas superfícies mucosas de indivíduos saudáveis. Em pacientes susceptíveis ou após infecção sistêmica experimental, pode invadir os tecidos e se disseminar através da corrente sanguínea. Durante a invasão os macrófagos são atraídos e podem fagocitar *C. glabrata* (KASPER et al., 2015).

A espécie *C. glabrata* é uma das mais frequentes do gênero *Candida* (ABBES et al., 2011) e um dos principais patógenos oportunistas dos seres humanos causando candidíase invasiva (NEVITT; THIELE, 2011). Com alta incidência principalmente entre as mulheres (ARENDRUP, 2013), está associada à antibióticoterapia, cateteres venosos centrais, nutrição parenteral e ao aumento de indivíduos imunocomprometidos com diabetes, câncer e Aids (NEVITT; THIELE, 2011).

O desenvolvimento de infecções causadas por *C. glabrata*, envolve fatores de predisposição do hospedeiro e também fatores de virulência associados ao fungo. Esta espécie de *Candida* causa destruição de tecidos por fatores de virulência como a liberação de enzimas hidrolíticas (fosfolipases e proteinases) no local da infecção (SILVA et al., 2011), e tem apresentado baixa sensibilidade a antifúngicos (NEVITT; THIELE, 2011; DOI et al., 2016), podendo ser resistente ao fluconazol, mas a anfotericina B tem sido utilizada com sucesso para o tratamento da candidíase (COLOMBA et al., 2014). A resistência ao fluconazol por *C. glabrata* reforça a importância da rápida identificação da espécie para melhorar a terapia

antifúngica de forma eficiente e econômica (PFALLER et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2014).

A espécie *C. parapsilosis* é um dos fungos comensais mais frequentemente isolados das mãos humanas mesmo não sendo um patógeno obrigatório em seres humanos. Esta espécie também já foi encontrada em animais domésticos e insetos (SABINO et al., 2011; DELFINO et al., 2014; GUO et al., 2015). A candidemia causada por *C. parapsilosis* ocorre principalmente em pacientes com câncer hepatobiliar e gastrointestinal (LI et al., 2013), sendo frequentemente associada ao uso de cateter venoso central, doenças cardiovasculares, pacientes submetidos à cirurgia e pacientes idosos hospitalizados em UTIs (BARCHIESI et al., 2016). A espécie *C. parapsilosis* induz forte resposta celular anti-inflamatória Th2 (TÓTH et al., 2013).

As propriedades de virulência da espécie *C. parapsilosis* incluem a alta capacidade de adesão a superfícies biológicas e protéticas, e a formação de biofilmes, que confere resistência às células do sistema imunológico e aos antifúngicos. Além disso, a produção de enzimas hidrolíticas, que causam danos nos tecidos dos hospedeiros, é importante no desempenho de sua patogenicidade (CHOW et al., 2012). Geralmente a espécie *C. parapsilosis* é insensível às equinocandinas (LOPEZ et al., 2014), sendo o fluconazol o antifúngico mais prescrito para infecções por esta espécie de *Candida* (LIN et al., 2015).

A adesão de *C. parapsilosis* às células endoteliais é rápida e eficiente *in vitro*, o que sugere que este mecanismo seja similar *in vivo* (SHINTAKU et al., 2013). A espécie *C. parapsilosis* tende a ser morta na superfície endotelial por neutrófilos, no entanto, se ocorrer endocitose evade-se da morte e se reproduz de forma segura para perpetuar novos ciclos de infecção, e as células endoteliais infectadas servem de reservatório para a conservação dos fungos (Figura 2) (GLASS et al., 2015).

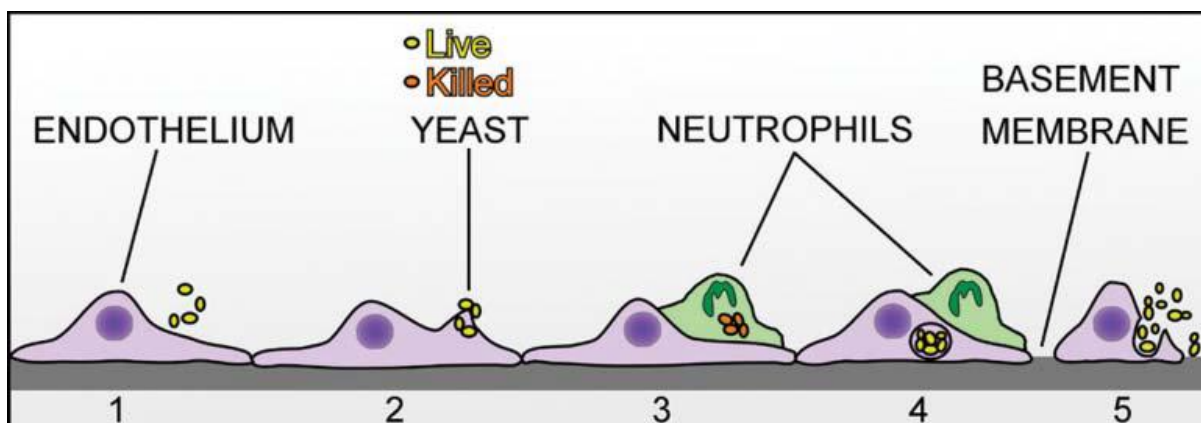


Figura 2 – Vigilância e evasão imunológica de *C. parapsilosis*. A espécie *C. parapsilosis* no sangue adere às células endoteliais (1 e 2). Os neutrófilos podem fagocitar e matar as células do fungo na superfície (3), no entanto, se as células do fungo entrarem nas células endoteliais, elas são protegidas contra a morte (4), podendo se replicar e romper a membrana das células endoteliais para causar novos ciclos de infecção (5) (GLASS et al., 2015).

A espécie *C. krusei* é a quinta espécie de *Candida* mais frequente, sendo o fungo patogênico oportunista (PFALLER et al., 2008) com menor virulência, mesmo colonizando a cavidade oral e formando biofilmes, em relação às outras espécies de *Candida* em mamíferos (SCORZONI et al., 2013; ROSSONI et al., 2017). A infecção por *C. krusei* tem como fatores de risco doenças subjacentes, uso de antibióticos múltiplos e profilaxia antifúngica (FORASTIERO et al., 2015), induzindo a produção de IL-12, o que leva à resposta do tipo I e favorece a imunidade mediada por monócitos contra a infecção por esta espécie de *Candida* (XIONG et al., 2000). Nos serviços de saúde esta espécie é comum em pacientes da hematologia, oncologia, cirurgia, dermatologia, urologia, obstetrícia, ginecologia e UTIs (médica, cirúrgica e neonatal) (PFALLER et al., 2008).

A espécie *C. krusei* é resistente ao fluconazol (MAJITHIYA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2014; SRINIVASNAKSHATRI et al., 2014), mas suscetível ao voriconazol (SCORZONI et al., 2013). Ainda que a anfotericina B seja o melhor agente antifúngico disponível para o tratamento (KARYOTAKIS et al., 1995), o antifúngico isavuconazol tem sido eficaz na redução da carga fúngica no cérebro em candidíase invasiva (MAJITHIYA et al., 2009).

1.2 Distribuição geográfica e epidemiologia

As infecções por *Candida* são observadas nos dois hemisférios do planeta e em todos os continentes, apresentando variações geográficas espécie-específicas importantes. A espécie *C. albicans* é encontrada na Europa, na América

Latina e na América do Norte. Já a espécie *C. glabrata* é mais frequente na América do Norte e na Europa, e menos frequente na América Latina (PFALLER et al., 2011). Outra *Candida* a demonstrar preferência pelo hemisfério norte é a espécie *C. krusei*, sendo mais encontrada também na América do Norte e na Europa (PFALLER et al., 2008). Já, as espécies *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* têm sido mais frequentes no hemisfério sul, similar à espécie *C. albicans*. A infecção por *C. parapsilosis*, em neonatos, dividida por regiões geográficas foi maior na Austrália (35,8%) e América do Sul (29,1%) em relação à Ásia (24,7%) e Europa (19,1%) (PAMMI et al., 2013).

Em uma revisão de literatura realizada na Europa sobre candidemia causada por espécies de *Candida* não-*albicans*, a espécie *C. glabrata* foi a mais frequente na Finlândia, Noruega e Dinamarca; a espécie *C. parapsilosis* foi a mais frequente na Espanha; e a espécie *C. krusei* foi a segunda espécie mais frequentemente encontrada na Finlândia, a terceira espécie na Dinamarca e a quarta na Noruega e na Espanha. Esta mesma revisão de literatura também realizada nos Estados Unidos obteve como resultado da candidemia por espécies de *Candida* não-*albicans*, a maior frequência de infecção por *C. glabrata* (29,0%) seguida por *C. parapsilosis* (17,0%), *C. tropicalis* (10,0%), *C. krusei* (1,0%) e outras espécies não-*albicans* (5,0%) (GUINEA, 2014). Ainda no hemisfério norte, particularmente no Canadá, a epidemiologia da variação de espécies de *Candida* não-*albicans* em pacientes infectados apresentou a espécie *C. glabrata* (19,3%) como a mais frequente, seguida por *C. parapsilosis* (12,4%), *C. tropicalis* (8,7%) e *C. krusei* (4,4%) (PFALLER et al., 2014).

Um estudo realizado em um hospital público infantil brasileiro, no período de 2007 a 2010, demonstrou a seguinte frequência de infecções causadas pelo gênero *Candida*: *C. albicans* (37,5%), *C. tropicalis* (24,0%), *C. parapsilosis* (22,1%), *C. krusei* (2,9%) e *C. glabrata* (1,9%) (OLIVEIRA et al., 2014). Em crianças maiores de um ano de idade (população pediátrica não neonatal) a mortalidade causada por *Candida* não-*albicans* ocorre principalmente pelas espécies *C. glabrata* e *C. krusei* (HEGAZI et al., 2014).

Um levantamento realizado em 16 hospitais distribuídos dentre as cinco regiões do Brasil, durante o período de 2007 a 2010, demonstrou que a taxa total de mortalidade por candidemia durante a internação hospitalar foi de 72,2%, sendo a espécie *C. albicans* (34,3%) a mais frequente dentre as infecções por *Candida* spp., seguida por *C. parapsilosis* (24,1%), *C. tropicalis* (15,3%) e *C. glabrata* (10,2%) (DOI

et al., 2016). Apesar das taxas de incidência da infecção por *C. glabrata* apresentarem aumento principalmente no hemisfério norte, no Brasil foi observada a prevalência de *C. glabrata* nos jalecos dos profissionais da saúde com a frequência de 57,1% e nas superfícies hospitalares com uma frequência de 37,6% (SAVASTANO et al., 2016). No Brasil, esta espécie foi a mais frequente em hospitais privados (COLOMBO et al., 2013).

A incidência das infecções por *C. parapsilosis*, embora com maior frequência no hemisfério sul, apresentou aumento particularmente em locais com grande uso de equinocandinas (ARENDRUP, 2014). Em um estudo epidemiológico realizado, entre 2010 e 2011, na Espanha acerca das espécies de *Candida* não-*albicans*, a espécie *C. parapsilosis* foi a mais incidente, seguida por *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (PUIG-ASENSIO et al., 2014). Na Itália dados epidemiológicos, de 1998 a 2013, mostraram que entre as espécies de *Candida* não-*albicans*, a espécie *C. parapsilosis* também foi a mais frequente (62,2%), seguida por *C. glabrata* (10,0%), *C. tropicalis* (8,6%), *C. guilliermondii* (8,6%) e *C. krusei* (5,0%) (CAGGIANO et al., 2015).

1.3 Infecções causadas por espécies de *Candida* não-*albicans*

As infecções associadas ao gênero *Candida* podem ser endógenas, quando a espécie é comensal, mas pode causar infecção, ou nosocomiais, quando são adquiridas dentro de centros de saúde (KATIYAR et al., 2016). A partir da década de 1990 tem-se observado um aumento na incidência de *Candida* spp. em diversos hospitais em todo o mundo (PFALLER; DIEKEMA, 2002; PERLROTH et al., 2007; PAPPAS et al., 2010; PARMELAND et al., 2013), sendo que de 60% a 90% dos casos as infecções fúngicas acometem pacientes imunodeprimidos (PAPPAS et al., 2010). A candidemia nosocomial causada por espécies de *Candida* não-*albicans* tem aumentado ano após ano (OLIVEIRA et al., 2014) e apresenta como fatores predisponentes implantes cirúrgicos artificiais e exposição anterior a antifúngicos (DING et al., 2015). Em pacientes que passaram por cirurgia a prevalência de *Candida* não-*albicans* aumentou nos últimos anos, nos quais a candidíase intra-abdominal tem sido muito frequente (AGUILAR et al., 2015; BLISS, 2015).

A maioria das infecções causadas por espécies de *Candida* não-*albicans* ocorrem no sangue, mas também são detectadas no abdômen, nos pulmões, nos ossos e na pele. As espécies de *Candida* não-*albicans* também são encontradas no

SNC, no coração e nos olhos, sendo as quatro espécies patogênicas mais frequentes *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (STORTI et al., 2012; PFALLER et al., 2014; TURNER; BUTLER, 2014). Os fatores de risco mais comuns para estas infecções são associados a cateteres (venoso, urinário e arterial), uso de antibióticos de amplo espectro, ventilação mecânica, intubação nasogástrica, nutrição enteral e parenteral, e uso de corticosteroides sistêmicos (JORDAN et al., 2014).

