

ESTUDIO DE LA VIRULENCIA DE ESPECIES DEL GENERO *Candida* EN EL ORGANISMO MODELO *Galleria mellonella*

Torres-Castellanos, María Fernanda (1), Lozoya-Pérez, Nancy Edith (2), Tamez Castrellón, Alma Karina (3), Mora-Montes, Héctor Manuel (4)

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

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

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

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

Resumen

Hoy en día los modelos de invertebrados han sido usados con mucha frecuencia para evaluar la interacción huésped- patógeno de muchos microorganismos como hongos del genero ***Candida*** puesto que al usar estos organismos obtenemos resultados que son comparables con los obtenidos usando vertebrados (por ejemplo, ratones) además de que el tiempo, el costo y las regulaciones éticas no son un impedimento. El organismo ***Galleria mellonella*** como modelo de infección proporciona una alternativa valiosa y factible. Es por ello que en el presente trabajo se analizaron la virulencia de 8 cepas de ***Candida*** (7 ***C. albicans*** y 1 ***C. auris***) utilizando como huésped al organismo ***Galleria mellonella*** al cual se le inoculó 2×10^7 levaduras por cada 10 μL ; en cada larva, monitoreando 3 réplicas independientes de cada cepa por un lapso de 8 días. Al final los estudios estadísticos nos arrojaron la capacidad de virulencia de cada cepa y si está depende de la reproducción de la misma dentro del organismo.

Abstract

Nowadays invertebrate models have been used very frequently to evaluate the interaction of many microorganisms such as fungi of the genus ***Candida***. Since data generated in these models are comparable with those obtained using vertebrates (for example, mice) they are getting momentum in the study of the host-fungus interaction. Moreover time, cost and ethical regulations are not an impediment. The ***Galleria mellonella*** organism as a model of infection that provides a valuable and feasible alternative. That is why we studied the virulence of 8 strains of ***Candida*** (7 ***C. albicans*** and 1 ***C. auris***) using as host the organism ***Galleria mellonella*** to which 2×10^7 yeasts were inoculated per 10 μL ; in each larva, monitoring 3 independent replicas of each strain for a period of 8 days. At the end of the statistical studies we showed the virulence capacity of each strain.

Palabras clave

Galleria mellonella; ***C. albicans***; ***C. auris***; Modelo invertebrado; Patogénesis; Virulencia; Infección.

INTRODUCCIÓN

En la última década, los modelos experimentales de insectos *in vivo* han demostrado ser una herramienta útil para evaluar las interacciones huésped-patógeno. Este aumento en la demanda y el interés en los modelos de *insectos in vivo* surgieron con el avance global de la resistencia a antibióticos y anti fúngicos [1].

Insectos y vertebrados divergieron hace aproximadamente 500 millones de años, y mientras que los vertebrados han desarrollado una respuesta inmune adaptativa, el sistema inmune innato vertebrado todavía conserva fuertes similitudes estructurales y funcionales con el sistema inmune del insecto. [2]

Como resultado de estas similitudes conservadas, una amplia gama de insectos se ha empleado para estudiar la virulencia de patógenos bacterianos y fúngicos, incluyendo hongos de mamíferos, por ejemplo, el género *Candida* y *Sporothrix* [1,3]. Teniendo resultados que son comparables con los obtenidos usando vertebrados (por ejemplo, ratones). [4]

Aunque los modelos de mamíferos son invaluable y tradicionalmente empleados para analizar la eficacia de los compuestos antimicrobianos, tienen ciertos inconvenientes tales como el tiempo, el costo y las regulaciones éticas. [5]

Esto ha llevado a que se establezcan una variedad de modelos de insectos hospedadores para tales propósitos. Estos modelos incluyen la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* [6], la polilla de cera *Galleria mellonella* [7] y el gusano de seda *Bombyx mori* [8]

- ***Galleria mellonella***

Las larvas de la polilla de cera ***G. mellonella*** tienen 1.5-2.5 cm de longitud. Su tamaño permite un medio fácil de inoculación con cantidades específicas de droga o patógeno lo que hace que en ***G. mellonella*** sea más factible evaluar la función de las células fagocíticas y las respuestas inmunes para determinar la virulencia de patógenos [9]

