

# Estudio de factores de virulencia de *Candida albicans* responsable de micosis invasoras a partir de ensayos de supervivencia con *Galleria mellonella*

Natalia McCormick-De la Cruz<sup>1,2\*</sup>, Laura Marcos-Zambrano<sup>2</sup>, Pilar Escribano<sup>2</sup>, Jesús Guinea<sup>2</sup>

**1**Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España. **2** Servicio de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas-VIH, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, España

## Resumen

La candidiasis invasora por *Candida albicans* (IC) es la micosis invasora más frecuente y una causa importante de morbimortalidad en pacientes cuyo estado de salud es crítico y en aquéllos con estancias hospitalarias prolongadas. La patogenicidad de *Candida albicans* es atribuida a la adquisición de factores de virulencia, que han sido clásicamente estudiados en modelos murinos. Sin embargo, por razones éticas han cobrado fuerza los modelos animales invertebrados, dentro de los que destaca *Galleria mellonella*. Teniendo en cuenta el valor de *Galleria mellonella* como modelo animal para el estudio de interacciones patógeno – hospedador de *Candida albicans* y la importancia que tienen los factores de virulencia en el desarrollo de una infección, en este trabajo se busca correlacionar (si es posible) parámetros estudiados de la cinética de crecimiento *in-vitro* de 20 muestras de *Candida albicans*, aisladas de pacientes diagnosticados con candidemia, con su capacidad para infectar y matar a *Galleria mellonella*. El crecimiento *in-vitro* de cada cepa se ha representado en forma de curva de crecimiento y se han calculado valores de velocidad media, máxima absorbancia y tiempo hasta alcanzar la velocidad máxima. La virulencia de *Candida albicans* se ha evaluado mediante ensayos de supervivencia en *Galleria mellonella*.

**Palabras clave:** candidiasis invasora; factores de virulencia; *Galleria mellonella*.

**Cita:** McCormick-Delacruz, N, Marcos-Zambrano L, Escribano P, Guinea J (2015) Estudio de factores de virulencia de *Candida albicans* responsable de micosis invasoras a partir de ensayos de supervivencia con *Galleria mellonella*. *Dianas* 4(1): e20150909. ISSN 1886-8746 journal.dianas.e20150909. URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

**Editores:** María José Carmena y Alberto Domingo, Departamento de Biología de Sistemas, Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, España.

**Recibido:** 25 de junio de 2015

**Copyright:** © 2015 Natalia McCormick-De la Cruz et al. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

\*E-mail: [mccormicknata@gmail.com](mailto:mccormicknata@gmail.com)



## Introducción

### *La candidemia como problema clínico*

Las especies del género *Candida* forman parte de la microbiota de la piel y tracto gastrointestinal del ser humano [1]. Sin embargo, en determinadas condiciones en las que se rompe la homeostasis de las barreras protectoras, como son el uso de catéteres intravenosos, la ventilación mecánica, la administración previa de antibióticos de amplio espectro [2], la nutrición parenteral, quemaduras, estados de inmunosupresión, trasplante de órganos sólidos y de médula ósea, malignidades sólidas o líquidas [2], quimioterapia y procedimientos quirúrgicos invasivos [3] [4], estos comensales oportunistas causan infecciones [5].

La candidiasis invasora (IC) es la micosis invasora más frecuente, y la candidemia (definida como el aislamiento de levaduras del género *Candida* a partir de hemocultivos) es la manifestación clínica más frecuente. *Candida albicans* es especie que con más frecuencia causa candidemia (aproximadamente el 50% de los casos [4]), suponiendo entre el 70-96% de todas las micosis oportunistas [6] y presentando una mortalidad asociada que alcanza hasta el 35% en los pacientes [7] [8]. *C. albicans*, es una causa importante de morbimortalidad en pacientes críticos y en aquéllos con estancias hospitalarias prolongadas [9].

