

PATOGENICIDAD DÉRMICA DE UN AISLAMIENTO AUTÓCTONO DEL HONGO ENTOMOPATÓGENO *Beauveria bassiana* EN RATONES

Dermal Pathogenicity of an Autochthonous Isolate of Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* in Mice

María Eugenia Acosta-Quintero¹, Dalmiro José Cazorla-Perfetti^{1*}, Giovanny Eduarte-Pereira² y Pedro Morales-Moreno¹

¹Laboratorio de Entomología, Parasitología y Medicina Tropical (L.E.P.A.M.E.T.). Centro de Investigaciones Biomédicas (C.I.B.), Universidad Nacional Experimental "Francisco de Miranda" (UNEFM), Apdo. 7403, Coro 4101, Coro. Estado Falcón. Venezuela. E-mail: lutzomyia@hotmail.com. ²Cátedra de Farmacología, Área Ciencias de la Salud, UNEFM. Coro. Estado Falcón. Venezuela.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar a dosis de 1×10^9 conidias/mL por vía dérmica en ratones albinos NMRI (machos y hembras), la patogenicidad del aislamiento autóctono LF14 de *Beauveria bassiana* (Fungi: Ascomycota). Esta especie posee una elevada virulencia hacia *Rhodnius prolixus* y *Triatoma maculata* (Triatominae), vectores de la enfermedad de Chagas en Venezuela. Se realizaron observaciones clínicas y de comportamiento diarias y se registró el peso corporal. Asimismo, se estimó el aclaramiento fúngico mediante examen directo y cultivo de muestras de piel y de infectividad con la toma de muestras de tejidos de varios órganos, incluyendo un estudio histopatológico durante las necropsias a los 3; 7 y 14 días después de la inoculación. No ocurrieron muertes ni alteraciones clínico-patológicas discernibles, siendo el tipo de comportamiento activo-normal en el 100% de los casos. El peso promedio corporal ganado, tanto en los animales expuestos a LF14 *B. bassiana* como los controles, se incrementó con el tiempo, siendo sólo las diferencias entre sexos estadísticamente significativas ($F=42,84$; $g.l.=1$; $P<0,00001$). Se obtuvieron conidias viables sin germinar a las 24 horas después de la inoculación, lo que sugiere que no hubo germinación fúngica en la región dérmica. No se detectaron anomalías en la inspección anatomopatológico ni conidias germinadas en ninguno de los órganos estudiados, sin ninguna reacción tisular patológica, sugiriendo que no existe evidencia de multiplicación fúngica. Se concluyó que aún a una dosis fúngica elevada, el aislamiento LF14 de *B. bassiana* no es patogénico por vía dérmica en ratones albinos NMRI.

Palabras clave: *Beauveria bassiana*, toxicidad, patogenicidad, ratones, infectividad.

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate with doses of 1×10^9 conidia/mL dermally administered in white mice (NMRI strain) (males and females), pathogenicity of a native isolate LF14 of *Beauveria bassiana* (Fungi: Ascomycota). This species is highly virulent to *Rhodnius prolixus* and *Triatoma maculata* (Triatominae), vectors of the Chagas disease in Venezuela. Clinical and behavioural evaluations were done daily, as well as weight of the mice. Likewise, clearance of fungus of the skin was estimated by direct examination and culturing, and infectivity by performing mycological and histopathological test after necropsies at 3, 7 and 14 days post-inoculation. Animals no showed discernible pathological changes or died, with 100% active-normal behaviour. In all the mice groups, including control ones, there was an increasing in the mean weight gained through time, with statistically significance difference between the sexes ($F=53,2$; $g.l.=1$; $P<0,0000$). Nongerminated conidia viable were observed 24 hours after inoculating fungus, suggesting there was no germination into dermal region. Anatomopathological changes or germinated conidia were not detected in analysed organs, with normal tissue reactions, suggesting no evidence for fungal multiplication. It can be concluded that even to a high dose dermally administered, isolate LF14, *B. bassiana* is non pathogenic in white mice (NMRI strain).

Key words: *Beauveria bassiana*, toxicity, pathogenicity, mice, infectivity.

INTRODUCCIÓN

Beauveria bassiana (Bálsamo) Vuillemin es un hongo filamentosos (Ascomycota: Hipocreales), que en la actualidad se encuentra bajo un intenso estudio y utilización como agente para el control biorracional de una amplia variedad de artrópodos-plagas, tanto de importancia agrícola como aquellos que poseen relevancia en la salud pública humana y animal [30, 31].

Las especies de *Beauveria*, y en particular *B. bassiana*, generalmente son implementadas como agentes de control microbiano de una manera segura para los animales vertebrados y los humanos, siendo demostrada su seguridad en varios modelos animales [30, 31]. Sin embargo, como cualquier otro microorganismo, *B. bassiana*, así como también otras especies de hongos entomopatógenos y de otras 400 especies fúngicas, posee la potencialidad de actuar como un patógeno oportunista, aunque debe mencionarse que estos reportes son extremadamente raros [11, 30, 31]. En el caso particular de las infecciones humanas, el análisis de los reportes indica que las mismas se han dado en condiciones o circunstancias extraordinarias o muy *sui generis*, tales como individuos extremadamente inmunosuprimidos (e.g., leucemia aguda) o con un historial de cirugías o injurias, como en el caso de queratitis en el ojo después de eventos traumáticos y tratados con corticosteroides [11, 19, 29, 30, 31]. Existen reportes de infecciones por este hifomiceto en reptiles en cautiverio, incluyendo tortugas [9], y caimanes [6], lo cual se puede atribuir a las inadecuadas condiciones de cautividad [30].

