

# Genotipificación de *Malassezia furfur* atípica y una aproximación de potenciales inhibidores de crecimiento

**Presentado por:**

Diana Catalina Rojas Padilla

**Asesor interno:**

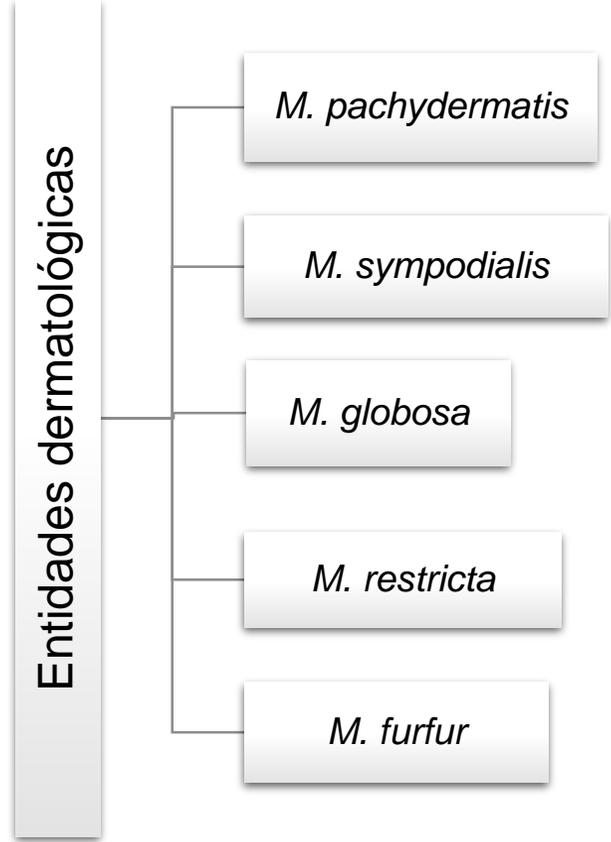
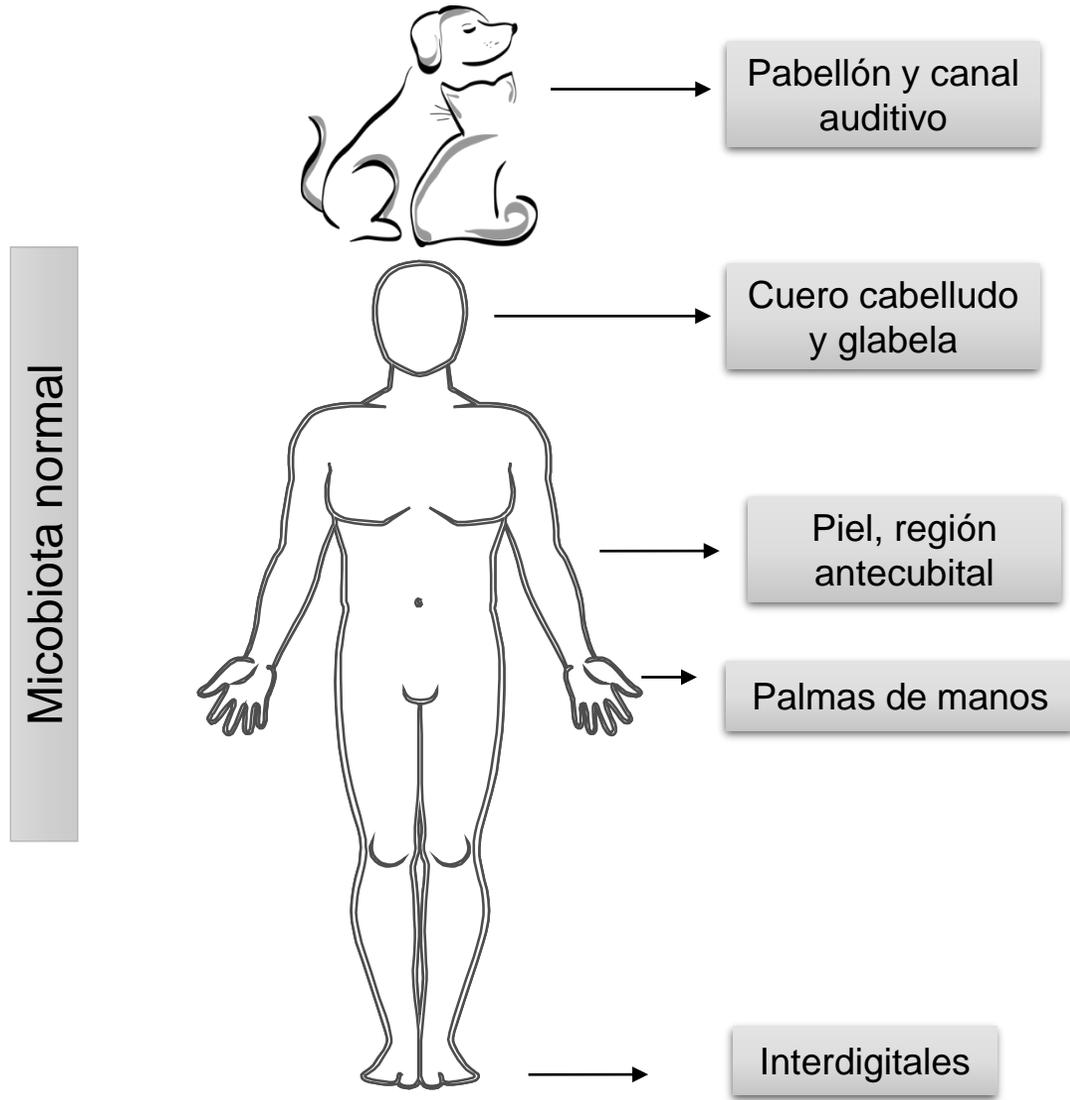
Vilma Yamile Martínez Granados Esp.

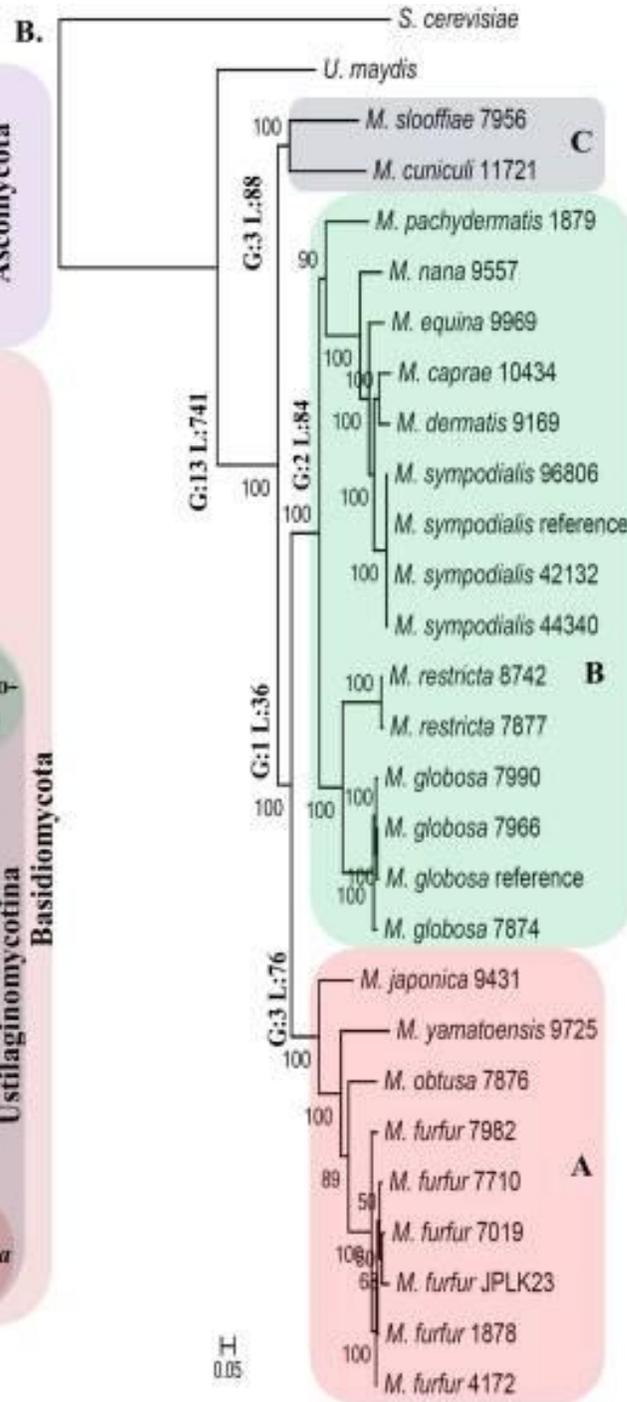
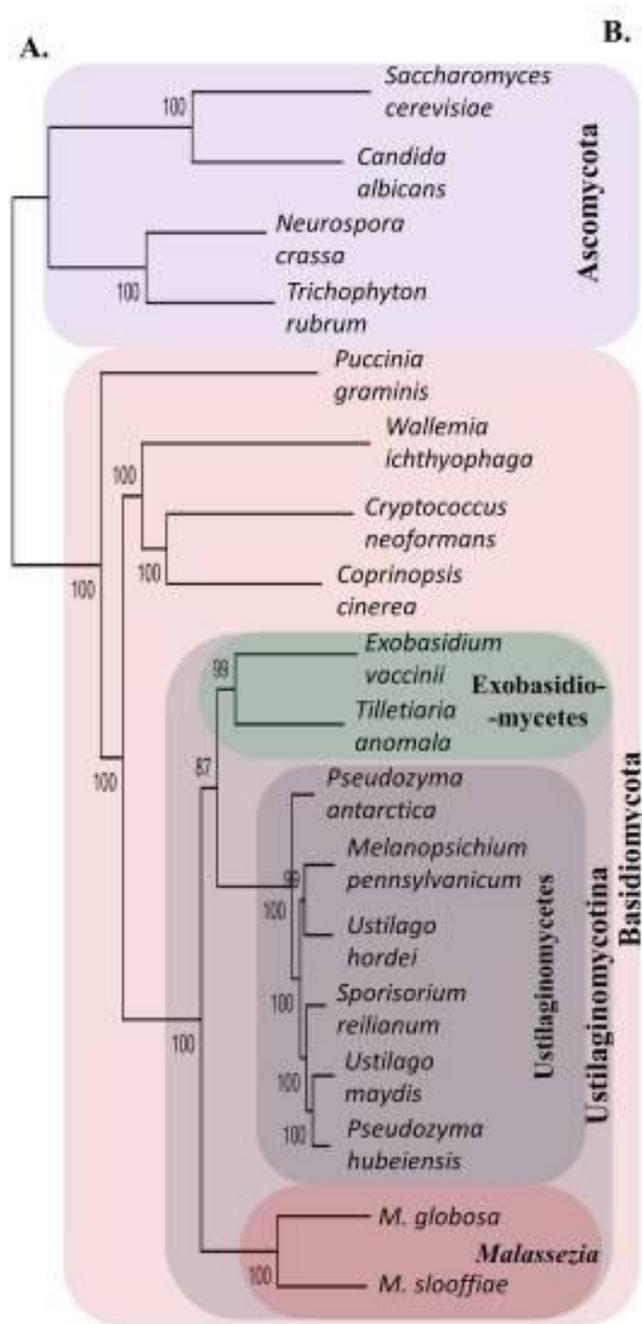
**Asesor externo:**

Adriana Marcela Celis Ramírez M.Sc. Ph.D.