La patogenicidad de *Candida albicans* es atribuida a la adquisición de factores de virulencia, que no son otra cosa que adaptaciones resultantes de la coevolución con su hospedador. El éxito o fracaso de dicha interacción depende de factores intrínsecos del hongo, como sus estrategias evasoras de la respuesta inmune, su capacidad de adhesión y formación de *biofilms* o la producción de enzimas hidrolíticas [10], del estado fisiológico del hospedador, y de otros factores ambientales como la temperatura [12].

### ***Galleria mellonella* como modelo *in-vivo***

Clásicamente, los modelos murinos han sido los elegidos para llevar a cabo el estudio de factores de virulencia. Sin embargo, por razones éticas se ha promovido la adopción de políticas de reducción del número de animales de experimentación, refinamiento de los protocolos buscando la comodidad y bienestar de los animales durante el procedimiento y el reemplazo por modelos animales invertebrados, que son una alternativa igualmente válida [11] [12]. Son ejemplos ya validados de animales modelo para el estudio de los factores de virulencia de hongos *Caenorhabditis elegans* [13], *Drosophila melanogaster* [14] y *Galleria mellonella*, entre otros

Dentro de estos modelos alternativos, los insectos tienen ventajas logísticas, como la facilidad de manipulación y su bajo precio [15]. Además, fisiológicamente, los insectos pueden considerarse modelos apropiados para el estudio de factores de virulencia ya que responden a infecciones de una forma muy similar, y por lo tanto con una alta capacidad de correlación, con los modelos murinos y el hombre. Por ejemplo, la cutícula de los insectos tiene una función protectora y aislante similar a la piel de los mamíferos, lo que la convierte en la primera línea de defensa ante la entrada de un patógeno. A medida que la infección progresa, el patógeno invade la hemolinfa del insecto, cuya función es comparable con la de la sangre en los mamíferos. En la hemolinfa circulan distintos tipos de hemocitos, las células responsables de la respuesta inmune innata en los insectos [16]. Entre éstos, los plasmotocitos y granulocitos, que en estructura y función son comparables con los neutrófilos, intervienen en la fagocitosis, encapsulación y neutralización de bacterias y hongos unicelulares con enzimas líticas. Los hemocitos junto con el proceso de melanización, que es comparable con la cascada del complemento de los mamíferos [17], reconocen los patógenos mediante receptores específicos de superficie (PRRs) e intervienen en la activación de cascadas de señalización que demuestran el alto grado de similitud evolutiva entre ambos grupos animales, y por tanto, validan el uso de los insectos como modelos animales para el estudio de interacciones patógeno- hospedador, factores de virulencia y eficacia de sustancias antimicrobianas [16] [18].

Particularmente, las larvas de *Galleria mellonella* presentan ventajas respecto a otros modelos animales, como tener una temperatura óptima de crecimiento entre los 25–37 °C, la temperatura a la que se desarrollan las infecciones de *Candida* en el cuerpo humano. Respecto del procedimiento experimental, al infectar larvas se tiene el control de la cantidad de inóculo inyectado y la evaluación de la supervivencia es directa e intuitiva, ya que cuando mueren no hay respuesta a estímulo físico [15] y se vuelven de color negro debido a la melanización [19].

Teniendo en cuenta el valor de *Galleria mellonella* como modelo animal para el estudio de *Candida albicans* y la importancia que tienen los factores de virulencia en el desarrollo de una infección, en este trabajo se busca correlacionar (si es posible) algún parámetro de la cinética de crecimiento *in-vitro* de las levaduras con su capacidad para infectar y matar a *Galleria mellonella*.

## **Materiales y métodos**

### ***Determinación de la cinética de crecimiento in-vitro***

**Levaduras.** Un total de 20 cepas de *C. albicans* de pacientes con candidemia fueron estudiadas. Las cepas se cultivaron en medio Agar CHROMagar Candida (Tech-Laim S. A., Torrejón de Ardoz, España) [20].

**Medio de cultivo.** RPMI-1640 enriquecido con glucosa 2% y tamponado a pH 7 con MOPS (ácido morfolinopropanosulfónico).