Estudios a nivel experimental y de campo han demostrado que, *B. bassiana* posee un potencial muy promisorio para ser implementado en el manejo biorracional de poblaciones de especies de triatomíneos, las cuales poseen importancia epidemiológica en la transmisión de la enfermedad de Chagas [14]. Esto es relevante mencionarlo, toda vez que varias especies de triatomíneos han desarrollado resistencia hacia los insecticidas de origen químico, los cuales similarmente han sido poco efectivos hacia aquellos triatomíneos-vectores de hábitos peridomésticos y selváticos [13,14]. Además, debe destacarse los efectos tóxicos potenciales de los insecticidas químicos sobre la salud humana y de los animales, tanto los de hábitos silvestres como aquellos domesticados por el hombre y los organismos benéficos (e.g., polinizadores y enemigos naturales de otros artrópodos dañinos), así como también a toda la biósfera en general, lo que evidentemente alteraría el equilibrio natural de los ecosistemas con la subsecuente contaminación de las aguas y los suelos [4].

Como parte de un proyecto global para seleccionar patotipos autóctonos de hongos entomopatógenos que sean altamente virulentos contra vectores de enfermedades metaxénicas y adaptados a las condiciones del medio venezolano, el equipo de investigación del presente estudio ha demostrado bajo condiciones de laboratorio, la elevada patogenicidad y virulencia que posee el aislamiento nativo LF14 de *B. bassiana* sobre *Rhodnius prolixus* y *Triatoma maculata* [2], vectores de la enfermedad de Chagas en Venezuela, siendo por lo tanto un potencial patotipo para ser empleado en futuros programas de manejo integrado de plagas (MIP) de la tripanosomiasis americana en zonas endémicas del país, y particularmente en la región falconiana. Este hecho ha aumentado la necesidad de evaluar su bioseguridad y su impacto ambiental como posible agente de control biológico, antes de ser evaluado a nivel de campo. Con el objetivo de determinar la patogenicidad de LF14, *B. bassiana* en modelos vertebrados, se les aplicó el aislamiento por vía dérmica a ratones (*Mus musculus*) albinos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los ensayos de tipo descriptivo-analítico, se realizaron en el laboratorio de Entomología Parasitología y Medicina Tropical (LEPAMET), de la Universidad Nacional Experimental "Francisco de Miranda" (UNEFM), Coro, estado Falcón, Venezuela. Básicamente se utilizó parte del diseño experimental previsto en el nivel I de evaluación toxicológica de los agentes microbianos para el control de plagas de la Agencia de Protección Ambiental (*Environmental Protection Agency: EPA*) de los Estados Unidos de América (EUA) [30]. Asimismo, fueron conducidos cumpliendo las normas internacionales y nacionales de bioética y bioseguridad de las buenas prácticas de laboratorio, y en el cuidado y uso de animales de laboratorio, lo que permitió que recibieran cuidados humanísticos [5]. El presente protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Bioética de la UNEFM el 31 de Enero de 2008.

Animales de experimentación

Se usaron 12 ratones/sexo albinos heterocigotos NMRI, entre 6 y 7 semanas de edad por cada grupo de ensayo, incluyendo los respectivos controles, cuyos pesos no excedieron aproximadamente 20% del peso promedio para cada sexo, con calidad higiénico sanitarias de acuerdo a las normas de cuidado y uso de animales de laboratorio [5]. Se colocaron 3 animales por jaulas de uso habitual en el Bioterio. El alimento (Ratarina: Protinal®, Valencia, Venezuela) y el agua se esterilizaron por vapor húmedo en autoclave (All American 25X-1, Wisconsin Aluminum Foundry, EUA) y suministrados *ad libitum*. Los animales se mantuvieron en ciclo de luz-oscuridad 12-12 horas.

Cultivos fúngicos y preparación de la suspensión de conidios

Los ensayos se hicieron con el aislamiento LF14, de *B. bassiana*, de la micoteca del laboratorio de Fitopatología (LF), Núcleo Universitario "Rafael Rangel" (NURR), Universidad de Los Andes (ULA), Trujillo, estado Trujillo, Venezuela. El mismo fue aislado en 1992, a partir del cadáver esporulado de un insecto coleóptero no identificado recolectado en la población de Monay, estado Trujillo, en la región andino-venezolana. Las conidias se obtuvieron removiendo, mediante asa de platino, la superficie de cultivos esporulados de 15 días crecidos sobre medio sólido Sabouraud-agar (25 gr de glucosa; 10 gr de peptona; 20 gr de agar y 1000 cc de agua destilada), y mantenidos a temperatura 26°C y humedad relativa (HR) >90% en cámara de ambientación o climatizada (Biotronette® Mark II, modelo 845, Lab Line Instruments, Inc, Illinois, EUA). El material fúngico cosechado se suspendió en agua destilada estéril con 0,1% Tween 20 y se filtró a través de gasa para separar el micelio de las conidias. La suspensión de conidias se ajustó, mediante hemocitómetro (Nebaüer improved, Marienfeld, Alemania), a 1×10^9 conidias/mL, y se utilizó inmediatamente [3, 7].