A infecção sistêmica por *C. glabrata* pode ocorrer pela cavidade oral, vagina, pele e cateteres internos, além do trato gastrointestinal (WELLS et al., 2007), e tem sido comumente relatada em pacientes com idade mais avançada, com cirurgia e terapia antifúngica prévias, transplantados, diabéticos e com tumores, sendo rara na UTI neonatal (PFALLER et al., 2014). A espécie *C. glabrata* pode causar infecção aguda e morte do hospedeiro, evoluindo de uma peritonite para a formação de abscessos pela perfuração do trato gastrointestinal, tanto em camundongos como em seres humanos (CHENG et al., 2014). Raramente a espécie *C. glabrata* tem sido associada à esofagite de pacientes, no entanto a candidíase do esôfago de pacientes HIV positivos pode ser a primeira manifestação da Aids (FIDEL et al., 1999).

As infecções causadas por *C. krusei* são frequentes em pacientes com terapia antifúngica prévia, neutropênicos, transplantados com células-tronco, com doença maligna hematológica e que foram tratados com corticosteroides (imunossupressores) (PFALLER et al., 2014). Em pacientes com doenças gastrointestinais a espécie *C. krusei* está associada ao sangramento gástrico, as úlceras duodenais e principalmente a pacientes com gastrite (HUONG et al., 2013). Já em pacientes com leucemia, submetidos a transplante de medula, a infecção por *C. krusei* ocorre pelo uso de imunossupressores (FANCI et al., 2005). A prevalência de *C. krusei* é alta na população feminina sendo a laceração perineal e a idade acima dos 50 anos fatores importantes de vaginite (GÜZEL et al., 2013).

As infecções por *C. parapsilosis* apresentaram-se com maior frequência em indivíduos jovens, principalmente pacientes pediátricos, o que demonstra ser esta espécie um importante patógeno neonatal (PFALLER et al., 2014). A espécie *C. parapsilosis* já foi isolada em hemoculturas, cateteres, pele, unhas e ambiente hospitalar (SABINO et al., 2015), no qual as cepas podem permanecer durante anos (BARBEDO et al., 2015). A morte de pacientes com candidemia causada por *C.*

parapsilosis tem como fatores agravantes comorbidade e malignidade (LIN et al., 2015). As infecções sanguíneas associadas ao uso de cateter representaram um terço dos casos totais de infecções por *C. parapsilosis* (JORDAN et al., 2014).

1.4 Efeito de imunossupressores associados com *Candida*

A candidíase sistêmica é um problema comum entre os imunocomprometidos, incluindo pacientes submetidos a transplante de medula óssea e quimioterapia, portadores de doenças malignas hematológicas, pacientes submetidos à cirurgia gastrointestinal ou aqueles que apresentam queimaduras graves que comprometem a mucosa (CHOW et al., 2012). De maneira geral, a corticoterapia tem sido associada com o aumento de infecções causadas por *Candida* spp., em particular, *C. albicans* (PEREIRA et al., 2014).

Outro fator de risco no desenvolvimento de candidíase invasiva relacionado ao imunocomprometimento do hospedeiro é a neutropenia, baixo número de neutrófilos (CHOW et al., 2012). Nos pacientes com baixa imunidade as espécies de *Candida* frequentemente encontradas são *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (TOMCZAC et al., 2014).

A prednisolona é um glicocorticoide clássico usado para tratar uma ampla gama de problemas de saúde; efetivamente reduz a inflamação induzindo imunossupressão (DE KRUIF et al., 2007; YAN et al., 2015). É um imunossupressor utilizado no tratamento de doenças inflamatórias crônicas, cujo papel anti-inflamatório deve-se principalmente à sua capacidade de suprimir ou inibir a ativação dos fatores de transcrição NF- κ B (ANDERSSON et al., 2005). A prednisolona aumenta a carga fúngica no trato gastrointestinal e facilita a disseminação de *C. albicans* para órgãos vitais como baço, fígado e rins (KOBAYASHI-SAKAMOTO et al., 2018).

O tratamento para esclerose múltipla inclui medicamentos que visam reduzir a frequência e a gravidade das exacerbações, mas não ocorre cura da doença. Assim, em sua fase aguda, a esclerose múltipla é usualmente tratada com corticosteroides enquanto que em sua fase crônica utilizam-se drogas imunomoduladoras (GOLD; WOLINSKY, 2011). A resistência antifúngica em pacientes com Aids deve-se ao estado imunossupressor, no qual os antifúngicos são incapazes de erradicar os fungos do hospedeiro (FIDEL et al., 1999). Na fertilização *in vitro* a imunossupressão tem tido destaque no papel do desenvolvimento de

candidíase sistêmica (AKHANOBAN et al., 2014). A endocardite causada por *Candida* em pacientes saudáveis é rara, no entanto, ela ocorre em pacientes com válvulas protéticas e em pacientes imunossuprimidos (PELEMIŠ et al., 2013).

Experimentalmente, a infecção sistêmica por *C. glabrata* em camundongos imunocompetentes tem os rins, o baço e o cérebro como os principais órgãos-alvo (JACOBSEN et al., 2010). No entanto, em infecção experimental por *C. krusei*, observou-se maior carga fúngica em amostras de fígado, pulmões e rins de animais imunossuprimidos quando comparados a animais não suprimidos, apoiando a ideia de que a condição de imunossupressão está associada à maior disseminação de *Candida*. (ANAISSIE et al., 1993).

Os pacientes pediátricos são susceptíveis a infecções causadas por *Candida* spp. principalmente quando apresentam neutropenia, uso de corticosteroides, cateter venoso central e nutrição parenteral (GOKCEBAY et al., 2016). Em crianças neutropênicas com problemas hematológicos a maior porcentagem de espécies de *Candida* foi observada nos pacientes com leucemia linfoblástica aguda, sendo que a cavidade oral apresentou uma colonização maior que as demais partes do corpo (HADDADI et al., 2014).

Os neonatos prematuros constituem um grupo de pacientes com elevado risco para candidíase e suas complicações, pois sua susceptibilidade a essas infecções também se relacionam a mecanismos de imunocomprometimento (GUO et al., 2015). A espécie *C. parapsilosis* é a que tem maior incidência de infecção nos prematuros (CHOW et al., 2012) e a mais frequente em pacientes menores de dois anos de idade submetidos à ventilação mecânica (DOTIS et al., 2012). As infecções causadas por *C. parapsilosis* no período neonatal contribuíram para a morbidade e a mortalidade, com uma taxa de 10%, sendo responsáveis por um terço das infecções em neonatos prematuros. A predileção da espécie *C. parapsilosis* por neonatos ainda não está evidente, mas sua profilaxia está associada à alimentação com leite materno, remoção de cateteres venosos centrais, prudência no uso de corticosteroides e uso correto de antibióticos (PAMMI et al., 2013).

1.5 Relação entre *Candida* e SNC

As doenças neurodegenerativas constituem um grupo heterogêneo de doenças do SNC que são caracterizadas pela perda lenta e irreversível das funções neuronais e sua etiologia permanece em grande parte desconhecida (PISA et al.,

2015). Uma possível ligação entre infecções fúngicas e outras patologias envolvendo o SNC foi descrita e inclui doença de Parkinson (EPP; MRAVEC, 2006), doença de Alzheimer (PISA et al., 2015), autismo (RATNASEELAN et al., 2018) e esclerose múltipla (ALONSO et al., 2018). Os fatores causadores dessas doenças de alta complexidade, que são frequentemente o resultado da combinação genética e ambiental, ainda são desconhecidos e a base molecular de sua patogênese ainda não foi completamente esclarecida (DE CHIARA et al., 2012). Duas teorias diferentes poderiam explicar essa relação, uma possibilidade é o mimetismo molecular entre alguns antígenos microbianos e hospedeiros (CHASTAIN; MILLER, 2012) e a outra é que a própria infecção seja responsável pelas lesões focais no SNC (ALONSO et al., 2018). Estudos têm sugerido a possibilidade de que as infecções que atingem o SNC desempenhem um papel cofatorial na indução das doenças neurodegenerativas (MATTSON, 2012; SAROUKOLAEI et al., 2016; GÓRALSKA et al., 2018).

As infecções sistêmicas por *Candida* afetam órgãos vitais, incluindo o SNC (LI et al., 2017). As infecções fúngicas que acometem o SNC estão associadas com considerável morbidade e mortalidade, e compreendem um amplo espectro de sintomas clínicos, incluindo abscessos cerebrais, acidente vascular cerebral/vasculite, aneurismas, hidrocefalia, meningites/meningoencefalites e trombose arterial (KHANDELWAL et al., 2011; MURTHY; SUNDARAM, 2014; GÓRALSKA et al., 2018). Os principais agentes etiológicos dessas infecções são fungos da ordem *Mucorales* e dos gêneros *Aspergillus*, *Cryptococcus* e *Candida* (PANACKAL; WILLIAMSON, 2015).

Embora sejam raros os relatos clínicos de acometimento do cérebro em pacientes com candidíase sistêmica, as espécies de *Candida* são frequentemente encontradas no cérebro de pacientes que morreram devido a esta infecção (PARKER et al., 1981). A disseminação deste patógeno para o cérebro é mais comum em recém-nascidos (FAIX; CHAPMAN, 2003), sendo também responsável por grande parte dos abscessos cerebrais em pacientes imunocomprometidos (YAMPOLSKY et al., 2010; FENNELLY et al., 2013). Experimentalmente, foi demonstrado que na infecção sistêmica por *C. albicans*, o fungo se dissemina para o cérebro de camundongos suíços e induz migração de fagócitos peritoneais para os focos de infecção (FRAGA-SILVA et al., 2013). Lionakis et al. (2011) observaram expansão significativa da micróglia no cérebro de camundongos C57BL/6 após

infecção por *C. albicans*.

Para invadir o SNC a espécie *C. albicans* precisa atravessar a BBB. As HBMECs diferem das células endoteliais dos vasos sistêmicos. Segundo Jong et al. (2001) a espécie *C. albicans* é capaz de penetrar nestas células e de determinar a formação de pseudo-hifas em seu interior. Além disto, estes autores constataram que *C. albicans* é capaz de atravessar estas células através de transcitose, e a identificação de algumas moléculas que participam deste processo de migração foi descrita recentemente. Liu et al. (2011) descreveram que a espécie *C. albicans* infecta o cérebro ligando-se a gp96, uma proteína de choque térmico, expressa exclusivamente em HBMECs. Esta proteína é reconhecida pela Als3 (invasiva fúngica) de *C. albicans*, o que permite a entrada do fungo pela célula endotelial e sua disseminação para o SNC (Figura 3). A proteína Als3 influencia a patogênese da candidíase em camundongos aumentando o deslocamento de fungos para o cérebro e o córtex renal durante a infecção (FU et al., 2013).

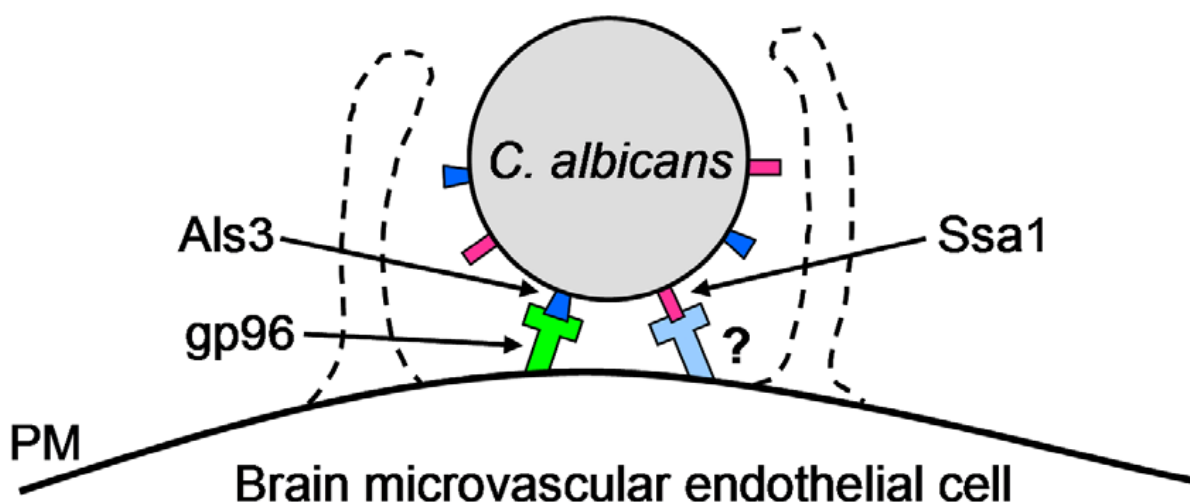


Figura 3 – Modelo das interações da endocitose de *C. albicans* por HBMECs. A Als3 de *C. albicans* liga-se a gp96 na superfície de HBMECs e induz endocitose (LIU et al., 2011).

Segundo Purzycki e Shain (2010), certas espécies de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Candida*, conseguiriam evadir-se da resposta imunológica por se encontrarem revestidos com uma proteção de manana. Esta característica lhes permitiria sobreviver no organismo humano, em um sítio não neurológico e liberar seus metabólitos continuamente para a corrente sanguínea. Entre estes produtos existem toxinas que são capazes de alterar a permeabilidade da BBB e atingir o SNC ocasionando degradação e liberação de componentes da bainha de mielina,

sendo possível, portanto, hipotetizar que os autoantígenos assim liberados atinjam os órgãos linfoides secundários desencadeando uma resposta autoimune específica.

A possível contribuição de componentes fúngicos para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas e/ou autoimunes é sustentada tanto por achados em modelos experimentais como por algumas evidências observadas em pacientes com esclerose múltipla, uma doença autoimune que acomete o SNC. Benito-León et al. (2010), mostraram uma associação significativa nos níveis de anticorpos séricos entre *Candida* e esclerose múltipla. No estudo de Pisa et al. (2011) foi constatada a presença de macromoléculas fúngicas, de β -1,3-glucana e de anticorpos anti-*Candida* no sangue periférico de um paciente com esclerose múltipla. Os anticorpos específicos e os antígenos de *Candida* também estavam presentes no líquido cefalorraquidiano deste indivíduo. Recentemente, estes autores comprovaram a presença de antígenos de *Candida* no líquido de vários pacientes com esclerose múltipla (PISA et al., 2013).