**Inóculo.** Para poder comparar el crecimiento de las levaduras entre sí se ajustó la cantidad de células en 5 mL de agua estéril a 0,50 – 0,55 McFarland con un nefelómetro (Dinko Instruments), lo que se corresponde a 10<sup>5</sup> levaduras/mL [21]. Cada cepa se testó por triplicado en una placa de 96 pocillos añadiendo 100 µL del inóculo en cada pocillo. En todos los pocillos internos se añadieron 100 µL de RPMI. En el blanco se sustituyeron los 100 µL del inóculo por agua estéril, de forma que sirve también como control de posibles contaminaciones. Con el fin de evitar la evaporación de las muestras, se dispensaron 300 µL de agua en los pocillos de los bordes de la placa.

**Cinética de crecimiento.** La tasa de crecimiento fue determinada mediante la lectura de densidad óptica en un espectrofotómetro (Thermo Scientific Multiskan FC) a 490 nm durante un periodo de 48 h de forma continuada cada 15 minutos y en agitación moderada cada 3 minutos a 37 °C [20]. Los cambios en la

densidad óptica a lo largo del tiempo fueron representados en una curva de crecimiento [22]. Además, se estudió la velocidad media de crecimiento, el valor máximo de absorbancia y el tiempo en llegar a la velocidad máxima.

### **Ensayos de supervivencia en *Galleria mellonella***

**Medios de cultivo.** Las cepas fueron cultivadas en medio Sabouraud (95% medio Sabouraud; 5% bactoagar) y posteriormente crecidas durante toda la noche en 10 mL de medio YPD (2% glucosa; 2% bactopectona; 1% extracto de levadura) a 167 rpm en agitación a 30 °C. La concentración obtenida fue de aproximadamente  $10^8$  células/mL.

**Preparación del inóculo.** Las levaduras fueron separadas del medio por centrifugación a  $3000 \times g$  y lavadas 3 veces en 10 mL de PBS (pH 7.2). Tras los lavados, las células fueron reconstituidas en 5 mL de PBS y diluidas hasta llegar a una concentración final de  $5 \times 10^7$  células/mL [23]. La cantidad de células fue cuantificada mediante un hemocitómetro automático (Mini Automated Cell Counter Moxi Z, Orflo).

Basándose en datos previos [24] se eligió una concentración final de  $5 \times 10^7$  células/mL porque se ha comprobado que a esta concentración se consigue una supervivencia media del 50% de las larvas tras 72 – 96 h tras el inóculo.

**Infección de las larvas.** Las larvas de *Galleria mellonella* (Alcotan Valencia S. L., España) sanas y en crecimiento se almacenan en oscuridad en placas Petri con alimento a base de miel y polen a 25 °C. Antes del inóculo, el abdomen de las larvas fue desinfectado con un hisopo empapado en etanol 70% y la jeringa fue desinfectada sucesivamente en una solución de lejía al 10%, etanol 70% y PBS [21]. Para cada muestra se eligieron al azar 10 gusanos de tamaño uniforme y sin manchas negras en su cuerpo. El grupo control estaba formado por larvas no expuestas a levadura a las que se les inyectaron 10  $\mu$ L de PBS [7]. Las larvas fueron inoculadas con 10  $\mu$ L de levaduras a la concentración final ( $5 \times 10^5$  células/larva) con una jeringa Hamilton en la falsa pata más distal de su abdomen. Tras confirmar que la inyección *per se* no había causado daño físico al animal, éstos fueron incubados en placas Petri sobre papel de filtro y sin alimento a 37 °C en oscuridad durante 9 días, durante los que se evaluó diariamente su supervivencia.

**Supervivencia.** Las larvas se consideraron muertas cuando no respondían a estímulos táctiles [25]. El recuento diario de los individuos fue representado en curvas de muerte, y las diferencias entre los grupos fueron analizadas con el test estadístico de Kaplan- Meier usando el programa GraphPad Prism 5 (Graph Pad Software Inc., CA, USA).

