

***Galleria mellonella* como un modelo novedoso para el estudio de *Malassezia furfur* CBS 1878**

Pinzón, E.N.¹, Celis, A¹, Parra-Giraldo, CM.²

¹Grupo de Investigación Celular y Molecular de Microorganismos Patógenos, Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de los Andes, Bogotá D.C., Colombia. ²Unidad de Proteómica y Miosis Humanas, Grupo de Enfermedades Infecciosas, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C., Colombia.

Resumen

Malassezia furfur es una levadura lípido-dependiente y comensal que hace parte de la microbiota de la piel de animales y humanos. Esta levadura se ha relacionado como un agente patógeno causante de infección sistémica en pacientes que reciben emulsión lipídica intravenosa, particularmente en neonatos con dispositivos de acceso venoso central y pacientes inmunosuprimidos. Sin embargo, actualmente no se conocen los procesos de interacción del patógeno con su hospedero. En este estudio proponemos a *Galleria mellonella* como un nuevo modelo de estudio que permite evaluar la virulencia de este patógeno en relación con su hospedero. Este insecto puede sobrevivir a un amplio rango de temperaturas, incluyendo la temperatura corporal humana, además, presenta una gran similitud de su respuesta inmune innata con la de los humanos. Este modelo ha permitido el estudio de la virulencia y la actividad de fármacos en algunas levaduras de gran importancia médica como *Candida* sp. y *Cryptococcus* sp. El objetivo de este estudio es establecer el modelo de infección de *M. furfur* en *G. mellonella*. Para cumplir este objetivo, se realizaron ensayos de mortalidad en *G. mellonella* ajustando cuatro concentraciones distintas de *M. furfur* e inyectándolas en el hemocele de la larva, también se realizó caracterización de hemocitos para observar la respuesta inmune por parte de la larva hacia el patógeno y adicionalmente se midió la variación en carga fúngica para corroborar el aumento en el número de las levaduras en la hemolinfa del insecto.

Se logró estandarizar el modelo de infección de *M.furfur* en *G.mellonella*, se obtuvo una mortalidad en las larvas dependiente de la dosis; es decir, proporcional al inóculo inyectado. También, se observó una posible tolerancia de las larvas a concentraciones bajas del patógeno y finalmente se logró la activación del sistema inmune en la hemolinfa de la larva a causa del patógeno. Así, esta investigación es un primer acercamiento que permite el estudio de la relación hospedero-patógeno de *M. furfur* y potencialmente su implementación en el tamizaje de moléculas antifúngicas.

Palabras clave: *M. furfur*, *G. mellonella*, mortalidad, modelo animal, respuesta inmune.

Abstract

Malassezia furfur is a lipid dependent yeast, that is part of the microbiota of animals and humans skin. *M. furfur* has been identified as a pathogen causing systemic infection in immunosuppressed patients and neonatal with lipid parental nutrition. However, the interaction of the pathogen with its host is currently unknown. That is the reason we propose *Galleria mellonella* as a new infection model that allows us to evaluate the virulence of this

44 pathogen in interaction with the host. This insect tolerates a wide range of temperatures,
45 including human temperature 37°C, and the immune response against pathogens is similar
46 to the innate immune response in humans. This model has allowed scientists to the study
47 of virulence and the activity of drugs in some yeast of medical importance such as *Candida*
48 sp. and *Cryptococcus* sp. The aim of this study is to establish *G. mellonella* as infection
49 model of *M. furfur*. The inoculum of this yeast was adjusted to four different concentrations
50 that were injected into *G. mellonella* hemocoel to carry out a mortality assay. Hemolymph
51 analysis was done to observe the immune response of the larva against the pathogen, we
52 also cheked the fungal load to ensure increase of the pathogen in the hemolymph. *G.*
53 *mellonella* was standardized as infection model of *M. furfur* and this showed a possible
54 tolerance to the pathogen at low concentrations. This study is a first approach that will allow
55 us to study the host-pathogen interaction and the antifungal activity of *M. furfur*.

56 Key words: *M.furfur*, *G.mellonella*, mortality, animal model, immune response.

57 **Introducción**

58

59 Las levaduras del género *Malassezia* se caracterizan por ser lípido-dependientes y
60 pertenecen al filo Basidiomycota, estos microorganismos forman parte del microbioma de la
61 piel de algunas aves y mamíferos, y además se han considerado como patógenos
62 oportunistas (Velegraki, Cafarchia, Gaitanis, Iatta, & Boekhout, 2015). En los humanos, las
63 especies de *Malassezia* se han relacionado con diferentes entidades dermatológicas, en
64 donde se incluye pitiriasis versicolor, caspa/dermatitis seborreica y dermatitis atópica
65 (Harada, Saito, Sugita, & Tsuboi, 2015). Diferentes factores de riesgo se han asociado al
66 establecimiento de estas entidades, como las condiciones climáticas y el sistema inmune
67 del hospedero. Estos factores de riesgo se encuentran dentro de las principales causas que
68 dan inicio al proceso de disbiosis; sin embargo, actualmente no se conoce el mecanismo
69 exacto de la patogénesis (Nakatsuji & Gallo, 2019). Se ha demostrado que de las 18
70 especies descritas actualmente de este género, *M. furfur* está asociada con infecciones
71 sistémicas (Chryssanthou, Broberger, & Petrini, 2001). Principalmente, se han reportado
72 casos en neonatos prematuros asociados a catéter venoso central con infusión de emulsión
73 lipídica y en pacientes inmunocomprometidos con nutrición parental (Rhim *et al.*, 2020)

74

75 Con el objetivo de investigar la interacción hospedero-patógeno incluyendo la patogénesis
76 y respuesta inmune, así como el efecto de compuestos antifúngicos en infecciones
77 ocasionadas por hongos, se han desarrollado modelos de estudio en animales vertebrados,
78 tales como modelo murino y pez cebra (Brothers & Wheeler, 2012)(Segal & Frenkel, 2018).
79 Estos modelos han permitido resolver cuestionamientos médicos y terapéuticos que no se
80 logran con ensayos *in vitro* dado que no se pueden imitar las condiciones reales presentes
81 en sistemas biológicos. Su uso generalizado se debe, en parte, a las diferentes ventajas
82 metodológicas que presentan, tales como la disponibilidad de cepas genéticamente
83 determinadas, la capacidad de simular la respuesta y el desarrollo de una enfermedad y la
84 capacidad de controlar múltiples variables (Hohl, 2014). Sin embargo, la utilidad de estos
85 modelos es limitada debido a que los costos son demasiado altos, requiere de procesos de
86 aprobación por parte del comité de ética y capacitación del personal (Doke & Dhawale,
87 2015) .

