

# Estudio de la virulencia de especies del género *Candida* en el organismo modelo *Galleria mellonella*.

Pérez- López, Manuel Alejandro (1), Clavijo-Giraldo, Diana Marcela (2), Mora-Montes, Héctor Manuel (3)

1 [Licenciatura en Biología Experimental, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [bio.manne23@gmail.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

Hasta ahora, los estudios de virulencia de organismos patógenos como los hongos del género *Candida spp.* y otros microorganismos, se llevan a cabo en organismos superiores, como el ratón (*Mus musculus*); aunque son costosos en cuestión de manejo y manutención, su uso plantea cuestiones bioéticas importantes. El uso de las larvas de *Galleria mellonella* como modelo de infección proporciona una alternativa valiosa y factible. El presente trabajo comprende el estudio de virulencia de especies del género *Candida*, específicamente el análisis de cinco cepas distintas de *Candida glabrata*, utilizando el organismo modelo *G. mellonella*, inyectando e inoculando  $2 \times 10^7$  levaduras por cada  $10 \mu\text{l}$ ; en cada larva, monitoreando las réplicas en un lapso de 10 días. El análisis estadístico reveló que la cepa *Cganp1Δ+ANP1* es el microorganismo más virulento de este grupo. La correlación de los datos obtenidos en este estudio, con los reportados en ratón son muy diferentes. Por lo tanto, *G. mellonella* es un modelo no apropiado para el estudio de virulencia de *C. glabrata*.

## Abstract

Until now, studies of virulence of pathogenic organisms such as fungi of the genus *Candida spp.* are performed in higher organisms like the mouse (*Mus musculus*); although they are expensive in a matter of management and maintenance, and their use raises important bioethical issues. The use of *Galleria mellonella* larva as infection model provides a valuable and feasible alternative. This work includes the study of virulence of *Candida* species, specifically the analysis of five different strains of *Candida glabrata*, using the model organism *G. mellonella*, injecting and inoculating  $2 \times 10^7$  yeast per  $10 \mu\text{l}$ ; each larva, monitoring replicas for a period of 10 days. Statistical analysis revealed that the strain *Cganp1Δ + ANP1* is the most virulent microorganism of this group. The correlation of the data obtained in this study with those reported in mice significantly contrast. Therefore, *G. mellonella* is an alternative model not suitable for the study of *C. glabrata* virulence.

## Palabras Clave

*Galleria mellonella*; *Cándida glabrata*; infección, modelo invertebrado, patogénesis fúngica.

## INTRODUCCIÓN

El estudio de la virulencia y patogénesis fúngica, a menudo requiere de un modelo animal apropiado. Mamíferos como modelo de infección son costosos en cuestión de manejo, cuidado y manutención, además de que pueden plantear cuestiones bioéticas complejas. El uso de insectos como modelos de infección proporciona una alternativa valiosa y factible.

Los invertebrados que se han utilizado recientemente como huéspedes alternativos para evaluar la virulencia de las bacterias y hongos, entre ellos, las larvas de *Galleria mellonella* son populares porque son fáciles de criar y requieren instalaciones no especializadas para mantener la colonia [1].

En comparación con otros anfitriones no vertebrados, tales como nemátodos, estos insectos tienen un sistema relativamente avanzado de defensas antimicrobianas y por tanto son más propensos a producir información relevante para el proceso de infección de mamíferos. Al igual que los mamíferos, los insectos poseen un sistema inmune innato complejo [2].

Las larvas de la llamada polilla de la cera, *G. mellonella*, se ha demostrado que pueden facilitar gran información útil sobre la virulencia y patogénesis de un amplio espectro de microorganismos, incluyendo hongos de mamíferos, por ejemplo, el género *Candida* y el *Sporothrix* [3, 4, 5].

Además, el sistema inmune de *G. mellonella* muestra una similitud funcional y estructural comparándolo al sistema inmune innato de los mamíferos: los patógenos son reconocidos por receptores de reconocimiento de patógenos y pueden ser fagocitadas por hemocitos, el equivalente funcional de los neutrófilos en los mamíferos. Al igual que en los neutrófilos, los hemocitos utilizan especies reactivas de oxígeno y enzimas líticas para eliminar los microorganismos patógenos [6].