## **Resultados**

### **Determinación de la cinética de crecimiento in-vitro**

La variación de la turbidez del medio en el espectrofotómetro es un método rápido y no destructivo de medir en tiempo real el incremento en la biomasa de *Candida albicans*. Los cambios en la densidad óptica fueron representados en una curva de crecimiento que resultó seguir un patrón sigmoideo dividido en una fase inicial de latencia seguida por una fase de crecimiento exponencial que progresa a una fase estacionaria y posteriormente a un declive progresivo como consecuencia del agotamiento de los recursos en el medio (Figura 1).

Con el fin de evaluar parámetros cinéticos que puedan intervenir en la virulencia de las levaduras, se calcularon la velocidad media de crecimiento, el valor máximo de absorbancia y el tiempo en llegar a la velocidad máxima (Tabla 1).

En el primer caso, la velocidad media se corresponde en la representación gráfica con la pendiente de la curva y se entiende como el incremento en valores de densidad óptica a lo largo del tiempo (DO/s). En el conjunto de muestras analizadas, este parámetro estaba comprendido entre  $2,5 \times 10^{-6}$  -  $7 \times 10^{-6}$  DO/s. El segundo parámetro estudiado fue el valor máximo de absorbancia alcanzado. Este caso, los valores estaban comprendidos entre 0,543 - 1,34 DO. Los valores máximos y mínimos de velocidad media y absorbancia coincidían con las mismas cepas, 7139703 y 8011692, respectivamente. La relación entre ambos valores permitió relacionar de forma proporcional la velocidad media con un mayor crecimiento del hongo.

Respecto del tercer parámetro, el tiempo hasta que las distintas muestras *Candida albicans* alcanzan la velocidad máxima estaba comprendido entre 8 – 46h. El valor mínimo de tiempo registrado fue el de la muestra 7093494, y el máximo en 7189042. Estos valores extremos no coincidieron con las cepas cuya velocidad media era más alta o más baja ni menor o mayor cantidad de biomasa.

Evidencia experimental previa [22] sugiere que otros parámetros cinéticos, como la duración de la fase *lag*, son dependientes de la variabilidad individual. En este estudio, es posible deducir *a priori* que en el análisis cinético de las levaduras también se han encontrado diferencias individuales para los parámetros

estudiados pero es necesaria una correlación con la supervivencia de *Galleria* para que puedan ser entendidos como factores de virulencia.

