

# Estandarización de un protocolo de infección de *Malassezia furfur* para la evaluación de tropismo en larvas de pez cebra (*Danio rerio*)

DAVID FELIPE SOTO PRIETO<sup>1</sup>, LUCIA URIBE<sup>2</sup>, MARITZA TORRES<sup>1</sup>, ZAYRA GARAVITO<sup>2</sup>, ADRIANA CELIS<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Grupo Celular y Molecular de Microorganismos Patógenos, Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia

<sup>2</sup>Laboratorio de Biología del Desarrollo, Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia

## Resumen

En este trabajo se llevó a cabo la estandarización de un modelo de infección de *Malassezia furfur* CBS 1878, usando el organismo modelo pez cebra (*Danio rerio*). Encontramos que *M. furfur* CBS 1878 puede afectar la tasa de supervivencia de los embriones micro inyectados de manera dosis-dependiente. Igualmente, al realizar el monitoreo de la colonización y tropismo de la levadura se visualizaron las interacciones entre el patógeno y el tejido infectado en el pez cebra. Los resultados de este trabajo demuestran que este modelo vertebrado podría llegar a ser una herramienta útil para el estudio de los procesos de interacción huésped – patógeno. De esta forma, pueden permitir avanzar en el conocimiento de los mecanismos de virulencia relacionados con el establecimiento de la infección por parte de esta levadura comensal de la piel de los humanos y animales. Asimismo, se resaltan las ventajas en términos de monitoreo, manejo e implementación del pez cebra para el estudio de patologías asociadas a hongos.

## Introducción

*Malassezia furfur* CBS 1878 es una levadura perteneciente a la microbiota normal de la piel y se caracteriza principalmente por su naturaleza lipofílica (Thayikkannu *et al.*, 2015). Esta ha sido asociada con distintas afectaciones sistémicas en neonatos y pacientes inmunocomprometidos (Maurer *et al.*, 2000). Se ha descrito su presencia en, neumonía, osteomielitis y meningitis, causadas principalmente por la contaminación de catéteres (Gaitanis *et al.*, 2012). Particularmente, han estado estrechamente relacionadas con el uso de una suplementación dietaria basada en altos contenidos de lípidos (Schleman *et al.*, 2000) y varios factores de virulencia de la levadura, tales como lipasas, fosfolipasas, indoles y macromoléculas extracelulares (Zhang *et al.*, 2019). Teniendo en cuenta estas patologías, el establecimiento de un modelo *in-vivo* es esencial para entender la interacción entre este patógeno y su hospedero. Algunos estudios previamente realizados están basados en modelos *in-vivo* tradicionalmente usados como los modelos murinos e *in-vitro* como los cultivos celulares. Sin embargo, estos tienen algunas limitaciones. Por ejemplo, los modelos murinos tienen desventajas como el alto costo de manutención, tiempo de desarrollo prolongado y difícil seguimiento de las células inyectadas en el organismo. En cuanto a los cultivos celulares estos se han convertido en una herramienta de estudio complementario a modelos animales, pero a diferencia de estos, los cultivos celulares permiten evaluar las distintas fases y tipos de interacciones entre el patógeno y múltiples tipos de células del huésped (Rosowski *et al.*, 2018).

Por lo tanto, se han buscado otros organismos como alternativas que permitan llenar los vacíos y resolver las incógnitas que no pueden ser fácilmente abordadas usando los modelos tradicionales. El pez cebra (*Danio rerio*) ha sido implementado de forma exitosa para una gran variedad de estudios de investigación pre-clínica (Frisk *et al.*, 2012). Debido a su alta tasa reproductiva, similitud en términos genéticos, fisiológicos, estructura anatómica y más

importante un sistema inmune innato y adaptativo similar al de los mamíferos, ha ganado importancia en investigación biomédica. A las 36 hpf (horas post – fertilización) los embriones ya presentan un sistema circulatorio funcional que alimenta una variedad de tejidos y a su vez transporta distintas células del sistema inmune innato, como macrófagos y neutrófilos a diferentes regiones del individuo (Boshra, Li, & Sunyer, 2006). Gracias a estas ventajas, recientemente varios estudios han sido realizados con el fin de hacer una evaluación de la eficacia del modelo para estudiar otras levaduras como *Candida albicans* (Gratacap *et al.*, 2017) y *Cryptococcus neoformans* (Bojarczuk *et al.*, 2016). Por esta razón, el objetivo de esta investigación fue estandarizar un modelo de estudio para *M. furfur* CBS 1878 usando embriones de peces cebra.

