

ESTUDIO DE LA VIRULENCIA DE CEPAS MUTANTES DE *CANDIDA ALBICANS* EN EL ORGANISMO MODELO *GALLERIA MELLONELLA*

Evans Trejo, Cody Eduardo (1), Clavijo-Giraldo, Diana Marcela (2), Mora-Montes, Héctor Manuel (3)

1 [Ingeniería en Biotecnología, Instituto Tecnológico y de Educación Superior de Monterrey] | Dirección de correo electrónico: [codevans@hotmail.com]

2 [Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [diamar438@hotmail.com]

3 [Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [hmora@ugto.mx]

Resumen

Candida albicans es responsable de una amplia variedad de infecciones mucosas y sistémicas, con una tasa de mortalidad del 35-60%, representando la cuarta causa de infecciones del torrente sanguíneo adquiridas en hospitales de EE. UU. Se comparó la sobrevivencia de larvas de *G. mellonella*, infectadas con las mutantes de *C. albicans*, con la virulencia reportada para estas cepas en el modelo de ratón. Durante este experimento se estudiaron tres cepas de *Candida albicans*; *mnt1-mnt2Δ*, *mnn4Δ* y *pmr1Δ*. Los datos obtenidos de la cepa con el gen *mnn4* eliminado discrepan significativamente con los reportados en el ratón y sugieren que la relevancia del manosilfosfato durante la patogénesis de *C. albicans* es hospedero específico. De igual manera, para la delección del gen *mnt1-mnt2Δ* los datos de virulencia generados en el modelo vertebrado no correlacionan con los obtenidos en larvas de *G. mellonella*. Finalmente, los resultados en *pmr1Δ* demostraron que la glicosilación normal no se requiere para el crecimiento *in vitro*, pero es esencial para la virulencia de *C. albicans*. Consideramos que el modelo de *G. mellonella* permite el estudio a la respuesta de virulencia bajo un diferente kit de defensas antimicrobianas que permitirá una mayor comprensión los mecanismos de virulencia de *C. albicans*.

Abstract

Candida albicans is responsible for a wide variety of mucosal and systemic infections, with a mortality rate of 35-60%, and represents the fourth cause of bloodstream infections in US hospitals acquired. The survival rate of *G. mellonella*, infected with mutants of *C. albicans*, was compared with the virulence reported in the mouse model. During this experiment three strains of *Candida albicans* were studied; *mnt1-mnt2Δ*, *mnn4Δ* and *pmr1Δ*. The data obtained from the strain with the *MNN4* disrupted differ significantly with those reported in mice, and suggest that the relevance of mannosylphosphate during the pathogenesis of *C. albicans* is host specific. A similar observation was obtained when the virulence of the *mnt1-mnt2Δ* was assessed, there was no correlation between data generated in the vertebrate model and in *G. mellonella* larvae. Finally, the results showed that in the *pmr1Δ* null mutant normal glycosylation is dispensable for growth *in vitro*, but essential for virulence in both mouse and *G. mellonella*. We believe that the *G. mellonella* model allows the study of virulence response under a different antimicrobial defenses kit that allow a greater understanding of virulence mechanisms of *C. albicans*.

Palabras Clave

Glicosilación de proteínas; Pared celular; ,modelo invertebrado; patogénesis fúngica.

INTRODUCCIÓN

Candida albicans es uno de los hongos patógenos más estudiados en la micología médica. Aunque comúnmente se encuentra dentro del tracto gastrointestinal, puede colonizar otras mucosas y la piel y por lo tanto causar infecciones superficiales. También es responsable de infecciones sistémicas, que ponen en riesgo la vida del paciente y que están asociadas con una tasa de mortalidad alta, de entre el 35 y 60%, representando la cuarta causa de infecciones del torrente sanguíneo adquiridas en hospitales de EE. UU. [1, 2]. Debido a ello el estudio de sus mecanismos de virulencia han sido de gran relevancia.

Aunque los ratones se consideran el estándar de oro para estudiar la virulencia de los hongos, otros organismos modelo, en particular invertebrados, han sido cada vez más utilizados. La larva de la polilla de la cera (*Galleria mellonella*) ha sido especialmente considerado como un modelo para estudiar a los patógenos de humanos [3, 4]. Este insecto posee un bajo costo de mantenimiento y no requiere de instalaciones especializadas para su cuidado. Esto permite realizar el estudio sobre un gran número de larvas en cortos periodos de tiempo. En adición, el tamaño relativamente grande de las larvas facilita su fácil manejo, la inyección de un inóculo definido, y toma de muestras para los análisis posteriores [5].