La respuesta inmune innata del insecto consiste en dos componentes interconectados estrechamente, las respuestas celulares y humorales. [10]

La respuesta celular está mediada por hemocitos e implica respuestas tales como fagocitosis, encapsulación, nodulación y coagulación. [11]

El sistema inmune de ***G. mellonella*** está compuesto por seis tipos de células fagocíticas: Coagulocitos, Granulocitos, Plasmacitos, Oenocitos, Esperulocitos y Prohemocitos. [9,12]

Los hemocitos se encuentran circulando libremente en la hemolinfa o adhiriéndose a órganos internos como el cuerpo graso o el tracto digestivo del insecto. [11] La densidad de los hemocitos en la hemolinfa varía durante la vida del insecto y también en respuesta a la introducción de patógenos. [13]

Las defensas humorales están compuestas de moléculas efectoras solubles que incluyen péptidos antimicrobianos, proteínas similares a complemento, melanina y productos generados por cascadas proteolíticas como la ruta de la fenoloxidasa (PO) que inmovilizan o matan patógenos dentro del insecto. [14]

- ***Candida***

El género ***Candida*** comprende aproximadamente 200 especies, el más importante patógeno de los clasificados dentro del género ***Candida*** es la ***C.albicans***.

Candida albicans es la que más frecuentemente produce patología en el hombre causando varias manifestaciones clínicas causadas por esta especie incluye muguet, vaginitis, infecciones cutáneas, afección pulmonar, entre otras. [15]

En esta investigación se recabarán datos de supervivencia de larvas de *G. mellonella* las cuales fueron inoculadas con 7 distintas cepas de *C. albicans* y una de *C. auris*, Para evaluar que el efecto observado en los ensayos de virulencia corresponde a la dosis del patógeno fueron determinadas las Unidades formadoras de colonias.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de microorganismos

Para el presente estudio se emplearon 8 cepas (Tabla 1).

Tabla 1: Cepas utilizadas en el experimento

Cepa	Organismo	Genotipo
C76	<i>C. albicans</i>	mns1d+MNS1
C26	<i>C. albicans</i>	och1D+CIP10
C22	<i>C. albicans</i>	och1D+CaOCH1
C219	<i>C. albicans</i>	HMY12 Genotipo: rot2D::dp1200/rot2D::dp1200, RPS1/rps1D::Clp10
C132	<i>C. albicans</i>	NGY152 Silvestre
C75	<i>C. albicans</i>	mns1D+Clp10
C235	<i>C. albicans</i>	HMY58 Genotipo: As Cal4 but rot2D/rot2D, RPS1/rps1D::Clp10-SsROT2 clone
C586	<i>C. auris</i>	Aislado clínico del canal externo auditivo (humano) cepa de referencia atcc.

Para la propagación de los microorganismos se utilizó un medio complejo YPD (0.3 % extracto de levadura, 1% peptona de gelatina, 3% glucosa).

Las cepas se crecieron en placas de YPD y se incubaron a 28°C durante dos días A partir de alguna colonia aislada de las placas, se tomó una asada y fue sembrada en 25 ml de YPD a 28°C, con agitación constante durante 24horas. Las células fueron obtenidas mediante centrifugación y re suspendidas en 5 mL de PBS 1X estéril.

Una vez obtenidos las células libres de medio de cultivo, se ajustaron las suspensiones de células a 2×10^7 levaduras por cada 10 μ L de inóculo. La cuantificación se realizó en microscopio de campo claro, utilizando una cámara de Neubauer a un aumento de 40X.

Cria, manejo y selección de larvas de *G. mellonella*

Las larvas de *G.mellonella* empleadas para este experimento fueron obtenidas del insectario estandarizado por el Laboratorio de Glicobiología de Hongos. Se seleccionan individuos de la última fase larvaria, que tienen entre 2-3 cm de largo y 180-200 mg de peso [7]

Se hicieron grupos homogéneos de diez larvas, cada uno para evaluar cada cepa de *Candida*. Se realizaron tres réplicas de cada experimento. 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 *G. mellonella*

La inyección se realizó en el propodio posterior izquierdo de las larvas con ayuda de una jeringa Hamilton con aguja de 26 gauges de 10 μL . Según al protocolo estandarizado por el equipo de trabajo del Laboratorio de Glicobiología de Hongos, se procedió a inyectar 10 μL de la suspensión de 2×10^7 de células. Realizándose 3 experimentos independientes.

