

ANÁLISIS DE LA VIRULENCIA DE SPOROTHRIX SCHENCKII Y SPOROTHRIX BRASILIENSIS EN EL ORGANISMO MODELO GALLERIA MELLONELLA.

Diana Marcela Clavijo Giraldo (1), Héctor Manuel Mora Montes (2).

1 [Licenciatura en Biología Experimental] | Dirección de correo electrónico: [diamar438@hotmail.com]

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

Resumen

La esporotricosis es una micosis subcutánea causada por un grupo de hongos patógenos filogenéticamente relacionado, conocido como el complejo *Sporothrix schenckii*. Hasta ahora, los estudios sobre la virulencia de estos organismos se han realizado usando modelos de infección subcutánea en ratones. En este trabajo, se llevó a cabo la estandarización de un protocolo de infección usando larvas de *G. mellonella* con células de *S. schenckii* stricto sensu y *S. brasiliensis*. Para este propósito, las larvas se inocularon con las tres morfologías de este hongo (conidios, micelio y levaduras) en tres concentraciones diferentes (1×10^5 , 1×10^6 y 1×10^7 células/ μl) y a diferentes temperaturas. La mortalidad se monitorizó durante 15 días, que es el tiempo medio para tener una tasa de mortalidad del 100% en cada condición. El análisis estadístico reveló que las células de levadura fue la mejor morfología para llevar a cabo los análisis de virulencia, en una concentración de 1×10^5 células/ μL . Para confirmar la utilidad de este protocolo, se analizó la virulencia de nueve aislados clínicos de *Sporothrix*, encontrando que los datos de la virulencia en los insectos tienen una correlación del 100% con los generados en el modelo de ratón. Por lo tanto, *G. mellonella* es un modelo alternativo para estudiar la virulencia de los miembros del complejo *S. schenckii*.

Abstract

Sporotrichosis is a subcutaneous mycosis caused by a group of pathogenic fungi phylogenetically related, known as *Sporothrix schenckii* complex. Until now, studies on the virulence of these organisms have been conducted using subcutaneous infection models in mice. In this work, we carried out the standardization of a protocol of infection of *G. mellonella* larvae with *S. schenckii* sensu stricto and *S. brasiliensis* cells. For this purpose, larvae were inoculated with the three morphologies of this fungus (conidia, mycelium and yeasts) in three different concentrations (1×10^5 , 1×10^6 and 1×10^7 cells/ μL) and at different temperatures for insect maintenance. Mortality was monitored during 15 days, the average time have a 100% mortality rate in each condition. Statistical analysis revealed that yeast cells was the best morphology to carry out further virulence analyzes, in a concentration of 1×10^5 cells/ μL . To confirm the usefulness of this protocol, the virulence of nine clinical isolates of *Sporothrix* was analyzed, finding that the data of virulence in the insects have a 100% correlation with those generated in the mouse model. Therefore, *G. mellonella* is an alternative model to study the virulence of *S. schenckii* complex members.

Palabras Clave

Sporothrix schenckii, *S. brasiliensis*, *Galleria mellonella*, virulencia.

INTRODUCCIÓN

Sporothrix schenckii y *S. brasiliensis* son hongos patógenos pertenecientes a un grupo de hongos filogenéticamente emparentados con diferentes distribuciones geográficas, conocido como el complejo *S. schenckii* [8]. En México, se han reportado epidemias de esporotricosis en diversos estados de la República y se considera un infección endémica de las zonas rurales de Jalisco, Nayarit, Guanajuato, San Luis Potosí, Hidalgo, Puebla, Tlaxcala y el Estado de México [7]. Como es evidente, los hongos patógenos para el humano son de incuestionable relevancia médica, ya que pueden causar enfermedades muy importantes. El estudio de estos organismos permite entender las bases biológicas de su habilidad para sobrevivir dentro del organismo, adherirse y causarle daño a los tejidos. Estos estudios se han podido llevar a cabo con éxito en animales de laboratorio, utilizando especialmente ratones, ya que en ciertos aspectos su biología es similar a la del humano. Sin embargo, existen limitantes económicas, logísticas y bioéticas para el uso de modelos de infección en mamíferos [4][6]. Como alternativa, se propone desde hace unos años, el uso de invertebrados como modelos de infección. Entre éstos destaca la larva de la polilla de cera (*Galleria mellonella*), por ser un organismo barato, muy fácil de mantener y de criar, que no requiere instalaciones especializadas para su cuidado y además, porque pueden llevarse a cabo experimentos en masa, lo cual impacta de forma positiva en la reproducibilidad de los datos [4][6]. Otra ventaja significativa es que el sistema inmune de estas larvas es funcionalmente similar a la rama innata del nuestro sistema inmune [1][5]. Por lo tanto, en el presente proyecto buscamos analizar si las larvas de *G. mellonella* son un modelo alternativo para estudiar la virulencia de dos miembros del complejo de *S. schenckii*, algo que hasta la fecha no ha sido reportado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos y medios de cultivo:

Para el análisis de la virulencia de los diferentes aislados clínicos, fue necesario estandarizar un

protocolo de infección. Para esto se utilizaron las cepas *S. schenckii sensu stricto* 1099-18 ATCCMYA 4821 y *S. brasiliensis* 5110 ATCC MYA 4823 que son cepas estudiadas y de las que se sabe que tienen una baja y alta virulencia, respectivamente [3].