1.6 Justificativa

As infecções por espécies de *Candida* não-*albicans* têm apresentado maior incidência em todo o mundo e, similar à espécie *C. albicans*, estas espécies podem se disseminar para o SNC. A relação entre infecções por *Candida* e SNC tem sido associada a condições de imunocomprometimento do hospedeiro, mas de maneira geral, pouco estudadas.

A hipótese de trabalho foi que as espécies de *Candida* não-*albicans* apresentam diferentes tropismos para o SNC e que a condição de imunossupressão altera o tropismo desses fungos para o SNC. A relevância imediata desta abordagem reside no esclarecimento da relação espécie-específica por *Candida* spp. e SNC.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

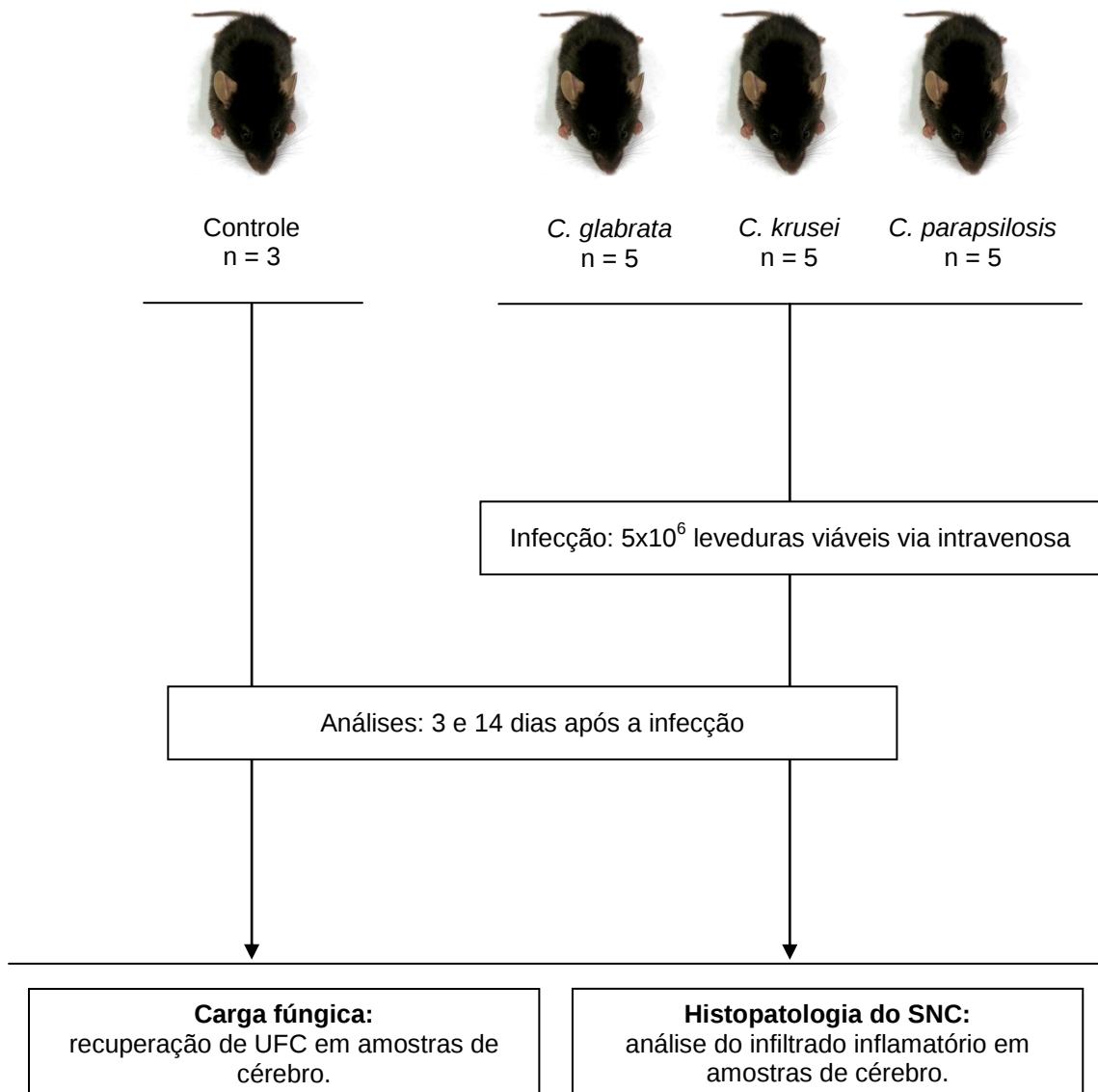
Caracterizar a colonização/infecção e a resposta imunológica no SNC decorrentes da infecção sistêmica por espécies de *Candida* não-*albicans* em camundongos imunocompetentes e imunossuprimidos.

2.2 Objetivos específicos

- I. Avaliar a capacidade de infecção sistêmica e disseminação de *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* para o SNC;
- II. Avaliar se o tratamento com corticoide altera a disseminação de *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* para o SNC.

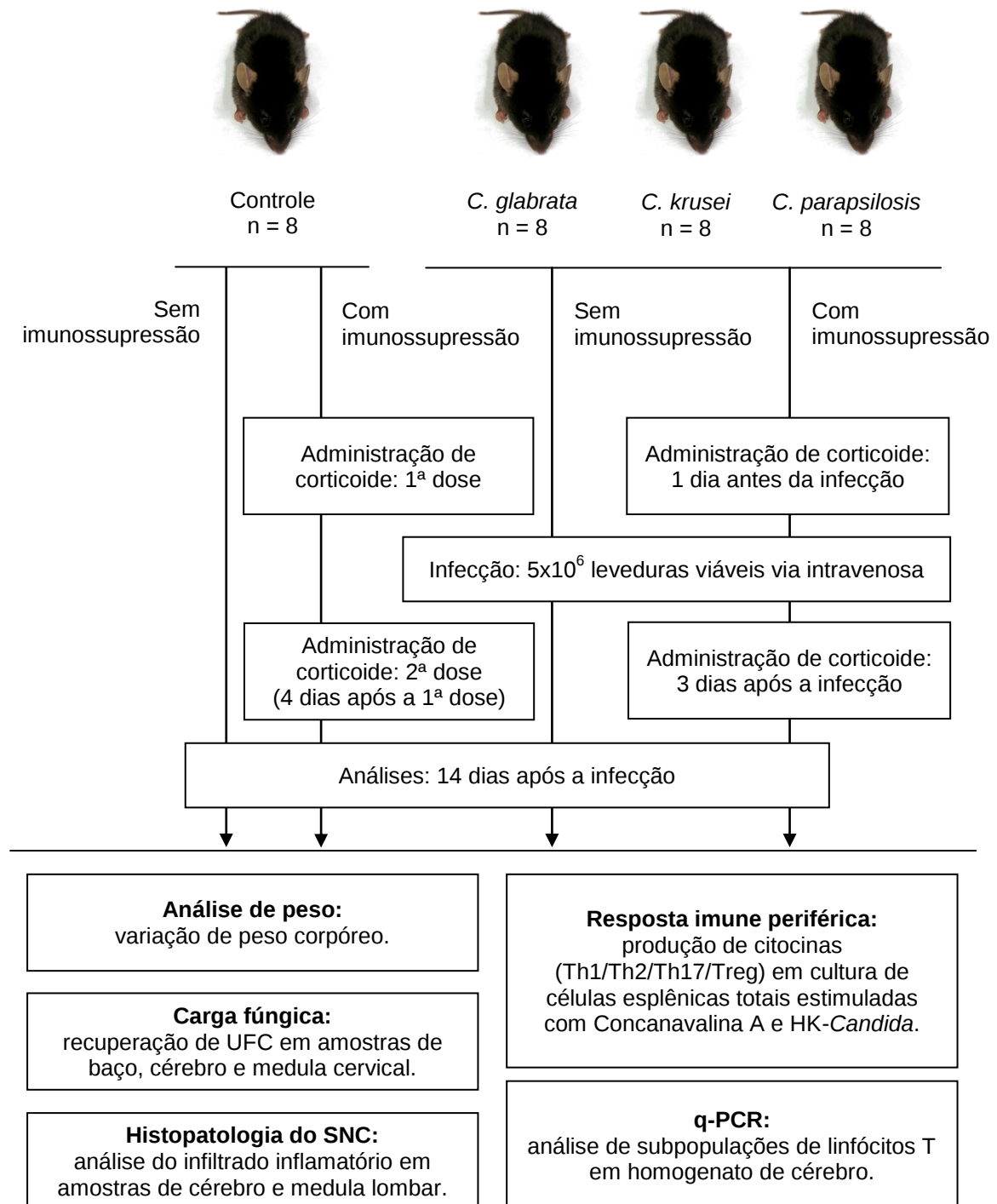
2.2.1 Protocolo experimental I

Objetivo: caracterizar e comparar o decurso da infecção por *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* no SNC de camundongos C57BL/6.



2.2.2 Protocolo experimental II

Objetivo: avaliar se o tratamento com corticosteroide interfere no decurso da infecção por *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* no SNC de camundongos C57BL/6.



3 REFERÊNCIAS

1. Abbes S, Sellami H, Sellami A, Makni F, Mahfoudh N, Makni H, et al. Microsatellite analysis and susceptibility to FCZ of *Candida glabrata* invasive isolates in Sfax Hospital, Tunisia. *Med Mycol*. 2011;49(1):10–5.
2. Aguilar G, Delgado C, Corrales I, Izquierdo A, Gracia E, Moreno T, et al. Epidemiology of invasive candidiasis in a surgical intensive care unit: an observational study. *BMC Res Notes*. BioMed Central; 2015;8(1):4–9.
3. Akhanoba F, MacDougall J, Mathur R, Hassan W. Severe systemic candidiasis following immunomodulation therapy in in vitro fertilisation-embryo transfer (IVF-ET). *BMJ Case Rep*. 2014;1–4.
4. Alonso R, Fernández-Fernández AM, Pisa D, Carrasco L. Multiple sclerosis and mixed microbial infections. Direct identification of fungi and bacteria in nervous tissue. *Neurobiol Dis* [Internet]. Elsevier Inc; 2018;117(2017):42–61. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.05.022>
5. Anaissie E, Hachem R, K-Tin UC, Stephens LC, Bodey GP. Experimental hematogenous candidiasis caused by *Candida krusei* and *Candida albicans*: Species differences in pathogenicity. *Infect Immun*. 1993;61(4):1268–71.
6. Andersson AK, Chaduvula M, Sara E, Khanolkar-young S, Jain S, Suneetha S, et al. Effects of Prednisolone Treatment on Cytokine Expression in Patients with Leprosy Type 1 Reactions Effects of Prednisolone Treatment on Cytokine Expression in Patients with Leprosy Type 1 Reactions. *Infect Immun*. 2005;73(6):3725–33.
7. Arendrup MC. *Candida* and Candidaemia: Susceptibility and Epidemiology. *Dan Med J*. 2013;60(11):1–32.
8. Arendrup MC. Update on antifungal resistance in *Aspergillus* and *Candida*. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. European Society of Clinical Infectious Diseases; 2014;20(6):42–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12513>
9. Barbedo LS, Vaz C, Pais C, Figueiredo-Carvalho MHG, Muniz M de M, Zancoppe-Oliveira RM, et al. Different scenarios for *Candida parapsilosis* fungaemia reveal high numbers of mixed *C. parapsilosis* and *Candida orthopsilosis* infections. *J Med Microbiol*. 2015;64(1):7–17.
10. Barchiesi F, Orsetti E, Osimani P, Catassi C, Santelli F, Manso E. Factors related to outcome of bloodstream infections due to *Candida parapsilosis* complex. *BMC Infect Dis* [Internet]. BMC Infectious Diseases; 2016;16(1):1–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12879-016-1704-y>
11. Benito-León J, Pisa D, Alonso R, Calleja P, Díaz-Sánchez M, Carrasco L. Association between multiple sclerosis and *Candida* species: evidence from a case-control study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2010;29(9):1139–45. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10096-010-0979-y>

12. Bliss JM. *Candida parapsilosis* : An emerging pathogen developing its own identity. *Virulence* [Internet]. 2015;6(2):109–11. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21505594.2015.1008897>
13. Brown AJP, Gow NAR. Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. *Trends Microbiol.* 1999;7(8):333–8.
14. Brunke S, Hube B. Two unlike cousins: *Candida albicans* and *C. glabrata* infection strategies. *Cell Microbiol.* 2013;15(5):701–8.
15. Caggiano G, Coretti C, Bartolomeo N, Lovero G, De Giglio O, Montagna MT. *Candida* bloodstream infections in Italy: Changing epidemiology during 16 years of surveillance. *Biomed Res Int.* Hindawi Publishing Corporation; 2015;2015(January 1998):1–9.
16. Chastain EML, Miller SD. Molecular mimicry as an inducing trigger for CNS autoimmune demyelinating disease. *Immunol Rev.* 2012;245(1):227–38.
17. Chen CY, Sheng WH, Huang SY, Chou WC, Yao M, Tang JL, et al. Clinical characteristics and treatment outcomes of patients with candidaemia due to *Candida parapsilosis* sensu lato species at a medical centre in Taiwan, 2000-12. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70(5):1531–8.
18. Cheng S, Clancy CJ, Hartman DJ, Hao B, Hong Nguyen M. *Candida glabrata* intra-abdominal candidiasis is characterized by persistence within the peritoneal cavity and abscesses. *Infect Immun.* 2014;82(7):3015–22.
19. Chow BDW, Linden JR, Bliss JM. *Candida parapsilosis* and the neonate: Epidemiology, virulence and host defense in a unique patient setting. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2012;10(8):935–46.
20. Colomba C, Trizzino M, Imburgia C, Madonia S, Siracusa L, Giammanco GM. *Candida glabrata* meningitis and endocarditis: A late severe complication of candidemia. *Int J Infect Dis* [Internet]. International Society for Infectious Diseases; 2014;29:e174–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2014.04.032>
21. Colombo AL, Garnica M, Aranha Camargo LF, Da Cunha CA, Bandeira AC, Borghi D, et al. *Candida glabrata*: An emerging pathogen in Brazilian tertiary care hospitals. *Med Mycol.* 2013;51(1):38–44.
22. De Chiara G, Marcocci ME, Sgarbanti R, Civitelli L, Ripoli C, Piacentini R, et al. Infectious agents and neurodegeneration. *Mol Neurobiol.* 2012;46(3):614–38.
23. de Kruif MD, Lemaire LC, Giebelen IA, van Zoelen MAD, Pater JM, van den Pangaart PS, et al. Prednisolone Dose-Dependently Influences Inflammation and Coagulation during Human Endotoxemia. *J Immunol* [Internet]. 2007;178(3):1845–51. Available from: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.178.3.1845>
24. Delfino D, Scordino F, Pernice I, Lo Passo C, Galbo R, David A, et al. Potential association of specific *Candida parapsilosis* genotypes, bloodstream infections and

colonization of health workers' hands. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. European Society of Clinical Infectious Diseases; 2014;20(11):O946–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12685>

25. Ding X, Yan D, Sun W, Zeng Z, Su R, Su J. Epidemiology and risk factors for nosocomial *Non-Candida albicans* candidemia in adult patients at a tertiary care hospital in North China. *Med Mycol*. 2015;53(7):684–90.