88

89 Desde el año 2002 se ha reportado el uso de animales invertebrados, como lo es *Galleria*
90 *mellonella*, para el estudio de la patogénesis de infecciones causadas por diferentes
91 microorganismos (Binder, Maurer, & Lass-Flörl, 2016). *G. mellonella* es un insecto conocido
92 como gusano de la cera, de distribución mundial y su estadio larval ha sido utilizado como
93 una alternativa de experimentación in vivo para estudiar interacciones patógeno-hospedero
94 en patologías tanto bacterianas como fúngicas (Loh *et al.*, 2013) (Eisenman *et al.*, 2014).
95 Este organismo ha sido aceptado por la comunidad científica como un modelo de estudio
96 óptimo debido a las diversas ventajas que presenta. Por ejemplo, el estado larval puede ser
97 incubado a 37°C, permitiendo así el estudio de la expresión genética de factores de
98 virulencia del patógeno en las condiciones de temperatura propias del ser humano.
99 Adicionalmente, este modelo tiene la capacidad de someter la larva a dosis exactas del
100 patógeno, lo que permite analizar de una manera más precisa la eficacia de sustancias
101 antifúngicas. Además, la respuesta inmune innata de *G. mellonella* comparte similitudes
102 con la respuesta innata de los mamíferos (Browne, Heelan, & Kavanagh, 2013), permitiendo
103 así extrapolar los mecanismos de acción inmunológicos que se observan en el modelo a
104 las respuestas desencadenadas durante una infección en seres humanos. Esto se debe,
105 en parte, a que existe homología entre los hemocitos, células fagocíticas de gran
106 importancia para la inmunidad innata de *G. mellonella*, y los neutrófilos, claves en la
107 respuesta inmune en los humanos. Por otra parte y en referencia a otro modelo de
108 invertebrados, se ha demostrado que en *Drosophila melanogaster* la respuesta a un
109 patógeno involucra efectores, receptores y la regulación genética similar a la de los
110 humanos (Salzet, 2001).

111 Ahora bien, para lograr obtener resultados confiables y reproducibles al usar *G. mellonella*
112 como modelo, Champion *et al.* (2018) se debe considerar diversos factores importantes para
113 establecer la estandarización de dicho modelo. Previamente, se ha estandarizado el uso de
114 *G. mellonella* como un modelo de estudio en infecciones fúngicas causadas por diferentes
115 dermatofitos y levaduras como *Cryptococcus neoformans* y *Candida albicans* (Ishii,
116 Matsumoto, Yamada, Abe, & Sekimizu, 2017)(Amorim-Vaz, Delarze, Ischer, Sanglard, &
117 Coste, 2015)(Mylonakis *et al.*, 2005). Sin embargo, este modelo no ha sido estandarizado
118 ni evaluado para levaduras del género *Malassezia*, es por esto que este estudio busca
119 determinar las condiciones necesarias para el establecimiento de la infección por la
120 levadura *M. furfur*, y así aproximarnos al conocimiento de los mecanismos relacionados con
121 la interacción hospedero-patógeno en este género de levaduras.

122

123 **MATERIALES Y MÉTODOS**

124

125 **Preparación del inóculo**

126 El aislamiento de *Malassezia furfur* CBS 1878 (Westerdijk institute, Utrecht, The
127 Netherlands) preservados a -80°C, fueron reactivados durante 5 días a 33°C en agar Dixon
128 modificado (mDixon; 36 g.L⁻¹ agar mycosel [BD], 20 g.L⁻¹ Oxbile [Sigma-Aldrich], 36 g.L⁻¹
129 de extracto de malta [Oxoid], 2 mL.L⁻¹ de glicerol [Sigma-Aldrich], 2 mL.L⁻¹ de ácido oleico
130 [Sigma-Aldrich] y 10 mL.L⁻¹ de Tween 40 [Sigma -Aldrich]) (Boekhout, Guého-Kellermann,
131 Mayser, & Velegaki, 2010). Se realizó prueba de hidrólisis de la urea, crecimiento en agar
132 Sabouraud y prueba de asimilación de tween, para confirmar la especie (Kregen, N, 1984).
133 Una vez confirmada la especie, se sembró en agar Dixon modificado durante 4 días a 33°C

134 para realizar el ajuste de inóculo. Para esto, *M. furfur* se suspendió y filtró en solución de
135 tween 80 (0,5%), para luego realizar el conteo de unidades formadoras de colonia (UFC) y
136 ajuste de inóculo por medio de cámara de Neubauer. Teniendo en cuenta que la
137 estandarización de este modelo para especies de *Malassezia* spp. no se ha llevado a cabo
138 anteriormente, el inóculo utilizado en este experimento se ajustó a cuatro distintas
139 concentraciones: 1.5×10^6 , 1.5×10^7 , 1.5×10^8 y 1.5×10^9 UFC/mL, utilizando como base
140 los experimentos previamente realizados para levaduras patógenas como *Cryptococcus*
141 spp. y *Candida glabrata* (Mylonakis et al., 2005) (Ames et al. 2017). Cada concentración fue
142 confirmada mediante la siembra y conteo de UFC en placa de agar Dixon modificado.