# INTRODUCCIÓN





**Cluster C:** Aisladas comúnmente de animales.

**Cluster B:** Representado por *M. globosa*, *M. restricta* especies más abundantes en la piel. Subcluster B: Comprende especies zoofílicas

**Cluster A:** Especies antropofílicas. Complejo de *M. furfur*.

0.1

Wu et al. 2015

0.05

# ANTECEDENTES

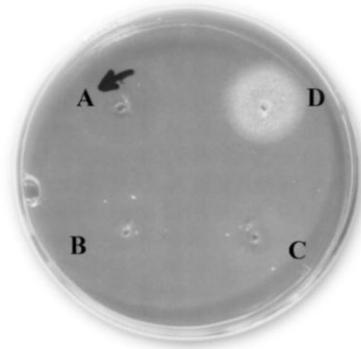


**Rincón *et al.***

<i>Malassesia</i> spp.	
45.1	Lesiones de PV
1828	Lesiones de PV
39C1	Individuo sano
28A1	Individuo sano
13MC	Individuo sano
4DS	Lesiones de DS

*M. globosa* 37.5 %  
*M. sympodialis* 31.3%  
*M. furfur* 31.3 %

**González *et al.***



No se logró resolver la posición taxonómica de *M. furfur* atípica.

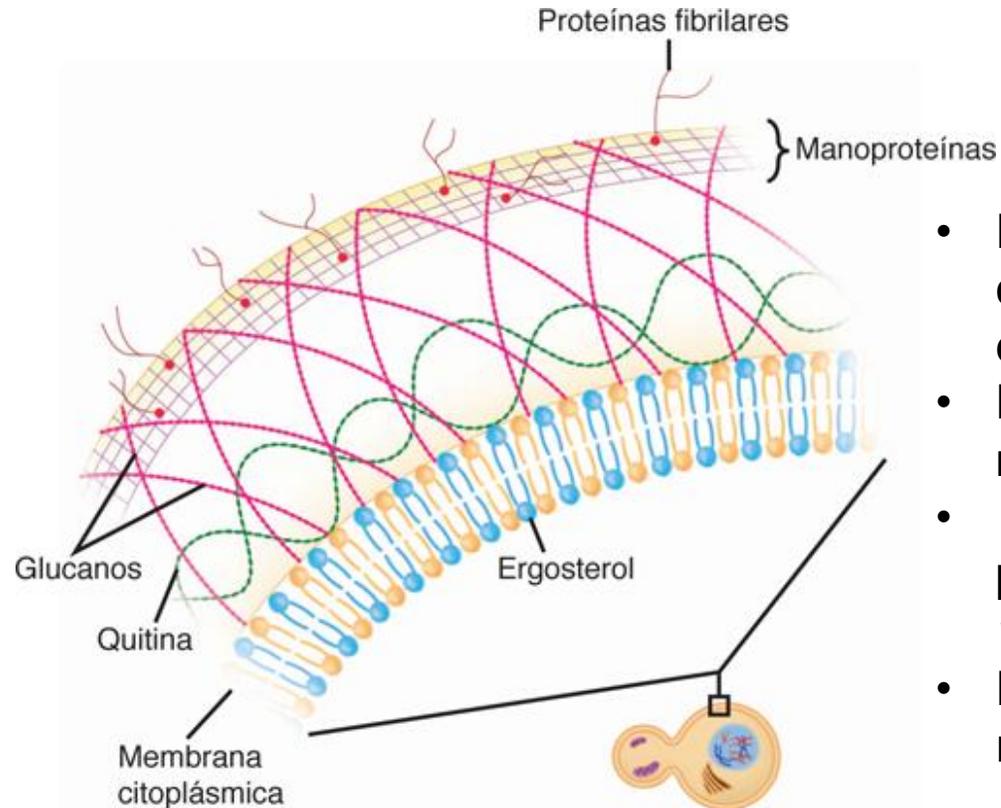
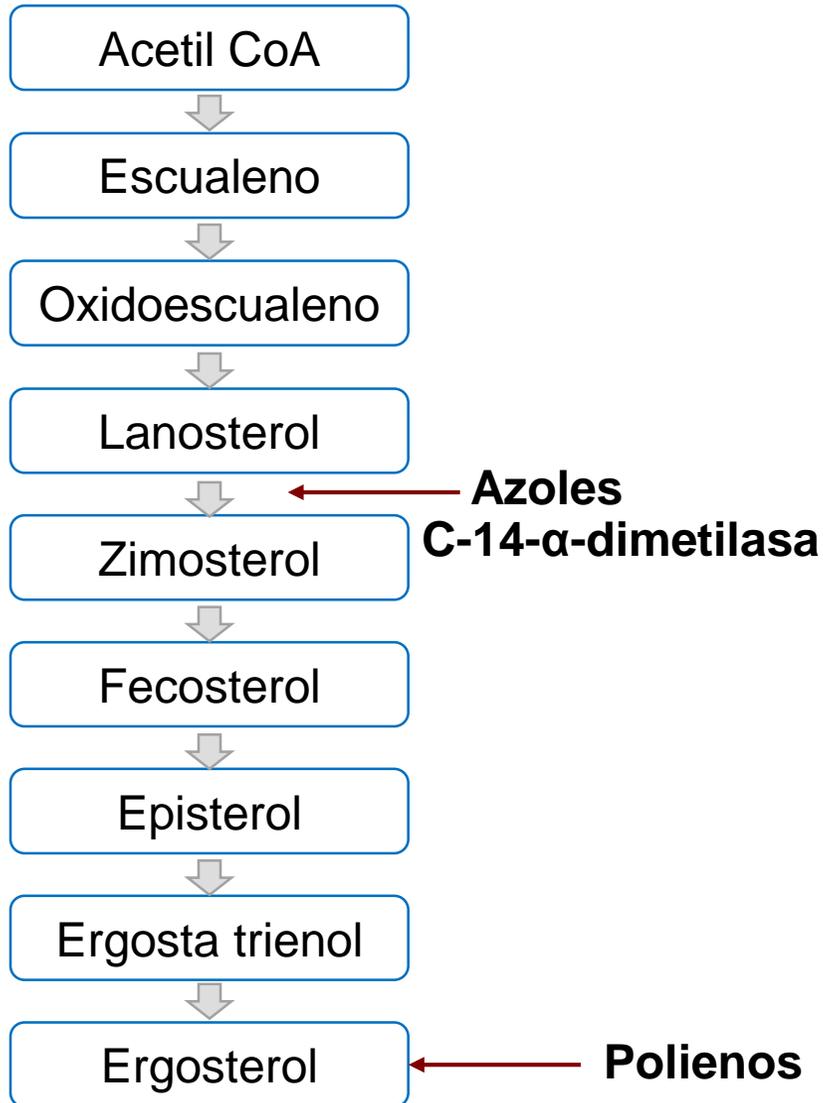
**Grupo CeMoP.**