26. Doi AM, Pignatari ACC, Edmond MB, Marra AR, Camargo LFA, Siqueira RA, et al. Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. *PLoS One*. 2016;11(1):e0146909.

27. Dotis J, Prasad PA, Zaoutis T, Roilides E. Epidemiology, Risk Factors and Outcome of *Candida parapsilosis* Bloodstream Infection in Children. *Pediatr Infect Dis J*. 2012;31(6):557–60.

28. Eggimann P, Garbino J, Pittet D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis*. 2003;3(11):685–702.

29. Epp LM, Mravec B. Chronic polysystemic candidiasis as a possible contributor to onset of idiopathic Parkinson's disease. *Bratisl Lek Listy*. 2006;107(6–7):227–30.

30. Faix RG, Chapman RL. Central Nervous System Candidiasis in the High-risk Neonate. *Semin Perinatol*. 2003;27(5):384–92.

31. Fanci R, Guidi S, Bonolis M, Bosi A. *Candida krusei* fungemia in an unrelated allogeneic hematopoietic stem cell transplant patient successfully treated with Caspofungin [3]. *Bone Marrow Transplant*. 2005;35(12):1215–6.

32. Fè d'Ostiani C, Del Sero G, Bacci A, Montagnoli C, Spreca A, Mencacci A, et al. Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus *Candida albicans*. Implications for initiation of T helper cell immunity in vitro and in vivo. *J Exp Med* [Internet]. 2000;191(10):1661–73. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2193147&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

33. Fennelly AM, Slenker AK, Murphy LC, Moussouttas M, Desimone JA. *Candida* cerebral abscesses: A case report and review of the literature. *Med Mycol*. 2013;51(7):779–84.

34. Fidel PL, Vazquez JA, Sobel JD. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 1999;12(1):80–96. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=88907&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

35. Forastiero A, Garcia-Gil V, Rivero-Menendez O, Garcia-Rubio R, Monteiro MC, Alastruey-Izquierdo A, et al. Rapid Development of *Candida krusei* Echinocandin Resistance during Caspofungin Therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(11):6975–82.

36. Fraga-Silva TF de C, Venturini J, de Arruda MSP. Trafficking of phagocytic peritoneal cells in hypoinsulinemic-hyperglycemic mice with systemic candidiasis. *BMC Infect Dis* [Internet]. *BMC Infectious Diseases*; 2013;13(1). Available from: *BMC Infectious Diseases*
37. Fridkin SK, Jarvis WR. Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol Rev*. 1996;9(4):499–511.
38. Fu Y, Phan QT, Luo G, Solis N V., Liu Y, Cormack BP, et al. Investigation of the function of *Candida albicans* Als3 by heterologous expression in *Candida glabrata*. *Infect Immun*. 2013;81(7):2528–35.
39. Glass KA, Longley SJ, Bliss JM, Shaw SK. Protection of *Candida parapsilosis* from neutrophil killing through internalization by human endothelial cells. *Virulence*. 2015;6(5):504–14.
40. Gokcebay DG, Yarali N, Isik P, Bayram C, Ozkaya-Parlakay A, Kara A, et al. *Candida* associated bloodstream infections in pediatric hematology patients: A single center experience. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2016;8(1):4–9.
41. Gold R, Wolinsky JS. Pathophysiology of multiple sclerosis and the place of teriflunomide. *Acta Neurol Scand*. 2011;124(2):75–84.
42. Góral ska K, Blaszkowska J, Dzikowiec M. Neuroinfections caused by fungi. *Infection* [Internet]. Springer Berlin Heidelberg; 2018;46(4):443–459. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s15010-018-1152-2>
43. Guinea J. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. *European Society of Clinical Infectious Diseases*; 2014;20(6):5–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12539>
44. Guo W, Gu HF, Zhang HG, Chen SB, Wang JQ, Geng SX, et al. An outbreak of *Candida parapsilosis* fungemia among preterm infants. *Genet Mol Res*. 2015;14(4):18259–67.
45. Gupta A, Varma A, Gupta A. *Candida glabrata* candidemia: An emerging threat in critically ill patients. *Indian J Crit Care Med* [Internet]. 2015;19(3):151–4. Available from: <http://www.ijccm.org/text.asp?2015/19/3/151/152757>
46. Güzel AB, Aydin M, Meral M, Kalkanci A, Ilkit M. Clinical characteristics of Turkish women with *Candida krusei* vaginitis and antifungal susceptibility of the *C. krusei* isolates. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2013;2013.
47. Haddadi P, Zareifar S, Badiie P, Alborzi A, Mokhtari M, Zomorodian K, et al. Yeast colonization and drug susceptibility pattern in the pediatric patients with neutropenia. *Jundishapur J Microbiol*. 2014;7(9):1–6.
48. Hegazi MA, Abdelkader AM, Zaki ME, El-Deek BS. Characteristics and risk

factors of candidemia in pediatric intensive care unit of a tertiary care children's hospital in Egypt. *J Infect Dev Ctries*. 2014;8(5):624–34.

49. Huong DT, Zhao Y, Nguyet NT, Loan TT, Binh NTT, Thinh N Van, et al. *Candida krusei* colonization in patients with gastrointestinal diseases. *Med Mycol*. 2013;(November):884–7.
50. Jacobsen ID, Brunke S, Seider K, Schwarzmüller T, Firon A, D'Enfert C, et al. *Candida glabrata* persistence in mice does not depend on host immunosuppression and is unaffected by fungal amino acid auxotrophy. *Infect Immun*. 2010;78(3):1066–77.
51. Jong, A. Y., Stins, M. F., Huang, S.-H., Chen, S. H. M., & Kim KS. Traversal of *Candida albicans* across human blood-brain barrier in vitro. *Infect Immun*. 2001;69(7):4536–44.
52. Jordan I, Hernandez L, Balaguer M, López-Castilla JD, Casanueva L, Shuffelman C, et al. *C. albicans*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* invasive infections in the PICU: clinical features, prognosis and mortality. *Rev Esp Quimioter* [Internet]. 2014;27(1):56–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24676244>
53. Karyotakis NC, Dignani MC, Anaissie EJ. SCH 51048, a new antifungal triazole active against hematogenous *Candida krusei* infections in neutropenic mice. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39(3):775–7.
54. Kasper L, Seider K, Hube B. Intracellular survival of *Candida glabrata* in macrophages: Immune evasion and persistence. *FEMS Yeast Res*. 2015;15(5):1–12.
55. Katiyar S, Shiffrin E, Shelton C, Healey K, Vermitsky JP, Edlind T. Evaluation of polymorphic locus sequence typing for *Candida glabrata* epidemiology. *J Clin Microbiol*. 2016;54(4):1042–50.
56. Khandelwal N, Gupta V, Singh P. Central nervous system fungal infections in tropics. *Neuroimaging Clin N Am* [Internet]. Elsevier Inc; 2011;21(4):859–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nic.2011.07.006>
57. Kobayashi-Sakamoto M, Tamai R, Isogai E, Kiyoura Y. Gastrointestinal colonisation and systemic spread of *Candida albicans* in mice treated with antibiotics and prednisolone. *Microb Pathog* [Internet]. Elsevier Ltd; 2018;117(July 2017):191–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.02.043>
58. Kundu G, Noverr MC. Exposure to host or fungal PGE2 abrogates protection following immunization with *Candida*-pulsed dendritic cells. *Med Mycol*. 2011;49(4):380–94.
59. Kurokawa CS, Araujo JP, Soares AMVC, Sugizaki MF, Peraçoli MTS. Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines Produced by Human Monocytes Challenged In Vitro with *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbiol Immunol*. 2007;51(4):421–8.
60. Li D, Zhang W, Zheng S, Ma Z, Zhang P, Liu Z. Surveillance study of candidemia

in cancer patients in North China. *Med Mycol*. 2013;51(4):378–84.

61. Li H, Gong H, Qi Y, Li J, Ji X, Sun J, et al. In vitro and in vivo antifungal activities and mechanism of heteropolytungstates against *Candida* species. *Sci Rep* [Internet]. Springer US; 2017;7(1):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-17239-8>

62. Lin CC, Liu CP, Hsieh FC, Lee CM, Wang WS. Antimicrobial susceptibility and clinical outcomes of *Candida parapsilosis* bloodstream infections in a tertiary teaching hospital in Northern Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* [Internet]. Elsevier Taiwan LLC; 2015;48(5):552–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmii.2014.07.007>

63. Lionakis MS, Lim JK, Lee C-CR, Murphy PM. Organ-Specific Innate Immune Responses in a Mouse Model of Invasive Candidiasis. *J Innate Immun* [Internet]. 2011;3(2):180–99. Available from: <http://www.karger.com/doi/10.1159/000321157>

64. Liu Y, Mittal R, Solis NV, Prasadara NV, Filler SG. Mechanisms of *Candida albicans* trafficking to the brain. *PLoS Pathog*. 2011;7(10):1–13.

65. Lopez R, Hunter AR, Geoghegan O, Demertzi E. *Candida parapsilosis* osteomyelitis. *BMJ Case Rep*. 2014;2014:1–4.

66. Majithiya J, Sharp A, Parmar A, Denning DW, Warn PA. Efficacy of isavuconazole, voriconazole and fluconazole in temporarily neutropenic murine models of disseminated *Candida tropicalis* and *Candida krusei*. *J Antimicrob Chemother*. 2009;63(1):161–6.

67. Marchetti O, Bille J, Fluckiger U, Eggimann P, Ruet C, Garbino J, et al. Epidemiology of Candidemia in Swiss Tertiary Care Hospitals: Secular Trends, 1991–2000. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2004;38(3):311–20. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/380637>

68. Mattson MP. Energy Intake and Exercise as Determinants of Brain Health and Vulnerability to Injury and Disease. *Cell Metab*. 2012;16(6):706–22.

69. Murthy JMK, Sundaram C. Fungal infections of the central nervous system [Internet]. 1st ed. Vol. 121, *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier B.V.; 2014. 1383-1401 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-7020-4088-7.00095-X>

70. Németh T, Tóth A, Szenzenstein J, Horváth P, Nosanchuk JD, Grózer Z, et al. Characterization of Virulence Properties in the *C. parapsilosis* *Sensu Lato* Species. *PLoS One*. 2013;8(7):1–10.

71. Netea MG, Gow NAR, Munro CA, Bates S, Collins C, Ferwerda G, et al. Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *J Clin Invest*. 2006;116(6):1642–50.

72. Netea MG, Stuyt RJL, Kim S, Meer JWM Van Der, Kullberg BJ, Dinarello CA. The Role of Endogenous Interleukin (IL)– 18 , IL-12 , IL-1 b , and Tumor Necrosis Factor

– a in the Production of Interferon- γ Induced by *Candida albicans* in Human Whole-Blood Cultures. *J Infect Dis* 2002;185:963–70.

73. Nevitt T, Thiele DJ. Host iron withholding demands siderophore utilization for *Candida glabrata* to survive macrophage killing. *PLoS Pathog*. 2011;7(3):1–15.

74. Oliveira VKP, Ruiz L da S, Oliveira NAJ, Moreira D, Hahn RC, Melo AS de A, et al. FUNGEMIA CAUSED BY *Candida* SPECIES IN A CHILDREN'S PUBLIC HOSPITAL IN THE CITY OF SÃO PAULO, BRAZIL: STUDY IN THE PERIOD 2007-2010. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* [Internet]. 2014;56(4):301–5. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652014000400301&lng=en&tling=en

75. Pammi M, Holland L, Butler G, Gacser A, Bliss JM. *Candida parapsilosis* is a Significant Neonatal Pathogen: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Pediatr Infect Dis J*. 2013;32(5):e206–16.

76. Panackal AA, Williamson PR. Fungal infections of the central nervous system. *Continuum (N Y)*. 2015;21(6):1662–78.

77. Papon N, Courdavault V, Clastre M, Bennett RJ. Emerging and Emerged Pathogenic *Candida* Species: Beyond the *Candida albicans* Paradigm. *PLoS Pathog*. 2013;9(9):1–4.

