

# ESTUDIO DE LA VIRULENCIA DE ESPECIES DEL GÉNERO *CANDIDA* EN EL ORGANISMO MODELO *TENEBRIO MOLITOR*

Jáuregui-Pérez Oscar Isaac (1), Clavijo-Giraldo Diana Marcela (2), Mora-Montes Héctor Manuel (3)

1 [Licenciatura en Química, Universidad de Guanajuato] | [oscar\_lobo50@hotmail.com]

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

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

## Resumen

*Tenebrio molitor* ha sido una alternativa a otros modelos de estudio vertebrados, debido a su facilidad de manejo, menor coste, se mantiene en una gama de temperaturas y su facilidad de cultivo. Se han empleado en estudios de infecciones provenientes de microorganismos patógenos como es el caso de *Candida albicans*. Este hongo se caracteriza por causar infecciones superficiales de las mucosas y en el huésped inmunocomprometido infecciones sistémicas que amenazan la vida; siendo la pared celular lo primero que entra en contacto y por lo tanto tiene un papel importante en la adhesión, antigenicidad, modulación de la respuesta inmune del huésped y reconocimiento de este hongo por células inmunes innatas. Por ello, el presente trabajo, se analizó tres mutantes con defectos en la síntesis de la pared celular (*Caoch1*, *Camns1*, *Carot2*) y sus respectivas reintegrantes. El análisis se basó en la supervivencia de larvas de *T. molitor* inoculadas con  $2 \times 10^5$  células por cada 5  $\mu\text{L}$  de inóculo; lo que se observó es que la cepa mutante carente de *CaOCH1* muestra una mayor virulencia, mientras que las que carecen de *CaMNS1* y *CaROT2* tuvieron una tendencia hacia la atenuación de la virulencia.

## Abstract

*Tenebrio molitor* has been an alternative to other vertebrate study models, due to its ease of handling, lower cost, is maintained in a range of temperatures and its ease of cultivation. They have been used in studies of infections from pathogenic microorganisms such as *Candida albicans*. This fungus is characterized by superficial skin infections of the mucous membranes and in the host immunocompromised systemic infections that threaten life; The cell wall is the first to come into contact and therefore has an important role in adhesion, antigenicity, modulation of host immune response and recognition of this fungus by innate immune cells. Therefore, the present work, we analyzed three mutants with defects in the cell wall synthesis (*CaOCH1*, *CaMNS1*, *CaROT2*) and their respective reintegrantes. The analysis was based on the survival of *T. molitor* larvae inoculated with  $2 \times 10^5$  cells per 5  $\mu\text{L}$  of inoculum; What was observed is that the mutant strain lacking *CaOCH1* shows a greater virulence, whereas the *CaMNS1* and *CaROT2* carcasses had a tendency toward attenuation of virulence.

## Palabras Clave

Tenebrio molitor, Candida albicans, inmunocomprometidos, modelo de estudio, virulencia.

## INTRODUCCIÓN

Hoy en día se ha hecho énfasis en el estudio de ciertos hongos patógenos, haciendo uso de un modelo apropiado para su estudio. Ya que en los recientes años se ha visto una mayor tasa de mortalidad asociada a ellos en los seres humanos.

El uso de insectos ha proporcionado una alternativa, para evitar la utilización de mamíferos como hospederos, ya que implica un mayor costo, manutención, cuidado, y sobre todo, tienen mayores implicaciones bioéticas. Recientemente, se ha popularizado el uso de insectos, debido a la variabilidad de temperaturas en la que se pueden manipular, además de su simplicidad en la técnica de establecer infecciones por diferentes vías, ya sean mediante la alimentación, la aplicación tópica o la inyección [1].

Por ende los estudios en modelos invertebrados como *T. molitor* y *Galleria mellonella* entre otros, han facilitado los resultados ante el estudio de enfermedades fúngicas o bacterianas. Ya que dichos insectos tienen una respuesta fácil de observar, proporcionando una mayor rapidez en los resultados ya que producen respuestas humorales y celulares coordinadas que producen una capa de hemocitos muertos melanizados sobre el patógeno las cuales son fáciles de visualizar, lo que provoca su muerte y aislamiento [2].