## **Metodología**

### **Cultivo y preparación del inóculo.**

La cepa usada en este estudio fue *Malassezia furfur* CBS 1878 adquirida de la colección Westerdijk Fungal Biodiversity Institute (Utrecht, Holand). Esta fue cultivada por 3 días a 33°C en agar Dixon modificado (mDixon; 36g  $mL^{-1}$  agar Mycosel[BD], 20g  $mL^{-1}$  Oxbile[Sigma-Aldrich], 36 g  $mL^{-1}$  Extracto de malta [Oxoid], 2  $mL L^{-1}$  Glicerol [Sigma-Aldrich], 2  $mL L^{-1}$  ácido oleico [Sigma-Aldrich] y 10  $mL L^{-1}$  Tween 40 [Sigma-Aldrich]) (Celis *et al.*, 2017). Posteriormente se realizó una suspensión de las levaduras en 5 mL de Tween 80 (0.5%), la cual fue filtrada con una gasa estéril. Se hizo un conteo celular de la solución madre en una cámara de Neubauer. Basados en estos conteos, se prepararon los inóculos a micro inyectar  $1.5 \times 10^6$ ,  $1.5 \times 10^7$  y  $1.5 \times 10^8$  UFC  $mL^{-1}$

### **Microinyección en embriones de pez cebra de 36 hpf**

El proceso de microinyección se hizo con modificaciones menores del procedimiento descrito previamente (Gacha-Garay *et al.*, 2019). Específicamente, para de *M. furfur* CBS 1878 en las larvas del pez cebra, los embriones fueron anestesiados por inmersión en 0.265 mg  $mL^{-1}$  de Tricaine Methanesulfonate (MS-222) [Sigma-Aldrich] y posicionados ventralmente en camas de agarosa. La microinyección para la inoculación del embrión se hizo en el área pericárdica (**Figura 1**). La solución usada como vehículo de microinyección contenía Tween 80 al 0,5% con rojo de fenol (1mg  $mL^{-1}$ ) [Sigma-Aldrich]. En esta solución se prepararon los inóculos que contenían las células de la levadura en distintas concentraciones. Los embriones micro inyectados fueron transferidos a placas de pozos de 24 pozos [Thermo Scientific<sup>TM</sup> BioLite] con 2 ml de agua de huevo estéril, realizando monitoreo aproximadamente cada 6 horas por un periodo de 48 horas. Las placas fueron incubadas a una temperatura de 32°C El control negativo solo fue micro – inyectado con el vehículo. Se hicieron 3 réplicas independientes.



**Figura 1.** Sitio de microinyección en embriones de peces cebra (>36 horas post—fertilización) vientre arriba, anterior a la derecha - Área pericárdica (círculo rojo).

### **Determinación de la carga fúngica por ensayo de formación de colonias**

La carga fúngica de los embriones de pez micro inyectados con las diferentes concentraciones de *M. furfur* CBS 1878 fueron analizados entre las 10 a 12 horas post – inyección (hpi). Los peces inoculados se sacrificaron por inmersión en  $0.408 \text{ mg mL}^{-1}$  Tricaine Methanesulfonate (MS-222). Posteriormente, fueron lavados con  $200 \mu\text{L}$  PBS (1X) estéril y se homogenizaron en  $0,5 \text{ mL}$  de PBS (1X). Los volúmenes fueron aforados a  $1 \text{ mL}$  con PBS estéril en un tubo eppendorf de  $1,5 \text{ mL}$ . Para determinar el número de unidades formadoras de colonias de *M. furfur* CBS 1878 se realizaron diluciones seriadas ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ ) y se llevó a cabo el plaqueo en mDixon. Las placas se incubaron a  $33^\circ\text{C}$  durante 48 horas. Las unidades formadoras de colonia obtenidas se confirmaron mediante la implementación de pruebas fenotípicas y bioquímicas (ureasa, catalasa y crecimiento en agar Sabouraud). *M. furfur* es ureasa positiva, catalasa positiva y ausencia de crecimientos en agar Sabouraud (Elshabrawy *et al.*,2017).