78. Pappas PG, Alexander BD, Andes DR, Hadley S, Kauffman CA, Freifeld A, et al. Invasive Fungal Infections among Organ Transplant Recipients: Results of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET). *Clin Infect Dis* [Internet]. 2010;50(8):1101–11. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/651262>

79. Parker JC, McCloshey JJ, Lee RS. Original Contributions HUMAN CEREBRAL CANDIDOSIS – A POSTMORTEM EVALUATION OF 19 PATIENTS. *Hum Pathol*. 1981;12(1):23–8.

80. Parmeland L, Gazon M, Guerin C, Argaud L, Lehot JJ, Bastien O, et al. *Candida albicans* and non-*Candida albicans* fungemia in an institutional hospital during a decade. *Med Mycol*. 2013;51(1):33–7.

81. Pelemiš M, Stevanović G, Lavadinović L, Matić S, Milošević I, Korać M, et al. A rare case of *Candida parapsilosis* endocarditis in a young healthy woman--case report. *J Cardiothorac Surg* [Internet]. 2013;8:29. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3599937&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

82. Pereira T dos SF, Silva Alves J de FC, Gomes CC, Nascimento AR do, Stoianoff MA de R, Gomez RS. Kinetics of oral colonization by *Candida* spp. during topical corticotherapy for oral lichen planus. *J Oral Pathol Med*. 2014;43(8):570–5.

83. Perlroth J, Choi B, Spellberg B. Nosocomial fungal infections: Epidemiology, diagnosis, and treatment. *Med Mycol*. 2007;45(4):321–46.

84. Pfaller MA, Andes DR, Diekema DJ, Horn DL, Reboli AC, Rotstein C, et al. Epidemiology and outcomes of invasive candidiasis due to non-albicans species of *Candida* in 2,496 patients: Data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH) registry 2004-2008. *PLoS One*. 2014;9(7):1–12.
85. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: A persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20(1):133–63.
86. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Nagy E, Dobiasova S, et al. *Candida krusei*, a multidrug-resistant opportunistic fungal pathogen: Geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. *J Clin Microbiol*. 2008;46(2):515–21.
87. Pfaller MA, Diekema DJ. MINIREVIEW Role of Sentinel Surveillance of Candidemia : Trends in Species Distribution and Antifungal Susceptibility. *J Clin Microbiol*. 2002;40(10):3551–7.
88. Pfaller MA, Messer SA, Hollis RJ, Boyken L, Tendolkar S, Kroeger J, et al. Variation in susceptibility of bloodstream isolates of *Candida glabrata* to fluconazole according to patient age and geographic location in the United States in 2001 to 2007. *J Clin Microbiol*. 2009;47(10):3185–90.
89. Pfaller MA, Moet GJ, Messer SA, Jones RN, Castanheira M. Geographic variations in species distribution and echinocandin and azole antifungal resistance rates among *Candida* bloodstream infection isolates: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008 to 2009). *J Clin Microbiol*. 2011;49(1):396–9.
90. Pisa D, Alonso R, Carrasco L. Fungal infection in a patient with multiple sclerosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2011;30(10):1173–80. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10096-011-1206-1>
91. Pisa D, Alonso R, Jiménez-Jiménez FJ, Carrasco L. Fungal infection in cerebrospinal fluid from some patients with multiple sclerosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2013;32(6):795–801. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10096-012-1810-8>
92. Pisa D, Alonso R, Rábano A, Rodal I, Carrasco L. Different Brain Regions are Infected with Fungi in Alzheimer's Disease. *Sci Rep* [Internet]. Nature Publishing Group; 2015;5:1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep15015>
93. Puig-Asensio M, Padilla B, Garnacho-Montero J, Zaragoza O, Aguado JM, Zaragoza R, et al. Epidemiology and predictive factors for early and late mortality in *Candida* bloodstream infections: A population-based surveillance in Spain. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(4):O245–54.
94. Purzycki CB, Shain DH. Fungal toxins and multiple sclerosis: A compelling connection. *Brain Res Bull* [Internet]. Elsevier Inc.; 2010;82(1–2):4–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2010.02.012>

95. Ramage G, Rajendran R, Sherry L, Williams C. Fungal biofilm resistance. *Int J Microbiol*. 2012;2012:1–14.
96. Ratnaseelan AM, Tsilioni I, Theoharides TC. Effects of Mycotoxins on Neuropsychiatric Symptoms and Immune Processes. *Clin Ther* [Internet]. Elsevier HS Journals, Inc.; 2018;40(6):903–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinthera.2018.05.004>
97. Reboli AC. Editorial commentary: Is the debate about treatment of *Candida parapsilosis* complex infections with echinocandins much ado about nothing? *Clin Infect Dis*. 2014;58(10):1422–3.
98. Romão D, Cavalheiro M, Mil-Homens D, Santos R, Pais P, Costa C, et al. A New Determinant of *Candida glabrata* Virulence: The Acetate Exporter CgDtr1. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2017;7(November):1–10. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2017.00473/full>
99. Rossoni RD, Barros PP de, Freire F, Santos JD dos, Jorge AOC, Junqueira JC. Study of Microbial Interaction Formed by *Candida krusei* and *Candida glabrata*: In Vitro and In Vivo Studies. *Braz Dent J* [Internet]. 2017;28(6):669–74. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-64402017000600669&lang=pt%0Ahttp://www.scielo.br/pdf/bdj/v28n6/1806-4760-bdj-28-06-669.pdf
100. Ruan SY, Hsueh PR. Invasive candidiasis: An overview from Taiwan. *J Formos Med Assoc* [Internet]. Formosan Medical Association & Elsevier; 2009;108(6):443–51. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0929-6646\(09\)60091-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0929-6646(09)60091-7)
101. Sabino R, Sampaio P, Carneiro C, Rosado L, Pais C. Isolates from hospital environments are the most virulent of the *Candida parapsilosis* complex. *BMC Microbiol* [Internet]. BioMed Central Ltd; 2011;11(1):180. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/11/180>
102. Sabino R, Sampaio P, Rosado L, Videira Z, Grenouillet F, Pais C. Analysis of clinical and environmental *Candida parapsilosis* isolates by microsatellite genotyping- a tool for hospital infection surveillance. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. Elsevier Ltd; 2015;21(10):954.e1-954.e8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2015.06.001>
103. Saijo S, Iwakura Y. Dectin-1 and Dectin-2 in innate immunity against fungi. *Int Immunol*. 2011;23(8):467–72.
104. Saroukolaei SA, Ghabaee M, Shokri H, Badiei A, Ghourchian S. The role of *Candida albicans* in the severity of multiple sclerosis. *Mycoses*. 2016;59(11):697–704.
105. Savastano C, de Oliveira Silva E, Gonçalves LL, Nery JM, Silva NC, Dias ALT. *Candida glabrata* among *Candida* spp. From environmental health practitioners of a Brazilian hospital. *Brazilian J Microbiol*. 2016;47(2):367–72.

106. Schwartz S, Kontoyiannis DP, Harrison T, Ruhnke M. Advances in the diagnosis and treatment of fungal infections of the CNS. *Lancet Neurol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2018;17(4):362–72. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30030-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30030-9)
107. Scorzoni L, de Lucas MP, Mesa-Arango AC, Fusco-Almeida AM, Lozano E, Cuenca-Estrella M, et al. Antifungal Efficacy during *Candida krusei* Infection in Non-Conventional Models Correlates with the Yeast In Vitro Susceptibility Profile. *PLoS One*. 2013;8(3):1–13.
108. Shintaku T, Glass KA, Hirakawa MP, Longley SJ, Bennett RJ, Bliss JM, et al. Human endothelial cells internalize *Candida parapsilosis* via n-wasp-mediated endocytosis. *Infect Immun*. 2013;81(8):2777–87.
109. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: Biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev*. 2012;36(2):288–305.
110. Srinivasnakshatri VK, Subramani P, Venkateshwaraprasad KN, Varma P. A fatal case of fungal empyema due to *Candida Krusei* and *Candida tropicalis*: A rare occurrence with an atypical presentation. *J Clin Diagnostic Res*. 2014;8(11):DD01-DD02.
111. Storti LR, Pasquale G, Scomparim R, Galastri AL, Alterthum F, Gambale W, et al. *Candida* spp. isolated from inpatients, the environment, and health practitioners in the pediatric unit at the University Hospital of the Jundiaí Medical College, state of São Paulo, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. 2012;45(2):225–31. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822012000200017&lng=en&tlng=en
112. Tomczak H, Szalek E, Grześkowiak E. The problems of urinary tract infections with *Candida* spp. aetiology in women. *Postepy Hig Med Dosw*. 2014;68:1036–9.
113. Tóth A, Csonka K, Jacobs C, Vágvölgyi C, Nosanchuk JD, Netea MG, et al. *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* induce different T-cell responses in human peripheral blood mononuclear cells. *J Infect Dis*. 2013;208(4):690–8.
114. Treviño-Rangel RDJ, González GM, Martínez-Castilla AM, García-Juárez J, Robledo-Leal ER, González JG, et al. *Candida parapsilosis* complex induces local inflammatory cytokines in immunocompetent mice. *Med Mycol*. 2015;53(6):612–21.
115. Turner SA, Butler G. The *Candida* pathogenic species complex. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014;4(9):1–17.
116. van de Veerdonk FL, Netea MG, Joosten LA, van der Meer JWM, Kullberg BJ. Novel strategies for the prevention and treatment of *Candida* infections: The potential of immunotherapy. *FEMS Microbiol Rev*. 2010;34(6):1063–75.
117. Wells CL, Johnson MA, Henry-Stanley MJ, Bendel CM. *Candida glabrata*

colonizes but does not often disseminate from the mouse caecum. *J Med Microbiol.* 2007;56(5):688–93.

118. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial Bloodstream Infections in US Hospitals: Analysis of 24,179 Cases from a Prospective Nationwide Surveillance Study. *Clin Infect Dis.* 2004;39:309–17.

119. Xiong J, Kang K, Liu L, Yoshida Y, Cooper KD, Ghannoum MA. *Candida albicans* and *Candida krusei* differentially induce human blood mononuclear cell interleukin-12 and gamma interferon production. *Infect Immun.* 2000;68(5):2464–9.

120. Yampolsky C, Corti M, Negroni R. Fungal cerebral abscess in a diabetic patient successfully treated with surgery followed by prolonged antifungal therapy. *Rev Iberoam Micol* [Internet]. Elsevier; 2010;27(1):6–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2009.12.001>

121. Yan S, Deng X, Wang Q, Sun X, Wei W. Prednisone treatment inhibits the differentiation of B lymphocytes into plasma cells in MRL/MpSlac-lpr mice. *Acta Pharmacol Sin* [Internet]. Nature Publishing Group; 2015;36(11):1367–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26456588> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4635331>

122. Yashavanth R, Shiju MP, Bhaskar UA, Ronald R, Anita KB. Candiduria: Prevalence and trends in antifungal susceptibility in a tertiary care hospital of Mangalore. *J Clin Diagnostic Res.* 2013;7(11):2459–61.

CAPÍTULO II

4 ARTIGO CIENTÍFICO

Frontiers in Microbiology - Original Research

Corticotherapy is associated with increased fungal load in the CNS of non-*albicans Candida* species infected mice

Marcelo D'Alessandre Sanches¹, Luiza Ayumi Nishiyama Mimura², Larissa Ragozo Cardoso de Oliveira¹, Larissa Lumi Watanabe Ishikawa², Alexandrina Sartori², Cilmary Suemi Kurokawa¹ and Thais Fernanda de Campos Fraga-Silva^{1*}.

¹São Paulo State University (Unesp), Medical School, Botucatu, Brazil; ²São Paulo State University (Unesp), Institute of Biosciences, Botucatu, Brazil.

*Corresponding author:

e-mail: thaisfragasilva@gmail.com

Abstract

The genus *Candida* includes commensal fungi that can cause local and systemic infections, with frequent involvement of vital organs, include central nervous system (CNS). *Candida* spp. occupy the fourth place among infections in the CNS. Although the incidence of *C. albicans* decreases among patients under immunosuppressive therapies, the incidence of non-*albicans Candida* increases. In this context, the objective of this work was to characterize the changes in the CNS after a systemic infection by non-*albicans Candida* species in immunocompetent and immunosuppressed mice. Adult female C57BL/6 mice were intravenously infected with *C. glabrata*, *C. krusei* and *C. parapsilosis* yeasts and were immunosuppressed with prednisolone. All *Candida* spp. disseminated to the brain and spinal cord samples from immunocompetent animals. The effect of prednisolone treatment was evaluated by body weight variation, microbiological and histopathological analysis of the CNS, and spleen cells cytokine production on days 3 and 14 post-infection. The immunosuppression resulted in body weight loss, in leukopenia and reduced IL-2 production in the spleen. At day 14 post-infection, CNS fungal load decreased in the immunocompetent mice and increased in the immunosuppressed ones. Inflammatory infiltration associated to a Th1 cells profile was higher in brain samples of *C. krusei* immunosuppressed compared with immunocompetent infected mice. Altogether, these results indicate that *C. glabrata*, *C. krusei* and *C. parapsilosis* are also able to disseminate, reach the CNS and promote local inflammation. In addition, they clearly show that corticotherapy increases fungal load in the CNS. It is possible that the neuroinflammation triggered by *Candida* can be even more deleterious in other CNS pathologies.

Keywords: *Candida* spp.; neuroinflammation; immunosuppression; prednisolone.

Introduction

The genus *Candida* includes commensal fungi that live in the human oral cavity, gastrointestinal and genitourinary tracts. In certain conditions, such as changes in the microbiota and loss of integrity of epithelial barriers, excessive growth or translocation of the fungus through the intestine may occur and cause local and systemic infections (Eggimann et al., 2003). Thus, *Candida* spp. are considered opportunistic commensal pathogens that promote infection under host predisposing conditions.