La respuesta inmune de los insectos es similar a la de los mamíferos, en la que se encuentran barreras estructurales y pasivas, así como respuestas humorales y celulares que se realizan por hemocitos dentro de la hemolinfa, dichos hemocitos son usados como defensas celulares del insecto ante la presencia de una bacteria u hongo, además que participan en otros procesos tales como fagocitosis, encapsulación y formación de nódulos [3].

*T. molitor* es un insecto usado, al igual que *G. mellonella*, como modelo de estudio para la comparación contra un modelo murino (ratones). La ventaja de *T. molitor* ante otros modelos como *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Caenorhabditis elegans* (nematodo), éste puede mantenerse a una temperatura que oscila entre los 25 °C y 37°C, mientras que los otros dos modelos no toleran este rango de temperatura y las larvas

de *Tenebrio* son fáciles de cultivar en un laboratorio [4].

Las larvas de *T. molitor* producen varios péptidos antimicrobianos para la defensa ante microorganismos patógenos, incluidos los hongos. Ante la presencia de *C. albicans* producen diferentes tipos de proteínas tenecinas como respuesta inmunológica antimicrobiana. [4]. Lo que ha llevado a mayores estudios sobre hongos patógenos, debido al incremento de casos de enfermedades fúngicas sistémicas, especialmente en paciente inmunocomprometidos. Ya que estas enfermedades están asociadas con una alta mortalidad (entre 40% y 67% para la candidiasis y más del 88% para la aspergilosis invasiva). Estos factores llevan a entender más la fisiopatología de diferentes infecciones fúngicas, para la obtención de nuevos agentes antifúngicos y métodos de terapia farmacológica [5].

*C. albicans* es un hongo patógeno oportunista en los seres humanos y causa infecciones superficiales de la mucosa y, en el huésped inmunocomprometido infecciones sistémicas que amenazan la vida. Siendo la pared celular de *C. albicans* el punto de contacto inmediato entre el hongo y el huésped y, por tanto, desempeña un papel clave en la interacción huésped-hongo. Tiene una capa externa rica en manoproteínas y estas mismas tienen un papel importante en la adhesión, antigenicidad, modulación de la respuesta inmune del huésped y reconocimiento de este hongo por células inmunes innatas. Por ende, los estudios en la glicosilación de la pared celular son significativos para proporcionar información sobre las interacciones patogénicas entre el hongo y el huésped [6, 7].

El presente trabajo se enfoca en el estudio de la virulencia de las cepas de *C. albicans* con los genes deletados *OCH1*, *ROT2*, y *MNS1*, implicados en la síntesis de la pared celular, así como sus controles reintegrantes, para observar los defectos y hacer una correlación de los datos de virulencia en *T. molitor* con los ya reportados en el modelo ratón.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Crecimiento de los microorganismos.

Para llevar a cabo el estudio se sembraron 150  $\mu\text{L}$  de 7 cepas diferentes de ***Candida albicans***; wt (silvestre) como control positivo, *Carot2 $\Delta$* , *Camns1 $\Delta$* , *Caoch1 $\Delta$* , estas tres últimas con su respectiva cepa mutante y reintegrante, en 15 mL del medio YPD (1% Extracto de levadura, 2% Peptona de gelatina, 2% de Dextrosa), se incubaron durante 24 horas a 28 °C en agitación constante.

Una vez observado el crecimiento celular, se centrifugó a 4500 rpm durante 5 minutos, después se decantó el medio y se realizaron tres lavados de 1 mL de PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.76 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.4). Se resuspendió con el último lavado de PBS, del cual se tomaban 750  $\mu\text{L}$  y se añadió 250  $\mu\text{L}$  del Glicerol al 50% y guardados en refrigeración, para la obtención de stocks. A partir de ellos se ajustó la concentración celular a  $2 \times 10^5$  células por cada 5  $\mu\text{L}$  de inóculo. Para ello la cuantificación celular se llevó a cabo en un microscopio de campo claro, con la ayuda de una cámara de *Neubauer* utilizando el aumento de 40X.