Para la propagación de los microorganismos se utilizó medio complejo YPD. Para el análisis de la virulencia se utilizaron 9 cepas adicionales de las especies *S. schenckii* y *S. brasiliensis*

Para la estandarización del protocolo se usaron las tres morfologías típicas de hongo: conidios, levaduras y fase micelial.

Para la obtención de conidios, se inocularon placas con medio YPD, sólido, pH 4.5, con 30 μ L de un stock de conidios congelados a -70°C . Las placas se incubaron a 28°C durante 9 días. Los conidios se cosecharon de cada placa, utilizando 5 mL de agua estéril y raspando la superficie con un asa de vidrio estéril.

Para la obtención de levaduras y fase micelial, se inocularon matraces Erlenmeyer de 125 mL que contenían 50 mL de medio YPD, líquido, pH 7.8 y pH 4.5, respectivamente, con 50 μ L de la suspensión de conidios obtenida con anterioridad. Para obtener levaduras los matraces se incubaron durante 5, mientras que la fase micelial se incubó por 3 días; con agitación constante de 120 rpm y a una temperatura de 37°C para las levaduras y de 28°C para la fase micelial.

Todas las morfologías obtenidas fueron guardadas en PBS, pH 7.4 a una temperatura de -20°C .

Una vez estandarizado el protocolo de infección se realizaron los análisis de virulencia utilizando únicamente la morfología de levadura.

Obtención y mantenimiento de las larvas de *G. mellonella*:

Las larvas de *G. mellonella* se adquirieron con un distribuidor autorizado: "Nutrición Animal de Occidente S.A" de la ciudad de Puebla, México.

Infección y análisis de virulencia:

Una vez obtenidas las células de las cepas en sus tres morfologías se cuantificaron en el microscopio utilizando una cámara de Neubauer.

Una vez contabilizadas las células se ajustaron las suspensiones de células en tres concentraciones: 1×10^5 ; 1×10^6 células/ μL y 1×10^7 células/ μL .

Se hicieron grupos homogéneos de 10 larvas, cada uno para evaluar cada condición (Control, PBS 1X, conidios, levaduras y micelio en concentraciones de 1×10^5 , 1×10^6 , y 1×10^7 células/ μL) y se pusieron en placas de Petri. Para la inoculación se utilizó una jeringa con capacidad de 10 μL . Se cargaron 10 μL de suspensión celular y se procedió a inocular las larvas. Para esto, primero aseamos las larvas y luego inyectamos las larvas en la propierna izquierda. Una vez realizadas todas las inoculaciones, las larvas se mantuvieron a 37°C, 28°C y temperatura ambiente y se monitorearon durante 15 días.

Análisis estadísticos:

Los datos se analizaron utilizando la prueba Mann-Whitney. Las gráficas de supervivencia se compararon utilizando una prueba de log-rank utilizando el programa GraphPad Prism 5 para Windows. Los valores de p por debajo de 0.05 se consideraron significativos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Después de realizar las primeras inoculaciones fue evidente que las larvas respondían con mayor rapidez ante las células de *S. brasiliensis*, melanizando su cuerpo casi de inmediato.

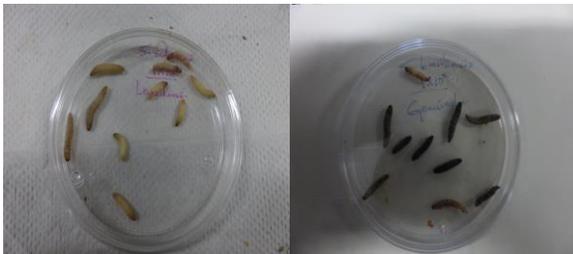


Imagen 1. Melanización como respuesta a la infección. A la izquierda se observan las larvas antes de ser inyectadas. A la derecha, las larvas 10 minutos después de la inyección.

Posteriormente, observamos que eran necesarios 15 días para obtener en promedio el 100% en la mortalidad de todas las condiciones evaluadas. Los experimentos fueron realizados por triplicado y los datos obtenidos fueron analizados, determinando que las larvas de *G. mellonella* tienen un comportamiento similar a los estudios ya realizados, mostrando de forma general que *S. brasiliensis* tarda menos tiempo (7,93 días) que *S. schenckii* (8,12 días) para matar a las larvas.

Además, se observó que la morfología de levadura, en una concentración de 1×10^5 células/ μL , era la que presentaba los datos más consistentes.