Procedimiento de infección

Aproximadamente 24 horas antes del ensayo, se rasuró con hojillas estériles, un área (aproximadamente 10% de la superficie corporal) ventral y dorsal del tronco de los animales. Sobre estas áreas se sujetaron mediante cinta adhesiva no irritante, una gasa estéril previamente impregnada con una suspensión de 1×10^9 conidias/mL del hifomiceto, en una sola dosis durante 24 horas. Al grupo de animales control se les aplicó la gasa impregnada en agua destilada estéril. Al cabo de este tiempo, los residuos de las sustancias del área dérmica expuesta se removieron con agua estéril. Posteriormente, durante 14 días se realizaron exámenes clínicos y de comportamiento, determinación diaria de peso, mortalidad y estudio micológico (aclaramiento) de la piel. En los exámenes clínicos se evaluó la presencia de signos de irritación en piel y pelo, ojos y mucosas, frecuencia respiratoria, frecuencia cardíaca, sistema nervioso central y autonómico, actividad somato-motora, patrones de conducta o comportamiento calificado como normal-activo, sensible, pasivo, agresivo [26], haciéndose énfasis, entre otros, en convulsiones, diarrea, letargo, salivación, somnolencia y coma. A cada animal se le hizo determinación diaria de peso.

Para el estudio micológico (aclaramiento) se tomó la muestra con hisopo estéril de las áreas rasuradas, y se colocó sobre lámina portaobjeto, se colorearon con azul de algodón, cubriéndose con laminilla cubreobjeto para observarse bajo microscopio fotónico (Axiostar Plus, Carl Zeiss, Alemania). El cultivo de la muestra se hizo en medio sólido (agar-Sabouraud) por agotamiento en estría (*zig-zag*), las placas se incubaron por 7-14 días a 26°C y HR>90% en cámara de ambientación (Biotronette® Mark II, modelo 845, Lab Line Instruments, Inc, Illinois, EUA), como ya se indicó anteriormente [3, 7]. A las 24; 48 y 72 horas se estimó el número de conidias germinadas (%). Una vez concluida la incubación, se cuantificó la esporulación (conidias/mL) mediante hemocitómetro [7].

Se llevaron anotaciones diarias del número de animales que sobrevivieron o fallecieron durante la investigación.

Estudio histopatológico

A todos los animales se les realizaron necropsia completa (anatomopatología), detallándose las características externas e internas (órganos y sistemas). Los sacrificios se realizaron (2-3 animales/sexo) en los días 3; 7 y 14 después de la inoculación fúngica, mediante anestesia con éter dietílico, seguida de dislocación cervical. Mediante pinzas y tijeras de disección, se tomaron muestras de tejidos, incluyendo piel, riñones, hígado, bazo, pulmones, tráquea, estómago, intestinos y corazón. A las muestras obtenidas se les hizo estudio micológico (infectividad) directo y cultivo en medio sólido, como ya se describió anteriormente. Para el estudio histopatológico, una sección de las muestras se fijó en formaldehído al 10% y se incluyeron en parafina para hacer cortes histológicos de 5-7µm con microtomo de rotación (Reichert Jung HN-40, Mannheim, Alemania) accionado manualmente. Los cortes se colorearon con hematoxilina – eosina

(H & E) y/o azul de toluidina, y se evaluaron y fotografiaron (Olympus, Fe-120, Olympus Imaging Corp., Japón) bajo un microscopio fotónico (Axiostar Plus, Carl Zeiss, Alemania).

Análisis estadísticos

A los porcentajes de germinación antes de realizar los análisis, se les aplicó una transformación angular o arcoseno ($\text{Sen}^{-1}\sqrt{x}$) de manera tal de homogenizar las varianzas [25]. La significancia estadística de las diferencias entre las medias de los pesos, % de germinación y cantidad de esporulación (conidias/mL) entre los diferentes ensayos, se calculó mediante las pruebas de análisis de Varianza (ANOVA) de una vía y de comparación múltiple Student-Newman-Keusl (SNK) [25]. Los datos se analizaron mediante paquetes estadísticos MINITAB versión 13,20 (Minitab Inc. 2000) [18].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todos los ratones, incluyendo machos y hembras, sobrevivieron durante la realización de los experimentos. La evaluación clínica no reveló cambios o alteraciones en la piel, tales como modificación en la coloración, humedad y turgencia, presencia de edema, eritema, inflamación, necrosis, dermatitis de contacto y/o alérgica, entre otros, siendo por lo tanto el índice de irritación dérmica de 0 con 100% de normalidad. Al cabo de los 14 días de observaciones, en la región dérmica depilada expuesta, el pelo creció normalmente. En el 100% de los casos, no se observaron cambios o alteraciones patológicas de síntomas clínicos discernibles en ojos y/o mucosas, en los sistemas respiratorio, circulatorio, nervioso central y autonómico, en la actividad somato-motora de los animales, tanto en los expuestos a la acción fúngica como los controles no expuestos, así como tampoco en su comportamiento, el cual se observó normal para la especie al conservar sus hábitos y características [26], siendo en todos los casos de tipo activo-normal.

El peso promedio corporal en ambos sexos, tanto en los animales expuestos a LF14 *B. bassiana* como los controles, se incrementó significativamente durante los 14 días de observación (TABLA I), las diferencias entre sexos tomando en cuenta el total de peso promedio ganado fueron estadísticamente significativas ($F=42,84$; $g.l.=1$; $P<0,00001$). Sin embargo, cuando se observa el análisis comparativo para cada sexo en particular, entre los ratones inoculados y los no expuestos al hongo, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas ($P>0,05$) para esta variable, desde el inicio y al final del periodo de observación (TABLA I).