Secuenciación de genomas

Reconstrucción metabólica

Ensayo en modelo murino

# TRATAMIENTO

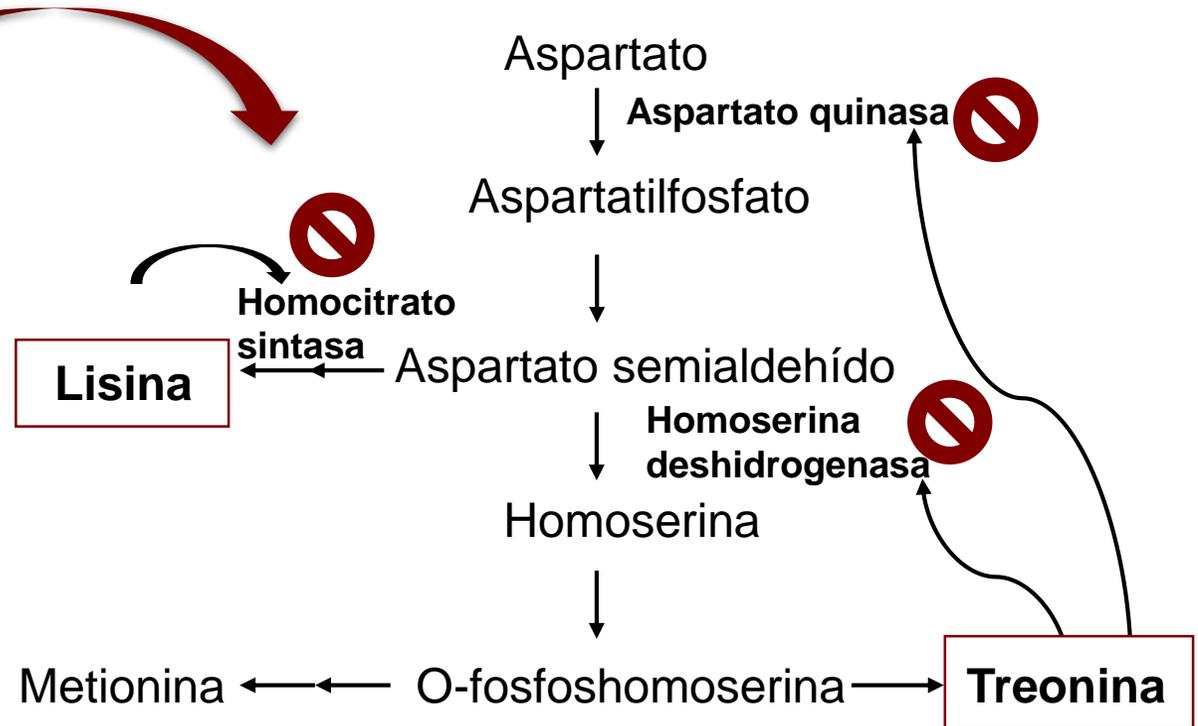
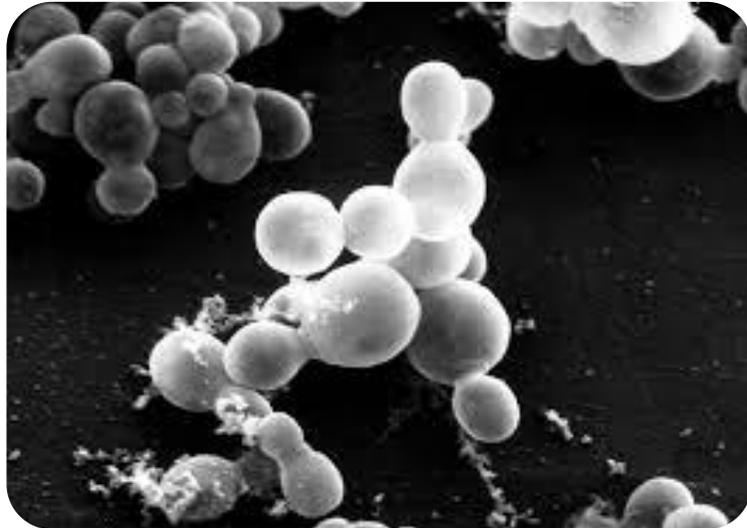


- Efectos tóxicos, cronicidad de la enfermedad.
- Dependencia a los medicamentos.
- Alta variabilidad en el perfil de sensibilidad *in vitro*.
- Posible emergencia de resistencia.

Fuente: Kenneth J. Ryan, C. George Ray: *Sherris. Microbiología médica*, 6e: [www.accessmedicina.com](http://www.accessmedicina.com)  
Derechos © McGraw-Hill Education. Derechos Reservados.

# NUEVOS BLANCOS TERAPÉUTICOS

Estudios previos de redes metabólicas y balance de flujo de *M. furfur* y *M. pachydermatis*. (Triana *et al.* 2017)



Aminoácidos esenciales para el ser humano

Camelo *et al.* y Rodríguez *et al.* 2017.

# OBJETIVOS

---

## OBJETIVO GENERAL:

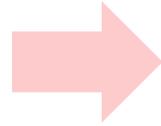
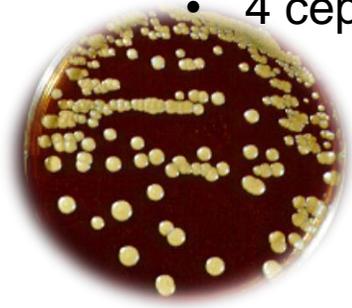
Revisar la posición taxonómica y filogenética de aislados identificados como *Malassezia furfur* atípica y evaluación de potenciales inhibidores.

## OBJETIVO ESPECÍFICO:

- Caracterizar fenotípica y molecularmente a *M. furfur* atípica.
- Determinar las relaciones filogenéticas de *M. furfur* atípica con cepas de referencia de *M. furfur* mediante análisis multilocus de secuencias.
- Evaluar la actividad antifúngica *in vitro* de los potenciales inhibidores Lisina y Treonina, frente a *M. furfur* atípica.

# Caracterización fisiológica y fenotípica

- 8 aislados de *M. furfur* atípica del Grupo CeMoP
  - 4 cepas de referencia de *M. furfur*



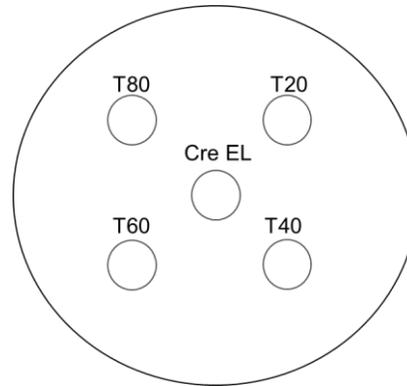
Inoculo 0.5 McFarland



Crecimiento en agar Sabouraud suplementado con 10% Tween 20 y 0.1% de Tween 80.

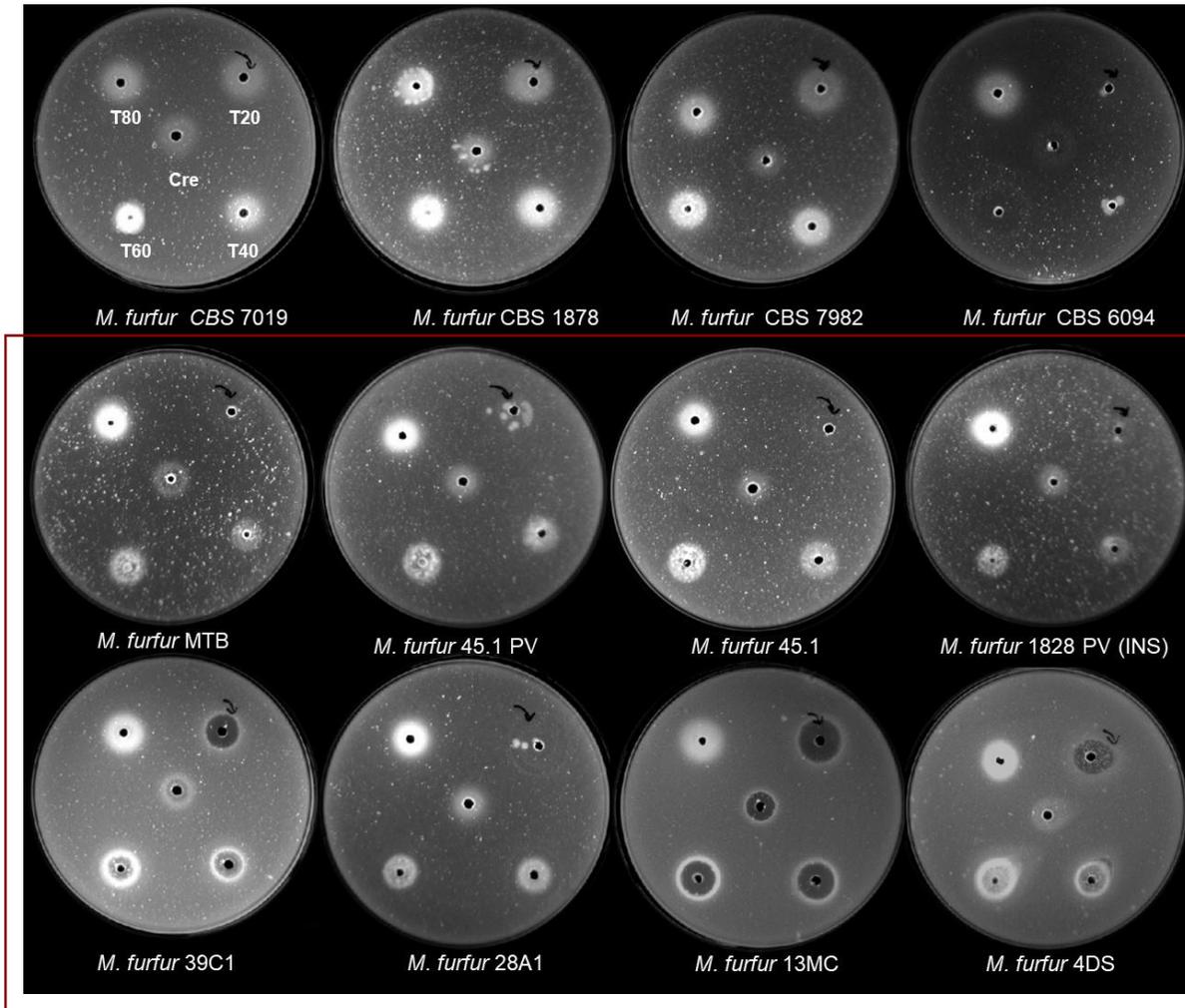


- Catalasa
- Ureasa
- $\beta$ -glucosidasa
- C. Sabouraud
- Producción de pigmento en p-agar.