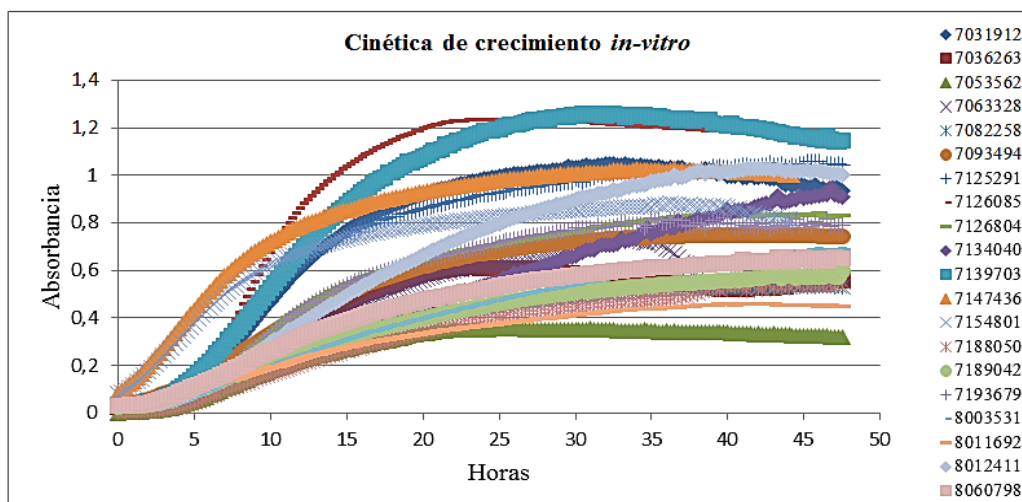


Figura 1. Representación del crecimiento *in-vitro*

Muestra	Velocidad media DO/s	Absorbancia máxima (Do)	Tiempo hasta velocidad máxima (h)
7031912	5,81327E-06	1,181733333	43,7500037
7036263	2,97638E-06	0,7581	33,91666944
7053562	3,10182E-06	0,665566667	31,58333796
7063328	3,55793E-06	0,866266667	38,16666759
7082258	2,96495E-06	0,614033333	14,62500093
7093494	4,18604E-06	0,831233333	8,041669444
7125291	5,77979E-06	1,148166667	41,375
7126085	6,09737E-06	1,3334	8,291666667
7126804	4,9954E-06	0,936566667	30,45833333
7134040	5,60453E-06	1,037366667	38,87500139
7139703	6,91411E-06	1,347766667	21,375
7147436	4,66738E-06	1,1205	26,20833611
7154801	3,81376E-06	0,9688	16,54166667
7188050	5,22527E-06	0,973266667	44,70833796
7189042	3,36126E-06	0,6903	46,45833704
7193679	4,70253E-06	0,929233333	42,87500046
8003531	4,1382E-06	0,776066667	30,45833704
8011692	2,52375E-06	0,543	22,04166574
8012411	6,53638E-06	1,1172	42,45833426
8060798	3,68452E-06	0,7344	20,20833519
Control	0	0	0

Tabla 1. Parámetros cinéticos estudiados

### Ensayos de supervivencia en *Galleria mellonella*

Las curvas de muerte fueron representadas y analizadas mediante el método de Kaplan–Meier y las diferencias entre ellas fueron determinadas mediante el test Log-rank (Mantel-Cox) [23] usando el programa GraphPad Prism 5 (Graph Pad Software Inc., CA, USA) (

Figura 2). Valores cuyo  $P < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

Un primer análisis consistió en comparar los animales control con los animales infectados. En general, para los grupos de larvas infectadas, la mortalidad encontrada era cercana al 100% entre las 48 – 72h

después de la infección, mientras que el grupo control permaneció viable hasta el día final del estudio. Al comparar estadísticamente para saber si estas diferencias eran consecuencia del azar o si se debían al tipo de inóculo que habían recibido, se obtuvo un P-valor de 0,048. Por lo tanto, la diferencia en la tasa de supervivencia entre los animales inoculados con *Candida albicans* y los controles con PBS es estadísticamente significativa y no puede justificarse exclusivamente por azar. Estos resultados confirman que *Candida albicans* produce infecciones letales en *Galleria mellonella*.

Respecto de las diferencias entre los distintos grupos de larvas infectadas, la hipótesis a contrastar buscaba diferencias entre las proporciones de supervivencia de las larvas que recibieron distintas cepas consecuencia de características de las levaduras y no por azar. El test de Log-rank (Mantel – Cox) mostró un P-valor de 0,6186. Por lo tanto, la diferencia en la tasa de supervivencia entre los animales inoculados con distintas muestras de *Candida albicans* no es estadísticamente significativa, lo que quiere decir que no se han encontrado variaciones entre las cepas en su capacidad de infectar y matar a *Galleria mellonella*.

Survival of Todos los datos: Survival proportions

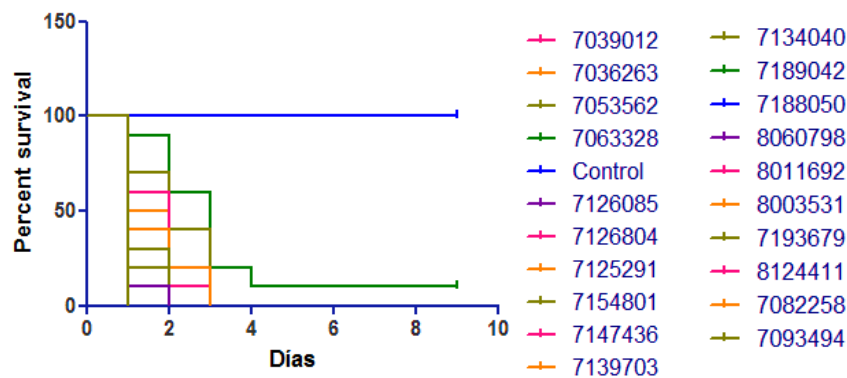


Figura 2. Curvas de muerte de los ensayos de supervivencia de *Galleria mellonella*