El estudio micológico (aclaramiento) mediante el examen directo reveló la presencia de conidias sin germinar de LF14 *B. bassiana* a las 24 horas después de la inoculación en todos los machos y hembras expuestos a la acción fúngica. En relación con el cultivo en medio sólido de la muestra de la región rasurada, la misma resultó positiva a la presencia de LF14 *B. bassiana*, similarmente sólo a las 24 horas después

TABLA I
DESARROLLO DEL PESO PROMEDIO CORPORAL (GR.; $\bar{X} \pm D.S.$)* DURANTE 14 DÍAS DE RATONES ALBINOS NMRI
EXPUESTOS POR VÍA DÉRMICA A 1×10^9 CONIDIAS/ML DEL AISLAMIENTO LF14 *Beauveria bassiana*

Tiempo (días)	Grupo - Tratamiento			
	Machos inoculados +	Control+	Hembras inoculadas+	Control+
0	34,0 ± 2,8 ^{A,a}	33,7 ± 2,9 ^{A,a}	30,3 ± 4,2 ^{B,a}	31,0 ± 4,4 ^{B,a}
1	34,0 ± 2,8 ^{A,a}	33,7 ± 2,9 ^{A,a}	30,2 ± 4,3 ^{B,a}	31,1 ± 4,5 ^{B,a}
2	34,4 ± 2,8 ^{A,a}	33,9 ± 3,0 ^{A,a}	30,4 ± 4,3 ^{B,a}	31,3 ± 4,5 ^{B,a}
3	34,7 ± 2,7 ^{A,a}	34,5 ± 2,9 ^{A,a}	31,8 ± 4,3 ^{B,a}	31,6 ± 4,4 ^{B,a}
4	35,1 ± 2,8 ^{A,a}	34,9 ± 2,9 ^{A,a}	32,2 ± 4,0 ^{B,a,c}	31,9 ± 4,3 ^{B,a,c}
5	35,5 ± 2,7 ^{A,a,c}	35,3 ± 2,9 ^{A,a,c}	32,4 ± 3,8 ^{B,a,c}	32,2 ± 4,1 ^{B,a,c}
6	35,9 ± 2,7 ^{A,a,c}	35,7 ± 3,0 ^{A,a,c}	32,6 ± 3,6 ^{B,a,d}	32,5 ± 3,9 ^{B,a,d}
7	36,3 ± 2,9 ^{A,a,d}	36,0 ± 2,9 ^{A,a,d}	32,8 ± 3,5 ^{B,a,d}	32,8 ± 3,6 ^{B,a,d}
8	36,6 ± 2,8 ^{A,a,d}	36,3 ± 3,0 ^{A,a,d}	33,0 ± 3,4 ^{B,a,d}	33,1 ± 3,4 ^{B,a,d}
9	36,9 ± 2,8 ^{A,a,e}	36,7 ± 3,0 ^{A,a,e}	33,3 ± 3,1 ^{B,a,d}	33,5 ± 3,1 ^{B,a,d}
10	37,3 ± 2,7 ^{A,C,a}	37,1 ± 2,8 ^{A,a,e}	33,6 ± 3,0 ^{B,C,a,d}	33,8 ± 2,9 ^{B,C,a,d}
11	37,5 ± 2,1 ^{A,b,c,d,e}	37,4 ± 2,3 ^{A,b,c,d,e}	33,9 ± 2,8 ^{B,C,a,d}	34,1 ± 2,5 ^{B,C,a,d}
12	37,8 ± 1,9 ^{A,C,b,d,e}	37,7 ± 2,2 ^{A,C,b,d,e}	34,2 ± 2,6 ^{B,a,d}	34,3 ± 2,1 ^{B,C,s,d}
13	38,1 ± 1,8 ^{A,b,e}	37,9 ± 1,9 ^{A,b,e}	34,5 ± 2,5 ^{B,b,c,d}	34,7 ± 1,7 ^{B,C,b,c,d}
14	38,5 ± 1,6 ^{A,C,b}	38,1 ± 1,7 ^{A,b}	34,8 ± 2,1 ^{B,b,d}	36,0 ± 1,4 ^{B,C,b,d}
Total	36,3 ± 1,4 ^A	36,1 ± 1,5 ^A	32,8 ± 1,4 ^B	33,1 ± 1,4 ^B

* En el análisis de comparación múltiple (SNK), cuando dos medias posean letras mayúsculas iguales en las filas o minúsculas en las columnas, sus diferencias resultaron estadísticamente no significativas ($P > 0,05$). \bar{X} = media aritmética; D.S.= Desviación Standard. + N= 12.

de la inoculación, obteniéndose tasas promedio de germinación para ambos sexos $\geq 98\%$ ($\bar{X} \pm D.S.$ = 98,8 ± 0,8 en machos; 99,1 ± 0,5, en hembras) a las 24 horas de su incubación, y de esporulación: $\bar{X} \pm D.S.$ = 17,5x10⁵ ± 1,8x10⁴ conidias/mL en machos, y 17,3x10⁵ ± 1,2x10⁴ conidias/mL en hembras, siendo las diferencias entre sexos para ambos parámetros estadísticamente no significativas ($P > 0,05$).