### **Tinciones hematoxilina – eosina**

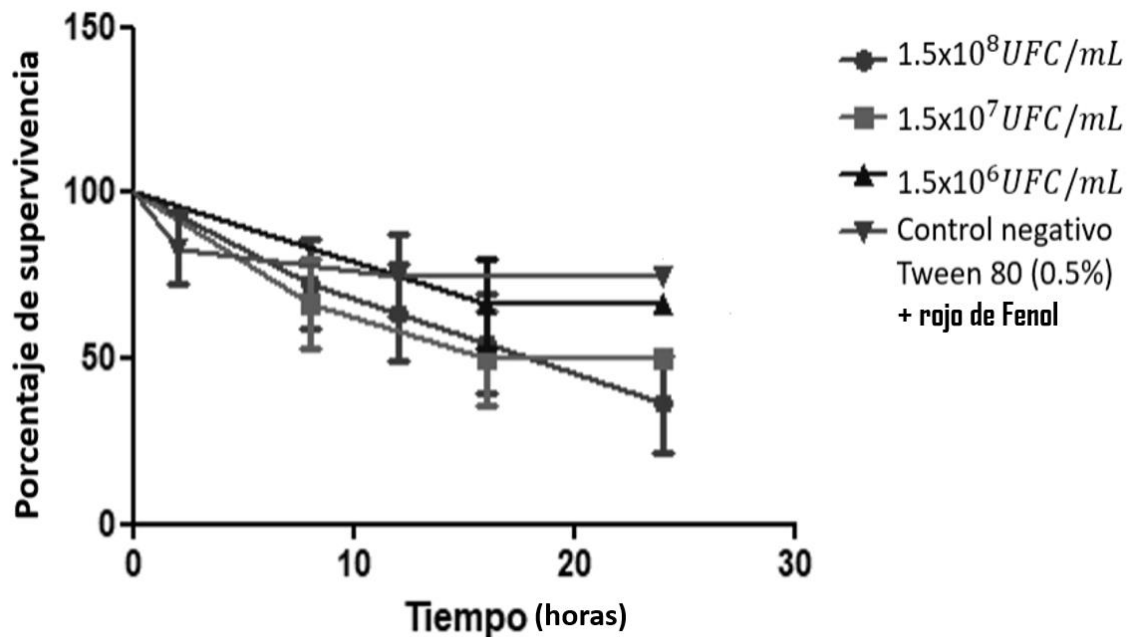
Para determinar la capacidad invasiva de la levadura en los embriones micro inyectados, se realizó un análisis histológico utilizando individuos que mostraran signos de deterioro (ruptura vitelina y necrosis en el área de microinyección) con las concentraciones más altas de inóculo. Para esto los embriones fueron sacrificados por inmersión en  $0.408 \text{ mg mL}^{-1}$  Tricaine Methanesulfonate (MS-222), fijados con para formaldehído al 4% [Sigma-Aldrich] y deshidratados en etanol al 50%,70% y 96% y fueron embebidos en parafina. Se realizaron cortes de  $5 \mu\text{m}$  con un micrótopo [Leica Microsystems] y las secciones de tejidos fueron teñidos con hematoxilina – eosina.

### **Análisis estadístico**

Se realizaron los análisis de significancia de la curva de supervivencia por medio de la prueba Kaplan – Meier Log Rank Test ANOVA (Abou-Shaara, 2018) e igualmente se realizó un Modelo de regresión logística binomial con el objetivo de evaluar el ajuste de los resultados obtenidos al modelo de regresión.