Parte fundamental de la inoculación de las larvas es la preparación de la zona a inyectar y su desinfección. La pro pierna izquierda es el punto de inyección (Figura 1), el cual es desinfectado con etanol al (70%). Una vez inoculadas las larvas se mantuvieron dentro de cajas de Petri a temperatura no mayor a 30°C por 8 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 de 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. El software 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 de 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 1X; al obtener una solución homogénea se prosiguió a hacer una dilución tomando 100 μL de la primera dilución junto con 900 μL de PBS1X de esa dilución se inocularon 100 μL sobre placas de medio cultivo de YPD+Ampicilina, se incubaron a 28°C y tras un lapso de 36 hrs se realiza un conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

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

Después del monitoreo de las réplicas de los tres experimentos, los datos de supervivencia y UFC se analizaron para determinar la virulencia de cada una de las cepas.



Figura 2: Larva viva (izquierdo), larva muerta (derecha)

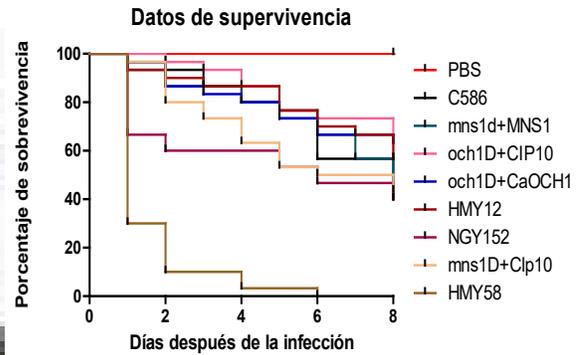


Figura 3: Curvas de supervivencia de individuos por cada cepa. $p < 0.0001$, se observa la capacidad de las distintas cepas de *C. albicans* y la cepa de *C. auris* (C586) de matar a individuos y el tiempo que tarda en hacerlo, esto indica la virulencia.

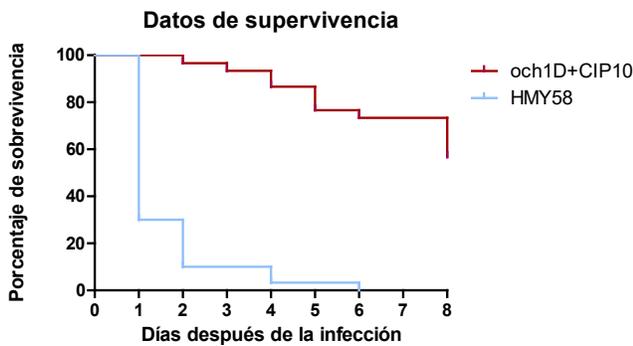


Figura 4: Curva de supervivencia de idem de virulencia entre la cepa menos virulenta contra la más virulenta según los datos obtenidos, obteniendo una $p < 0.0001$



Figura 5: Recuperación de material fúngico (UFC), A) Colonias típicas de *C. albicans* y *C. auris* en YPD+ AMP. B) Levaduras de *Candida*

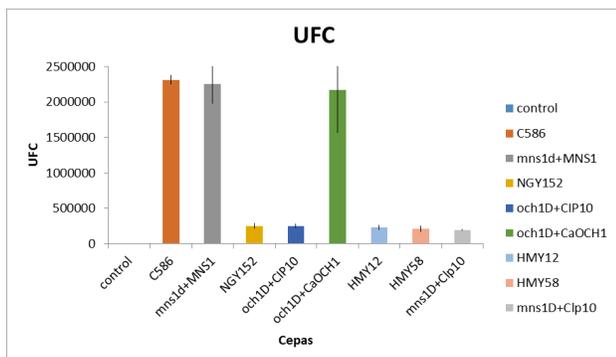


Figura 6: Gráfica de UFC, recuperación de material fúngico a partir de la extracción de la biomasa fúngica de las larvas