En comparación con otros anfitriones modelos invertebrados, tales como *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster*, *G. mellonella* tiene un sistema relativamente avanzado de defensas antimicrobianas. Los péptidos antimicrobianos son producidos por *G. mellonella* en respuesta a la infección y probablemente contribuyen a la defensa del huésped, como se ha demostrado para las infecciones causadas por *Candida* en células epiteliales de mamíferos. Por lo tanto, son más propensos a producir información relevante para el proceso de infección en los mamíferos. [5]

Durante este experimento se estudiaron tres cepas de *Candida albicans*; *mnt1-mnt2Δ*, *mnn4Δ* y *pmr1Δ*. La cepa mutante *mnt1-mnt2Δ* tiene deletados genes que codifican para α 1,2-manosiltransferasas relevantes en la síntesis de *O-mananas* de la pared celular [6]. La cepa mutante *mnn4Δ* carece de manosilfosfato en la pared [7]; mientras que la cepa

pmr1Δ tiene severos defectos en la glicosilación de proteínas, afectando tanto a la *O*-glicosilación como a la *N*-glicosilación [8].

El objetivo de este experimento es comparar la sobrevivencia de larvas de *G. mellonella*, infectadas con las mutantes de *C. albicans*, con la virulencia reportada para estas cepas en el modelo de ratón [6, 7, 8]. Con ello se espera generar datos importantes que permitan apoyar, o no, el uso de larvas de *G. mellonella* como un hospedero alternativo para estudiar la virulencia de *C. albicans*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de los Microorganismos.

Para la propagación de los microorganismos se utilizó el medio de extracto de levadura, peptona, y dextrosa (YPD) estándar.

Empleando el Stock central de cada cepa se inocularon 50 μ L sobre placas de YPD, y se incubaron a 28°C por un lapso de 24hrs. A partir de alguna colonia aislada de las placas, se inocularon 20 mL de medio líquido YPD y se incubaron a 28°C, con agitación constante por 24hrs. Las células se cosecharon por centrifugación y se lavaron dos veces con buffer de fosfatos salino (PBS), obteniendo una pastilla celular que se resuspendió con 500 μ L agua estéril y 500 μ L de glicerol (50%) para poder ser guardado en refrigeración.

A partir del stock preparado se tomaron alícuotas de 50 μ L, se inocularon en 10 mL de medio líquido YPD, y se incubaron a 28°C por 24hrs en agitación constante. A partir del medio líquido se obtuvo la pastilla al igual que en la preparación del stock y se resuspendió en 1 mL de PBS.

Una vez obtenidos el stock libre de medio de cultivo, se ajustó la concentración a 2×10^7 células por cada 10 μ L del inóculo. La cuantificación se realizó con la ayuda de un microscopio de campo claro y una cámara de Neubauer.

Manejo y selección de larvas de *G. mellonella*.

Se tomó una población homogénea de 10 larvas para cada cepa a analizar más una extra para el control. Se realizaron 3 réplicas de cada experimento, con diferentes días de inyección. Para ello se seleccionan individuos en última fase larvaria, es decir entre 2 y 3 cm de largo y de 180 a 200 mg de peso. [3]

Se retiró el capullo de seda alrededor de las larvas tanto al inicio como en todo el proceso del experimento para mantenerlas en estado larvario.

Inoculación e infección de larvas de *G. mellonella*.

Fue necesaria la limpieza de la zona de inyección para evitar cualquier contaminación. La inyección se realizó con una jeringa hipodérmica estéril de capacidad para 10 μ L de carga. Tanto al inicio como entre cada cepa se necesitó limpiar la jeringa con etanol, cloro, nuevamente etanol y finalmente PBS. En la proplegna izquierda se aplicó etanol y se procedió a la inyección de 10 μ L de la suspensión de 2×10^7 células. Una vez inoculadas las larvas se mantuvieron cautivas dentro de cajas Petri a temperatura ambiente por 10 días.

Análisis estadístico de virulencia.

El estudio fue ciego simple, en el que se le dio un número a cada cepa para evitar que las expectativas del investigador influyeran sobre los resultados. La cepa *mnt1-mnt2* Δ se le denominó C86, *mnn4* Δ fue C73 y *pmr1* Δ fue C136. No se dio a conocer cual número correspondía a cuál cepa hasta el análisis estadístico.

Cada 24 horas se realizó un conteo de larvas vivas y muertas. Tomando como día 1, 24 horas de la inyección. Para considerar a una larva muerta es necesario tomar en cuenta la presencia de tres características: melanización del cuerpo, ausencia de movimiento voluntario y falta de respuesta a estímulos externos.

Los datos obtenidos de la experimentación, fueron analizados con gráficos de supervivencia, utilizando una prueba de log-rank del paquete estadístico GraphPad Prism 5. Prism calcula fracciones de

supervivencia utilizando el método del producto límite Kaplan-Meier, contiene los números usados para representar gráficamente la supervivencia en función del tiempo.