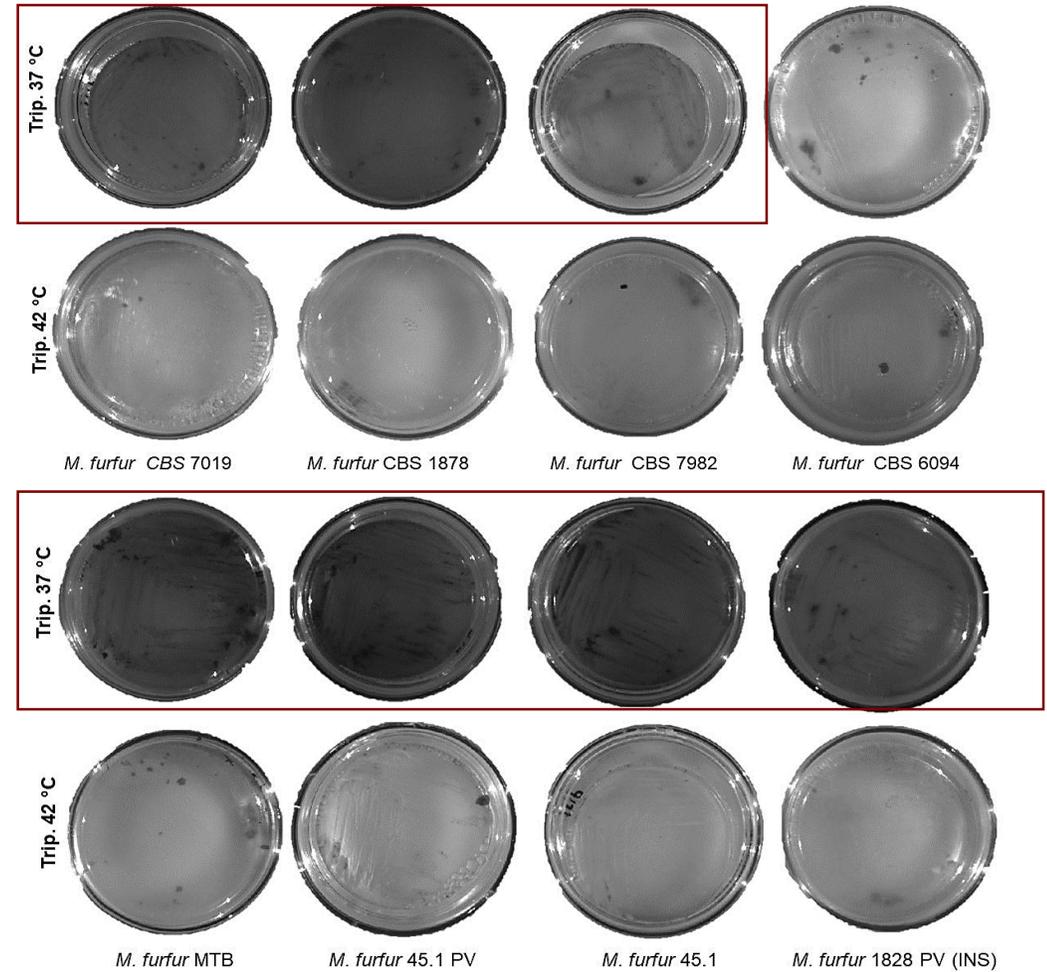
Asimilación de Tween y Cremophor EL.

**Patrón de asimilación de Tween 20, 40, 60 , 80 de *M. furfur*.**



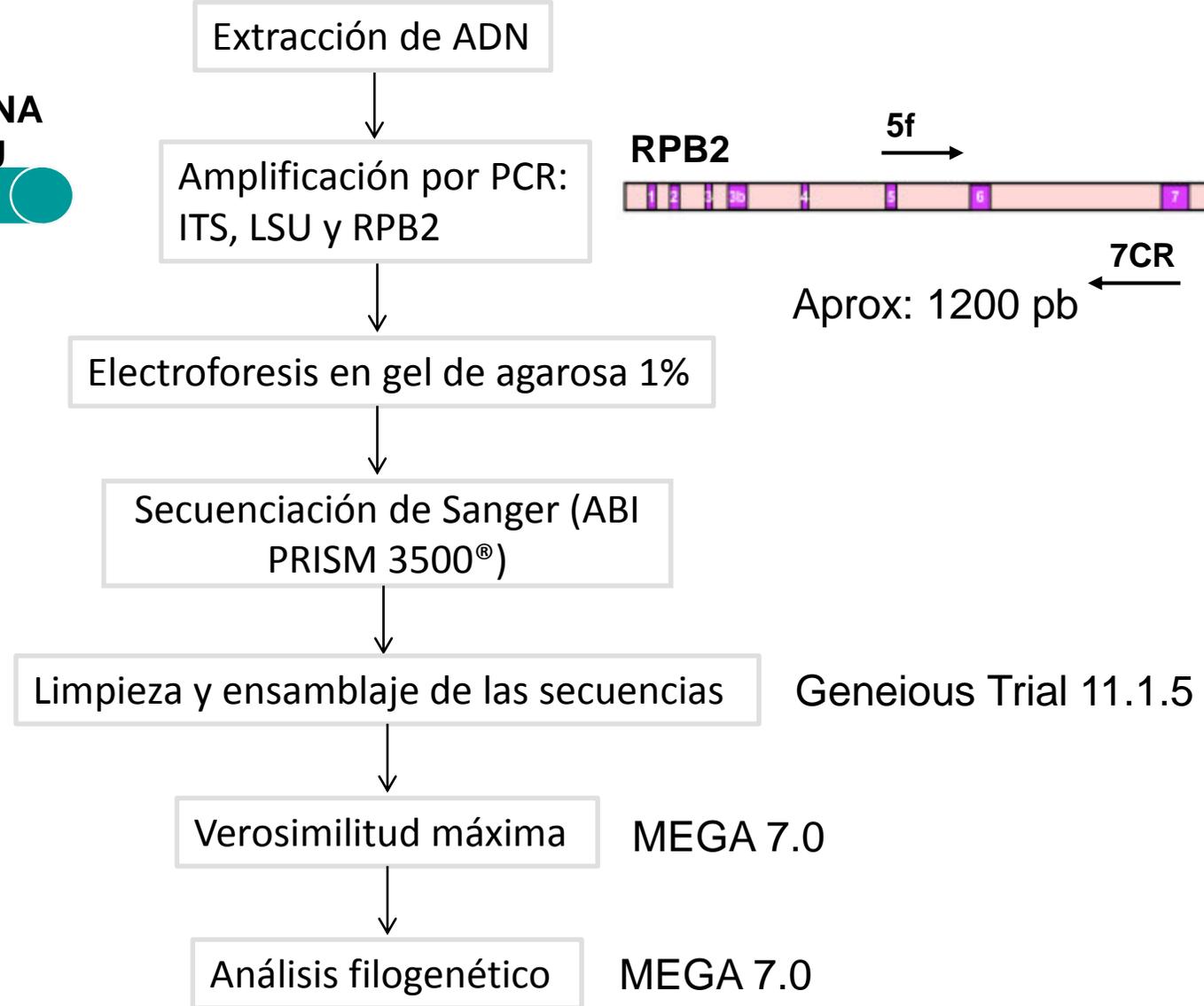
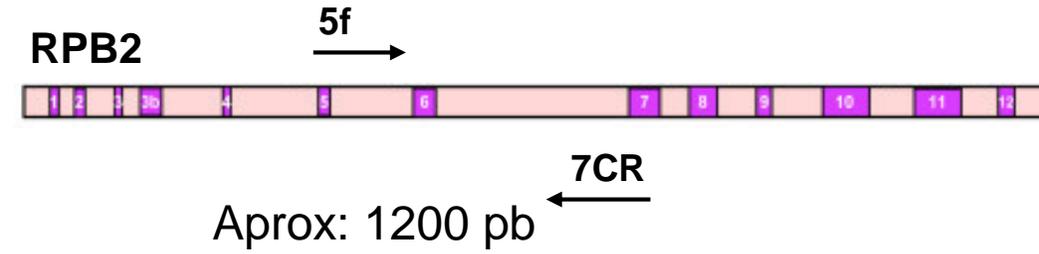
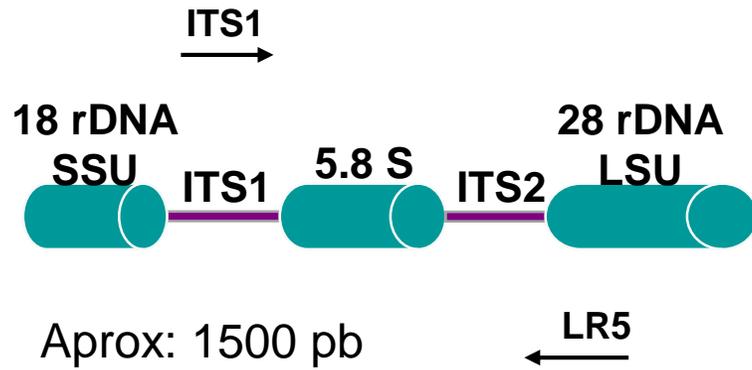
**González et al. 2008, Crespo et al. 2006, Zinkeviciene et al. 2016**

**Crecimiento y producción de pigmento en agar triptófano, cepas de *M. furfur*.**



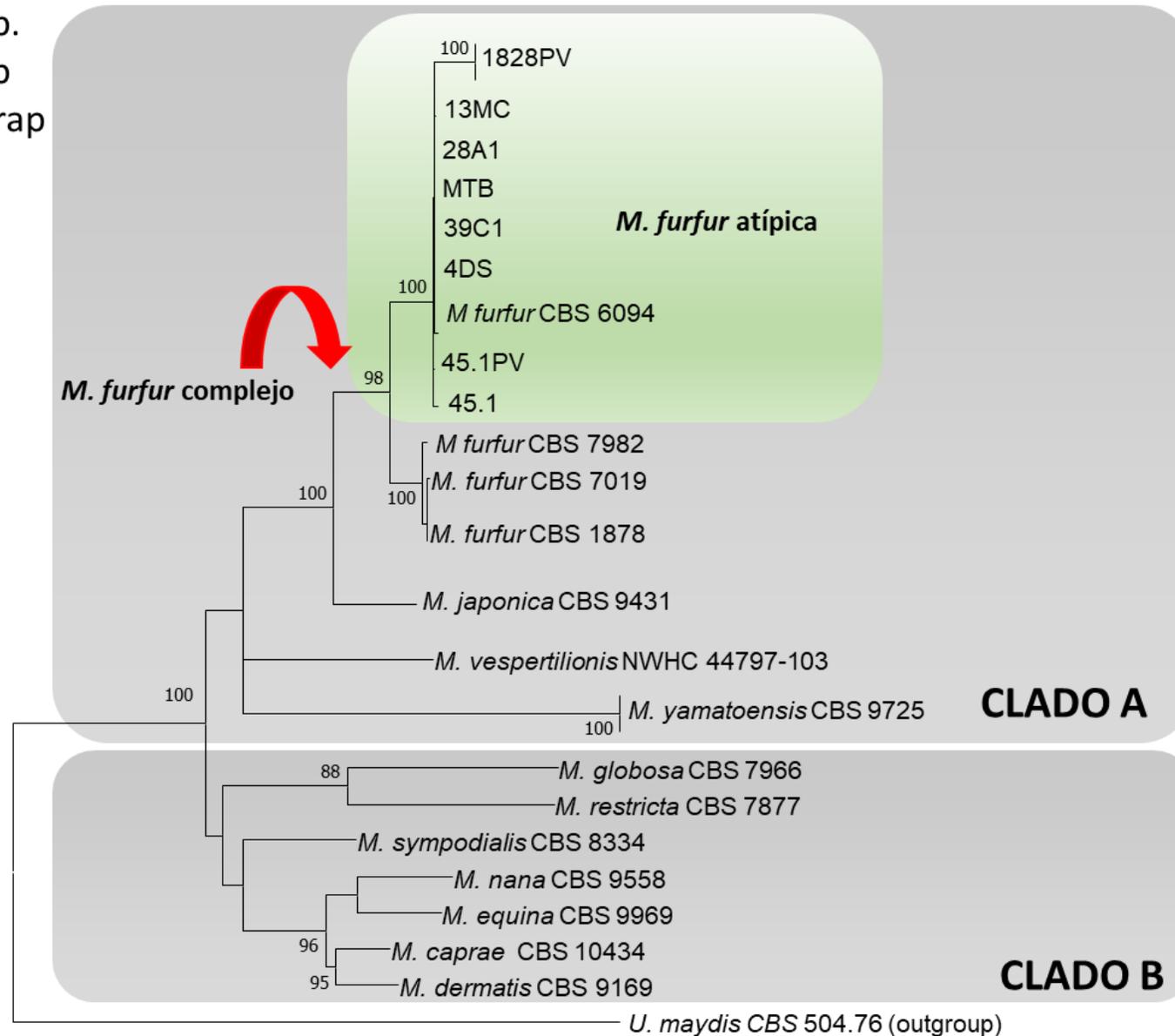
**Mallick et al. 2016, Lorch et al. 2018**