### Manejo y selección de larvas de *T. molitor* para inoculación.

Las larvas de *T. molitor* fueron obtenidas del insectario estandarizado por el Laboratorio de Glicobiología, de las cuales se tomaron grupos de 10 larvas de tamaño y aspecto homogéneo, con una longitud entre 2-2.5 cm y con un peso entre 100-200 mg, sin marcas negras o grisáceas y de un color uniforme [4].

### Inoculación e infección con *C. albicans* de larvas de *T. molitor*.

Se llevó a cabo el protocolo estandarizado por el Laboratorio de Glicobiología de Hongos, haciendo uso de una jeringa hipodérmica estéril de 50  $\mu\text{L}$ . Parte importante de la inyección es la aplicación de la misma en la zona correcta de la larva, que

corresponde al 4<sup>to</sup> segmento (Figura 1), comenzado el conteo de la cola a la cabeza y la esterilidad de la jeringa realizando dos lavados de etanol 70%, y dos lavados de PBS respectivamente después de cada cepa, y así inocular 5  $\mu\text{L}$  de la suspensión de  $2 \times 10^5$  células. Después de la inoculación, se introdujeron en cajas Petri y se llevaron a incubación por 10 días a 37° C para su seguimiento.

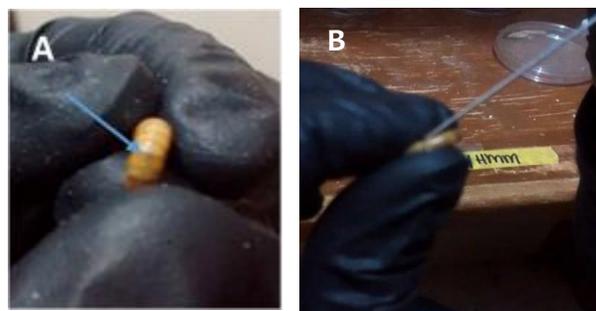


Figura 1: A) Larva preparada para ser inoculada, en el 4<sup>to</sup> segmento de la cola a la cabeza. B) Larva inyectada con 5  $\mu\text{L}$  de la suspensión que se encuentra a una concentración de  $2 \times 10^5$  células.

### Análisis estadístico de la virulencia de *C. albicans*.

Se usó el programa GraphPad Prism, utilizando el método de supervivencia del tipo Kaplan-Meier contiene los números usados para representar gráficamente la supervivencia en función del tiempo, y el análisis estadístico Log-rank. Realizando la interpretación de los gráficos obtenidos, comparando la tendencia de la cepa wt (silvestre) contra las cepas mutantes y reintegrantes. Los valores de *p* por debajo de 0,05 se consideran significativos y aceptables.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se observó la supervivencia de las larvas *T. molitor* durante 10 días. Tomándose como larva muerta aquella de aspecto negro, que no mostrara signos vitales (Figura 2).



Figura 2: *Tenebrio molitor*, después de 10 días de incubación. A) Larva viva inoculada con PBS. B) Larva muerta melanizada inoculada con *C. albicans* (cepa silvestre).

Se monitoreo los tres ensayos de la inoculación de las 7 cepas de *C. albicans* determinando que la cepa mutante *CaOCH1*, no tiene una diferencia significativa contra la silvestre por ende el gen deletado no afecta la virulencia del hongo patógeno, en cambio, las mutantes *CaROT2* y *CaMNS1* mostraron una diferencia considerable por lo que se atenuó la virulencia al deletar estos dos genes. Por último, las cepas reintegrantes de los mismos genes (*CaOCH1*, *CaROT2* y *CaMNS1*) tuvieron comportamiento cercano al de la silvestre, siendo un resultado esperado debido a que el termino reintegrante hace referencia a un gen que se eliminó y después se integró de nuevo, por ello estas cepas no muestran alteración genómica, y se esperaba un comportamiento similar a la silvestre, como fue el caso (Figura 3).