143 **Ensayo de mortalidad en *Galleria mellonella***

144 Para este ensayo se siguieron los protocolos de infección de *Cryptococcus neoformans*
145 llevado a cabo por Velez *et al.*, (2018) y la metodología realizada por Fallon *et al.*, (2012).
146 Se utilizaron larvas de *Galleria mellonella* en estadios 5 y 6 obtenidas de Scientia Colombia,
147 S.A.S. las cuales fueron almacenadas en oscuridad a temperatura ambiente por 24h para
148 su preparación. Se realizaron tres lavados de desinfección antes de su manipulación: el
149 primero en hipoclorito (0.1%) por 30 segundos, posteriormente, baño de agua destilada por
150 30 segundos y finalmente, baño de agua destilada desde otro recipiente por 20 segundos.
151 Para la inyección se utilizaron jeringas de insulina BD-ultrafine de 6mm. Se inyectaron
152 10µl de inóculo a 20 larvas independientemente para cada una de las concentraciones
153 preparadas (1.5×10^6 , 1.5×10^7 , 1.5×10^8 y 1.5×10^9 UFC/mL) en la última pro-pata izquierda
154 (hemocele) de cada larva. Posterior a esto, las larvas infectadas se incubaron en cajas de
155 petri a 33°C y se realizó revisión de estas cada 24h durante 15 días para evaluar su
156 supervivencia; se consideró una larva como muerta tras no observar una estimulación física
157 al tacto (Jorjão et al., 2018).

158 Todos los ensayos en este experimento se realizaron 3 veces de manera independiente en
159 donde se utilizaron 60 larvas para el control de cada uno de los ensayos: control absoluto
160 (20), control de desinfección (20) y control de inoculación (20). En el primero, control
161 absoluto del ensayo, las larvas no son manipuladas durante el desarrollo de cada ensayo,
162 controlando así la calidad del lote de larvas. En el segundo grupo control se utilizaron larvas
163 únicamente desinfectadas, controlando de esta manera el método de desinfección. El último
164 grupo control, además de ser desinfectadas, las larvas fueron inyectadas con solución
165 tween 80 (0,5%) para control negativo.

166 **Caracterización de hemocitos**

167 Para obtener los hemocitos durante el experimento, al día 5 después de la inyección se
168 realizó un extendido de hemolinfa a dos larvas al azar por cada uno de los tratamientos o
169 concentraciones, incluyendo los controles. Para el extendido de hemolinfa cada larva fue
170 sometida a temperatura de -80°C por dos minutos e instantáneamente se realizó un corte
171 horizontal en la parte ventral entre el primer y segundo par de propatas utilizando un
172 escalpelo. Al obtener una gota de la hemolinfa, se hace un extendido en lámina y posterior
173 tinción con Wright. Los hemocitos fueron observados y caracterizados en microscopio de
174 luz Leica Dm500 siguiendo el estudio realizado por (Arteaga Blanco et al., 2017).

175 **Medición de carga fúngica**

176 La carga celular de *M. furfur* en las larvas se determinó 5 días después de la inoculación.
177 Se tomaron 3 larvas al azar de cada una de las diferentes concentraciones inyectadas,
178 incluyendo los controles y se desinfectaron utilizando el método de lavado realizado en el
179 ensayo de mortalidad. Posteriormente, cada larva se maceró de manera individual en un

180 eppendorf con 1mL de solución tween 80 (0,5%) por 5 minutos. De cada macerado se tomó
181 100µl y se hicieron diluciones seriadas 1:10 y 1:100 que luego fueron inoculadas por
182 superficie en agar Dixon modificado e incubadas a 33°C. El conteo de UFC/Larva fue
183 evaluado cada 24 horas.

184 **Análisis estadístico**

185 Se realizaron curvas de mortalidad por medio del programa GraphPadPrism (version 8.2.0)
186 utilizando el estimador de Kaplan-Meier (Rickert, 2017) y se contrastaron todas las curvas
187 de supervivencia utilizando la prueba de Mantel-Cox (Pavlič & Perme, 2017). Se utilizó
188 Wilcoxon-test para comparar cada curva con el grupo control. La medición de carga fúngica
189 se evaluó mediante el análisis de varianza ANOVA tipo-II utilizando el programa Rstudio.
190 Para los estos análisis estadísticos se consideró significativo valores $p < 0,05$.

191

192 **RESULTADOS**

193

194 **Ensayo de mortalidad**

195 El ensayo de mortalidad permitió evidenciar la capacidad de *M. furfur* para establecer una
196 infección sistémica en *G. mellonella* a una temperatura de 33°C. En todas las réplicas del
197 experimento se observó un comportamiento de la mortalidad dependiente de la
198 concentración de *M. furfur* inoculada en las larvas. Como se muestra en la Figura 1 las
199 larvas que fueron inoculadas con la concentración de inóculo mas alta (1.5×10^9 UFC/mL)
200 mostraron significativamente menor supervivencia (valor $p < 0.0001$), en donde desde las
201 24h de inoculación hubo muerte de individuos y el 50% de mortalidad se alcanzó en el día
202 3; después de 15 días de observación, solo el 4.4% de la población sobrevivió a esta
203 concentración de inóculo. En las larvas inoculadas con la concentración de 1.5×10^8 UFC/mL
204 de igual manera se observó una menor supervivencia de las larvas con diferencia
205 significativa (valor $p < 0.0001$) comparado con el grupo control. El 50% de mortalidad de la
206 población de larvas inoculadas a esta concentración se obtuvo después del día 13 y al
207 finalizar el experimento, en el día 15 habría sobrevivido el 48.8% de la población. En el caso
208 de las dos concentraciones de inóculos restantes 1.5×10^7 UFC/mL y 1.5×10^6 UFC/mL no se
209 observaron diferencias significativas comparadas con el grupo control (valor $p = 0.0008$ y
210 $p = 0.0419$ respectivamente); en las larvas con inóculos de concentración a 1.5×10^7 UFC/mL
211 después de 15 días experimentales sobrevivió el 77.8% de la población. De la misma
212 manera, el porcentaje de supervivencia de larvas inoculadas con a 1.5×10^6 UFC/mL fue de
213 91.1%; con ninguna de estas concentraciones inoculadas se obtuvo el 50% de mortalidad.