# Caracterización molecular



**Árbol filogenético, se incluyen las especies de *Malassezia*, inferido con las secuencias de RPB2.**

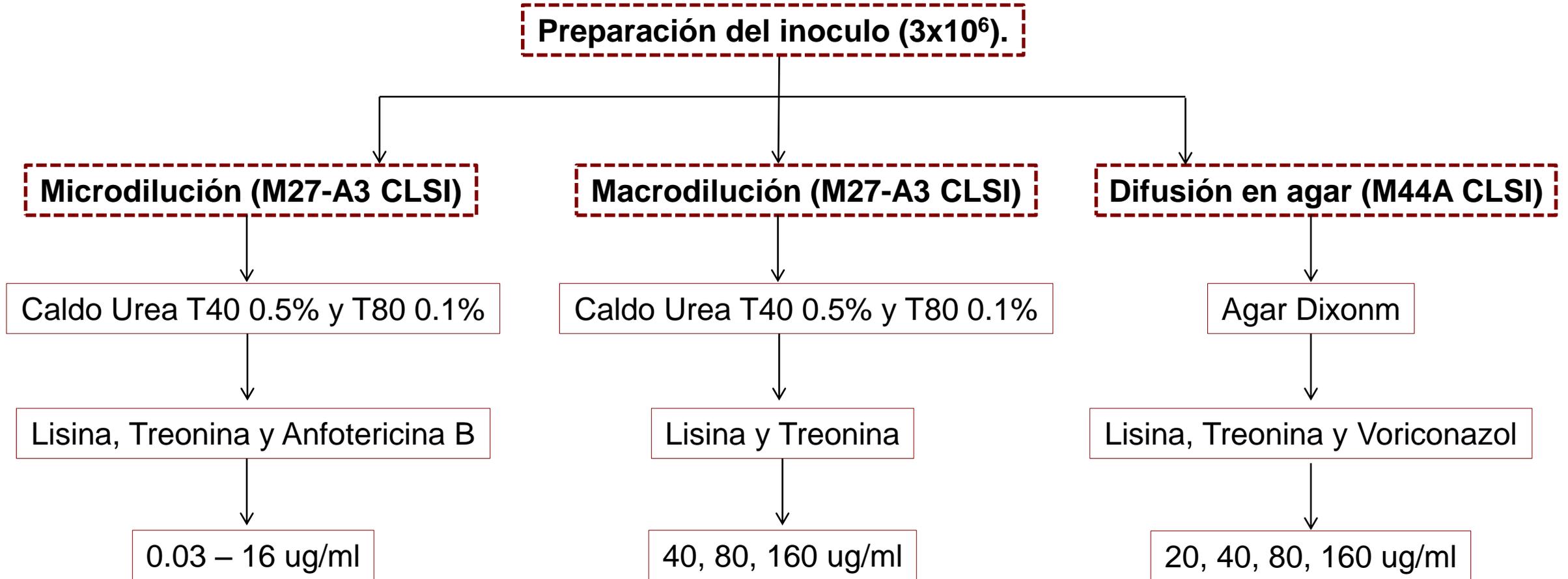
*Malassezia* spp.  
 RPB2 - 946 pb  
 ML- 1000 Bootstrap  
 T92 G+I



**Gonzalez et al. 2008**  
**Honnavar et al. 2016**  
**Visaggie et al. 2014.**  
**Guevara-Suarez et al. 2017.**  
**Sandoval-Denis et al. 2018**

0.10

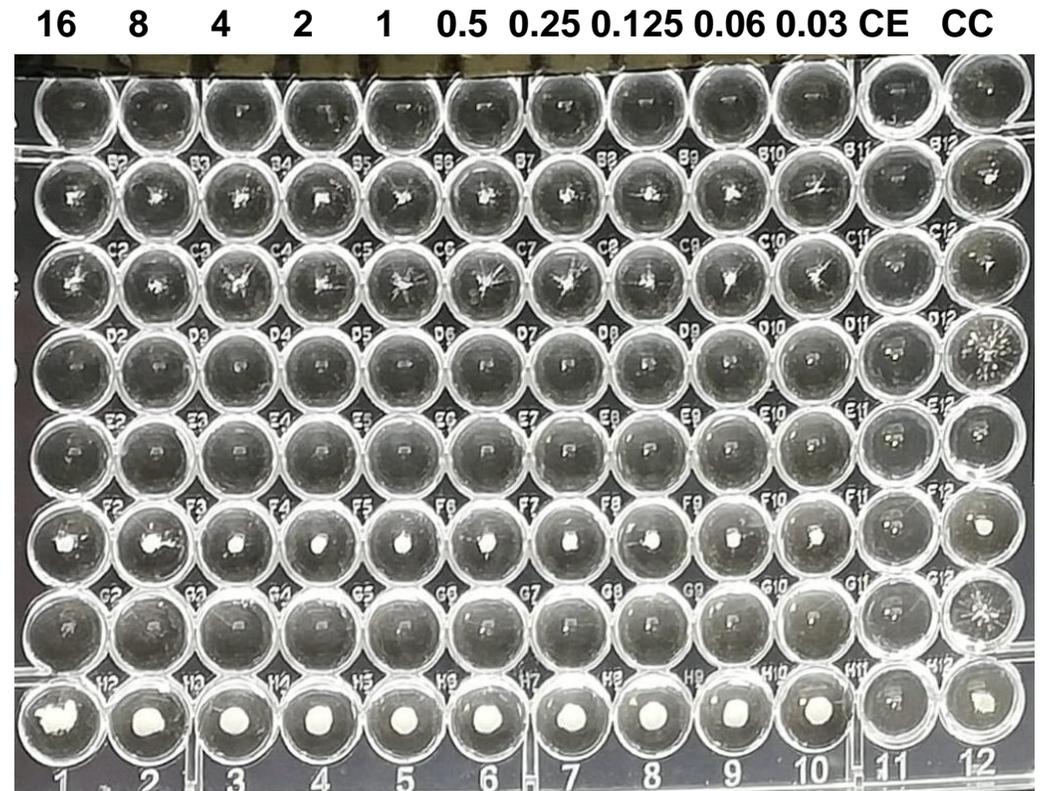
# Sensibilidad antifúngica *in vitro*



**Sensibilidad *in vitro* de *Malassezia* spp. y *Candida* spp. a Anfotericina B, L-lisina y L-treonina.**

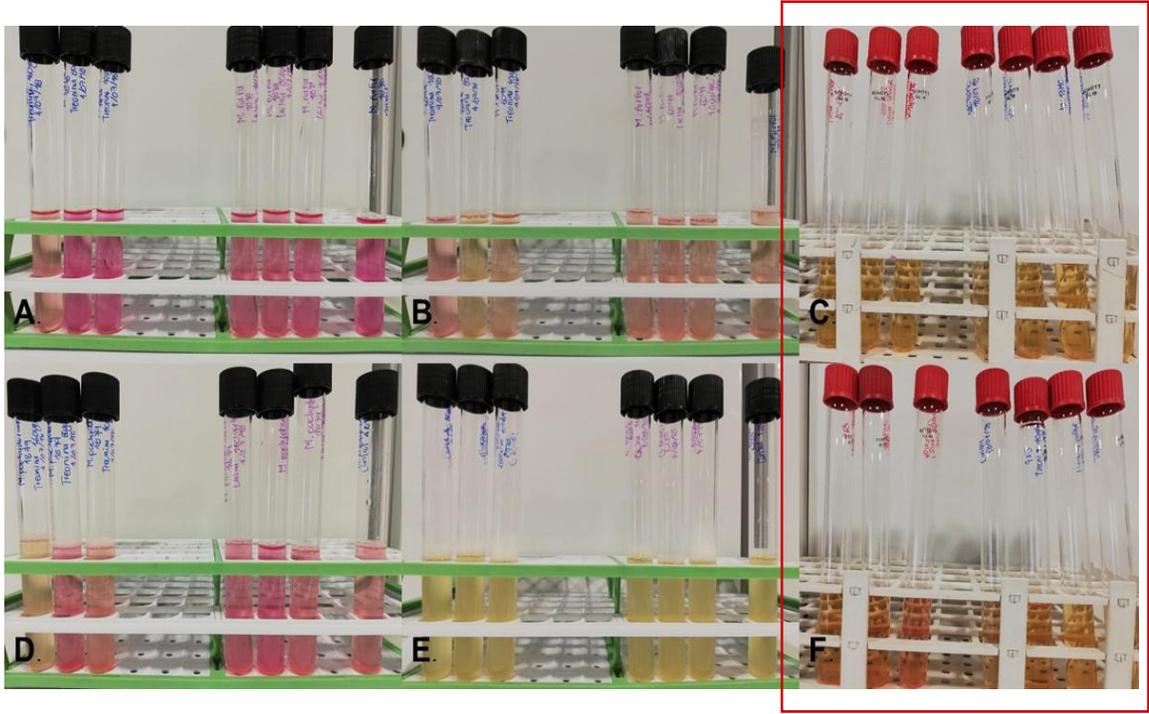
Cepa	Antifúngico CMI (µg/ml)		
	Anfotericina B	Lisina	Treonina
<i>M. furfur</i> CBS 7019	0.25	>16	>16
<i>M. furfur</i> CBS 1878	0.5	>16	>16
<i>M. furfur</i> CBS 7982	-	-	-
<i>M. furfur</i> CBS 6094	0.25	>16	>16
<i>M. furfur</i> MTB	-	-	-
<i>M. furfur</i> 45.1 PV	0.5	>16	>16
<i>M. furfur</i> 45.1	0.5	>16	>16
<i>M. furfur</i> 1828 PV (INS)	-	-	-
<i>M. furfur</i> 39C1	-	-	-
<i>M. furfur</i> 28A1	1	>16	>16
<i>M. furfur</i> 13MC	-	-	-
<i>M. furfur</i> 4DS	0.25	>16	>16
<i>M. pachydermatis</i> CBS 1879	0.25	>16	>16
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	2	>16	>16
<i>C. parasilopsis</i> ATCC 22019	1	>16	>16

**Resultado de placa sensibilizada con L-Lisina e inoculadas con *Malassezia* spp y *Candida* spp.**



No se observó inhibición a ninguna concentración con L-lisina y L-treonina.