Comparando los resultados que se obtuvieron de se observó que la HMY58 y NGY152 fueron las que tuvieron la mayor virulencia (ver figura 3), mientras que la och1D+CIP10 su virulencia fue la más baja de todas. (Ver figura 4)

Al analizar las UFC se observó que las cepas con más virulencia, no se reprodujeron tanto como la cepa que fue de baja virulencia, por lo que podemos inferir que las cepa HMY58 y NGY152 no necesitan reproducirse demasiado para tener un efecto nocivo por el contrario la cepa och1D+CIP10 tuvo una gran reproducibilidad dentro del organismo pero no tuvo una alta virulencia. (Ver figura 6)

CONCLUSIONES

Se logró evaluar la virulencia de las 8 cepas de **Candida** utilizando como modelo de estudio a la larva de **Galleria mellonella**, los resultados se obtuvieron mediante un análisis de supervivencia y mortalidad, de organismos infectados con diferentes cepas.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mi hijo por ser la mayor motivación que tengo en la vida, a mis padres, pareja y hermanas que me apoyan para cumplir mis metas. Agradezco al Dr. Héctor por la confianza y el permitirme ser parte de este proyecto. Gracias a Nancy y Alma que estuvieron apoyándome a lo largo del proyecto porque me compartieron sus conocimientos y su tiempo. A todos los del laboratorio de Glicobiología que me ayudaron y apoyaron. A mis amigos de la carrera que siempre están para apoyarme. Este trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (ref. PDCPN2014-247109, yFC 2015-02-834), Universidad de Guanajuato (ref. 1025/2016; CIIC 95/2018), y Red Temática Glicociencia en Salud (CONACYT-México).

REFERENCIAS

1. Romani, L., (2004). Immunity to fungal infections: *Nature Reviews Immunology*, 4,11-24.
2. Brennan, M., D. Y. Thomas, M. Whiteway, and K. Kavanagh, (2002). Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae: *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 34, 153-157.
3. Cook, S.M. and McArthur, J.D. (2013) Developing *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens. *Virulence* 4(5):350-353.
4. (Ben-Ami, 2011; Brennan et al., 2002; Fleming et al., 2006; Lemaitre y Hoffmann, 2007; Scully y Bidochka, 2006).
5. Kavanagh, K., and J. P. Fallon, (2010). *Galleria mellonella* larvae as models for studying fungal virulence: *Fungal Biology Reviews*, 24, 79-83
6. Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J.-M. Reichhart, and J. A. Hoffmann, (1996). The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette *spätzle/Toll/cactus* Controls the Potent Antifungal Response in *Drosophila* Adults: *Cell*, 86, 973-983.
7. Kavanagh, K., and E. P. Reeves, (2004). Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens: *FEMS Microbiology Reviews*, 28, 101-112.
8. Hamamoto, H., K. Kurokawa, C. Kaito, K. Kamura, I. M. Razanajatovo, H. Kusuhara, T. Santa, and K. Sekimizu, (2004). Quantitative evaluation of the therapeutic effects of antibiotics using silkworms infected with human pathogenic microorganisms: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48, 774-779.
9. Cotter, G., S. Doyle, and K. Kavanagh, (2000). Development of an insect model for the in vivo pathogenicity testing of yeasts: *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 27, 163-169.
10. Hoffmann, J. A., (1995). Innate immunity of insects: *Current Opinion in Immunology*, 7, 4-10.
11. Lavine, M., and M. Strand, (2002). Insect hemocytes and their role in immunity: *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32, 1295-1309.
12. 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.
13. Bergin, D., M. Brennan, and K. Kavanagh, (2003). Fluctuations in haemocyte density and microbial load may be used as indicators of fungal pathogenicity in larvae of *Galleria mellonella*: *Microbes and Infection*, 5, 1389-1395.
14. Strand, M. R., (2008). Insect hemocytes and their role in immunity: *Insect Immunology*, p. 25-47.
15. Breawner DL, Anderson GL, Yuen KY (1992). Serotype prevalence of *Candida albicans* from blood culture isolates. *J Clin Microbiol* p 30:14