Systemic *Candida* infections affect vital organs, including the central nervous system (CNS) (Li et al., 2017). Morbidities in these infections are severe and comprise a broad spectrum of clinical symptoms, including brain abscesses, meningitis/meningoencephalitis, stroke/vasculitis and death (Murthy & Sundaram, 2014). The spread of this pathogen to the brain is more common in newborns (Faix & Chapman, 2003) and this is also responsible for most of the brain abscesses in immunocompromised patients (Yampolsky et al., 2010). *Candida* spp. occupy the fourth place among infections in the CNS (Panackal & Williamson, 2015).

To invade the CNS, fungi must cross the blood-brain barrier (BBB). *C. albicans* is able to pass through the human brain microvascular endothelial cells (HBMECs) via transcytosis and it is also able to generate pseudohyphae inside those cells (Jong et al., 2001). This process requires the initial binding of *C. albicans* to gp96, a heat shock protein, exclusively expressed in HBMECs (Liu et al., 2011). Als3 is a *C. albicans* invasin which binding to gp96 allows the internalization of the fungus by the endothelial cell and its dissemination to the CNS.

Neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, amyotrophic lateral sclerosis and multiple sclerosis (MS), constitute a heterogeneous group of CNS disorders that are characterized by a slow and irreversible loss of neuronal functions. Although the etiology of neurodegenerative diseases remains largely unknown (Pisa et al., 2015), some studies have suggested the possibility that infections reaching the CNS act as a cofactor in the induction of these diseases (Mattson, 2012; Saroukolaei et al., 2016; Góralaska et al., 2018). Evidences observed in MS patients support the possible contribution of *Candida* infections to the development of neurodegenerative and/or autoimmune diseases. Compared to normal/healthy subjects, MS patients present significantly higher levels of specific antibodies and *Candida* spp.-derived macromolecules in blood (Benito-León et al., 2010; Pisa et al., 2011) and in the cerebrospinal fluid (Pisa et al., 2013).

The incidence of *C. albicans* decreased in many countries, especially among patients under immunosuppressive therapies, while the incidence of non-*albicans Candida* increased (Yapar, 2014; Wu et al., 2017). Similarly, to *C. albicans*, non-*albicans Candida* species can also reach the CNS, disclosing the interesting possibility that they can present distinct neurotropism and also a specific behavior considering their spread to the CNS when hosts are under immunosuppressive therapy. Therefore, in the present study we evaluated the ability of three non-*albicans Candida* species to spread to the CNS in immunocompetent and immunosuppressed C57BL/6 mice.

Methods

Animals. Female C57BL/6 mice 9 to 11 weeks old were purchased from a specific pathogen-free facility at University of São Paulo (USP) (Ribeirão Preto, SP, Brazil). Mice were allocated in cages (maximum five animals per cage) with sterilized food and water *ad libitum* and were manipulated in accordance with the local Ethics Committee for Animal Experimentation, from São Paulo State University (UNESP) (Botucatu, SP, Brazil).

***Candida* spp. inoculum.** *C. glabrata* (H-3479), *C. krusei* (ATCC 6258) and *C. parapsilosis* (ATCC 90018) were originally obtained from the fungal collection of Mycology Laboratory (UNESP, Botucatu, SP, Brazil) and stored at -80°C in glycerol stocks. For mice infection, *Candida* spp. were cultured in Sabouraud-dextrose agar (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) for 24 hours, at 37°C, and carefully washed with sterile saline solution (SSS). The suspensions were centrifuged and washed twice at $450 \times g$ for 5 min at 4°C. The fungal concentration was adjusted to 5.0×10^7 viable yeast cells/mL in SSS and then inoculated into the lateral tail vein (0.1 mL/animal). For stimulation of cell cultures, the fungal suspensions were previously heat-killed.

Immunosuppression. The animals were immunosuppressed by administration of two subcutaneous injections of prednisolone (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at a dose of 100 mg/kg body weight delivered 1 day before and 3 days after the infection with *Candida* spp., adapted to Takakura et al. (2003).

Determination of fungal burden. Fourteen days after infection, mice were anesthetized with ketamine/xylazine and perfused with 10 mL of sterile saline solution. Brain, cervical spinal

cord and spleen were collected, weighted and macerated in 1.0 mL of SSS. Afterwards, 0.1 mL from each tissue homogenate was spread over culture plates containing Sabouraud-dextrose agar (Difco) using a Drigalski T loop. The plates were then sealed and incubated at 37°C for 3 days. The number of colony forming units (CFU) was normalized per gram of tissue and log transformed.

Spleen cell culture. Spleens were initially dissociated by sterile pestles and then the red blood cells were lysed with buffer containing NH₄Cl. The remaining cells were washed with RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) medium. Cells were adjusted to 5×10^6 cells/mL in RPMI medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), 2 mM of L-glutamine (Sigma-Aldrich) and 0.1% antibiotic-antimycotic (Sigma-Aldrich). Spleen cell cultures were stimulated with heat-killed *Candida* spp. (5 yeasts/cell) and were incubated at 37°C, 5% CO₂ in a humidified incubator for 48h. Cell-free supernatants were harvested and stored at -80°C for cytokine analysis.

Cytokine quantification. Cytokine levels were evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in culture supernatants using IFN- γ , IL-5 and IL-10 BD OptEIA Sets (Becton, Dickinson and Company, BD, Franklin, San Diego, CA, USA) and IL-2, IL-6, IL-17, and TNF- α DuoSets (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). The assays were performed according to the manufacturer's instructions.

Histopathology of the CNS. After euthanasia, brain and lumbar spinal cord samples were removed and fixed in 10% neutral buffered formalin. Paraffin slides with 4 μ m were stained with hematoxylin and eosin (HE) to evaluate the inflammatory process. A semi-quantitative analysis of CNS inflammation was performed according to the following criteria: (0) inflammatory infiltration absent; (1) mild inflammatory infiltration; (2) moderate inflammatory infiltration, and (3) intense inflammatory infiltration.

PCR Assays. Frozen brain samples were used for RNA extraction with Trizol reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and cDNA synthesis (RT-PCR) was performed according to the manufacturer's recommendations for the High Capacity RNA-to-cDNA converter kit (Life Technologies). Expression of *Rorc* (Mm01261022_m1), *Foxp3* (Mm00475162_m1), *Tbx21* (Mm00450960_m1) and *Gata3* (Mm00484683_m1) genes were analyzed based on GAPDH (Mm99999915_g1) reference gene levels. Real Time PCR was performed using

Taqman system according to manufacturer's recommendations (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Gene expression was represented as relative fold difference ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) using the Control (non-treated and non-infected) group as the calibrator.

Statistical Analysis. First, the results were analyzed by Shapiro-Wilk's test, to test for the normality of data. Comparisons between two samples were made by *t*-test and three or more samples were made by One Way ANOVA followed by Tukey's test. Data were analyzed using SigmaPlot statistical package for Windows version 12.0 (Jandel Corporation, CA, USA) and values of $P < 0.05$ were considered statistically significant. Graphs and figures were made in GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., San Diego, California, USA). Results were expressed as mean $\pm$ standard error of mean (SEM).

Results

Prednisolone affects body weight, fungal load and cytokine production of *Candida* spp. infected mice

The immunosuppression per se resulted in body weight loss, in leukopenia and reduced IL-2 production in the spleen (**Figure S1**). Prednisolone treatment determined significant body weight loss in mice infected with the three *Candida* spp. (**Figure 1A**). The treatment also increased spleen fungal load in *C. krusei* infected mice but not in *C. glabrata* and *C. parapsilosis* ones (**Figure 1B**). The efficacy of corticotherapy was supported by both, a decreased splenic leukocyte number (**Figure 1C**) and IL-2 production by spleen cells stimulated with heat-killed *Candida* spp. in infected mice (**Figure 1D**). IFN- γ and IL-17 production was not affected after prednisolone treatment (**Figure 1E,F**) whereas IL-5 was elevated in *C. krusei* and *C. parapsilosis* but not in mice infected with *C. glabrata* (**Figure 1G**). TNF- α , IL-6, and IL-10 levels were significantly elevated in prednisolone treated mice (**Figure 1H-J**).

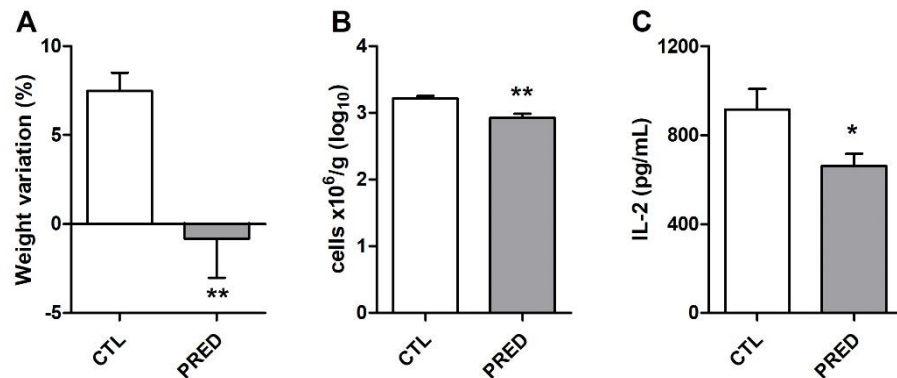


Figure S1. Effect of prednisolone in non-infected mice with 14 days. Body weight (A), total spleen leukocyte cell number (B) and production of IL-2 (C) by spleen cell cultures of immunocompetent (CTL) and immunosuppressed (PRED) non-infected mice. The results are expressed as mean $\pm$ SEM (*p<0.05 and **p<0.01 statistical difference between groups analyzed by *t* test; p <0.05; n = 8).

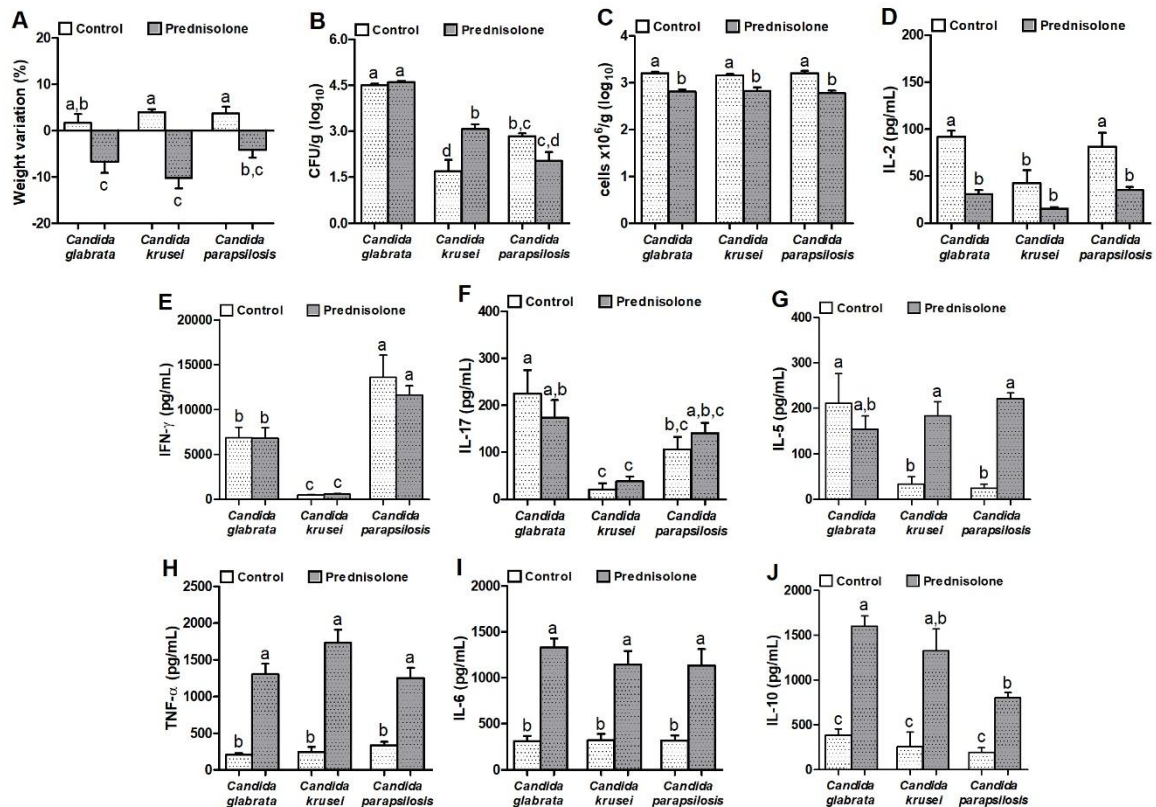


Figure 1. Effect of prednisolone on body weight, fungal load and cytokine production. Body weight (A), spleen fungal load (B), total spleen leukocyte cell number (C) and production of IL-2 (D), IFN- γ (E), IL-17 (F), IL-5 (G), TNF- α (H), IL-6 (I) and IL-10 (J) by spleen cell cultures of immunocompetent (Control) and immunosuppressed (Prednisolone) infected-mice. The results are expressed as mean $\pm$ SEM (different letters indicate statistical difference among groups analyzed by One-way ANOVA with post-hoc Tukey test; p <0.05; n = 8).

***Candida* spp. reached the brain of immunocompetent mice**

Mice were infected with *C. glabrata*, *C. krusei* or *C. parapsilosis* and evaluated 3 and 14 days after infection. All three *Candida* spp. were able to spread to the brain and to trigger a local inflammation in already 3 days after infection. Nevertheless, on day 14, all the groups exhibited a diminished fungal load (**Figure 2A**); *C. glabrata* showed the highest fungal load whereas *C. parapsilosis* showed the lowest fungal burden in both analyzed periods, that is, 3 and 14 days. Histological scoring of inflammation was similar among groups and periods (**Figure 2B**); the three *Candida* spp. induced inflammatory infiltration in the brain meninges and parenchyma (gray matter and white matter) (**Figure 2C**).