214

215

216

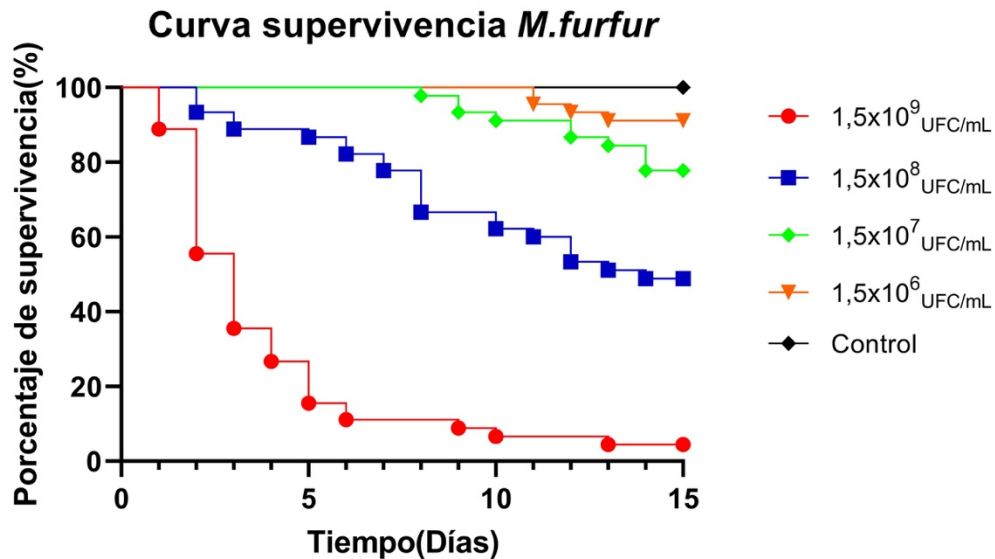
217

218

219

220

221



222

223

224

225

226

227

228

229 Caracterización de hemocitos

230 Se encontraron células del sistema inmune de *G. mellonella* tanto en los controles, como
231 en las larvas inyectadas con diferentes concentraciones de *M. furfur*. Así mismo, se
232 observaron levaduras del patógeno en la hemolinfa y dentro de los hemocitos de las larvas.
233 En el control (Figura 2A) se observó predominantemente esferulocitos y plasmocitos de
234 forma oval o esférica con un núcleo centrado. Por otra parte, en la hemolinfa de larvas que
235 fueron inyectadas con *M. furfur* se observaron cuatro tipos de hemocitos: oenocitos,
236 plasmocitos, granulocitos, y esferulocitos. Los primeros (Figura 2B) eran de gran tamaño y
237 de forma redonda irregular con un pequeño núcleo. Los plasmocitos (Figura 2C y D)
238 ovoides, elongados y en forma fusiforme con núcleo ovoide. Los granulocitos (Figura 2F)
239 se observaron con núcleo central y redondo, rodeado de pequeños gránulos en el
240 citoplasma.

241

242

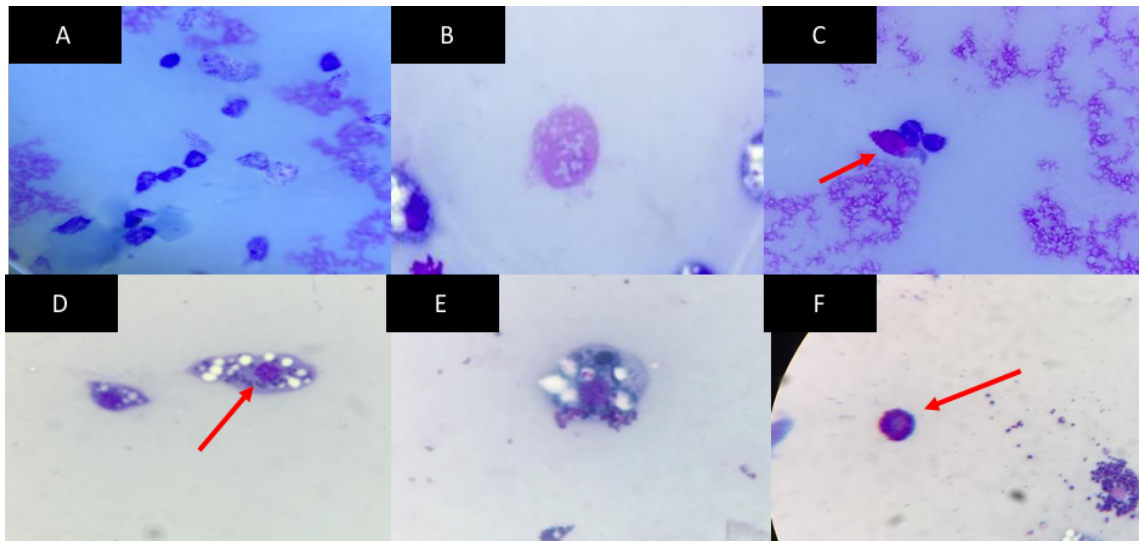
243

FIGURA1. Curvas de supervivencia de *Galleria mellonella* inoculadas con *Malassezia furfur* a diferentes concentraciones de inóculo. ● Larvas inyectadas con 1.5×10^9 UFC/mL; ■ larvas inyectadas con 1.5×10^8 UFC/mL; ▲ larvas inyectadas con 1.5×10^7 UFC/mL; ▼ larvas inyectadas con 1.5×10^6 UFC/mL; ◆ larvas inyectadas con solución tween 80 al 0,5%. $P < 0.0001$.