**Prueba de sensibilidad *in vitro* de L-lisina y L-treonina, Macrodilución.**

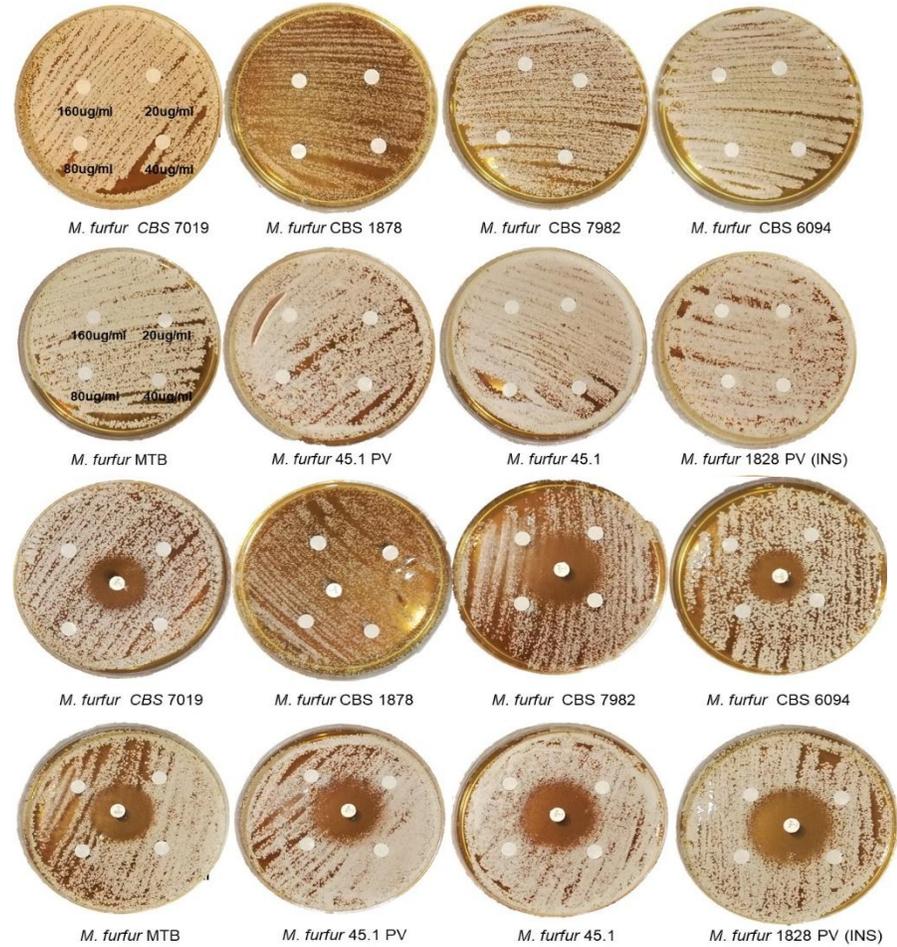


**A. *M. furfur* CBS 1878, B. *M. furfur* CBS 6094, C. *M. furfur* 13MC, D. *M. pachydermatis* CBS 1878, E. *C. krusei* ATCC 6258, F. *M. furfur* 4DS.**

De izquierda a derecha 40, 80, 160 ug/μl de lisina, 40, 80, 160 ug/μl de treonina y el último tubo corresponde al control de crecimiento.

**Pascale et al. (2011)**

**Prueba de sensibilidad *in vitro* de L-lisina y L-treonina, difusión en agar Dixon de *M. furfur*.**



**Matijevi et al. (2004)**

**Sensibilidad *in vitro* de *Malassezia* spp. y *Candida* spp. a L-lisina y L-treonina.**

Cepa	Antifúngico CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	
	Lisina	Treonina
<i>M. furfur</i> CBS 7019	>160	>160
<i>M. furfur</i> CBS 1878	>160	>160
<i>M. furfur</i> CBS 7982	>160	>160
<i>M. furfur</i> CBS 6094	>160	>160
<i>M. furfur</i> MTB	>160	>160
<i>M. furfur</i> 45.1 PV	>160	>160
<i>M. furfur</i> 45.1	>160	>160
<i>M. furfur</i> 1828 PV (INS)	>160	>160
<i>M. furfur</i> 39C1	>160	>160
<i>M. furfur</i> 28A1	>160	>160
<i>M. furfur</i> 13MC	>160	>160
<i>M. furfur</i> 4DS	>160	>160
<i>M. pachydermatis</i> CBS 1879	>160	>160
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	>160	>160
<i>C. parasilopsis</i> ATCC 22019	>160	>160

- No se observó inhibición a mayores concentraciones de L-lisina y L-treonina.

**Rincón *et al.* 2006, Cafarchia *et al.* 2012.**

# CONCLUSIONES

---

1. Se confirmaron las características fenotípicas de las cepas *M. furfur* atípicas, aunque con leves diferencias con respecto a los reportes previos.
2. El análisis filogenético multilocus, permitió confirmar la relación de *M. furfur* atípica con el complejo *M. furfur*.
3. Se propone a RPB2 como un buen marcador molecular para la identificación de especies potencialmente nuevas para el género.
4. Los candidatos propuestos como potenciales inhibidores, Treonina y Lisina, no tuvieron efecto inhibitorio en el crecimiento de la cepas de *M. furfur* y *M. furfur* atípica.

# RECOMENDACIONES

---

- Se sugiere realizar más estudios con genes codificantes de proteínas para la identificación taxonómica de especies nuevas para el género de *Malassezia*.
- Se propone realizar más investigaciones para evaluar los candidatos como inhibidores Lisina y Treonina.
- Realizar mas estudios evaluando otros candidatos de inhibición de crecimiento para *Malassezia*, evaluados en reportes previos para las levaduras como *Sacharomyces*, *Cryptococcus* y *Candida* spp.
- Se sugiere estandarizar un medio óptimo para la implementación de estas técnicas, en levaduras lípido-dependientes como *Malassezia*.

# AGRADECIMIENTOS

---



Universidad de  
los Andes

# REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

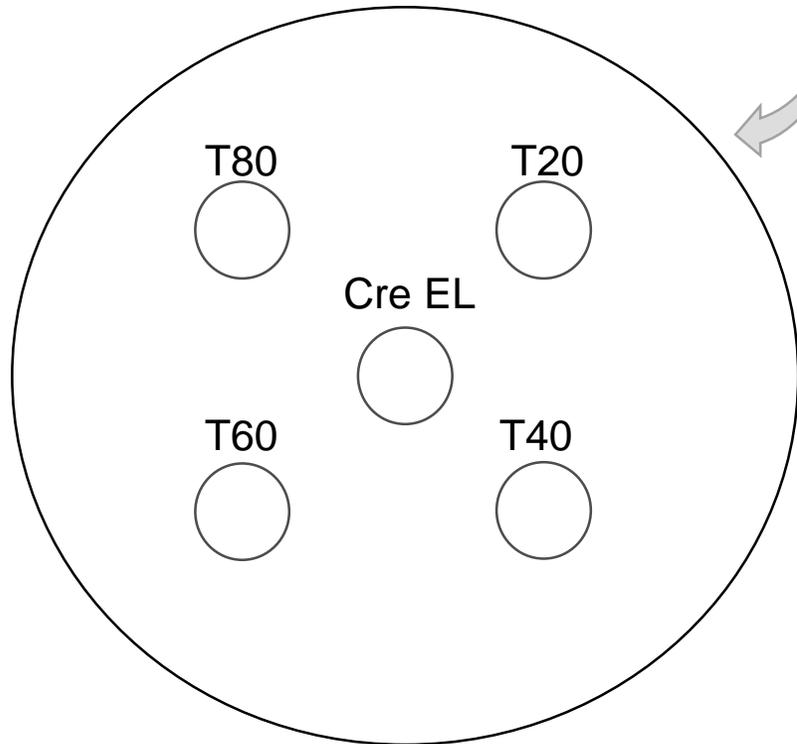
---

- Celis A, Wösten H, Triana S, Restrepo S, Cock H. *Malassezia* spp. beyond The Mycobiota. SMDJ [Internet]. 2017 Noviembre; 3(3):1019.
- Rincón S, Celis A., Sopo L, Motta A., Cepero M. *Malassezia* yeast species isolated from patients with dermatologic lesions. Biomédica [Internet]. 2005.
- Wu G, Zhao H, Li C, Rajapakse P, Wong C, Xu J, et al. Genus-Wide Comparative Genomics of *Malassezia* Delineates Its Phylogeny, Physiology, and Niche Adaptation on Human Skin. PLoS Genet. [Internet]. 2015; 11(11):e1005614.
- González A, Sierra R, Cárdenas E, Grajales A, Restrepo S, Cepero M, et al. Physiological and Molecular Characterization of Atypical Isolates of *Malassezia furfur*. JCM [Internet]. 2009; 47(1):48-53.
- Camelo L, Triana S, Celis A, Reyes A, González A. Estudio de la Enzima Homocitrato Sintasa de *Malassezia pachydermatis* como Candidata a Blanco Terapéutico y Evaluación del Efecto de la L-Lisina como Inhibidor Mediante Docking Molecular. Universidad de los Andes. 2017.
- Rodríguez N, Celis A, González A. Purificación de la enzima homoserina deshidrogenasa de *Malassezia furfur* y detección de treonina como inhibidor competitivo a partir de la actividad enzimática y los parámetros cinéticos. Universidad de los Andes.
- Guevara-Suarez M, Sutton D, Gené J, García D, Wiederhold N, Guarro J, Cano-Lira J. Four new species of *Talaromyces* from clinical sources. Mycoses. [Internet]. 2017