El sistema inmune de *G. mellonella* está compuesto por seis tipos de células fagocíticas: coagulocitos, granulocitos, plasmacitos, oenocitos, esperulocitos y prohemocitos. El aumento de la densidad de estas células, refleja la virulencia de cualquier tipo de interacción

patogénica de origen fúngico y también bacteriano [7, 8].

*Candida spp.* son un grupo de hongos patógenos de humanos, muy importantes, causantes de infecciones que van desde la benigna manifestación superficial de la candidiasis aguda y la enfermedad diseminada [4][9].

El presente trabajo comprende el estudio de virulencia de especies del género *Candida*, específicamente el análisis de cinco cepas distintas de *Candida glabrata*, utilizando el organismo modelo *G. mellonella*, así como determinar si existe una correlación entre los datos de virulencia de este insecto, comparados con los ya reportados en los modelos de mamíferos superiores, como el ratón *Mus musculus*.

El hongo *Candida glabrata* es un patógeno importante y cada vez más común de los seres humanos, sobre todo en huéspedes inmunocomprometidos. A pesar de esto, poco se sabe acerca de los atributos que permiten a este organismo causar enfermedades y su interacción con el sistema inmune del huésped. Sin embargo, en común con otros hongos, la pared celular de *C. glabrata* es el punto inicial de contacto entre el huésped y patógeno, y, como tal, es probable que desempeñe un papel importante en la mediación de las interacciones y de ahí la virulencia. [10]

Se obtendrán datos de supervivencia de larvas de *G. mellonella* inoculadas con cepas de *C. glabrata*, además de la recuperación de las unidades formadoras de colonias de los hongos, a través de los cuerpos infectados y melanizados de los individuos muertos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cultivo de los Microorganismos.

Para el presente estudio, se emplearon cinco cepas de *Candida glabrata*: Cganp1Δ, Cganp 1Δ+ANP1, Cgmnn2Δ y Cgmnn2Δ+MNN2 mutantes en genes implicados en la adhesión celular y CgATCC2001 como control, de todas ellas se tiene registro su virulencia en ratones *Mus musculus*. [10]

Para la propagación de los microorganismos se utilizó un medio complejo YPD tanto sólido como líquido.

Empleando el Stock central de cada cepa, se vertieron  $50\mu\text{l}$  sobre placas. Las placas fueron incubadas a  $28^\circ\text{C}$  por un lapso de 24hrs. A partir de alguna colonia aislada de las placas, se tomó una asada y fue sembrada en  $50\text{ml}$  de medio líquido YPD. Incubados a  $28^\circ\text{C}$ , con agitación constante por 24hrs. Mediante los cultivos líquidos, se procede a la centrifugación de las células, lavando en PBS y retirando el medio de cultivo, hasta obtener una pastilla celular de aproximadamente  $0,07\text{g}$ . A estas pastillas de levaduras, se resuspenden en Agua estéril y Glicerol (50%) en proporción 2:1 respectivamente y guardados en refrigeración. A partir de estos STOCK's se tomaron alícuotas de  $50\mu\text{l}$  y fueron inoculados en  $20\text{ml}$  de medio líquido YPD, incubados a  $28^\circ\text{C}$  por 24hrs en agitación constante. De estos medios, se centrifugan las células hasta obtener aproximadamente  $0,07\text{g}$  de las pastillas celulares, lavadas con PBS y retirando el remanente de medio de cultivo.

Se resuspendieron en  $1000\mu\text{l}$  de PBS. Una vez obtenidos los STOCK's libres de medio de cultivo, se ajustaron las suspensiones de células a  $2 \times 10^7$  levaduras por cada  $10\mu\text{l}$  del inóculo. La cuantificación se realizó en microscopio de campo claro, utilizando una cámara de Neubauer a un aumento de 40X.

### Cría, manejo y selección de larvas de *G. mellonella*.

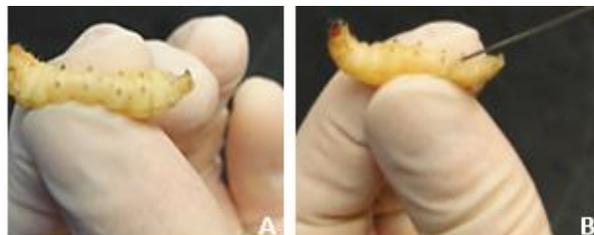
Las larvas de *G. mellonella* empleadas para este experimento fueron obtenidos del Insectario estandarizado por el Laboratorio de Glicobiología de Hongos. Se seleccionan los individuos de la última fase larvaria, que tienen entre  $2 - 3\text{ cm}$  de largo y  $180 - 200\text{ mg}$  de peso. [2]

Se hacen grupos homogéneos de diez larvas, cada uno para evaluar cada cepa de *C. glabrata*. Se realizaron tres réplicas de cada experimento, con diferente día de inyección. Se retiró el capullo de seda alrededor de las larvas tanto al inicio como en todo el proceso del experimento.