Recuperación de conidias de animales (Infectividad)

Cuando se observa el análisis del estudio de infectividad se aprecia que, el hongo sólo se logró aislar en piel al día 3 de la necropsia, en todos los animales (3/sexo) muestreados, obteniéndose tasas promedio de esporulación de 2,6x10⁵ ± 2,1x10⁴ y 2,5x10⁵ ± 1,7x10⁴ para machos y hembras, respectivamente, no siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$).

Anatomopatología

El examen externo de los cadáveres a través de la inspección y la palpación desde la cabeza hasta la cola, no mostró hallazgos patológicos, tales como alteración en la coloración de piel, palma y planta de las patas, distribución anómala o daño en el pelo, alteración en conjuntivas oculares, abultamientos, depresiones, lesiones, entre otras, en la superficie corporal, no detectándose diferencias entre los tratamientos y los grupos controles no expuestos al hongo. Tras la extirpación de la parrilla costal, se realizó el examen de la cavidad to-

rácica, no evidenciándose alteraciones macroscópicas como adherencias entre las pleuras, derrame pleural o pericárdico, presencia de líquidos, hemorragias o lesiones. El examen de la cavidad abdominal no mostró hallazgos patológicos como adherencias del epiplón, aumento o disminución en el líquido peritoneal, así como cambios en la coloración o presencia de tumoraciones o lesiones, y el diafragma se visualizó en posición, configuración y altura normal. Se estudiaron todos los órganos toraco-abdominales, los cuales se evidenciaron de características macroscópicas normales.

Al realizar el estudio histopatológico de los órganos extraídos durante las necropsias, se constató que en general ninguno de los grupos de tratamiento en estudio presentaron alteraciones estructurales de consideración en los tejidos, cuando se compararon con los grupos controles. De una manera global, no se observaron infiltrados de macrófagos, neutrófilos y eosinófilos como parte de un proceso inflamatorio agudo, así como tampoco conidias germinadas ni evidencias fúngicas o histopatológicas de la multiplicación del aislamiento LF14 (FIG. 1).

Como bien lo señala Toriello [27], antes de ser probados a nivel de campo, los bioplaguicidas deben cumplir con ciertas normas básicas de bioseguridad, que permitan garantizar que los mismos sean seguros para la salud pública y el ambiente.

Las conidias de LF14 *B. bassiana* pudieron recuperarse viables en la piel de los murinos 24h después de su inoculación, revelándose además con los estudios anatómico e histopatológicos que no se presentaron cambios o alteraciones dérmicas dis-

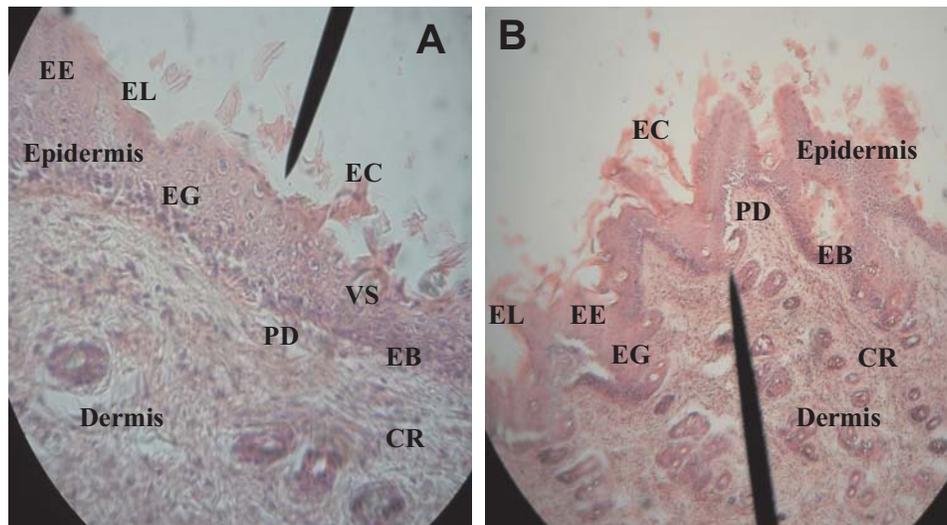


FIGURA 1. CORTES HISTOLÓGICOS DE FRAGMENTOS DE PIEL DE REGIÓN DORSAL DE RATONES ALBINOS: CONTROLES (A), EXPUESTOS AL AISLAMIENTO LF14 *Beauveria bassiana* (B). (H&E; 400X). ABREVIATURAS: CR (CAPA RETICULAR); EB (ESTRATO BASAL); EC (ESTRATO CORNEO); EE (ESTRATO ESPINOSO); EG (ESTRATO GRANULOSO); EL (ESTRATO LUCIDO); PD (PAPILAS DÉRMICAS); VS (VASOS SANGUÍNEOS)./ HISTOLOGICAL SECTIONS OF DORSAL SKIN FRAGMENTS OF WHITE MICE: CONTROLS (A), EXPOSED TO ISOLATE LF14 *Beauveria bassiana* (B). (H&E; 400X). ABBREVIATIONS: CR (RETICULAR LAYER); EB (BASAL LAYER); EC (CORNEAL LAYER); EE (SPINOUS LAYER); EG (GRANULAR LAYER); EL (LÁMINA LÚCIDA); PD (DERMAL PAPILAE); VS (BLOOD VESSELS).