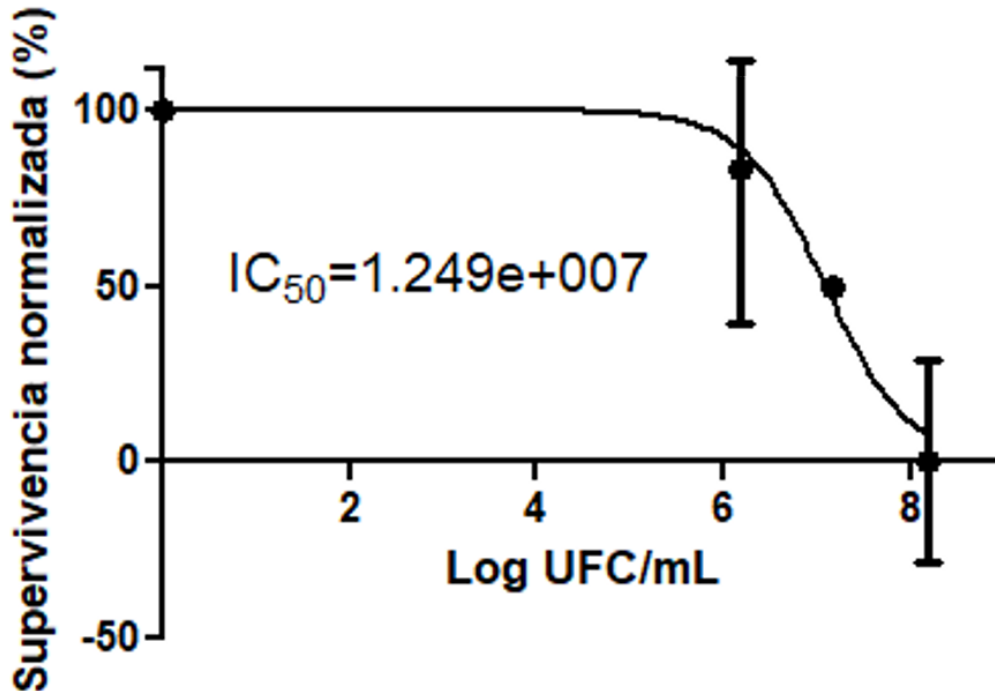
## Resultados

### Ensayo de mortalidad de los embriones por *M. furfur* CBS 1878



**Figura. 2. Curva de porcentaje de supervivencia** mediante la metodología de microinyección con distintas concentraciones de inoculo de *M.furfur* CBS 1878. (p- Value :0.35)

El porcentaje de supervivencia de los embriones infectados fue determinado para evaluar la viabilidad de usar el pez cebra como un modelo de estudio para la infección causada por *M. furfur* CBS 1878. Como se muestra en la Figura.2, los individuos micro inyectados con la dosis más alta presentan una mayor afectación en la supervivencia comparada con las otras concentraciones de inoculo. Pero estas diferencias entre las curvas no son estadísticamente significativas (p- Value:0.35). Por lo tanto, estos resultados no nos permiten evidenciar que las células de *M. furfur* CBS 1878 tienen un efecto negativo significativo en la tasa de supervivencia de los embriones del pez cebra.