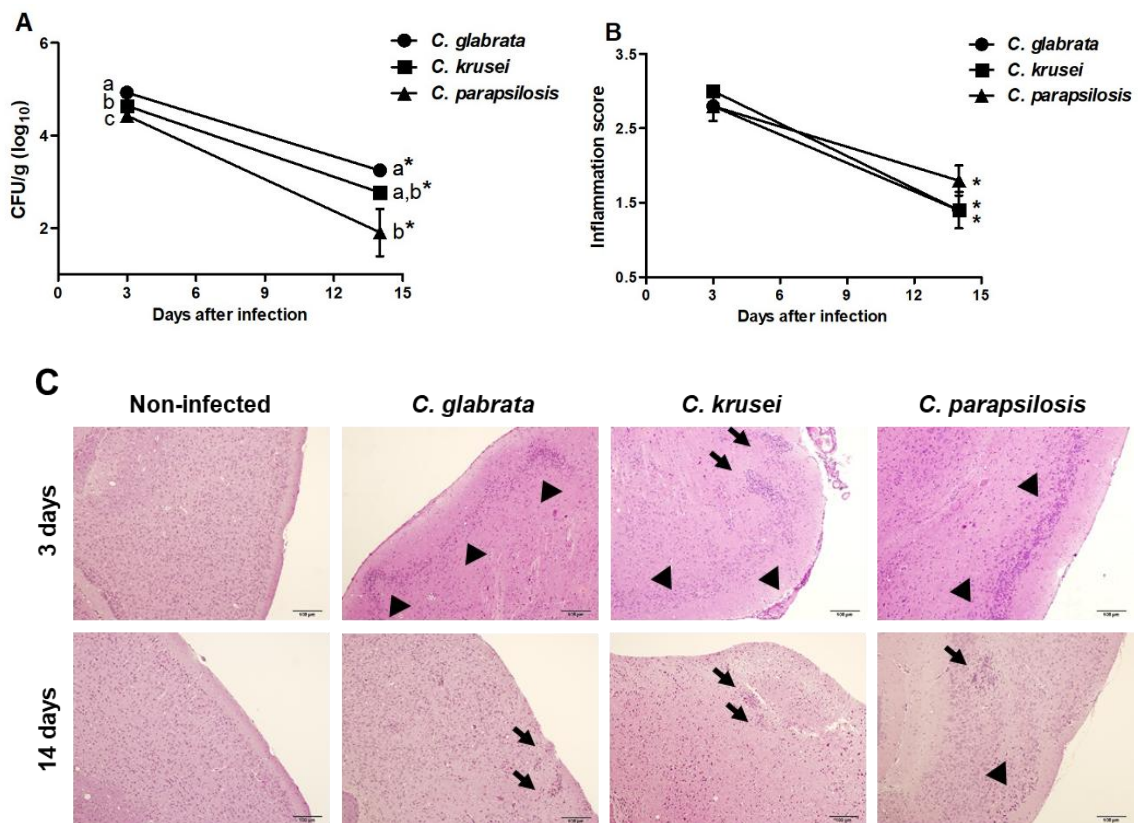


Figure 2. Dissemination of *Candida* spp. to the brain and inflammatory infiltration in immunocompetent infected mice. Brain fungal load (A) and inflammation score (B) of *C. glabrata*, *C. krusei* and *C. parapsilosis* in brain samples. Inflammatory infiltration (C) in brain samples were evaluated at 3 and 14 days after infection. The results are expressed as mean $\pm$ SEM (*indicate statistical difference between 3 and 14 days analyzed by unpaired t-test; different letters indicate statistical difference among groups analyzed by One-way ANOVA with post-hoc Tukey test; $p < 0.05$; $n = 5$). Arrowheads indicate diffuse inflammatory infiltration and arrows indicate focus of inflammatory infiltration.

Corticotherapy enhances fungal load and inflammation at the CNS

Mice infected with *C. glabrata*, *C. krusei* or *C. parapsilosis* were treated with prednisolone and evaluated 14 days after the infection. Corticotherapy increased fungal load in the CNS, being the brain (Figure 3A) and the spinal cord (Figure 3B) both affected. Interestingly, fungal loads at the spinal cord were differently affected by prednisolone treatment, *C. krusei* and *C. parapsilosis* infected mice presented significantly higher fungal load than *C. glabrata*. Treatment with prednisolone significantly increased brain inflammation only in *C. krusei* infected mice (Figure 3C). In spite of the presence of *Candida* spp. on the spinal cord, no inflammatory infiltrates were detected in sections stained with HE.

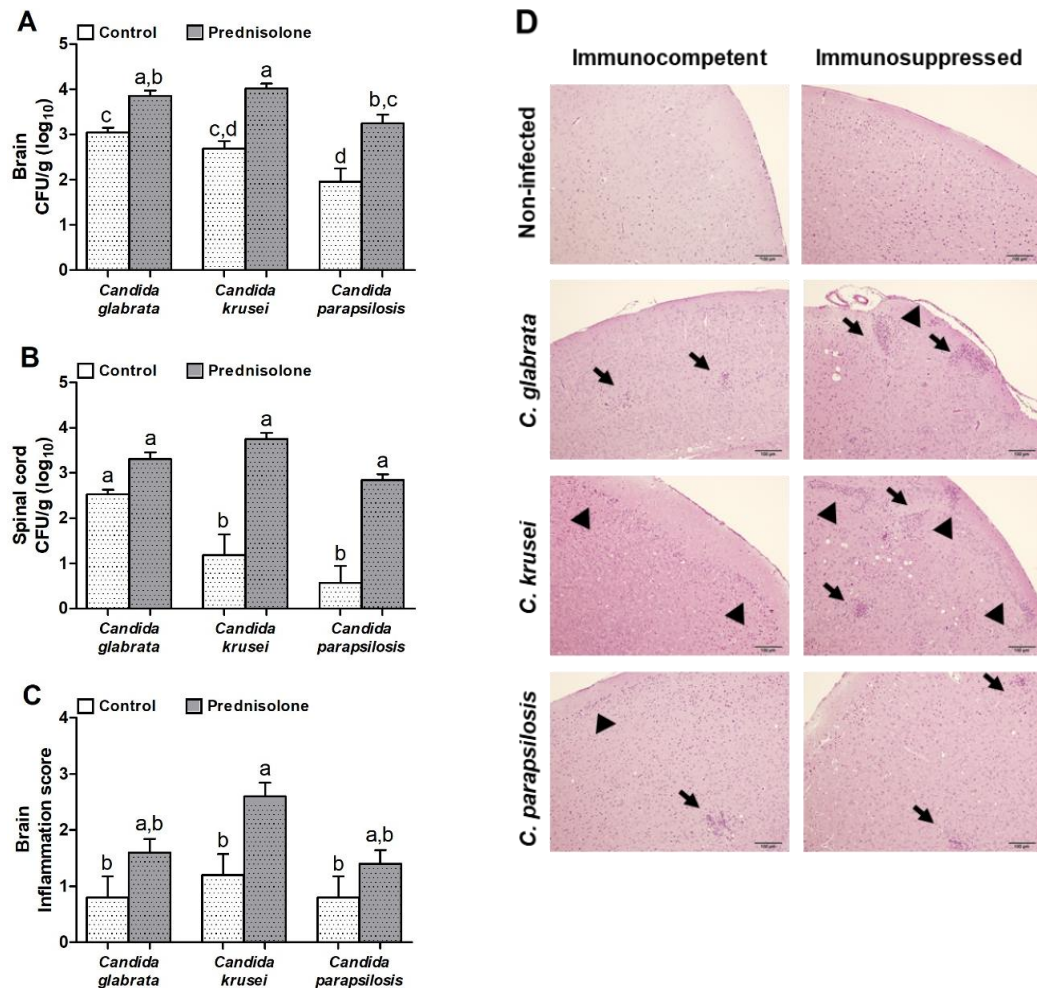


Figure 3. Effect of corticotherapy in the fungal load and inflammation at the central nervous system. Fungal load of *C. glabrata*, *C. krusei* and *C. parapsilosis* in brain (A) and spinal cord (B) samples and inflammation score (C) in brain samples (D) of immunocompetent (Control) and immunosuppressed (Prednisolone) infected mice. The results are expressed as mean $\pm$ SEM (different letters indicate statistical difference among groups analyzed by One-way ANOVA with post-hoc Tukey test; $p < 0.05$; $n = 8$ for CFU and $n = 5$ for inflammation score). Arrowheads indicate diffuse inflammatory infiltration and arrows indicate focus of inflammatory infiltration.

Prednisolone triggers Th1 neuroinflammation in *C. krusei* infection

Quantification of mRNA transcription factors indicated that Rorc (Th17 signature) (**Figure 4A**) and Foxp3 (Treg signature) (**Figure 4B**) were similarly expressed in the brain of prednisolone treated and not treated infected mice. Also, no differences were observed concerning the three *Candida* spp. However, clear differences were detected when Tbx21 (Th1 signature) and Gata3 (Th2 signature) were evaluated. *C. krusei* immunosuppressed mice showed a higher mRNA expression of Tbx21 compared to *C. krusei* immunocompetent mice (**Figure 4C**). Differently, this group showed a lower mRNA expression of Gata3 compared to *C. krusei* immunocompetent mice (**Figure 4D**).

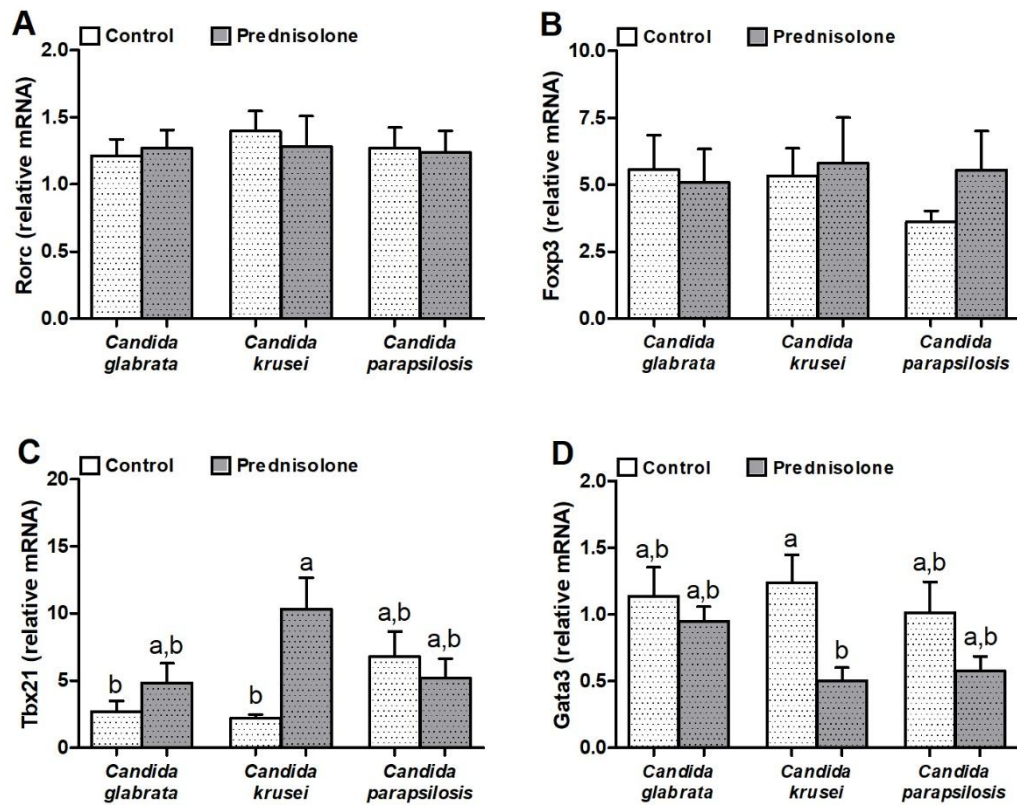


Figure 4. Effect of *Candida* spp. on the infiltration of T subsets at the CNS. Relative mRNA expression of Rorc (A), Foxp3 (B), Tbx21 (C) and Gata3 (D) in brain samples of immunocompetent (Control) and immunosuppressed (Prednisolone) infected mice. The results are expressed as mean $\pm$ SEM (different letters indicate statistical difference among groups analyzed by One-way ANOVA with post-hoc Tukey test; $p < 0.05$; $n = 6$).

Discussion

The number of fungal diseases in the central nervous system (CNS) has increased during the

past few years. Even though some fungi can trigger pathologies in healthy subjects, most of these agents provoke illness in previously immunocompromised hosts.

A variety of clinical manifestations can be initiated by fungal infections as meningitis, encephalitis, hydrocephalus, cerebral abscesses and even stroke syndromes (Górska et al., 2018). A possible link between fungal infections and other pathologies involving the CNS have been described and include Parkinson's disease (Epp & Mravec, 2006), Alzheimer's disease (Pisa et al., 2015), autism (Ratnaseelan et al., 2018) and multiple sclerosis (MS) (Alonso et al., 2018). Two different theories could explain this relation, one possibility is the molecular mimicry between some microbial and host antigens (Chastain & Miller, 2012) and the second possibility is that the infection itself is responsible for the focal lesions in the CNS (Alonso et al., 2018). On both, the immune system is activated by the microbial infection and could initiate or enhance neuroinflammation.

We recently demonstrated that a systemic infection by *Candida albicans* reaches the CNS and significantly increases the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis, a mouse model of MS (Fraga-Silva et al., 2015). In this investigation, we hypothesized if other *Candida* specie would be also able to reach the CNS during an experimental systemic infection in mice. To mimicry the natural conditions, in which installation in the CNS is more prevalent in immunosuppressed subjects, the mice were submitted to a corticotherapy with prednisolone. C57BL/6 female mice were therefore infected with *C. glabrata*, *C. krusei* or *C. parapsilosis* by the lateral vein and disease evolution was checked at 14 days after infection.