cernibles, ni en ningún otro órgano, tales como: edema, eritema, inflamación, necrosis y/o alopecia, en el cuerpo ni en las extremidades, tampoco se observaron reacciones cutáneas de tipo inmunológico, lo cual sugiere la seguridad a nivel dérmico de este aislamiento fúngico, aún con la aplicación de altas dosis conidiales de 1×10^9 conidias/mL. Similares observaciones se han obtenido con otras cepas de *Beauveria* en modelos vertebrados (e.g., ratones: *M. musculus*, conejos: *Oryctolagus cuniculus*), donde se ha demostrado su bioseguridad sin producirse irritaciones dérmicas [26, 30]. Sin embargo, se debe tener siempre presente que el género *Beauveria* se encuentra entre los hongos oportunistas de capacidad queratinolítica/queratinofílica que pueden destruir la queratina por medios enzimáticos [1], por lo que, aunque muy rara vez, ocasionalmente puede ser verificado como agente causal, entre otras infecciones humanas, de lesiones necróticas en piel y keratitis, propia esta última de la córnea la cual posee al igual que la piel humana, queratina [19, 24, 29]. Dentro de otros factores a determinar para la evaluación de la capacidad infectiva dérmica del aislamiento fúngico LF14, cabe mencionar su capacidad para producir sustancias antibióticas (e.g., penicilinas) que permiten la destrucción de la flora cutánea bacteriana, las cuales actúan como barrera cutánea al producir enzimas contra los antibióticos, facilitándose así la infección micótica. Además, el pH, temperatura, humedad, la presión osmótica, presencia de globulinas, ferritina, quelantes de metales en el suero de los vertebrados, pudieran dificultar o limitar el crecimiento fúngico [16, 20].

Tal como ocurre normalmente con *M. musculus* durante su desarrollo hasta la adultez [22], en todos los animales del presente trabajo, incluyendo los inoculados con LF14 *B. bassiana*, se registró un incremento del peso promedio ganado. Este

hecho sugiere que no se presentó una alteración fisiológica debida directamente por las conidias intactas, el micelio o por sus toxinas (metabolitos secundarios), que pudiera incidir en la reducción del peso corporal de los ratones expuestos, como ocurre con otros hongos tácitamente patógenos, tales como *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (Basidiomycota), que afecta algunos órganos de los ratones lo que a su vez altera el sistema fisiológico de los mismos [26]. Resultados similares a éstos han obtenido otros investigadores al exponer otras cepas de *B. bassiana* y de otras especies de hongos entomopatógenos, tanto en mamíferos [26] como en aves [10], así como también con *Metarhizium anisopliae* y *Paecilomyces fumosoroseus* en ratones [17, 28], y *P. lilacinus* en ratas (*Rattus rattus*) [15], donde los pesos promedio ganados se han incrementado también al final del periodo de observación. Como bien lo indican Tapias y Dussan [26], las diferencias significativas detectadas en los pesos promedio entre ambos sexos es un evento normal y común, debido a que por características fisiológicas y morfológicas los machos murinos (*M. musculus*) tienen un mayor peso corporal que sus congéneres hembras [22].

Cuando se analiza la mayoría de los estudios experimentales, llama la atención que las pruebas dérmicas, así como también las de tipo ocular, se implementan en pocas ocasiones o se les consideran opcionales. Al menos en el presente trabajo se implementó la de tipo dérmico, debido a que el método de aplicación de las suspensiones de hongos entomopatógenos es por medio de aspersiones, lo que genera aerosoles que incrementan las posibilidades de contacto con las conidias y su potencial infección [26]. Además de que se deben seguir las recomendaciones de las Agencias Internacionales *ad hoc* para las evaluaciones de toxicidad/patogenicidad [26, 30].

Cuando se evalúan los riesgos bio-toxicológicos de los microinsecticidas, el Nivel I corresponde a la serie de baterías iniciales de pruebas toxicológicas que consisten en varios bioensayos experimentales donde se evalúa un riesgo máximo del microorganismo a utilizar (e.g., 10-100 veces la cantidad recomendada a nivel de campo). Si el resultado de dichas pruebas es negativo (i.e., ausencia de infectividad o patogenicidad), entonces esto indicaría la escasa probabilidad de que estos microorganismos ocasionen problemas patológicos; reportándose como “escasa probabilidad” debido a que, como se ha venido documentando a lo largo de este trabajo, siempre existirá, aunque muy remotamente, la posibilidad de producir infecciones a cualquier integrante de la Biósfera que sea susceptible o durante su manipulación o uso en labores prácticas de estos bioproductos [12, 23]. En virtud de que no se presentaron efectos adversos de consideración implementando las pruebas dérmicas del nivel I de la US-EPA, no se consideró necesario por lo tanto proceder con otras pruebas de los niveles II, III y IV más elaboradas, como lo son la cuantificación de la toxicidad a través de la dosis letal media (DL₅₀), e infectividad a través de la dosis de efectividad media (DE₅₀) e irritabilidad, además de la realización de otras pruebas agudas adicionales para evaluar el rango de especies *no-diana* y la ruta óptima de exposición, o hasta llegar a las del nivel IV donde se han pruebas directamente en el campo ya sean reales o simuladas [12, 27].