Recuperación del material fúngico.

Para la recuperación fúngica se utilizaron larvas muertas que aún no se hubieran secado, es decir en los primeros dos días de haber muerto. Se cortó la cabeza y se obtuvo todo el contenido interno y se resuspendió en 1 mL de PBS; a partir de una solución homogénea se diluyó 1:1000 y se inocularon 50 μ L sobre placas de medio YPD más ampicilina. Las placas se incubaron a 28°C y tras un lapso de 48hrs se realizó un conteo de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como lo muestra la figura 1, la cepa *mnn4* Δ es capaz de matar alrededor del 90% de la población infectada en un periodo de 10 días; sin embargo, lo hace a una tasa mucho más lenta que la cepa silvestre (WT), por lo que se concluye que presenta una atenuación en la virulencia en el modelo *G. mellonella*. En el modelo murino la delección del gen *MNN4* no afectó notablemente la capacidad de colonizar y matar a los ratones [7]. Por lo tanto, nuestros datos discrepan significativamente con los reportados en el ratón y sugieren que la relevancia del manosilfosfato durante la patogénesis de *C. albicans* es hospedero específico.

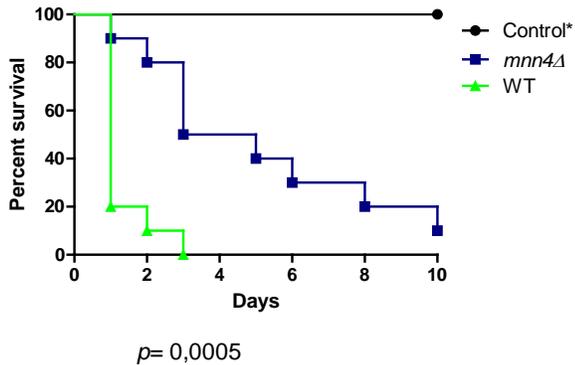


Figura 1. Gráfica de supervivencia de la mutante *mnn4Δ* en un periodo de 10 días. La cepa muestra una atenuación de la virulencia cuando se compara con el porcentaje de supervivencia de los animales inoculados con la cepa silvestre (WT).

En la figura 2, la mutante *mnt1-mnt2Δ* muestra un comportamiento muy similar a la cepa WT, en cuanto al porcentaje de supervivencia de los animales infectados se refiere. Las pruebas realizadas en ratones muestran que la doble delección de los genes *MNT1* y *MNT2* atenuó significativamente la virulencia [6]. Estos datos nuevamente enfatizan que los datos de virulencia generados en el modelo vertebrado no correlacionan con los obtenidos en larvas de *G. mellonella*.

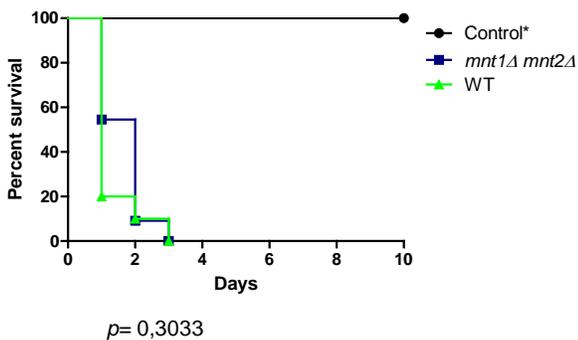


Figura 2. Gráfica de supervivencia de la mutante *mnt1-mnt2Δ* en un periodo de 10 días. El porcentaje de supervivencia de los animales infectados con la mutante o con la cepa silvestre (WT) no es estadísticamente distinto.

En la figura 3, la cepa *pmr1Δ* muestra una baja virulencia en comparación a las dos cepas anteriores y a la cepa silvestre. En un modelo murino de infección sistémica, la delección del gen *PMR1* dio como resultado la atenuación severa en la virulencia [8], demostrando que la glicosilación normal no se requiere para el crecimiento *in vitro*, pero es esencial para la virulencia de *C. albicans*. Nuestros datos apoyan dicha observación.

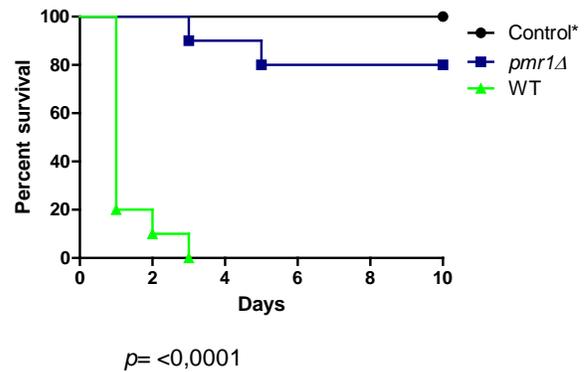


Figura 3. Gráfica de supervivencia de la mutante *pmr1Δ* en un periodo de 10 días. La cepa muestra una atenuación de la virulencia cuando se compara con el porcentaje de supervivencia de los animales inoculados con la cepa silvestre (WT).