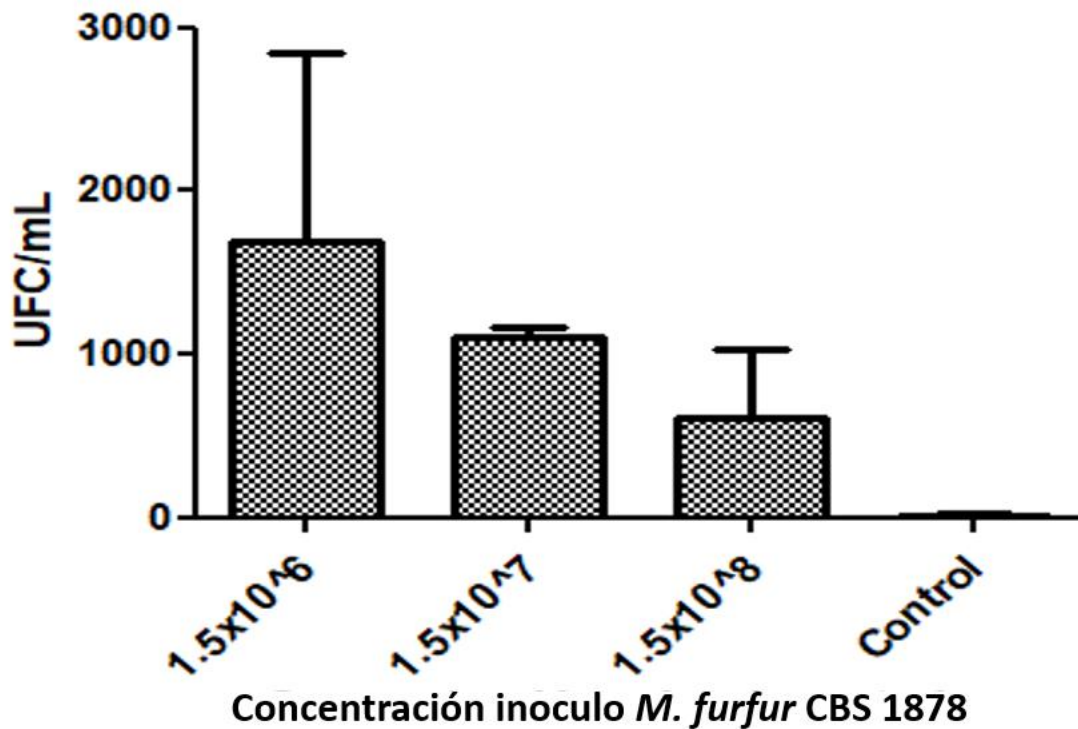


**Figura 3. Curva pro – bit.** Dosis infectiva del modelo. Donde se representa la concentración la dosis letal 50 (valor – p: 0.05; R: 0.5)

Los datos de supervivencia de los individuos micro inyectados se observan en la curva pro – bit (Figura 3.) la cual permitió obtener la dosis infectiva del modelo ( $1.2 \times 10^7 \text{ UFC L}^{-1}$ ) y de igual forma mediante el análisis estadístico del modelo se identificó un efecto significativo sobre la supervivencia del embrión. Como se esperaba, hubo una variación del porcentaje de supervivencia que depende de la concentración del inóculo, es decir, embriones micro inyectados con mayor concentración presentaron una tasa de supervivencia baja.

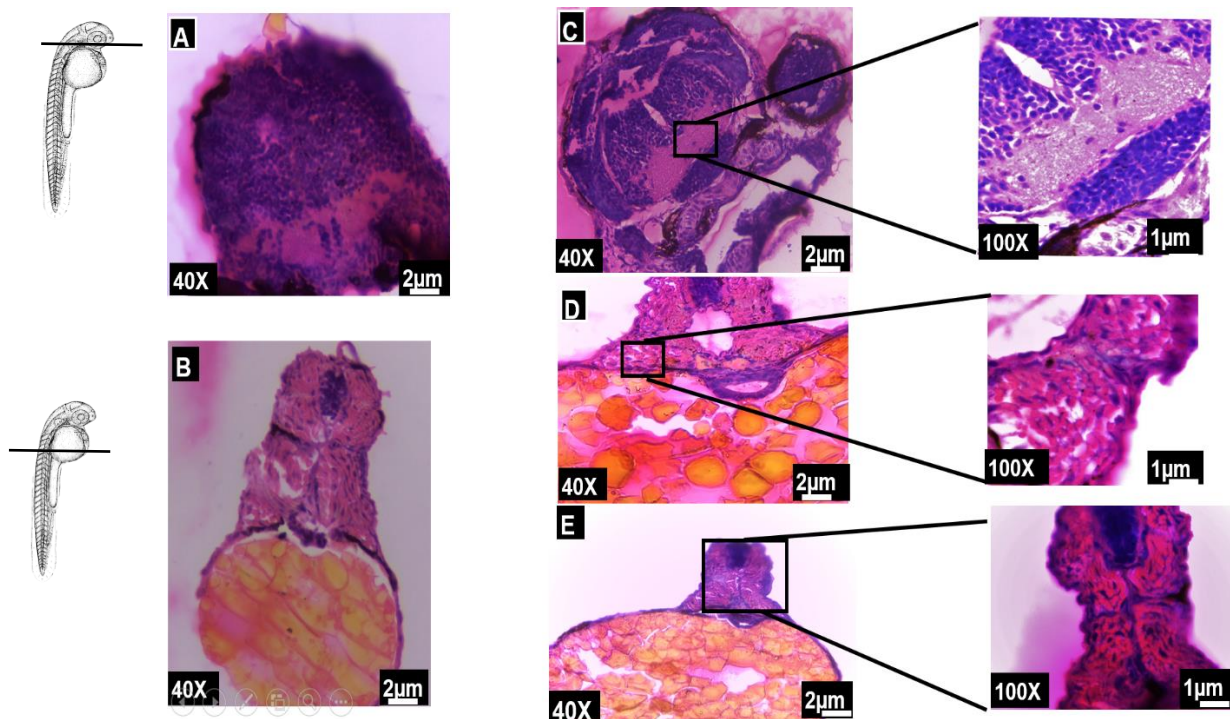
#### **Análisis de colonización e invasión de *M. furfur* CBS 1878 en el pez cebrá.**