Inoculo 0.5 McFarland

3 ml



5 ul x cada Tween

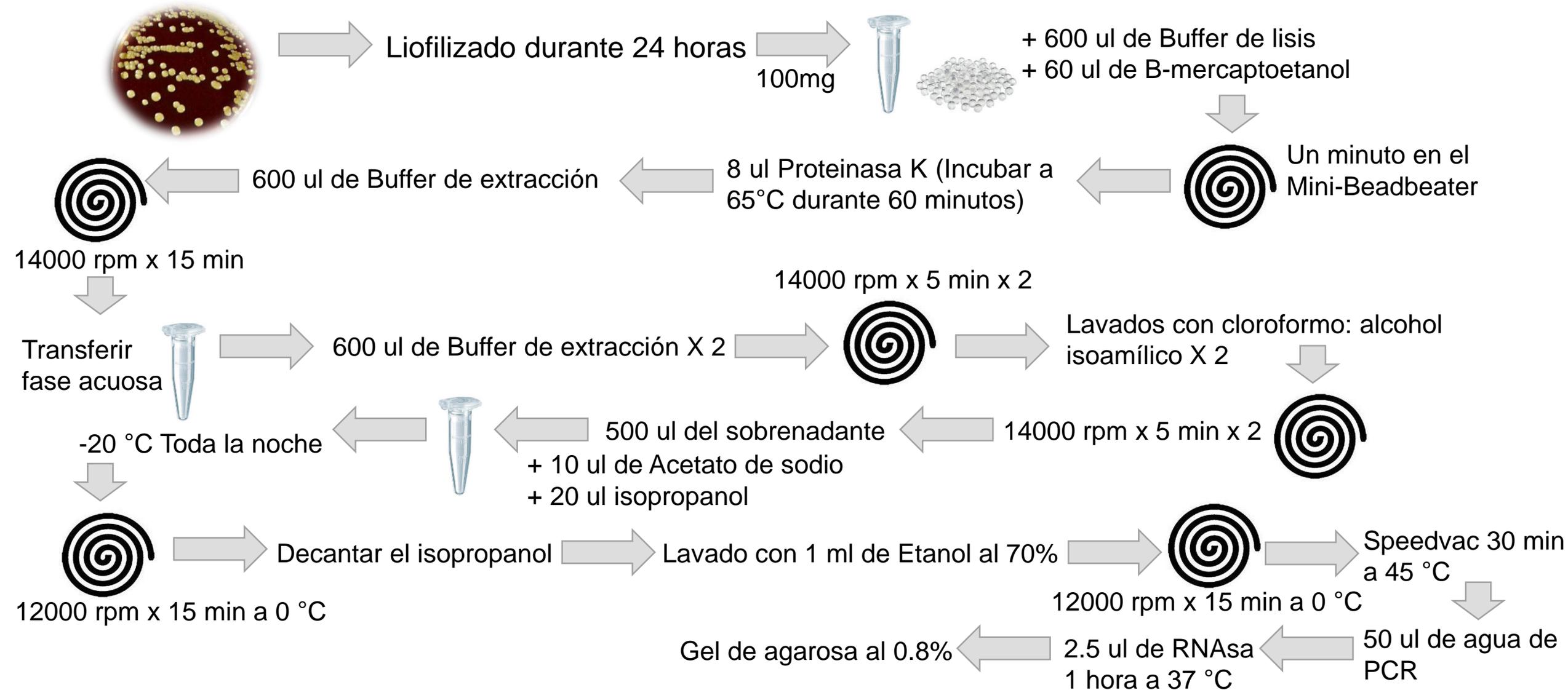
Tween 20: monolaurato de polioxietilen(20)sorbitano. Acido laurico, >40% (Balance de acido miristico, palmítico y esteárico)

Tween 40: monopalmitato de polioxietilen(20)sorbitano. Acido palmítico, ~90% (Balance acido esteárico)

Tween 60: monoestearato de polioxietilen(20)sorbitano. Acido esteárico, 40-60% acido palmítico y esteárico total, ≥90%.

Tween 80: monooleato de polioxietilen(20)sorbitano. 70% de acido oleico y acido palmítico.

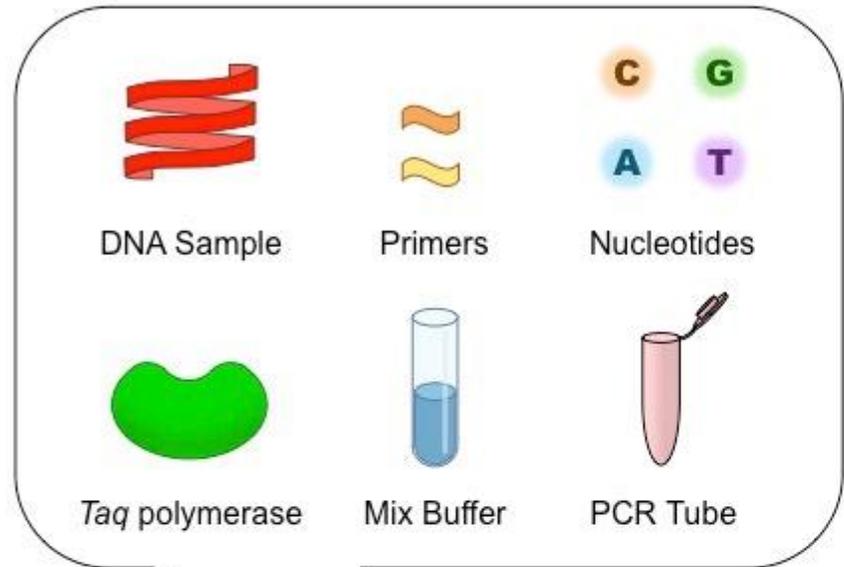
## Extracción de ADN



Reactivo	Función
Buffer de lisis (Tris HCl 50mM pH 8.0, EDTA 50mM pH 8.0 SDS al 3%)	<p><u>Tris HCl</u>: Es un tampón biológico, cuya función es mantener el pH de la solución constante (pH 7.0 pH 8.0).</p> <p><u>EDTA</u>: Es un agente quelante de iones metálicos como Ca<sup>++</sup> y Mg<sup>++</sup>. Inhibe la acción de las nucleasas al no haber cofactores libres para su actividad y así protege al ADN.</p> <p><u>SDS</u>: Es un detergente aniónico que actúa como agente solubilizante de proteínas y de componentes de tejidos y membranas.</p>
B-mercaptoetanol	Es un antioxidante, escinde enlaces disulfuro y forma disulfuros. Se usa para ayudar en la desnaturalización de estructuras ricas en GC.
Proteinasa K (200 mg/ml)	Digiere proteínas y remueve contaminantes a partir de las preparaciones de ácidos nucleicos.
Buffer de extracción (Fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1))	Desproteíniza e inhibe las nucleasas. Separación de las fase acuosa, interfase y fase orgánica.
Cloroformo: alcohol isoamílico 24:1	<p><u>Cloroformo</u>: Elimina trazas de fenol y desnaturaliza nucleasas.</p> <p><u>Alcohol isoamílico</u>: Reduce la formación de espuma, facilita las fases.</p>
Acetato de sodio e Isopropanol	Precipitación de ácidos nucleicos.
Etanol al 70%	Elimina sales residuales.

# Amplificación de ADN

## PCR Components

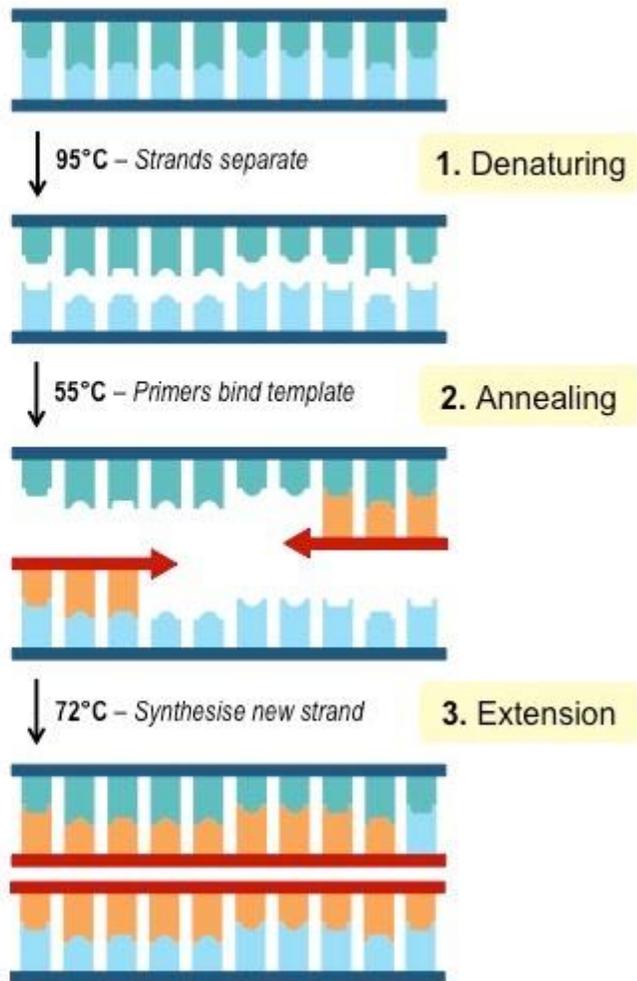


Thermal Cycler



PCR Cycle

## PCR Process (ONE Cycle)



-Primers: es una cadena de ácido nucleico que sirve como punto de partida para la replicación del DNA.