244

245

246



247

248

249

250

251

252

FIGURA 2. Caracterización de hemocitos de *Galleria mellonella*, láminas con tinción de Wright utilizando objetivo 100X en microscopio de luz. (A) lámina control. (B) Presencia de oenocitoide en hemolinfa de *G. mellonella* infectada con *M. furfur*. (C y D) Presencia de plasmocitos en hemolinfa de *G. mellonella* infectada con *M. furfur*. (E) Presencia de lisis celular. Oenocitos lisados en hemolinfa de *G. mellonella* infectada con *M. furfur*. (F) Presencia de granulocitos en hemolinfa de *G. mellonella* infectada con *M. furfur*.

253

254 Además, en la hemolinfa proveniente de larvas inoculadas con 1.5×10^9 UFC/mL de *M. furfur*
255 se encontraron levaduras de forma esférica dentro y fuera de los oenocitos. Como se
256 observa en la Figura 2E hubo deformación y lisis celular.

257

258 **Medición de carga fúngica**

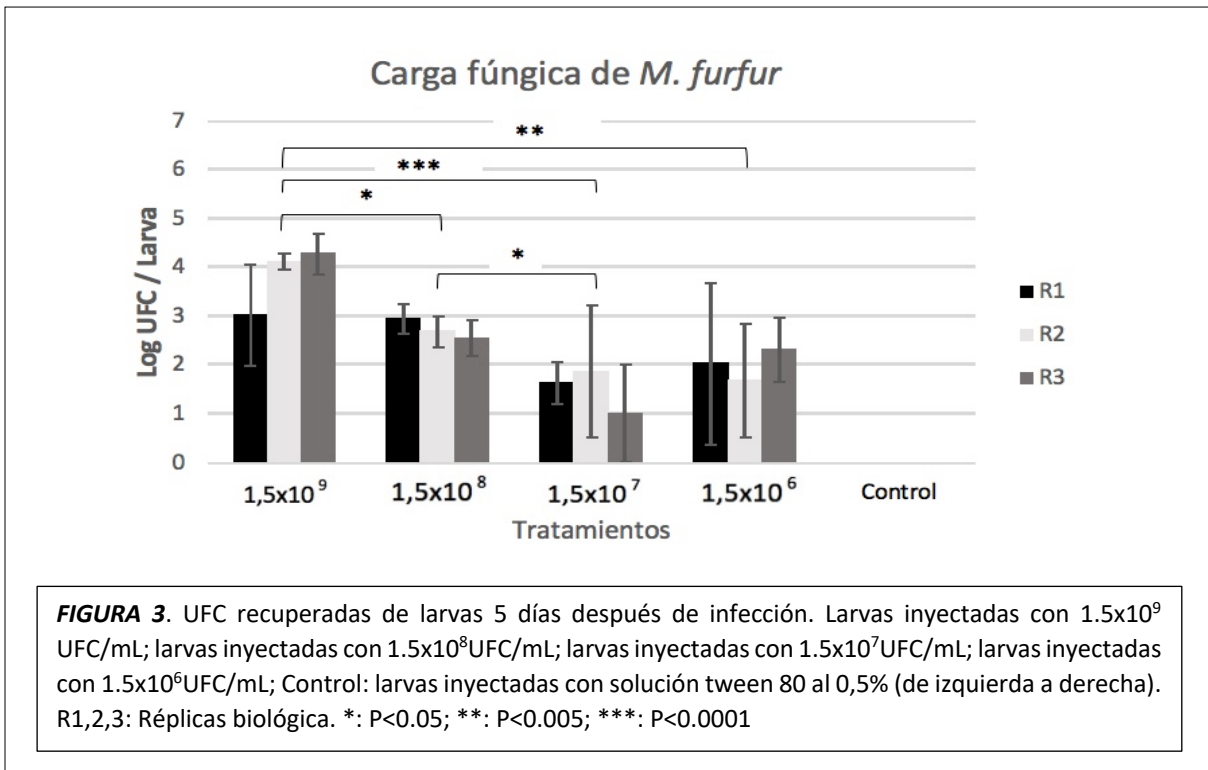
259 Se confirmó la infección de *M.furfur* en el macerado realizado a las larvas por medio del
260 conteo de unidades formadoras de colonia (UFC). La recuperación de UFC tuvo un
261 comportamiento similar en todas las réplicas biológicas durante los 9 días de conteo. Esta
262 cantidad fue expresada en valores logarítmicos como se observa en la Figura 3.

263 En el tratamiento con la dosis mas alta (1.5×10^9 UFC/mL) inoculada fueron donde mas UFC
264 se encontraron 5 días después de la infección. A medida que la dosis inyectada era menor
265 (1.5×10^8 UFC/mL, 1.5×10^7 UFC/mL) la cantidad de UFC disminuía también, en valores
266 logarítmicos. Sin embargo, el conteo obtenido de las larvas inyectadas a la concentración
267 mas baja (1.5×10^6 UFC/mL) fue mayor, sin diferencia estadísticamente significativa, a la
268 concentración de 1.5×10^7 UFC/mL en las tres réplicas biológicas realizadas. En las larvas
269 maceradas del grupo control no se encontraron UFC en ninguna de las réplicas biológicas.