La capacidad de colonizar e invadir tejidos dentro del hospedero es crucial para el proceso infeccioso de *M. furfur* CBS 1878. Mediante el ensayo de unidad formadora de colonia (UFC) se analizaron las células de esta levadura dentro del pez. Como muestra la figura 4. el conteo del número de unidades formadoras de colonia fue mayor en el grupo de peces micro inyectados con la concentración de inóculo más baja ( $1.5 \times 10^6 \text{ UFC mL}^{-1}$ ). Por el contrario, el conteo de UFCs en los individuos micro inyectados con la concentración de inóculo más alta ( $1.5 \times 10^8 \text{ UFC mL}^{-1}$ ) fue la más baja respecto a los demás inóculos.



**Figura 4. Carga fúngica de *M. furfur* CBS 1878 en embriones infectados.** 4 individuos micro inyectados con cada una de las concentraciones fueron colectados y estos se tomaron a las 12 hpi. El eje X representa las concentraciones del inóculo de *M. furfur* CBS 1878 y el eje Y el número de unidades formadoras de colonia (UFC) recuperadas de los embriones.

En cuanto al análisis histológico de la colonización de la levadura, se observa en la Fig. 4. secciones a dos diferentes alturas del embrión. Se puede observar alteraciones en la integridad celular en zonas como el encéfalo, somitas y vitelo. En los embriones micro inyectados (figura 4C, 4D y 4E) respecto al control (figura 4A y 4B). Estas alteraciones se ven reflejadas en una pérdida en la homogeneidad celular del vitelo, donde los embriones micro inyectados presentan un tamaño reducido y las células están disgregadas. Además, en el tejido muscular se observan una serie de espacios entre las células de este, asimismo en el encéfalo se observa un espacio celular relacionado con este lo cual podría estar relacionado a un proceso inflamatorio.



**Figura 5. Embriones micro inyectados**

A. y B. Control negativo. C.  $1.5 \times 10^6 \text{ UFC mL}^{-1}$ . D.  $1.5 \times 10^7 \text{ UFC mL}^{-1}$ . E.  $1.5 \times 10^8 \text{ UFC mL}^{-1}$ . A. Corte a la altura del encéfalo. B, D y E cortes a la altura del vitelo. Posición de las secciones: Dorso a ventral

### Discusión

En este estudio, se evaluó la aplicación del pez cebra como un modelo para la investigación del proceso infectivo de *M. furfur* CBS 1878. Se encontró que esta levadura genera una variación en la tasa de supervivencia de los embriones del pez cebra dependiendo de la dosis de inóculo que se utilice para la micro inyección. El análisis histológico muestra que hay afectaciones en tejidos como el encéfalo, somitas y vitelo a pesar de que la técnica de visualización del tejido no permitió identificar la levadura en dichas áreas. Sin embargo, estos efectos localizados no están presentes en las secciones tomadas del grupo control micro inyectado con el vehículo, descartando un efecto generalizado del mismo. Estas alteraciones en la integridad celular podrían estar relacionadas con las características lipofílicas de esta levadura. Paralelamente en el tejido muscular y encefálico se evidencian zonas con espacios inter – celulares probablemente llenos de fluido, que podrían ser el reflejo de un proceso inflamatorio mediado probablemente por la respuesta inmune del pez ante la presencia de *M. furfur* CBS 1878. Este tipo de alteraciones o respuestas inflamatorias han sido reportadas previamente en estudios realizados con otros hongos en el pez cebra. Por ejemplo, en una investigación realizada con *Aphanomyces* se observó una serie de granulomas a la altura del sistema digestivo, donde se visualizaron agregados de la levadura y algunas células inmunes (Frisk, 2012). De igual forma se han reportado procesos de reclutamiento de células inmunes en el pez cebra mediadas por la inyección de *C. albicans*, en el sitio de microinyección y áreas como el encéfalo y tejido digestivo (Wang *et al.*, 2015). Paralelamente con *C.*

*neoformans* se ha buscado dilucidar el mecanismo de colonización del sistema nervioso central, donde se ha reportado la importancia que juegan algunos procesos pro – inflamatorios y células como los macrófagos (Bojarczuk *et al.*, 2016). Todos estos ensayos experimentales muestran los diferentes mecanismos de respuesta celular y humoral llevadas a cabo en el pez, las cuales presentan similitudes entre sí y lo más importante, con otros modelos como los murinos. Asimismo, se ha evaluado el tropismo de estos organismos para entender las diferentes actividades metabólicas relevantes para llevar a cabo un proceso de colonización (Tenor *et al.*, 2015).