Prednisolone treatment, following a protocol described by Takakura et al. (2003), significantly reduced body weight in mice infected with any of the three *Candida* species. This finding was expected and is well documented by literature and it has been mainly attributed to catabolic effects in skeletal muscles (Sali et al., 2012). The effectiveness of corticotherapy was additionally supported by a reduced splenic cell number. Even though the total number of T cells in the spleen was not determined, the reduced spleen cell number was possibly due to T cell apoptosis that has been consistently associated with corticosteroid effects (Herold et al., 2006). The involution of lymphoid tissues in response to treatment with corticosteroid involves the death of mature lymphocytes and inhibition of mitosis in immature lymphocytes (Douglierty, 1959). High doses of glucocorticoids induce apoptosis in T cells and other immune cells such as thymocytes, B cells, macrophages, mature dendritic cells, eosinophils, and natural killer cells (Gruver-Yates & Cidlowski, 2013). Apoptosis associated with glucocorticoids involves the activation of intrinsic and extrinsic apoptotic pathways (Smith & Cidlowski, 2010).

Prednisolone treatment also determined clear alterations in cytokine production by splenic cells stimulated with the corresponding *Candida* spp. antigens. As expected, we observed an IL-2 reduction. Besides the reduced number of T cells, which may be associated with the reduced levels of IL-2, it is known that corticosteroids can interfere with IL-2 binding by modulating the binding itself and/or signal processing function of the IL-2 receptor (Horst & Flad, 1987). Most of the cytokines, such as IL-1 β , TNF- α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 and IFN- γ , are down-regulated by corticosteroids through inactivation of pro-inflammatory transcription factors (AP-1, NF κ B), up-regulation of the expression of cytokine inhibitory proteins (IkB) and also by reducing the half-life of cytokine mRNAs (Brattsand & Linden, 1996).

Surprisingly, TNF- α , IL-5, IL-6 and IL-10 levels were clearly elevated in comparison to non-treated infected mice and INF- γ and IL-17 production were not changed by corticotherapy. These unexpected results could be associated to the time-point chose for evaluation, that is, 14 days after infection. The effects of prednisolone on the immune system tend to be short-lived and may subside within 24 to 48 hours after drug administration (Hanson et al., 1986).

An elevation of the splenic fungal load was also anticipated in prednisolone treated mice, however, only *C. krusei* presented a significant increased amount of fungi in this organ. Coincidentally, *C. krusei* infected mice were clearly different in terms of cytokine production. These animals produced less IL-2 and almost no IFN- γ and IL-17 in response to the cognate antigen stimulation in comparison to the two other *Candida* species. In addition, in these infected mice, prednisolone treatment increased IL-5 production but not the other Th cells signature cytokines, that is, IFN- γ and IL-17. These findings were initially interpreted as indication that this *Candida* spp. was not inducing a strong peripheral Th1/Th17 polarization, which is, at least in *Candida albicans*, responsible for the control of the infection (Richardson & Moyes, 2015).

An initial analysis indicated that all three *Candida* spp. were able to spread to the brain and also to trigger local inflammation in infected, but immunocompetent (not treated with prednisolone) mice. These findings indicated that non-*albicans Candida* also hold the ability to reach the brain, similarly to *C. albicans*, as we previously demonstrated (Fraga-Silva et al., 2015). Interestingly, prednisolone treatment, differently from its effect on spleen, was clearly associated with and increased fungal load at both the brain and the spinal cord of mice infected with all three *Candida* spp.. This finding strongly suggests that corticotherapy, and possibly many other immunosuppressive drugs, are able to facilitate the fungal dissemination

to the CNS.

The fact that this increase in fungal load was even more pronounced in the spinal cord, compared with the brain, mainly in animals infected with the *C. krusei* and *C. parapsilosis* is possibly relevant in terms of CNS involvement. In addition, this striking amount of fungi in the spinal cord was concomitant with the absence or a very discrete process of inflammation, implying that no inflammatory cells, or very few ones, are infiltrating this area. Even though this is a complex subject, there is a general idea that the yeast morphology is more commonly present as a commensal agent whereas hyphae and/or pseudohyphae characterize virulent forms (Brown & Gow, 1999). In this scenario, it would be interesting to investigate if hyphae are present in greater quantity in the brain than in the spinal cord.

Analysis of T helper cell subsets by means of their transcription factors signature suggested that the inflammatory phenotype in the brain of *C. krusei*-infected mice was differently affected by prednisolone treatment. In this case, mice presented a predominant Th1 profile whereas this local polarization did not happen in the two other species.

Altogether, these results indicate, similarly to *C. albicans*, that *C. glabrata*, *C. krusei* and *C. parapsilosis* are also able to disseminate, reach the CNS and promote local inflammation. In addition, they clearly show that corticotherapy increases their respective fungal loads at both, the brain and the spinal cord, being *C. krusei* the specie that triggers the highest local accumulation of Th1 cells. It is possible that the neuroinflammation triggered by this type of Th1-inducing *Candida* can be even more deleterious in other CNS pathologies. Considering that samples from the CNS are difficult to obtain from patients, we believe that experimental models can be widely explored to investigate other aspects of CNS impairment, including the effect of fungi infections, in many CNS disorders such as multiple sclerosis and Parkinson and Alzheimer's diseases.

Ethics statement

The animals were manipulated in accordance with the Brazilian legislation that is regulated by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and by the Ethical Principles in Animal Research formulated by the Brazilian Society of Science in Laboratory Animals. The whole experimental protocol was also approved by the Medical School Ethics Committee on Use of Animals (CEUA – protocol number 1206/2017), UNESP, Botucatu, SP, Brazil.

Acknowledgments

Special thanks to Professor Eduardo Bagagli (UNESP, Botucatu, SP, Brazil) for kindly donating the *Candida* strains. The authors have no conflicts of interest to declare that are directly relevant to the content of this article.

References

- ALONSO, R.; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, A. N.; PISA, D.; CARRASCO, L. Multiple sclerosis and mixed microbial infections. Direct identification of fungi and bacteria in nervous tissue. **Neurobiology of Disease**, v. 117, p. 42-61. 2018.
- BENITO-LEÓN, J. et al. Association between multiple sclerosis and *Candida* species: evidence from a case-control study. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, n. 29, p. 1139-1145. june. 2010.
- BRATTSAND, R.; LINDEN, M. Cytokine modulation by glucocorticoids: mechanisms and actions in cellular studies. **Aliment Pharmacol Ther.**, v. 10, suppl 2, p. 81-90. 1996.
- BROWN, A. J. P.; GOW, N. A. R. Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. **Trends In Microbiology**, v. 7, n. 8, p. 333-338. august. 1999.
- CHASTAIN, E. M.; MILLER, S. D. Molecular mimicry as an inducing trigger for CNS autoimmune demyelinating disease. **Immunol. Rev.**, v. 245, p. 227-238. 2012.
- DOUGHIERTY, T. F. Adrenal Cortical Control of Lymphatic Tissue Mass. In: F. STOULMN (ed.), *The Kinetics of Cellular Proliferation*, pp. 264-274. **New York**: Grune & Stratton, 1959.
- EGGIMANN, P. et al. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. **Lancet. Infect. Dis.**, v. 3, p. 685-702. november. 2003.
- EPP, L. M.; MRAVEC, B. Chronic polysystemic candidiasis as a possible contributor to onset of idiopathic Parkinson's disease. **Bratisl Lek Listy.**, v. 107, n. 6-7, p. 227-230, 2006.
- FAIX, R. G.; CHAPMAN, R. L. Central Nervous System Candidiasis in the High-risk Neonate. **Seminars in Perinatology**, v. 27, n. 5, p. 384-392. october. 2003.
- FRAGA-SILVA, T. F. C. et al. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Development Is Aggravated by *Candida albicans* Infection. **Journal of Immunology Research**, v. 2015, n. 635052, p. 1-11. january. 2015.
- GÓRALSKA, K.; BLASZKOWSKA, J.; DZIKOWIEC, M. Neuroinfections caused by fungi. **Infection**, doi. 10.1007/s15010-018-1152-2. 2018.
- GRUVER-YATES, A. L.; CIDLOWSKI, J. A. Tissue-Specific Actions of Glucocorticoids on

- Apoptosis: A Double-Edged Sword. **Cells**, v. p. 202-223. 2013.
- HANSON, R. G.; PETERS, M. G.; HOOFNAGLE, J. H. Effects of Immunosuppressive Therapy with Prednisolone on B and T Lymphocyte Function in Patients with Chronic Type B Hepatitis. **Hepatology**, v. 6, n. 2, p. 173-179. 1986.
- HEROLD, M. J.; MCPHERSON, K. G.; REICHARDT, H. M. Glucocorticoids in T cell apoptosis and function. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 63, p. 60-72. 2006.
- HORST, H. J.; FLAD, H. D. Corticosteroid-interleukin 2 interactions: inhibition of binding of interleukin 2 to interleukin 2 receptors. **Clin Exp Immunol.**, v. 68, n. 1, p. 156-161. Apr. 1987.
- JONG, A.Y. et al. Traversal of *Candida albicans* across Human Blood-Brain Barrier In Vitro. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 7, p. 4536-4544. july. 2001.
- LI, H. et al. *In vitro* and *in vivo* antifungal activities and mechanism of heteropolystyrenes against *Candida* species. **Scientific Reports**, v. 7, n. 16942, p.1-9. december. 2017.
- LIU, Y. et al. Mechanisms of *Candida albicans* Trafficking to the Brain. **PLOS Pathogens**, v. 7, n. 10, p. 1-13. october. 2011.
- MATTSON, M. P. Energy Intake and Exercise as Determinants of Brain Health and Vulnerability to Injury and Disease. **Cell Metab.**, v. 16, n. 6, p. 706-722. december. 2012.
- MURTHY, J. M. K.; SUNDARAM C. Fungal infections of the central nervous system. **Handbook of Clinical Neurology**, v. 121, n. 3, p. 1383-1401. 2014.
- PANACKAL, A. A.; WILLIAMSON, P. R. Fungal Infections of the Central Nervous System. **Continuum (Minneapolis)**, v. 21, n. 6, p. 1662-1678. december. 2015.
- PISA, D. et al. Different Brain Regions are Infected with Fungi in Alzheimer's Disease. **Scientific Reports.**, v. 5, n. 15015, p. 1-13. october. 2015.
- PISA, D. et al. Fungal infection in a patient with multiple sclerosis. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, may. 2011.
- PISA, D. et al. Fungal infection in cerebrospinal fluid from some patients with multiple sclerosis. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, n. 32, p. 795-801. january. 2013.
- RATNASEELAN, A. M.; et al. Effects of Mycotoxins on Neuropsychiatric Symptoms and Immune Processes. **Clin Ther.**, v. 40, n. 6, p. 903-917. june. 2018.
- RICHARDSON, J. P.; MOYES, D. L. Adaptive immune responses to *Candida albicans* infection. **Virulence**, v. 6, n. 4, p. 327-337. may/june. 2015.
- SALI, A.; et al. Glucocorticoid-treated mice are an inappropriate positive control for long-term preclinical studies in the *mdx* mouse. **PLoS ONE.**, v. 7:e34204. 2012.

- SAROUKOLAEI, S. A.; et al. The role of *Candida albicans* in the severity of multiple sclerosis. *Mycoses*, v. 59, n. 11, p. 697-704. 2016.
- SMITH, L.K.; CIDLOWSKI, J.A. Glucocorticoid-induced apoptosis of healthy and malignant lymphocytes. **Prog. Brain Res.**, v. 182, p. 1-30. 2010.
- TAKAKURA, N. et al. A Novel Murine Model of Oral Candidiasis with Local Symptoms Characteristic of Oral Thrush. **Microbiol. Immunol.**, v. 47, n. 5, p. 321-326. february. 2003.
- WU, P. F.; et al. Epidemiology and antifungal susceptibility of candidemia isolates of non-*albicans Candida* species from cancer patients. **Emerg Microbes Infect.**, v. 6, n. 10: e87. Oct. 2017.
- YAMPOLSKY, C. et al. Fungal cerebral abscess in a diabetic patient successfully treated with surgery followed by prolonged antifungal therapy. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 27, n. 1, p.6-9. march. 2010.
- YAPAR, N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. **Ther Clin Risk Manag.**, v. 10, p. 95-105. 2014.

CONCLUSÕES

I. As três espécies de *Candida* estudadas têm a capacidade de se disseminarem para o SNC atingindo o cérebro e a medula;

II. Os estados de imunossupressão estão associados a uma maior disseminação de *Candida* spp. para o SNC.

ANEXO

ANEXO A – CERTIFICADO Nº 1206/2017-CEUA

  		Comissão de Ética no Uso de Animais Criada através da Portaria DFM nº 611 de 13/12/2012
CERTIFICADO Nº 1206/2017-CEUA		
Certificamos que a proposta intitulada "Infecção experimental por Candida spp. E topismo para o sistema nervoso central", registrada com o n. 1206/2017, sob a responsabilidade da Marcelo D'Alessandre Sanches, orientado pela Profa Dra Cilmerly Suemi Kurokawa, e Coorientado pela Profa Dra Thais Fernanda de Campos Fraga da Silva, com a colaboração da Profa Titular Alexandrina Sartori – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n. 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu, em reunião de 23/02/17.		
Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica	
Vigência da autorização	01/08/2018	
Espécie/Linhagem/Raça	Camundongo isogênico	
Nº de animais	100	
Peso/Idade	19-23 gramas/9-11 semanas	
Sexo	Fêmea	
Origem	Biotério da USP - Riberão Preto	
 Prof. Dr. Guilherme Antônio Moreira de Barros Presidente da CEUA  Kleber Messias Camargo Secretário da CEUA		
Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P. CEP: 18.618-970 Fone: (14) 3880-1608/3880-1609 e-mail secretaria: ceua@fmb.unesp.br		