270

271

272



273

274

275

276

277

278

279

DISCUSIÓN

280

281

282

283

284

285

286

287

La virulencia asociada a patógenos fúngicos en humanos ha sido comúnmente estudiada en cepas especiales de ratones y algunos otros hospederos vertebrados como *guinea pigs*, pez cebra y conejos (Hohl, 2014). Sin embargo, en los últimos años el interés en buscar otros animales como modelo de investigación ha aumentado, debido principalmente a los costos y consideraciones bioéticas implicados en la experimentación con animales vertebrados (Doke & Dhawale, 2015). Es por esto, que es importante establecer si la interacción de hospederos invertebrados con el patógeno produce un fenómeno similar al de los hospederos convencionales.

288

289

290

291

292

293

294

295

G. mellonella ha sido un modelo utilizado para el estudio de la patogénesis de diferentes microorganismos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* y en algunos dermatofitos (Miyata, Casey, Frank, Ausubel, & Drenkard, 2003);(Amorim-Vaz *et al.*, 2015);(Mylonakis *et al.*, 2005);(Reeves, Messina, Doyle, & Kavanagh, 2004);(Ishii *et al.*, 2017). Sin embargo, especies del género *Malassezia* sp. hasta ahora solo han sido estudiadas en algunos hospederos como: murinos, *Tenebrio molitor*, *C. eleagans* y en *Drosophila melanogaster* (Sparber & Leibundgut-Landmann, 2019)(Silva *et al.*, 2018)(Merkel *et al.*, 2018).

296

297

298

En el presente estudio, se logra desarrollar un modelo reproducible de una infección sistémica de *M. furfur* inducida por inyección de levaduras en la hemolinfa de *G. mellonella*. Se observa que la mortalidad de las larvas depende de la concentración del inóculo

299 inyectado; en otras palabras, la virulencia de *M. furfur* es proporcional a la carga fúngica
300 inyectada. Sin embargo, en las concentraciones más bajas utilizadas (1.5×10^7 UFC/mL y 1.5
301 $\times 10^6$ UFC/mL) no se evidenció un cambio significativo en la mortalidad. Es por esto, que
302 próximos estudios deberían llevarse a cabo concentraciones de inóculo más altas para
303 evidenciar los cambios en la supervivencia de las larvas con el uso de sustancias
304 antifúngicas en ellas.

305 El 50% de la mortalidad de *G. mellonella* se obtuvo en el día 3 del experimento utilizando
306 la concentración de 1.5×10^9 UFC/mL de inóculo de *M. furfur*; es decir, que a esta
307 concentración se logra observar letalidad de la mitad de la población en este modelo animal.
308 Además, se observa variación en la cantidad de hemocitos y la respuesta inmune
309 presentada por *G. mellonella*, que posiblemente esté relacionada con la concentración del
310 patógeno inoculado; sin embargo, deberán llevarse a cabo más estudios respecto al conteo
311 de hemocitos en la larva antes, durante y después de la infección para obtener una mejor
312 visión de la respuesta inmune de *G. mellonella* desencadenada por la infección de *M. furfur*.

313 A diferencia de otros estudios realizados con serotipos de *Cryptococcus neoformans*
314 (Mylonakis et al., 2005), *M. furfur* necesita de concentraciones más altas (1.5×10^9 UFC/mL, 1.5
315 $\times 10^8$ UFC/mL) para lograr establecer una infección sistémica en *G. mellonella*. Esta menor
316 virulencia de *M. furfur* en comparación con otras levaduras patógenas, se debe a que esta
317 especie hace parte de la microbiota de la piel como un microorganismo comensal (Grice &
318 Dawson, 2017). Por otra parte, la caracterización de las células en la respuesta inmune de
319 *G. mellonella* da una primera visión de lo que sucede en la hemolinfa de este modelo, en
320 donde efectivamente hay una interacción entre el hospedero y el patógeno. Para próximos
321 estudios se debe realizar una observación detallada de esta interacción para entender la
322 evolución de la enfermedad y los factores que se involucran en ella.

323 Las especies del género *Malassezia* son lípido-dependientes, requieren principalmente de
324 ácido palmítico y ácido oleico para sobrevivir. Según estudios previamente realizados,
325 (Yendol, 1969) de la composición total de ácidos grasos en la hemolinfa de *G. mellonella*,
326 el ácido palmítico (16:0) y ácido oleico (18:1) constituyen el 41.5 y 38.5%, respectivamente;
327 es por esto, que *M. furfur* logra realizar una infección sistémica en las larvas de *G.*
328 *mellonella*. Por otro lado, investigaciones realizadas por (Patil & Magar, 1960) determinó la
329 cantidad de ácidos grasos en la sangre de los humanos mostrando que tanto en el plasma
330 como en las células sanguíneas se encuentran una gran cantidad de lípidos
331 ($485 \pm 11,6$ mg/100 mL de plasma y $397-7 \pm 12,6$ mg/100 mL de células respectivamente), el 50-
332 70% son de ácidos grasos y el ácido oleico es el componente principal y más abundante.
333 Es decir, es posible que existe una correlación de la virulencia de *M. furfur* en *G. mellonella*
334 con el comportamiento de este patógeno a nivel clínico.

335 Con respecto a la carga fúngica encontrada 5 días post-inoculación se establece una
336 relación con las concentraciones del patógeno inyectadas. Cuanto mayor es la
337 concentración inyectada, mayor es la carga fúngica encontrada en UFC (Figura 3). Sin
338 embargo, en las larvas inyectadas con la concentración mas baja (1.5×10^6 UFC/mL) la carga
339 fúngica fue mayor que en larvas inyectadas con una concentración mayor (1.5×10^7 UFC/mL),
340 sin diferencia significativa. Estudios previos muestran que en el momento que un animal es
341 infectado, puede mostrar tolerancia reduciendo el impacto negativo de la infección, sin
342 necesariamente reducir la cantidad del patógeno y así mantener su *fitness* en la población
343 (Adelman & Hawley, 2017). Dada la concentración baja del patógeno en la hemolinfa de *G.*
344 *mellonella*, es posible observar un fenómeno de tolerancia de las larvas; esto no sucede
345 con las concentraciones mas altas, debido a la correlación entre la virulencia y la dosis
346 inyectada. Esto demuestra que la concentración mas baja utilizada en este estudio debe

347 ser re evaluada para futuros estudios con potenciales antifúngicos, debido a que no se
348 observa alta virulencia de *M.furfur*, ni mortalidad de *G. mellonella*.