Se puede considerar que al no detectarse conidias germinadas, ni su persistencia, adherencia o multiplicación ni daño de los tejidos, el aislamiento LF14 *B. bassiana* inoculado por la vía dérmica aún a elevadas dosis, no es patógeno ni tóxico para el modelo murino NMRI, siendo por lo tanto segura para el mismo, y esperándose que sea similarmente seguro para todos los integrantes de la Biósfera, incluyendo los seres humanos, especialmente para los trabajadores que realicen la aplicación del producto a nivel de campo en los futuros Programas de MIP de los vectores de la enfermedad de Chagas. Esto se indica a pesar de que en *B. bassiana* se han detectado toxinas (e.g., beauvericina) y otros metabolitos secundarios [21].

Sin embargo, se debe tener cuenta que la manipulación de los hongos entomopatógenos durante su manufacturación, almacenamiento y aplicación en el campo podría exponer a los trabajadores a dosis fúngicas muy elevadas, por lo que se requiere seguir las recomendaciones de seguridad durante los procesos de manufacturación para reducir la exposición y contacto de los humanos con estos agentes fúngicos [8,17]. Por otra parte, a pesar de que se espera que otros aislamientos autóctonos de *B. bassiana*, que se aplican a nivel de control de plagas de interés agropecuario y de la Salud Pública, sean similarmente inocuos para los vertebrados, no obstante, como bien lo señalan Goettel y col. [8], cada cepa/aislamiento debe ser tratado, registrado y probada su patogenicidad/toxicidad basados en un óptica “caso por caso”, toda vez que los hongos pueden presentar una amplia variabilidad intraespecífica.

CONCLUSIONES

La administración por vía dérmica del aislamiento LF14 de *B. bassiana* a dosis de 1x10⁹ conidias/mL no causó alteraciones anatómo o histopatológicas ni de tipo conductuales discernibles en ratones albinos NMRI.

AGRADECIMIENTO

Decanato de Investigaciones de la UNEFM, Coro, estado Falcón, Venezuela.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] CARRILLO, A.; SANTOS, P.; GIUSIANO, G.; EZKURRA, P.; QUINDOS, G. Problemas micológicos en la piel II. Micosis por hongos filamentosos oportunistas. Importancia clínica de las infecciones. 2006. Universidad Nacional del Nordeste, Argentina. En Línea: http://www.unne.edu.ar/med_regional/boletin/2006/micologia_problemasmicologicos.pdf. 12-01-2010.
- [2] CAZORLA, D.; MORALES, P.; SALAS, P.; YÁNEZ, Y.; CASTILLO, C.; ACOSTA, M. Patogenicidad de un aislamiento autóctono de *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) contra *Rhodnius prolixus* y *Triatoma maculata* (Hemiptera: Reduviidae, Triatominae). **XIX Congreso Venezolano de Entomología “Dr. Carlos Pereira Núñez”**. San Felipe, 4 al 7 julio, Venezuela. Pp 138-139. 2005.
- [3] CAZORLA, D.; MORALES, P.; ACOSTA, M. Efectos de gradientes térmicos, salinos y ph sobre la germinación *in vitro* de un aislado nativo de *Beauveria bassiana* (bálsamo) Vuillemin, patógeno para *Rhodnius prolixus* y *Triatoma maculata*. **Rev. Científ. FCV-LUZ**. XVII (6): 627-631. 2007.
- [4] COOK, R.; BRUCKART, W.; COULSON, J.; GOETTEL, M.; HUMBER, R.; LUMSDEN, R.; MADDOX, J.; McMANNUS, M.; MOORE, L.; MEYER, S.; QUIMBY, P.; STACK, J.; VAUGHN, J. Safety of microorganism interided for pest and plant disease control: a framework for scientific evaluation. **Biol. Contr.** 7: 333- 351. 1996.
- [5] FONDO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (FONACIT). Normas para la utilización de animales en investigación: en experimentación en el laboratorio, obtenidos en sus hábitats, estudios de sus patologías y de su comportamiento natural. 2008. Comisión de Bioética CONICIT. Código de Bioética y Bioseguridad. En línea: <http://www.fonacit.gov.ve/documentos/bioetica2009>. 14-03-2009.
- [6] FROMTLING, R.; KOSANKE, S.; JENSEN, J.; BULMER, G. Fatal *Beauveria bassiana* infection in a captive American alligator. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 175: 934-936. 1979.
- [7] GOETTEL, M.; INGLIS, G. Fungi: Hyphomycetes. In: Lacey, L. (Ed). **Manual of techniques in insect pathology**.