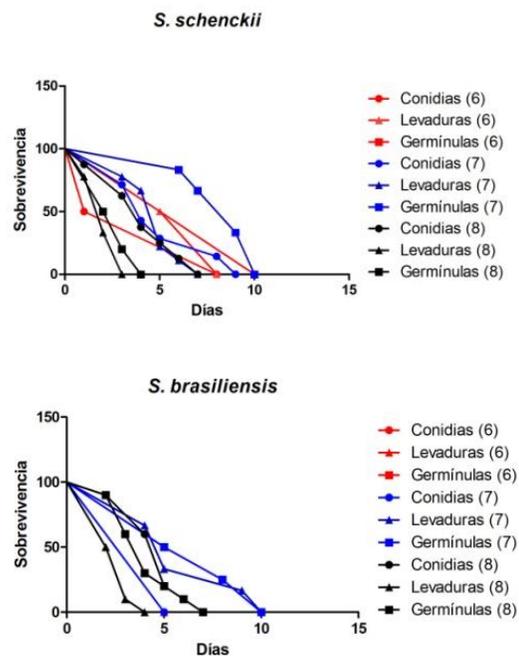


Imagen 2. Gráficas de supervivencia para cada morfología y cada concentración. Las gráficas fueron comparadas mediante la prueba de log-rank.

Cepas	Ss-39	Ss-54	Ss-B02	114500	14158	UFTMo1
Ss-54	0,5627					
Ss-B02	0,5518	0,8319				
114500	0,0013	0,0017	0,0007			
14158	0,2939	0,4538	0,3656	0,0148		
UFTMo1	0,0014	0,0022	3,3E-05	0,0214	0,0690	
Ss-47	0,0177	0,0378	0,0009	0,0027	0,5846	0,0010

Tabla 1. Análisis de los datos. Valores de *p* por debajo de 0.05 se consideran significativos.

Finalmente, se hicieron los análisis de virulencia, con 9 aislados clínicos y utilizando el protocolo ya estandarizado, encontrando que la virulencia de las especies puede cambiar dependiendo de la cepa que se analice. Así, determinamos que las cepas de *S. schenckii* tenían una virulencia mayor que algunas de las cepas de *S. brasiliensis*.

CONCLUSIONES

Conseguimos estandarizar un protocolo de infección en larvas de *G. mellonella*, demostrando que se conservan los resultados de jerarquización, donde la especie *S. brasiliensis* es más virulenta que *S. schenckii sensu stricto*. Por otro lado el análisis de los aislados clínicos, demostró que la virulencia depende de la cepa analizada [2][5], en este caso, las cepas de *S. schenckii* mostraron una virulencia mayor que la mayoría de las cepas de *S. brasiliensis* analizadas.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al grupo de trabajo del laboratorio de Glicobiología de Hongos del Departamento de Biología, a la Universidad de Guanajuato y al Concyteq por aportar la financiación y las instalaciones, necesarios para el desarrollo de este proyecto.

REFERENCIAS

- Bergin, D., Reeves, E. P., Renwick, J., Wientjes, F. B. and Kavanagh, K. (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
- Brito, M.M.S., Conceicao-Silva, F., Morgado, F. N., Raibolt, P.S., Schubach, A., et al. (2007) Comparison of virulence of different *Sporothrix schenckii* clinical isolates using experimental murine model. *Medical Mycology* 45(8): 721-729
- Castro, R.A., Kubitschek-Barreira, P. H., Teixeira, P. A. C., Sanches, G. F., Teixeira, M. M., Quintella, L. P., et al. (2013) Differences in cell morphometry, cell wall topography and Gp70 expression correlate with the virulence of *Sporothrix brasiliensis* clinical isolates. *PLoS ONE* 8(10): e75656
- Cook, S.M. and McArthur, J.D. (2013) Developing *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens. *Virulence* 4(5):350-353.
- Fernandes, G. F., dos Santos, P. O., Rodrigues, A. M., Sasaki, A. A., Burger, E. and de Camargo, Z. P. (2013) Characterization of virulence profile, protein secretion and immunogenicity of different *Sporothrix schenckii sensu stricto* isolates compared with *S. globosa* and *S. brasiliensis* species. *Virulence* 4(3): 241-249
- Jacobsen, I.D. (2014) *Galleria mellonella* as a model host to study virulence of *Candida*. *Virulence* 5(2):237-239.
- Lopez-Romero, E., Reyes-Montes Mdel, R., Perez-Torres, A., Ruiz-Baca, E., Villagomez-Castro, J.C., Mora-Montes, H.M., et al. (2011) *Sporothrix schenckii* complex and sporotrichosis, an emerging health problem. *Future Microbiol* 6(1):85-102.
- Marimon, R., Gene, J., Cano, J., Trilles, L., Dos Santos Lazera, M. and Guarro, J. (2006) Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. *J Clin Microbiol* 44(9):3251-3256.