Respecto a los análisis estadísticos obtenidos a partir de la curva pro – bit, la regresión aplicada obtuvo un valor de 0.5, lo cual indica una alta variación en los resultados, ya que este valor refleja que el 50% de los datos obtenidos están ajustados al modelo. Esto muestra que la estandarización del protocolo de infección de *M. furfur* CBS 1878 en embriones de pez cebra es potencialmente viable, pero se requiere completar el proceso de estandarización e incorporar algunas modificaciones. Dichos ajustes están ligados a un mayor número de organismos micro inyectados y un seguimiento por un intervalo de tiempo menor. Estas modificaciones se podrían plantear teniendo en cuenta que en otros modelamientos hechos en el pez cebra se tomaron más individuos por cada réplica independiente y se hizo una revisión a las 2, 15 y 23 hpi (Rosowski *et al.*, 2018). En el presente trabajo se hizo una revisión de los individuos micro inyectados en intervalos de 8 a 12 hpi lo que podría ser un factor importante a tener en cuenta. Dado los resultados obtenidos en la **figura 4**, donde se observa un patrón contradictorio a lo esperado, este podría estar explicado por una respuesta inmune adaptativa funcional en el intervalo de tiempo en el que se tomó el individuo (Boshra *et al.*, 2006).

Además, se han implementado métodos de seguimiento más eficaces y selectivos que han permitido una mejor visualización del proceso infectivo de distintas levaduras. Entre estas técnicas que podrían ser implementadas y estandarizadas en este ensayo se encuentra la utilización de anticuerpos, tinción con ácido periódico de Schiff y marcaje mediante la expresión de proteínas fluorescentes como EGFP y d'Tomato (Ho *et al.*, 2019). Estas han sido ampliamente usadas en la visualización de las distintas etapas presentes en el proceso de colonización de algunas levaduras, como es el caso de *C. albicans* donde se ha evaluado el rol de la formación de estructuras como pseudo hifas e hifas como un factor de virulencia (Maciel *et al.*, 2019). Por esta razón, para futuros estudios de *M. furfur* CBS 1878 en el pez cebra la implementación de nuevas herramientas y modificaciones podría aumentar la fiabilidad de los datos, llevar a la evaluación de otros factores asociados a las interacciones patógeno hospedero y además implementar el modelo en otras fases tardías y tempranas del desarrollo del pez cebra. Por ejemplo, en un análisis de un factor de virulencia ligado a formación de estructuras esenciales para llevar a cabo un proceso infectivo de *Candida albicans* se infectaron embriones del pez cebra de 24 hpf (Deng & Lin, 2018). Esto con el fin de analizar y entender todas las posibles variables implicadas en términos de colonización, tropismo y defensa del hospedero. Adicionalmente, con este patógeno se han logrado visualizar las interacciones en etapas adultas del pez cebra, donde el sistema inmune adaptativo se encuentra funcional en contraste con etapas tempranas (Wu & Chen, 2016).



## Agradecimientos

A los integrantes del grupo de investigación Celular y Molecular de Microorganismos Patógenos (CeMoP) y al Laboratorio de Biología del Desarrollo (Bioldes) de la universidad de los Andes