- ogy. Academic Press. San Diego, California, USA. Pp 213-249. 1997.
- [8] GOETTEL, M.; HAJEK, A.; SIEGEL, J.; EVANS, H. Safety of Fungal Biocontrol Agents. In: Butt, T., Jackson, C. Magan N. (Eds). **Fungi as Biocontrol Agents**. CAB International. United Kingdom. Pp 347-375. 2001.
- [9] GONZÁLEZ, C.; ESPEJO, S.; BARCENA, A. Mycotic pulmonary disease by *Beauveria bassiana* in a captive tortoise. **Mycoses**. 38: 167-169. 1995.
- [10] HAAS-COSTA, J.; ALVES, L.; DAROS, A. Safety of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. To *Gallus domesticus* L. **Braz. Arch. Biol. Technol.** 53: 465-471. 2010.
- [11] HENKE, M.; DE HOOG, G.; GROSS, U.; ZIMMERMANN, G.; KRAEMER, D.; WEIG, M. Human deep tissue infection with an entomopathogenic *Beauveria* species. **J. Clin. Microbiol.** 40: 2698-2702. 2002.
- [12] JARONSKI, S.; GOETTEL, M.; LOMER, C. Regulatory requirements for ecotoxicological assessments of microbial insecticides- How relevant are they? In: Hokkanen, H., Hajek, A. (Eds). **Environmental Impacts of Microbial Insecticides**. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. Pp 237-260. 2003.
- [13] LARDEUX, F.; DEPICKÈRE, S.; DUCHON, S.; CHÁVEZ, T. Insecticide resistance of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) vector of Chagas disease in Bolivia. **Trop. Med. Inter. Health.** 15: 1037-1048. 2010.
- [14] LUZ, C.; ROCHA, L.; NERY, G.; MAGALHAES, B.; TIGANO, M. Activity of oil-formulated *Beauveria bassiana* against *Triatoma sordida* in peridomestic areas in Central Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 99: 211-218. 2004.
- [15] MANCEBO, A.; GONZÁLEZ, F.; GONZÁLEZ, B.; RIERA, L.; LUGO, S.; BADA, A. Evaluación de la patogenicidad en ratas del *Paecilomyces lilacinus* LPL-01 utilizando vías diferentes de exposición. **Rev. Toxicol.** 22: 185-190. 2005.
- [16] MIER, T.; RIVERA, F.; RODRÍGUEZ, M.; CARRILLO, J.; TORIELLO, C. Infectividad del hongo entomopatógeno *Verticillium lecanii* en ratones y cobayos. **Rev. Latinoam. Microbiol.** 36: 107-111. 1994.
- [17] MIER, T.; OLIVARES-REDONDA, G.; NAVARRO-BARRANCO, H.; PÉREZ-MEJÍA, A.; MARTE-LORENZANA, M.; PÉREZ-TORRES, A.; TORIELLO, C. Acute oral intragastric pathogenicity and toxicity in mice of *Paecilomyces fumosoroseus* isolated from whiteflies. **Antonie Van Leeuwenhoek.** 88: 103-111. 2005.
- [18] MINITAB. MINITAB User's Guide, version 13.20. 2000. MINITAB Ltd, UK. On line: <http://www.minitab.com/en-US/default.aspx>. 07-09-2011.
- [19] PARISEAU, B.; NEHLS, S.; OGAWA, G.; SUTTON, D.; WICKES, B.; ROMANELLI, A. *Beauveria* keratitis and biopesticides: case histories and a random amplification of polymorphic DNA comparison. **Cornea.** 29: 152-158. 2010.
- [20] PARRA DE C. V. Lesiones elementales. En: Driban, N., Parra de Cantú, V., Bassotti de Ahuad, A. (Eds). **Dermatología semiología sistematizada**. EDIUNC, Mendoza, Argentina. 66-70 Pp. 2007.
- [21] PUCHETA, M.; FLORES, A.; RODRÍGUEZ, S.; DE LA TORRE, M. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. **Intercien.** 31: 856-860. 2006.
- [22] QUESADA-DOMÍNGUEZ, A. Biología de los animales de laboratorio. En: **Introducción al manejo de los animales de laboratorio: roedores y pequeñas especies**. Ediciones de la Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México. Pp 53-72. 1997.
- [23] SIEGEL, J. Testing the pathogenicity and infectivity of entomopathogens to mammals. In: Lacey, L. (Ed.). **Manual of techniques in insect pathology**. Academic Press. San Diego, California, USA. Pp 213-249. 1997.
- [24] SMITH, F. The Molecular Genetics of Keratin Disorders. **Am. J. Clin. Dermatol.** 4: 347-364. 2003.
- [25] STEEL, R.; TORRIE, J. Análisis de la varianza II: clasificaciones múltiples. 9. En: **Bioestadística: Principios y procedimientos**. 2^{da} Ed. McGraw-Hill. D.F., México. Pp. 188-230. 1989.
- [26] TAPIAS, S.; DUSSÁN, J. Evaluación del grado de seguridad del hongo *Beauveria bassiana* utilizado para el control biológico de insectos plaga. **Actual. Biol.** 22: 17-27. 2000.
- [27] TORIELLO, C. Bioseguridad de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin (Hyphomycete). **Vedalia.** 9-10: 107-113. 2003.
- [28] TORIELLO, C.; PÉREZ-TORRES, A.; BURCIAGA-DÍAZ, A.; NAVARRO-BARRANCO, H.; PÉREZ-MEJÍA, A.; LORENZANA-JIMÉNEZ, M.; MIER, T. Lack of acute pathogenicity and toxicity in mice of an isolate of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* from spittlebugs. **Eco-toxicol. Environ. Saf.** 65: 278-287. 2006.
- [29] TUCKER, D.; BERESFORD, C.; SIGLER, L.; ROGER, K. Disseminated *Beauveria bassiana* infection in a patient with acute lymphoblastic leukemia. **J. Clin. Microbiol.** 42: 5412-5114. 2004.
- [30] UNITED STATE ENVIROMENTAL PROTECTION AGENCY (US-EPA). Microbial Pesticide test guidelines. 1996. OPPTS 885.5000. Background for Microbial Pesticides Testing. On Line: <http://www.nepis.epa.gov/Exe/ZyPURL.cgi?> 22-09-2009.
- [31] ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. **Biocontr Sci. Technol.** 17: 553-596. 2007.