## Discusión

Los resultados del análisis del crecimiento cinético permiten identificar diferencias individuales para los parámetros estudiados. Fue posible hallar una proporción respecto de la cantidad de biomasa de hongo con su velocidad media de crecimiento. Sin embargo, no fue posible encontrar una relación de ninguno de estos parámetros con el tiempo en llegar a la velocidad máxima. A partir de estos resultados es posible deducir que en el perfil cinético estudiado de las levaduras hay diferencias individuales pero es necesaria una correlación con la supervivencia de *Galleria* para que puedan ser entendidos como factores de virulencia.

Respecto de los ensayos de supervivencia de *Galleria mellonella*, la diferencia en la tasa de supervivencia entre los animales inoculados con *Candida albicans* y los controles con PBS confirman que *Candida albicans* produce infecciones letales en *Galleria mellonella*. Al comparar las posibles diferencias entre los distintos grupos de larvas infectadas no se han encontrado variaciones entre las cepas en su capacidad de infectar y matar a *Galleria mellonella*. Por lo tanto, las diferencias individuales encontrados en los estudios cinéticos no demostraron ser determinantes en la tasa de supervivencia de *Galleria mellonella*. Los resultados obtenidos sugieren que diferencias en parámetros cinéticos de velocidad media, tiempo en alcanzar la velocidad máxima y el valor máximo de absorbancia no parecen ser determinantes para la virulencia de *Candida albicans* en *Galleria mellonella*.

Estos resultados, además, corroboran el valor que tiene *Galleria mellonella* como modelo animal para el estudio de la patogenia y virulencia de agentes infecciosos, y en concreto de *Candida albicans*. Sin embargo, hay que tener en cuenta que existen limitaciones que deben tenerse en cuenta a la hora de extrapolar los resultados en modelos murinos y en los humanos.

## Bibliografía

- [1] M. K. Arendrup, «Candida and Candidaemia, Susceptibility and Epidemiology,» *Dan Med J.*, vol. 60, nº 11, pp. 1-32, 2013.
- [2] N. Yapar, «Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis,» *Therapeutics and Clinical Risk Management*, vol. 10, pp. 95-105, 2014.