## Bibliografía

- Abou-Shaara, H. F. (2018). Scientific note: Similarities between survival analysis using kaplan-meier and ANOVA. *Thailand Statistician*, *16*(2), 221–229.
- Bojarczuk, A., Miller, K. A., Hotham, R., Lewis, A., Ogryzko, N. V., Kamuyango, A. A., ... Johnston, S. A. (2016). Cryptococcus neoformans Intracellular Proliferation and Capsule Size Determines Early Macrophage Control of Infection. *Scientific Reports*, *6*(February), 1–15. <https://doi.org/10.1038/srep21489>
- Boshra, H., Li, J., & Sunyer, J. O. (2006). Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish and Shellfish Immunology*, *20*(2), 239–262. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.04.004>
- Celis, A. M., Vos, A. M., Triana, S., Medina, C. A., Escobar, N., Restrepo, S., ... de Cock, H. (2017). Highly efficient transformation system for Malassezia furfur and Malassezia pachydermatis using Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation. *Journal of Microbiological Methods*, *134*, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.01.001>
- Deng, F.-S., & Lin, C.-H. (2018). Identification and characterization of ORF19.1725, a novel gene contributing to the white cell pheromone response and virulence-associated functions in Candida albicans. *Virulence*, *9*. <https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1456228>
- Frisk, C. S. (2012). *Bacterial and Fungal Diseases. The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380920-9.00030-4>
- Gacha-Garay, M. J., Niño-Joya, A. F., Bolaños, N. I., Abenoza, L., Quintero, G., Ibarra, H., ... Garavito-Aguilar, Z. V. (2019). Pilot study of an integrative new tool for studying clinical outcome discrimination in acute leukemia. *Frontiers in Oncology*, *9*(APR), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00245>
- Gaitanis, G., Magiatis, P., Hantschke, M., Bassukas, I. D., & Velegraki, A. (2012). The Malassezia genus in skin and systemic diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, *25*(1), 106–141. <https://doi.org/10.1128/CMR.00021-11>
- Gratacap, R. L., Scherer, A. K., Seman, B. G., & Wheeler, R. T. (2017). Control of Mucosal Candidiasis in the Zebrafish Swim Bladder Depends on Neutrophils That Block Filament Invasion and Drive Extracellular-Trap Production. <https://doi.org/10.1128/IAI.00276-17>

- Ho, J., Yang, X., Nikou, S. A., Kichik, N., Donkin, A., Ponde, N. O., ... Naglik, J. R. (2019). Candidalysin activates innate epithelial immune responses via epidermal growth factor receptor. *Nature Communications*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09915-2>
- Maciel, E. I., Jiang, C., Barghouth, P. G., Nobile, C. J., & Oviedo, N. J. (2019). The planarian *Schmidtea mediterranea* is a new model to study host-pathogen interactions during fungal infections. *Developmental and Comparative Immunology*, *93*(December 2018), 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.12.005>
- Maurer, T. a. (2000). Dermatologic manifestations of HIV infection. *Topics in HIV Medicine : A Publication of the International AIDS Society, USA*, *13*(5), 149–154. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17437477>
- Rosowski, E., Knox, B., Archambault, L., Huttenlocher, A., Keller, N., Wheeler, R., & Davis, J. (2018). The Zebrafish as a Model Host for Invasive Fungal Infections. *Journal of Fungi*, *4*(4), 136. <https://doi.org/10.3390/jof4040136>
- Schleman, K. A., Tullis, G., & Blum, R. (2000). Intracardiac mass complicating malassezia furfur fungemia. *Chest*, *118*(6), 1828–1829. <https://doi.org/10.1378/chest.118.6.1828>
- Tenor, J. L., Oehlers, S. H., Yang, J. L., Tobin, D. M., & Perfect, J. R. (2015). Live Imaging of Host-Parasite Interactions in a Zebrafish Infection Model Reveals Cryptococcal Determinants of Virulence and Central Nervous System Invasion. <https://doi.org/10.1128/mBio.01425-15>
- Thayikkannu, A. B., Kindo, A. J., & Veeraraghavan, M. (2015). Malassezia-Can it be Ignored? *Indian Journal of Dermatology*, *60*(4), 332–339. <https://doi.org/10.4103/0019-5154.160475>
- Wang, K., Fang, X., Ma, N., Lin, Q., Huang, Z., Liu, W., ... Zhang, Y. (2015). Myeloperoxidase-deficient zebrafish show an augmented inflammatory response to challenge with *Candida albicans*. *Fish and Shellfish Immunology*, *44*(1), 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.01.038>
- Wu, C.-C., & Chen, B.-S. (2016). A Systems Biology Approach to the Coordination of Defensive and Offensive Molecular Mechanisms in the Innate and Adaptive Host-Pathogen Interaction Networks. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149303>
- Zhang, Y. J., Han, Y., Sun, Y. Z., Jiang, H. H., Liu, M., Qi, R. Q., & Gao, X. H. (2019). Extracellular vesicles derived from *Malassezia furfur* stimulate IL-6 production in keratinocytes as demonstrated in in vitro and in vivo models. *Journal of Dermatological Science*, *93*(3), 168–175. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2019.03.001>