### Inoculación e infección de larvas de *Galleria mellonella*.

La inyección se realizó con una jeringa hipodérmica estéril de capacidad para  $10\mu\text{l}$  de carga. Según al protocolo estandarizado por el Equipo de trabajo del Laboratorio de Glicobiología de Hongos, se

procedió a inyectar  $10\mu\text{l}$  de la suspensión de  $2 \times 10^7$  levaduras. Parte fundamental de la inoculación de las larvas es la preparación de la zona a inyectar y su desinfección. La propleura izquierda es el punto de inyección (Figura 1), el cual es untado con Etanol (70%). Una vez inoculadas las larvas se mantuvieron cautivas dentro de cajas Petri a temperatura ambiente por 10 días.



**FIGURA 1:** Larvas de *Galleria mellonella*. A) Insecto entre el pulgar y el índice, preparado para ser desinfectado e inyectado. B) Inserción de la aguja para la inoculación del hongo. Tomado de [7].

### Análisis estadístico de virulencia.

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. Los valores de  $p$  por debajo de  $0,05$  se consideran significativos y aceptables.

### Recuperación del material fúngico.

A partir de alguna de las larvas muertas, se procedió a extraer todo el contenido interno o hemocelomático, este se resuspendió en PBS; al obtener una solución homogénea se prosiguió a inocular  $50\mu\text{l}$  sobre placas de medio de cultivo YPD + Ampicilina+ Kanamicina, se incubaron a  $28^\circ\text{C}$  y tras un lapso de 36hrs se realiza un conteo de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC), correspondientes a las colonias de *C. glabrata*.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se consideró como larva muerta, aquel individuo que presentara las siguientes características: melanización del cuerpo, ausencia de signos vitales y cesación del ciclo de vida (Figura 2).

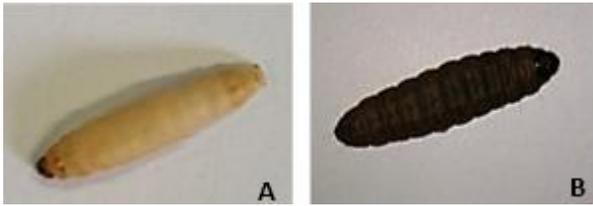


FIGURA 2: Larvas de *G. mellonella*, melanización como respuesta inmune a la infección (10 días después de la inyección). A) Larva viva inoculada con PBS. B) Larva muerta inoculada con *Candida glabrata* CgATCC2001.

Después del monitoreo de las tres réplicas de los experimentos, los datos fueron analizados, determinando que este insecto en estado larvario, tiene un comportamiento patógeno-hospedero muy diferente a los estudios realizados en mamíferos superiores, se demostró que cada cepa tiene una capacidad distinta para matar a este lepidóptero, mostrando de forma general que *Candida glabrata* Cganp1Δ+ANP1 es hipervirulenta, matando el 100% de los individuos en 4 días (Figura 3).