-Buffer de Taq: Amortiguador, mantiene el pH en las condiciones requeridas.

-MgCl: Aumenta la temperatura de hibridación del DNA. Cofactor para la Taq.

-Taq-polimerasa: Polimerasa termoestable.

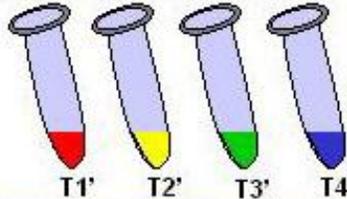
-dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dTTP, deben utilizarse en concentraciones equivalentes.

-DMSO: Reduce la estructura secundaria del ADN y es útil sobre todo para amplificar regiones con gran cantidad de GCs.

# Amplificación de ADN

## Secuenciación automática

ddTTP ddATP ddCTP ddGTP



Gracias al empleo de 4 fluorocromos diferentes, se puede combinar el resultado de las 4 reacciones y aplicar la mezcla a un mismo pocillo del gel de electroforesis.

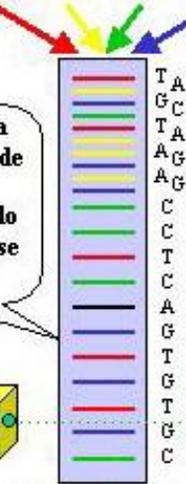
Desnaturalización para separar Las hebras de ADN

Se genera un registro informatizado de los 4 perfiles de color, que combinados se interpretan como una secuencia.

No sólo se pueden detectar los 4 colores tras acabar la separación electroforética, sino que incluso según va transcurriendo ésta el detector puede medir la presencia de las bandas que van pasando por el haz láser y su color.

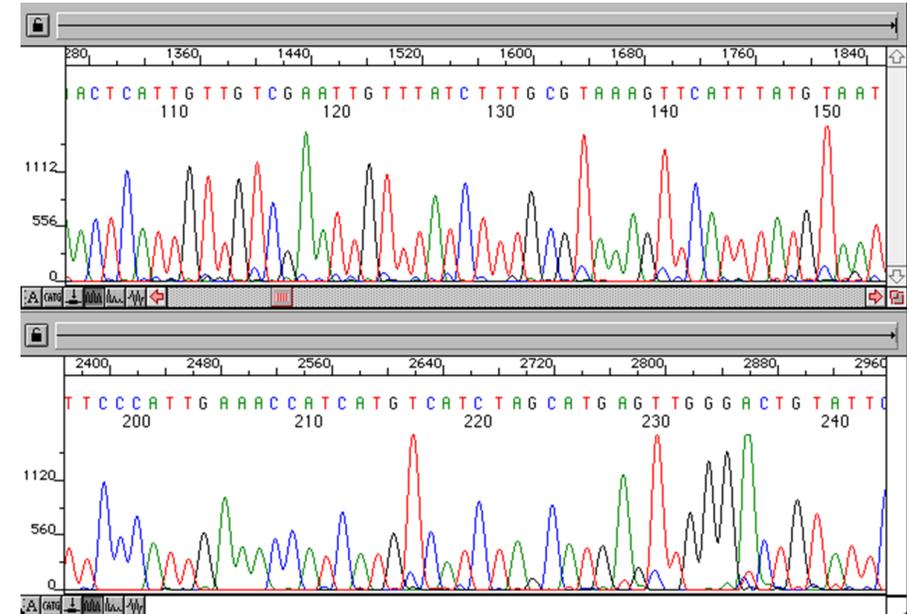
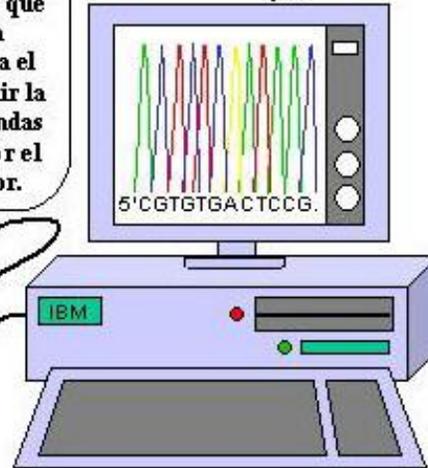
El color de cada banda corresponde al del dideoxinucleótido 3'-terminal de ese fragmento.

Láser

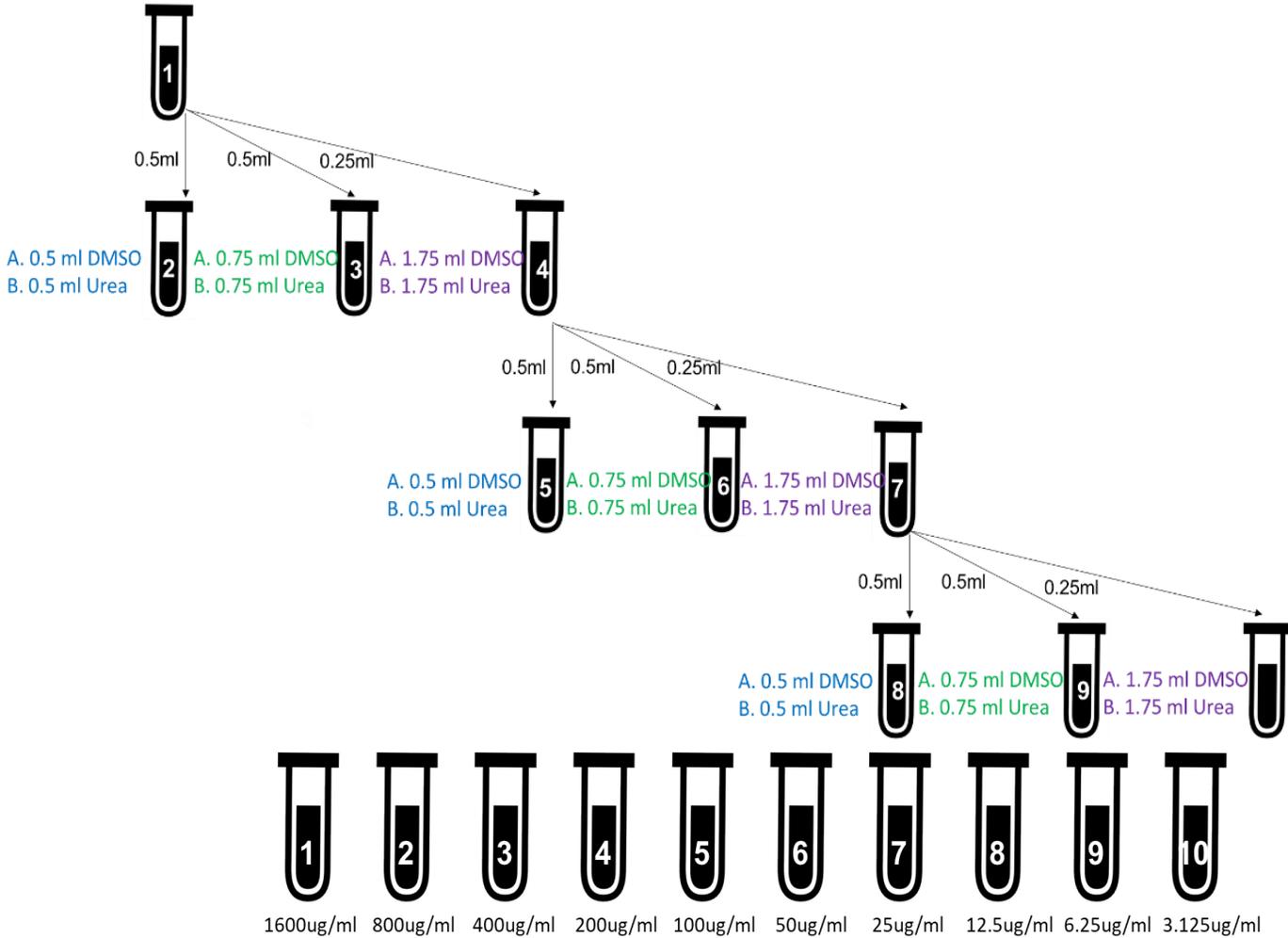


Electroforesis

Detector

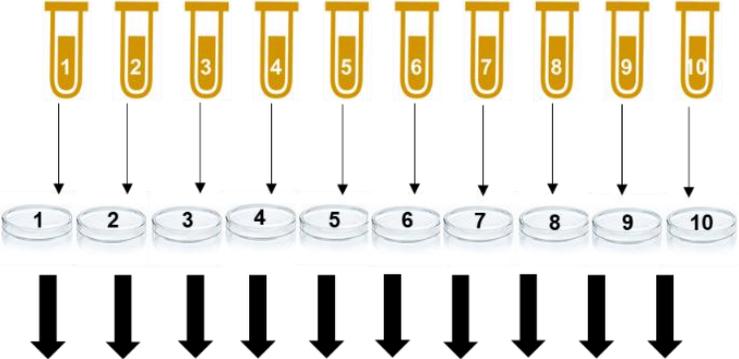


# Sensibilización de microplacas



Diluciones intermedias

Dilución 1/50 (Diluciones intermedias 100 µl + 4.9 ml de Caldo Urea )



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Dark Red	Dark Red	Dark Red	Dark Red	Orange	Yellow						
B	Dark Red	Dark Red	Dark Red	Dark Red	Orange	Yellow						
C	Dark Red	Dark Red	Dark Red	Dark Red	Orange	Yellow						
D	Dark Red	Dark Red	Dark Red	Dark Red	Orange	Yellow						
E	Dark Red	Dark Red	Dark Red	Dark Red	Orange	Yellow						
F	Dark Red	Dark Red	Dark Red	Dark Red	Orange	Yellow						
G	Dark Red	Dark Red	Dark Red	Dark Red	Orange	Yellow						
H	Dark Red	Dark Red	Dark Red	Dark Red	Orange	Yellow						
	16ug/ml	8ug/ml	4ug/ml	2ug/ml	1ug/ml	0.5ug/ml	0.25ug/ml	0.125ug/ml	0.06ug/ml	0.03ug/ml	CE	CC

# Técnica de macrodilución