- [3] P. G. Pappas, «Invasive candidiasis,» *Infect Dis Clin North Am.*, vol. 20, nº 3, p. 485–506, 2006.
- [4] L. Klingspor, A. M. Tortorano, J. Peman y et al., «Invasive Candida infections in surgical patients in intensive care units: a prospective, multicentre survey initiated by the European Confederation of Medical Mycology (ECMM) (2006–2008),» *Clin Microbiol Infect.*, vol. 21, nº 1, p. 87, 2015.
- [5] V. Tak, P. Mathur, P. Varghese y et al., «The epidemiological profile of candidemia at an Indian trauma care center,» *J Lab Physicians*, vol. 6, pp. 96–101, 2014.
- [6] H. Wisplinghoff, T. Bischoff y S. M. Tallent, «Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: Analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study,» *Clin Infect Dis*, vol. 39, pp. 309–17, 2004.
- [7] B. Fuchsa, J. Ebya, C. Nobile y et al., «Role of filamentation in *Galleria mellonella* killing by *Candida albicans*,» *Microbes Infect*, vol. 6, pp. 488–96, 2010.
- [8] S. Pu, N. Siqiang, Z. Chuanming y et al., «Epidemiology, antifungal susceptibilities, and risk factors for invasive candidiasis from 2011 to 2013 in a teaching hospital in southwest China,» *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 2015.
- [9] T. E. Zaoutis, J. Argon, J. Chu y et al., «The epidemiology and attributable outcomes of candidemia in adults and children hospitalized in the United States: A propensity analysis,» *Clin Infect Dis*, vol. 41, pp. 1232–9, 2005.
- [10] Silva, S., M. Negri, M. Henriques y et al., «*Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance,» *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 36, pp. 288–305, 2011.
- [11] N. Browne y K. Kavanagh, «Developing the potential of using *Galleria mellonella* larvae as models for studying brain infection by *Listeria monocytogenes*,» *Virulence*, vol. 4, nº 4, pp. 271–2, 2013.
- [12] N. Trevijano-Contador y O. Zaragoza, «Expanding the use of alternative models to investigate novel aspects of immunity to microbial pathogens,» *Virulence*, vol. 5, nº 4, p. 454–56, 2014.
- [13] J. Giacomotto y L. Ségalat, «High-throughput screening and small animal models, where are we?,» *Br J Pharmacol*, vol. 160, pp. 204–16, 2010.
- [14] G. Chamilos y et al., «*Drosophila melanogaster* as a facile model for large-scale studies of virulence mechanisms and antifungal drug efficacy in *Candida* species,» *J Infect Dis*, vol. 193, pp. 1014–22, 2006.
- [15] A. Desalermos, B. Fuchs y E. Mylonakis, «Selecting an invertebrate model host for the study of fungal pathogenesis,» *PLoS Pathog*, 2012.
- [16] D. Bergin, M. Brennan y K. Kavanagh, «Fluctuations in haemocyte density and microbial load may be used as indicators of fungal pathogenicity in larvae of *Galleria mellonella*,» *Microbes Infect*, vol. 5, pp. 1389–95, 2003.
- [17] B. Walters y N. A. Ratcliffe, «Studies on the in vivo cellular reactions of insects: fate of pathogenic and non-pathogenic bacteria in *Galleria mellonella* nodules,» *J. Insect. Physiol.*, vol. 29, pp. 417–23, 1983.
- [18] E. Reeves, C. Messina, S. Doyle y et al., «Correlation between gliotoxin production and virulence of *Aspergillus fumigatus* in *Galleria mellonella*,» *Mycopathologia*, vol. 158, pp. 73–9, 2004.
- [19] B. Fuchs, E. O'Brien, J. Khoury y E. Mylonakis, «Methods using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis,» *Virulence*, vol. 1, pp. 475–82, 2010.
- [20] M. C. Arendrup, D. S. Perlin, R. H. Jensen y et al., «Differential in vivo activities of Anidulafungin, Caspofungin and Micafungin against *Candida glabrata* Isolates with and without FKS Resistance Mutations,» *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, pp. 2435–42.
- [21] S. Gago, R. García-Rodas, I. Cuesta y et al., «*Candida parapsilosis*, *Candida ortopsilosis*, and *Candida metapsilosis* virulence in the non-conventional host *Galleria Mellonella*,» *Virulence*, vol. 5, nº 2, pp. 278–285, 2014.
- [22] J. Meletiadiis, D. T. A. te Dorsthorst y P. E. Verweij, «Use of Turbidimetric Growth Curves for Early Determination of Antifungal Drug Resistance of Filamentous Fungi,» *Journal of Clinical Microbiology*, p. 4718–25, 2003.
- [23] L. De Dong, D. Li, H. Gan-Hai y et al., «Using *Galleria mellonella* - *Candida albicans* Infection Model to Evaluate Antifungal Agents,» *Biol. Pharm. Bull*, vol. 36, nº 9, pp. 1482–7, 2013.
- [24] A. Gómez-López, A. Forastiero, E. Cendejas-Bueno y et al., «An invertebrate model to evaluate virulence in *Aspergillus fumigatus*: the role of azole resistance,» *Medical Mycology*, vol. 52, pp. 311–9, 2014.
- [25] E. Mylonakis, R. Moreno, J. El Khoury y et al., «*Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis,» *Infect Immun*, vol. 73, pp. 3842–50, 2005.