349 El modelo de *G. mellonella* es económico y relativamente fácil de manejar en el laboratorio.
350 El uso de este puede reducir la necesidad de capacitar personal durante el desarrollo
351 experimental *in vivo* con animales vertebrados y la experimentación de compuestos
352 antifúngicos en estos. *G. mellonella* puede ser de gran utilidad para laboratorios
353 especializados en el estudio de la patogénesis de infecciones fúngicas debido a sus
354 múltiples ventajas mencionadas en el presente estudio. Sin embargo, hay algunas
355 limitaciones que se deben tener en cuenta al utilizar este modelo, *G. mellonella* presenta
356 una respuesta inmune innata muy similar a los mamíferos; pese a esto, no tiene un sistema
357 inmunológico adaptativo, y por lo tanto no posee un sistema humoral basado en
358 anticuerpos. Por lo que habrá algunos rasgos de la virulencia del patógeno que no se
359 podrán analizar como ocurre con precisión en los humanos a nivel clínico. Otro aspecto
360 práctico para el uso de este modelo es que las larvas de *G. mellonella* no pueden ser
361 sometidas a una alta cantidad de inyecciones para el testeo de compuestos antifúngicos,
362 debido a que esto aumentara la probabilidad de muerte por los traumas realizados en la
363 epicutícula de la larva y, además, por su tamaño, la cantidad en volumen inoculado podría
364 fácilmente superar la capacidad en volumen de la larva (62µl -70µl) (Shapiro, M. 1969)
365 causándole la muerte.

366 En esta investigación se da una primera visión del potencial de larvas de *G. mellonella* para
367 el estudio de la virulencia de *M.furfur* y el estudio de su patogénesis. No obstante, algunas
368 sugerencias deben de tenerse en cuenta para futuros trabajos. Inicialmente, conocer cuales
369 receptores de los hemocitos interactúan con ligandos *M. furfur*, investigar en el caso de una
370 respuesta inmune desequilibrada cómo podría afectar en la patogénesis. Además, teniendo
371 en cuenta que la hemolinfa y la epicutícula de *G. mellonella* contiene algunos ácidos grasos
372 esenciales para el crecimiento de especies de *Malassezia* spp., se debe realizar la
373 estandarización de este modelo en diferentes especies para conocer su comportamiento
374 con este hospedero.

375 Para futuros estudios será necesario el desarrollo de herramientas que permitan la
376 investigación de la interacción a nivel celular y molecular entre el patógeno y *G. mellonella*,
377 tales como: el uso de líneas celulares inmortales de *G. mellonella*, anticuerpos que permitan
378 la diferenciación de los hemocitos encontrados y desarrollo en los datos genómicos para
379 lograr la manipulación del genoma de *G. mellonella*. Finalmente, al tener un amplio
380 conocimiento en las diferencias y similitudes que presenta la patogénesis en diferentes
381 modelos animales, permitirá identificar los mecanismos que pueden extrapolarse a las
382 infecciones en los seres humanos, permitiendo la investigación enfocada al tratamiento de
383 la enfermedad.

384

385

386

387 **Referencias**

388

389 Adelman, J. S., & Hawley, D. M. (2017). Tolerance of infection: A role for animal behavior,
390 potential immune mechanisms, and consequences for parasite transmission.
391 *Hormones and Behavior*. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2016.10.013>

392 Ames, L., Duxbury, S., Pawlowska, B., Ho, H. I., Haynes, K., & Bates, S. (2017). *Galleria*
393 *mellonella* as a host model to study *Candida glabrata* virulence and antifungal efficacy.
394 *Virulence*, 8(8), 1909–1917. <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1347744>

395 Amorim-Vaz, S., Delarze, E., Ischer, F., Sanglard, D., & Coste, A. T. (2015). Examining the
396 virulence of *Candida albicans* transcription factor mutants using *Galleria mellonella* and
397 mouse infection models. *Frontiers in Microbiology*, 6(MAY), 1–14.
398 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00367>

399 Arteaga Blanco, L. A., Crispim, J. S., Fernandes, K. M., de Oliveira, L. L., Pereira, M. F.,
400 Bazzolli, D. M. S., & Martins, G. F. (2017). Differential cellular immune response of
401 *Galleria mellonella* to *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Cell and Tissue Research*,
402 370(1), 153–168. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2653-5>

403 Binder, U., Maurer, E., & Lass-Flörl, C. (2016). *Galleria mellonella*: An invertebrate model to
404 study pathogenicity in correctly defined fungal species. *Fungal Biology*, 120(2), 288–
405 295. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.06.002>

406 Boekhout, T., Guého-Kellermann, E., Mayser, P., & Velegraki, A. (2010). *Malassezia* and
407 *the skin: Science and clinical practice*. *Malassezia and the Skin: Science and Clinical*
408 *Practice*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-03616-3>

409 Brothers, K. M., & Wheeler, R. T. (2012). Non-invasive Imaging of Disseminated Candidiasis
410 in Zebrafish Larvae. *Journal of Visualized Experiments*, (65), 2–7.
411 <https://doi.org/10.3791/4051>

412 Browne, N., Heelan, M., & Kavanagh, K. (2013). An analysis of the structural and functional
413 similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes. *Virulence*, 4(7), 597–603.
414 <https://doi.org/10.4161/viru.25906>

415 Chryssanthou, E., Broberger, U., & Petrini, B. (2001). *Malassezia pachydermatis* fungaemia
416 in a neonatal intensive care unit. *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics*,
417 90(3), 323–327. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2001.tb00312.x>