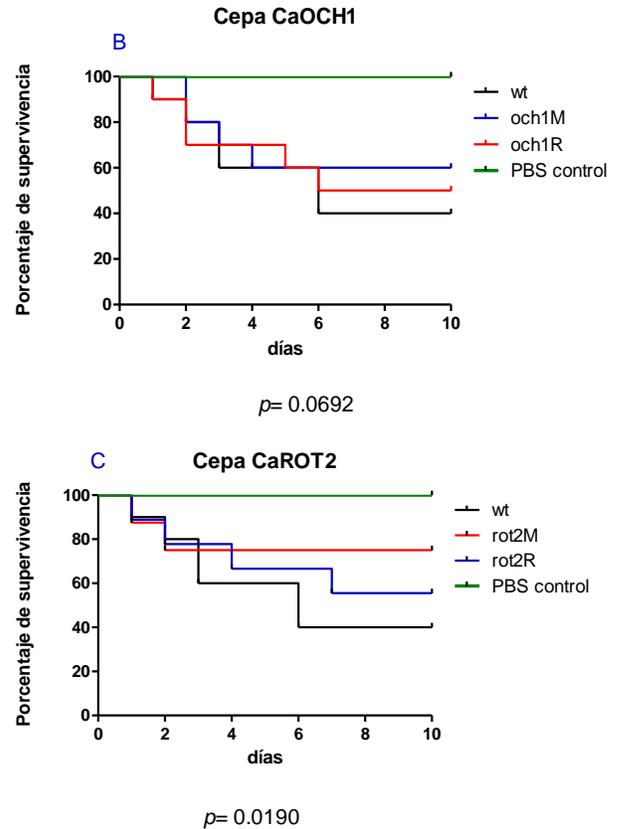
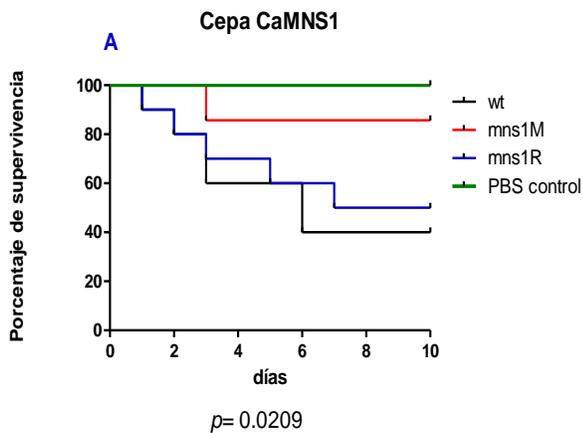


Figura 3: Curvas de supervivencia de *T. molitor* inoculadas con 5µl del inoculo a 7 cepas distintas de la especie *C. albicans* con una concentración de  $2 \times 10^5$  células. La mutante *OCH1* muestra un comportamiento similar a la silvestre, mientras que las mutantes *ROT2* y *MNS1* hubo una atenuación de la virulencia. El comportamiento de las tres cepas reintegrantes (*MNS1*, *ROT2* y *OCH1*), mostraron una tendencia a la cepa silvestre. Gráficos A, B y C.

Comparando los resultados obtenidos del presente experimento con los datos del modelo murino, se obtuvo que los valores son parecidos al modelo mamífero solo para las cepas mutantes *CaMNS1* y *CaROT2*, las cuales hubo una atenuación en la virulencia, mientras que el resultado obtenido con el gen *CaOCH1* fue distinto, ya que en el modelo vertebrado se atenuó la virulencia de dicha cepa, mientras que en el *T. molitor* la cepa mantuvo su virulencia.

## CONCLUSIONES

Con los datos obtenidos durante la observación de las larvas en incubación, se logró el objetivo de analizar la virulencia de tres mutantes de *C. albicans*, dichas mutantes con defectos en la síntesis de la pared celular. A lo que nos llevó que la mutante *CaOCH1* mantuvo su carácter virulento a pesar del gen deletado. Mientras que las mutante *CaROT2* y *CaMNS1* perdieron dicho carácter debido al defecto de la pared celular.