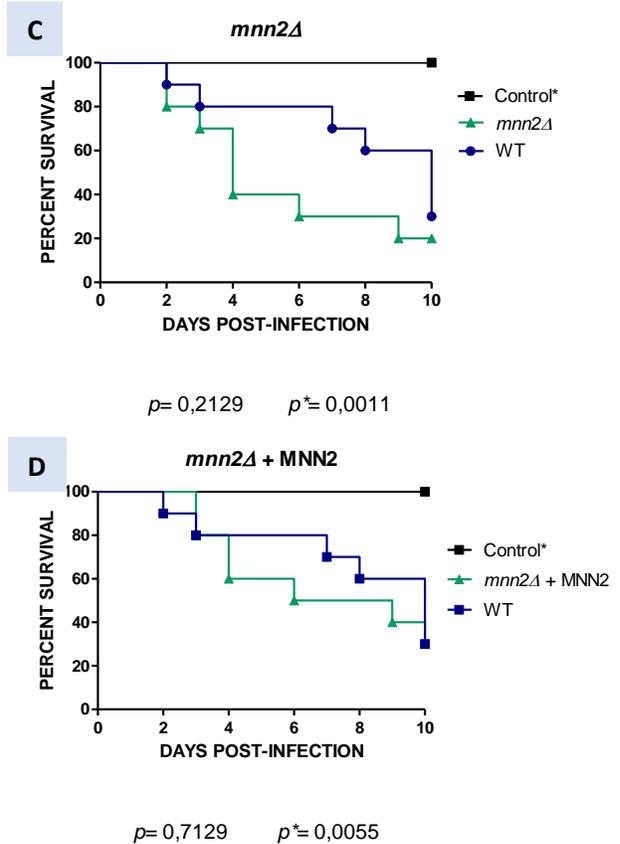
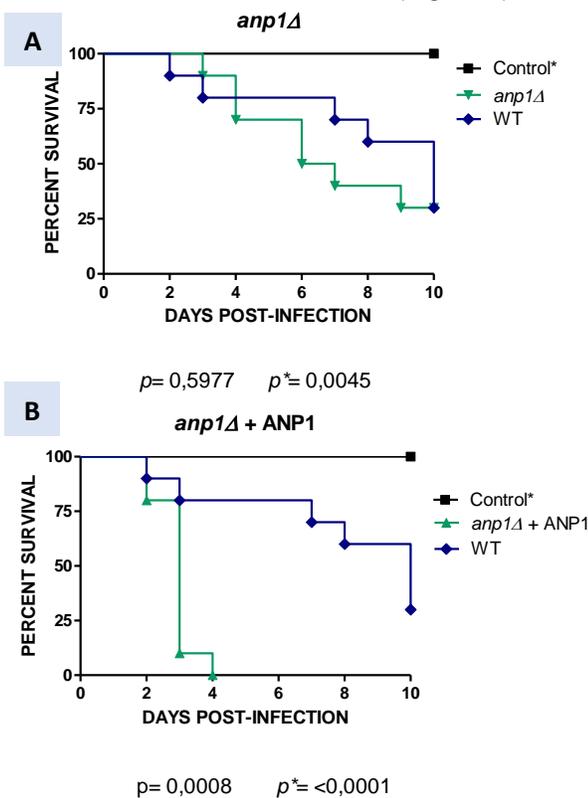


FIGURA 3: Curvas de Supervivencia de *G. mellonella* inoculadas con cinco distintas cepas de *C. glabrata*, y una concentración final de  $2 \times 10^7$  levaduras por cada  $10 \mu\text{l}$  de inóculo. Solo la cepa Cganp1Δ + ANP1 muestra una virulencia significativamente distinta a la cepa control WT. GRÁFICAS A, B, C y D.

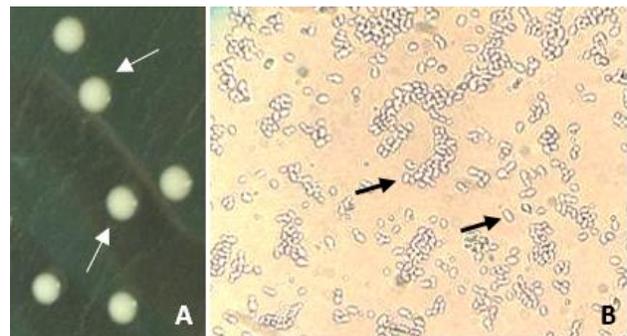
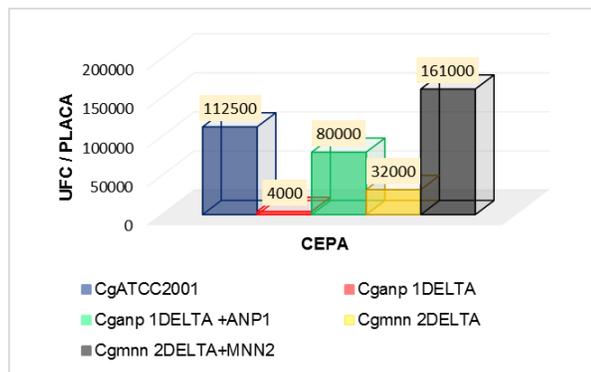


FIGURA 4: Recuperación de material fúngico (UFC). A) Colonias típicas de *C. glabrata* en YPD+AMP+KAN. B) Levaduras de *C. glabrata* (40X).