418 Doke, S. K., & Dhawale, S. C. (2015). Alternatives to animal testing: A review. *Saudi*
419 *Pharmaceutical Journal*, 23(3), 223–229. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2013.11.002>

420 Grice, E. A., & Dawson, T. L. (2017). Host–microbe interactions: *Malassezia* and human
421 skin. *Current Opinion in Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.10.024>

422 Harada, K., Saito, M., Sugita, T., & Tsuboi, R. (2015). *Malassezia* species and their
423 associated skin diseases. *Journal of Dermatology*, 42(3), 250–257.
424 <https://doi.org/10.1111/1346-8138.12700>

425 Hohl, T. M. (2014). Overview of vertebrate animal models of fungal infection. *Journal of*
426 *Immunological Methods*, 410, 100–112. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2014.03.022>

427 Ishii, M., Matsumoto, Y., Yamada, T., Abe, S., & Sekimizu, K. (2017). An invertebrate
428 infection model for evaluating anti-fungal agents against dermatophytosis. *Scientific*
429 *Reports*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12523-z>

430 Jorjão, A. L., Oliveira, L. D., Scorzoni, L., Figueiredo-Godoi, L. M. A., Cristina A Prata, M.,

431 Jorge, A. O. C., & Junqueira, J. C. (2018). From moths to caterpillars: Ideal conditions
432 for *Galleria mellonella* rearing for in vivo microbiological studies. *Virulence*, 9(1), 383–
433 389. <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1397871>

434 Merkel, S., Heidrich, D., Danilevicz, C. K., Scroferneker, M. L., & Zanette, R. A. (2018).
435 *Drosophila melanogaster* as a model for the study of *Malassezia pachydermatis*
436 infections. *Veterinary Microbiology*, 224(June), 31–33.
437 <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.08.021>

438 Miyata, S., Casey, M., Frank, D. W., Ausubel, F. M., & Drenkard, E. (2003). Use of the
439 *Galleria mellonella* caterpillar as a model host to study the role of the type III secretion
440 system in *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Infection and Immunity*.
441 <https://doi.org/10.1128/IAI.71.5.2404-2413.2003>

442 Mylonakis, E., Moreno, R., El, J. B., Idnurm, A., Heitman, J., Stephen, B., ... Calderwood,
443 S. B. (2005). *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans*
444 pathogenesis. *Infection and Immunity*, 73(7), 3842–2850.
445 <https://doi.org/10.1128/IAI.73.7.3842>

446 Patil, V. S., & Magar, N. G. (1960). Fatty acids of human blood. *Biochemical Journal*, 74(3),
447 427–429. <https://doi.org/10.1042/bj0740427>

448 Pavlič, K., & Perme, M. P. (2017). On comparison of net survival curves. *BMC Medical*
449 *Research Methodology*, 17(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12874-017-0351-3>

450 Reeves, E. P., Messina, C. G. M., Doyle, S., & Kavanagh, K. (2004). Correlation between
451 gliotoxin production and virulence of *Aspergillus fumigatus* in *Galleria mellonella*.
452 *Mycopathologia*. <https://doi.org/10.1023/B:MYCO.0000038434.55764.16>

453 Rickert, J. (2017). Survival Analysis with R.

454 Salzet, M. (2001). Vertebrate innate immunity resembles a mosaic of invertebrate immune
455 responses. *Trends in Immunology*, 22(6), 285–288. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(01\)01895-6](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(01)01895-6)

457 Segal, E., & Frenkel, M. (2018). Experimental In Vivo Models of Candidiasis. *Journal of*
458 *Fungi*, 4(1), 21. <https://doi.org/10.3390/jof4010021>

459 Shapiro, M. (1969). Changes in hemolymph total solids and blood volumen of the greater
460 wax moth, *Galleria mellonella*, during the course of starvation. *Journal of Invertebrate*
461 *Pathology*, 13(1), 63-67. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(69\)90238-9](https://doi.org/10.1016/0022-2011(69)90238-9)

462 Silva, A.P.R., Valerio, A.D., Viana, R.O., Ricoy, A.C.D.S., Johann, S., Alves, V.D.S.
463 *Caenorhabditis Elegans* and *Tenebrio Molitor* - New Tools to Investigate *Malassezia*
464 Species. Preprints 2018, 2018100001.
465 <https://doi.org/10.20944/preprints201810.0001.v1>

466 Sparber, F., & Leibundgut-Landmann, S. (2019). Infecting mice with *Malassezia* spp. To
467 study the fungus-host interaction. *Journal of Visualized Experiments*.
468 <https://doi.org/10.3791/60175>

469 Velegriaki, A., Cafarchia, C., Gaitanis, G., Iatta, R., & Boekhout, T. (2015). *Malassezia*
470 Infections in Humans and Animals: Pathophysiology, Detection, and Treatment. *PLoS*
471 *Pathogens*, 11(1), 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004523>

472 Velez, N., Alvarado, M., Parra-Giraldo, C., Sánchez-Quitian, Z., Escandón, P., & Castañeda,
473 E. (2018). Genotypic Diversity Is Independent of Pathogenicity in Colombian Strains of
474 *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in *Galleria mellonella*. *Journal of*
475 *Fungi*, 4(3), 82. <https://doi.org/10.3390/jof4030082>

476 Yendol, W. G. (Department of E. and P. R. L. and G. S. C. (1969). Fatty Acid Composition
477 of *Galleria* Larvae, Hemolymph, and Diet (Lepidoptera: *Galleriidae*). *Fatty Acid*
478 *Composition of Galleria Larvae, Hemolymph, and Diet (Lepidoptera: Galleriidae)*,
479 63(1), 339. <https://doi.org/10.1093/aesa/62.1.339>

480