Las cepas *CaROT2* y *CaMNS1* presentan defectos en la síntesis de la pared celular, es por ello el motivo de la atenuación de estas dos cepas, ya que la pared celular es el primer punto de contacto entre hongo y hospedero, al haber un defecto se verá modificada la interacción hongo-hospedero.

Mientras que el comportamiento en el análisis de supervivencia de las cepas reintegrantes fue el mismo que la tendencia que seguía el control positivo (cepa silvestre), se restauró la virulencia, para los controles reintegrantes. Con ello se corrobora que a pesar que un gen se elimine y luego se reintegre, el carácter virulento de la cepa se mantendrá provocando una respuesta inmune.

Las cepas mutadas en genes que participan en síntesis de la pared celular disminuyen su tasa de mortalidad esto en el modelo murino. Esta tendencia se correlaciona con el modelo *T. molitor* por lo que resulta ser una alternativa para el estudio de la virulencia en genes *CaMNS1* y *CaROT2*, no así para *CaOCH1*, el cual muestra no ser un modelo adecuado para el estudio del gen *CaOCH1* ya que proporciona datos insignificativos para el estudio de la virulencia de *C. albicans*.

## AGRADECIMIENTOS

Gracias a mis padres y hermanos por siempre estar ahí cuando más lo necesito y estar en todo momento apoyándome a cumplir mis metas, siendo mi principal motor en esta vida. Mis más sinceros agradecimientos al Dr. Mora Montes por haberme permitido estar en ese gran laboratorio y darme la confianza para la realización de este presente trabajo, y además de compartirme sus conocimientos para un mejor desempeño.

Quiero agradecer a Adriana Pérez por compartir esta grata experiencia de una nueva meta

cumplida en nuestra vida, por ser un gran apoyo en todo momento.

Agradecimientos para Diana Clavijo, por compartir sus conocimientos en esta área y su valioso tiempo asistiéndome científicamente, además de resolver mis dudas durante toda la estancia en el laboratorio de Glicobiología.

## REFERENCIAS

- [1] McMillan, S. & Desbois, A. P. (2015). Paving the way acceptance of *Galleria mellonella* as a new model insect. *Journal of Virulence*, 6, 410-411.
- [2] Thompson, J. J., Rolff, J., & Silva-Jothy, M. T. (2003). Examining costs of induced and constitutive immune investment in *Tenebrio molitor*. *Journal of Evolutionary Biology* 16, 1038-1044.
- [3] Cotter, G., Doyle, S. & Kavanagh, K. (1999). Development of an insect model for the in vivo pathogenicity testing of yeast. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 2000 (27), 163-169.
- [4] de Souza P. C., Morey A. T., Casthaneira, G. M., Bocate, K. P., Panagio, L. A., Ito, F. A., Furlaneto, M. C., Yamada, S. F., Costa, I. N., Mora, H. M. & Almeida, R. S. (2015). *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) as an alternative host to study fungal infections. *Journal Microbiological Methods* 118, 182-186.
- [5] Arvanitis, M., Glavis, Justin. & Mylonakis, E. (2013). Invertebrate models of fungal infections. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1832, 1378-1383.
- [6] Mora, H. M., Bates, S., Netea, M. G., Díaz, D. F., López, E., Zinker, S., Ponce, P., Kullber, B. J., Brown A. J., Odds, F. C., Flores, A. & Gow, N. A. (2007) Endoplasmic reticulum  $\alpha$ -glycosidases of *Candida albicans* are required for N glycosylation, cell wall integrity, and normal host-fungus interaction. *Eukaryotic cell*, 6(12), 2184-2193.
- [7] Bates, S., Hughes, H. B., Munro, C. A., Thomas, W. P., MacCallum, D. M., Bertram, G., & Gow, N. A. (2006). Outer chain N-glycans are required for cell wall integrity and virulence of *Candida albicans*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(1), 90-98.