Con el material fúngico recuperado, se hace evidente que la infección de *G. mellonella* es debido a las cepas inoculadas de *C. glabrata*. (Figura 4)



**FIGURA 5: Recuperación de material fúngico (UFC). A partir de las larvas se extrajo la biomasa fúngica y se determinó las UFC.**

## CONCLUSIONES

Se logró evaluar la virulencia de cinco cepas de *Candida glabrata* utilizando como modelo de estudio el lepidóptero *G. mellonella*, mediante un análisis de supervivencia y mortalidad. Comparando los resultados obtenidos de este trabajo, con los reportados en mamíferos superiores (ratones), se obtuvieron resultados distintos, siendo *Cganp1Δ+ANP1* la más virulenta de este grupo de cepas.

*G. mellonella* no resultó ser adecuado para el estudio de la virulencia de *C. glabrata*.

## AGRADECIMIENTOS

Gracias a mis padres por siempre desear y anhelar lo mejor para mi vida y por ser los principales promotores de mis sueños. Mis más sinceros agradecimientos al Dr. Héctor por su confianza, comprensión y facilitaciones para la realización del presente trabajo, al igual que a su gran equipo de trabajo que siempre estuvo ahí para apoyarme. Agradecerle también al "Equipo Larva" (Cody Evans, Jorge Luna) por ser una pieza fundamental en mi estancia dentro del Laboratorio de Glicobiología de Hongos.

A mis amigos Yessica Ramírez, Irving Ortiz y Christian Arrona, por emprender juntos en el camino de la Investigación científica.

Agradecimientos especiales para Diana Clavijo, amiga y alumna del Posgrado en Biología, quien compartió su sabiduría de vida y su valioso tiempo de asistencia científica.

## REFERENCIAS

- Clavijo, D., Martínez, J.A., Lopes, L.M., Ponce, P., Franco, B., Almeida, B.S. y Mora, H.M. (2016) Analysis of *Sporothrix schenckii sensu stricto* and *Sporothrix brasiliensis* virulence in *Galleria mellonella*. *J Microbiol Methods*. 2016 Mar;122:73-7. doi: 10.1016/j.mimet.2016.01.014.
- Ramarao, N., Nielsen-Leroux, C., Lereclus, Didier (2012) The Insect *Galleria mellonella* as a Powerful Infection Model to Investigate Bacterial Pathogenesis. *J. Vis. Exp.* (70). E4392, doi:10.3791/4392.
- Cook, S.M. and McArthur, J.D. (2013) Developing *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens. *Virulence* 4(5):350-353.
- Jacobsen, I.D. (2014) *Galleria mellonella* as a model host to study virulence of *Candida*. *Virulence* 5(2):237-239.
- Campos, J. (2012) *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens. *Virulence* 3(6):474-476.
- Bergin, D., Reeves, E.P., Renwick, J., Wientjes, F.B. y Kavana (2005) Superoxide production in *Galleria mellonella* Hemocytes: Identification of Proteins Homologous to the NADPH Oxidase Complex of Human Neutrophils. *Infect Immun* 73(7):4161-4170.
- Burgwyn, B.F., Elizabeth, O'B, Joseph, E.K y Mylonakis, E. (2010) Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. *Virulence* 1(6):475-482.
- Cotter, G., Doyle, S., Kavanagh, K. (2000) Development of an insect model for the in vivo pathogenicity testing of yeasts. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2(7):163-169.
- Algoribi MF, Gibreel TM, Dodgson AR, Beatson SA, Upton M (2014) *Galleria mellonella* Infection Model Demonstrates High Lethality of ST69 and ST127 Uropathogenic *E. coli*. *PLoS ONE* 9(7): e101547. doi: 10.1371/journal.pone.0101547
- West L, Lowman DW, Mora-Montes HM. (2013). Differential Virulence of *Candida glabrata* Glycosylation Mutants. *The J Biol Chem*. 288(30):22006-22018. doi:10.1074/jbc.M113.478743.
- Gago, S., García, R., Cuesta, I., Mellado, E. and Izquierdo, A.A (2014) *Candida parapsilosis*, *Candida orthodysidiosis* and *Candida metapsilosis* virulence in the non-conventional host *Galleria mellonella*. *Virulence* 5(2):278-285.