El modelo *G. mellonella* permite realizar un gran número de pruebas con una población significativa, pero a su vez requiere de un cuidado significativo durante la inoculación del hongo mediante inyección. Una lesión mecánica o la inyección con pequeñas burbujas de aire pueden matar a las larvas creando un falso positivo en los resultados. Este tipo de errores se pueden ver reflejados en los controles, debido a ello no se puede considerar resultados confiables si no poseen una supervivencia del 100%. También se puede parcialmente identificar las muertes por estas malas prácticas de inyección por los días que tardan en morir. Se ha notado que dichas muertes ocurren en los primeros dos días, después de dos días no se ha registrado ninguna muerte en controles.

Durante la recuperación del material fúngico, se obtuvo *C. albicans* únicamente asegurándonos de esa manera que no existe contaminación de otro hongo. La C73 tuvo $5,88 \times 10^7$, la C86 tuvo $7,3 \times$

107 y la C136 tuvo 2.98×10^7 . Se puede observar una relación entre la tasa de mortalidad y la concentración de levaduras recuperadas.

CONCLUSIONES

Con el presente trabajo se logró el objetivo de comparar la sobrevivencia de larvas de *G. mellonella*, infectadas con las mutantes de *C. albicans*, con la virulencia reportada para estas cepas en el modelo de ratón. A pesar que la cepa *pmr1Δ* obtuvo los mismos resultados tanto en *G. mellonella* como en modelos murinos, las cepas mutantes *mnt1-mnt2Δ* y *mnn4Δ* muestran que los resultados del modelo vertebrado no correlacionan con los obtenidos en larvas de *G. mellonella*.

Tomando en cuenta lo anterior, consideramos que el modelo de *G. mellonella* no puede ser considerado como un sustituto de modelos murinos para el estudio de la virulencia de cepas mutantes de *Candida albicans*. Sin embargo, esto no le quita importancia al uso de invertebrados como modelos para el estudio de hongos patógenos, más bien redirige el estudio a la respuesta de virulencia bajo un diferente kit de defensas antimicrobianas que nos permitirá una mayor comprensión de los mecanismos de virulencia de *C. albicans*.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por CONACyT, México (PDCPN2014-247109) y Universidad de Guanajuato.

Un Agradecimiento especial a Manuel Pérez, Jorge Luna y a todos los miembros del laboratorio de Glicobiología de hongos por su constante apoyo para la realización de este proyecto.

REFERENCIAS

- [1] Kadosh, D. (2016). Control of *Candida albicans* morphology and pathogenicity. *Cell. Mol. Life Sci.* doi: 10.1007/s00018-016-2294-y
- [2] Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB (2004) Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 39(3):309-317. doi:10.1086/421946CID32752
- [3] Ramarao, N., Nielsen-Leroux, C., Lerec, Didier (2012) The insect *Galleria mellonella* as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis. *J. Vis. Exp.* (70). E4392, doi:10.3791/4392.
- [4] Cook, S.M. and McArthur, J.D. (2013) Developing *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens. *Virulence* 4(5):350-353.
- [5] Jacobsen, I.D. (2014) *Galleria mellonella* as a model host to study virulence of *Candida*. *Virulence* 5(2):237-239.
- [6] Munro, C. A., Bates, S., Buurman, E. T., Hughes, H. B., MacCallum, D. M., Bertram, G., ... & Hamilton, S. (2005). *Mnt1p* and *Mnt2p* of *Candida albicans* are partially redundant α -1, 2-mannosyltransferases that participate in O-linked mannosylation and are required for adhesion and virulence. *J. Biol. Chem.* 280(2), 1051-1060.
- [7] Hobson, R. P., Munro, C. A., Bates, S., MacCallum, D. M., Cutler, J. E., Heinsbroek, S. E., ... & Gow, N. A. (2004). Loss of cell wall mannosylphosphate in *Candida albicans* does not influence macrophage recognition. *J. Biol. Chem.* 279(38), 39628-39635.
- [8] Bates, S., MacCallum, D. M., Bertram, G., Munro, C. A., Hughes, H. B., Buurman, E. T., ... & Gow, N. A. (2005). *Candida albicans* *Pmr1p*, a secretory pathway P-type Ca^{2+}/Mn^{2+} -ATPase, is required for glycosylation and virulence. *J. Biol. Chem.* 280(24), 23408-23415.